

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580037521.3

[51] Int. Cl.

A61K 31/415 (2006.01)
A61K 31/416 (2006.01)
A61K 31/4162 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 21 日

[11] 公开号 CN 101076331A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 43/00 (2006.01)

[22] 申请日 2005.11.1

[21] 申请号 200580037521.3

[30] 优先权

[32] 2004.11.5 [33] US [31] 60/625,536

[86] 国际申请 PCT/US2005/039560 2005.11.1

[87] 国际公布 WO2006/052569 英 2006.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2007.4.29

[71] 申请人 艾尼纳制药公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 多米尼克·P·贝汉

丹尼尔·T·康诺利

杰里米·里奇曼

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司

代理人 王允方 刘国伟

权利要求书 5 页 说明书 75 页 序列表 4 页

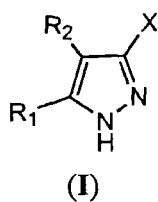
[54] 发明名称

包含烟酸受体部分促效剂的用于治疗发红和
脂质相关病症的组合物

[57] 摘要

本发明提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂。另外，本发明提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂和改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。本发明进一步提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂且随后向所述个体投与改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。

1. 一种降低个体由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂。
2. 根据权利要求1所述的方法，其中所述发红由烟酸诱发。
3. 根据权利要求1所述的方法，其中所述发红由烟酸类似物诱发。
4. 根据权利要求1所述的方法，其中所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物。
5. 根据权利要求1所述的方法，其中所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。
6. 根据权利要求1所述的方法，其中所述烟酸受体部分促效剂包含式(I)：



或其医药学上可接受的盐，

其中：

X 为羧基或四唑-5-基；

R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及

R₂ 为 H；

或

R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环或视需要经甲基取代的 5 元杂环。

7. 根据权利要求6所述的烟酸受体部分促效剂，其中所述烟酸受体部分促效剂包含选自以下各物组成的群组的化合物：

3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑；

5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸；

5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸；

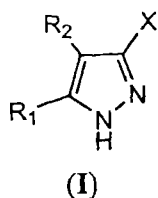
5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸；

6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑；

3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑；

3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑；
 3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑；
 3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑；
 5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑；以及
 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑；
 或其医药学上可接受的盐。

8. 一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂和改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。
9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述发红由烟酸诱发。
10. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述发红由烟酸类似物诱发。
11. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物。
12. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。
13. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。
14. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I)：



或其医药学上可接受的盐，

其中：

X 为羧基或四唑-5-基；

R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；和

R₂ 为 H；

或

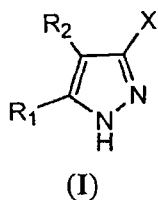
R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环或视需要经甲基取代的 5 元杂环。

15. 根据权利要求 14 所述的烟酸受体部分促效剂，其中所述烟酸受体部分促效剂包含

选自由以下各物组成的群组的化合物：

3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑；
 5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸；
 5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸；
 5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸；
 6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑；
 3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑；
 3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑；
 3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑；
 3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑；
 5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑；以及
 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑；
 或其医药学上可接受的盐。

16. 一种预防或治疗个体体内脂质相关病症的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂和改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。
17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述发红由烟酸诱发。
18. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述发红由烟酸类似物诱发。
19. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物。
20. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。
21. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。
22. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I)：



或其医药学上可接受的盐，

其中：

X 为羧基或四唑-5-基；

R_1 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及

R_2 为 H；

或

R_1 和 R_2 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环或视需要经甲基取代的 5 元杂环。

23. 根据权利要求 22 所述的烟酸受体部分促效剂，其中所述烟酸受体部分促效剂包含选自以下各物组成的群组的化合物：

3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑；

5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸；

5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸；

5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸；

6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑；

3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑；

3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑；

3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑；

3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑；

5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑；以及

5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑；

或其医药学上可接受的盐。

24. 根据权利要求 16 所述的方法，所述方法进一步包含向所述个体投与至少一种选自以下各物组成的群组的药剂： α -葡糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

25. 一种投与改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物的具有降低引起个体体内发红反应能力的组合物，其包含

(a) 改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物，和

(b) 降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂。

26. 一种预防或治疗脂质相关病症的试剂盒，其包含至少一个剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个剂量单位的烟酸或烟酸类似物，其中所述烟酸受体部分促效剂所存在的量为降低所述个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的有效量且其中所

述烟酸或烟酸类似物所存在的量为改变脂质的量。

27. 一种预防或治疗脂质相关病症的试剂盒，其包含至少一个剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个分离剂量单位的烟酸或烟酸类似物，其中所述烟酸受体部分促效剂所存在的量为降低所述个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的有效量且其中所述烟酸或烟酸类似物所存在的量为改变脂质的量。
28. 一种预防或治疗脂质相关病症的试剂盒，其包含至少一个预剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个分离剂量单位的烟酸或烟酸类似物，其中所述烟酸受体部分促效剂所存在的量为降低所述个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的有效量且其中所述烟酸或烟酸类似物所存在的量为改变脂质的量。

包含烟酸受体部分促效剂的用于治疗发红和脂质相关病症的组合物 技术领域

本发明通常涉及诸如动脉粥样硬化的脂质相关病症的治疗，且更具体来说涉及用于预防由烟酸治疗诱发的发红的组合物和方法。

背景技术

动脉粥样硬化为脂肪物质、胆固醇和其他物质沉积在动脉内膜积聚的过程。所述积聚称为斑块。破裂的斑块致使形成可阻塞血液流向心脏（心脏病发作）或脑（中风）的血块。心脏病发作为美国男性与女性的第一死亡原因且中风为第三死亡原因。[例如参见 *Nature Medicine, Special Focus on Atherosclerosis*, (2002) 8:1209-1262]。异常高水平的循环脂质为发展动脉粥样硬化的主要诱病因素。低密度脂蛋白（LDL）胆固醇水平升高、三酸甘油酯水平升高或高密度脂蛋白（HDL）胆固醇水平降低独立地为动脉粥样硬化和相关病理的致病因素。

烟酸（尼克酸（nicotinic acid）、吡啶-3-甲酸、维生素 B3）为人体健康、发育和繁殖所需的水溶性维生素。烟酸也为最早用于治疗脂质相关病症的药物之一。因为其有利影响实质上所有以上所列的脂质参数，所以其为有价值的药物。[*Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, 编者 Harmon JG and Limbird LE, 第 36 章, Mahley RW and Bersot TP (2001) 第 971-1002 页]。烟酸在治疗或预防动脉粥样硬化心血管疾病中的益处已在 6 个主要临床试验中得以证明。[*Guyton JR (1998) Am J Cardiol* 82:18U-23U]。烟酸的类似物或衍生物的结构和合成已在整个 *Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 第 10 版(1983)中加以讨论。

令人遗憾地，改变血清脂质含量所需的烟酸剂量相当大且在所述剂量下时常发生不良副作用。副作用可包括胃肠紊乱、肝毒性和葡萄糖代谢和尿酸水平的破坏。然而，烟酸治疗的最常见和突出副作用为剧烈发红，通常伴随皮肤瘙痒、发麻和暖和感。虽然发红反应通常无害，但其十分令人不愉快，患者顺应性显著降低。30-40%的患者通常在开始治疗后数天内停止采用烟酸治疗。

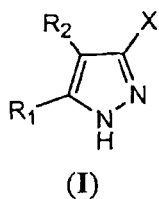
已努力开发使皮肤发红反应最小化同时维持治疗功效的烟酸类似物、剂型和治疗方案。然而，迄今为止，所述努力已产生仅仅部分降低皮肤发红反应的化合物或方法。另外，所述化合物或方法可产生其他副作用。举例来说，在投与烟酸之前，可投与诸如阿

司匹林（aspirin）的化合物以试图降低发红。然而，阿司匹林至多仅使一些患者的发红部分降低，且阿司匹林的胃肠副作用限制其使用。另外，已开发据报道具有较低发红发生率的烟酸缓释配方。然而，已展示所述缓释配方产生比发红更严重的副作用——肝毒性。

因此，对安全降低或消除由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的化合物和方法存在需要。本发明满足所述需要且同时具备相关优点。

发明内容

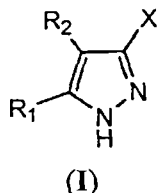
本发明提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂。在一个实施例中，所述发红由烟酸诱发，且在另一个实施例中，所述发红由烟酸类似物诱发。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式（I）化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-咪唑并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噁吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-咪唑并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。

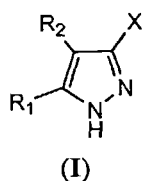
另外，本发明进一步提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂和改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。在一个实施例中，所述发红由烟酸诱发，且在另一个实施例中，

所述发红由烟酸类似物诱发。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。

另外，本发明提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂且随后向所述个体投与改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。在一个实施例中，所述发红由烟酸诱发，且在另一个实施例中，所述发红由烟酸类似物诱发。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。

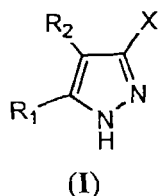
另外，本发明也提供一种预防或治疗个体体内脂质相关病症的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂和改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。在一个实施例中，所述发红由烟酸诱发，且在另一个实施例中，所述发红由烟酸类似物诱发。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-

四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-咪唑并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述方法进一步包含向所述个体投与至少一种选自由以下各物组成的群组的药剂： α -葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

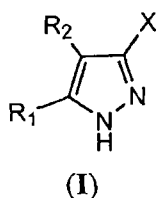
本发明进一步提供一种预防或治疗个体体内脂质相关病症的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂且随后向所述个体投与改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。在一个实施例中，所述发红由烟酸诱发，且在另一个实施例中，所述发红由烟酸类似物诱发。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-咪唑并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-咪唑并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述方法进一步包含向所述个体投与至少一种选自由以下各物组成的群组的药剂： α -葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管

紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

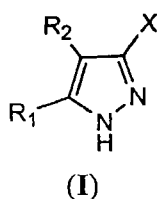
另外，本发明提供一种用于投与改变脂质有效量的具有降低引起个体体内发红反应能力的烟酸或烟酸类似物的组合物，所述组合物包含（a）改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物和（b）降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂。在一个实施例中，所述组合物包含改变脂质有效量的烟酸，且在另一个实施例中，所述组合物包含改变脂质有效量的烟酸类似物。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式（I）化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述组合物进一步包含至少一种选自由以下各物组成的群组的药剂： α -葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

本发明也提供一种预防或治疗脂质相关病症的试剂盒，所述试剂盒包含至少一个剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个剂量单位的烟酸或烟酸类似物，其中所述烟酸受体部分促效剂所存在的量为降低所述个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的有效

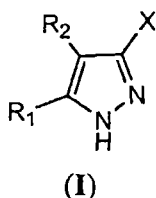
量且其中所述烟酸或烟酸类似物所存在的量为改变脂质的量。在一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸，且在另一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸类似物。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，烟酸或烟酸类似物的所述剂量单位为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述试剂盒进一步包含至少一种选自由以下各物组成的群组的药剂：α-葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

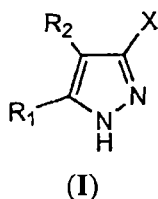
本发明进一步提供一种预防或治疗脂质相关病症的试剂盒，所述试剂盒包含至少一个剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个分离剂量单位的烟酸或烟酸类似物，其中所述烟酸受体部分促效剂所存在的量为降低所述个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的有效量且其中所述烟酸或烟酸类似物所存在的量为改变脂质的量。在一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸，且在另一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸类似物。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例

中, 所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中, 烟酸或烟酸类似物的所述剂量单位为每天至少 500 毫克。在一个实施例中, 所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物:



或其医药学上可接受的盐, 其中: X 为羧基或四唑-5-基; R_1 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基; 及 R_2 为 H; 或 R_1 和 R_2 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环, 或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说, 所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物: 3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑, 或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中, 所述试剂盒进一步包含至少一种选自由以下各物组成的群组的药剂: α -葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

另外, 本发明提供一种预防或治疗脂质相关病症的试剂盒, 所述试剂盒包含至少一个预剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个分离剂量单位的烟酸或烟酸类似物, 其中所述烟酸受体部分促效剂所存在的量为降低所述个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的有效量且其中所述烟酸或烟酸类似物所存在的量为改变脂质的量。在一个实施例中, 所述试剂盒包含剂量单位的烟酸, 且在另一个实施例中, 所述试剂盒包含剂量单位的烟酸类似物。在一个实施例中, 所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物, 且在另一个实施例中, 所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中, 烟酸或烟酸类似物的所述剂量单位为每天至少 500 毫克。在一个实施例中, 所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物:



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述试剂盒进一步包含至少一种选自由以下各物组成的群组的药剂：α-葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

附图说明

无

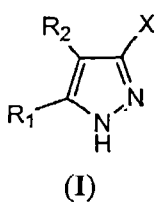
具体实施方式

申请者已发现烟酸受体部分促效剂可有效降低由烟酸或烟酸类似物诱发的发红。如本文所揭露，向小鼠投与烟酸受体部分促效剂会有效降低由烟酸诱发的发红（参见实例 1 和 2）。如由投与 PGD₂ 所示，所述小鼠仍具有发红的能力（参见实例 2）。另外，如本文所揭露，降低发红的烟酸受体部分促效剂并不会干扰烟酸诱发的游离脂肪酸释放的降低（参见实例 3）。

虽然烟酸用作脂质相关病症的治疗已达数年之久，但烟酸起作用所经由的受体直到最近才知道。最初，提出烟酸可能经由特异性 GPCR 起作用（Lorenzen A, 等人, (2001) *Molecular Pharmacology* 59:349-357）。最终，称为 HM74a 的已知孤儿 GPCR 被鉴别为尼

克酸受体（例如参见美国专利申请第 10/314,048 号）。人类烟酸受体的核苷酸序列可见于基因库入藏登记号第 NM_177551 号和本文的 SEQ ID NO.1。

本发明提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂。在一个实施例中，所述发红由烟酸诱发，且在另一个实施例中，所述发红由烟酸类似物诱发。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，发红完全降低或清除。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。

通常，发红可由数种原因引起，例如，发红可由社会压力或焦虑、激素变化、热或屏住呼吸所诱发，所有原因可导致面部瞬时发红。本专利申请涉及由烟酸或烟酸类似物诱发的发红。

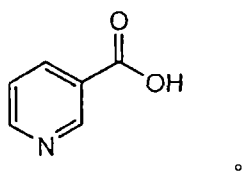
如本文所使用，术语“由烟酸或烟酸类似物诱发的发红”意谓因投与足够剂量的烟酸或烟酸类似物引起的可检测的皮肤发红反应。发红反应的特征在于皮肤发红且也可包括其他症状，例如皮肤瘙痒、发麻、暖和的感觉或头痛。发红反应可在皮肤的任何部位出现，例如脸部、颈部或躯体，且可在一个部位或一个以上部位出现。对人类来说，发

红反应可持续数分钟到数小时。一般来说，对于人类，因口服足够剂量的烟酸或烟酸类似物引起的发红反应通常可持续 20 分钟到 8 小时或更长的任何时间。对小鼠或大鼠来说，发红反应通常在投与（注射）烟酸后约 3 分钟时达到顶峰且在约 30 分钟后显著减退。

在本发明的任一个实施例中，当烟酸或烟酸类似物诱发发红时，其所存在的量为足以引起可检测发红的剂量。产生可检测发红反应所需的烟酸或烟酸类似物的量取决于数个变量，例如化合物的配方和个体个体。具体来说，产生可检测发红反应所需的烟酸或烟酸类似物的量可取决于（例如）个体的体重、个体的遗传组成或个体的一般健康。可引起人类发红反应的烟酸或烟酸类似物的量可低于降低动脉粥样硬化相关血清脂质的量所需的量且可包括（例如）每天至少 175 毫克、每天至少 200 毫克、每天至少 250 毫克、每天至少 500 毫克、每天至少 750 毫克、每天至少 1 克、每天至少 1.5 克、每天至少 2 克、每天至少 2.5 克、每天至少 3 克、每天至少 3.5 克、每天至少 4 克、每天至少 4.5 克、每天至少 5 克、每天至少 5.5 克、每天至少 6 克、每天至少 6.5 克、每天至少 7 克、每天至少 7.5 克、每天至少 8 克、每天至少 8.5 克、每天至少 9 克或更多。举例来说，每天 500 毫克到 2 克的烟酸可使大多数人出现发红反应。

如本文所使用的“个体”意谓任何动物，包括哺乳动物，例如，小鼠、大鼠、其他啮齿动物、兔、狗、猫、猪、牛、羊、马或灵长类动物（例如人类）。在一个实施例中，个体为人类。

如本文所使用，“烟酸”意谓具有下列化学式的尼克酸：



如所属领域的技术人员所理解，烟酸可与其他化合物配制以改变其药理学性质。举例来说，取决于添加到烟酸中的其他化合物，烟酸可配制为速释（IR）型或缓释（SR）型。在一个实施例中，烟酸为 IR 型。在一个实施例中，烟酸不为一天一次单个剂量的缓释型烟酸。

缓释配方设计为自锭剂或胶囊缓慢释放活性成分，与常规或快速剂型相关的典型给药频率相比，此使得给药频率降低。设计慢药物释放以降低且延长血液药物水平，且因此最小化或减轻与常规或速释烟酸产品相关的发红副作用。然而，对具有脂质相关病症

的患者的研究已证明一些缓释产品并不具有与速释烟酸相同的有利脂质改变效应，且实际上与速释产品相比，具有更糟的副作用概况。举例来说，已知缓释烟酸配方会引起更高的肝毒性发生率，如以下参考文献所述：Henken 等人：Am J Med, 91:1991 (1991)及 Dalton 等人：Am J Med, 93: 102 (1992)。已开发烟酸的缓释配方，诸如 Nicobid.RTM.胶囊 (Rhone-Poulenc Rorer)、Endur-acin.RTM. (Innovite Corporation) 及美国专利第 5,126,145 号和第 5,268,181 号所述的配方，所述专利描述含有两种不同类型的羟丙基甲基纤维素和疏水性组分的缓释烟酸配方。

如本文所使用，“烟酸类似物”意谓结构上或功能上与烟酸有关但与烟酸不同的化合物。举例来说，烟酸类似物可在结构上与烟酸有关。此项技术已知数种烟酸结构类似物且实例描述于本文中。在一些实施例中，烟酸结构类似物含有至少一个酸性官能团，诸如羧基、四唑基和其类似基团。在一些实施例中，烟酸结构类似物含有至少一个氮环原子，诸如吡啶基、吡唑基、异噁唑基和其类似基团中所存在的氮。在一些实施例中，烟酸结构类似物含有至少一个酸性官能团和至少一个氮环原子。所述基团包括在活体内（例如）在血液中由水解转化产生酸性官能团或环氮的前药基团。透彻讨论提供于下列参考文献中：T. Higuchi 和 V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," the A.C.S. Symposium Series 第 14 卷和 "Bioreversible Carriers in Drug Design," 编者 Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987，两者皆以引用的方式并入本文中。

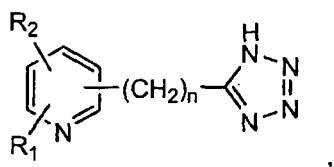
烟酸类似物可在功能上与烟酸有关，例如，烟酸类似物可具有烟酸的诸如与烟酸受体特异性结合或对烟酸受体处的结合作出反应启动细胞内信号的功能。举例来说，在本发明之任一实施例中，烟酸类似物可为烟酸受体促效剂。烟酸类似物可为烟酸的结构或功能类似物，或烟酸类似物可为烟酸的结构与功能类似物。

数种烟酸的类似物或衍生物为此项技术所已知且其可见于（例如）：Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 第 10 版 (1983)。烟酸类似物可包括（例如）烟醇酒石酸酯、d-葡萄糖醇六烟酸肌醇酯、烟酸铝、烟酸戊四醇酯、d,1- α -生育酚烟酸酯、6-OH-尼克酸、nicotinic acid、尼克酰胺、尼克酰胺-N-氧化物、6-OH-尼克酰胺、NAD、N-甲基-2-吡啶-8-甲酰胺、N-甲基-尼克酰胺、N-核糖基-2-吡啶酮-5-羧基化物、N-甲基-4-吡啶酮-5-甲酰胺、bradiliane、山梨糖醇酯、hexanicite、sorbitol 以及尼克酸的低级醇酯。如上所述，烟酸、烟酸类似物可以不同方式配制以改变其药理学性质。

如上所述，烟酸类似物包括烟酸受体促效剂（不为烟酸）。数种烟酸受体促效剂为此

项技术所已知且其可见于(例如): Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 第10版(1983)。烟酸促效剂的特定实例,在本文中视为烟酸类似物,列于如下实施例中和下列专利申请中: 60/418,057 和 60/478,664, 其整体内容并入本文中。

在一些实施例中,本发明的烟酸类似物具有如下化学式:



其中:

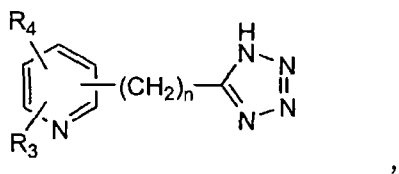
R_1 是选自由以下各基组成的群组: 卤素、羟基、乙酰氨基、氨基、烷氧基、烷氧羰基、烷基硫基、单烷基氨基、二烷基氨基、N-烷基氨基甲酰基、N,N-二烷基氨基甲酰基、烷基磺酰基, 所述烷基含有1到4个碳; 三氟甲基、三氟甲氧基、三氟甲基硫基、甲氧基甲基、羧基、氨基甲酰基、含有至多4个碳原子的烷酰基氧基、苯基、对氯苯基、对甲基苯基以及对氨基苯基;

R_2 是选自由以下各基组成的群组: 卤素、含有1-4个碳原子的烷酰基氧基、含有2到5个碳原子的烷氧羰基、氨基甲酰基、N-烷基氨基甲酰基以及N,N-二烷基氨基甲酰基, 其中所述烷基含有1-4个碳原子; 以及三氟甲基; 及

n 为0到4的整数; 或

其N-氧化物。

在一些实施例中,本发明的烟酸类似物具有如下化学式:



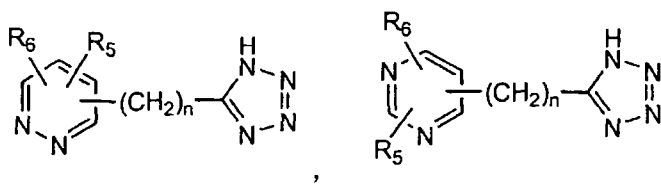
其中:

R_3 和 R_4 为氢、含有1到4个碳原子的烷基或含有3到7个碳原子的环烷基; 及

n 为0到4的整数; 或

其N-氧化物。

在一些实施例中，本发明的烟酸类似物具有以下化学式：



或

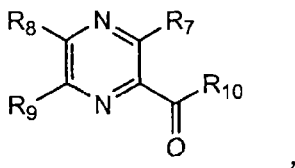
其中：

R_5 和 R_6 各自选自以下各基组成的群组：H、卤素、羟基、氨基、烷氧基、烷基硫基、单烷基氨基、二烷基氨基、N-烷基氨基甲酰基、N,N-二烷基氨基甲酰基、烷基硫氧基、烷基磺酰基，所述烷基含有 1 到 4 个碳；三氟甲基、三氟甲氧基、三氟甲基硫基、羧基、氨基甲酰基、含有至多 4 个碳原子的烷酰基氧基、苯基、对氯苯基、对甲基苯基以及对氨基苯基；及

n 为 0 到 4 的整数；或

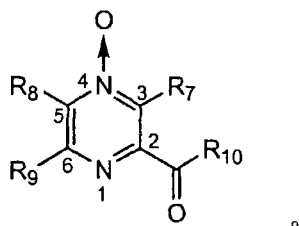
其 N-氧化物。

在一些实施例中，本发明的烟酸类似物具有如下化学式：

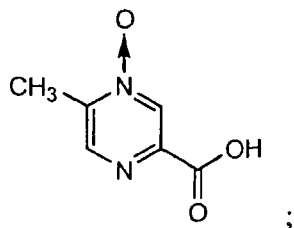


其中：

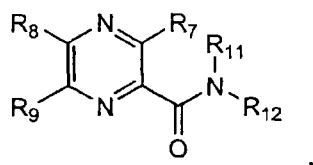
R_7 、 R_8 及 R_9 中的至少一个为 C_{1-6} 烷基且其余为氢原子； R_{10} 为羟基或 C_{1-6} 烷氧基；或当 R_{10} 为羟基时，为所述化合物与医药学上可接受的碱形成的盐，或其 4-N-氧化物。N-氧化物的位置由下列编号方式指定且 4-N-氧化物的结构具有如下结构：



一种特定 4-N-氧化物为 5-甲基吡嗪-2-甲酸-4-氧化物 (Acipimox™) 且具有如下结构:



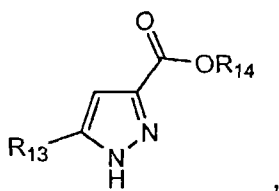
在一些实施例中, 本发明的烟酸类似物具有如下化学式:



其中:

R₇、R₈ 以及 R₉ 中的至少一个为 C₁₋₆ 烷基且其余为氢原子; 及可相同或不同的 R₁₁ 和 R₁₂ 各为氢或 C₁₋₆ 烷基; 或其 4-N-氧化物; N-氧化物的位置与上文所述相同;

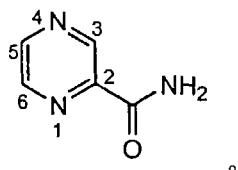
在一些实施例中, 本发明的烟酸类似物具有如下化学式:



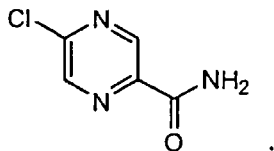
其中:

至少一个 R₁₃ 表示具有 7-11 个碳原子的烷基且 R₁₄ 表示 H 或具有至多两个碳原子的低级烷基, 以及医药学上可接受的载剂;

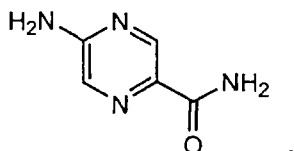
在一些实施例中, 本发明的烟酸类似物为吡嗪-2-甲酸酰胺且具有如下结构:



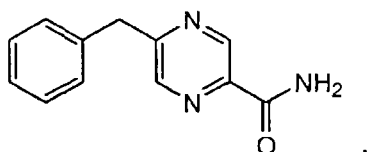
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-氯-吡嗪-2-甲酸酰胺且具有如下结构：



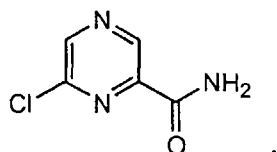
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-氨基-吡嗪-2-甲酸酰胺且具有如下结构：



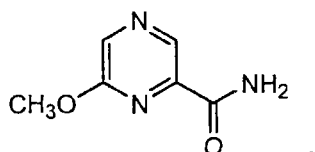
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-苄基-吡嗪-2-甲酸酰胺且具有如下结构：



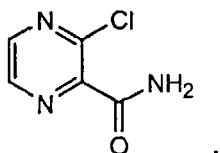
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 6-氯-吡嗪-2-甲酸酰胺且具有如下结构：



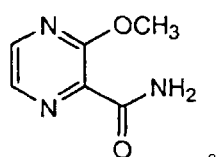
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 6-甲氧基-吡嗪-2-甲酸酰胺且具有如下结构：



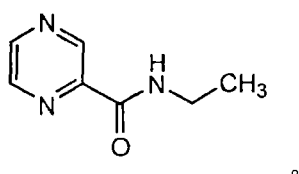
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 3-氯-吡嗪-2-甲酸酰胺且具有如下结构：



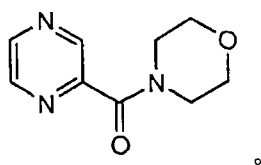
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 3-甲氧基-吡嗪-2-甲酸酰胺且具有如下结构：



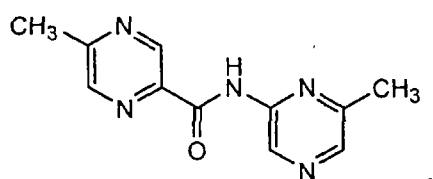
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为吡嗪-2-甲酸乙酰胺且具有如下结构：



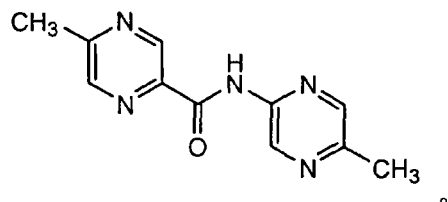
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为吗啉-4-基-吡嗪-2-基甲酮且具有如下结构：



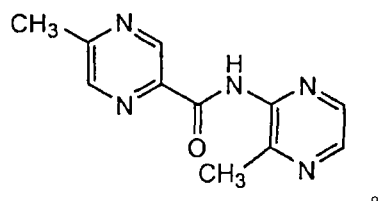
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-甲基-吡嗪-2-甲酸(6-甲基-吡嗪-2-基)-酰胺且具有如下结构：



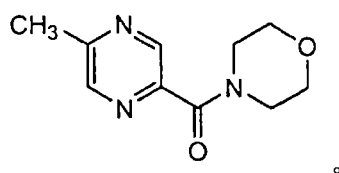
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-甲基-吡嗪-2-甲酸(5-甲基-吡嗪-2-基)-酰胺且具有如下结构：



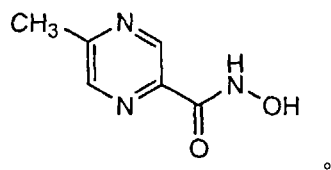
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-甲基-吡嗪-2-甲酸(3-甲基-吡嗪-2-基)-酰胺且具有如下结构：



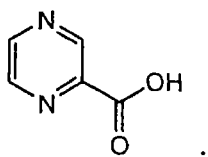
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为(5-甲基-吡嗪-2-基)-吗啉-4-基-甲酮且具有如下结构：



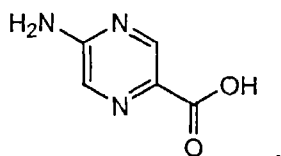
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-甲基-吡嗪-2-甲酸羟酰胺且具有如下结构：



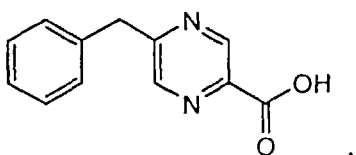
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为吡嗪-2-甲酸且具有如下结构：



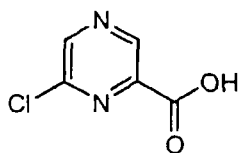
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-氨基-吡嗪-2-甲酸且具有如下结构：



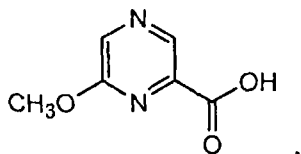
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-苄基-吡嗪-2-甲酸且具有如下结构：



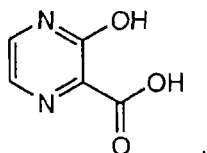
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 6-氯-吡嗪-2-甲酸且具有如下结构：



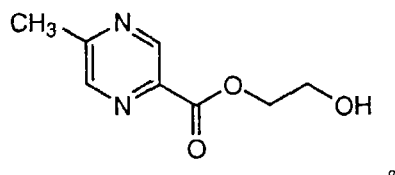
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 6-甲氧基-吡嗪-2-甲酸且具有如下结构：



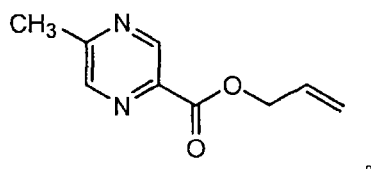
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 3-羟基-吡嗪-2-甲酸且具有如下结构：



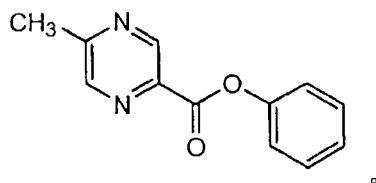
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-甲基-吡嗪-2-甲酸 2-羟基-乙酯且具有如下结构：



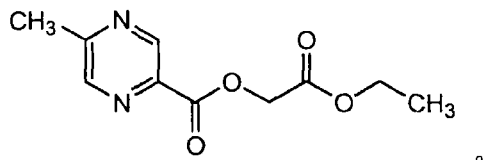
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-甲基-吡嗪-2-甲酸烯丙酯且具有如下结构：



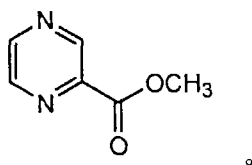
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-甲基-吡嗪-2-甲酸苯酯且具有如下结构：



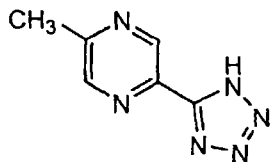
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-甲基-吡嗪-2-甲酸乙氧基羰基甲酯且具有如下结构：



在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为吡嗪-2-甲酸甲酯且具有如下结构：

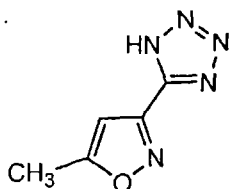


在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 2-甲基-5-(1H-四唑-5-基)-吡嗪且具有如下结构：

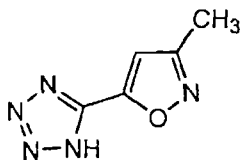


或上文所述的其 4-N-氧化物。

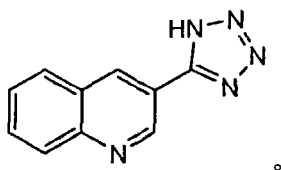
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-(5-甲基-异噁唑-3-基)-1H-四唑且具有如下结构：



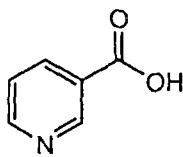
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-(3-甲基-异噁唑-5-基)-1H-四唑且具有如下结构：



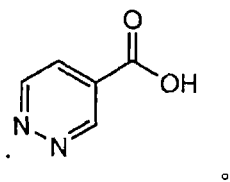
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-(3-喹啉基)四唑且具有如下结构：



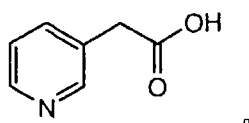
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为尼克酸且具有如下结构：



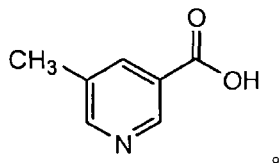
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为吡嗪-4-甲酸且具有如下结构：



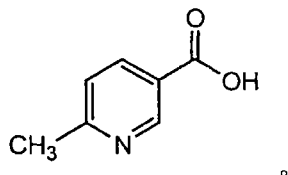
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 3-吡啶乙酸且具有如下结构：



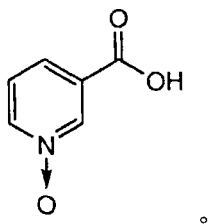
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 5-甲基尼克酸且具有如下结构：



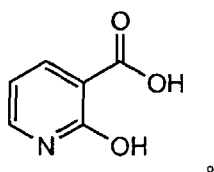
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 6-甲基尼克酸且具有如下结构：



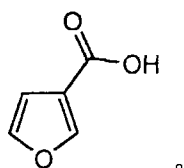
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为尼克酸-1-氧化物且具有如下结构：



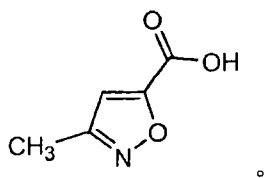
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 2-羟基尼克酸且具有如下结构：



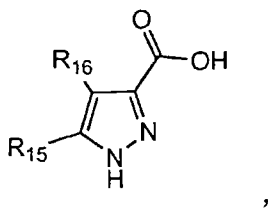
在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为呋喃-3-甲酸且具有如下结构：



在一些实施例中，本发明的烟酸类似物为 3-甲基异噁唑-5-甲酸且具有如下结构：



在一些实施例中，本发明的烟酸类似物具有如下化学式：



其中：

R_{15} 是选自由以下各基组成的群组：异丙基、正丙基、正丁基、正十一基、苯基、3-氯苯基、4-氯苯基、苄基、4-苄基、4-甲氧基苄基、2-苯基乙基以及 3-苯基丙基；及

R_{16} 为 H；或

R_{15} 和 R_{16} 一起形成 $-OCH_2CH_2-$ 、 $-C_3H_6-$ 或 $-C_4H_8-$ 基团，只要所述 $-OCH_2CH_2-$ 基团的氧原子连接于吡唑环的 5 位。

因为烟酸类似物包括烟酸的功能类似物，所以烟酸类似物包括烟酸受体促效剂。因

此，本发明也提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸受体促效剂诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂。

通常，当配位体与其受体结合时，通常称为受体的激活，受体构形发生的变化有助于细胞内区与细胞内 G 蛋白之间的偶合。虽然存在其他 G 蛋白，但 Gq、Gs、Gi、Gz 以及 Go 为当前已鉴别出的 G 蛋白。也存在混杂的 G 蛋白，其似乎可使数类 GPCR 与磷脂酶 C 途径偶合，诸如 Ga15 或 Ga16 [Offermanns 和 Simon, J Biol Chem (1995) 270:15175-80]，或设计嵌合 G 蛋白以使大量不同 GPCR 与相同途径偶合 [Milligan 和 Rees, Trends in Pharmaceutical Sciences (1999) 20:118-24]。与 G 蛋白偶合的配位体激活的 GPCR 启动称为信号转导的信号级联过程。在正常情况下，信号转导最终导致细胞激活或细胞抑制。

在生理情况下，GPCR 在以下两种不同构形之间处于平衡下存在于细胞膜中：非活性状态和活性状态。处于非活性状态下的受体不能连接到细胞内信号转导途径以启动信号转导从而产生生物反应。受体构形变化为活性状态允许连接到转导途径（经由 G 蛋白）且产生生物反应。受体可由配位体或诸如药物的化合物而稳定于活性状态。另外，最新发现提供除配位体或药物以外的促进受体处于活性状态构形且使受体稳定于活性状态构形的方式。所述方式藉由模拟配位体与受体结合的效应有效使受体稳定于活性状态。因所述配位体独立性方式而稳定被称为组成性受体激活。

细胞内信号的启动可（例如）通过测量环腺苷酸（cAMP）、环鸟苷酸（cGMP）、肌醇三磷酸酯（IP3）、甘油二酯（DAG）以及钙的第二信使的水平来测定。此项技术熟知数种用于测量所述第二信使的检定法，例如 FLIPR 检测、黑素细胞检测或 CRE 报告基因检测（例如参见本文的实例 7、10、11 以及 12）。

促效剂为例如配位体或候选化合物的物质，当其与受体结合时，其激活细胞内反应。细胞内反应可（例如）为 GTP 与膜结合的增强或诸如 cAMP 或 IP3 的第二信使水平的调节。在一些实施例中，促效剂为当其与受体结合时能激活细胞内反应（例如，增强 GTP7S 与膜的结合或降低细胞内 cAMP 水平）的先前未知的物质。部分促效剂为例如配位体或候选化合物的物质，当其与受体结合时，虽然激活细胞内反应，但程度比完全促效剂激活的程度低。

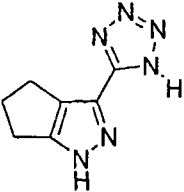
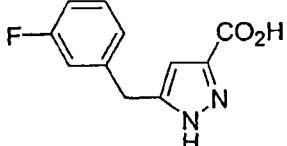
如本文所使用，“烟酸受体部分促效剂”为当其与烟酸受体结合时，虽然激活细胞内反应但程度比在烟酸受体处为完全促效剂的烟酸所激活的程度低的物质。学术上，术语部分促效剂为相对术语，因为与完全促效剂相比，部分促效剂产生部分反应。因为新颖

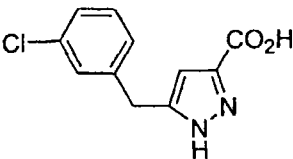
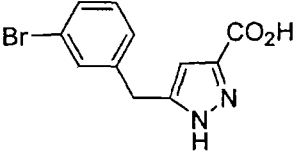
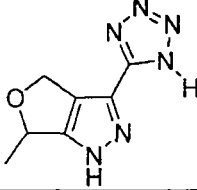
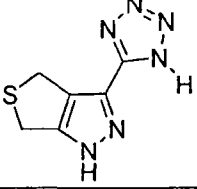
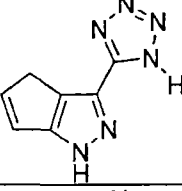
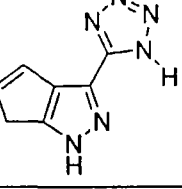
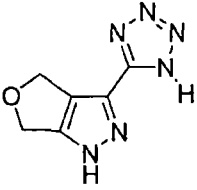
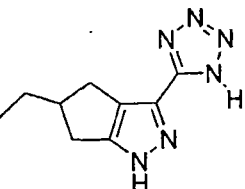
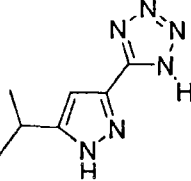
的化合物正随时间而发现，所以完全促效剂可变化且以前的完全促效剂可变为部分促效剂。为清楚起见，如本文所使用的烟酸受体部分促效剂是与作为完全促效剂的烟酸相比。与烟酸相比，烟酸受体部分促效剂激活细胞内反应的程度可检测地较低，亦即，烟酸受体部分促效剂引发比最大反应低的反应。因此，烟酸受体部分促效剂具有比烟酸差的功效。举例来说，烟酸受体部分促效剂具有与烟酸相比 90%或更低的功效、与烟酸相比 85%或更低的功效、与烟酸相比 80%或更低的功效、与烟酸相比 75%或更低的功效、与烟酸相比 70%或更低的功效、与烟酸相比 65%或更低的功效、与烟酸相比 60%或更低的功效、与烟酸相比 55%或更低的功效、与烟酸相比 50%或更低的功效、与烟酸相比 45%或更低的功效、与烟酸相比 40%或更低的功效、与烟酸相比 35%或更低的功效、与烟酸相比 30%或更低的功效、与烟酸相比 25%或更低的功效、与烟酸相比 20%或更低的功效、与烟酸相比 15%或更低的功效或与烟酸相比 10%的功效。举例来说，烟酸受体部分促效剂可具有与烟酸相比 10%到 90%的功效、与烟酸相比 20%到 80%的功效、与烟酸相比 30%到 70%的功效、与烟酸相比 40%到 60%的功效或与烟酸相比 45%到 55%的功效。功效（所测量的反应的量值）不同于效能（引发确定反应所需的化合物的量）。因此，当与促效剂、拮抗剂或反向促效剂相比时，烟酸受体部分促效剂可具有更高、更低或相等的效能。

烟酸受体部分促效剂可使用此项技术熟知及本文揭露的检定法测定。举例来说，烟酸受体部分促效剂可使用 cAMP 检定法测定。

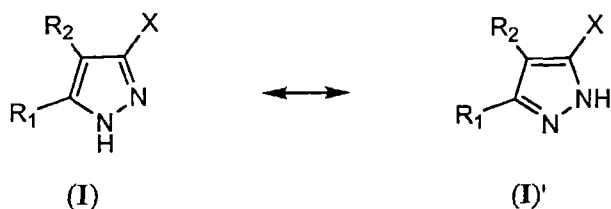
代表性烟酸受体部分促效剂展示于表 A 中：

表 A

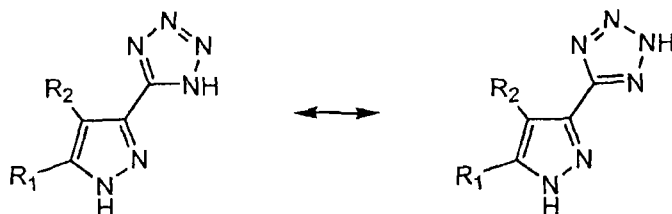
化合物序号	结构	化学名称
1		3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑
2		5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸

3		5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸
4		5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸
5		6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑
6		3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑
7		3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑
8		3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑
9		3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑
10		5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑
11		5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑

本发明的化合物可以各种互变异构体存在。所属领域技术人员应了解吡唑可以至少两种互变异构体存在，且虽然式 (I) 表示一种形式，但应了解所有互变异构体皆包括在本发明中。举例来说，两种可能的式 (I) 吡唑互变异构体展示如下：



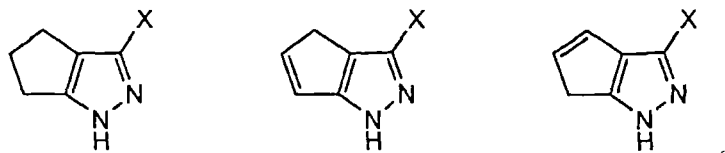
另外，对式 (I) 来说，当 X 为四唑-5-基时，所属领域技术人员也应了解四唑可以至少两种互变异构体存在，应了解四唑基的所有互变异构体皆包括在本发明内。举例来说，当 X 为四唑-5-基时，两种可能的式 (I) 互变异构体展示如下：



另外，应了解若 X 为四唑-5-基，则互变异构体可以吡唑环与四唑环的组合形式存在。应了解本文所揭露的化合物可存在的所有互变异构体皆在本发明的范畴内。

术语“羧基”表示 $\text{-CO}_2\text{H}$ 基团和相应的共轭碱 -CO_2^- ；也称为羧酸基团。

术语“5 元碳环”表示含有 5 个环碳和视需要一或两个桥环双键的非芳环；在一些实施例中，5 元碳环的两个环碳与吡唑环共享，例如（但不限于）当 R_1 和 R_2 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成 5 元碳环时，具有如下化学结构：

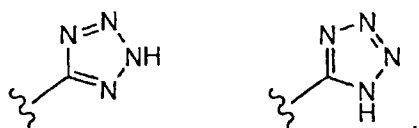


术语“5 元杂环”表示含有 4 个环碳和一个选自氧和硫的杂原子以及视需要一个桥环双键的非芳环。在一些实施例中，5 元碳环的两个环碳与吡唑环共享，例如（但不限

于) 若 R_1 和 R_2 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成 5 元杂环, 则具有如下化学结构:



术语“四唑-5-基”指如下所示的基团和相应互变异构体:



关于烟酸受体, 此项技术已知数种烟酸受体序列。举例来说, 人类烟酸受体核苷酸序列可见于基因库入藏登记号第 NM_177551 号且在本文中列为 SEQ ID NO: 1。同时应了解对烟酸受体的限制性修饰可在不破坏烟酸受体与烟酸结合的能力的情况下进行。举例来说, 烟酸受体意欲包括其他烟酸受体多肽, 例如, 人类烟酸受体多肽的物种同源物 (SEQ ID NO: 2)。人类烟酸受体的物种同源物的序列存在于数据库中, 例如烟酸受体的大鼠同源物可见于基因库入藏登记号第 BAC58009 号。另外, 烟酸受体包括大体上保留整个烟酸受体多肽的烟酸受体结合功能的烟酸受体的剪接变体和等位变体。

另外, 与野生型受体相比, 烟酸受体可含有氨基酸变化, 例如, 保守氨基酸变化, 只要突变受体大体上保留野生型烟酸受体多肽的烟酸受体结合功能。氨基酸序列的保守和非保守氨基酸变化、缺口和插入可使用诸如基本局部比对搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool, “BLAST”) 的可用算法和程序使用默认设置与参考序列相比 (例如参见 Karlin 和 Altschul, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:2264-8; Altschul 等人, J Mol Biol (1990) 215:403-410; Altschul 等人, Nature Genetics (1993) 3:266-72 以及 Altschul 等人, Nucleic Acids Res (1997)25:3389-3402)。

烟酸受体与烟酸特异性结合。术语特异性结合意欲意谓多肽对于靶多肽来说所具有的亲和力应比其对于无关多肽的亲和力显著更高。此项技术熟知数种用于检测或测量受体结合的方法, 例如, 放射性配位体结合检定法或诸如 FLIPR 检定法的具有功能读出的检定法。

应了解大体上保留整个多肽的烟酸受体结合功能的烟酸受体片段可代替整个多肽使

用。举例来说，烟酸受体的配位体结合域可代替整个多肽使用以测定部分促效剂与烟酸受体的结合。

如本文所使用，烟酸受体部分促效剂的“降低发红有效量”意谓足以引起由烟酸或烟酸类似物诱发的发红降低的量。

如本文所使用，“降低”意谓可测的量或特定活性的减少且与术语“减少”、“减弱”、“减低”以及“减轻”同义使用。关于发红的量，发红的降低可（例如）为发红的减少或发红的消除。举例来说，发红可降低至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%。另外，发红可降低 100%或清除以致发红不可检测。在一个实施例中，发红降低至少约 80%。在另一个实施例中，发红的降低为完全降低或发红消除。

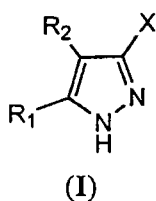
数种方法可用于检测和定量发红。举例来说，发红可在视觉上检测和定量。一种检测和定量发红的方法为激光多普勒法（Laser Doppler），例如使用 Pirimed PimII 激光多普勒法。另外，可采用对个体的调查来评定发红和诸如发麻或暖和感的可与发红相关联的症状的严重性。检测和定量发红的另一种方法可包括测量诸如血液或尿的来自个体的生物样品中的前列腺素 D₂（PGD₂）或前列腺素 F₂（PGF₂）的水平。另外，例如，PGD-M 的水平、PGD₂ 的主要尿代谢物可从个体的尿中测量。测量前列腺素水平的检定为市售的，例如用于 PGD₂ 的酶免疫检定可获自 Cayman Chemical（Ann Arbor, MI）。

如所属领域的技术人员所理解，达成发红降低所需的烟酸或烟酸类似物的量应随（例如）特定化合物、其配方、投药途径以及个体个体而变化。

向个体投药的合适途径包括使用此项技术已知的方法经口、局部、经鼻、经直肠、经粘膜或经肠投与；非经肠传送，包括肌内、皮下、髓内注射以及鞘内、直达心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、肺内（吸入）或眼内注射。其他投药途径为气雾剂和储槽式配方。在一个实施例中，投药途径为口服。

本发明进一步提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂和改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。在一个实施例中，所述发红由烟酸诱发，且在另一个实施例中，所述发红由烟酸类似物诱发。在另一个实施例中，发红完全降低或消除。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500

毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-咪唑并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-咪唑并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。

如本文所使用，术语“改变脂质有效量”关于烟酸或烟酸类似物的量时意谓足以可检测地改变动脉粥样硬化相关血清脂质的量的所述化合物的量，所述可检测地改变例如为个体体内 LDL 胆固醇、VLDL 胆固醇或三酸甘油酯的量的减少或 HDL 胆固醇的增加。举例来说，改变脂质有效量的烟酸可使 HDL 胆固醇的量增加或使 LDL 胆固醇的量减少。另外，例如，改变脂质有效量的烟酸可使 HDL 胆固醇的量增加和使 LDL 胆固醇的量减少。此项技术熟知用于测量血液中所述脂质的量的标准实验室检定法。（参见，例如本文中的实例 6）。

在血液中，胆固醇由诸如 VLDL 胆固醇、LDL 胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇（HDL 胆固醇）的脂蛋白复合物运输。LDL 将血液中的胆固醇运载到血管壁的内皮下间隙。认为血管壁内皮下间隙内的 LDL 胆固醇的过氧化作用会导致动脉粥样硬化斑块形成。另一方面，认为 HDL 胆固醇会对抗斑块形成且延迟或预防心血管疾病和动脉粥样硬化症状的发作。迄今为止已鉴别数种 HDL 胆固醇的亚型，诸如 HDL₁ 胆固醇、HDL₂ 胆固醇以及 HDL₃ 胆固醇。

存在数种 HDL 可保护以防动脉粥样硬化更进一步发展的机理。活体外研究已展示

HDL 能够将胆固醇从细胞中移除 [Picardo 等人, (1986) Arteriosclerosis, 6,434-441]。所述特性资料提出 HDL 的一个抗动脉粥样硬化性质可能在于其耗尽过量游离胆固醇组织的能力且最终导致所述胆固醇传送到肝中 [Glomset, (1968) J. Lipid Res., 9,155-167]。此已由展示胆固醇从 HDL 有效转移到肝的实验得到证明 [Glass 等人, (1983) J. Biol. Chem., 258 7161-7167; McKinnon 等人, (1986) J. Biol. Chem., 26,2548-2552]。另外, HDL 在循环中可充当快速代谢富含三酸甘油酯的脂蛋白所需的脱辅基蛋白的储存器 [Grow 和 Fried, (1978) J. Biol. Chem., 253, 1834-1841; Lagocki 和 Scanu, (1980) J. Biol. Chem., 255, 3701-3706; Schaefer 等人, J. Lipid Res., (1982) 23,1259-1273]。

通常, 总胆固醇/HDL-胆固醇 (也就是, TC/HDL) 比率可表示关于个体感染诸如动脉粥样硬化、心脏病或中风的病状的风险的有效预测因子。血浆脂质水平的现行分类展示于表 B 中:

表 B
血浆脂质水平的分类

总胆固醇	<200 mg/dl	合乎需要
	200-239 mg/dl	胜败高 (Borderline High)
	>240 mg/dl	高
HDL 胆固醇	<40 mg/dl	低 (男性)
	<50 mg/dl	低 (女性)
	>60 mg/dl	高

来自: 2001 国家胆固醇教育计划指南 (2001 National Cholesterol Education Program Guidelines)

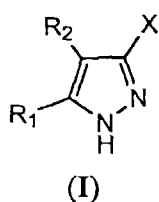
因此, 所推荐的总胆固醇/HDL-C (也就是 TC/HDL) 比率指示比率小于或等于 3.5 为理想的且比率大于 4.5 视为“危险”。在个体表现“正常”LDL 和总胆固醇但拥有低 HDL-胆固醇的情况下, 确定 TC/HDL 比率的值为清楚明显的。基于 LDL 和总胆固醇, 个体可能不具有资格治疗, 然而, 当把 HDL-胆固醇水平包括在内时, 可获得更精确的风险评定。因此, 如果个体的 HDL-胆固醇水平使得比率大于 4.5, 那么可准许治疗性或预防性介入。

关于 LDL-胆固醇水平, 美国心脏协会 (American Heart Association) 当前认为 LDL-胆固醇水平小于 100 mg/dL 最佳, 100-129 mg/dL 接近最佳, 130-159 mg/dL 为胜败高, 160- 189 mg/dL 偏高且 190 mg/dL 视为 LDL-胆固醇的极高水平。关于三酸甘油酯水平,

美国心脏协会当前认为小于 150 mg/L 为正常, 150-199 mg/dL 为胜败高, 200-499 mg/dL 偏高且 500 mg/dL 视为三酸甘油酯的极高水平。

为改变动脉粥样硬化相关血清脂质的量所需的烟酸或烟酸类似物的量应随化合物的配方和个体而变化。具体来说, 改变动脉粥样硬化相关血清脂质的量所需的烟酸或烟酸类似物的量可取决于(例如)个体的体重、个体的遗传组成或个体的一般健康。可改变动脉粥样硬化相关血清脂质的量的烟酸或烟酸类似物的量可包括(例如)每天至少 500 毫克、每天至少 750 毫克、每天至少 1 克、每天至少 1.5 克、每天至少 2 克、每天至少 2.5 克、每天至少 3 克、每天至少 3.5 克、每天至少 4 克、每天至少 4.5 克、每天至少 5 克、每天至少 5.5 克、每天至少 6 克、每天至少 6.5 克、每天至少 7 克、每天至少 7.5 克、每天至少 8 克、每天至少 8.5 克、每天至少 9 克或更多。在一个实施例中, 所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克烟酸。在另一个实施例中, 所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天 1 到 3 克。

另外, 本发明提供一种降低个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法, 所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂且随后向所述个体投与改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。在一个实施例中, 所述发红由烟酸诱发, 且在另一个实施例中, 所述发红由烟酸类似物诱发。在另一个实施例中, 发红完全降低或消除。在又一个实施例中, 所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。在一个实施例中, 所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物:



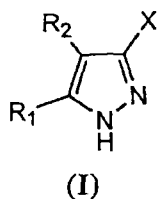
或其医药学上可接受的盐, 其中: X 为羧基或四唑-5-基; R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基; 及 R₂ 为 H; 或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环, 或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说, 所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物: 3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-

四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-咪唑并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。

就本文所揭露的方法来说，烟酸受体部分促效剂和烟酸或烟酸类似物可在同一时间或不同时间一起或分开投与。举例来说，烟酸或烟酸类似物可作为烟酸受体部分促效剂组合在同一配方中或可为分开的配方。若烟酸或烟酸类似物和烟酸受体部分促效剂为分开的配方，则其可一起或分开投与，例如隔开少于 1 分钟如同一口气服用或隔开更多的时间如同不是一口气服用。

在本发明的方法中，如果向个体投与烟酸受体部分促效剂，且随后投与烟酸或烟酸类似物，那么投与烟酸受体部分促效剂与随后投与烟酸或烟酸类似物之间的时间可为（例如）至少约 1 分钟、至少约 5 分钟、至少约 10 分钟、至少约 20 分钟、至少约 30 分钟、至少约 45 分钟、至少约 1 小时、至少约 2 小时、至少约 3 小时、至少约 4 小时、至少约 5 小时、至少约 6 小时、至少约 7 小时、至少约 8 小时、至少约 9 小时、至少约 10 小时、至少约 12 小时、至少约 14 小时、至少约 20 小时或至少约 24 小时或更长。

本发明也提供一种预防或治疗个体体内脂质相关病症的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂和改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。在一个实施例中，所述发红由烟酸诱发，且在另一个实施例中，所述发红由烟酸类似物诱发。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，发红完全降低或消除。在又一个实施例中，所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-

四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噁吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述方法进一步包含向所述个体投与至少一种选自以下各物组成的群组的药剂： α -葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂和噻唑烷二酮。

如本文所使用，术语“治疗”关于病症时意谓降低与特定病症相关联的一个或一个以上症状的严重性。因此，治疗病症不必意谓降低与病症相关联的所有症状的严重性且不必意谓完全降低与病症相关联的一个或一个以上症状的严重性。类似地，术语“预防”意谓预防与特定病症相关联的一个或一个以上症状的出现或发作且不必意谓完全预防病症。本发明的方法可用于治疗烟酸反应性病症，包括（例如）如下所述的脂质相关病症。

如本文所使用，术语“脂质相关病症”意谓任何与个体体内非最佳水平的动脉粥样硬化相关血清脂质（例如，LDL 胆固醇、VLDL 胆固醇、HDL 胆固醇或三酸甘油酯）有关的病症。因此，脂质相关病症可为（例如）LDL 胆固醇水平的升高、HDL 胆固醇水平的降低，或至少部分由非最佳水平的动脉粥样硬化相关血清脂质引起的病症，诸如动脉粥样硬化、心脏病发作（心肌梗塞）或中风。最佳水平的动脉粥样硬化相关血清脂质如上所讨论且非最佳水平的所述脂质或小于最佳比率的所述脂质视为脂质相关病症。

高脂血症为脂质相关病症，其是用于任何或所有血浆中诸如胆固醇、三酸甘油酯以及脂蛋白等脂质浓度升高的一般术语。高脂血症可为后天性的或可为先天性的。高脂血症的特定形式可包括（例如）高胆固醇血症、家族性异常 β 脂蛋白血症、糖尿病性异常脂质血症、肾病异常脂质血症以及家族性组合高脂血症。高胆固醇血症的特征在于血清低密度脂蛋白胆固醇和血清总胆固醇的升高。家族性异常 β 脂蛋白血症（亦称为 III 型高脂血症）的特征在于血清中称为 β -VLDL 的极低密度脂蛋白胆固醇（VLDL-胆固醇）粒子的积聚。同样与所述病状相关联的是以异常同种型载脂蛋白 E2 替换正常载脂蛋白 E3。糖尿病性异常脂质血症的特征在于多发性脂蛋白异常，诸如 VLDL 胆固醇过量产生、异常的 VLDL 三酸甘油酯脂解、LDL 胆固醇受体活性降低以及有时为 III 型高脂血症。肾病异常脂质血症很难治疗且通常包括高胆固醇血症和高甘油三酯血症。家族性组合高脂

血症的特征在于多个高脂血症表型，也就是，IIa、IIb、IV、V 或高载脂蛋白 β 脂蛋白血症（hyperapobetalipoproteinemia）。

至少部分由非最佳水平动脉粥样硬化相关血清脂质引起的病症包括在脂质相关病症的定义中。所述病症包括（例如）冠状动脉病（CAD）或冠心病、充血性心力衰竭、心绞痛、动脉瘤、缺血性心脏病、心肌梗塞和中风。脂质相关病症可包括诸如冠心病（其为包含向心脏供应血液的小血管变窄的病症）和心脏丧失有效泵送血液的能力的充血性心力衰竭等心脏病。脂质相关病症可包括因血管部分或完全阻塞所致流向组织或器官的血流减少而引起的病症。所述病症包括（例如）心绞痛、缺血性心脏病、心肌梗塞和中风。脂质相关病症可包括因血管减弱而引起的病症，诸如动脉瘤，其为通常由动脉粥样硬化引起的血管中减弱的区域。

本发明的方法、组合物和试剂盒可用于预防或治疗个体体内的脂质相关病症。当用于预防脂质相关病症时，个体可具有最佳水平的脂质但可能会因其他原因（例如，脂质相关病症家族史）冒脂质相关病症的风险。本发明的方法、组合物和试剂盒可用于预防性地预防任何年龄的个体，例如具有感染脂质相关病症致病因素即肥胖或糖尿病的小孩或成人体的脂质相关病症。

本发明也提供除烟酸受体部分促效剂和烟酸或烟酸类似物外，还包括另一或其他治疗化合物的组合疗法的方法。其他治疗化合物可包括（例如）可用于进一步降低发红的化合物或可用于进一步减低个体体内动脉粥样硬化相关血清脂质的量的化合物。

可与烟酸受体部分促效剂和烟酸或烟酸类似物组合的治疗化合物可包括（例如）降低诸如 PGD_2 合成的前列腺素合成的化合物。所述化合物可包括（例如）非类固醇消炎药物（NSAID）。NSAID 的实例包括：阿司匹林、水杨酸盐、伊布普洛芬（ibuprofen）、消炎痛（indomethacin）、那普洛仙（naproxen）、那普洛仙钠、酮基布洛芬（ketoprofen）、非诺洛芬（fenoprofen）、奥沙普嗪（oxaprozin）、舒林酸（sulindac）、氟比洛芬（flurbiprofen）、依托度酸（etodolac）、双氯芬酸（diclofenac）、酮咯酸（ketorolac）、托尔米丁（tolmetin）、萘丁美酮（nabumetone）、舒洛芬（suprofen）、苯噻洛芬（benoxaprofen）、卡洛芬（carprofen）、阿罗芬（aclofenac）、芬氯酸（fenclofenac）、佐美酸（zomepirac）、甲氧芬那酸（meclofenamate）、扑湿痛（mefenamic acid）、羟保泰松（oxyphenbutazone）、保泰松（phenylbutazone）以及吡罗昔康（piroxicam）。除与 COX-1 抑制剂组合外，治疗化合物可与诸如塞来昔布（Celecoxib）或罗非昔布（Rofecoxib）的选择性 COX-2 抑制剂组合。

可与烟酸受体部分促效剂和烟酸或烟酸类似物组合的治疗化合物可包括（例如）降

低个体体内动脉粥样硬化相关血清脂质的量的化合物。所述化合物包括（例如） α -葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二胍、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶（ACE）抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

α -葡萄糖苷酶抑制剂属于胰腺和/或小肠内竞争性抑制诸如 α -淀粉酶、麦芽糖酶、 α -糊精酶、蔗糖酶等的消化酶的药物类。 α -葡萄糖苷酶抑制剂的可逆性抑制作用藉由延迟淀粉和糖的消化来减缓、减弱或降低血糖水平。 α -葡萄糖苷酶抑制剂的一些代表性实例包括阿卡波糖（acarbose）、N-(1,3-二羟基-2-丙基)维列胺（N-(1,3-dihydroxy-2-propyl)valiolamine）（属名：伏格列波糖（voglibose））、米格列醇（miglitol）及此项技术已知的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

醛糖还原酶抑制剂为抑制多元醇途径中第一级限速酶的药物。醛糖还原酶抑制剂的实例包括吐露司他（tolurestat）、依帕司他（epalrestat）、3,4-二氢-2,8-二异丙基-3-硫代-2H-1,4-苯并噁嗪-4-乙酸、2,7-二氟螺(9H-芴-9,4'-咪唑啉)-2',5'-二酮（属名：咪瑞司他（imirestat））、3-[(4-溴-2-氟苯基)甲基]-7-氯-3,4-二氢-2,4-二氧代-1(2H)-喹唑啉乙酸（属名：折那司他（zenarestat））、6-氟-2,3-二氢-2',5'-二氧代-螺[4H-1-苯并哌喃-4,4'-咪唑啉]-2-氨基甲酰（SNK-860）、唑泊司他（zopolrestat）、索比尼尔（sorbiniol）以及 1-[(3-溴-2-苯并呋喃基)磺酰基]-2,4-咪唑啉二酮（M-16209），以及此项技术已知的醛糖还原酶抑制剂。

缩二胍为一类刺激无氧酵解、增加周围组织中对胰岛素的敏感性、抑制从肠吸收葡萄糖、抑止肝葡萄糖异生作用且抑制脂肪酸氧化作用的药物。缩二胍的实例包括苯乙双胍、二甲双胍、丁二胍以及此项技术已知的缩二胍。

士他汀（Statin）化合物属于一类通过抑制羟甲基谷氨酸基 CoA（HMG-CoA）还原酶降低血胆固醇水平的药物。HMG-CoA 还原酶为胆固醇生物合成中的限速酶。抑制所述还原酶的士他汀通过上调 LDL 受体的活性且负责清除来自血液的 LDL 使血清 LDL 浓度降低。士他汀化合物的实例包括罗苏伐他汀（rosuvastatin）、普伐他汀（pravastatin）和其钠盐、斯伐他汀（simvastatin）、洛伐他汀（lovastatin）、阿伐他汀（atorvastatin）、氟伐他汀（fluvastatin）、西伐他汀（cerivastatin）以及此项技术已知的 HMG-CoA 还原酶抑制剂。

角鲨烯合成抑制剂属于一类通过抑制角鲨烯的合成降低血胆固醇水平的药物。角鲨烯合成抑制剂的实例包括(S)- α -[双[2,2-二甲基-1-氧代丙氧基]甲氧基] 磷酰基]-3-苯氧基苯丁烷磺酸、单钾盐（BMS-188494）以及此项技术已知的角鲨烯合成抑制剂。

纤维酸酯化合物属于一类通过抑制肝中三酸甘油酯合成和分泌且激活脂蛋白脂肪酶来降低血胆固醇水平的药物。已知纤维酸酯激活过氧化物酶体增殖物激活受体且诱发脂蛋白脂肪酶表达。纤维酸酯化合物的实例包括苯扎贝特（bezafibrate）、贝罗贝特（beclobrate）、比尼贝特（binifibrate）、西普贝特（ciprofibrate）、克利贝特（clinfibrate）、氯贝特（clofibrate）、氯贝酸（clofibric acid）、依托贝特（etofibrate）、非诺贝特（fenofibrate）、吉非贝齐（gemfibrozil）、尼可贝特（nicofibrate）、吡贝特（pirifibrate）、氯烟贝特（ronifibrate）、双贝特（simfibrate）、西奥贝特（theofibrate）以及此项技术已知的纤维酸酯。

LDL（低密度脂蛋白）分解代谢增强剂属于一类通过增加 LDL 受体的数目降低血胆固醇水平的药物，实例包括此项技术已知的 LDL 分解代谢增强剂。

血管紧张素转化酶（ACE）抑制剂属于通过抑制血管紧张素转化酶来部分降低血糖水平且降低血压的药物类。血管紧张素转化酶抑制剂的实例包括卡托普利（captopril）、依那普利（enalapril）、阿拉普利（alacepril）、地拉普利（delapril）、雷米普利（ramipril）、赖诺普利（lisinopril）、咪达普利（imidapril）、贝那普利（benazepril）、西罗普利（ceronapril）、西拉普利（cilazapril）、依那普利拉（enalaprilat）、福辛普利（fosinopril）、莫威普利（movaltopril）、培哚普利（perindopril）、喹那普利（quinapril）、螺普利（spirapril）、替莫普利（temocapril）、群多普利（trandolapril）以及此项技术已知的血管紧张素转化酶抑制剂。

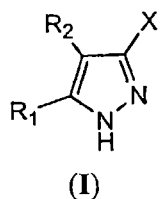
胰岛素分泌增强剂属于具有促进胰腺β细胞的胰岛素分泌的性质的药物类。胰岛素分泌增强剂的实例包括磺酰脲（SU）。磺酰脲（SU）为通过经由细胞膜中的 SU 受体传递胰岛素分泌信号促进胰腺β细胞的胰岛素分泌的药物。磺酰脲的实例包括甲苯磺丁脲（tolbutamide）、氯磺丙脲（chlorpropamide）、甲磺氮卓脲（tolazamide）、醋磺环己脲（acetohexamide）、4-氯-N-[(1-吡咯啉基氨基)羰基]-苯磺酰胺（属名：甘油吡嗪酰胺（glycopyramide））或其铵盐、格列本脲（glibenclamide）（格列本脲（glyburide））、格列齐特（gliclazide）、1-丁基-3-间胺磺脲、磺胺丁脲（carbutamide）、格列波脲（glibonuride）、格列吡嗪（glipizide）、格列喹酮（gliquidone）、格列索匹（glisoxepid）、格列丁噻唑（glybuthiazole）、格列丁唑（glibuzole）、格列己脲（glyhexamide）、格列咪啉（glymidine）、格列平脲（glypinamide）、苯磺丁脲（phenbutamide）、甲磺环己脲（tolcyclamide）、格列美脲（glimepiride）以及其他此项技术已知的胰岛素分泌增强剂。其他胰岛素分泌增强剂包括 N-[[4-(1-甲基乙基)环己基]羰基]-D-苯丙氨酸（那格列奈（Nateglinide））、二水合

(2S)-2-苄基-3-(顺-六氢-2-异吲哚啉基羰基)丙酸钙（米格列奈（Mitiglinide），KAD-1229）以及其他此项技术已知的胰岛素分泌增强剂。噻唑烷二酮属于更普遍称为TZD的药物类。噻唑烷二酮的实例包括罗格列酮（rosiglitazone）、吡格列酮（pioglitazone）以及此项技术已知的噻唑烷二酮。

本发明的方法、试剂盒以及组合物可适用于（例如）降低由烟酸或烟酸类似物诱发的发红。可将烟酸或烟酸类似物投与个体（例如）以预防或治疗烟酸反应性病症。烟酸反应性病症为可由烟酸或烟酸类似物预防或治疗的病症或疾病。烟酸反应性病症可包括（例如）如本文所述的脂质相关病症。举例来说，脂质相关病症可为（例如）高密度脂蛋白（HDL）胆固醇的量降低、低密度脂蛋白（LDL）胆固醇量的升高、三酸甘油酯量的升高，或至少部分由非最佳水平的动脉粥样硬化相关血清脂质引起的病症，诸如动脉粥样硬化、心脏病或中风。

烟酸反应性病症的另一实例为痛经（dysmenorrhea 或 painful menstrua）。在一篇报告中，每天两次给 80 位患有痛经的女性群组补充 100 毫克烟酸，月经开始之前 7 到 10 天开始且随后在严重月经痛期间每 2 到 3 小时补充 [Hudgins, (1952) Am Pract Dig Treat 3:892-893; Hudgins (1954) West J Surg Obstet Gynecol 62:610-611]。约 90%的个体经历显著减轻。严重月经痛期间所需的剂量（每 2 到 3 小时 100 毫克）足够高会在一些女性中引起发红。在这种情况下，本发明的方法、试剂盒以及组合物可用于降低由烟酸诱发的发红。

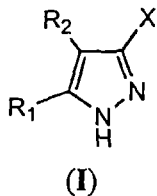
本发明进一步提供一种预防或治疗个体体内脂质相关病症的方法，所述方法包含向所述个体投与降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂且随后向所述个体投与改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物。在一个实施例中，所述发红由烟酸诱发，且在另一个实施例中，所述发红由烟酸类似物诱发。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，发红完全降低或消除。在又一个实施例中，所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式（I）化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述方法进一步包含向所述个体投与至少一种选自由以下各物组成的群组的药剂： α -葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

如上所述，投与烟酸受体部分促效剂与随后投与烟酸或烟酸类似物之间的时间可为（例如）至少约 1 分钟、至少约 5 分钟、至少约 10 分钟、至少约 20 分钟、至少约 30 分钟、至少约 45 分钟、至少约 1 小时、至少约 2 小时、至少约 3 小时、至少约 4 小时、至少约 5 小时、至少约 6 小时、至少约 7 小时、至少约 8 小时、至少约 9 小时、至少约 10 小时、至少约 12 小时、至少约 14 小时、至少约 20 小时或至少约 24 小时或更长。

另外，本发明提供一种用于投与改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物具有降低引起个体体内发红反应的能力的组合物，所述组合物包含（a）改变脂质有效量的烟酸或烟酸类似物和（b）降低发红有效量的烟酸受体部分促效剂。在一个实施例中，所述组合物包含改变脂质有效量的烟酸，且在另一个实施例中，所述组合物包含改变脂质有效量的烟酸类似物。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，所述改变脂质的烟酸或烟酸类似物的量为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式（I）化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接之两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噁吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述组合物进一步包含至少一种选自由以下各物组成的群组的药剂：α-葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

如本文所使用，“组合物”意谓包含至少一种组分的物质。医药组合物为组合物的实例。医药组合物意谓包含至少一种活性成分的组合物，由此组合物经受研究以在哺乳动物（例如，人类）体内得到特定的有效的成果。所属领域的技术人员应理解且了解适合基于技术人员的需要确定活性成分是否具有合乎需要的有效成果的技术。

本文所述的组合物可包括医药学上或生理学上可接受的载剂。合适的医药学上可接受的载剂可采用此项技术中之载剂；例如参见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, (Gennaro 等人编)。对预防或治疗使用来说，虽然本发明的化合物在选择使用中有可能可呈未加工或纯化学形式投与，但也可希望化合物或活性成分以医药配方或组合物的形式存在。

因此，本发明进一步提供医药配方，其包含本发明的化合物或其医药学上可接受的盐或衍生物以及一种或一种以上其医药学上可接受的载剂和/或预防性成分。载剂在与配方的其他成分相容且对其接受者不会过度有害的意义上为“可接受的”。

医药配方包括那些适合经口、直肠、鼻、局部（包括颊和舌下）、阴道或非经肠（包括肌肉内、皮下以及静脉内）投与的配方或呈适合吸入或吹入投与的形式的配方。

可将本发明的化合物连同常规佐剂、载剂或稀释剂放入医药配方形形式和其单位剂量中；且可采用呈诸如锭剂或填充胶囊的固体形式，或诸如溶液、悬浮液、乳液、酏剂、凝胶或填充所述液体的胶囊的液体形式，所有皆用于经口使用；呈栓剂形式用于直肠投与，呈液体、凝胶、洗剂或软膏形式用于局部使用，或呈无菌可注射溶液的形式用于非经肠（包括皮下）使用。所述医药组合物和其单位剂型可以常规比例包含常规成分，包含或不包含他活性化合物或要素，且所述单位剂型可含有任何合适的与待使用的预期日剂量范围相称的有效剂量活性成分。

对由本发明的化合物制备医药组合物来说，医药学上可接受的载剂可为固体或液体。固体形式制剂包括散剂、锭剂、药丸、胶囊、扁囊剂、栓剂以及可分散的颗粒。固体载剂可为一种或一种以上也可充当稀释剂、调味剂、增溶剂、润滑剂、悬浮剂、粘合剂、防腐剂、锭剂崩解剂或封装材料的物质。对散剂来说，载剂可为与细粒活性组分一起形成混合物的细粒固体。对锭剂来说，活性组分可与具有必需的结合力的载剂以合适比例混合且压实为所需的形状及大小。

粉剂和锭剂可含有不同百分率量的活性化合物。粉剂或锭剂中的代表性量可含有0.5%到约90%的活性化合物，然而，技术人员应知道必要时量可超出所述范围。散剂和锭剂的合适载剂为碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、胶质、糊精、淀粉、明胶、黄芩胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂和其类似物。术语“制剂”意欲包括以封装材料作为载剂的活性化合物的配方，提供其中有或无载剂的活性组分被载剂包围的胶囊，因此，所述载剂与活性组分相关联。类似地，包括扁囊剂和口含剂。锭剂、散剂、胶囊、药丸、扁囊剂以及口含剂可以适于经口投与的固体形式使用。

对制备栓剂来说，可首先将诸如脂肪酸甘油酯的混合物或可可脂的低熔点蜡熔化且可将活性成分通过搅拌均匀分散其中。随后，将所溶化的均匀混合物倾入适宜大小的模型中，使其冷却，且因此固化。适合经阴道投与的配方可以阴道栓剂、棉塞、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫体或喷雾的形式存在，除活性成分以外其还含有诸如此项技术已知为适当的载剂。

液体形式制剂包括溶液、悬浮液以及乳液，例如水或水-丙二醇溶液。举例来说，非经肠注射液体制剂可以溶液形式配制于聚乙二醇水溶液中。可注射制剂，例如无菌可注射水性或油性悬浮液可根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌可

注射制剂也可为在无毒非经肠可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液，例如为在 1,3-丁二醇中的溶液。可使用的可接受的赋形剂和溶剂为水、林格氏液（Ringer's solution）以及等渗氯化钠溶液。另外，无菌不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。出于此目的，可使用任何温和不挥发油，包括合成单酸甘油酯或二酸甘油酯。另外，诸如油酸的脂肪酸在可注射制剂中获得应用。

因此，可根据本发明的组合物配制用于非经肠投与（也就是，通过注射，例如快速注射或连续输注投与）且其可以安瓿、预填充注射器、小体积输液的单位剂型或以具有添加防腐剂的多剂量容器形式存在。组合物可采用诸如于油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液或乳液的形式且可含有诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂的调配剂。或者，活性成分可呈散剂形式，其通过无菌分离无菌固体或由溶液通过冷冻干燥获得，在使用之前，用例如无菌无热原水的合适媒剂复原。

适合经口使用的水溶液可通过将活性组分溶解于水中且按需要添加合适着色剂、调味剂、稳定剂以及稠化剂来制备。适合经口使用的水性悬浮液可通过将细粒活性组分和诸如天然或合成树胶、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠或其他众所周知的悬浮剂的粘性物质一起分散于水中来制造。也包括固体形式制剂，意欲将其在使用之前即刻转化为经口投与的液体形式制剂。所述液体形式包括溶液、悬浮液以及乳液。除活性组分以外，所述制剂可含有着色剂、调味剂、稳定剂、缓冲剂、人工和天然甜味剂、分散剂、增稠剂、增溶剂和其类似物。

对局部投与到表皮来说，根据本发明的组合物可配制为软膏、乳膏或洗剂或经皮贴片。软膏和乳膏（例如）可与水性或油性基质一起通过添加合适增稠剂和/或胶凝剂而配制。洗剂可与水性或油性基质一起配制且通常也可含有一种或一种以上乳化剂、稳定剂、分散剂、悬浮剂、稠化剂或着色剂。

适合在口腔中局部投与的配方包括口含剂，其在通常为蔗糖和阿拉伯胶（acacia）或黄芪胶的调味基质中包含活性剂；软锭剂，其在诸如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶的惰性基质中包含活性成分；以及漱口药，其在合适液体载剂中包含活性成分。

溶液或悬浮液可由常规方式，例如滴管、吸管或喷雾直接施用于鼻腔。配方可以单剂型或多剂型提供。在滴管或吸管的后者情况下，此可通过个别投与适当的预定体积的溶液或悬浮液来达成。在喷雾的情况下，此可（例如）借助于计量雾化喷雾泵达成。投与呼吸道也可借助于气雾剂配方达成，在所述配方中，活性成分以具有合适推进剂的加压包装提供。如果医药组合物以例如经鼻气雾剂的气雾剂形式或通过吸入投与，那么此

可（例如）使用喷雾、喷雾器、泵喷雾器、吸入装置、计量吸入器或干粉吸入器进行。用于以气雾剂形式投与本发明的组合物的医药形式可通过所属领域的技术人员熟知的方法制备。对其制剂来说，例如本发明的化合物于水、水/醇混合物或合适盐水溶液中的溶液或分散液可使用以下各物而加以使用：惯用添加剂，例如苯甲醇或其他合适防腐剂、增加生物利用率的吸收增强剂、增溶剂、分散剂以及其他；且若合适，使用惯用推进剂，例如包括二氧化碳、诸如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷或二氯四氟乙烷的 CFC 类以及其类似物。气雾剂也可方便地含有诸如卵磷脂的表面活性剂。药物的剂量可通过提供计量阀来加以控制。

在包括鼻内配方的意欲投与呼吸道的配方中，化合物通常应具有较小的粒径，例如大约 10 微米或更低。所述粒径可通过此项技术已知的方式，例如微粉化获得。当需要时，可使用经调适以缓释活性成分的配方。

或者，活性成分可以干燥粉末形式，例如化合物于合适粉末状基质中的粉末状混合物的形式提供，所述粉末状基质为诸如乳糖、淀粉、诸如羟丙基甲基纤维素以及聚乙烯吡咯烷酮（PVP）的淀粉衍生物。粉末载剂在鼻腔中可方便地形成凝胶。粉末组合物可以单位剂型存在，例如，（例如）明胶的胶囊或药包，或泡罩包装，其中的粉末可借助于吸入器投与。

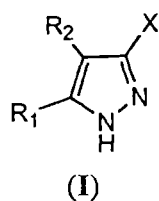
除之前所述的配方外，化合物也可配制为储槽式制剂。所述长期作用的配方可通过植入（例如，皮下或肌肉内）或通过肌肉内注射投与。因此，举例来说，化合物可与合适的聚合或疏水物质（例如，于可接受的油中的乳液）或离子交换树脂一起配制或配制为难溶衍生物（例如，难溶盐）。另外，组合物可经由诸如泵的控释系统传送。

另外，组合物可使用诸如含有治疗剂的固体疏水性聚合物的半透性基质的缓释系统传送。已确定各种缓释物质且为所属领域的技术人员所熟知。取决于缓释胶囊的化学特性，其可释放化合物达数周到 100 天以上。取决于治疗剂的化学特性和生物稳定性，可使用其他使调节剂稳定的策略。

本发明提供由消费者用于预防或治疗脂质相关病症的试剂盒。试剂盒可包含本发明的医药组合物和描述使用医药组合物预防或治疗脂质相关病症的方法的说明书。举例来说，试剂盒可含有至少一个剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个剂量单位的烟酸或烟酸类似物。另外，试剂盒可包括其他与本发明的组合物组合使用的治疗剂。

本发明提供一种预防或治疗脂质相关病症的试剂盒，所述试剂盒包含至少一个剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个剂量单位的烟酸或烟酸类似物，其中所述烟酸受

体部分促效剂所存在的量为降低所述个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的有效量且其中所述烟酸或烟酸类似物所存在的量为改变脂质的量。在一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸，且在另一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸类似物。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，发红完全降低或消除。在又一个实施例中，烟酸或烟酸类似物的所述剂量单位为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接之两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噁吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述试剂盒进一步包含至少一种选自以下各物组成的群组的药剂：α-葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

本发明的组合物可以各式各样的经口、局部或非经肠的剂型投与。所述剂型可包含本发明的化合物或本发明的化合物的医药学上可接受的盐作为活性组分对于熟习此项技术者来说是显而易见的。

用于预防或治疗所需的活性成分或其活性盐或衍生物的剂量应不仅随所选择的特定盐而且随投药途径、所治疗的病状的特性以及个体的年龄和病状而变化，且最终应由巡

诊医师或临床医师加以判断。一般来说，所属领域的技术人员理解如何将模型系统，通常动物模型中获得的活体内资料外推到诸如人类的另一系统。说明性但不意欲为限制性的活体内动物模型提供为如下实例。在一些情况下，所述外推法可仅仅基于与诸如哺乳动物，优选地为人类的另一模型相比的动物模型的重量，然而，更通常来说所述外推法并不仅基于重量，而是并入多种因素。代表性因素包括个体的体型、年龄、重量、性别、饮食以及医学病状，疾病的严重性，投药途径，诸如所使用的特定化合物的活性、功效、药物动力学以及毒物学概况的药理学考虑，是否使用药物传送系统，执行的是正治疗或预防的急性病态还是慢性病态或是否使用组合疗法。用本发明的化合物和/或组合物预防或治疗疾病病征的给药方案根据以上所述的多种因素加以选择。因此，所使用的实际给药方案可在很大程度上变化且因此可偏离优选给药方案，且所属领域的技术人员应认为所述典型值范围以外的剂量和给药方案可被测试且可酌情用于本发明的方法中。

合乎需要的剂量可方便地以单次剂量或以适当间隔投与的分次剂量（例如，每天 2 次、3 次、4 次或更多次亚剂量）存在。亚剂量自身可进一步分为（例如）若干离散的松散间隔的投药。尤其当适于投与相对较大的量时，日剂量可分为数份投药，例如 2 份、3 份或 4 份。取决于个体行为，适当时可能有必要上下偏离所指出的日剂量。

用于本专利申请中的试剂盒包括含有本发明的医药组合物的容器且也可包括诸如分开的瓶子或分开的箔包装的分开容器。容器可为任何此项技术已知的由医药学上可接受的材料制成的常规形状或形式，例如，纸盒或纸板盒、玻璃或塑料的瓶或罐、可再密封的袋子（例如，用于容纳锭剂的“再装物”以放入不同容器中）或具有根据治疗日程从包装中压出的个别剂量的泡罩包装。所使用的容器可取决于所涉及的确切剂型，例如，常规纸板盒通常不应用于容纳液体悬浮液。可行的是单个包装中可同时使用一个以上容器以在市场上销售单个剂型。举例来说，锭剂可包含于瓶子中，瓶子又包含于盒子中。

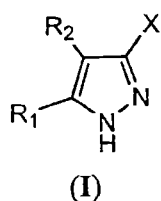
所述试剂盒的实例为所谓的泡罩包装。泡罩包装在包装工业中为人们所熟知且广泛用于包装医药单位剂型（锭剂、胶囊以及其类似物）。泡罩包装通常由覆盖有优选透明的塑料材料的箔片的相对硬材料的薄片组成。包装加工期间，凹穴形成于塑料箔片中。凹穴具有待包装的个别锭剂或胶囊的大小和形状或可具有容纳多个待包装的锭剂和/或胶囊的大小和形状。接着，将锭剂或胶囊相应地放置于凹穴中且将相对硬材料的薄片相对于塑料箔片在箔片的与形成凹穴的方向相反的一面上密封。结果，锭剂或胶囊按需要个别密封或共同密封于塑料箔片与薄片之间的凹穴中。薄片的强度通常可使锭剂或胶囊可通过在凹穴上人工施压从而在凹穴位置处薄片上形成开口而从泡罩包装取出。锭剂或胶

囊随后可经由所述的开口取出。

可能希望提供书面记忆辅助物，其中所述书面记忆辅助物为含有医师、药剂师或个体可用的信息和/或说明书的型式，例如，呈紧跟锭剂或胶囊的编号的形式的，由此所述编号对应于应摄取所指定的锭剂或胶囊的方案的天数，或含有相同类型的信息的卡片。所述记忆辅助物的另一实例为印刷于卡片上的日历，例如，如同下述“第一周，星期一、星期二”等，“第二周，星期一、星期二”等。记忆辅助物的其他变体将显而易见。

试剂盒的另一特定实施例为设计用于一次一个分配日剂量的分配器。所述分配器可配备有记忆辅助物以进一步有助于顺从方案。所述记忆辅助物的实例为指示已分配的日剂量的数目的机械计数器。所述记忆辅助物的另一实例为电池供电的微芯片存储器，其与（例如）读出已服用的上次日剂量的日期和/或提醒服用下次剂量的时间的液晶读出或可听提醒信号耦合。

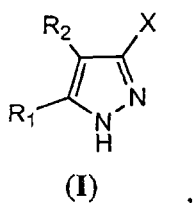
本发明进一步提供一种预防或治疗脂质相关病症的试剂盒，所述试剂盒包含至少一个剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个分离剂量单位的烟酸或烟酸类似物，其中所述烟酸受体部分促效剂所存在的量为降低所述个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的有效量且其中所述烟酸或烟酸类似物所存在的量为改变脂质的量。在一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸，且在另一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸类似物。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，发红完全降低或消除。在又一个实施例中，烟酸或烟酸类似物的所述剂量单位为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基；R₁ 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R₂ 为 H；或 R₁ 和 R₂ 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-咪唑并[3,4-c]吡唑、3-(1H-

四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述试剂盒进一步包含至少一种选自由以下各物组成的群组的药剂： α -葡糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

另外，本发明提供一种预防或治疗脂质相关病症的试剂盒，所述试剂盒包含至少一个预剂量单位的烟酸受体部分促效剂和至少一个分离剂量单位的烟酸或烟酸类似物，其中所述烟酸受体部分促效剂所存在的量为降低所述个体体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的有效量且其中所述烟酸或烟酸类似物所存在的量为改变脂质的量。预剂量单位为意欲在一些其他剂量单位之前投与的烟酸受体部分促效剂的剂量。在一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸，且在另一个实施例中，所述试剂盒包含剂量单位的烟酸类似物。在一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的结构类似物，且在另一个实施例中，所述烟酸类似物为烟酸的功能类似物。在另一个实施例中，发红完全降低或消除。在又一个实施例中，烟酸或烟酸类似物的所述剂量单位为每天至少 500 毫克。在一个实施例中，所述烟酸受体部分促效剂包含式 (I) 化合物：



或其医药学上可接受的盐，其中：X 为羧基或四唑-5-基； R_1 为异丙基、3-氟-苄基、3-氯-苄基或 3-溴-苄基；及 R_2 为 H；或 R_1 和 R_2 连同其所连接的两个吡唑环碳一起形成视需要经乙基取代的 5 元碳环，或视需要经甲基取代的 5 元杂环。举例来说，所述烟酸受体部分促效剂可包含选自由以下各物组成的群组的化合物：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑、5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸、6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-1,6-二氢-环戊吡唑、3-(1H-四唑-5-基)-2,6-二氢-4H-呋喃并[3,4-c]吡唑、5-乙基

-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑以及 5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑，或其医药学上可接受的盐。在另一个实施例中，所述试剂盒进一步包含至少一种选自以下各物组成的群组的药剂： α -葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶抑制剂、缩二脲、HMG-CoA 还原酶抑制剂、角鲨烯合成抑制剂、纤维酸酯、LDL 分解代谢增强剂、血管紧张素转化酶抑制剂、胰岛素分泌增强剂以及噻唑烷二酮。

本文所使用的诸如“例如”和“包含”的一般术语在本文中根据其标准含义定义。术语“例如”和“诸如”意欲为例示性的而非限制性的。

本发明的一个方面涉及如本文所述的烟酸受体部分促效剂和烟酸或烟酸类似物，其用于由疗法治疗人类或动物体的方法中。

本发明的另一方面涉及如本文所述的烟酸受体部分促效剂，其用于由疗法治疗人类或动物体内由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法中。本发明的另一方面涉及一种治疗由烟酸或烟酸类似物诱发的发红的方法，所述方法包含优选地以医药组合物形式向患有所述病状的个体投与治疗有效剂量的如本文所述的烟酸受体部分促效剂。

本发明的一个方面涉及一种治疗脂质相关病症的方法，所述方法包含优选地以医药组合物形式向患有所述病状的个体投与治疗有效剂量的如本文所述的烟酸受体部分促效剂和烟酸或烟酸类似物。本发明的另一方面涉及如本文所述的烟酸受体部分促效剂和烟酸或烟酸类似物，其用于由疗法治疗人类或动物体内脂质相关病症的方法中。

本发明的一个方面涉及如本文所述的烟酸受体部分促效剂和烟酸或烟酸类似物用于制造供治疗由烟酸或烟酸类似物诱发的发红使用的药剂的用途。本发明的另一方面涉及如本文所述的烟酸受体部分促效剂用于制造供治疗由烟酸或烟酸类似物诱发的发红使用的药剂的用途。另外，本发明的一个方面涉及如本文所述的烟酸受体部分促效剂和烟酸或烟酸类似物用于制造供治疗脂质相关病症使用的药剂的用途。

实例

下列实例出于说明性目的而非限制性手段加以提供。所属领域的技术人员应能够基于本文的揭露内容设计等价的检定和方法，所有该等检定和方法形成本发明的部分。

实例 1

烟酸受体部分促效剂阻滞由烟酸诱发的发红

这个实例展示烟酸受体部分促效剂可阻滞由烟酸诱发的发红。测试表 A 的数种烟酸受体部分促效剂阻滞小鼠体内烟酸诱发的发红的能力。使用激光多普勒法测量发红。

在这些实验中，对照组含有仅投与烟酸的麻痹小鼠且随时间测量基线以上的发红。

实验组含有投与烟酸之前约 10 分钟投与烟酸受体部分促效剂的麻痹小鼠。随后，随时间测量投与烟酸后，基线以上的发红且与仅经烟酸处理的小鼠相比。

代表性数据：

仅经烟酸处理的对照小鼠 1.5 分钟后开始发红，3 分钟时在基线约 150%处出现发红峰值且约 15 分钟内返回到基线约 30%处。

化合物 2: 仅经烟酸处理的小鼠 1.5 分钟后开始发红，3 分钟时在基线约 100%到 150%处出现发红峰值且约 15 分钟内返回到基线约 30%到 45%处。投与烟酸之前，用化合物 2 处理小鼠在 3 分钟时产生从基线 0%的变化，15 分钟内产生从基线缓慢增加到基线以上约 15%的变化。投与烟酸之前，用化合物 3 处理小鼠在 3 分钟时产生从基线约 18%的变化，15 分钟时产生从基线缓慢减少到基线以上约 13%的变化。投与烟酸之前，用化合物 4 处理小鼠在 3 分钟时产生从基线 15%的变化，15 分钟内产生从基线缓慢增加到基线以上约 30%的变化。

实例 2

经烟酸受体部分促效剂处理的小鼠保留对 PGD₂ 投与作出反应发红的能力

如实例 1 所示，用烟酸受体部分促效剂处理小鼠会阻滞由烟酸诱发的发红。所述实例展示经烟酸受体部分促效剂处理的小鼠当给予已知的诱发发红的药剂 PGD₂ 时保留发红能力。

在这个实验中，小鼠在投与烟酸之前，经化合物 1 处理约 10 分钟且如实例 1 执行所述实验。重建基线后，投与 PGD₂ 且记录发红。具体来说，在这个实验中，仅经烟酸处理的小鼠 1.5 分钟后开始发红，3 分钟时在基线约 60%处出现发红峰值且约 15 分钟内返回到基线约 20%处。投与烟酸之前，用化合物 1 处理小鼠约 10 分钟，3 分钟时产生从基线 10%的变化，15 分钟内产生从基线缓慢增加到基线以上约 20%的变化。随后在基线以上 20%重建基线且投与 PGD₂。约 1.5 分钟后开始发红且投与 PGD₂ 后约 6 分钟在原始基线约 70%处出现峰值。这个实验展示当给予 PGD₂ 时，虽然小鼠发红的能力并未由烟酸受体部分促效剂减少，但由烟酸诱发的发红显著降低。

实例 3

NEFA 竞争

这个实例展示烟酸受体部分促效剂（化合物 1）并不干扰由烟酸诱发的游离脂肪酸的降低。

给予小鼠：媒介、媒介+烟酸或化合物 1+烟酸。10 分钟后，使小鼠安乐死且收集血

液。加工血样且使用非酯化脂肪酸（NEFA）检定（来自 Waco Chemicals USA, Richmond, VA 的 NEFA-C 检定试剂盒）测试血样的游离脂肪酸释放。

按照制造商建议的方案进行 NEFA 检定。所测量的媒剂样品的游离脂肪酸浓度为 0.9 mM，媒剂+烟酸的为 0.4 mM 且化合物 1+烟酸的为 0.38 mM。因此，烟酸受体部分促效剂并不干扰由烟酸诱发的游离脂肪酸的降低。

实例 4

大鼠中游离脂肪酸水平和人类脂肪细胞的脂解的测量

这个实例展示游离脂肪酸水平可在大鼠中测量。这个实例也展示游离脂肪酸水平可在人类脂肪细胞中测量。

大鼠检定

将导管用外科手术植入雄性 Sprague Dawley 大鼠的颈静脉中。给大鼠几天时间自导管植入外科手术中恢复，且随后，接下来几天不给大鼠的食物且约 16 小时后以每公斤体重 15 毫克、每公斤体重 30 毫克或每公斤体重 45 毫克腹膜内（IP）注射媒剂或烟酸[NA]。可以同样方式测试烟酸类似物。在不同时间点抽血（约 200 ml）且在离心作用后分离血浆。随后经由 NEFA C 试剂盒根据制造商的说明书（Wako Chemicals USA, Inc）测量血浆 FFA。

人类脂肪细胞脂解检定：

脂肪细胞获自 ZenBio（Research Triangle, North Carolina）且根据制造商的方案执行脂解检定。细胞内 cAMP 含量的升高和经由激素敏感性脂肪酶的脂解的伴随性激活使用异丙基肾上腺素以凭经验确定的浓度和时间实现。在存在或不存在所关注的化合物（例如，烟酸或烟酸类似物）的情况下，允许脂解持续合乎需要的时间。测试至少 5 种化合物浓度以用于非线性回归分析和 EC₅₀ 值的测定。比色测量甘油产量的百分率且与标准物（ZenBio）相比。

实例 5

小鼠动脉粥样硬化模型

已展示通过剔除脂联素基因而产生的缺乏脂联素的小鼠易感染动脉粥样硬化且为胰岛素抗性。所述小鼠也为缺血性心脏病的合适模型 [Matsuda, M 等人, J Biol Chem (2002)(7 月)和其中所引用的参考文献，其揭露内容的整体以引用的方式并入本文中]。

将脂联素剔除小鼠安置在标准实验室条件下，在 22°C 和 50%相对湿度下（7-9 只小鼠/笼）。通过微渗透泵给小鼠投药，使用异氟烷麻醉扎针以经皮下（s.c）方式提供本发

明的化合物、盐水或与小鼠不相干的化合物。测定以不同时间间隔处死的不同小鼠群组的新生内膜增厚和缺血性心脏病。使用学生 T 检验评估群组之间的显著差异（比较本发明的化合物与盐水治疗）。

动脉粥样硬化的上述小鼠模型以举例说明的方式而非限制性方式提供。进一步举例来说，也已展示缺乏载脂蛋白 E 的小鼠易感染动脉粥样硬化 [Plump AS 等人, *Cell* (1992) 71:343-353; 其揭露内容的整体以引用的方式并入本文中]。

可使用的另一模型为 C57BL/6J 小鼠体内由饮食诱发的动脉粥样硬化，所述小鼠为已知易感染饮食诱发的动脉粥样硬化的病变形成的纯系株。所述模型为所属领域的技术人员所熟知 [Kamada N 等人, *J Atheroscler Thromb* (2001) 8:1-6; Garber DW 等人, *J Lipid Res* (2001) 42:545-52; Smith JD 等人, *J Intern Med* (1997) 242:99-109; 每篇参考文献的揭露内容的整体以引用的方式并入本文中]。

实例 6

HDL 胆固醇和动脉粥样硬化的活体内猪模型

本发明的化合物作为医学药剂在预防或治疗脂质相关病症中的效用（例如）通过活体内猪模型中化合物降低总胆固醇与 HDL 胆固醇的比率、升高 HDL 胆固醇或保护以免遭受动脉粥样硬化的活性得以证明。因为猪比大多数其他动物模型更接近地反映人体生理学，尤其脂类代谢，所以将其用作动物模型。此处出现说明性的活体内猪模型，而并不意欲限制本发明。

在 50 天期间，给约克夏白化病猪（Yorkshire albino pigs）（体重 25.5 ± 4 kg）喂富含饱和脂肪酸和富含胆固醇（SFA-CHO）的饮食（每 35 千克猪体重 1 千克食物），所述饮食包括标准食物，补充有 2%胆固醇和 20%牛脂[Royo T 等人, *European Journal of Clinical Investigation* (2000) 30:843-52; 所述揭露内容的整体以引用的方式并入本文中]。饱和与不饱和脂肪酸的比率从正常猪食物中的 0.6 修改为 SFA-CHO 饮食中的 1.12。将动物分为两个群组，一个群组（ $n = 8$ ）喂以 SFA-CHO 饮食且经安慰剂处理，且一个群组（ $n = 8$ ）喂以 SFA-CHO 饮食且经调节剂处理（ $3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ）。给对照动物喂标准食物持续 50 天的时间。基线时（接收动物后 2 天）和开始所述饮食后 50 天收集血样。分析血液脂质。将动物处死且验尸。

或者，上述分析包含复数个各经不同剂量的所关注的化合物处理的群组。剂量包括（例如）： $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以及 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。或者，在复数个时间点，例如 10 周、20 周、30 周、40 周以及 50 周时

进行上述分析。

HDL 胆固醇

将血液收集在柠檬酸三钠中 (3.8%, 1:10)。在离心作用后获得血浆 (1200 g, 15 min) 且立即加工。使用自动分析器 Kodak Ektachem DT System (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) 测量总胆固醇、HDL 胆固醇以及 LDL 胆固醇。将具有范围以上的值参数的样品用由制造商提供的溶液稀释, 且随后重分析。测定总胆固醇/HDL 胆固醇比率。进行群组之间 HDL 胆固醇的含量的比较。进行群组之间总胆固醇/HDL 胆固醇比率的比较。

投与所关注的化合物后, HDL 胆固醇的升高或总胆固醇/HDL 胆固醇比率的降低视为所述化合物具有上述效用的指示。

动脉粥样硬化

沿腹部表面纵向开口, 将胸和腹主动脉完整地去除, 且从胸和腹主动脉的标准部位切除样品以用于组织学检查和脂质组成以及合成研究后, 将胸和腹主动脉固定在中性缓冲福尔马林中。固定之后, 将整个主动脉用苏丹 IV (Sudan IV) 染色且平坦钉住, 且用连接于计算机化图像分析系统的电视摄像机获得数字图像 (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD) 以确定涉及动脉粥样硬化病变的主动脉表面的百分率 [Gerrity RG 等人, Diabetes (2001) 50:1654-65; Cornhill JF 等人, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (1985) 5:415-26; 所述揭露内容的整体以引用的方式并入本文中]。进行群组之间涉及动脉粥样硬化病变的主动脉表面的百分率的比较。

投与所关注的化合物之后, 涉及动脉粥样硬化病变的主动脉表面的百分率降低视为所述化合物具有上述效用的指示。

血浆游离脂肪酸

所属领域的任何技术人员应显而易见: 上述活体内猪模型可容易地被修改以阐明 (非限制) 化合物降低血浆游离脂肪酸的活性。

实例 7

测定 GPCR 激活的检定

多种方法可用于评定人类 GPCR 的激活。以下为说明性的, 相信所属领域的技术人员具有能力确定那些优先地有利于技术人员的技术。

1. 膜结合检定: [³⁵S]GTP γ S 检定

当 G 蛋白偶合受体因配位体结合或组成性激活而处于其活性状态时, 所述受体与 G

蛋白偶合且刺激 GDP 的释放和随后 GTP 与 G 蛋白的结合。G 蛋白-受体复合体的 α 亚单元充当 GTP 酶且使 GTP 缓慢水解为 GDP，此时受体通常失活。激活的受体继续将 GDP 换成 GTP。非可水解 GTP 的类似物， $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ，可用于证明 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 与表达激活受体的膜的结合增强。使用 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 结合测量激活的优点在于：(a) 通常适用于所有 G 蛋白偶合受体；(b) 其最接近膜表面使得采集影响细胞内级联的分子的可能性更小。

所述检定利用 G 蛋白偶合受体刺激 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 与表达有关受体的膜的结合的能力。因此，检定可用于直接鉴别法中以筛选内源 GPCR 和非内源组成性激活 GPCR 的候选化合物。所述检定具有普遍性且具有针对所有 G 蛋白偶合受体的药物发现的应用。

将 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 检定在 20 mM HEPES 和 1 mM 与约 20 mM 之间的 MgCl_2 (虽然 20 mM 为优选的，但所述量可调整以使结果最优化) (pH 7.4)、具有约 0.3 nM 与约 1.2 nM 之间的 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 的结合缓冲液 (虽然 1.2 为优选的，但所述量可调整以使结果最优化) 和 12.5 μg 到 75 μg 膜蛋白 (例如，293 个表达 GPR35 的细胞，所述量可调整以使结果最优化) 以及 10 μM GDP (所述量可改变以最优化) 中培育 1 小时。随后添加麦芽凝集素珠粒 (25 μl ; Amersham) 且将混合物在室温下再培育 30 分钟。随后，将试管在室温下以 $1500\times g$ 离心 5 分钟，且随后在闪烁计数器中计数。

2. 腺苷酰基环化酶

可将设计用于基于细胞的检定的 Flash Plate™腺苷酰基环化酶试剂盒 (New England Nuclear, 目录号: SMP004A) 修改以与粗质血浆膜一起使用。Flash Plate 孔含有也含有识别 cAMP 的特异性抗体的闪烁体涂层。孔中所产生的 cAMP 可通过直接竞争放射性 cAMP 示踪物与 cAMP 抗体的结合来定量。下文充当简短方案用于测量表达受体的全细胞中 cAMP 含量的变化。

瞬时转染之后约 24 小时，采集转染细胞。将培养基小心地抽吸出来且舍弃。将 10 ml PBS 平缓地添加到各碟细胞中，接着小心抽吸。将 1 ml Sigma 细胞解离缓冲液和 3 ml PBS 添加到各板中。将细胞吸出板且将细胞悬浮液收集于 50 ml 圆锥型离心管中。随后，将细胞在室温下在 1,100 rpm 下离心 5 分钟。将细胞小球小心地再悬浮于适当体积的 PBS (约 3 ml/板) 中。随后，将细胞使用血细胞计数器计数且再添加 PBS 以产生适当数目的细胞 (最终体积为约 50 μl /孔)。

制备 cAMP 标准物和检测缓冲液 (11 ml 检测缓冲液包含 1 μCi 示踪物 $[^{125}\text{I}]\text{cAMP}$ (50 μl)) 且根据制造商的说明书维护。新鲜制备用于筛选的检定缓冲液且其含有 50 μl 刺激缓冲液、3 μl 候选化合物 (12 μM 最终检定浓度) 和 50 μl 细胞。在使用之前，将检定缓

冲液存储在冰上。优选地在（例如）96孔板中进行的检定通过添加 50 μ l cAMP 标准物到适当孔中开始，接着添加 50 μ l PBSA 到孔 H11 和 H12 中。将 50 μ l 刺激缓冲液添加到所有孔中。使用能够分配 3 μ l 化合物溶液的加样头（pin tool）将 DMSO（或选定的候选化合物）添加到适当孔中，其中最终检定浓度为 12 μ M 候选化合物和总检定体积为 100 μ l。随后，将细胞添加到孔中且在室温下培育 60 分钟。随后，将 100 μ l 含有示踪物 cAMP 的检测混合物添加到孔中。随后，将板再培育 2 小时，接着在 Wallac MicroBeta 闪烁计数器中计数。随后，由包含于各检定板中的标准 cAMP 曲线外推 cAMP/孔的值。

3. Gi 耦合靶 GPCR 的基于细胞的 cAMP

TSHR 为 Gs 耦合 GPCR，其在激活后会引起 cAMP 的积聚。TSHR 可通过使氨基酸残基 623 突变（也就是，将丙氨酸残基改为异亮氨酸残基）组成性激活。希望 Gi 耦合受体抑制腺苷酰基环化酶，且因此降低 cAMP 产量的水平，此可能使 cAMP 水平的评定具有挑战性。测量作为激活 Gi 耦合受体的指示的 cAMP 产量的减少的有效技术可通过使作为“信号增强剂”的非内源性组成性激活 TSHR（TSHR-A623I）（或内源性组成性活性 Gs 耦合受体）与 Gi 连接的靶 GPCR 共转染以建立 cAMP 的基线水平来实现。产生内源或非内源型 Gi 耦合受体之后，随后将靶 GPCR 与信号增强剂共转染，且靶 GPCR 为可用于筛选的物质。在一些实施例中，此方法优选地用于候选化合物相对于 Gi 耦合受体的直接鉴别中。应注意，对 Gi 耦合 GPCR 来说，当使用此方法时，靶 GPCR 的反向促效剂将增加 cAMP 信号且促效剂将降低 cAMP 信号。

第 1 天，涂覆 2×10^4 个 293 细胞/孔。第 2 天，准备两个反应试管（各试管遵循的比例根据板而定）：试管 A：通过将 2 μ g 各转染于哺乳动物细胞中的受体的 DNA，总计 4 μ g DNA（例如，pCMV 载体；具有突变 TSHR（TSHR-A623I）的 pCMV 载体；TSHR-A623I 和 GPCR 等），混合于 1.2 ml 无血清 DMEM（Irvine Scientific, Irvine, CA）中准备；试管 B：通过将 120 μ l lipofectamine（Gibco BRL）混合于 1.2 ml 无血清 DMEM 中准备。随后，将试管 A 和 B 通过倒转（数次）混合，接着在室温下培育 30-45 分钟。混合物指“转染混合物”。将经涂覆的 293 细胞用 1 $\times$ PBS 洗涤，接着添加 10 ml 无血清 DMEM。随后，将 2.4 ml 转染混合物添加到细胞中，接着在 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 下培育 4 小时。随后，将转染混合物通过抽吸除去，接着添加 25 ml DMEM/10%胎牛血清。随后，将细胞在 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 下培育。24 小时培育之后，采集细胞且用于分析。

虽然设计 Flash Plate™腺苷酰基环化酶试剂盒（New England Nuclear，目录号：SMP004A）用于基于细胞的检定，但取决于熟练的技术人员的需要可将其加以修改以与

粗质血浆膜一起使用。Flash Plate 孔含有也含有识别 cAMP 的特异性抗体的闪烁体涂层。孔中所产生的 cAMP 可通过直接竞争放射性 cAMP 示踪物与 cAMP 抗体的结合来定量。下文充当简短方案用于测量表达所关注受体的全细胞中 cAMP 含量的变化。

瞬时转染之后约 24 小时, 采集转染细胞。将培养基小心地抽吸出来且舍弃。将 10 ml PBS 平缓地添加到各碟细胞中, 接着小心抽吸。将 1 ml Sigma 细胞解离缓冲液和 3 ml PBS 添加到各板中。将细胞吸出板且将细胞悬浮液收集于 50 ml 圆锥型离心管中。随后, 将细胞在室温下在 1,100 rpm 下离心 5 分钟。将细胞小球小心地再悬浮于适当体积的 PBS (约 3 ml/板) 中。随后, 将细胞使用血细胞计数器计数且再添加 PBS 以产生适当数目的细胞 (最终体积为约 50 μ l/孔)。

制备 cAMP 标准物和检测缓冲液 (11 ml 检测缓冲液包含 1 μ Ci 示踪物 [125 I]cAMP (50 μ l)) 且根据制造商的说明书维护。新鲜制备用于筛选的检定缓冲液且其含有 50 μ l 刺激缓冲液、3 μ l 候选化合物 (12 μ M 最终检定浓度) 和 50 μ l 细胞。在使用之前, 将检定缓冲液存储在冰上。检定通过添加 50 μ l cAMP 标准物到适当孔中开始, 接着添加 50 μ l PBSA 到孔 H11 和 H12 中。将 50 μ l 刺激缓冲液添加到所有孔中。使用能够分配 3 μ l 化合物溶液的加样头将选定的化合物 (例如 TSH) 添加到适当孔中, 其中最终检定浓度为 12 μ M 候选化合物和总检定体积为 100 μ l。随后, 将细胞添加到孔中且在室温下培育 60 分钟。随后, 将 100 μ l 含有示踪物 cAMP 的检测混合物添加到孔中。随后, 将板再培育 2 小时, 接着在 Wallac MicroBeta 闪烁计数器中计数。随后, 由包含于各检定板中的标准 cAMP 曲线外推 cAMP/孔的值。

4. 基于报告基因的检定

a. CRE-LUC 报告基因检定 (Gs 相关受体)

将 293 或 293T 细胞以每孔 2×10^4 个细胞的密度涂覆于 96 孔板且次日, 根据制造商的说明书使用 Lipofectamine 试剂 (BRL) 转染。如下为各 6 孔转染制备 DNA/脂质混合物: 将于 100 μ l DMEM 中的 260 ng 质粒 DNA 与于 100 μ l DMEM 中的 2 μ l 脂质温和地混合 (260 ng 质粒 DNA 由 200 ng 8 $\times$ CRE-Luc 报告基因质粒、50 ng 包含内源受体或非内源受体的 pCMV 或仅 pCMV 以及 10 ng GPRS 表达质粒 (于 pcDNA3 (Invitrogen) 中的 GPRS) 组成)。8 $\times$ CRE-Luc 报告基因质粒如下制备: 载体 SRIF- β -gal 通过将大鼠生长抑素启动子 (-71/+51) 克隆于 p β gal-Basic 载体 (Clontech) 的 BglV-HindIII 位点处而获得。cAMP 反应元件的八个复本通过腺病毒模板 AdpCF126CCRE8 的 PCR 获得 (参见, Suzuki 等人., Hum Gene Ther 7:1883-1893 (1996)); 其揭露内容的整体以引用的方式并入

本文中)且克隆于 SRIF- β -gal 载体 Kpn-BglIV 位点处,产生 8 $\times$ CRE- β -gal 报告基因载体。8 $\times$ CRE- Luc 报告基因质粒通过用在 pGL3-basic 载体 (Promega) HindIII- BamHI 位点处获得的荧光素酶基因替换 8 $\times$ CRE- β -gal 报告基因载体中的 β -半乳糖苷酶基因产生。在室温下培育 30 分钟之后,将 DNA/脂质混合物用 400 μ l DMEM 稀释且将 100 μ l 经稀释混合物添加到各孔中。在细胞培养培育箱中培育 4 小时之后,将 100 μ l 具有 10% FCS 的 DMEM 添加到各孔中。次日,所转染的细胞改为每孔 200 μ l 具有 10% FCS 的 DMEM。八小时后,用 PBS 洗涤一次后,将孔改为每孔 100 μ l 无酚红的 DMEM。第二天,按照制造商的说明书使用 LucLite™ 报告基因检定试剂盒 (Packard) 测量荧光素酶的活性且在 1450 MicroBeta™ 闪烁和冷光计数器 (Wallac) 上读数。

b. AP1 报告基因检定 (Gq 相关受体)

检测 Gq 刺激的方法取决于 Gq 依赖性磷脂酶 C 使其启动子中含 AP1 元件的基因激活的已知性质。可按照上述关于 CREB 报告基因检定所述的方案,除磷酸钙沉淀的组分为 410 ng pAP1-Luc、80 ng pCMV 受体表达质粒和 20 ng CMV-SEAP 外,使用 Pathdetect™ AP-1 顺-报告系统 (Stratagene, 目录号: 219073)。

c. SRF-LUC 报告基因检定 (Gq 相关受体)

一种检测 Gq 刺激的方法取决于 Gq 依赖性磷脂酶 C 使其启动子中含血清反应因子的基因激活的已知性质。Pathdetect™ SRF-Luc 报告系统 (Stratagene) 可用于 (例如) COS7 细胞中 Gq 耦合活性的检定。根据制造商的说明书使用哺乳动物 Transfection™ 试剂盒 (Stratagene, 目录号: 200285), 将细胞用系统的质粒组分和编码内源或非内源 GPCR 的所指示的表达质粒转染。简单来说,按照制造商的说明书,将 410 ng SRF-Luc、80 ng pCMV 受体表达质粒以及 20 ng CMV-SEAP (所分泌的碱性磷酸酶表达质粒;在转染细胞的培养基中测量碱性磷酸酶活性以控制样品之间转染效率的变化) 组合于磷酸钙沉淀中。将沉淀的一半均等分布在 96 孔板的 3 个孔上且保持在无血清培养基中的细胞上持续 24 小时。最后 5 小时,将细胞与 (例如) 1 μ M 候选化合物一起培育。随后,将细胞溶解且按照制造商的说明书使用 LucLite™ 试剂盒 (packard, 目录号: 6016911) 和 “Trilux 1450 Microbeta” 液体闪烁和冷光计数器 (Wallac) 检定其荧光素酶活性。数据可使用 GraphPad Prism™ 2.0a (GraphPad Software Inc.) 分析。

d. 细胞内 IP3 积聚检定 (Gq 相关受体)

第 1 天,将包含所关注的受体 (内源或非内源) 的细胞涂覆于 24 孔板上,通常 1×10^5 个细胞/孔 (但所述数目可最优化)。第 2 天,可将细胞通过首先将每孔 0.25 μ g 于 50 μ l

无血清的 DMEM 中的 DNA 与每孔 2 μ l 于 50 μ l 无血清的 DMEM 中的 lipofectamine 混合而转染。将溶液温和地混合且在室温下培育 15-30 分钟。将细胞用 0.5 ml PBS 洗涤且将 400 μ l 无血清的培养基与转染培养基混合且添加到细胞中。随后, 将细胞在 37°C/5% CO₂ 下培育 3-4 小时, 且随后除去转染培养基且用 1 ml/孔正常生长培养基替换。第 3 天, 将细胞用 ³H-肌醇标记。简单来说, 除去培养基且将细胞用 0.5 ml PBS 洗涤。随后, 添加每孔 0.5 ml 无肌醇/无血清培养基 (GIBCO BRL) 和每孔 0.25 μ Ci ³H-肌醇且将细胞在 37°C/5% CO₂ 下培育 16-18 小时隔夜。第 4 天, 将细胞用 0.5 ml PBS 洗涤且添加 0.45 ml 含有无肌醇/无血清的培养基、10 μ M 巴吉林 (pargyline)、10 mM 氯化锂的检定培养基或若使用含血清素受体的对照构建体, 则添加 0.4 ml 检定培养基和 50 μ l 10 $\times$ 酮色林 (ketanserin) (ket) 以使最终浓度为 10 μ M。随后, 将细胞在 37°C 下培育 30 分钟。随后, 将细胞用 0.5 ml PBS 洗涤且每孔添加 200 μ l 新鲜/冰冷停止溶液 (1 M KOH; 18 mM 硼酸钠; 3.8 mM EDTA)。将溶液保持在冰上 5-10 分钟或直到细胞溶解且随后用 200 μ l 新鲜/冰冷中和溶液 (7.5% HCL) 中和。随后, 将溶解产物转移到 1.5 ml eppendorf 试管中且每试管添加 1 ml 三氯甲烷/甲醇 (1:2)。使溶液涡旋 15 秒且将上面的相施加于 Biorad AG1-X8™ 阴离子交换树脂 (100-200 目)。首先, 将树脂用水以 1:1.25 W/V 洗涤且将 0.9 ml 上面的相装载于管柱上。将管柱用 10 ml 5 mM 肌醇和 10 ml 5 mM 硼酸钠/60 mM 甲酸钠洗涤。将肌醇三磷酸酯洗脱于含有 10 ml 闪烁混合物和 2 ml 0.1 M 甲酸/1 M 甲酸铵的闪烁管中。通过用 10 ml 0.1 M 甲酸/3 M 甲酸铵洗涤使管柱再生且用去离子水漂洗两次且在 4°C 下存储于水中。

实例 8

融合蛋白制备

a. GPCR:Gs 融合构建体

GPCR-G 蛋白融合构建体的设计可如下实现: 将大鼠 G 蛋白 Gs α 的 5'端和 3'端 (long form; Itoh, H. 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:3776 (1986)) 工程化以在其上包括 HindIII 序列。确认正确序列 (包括侧面 HindIII 序列) 之后, 通过使用载体的 HindIII 限制酶切位点亚克隆将整个序列穿梭于 pcDNA3.1(-) (Invitrogen, 目录号: V795-20) 中。Gs α 序列的正确方向在亚克隆于 pcDNA3.1(-) 中之后确定。随后证实在 HindIII 序列上含有大鼠 Gs α 基因的所修饰的 pcDNA3.1(-); 所述载体现在可用作“通用”Gs α 蛋白载体。由于 pcDNA3.1(-) 载体在 HindIII 位点上游含有多个众所周知的限制酶切位点, 因此有利地提供在 Gs 蛋白的上游插入所关注的受体的编码序列的能力。相同方法可用于产生其他“通

用” G 蛋白载体，且当然，可使用其他技术人员已知的市售或专利载体，重要的标准为 GPCR 的序列在 G 蛋白序列的上游和框内。

b. Gq (6 个氨基酸缺失) /Gi 融合构建体

Gq (del) /Gi 融合构建体的设计可如下实现：使 Gαq 亚单元的 N 末端六个氨基酸（氨基酸 2 到 7，具有 TLESIM 序列 (SEQ ID NO:3)）缺失且将具有序列 EYNLV (SEQ ID NO:4) 的 C 末端五个氨基酸用具有序列 DCGLF (SEQ ID NO:5) 的 Gαi 蛋白的相应氨基酸替换。所述融合构建体可通过 PCR 使用下文引物获得：

5'-gatcAAGCTTCCATGGCGTGCTGCCTGAGCGAGGAG-3' (SEQ ID NO:6) 和

5'-gatcGGATCCTTAGAACAGGCCGCGAGTCCTTCAGGTTTCAGCTGCAGGATGGTG-3' (SEQ ID NO:7)

和含有以血球凝集素标记为模板的小鼠 Gαq 野生型版本的质粒 63313。包括较低帽 (lower caps) 中的核苷酸作为间隔区。

TaqPlus Precision DNA 聚合酶 (Stratagene) 可用于通过下列周期将步骤 2 到 4 重复 35 次扩增：95°C 2 分钟；95°C 20 秒；56°C 20 秒；72°C 2 分钟以及 72°C 7 分钟。或将 PCR 产物克隆于 pCRII-TOPO 载体 (Invitrogen) 中且使用 ABI Big Dye Terminator 试剂盒 (P.E. Biosystems) 定序。可将来自含有融合构建体的序列的 TOPO 纯系的插入物通过两步克隆法穿梭于表达载体 pcDNA3.1(+) HindIII / BamHI 位点处。也参见，2002 年 9 月 6 日公开为 WO02068600 的 PCT 专利申请第 PCT/US02/05625 号，其揭露内容的整体以引用的方式并入本文中。

实例 9

[³⁵S]GTPγS 检定

A. 膜制备

在一些实施例中，供鉴别作为（例如）促效剂、反向促效剂或拮抗剂的候选化合物使用的包含所关注的靶 GPCR 的膜制备如下：

a. 物质

“膜刮落缓冲液”包含 20 mM HEPES 和 10 mM EDTA (pH 7.4)；“膜洗涤缓冲液”包含 20 mM HEPES 和 0.1 mM EDTA (pH 7.4)；“结合缓冲液”包含 20 mM HEPES、100 mM NaCl 和 10 mM MgCl₂ (pH 7.4)。

b. 程序

所有物质在整个程序中保持在冰上。首先，自细胞的汇合单层抽吸培养基，接着用 10 ml 冷 PBS 漂洗，接着抽吸。此后，将 5 ml 膜刮落缓冲液添加到刮落细胞中；此后将

细胞提取物转移到 50 ml 离心管中（在 4℃ 下在 20,000 rpm 下离心 17 分钟）。此后，抽吸上清液且将小球再悬浮于 30 ml 膜洗涤缓冲液中，接着在 4℃ 下在 20,000 rpm 下离心 17 分钟。随后，抽吸上清液且将小球再悬浮于结合缓冲液中。随后，将其使用 Brinkman Polytron™ 均质器（爆发 15-20 秒直到所有物质处于悬浮状态）均质化。在本文中，其称为“膜蛋白”。

Bradford 蛋白检定

均质化之后，使用 Bradford 蛋白检定测定膜的蛋白浓度（可将蛋白稀释到约 1.5 mg/ml，等分且冷冻（-80℃）以便稍后使用；当冷冻时，使用方案将如下：检定当天，将冷冻膜蛋白在室温下解冻，接着涡旋且随后用 Polytron 在约 12×1,000 rpm 下均质化约 5-10 秒；应注意，对多个制剂来说，在均质化不同制剂之间应对均质器彻底清洗）。

a. 物质

按照制造商的说明书（Biorad，目录号：500-0006）使用结合缓冲液（如上所述）；Bradford 染料试剂；Bradford 蛋白标准物。

b. 程序

准备两只重复试管，一只包括膜且一只作为对照“空白”。各试管含有 800 μl 结合缓冲液。此后，将 10 μl Bradford 蛋白标准物（1 mg/ml）添加到各试管中，且随后将 10 μl 膜蛋白添加到仅一只试管（不是空白）。此后，将 200 μl Bradford 染料试剂添加到各试管中，接着使各试管涡旋。五分钟之后，将试管再涡旋且将其中的物质转移到小玻璃管中。将小玻璃管使用 CECIL 3041 分光光度计在 595 波长下读数。

鉴别检定

a. 物质

GDP 缓冲液由 37.5 ml 结合缓冲液和 2 mg GDP 组成（Sigma，目录号：G-7127）组成，接着连续稀释于结合缓冲液中以获得 0.2 μM GDP（各孔中 GDP 的最终浓度为 0.1 μM GDP）；包含候选化合物的各孔具有 200 μl 的最终体积，由 100 μl GDP 缓冲液（最终浓度为 0.1 μM GDP）、50 μl 于结合缓冲液中的膜蛋白和 50 μl 于结合缓冲液中的 [³⁵S]GTPγS（0.6 nM）（每 10 ml 结合缓冲液 2.5 μl [³⁵S]GTPγS）组成。

b. 程序

候选化合物可使用 96 孔板格式进行筛选（其可在 -80℃ 下冷冻）。可将膜蛋白（或除靶 GPCR 以外的具有表达载体的膜，作为对照）短暂均质化直到悬浮。蛋白质浓度可使用以上所陈述的 Bradford 蛋白检定测定。将膜蛋白（和对照）用结合缓冲液稀释为 0.25

mg/ml (最终检定浓度为 12.5 微克/孔)。此后, 将 100 μ l GDP 缓冲液添加到 Wallac Scintistrip™ (Wallac) 的各孔中。使用 5 μ l 加样头以将 5 μ l 候选化合物转移到所述孔中 (也就是, 5 μ l 于 200 μ l 的总检定体积中为 1:40 的比率以致候选化合物的最终筛选浓度为 10 μ M)。并且, 为避免污染, 各转移步骤后, 应将加样头在三个包含水 (1 $\times$)、乙醇 (1 $\times$) 和水 (2 $\times$) 的储集器中漂洗, 每次漂洗之后应将过量液体从加样头摇落且用纸和擦拭物干燥。此后, 将 50 μ l 膜蛋白添加到各孔 (也使用包含膜而不包含靶 GPCR 的对照孔) 中, 且在室温下预培育 5-10 分钟。此后, 将 50 μ l 于结合缓冲液中的 [35 S]GTP γ S (0.6 nM) 添加到各孔中, 接着在室温下在震荡器上培育 60 分钟 (板覆盖有箔片)。随后, 通过将板在 22 $^{\circ}$ C 下在 4000 RPM 下旋转 15 分钟使检定停止。用 8 通道多支管抽吸板且将板用板覆盖层密封。将板在 Wallac 1450 上使用“Prot. #37”设置读数 (按照制造商的说明书)。

实例 10 环腺苷酸检定

另一鉴别作为 (例如) 促效剂、反向促效剂或拮抗剂的候选化合物的检定方法可通过利用基于环化酶的检定实现。除直接鉴别外, 所述检定方法可作为独立的方法使用以提供对来自以上实例中所陈述的 [35 S]GTP γ S 方法的结果的确认。

经修改的 Flash Plate™ 腺苷酰基环化酶试剂盒 (New England Nuclear; 目录号: SMP004A) 可根据下列方案用于作为所关注受体的反向促效剂和促效剂的候选化合物的直接鉴别中。

转染后约 3 天, 采集转染细胞。通过使于含有 20 mM HEPES (pH 7.4) 和 10 mM MgCl₂ 的缓冲液中的悬浮细胞均质化而制备膜。均质化在冰上使用 Brinkman Polytron™ 执行约 10 秒。将所得均浆在 4 $^{\circ}$ C 下在 49,000 $\times$ g 下离心 15 分钟。随后, 将所得小球再悬浮于含有 20 mM HEPES (pH 7.4) 和 0.1 mM EDTA 的缓冲液中, 均质化 10 秒, 接着在 4 $^{\circ}$ C 下在 49,000 $\times$ g 下离心 15 分钟。随后, 将所得小球存储在 -80 $^{\circ}$ C 下直到使用。直接鉴别筛选的当天, 将膜小球在室温下缓慢解冻, 再悬浮于含有 20 mM HEPES (pH 7.4) 和 10 mM MgCl₂ 的缓冲液中以产生 0.60 mg/ml 的最终蛋白质浓度 (将再悬浮膜放在冰上直到使用)。

制备 cAMP 标准物和检测缓冲液 (11 ml 检测缓冲液包含 2 μ Ci 示踪物 [125 I] cAMP (100 μ l)) 且根据制造商的说明书维护。新鲜制备用于筛选的检定缓冲液且其含有 20 mM HEPES (pH 7.4)、10 mM MgCl₂、20 mM 磷酸肌酸 (Sigma)、0.1 单位/毫升肌酸磷酸激酶 (Sigma)、50 μ M GTP (Sigma) 和 0.2 mM ATP (Sigma); 随后, 将检定缓冲液存储在冰上直到使用。

将候选化合物连同 40 μ l 膜蛋白 (30 微克/孔) 以及 50 μ l 检定缓冲液添加到 (例如) 96 孔板孔 (3 微升/孔; 12 μ M 最终检定浓度) 中。随后, 在轻轻震荡的情况下, 将混合物在室温下培育 30 分钟。

培育之后, 将 100 μ l 检测缓冲液添加到各孔中, 接着培育 2-24 小时。随后, 将板在 Wallac MicroBeta™ 板读数器上使用 “Prot. #31” 设置计数 (按照制造商的说明书)。

实例 11

测量细胞内钙浓度的荧光成像板读数器 (FLIPR) 检定

将来自各自的纯系株的经靶受体 (实验) 和 pCMV (负对照) 稳定转染的细胞以 5.5×10^4 个细胞/孔播种于具有完全培养基 (具有 10% FBS 的 DMEM、2 mM L-谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠) 的经聚-D-赖氨酸预处理的 96 孔板 (Becton-Dickinson, #356640) 中以便在第二天检定。因为烟酸受体为 Gi 耦合的, 所以包含烟酸受体的细胞可进一步包含 Ga15、Ga16 或嵌合 Gq/Gi α 亚单元。为制备 Fluo4-AM (分子探针, #F 14202) 培育缓冲储备液, 将 1 mg Fluo4-AM 溶解于 467 μ l DMSO 和 467 μ l Pluronic acid (分子探针, #P3000) 中以产生 1mM 储备溶液, 可将其在 -20°C 下存储 1 个月。Fluo4-AM 为荧光钙指示剂染料。

在洗涤缓冲液 (1 $\times$ HBSS/2.5 mM 丙磺舒 (Probenicid) /20 mM HEPES (pH 7.4)) 中制备候选化合物。

在检定时, 从孔中除去培养基且将细胞装载 100 μ l of 4 μ M Fluo4-AM/2.5 mM 丙磺舒 (Sigma, #P8761) /20 mM HEPES/完全培养基 (pH 7.4)。允许在 37°C/5% CO₂ 下进行培育 60 分钟。

培育 1 小时后, 除去 Fluo4-AM 培育缓冲液且将细胞用 100 μ l 洗涤缓冲液洗涤 2 次。各孔中留下 100 μ l 洗涤缓冲液。使板返回到 37°C/5% CO₂ 下的培育箱中历时 60 分钟。

将 FLIPR (荧光成像板读数器; 分子装置) 编程以在第 30 秒时添加 50 μ l 候选化合物且在另外的 150 秒内记录由候选化合物引起的细胞内钙浓度 ($[Ca^{2+}]$) 的瞬时变化。总荧光变化计数用于使用 FLIPR 软件确定促效剂活性。所述仪器软件使荧光读数归一化以在零时产生等价的初始读数。

虽然上文提供使用稳定转染的细胞的 FLIPR 检定促效剂活性, 但所属领域的技术人员应能容易地修改所述检定以表征拮抗剂活性。所述所属领域的技术人员也应能容易地了解或者可使用瞬时转染的细胞。

实例 12

受体结合检定

除本文所述的方法以外，评估候选化合物的另一方法为通过测定与烟酸受体的结合亲和力。此类检定通常需要烟酸受体的放射性标记配位体。

诸如放射性标记烟酸的放射性标记化合物可用于鉴别/评估化合物的筛选检定中。概括来说，可就新近合成或鉴别的化合物（也就是，候选化合物）的降低放射性标记的烟酸与烟酸受体的结合的能力作出评估。因此，与放射性标记烟酸竞争以与烟酸受体结合的能力直接与候选化合物与烟酸受体的结合亲和力相关。

测定烟酸受体的受体结合的检定方案：

A. 烟酸受体制备

举例来说，HEK293 细胞（人类肾脏，ATCC）可瞬间或稳定地用如本文所述的烟酸受体转染。举例来说，293 细胞可用 10 µg 人类烟酸受体和 60 µl Lipofectamine（每 15 cm 的碟）瞬间转染且在改变培养基的情况下，在碟中生长 24 小时（75%汇合）。将细胞与每碟 10 毫升 HEPES-EDTA 缓冲液（20 mM HEPES + 10 mM EDTA, pH 7.4）一起除去。随后，将细胞在 Beckman Coulter 离心机上在 17,000 rpm（JA-25.50 转子）下离心 20 分钟。随后，将小球再悬浮于 20 mM HEPES + 1 mM EDTA (pH 7.4) 中且用 50 ml 杜恩斯(Dounce) 均质器均质化且再离心。除去上清液之后，将小球在 -80°C 下存储直到用于结合检定。当用于检定中时，将膜在冰上解冻 20 分钟且随后添加 10 ml 培育缓冲液（20 mM HEPES、1 mM MgCl₂、100 mM NaCl, pH 7.4）。随后，使膜涡旋以将粗质膜小球再悬浮且用 Brinkmann PT-3100 Polytron 均质器在设置 6 下均质化 15 秒。使用 BRL Bradford 蛋白质检定测定膜蛋白的浓度。

B. 结合检定

对总结合来说，将总体积为 50 µl 的适当稀释膜（稀释于含有 50 mM Tris HCl (pH 7.4)、10 mM MgCl₂ 和 1 mM EDTA 的检定缓冲液中；5-50 µg 蛋白质）添加到 96 孔聚丙烯微量滴定板中，接着添加 100 µl 检定缓冲液和 50 µl 放射性标记烟酸。对非特异性结合来说，添加 50 µl 检定缓冲液而不是 100 µl，且在添加 50 µl 放射性标记烟酸之前，再添加 50 µl 10 µM 冷烟酸受体。随后，将板在室温下培育 60-120 分钟。结合反应通过将检定板穿过具有 Brandell 96 孔板收集器的微板装置 GF/C Unifilter 过滤板过滤，接着用含有 0.9% NaCl 的冷 50 mM Tris HCl (pH 7.4) 洗涤而终止。随后，将过滤板底部密封，将 50 µl Optiphase Supermix 添加到各孔中，将板顶部密封且将板在 Trilux MicroBeta 闪烁计数器中计数。对化合物竞争研究来说，将 100 µl 适当稀释候选化合物添加到适当孔中而不是添加 100 µl 检定缓冲液，接着添加 50 µl 放射性标记烟酸。

C. 计算

候选化合物起初以 1 μM 和 0.1 μM 检定且随后以所选择的中间剂量会引起约 50% 的放射性标记烟酸结合抑制（也就是， IC_{50} ）的浓度范围检定。在不存在候选化合物（ B_0 ）的情况下，特异性结合为总结合（ B_T ）减去非特异性结合（NSB）的差且类似地，特异性结合（在存在候选化合物的情况下）（ B ）为替换结合（ B_D ）减去非特异性结合（NSB）的差。 IC_{50} 由抑制反应曲线，洛基-对数曲线（logit-log plot）（% B/B_0 对候选化合物的浓度）测定。

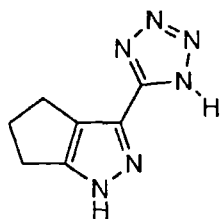
K_i 通过 Cheng 和 Prustoff 转换计算：

$$K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [\text{L}] / K_D)$$

其中， $[\text{L}]$ 为用于检定的放射性标记烟酸的浓度且 K_D 为在相同结合条件下独立测定的放射性标记烟酸的解离常数。

实例 13：本发明的化合物的制备

实例 13.1：3-(1H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑（化合物 1）的制备

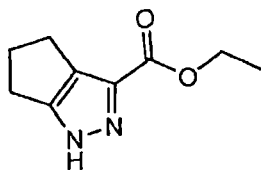


方法 A：化合物 1 的制备

在微波照射加热至 175 $^{\circ}\text{C}$ 历时 20 分钟的情况下，将 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-腈（0.022 g, 0.165 mmol）和叠氮化钠（0.086 g, 1.30 mmol）溶解于 DMF（3 cm^3 ）中。将溶液冷却至室温，过滤且将所过滤的固体用乙酸乙酯洗涤。将组合溶液添加到饱和碳酸氢钠水溶液（20 cm^3 ）中且用乙酸乙酯洗涤。将水层通过添加 1 M 盐酸水溶液酸化到 pH 值为 1 且萃取到乙酸乙酯中。将乙酸乙酯洗涤液组合且在减压下除去溶剂，将所得固体经制备 HPLC 纯化以产生呈白色固体的 3-(2H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑（0.012 g, 0.068 mmol, 41%）。 ^1H NMR δ (CD_3OD): 2.88 (类三重峰, 2H, $J=7.0$), 2.82 (类三重峰, 2H, $J=7.3$), 2.64 (类四重峰, 2H, $J=7.1$); m/z (ES^+): 177 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 。

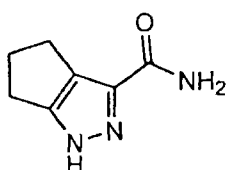
中间体 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-腈使用如下程序制备。

步骤 A：1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸乙酯



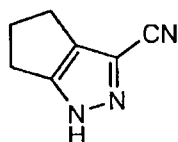
将环戊酮 (10.0 g, 118.9 mmol) 溶解于无水乙醇 (30 cm³) 中且添加乙醇钠 (53 cm³, 21% 于乙醇中, 143 mmol)。将所得溶液在氩下搅拌 10 分钟, 随后添加草酸二乙酯 (19.1 g, 131 mmol)。再添加乙醇 (10 cm³) 且将溶液在 75°C 下加热 3 小时且冷却到室温。添加溶解于水 (20 cm³) 中的盐酸胍 (8.15 g, 119 mmol) 且将溶液加热到 75°C 隔夜。在减压下除去溶剂且将所得物溶解于乙酸乙酯 (200 cm³) 中且用水 (200 cm³) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤且在减压下除去溶剂以产生呈乳白色固体的 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸乙酯 (16.16 g, 90.0 mmol, 76%)。δ_H (CD₃OD): 4.34 (q, 2H, J=7.1, OCH₂CH₃), 2.78 (类三重峰, 2H, J=7.0), 2.72 (br s, 2H), 2.49 (br s, 2H), 1.36 (t, 3H, J=7.1, OCH₂CH₃)。m/z (ES⁺): 181 [M+H]⁺。

步骤 B: 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺



将 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸乙酯 (0.808 g, 4.48 mmol) 溶解于甲醇氨 (约 7 M, 12 cm³) 且在 95°C 下搅拌隔夜。将所得溶液冷冻且将沉淀 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺通过真空过滤收集为白色结晶固体 (0.438 g, 2.90 mmol, 65%)。δ_H (CD₃OD): 2.79 (类三重峰, 2H, J=6.9), 2.73 (类三重峰, 2H, J=7.3), 2.55 (br s, 2H); m/z (ES⁺): 152 [M+H]⁺。

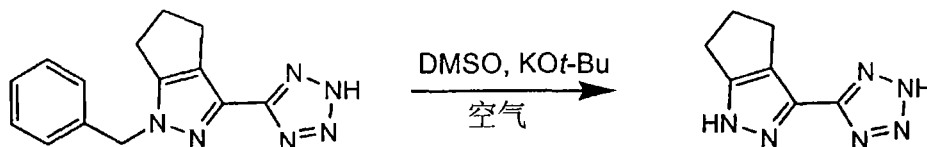
步骤 C: 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-腈



将 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺 (0.210 g, 1.39 mmol) 添加到无水乙腈 (12 cm³) 中, 加热到 80°C 且添加氯化钠 (2.0 g, 34 mmol)。15 分钟后, 添加三氯氧磷 (0.128 g,

0.83 mmol) 且将溶液加热到 80℃ 隔夜, 冷却, 过滤且将所收集的固体用乙腈洗涤。在减压下从组合溶液中除去溶剂且将所得固体经制备 HPLC 纯化以产生呈深紫色固体的 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-腈 (0.031 g, 0.23 mmol, 17%)。δ_H (CD₃OD): 2.79 (类三重峰, 2H, J=7.3), 2.73 (类三重峰, 2H, J=7.1), 2.65-2.55 (m, 2H); m/z (ES⁺): 134 [M+H]⁺。

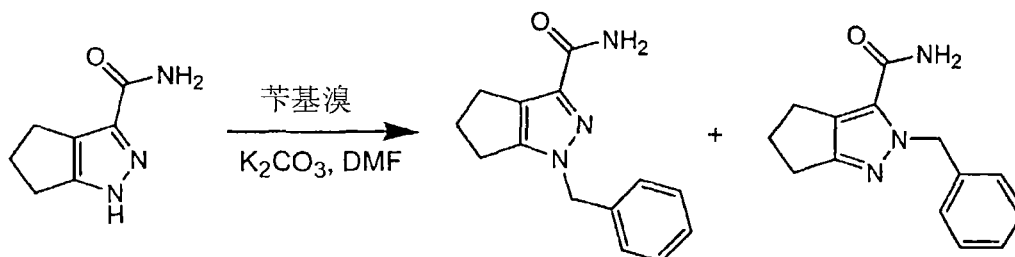
方法 B: 化合物 1 的制备



将空气鼓泡通过 1-苄基-3-(2H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑 (1.92 g, 7.21 mmol) 和 KOt-Bu (65 mL 于 THF 中的 1 M 溶液) 于 DMSO (50 mL) 中的搅拌溶液历时 2.0 小时。将反应通过添加 HCl (3 M 水溶液) 酸化为 pH 值 = 2。将混合物过滤且将滤液在真空下浓缩以除去挥发性组分。将物质经逆相 HPLC 纯化: Phenomenex[®] Luna C18 管柱 (10 μ, 250 × 50 mm), 梯度: 于 H₂O (含有 1% v/v TFA) 中的 5% (v/v) CH₃CN (含有 1% v/v TFA) 到 50% H₂O, 60 mL/min, λ = 214 nm。通过将材料装载于 Varian BondElut[®] 60 mL, 10 g SCX 筒上将产物进一步纯化。将 MeOH (150 mL) 穿过管柱以除去未结合的杂质。随后, 通过使于 MeOH (150 mL) 中的 2 N NH₃ 溶液穿过管柱将产物洗脱。浓缩洗脱液产生呈白色固体的化合物 1 的铵盐 (947 mg, 5.38, 产率 75%)。¹H NMR (铵盐, 400MHz, CD₃OD): δ2.88 (2H, t, J = 6.8 Hz), 2.74 (2H, t, J = 6.8 Hz), 2.52 (2H, quin, J = 6.8 Hz)。HPLC/MS: Discovery[®] C18 管柱 (5 μ, 50 × 2.1 mm), 梯度: 于 H₂O (含有 1% v/v TFA) 中的 5% (v/v) CH₃CN (含有 1% v/v TFA) 到于 H₂O 中的 99% v/v CH₃CN, 0.75 mL/min, t_r = 1.22 min, ESI⁺ = 177.3 (M + H)。C₇H₈N₆ 的分析计算值 (中性化合物): C, 47.72; H, 4.58。实验值: C, 47.27; H, 4.16。C₇H₁₁N₇ 的分析计算值 (铵盐): C, 43.51; H, 5.74。实验值: C, 42.94; H, 5.30。

中间体 1-苄基-3-(2H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑使用如下程序制备。

步骤 A: 1-苄基-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺和 2-苄基-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺的制备



在 25℃ 下, 向 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺 (2.57 g, 17.0 mmol) 于 DMF (34 mL) 中的搅拌溶液中添加 K_2CO_3 (5.87 g, 42.5 mmol), 接着添加苄基溴 (4.36 g, 25.5 mmol)。将反应在周围温度下搅拌 16 小时, 此时将混合物用 EtOAc (75 mL) 稀释且过滤。将滤液用 H_2O (100 mL) 洗涤且将水相用 EtOAc (75 mL) 和 CH_2Cl_2 (75 mL) 反萃取。将组合有机萃取物经 $MgSO_4$ 干燥, 过滤且真空浓缩。经硅胶色谱法纯化 (梯度: 于己烷中的 50% EtOAc 到于己烷中的 95% EtOAc) 产生分离呈白色固体的 2-苄基-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺 (739 mg, 3.07 mmol, 产率 18%), 接着产生分离呈白色固体的 1-苄基-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺 (3.24 g, 13.4 mmol, 产率 79%)。

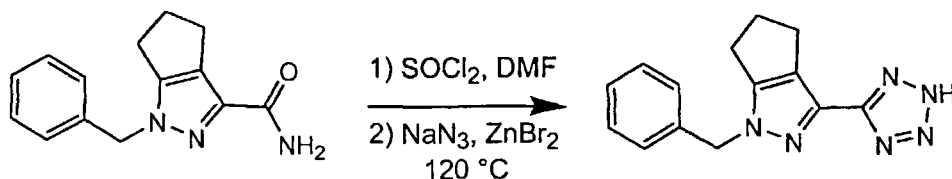
1-苄基-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺。

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.37-7.30 (3H, m), 7.19 (2H, m), 6.67 (1H, bs), 5.34 (1H, bs), 5.19 (2H, s), 2.82 (2H, m), 2.51 (4H, m)。 ^{13}C APT NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 向上为: 164.8, 155.2, 139.0, 136.0, 129.5, 55.3, 31.2, 24.1; 向下为: 129.0, 128.3, 127.8。 HPLC/MS: Alltech® Prevail C18 管柱 (5 μ , 50 $\times$ 4.6 mm), 梯度: 于 H_2O (含有 1% v/v TFA) 中的 5% v/v CH_3CN (含有 1% v/v TFA) 到于 H_2O 中的 99% v/v CH_3CN , 3.5 mL/min, $t_r = 2.13$ min, $ESI^+ = 242.2$ (M + H)。

2-苄基-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺。

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.34-7.21 (5H, m), 5.76 (2H, s), 5.70-5.38 (2H, bs), 2.78 (4H, m), 2.49 (2H, m)。 ^{13}C APT NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 向上为: 161.9, 160.1, 138.3, 128.3, 127.1, 55.1, 29.9, 24.8, 24.7; 向下为 128.6, 128.0, 127.6。 HPLC/MS: Alltech® Prevail C18 管柱 (5 μ , 50 $\times$ 4.6 mm), 梯度: 于 H_2O (含有 1% v/v TFA) 的 5% v/v CH_3CN (含有 1% v/v TFA) 到于 H_2O 中的 99% v/v CH_3CN , 3.5 mL/min, $t_r = 1.98$ min, $ESI^+ = 242.1$ (M + H)。

步骤 B: 1-苄基-3-(2H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑的制备

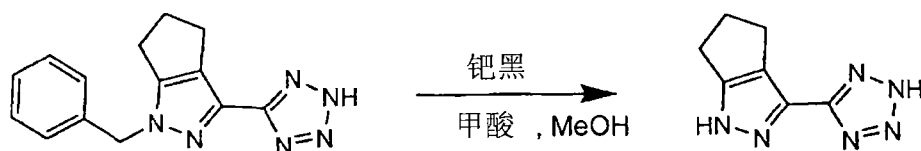


在室温下, 向 1-苄基-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺 (3.02 g, 12.53 mmol) 于

DMF (25 mL) 中的溶液中添加亚硫酸氯 (1.94 g, 16.3 mmol)。将反应搅拌 18 小时, 此时添加 NaHCO_3 (饱和水溶液, 6 mL) 以中止过量的亚硫酸氯。将混合物用 EtOAc (150 mL) 稀释且相继用 NaHCO_3 (饱和水溶液, 100 mL) 和盐水 (100 mL) 洗涤。将洗涤水溶液用 EtOAc (2×100 mL) 反萃取且将组合有机物经 MgSO_4 干燥且真空浓缩以产生粗黄色油状物。

将浓缩物溶解于 DMF (20 mL) 中且放置于厚壁密封反应容器中, 此时向其中相继添加 ZnBr_2 (4.70 g, 18.0 mmol) 和 NaN_3 (2.73 g, 42.0 mmol)。将容器密封且加热到 120 °C 历时 18 小时。将混合物冷却到室温且添加 HCl (3 M 水溶液, 2 mL) 且继续搅拌 5 分钟。将混合物用 EtOAc (150 mL) 稀释且用 HCl (1 M, 水溶液, 100 mL) 洗涤。将有机物经 MgSO_4 干燥, 过滤且浓缩。硅胶色谱法纯化 (梯度: 50:50:0.2, 己烷:EtOAc:AcOH 到 100:0.2, EtOAc:AcOH) 产生呈白色固体的 1-苄基-3-(2H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑 (2.06 g, 7.74 mmol, 产率 62%)。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 7.36-7.25 (5H, m), 5.30 (2H, s), 2.84 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 2.62-2.56 (4H, m)。 ^{13}C APT NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 向上为: 153.8, 151.9, 137.6, 131.5, 128.9, 55.8, 31.9, 24.8, 24.6; 向下为: 129.9, 129.1, 129.0。HPLC/MS: Discovery® C18 管柱 (5μ , 50×2.1 mm), 梯度: 于 H_2O (含有 1% v/v TFA) 中的 5% v/v CH_3CN (含有 1% v/v TFA) 到于 H_2O 中的 99% v/v CH_3CN , 0.75 mL/min, $t_r = 2.18$ min, $\text{ESI}^+ = 267.1$ (M + H)。

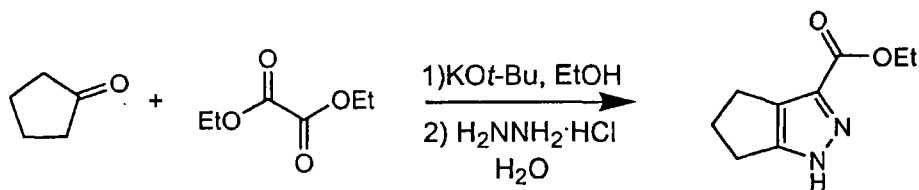
方法 C: 化合物 1 的制备



向 1-苄基-3-(2H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑 (59.4 g, 223 mmol) 于 10% 甲酸/MeOH (体积/体积, 900 mL) 中的溶液中添加钡黑 (39.8 g, 374 mmol)。在 N_2 气氛下, 将混合物机械搅拌 24 小时。将反应过滤且浓缩。将产物进一步纯化且通过如下步骤转化为铵盐: 将物质 (于 MeOH 中的溶液) 装载于含有 Bondesil SCX SPE 树脂 (750 g) 的管柱上。将管柱用 MeOH (2.0 L) 冲洗以除去未结合的杂质。将产物使用 2N NH_3/MeOH (约 1.5 L) 洗脱。浓缩之后, 获得呈白色固体的四唑铵盐 (39.3 g, 203 mmol, 产率 91%)。

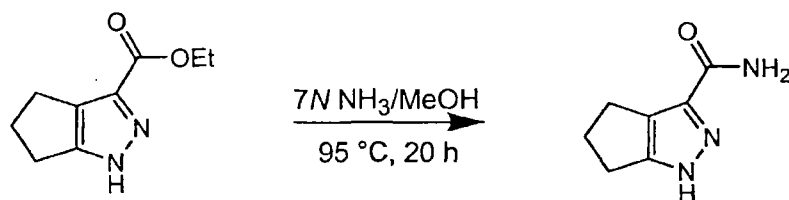
中间体 1-苄基-3-(2H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑使用如下程序制备。

步骤 A: 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸乙酯的制备



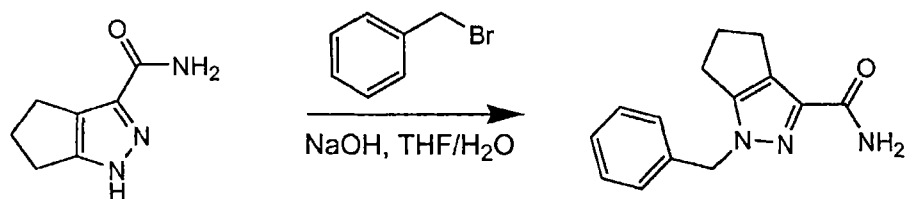
在室温下在 N_2 下, 经 0.5 小时经由加料漏斗向环戊酮 (42.0 g, 0.50 mol) 和草酸二乙酯 (73.1 g, 0.50 mol) 于 EtOH (2.5 L) 中的溶液中添加 KOt-Bu 于 THF (500 mL 1 M 溶液, 0.50 mol) 中的溶液。将反应搅拌 3.5 小时, 此时将烧瓶冷却到 0°C 。经 0.5 小时, 经由加料漏斗添加于 H_2O (250 mL) 中的盐酸肼 (37.6 g, 0.55 mol)。将反应温至室温且搅拌 16 小时。在真空下除去挥发性组分且将所得固体用 $NaHCO_3$ (饱和水溶液, 500 mL) 和 H_2O (500 mL) 洗涤。在真空下进一步浓缩产生呈黄色固体的纯 1,4,5,6-四氢-环戊吡啶-3-甲酸乙酯 (63.6 g, 0.35 mol, 产率 71%)。

步骤 B: 1,4,5,6-四氢-环戊吡啶-3-甲酸酰胺的制备



将 1,4,5,6-四氢-环戊吡啶-3-甲酸乙酯 (63.5 g, 0.35 mmol) 溶解于 7N $NH_3/MeOH$ (1.0 L) 溶液中。将溶液分为四等份, 将每一份转移到 350 mL 厚壁密封反应容器中。将容器加热到 95°C 且搅拌 20 小时。将反应冷却到室温, 此时固体沉淀。将溶液过滤且将固体用 $NaOH$ (1 N 水溶液, 200 mL) 洗涤以产生呈白色固体的纯 1,4,5,6-四氢-环戊吡啶-3-甲酸酰胺 (42.0 g, 0.20 mol, 产率 80%)。

步骤 C: 1-苄基-1,4,5,6-四氢-环戊吡啶-3-甲酸酰胺和 2-苄基-1,4,5,6-四氢-环戊吡啶-3-甲酸酰胺的制备



在室温下,向 1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺(41.5 g, 275 mmol)于 THF(460 mL)中的溶液中添加 NaOH 溶液(5 N 水溶液, 110 mL, 0.54 mol)。搅拌 5 分钟之后,添加苄基溴(49.2 g, 0.29 mol)且将反应搅拌 16 小时。在真空下除去挥发性组分且将所得固体用 H₂O(3×250 mL)洗涤。进一步浓缩产生呈 1-苄基-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺和 2-苄基-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺的 20:1 混合物的几何异构体(65.3 g, 270 mmol, 产率 98%)且无须分离即可使用。

步骤 D: 1-苄基-3-(2H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑的制备



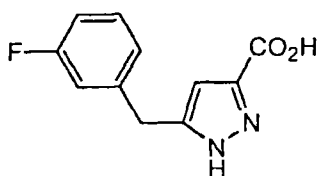
在 N₂ 气氛下,将无水 DMF(250 mL)装入配备有干燥试管的烧瓶中。将烧瓶冷却到 0°C 且经 5 分钟经由注射器添加亚硫酰氯(36.7 g, 309 mmol)。再搅拌 10 分钟之后,经 5 分钟使用加料漏斗添加 1-苄基-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺(67.7 g, 281 mmol)于 DMF(310 mL)中的溶液。将混合物缓慢温至室温且搅拌 16 小时。添加 NaHCO₃(饱和水溶液, 100 mL)且将混合物搅拌 10 分钟。在真空下除去挥发性组分且将残余物用 EtOAc(700 mL)和 NaHCO₃(饱和水溶液, 700 mL)稀释。将层分离且将水相用 EtOAc(400 mL)反萃取。将组合有机物用 NaHCO₃(饱和水溶液, 600 mL)和盐水(600 mL)洗涤,经 MgSO₄干燥,过滤且浓缩以产生 63.1 g 呈棕色固体的腈。

向腈(上述)于 DMF(560 mL)中的溶液中添加 ZnBr₂(95.6 g, 425 mmol),接着添加 NaN₃(55.2 g, 849 mmol)。将混合物加热到 120°C 且搅拌 14 小时。将反应冷却到室温且在真空下除去 DMF。添加 HCl(2 N 水溶液, 800 mL)且将混合物搅拌 15 分钟接着过滤。将固体添加到 EtOAc(500 mL)和 HCl(5 N 水溶液, 300 mL)的双相混合物中且搅拌 0.5 小时。将溶液过滤且将层分离。将剩余固体再一次如上所述经 EtOAc 和 HCl(5 N 水溶液)处理且重复所述过程(搅拌,过滤,分离)直到所有固体物质溶解。将组合有机滤液浓缩以产生呈浅棕色固体的 1-苄基-3-(2H-四唑-5-基)-1,4,5,6-四氢-环戊吡唑(61.0 g, 229 mmol, 由酰胺的产率为 81%)。

实例 13.2: 本发明的吡唑甲酸类制备的一般程序

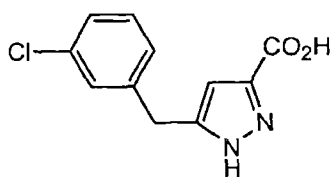
向溶解于乙醇的相应酮（5 mL/mmol）中添加草酸二乙酯（1.2 当量）和 *t*-BuOK 于 THF（1.1 当量）中的 1 M 溶液。将混合物在 75°C 下加热 30 分钟，随后在冰浴中冷却到 4°C。添加胂水溶液（2 当量，2 mL/mmol）且将所得混合物在 75°C 下加热 1 小时。在减压下除去乙醇且将粗产物用 NaHCO_3 饱和水溶液稀释且用 EtOAc 萃取。将有机层经 Na_2SO_4 干燥且浓缩以产生相应吡唑酯衍生物。随后，在 95°C 下在碱性条件下，经 2 小时，使用 5 N NaOH 水溶液进行酯的水解。使用 12 N HCl 将溶液的 pH 值调整到约 1 且将混合物用 AcOEt 萃取，将有机层经 Na_2SO_4 干燥且浓缩。将粗物质经由结晶或 HPLC 纯化以提供吡唑甲酸衍生物。

实例 13.3：5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸（化合物 2）的制备



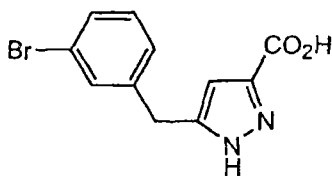
使用实例 13.2 中所述的一般程序制备 5-(3-氟-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸。 ^1H NMR (DMSO, 400MHz) δ (ppm): 7.34 (1H, m), 7.07 (2H, m), 6.50 (1H, s), 3.98 (2H, s)。质谱: m/z : 221 ($M+1$) $^+$ 。

实例 13.4：5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸（化合物 3）的制备



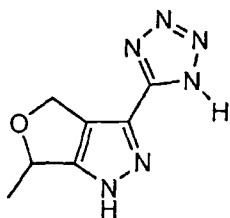
使用实例 13.2 中所述的一般程序制备 5-(3-氯-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸。

实例 13.5：5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸（化合物 4）的制备



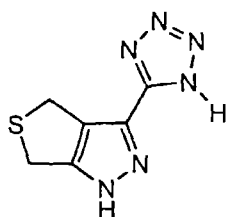
使用实例 13.2 中所述的一般程序制备 5-(3-溴-苄基)-1H-吡唑-3-甲酸。¹H NMR (DMSO, 400MHz) δ (ppm): 7.46 (1H, s), 7.42 (1H, m), 7.27 (2H, m), 6.51 (1H, s), 3.97 (2H, s)。质谱: m/z : 281 (M+1)⁺, 283 (M+1)⁺。

实例 13.6: 6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑 (化合物 5) 的制备



以类似于实例 13.1 所述的方式制备 6-甲基-3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑, 吡唑形成之后, 由管柱色谱法进行几何异构体的分离。化合物 5 由 NMR 和 MS 表征; ¹H NMR (400MHz, DMSO): δ 5.20 (m, 1H), 4.94 (dd, $J=34.7, 10.3$ Hz, 2 H), 1.39 (d, $J=4.4$ Hz, 3 H)。HPLC/MS: Alltech®Prevail C18 管柱 (5 μ , 50 $\times$ 4.6 mm), 梯度: 于 H₂O (含有 1% v/v TFA) 的 5% v/v CH₃CN (含有 1% v/v TFA) 到于 H₂O 中的 99% v/v CH₃CN, 3.5 mL/min, $t_r = 1.03$ min, $ESI^+ = 192$ (M + H)。

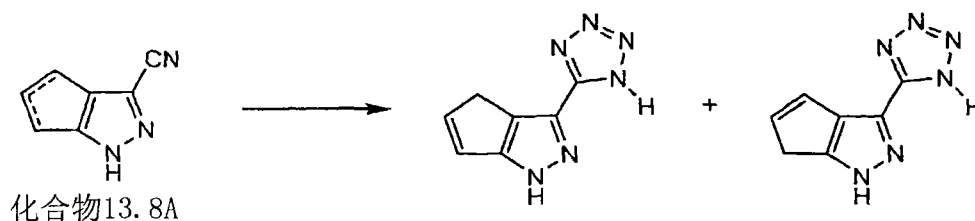
实例 13.7: 3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑 (化合物 6) 的制备



以类似于实例 13.1 所述的方式制备 3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-噻吩并[3,4-c]吡唑, 且其由 NMR 和 MS 表征; ¹H NMR (400MHz, MeOD): δ 4.00 (2H, m), 3.95 (2H, m)。HPLC/MS: Waters® YMC ODS-A C18 管柱 (5 μ , 50 $\times$ 4.6 mm), 梯度: 于 H₂O (含有 1% v/v TFA) 中的 5% v/v CH₃CN (含有 1% v/v TFA) 到于 H₂O 中的 99% v/v CH₃CN, 3.5 mL/min, $t_r = 1.27$ min, $ESI^+ = 194$ (M + H)。

实例 13.8: 3-(1H-四唑-5-基)-1,4-二氢-环戊吡唑 (化合物 7) 和 3-(1H-四唑-5-基)-1,6-

二氢-环戊吡唑（化合物 8）的制备



化合物 13.8A

在 200℃下，将呈异构体混合物形式的化合物 13.8A（50 mg、0.38 mmol）、叠氮化钠（86.5 mg，1.33 mmol）和溴化锌（300 mg，1.33 mmol）于 DMF（2 mL）中的溶液在微波下照射 6 小时。冷却到室温后，将反应混合物经 2 N HCl 溶液处理，用 EtOAc 萃取，用 H₂O 洗涤且真空浓缩。HPLC 分离（C18 管柱，于 H₂O 中的 5% 到 99% CH₃CN）提供 40.3 mg（61%）合乎需要的呈烯烃异构体的 2:1 混合物形式的产物。

LC-MS *m/z* 175 (*M*+1); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.94 (m, 0.5 H), 6.87 (m, 1 H), 6.76 (m, 1 H), 6.40 (m, 0.5 H), 3.35 (m, 3 H)。

将异构体经逆相 HPLC 分离：Phenomenex® Luna C18 管柱（10 μ，250 × 21.2 mm），梯度：于 H₂O（含有 1% v/v TFA）中的 5%（v/v）CH₃CN（含有 1% v/v TFA）到 70% H₂O，20 ml/min，λ= 280 nm。

或者，将异构体经正相 HPLC 分离：Dynamax Micorsorb Si（制备）管柱（8 μ，250 × 10 mm），梯度：于己烷（含有 2% v/v AcOH）中的 80%（v/v）EtOAc（含有 2% v/v AcOH）到 99% EtOAc，7.5 ml/min，λ= 280 nm。

正相和逆相色谱管柱异构体洗脱的顺序相同。

异构体 1（高 R_f 异构体）：

¹H NMR (400MHz, MeOD): δ 6.79 (2H, m), 3.42 (2H, m)。HPLC/MS: Discovery® C18 管柱（5 μ，50 × 2.1 mm），梯度：于 H₂O（含有 1% v/v TFA）中的 5% v/v CH₃CN（含有 1% v/v TFA）到于 H₂O 中的 99% v/v CH₃CN，0.75 mL/min，*t_r* = 1.10 min，ESI⁺ = 174.9 (*M* + H)。

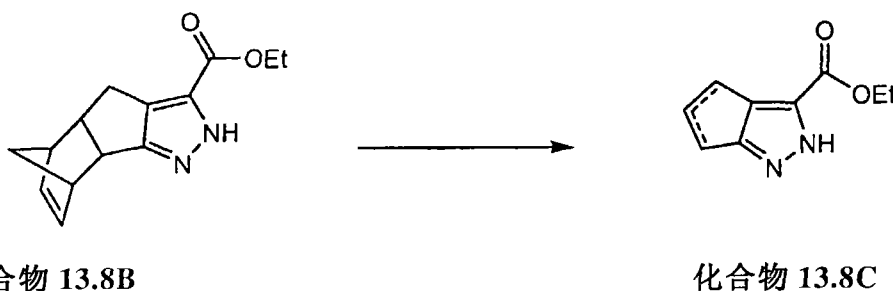
异构体 2（低 R_f 异构体）：

¹H NMR (400MHz, MeOD): δ 6.98 (1H, m), 6.44 (1H, m), 3.33 (2H, m)。HPLC/MS: Discovery® C18 管柱（5 μ，50 × 2.1 mm），梯度：于 H₂O（含有 1% v/v TFA）中的 5% v/v CH₃CN（含有 1% v/v TFA）到于 H₂O 中的 99% v/v CH₃CN，0.75 mL/min，*t_r* = 1.11 min，

$\text{ESI}^+ = 175.1 (\text{M} + \text{H})$ 。

呈异构体混合物形式的中间化合物 13.8A 使用如下步骤制备：

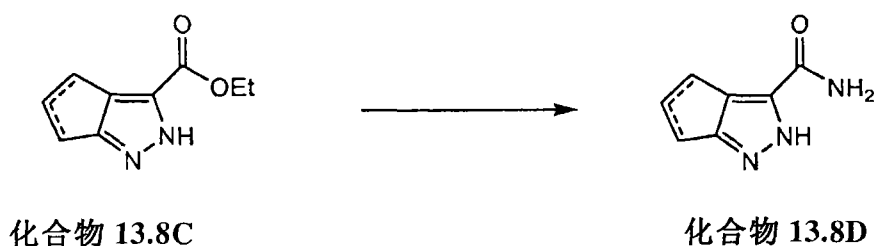
步骤 A：2,4-二氢-环戊吡唑-3-甲酸乙酯与 2,6-二氢-环戊吡唑-3-甲酸乙酯（混合物）的制备



使用如本文所述制备吡唑酯的类似方法（参见实例 13.1 和 13.2）由相应酮制备化合物 13.8B。在氮下，将化合物 13.8B（2.0 g, 8.19 mmol）于苯基醚（25 mL）中的溶液在回流（250℃到 260℃）下氮气中加热 2 小时。

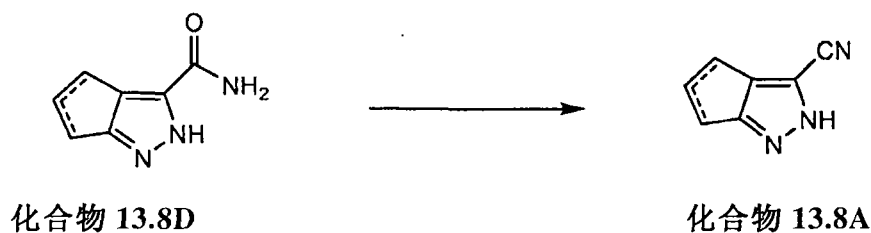
将溶液冷却到室温后，将其装载在 SiO_2 管柱上，用 DCM 冲洗以排出苯基醚，且用 EtOAc/Hex（1/3）洗脱以提供 1.05 g（72%）呈烯烃异构体混合物形式的化合物 13.8C。LC-MS m/z 179 (M+1)。

步骤 B：2,4-二氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺与 2,6-二氢-环戊吡唑-3-甲酸酰胺（混合物）的制备



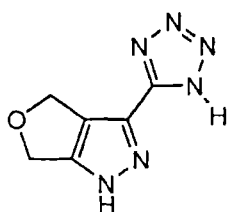
将呈异构体混合物形式的化合物 13.8C（1.0 g, 5.61 mmol）溶解于最少量的二噁烷（< 5 mL）且在紧密封的容器中与 28%氢氧化铵溶液（100 mL）混合。将溶液在室温下搅拌 24 小时且真空浓缩以提供呈异构体混合物形式的固体状的化合物 13.8D（定量产率）。LC-MS m/z 150 (M+1)。

步骤 C：2,4-二氢-环戊吡唑-3-腈与 2,6-二氢-环戊吡唑-3-腈（混合物）的制备



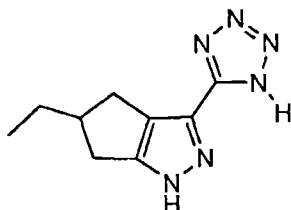
在室温下,向呈异构体混合物形式的化合物 13.8D(0.80 g, 5.36 mmol)和碳酸钾(0.445 g, 3.22 mmol)于乙腈(30 mL)中的悬浮液中添加 POCl_3 (0.785 mL, 8.58 mmol)。将反应混合物在回流下加热 2 小时。真空浓缩之后,将残余物用 EtOAc (150 mL) 稀释,用 H_2O 和盐水洗涤,干燥 (Na_2SO_4) 且浓缩以提供 141 mg (20%) 呈异构体混合物形式的化合物 13.8A。LC-MS m/z 132 ($M+1$)。

实例 13.9: 3-(1H-四唑-5-基)-4,6-二氢-1H-呋喃并[3,4-c]吡唑 (化合物 9) 的制备



以类似于实例 13.1 所述的方式制备化合物 9, 且其由 NMR 和 MS 表征; LC-MS m/z 179 ($M+1$); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 5.07 (t, $J=2.2$ Hz, 2 H), 4.92 (t, $J=2.2$ Hz, 2 H)。

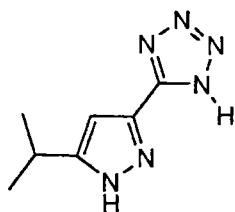
实例 13.10: 5-乙基-3-(1H-四唑-5-基)-2,4,5,6-四氢-环戊吡唑 (化合物 10) 的制备



以类似于实例 13.1 所述的方式制备化合物 10, 且其由 NMR 和 MS 表征; ^1H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 3.07 (1H, dd, $J=14.8, 7.6$ Hz), 2.94-2.82 (2H, m), 2.51 (1H, dd, $J=15.2, 6.8$ Hz) 2.41 (1H, dd, $J=13.6, 5.6$ Hz), 1.6 (2H, m), 1.02 (3H, t, $J=7.2$ Hz)。HPLC/MS: Discovery® C18 管柱 (5μ , 50×2.1 mm), 梯度: 于 H_2O (含有 1% v/v TFA) 中的 5% v/v

CH₃CN（含有 1% v/v TFA）到于 H₂O 中的 99% v/v CH₃CN，0.75 mL/min， $t_r = 1.42$ min， $ESI^+ = 205.2$ (M + H)。

实例 13.11：5-(5-异丙基-1H-吡唑-3-基)-1H-四唑（化合物 11）的制备



以类似于本文所述的方式或通过此项技术已知的方法制备化合物 **11**。

申请者保留排除本发明的任一实施例的任一种或一种以上化合物的权利。申请者也保留排除（例如）任何烟酸的配方或量、烟酸类似物或烟酸受体促效剂、任何烟酸受体部分促效剂或任何组合疗法的权利。

在整个专利申请中，引用各种公开案、专利和公开专利申请案。本专利申请中所参考的所述公开案、专利和公开专利申请案的揭露内容的整体以引用的方式并入本专利申请中。本文中申请者对公开案、专利或公开专利申请案的引用并不代表申请者承认所述公开案、专利或公开专利申请案为现有技术。

熟练的技术人员能力范围内的本发明的修改和扩展涵盖于上述揭露内容和随附权利要求书中。

<110> 艾尼纳制药有限公司

<120> 包含烟酸受体部分促效剂的用于治疗发红和脂质相关病症的组合物

<130> 97.w01

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1092

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

atgaatcggc accatctgca ggatcacttt ctggaaatag acaagaagaa ctgctgtgtg      60
ttccgagatg acttcattgt caaggtgttg ccgccggtgt tggggctgga gtttatcttc      120
gggcttctgg gcaatggcct tgccctgtgg attttctgtt tccacctcaa gtcctggaaa      180
tccagccgga ttttctgtt caacctggca gtggctgact ttctactgat catctgcctg      240
cccttcttga tggacaacta tgtgaggcgt tgggactgga agtttgggga catcccttgc      300
cggctgatgc tcttcatgtt ggctatgaac cgccagggca gcatcatctt cctcacggtg      360
gtggcggtag acaggtatth ccgggtggtc catccccacc acgccctgaa caagatctcc      420
aatcggacag cagccatcat ctcttgccct ctgtggggca tcactattgg cctgacagtc      480
cacctcttga agaagaagat gccgatccag aatggcggtg caaatttgtg cagcagcttc      540
agcatctgcc ataccttcca gtggcacgaa gccatgttcc tcctggagtt cttcctgccc      600
ctgggcatca tcctgttctg ctgagccaga attatctgga gcctgcggca gagacaaatg      660
gaccggcatg ccaagatcaa gagagccatc accttcatca tgggtggtggc catcgtcttt      720
gtcatctgct tccttcccag cgtggttgtg cggatccgca tcttctggct cctgcacact      780
tcgggcacgc agaattgtga agtgtaccgc tcggtggacc tggcgttctt tatcactctc      840
agcttcacct acatgaacag catgctggac ccggtggtgt actacttctc cagcccatcc      900
tttcccaact tcttctccac ttgatcaac cgctgcctcc agaggaagat gacaggtgag      960
ccagataata accgcagcac gagcgtcgag ctcacagggg accccaacaa aaccagaggc     1020
gctccagagg cgtaaatggc caactccggt gagccatgga gccctcttta tctgggcca      1080
acctctcctt aa                                1092

```

<210> 2

<211> 363

<212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2

Met Asn Arg His His Leu Gln Asp His Phe Leu Glu Ile Asp Lys Lys
 1 5 10 15

Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Asp Phe Ile Val Lys Val Leu Pro Pro
 20 25 30

Val Leu Gly Leu Glu Phe Ile Phe Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Ala
 35 40 45

Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile
 50 55 60

Phe Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu
 65 70 75 80

Pro Phe Leu Met Asp Asn Tyr Val Arg Arg Trp Asp Trp Lys Phe Gly
 85 90 95

Asp Ile Pro Cys Arg Leu Met Leu Phe Met Leu Ala Met Asn Arg Gln
 100 105 110

Gly Ser Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg
 115 120 125

Val Val His Pro His His Ala Leu Asn Lys Ile Ser Asn Arg Thr Ala
 130 135 140

Ala Ile Ile Ser Cys Leu Leu Trp Gly Ile Thr Ile Gly Leu Thr Val
 145 150 155 160

His Leu Leu Lys Lys Lys Met Pro Ile Gln Asn Gly Gly Ala Asn Leu
 165 170 175

Cys Ser Ser Phe Ser Ile Cys His Thr Phe Gln Trp His Glu Ala Met
 180 185 190

Phe Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Ser
 195 200 205

Ala Arg Ile Ile Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Arg Ala Ile Thr Phe Ile Met Val Val Ala Ile Val Phe
 225 230 235 240

Val Ile Cys Phe Leu Pro Ser Val Val Val Arg Ile Arg Ile Phe Trp
245 250 255

Leu Leu His Thr Ser Gly Thr Gln Asn Cys Glu Val Tyr Arg Ser Val
260 265 270

Asp Leu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met
275 280 285

Leu Asp Pro Val Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe
290 295 300

Phe Ser Thr Leu Ile Asn Arg Cys Leu Gln Arg Lys Met Thr Gly Glu
305 310 315 320

Pro Asp Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Asp Pro Asn
325 330 335

Lys Thr Arg Gly Ala Pro Glu Ala Leu Met Ala Asn Ser Gly Glu Pro
340 345 350

Trp Ser Pro Ser Tyr Leu Gly Pro Thr Ser Pro
355 360

<210>	3
<211>	6
<212>	PRT
<213>	人工

<220>
<223> 肽

<400> 3

Thr Leu Glu Ser Ile Met
1 5

<210>	4
<211>	5
<212>	PRT
<213>	人工

<220>
<223> 肽

<400> 4

Glu Tyr Asn Leu Val
1 5

<210> 5

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 肽

<400> 5

Asp Cys Gly Leu Phe
1 5

<210> 6
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 6
gatcaagctt ccatggcgtg ctgcctgagc gaggag 36

<210> 7
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 7
gatcggatcc ttagaacagg ccgcagtcct tcaggttcag ctgcaggatg gtg 53