



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117136061 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 28

(21) 申请号 202180078421.4

(22) 申请日 2021.09.21

(30) 优先权数据

63/081,089 2020.09.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/051375 2021.09.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/061312 EN 2022.03.24

(71) 申请人 索尔特戈公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 B·斯鲁特 B·勒瓦莱

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟

(51) Int.Cl.

A61K 31/519 (2006.01)

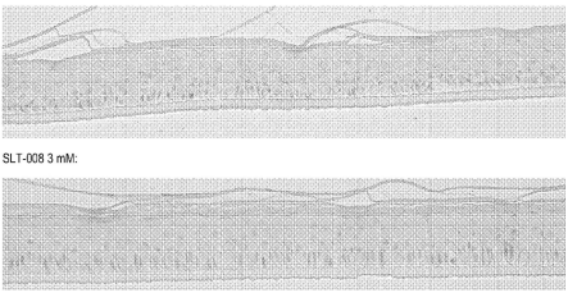
权利要求书11页 说明书34页 附图12页

(54) 发明名称

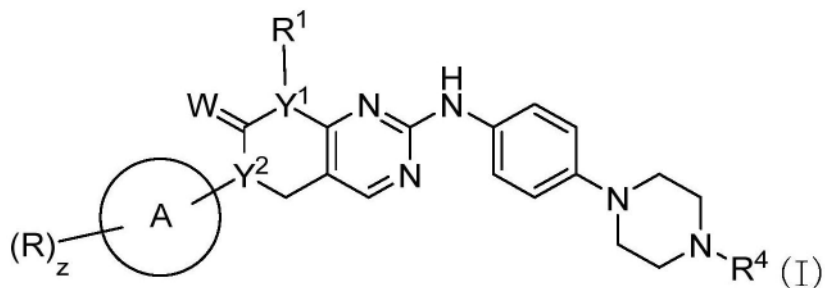
SIK抑制剂及其使用方法

(57) 摘要

一方面,本发明提供可抑制盐诱导型激酶(SIK)的化合物和使用该化合物治疗疾病或疾患的方法。



1. 一种下式 (I) 化合物:



其中W为S或O;

Y¹为N或CR^A;

Y²为N或CR^B;

环A为单环或多环碳脂环族基团、单环或多环或杂脂环族基团、单环或多环碳环芳基、或单环或多环碳环芳基杂芳基;

每个R为相同或不同的经取代或未经取代的烷基、卤素、羟基、氰基、氨基、经取代或未经取代的烷氧基、经取代或未经取代的烷硫基、经取代或未经取代的烷基砷、或经取代或未经取代的烷基胺;

z为0至环A的价态所允许的值的整数;

R^A和R^B独立地为H、卤素、-OH、-NH₂、-CN、或经取代或未经取代的烷基;

R¹为经取代或未经取代的单环或多环碳脂环族基团、经取代或未经取代的单环或多环杂脂环族基团、经取代或未经取代的单环或多环碳环芳基、或经取代或未经取代的单环或多环杂芳基;且

R⁴为H、或经取代或未经取代的烷基;

及其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中每个R为相同或不同的经取代或未经取代的烷基、或卤素。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其中每个R为相同或不同的经取代或未经取代的烷基、或氯。

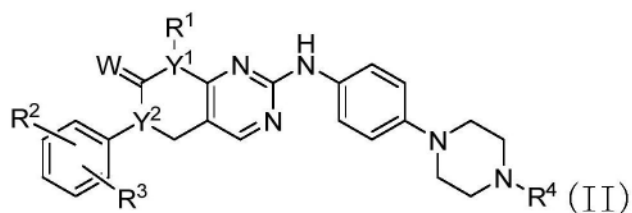
4. 根据权利要求1所述的化合物,其中每个R为相同或不同的经取代或未经取代的烷基。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的化合物,其中环A为单环或多环碳脂环族基团、或单环或多环杂脂环族基团。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的化合物,其中环A为单环或多环碳环芳基、或单环或多环杂芳基。

7. 根据权利要求1至4中任一项所述的化合物,其中环A为单环或多环碳环芳基。

8. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为下式 (II) 化合物:



其中W为S或O；

Y^1 为N或 CR^A ；

Y^2 为N或 CR^B ；

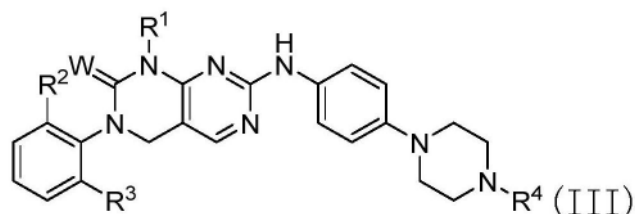
R^A 和 R^B 独立地为H、卤素、-OH、-NH₂、-CN、或经取代或未经取代的烷基；

R^1 为经取代或未经取代的多环碳脂环族或杂脂环族基团；

R^2 和 R^3 各自独立地为H、经取代或未经取代的烷基、卤素、羟基、氰基、氨基、经取代或未经取代的烷氧基、经取代或未经取代的烷硫基、经取代或未经取代的烷基砷、或经取代或未经取代的烷基胺；且

R^4 为H、或经取代或经取代或未经取代的烷基；及其药学上可接受的盐。

9. 根据权利要求1所述的化合物，其中所述化合物为下式 (III) 化合物：



其中在式 (III) 中：

W为S或O；

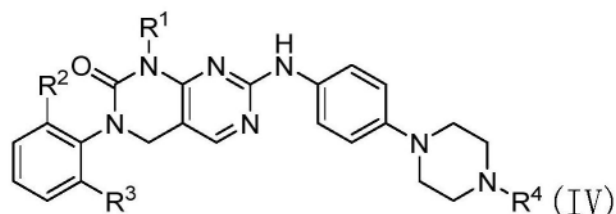
R^1 为经取代或未经取代的多环碳脂环族或杂脂环族基团；

R^2 和 R^3 各自独立地为H、经取代或未经取代的烷基、卤素、羟基、氰基、氨基、经取代或未经取代的烷氧基、经取代或未经取代的烷硫基、经取代或未经取代的烷基砷、或经取代或未经取代的烷基胺；且

R^4 为H、或经取代或未经取代的烷基；

及其药学上可接受的盐。

10. 根据权利要求1所述的化合物，其中所述化合物为下式 (IV) 化合物：



其中在式 (IV) 中：

R^1 为经取代或未经取代的多环碳脂环族或杂脂环族基团；

R^2 和 R^3 各自独立地为H、经取代或未经取代的烷基、卤素、羟基、氰基、氨基、经取代或未经取代的烷氧基、经取代或未经取代的烷硫基、经取代或未经取代的烷基砷、或经取代或未经取代的烷基胺；且

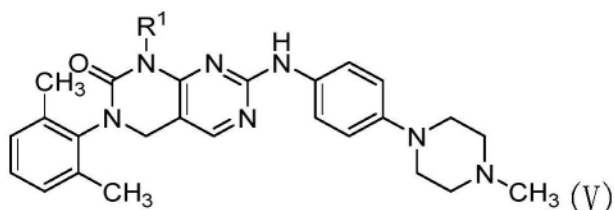
R^4 为H、或经取代或经取代或未经取代的烷基；及其药学上可接受的盐。

11. 根据权利要求8至10中任一项所述的化合物，其中 R^2 和 R^3 各自独立地为经取代或未经取代的烷基、或卤素。

12. 根据权利要求8至10中任一项所述的化合物，其中 R^2 和 R^3 各自独立地为经取代或未经取代的烷基、或氯。

13. 根据权利要求8至10中任一项所述的化合物，其中 R^2 和 R^3 为相同或不同的经取代或未经取代的烷基。

14. 根据权利要求1所述的化合物，其中所述化合物为下式(V)化合物：

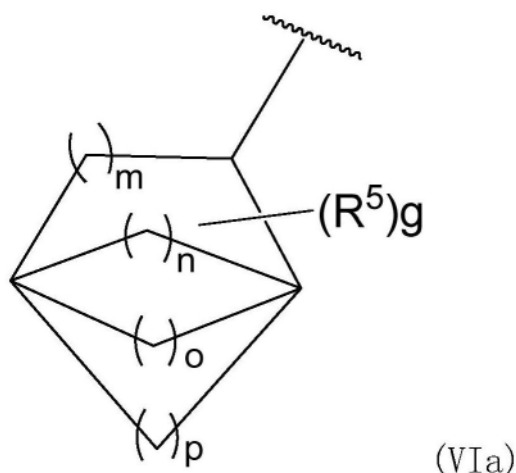


其中在式(V)中：

R^1 为经取代或未经取代的多环碳脂环族或杂脂环族基团；及其药学上可接受的盐。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的化合物，其中 R^1 为任选地经取代的多环碳脂环族基团。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的化合物，其中 R^1 具有下式(VIa)的结构：



其中在式(VIa)中：

m 为0至5的整数；

n 为0至3的整数；

o 为0至3的整数；

p 为0至5的整数；

每个 R^5 为相同或不同的非氢取代基，诸如羟基、卤素、任选地经取代的烷基、或任选地经取代的杂烷基；

g 为0或正整数；且

m 、 n 、 o 或 p 中的至少一个为正整数。

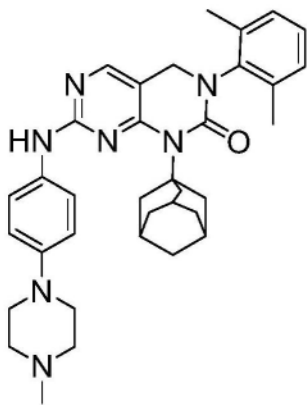
17. 根据权利要求1至16中任一项所述的化合物，其中 R^1 为任选地经取代的金刚烷基、任选地经取代的降冰片基、任选地经取代的环[2,2,2]辛基、或任选地经取代的双环[3,3,1]

壬基。

18. 根据权利要求1至14中任一项所述的化合物, 其中R¹为任选地经取代的多环杂脂环族基团。

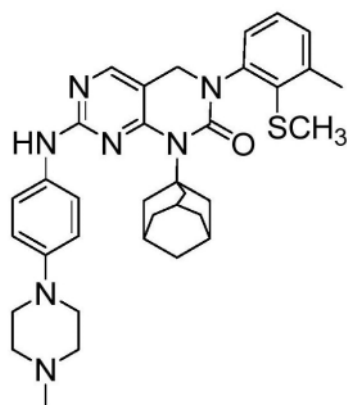
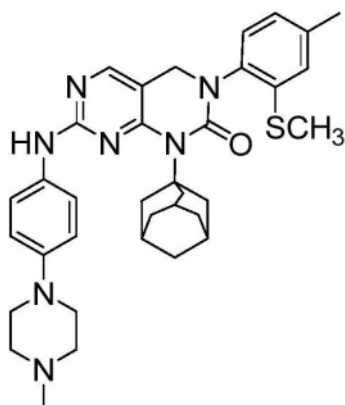
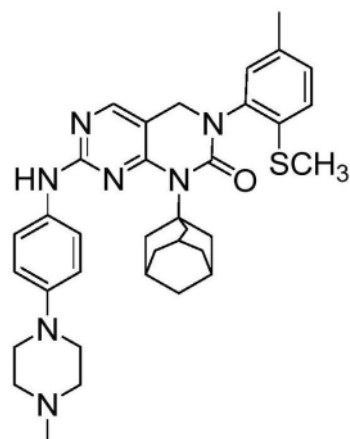
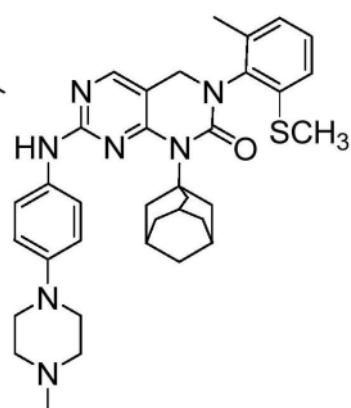
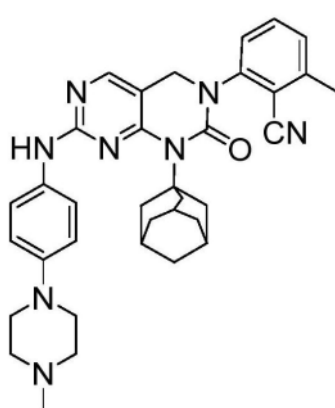
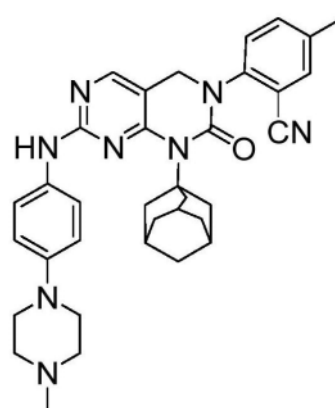
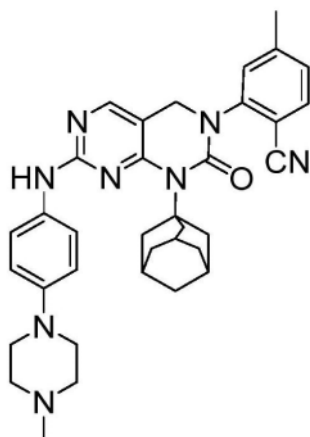
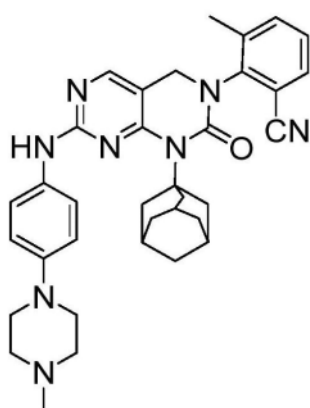
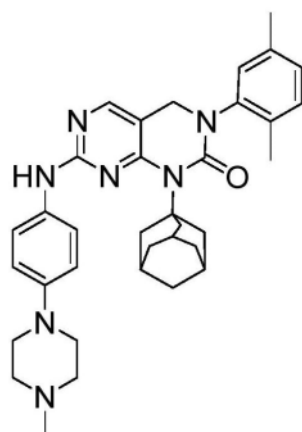
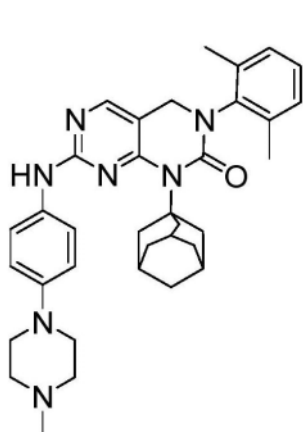
19. 根据权利要求1至14中任一项所述的化合物, 其中R¹为任选地经取代的硫代降冰片基、或任选地经取代的氧代降冰片基。

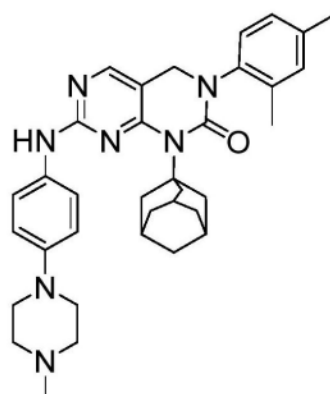
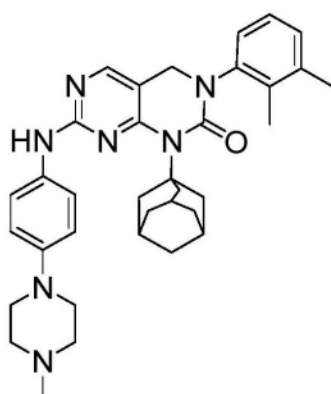
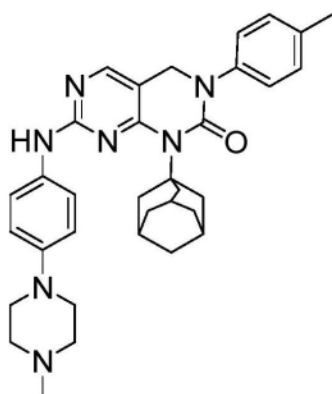
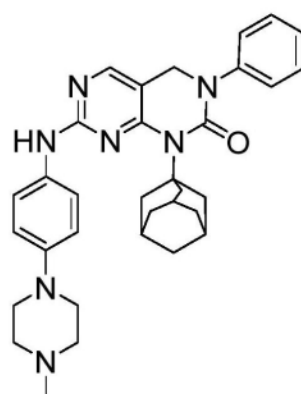
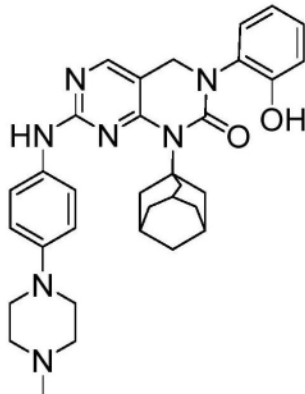
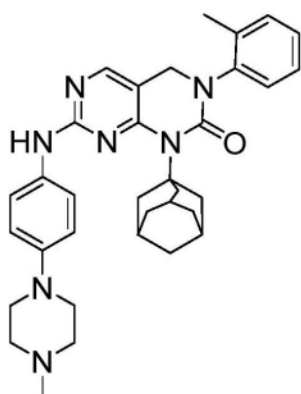
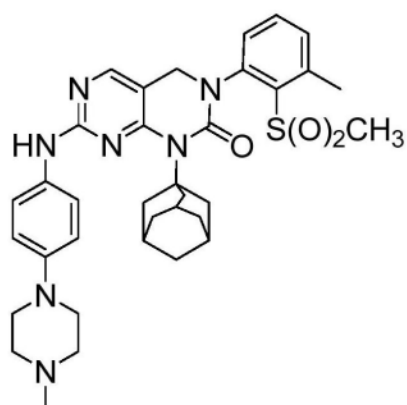
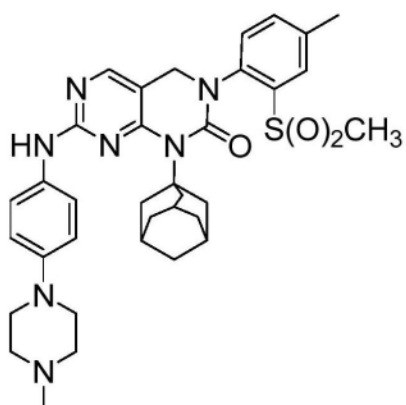
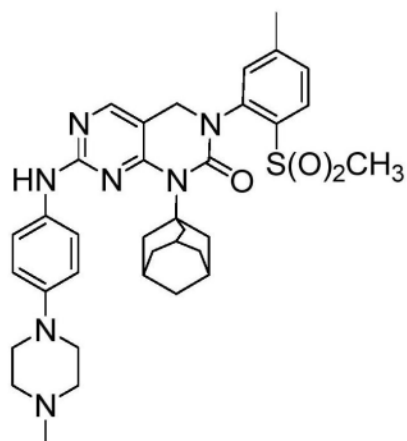
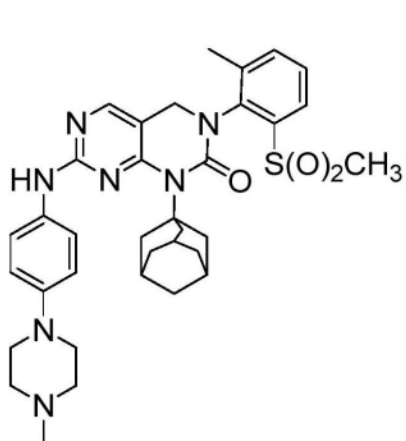
20. 一种化合物, 所述化合物为:

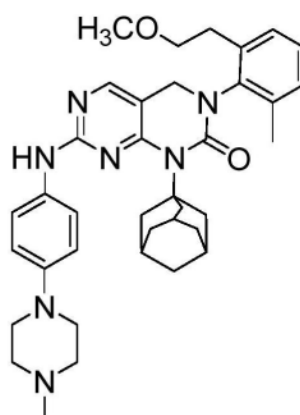
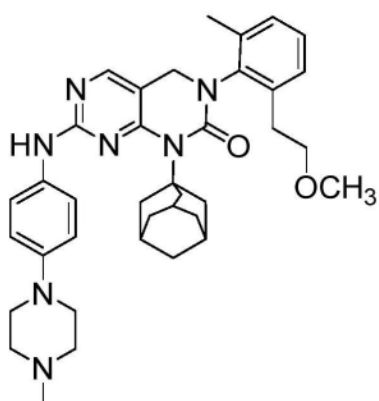
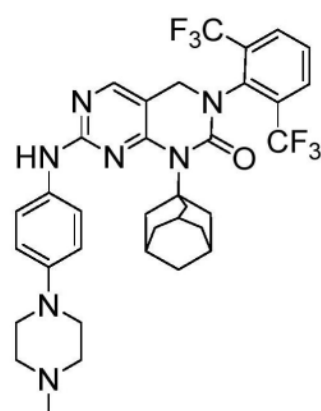
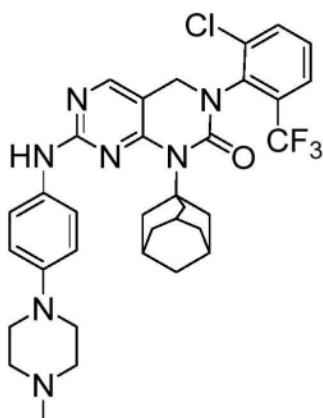
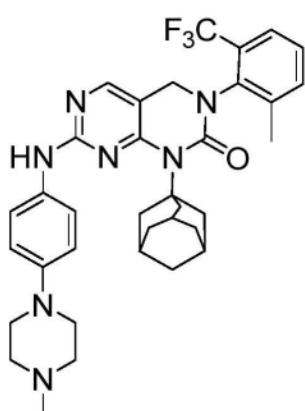
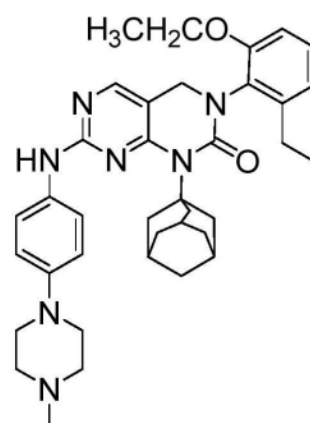
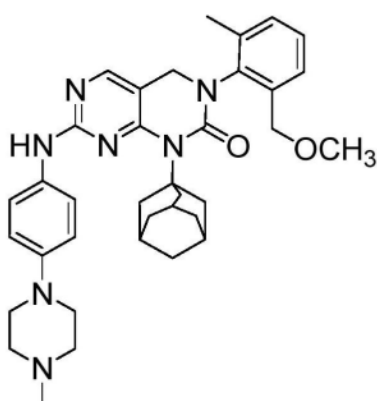
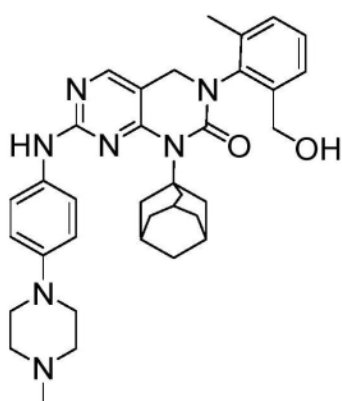
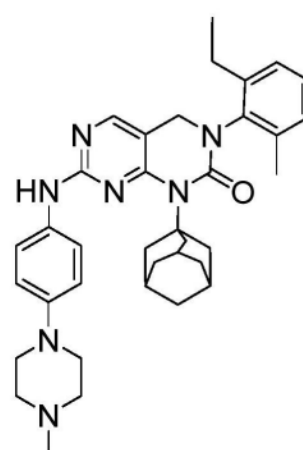
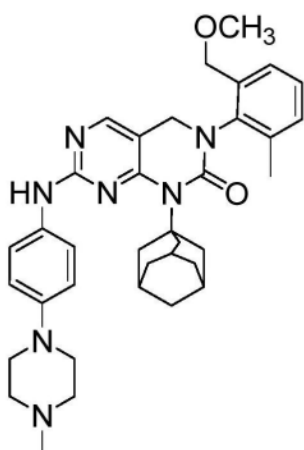
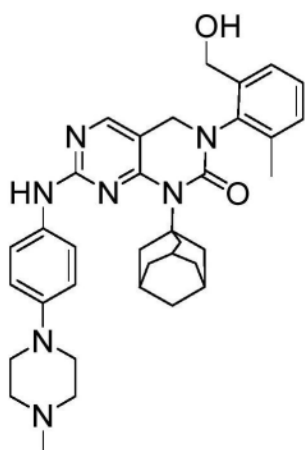


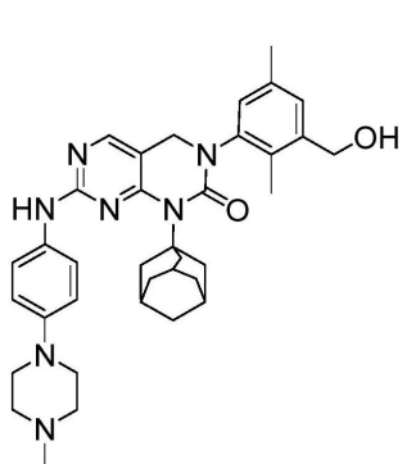
或其药学上可接受的盐。

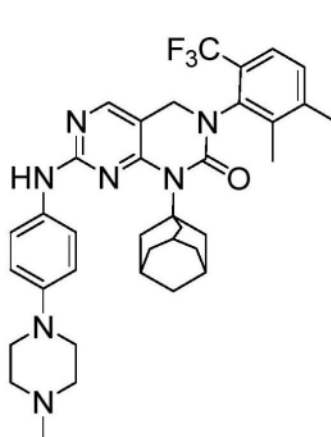
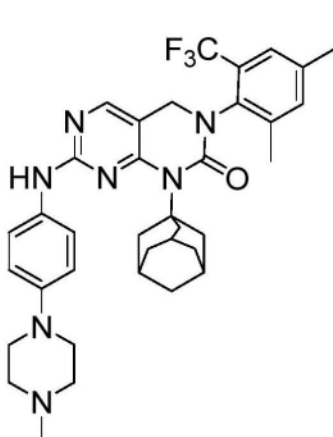
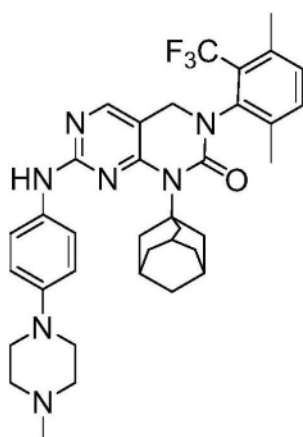
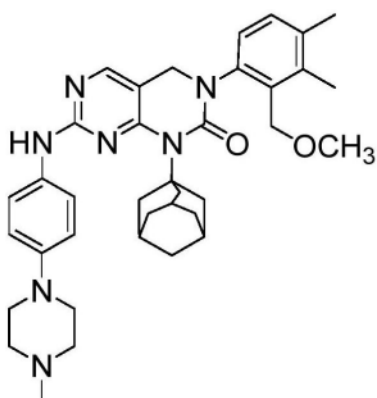
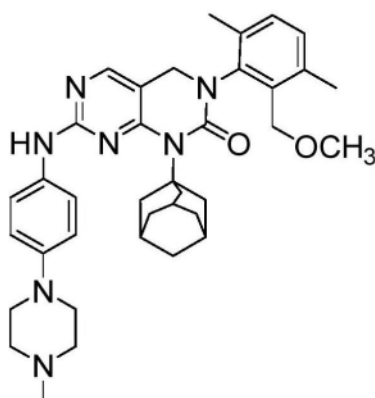
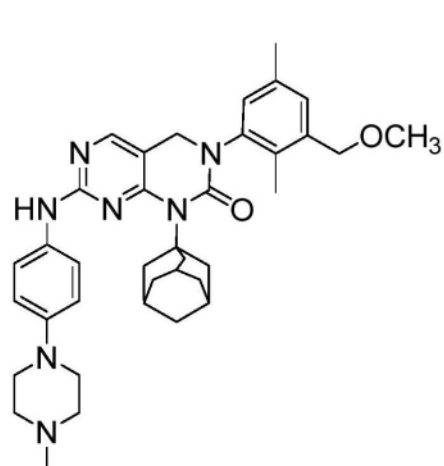
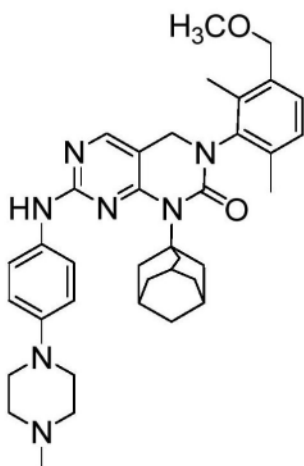
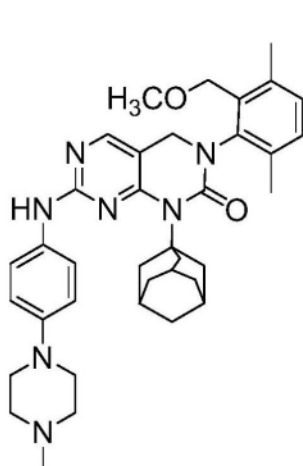
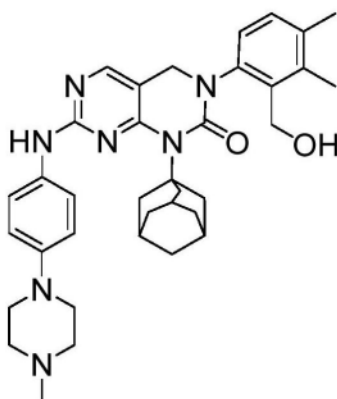
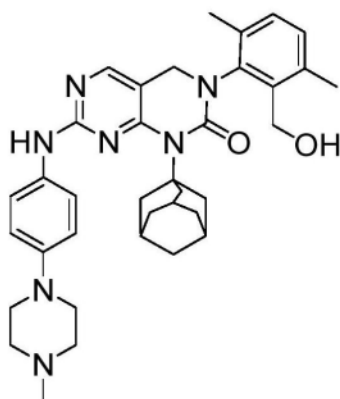
21. 一种化合物, 所述化合物为:













22. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至21中任一项所述的化合物和一种或多种

药学上可接受的载体。

23. 一种用于治疗罹患或易患皮肤相关疾患或疾病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者给药有效量的根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或组合物。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述受试者经鉴定为罹患皮肤相关疾患或疾病,且将所述化合物或组合物给药至所述经鉴定的受试者。

25. 一种用于治疗罹患或易患红斑痤疮的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者给药有效量的根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或组合物。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述受试者经鉴定为罹患红斑痤疮,且将所述化合物或组合物给药至所述经鉴定的受试者。

27. 根据权利要求25或26所述的方法,其中所述受试者罹患红斑血管扩张型红斑痤疮(亚型1)、丘疹脓疱型红斑痤疮(亚型2)、赘疣型红斑痤疮(亚型3)和/或眼红斑痤疮(亚型4)。

28. 根据权利要求25或26所述的方法,其中所述受试者已经鉴定为罹患红斑血管扩张型红斑痤疮(亚型1)、丘疹脓疱型红斑痤疮(亚型2)、赘疣型红斑痤疮(亚型3)和/或眼红斑痤疮(亚型4),且将所述化合物或组合物给药至所述将鉴定的受试者。

29. 一种增加受试者组织内的色素沉积的方法,所述方法包括以足以增加黑色素产生的量向所述受试者给药根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或组合物,从而增加所述受试者组织内的色素沉积。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述受试者组织为皮肤或头发。

31. 一种增加有需要的受试者皮肤组织内的细胞DNA稳定性的方法,所述方法包括以足以减少所述皮肤组织细胞DNA中的凋亡和/或胸腺嘧啶二聚体形成的量向所述受试者给药根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或组合物,从而增加所述受试者皮肤组织内的细胞DNA稳定性。

SIK抑制剂及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抑制盐诱导型激酶的化合物,以及涉及所述化合物用于治疗或预防受试者的皮肤疾患和皮肤相关疾患。

背景技术

[0002] 对于很多皮肤疾患的治疗措施具有公认的缺点,包括各种副效应和有限的有效性。增加皮肤色素沉积的药剂可能具有从改善炎性皮肤疾患和提供防晒到纯粹的美容应用范围内的很多有益皮肤学效应。因此,对于皮肤疾患和瑕疵进行新的治疗将会是所希望的。

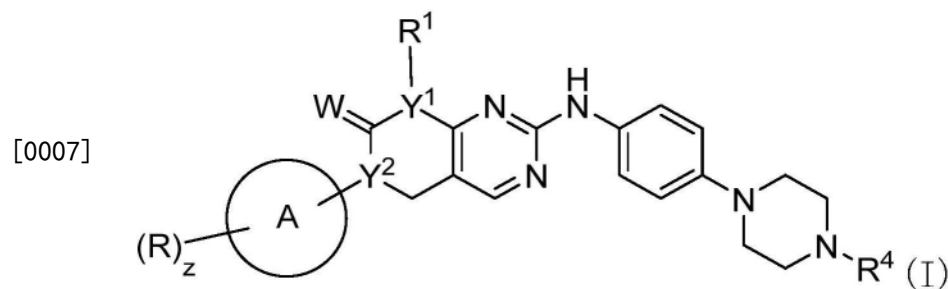
[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请涉及并主张2020年9月21日提交的美国专利申请号63/081,089的优先权,其整体公开通过引用并入本文。

发明内容

[0005] 一方面,我们提供抑制盐诱导型激酶的化合物,用于治疗或预防受试者的皮肤疾患和皮肤相关疾患。

[0006] 在优选的方面,提供下式(I)化合物:



[0008] 其中W为S或O;

[0009] Y¹为N或CR^A;

[0010] Y²为N或CR^B;

[0011] 环A为单环或多环碳脂环族基团、单环或多环杂脂环族基团、单环或多环碳环芳基、或单环或多环杂芳基;

[0012] 每个R为相同或不同的经取代或未经取代的烷基、卤素、羟基、氰基、氨基、经取代或未经取代的烷氧基、经取代或未经取代的烷硫基、经取代或未经取代的烷基砷、或经取代或未经取代的烷基胺;

[0013] z为0 (其中环A没有非氢环取代基) 至环A的价态所允许的整数值的整数;

[0014] R^A和R^B独立地为H、卤素、-OH、-NH₂、-CN、或经取代或未经取代的烷基;

[0015] R¹为经取代或未经取代的单环或多环碳脂环族基团、经取代或未经取代的单环或多环杂脂环族基团、经取代或未经取代的单环或多环碳环芳基、或经取代或未经取代的单环或多环杂芳基;且

[0016] R⁴为H、或经取代或未经取代的烷基;

[0017] 及其药学上可接受的盐。

[0018] 在某些实施方案中,环A为单环或多环碳环芳基、或多环杂芳基。例如,环A可以是任选地经取代的苯基、任选地经取代的萘基、或任选地经取代的蒽基、任选地经取代的吡啶基、任选地经取代的嘧啶基、或任选地经取代的嘌呤基。在某些实施方案中,环A为苯基、萘基或蒽基,且 z 为0至10的整数。在某些优选实施方案中,环A为任选地经取代的苯基。

[0019] 在某些优选实施方案中,环A为单环或多环碳脂环族基团、或单环或多环杂脂环族基团。在某些优选实施方案中,环A为多环碳脂环族基团或多环杂脂环族基团。在某些优选实施方案中,环A为多环碳脂环族基团。

[0020] 在某些优选实施方案中, R^1 为单环或多环碳脂环族基团、或单环或多环杂脂环族基团。在某些优选实施方案中, R^1 A为多环碳脂环族基团或多环杂脂环族基团。在某些优选实施方案中, R^1 为多环碳脂环族基团。

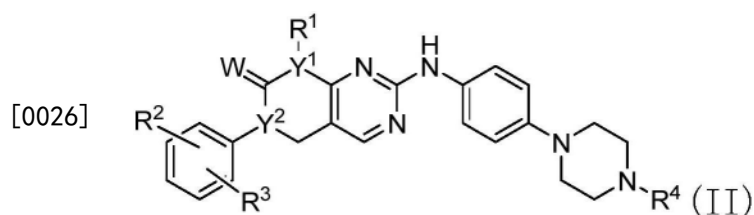
[0021] 在某些实施方案中, R^1 为单环或多环碳环芳基、或多环杂芳基。例如, R^1 可以是任选地经取代的苯基、任选地经取代的萘基、或任选地经取代的蒽基、任选地经取代的吡啶基、任选地经取代的嘧啶基、或任选地经取代的嘌呤基。在某些方面, R^1 不是单环基团,诸如苯基或其他单碳环芳基或单环碳脂环。

[0022] 在式(I)的某些实施方案中, z 为0至20的整数,更典型地, z 为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,或在某些实施方案中, z 为0、1、2、3、4、5或6,或在某些实施方案中, z 为0、1、2或3。

[0023] 在式(I)的某些实施方案中, R 为经取代或未经取代的烷基或卤素,诸如F、Cl、Br或I,特别是Cl。在式(I)的某些实施方案中, R 为经取代或未经取代的烷氧基,诸如甲氧基或乙氧基。

[0024] 在某些方面,一个或多个 R 基团为经取代或未经取代的烷基且不含任何不饱和的碳-碳键。在某些方面,一个或多个 R 基团为经取代或未经取代的烷基,诸如 C_{1-6} 未经取代的烷基,且不含任何不饱和的碳-碳键。在其他方面, R 为经取代或未经取代的烷基且可含有一个或多个不饱和的碳-碳键(且因此,此类 R 可称为经取代或未经取代的烯基,诸如具有2至6或8个碳原子;或经取代或未经取代的炔基,诸如具有2至6或8个碳原子)。

[0025] 在优选的方面,提供下式(II)化合物:



[0027] 其中 W 为S或O;

[0028] Y^1 为N或 CR^A ;

[0029] Y^2 为N或 CR^B ;

[0030] R^A 和 R^B 独立地为H、卤素、-OH、-NH₂、-CN、或经取代或未经取代的烷基;

[0031] R^1 为经取代或未经取代的多环碳脂环族基团、或经取代或未经取代的多环杂脂环族基团;

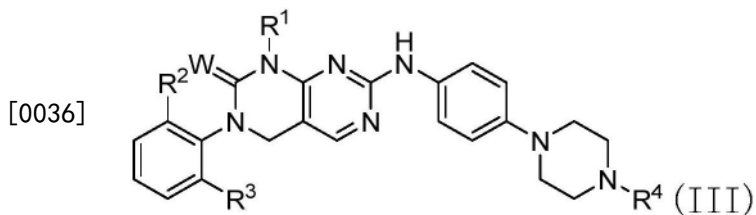
[0032] R^2 和 R^3 各自独立地为H、经取代或未经取代的烷基、卤素、羟基、氰基氨基经取代或未经取代的烷氧基经取代或未经取代的烷硫基经取代或未经取代的烷基砜、或经取代或未

经取代的烷基胺；且

[0033] R^4 为H、或经取代或未经取代的烷基；

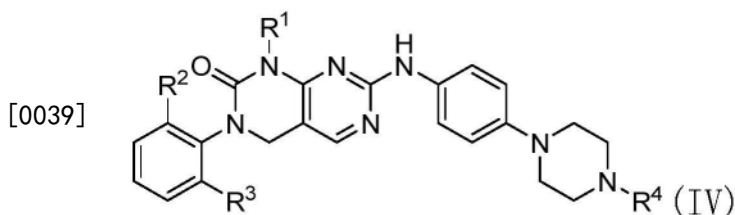
[0034] 及其药学上可接受的盐。

[0035] 优选的式 (I) 或 (II) 化合物包括下式 (III) 的那些：



[0037] 其中在式 (III) 中, W 、 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自与上文关于式 (II) 所定义的相同；及其药学上可接受的盐。

[0038] 在又一方面,提供下式 (IV) 化合物：



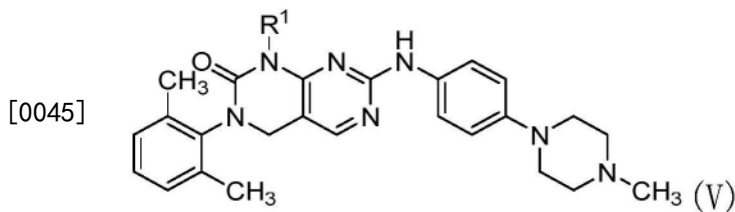
[0040] 其中在式 (IV) 中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自与上文关于式 (II) 所定义的相同；及其药学上可接受的盐。

[0041] 在某些实施方案中,在式 (II)、(III) 或 (IV) 中的任一者中, R^2 和 R^3 中的每一个独立地为H、经取代或未经取代的 C_1 - C_6 烷基、或卤素,且 R^4 为H、或经取代或未经取代的 C_1 - C_6 烷基。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的至少一者为经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基,诸如任选地经取代的甲基、或卤素诸如-F、-Cl、-Br或-I。在式 (II)、(III) 或 (IV) 的某些实施方案中, R^2 和 R^3 两者均不是H,且在某些优选方面可以是经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基诸如任选地经取代的甲基、或卤素诸如-F、-Cl、-Br或-I,特别是-Cl。

[0042] 在特定实施方案中,在式 (II)、(III) 或 (IV) 中的任一者中, R^2 、 R^3 和 R^4 为相同或不同的且各自为未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, R^2 、 R^3 和 R^4 中的一者或多者为经取代的甲基。在某些实施方案中, R^2 、 R^3 和 R^4 中的至少两者或多者为经取代的甲基。在某些实施方案中, R^2 、 R^3 和 R^4 中的每一个为经取代的甲基。

[0043] 在特定实施方案中,在式 (II)、(III) 或 (IV) 中的任一者中, R^2 和 R^3 各自独立地为未经取代的 C_1 - C_4 烷基或卤素。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的至少一者为未经取代的甲基。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的至少一者为卤素。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的至少一者为-Cl。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的至少一者为-Br。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的至少一者为-F。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的至少一者为-I。

[0044] 在某些实施方案中,优选的化合物包括具有下式 (V) 的结构的那些：

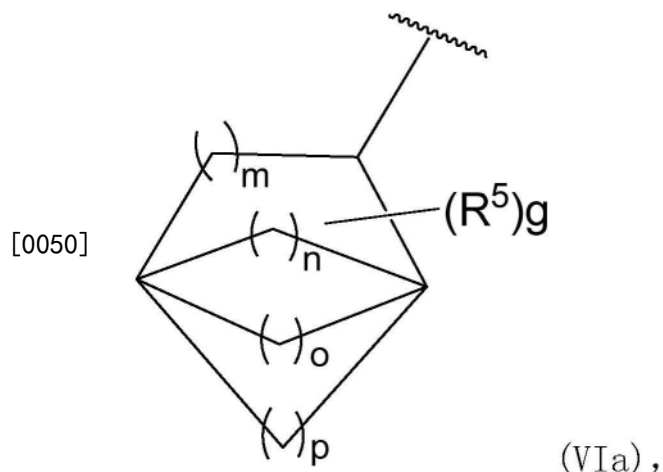


[0046] 其中在式(V)中, R^1 与上述式(I)或(II)中定义的相同;及其药学上可接受的盐。

[0047] 在特定方面,上述式(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)的优选化合物包括其中 R^1 为任选地经取代的多环碳脂环族基团的那些。

[0048] 在上述式中任一者的优选实施方案中, R^1 包含双环碳脂环族基团。在另一优选实施方案中, R^1 包含三环碳脂环族基团。

[0049] 更特别地,在一个方面,优选为式(VI)化合物,其定义为上述式(I)、(II)、(III)、(IV)和/或(V)中任一者的化合物,其中 R^1 具有下式(VIa)的结构:



[0051] 其中在式(VIa)中:

[0052] m 是0至5的整数;

[0053] n 为0至3的整数;

[0054] o 为0至3的整数;

[0055] p 为0至5的整数;

[0056] 每个 R^5 为相同或不同的非氢取代基,诸如羟基、卤素、任选地经取代的烷基、或任选地经取代的杂烷基;

[0057] g 为0(其中不存在 R^5 基团)或正整数诸如1至10,且更典型地, g 为0、1、2、3、4、5或6。在式(VIa)且 n 和 o 中的至少一者为正整数的某些实施方案中,当 n 或 o 为0时,在两个相邻碳原子之间不形成直接键合,而当 m 或 p 为0时,在两个相邻碳原子之间形成直接键合。在某些方面, g 将会为0,即,碳脂环族环除了具有与环氮的链接之外将不具有任何非氢取代基(公认上述式(VIa)中不显示化合物环氮,但 R^1 到式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)化合物的环氮的链接由式VIa的波浪线表示)。在某些方面, g 为0、1、2或3,或者 g 为0、1或2。

[0058] 在式(VI)和(VIa)的某些实施方案中, n 和 o 中的至少一者为1或更大的整数。

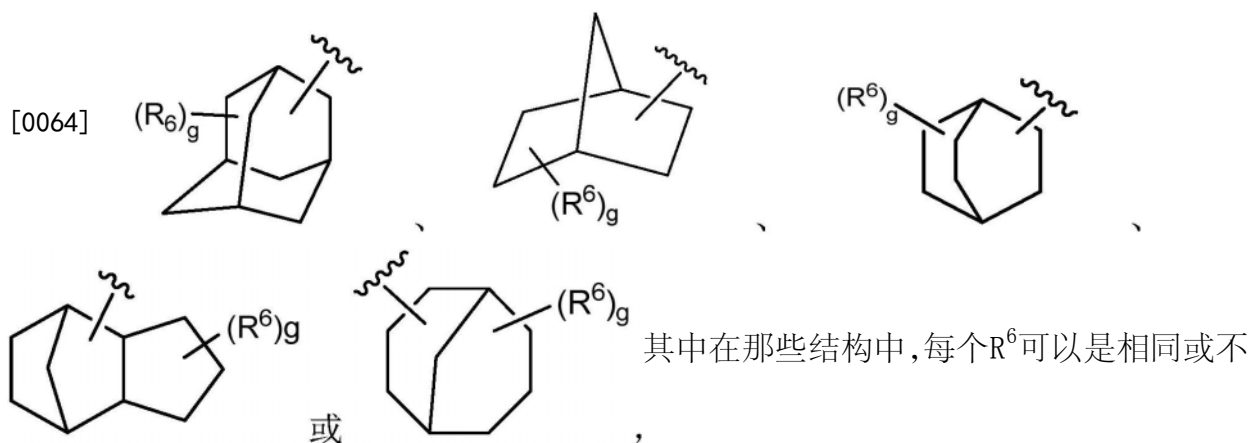
[0059] 在包括式(VI)和(VIa)在内的上述式的其他某些实施方案中, R^1 可以是任选地经取代的金刚烷基。

[0060] 在包括式(VI)和(VIa)在内的上述式的又一些某些实施方案中, R^1 可以是任选地经取代的降冰片基。

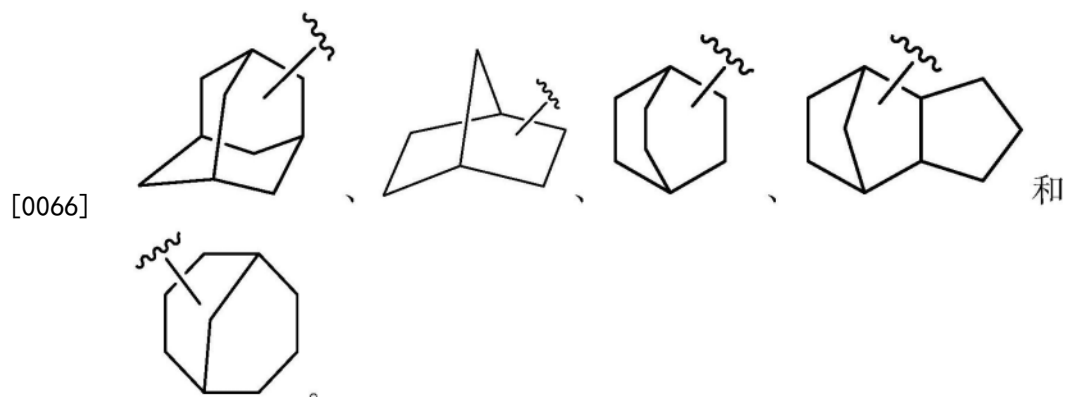
[0061] 在包括式(VI)和(VIa)在内的上述式的再一些某些实施方案中, R^1 可以是任选地经取代的双环[2,2,2]辛基。

[0062] 在包括式(VI)和(VIa)在内的上述式的其他实施方案中, R^1 可以是任选地经取代的双环[3,3,1]壬基。

[0063] 在相关实施方案中,在式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及/或(VI)中的任一者中, R^1 可包括选自下列的部分:

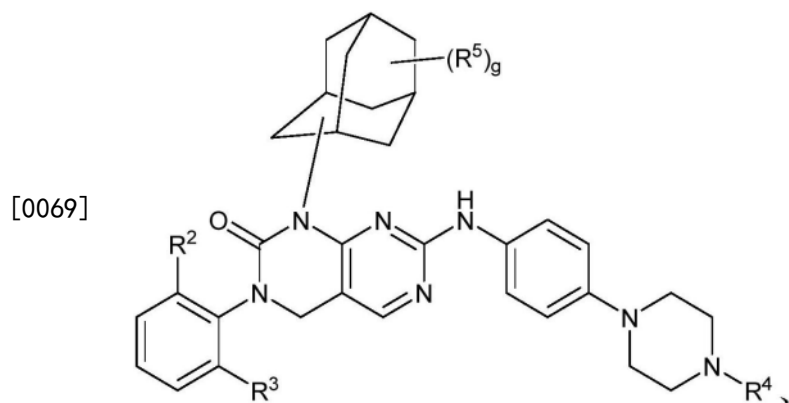


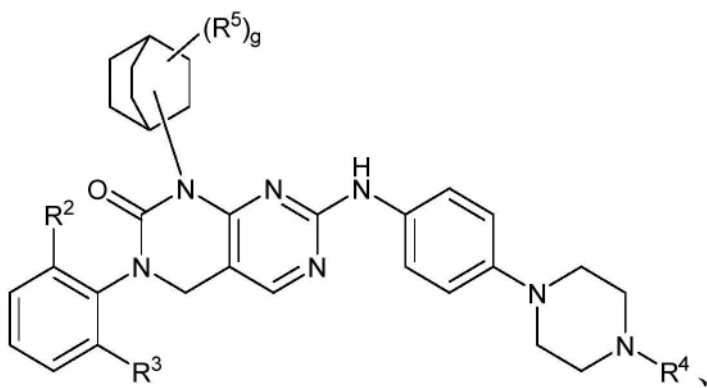
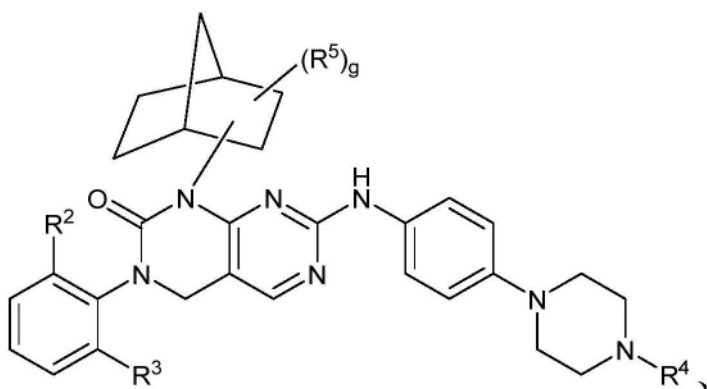
[0065] 在某些优选实施方案中,上述结构中的 g 为0。在此类实施方案中,在式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(VI)化合物中, R^1 可包含选自下列的部分:



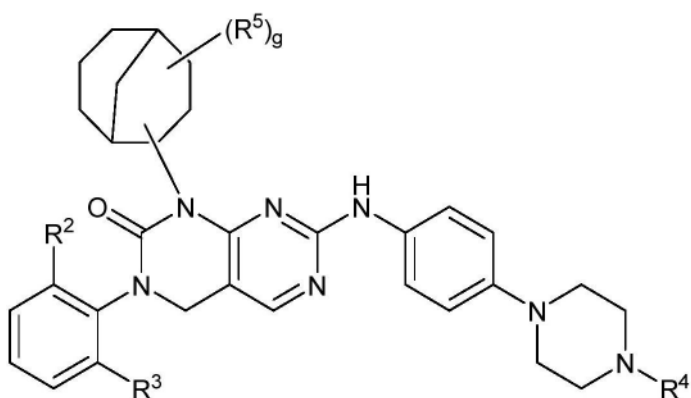
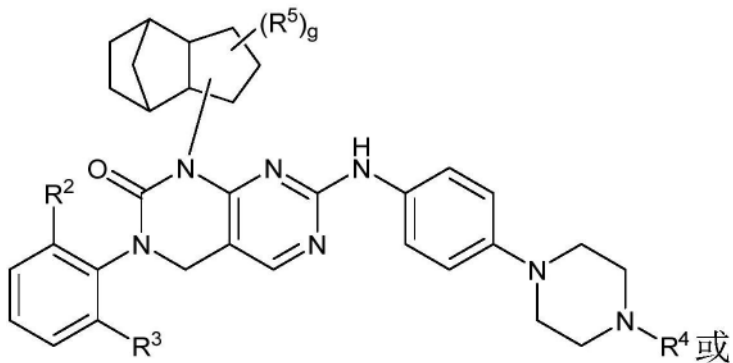
[0067] 再一次,如将会理解的,上述那些结构中的波浪线表示与式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(VI)化合物的环氮的链接。

[0068] 在其他实施方案中,优选的化合物包括下列结构中的任一者:



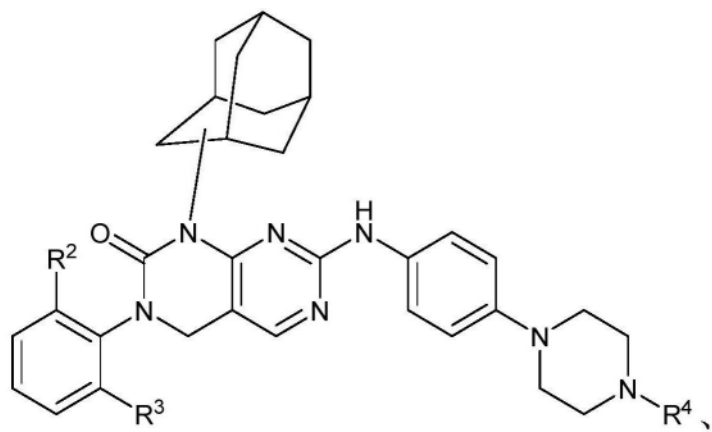


[0070]

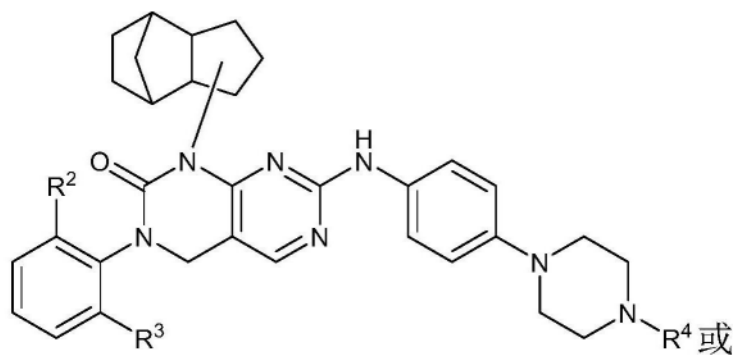
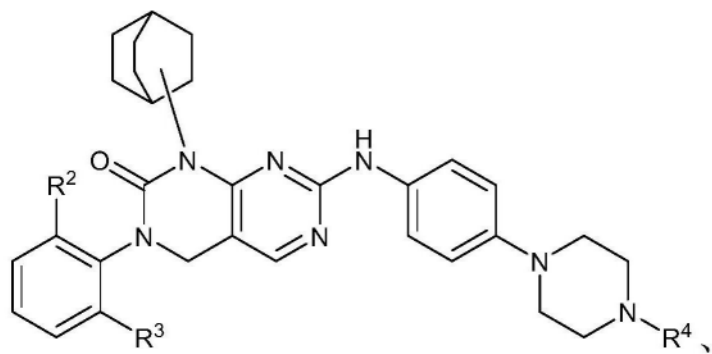
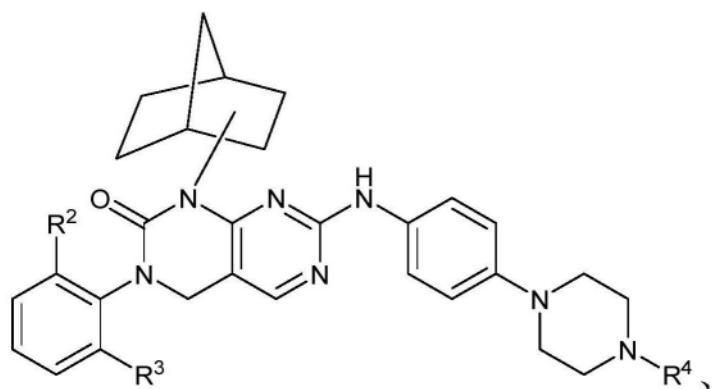


[0071] 其中在上述结构中, R²、R³和R⁴与上述式(II)中所定义的相同;且R⁵和g与上述式(VIa)中所定义的相同;及其药学上可接受的盐。R²、R³、R⁴和每个R⁵优选可以是任选地经取代的C₁₋₄烷基,诸如任选地经取代的甲基。优选地,g可以是0、1、2或3。

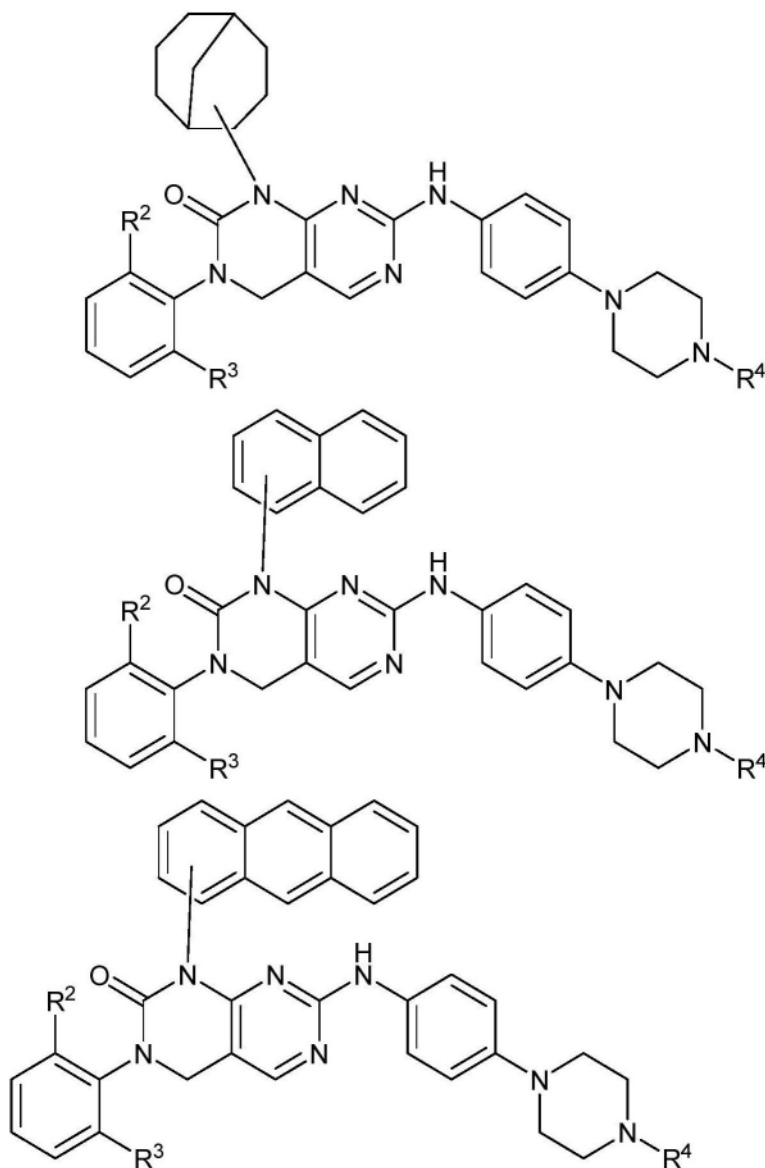
[0072] 在其他实施方案中,优选的化合物包括下列结构中的任一者:



[0073]



[0074]



[0075] 其中在上述结构中, R^2 、 R^3 和 R^4 与上述式(II)中所定义的相同;及其药学上可接受的盐。 R^2 、 R^3 和 R^4 优选可以是任选地经取代的 C_{1-4} 烷基,诸如任选地经取代的甲基,包括未经取代的甲基。在某些实施方案中, R^2 、 R^3 和 R^4 各自为未经取代的甲基。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的至少一者为未经取代的甲基。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的至少一者为卤素。

[0076] 在其他实施方案中,上述式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(VI)包括其中 R^1 为任选地经取代的多环杂脂环族基团的那些。例如,合适的 R^1 基团可包括包含任选地经取代的硫代降冰片基或任选地经取代的氧代降冰片基的部分。

[0077] 在又一方面,提供药物组合物,其包含如上文详述的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(VI)中任一者的化合物。该组合物可合适地包含一种或多种药学上可接受的载体。在优选实施方案中,该组合物可经配制或以其他方式调适以用于皮肤色素沉积相关的情况,例如,该组合物可经调适以用于外用给药诸如软膏、凝胶或洗剂,或用于作为片剂或胶囊口服给药。

[0078] 在优选的方面,提供增加受试者组织内的色素沉积的方法,该方法包括以足以增加黑色素产生的量向受试者给药上文详述的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(VI)中任

一者的化合物,从而增加该受试者组织内的色素沉积。

[0079] 在其他优选的方面,提供治疗罹患或易患炎症性皮肤病的受试者的方法,该炎症性皮肤病包括红斑血管扩张型红斑痤疮(亚型1)、丘疹脓疱型红斑痤疮(亚型2)、赘疣型红斑痤疮(亚型3)和/或眼红斑痤疮(亚型4)中的任一者。

[0080] 在优选的其他方面,提供增加有需要的受试者的皮肤组织中的细胞DNA稳定性的方法,该方法包括以足以减少皮肤组织的细胞DNA中的凋亡和/或胸腺嘧啶二聚体形成的量向受试者给药上文详述的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(VI)中任一者的化合物,从而增加该受试者皮肤组织中的细胞DNA稳定性。

[0081] 在又一方面,提供用于治疗或预防疾病或疾患的试剂盒,该疾病或疾患包括色素沉积疾患、肤色不均匀、低色素沉积、白癜风、炎症性皮肤病(包括红斑痤疮)或其他皮肤相关疾患或病症。本发明的试剂盒可合适地包含1)式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)中任一者的一种或多种化合物;和2)使用该一种或多种化合物来治疗或预防疾病或疾患的使用说明,该疾病或疾患包括低色素沉积、白癜风、炎症性皮肤病(包括红斑痤疮)或其他皮肤相关疾患或病症。优选的,试剂盒将会包含治疗有效量的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)中任一者的一种或多种化合物。使用说明可合适地为书面形式,包括作为产品标签。

[0082] 可使用本文所述的系统进行处理各种皮肤情况的方法,诸如用于美容目的。应理解,尽管此类方法由医生执行,但非医生诸如美容师和其他经过适当训练的人员可使用本文所述的系统在有或没有医生监督的条件下处理各种皮肤情况。

[0083] 本发明的其它方面在后文中公开。

附图说明

[0084] 以下具体实施方式以举例方式给出而不试图将本发明限制为所描述的具体实施方案并且可以结合通过引用并入本文附图最佳地理解。

[0085] 图1描绘经Fontana-Masson染色的媒介物(PEG/乙醇/Transcutol®)切片和3mM SLT-008切片中的黑色素含量。

[0086] 图2描绘SLT-008对于黑色素合成的效应,与经赋形剂E2处理的剥离批次SE2J11进行比较。黑色:对照;红色:UV对照;紫色:0.5%SLT-008;和蓝色:0.9%SLT-008。

[0087] 图3描绘从经Fontana-Masson染色的媒介物(无水乙醇)切片和SLT-008(0.9%)切片测定的黑色素含量。

[0088] 图4描绘具有不同剂量的SLT-008(0.3 μ g/ml、0.01 μ g/ml和0.0033 μ g/ml)的固定在4%甲醛中、脱水的和石蜡包埋的组织。用曙红和苏木精(H/E)对6 μ m表皮切片染色。载玻片用特定媒介封固并且用与数码相机(Zeiss)偶联的Leica DM2000光学显微镜检查。

[0089] 图5描绘在持续10天将SLT-008施加到黑化的重建表皮上之后的乳酸脱氢酶(LDH)释放。

[0090] 图6描绘经Fontana-Masson染色的切片中的黑色素含量。表皮色素沉积通过功能性黑素细胞的树突状形貌以及经组织为角化细胞细胞核上的核上黑色素帽的黑素体的形成来显示。图6A显示未经处理的对照、媒介物(DMSO 0.05%)和两种阳性对照弗斯可林(forskolin)(3.33 μ M)或IBMX(150 μ M)与DMSO 0.05%。图6B显示0.3 μ g/ml、0.011 μ g/ml、0.0033 μ g/ml的SLT-008与DMSO 0.005%。

[0091] 图7描绘从经Fontana-Masson染色的切片测定的黑色素含量(对于IBMX和FSK处理,相对于DMSO 0.05%的百分比;对于SLT-008处理,相对于DMSO 0.005%的百分比)。使用剂量为150 μ M的IBMX和剂量为3.33 μ M的弗斯可林作为促色素沉积对照。结果如图所示。剂量为0.3 μ g/ml的SLT-008得到129 $\pm$ 5.7黑色素含量。剂量为0.011 μ g/ml的SLT-008得到125.6 $\pm$ 15.4黑色素含量。

[0092] 图8描绘通过在以1.0 μ g/ml、0.1 μ g/ml和0.3 μ g/ml施加SLT-008之后进行化学萃取得到的黑色素含量。

[0093] 图9描绘全部样品中,对于与表皮中凋亡细胞相关的TUNEL染色呈阳性的表面所含的百分比。

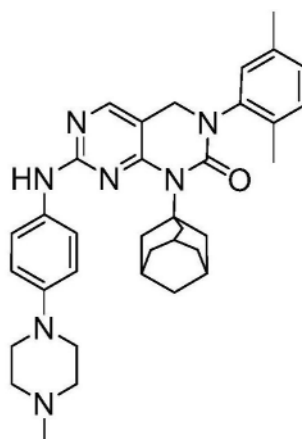
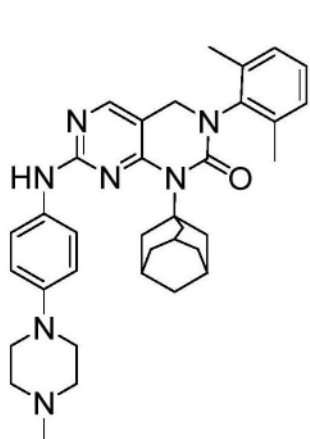
[0094] 图10描绘全部样品中,对于表皮中的胸腺嘧啶二聚体形成呈阳性的表面所含的百分比。

[0095] 图11描绘全部样品中,对于与表皮中凋亡细胞相关的TUNEL染色呈阳性的表面所含的百分比。

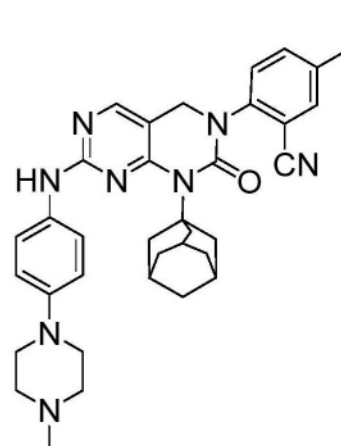
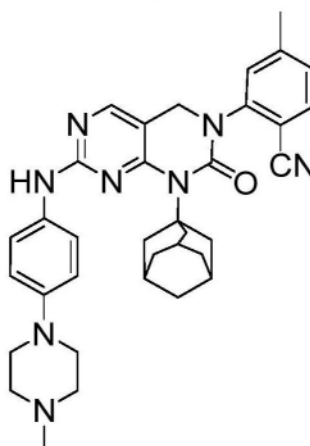
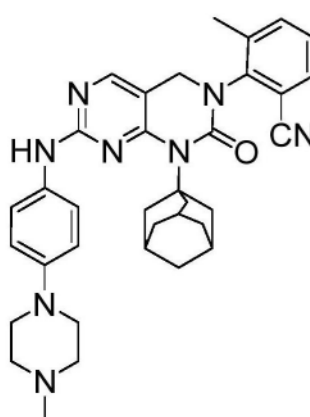
具体实施方式

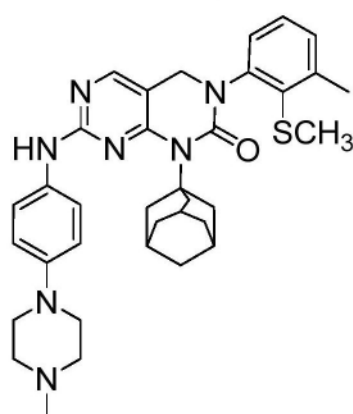
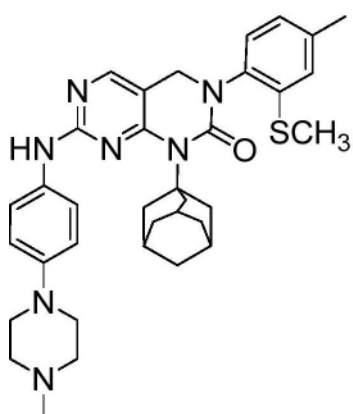
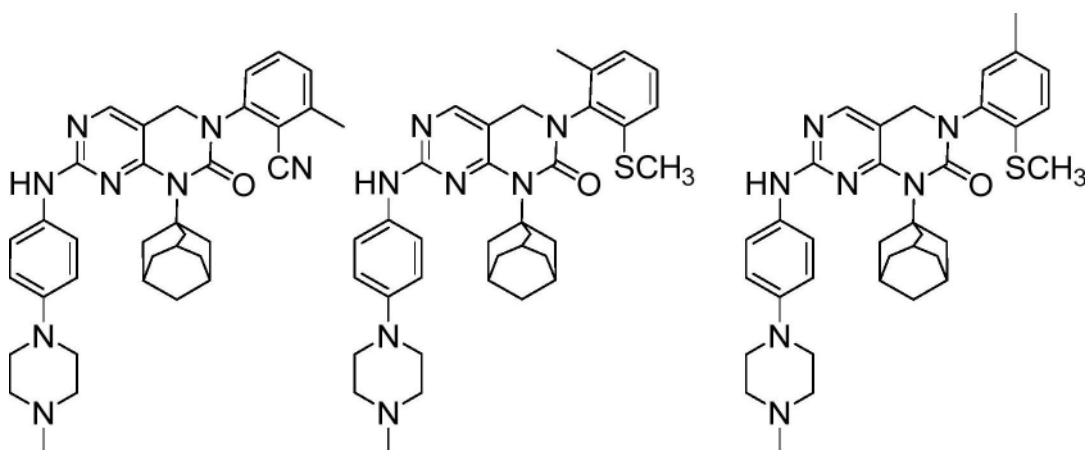
[0096] 如所讨论的,我们现在提供新化合物和方法,包括式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和(VI)化合物。

[0097] 具体地,优选的化合物包括下列和这些化合物的药学上可接受的盐:

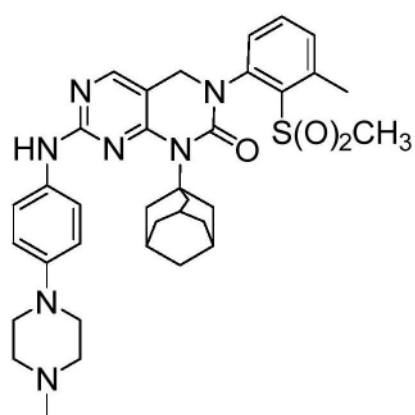
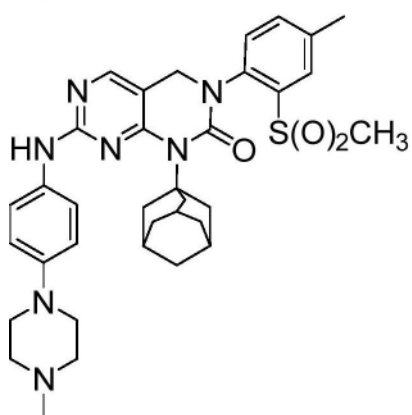
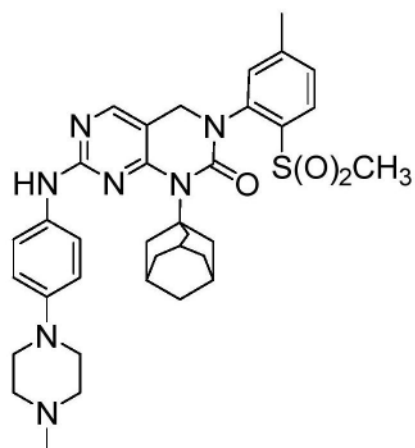
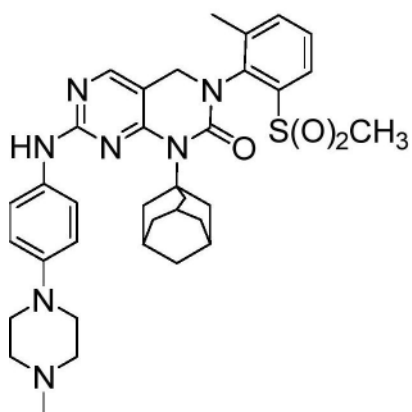


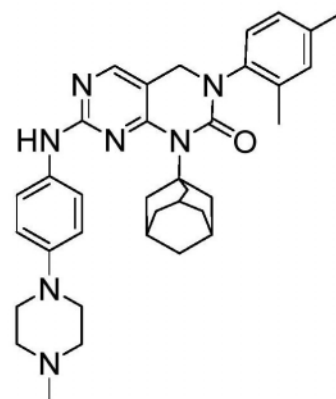
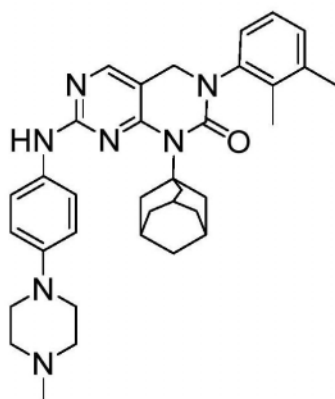
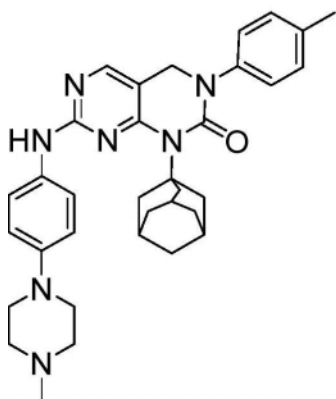
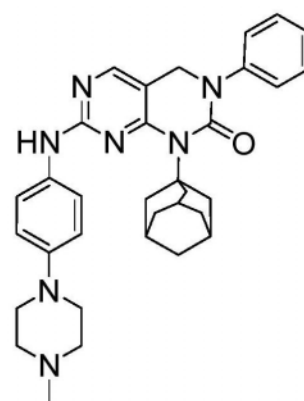
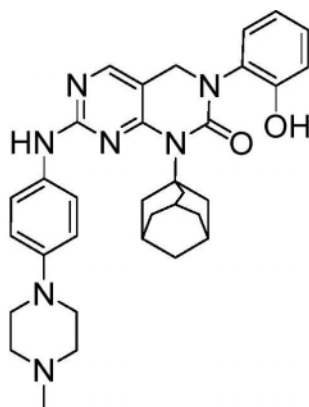
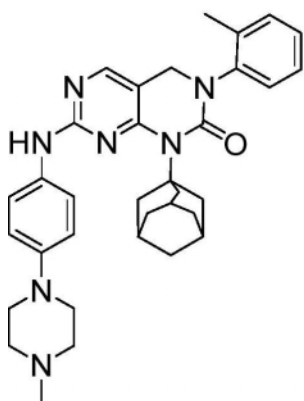
[0098]



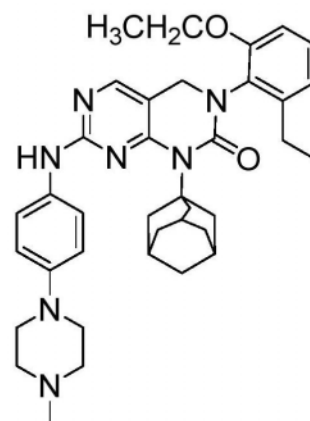
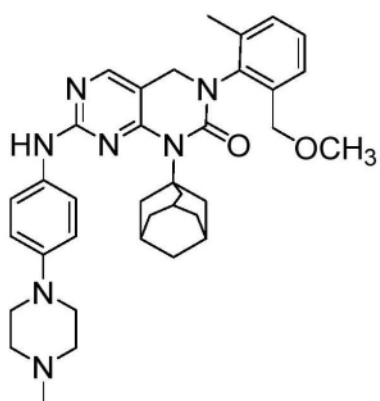
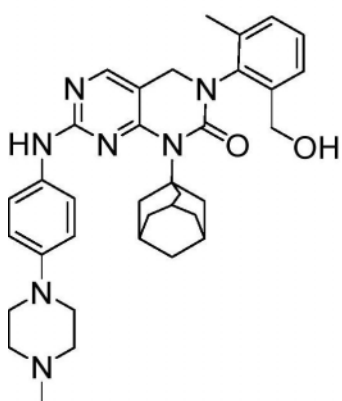
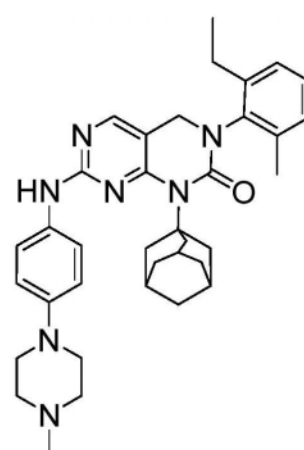
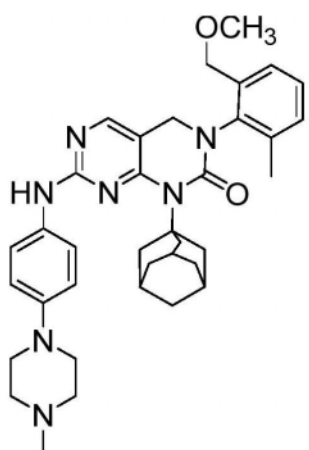
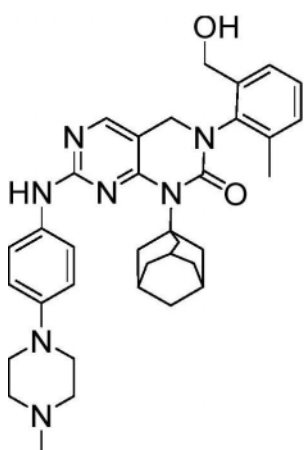


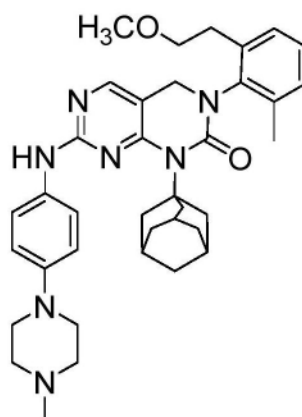
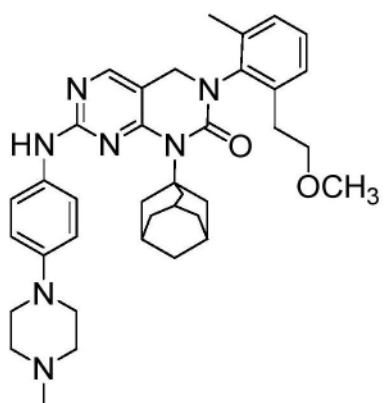
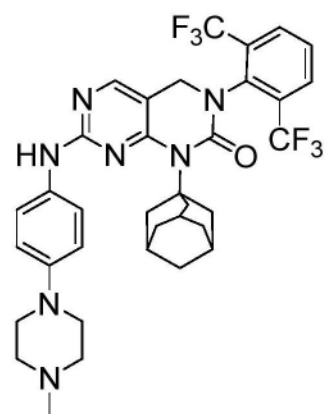
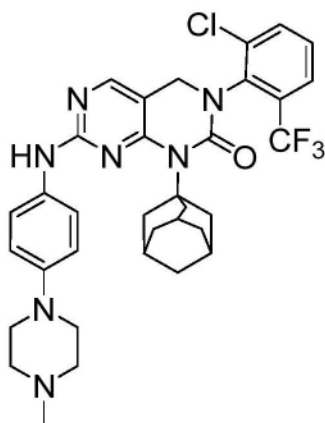
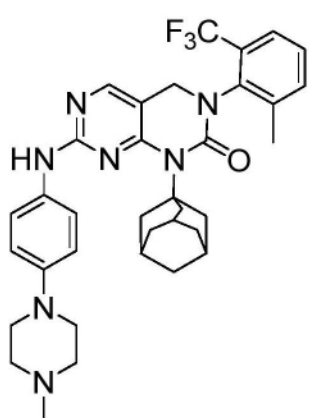
[0099]



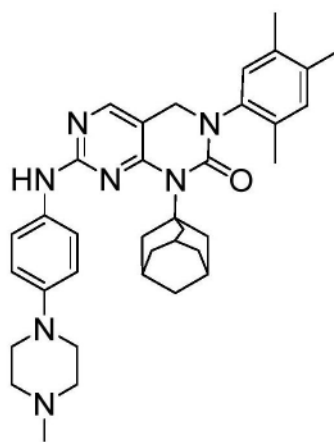
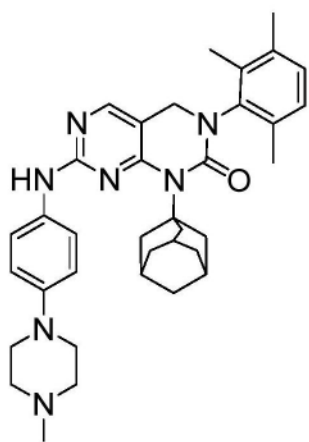
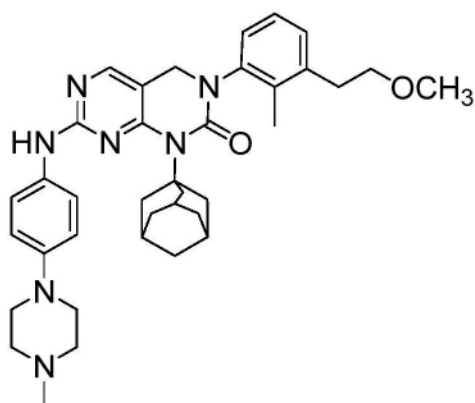
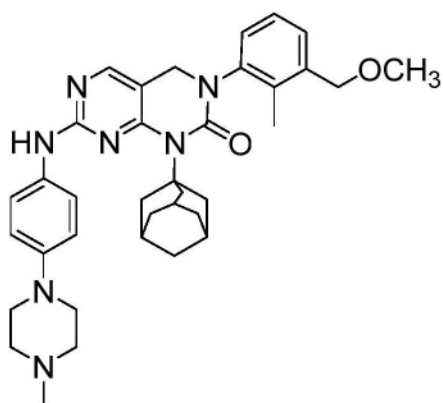


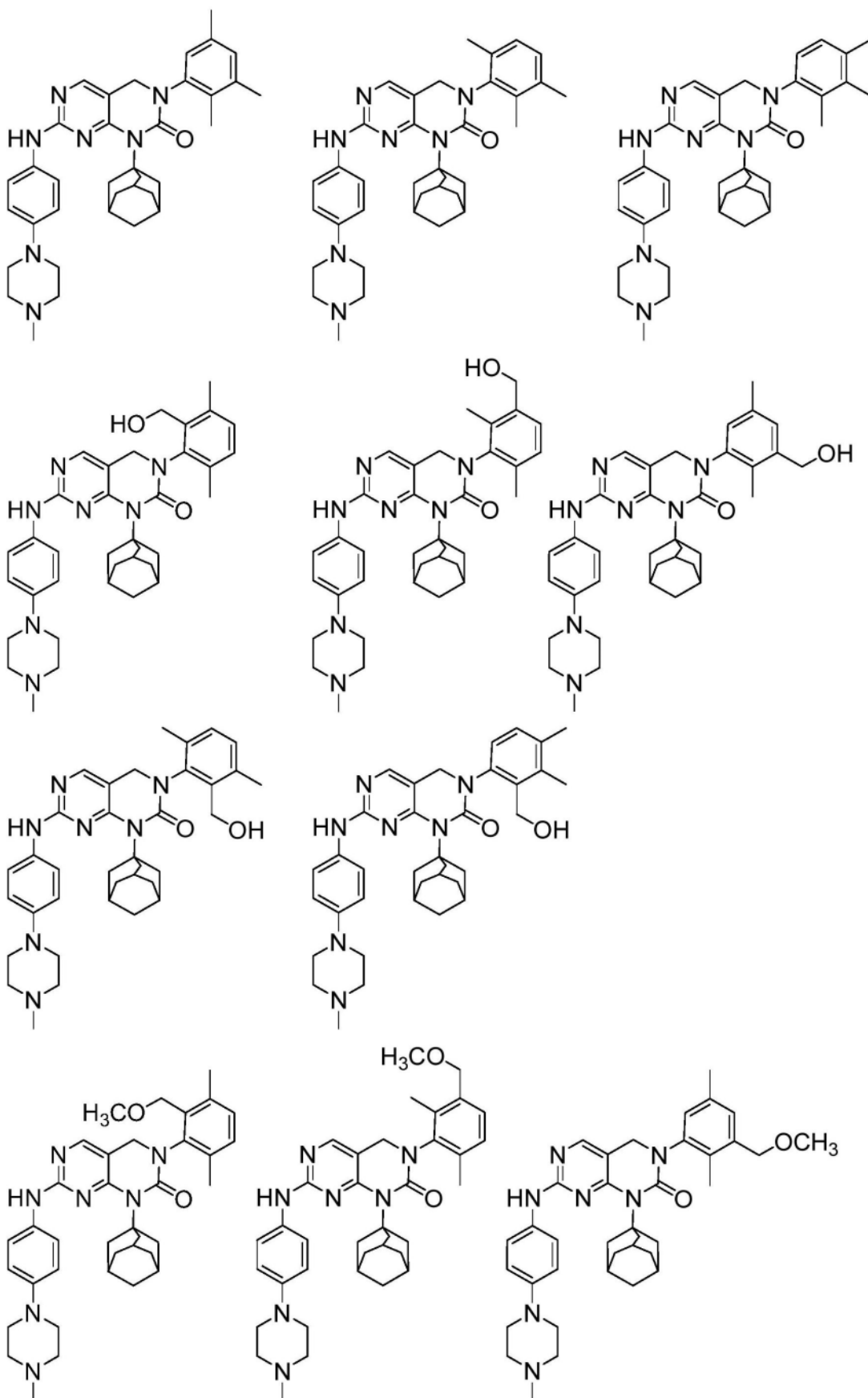
[0100]



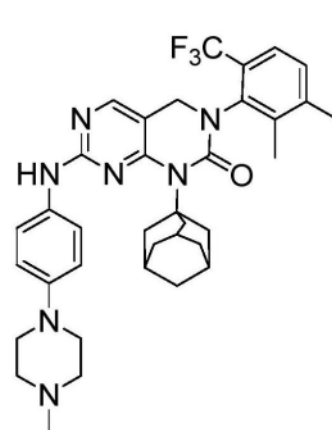
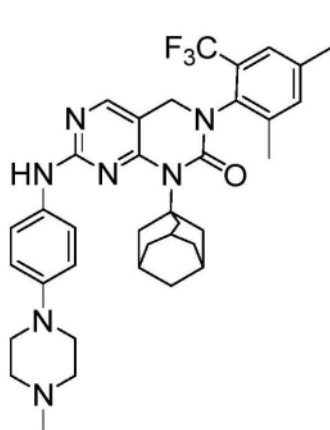
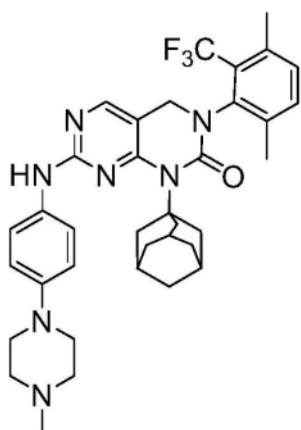
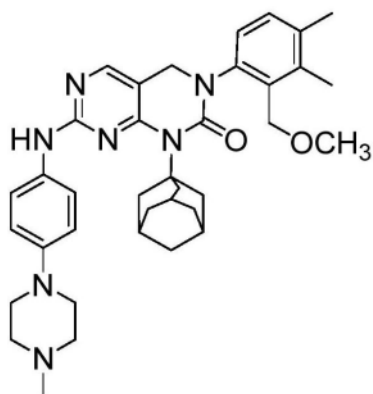
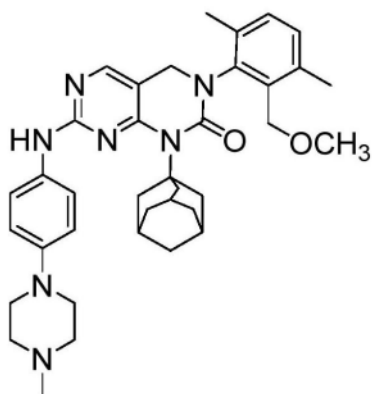


[0101]

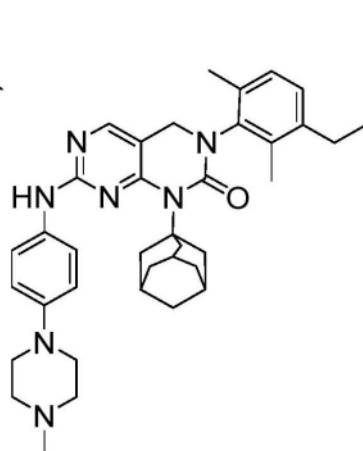
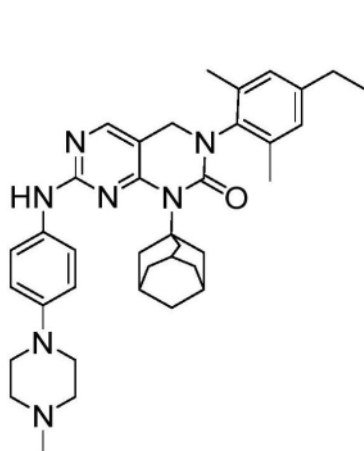
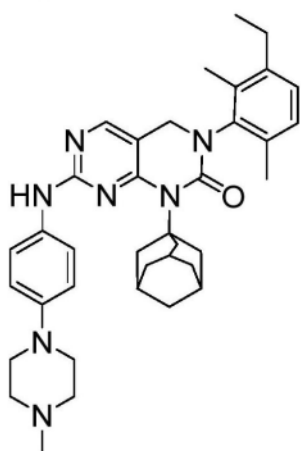
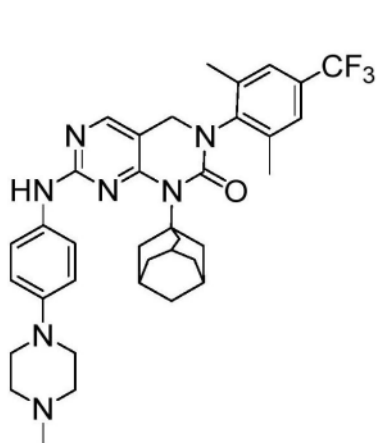
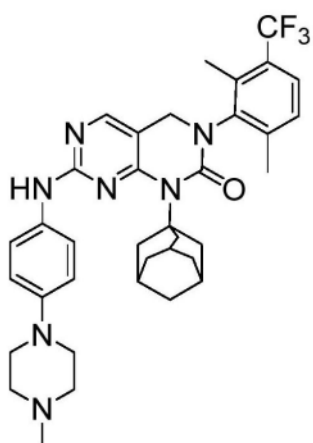


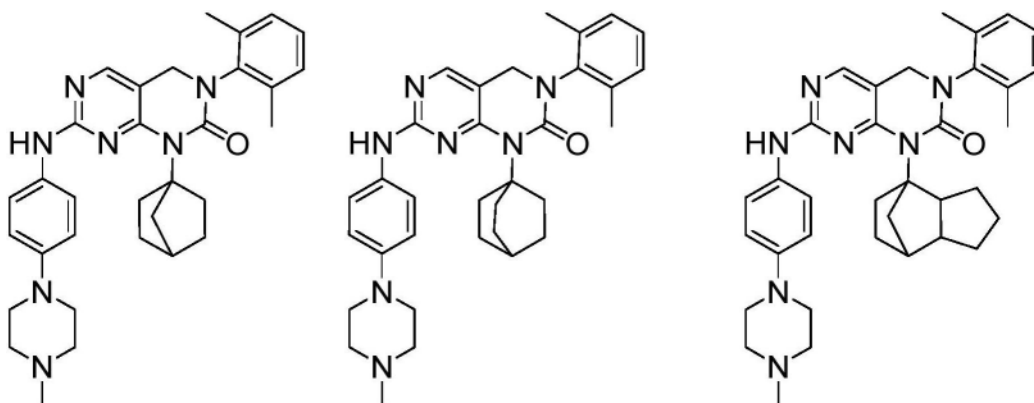


[0102]

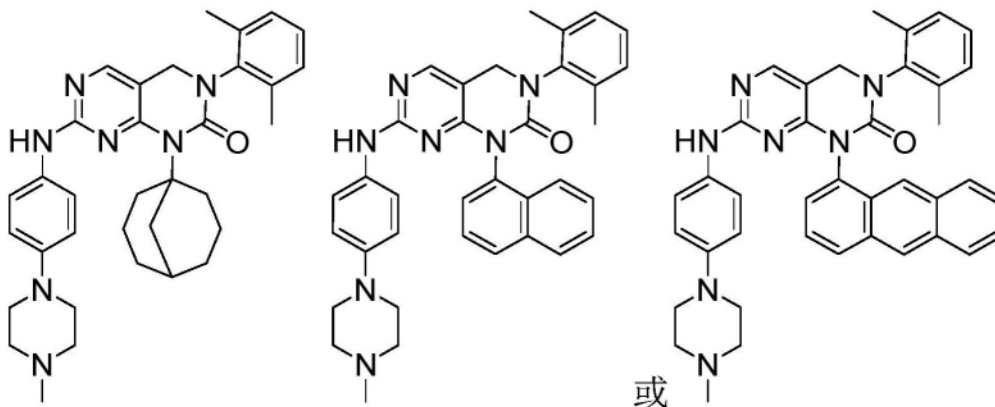


[0103]





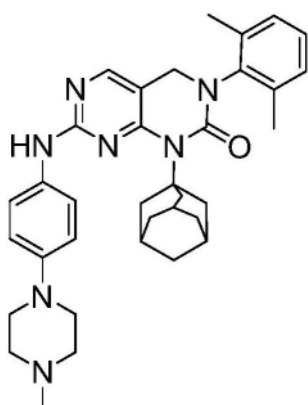
[0104]



或

[0105] 和上述化合物的药学上可接受的盐。

[0106] 特别优选的化合物为：



[0107]

[0108] 及其药学上可接受的盐。

[0109] 定义

[0110] 本文所使用的缩写具有它们化学和生物学领域内的的传统意义。根据化学领域中已知的化学价态的标准规则来构建本文所详述的化学结构和式。

[0111] 除非另做指定, 否则术语“碳脂环族的”意为环状版本的“烷基”, 它们不是芳族的但可以含有一个或多个环内碳-碳双键。但在优选的方面, 碳脂环族将不含任何环内碳-碳多键。碳脂环族部分包括单环或多环基团, 诸如双环、三环或其他多环的环烷基环系统。单环的环烷基的示例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基和环辛基。双环的环烷基环系统为桥接的单环的环或稠合的双环的环。桥接的单环的环含有单环的环烷基环, 其中该单环的环的两个非相邻碳原子通过具有一个与三个之间的额外碳原子的亚烷基桥(即, $(CH_2)_w$ 形式的桥接基团, 其中w为1、2或3)链接。双环的环系统的代表性示例

包括但不限于,金刚烷基、双环[3.1.1]庚烷、双环[2.2.1]庚烷、双环[2.2.2]硅烷、双环[3.2.2]壬烷、双环[3.3.1]壬烷和双环[4.2.1]壬烷。此外,耦合的双环的环烷基环系统含有与苯基、单环的环烷基、单环的环烯基、单环的杂环基或单环的杂芳基耦合的单环的环烷基环。在某些实施方案中,经桥接或耦合的双环碳脂环族部分通过该单环的脂环族环内所含的任何碳原子附接至母体分子部分。在某些实施方案中,耦合的双环碳脂环族部分为於苯基环、5元或6元单环的环烷基耦合的5元或6元单环的环烷基环。

[0112] 如本文所用的术语“杂脂环族的”或“杂环的”意为单环、双环或多环的杂环。杂环基单环的杂环为3元、4元、5元、6元或7元环,其含有至少一个独立地选自由O、N、P和S组成的组的杂原子,其中该环是饱和的或不饱和的但不是芳族的。3元或4元环含有1个选自由O、N、P和S组成的组的杂原子。5元环可含有零个或一个双键和一个、两个或三个选自由O、N、P和S组成的组的杂原子。6元或7元环含有零个、一个或两个双键和一个、两个或三个选自由O、N、P和S组成的组的杂原子。杂环基单环杂环通过该杂环基单环杂环内含有的任何碳原子或任何氮原子连接至母体分子部分。杂环基单环杂环的代表性示例包括但不限于氮杂环丁烷基、氮杂环庚烷基、氮杂环丙烷基、二氮杂环庚烷基、1,3-二氧杂环己烷基、1,3-二氧杂环戊烷基、1,3-二硫杂环戊烷基、1,3-二硫杂环己烷基、咪唑啉基、咪唑烷、异噻唑啉基、异噻唑啉基、异噻唑啉基异噻唑啉基、吗啉基、噁二唑啉基、噁二唑啉基、噻唑啉基、噻唑啉基、哌嗪基、哌啶基、吡喃基、吡唑啉基、吡唑啉基、吡咯啉基、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、噻二唑啉基、噻二唑啉基、噻唑啉基、噻唑啉基、硫代吗啉基、1,1-二氧负离子基硫代吗啉基(硫代吗啉砜)、硫代吡喃基和三噻烷基。杂环基双环杂环为与苯基、单环的环烷基、单环的环烯基、单环的杂环或单环的杂芳基耦合的单环杂环。杂环基双环杂环通过该双环的环系统的单环杂环部分内含有的任何碳原子或任何氮原子连接至母体分子部分。双环杂环基的代表性示例包括但不限于,2,3-二氢苯并呋喃-2-基、2,3-二氢苯并呋喃-3-基、吡啶-1-基、吡啶-2-基、吡啶-3-基、2,3-二氢苯并噻吩-2-基、十氢喹啉基、十氢异喹啉基、八氢-1H-吡啶基和八氢苯并呋喃基。多环杂环基环系统为与下列耦合的单环杂环基环(基环): (i) 一个选自由双环芳基、双环杂芳基、双环的环烷基、双环的环烯基和双环杂环基组成的组;或(ii) 两个其余环系统,其独立地选由苯基、双环芳基、单环或双环杂芳基、单环或双环的环烷基、单环或双环的环烯基、和单环或双环杂环基。多环杂环基通过该基环内含有的任何碳原子或氮原子附接至母体分子部分。多环杂环基的示例包括但不限于10H-吩噻嗪-10-基、9,10-二氢吡啶-9-基、9,10-二氢吡啶-10-基、10H-吩噻嗪-10-基、10,11-二氢-5H-二苯并[b,f]吡庚因-5-基、1,2,3,4-四氢吡啶并[4,3-g]异喹啉-2-基、12H-苯并[b]吩噻嗪-12-基和十二氢-1H-吡啶-9-基。

[0113] 术语“烷基”本身或作为另一取代基的一部分,除非另做指定,否则意为直链(即,不分支的)或支链碳链(或碳)或其组合,其可以是完全饱和的、单或多不饱和的,且可包括一价、二价和多价基团。烷基可包括指定数目的碳(例如,C₁-C₁₀意为一个至十个碳)。烷基为未环化的链。饱和烃基团的示例包括但不限于,基团诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、甲基,例如正戊基、正己基、正辛基等的同系物和异构体。不饱和烷基为具有一个或多个双键或三键的烷基。不饱和烷基(其也可称为烯基)的示例包括但不限于,乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-丙炔基、3-丙炔基、3-丁炔基和高级同系物和异构体。烷氧基为经由氧

链接基(-O-)附接至该分子剩余部分的烷基。烷基部分可以是烯基部分。烷基部分可以是炔基部分。烷基部分可以是完全饱和的。与“烯基”的下述讨论一致,烯基可包括超过一个双键和/或除了包括一个或多个双键之外还包括一个或多个三键。与“炔基”的下述讨论一致,炔基可包括超过一个三键和/或除了包括一个或多个三键之外还包括一个或多个双键。在某些方面,烷基合适地具有1至10个碳原子,1至8碳原子,或者1、2、3、4、5或6个碳原子。

[0114] 如本文所用,术语“碳环芳基”是指其中每个芳族环原子为碳的芳族基团,且包括例如苯基、萘基、蒽基、茈基、联苯、茛、茛满、1,2-二氢萘、1,2,3,4-四氢萘等。

[0115] 如本文所用,术语“杂芳族基团”是指芳族基团,其中至少一个芳族环原子不是碳(且可以是例如N、O或S)。杂芳族基团包括例如吡啶基、呋喃基、吡咯、噻吩、咪唑、吡唑、噁唑、异噁唑、噻唑、异噻唑、三唑、呋喃、噁二唑、噻二唑、二噻唑、四唑、吡喃、噻喃、二噻喃、噻喃、二噻英、二噻英和三噻等。

[0116] “烷氧基”是指式-OR_a的基团,其中R_a为如上文所讨论的烷基,且合适地具有1至10个碳原子或1、2、3、4、5、6、7或8个碳原子。烷氧基的示例包括而不限于-O-甲基(甲氧基)、-O-乙基(乙氧基)、-O-丙基(丙氧基)、-O-异丙基(异丙氧基)等。

[0117] “烷硫基”是指式-SR_a的基团,其中R_a为如上定义的烷基基团,其含有一个至十二个碳原子、至少1至10个碳原子、至少1至8个碳原子、至少1至6个碳原子或至少1至4个碳原子。

[0118] “磺”是指-S(O)₂-基团,其中六价硫通过双键附接至两个氧原子中的每一个且进一步通过单共价键附接至两个碳原子。

[0119] “烷基磺”是指链接至烷基的磺基团例如式-S(O)₂(C₁₋₆烷基)的基团。

[0120] 在某些方面,“烯基”是指不饱和烷基,其具有至少一个双键和两个至十二个碳原子(C₂-C₁₂烯基)、两个至八个碳原子(C₂-C₈烯基)或两个至六个碳原子(C₂-C₆烯基),并且其通过单键附接至分子的剩余部分,例如,乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基等。

[0121] 在某些方面,“炔基”是指不饱和的烷基,其具有至少一个三键和两个至十二个碳原子(C₂-C₁₂炔基)、两个至十个碳原子(C₂-C₁₀炔基)、两个至八个碳原子(C₂-C₈炔基)或两个至六个碳原子(C₂-C₆炔基),并且其通过单键附接至分子的剩余部分例如,乙炔基丙炔基丁炔基戊炔基、己炔基等。

[0122] 如本文所用且除非另做指定,否则“氨基”是指-NH₂。

[0123] 如本文所用且除非另做指定,否则“烷基氨基”是指-NR'(R'')基团,R'和R''可以是氢或者如本文所定义的经取代或未经取代的烷基。在一些实施方案中,烷基氨基为C₁-C₆-烷基-氨基,诸如甲基氨基、乙基氨基、正丙基氨基、异丙基氨基、正丁基氨基、异丁基氨基、叔丁基氨基、或甲基氨基-N-氧化物等。

[0124] 符号“~”表示化学部分与分子或化学式的其余部分的附接点。

[0125] “经取代的”部分,包括上述式(I)、(II)、(III)、(V)或(V)中任一者的经取代的R¹、R²、R³、R⁴、R⁵或R⁶基团,是指在一个或多个可用之处被诸如下列的非氢取代基取代的基团:羟基、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、未经取代的烷基(例如,C₁-C₈烷基、C₁-C₆烷基或C₁-C₄烷基)、未经取代的杂烷基(例如,2元至8元杂烷基、2元至6

元杂烷基、或2元至4元杂烷基)、未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈环烷基、C₃-C₆环烷基、或C₅-C₆环烷基)、未经取代的杂环烷基(例如,3元至8元杂环烷基、3元至6元杂环烷基、或5元至6元杂环烷基)、未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀芳基、C₁₀芳基、或苯基)、或未经取代的杂芳基(例如,5元至10元杂芳基、5元至9元杂芳基、或5元至6元杂芳基),这些取代基可以进一步任选地经取代。

[0126] 如本文所用,“盐诱导型激酶”或“SIK”包括丝氨酸/苏氨酸激酶家族,其可能在信号转导中发挥作用,例如,通过控制转录调节因子(例如,组蛋白脱乙酰酶(HDAC)和cAMP调节的转录共激活因子(CRTC))的磷酸化和亚细胞定位。SIK可响应增加cAMP的细胞内水平的细胞外控制线索(例如,饮食盐摄入到肾上腺中)而控制基因表达。示例性SIK可包括但不限于,SIK1(Unipro ID:P57059、Q60670、Q9R1U5)、SIK2(UniPro ID:Q9H0K1、Q8CFH6或Q9IA88)、SIK1B(UniPro ID:A0A0B4J2F2)等。

[0127] 参照蛋白质抑制剂相互作用的术语“抑制作用”、“抑制”、“抑制了”等意为对蛋白质的活性或功能产生相对于在不存在抑制剂的情况下该蛋白质的活性或功能的负面影响(例如,减少)。在实施方案中,抑制作用意为对蛋白质的浓度或水平产生相对于在不存在抑制剂的情况下该蛋白质的浓度或水平的负面影响(例如,减少)。在实施方案中,抑制作用是指疾病或疾病症状的降低。在实施方案中,抑制作用是指特定蛋白质靶的活性的降低。因此,抑制作用至少部分地包括部分或完全地阻断刺激,减少、阻止或延迟激活,或使信号转导或酶活性失活、减感或下调,或减少蛋白质的量。在实施方案中,抑制作用是指由于直接相互作用(例如,抑制剂与靶蛋白结合)所致的该靶蛋白活性的降低。在实施方案中,抑制作用是指由于间接相互作用(例如,抑制剂与激活靶蛋白蛋白质结合,从而阻止靶蛋白激活)所致的该靶蛋白活性的降低。“SIK抑制剂”为一种化合物,其对SIK活性或功能查收纳航能够相对于在不存在抑制剂的情况下SIK活性或功能的负面影响(例如,减少)。

[0128] 术语“抑制剂”、“阻遏剂”、或“拮抗剂”或“下调因子”可互换地指一种物质,其能够可检测地减少给定基因或蛋白质的表达或活性。与在不存在拮抗剂的情况下的对照相比,拮抗剂可将表达或活性减少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些情况下,表达或活性比在不存在拮抗剂的情况下的表达或活性低1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更低。

[0129] 如本文所用,术语“一”意为一个/种或多个/种。此外,如本文所用,短语“经...取代”意为所指定的基团可以经所指取代基中任一者或全部中的一者或多者取代。

[0130] 如本文所用,术语“约”意为包括所指定的值在内的值的范围,本领域一般技术人员会将其视为合理地类似于所指定的值。在实施方案中,约意为处于使用本领域通常可接受的测量的标准偏差内。在实施方案中,约意为延伸至所指定的值的+/-10%。在实施方案中,约包括所指定的值。

[0131] 术语“药学上可接受的盐”意在包括活性化合物的盐,该盐使用非毒性酸或碱制备,取决于在本文所述化合物上发现的特定取代基。当本公开的化合物含有相对酸性官能度时,可通过使中性形式的此类化合物与足量的所希望的碱接触而获得碱加成盐,该碱为纯净物或在合适的惰性溶剂中。药学上可接受的碱加成盐包括钠盐、钾盐、钙盐、铵盐、有机氨基盐或镁盐,或类似的盐。当本公开的化合物含有相对碱性官能度时,可通过使中性形式的此类化合物与足量的所希望的酸接触而获得酸加成盐,该酸为纯净物或在合适的惰性溶

剂中。药学上可接受的酸加成盐的示例包括衍生自无机酸如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、一氢碳酸、磷酸、一氢磷酸、二氢磷酸、硫酸、一氢硫酸、氢碘酸或磷酸等的那些盐,以及衍生自相对非毒性有机酸如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、富马酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、草酸、甲磺酸等的盐。还包括氨基酸的盐诸如天冬氨酸盐等,和有机酸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸等的盐(参见,例如, Berge等人,“Pharmaceutical Salts”, *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, 66, 1-19)。本公开的某些具体化合物含有碱性官能度和酸性官能度两者,这允许将化合物转化为碱加成盐或酸加成盐。

[0132] 因此,本发明的化合物,包括本公开的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)的那些化合物中的任一者,可作为盐诸如与药学上可接受的酸的盐而存在。本公开包括此类盐。此类盐的非限制性示例包括盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐、甲磺酸盐、硝酸盐、马来酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、丙酸盐、酒石酸盐(例如, (+)-酒石酸盐、(-)-酒石酸盐或其混合物,包括外消旋混合物)、琥珀酸盐、苯甲酸盐、与氨基酸诸如谷氨酸的盐和季铵盐(例如, 甲基碘化铵、乙基碘化铵等)。这些盐可通过本领域技术人员已知的方法。

[0133] 中性形式的化合物优选通过使盐与碱或酸接触并以传统方式分离母体化合物。母体形式的化合物可在某些物理性质诸如在极性溶剂中的溶解度方面与各种盐形式不同。

[0134] 除了盐形式外,本公开还提供前药形式的化合物。本文所述化合物的前药是已经在生理条件下经历化学变化以提供本公开化合物的那些化合物。本文所述化合物的前药可以在给药后在体内转化。此外,可以通过在离体环境中的化学或生化方法将前药转化为本公开的化合物,诸如当与合适的酶或化学试剂接触时。

[0135] 某些本公开化合物可能以未溶剂化的形式以及溶剂化的形式存在,包括水合形式。通常,溶剂化的形式等效于未溶解或的形式,且涵盖在本公开的范畴内。某些本公开化合物可能以多晶或无定形的形式存在。通常,全部物理形式对于本公开所设想的用途是等效的且旨在处于本公开的范畴内。

[0136] “药学上可接受的赋形剂”和“药学上可接受的载体”是指辅助将活性剂给药至受试者并为该受试者所吸收的物质,该物质可包括在本公开的组合物共而不引起对患者的显著覆面毒理学效应。药学上可接受的赋形剂的非限制性示例包括水、NaCl、生理盐水溶液、乳酸化林格溶液、普通蔗糖、普通葡萄糖、粘合剂、填料、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、芳香剂、盐溶液(诸如林格溶液)、醇、油、明胶、碳水化合物(诸如乳糖、直链淀粉或淀粉)、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮和着色剂等。此类制剂可经无菌化且,若需要,与不与本公开的化合物发生有害反应的佐剂诸如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂和/或芳香物质等混合。本领域技术人员将会了解,其他药物赋形剂可用于本公开中。

[0137] 术语“给药”意为向受试者口服给药,作为栓剂给药,外用接触、静脉内、肠胃外、腹膜内、肌肉内、病灶内、鞘内、鼻内或皮下给药,或植入缓释装置(例如,微型渗透泵)。给药通过任何途径进行,包括胃肠外和跨粘膜(例如, 口含、舌下、颞面、牙龈、鼻腔、阴道、直肠或透皮)途径。肠胃外给药包括,例如, 静脉内、肌肉内、动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内给药。其他递送模式包括但不限于,使用脂质体配制物、静脉内输液、透皮贴剂等。在实施方案中,给药不包括除所引用活性剂之外的任何活性剂的给药。

[0138] “共同给药”意为将本文所述的组合物在施用一种或多种额外疗法的同时、之前(立即)或之后(立即)给药。本文所提供的化合物可单独给药或可共同给药至患者。共同给药意为包括化合物单独地或组合地(超过一种化合物)同时或依序给药。因此,当期望时,制剂也可以与其它活性物质组合(例如,以降低代谢降解)。本公开化合物和组合物优选可以通过外用途径透皮递送,或配制为敷药棒、溶液、悬浮液、乳液、凝胶、乳霜、软膏、糊剂、果冻、涂剂、粉末和气溶胶。在一个实施方案中,具有式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)中任一者的结构的化合物与防晒物质共同给药。

[0139] 术语“疾病”或“病症”是指能够用本文所提供的化合物或方法治疗的患者或受试者的存在状态或健康状况。在一个实施方案中,“疾病”或“病症”是炎症性疾病或病症。

[0140] 如本文所用(和如本领域所充分理解的),“治疗”或“处理”在广义上也包括用于获得受试者的有益或所期望结果的任何途径,该结果包括临床结果。有益或所期望的临床结果可包括但不限于,减轻或缓解一种或多种症状或病症、减轻疾病程度、疾病状态稳定(即,不恶化)、阻止疾病传播或扩散、延迟或减缓疾病进展、缓解或缓和疾病状态、减少疾病复发、和消退,无论是部分的或总体的且无论是可检测的或不可检测的。换句话说,如本文所用,“治疗”包括疾病的任何治愈、缓解或预防。治疗可预防疾病发生;抑制疾病扩散;减轻疾病症状(例如,眼痛、看见光学周围的光晕、红眼、非常高的眼内压);完全或部分地去除疾病底层原因;缩短疾病持续时间;或这些事的组合。

[0141] “患者”或“有此需要的受试者”是指患有或易患可以通过给药如本文所提供的药物组合物进行治疗的疾病或病症的活生物体。非限制性示例包括人类、其他哺乳动物。在优选实施方案中,患者或受试者是人。

[0142] “有效量”是足以使化合物相对于不存在该化合物的情况下实现所宣称目标(例如,实现给药所针对的效应、治疗疾病、降低酶活性、增加酶活性、降低信号传导途径、或降低疾病或病症的一种或多种症状)的量。“有效量”的示例为足以促进治疗、预防或降低疾病一种或多种症状的量,也可称为“治疗有效量”。一种或多种症状的“降低”(和这一短语的预防等价物)意为减少症状的严重程度或频率或者消除症状。药物的“预防有效量”为当给药至受试者时将具有预期预防效应的药物的量,该预防效应例如防止或延迟损伤、疾病、病理或病症的发作(或复发),或降低损伤、疾病、病理或病症或其症状发作(或复发)的可能性。完全预防效应不必通过给药一个剂量实现,且可以仅在给药一系列剂量后发生。因此,预防有效量可在一次或多次给药中给药。如本文中所用,“减少活性的量”是指相对于拮抗剂不存在下减少酶活性所需的拮抗剂的量。如本文中所用,“扰乱功能的量”是指相对于拮抗剂不存在下扰乱酶或蛋白质功能所需的拮抗剂的量。确切量将取决于治疗的目标,且将由本领域技术人员使用已知技术确定(见,例如,Lieberman,Pharmaceutical Dosage Forms (vols.1-3,1992);Lloyd,The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(1999);Pickar,Dosage Calculations(1999);及Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2003,Gennaro,Ed.,Lippincott,Williams&Wilkins)。

[0143] 对于本文所述的任何化合物,治疗有效量最初可通过体外分析诸如细胞培养测定法确定。目标浓度将会是活性化合物能够实现本文所述方法的那些浓度,如使用本文所述或本领域已知的方法所测量的。

[0144] 如本领域所周知的,用于人类的治疗有效量也可以从动物模型确定。例如,用于人类的剂量可经配制以实现已经发现在动物中安全或有效的浓度。在人类中的剂量可以通过监测化合物有效性并如上所述向上或向下调节剂量进行调节。基于上述和其他方法调节剂量以实现在人类中的最大功效完全处于本领域一般技术人员的能力范围内。

[0145] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指如上所述足以缓解疾患的治疗剂的量。例如,对于给定参数,治疗有效量将显示至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%的增加或减少。疗效也可表示为成“倍”的增加或减少。例如,治疗有效量相对于对照可具有至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更大的效应。

[0146] 在一种实施方案中,“增加”是指,与参考水平(例如,具有正常黑色素产生的受试者或罹患黑色素产生疾患的受试者)的黑色素产生量相比,黑色素产生的量高出至少约0.05倍(例如,0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、5、10、25、50、100、1000、10,000倍或更高)。当“增加的”是指黑色素产生的量时,该术语也意为,与参考水平(例如,具有正常黑色素产生的受试者或罹患黑色素产生疾患的受试者)的黑色素产生量相比,黑色素产生的量高出至少约5%(例如,高出5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%)。量可以根据用于确定黑色素量的本领域已知方法来测量。

[0147] 在一种实施方案中,“增加”也指,与参考水平(例如,未经治疗的受试者)的DNA稳定性水平相比,DNA稳定性的量高出至少约0.05倍(例如,0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、5、10、25、50、100、1000、10,000倍或更高)。当“增加的”是指黑色素产生的量时,该术语也意为,与参考水平(例如,未经治疗的受试者)的DNA稳定性水平相比,DNA稳定性的量高出至少约5%(例如,高出5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%)。量可以根据用于确定DNA损害的本领域已知方法(例如,TUNEL测定法和胸腺嘧啶二聚体检测)来测量。

[0148] 剂量可依据患者需求及所采用的化合物而变。在本公开的情境中,给药至患者的剂量应足以随时间推移在该患者体内产生治疗性应答。剂量的大小也通过任何不良副作用的存在、属性和程度来确定。为特定状况确定适当剂量处于从业者业务范围内。通常,治疗始于较小剂量,这些剂量小于化合物的最优剂量。之后,剂量以小增量增加,直至达到所处情况下的最优效应。可以独立地调节剂量和间隔以提供对正在治疗的特定临床适应症有效的所给药化合物的水平。这将提供与个体疾病状态的严重程度相称的治疗方案。

[0149] 如所讨论的,也提供包含药物组合物,其包含一种或多种本发明化合物和药学上可接受的赋形剂,本发明化合物包括一种或多种式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)化合物。药物组合物可包括治疗有效量(例如,治疗有效量)的一种或多种式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)化合物。

[0150] 此外,对于每种制剂,本发明的药物组合物可以与额外的药学上可接受的载体一起制造。可用于本发明中的载体的类型没有特别限制,任何工业领域中传统使用的和药学上可接受的载体都可以使用。

[0151] 盐水、无菌水、IV流体、缓冲盐水、白蛋白注射液、葡萄糖溶液、麦芽糊精溶液、甘油、乙醇是可用载体的非限制性性示例。这些载体可单独使用或两种或更多种组合使用。载体可包括非天然存在的载体。如必要,可使用其他传统使用的添加剂如抗氧化剂和/或缓冲

剂。

[0152] 药物组合物可合适地为喷雾或液体洗液形式或其他用于外用施加的制剂,诸如洗剂、乳霜、软膏、糊剂、凝胶、泡沫或任何其他作为通常已知用于外用给药的载体的物理形式。此类增稠的外用制剂尤其具有优势,因为这些制剂粘附至放置材料的皮肤区域,因此使得局部高浓度的一种或多种本发明化合物被引入特定区域。例如,基于石蜡和羊毛脂的乳霜是本领域中通常已知的。可使用其他增稠剂诸如聚合物增稠剂。制剂也可包含以下中的一者或多者:水、防腐剂、活性表面活性剂、乳化剂、抗氧化剂或溶剂。

[0153] 药物组合物可经配制用于多种其他给药途径,诸如鼻腔、口服、肠胃外、肌肉内、关节内、静脉内、皮下或透皮给药。合适的药物组合物可与例如稀释剂、分散剂、表面活性剂、结合剂、润滑剂一起配制以作成注射液如水溶液,或作为悬浮液、乳液,和作为丸剂、胶囊、颗粒或片剂等。

[0154] 如所讨论的,也提供试剂盒。例如,可合适地将式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)中任一者的一种或多种化合物包装在合适的经标记的容器中,例如,用作治疗黑色素沉积疾患、肤色不均匀、低色素沉积、炎症性皮肤病(包括红斑痤疮)、白癜风或其他皮肤相关疾患或病症的受试者的疗法。此外,制品或试剂盒还可包括,例如,包装材料、使用说明、递送装置,用于治疗或监测特定状况。

[0155] 试剂盒也可包括图例(例如,印刷标签或插页或描述产品用途的其他媒介物(例如,录音带或录像带))。图例可以与容器关联(例如,贴在容器上),并且可描述容器中的组合物应该以何种方式给药(例如,给药频率和途径)、其适应症和其他用途。组合物可能准备好给药(例如,以剂量适当的单位存在),并且可包括一种或多种额外的药学上可接受的佐剂、载体或其他稀释剂和/或额外的治疗剂。或者,组合物可例如提供为浓缩形式,伴有稀释剂和稀释说明。

[0156] 如所讨论的,提供方法用于通过向受试者给药化合物或包括化合物的药物组合物来治疗疾病或疾患,诸如与盐诱导型激酶相关的炎症性疾病或疾患。优选的,化合物可具有式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)中任一者的结构。该方法可合适地包括给药有效量(例如,治疗有效量)的化合物。在优选的方面,该方法为治疗或预防色素沉积疾患、肤色不均匀、低色素沉积、炎症性皮肤病(包括红斑痤疮)、白癜风或其他皮肤相关疾病或疾患,适用于罹患或易患此类疾病或疾患的受试者。如所讨论的,受试者可合适地为男人或女人。

[0157] 受试者可能正罹患或易患白癜风,这是一种以皮肤上出现与色素沉积缺陷相关的白色斑块为特征的疾患。

[0158] 受试者可能正罹患或易患红斑血管扩张型红斑痤疮(亚型1)、丘疹脓疱型红斑痤疮(亚型2)、赘疣型红斑痤疮(亚型3)和/或眼红斑痤疮(亚型4)中的任一者。在一些实施方案中,治疗方法还可包括鉴定并选择罹患红斑痤疮(包括特定亚型的红斑痤疮)或其他皮肤相关疾病或疾患的受试者。在罹患红斑血管扩张型红斑痤疮(亚型1红斑痤疮)的受试者中,受试者可能表现出皮肤发红和潮红以及可见血管。在罹患丘疹脓疱型红斑痤疮(亚型2红斑痤疮)的受试者中,受试者可能表现出发红、肿胀和痤疮样皮疹。在罹患赘疣型红斑痤疮(亚型3)的受试者中,受试者可能表现出面对或其他皮肤增厚,且该皮肤可能发展为凹凸纹理。在罹患眼红斑痤疮(亚型4)的受试者中,受试者可能表现出眼充血和流泪、眼睛有砂砾感、干眼、眼睛瘙痒、视力下降。然后,可以用如本文所公开的化合物或组合物治疗经鉴定和选

择的受试者。

[0159] 在一些实施方案中,治疗方法可提供用于在有此需要的受试者中增加皮肤色素沉积和/或降低皮肤癌症的风险的方法。本公开提供用于增加皮肤色素沉积的用于美容目标的方法。在某些实施方案中,本文提供使用所述化合物在有此需要的受试者中增加皮肤颜色变深表现的方法(例如,经由所述化合物的外用给药)。

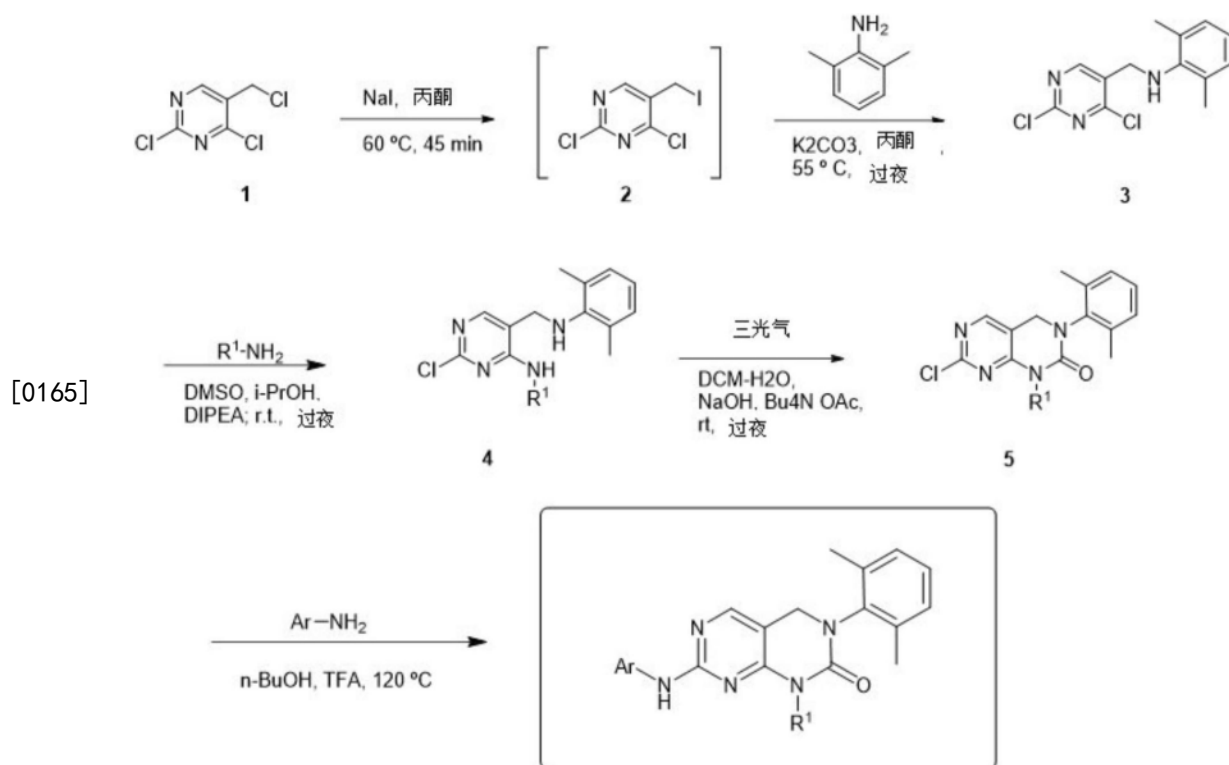
[0160] 在某些实施方案中,本公开提供增加受试者的皮肤沉积表现的方法,该方法包括向受试者的皮肤外用给药具有式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)中任一者的结构的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物、互变异构物或立体异构物或其药物组合物。

[0161] 在某些实施方案中,本公开提供治疗多形性日光疹(例如,阳光过敏)的方法。本公开提供诱导真黑素合成的方法。本公开提供诱导黑色素体成熟、传播和定位的方法。

[0162] 在某些实施方案中,提供在有此需要的受试者中可逆地增加皮肤色素沉积和/或降低皮肤癌症风险的方法,该方法包括向受试者的皮肤外用给药有效量的具有式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)中任一者的结构的化合物或其药物组合物。在某些实施方案中,提供通过向身体部分上的受试者皮肤外用给药本文所述化合物来增加皮肤色素沉积和/或降低皮肤癌症风险的方法。在某些实施方案中,该身体部分为受试者的脸部。在某些实施方案中,该身体部分为受试者的颈部。在某些实施方案中,该身体部分为受试者的胸部。在某些实施方案中,该身体部分为受试者的背部。在某些实施方案中,该身体部分上的皮肤为受试者的臂上的皮肤。在某些实施方案中,该身体部分上的皮肤为受试者的腿上的皮肤。在某些实施方案中,该皮肤在受试者躯干上。

[0163] 在某些实施方案中,本发明涉及具有式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)中任一者的结构的化合物或其药物这组合为的美容和/或皮肤病学用途,用于皮肤和/或体毛和/或头发的着色和/或上色。应用适用于改善色素沉积缺陷和疾患,例如人类白发的出现(灰发症或毛发的自然白化),这可能是衰老过程的可见表现(老年性灰发),或者可能与遗传易感性有关。头发和体毛的色素沉积需要黑色素细胞在毛囊球中的存在。现在了解,灰发症与毛干中黑色素的量的减少相关。由于保持头发头部的恒定着色是一个相当大的愿望,因此希望能够对抗这些可见的衰老迹象的出现,即保持或重新建立体毛和/或头发的着色。

[0164] 优选的化合物可合适地根据下述反应式1制备:



[0166]

反应式 1

[0167] 改变上述式(I)至(VI)化合物的环A(式(I))基团可通过在步骤中使用适当的胺(除上述2,6-二甲基苯胺之外)来提供,以得到上述化合物3,诸如2-甲基-6-甲氧基苯胺、2-甲基-6-乙氧基苯胺、2-甲基-6-羟基苯胺、2-甲基-6-氯苯胺、2,6-二(三氟甲基)苯胺、2,4-二甲基苯胺、2-(-SO₂CH₃)-6-甲基苯胺等。

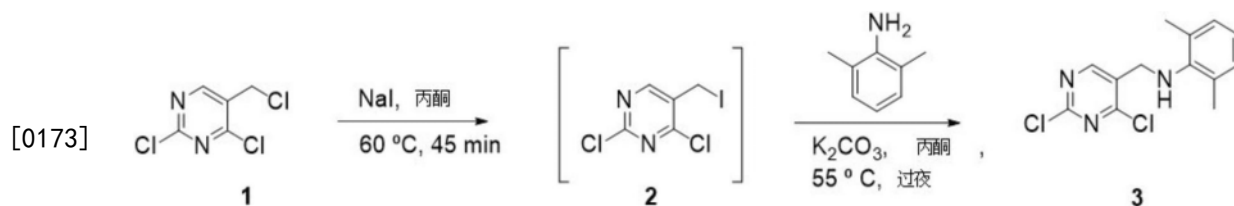
[0168] 改变R¹-NH₂化合物可用在步骤4中将所期望的R¹并入化合物中,诸如金刚烷基胺。

[0169] 下列非限制性实施例为例示性的。

[0170] 实施例1至4:化合物合成

[0171] 实施例1:化合物7的合成

[0172] 第1部分:N-((2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基)-2,6-二甲基苯胺的合成(化合物3,反应式2)

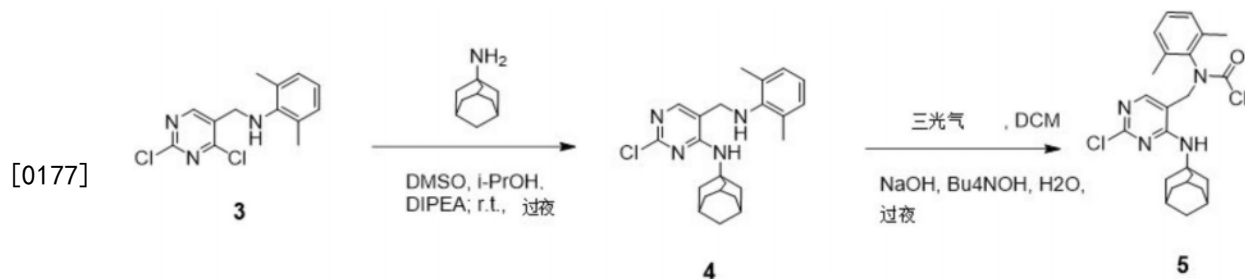


[0174] 将2,4-二氯-5-(氯甲基)嘧啶(1)(40g)一次性添加至碘化钠(30.6g)在丙酮(244mL)中的溶液中,并搅拌混合物直至获得澄清溶液(中间体(2)未经分离)。将混合物在室温搅拌15分钟,然后在60°C回流下在氮气氛下搅拌45分钟。将混合物冷却并稀释在丙酮(366mL)中。然后,添加2,6-二甲基苯胺(24.9g)和碳酸钾(83.9g),并将混合物加热至55°C在氮气氛下回流。

[0175] 将混合物倒在冰水上并用乙酸乙酯萃取。有机层用硫代硫酸钠水溶液、盐水洗涤,

分离,经无水 MgSO_4 干燥,过滤并在减压下去除溶剂,以给出粗制固体。将固体与乙酸乙酯一起研磨,冷却至 0°C ,并过滤以得到N-((2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基)-2,6-二甲基苯胺(3)(46.8g),为白色固体。

[0176] 第2部分:N-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)-2-氯-5-(((2,6-二甲基苯基)氨基)甲基)嘧啶-4-胺的合成(化合物4,反应式3)



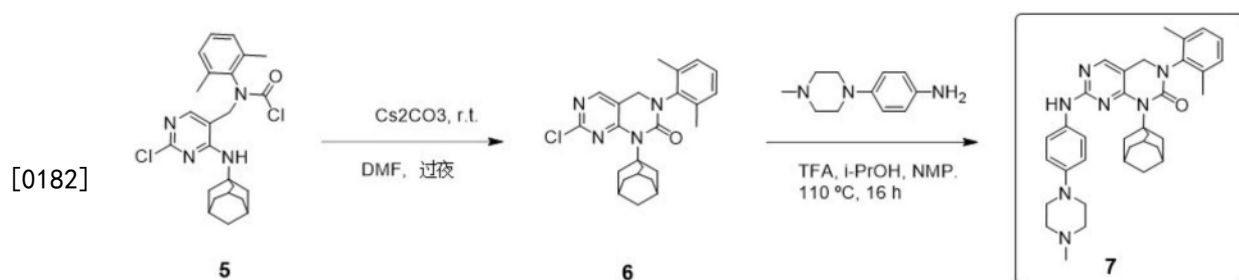
反应式 3

[0178] 将N-((2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基)-2,6-二甲基苯胺(3)(10g)溶解在THF(106mL)中。然后,将二异丙基乙胺(24.6mL)和1-金刚烷胺(10.7g)添加至混合物中并在回流下搅拌48小时。将混合物在 80°C 在密封管中搅拌过夜。添加乙酸乙酯并且用水洗涤(x3)。分离的有机层经无水 MgSO_4 干燥,过滤并在减压下去除溶剂。粗制固体通过快速柱色谱在硅胶上纯化(庚烷/乙酸乙酯(85:15))。收集所期望的分级分离物并且在减压下蒸发,得到N-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)-2-氯-5-(((2,6-二甲基苯基)氨基)甲基)嘧啶-4-胺(4)(7.49g),为白色固体。

[0179] 第3部分:((4-(((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)氨基)-2-氯嘧啶-5-基)甲基)(2,6-二甲基苯基)氨基甲酰氯的合成(化合物5,反应式3)

[0180] 将三光气(7.9g)添加至N-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)-2-氯-5-(((2,6-二甲基苯基)氨基)甲基)嘧啶-4-胺(4)(7.09g)溶解在 CH_2Cl_2 (212mL)中的溶液中,并将混合物搅拌1小时。在 0°C 将氢氧化钠(14.3g)和四丁基氢氧化铵(40%水溶液)(1.5g)在水(212mL)中的溶液逐滴添加至反应中并搅拌过夜。分离有机层和水层,并且有机相经无水 MgSO_4 干燥,过滤并在减压下去除。产物用 CH_2Cl_2 稀释,用饱和 NaHCO_3 (x2)合水洗涤。分离有机层并且经无水 MgSO_4 干燥,过滤并在减压下去除溶剂。粗制品通过快速柱色谱在硅胶上纯化,用 CH_2Cl_2 洗脱。收集所期望的分级分离物并在减压下蒸发,得到((4-(((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)氨基)-2-氯嘧啶-5-基)甲基)(2,6-二甲基苯基)氨基甲酰氯(5)(7.9g),为白色固体。

[0181] 第4部分:1-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)-7-氯-3-(2,6-二甲基苯基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2(1H)-酮的合成(化合物6,反应式4)



反应式 4

[0183] 在氮气下,将 Cs_2CO_3 (8.4g)添加至((4-(((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)氨基)-2-氯嘧啶-5-基)甲基)(2,6-二甲基苯基)氨基甲酰氯(7.9g)(化合物5)在干燥DMF中的溶液中。将混合物在室温搅拌过夜。然后,混合物以 CH_2Cl_2 稀释并且以水(x2)和盐水洗涤。分离有机层并经无水 MgSO_4 干燥,过滤并在减压下去除溶剂,以得到1-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)-7-氯-3-(2,6-二甲基苯基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2(1H)-酮(7.0g)(化合物6),其不经纯化即用于下一步骤。

[0184] 第5部分:1-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)-3-(2,6-二甲基苯基)-7-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2(1H)-酮的合成(化合物7,反应式4)

[0185] 将4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺(5.5g)和三氟乙酸(6.3mL)添加至1-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)-7-氯-3-(2,6-二甲基苯基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2(1H)-酮(6)(7.2g)和N-甲基吡咯烷酮(6.2mL)在异丙醇(94mL)中的溶液中。将混合物在密封管中在110℃搅拌过夜。添加乙酸乙酯,并且混合物以碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤。分离的有机层经无水 MgSO_4 干燥,过滤并在减压下去除溶剂。粗制混合物通过快速柱色谱在硅胶上纯化,用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 的梯度(100:0至70:30)洗脱。收集所期望的分级分离物并在减压下去除溶剂。所期望的化合物(7)从 CH_2Cl_2 -乙腈重结晶并过滤,以得到1-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)-3-(2,6-二甲基苯基)-7-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2(1H)-酮(6.14g),为白色固体。该化合物(7)在本文中有时也称为SLT-008。

[0186] 分析:LCMS(rt 2.647min,m/z 578.4)。

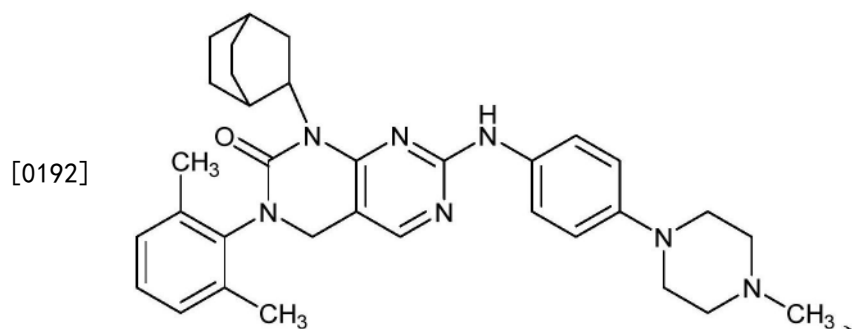
[0187] 熔融温度:283.5℃

[0188] ^1H NMR(400MHz,CDC13) δ 7.96(s,1H),7.51-7.44(m,2H),7.15-7.04(m,3H),6.94(d,J=9.0Hz,2H),6.88(s,1H),4.18(s,2H),3.25-3.19(m,4H),2.67(s,4H),2.55(d,J=1.8Hz,6H),2.42(s,3H),2.16(s,J=6.0Hz,6H),2.12(d,J=4.2Hz,3H),1.70(dd,J=27.8,12.0Hz,6H)。

[0189] 实施例2至4:

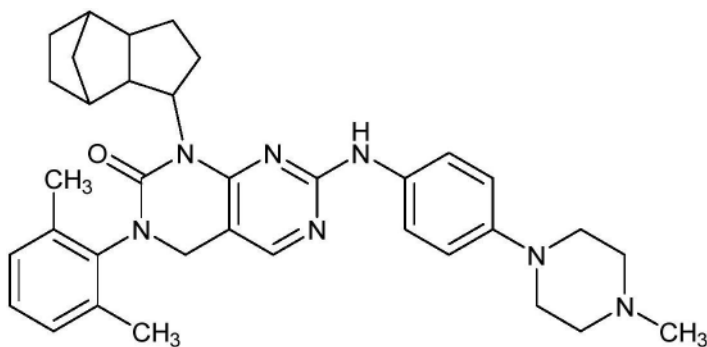
[0190] 根据上述实施例1的程序,替换上述反应式1中的适当胺化合物(即,胺类,以生产对应于上述反应式1中化合物3和4的化合物),制备下述实施例2至4的化合物。

[0191] 实施例2:



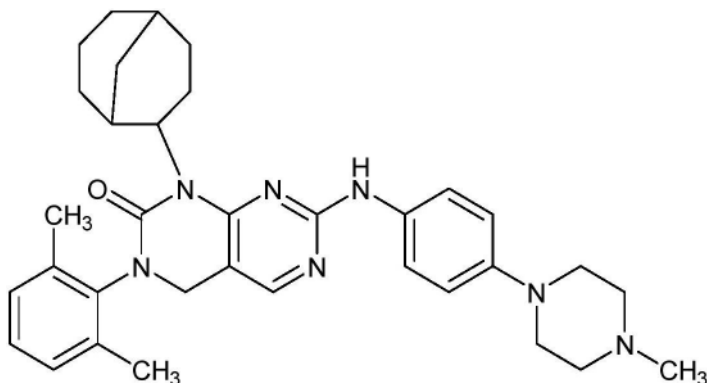
[0193] 实施例3:

[0194]



[0195] 实施例4:

[0196]



[0197] 实施例5:盐诱导型激酶抑制

[0198] 盐诱导型激酶 (SIK) 抑制剂SLT-008 (化合物7) 可以经优化为能够诱导皮肤色素沉积的外用剂。

[0199] 将SIK1 (h) 与8mM MOPS pH 7.0、0.2mM EDTA、100 μ MAMARAASAAALARRR、10mM醋酸镁和[γ - ^{33} P]-ATP (45 μ M) 一起培养。通过添加Mg/ATP mix混合物来启动反应。在室温培养40分钟后,通过添加磷酸至0.5%的浓度来终止反应。然后将10 μ L的反应点到P30滤垫上并且在0.425%磷酸中洗涤四次,每次持续4分钟,并且在甲醇中洗涤一次,然后干燥并进行闪烁计数。

[0200] 将SIK 2 (h) 与8mM MOPS pH 7.0、0.2mM EDTA、100 μ MKKKVSRSGLYRSPSPENLRPR、10mM醋酸镁和[γ - ^{33} P-ATP] (45 μ M) 一起培养。通过添加Mg/ATP mix混合物来启动反应。在室温培养40分钟后,通过添加磷酸至0.5%的浓度来终止反应。然后将10 μ L的反应点到P30滤垫上并且在0.425%磷酸中洗涤四次,每次持续4分钟,并且在甲醇中洗涤一次,然后干燥并进行闪烁计数。

[0201] 将SIK 3 (h) 与8mM MOPS pH 7.0、0.2mM EDTA、100 μ MKKKVSRSGLYRSPSPENLRPR、10mM醋酸镁和[γ - ^{33} P-ATP] (45 μ M) 一起培养。通过添加Mg/ATP mix混合物来启动反应。在室温培养40分钟后,通过添加磷酸至0.5%的浓度来终止反应。然后将10 μ L的反应点到P30滤垫上并且在0.425%磷酸中洗涤四次,每次持续4分钟,并且在甲醇中洗涤一次,然后干燥并进行闪烁计数。

[0202] 对于SIK1、SIK2和SIK3, IC₅₀分别经计算为5、8和超过20纳摩尔。

[0203] 表1:估计的IC₅₀值

[0204]

化合物	激酶	IC ₅₀ (nM)
SLT--008	SIK (h)	5

SLT--008	SIK2 (h)	8
SLT--008	SIK3 (h)	>20

[0205] 实施例6至10:体外和离体皮肤组织模型显示SLT-008的色素沉积功效(SLT-008在本文中指定为上述反应式4中的化合物7,1-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)-3-(2,6-二甲基苯基)-7-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2(1H)-酮)。

[0206] 实施例6:SLT-008的外用施加诱导黑色素色素沉积

[0207] 将原代人表皮角化细胞(hFK)接种在合适的载体基质上并且与人表皮黑色素细胞共培养。将SLT-8以0.3mM、1mM和3mM溶解在PEG/乙醇/Transcutol®中,使用筛网外用施加至模型表面上,并在4小时后去除。测试化合物每天施加一次,为期4天。未经处理的模型和仅用媒介物处理的模型用作对照。经UV照射的模型用作阳性对照。进行Fontana-Masson染色以将色素沉积效应可视化。Fontana-Masson染色通常用于将亲银素物质诸如黑色素、亲银素颗粒和一些神经分泌颗粒可视化。黑色素是一种非脂质、非血原性色素。它是一种黑褐色色素,正常情况下存在于毛发、皮肤、视网膜、虹膜和中枢神经系统的某些部分中。亲银素颗粒见于类癌瘤中。亲银素细胞颗粒或黑色素染成黑色。细胞核染成粉红色。细胞质染成淡粉色。在1mM且具体地在3mM下,SLT-008的单次外用施加诱导在透明层水平上的黑色素点。在3mM下,单次外用施加也诱导黑色素转移至角化细胞,并且观察到核加帽(图1)。

[0208] 实施例7:SLT-008对于人活皮肤外植体的色素沉积活性

[0209] 使用剥脱的人活皮肤外植体来评估两种浓度的SLT-008在皮肤上的色素沉积活性。

[0210] 在腹壁整形术期间从III型35岁高加索女性制备平均直径为11mm(±1mm)的人皮肤外植体。将外植体在5%湿度-CO₂气氛下在37°C在BEM培养基(BIO-EC的外植体培养基)中保持为活的。该研究在人皮肤组织上进行,该皮肤组织是根据《赫尔辛基宣言》和《法国公共卫生法》第L.1243-4条从手术残留物获得的。

[0211] 在第0天,使用scotch 3M将批次“S”的外植体剥脱5次以去除角质层,从而促进所测试产品的渗透。在第0天(D0,在剥脱后)、D1、D4、D6和D8,将赋形剂和所测试产品以2μl/外植体(2mg/cm²)为基准外用地施加,并使用小抹刀铺展。

[0212] 除了更新培养基后,对照外植体T不接受任何处理。在D0、D1、D4、D6和D8,对培养基进行半更新(1ml/孔)。在D0、D1、D4、D5、D6、D7和D8,将经照射的外植体(TUV)的培养基替换为HBSS(Hank平衡盐溶液;1ml/外植体)。然后,使用UV模拟器Vibert Lourmat RMX 3W照射“TUV”批次的外植体,对于II型供体,剂量为2.25J/cm²的UVA,对应于0.5MED(最小红斑剂量)。在UV照射结束时,将这些外植体放回2mL的BEM培养基中。已经确定,用UVA(TUVJ11与TJ11)照射不诱导细胞活力的改变。与剥脱的批次相比,用0.5%和0.9%的SLT-008处理也导致细胞活力的改变。用UVA(TUVJ11与TJ11)照射诱导表皮基底层中黑色素合成的增加。

[0213] 0.9%剂量的SLT-008诱导36%的显著(p<0.1)黑色素增加(图2)。色素沉积活性也通过Fontana-Masson染色进行检测(图3)。

[0214] 实施例8:剂量确定和SLT-008全身性暴露

[0215] 在经重建的表皮的培养基中进行研究以确定SLT-008的三个非毒性浓度,这些浓度对于正常人表皮黑色素细胞不产生系统性细胞毒性的(NHEMs-MP;Thermo Fisher Scientific,C1025C)。

[0216] 使用在以人黑色素细胞生长补充剂(HMGS;Thermo Fisher Scientific,S0025)和抗生素(庆大霉素,Thermo Fisher Scientific,15710049)补充的M254培养基(Thermo Fisher Scientific,M254500)中生长的NHEM的培养基进行初步剂量确定研究。将细胞在湿润培养箱中在37℃及5%CO₂气氛下维持。

[0217] 在开始用5个浓度的测试化合物处理前24小时,将NHEM接种在24孔板中,以三个平行实验进行(n=3)。对于溶解测试化合物的DMSO 0.003%进行平行测试。历经10天,进行在培养基中的总计6次重复施加(从接种后第1天直至第11天,在第4、5、6、7和8天更新培养基)。SDS 0.008%用作细胞毒性阳性对照。在处理结束时,用MTS测定法(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基-甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基-2H-四唑鎓)评估细胞活力。

[0218] 接着,通过组织切片的苏木精/曙红(H/E)染色,在经重建的黑化表皮中评估三种剂量的毒性的不存在。

[0219] 在用测试化合物处理结束时,将3个组织/剂量(n=3)固定在4%甲醛中,脱水并进行石蜡包埋。用曙红和苏木精(H/E)对6μm表皮切片染色。载玻片用特定媒介封固并且用与数码相机(Zeiss)偶联的Leica DM2000光学显微镜检查。

[0220] 该分析表明,在用3个所选剂量的SLT-008处理后没有形貌改变(图4)。

[0221] 实施例9:LDH释放测定法

[0222] 在用SLT-008处理的处理中期和处理结束后,对从黑化组织释放的乳酸脱氢酶(LDH)进行定量,以确保所选的剂量对于黑化的重构人表皮没有细胞毒性。在用细胞毒性检测KitPLUS(Roche-04744926001)进行为期5天和10天的处理后,根据制造商的说明,评估培养模型对LDH的释放。简单地讲,收集培养物上清液并与LDH检测反应剂在96孔板混合30分钟,然后使用分光光度计(GloMax-Promega)测量在490nm的光强度,参考波长为600nm。这在三次平行培养实验中进行(n=3)。总之,将SLT-008持续10天施加至黑化的重构表皮上并未诱导组织完整性的相关改变。从组织释放的LDH的轻微且明显的增加可以在用0.3μg/ml剂量的SLT-008处理10天后观察到,但没有达到设定的细胞毒性水平。因此,研究这些浓度对于组织色素沉积的效应(图5)。

[0223] 实施例10:黑色素含量

[0224] 基于剂量确定研究的结果,选择0.3μg/ml、0.01μg/ml和0.0033μg/ml剂量的SLT-008在重构的黑化人表皮的培养基中进行进一步施加。在用从3个新生高加索裔供体的包皮分离的NHEK(正常人表皮角化细胞,Lonza 00192906)和NHEMs-MP黑色素细胞重构的表皮上进行色素沉积效应研究。

[0225] 将组织在含有具体补充剂(其中包括人角化细胞生长因子,Fisher Scientific S0015或S001K)和抗生素(庆大霉素,Fisher Scientific,15710049)的Epilife培养基(Fisher Scientific,MEPI500CA)中在气液界面处培养。将组织在湿润气氛下在37℃和5%CO₂下维持。

[0226] 将黑色素细胞与重构的表皮共培养,并且在培养基中在湿润气氛下在7℃和CO₂5%下在气液界面处培养14天。在放置在气液界面处后(n=6)第4天至第14天的10天期间,以3个浓度将SLT-008施加至培养基中,期间进行5次培养基更替(在第7、8、9、10和11天)。为了允许表皮的色素沉积,在处理期间调整BPE(牛垂体提取物)在培养基中的浓度。用于溶解化合物的0.005%的DMSO用作参考对照条件。150μM的IBMX和3.33μM的弗斯可林用作

促色素沉积参考化合物以验证该实验。在该实验中还添加额外的0.05%的DMSO对照,对应于参考化合物的溶剂。

[0227] 在处理结束时(第14天),进行形貌分析。在可溶性提取后对表皮色素沉积进行定量,并且通过对组织学切片的Fontana Masson染色进行定量。制备表皮包埋在石蜡中的6 μ m切片并用Fontana Masson试剂染色。Fontana Masson染色特异性地将表皮内的黑色素染色。为了除了将黑色素可视化外还将表皮可视化,也用苏木精/曙红进行复染。以三个系列进行组织切片染色每个测试化合物一组。将具有用0.005%的DMSO处理的表皮切片的载玻片置于每组中进行Fontana Masson染色,以便比较SLT-008的效应。

[0228] 每个表皮的6 μ m石蜡切片上的黑色素沉积通过Fontana-Masson试剂(VWR-VWRK641295,VWRK641311;Klinipath-641215)染色。载玻片用特定媒介封固并且用配备数码相机(Zeiss)的Leica DM2000光学显微镜检查。

[0229] 对于黑色素定量,每个表皮取3张照片并使用Leica QWin3软件进行分析。取两个测量值。第一个测量值对应于染色的全局强度,反应较浅或较深的黑色素。第二个测量值表示照片上经标记的表面,且因此表示表皮中由黑色素占据的面积。执行测量值通过检查除角质层之外的表皮的全部细胞层来获得。

[0230] 然后观察对黑色素含量的分析。对每个剂量9张照片进行该分析(每个表皮3张照片且每个条件3张照片,总计9张照片)。图6A显示未经处理的对照、媒介物(DMSO 0.05%)和两个阳性对照,其显示完全表皮色素沉积,如通过功能性黑色素细胞的树突状形貌所例示,并且显示经组织为在角化细胞核上的核上黑色素帽的黑素体的形成(图6)。与DMSO 0.05%相比弗斯可林(3.33 μ M)或IBMX(150 μ M)增加色素沉积。弗斯可林和IBMX已知是黑色素产生的表皮诱导剂,并且在这里用作阳性对照以确认体外功能性色素沉积。如图6B中所述,与DMSO 0.005%相比,0.3 μ g/ml的SLT-008显著增加了色素沉积。在黑素体、树突和黑色素帽的存在两方面均观察到增加。

[0231] 从Fontana-Masson染色的切片确定黑色素含量(相对于DMSO 0.005%的百分比)。统计学分析(学生t检验)用来比较SLT-008与0.005%的DMSO的效应以及IBMX和弗斯可林与0.05%的DMSO的效应,其中 $0.01 < p\text{值} < 0.05$ 视为显著(*), $0.001 < p\text{值} < 0.01$ 视为高度显著(**),且 $p\text{值} < 0.001$ 视为非常高显著(***)。与其各自的0.005%的DMSO对照相比,0.3 μ g/ml的化合物SLT-008诱导黑色素含量的显著增加(图7)。

[0232] 使用本实施例中先前所述的类似方法,重复该试验。在这些处理结束时,从其插入物中取出组织($n=3$),浸没在可溶性提取溶液(Perkin Elmer-NJTSRN8010060)中并在80 $^{\circ}$ C加热1小时。用分光光度计(GloMax-Promega)在490nm测量上清液的光强度,并通过与合成黑色素(Sigma-M8631)的标准曲线来确定黑色素含量。

[0233] 与其溶剂对照(用0.03%的DMSO)相比,弗斯可林(阳性对照)处理显著增加了表皮内黑色素的产生。用作溶剂的0.03%和0.01%的DMSO不改变黑色素含量水平,指示其对于色素沉积的消极效应。当SLT-008和0.1 μ g/ml施加时以剂量效应增加黑色素含量,在以0.3 μ g/ml施加时更是如此(图8)。基于这些研究,通过Fontana Masson染色和化学提取定量两者均观察到,SLT-008的系统性施加在体外增加重构的表皮组织模型的黑色素含量。

[0234] 实施例11:剥脱诱导的细胞凋亡DNA保护研究

[0235] 本研究的目标是进行TUNEL(凋亡细胞标记物)的互补免疫染色。

[0236] 表2:在UVA控制照射研究中分析的批次

[0237]	批次	名称	外植体	采样时间
	T0	组织的对照	3	第0天
	T	未经处理的对照	3	第11天
	TUV	对照UV (UVA 0.5MED)	3	第11天
	S	剥脱	3	第11天
	SP9	剥脱+B (SLT-008) 0.5%+赋形剂	3	第11天
	SP10	剥脱+B (SLT-008) 0.9%+赋形剂	3	第11天

[0238] 表3:实验日程

	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11
[0239]	■	■			■	■	■	■	■			
	▼▲	▲			▲		▲		▲			
	▼外植体采样 ▲产品施加 ■UV-A 照射											

[0240] 组织学处理:使用Leica RM 2125Minot型显微切片机制作5- μ m厚的切片,并将切片封固在Superfrost®组织学载玻片上。使用Leica DMLB、Olympus BX43或BX63显微镜实现显微镜观察。用数字DP72或DP74 Olympus相机和CellSens存储软件将照片数字化。

[0241] TUNEL测定:使用原位细胞死亡检测试剂盒 (Roche,ref.11 684817 910) 在甲醛固定的石蜡包埋皮肤切片上评估DNA损伤,其中TUNEL试剂以1:2在PBS中在室温稀释1小时,并且POD转化剂以1:4稀释,然后通过VIP (Vector,ref.SK-4600) 揭示。通过图像分析对染色进行半定量。

[0242] 图像分析方法:使用CellSens软件对所选批次的全部图像进行图像分析。染色表面比较

[0243] 将处理组的经染色表面的百分比 (Surf%) 与未经处理的条件进行比较=>S与T; SP与S。

[0244] 与表皮中凋亡细胞有关的由TUNEL染色占据的表面的百分比显示在图9中。SLT-008 (0.9%,在绝对乙醇中) 将胶带剥脱后的凋亡细胞数显著地降低97%,从而证明DNA保护。

[0245] 实施例12:UVB DNA保护研究

[0246] 本研究的目标是使用活的人皮肤外植体来评估产品的DNA保护效应。

[0247] 表4:DNA保护活性 (UVB)

	D0	D1	D2	D3	D4	D5
[0248]					■	
	▼▲		▲		▲▲	▼
	▼ 外植体采样 ▲ 产品施加					

[0249] 在腹壁手术期间制备来自II-III型 (根据Fitzpatrick肤色分类) 51岁高加索女性的平均直径为11mm ($\pm$ 1mm) 的63个人皮肤外植体。将外植体在5%湿度-CO₂气氛下在37℃在BEM培养基 (BIO-EC的外植体培养基) 中保持存活。

[0250] 表5. 外植体分别

批次	条件	外植体	采样时间
T0	组织的对照	3	第 0 天
T	未经处理的对照	12	第 5 天
E	安慰剂	3	第 10 天
P1	制剂 SLT-008 0.1%	3	第 10 天
P2	制剂 SLT-008 0.5%	3	第 10 天
UVB	对照 UVB	9	第 5 天
EUVB	安慰剂 + UVB (2 MED)	9	第 5 天
P1UVB	制剂 SLT-008 0.1% + UVB (2 MED)	9	第 5 天
P2UVB	制剂 SLT-008 0.5% + UVB (2 MED)	9	第 5 天

[0252] DNA保护活性 (UVB) : 在第0天 (D0)、D2、D4和D6, 将赋形剂和所测试产品P1和P2以 $2\mu\text{l}$ /外植体 ($2\text{mg}/\text{cm}^2$) 的浓度外用地施加, 并使用小抹刀铺展。在D4, 将赋形剂和产品P1和P2施加量测 (在UV-B照射前和在照射后立刻)。除了更新培养基后, 对照外植体 (T) 不接受任何处理。在D2、D3和D6, 对培养基进行半更新 ($1\text{ml}/\text{孔}$)。

[0253] DNA保护活性 (UVB) : 在D4, 将经照射的外植体 (UVB) 的培养基替换为HBSS (Hank平衡盐溶液; $1\text{ml}/\text{外植体}$)。然后, 使用UV模拟器Vibert Lourmat RMX 3W照射外植体, 其中剂量为 $0.3\text{J}/\text{cm}^2$ 的UVB, 对应于在具有II-III表型的皮肤上的2MED。在UV照射结束时, 将经UVB处理的外植体放回 2mL 的BEM培养基中。

[0254] 采样: 在D0, 收集来自T0的3个外植体并切割为两部分。一半固定在缓冲福尔马林溶液中, 而另一半在 -80°C 冷冻。在D5、D6、D7和D10, 收集来自相关批次的3个外植体并以与D0中相同的方式进行处理。根据研究计划中提及的安排, 将处理天数、照射和采样调节至工作日。

[0255] 组织学处理: 在缓冲福尔马林中固定24小时后, 使用Leica PEARL自动脱水机将样品脱水并浸渍在石蜡中。使用Leica EG 1160包埋站来包埋样品。使用Leica RM 2125Minot型显微切片机制作 $5\text{-}\mu\text{m}$ 厚的切片, 并将切片封固在Superfrost®组织学载玻片上。使用Leica DMLB、Olympus BX43或BX63显微镜实现显微镜观察。用数字DP72或DP740lympus相机和CellSens存储软件将照片数字化。

[0256] 胸腺嘧啶二聚体免疫染色: 紫外光被DNA中的胸腺嘧啶和胞嘧啶碱基中的双键吸收。这种增加的能量打开该键并允许其与相邻碱基反应。如果相邻者为另一胸腺嘧啶或胞嘧啶碱基, 则可形成链接两个碱基的环丁烷环。这些环丁烷二聚体受限, 并在DNA中形成共价交联。这在当细胞需要复制其DNA时引起多种问题。DNA聚合酶难以读取该二聚体, 因为它不能平顺地匹配在活性位点内。用抗胸腺嘧啶二聚体抗体 (Kamiya, ref. MC-062, 克隆物KTM53) 对FFPE皮肤切片进行胸腺嘧啶二聚体免疫染色其中将该抗体以1:1600稀释在具有0.05%的Tween20的PBS-BSA 0.3%中, 并使用Vectastain Kit Vector扩增仪系统链霉亲

和素/生物素在室温培养1小时,并且通过VIP揭示,VIP是过氧化物酶的一种底物(Vector laboratories,Ref.SK-4600),在被氧化时发出紫外信号。使用软件CellSens通过图像分析对染色进行半定量

[0257] 在未经照射的批次上没有观察到胸腺嘧啶二聚体。全部批次的表皮中由胸腺嘧啶二聚体占据的表面的百分比显示在图10中。在第5无UVBJ5,胸腺嘧啶二聚体代表了表皮表面的26.5%。将产品施加对于胸腺嘧啶二聚体形成的效应与UVBJ5进行比较。赋形剂诱导了32%的显著增肌,P1诱导了1%的非显著增加,而P2诱导了35%的显著减少。产物施加对于胸腺嘧啶二聚体形成的效应也与EUVBJS5进行比较。P1诱导了24%的显著减少,而P2诱导了51%的显著减少。

[0258] TUNEL测定:用针对细胞死亡的原位检测试剂盒(Merck,ref.no.11 684 817 910)使用TUNEL试剂将DNA受损(凋亡细胞)染色,其中该试剂以1:2在PBS中在室温稀释1小时,并且POD转化剂以1:4稀释在PBS中,然后通过VIP(Vector Laboratories,ref:SK-4600)揭示。使用软件CellSens通过图像分析对染色进行半定量。对于外植体的每个样品,通过图像分析来确定被染色所覆盖的面部区域的百分比(染色表面百分比)。将处理组的染色表面百分比(Surf%)与未经处理的条件进行比较=>P与T。对经或未经处理的经照射批次进行相同的比较=>实施例:PUVA与UVA。

[0259] 全部样品的表皮中由凋亡细胞占据的表面的百分比显示在图11中。在第5天,TJ5,凋亡细胞代表了表皮表面的5.2%。UVB照射(UVBJS5与TJ5)诱导了表皮中凋亡细胞形成的142%的显著增加。将产品施加对于凋亡细胞形成的效应与UVBJ5进行比较。赋形剂诱导了78%的显著增肌,P1诱导了13%的非显著增加,而P2诱导了18%的非显著增加。

[0260] 将产品施加对于凋亡细胞形成的效应与EUVBJS5进行比较。P1诱导了36%的显著减少,而P2诱导了34%的显著减少。

[0261] 总之,(SLT-0080.1%溶液)通过将UVB照射(与EUVBJS5)时的胸腺嘧啶二聚体和凋亡细胞形成的水平分别降低24%和51%而显示良好的DNA保护活性。P2(SLT-0080.5%溶液)通过将UVB照射(与EUVBJS5)时的胸腺嘧啶二聚体和凋亡细胞形成的水平分别降低36%和34%也显示良好的DNA保护活性。

[0262] 应理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于例示性说明目的,并且将会向本领域技术人员提出针对其的各种修改或改变,并且这些修改或改变将被包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范畴内。本文引用的全部出版物、专利和专利申请通过引用而以其整体并入本文用于全部目的。

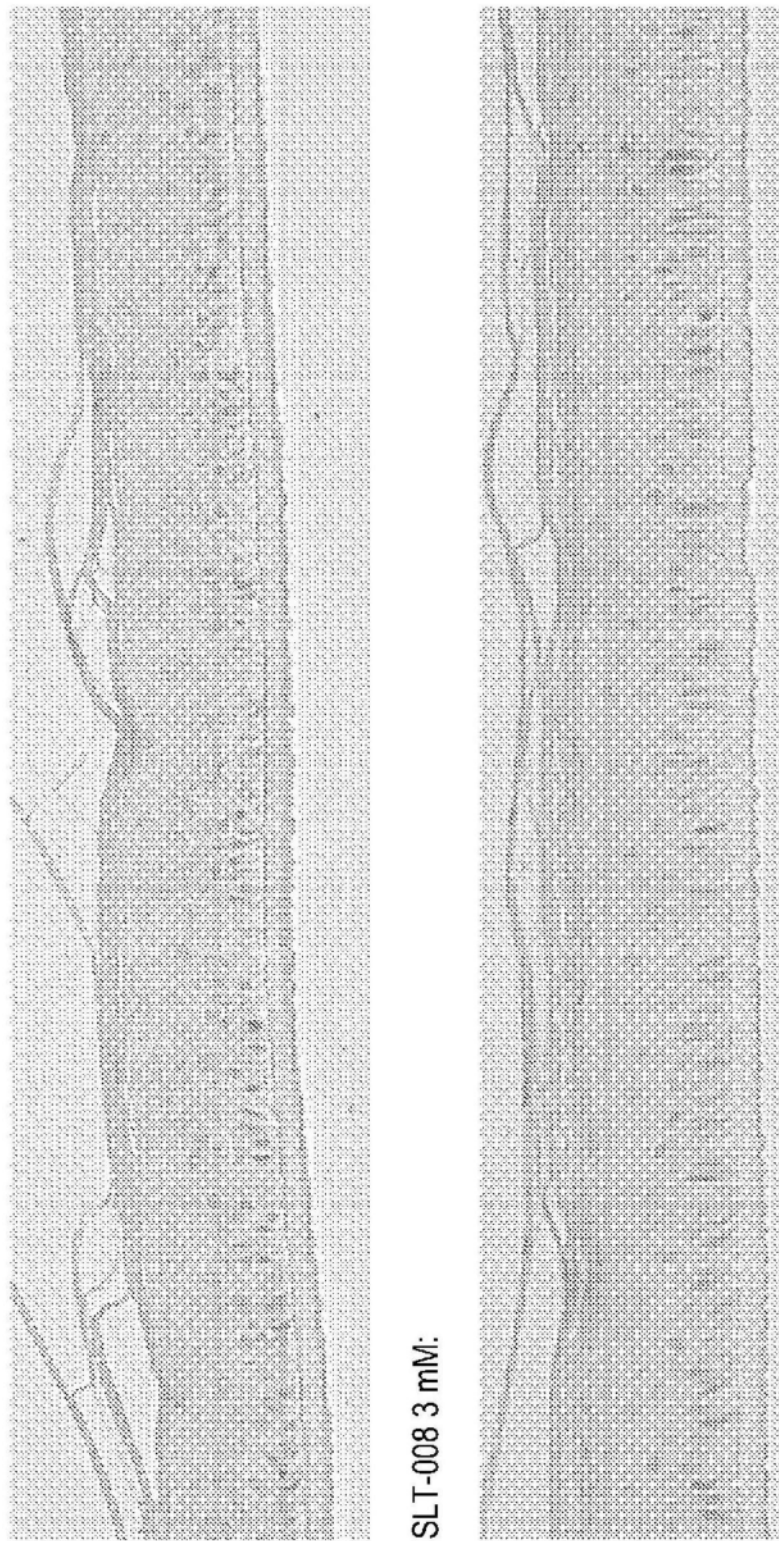


图1

在第11天，对于表皮的基底层中黑色素染色呈阳性的表面所占的百分比

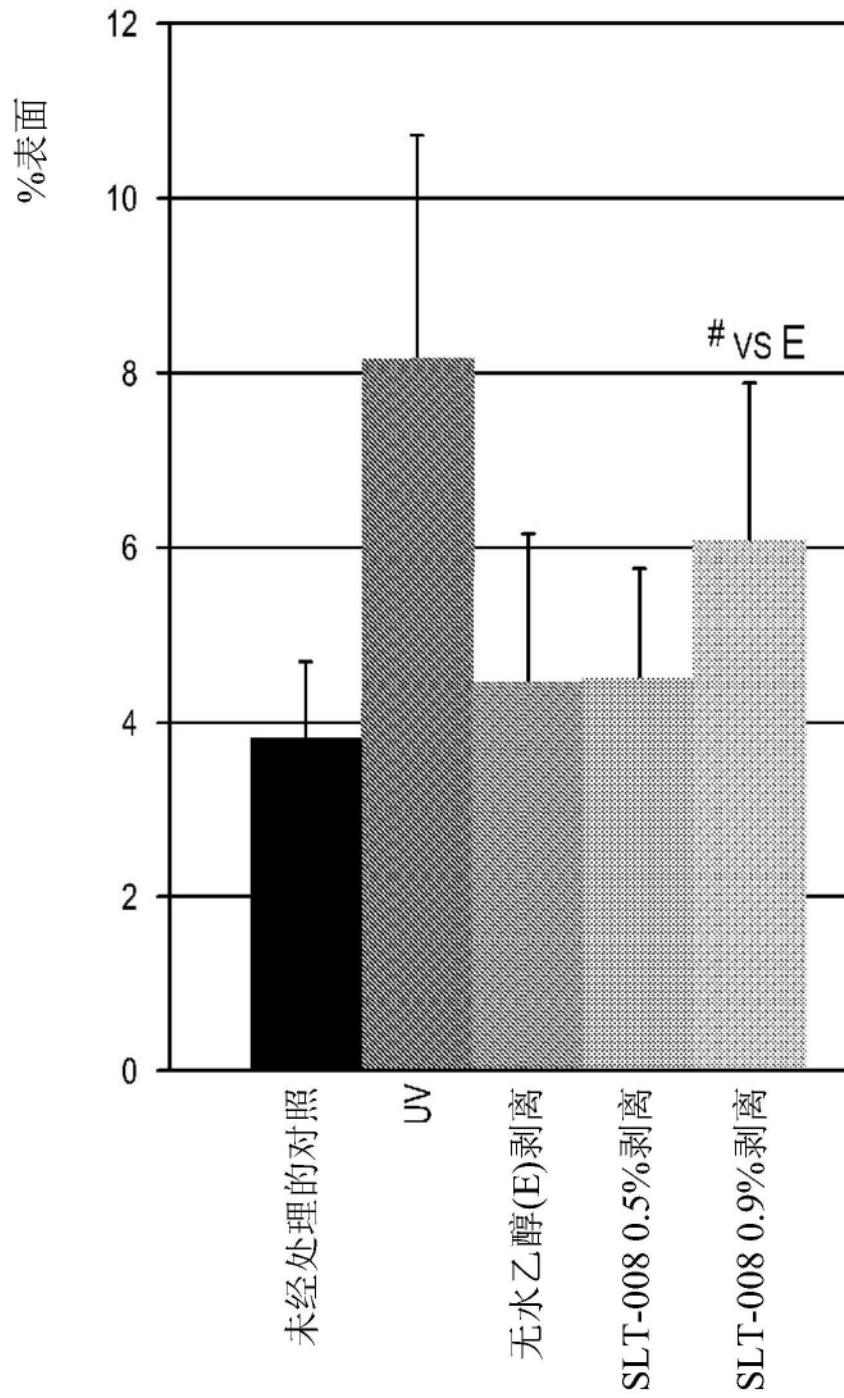
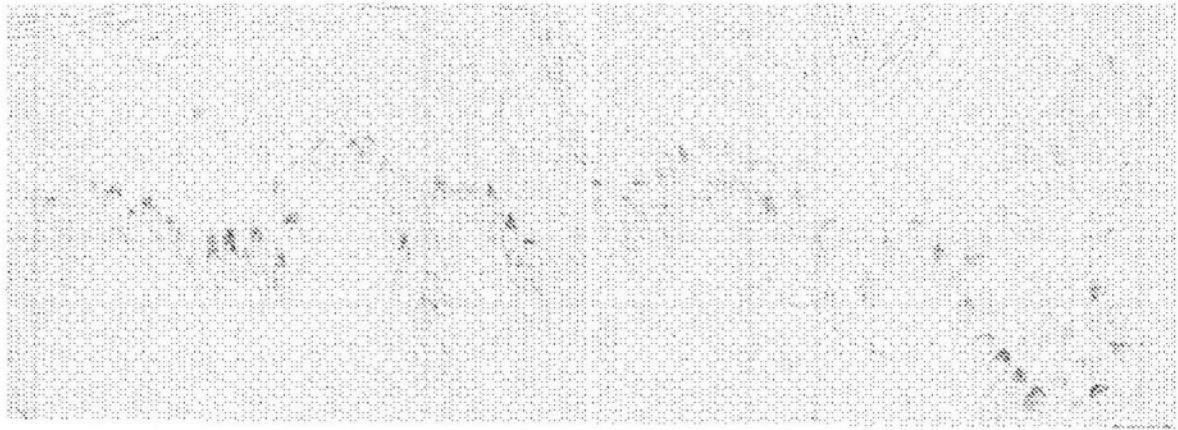


图2

用媒介物（无水乙醇）剥离的对照



SLT-008 0.9%



图3

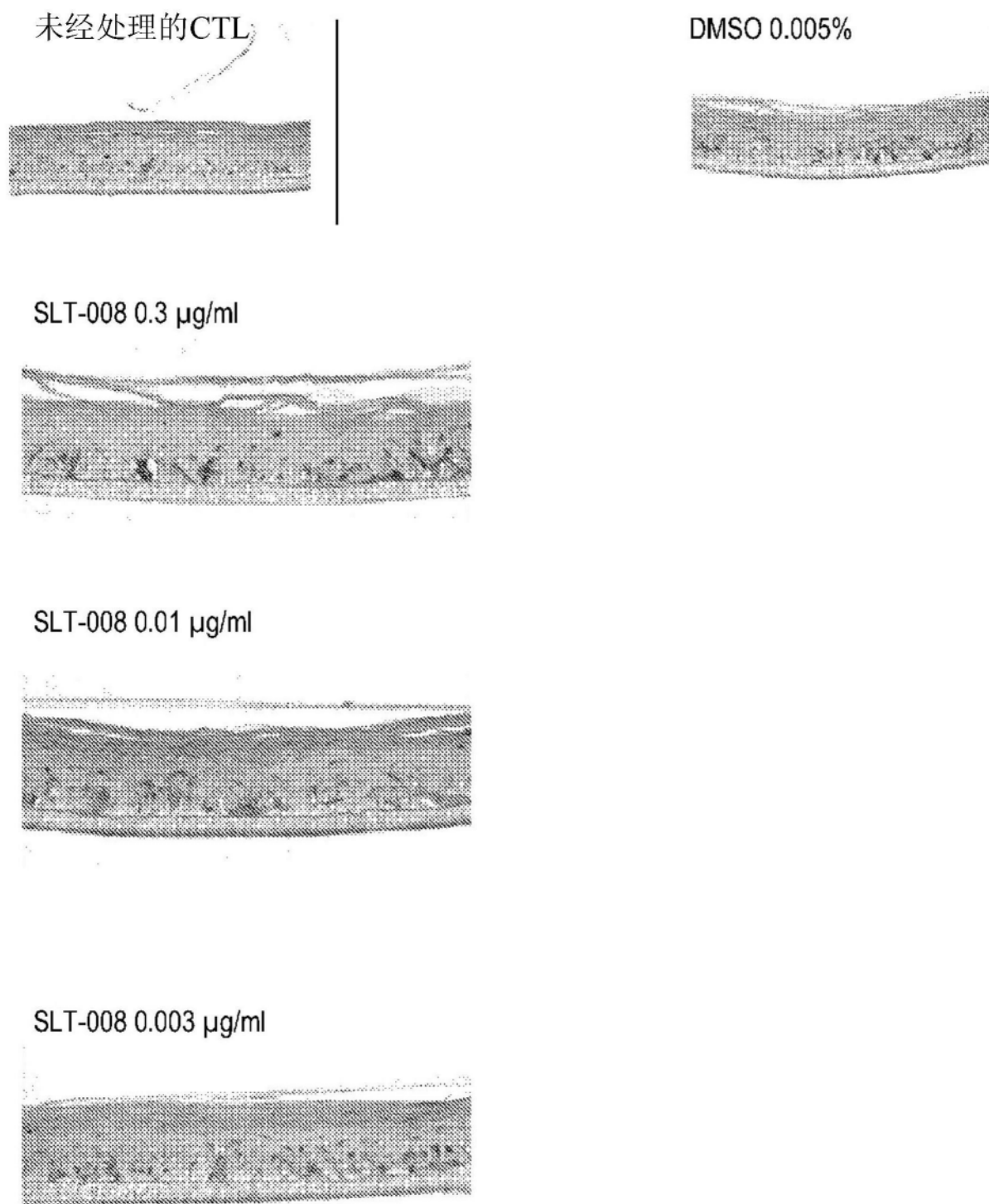


图4

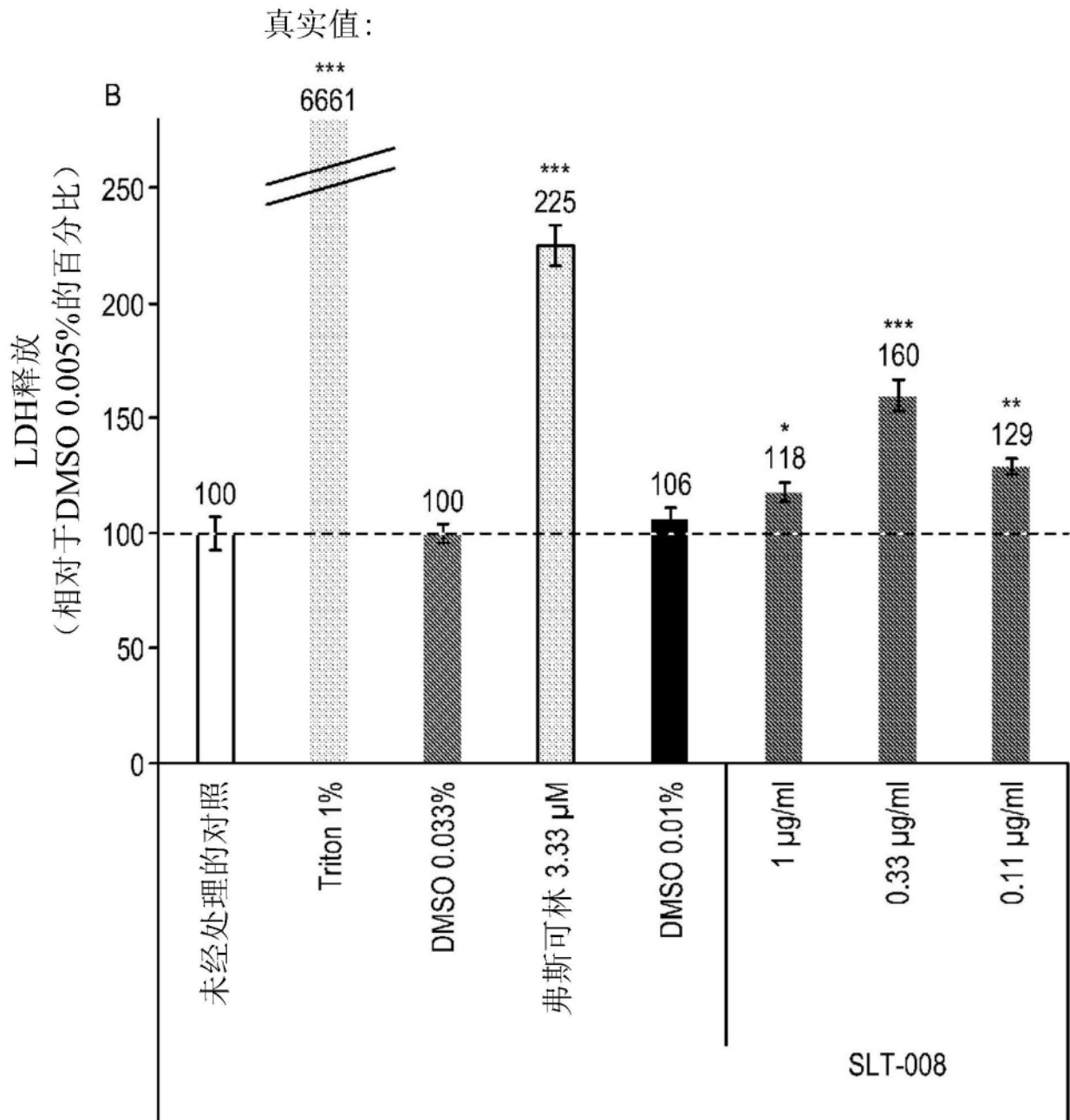


图5

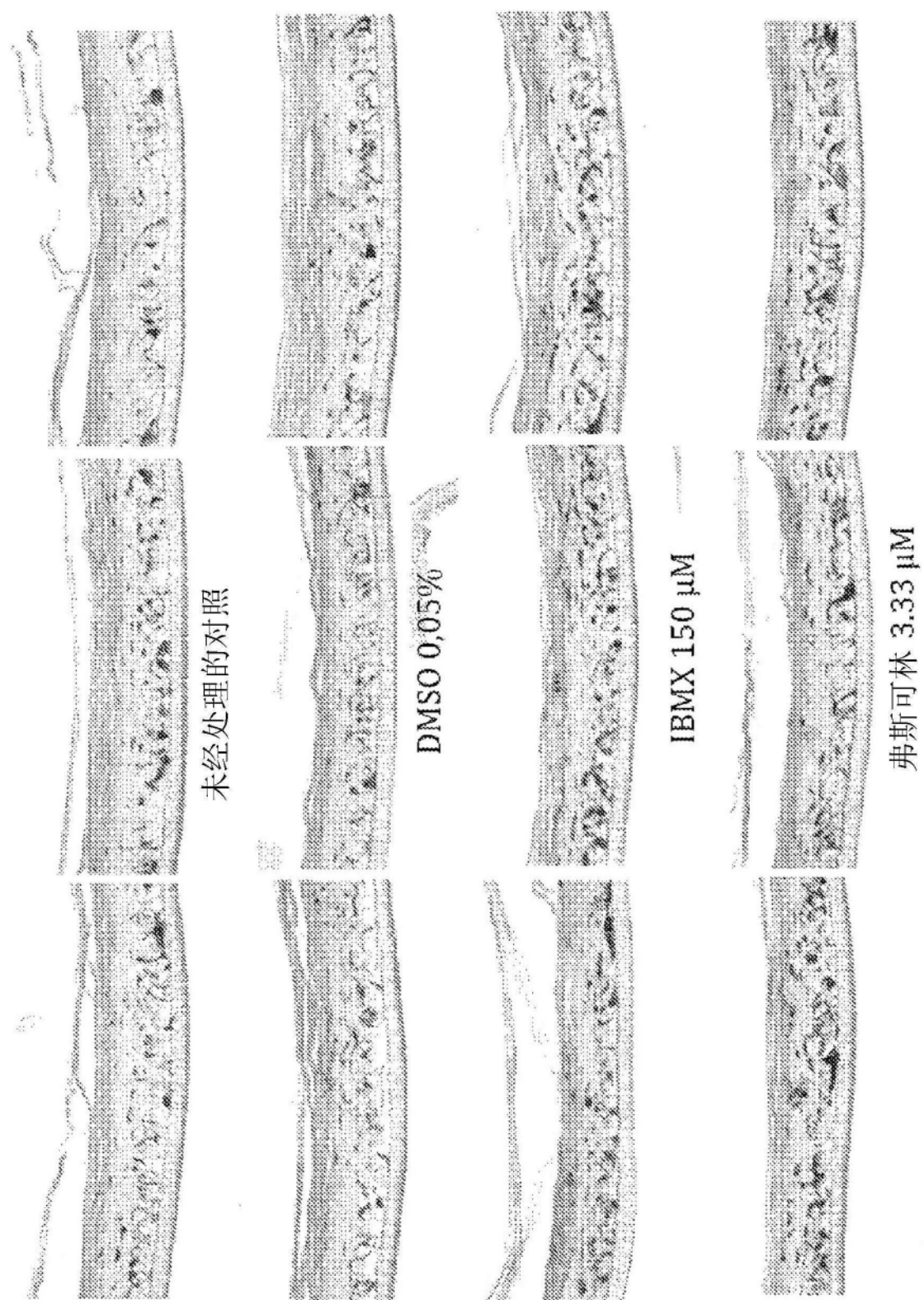


图6A

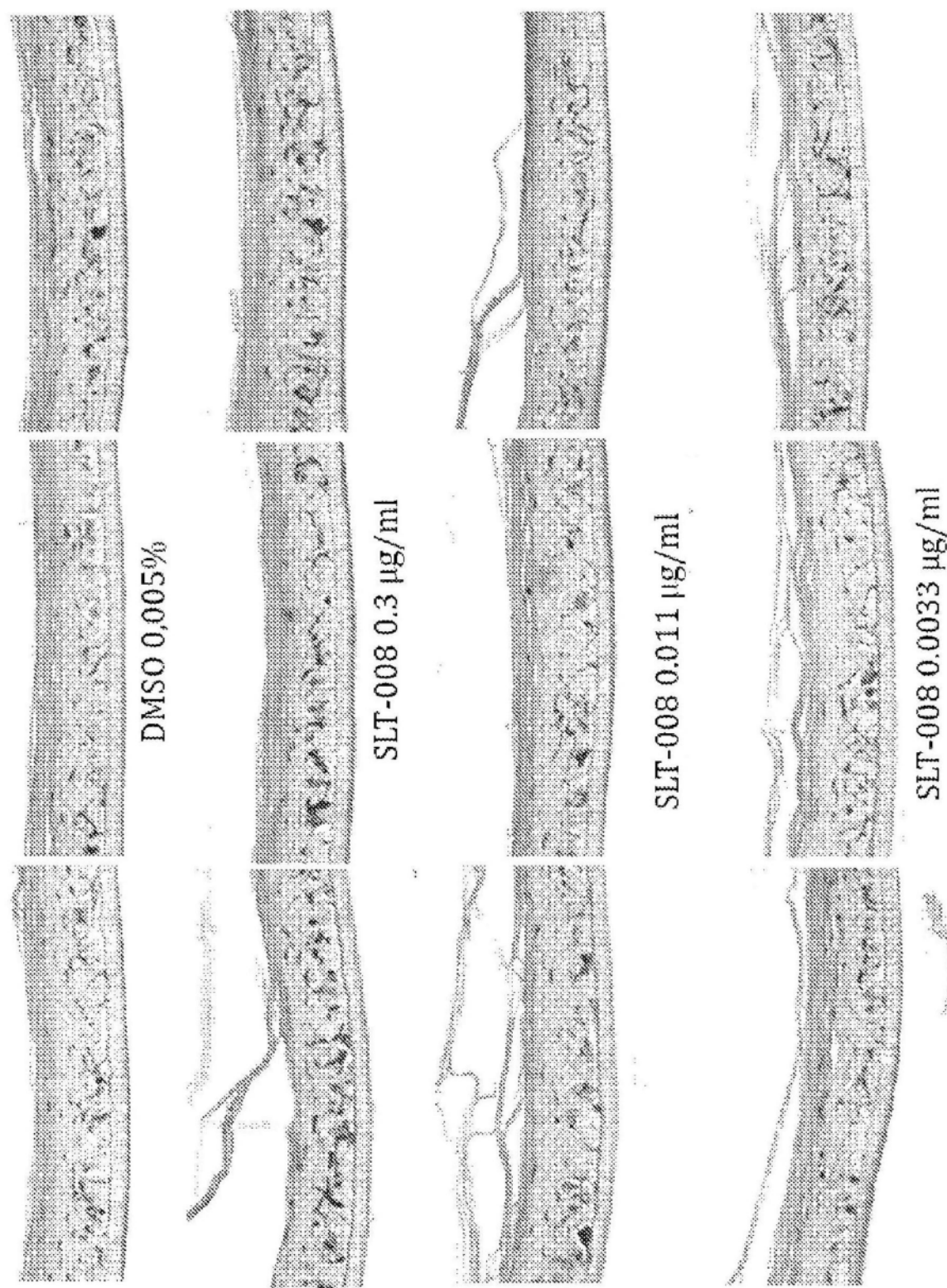


图6B

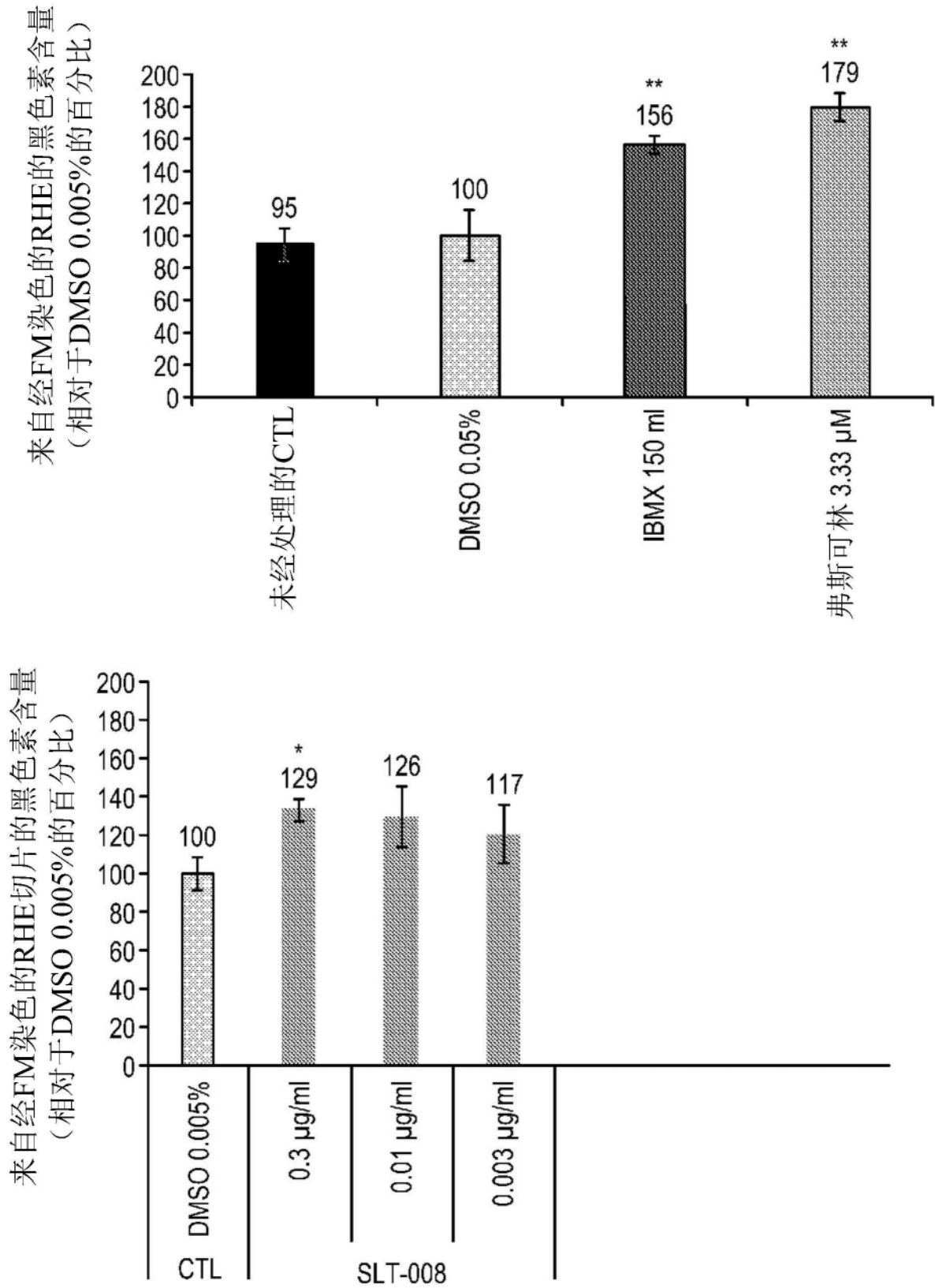


图7

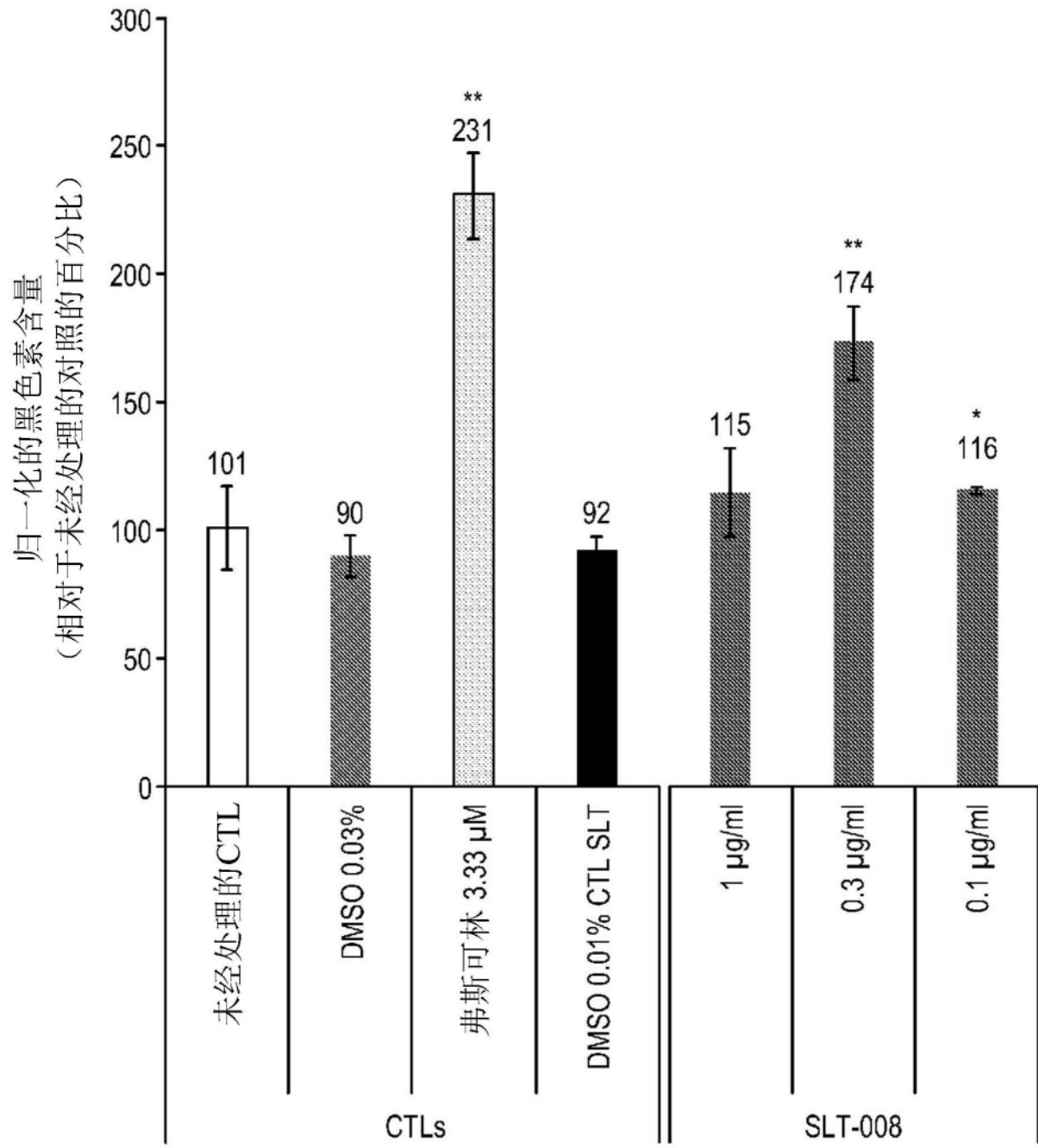


图8

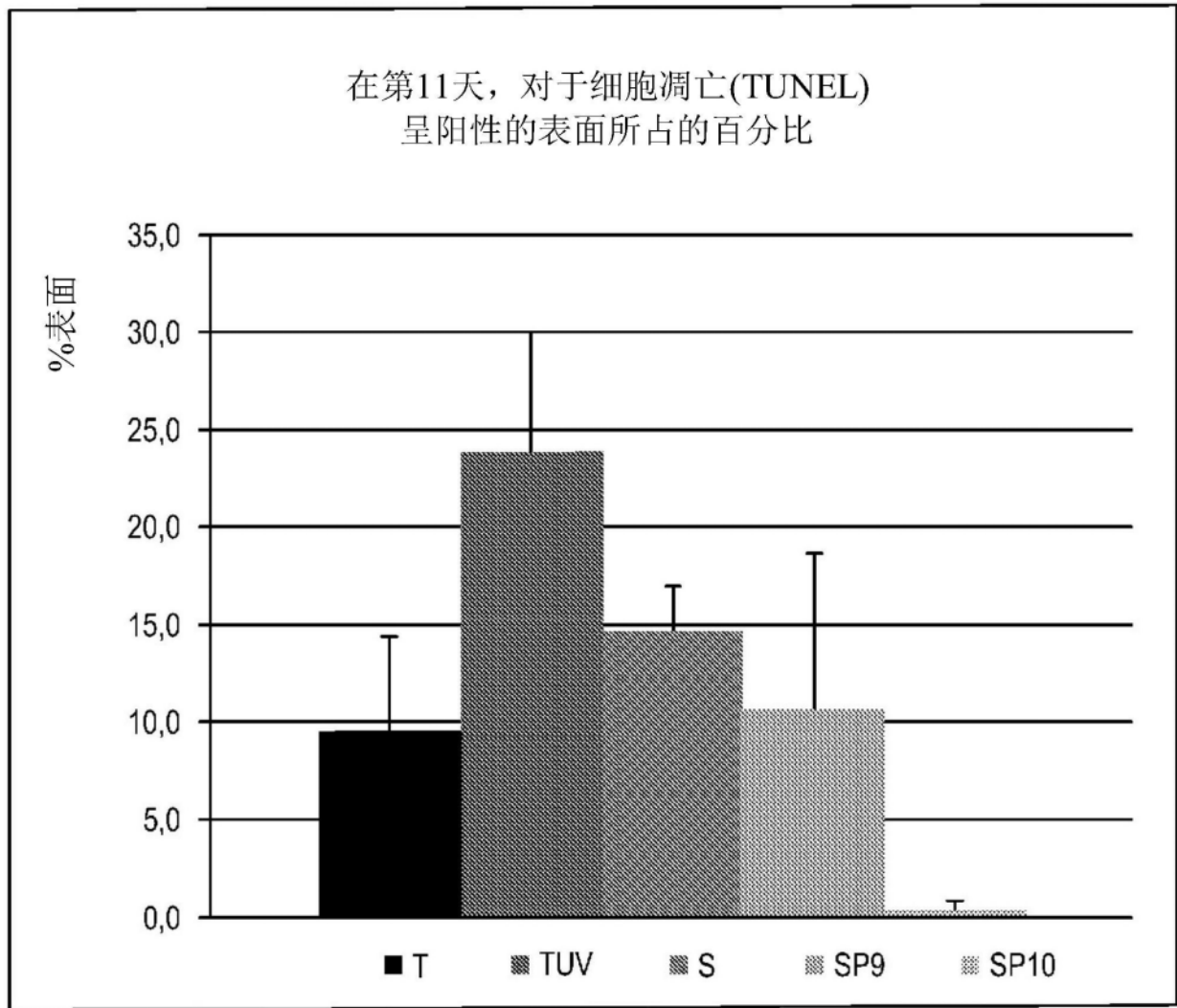


图9

胸腺嘧啶二聚体 (%表面)

	TJ5	UVBJ5	EUVBj5	P1UVBJ5	P2UVBJ5
平均	0	26.5	35.1	26.7	17.1
SD	0	7.5	5.8	7.6	5.1

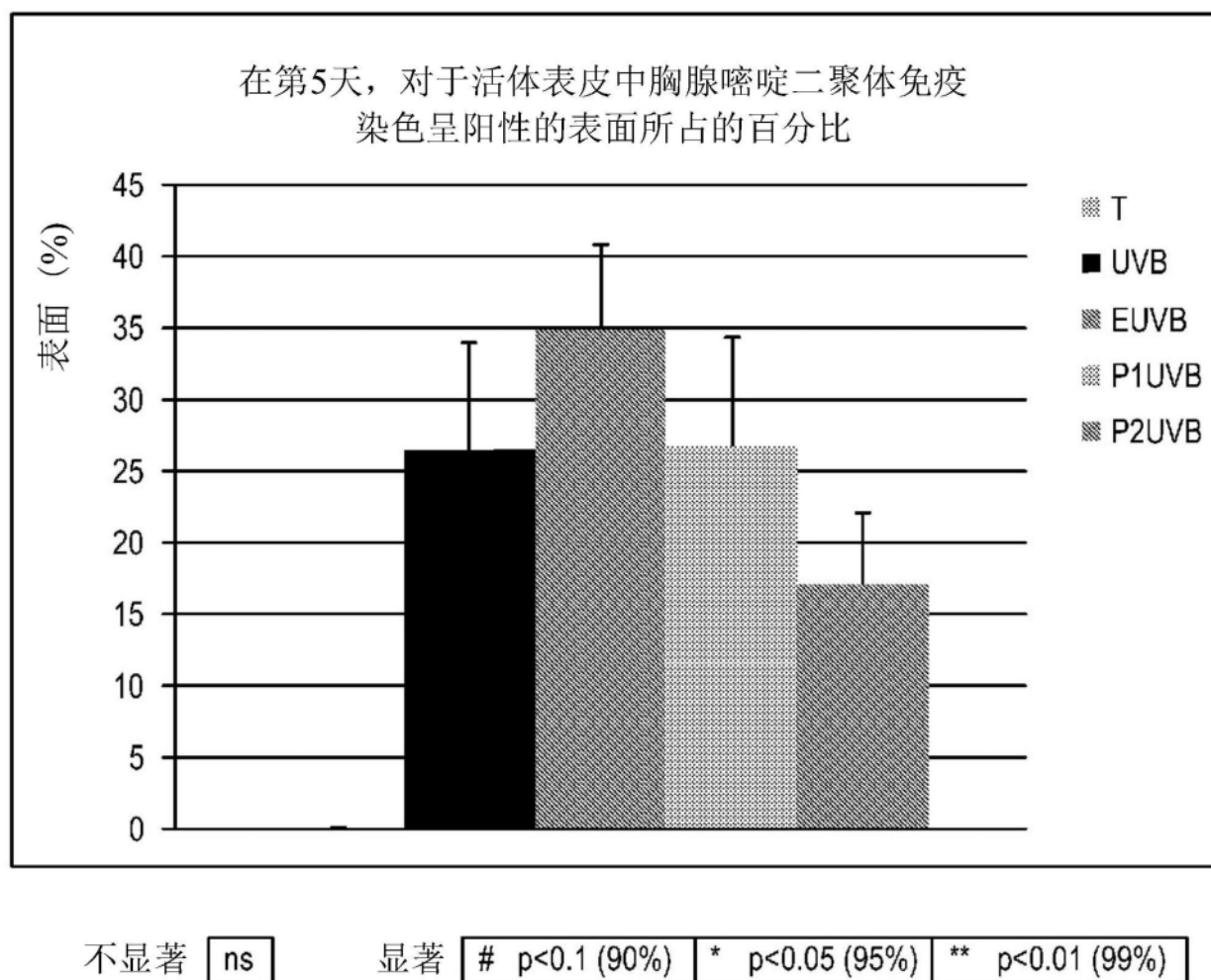


图10

凋亡细胞 (%表面)

	TJ5	UVBJ5	EUVBj5	P1UVBJ5	P2UVBJ5
平均	5,2	10.6	5.2	12.5	22.3
SD	2,4	2.5	2.4	2.2	7.5

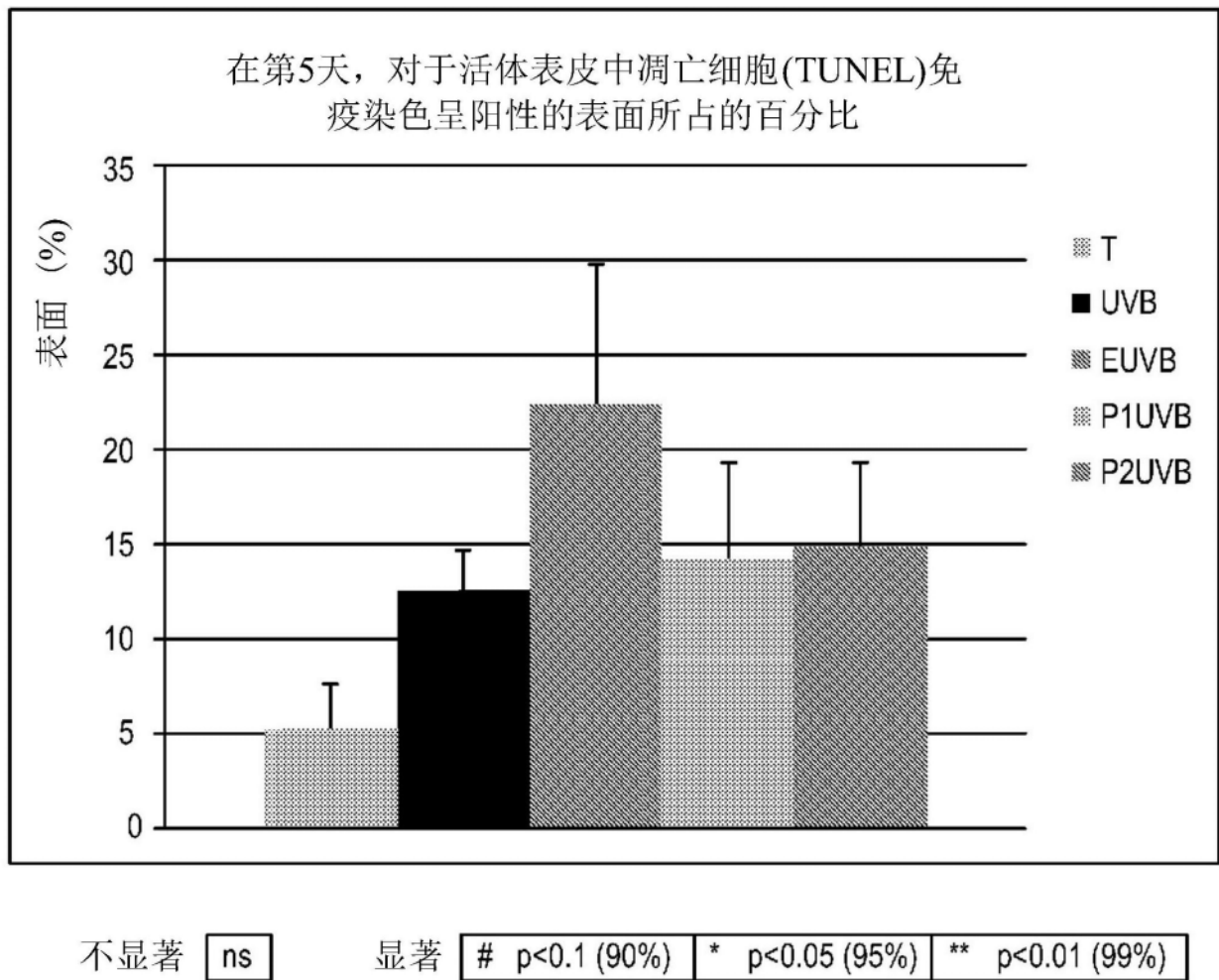


图11