



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101801377 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 02

(21) 申请号 200880106238. 5

A61P 29/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 08. 01

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

W0 2006134385 A, 2006. 12. 21, 实施例 1, 3.

0715068. 3 2007. 08. 02 GB

W0 2006134385 A, 2006. 12. 21, 摘要, 图 1.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

审查员 王晶晶

2010. 03. 09

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/GB2008/002635 2008. 08. 01

(87) PCT 申请的公布数据

W02009/016390 EN 2009. 02. 05

(73) 专利权人 剑桥企业有限公司

地址 英国剑桥

(72) 发明人 D · J · 戈兰格 D · 福克斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁志明

(51) Int. Cl.

A61K 31/45 (2006. 01)

C07D 211/76 (2006. 01)

C07D 223/12 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图 24 页

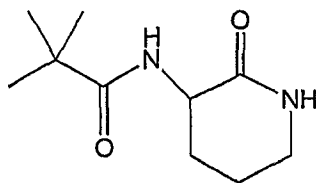
(54) 发明名称

抗炎组合物

(57) 摘要

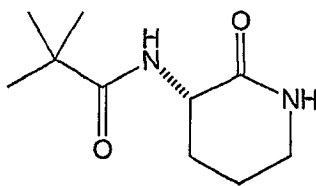
本发明涉及 3-(2', 2' - 二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮、及其药物组合物和用于制备药物的用途, 所述药物意在用于预防或治疗炎症障碍。

1. 式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐用于制备药物的用途,所述药物用于治疗炎性障碍:



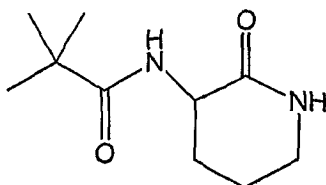
(I)

2. 式 (I') 的化合物或其药学上可接受的盐用于制备药物的用途,所述药物用于治疗炎性障碍:



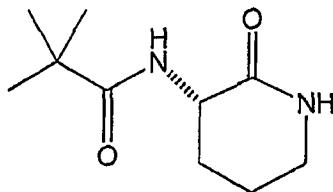
(I')

3. 药学上可接受的组合物,其包含作为活性成分的式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐,以及至少一种药学上可接受的赋形剂和 / 或载体:



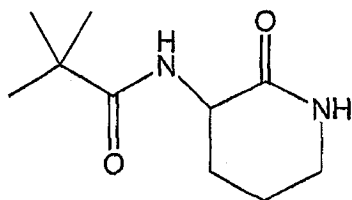
(I)

4. 药学上可接受的组合物,其包含作为活性成分的式 (I') 的化合物或其药学上可接受的盐,以及至少一种药学上可接受的赋形剂和 / 或载体:



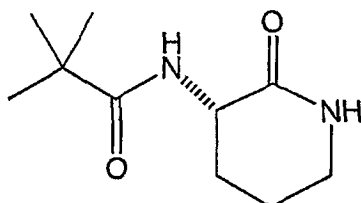
(I')

5. 通式 (I) 的化合物:



(I)

6. 通式 (I') 的化合物：



(I')

7. 权利要求 1 或 2 中任一项的式 (I) 或 (I') 的化合物的用途, 其中所述炎性障碍是哮喘、变应性鼻炎或慢性阻塞性肺病。

8. 权利要求 7 的式 (I) 或 (I') 的化合物的用途, 其中所述炎性障碍是哮喘。

抗炎组合物

[0001] 本发明涉及 3-(2', 2' -二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮, 及其药物组合物和用于制备药物的用途, 所述药物意在用于预防或治疗炎性障碍。

[0002] 炎症是生理学宿主防御的重要组成部分。然而, 越来越明显的是, 在时间上或空间上不适当的炎性反应在多种疾病中起作用, 所述疾病包括具有明显的白细胞组分的疾病 (例如, 自身免疫疾病、哮喘或动脉粥样硬化), 而且在传统上尚未被认为涉及白细胞的疾病 (例如, 骨质疏松症或阿尔茨海默氏病) 中起作用。

[0003] 趋化因子是一个与白细胞介素-8 具有同源性的信号分子的大家族, 其涉及在生理学和病理学二者条件下调节白细胞运输。借助在趋化因子信号转导中涉及的超过五十种配体和二十种受体, 该系统具有必要的信息密度以通过复杂的免疫调节过程从骨髓, 到外周, 然后通过次级淋巴器官返回, 传递至白细胞。然而, 趋化因子系统的这种复杂性首先妨碍了通过趋化因子受体阻断来调节炎性响应的药理学方法。已经证明, 在给定的炎性疾病中难以确定应该抑制哪种趋化因子受体来产生治疗益处。

[0004] 新近, 已经描述了同时通过多种趋化因子阻断信号转导的一个因子家族: Reckless 等人, *Biochem J.* (1999) 340:803-811。第一个这样的因子是一种被称为“肽 3”的肽, 发现其抑制由 5 种不同的趋化因子所诱导的白细胞迁移, 而响应于其它化学引诱物 (例如 fMLP 或 TGF- β) 的迁移未被改变。这种肽、及其类似物例如 NR58-3. 14. 3 (即序列 ID No. 1 c (DCys-DGln-DIle-DTrp-DLys-DGln-DLys-DPro-DAsp-DLeu-DCys)-NH₂) 被统称为“广谱趋化因子抑制剂” (BSCI)。Grainger 等人, *Biochem. Pharm.* 65 (2003) 1027-1034 随后显示, BSCI 在多种疾病的动物模型中具有潜在有用的抗炎活性。令人感兴趣的是, 多种趋化因子的同时阻断并不明显与急性或慢性毒性相关, 这表明这种方法可能是一种用于开发具有与甾体化合物相似的益处但是副作用减少的新抗炎药物的有用策略。

[0005] 然而, 肽和类肽衍生物例如 NR58-3. 14. 3 对于体内应用来说可能不是最佳的。它们的合成相当昂贵并且具有相对不利的药物动力学和药效学性质。例如, NR58-3. 14. 3 不是口服生物可利用的, 并且在静脉内注射之后以不到 30 分钟的半衰期从血浆清除。

[0006] 已经采用了两个平行的策略来鉴别保持肽 3 和 NR58-3. 14. 3 的抗炎性质但是用作药物的特征得到改善的新的制备物。首先, 已经开发了一系列的肽类似物, 其中有一些具有比 NR58-3. 14. 3 更长的血浆半衰期并且合成显著更便宜。其次, 已经进行了肽的结构: 活性分析以发现药效团, 以便提出可能保持原始肽的有利性质的小的非肽结构。

[0007] 这第二种方法得到了保持所述肽的抗炎性质的几个结构上不同的化合物系列, 包括生物碱育亨宾的 16-氨基和 16-氨基烷基衍生物, 以及多种 N-取代的 3-氨基戊二酰亚胺类。(参考文献: Fox 等人, *J MedChem* 45 (2002) 360-370; WO 99/12968 和 WO 00/42071)。所有这些化合物都是广谱的趋化因子抑制剂, 保持了相对于非趋化因子化学引诱物的选择性并且它们中有许多已经表现出在体内阻断急性炎症。

[0008] 这些化合物中效力最强和选择性最大的是 (S)-3-(十一碳-10-烯酰基)-氨基戊二酰亚胺 (NR58, 4), 其以 5nM 的 ED₅₀ 体外抑制趋化因子诱导的迁移。然而, 进一步的研究显示, 氨基戊二酰亚胺环在血清中易受酶促开环的影响。因此, 对于一些应用 (例如, 其中

所治疗的炎症是慢性的,例如在自身免疫疾病中),这些化合物可能不具有最佳的性质,具有类似抗炎性质的更稳定的化合物可能是更好的。

[0009] 作为鉴别这类稳定的类似物的一个方法,已经测试了(S)-3-(十一碳-10-烯酰基)-氨基戊二酰亚胺的多种衍生物在血清中的稳定性。一种这样的衍生物是6-脱氧代类似物(S)-3-(十一碳-10-烯酰基)-四氢吡啶-2-酮,它在人血清中在37°C在至少7天的时间内是完全稳定的,但是与母体分子相比效力显著减弱。

[0010] 稳定的广谱趋化因子抑制剂(BSCI)的一个这样的家族是3-氨基己内酰胺类,其具有七元的单内酰胺环(参见,例如,W02005/053702和W02006/016152)。然而,还从具有不同环大小的其它3-氨基内酰胺类产生了其它有用的抗炎化合物(参见,例如W02006/134385)。对内酰胺环的其它修饰,包括引入杂原子和双环内酰胺环系统,也得到了具有BSCI活性的化合物(参见,例如,W02006/018609和W02006/085096)。

[0011] 到目前为止,已经基于BSCI活性的最佳效力对具有BSCI活性并由此具有体内抗炎性质的广泛类别的药物进行了鉴别。例如,前述文献公开的内容教导了引入2,2-双取代(在酰基-3-氨基内酰胺的酰基侧链中的 α 碳原子或关键碳原子处)导致在急性炎症模型中的体外和体内作为BSCI效力的显著增加,无论所述2,2-双取代的酰基基团是开链的(参见W02005/053702)、单环的(参见W02006/134384),还是多环的(参见W02006/016152)。

[0012] 然而,期望的药理学作用的效力仅仅是确定药剂是否会制备有用的人用药物的一个因素,尽管它是一个重要的因素。特别地,药物动力学(或药物在身体内的处置)对特定药物的效用产生重要影响。药物动力学(以其最广泛的含义定义,是研究身体对药物的作用,其与药效学相对应,药效学是研究药物对身体的作用)取决于许多复杂的生理学过程,包括(但不限于)吸收、血浆稳定性、分布容积(特别是平衡到‘靶’组织中的速率)、代谢转化(包括肝脏代谢,例如细胞色素P450同工酶介导的氧化和II期代谢例如硫酸化和葡萄糖醛酸化,以及肝外代谢,例如血清酶的修饰)以及排泄(例如肾清除进入尿液中和粪便清除)。这些过程通常被统称为药物的‘ADME’性质(ADME是吸收、分布、代谢和排泄的首字母缩写词)。

[0013] 确定药物作为人用药物的效用的另一个重要因素是安全性。给予的许多(如果不是所有的)化合物都引起对机体的多种作用,其中期望的药理学作用通常仅仅是一个子集。其余的作用可能导致对患者的伤害(毒性作用)或麻烦(副作用)。对候选药用物质的这类性质的研究被称为毒理学或安全性药理学。不希望的作用大体上可以分为两种类型。类别作用与期望的药理作用有紧密联系,并且(在更大或更小程度上)是操纵所选择的分子靶标的必然结果。例如,设计用于预防病理性炎症的药物在一定程度上可以导致免疫抑制和感染的危险增加。这是因为炎症组织损伤和感染都不可避免地免疫系统活性的程度有关联。结果,共享相同的药理学靶标的所有分子都在更大或更小程度上共享类别作用。相比之下,化合物作用特异性地与特定的化合物结构相关,通常是与(不同于预定的药理学靶标的)靶标的相互作用(经常是意想不到的)的结果。原则上,找到具有相同的预定药理学作用但是完全没有化合物特异性副作用的另一中分子是可能的。一些化合物作用是共同的(例如hERG相互作用,其可以导致危险的心脏搏动期间QT间隔的延长,导致潜在致命的心脏节律失调),而其它化合物作用可能显然是特定化合物所特有的。

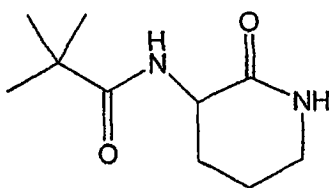
[0014] 严峻的是,尽管有数十年的药物开发经验,但是仍然没有被广泛接受的用于预测药物的 ADME 和药物动力学性质或其毒理学和安全性药理学方法。因为这种原因,首先使用体外测定系统(例如,表达 hERG 的细胞系),然后在动物中,最后在人体中进行 I 期临床试验的明确试验在全世界都是新药物开发的管理要求。

[0015] 已经描述了用于从对分子结构的检查来预测 ADME 的某些方面的方法,并且几乎没有疑问的是,有经验的药物化学家可以基于纯粹的理论理由可靠地排除许多结构。这种“经验法则”(因为它并不比前述方法更具依赖性)的一个实例是 Lipinsky 的“Rules of Five”,其基于如下的观察结果:大多数经过批准的药物满足了与分子量、可旋转键的数目和极性有关的某些标准。类似地,通常公知的是,具有大的疏水基团的分子更有可能表现出不合乎要求的与 hERG 通道的相互作用。

[0016] 这类一般性指南,即使是合起来使用时,可用于排除不适合的分子,但是仍有许多非常不适合的分子(由于种种原因)而漏网。现在,没有人会严肃地支持基于纯粹的理论理由从一类活性化合物选择药物候选物。结果,从具有特别有利的 ADME、药物动力学、毒理学和安全性药理学性质的类别中发现特定的化合物需要在好的候选物之间进行相当多的实践性实验,并且是不能被预测的新发现,即使是本领域技术人员也不能预测到。

[0017] 在这里,我们描述了先前没有报道过的新化合物 3-(2',2'-二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮(I)。

[0018]



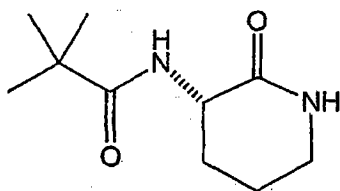
(I)

[0019] 这个化合物是以前已经描述过的一大通式类别的 BSCI 的特定成员(例如,参见 WO2006/134385)。然而,我们现在证明,尽管该类别的所有分子都具有 BSCI 活性,但是化合物(I)由于其 ADME、药物动力学、毒理学和安全性药理学性质的组合,在通过实验方法与该类别的其它成员进行比较时,具有显著优异的用作人用药物的性质。

[0020] 在内酰胺环的 3 位的碳原子是不对称的,因此,本发明的化合物具有至少两个可能的个体形式,即,“R”和“S”构型。本发明包括所述两种对映体形式以及这些形式的所有组合,包括外消旋的“RS”混合物。为简便起见,在结构式中未显示出特定的构型时,应该理解,它表示两种单独的对映体形式以及它们的混合物。因为对映体反转对产生化合物优越性的关键 ADME 性质没有影响(并且另外对化合物作为 BSCI 的效力仅有小的影响),所以两种对映体形式以及它们的混合物代表了显著优于整个该类别的特定实例。

[0021] 优选地,本发明的式(I)的化合物为式(I')的化合物。

[0022]



(I')

[0023] 在立构中心为 (S)- 构型的化合物 (I') 作为 BSCI 的效力是 (R)- 对映异构体的 5-25 倍。

[0024] 还提供了药物组合物,其包含作为活性成分的通式 (I) 或 (I') 的化合物或其药学上可接受的盐,以及至少一种药学上可接受的赋形剂和 / 或载体。

[0025] 药学上可接受的盐特别地是指无机酸的加成盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、磷酸盐、二磷酸和硝酸盐,或者有机酸的加成盐,例如乙酸盐、马来酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐、棕榈酸盐和硬脂酸盐。在可以使用时,本发明范围内还包括由碱形成的盐,所述碱例如氢氧化钠或氢氧化钾。关于药学上可接受的盐的其它实例,参考“Saltselection for basic drugs”, Int. J. Pharm. (1986), 33 :201-217。

[0026] 所述药物组合物可以是固体形式,例如粉末、颗粒、片剂、胶囊、脂质体或栓剂。合适的固体载体可以是例如磷酸钙、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、糊精、淀粉、明胶、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯基吡咯烷酮和蜡。其它合适的药学上可接受的赋形剂和 / 或载体是本领域技术人员已知的。

[0027] 本发明的药物组合物还可以作为液体形式存在,例如溶液、乳液、悬浮液或糖浆。合适的液体载体可以是例如水、有机溶剂例如甘油或二醇类、以及它们在水中的不同比例的混合物。

[0028] 本发明还提供式 (I) 或 (I') 的化合物或其药学上可接受的盐用于制备药物的用途,所述药物用于治疗炎性障碍。

[0029] 本发明包括其中所述化合物为水合形式或溶剂化形式的所定义的化合物、组合物和用途。

[0030] 与现有技术相比,本发明的改进在于如下的意想不到的观察结果:与以前描述(例如例如,在前文的国际申请中)的内酰胺 BSCI 的通式类别相比,3-(2',2'-二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮具有优异的 ADME 性质。尽管报告了这类化合物具有可接受的药效学性质(也就是说,由于它们的 BSCI 活性,它们具有有效的体内抗炎作用),并且推论它们一定应该具有可接受的药物动力学性质(ADME 性质),然而,对 ADME 性质的直接评价表明,3-(2',2'-二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮是显著地和意想不到地优异的(参见以下实施例)。

[0031] 特别是,尽管先前在血清中的体外稳定性研究表明,内酰胺 BSCI 显著地好于更早的酰亚胺 BSCI(参见,例如, W099/12968),如文献中报告的(例如, Fox 等人, J. Med. Chem. 2005 48 :867-74),但是现在明确的是,许多(或实际上是大多数)的内酰胺类 BSCI 易经受不希望的体内代谢。我们制备并测试了超过一打的酰基氨基内酰胺类的 BSCI,除了 3-(2',2'-二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮之外,到目前为止测试的所有内酰胺类

BSCI 都经历了快速肝脏代谢（细胞色素 P450 介导的羟基化作用和 / 或 II 期代谢）。

[0032] 至少部分是由于体内代谢的减少, 3-(2', 2' - 二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮的总体清除率显著地低于所测试的其它内酰胺 BSCI。结果, 3-(2', 2' - 二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮单次经口剂量给药之后的暴露更高 10 倍以上。因此, 3-(2', 2' - 二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮比以前公开的大多数（如果不是全部）内酰胺 BSCI 更适合用作人用药物, 特别是在需要长期经口暴露来获得功效的情况下。

[0033] 现有技术的肽（例如 NR58-3.14.3 的缺点在于：(a) 它们昂贵并且需要固相合成（至少对于较长的那些而言）和 (b) 它们非常快速地通过肾清除和 (c) 它们的效力通常更小得多（体外效力小 > 25 倍, 体内效力小 > 10,000 倍）。

[0034] 现有技术的氨基戊二酰亚胺是便宜的、不迅速地通过肾清除并且体外更有效, 但是它们在血清中极不稳定（原因是酰亚胺环的酶促开环, 参见, 例如, Fox 等人, J. Med. Chem. 2005 48 :867-74）。结果, 例如 (S)-3-(十一碳-10-烯酰基氨基)戊二酰亚胺等氨基戊二酰亚胺 BSCI 的体内效力比 2', 2' - 二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮的效力小至少 250 倍, 即使在急性炎症模型中（例如, 特征在于系统性 TNF- α 产生的 LPS 诱导的内毒素血症, 其中化合物稳定性和 ADME 性质的影响是最不明显的）。

[0035] 在文献中已经描述的在结构上相关（但是功能上显著不同）的另一个系列化合物是典型地基于 6 元的高丝氨酸内酯结构的细菌自诱导物化合物, 其通常具有 3-氧代-酰基侧链（例如, 参见 Bycroft 等人, US5,969,158, 该专利要求保护大量的这种化合物）。有趣的是, 尽管该专利公开的内容包括了涵盖内酰胺以及内酯在内的通式, 但是举例说明的具有细菌自诱导物性质的化合物中即使有也是极少数具有内酰胺头基团。已知所有这类化合物（但是特别是具有内酯头基团和 / 或 3-氧代酰基尾基团的那些）都是相对不稳定的, 这限制了它们作为药物的应用。

[0036] 本文中描述的改进, 即 3-(2', 2' - 二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮, 合成成本低（本文中披露的方法允许甚至是千克规模的直接合成）并且表现出优异的代谢稳定性, 不仅表现出在分离的血清中的体外代谢稳定性（以前公开的整个内酰胺类 BSCI 共有的性质）, 而且表现出体内的代谢稳定性。结果, 本发明的化合物（在目前为止被广泛研究的那些化合物中）对于治疗人类炎症性疾病来说, 在功效、效力和药物性质（例如, ADME、药物动力学、毒理学和安全性药理学）方面是唯一最佳的。

[0037] 根据本发明, 意在通过式 (I) 或 (I') 的化合物或其药学上可接受的盐或包含它们作为活性成分的药物组合物或药物预防或治疗的炎症障碍特别地包括：

[0038] - 自身免疫疾病, 例如例如, 多发性硬化、类风湿性关节炎、狼疮、肠易激综合征、克罗恩氏病；

[0039] - 血管障碍, 包括中风、冠状动脉疾病、心肌梗塞、不稳定型心绞痛、动脉粥样硬化或血管炎（例如, 贝切特氏综合征）、巨细胞性动脉炎、风湿性多肌痛、眶坏死性肉芽肿病、Churg-Strauss 综合症血管炎、Henoch-Schonlein 紫癜和川崎氏病；

[0040] - 病毒感染或复制, 例如包括痘病毒、疱疹病毒（例如, Samiri 疱疹病毒）、巨细胞病毒 (CMV)、肝炎病毒或慢病毒属（包括 HIV）在内的病毒的感染或复制；；

[0041] - 哮喘和相关的呼吸障碍, 例如变应性鼻炎和 COPD；

[0042] - 骨质疏松症；(骨矿物质密度低)；

- [0043] - 瘤生长；
- [0044] - 器官移植排斥和 / 或移植植物或器官功能延迟, 例如在肾移植患者中；
- [0045] - 特征在于 TNF- α 水平升高的障碍；
- [0046] - 银屑病；
- [0047] - 皮肤创伤和其它纤维化障碍, 包括肥厚性瘢痕 (瘢痕瘤形成)、一般手术或妇科手术后的粘连形成、肺部纤维化、肝脏纤维化 (包括酒精肝疾病) 或肾脏纤维化 (无论是特发的肾脏纤维化还是由于潜在疾病例如糖尿病引起的肾脏纤维化 (糖尿病性肾病))；
- [0048] - 由细胞内寄生物引起的障碍, 例如疟疾或肺结核；
- [0049] - 神经性疼痛 (例如手术后幻肢痛、疱疹后神经痛 (post-herpetic neuralgia) 等)；
- [0050] - 变态反应 ; 或
- [0051] - 阿尔茨海默氏病。
- [0052] 根据本发明, 另外的炎性障碍包括：
- [0053] -ALS ；
- [0054] - 抗原诱导的回忆应答
- [0055] - 免疫应答抑制。
- [0056] 这些临床适应症落入特征在于 TNF α 水平升高的炎性障碍或疾病的一般定义的范围之内。

[0057] 应当指出, 为了避免引起怀疑, 包括本文中要求保护的化合物在内的 BSCI 的主要作用机制是作用于免疫系统。因此, 所要求保护的例如病毒感染和 / 或复制以及肿瘤生长 (所述病况本身不是主要的免疫系统疾病) 的有利作用来源于调节免疫系统对病毒的感染和 / 或复制模式或者对肿瘤的生长和扩散的后续影响。因为包括本文中要求保护的化合物在内的 BSCI (一般说来) 并不直接影响病毒复制或肿瘤生长, 预期它们在其中不存在完整的和起作用的免疫系统的孤立体系 (例如, 在培养的细胞系的体外感染中, 或者在肿瘤细胞系增殖试验中) 中根本没有效果。因此, 关于任何化合物在这种孤立体系中的已有信息不能得到作用于免疫系统的 BSCI 的开发。

[0058] 在法律允许的情况下, 本发明还提供通过对患者给予抗炎用量的本文中要求保护的化合物、组合物或药物来治疗、改善或预防炎性疾病 (包括对任何试剂的有害炎性反应) 的症状的方法。

[0059] 本发明的药物的给药可以通过局部、经口、非肠道途径、通过肌肉注射等进行。

[0060] 所考虑的本发明药物的给药剂量包括 0.1mg-10g, 取决于所用的制剂和给药途径。

[0061] 根据本发明, 通式 (I) 或 (I') 的化合物可以使用随后描述的方法来制备。

[0062] 通式 (I) 或 (I') 的化合物的制备

[0063] 通式 (I) 或 (I') 的所有化合物都可以根据本领域技术人员已知的一般方法来制备。

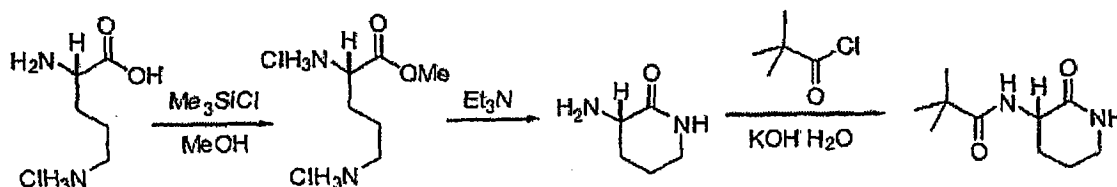
[0064] 化合物 (I) 是可以从鸟氨酸和 2,2- 二甲基丙酰氯制备的无色结晶化合物。对于 (I') 的合成, 使用对映体纯的 (S)- 鸟氨酸。可能从鸟氨酸或其甲基酯开始闭环。可以通过使用单甲基甲硅烷基氯就地生成 HCl 而使氨基酸在无水甲醇中酯化。作为选择, 可以将分离的酯闭环, 在任一情况中都使用三乙胺。然后可以在溶剂更换之后将粗产物酰基化。

[0065] 酰基氨基内酰胺产物 (I) 具有显著的水溶性, 因此, 用于相关的更具疏水性的产物 (参见, 例如, W02006/134385) 的酰化条件是不能令人满意的。使用三当量的碳酸钠作为碱导致形成大量的碳酸氢钠副产物沉淀, 除非使用大量的水 ($> 4\text{ mL}/\text{mmol}$ 鸟氨酸)。在这些浓度, 将产物提取到二氯甲烷中变得没有效率。因此, 将三当量的碳酸钠替换为 2.5 当量的氢氧化钾 (中和在闭环步骤中产生的 2.5 当量的盐酸三乙胺)。使用这种碱, 可以使水的用量显著降低 (低于 $1\text{ mL}/\text{mmol}$ 鸟氨酸) (最终的 pH 为 8-9)。用 EtOAc 提取水层 ($3 \times 2\text{ mL}/\text{mmol}$ 鸟氨酸) 并从 EtOAc ($0.5\text{ mL}/\text{mmol}$ 热的) 和 40-60 石油醚 ($5\text{ mL}/\text{mmol}$) 重结晶以 43% 收率产生第一批产物 (从 50 mmol 鸟氨酸得到 4.25g)。

[0066] 指出的是, 如果在后处理过程中水层的 pH 太低, 则会将少量的盐酸三乙胺提取到 EtOAc 层中。用水洗涤这个 EtOAc 溶液的尝试会将显著量的内酰胺产物 (I) 与胺盐酸盐一起提取出来。这可以通过在尝试 EtOAc 提取之前将水层的 pH 提高到 12 (例如, 通过添加相对于酰基氯为大约 1 当量的 KOH) 来避免, 然后只有三乙胺游离碱与内酰胺产物 (I) 一起提取出来, 其可以通过蒸发或在重结晶过程中更容易地除去。

[0067] 因此, 提供以下的优选合成路线:

[0068]



[0069] 将 (S)-鸟氨酸单盐酸盐 (50 mmol) 悬浮在无水甲醇 (100 mL) 中并加入三甲基甲硅烷基氯 (75 mmol)。将反应回流加热 24 小时。然后添加三乙胺 (150 mmol) 并将反应回流加热 48 小时。然后减压除去甲醇 (任选地, 可以在后面的阶段加入甲苯以有利于除去), 并将残余物溶解于水 (20 mL) 中, 添加 KOH (125 mmol)。

[0070] 将混合物冷却到 0°C , 然后缓慢加入 2,2-二甲基丙酰基氯 (50 mmol) 并将反应搅拌 18 小时, 同时温热到环境温度。然后添加固体 KOH (50 mmol), 并一旦它溶解, 就将反应用 EtOAc 提取 ($3 \times 100\text{ mL}$)。合并的有机层用 K_2CO_3 和 Na_2SO_4 的组合快速干燥并在低压下浓缩。然后使固体残余物从 EtOAc (25 mL) / 40-60 石油醚 ($200-250\text{ mL}$) 重结晶, 得到内酰胺 (I'), 为结晶固体 (大于 50% 收率)。

[0071] 然后通过质子核磁共振光谱法确认产物的同一性和纯度 ($> 95\%$), (δ H (400 MHz, CDCl_3) 6.63 (1H, br s, NH), 6.01 (1H, br s, NH), 4.20 (1H, dt, $J_{11,5.5}$, CHNH), 3.40-3.31 (2H, m, CH_2NH), 2.61 (1H, dq, $J_{13,4.5}$, CH_2), 1.97-1.88 (2H, m, CH_2), 1.50 (1H, dddd, $J_{13,12,9.5,7.5}$, CH_2), 1.22 (9H, s, $3 \times \text{CH}_3$)。

[0072] 定义

[0073] 术语“约”是指在所述数值附近的一个区间。如本申请中使用的, “约 X”是指从 X 减去 10% X 到 X 加上 10% X 的区间, 并且优选是从 X 减去 5% X 到 X 加上 5% X 的区间。

[0074] 本说明书中对数值范围的使用清楚地表示在本发明范围内包括所述范围内的所有单个整数以及在给定范围的最广泛范围内的上限和下限数字的所有组合。因此, 例如, 关于 (尤其是) 使用的 3-(2', 2'-二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮的剂量所指定的 0.1mg 到 10g 的范围意在包括介于 0.1mg 和 10g 之间的所有剂量以及上限和下限数字的每

个组合的所有子范围,无论是否明确地举例说明。

[0075] 如本文中使用的,术语“包括”意在理解为包括和“由...组成”。因此,在本发明涉及“包括化合物作为活性成分的药物组合物”时,该术语意在涵盖其中可以存在有其它活性成分的组合物以及仅限定一种活性成分的组合物这两种情况。

[0076] 除非另有限定,本文中所使用的所有技术和科学名词相同都具有与本发明所属技术领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。类似地,本文中提及的所有出版物、专利申请、所有的专利和其它参考文献都被并入本文作为参考(在法律允许的情况下)。

[0077] 提供以下实施例来举例说明上述方法,但是不能以任何方式将其看作是限制本发明的范围。

[0078] 附图简述

[0079] 图1(图A-E)示出了所测试的五种化合物(I')到(V)在1% CMC中以3mg/kg的剂量经口服途径对大鼠单次给药后的时间-浓度图。每种化合物的三个线条表示重复实验的三只动物。Y轴表示以ng/ml为单位的浓度(0-3000);X轴表示以分钟为单位的时间(0-480)。

[0080] 图2示出了通过对在24小时内从大鼠收集的汇集的尿进行LC-MS-MS(全范围扫描模式)识别的主要的代谢产物,所述大鼠暴露于3mg/kg剂量的在1% CMC中给予的所测试的五种化合物(I')到(V)的每一种化合物的单次口服剂量。指出的是,已经鉴定了化合物(IV)的主要代谢产物,但是没有通过以碎裂/再排列模式在公众可得到的代谢产物ID数据库中进行对比来阐明其结构。尽管没有确定单独的代谢产物的浓度,但是将它们以在尿中的丰度定性顺序表示,丰度最大的物质在每排的最左侧。

[0081] 图3(图A-F)示出了表达hERG基因产物的细胞在单独的实验中暴露于媒介物或暴露于五种化合物(I')到(V)时的电流对时间图。在每个实验中,使重复实验的细胞暴露于完全阻断hERG-转导的电流的阳性对照化合物。Y轴表示以nA为单位的电流;X轴表示以秒为单位的时间。图G表示暴露于每种化合物或暴露于单独的0.1% DMSO媒介物(Veh)或暴露于阳性对照化合物E-4031(+ve)的重复实验细胞的hERG尾电流(图A-F中时间对电流图下面的面积)。图G中的柱状图的Y轴表示相对于未经处理细胞的hERG尾电流的抑制百分比。

[0082] 图4示出了化合物(I')的典型结合曲线。在这个实验中,每个反应接受10nM的标记的BN83250(与化合物(I')结合于相同受体的内酰胺BSCI)以及各种竞争剂(100 μ M-1pM)。总的特异性结合是被大过量(100 μ M)置换的量。每个棒图表示三次平行测定的平均值,须触线表示SEM。Y轴表示以每分钟计数(cpm)为单位的每个实验中结合的放射性计数。上部的虚线表示在实验条件下的总的结合,而下部的虚线表示非特异性结合;特异性结合由虚线之间的距离表示。

[0083] 图5示出了五种化合物(I')到(V)(图A:(II);图B:(III);图C:(V);图D:(I')和图E:(IV))的每一种针对构成CEREP组的75种不同受体组(参见教科书)的交叉反应性图。化合物以单独的浓度(10 μ M)进行试验,并且报告已知配体对75种受体中每一种的结合抑制(每个柱状图的Y轴),因此-100%表示在试验化合物的存在下对特异性配体的结合增加2倍。所有的反应一式两份进行,并且棒图表示平均值(没有示出重复实验误差的估计值以使图简化)。在这个筛选试验中,仅将对结合的50%或更大的抑制(或

刺激) (代表试验化合物与特异性受体相互作用的 ED50 低于 $10\ \mu\text{M}$) 看作是统计学和生物学显著的。对于本文中试验的五种化合物, 仅有一个相互作用 (化合物 (II) 与 NK2 受体的相互作用, 在图 A 中由箭头标记) 被认为是潜在显著的, 尽管这种相互作用是弱的 (估计的 ED50 为 $5\text{--}10\ \mu\text{M}$)。

[0084] 图 6 (图 A-E) 示出了五种化合物 (I') 到 (V) 中的每一种在 ChemoTx™ 跨孔迁移试验中对趋化因子诱导的白细胞迁移的体外抑制作用的代表性剂量反应曲线。在每个实验中, 在有或者没有不同剂量 (从 10pM 到 $1\ \mu\text{M}$) 的每种化合物的存在下使用最大有效剂量的趋化因子 MCP-1 诱导 THP-1 细胞迁移。在每个实验中使用合适的媒介物对照。每个浓度的每种试验化合物对 MCP-1 诱导的迁移 (计算为在 MCP-1 的存在下迁移的细胞数减去从下部隔室中省掉 MCP-1 时迁移的细胞数) 的抑制百分比显示为三次重复试验测定值的平均值, 须触线表示 SEM。通过得到的图的线性内插估算 ED50。每个图的 Y 轴表示 MCP-1 诱导的迁移的抑制百分比; X 轴表示以 nM 为单位的试验化合物浓度 ($0.01\text{--}1000$)。

[0085] 图 7 示出了在低于致死量内毒素血症的鼠科模型中对 LPS 诱导的 TNF- α 产生的体内抑制作用的代表性剂量反应曲线。在每个实验中, 六只小鼠的试验组接受通过经口途径 (圆) 或皮下途径 (三角形) 给予的不同剂量的五种化合物的预处理 (图 A: (II); 图 B: (III); 图 C: (V); 图 D: (I') 和图 E: (IV))。在 30–60 分钟之后, 通过腹膜内途径用 LPS 攻击动物, 在 3 小时后通过末端取血制备血清。通过 ELISA 测量血液中的 TNF- α 水平, 并且在每个图的 Y 轴上示出对 LPS- 诱导的 TNF- α 产生的抑制程度 (计算为暴露于 LPS 的小鼠中的 TNF- α 浓度减去接受不含内毒素的 PBS 的伪暴露的小鼠中的 TNF- α 浓度), 表示为六只动物的平均值, 须触线表示 SEM。接受 LPS 但是没有进行 BSCI 处理的小鼠的 TNF- α 浓度典型地平均为 $5,000\text{--}6,000\text{pg/ml}$ (与未经攻击的小鼠的 $< 10\text{pg/ml}$ 相比较)。通过得到的图的线性内插估算 ED50。每个图的 X 轴表示以 mg 为单位的对组中的每只小鼠给药的每种化合物的剂量 ($1\text{E-}07$ 到 1)。

[0086] 图 8 示出了在代表性实验中化合物 (I') 对肺炎症的作用, 是通过在哮喘的啮齿动物模型中的 BAL 流体的细胞计数来评价的。棒图表示五只动物的组的平均细胞计数, 以 10^6 细胞为单位示出在 Y 轴上, 须触线表示 SEM; * 相对于 ' 敏化的 ' 动物为 $p < 0.01$, 使用不成对学生 t 检验, 假定等方差, 采用双尾)。水平线表示得自未经攻击的大鼠的肺的 BAL 流体中的白细胞平均数。其余三个组的所有大鼠都接受相同的敏化和攻击方案, 但是仅用媒介物处理 (' 敏化的 ') 或用 0.3mg/kg 体重的化合物 (I') 或用 30mg/kg 体重的 monteleukast (' Singulair™') 处理, 所有处理都是通过经口强饲法每天给予。

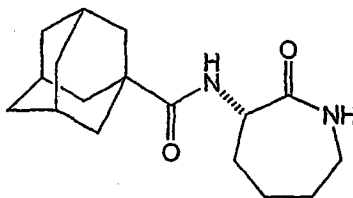
[0087] 图 9 示出了在代表性的实验中化合物 (I') 对 T- 辅助细胞极化的影响, 是通过在哮喘的啮齿动物模型中对由 CD4+ 脾细胞产生的 IFN- γ (Th1 标记物细胞因子) 和 IL-4 (Th2 标记物细胞因子) 的流式细胞计数测定来评价的。棒图表示 10 只动物的组的平均 Th1/Th2 比值, 示出在 Y 轴上, 须触线表示 SEM; * 相对于未经攻击的动物为 $p < 0.05$; † 相对于敏化的和经历攻击的大鼠的 $p < 0.05$, 在两种情况中都使用不成对学生 t 检验, 假定等方差, 采用双尾)。所有大鼠 (除 ' BN 大鼠 ' 组之外, 其没有暴露于卵清蛋白) 都接受相同的敏化和攻击方案, 但是仅用媒介物处理 (' 敏化的 + 媒介物 ') 或用 0.3mg/kg 体重的化合物 (I') 或用 30mg/kg 体重的孟鲁司特 (monteleukast) (' Singulair™') 处理, 所有处理都是通过经口强饲法每天给予。

[0088] 图 10 是多种不同的 BSCI 化合物在大鼠中的血浆半衰期（以分钟为单位）对经口暴露的绘图。在每种情况中，在单次 iv 推注 1mg/kg 剂量的溶解于含 1% CMC、0.9% DMSO 的盐水中的化合物之后的 0、0.25、0.5、1、2、4、6 和 8 小时使用标准的血浆浓度单室模型估算半衰期。在单次经口给予溶解于含 1% CMC、0.9% DMSO 的盐水中的 3mg/kg 化合物剂量之后计算经口暴露（AUC_{0-t}，单位为 min·ng/ml）。化合物 (I) 的 R- 对映异构体是化合物 (I') 的反转，并且定义为“(R)-(I)”，以空心圆标记。

实施例

[0089] 在以下实施例 1-6 中的每个实施例中，将 (S)-3-(2', 2' - 二甲基丙酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮（化合物 I'）与被选择作为各子类的代表的多种其它内酰胺 BSCI 进行比较。例如，选择 3-(金刚烷-1-羰基氨基)-己内酰胺 (II) 来代表多环酰基内酰胺 BSCI 的子类（例如以前在 W02006/016152 中公开的那些）。

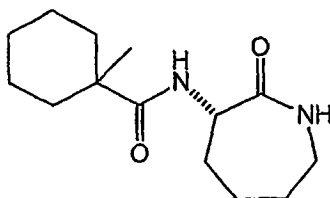
[0090]



(II)

[0091] 类似地，选择 3-(1' - 甲基环己基羰基氨基)-己内酰胺 (III) 代表单环酰基内酰胺 BSCI 的子类（例如以前在 W02006/134384 中公开的那些）。

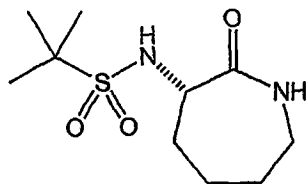
[0092]



(III)

[0093] 选择化合物 3-(1', 1' - 二甲基乙基磺酰基氨基)-己内酰胺 (IV) 代表具有简单的（非环）烷基侧链的 BSCI 子类（例如以前在 W02005/053702 中公开的那些）、以及具有磺酰基氨基连接器的子类（与所选的其余化合物的碳酰胺连接器相对应）。

[0094]

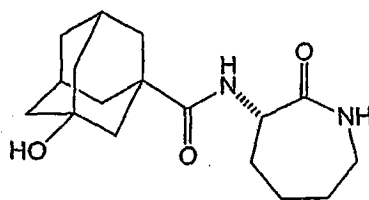


(IV)

[0095] 最后一个选择的化合物是 3-(3' - 羟基金刚烷基-1-羰基氨基)-己内酰胺 (V)，

代表具有被取代的酰基侧链（所述侧链在结构上可以是简单的直链、支链、单环或多环的）的 BSCI。

[0096]



(V)

[0097] 重要的是要指出，所有这些 BSCI 化合物 (II) 到 (V) 以前都已经明确地公开，并且全都具有有效的体外 BSCI 活性（对于 MCP-1 诱导的 THP-1 细胞迁移的抑制作用的 $ED_{50} < 1nM$ ）。全部都具有优异的在血清中的体外稳定性，并且从理论上讲，都是用于开发具有体内抗炎性质的人用药物的优异的候选物。

[0098] 所有上述化合物 (I'、II、III、IV 和 V) 都以内酰胺立构中心为 (S) 构型的形式进行试验。

[0099] 实施例 1. 单次剂量给药后的药物动力学

[0100] 将化合物作为单剂量（通过静脉内途径在 5% DMSO 中以 1mg/kg 体重给药或通过经口途径在 1% 羧甲基纤维素中以 3mg/kg 给药）对三只成年大鼠给药（每种化合物和每个给药途径使用不同的大鼠）。

[0101] 然后在直到剂量给药后 24 小时的不同时间点（包括在即将剂量给药之前）取得血液样本，并使用经过验证的 LC-MS/MS 试验评价各化合物的水平。简而言之，将 3-5 μ l 的脱蛋白质化的样品应用到用含 0.1% 甲酸的 95 : 5 水 : 乙腈平衡的 Waters Atlantis (C18 20x2.1mm, 3 μ m 珠子大小) 反相色谱柱上。在 3.5 分钟内，梯度洗脱结合的物质，梯度变化到含 0.1% 甲酸的 5 : 95 水 : 乙腈，随后分段梯度回到含 0.1% 甲酸的 95 : 5 水 : 乙腈。然后将柱洗脱剂应用到 Applied Biosystems API4000/3200 QTrap MS/MS 质谱仪上，使用以阳离子模式操作的 TurboIonSpray™ 离子源。界面温度设定为 650°C，每个 MRM 切换为 40ms 的停留时间，监测以下离子：

[0102]

分析物	Q1 质量 (amu)	Q3 质量 (amu)
(II)	291.14	135.1
(III)	253.16	97.0
(V)	307.15	151.1
(I')	199.15	57.2
(IV)	249.15	129.3
内标	213.19	57.1

[0103] 每次测定中的内标是相关的化合物 (S)-3-(2', 2' - 二甲基丙酰基氨基)-己内酰胺, 在脱蛋白之前将其掺入到样品中。对于除 (I') 之外的每个化合物, 这个试验的定量下限 (LLOQ) 是 2.4ng/ml, (I') 的定量下限是 38.1ng/ml。

[0104] 在每个收集的样品的 LC-MS/MS 分析之后, 使用公知用于这种应用的软件包 Kinetica 软件, 建模化合物的药物动力学处置。

[0105] 结果

[0106] 通过经口途径用每种化合物处理的每只大鼠的单独浓度对时间的图如图 1 中所示。直接显而易见的是, 在这五种结构不同的内酰胺 BSCI 中, 只有 (IV)、(V) 和 (I') 实现了任何可观察到的经口暴露, 而且其中 (I') 显著好于其它化合物。

[0107] 表 1 中示出了简单的一室药物动力学模型的参数。首先, 这证实 (I') 实现了优异的暴露 - 比第二最好的化合物 (V) 高接近 20 倍。这种优异的暴露 (计算为浓度时间曲线下面积, 单位为 min. ng/ml) 的原因也是明显的: (I') 的清除率比其它内酰胺 BSCI 低超过 10 倍, 所述清除率被定义为每分钟完全清除药物的理论血液体积, 单位为 ml/min/kg。

[0108]

	F(%)	t _{1/2} (分钟)	清除率 (ml/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	暴露 (min. ng/ml)
(I')	69	196	2.6	0.7	939,000
(II)	< 1	16	84	0.8	477
(III)	5	11	55	0.6	2,900
(IV)	45	19	32	0.6	41,400
(V)	59	24 *	31	1.4	57,100

[0109] 表 1. 结构上不同的内酰胺 BSCI 的药物动力学参数。

[0110] 每种化合物的得自简单的一室药物动力学模型的口服生物利用度 (F, %)、主要血浆半衰期 (t_{1/2}, 分钟)、清除率 (ml/min/kg)、分布容积 (V_{ss}, L/kg) 和暴露 (AUC 0-∞, min. ng/ml), 取三只大鼠的平均值。* 24 分钟是 (V) 的主要半衰期, 代表超过 95% 的注射剂量的清除率; 次要 t_{1/2β} 为 110 分钟。在所有情况中, 在 30 分钟内达到 C_{max}, 符合最佳吸收。

[0111] (II) 和 (III) 的清除率接近大鼠的肝脏血流量, 这强烈地提示这两种化合物几乎完全在首次通过肝脏时被代谢。类似地, (IV) 和 (V) 二者的清除率超过大鼠肾血流量大约 3-4 倍, 这再次提示显著的可能也是肝脏介导的代谢性清除。显著不同的是, 2.6ml/min/kg 的 (I') 的清除率低于肾血流量的一半 (典型地引述为 7-9ml/min/kg), 这提示具有最小的代谢性清除。因为 (I') 是极度水溶性的, 分布体积与在总体内水分中的自由平衡 (0.7L/kg) 一致, 有可能低于肾血流量的清除率代表了在远端肾小管中发生的水重吸收 (而不是例如由于螯合到亲脂性隔室中而减少了肾暴露)。

[0112] 与其它化合物相比,与(I')的更低得多的清除率一致的是,(I')具有显著更长的血浆半衰期(超过3小时,与其它四种化合物低于半小时的半衰期相比)。

[0113] 并没有观察到所有BSCI都具有口服生物利用度,即使已知所选的五种化合物对于急性炎症终点而言都具有口服生物活性。这可能反映了(II)和(III)的快速的肝脏介导的代谢,所述(II)和(III)有效地被吸收,但是在首次通过肝脏时转化为保持一些BSCI活性的代谢产物(参见实施例2)。

[0114] 基于这个药物动力学分析,对于本领域技术人员显而易见的是,尽管这五种化合物具有相似的化学稳定性和在分离的血清中的体外稳定性,以及基于理论基础上的它们的相似预测性质,但是(I')显著优于所有其它化合物。特别地,该化合物的清除率更低得多,这可能反映了肝脏介导的代谢的降低倾向,产生比所检查的第二最好的化合物更长10倍的血浆半衰期和更好将近20倍的经口暴露。

[0115] 在单独的实验中,将(I')与第二最好的化合物(V)在不同的物种(非啮齿动物)中进行药物动力学参数方面的比较,所述物种为狗。以简单的交叉设计对单一狗给予每种化合物的单个剂量(静脉内给予在5% DMSO中的1mg/kg,或经口给予在1% CMC中的3mg/kg),在两种给药途径之间有1周的清洗期。

[0116] 结果如表2中所示。

[0117] 静脉内的PK(1mg/kg)

[0118]

化合物	物种	半衰期 (分钟)	清除率 (ml/min/kg)	V _{ss} (L/kg)
(V)	大鼠	24	33	0.8
	狗	66	7.4	0.6
(I')	大鼠	196	2.6	0.7
	狗	236	1.9	0.6

[0119] 经口的PK(3mg/kg)

[0120]

化合物	物种	T _{max} (分钟)	半衰期 (分钟)	生物利用度 (%)	AUC (min. ng/ml)
(V)	大鼠*	15	24	59	57100
	狗	60	67	59	240000
(I')	大鼠	15-120	226	81	939000

	狗	60	217	75	1210638
--	---	----	-----	----	---------

[0121] 表 2. 最好的两种内酰胺 BSCI 在大鼠和狗中的药物动力学参数对比。在狗中的药物动力学与在大鼠中的大体上类似。在两个物种中, 化合物 (I') 都具有显著更低的清除率、更长的血浆半衰期, 并由此具有更大的暴露 (AUC, min. ng/ml)。在每种情况中, 主要半衰期 (更快的 $t_{1/2\alpha}$) 导致超过 95% 的注射剂量的清除。

[0122] 这些观察结果表明, (I') 的优异的药物动力学性质不是物种特异性的, 因此很有可能在人类中也观察到。

[0123] 实施例 2 初级代谢产物的鉴定

[0124] 在代谢笼中在 24 小时时间段内从接受每种化合物的单个经口剂量 (3mg/kg, 在 1% CMC 中) 的大鼠收集尿液。然后使合并的尿液样品经过全扫描质谱分析, 使用与上述实施例 1 中所述的相同的 LC-MS 条件。然后进行产物离子的进一步 MS-MS 分析, 从公众可得到的代谢产物 ID 数据库归属可能的裂解 / 再排列。

[0125] 对于主要的代谢产物, 通过使用本领域中公知的方法合成可靠试样来证实归属的结构, 在与尿液样品相同的条件下对可靠试样进行 LC-MS-MS 分析。

[0126] 指出的是, 代谢产物 ID 研究仅提供本申请不同代谢产物的相对量的定性估计, 需要单独的采用合适内标的经过验证的试验来量化每种代谢产物。

[0127] 结果

[0128] 图 2 中示出了所分析的五种化合物的以检测到的浓度排序的被检测的代谢产物。重要的是要指出, 此处使用的方法当然不是详尽的, 还可能存在着有低于本文中所用方法的检测限的另外的 (特别是次要的) 代谢产物。通常, 可以推断, 通过本文中使用的方法可以检测到 (尽管不一定经过结构确认) 占注射剂量的 10% 或更多的代谢产物。

[0129] 对于化合物 (II) 和 (III) 而言, 代谢的主要途径是细胞色素 P450 介导的羟基化作用, 与以接近肝脏血流量的速率快速清除一致 (参见上述实施例 1)。所述两种化合物的羟基化的主要位置是在环烷基尾部基团上, 第二 (更慢) 羟基化发生在内酰胺头部基团上。指出的是, 内酰胺羟基化产物在 MS-MS 上出现在 -2amu (而不是 +16amu), 是因为 7-羟基加合物在电喷射源中的不稳定性所致。

[0130] 对于化合物 (II) 而言, 二羟基化产物以充分量存在以便在尿液中检测到, 而对于化合物 (III) 而言, 没有检测到二羟基化产物。在两种情况中, 很可能还形成了低于所采用的方法的检测水平的另外的次要产物 (例如, (II) 的 3,5-二羟基和 3,5,7-三羟基金刚烷基衍生物、以及羟基-(II) 和羟基-(III) 二者的葡萄糖醛酸化加合物, 特别地因为检测到了 (V) 的葡萄糖醛酸化加合物)。

[0131] 对于化合物 (V) 而言, 葡萄糖醛酸化化合物是主要的代谢产物, 尽管在大鼠中只在尿液中清除了次要的葡糖醛酸酯级分, 主要部分进入到粪便中 (与在人中显著不同, 其中这种葡萄糖醛酸化的加合物主要在尿液中排泄)。还有可能形成了其它 II 期代谢产物 (例如, 3'-O-硫酸酯), 但是仅是含量 (至少在尿中) 太低而不能被本文中使用的方法检测到。对于化合物 (II) 和 (III) 而言, 还检测到少量的在内酰胺头部基团上被羟基化的产物 (同样主要是 -2amu 产物离子)。

[0132] 对于化合物 (IV) 而言, 不能鉴定主要的代谢产物, 尽管母体化合物的损失 (参见

表 3) 明显与未经确认的代谢产物的形成一致 (低于 10% 的 (IV) 注射剂量以原样回收) 。如果化合物 (IV) 是唯一的包含磺酰胺键的试剂, 似乎合理的是 (但是目前未经证实) 发生了该键的代谢裂解 (或其它修饰) 。同样, 还观察到在内酰胺头部基团处的少量羟基化。

[0133] 与所有其它化合物显著不同的是, 在尿液中没有检测到明显的 (I') 的代谢产物, 这与所注射的剂量的大部分以未改变的形式出现在尿液中 (参见表 3) 以及清除率等于或低于肾血流量 (参见上述实施例 1) 相一致。对于作为人用药物来开发来说, 没有形成代谢产物是 (I') 优于本文中试验的其它化合物的主要的和意想不到的优点, 并且至少部分地解释了产生在上述实施例 1 中描述的优异的药物动力学性质。

[0134] 为了提供所测试的每种化合物经历的代谢程度的定量估计, 使用与在实施例 1 中所述相同的经过验证的 LC-MS 试验来测量尿液中的未改变的母体化合物的量, 使用 (S)-3-(2' , 2' - 二甲基丙酰基氨基) - 己内酰胺作为内标。结果如表 3 中所示。另外, 还测定了各种目标组织中的化合物水平。

[0135] nd = 未检测 ; LLOQ = 2. 4ng/g

[0136]

化合物	心脏	肺	肾脏	肝脏	肌肉	脑	尿 (ng/ml)
(II)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(III)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(V)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	16300
(I')	5. 3	21. 9	5. 1	3. 6	3. 1	1. 6	24567
(IV)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1010

[0137] 表 3. 在大鼠中单剂量给药后 24 小时进入各组织中的化合物分布。在单次经口剂量给药 (3mg/kg, 在 1% CMC 中) 后 24 小时, 只有化合物 (I')、(V) 和 (IV) 可在尿液中检测到。这其中, 化合物 (I') 经历显著较少的代谢 (注射剂量的超过 60% 在尿液中回收) 。此外, 在单剂量给药后 24 小时, 只有化合物 (I') 可以在所检查的任何其它组织中检测到。这可能反映了与本文中试验的其它化合物相比, (I') 既具有优异的分布又具有增加的暴露。

[0138] (I') 与其它化合物相比的低得多的代谢速率意想不到地证明, 对于开发为人用药物的而言, (I') 显著优于以前公开的多种内酰胺 BSCI。这种降低的代谢 (并由此具有改善的 ADME 性质) 可能是在上述实施例 1 中所表现的显著优异的药物动力学性质的原因。此外, 因为意在将 BSCI 开发为针对白细胞被不适当地募集到多种组织中的抗炎药, (I') 在单剂量给药后 24 小时在所检验的所有机体组织中都有发现而所测试的所有其它内酰胺 BSCI 都不是这样的这一意想不到的发现明确地证明了这个新化合物的特定应用。

[0139] 实施例 3. 安全性药理学

[0140] 使五种化合物经历标准的 AMES 试验, 以评价可能的基因毒性。将三种 His- 营养缺陷型 *S. Typhimurium* 菌株 (TA102、TA98 和 TA100) 在有或没有 S9 大鼠肝脏微粒体代谢系统

的存在下用 5 个浓度（最高为 5mg/ml）的每种化合物进行处理。然后通过铺板在痕量 -His 的最低培养基上测定回复突变体菌落数。

[0141] 结果（表 4）表明，五种化合物中没有一种在所测试的任何菌株中显著地增加回复突变体菌落形成（无论是在有或者没有代谢活化的情况下）。

[0142] 在 5mg/ml：

[0143] * = 稀疏的细菌背景菌苔

[0144] ** = 在这个实验中的低对照值

[0145] = 回复突变体菌落显著增加

[0146]

化合物	TA100	TA100+S9	TA102	TA102+S9	TA98	TA98+S9
(II)	0.59 *	0.73	0.50 *	0.93	0.58 *	0.60 *
(III)	0.79	0.81	0.69	0.88	0.68	0.55
(V)	0.78	0.88	0.93	1.09	0.96	0.91
(I')	0.97	0.95	0.82	0.93	2.00 **	1.23
(IV)	0.89	0.90	0.85	0.88	0.82	0.90
+ve 对照	6.89	7.18	5.97	2.65	9.68	19.05

[0147] 表 4. 在 AMES 试验中的回复突变体菌落形成。所测试的化合物中没有一种在所测试的任何浓度引起回复突变体菌落形成的显著增加（仅示出了最高剂量的数据）。指出的是，化合物 (II) 在 5mg/ml 时引起细菌菌苔生长的抑制。

[0148] 在单独的实验中，针对与 hERG 离子通道的相互作用，试验了所有五种化合物。与 hERG 相互作用的化合物有引起 QT 延长和潜在的致命性心脏心律不齐的危险。在 10 μ M 时抑制 hERG 尾电流超过 50% 的化合物通常被认为是在作为人用药物开发时具有高风险。

[0149] 为经过稳定转染以表达 hERG 的 HEK239 细胞灌注包含 10 μ M 化合物 (0.1% DMSO) 的溶液。然后在去极化到 +20mV 保持 5 秒之后通过膜片钳分析记录三种细胞的 hERG 尾电流。然后在 4 点剂量反应曲线中测定在 10 μ M 时表现出显著调节作用的任何化合物的 hERG 相互作用效力。

[0150] 结果（图 3）表明，五种化合物中没有一种在 10 μ M 时显著地与 hERG 通道相互作用。

[0151] 我们推断，从安全性药理学角度看，包括 (I') 在内的所有五种化合物都同样地适合开发为人用药物。具体地，在上述实施例 1 和 2 中举例说明的 (I') 的显著优异的 ADME 和药物动力学性质并没有伴有相应更差的安全性药理学特征。

[0152] 实施例 4. 一般药理学

[0153] 评价了五种化合物的一般药理学，既针对具体的目标受体又针对多种其它受体（许多在结构上与目标受体相关）。通过竞争与 [³H]-BN83250 的结合评价对目标受体的特

异性结合 (BN83250 是 (S)-3-(2', 2' - 二甲基十二烷酰基氨基)-己内酰胺 ;Fox 等人, J Med Chem. 200 ;48 (3) :867-74 ;一种已知与本文中公开的内酰胺 BSCI 结合相同目标受体的物质)。通过与各种特异性放射性配体竞争对本领域中公知的其它受体的结合评价对非目标受体的结合。

[0154] 对于特异性结合,在 4°C 在 10nM [³H]-BN83250 (得自在 100% 乙醇中的 1 μ M 储备溶液 ;30Ci/mmol) 和各种竞争剂 (1% DMSO 最大媒介物浓度) 的存在下将人骨髓单核细胞系再悬浮在结合缓冲液 (20mMHEPES, 150mM NaCl, pH 7.4 ;每个反应 10⁶ 细胞) 中。将反应在冰上保温 2 小时,然后过滤通过在 0.5% 聚乙烯亚胺中预浸泡的 GF/C 过滤器。在慢速真空下用 5x5ml 冰冷的洗涤缓冲液 (20mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7.4) 洗掉未结合的物质。以前已经表明这些条件实现均衡结合,结合特异性最低为 80% (可与 10 μ M 冷的 BN83250 相比较)。

[0155] 然后在 1pM 到 10 μ M 的不同浓度测定化合物 (I')、(II) 和 (V) 对特异性的 [³H]-BN83250 的竞争。在这些实验中没有考查化合物 (III) 和 (IV)。(I') 的典型的竞争结合曲线如图 4 中所示。

[0156] 然后对不同化合物的竞争结合曲线进行非线性模拟,以便比较它们作为结合于目标受体 (定义为 BN83250 的特异性相互作用的位置) 的试剂的性质。所得模型的参数在表 5 中给出。

[0157]

化合物	相对于 MCP-1 的 功能性 ED ₅₀ (pM)	在目标受体的 K _a (pM)	Hill 斜率
(II)	80	8, 200	-0.5
(III)	80	未检测	未检测
(V)	120	10, 000	-0.5
(I')	50	50	-1.0
(IV)	800	未检测	未检测

[0158] 表 5. 竞争性结合曲线的非线性模拟

[0159] 重要的是要指出,与内酰胺 BSCI (II) 和 (V) 显著不同的是,化合物 (I') 表现出理想的和可预测的对目标受体的结合。特别地,结合受体的表观亲和力具有与迁移抑制试验中的功能性 ED₅₀ 数值相似的量级。类似地, Hill 斜率为约 -1.0 (简单的非合作竞争性结合模型的理论预期值),而其它内酰胺 BSCI 表现出显著更小的 Hill 斜率。化合物 (II) 和 (V) 偏离对目标受体的理想结合的原因尚未得知,但是这种差异进一步强调了化合物 (I') 的出乎意外的优越性。

[0160] 使用相似的规程评价对非目标受体的结合,为每种受体使用本领域中公知的特异性放射性配体。每个化合物仅以单一的浓度 (10 μ M) 试验针对每种配体的特异性结合的竞

争。在结合的抑制作用为 20% -80% 时, 估算相互作用的 K_a 。在抑制作用 < 20% 时, 假定化合物与受体没有竞争性相互作用。在抑制作用 > 80% 时, K_a 报告为 < 1 μ M。所筛选的受体的细节以及用于所述试验的放射性配体和细胞型得自 www.cerep.fr。

[0161] 结果 (图 5) 显示, 基于这板 75 种受体, 所测试的所有内酰胺 BSCI 化合物都没有主要的交叉反应性 (没有观察到具有估计的 K_a < 1 μ M 的相互作用)。只观察到一个弱的 (但是统计上显著的) 交叉反应 (化合物 (II) 与 NK2 受体)。在这个基础上, 化合物 (I') 比 (II) 对目标受体或多或少更具特异性, 但是, 基于在这个高通量筛选试验形式中确定的所测试的所有内酰胺 BSCI 化合物都没有靶外结合 (off-target binding), 所测试的所有内酰胺 BSCI 化合物都适合开发为人用药物。

[0162] 实施例 5. 广谱的化学因子体外抑制活性

[0163] 本发明的化合物的生物活性可以使用白细胞迁移的多种体外功能性试验来证明, 包括但不限于 Boyden 隔室和相关的跨孔迁移试验、在琼脂糖下的迁移试验和直接可视化隔室 (例如 Dunn Chamber)。

[0164] 例如, 为了显示对响应于趋化因子 (而非其它化学引诱物) 的白细胞迁移的抑制, 使用得自 Neuroprobe (Gaithersburg, MD, USA) 的 96 孔形式的 ChemoTx™ 微型跨孔试验系统。原则上, 这个试验包括由多孔膜分开的两个隔室。将化学引诱物置于下部隔室中, 将细胞置于上部隔室中。在 37°C 培养一段时间之后, 细胞向化学引诱物移动, 下部隔室中的细胞数与化学引诱物活性 (相对于一系列对照) 成正比。

[0165] 这个试验可以使用多种不同的白细胞。例如, 可以使用新制备的人外周血白细胞。作为选择, 可以使用本领域技术人员公知的方法制备包括多形核细胞或淋巴细胞或单核细胞的白细胞子集, 所述方法例如密度梯度离心或磁珠分离。作为选择, 可以使用已经得到广泛验证的无限增殖细胞系作为人外周血白细胞的模型, 包括但不限于 THP-1 细胞作为单核细胞的模型, 或 Jurkat 细胞作为天然 T 细胞的模型。

[0166] 尽管可接受试验的多种条件来证明对趋化因子诱导的白细胞迁移的抑制作用 (参见, 例如, 由 Frow 等人, Med Res Rev. 2004 ;24(3) :276-98 提供的关于解释体外迁移试验所需要的条件的建议), 但是本文提供了具体的实例。

[0167] 材料

[0168] 跨孔迁移系统由 Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA 生产。使用的板是 ChemoTx™ 板 (Neuroprobe 101-8) 和 30 μ l 透明板 (Neuroprobe MP30)。

[0169] Geys 的平衡盐溶液购自 Sigma (Sigma G-9779)。不含脂肪酸的 BSA 购自 Sigma (Sigma A-8806)。MTT, 即 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物, 购自 Sigma (Sigma M-5655)。不含酚磺酞的 RPMI-1640 购自 Sigma (Sigma R-8755)。

[0170] THP-1 细胞系 (European Cell Culture Collection) 用作白细胞细胞种群。

[0171] 试验规程

[0172] 使用以下操作来试验本发明的化合物特异性地阻断由趋化因子诱导的白细胞迁移的能力:

[0173] 首先, 制备要被置于上部隔室中的细胞悬液。通过离心 (770xg ;4 分钟) 使 THP-1 细胞形成团粒, 并用含 1mg/ml BSA 的 Geys 平衡盐溶液 (GBSS+BSA) 洗涤。然后重复这个洗涤步骤, 并使细胞在此形成团粒, 之后将其再悬浮在少量的 GBSS+BSA 中进行计数, 例如使

用标准血细胞计数器来计数。

[0174] 然后根据得到细胞数调节 GBSS+BSA 的体积,以便使细胞为 4.45×10^6 细胞 /ml GBSS+BSA 的最终密度。这样确保了在被置于板的上部隔室中的每个 $25 \mu\text{l}$ 溶液中包含 100,000 个 THP-1 细胞。

[0175] 为了试验单独的化合物抑制趋化因子诱导的迁移的能力,需要制备两批细胞。将 4.45×10^6 细胞 /ml 的 THP-1 细胞的悬浮液分为两部分。向一个部分中以适当的最终浓度添加在合适的媒介物中的要试验的抑制剂(例如在不超过 1% DMSO 中的 $1 \mu\text{M}$ 抑制剂)。向第二个部分添加等量的 GBSS+BSA 加上视情况而定的媒介物(例如,不超过 1% 的 DMSO)作为对照。

[0176] 然后,制备要被置于下部隔室中的化学引诱物溶液。例如,将 MCP-1 在 GBSS+BSA 中稀释,得到 25ng/ml 的最终浓度。将其分为两个部分,与细胞悬浮液一样。向第一个部分中加入试验化合物,使其最终浓度与添加到细胞悬浮液中的一样,同时向另一个部分中加入等量的 GBSS+BSA 加上视情况而定的媒介物(例如不超过 1% 的 DMSO)。作为选择,可以使用其它趋化因子(SDF-1 α , 7.5ng/ml ; RANTES, 50ng/ml ; IL-8, 10ng/ml , 使用嗜中性粒细胞作为目标细胞种群)。在每种情况中,重要的是要(在单独的实验中)确定引起所选的目标白细胞种群迁移的最大刺激的每种趋化因子的浓度。然后必须将这个最大浓度用于实验来检验本发明化合物的抑制活性。因为趋化因子典型地以铃状的剂量反应曲线诱导白细胞迁移,使用低于或高于最大趋化因子浓度可以导致假的结果(例如,如果不正确地实验选择高于最大浓度的化学引诱物,则趋化因子抑制剂化合物可以产生对白细胞迁移的似是而非的刺激)。在设计体外白细胞迁移实验时的这个重要因素的进一步例证已经由 Frow 和同事提供(Med Res Rev. 2004 ;24(3) :276-98)。另外,还可以使用非趋化因子化学引诱物来证明本发明化合物的生物活性的趋化因子选择性(例如,在使用嗜中性粒细胞作为目标细胞种群时使用 25ng/ml 的 C5a,或在使用 THP-1 细胞作为目标种群时使用 10ng/ml 的 TGF- β 1)。

[0177] 指出的是,在确定下部隔室溶液中的 MCP-1 最终浓度和上部隔室中细胞的最终浓度时,需要考虑到随试验化合物一起加入的液体体积。

[0178] 一旦已经制备了用于下部孔的化学引诱物溶液和用于上部隔室的细胞溶液,应该进行迁移隔室的组装。将 $29 \mu\text{l}$ 的合适的化学引诱物溶液置于隔室的下部孔中。在每个条件,试验应该至少以一式三份测定进行。在已经填充下部隔室之后,根据生产商的说明书将多孔膜用于隔室。最后,向每个上部隔室施加 $25 \mu\text{l}$ 的合适的细胞溶液。将塑料盖子置于整个装置上以防止蒸发。

[0179] 将组装的隔室在 37°C 、5% CO_2 培养 2 小时。将细胞在 GBSS+BSA 中的悬浮液也在相同条件下在试管中培养;这些细胞用于构建用于确定在每种条件下迁移到下部隔室中的细胞数的标准曲线。

[0180] 在培养结束时,将液体细胞悬浮液从上部隔室中平缓地取出,并将 $20 \mu\text{l}$ 的冰冷的含 20mM EDTA 的 PBS 加入到上部隔室中,将装置在 4°C 保温 15 分钟。这个操作使得黏附于膜下侧的任何细胞落入下部隔室中。

[0181] 在这个保温之后,将过滤器小心地用 GBSS+BSA 冲洗,以洗掉 EDTA,然后去除过滤器。

[0182] 然后通过许多方法测定每种条件下迁移到下部隔室中的细胞数,所述方法包括直接计数、用荧光或放射性标记物标记或使用活体染料。一般地,我们采用活体染料 MTT。为每个孔添加 3 μ l 的 MTT 储备溶液,然后将板在 37°C 保温 1-2 小时,期间细胞内的脱氢酶将可溶的 MTT 转化为可以用分光光度法量化的不溶性蓝色甲臞产物。

[0183] 平行地,建立一个 8- 点标准曲线。从加入到各上部隔室中的细胞数 (100,000) 开始,以在 GBSS+BSA 中的 2 倍系列稀释向下传递,向板加入 25 μ l 的细胞,添加 3 μ l 的 MTT 储备溶液。将标准曲线板在迁移板旁边保温。

[0184] 在保温结束时,小心地从下部隔室除去液体,注意不要扰动沉淀的甲臞产物。在短暂的空气干燥之后,向每个下部隔室添加 20 μ l 的 DMSO 以溶解蓝色染料,并使用 96 孔板读板器测定在 595nm 的吸光度。然后将每个孔的吸光度内插到标准曲线中,以估计每个下部隔室中的细胞数。

[0185] 通过从存在有化学引诱物时到达各孔的下部隔室的细胞平均数减去没有添加化学引诱物时到达下部隔室的细胞平均数测定化学引诱物刺激的迁移。

[0186] 通过将在有或没有不同浓度的试验物质的存在时发生的化学引诱物诱导的迁移进行比较来计算试验物质的影响。一般地,迁移的抑制作用表示为由于化合物的存在而被阻断的总的化学引诱物诱导的迁移的百分率。对于大多数化合物来说,通过确定在多个不同的化合物浓度 (在活性较差的化合物的情况中,一般是从 1nM 到 1 μ M 或更高) 下存在的对化学引诱物诱导的迁移的抑制作用来构建剂量-反应图。然后将每种化合物的抑制活性表示为使化学引诱物诱导的迁移降低 50% 所需的化合物浓度 (ED_{50} 浓度)。一般地,已经将 MCP-1 诱导的 THP-1 细胞迁移用作用于比较各种化合物的生物活性的标准化试验系统 (参见,例如,Reckless & Grainger, Biochem J. 1999 Jun 15 ;340(Pt 3) :803-11 ;Reckless 等人, Immunology. 2001 Jun ;103(2) :244-54 ;Fox 等人, J Med Chem. 2002 Jan 17 ;45(2) :360-70 ;Fox 等人, J Med Chem. 2005 Feb 10 ;48(3) :867-74 ;上述的国际申请)。抑制由超过一种趋化因子诱导的白细胞迁移而不抑制由非趋化因子化学引诱物 (例如, TGF- β 或 C5a) 诱导的白细胞迁移的化合物被定义为广谱的趋化因子抑制剂 (BSCIs ;参见,例如, Grainger & Reckless, Biochem Pharmacol. 2003 Apr 1 ;65(7) :1027-34 ;Grainger 等人, Mini Rev Med Chem. 2005 Sep ;5(9) :825-32)。

[0187] 结果

[0188] 图 6 中示出了化合物 (I') 抑制 MCP-1 诱导的 THP-1 细胞迁移的典型的剂量反应曲线,以及具有特别高的 (即, < 1nM) 效力的其它所选的内酰胺 BSCI 的可比较的剂量反应曲线。表 6 中示出了化合物 (I') 针对各种趋化因子和非趋化因子化学引诱物的效力,表示为 ED_{50} 值,并将其与以前描述的其它内酰胺 BSCI 进行比较。

[0189] 从这个数据显而易见,化合物 (I') 可以分类为 BSCI (是由于其强大地和有效地抑制由多种趋化因子诱导的白细胞迁移,但是对非趋化因子化学引诱物 (在这种情况下,为 C5a 过敏毒素) 诱导的白细胞迁移没有影响)。此外,显然,化合物 (I') 作为 BSCI 在体外至少与所选的以前公开的内酰胺 BSCI (例如,在 W02006/016152 中的化合物 (II) 或 W02005/053702 中的化合物 (IV)) 同样有效和强大。本文中所考查的所有内酰胺 BSCI 都比到目前为止公开的任何非内酰胺 BSCI (包括酰亚胺类例如 NR58, 4、育亨宾酰胺 (yohimbamides)、麦角酰胺和肽 3 和相关的结构例如 NR58-3. 14. 3) 显著更有效。实际上,化

合物 (I') 作为 BSCI 在体外比以前公开或描述的任何其它化合物更有效 (至少针对 MCP-1 诱导的迁移是这样)。尽管作为 BSCI 的这种效力定量地优于现有技术的 BSCI (即使程度上很小),但是使化合物 (I) 意想不到地优于现有技术 BSCI 的原因并不主要是这个性质。相反,这证明了已经在没有损失作为体外 BSCI 的能力和效力的情况下实现了化合物 (I) 与各种以前公开的 BSCI 相比出乎意外的并且显著优异的 ADME 和药物动力学性质。

[0190]

化合物	MCP-1	SDF-1 α	RANTES	IL-8 嗜中性 白细胞	C5a 嗜中性 白细胞
(II)	80	100	100	600	> 1,000,000
(III)	80	未检测	未检测	未检测	未检测
(V)	120	200	250	500	> 1,000,000
(I')	50	50	80	600	> 1,000,000
(IV)	800	未检测	未检测	未检测	未检测

[0191] 表 6. 所选的内酰胺 BSCI 对白细胞迁移的体外影响。示出了在每种情况中使响应于所示化学引诱物的最大剂量的白细胞迁移抑制 50% 所需要的化合物剂量 (以 PM 表示) (ED_{50})。除非另有说明,报告的数据使用 THP-1 细胞系。对于 C5a 诱导的迁移,所测试的化合物中没有一种以任何程度抑制嗜中性粒细胞迁移,即使在试验的最高浓度 (1 μ M)。

[0192] 实施例 6. 体内抗炎活性

[0193] 我们使用低于致死量的 LPS 诱导的内毒素血症试验来证明以前公开的 BSCI 的整体上的体内抗炎性质 (参见,例如, Fox 等人, J Med Chem. 2002 ;45 (2) :360-70 ;Fox 等人, J Med Chem. 2005 ;48 (3) :867-74)。在这个试验中,使用细菌内毒素 (LPS) 对小鼠给予非特异性的促炎性攻击,并测量系统性炎性响应的程度 (通过重要的促炎性细胞因子 $TNF-\alpha$ 来测量,细胞因子 $TNF-\alpha$ 在正常情况下在血液中基本上不存在,但是响应于各种炎性刺激物而迅速增加)。我们选择了这个模型,尽管它本身不是特别接近任何人类炎症疾病状况的模型,但是由于已知 $TNF-\alpha$ 在非常多的疾病 (包括类风湿性关节炎、自身免疫障碍、克罗恩氏病、动脉粥样硬化、哮喘和许多其它疾病) 中都是重要的。因此,抑制 $TNF-\alpha$ 产生的药物 (例如, EnbrelTM 和其它抗- $TNF-\alpha$ 抗体产品) 临床上已经用于治疗多种这类疾病。因此,在这个模型中显示 $TNF-\alpha$ 抑制活性高度预测了在多种疾病中具有临床上有用的抗炎作用。

[0194] 将小鼠 (每组 6 只) 用不同剂量的每种化合物预处理,所述预处理为在 LPS 攻击之前 30 分钟通过皮下途径进行处理或者在 LPS 之前 60 分钟通过口服途径 (通过强饲法) 进行处理。然后用腹膜内注射 750 μ g 的细菌 LPS 对小鼠进行攻击并在 3 小时后处死。从心脏穿刺得到的末端取血制备血清,并通过 ELISA (R & D Systems) 测定 $TNF-\alpha$ 浓度。在每个实验中,使用没有接受 LPS 的一组 6 只小鼠作为阴性对照,第二组只接受 LPS (没有候选的抑制剂)。武断地将从未经药物预处理的接受 LPS 的这些动物得到的血清中的 $TNF-\alpha$ 水平设置为 100% (其典型地为 6,000pg/ml 的水平,阴性对照组的水平为 < 10pg/ml)。以

前已经表明,合成的皮质类固醇地塞米松(本身是一种公知在多种炎症性疾病中具有活性的抗炎药物)在这种模型中使 LPS 诱导的 TNF- α 产生被抑制至少 90%,而沙利度胺(另一种公开的 TNF- α 产生抑制剂,在细胞 TNF- α 产生的水平起作用而不是如本文中所述的 BSCI 那样作为白细胞募集抑制剂)使 LPS 诱导的 TNF- α 产生被抑制约 60%。

[0195] 图 7 中示出了不同剂量的化合物(I')以及其它所选的内酰胺 BSCI 的作用。正如所料,无论是将化合物通过皮下途径(圆)还是通过口服途径(三角形)递送,该化合物都有力地抑制 LPS-诱导的 TNF- α 产生。在超过 1 μ g/小鼠的剂量,LPS-诱导的 TNF- α 水平通常被抑制超过 90%,与皮质类固醇地塞米松的作用相当。

[0196] 试验的其它内酰胺 BSCI 也以剂量依赖性方式抑制 LPS-诱导的 TNF- α (图 7),但是(I')的体内效力大于所测试的任何其它化合物(并且,实际上,大于已经在这个试验中进行检验的以前其它地方公开的其它内酰胺 BSCI 的效力)。效力的这种定量(即使小)的增加并不是我们由此要求保护的化合物(I)意想不到地优于现有技术 BSCI 的主要原因。相反,这证明了已经在没有损失作为体内抗炎药的能力和效力的情况下实现了化合物(I)与各种以前公开的 BSCI 相比出乎意外的并且显著优异的 ADME 和药物动力学性质。另外,这些发现明确地证明了(I)作为体内抗炎药在炎症模型中的应用,表明了可用于其中 TNF- α 产生增加是发病机理的因素的各种炎症性疾病。

[0197] 重要的是要指出,在这个模型中观察到的超急性炎症对所检验的抗炎药的 ADME 和药物动力学性质特别不敏感。因为 LPS 刺激在药物之后的仅 30 分钟给予,即使血浆停留时间非常短的药物(例如,化合物(II)和(III))仍以充分的浓度保持存在于血浆中,以引起强大的抗炎作用。因此,尽管这种试验没有强调所要求保护的化合物优于现有技术的优越性,但是其仍证明了化合物的应用。

[0198] 进一步通过在人类疾病哮喘的动物模型中进行研究,证明所要求保护的化合物的应用(响应于 LPS 暴露所观察到的超急性炎症性响应可能不是任何特定人类疾病的代表,但是它通常明显是有用的急性炎症的模型系统)。在这些研究中,根据以下实验设计使啮齿类动物(典型地为大鼠)暴露于卵清蛋白:

[0199] 通过在第 0 天单次腹腔内注射 0.1mg 卵清蛋白使成年 BrownNorway 大鼠(200-300g 体重, $n = 10$ /组)被敏化。然后每只大鼠在第 8 天接受用 1%卵清蛋白(w/v)溶液的气管内攻击,在第 15、18 和 21 天用 2%卵清蛋白(w/v)进行攻击。然后在第 21 天的最后一次攻击之后 3 小时将动物处死。指出的是,借助于通过 EndoTrap™ Red 柱(购自 Cambrex,根据生产商的说明书使用)使卵清蛋白(Sigma,可得到的最纯的等级)不含内毒素,并且使用 LAL 试验(QCL 1000™,Cambrex,根据生产商的说明书进行,内毒素水平被测定为 < 5EU/mg 蛋白。1mg 的标准内毒素包含 ~ 900,000EU/mg)确认内毒素水平。这样保证了肺炎症响应是由对卵清蛋白蛋白质的变态反应所引起的,而不是由非故意的 LPS 刺激引起的(所述 LPS 即使在最高纯度级别的商购卵清蛋白制备物中仍有存在),并由此确保了该模型更接近地代表人类哮喘的基础分子病理学。

[0200] 一组小鼠(作为基线对照)不接受卵清蛋白攻击,但是以另外方式同样处理。第二组(阳性对照)接受攻击但是没有药物处理。对第三组同样处理,但是从第 8 天直到第 21 天以 0.3mg/kg 的剂量通过口服强饲法每天给药给予化合物(I'),在同一天进行任何随后的卵清蛋白攻击之前 1 小时给药。化合物(I')作为在不含内毒素的磷酸盐缓冲盐水中

的无菌溶液给予。使第四组以与化合物(I')相同的处理程序通过口服途径接受 30mg/kg 的孟鲁司特(市售的哮喘药物 Singulair™ 的活性组分)。

[0201] 在处死时,使用 4 批的通过气管套管引入的 3ml 无菌磷酸缓冲盐水,通过进行气管肺泡灌洗(bronchoalveolar lavage, BAL)评价总的肺白细胞募集。对于每只动物,将 BAL 洗涤液合并,并计数总的细胞群体(使用血细胞计数器)。另外,根据本领域中公知的方法使用流式血细胞计数器估计得到的白细胞类型。

[0202] 还从每只小鼠取出脾并将其置于 RPMI+10% FCS+ 抗生素中。然后将脾挤压通过细孔(100 μ m)尼龙筛网到被置于无菌培养皿中的无菌滤网杯中,以产生单细胞悬浮液。然后将得到的细胞悬浮液离心(328g, 5 分钟)并在 RPMI+10% FCS+ 抗生素中洗涤,之后再悬浮在新鲜的培养基中并使用血细胞计数器计数。

[0203] 将得自每只小鼠的总计 4×10^6 总脾细胞(排除 RBC)在 96 孔板的 4 个孔(100 μ l 体积/孔/ 1×10^6 细胞/孔)中,在 2U/ml (10ng/ml) 鼠科 IL-2 的存在下,在 RPMI+10% FCS+ 抗生素中培养过夜(37°C, 5% CO₂)。大约 24 小时之后,将 4 个孔分为 2 个孔的 2 组:一组不经处理,而第二组在 37°C 用 500ng/ml 离子霉素和 50ng/ml PMA 刺激 4 小时。在这个培养的最后 2 小时期间,向每组的一个孔中添加 10 μ g/ml 布雷菲德菌素 A (1mg/ml 的 EtOH 储备溶液)。布雷菲德菌素 A 阻断蛋白质转运到高尔基体,因此允许蛋白质蓄积在 ER 中。

[0204] 将不含布雷菲德菌素 A 的孔在 37°C 培养另外的 48 小时。在培养结束时,将细胞悬浮液离心(328g, 5 分钟)并对上清液进行鼠科 IL-4 (Th2 细胞的标记物)和鼠科干扰素- γ (TNF- γ , Th1 细胞的标记物)的 ELISA 试验(R & D Systems, 根据生产商的说明书进行)。

[0205] 在四小时培养结束时立即对含布雷菲德菌素 A 的孔进行细胞内 IL-4 和 IFN- γ 的染色,所述染色如下进行:将细胞在冰上用抗-CD4-FITC 抗体(eBioscience Rat IgG2b, Cat. Code. 11-0041)染色 30 分钟,然后在 Dulbecco 氏 PBS 中洗涤并用含 2% 低聚甲醛(最终浓度)的 Dulbecco 氏 PBS 固定 20 分钟。在固定之后,用 Dulbecco 氏 PBS/1% BSA/0.5% 皂甙(Sigma S7900)在室温下处理 10 分钟使细胞变为可渗透的。然后将每个孔的细胞分配到三个单独的 FACS 管中并与以下物质在室温下培养 30 分钟:

[0206] • IFN- γ -PE (eBioscience Rat IgG1, Cat. Code. 12-7311-82, 100 μ g), 或

[0207] • IL-4-PE (eBioscience Rat IgG1, Cat. Code. 12-7041-82, 100 μ g), 或

[0208] • 同种型对照 (Rat IgG2b-FITC, eBioscience Cat. Code 11-4031 和 Rat IgG1-PE, eBioscience Cat. Code 12-4301 的混合物)。

[0209] 然后洗涤细胞(用 PBS/BSA/皂甙洗涤两次,然后用不含皂甙的 PBS/BSA 洗涤以允许膜闭合)并再悬浮在 Dulbecco 氏 PBS 中以便用于进行流式细胞计数法分析。

[0210] 在 PE 通道上对在 FITC 通道上进行 CD4 特异性染色(确定它们为 T-辅助细胞)的细胞分析 IL-4 或者 IFN- γ 特异性染色存在。然后报告 IFN- γ 染色阳性的 CD4⁺ 细胞与 IL-4 染色阳性的 CD4⁺ 细胞之间的比例,将作为 Th1/Th2 比。未经处理的 Brown Norway 大鼠在脾中具有大约 2.7 的 Th1/Th2 比(也就是说,与脾中的合成 IL-4 的 CD4⁺ 细胞相比,在脾中有大约 2.7 倍更多的 CD4⁺ 细胞合成 INF- γ)。在用卵清蛋白敏化并重复攻击之后,该比例下降到低于 1.5,这证明了在啮齿类和人类中伴随哮喘的变化发生了显著的 Th2 极化(降低的 Th1/Th2 比表示相对的 Th2 极化,而提高的 Th1/Th2 比表示相对的 Th1 极化)。

[0211] 化合物(I')和阳性对照对比化合物孟鲁司特二者的每天剂量给药都显著地降低BAL洗涤液中的白细胞数(使用化合物(I')时有70%的减少, $p < 0.01$ 不成对学生t检验, 图8)。

[0212] 这明确地证明了本发明的化合物在人类哮喘模型中具有有用的抗炎作用, 其源自于其阻断响应于趋化因子的白细胞迁移的能力。这种作用的量级至少与设计用于治疗人哮喘的市售药物(例如, Singular™)相当, 但是通过与孟鲁司特相比得以显著地增加的效力(需要30mg/kg的孟鲁司特剂量来产生可与仅0.3mg/kg剂量的化合物(I')相比较的类似的BAL白细胞计数减少)说明了化合物(I')的优异的药物动力学和生物分布参数。

[0213] 化合物(I')的每天剂量给药显著地逆转了Th2极化(图9), 而用阳性对照对比化合物孟鲁司特则不能, Th2极化被认为在本文中使用的卵清蛋白诱导的肺炎模型以及人类哮喘中都是哮喘发病机理的主要驱动因素。用即使例如0.3mg/kg的低剂量的化合物(I')通过口服途径进行治疗完全消除了由于慢性暴露于例如卵清蛋白的过敏原的Th2极化, 使得用化合物(I')处理的动物中的Th1/Th2平衡与未经攻击的Brown Norway大鼠基本上难以区分。

[0214] 有趣的是要指出, 例如动脉粥样硬化的其它慢性炎症性疾病涉及Th1(与Th2相反)极化。在所述两种疾病中, 已经描述了T-辅助细胞细胞因子特征的失调作为该疾病的慢性炎症因素的主要的致病原因。在涉及Th1极化的疾病(例如动脉粥样硬化)的模型中, 以前观察到在用BSCI(例如本文中要求保护的化合物(I'))治疗时显著的朝向Th2的转换。编码apoE的基因被同型删除的小鼠(apoE^{-/-}小鼠)发展出几种血管脂质病变, 即使在正常的咀嚼饮食的情况下, 并且Th1/Th2比为约8(与背景C57B16野生型品系中的3.2相比)。然而, 在用BSCI处理3个月的时间(从12周龄到24周龄, 期间发生大部分脂质病变形成)之后, 使Th1/Th2比例正常化(在这个模型中在非常高的剂量时甚至引起Th2极化)。与哮喘的卵清蛋白-诱导的肺炎模型中的数据合起来, 我们证明了BSCI能够使T-辅助细胞细胞因子生产特征正常化或重新平衡, 无论潜在的致病缺陷是Th2极化(如哮喘中情况中)还是Th1极化(如动脉粥样硬化中的情况)。我们认为BSCI是目前描述为对T-辅助细胞种群具有这种“重新平衡”作用的仅有的试剂。这些机械论的理解权利要求支持(与在具有炎症因素的不同疾病的许多动物模型中的效果数据)我们主张BSCI, 并且特别是本文中要求保护的化合物(I)(由于其意想不到地优异的药物动力学和生物分布性质), 可用作药物来治疗非常广泛的具有炎症因素的病况范围。

[0215] 实施例7. 化合物(I')与在结构上相关的类似物的比较

[0216] 在确定化合物(I)特别是在药物动力学方面具有与其它酰基氨基内酰胺BSCI相比令人惊讶地优异的药学性质之后, 下面我们将其与以前公开的结构上最相似的类似物进行对比。

[0217] 已经在实施例1到6中比较的化合物的原始组在以前公开的酰基氨基内酰胺BSCI的边界内汇集为尽可能在结构上不同。化合物(I)确保了在组中包括6元内酰胺'头基团', 尽管没有特定的原因来假定它们通常由于(或者实际上不如)具有7元内酰胺环的化合物(关于不同环大小的酰基氨基内酰胺类似物在BSCI的体外效力方面的广泛的比较参见W02006/134385)类似地, 所述组包括与其余分子中的酰胺连接器不同的磺酰胺键的一个实例(IV)。

[0218] 在尾基团方面,该组包括两个简单的烷基(都是戊酰基)和单个环状的烷基(一个甲基环己基基团、两个金刚烷基,其中一个金刚烷是被取代的)。所有的五种化合物都具有在关键碳(相对于酰胺羰基的羰基为2位,结合于这个关键碳的4个碳原子处于四面体排列)位置处具有四面体型键角的确定的2',2'-二取代。与其直链烷基'尾基团'相比或连接于这个关键碳的四个碳原子没有以基本上四面体排列的其它结构相比,在关键碳原子处的这种2',2'-二取代特征已经被公开(WO2006/016152)为赋予BSCI另外的效力。

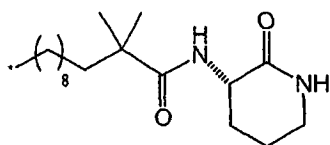
[0219] 结果,要求原始组中的'尾基团'具有这种2',2'-二取代特征,以确保适当的体外效力,而且该要求可能在得到的分子中实现可接受的物理特性。例如,预期金刚烷、环己基和短链2',2'-支链烷基基团会产生晶状(或半晶状的)固体形式并具有可接受的水溶性的化合物。相比之下,其它可能的尾基团,例如2',2'-二甲基十二烷酰基(其以另外方式地符合在关键的2-位的碳原子的期望排列)基于它们作为固体的蜡状无定形物理形式以及在生理学缓冲液中极度的不溶性而被排除在该组之外。这两个因素都降低了化合物用于药物开发的合意性,即使之前已经确定了ADME和毒理学性质,这是因为它们都使化合物难以操纵,例如在制剂或压片期间,并且这增加了不利的ADME性质的可能性,例如在长期剂量给药期间蓄积在脂肪储备中,或没有口服生物利用度。

[0220] 因此,在实施例1到6中考查的五种化合物具有大体上同等的适合于药物开发的机会。在确定它们的ADME性质之前,不可能预测那一种会是优异的。

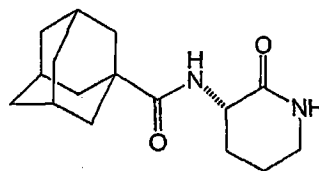
[0221] 然而,一旦完成了实施例1到6中所述的试验,显而易见,化合物(I)显著地且意想不到地优于其它化合物。因为化合物(I)是该组中唯一的具有6元环的化合物,有可能所述优异的性质是由于内酰胺环的大小。为了确定是否真是这样,我们回顾了以前公开的具有BSCI活性的酰基氨基内酰胺化合物的所有实例,并且选择了与(I)具有最大结构相似性的两种化合物。在所有以前已知的具有BSCI活性的化合物中,这是具有与化合物(I)最类似的结构两种化合物。

[0222] 所选择的化合物是3-(2',2'-二甲基十二烷酰基氨基)-四氢吡啶-2-酮(得自WO2006/134385的实施例3;此处命名为VI)和3-(金刚烷-1-羰基氨基)-四氢吡啶-2-酮(WO2006/134385的实施例1,此处命名为VII):

[0223]



(VI)



(VII)

[0224] 这些化合物与(I)的共同之处在于6元的内酰胺环、酰胺连接器、以及基本上四面体排列的2',2'-二取代的存在(有4个碳原子与相对于酰胺羰基基团为2位的关键碳结合)。

[0225] 使用与先前在实施例1中适用于化合物(I)到(V)的完全相同的规程,使化合物(VI)和(VII)经历在大鼠中进行的药物动力学分析。指出的是,在这些实验中使用(VI)和

(VII) 二者的 (S) 对映异构体, 因为预期应该这是活性更大的对映异构体, 与到目前为止所述的所有其它酰基氨基内酰胺 BSCI 一样。

[0226] 结果

[0227] 不幸的是, (VI) 是蜡状的固体, 具有保持溶剂的倾向。难以制备无溶剂的 (VI) 的制备物, 但是在数周中进行相当多的干燥之后最终得以实现。然而, 这个样品完全不溶解于用作前述化合物的静脉内剂量给药的媒介物的含 5% DMSO 的盐水。结果, 需要使用完全不同的媒介物来制备适于静脉内剂量给药的溶液。

[0228] 将化合物 (VI) 溶解于 50% PEG400/20% solutol/30% 盐水中, 用于剂量给药。包括 (VI) 在内的所有化合物悬浮 (或溶解) 在含 1% 羧甲基纤维素的盐水中用于口服剂量给药。尽管通常不推荐在使用不同媒介物的实验之间进行口服生物利用度的比较 (因为媒介物可能对化合物的内脏吸收有重要影响), 但是媒介物的选择显著地影响在 (VI) 的静脉注射后所观察到的半衰期是非常不太可能的, 将其与其它化合物 (例如 (I')) 相比较。

[0229] 简单的一室药物动力学模型的参数示出在表 7 中。示出了得自上述表 1 的化合物 (I') 的数据用于对比。显然, (VI) 和 (VII) 都显著地不如 (I'), 清除速率更高 10 倍以上, 经口暴露比 (I') 所实现的低 25-50 倍。

[0230]

	F(%)	$t_{1/2}$ (分钟)	清除率 (ml/min/kg)	Vss (L/kg)	暴露 (min. ng/ml)
(VI)	16	46	40.3	1.95	11,000
(VII)	35	20	31.1	0.7	32,500
(I')	69	196	2.6	0.7	939,000

[0231] 表 7. 所选择的 6 元环酰基氨基内酰胺 BSCI 的药物动力学参数。每种化合物的得自简单的一室药物动力学模型的口服生物利用度 (F, %)、在静脉内剂量给药后的主要血浆半衰期 ($t_{1/2}$, 分钟)、清除率 (ml/min/kg)、分布容积 (Vss, L/kg) 和经口暴露 (AUC 0-t, min. ng/ml), 取三只大鼠的平均值。对于 (VII) 而言, 在 15 分钟内达到 C_{max}, 与 (I') 的最佳吸收一致。然而, 疏水性的 (VI) 更慢地被吸收, T_{max} 为 60-120 分钟。

[0232] 实际上, 从表 7 与表 1 的比较显而易见, 化合物 (VI) 和 (VII) 在暴露方面甚至不如 (IV) 和 (V) 好。尽管与 (I) 共有 6- 内酰胺环, 但是化合物 (VI) 和 (VII) 具有显著更差的 ADME 性质, 并且与以前公开的多种其它酰基氨基内酰胺 BSCI 化合物相差不多。

[0233] 与 (VI) 和 (VII) 具有与 (I') 相比高得多的清除率一致的是, 这些化合物具有比 (I') 显著更短的血浆半衰期 (低于 1 小时, 与超过 3 小时相比)。

[0234] 基于这个药物动力学分析, 本领域技术人员显而易见的是, 尽管具有类似的化学稳定性、在理论根据上具有类似的预测性质以及结构相似性, 但是 (I') 显著优于 (VI) 和 (VII) 二者, 经口暴露比这些 6 元环内酰胺类似物的任一种更好 25-50 倍。我们推断, (I') 的意想不到地优异的 ADME 性质不能归因于 6 元环内酰胺 (因为例如 (VI) 和 (VII) 的其它

6 元环内酰胺没有共享其卓越的 ADME 特征),也不能归因于酰胺连接基(因为包括(II)、(III)和(V)在内的其它酰胺连接基化合物没有共享其卓越的 ADME 特征),也不能归因于特戊酰基(pivoyl)尾基团(因为化合物(IV)共享这个基团并不具有(I')的卓越的 ADME 特征)。相反,(I')的令人惊讶的和显著优异的 ADME 特征取决于结构特点的特定组合,其不能够被预测。

[0235] 实施例 8. 合理设计具有与(I')等价的 ADME 性质的酰基氨基内酰胺 BSCI 的尝试

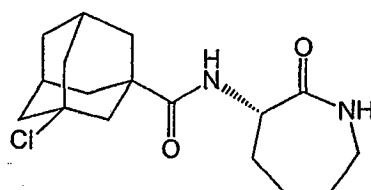
[0236] 在鉴定化合物(I')的优异的 ADME 性质的过程中,我们分析了作为 BSCI 具有低于纳摩尔效力的各种不同的酰基氨基内酰胺的药物动力学。结果,我们期待获得对在这种结构空间内调节分子的 ADME 性质的因素有一些了解。因此,我们尝试利用这种经验来从以前公开的结构分类中选择在 ADME 性质方面尽可能与(I')类似的第二种酰基氨基内酰胺 BSCI 化合物。

[0237] (IV)与(I')相比的相对快速的清除(参见上述表 1)提示,酰胺连接基可能与优异的 ADME 性质有关。因此,我们限定选择具有酰胺连接基的化合物。

[0238] 化合物(II)具有非常好的吸收,但是在体内快速地转化为(V),大概是通过肝脏细胞色素 P450 同工酶的作用。化合物(V)本身显然不会进一步氧化(可能由于金刚烷环上的吸电子取代基)但是仍相对快速地被清除。尿中不存在可检测的初级代谢产物强烈地提示,所述快速清除是由 II 期缀合物的形成所介导的,所述缀合物例如葡萄糖醛酸苷,在大鼠中在粪便中排泄。II 期缀合物容易在羟基形成,例如在(V)的情况中的 3-羟基金刚烷。结果,我们提出具有例如卤代取代基的不能形成 II 期缀合物的稳定的吸电子取代基(用于防止金刚烷环被细胞色素 P450 或其它肝脏羟基化酶或氧化酶所羟基化)的(II)的衍生物可能具有我们这在寻找的最佳的 ADME 性质。

[0239] 结果,合成并试验了以下化合物(VIII)。我们选择氯取代的类似物(而没有选择例如氟取代的类似物)是因为这是已知的化合物(参见 W02006/016152 的实施例 8),其合成路线容易得到。此外,引入脂肪族 C-F 键在合成上有挑战,并且可能使活性药物成分的商品成本增加一个数量级或更多。

[0240]



(VIII)

[0241] 如前所述(参见实施例 7),我们决定制备和评价这个化合物的(S)-对映异构体,因为一般说来,已知酰基氨基内酰胺化合物的(S)-对映异构体具有更大的体外 BSCI 活性。

[0242] 涉及这个分子的明显的考虑是 C-Cl 键的稳定性。因此,我们考查了(VIII)在生理盐水和在大鼠肝微粒体制备物中的体外稳定性。令人鼓舞的是,即使在 37°C 下 24 小时后,(VIII)的不到 2%经历水解(通过 LC/MS 测定,水解产物(V)和母体化合物(VIII)的双重离子检测)。类似地,将(VIII)以 1 μM 与大鼠微粒体制备物一起在 37°C 培养 1 小时

产生与“不含 NADPH”的空白试验相比低于 10% 的降解。结果,我们推断化合物 (VIII) 具有类似的体外稳定性和 (I') 固有的清除率。

[0243] 因此,基于理论基础,使用从 (I') 的发现所得到的经验以及本领域中预测 ADME 性质的一般技术,以及使用常规的体外筛选试验(例如体外稳定性和在肝脏微粒体制备物中的固有的清除率),预期化合物 (VIII) 具有与 (I') 相当的 ADME 性质。

[0244] 因此,我们对 (VIII) 进行在大鼠中的药物动力学分析,使用与前述在实施例 1 和 7 中用于化合物 (I') 到 (VII) 的完全相同的规程。

[0245] 结果

[0246] 简单的一室药物动力学模型的参数示出在表 8 中。示出了得自上述表 1 的化合物 (I') 的数据用于对比。显然,化合物 (VIII) 显著地不如 (I'),清除速率更高 20 倍以上,并且无论如何没有可检测的口服生物利用度。

[0247]

	F(%)	t _{1/2} (分钟)	清除率 (ml/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	暴露 (min. ng/ml)
(VIII)	< 1%	15	62.8	0.7	< 100
(I')	69	196	2.6	0.7	939,000

[0248] 表 8. 所选择的内酰胺 BSCI 的药物动力学参数。每种化合物的得自简单的一室药物动力学模型的口服生物利用度 (F, %)、在静脉内剂量给药后的主要血浆半衰期 (t_{1/2}, 分钟)、清除率 (ml/min/kg)、分布容积 (V_{ss}, L/kg) 和口服暴露 (AUC 0-t, min. ng/ml),取三只大鼠的平均值。对于 (VIII) 而言,在口服剂量给药后的所有时间点,被分析物的水平都是低于定量极限 (~ 2ng/ml)。

[0249] 总之,我们根据理论研究和体外筛选试验选择具有最佳 ADME 性质的化合物 (VIII) 仍是最不适合作为药物开发的酰基氨基内酰胺化合物之一,至少在已经确定 PK 的那些之中情况是这样。该化合物呈现快速的清除,产生短的血浆半衰期,并且另外表现出无论如何都没有口服生物利用度。

[0250] 化合物 (I') 的优越性的程度在图 10 中说明。这里,我们将已经在 大鼠中分析了药物动力学的每个 BSCI 化合物基于两个 PK 参数(血浆半衰期和经口暴露)绘图。化合物 (I') 远离群体,代表了化合物在这种结构空间中通常差的 ADME 性质(不是药物候选物的许多完全无关的类别的非典型),表明化合物 (I') 是意想不到地并且异常地优异的。

[0251] 实施例 9. (I) 的 (S)- 和 (R)- 对映异构体的对比

[0252] 化合物 (I') 已经表现出具有出乎意外的并且显著优异的 ADME 性质(参见实施例 1)。这个化合物具有不对称碳原子(在与酰胺连接基的环接合点)并因此以两种立体异构体存在:命名为 (I') 的 (S)- 对映异构体和命名为 (R)-(I) 的相对的 (R)- 对映异构体。

[0253] 与到目前为止所述所有其它酰基氨基内酰胺 BSCI 一样, (I) 的 (S)- 对映异构体作为 BSCI 在体外比相应的 (R)- 对映异构体更有效。这就是为什么在大多数实验中研究

(I') 而不是分离的 (R)-对映异构体或对映异构体的混合物。然而, ADME 性质不太可能与主要的药理学活性有关。实际上, 对于许多化合物而言, 对映异构体对的 ADME 性质是非常类似的, 因为 (在许多情况中) 化合物的物理特性在决定体内处置时是特别地主要的, 而对映异构体对的物理特性是相同的。

[0254] 结果, 我们试验了 (R)-对映异构体是否共享 (I') 的特别优异的 ADME 性质。因为任何特定的化合物的应用取决于主要药理学作用的效力以及分子的体内处置 (因为, 要发挥效力, 药物分子必须以充分的浓度存在于指定的目标位置以产生其药理学作用), 所以效力较低但是 ADME 性质优异的化合物可能比效力更大但是 ADME 性质较差的对比化合物更有效 (或在体内更有效力)。

[0255] 因此, 合成了 (I) 的分离的 (R)-对映异构体 (完全如本文中对于分离的 (S)-对映异构体所述, 但是用市售的具有高立体化学纯度的 (R)-鸟氨酸代替 (S)-鸟氨酸原料), 并使用与上述相同的方法测定这个药剂在大鼠中的 PK 性质 (参见实施例 1、7 和 8)。

[0256] 结果

[0257] 简单的一室药物动力学模型的参数示出在表 9 中。示出了得自上述表 1 的化合物 (I') 的数据以用于对比。显然, (R)-(I) 在相当程度上共享了 (I') 的意想不到地优异的 ADME 性质。与 (I') 的情况一致, (R)-(I) 也是基本上定量地口服生物可利用的, 并且在以 3mg/kg 单口服剂量之后实现与到目前为止所测试的第二最好的化合物 (参见实施例 1 中的化合物 (V), 表 1) 相比超过 5 倍以上的暴露。

[0258]

	F(%)	t _{1/2} (分钟)	清除率 (ml/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	暴露 (min. ng/ml)
(R)-(I)	84	81	8.6	0.9	295,000
(I')	69	196	2.6	0.7	939,000

[0259] 表 9. 分离的 (I) 的 (R)-和 (S)-对映异构体的药物动力学参数。每种化合物的得自简单的一室药物动力学模型的口服生物利用度 (F, %)、在静脉内剂量给药后的主要血浆半衰期 (t_{1/2}, 分钟)、清除率 (ml/min/kg)、分布容积 (V_{ss}, L/kg) 和口服暴露 (AUC 0-t, min. ng/ml), 取三只大鼠的平均值。在两种情况中, 典型地在 30 分钟时观察到峰血浆浓度, 符合良好吸收。

[0260] 尽管 (R)-(I) 在显著的程度上明显地共享 (I') 的异常有利的 ADME 性质, 但是仍有一些统计上显著的差异。最显著的是血浆清除率增加 ((R)-(I) 比 (I') 高 ~ 3 倍) 导致静脉内剂量给药后血浆半衰期短 2 倍, 以及单次口服剂量给药后的暴露低 3 倍。

[0261] (R)-(I) 的清除率接近大鼠的肾小球过滤速率 (典型地引述为 9ml/min/kg), 而 (I') 的清除率显著更低。这些发现的一个可能的解释是, (I') 被主动再吸收, 可能是发生在肾单位的远端小管中, 并且这个重吸收过程是有选择性的, (S)-对映异构体优先于 (R)-对映异构体。看起来似乎是合理的, 如果 (I') 的出乎意外的和高度优异的 ADME 性质部分地是由于借助能够将 (S)-对映异构体与 (R)-对映异构体加以区别的转运蛋白而在

肾单位中发生的再摄取,则这强调了 ADME 性质的不可预知性,并且进一步举例说明本文中所述的发明的非显而易见性。

[0262] 尽管如此,根据本发明,(R)-(I) 明显也是优异的化合物,如图 10 中的空心圆所举例说明的,图 10 说明了它在 ADME 性质方面比酰基氨基内酰胺的一般分类更接近(I')。因此,总而言之,(R)-(I) 和(I') 二者,并由此更总体地化合物(I) 表现出与已经公开的其它酰基氨基内酰胺 BSCI 相比意想不到地且显著地优异的 ADME 性质。此外,化合物(I') 略微但是总体上显著地优于化合物(I),并且因此是优选的。

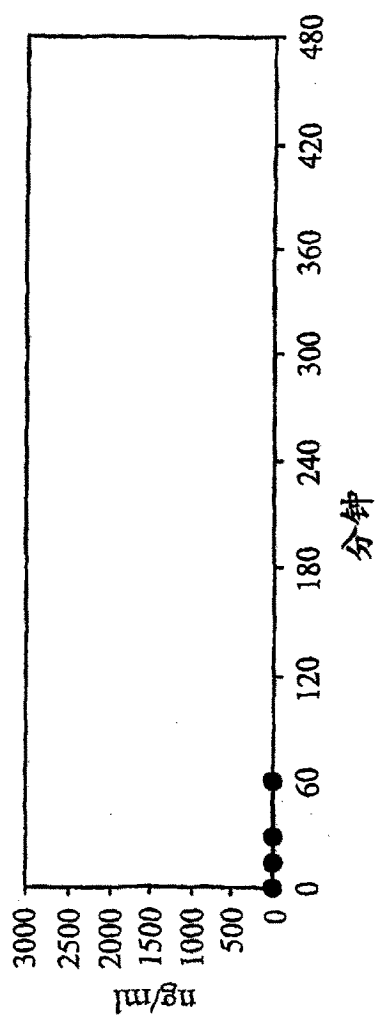
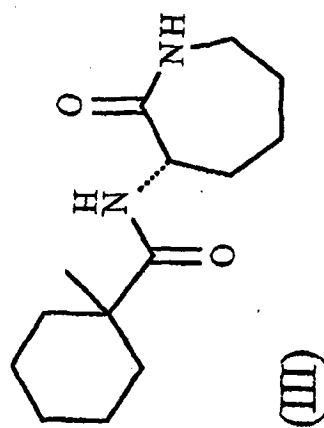
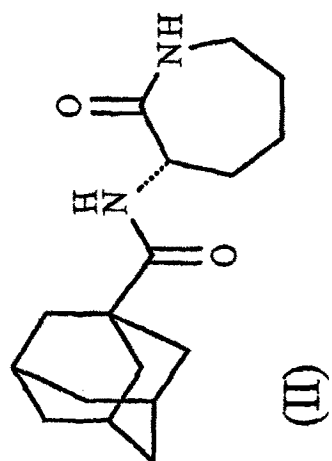


图 1A

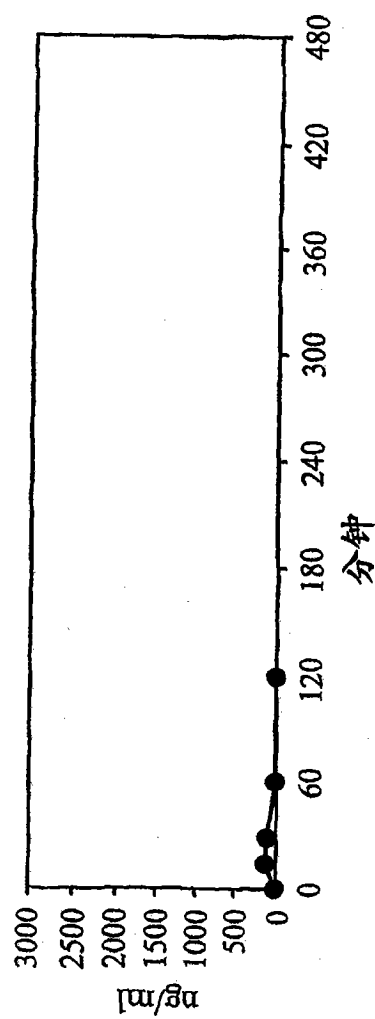


图 1B

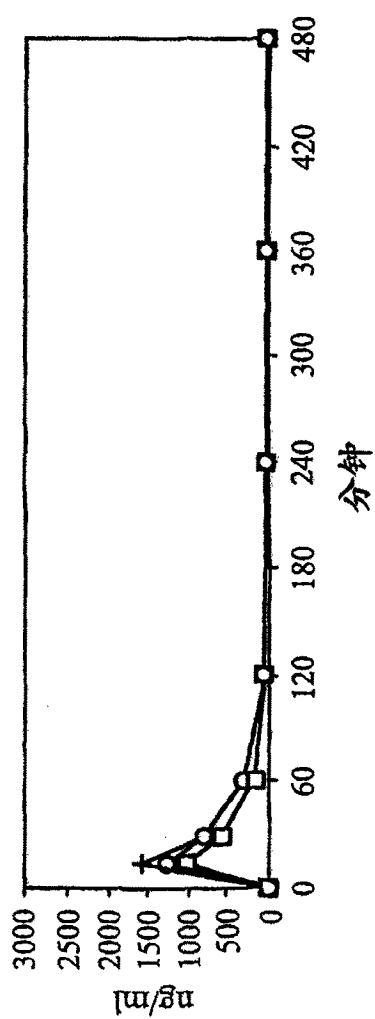
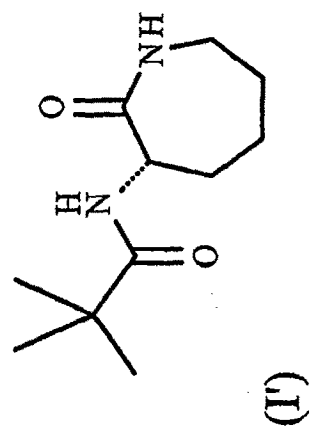
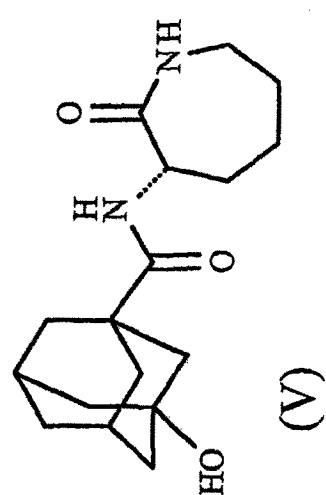


图 1C

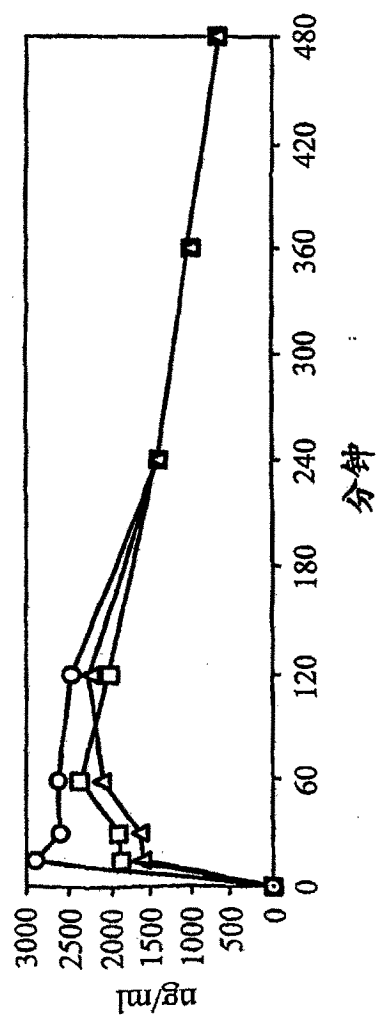


图 1D

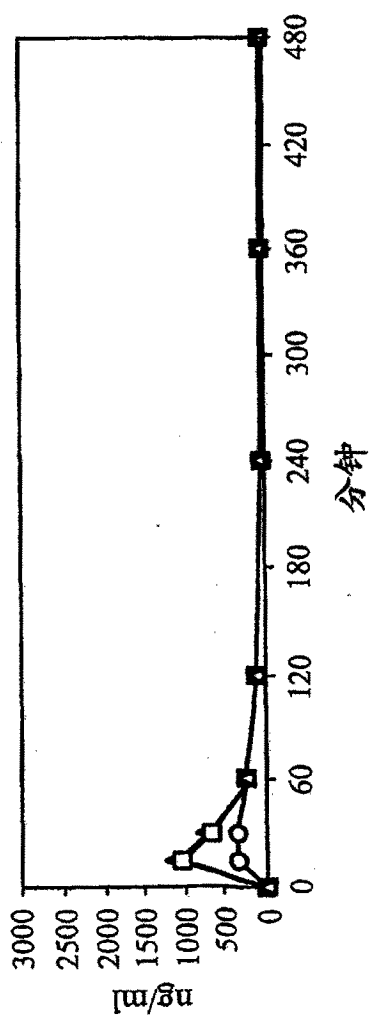
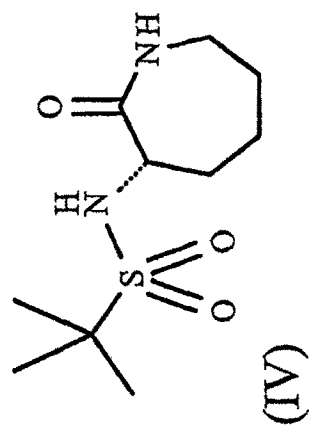


图 1E

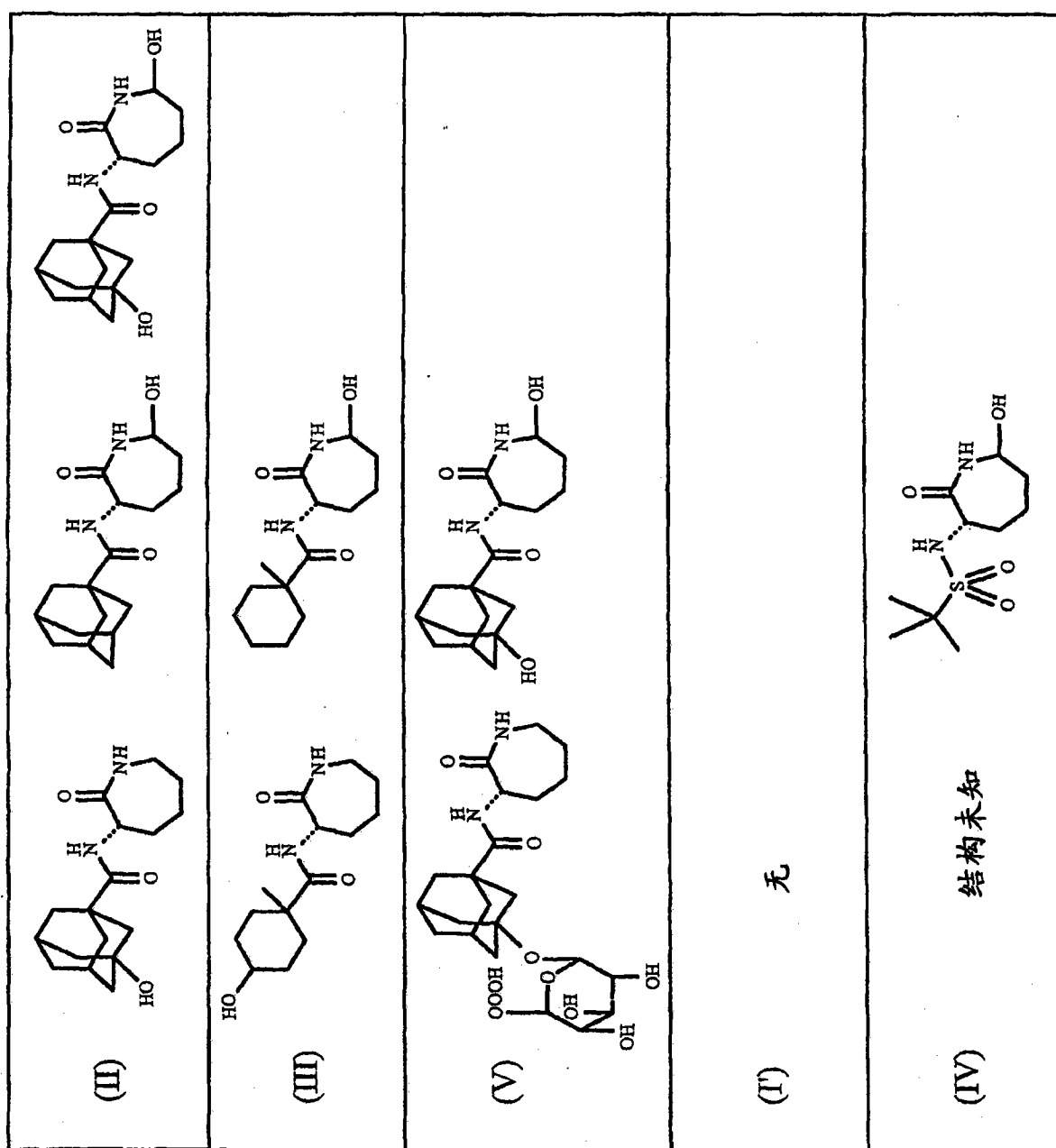


图 2

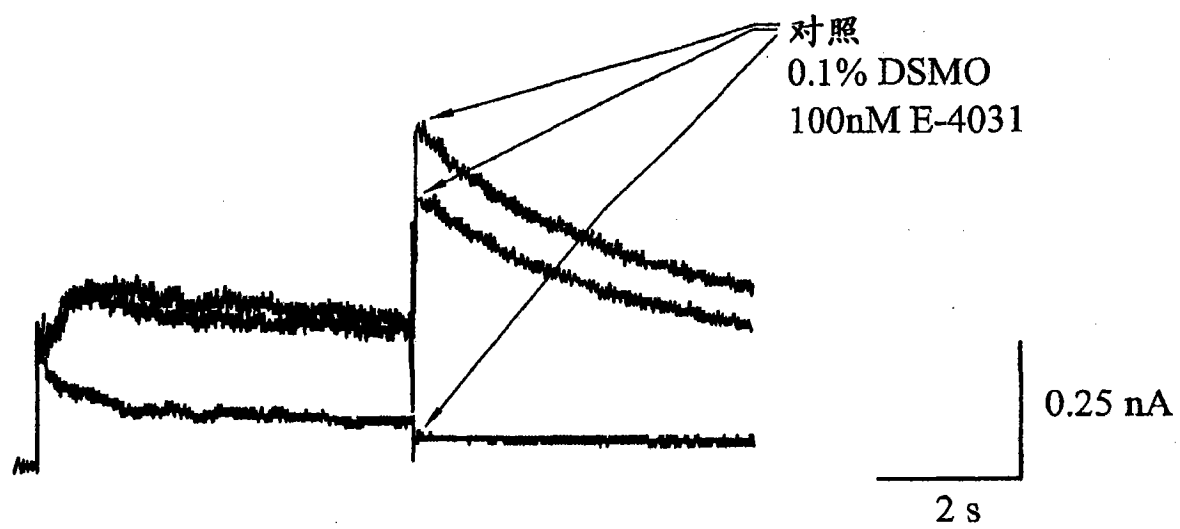


图 3A

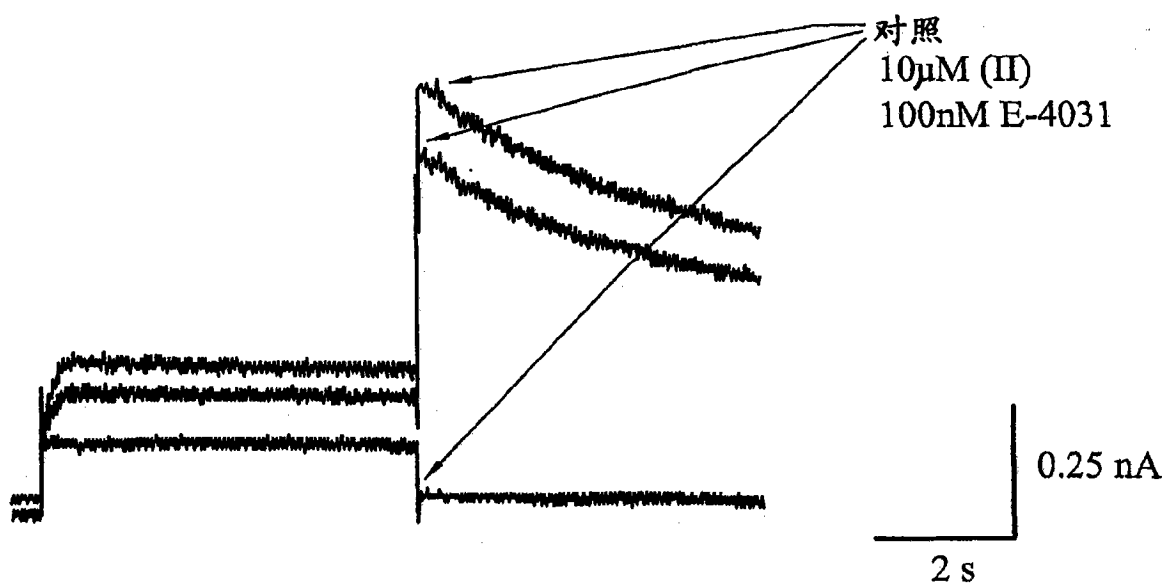


图 3B

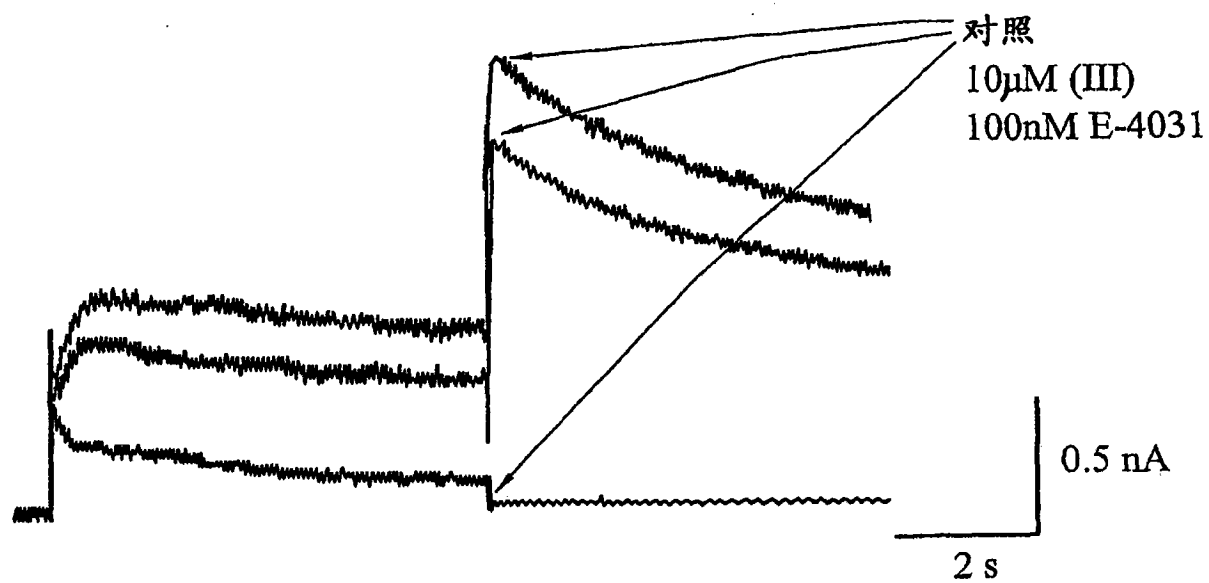


图 3C

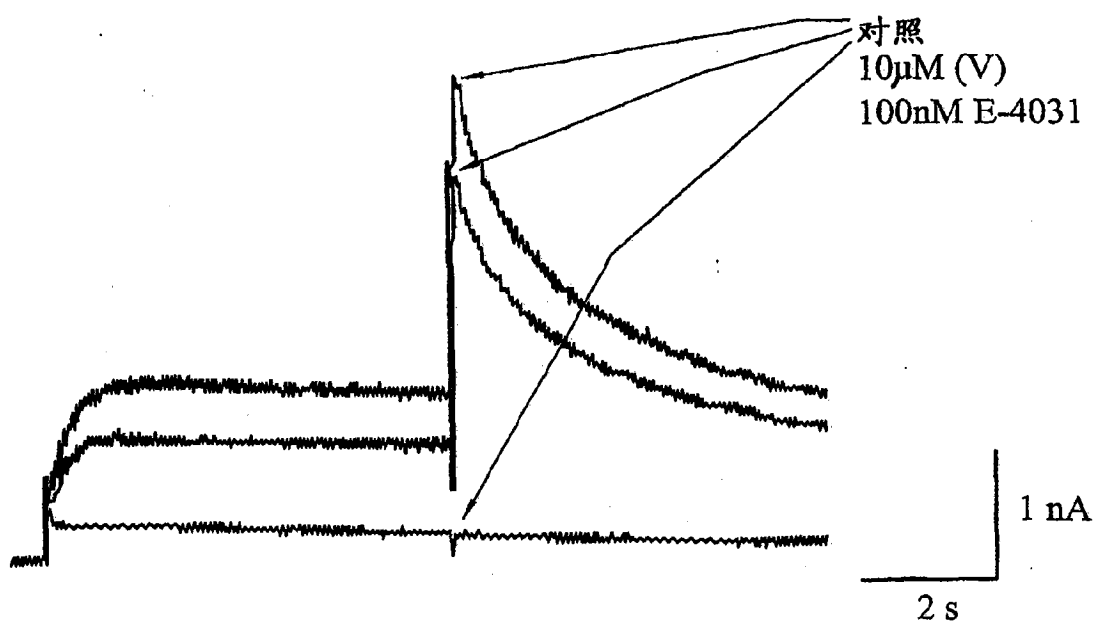


图 3D

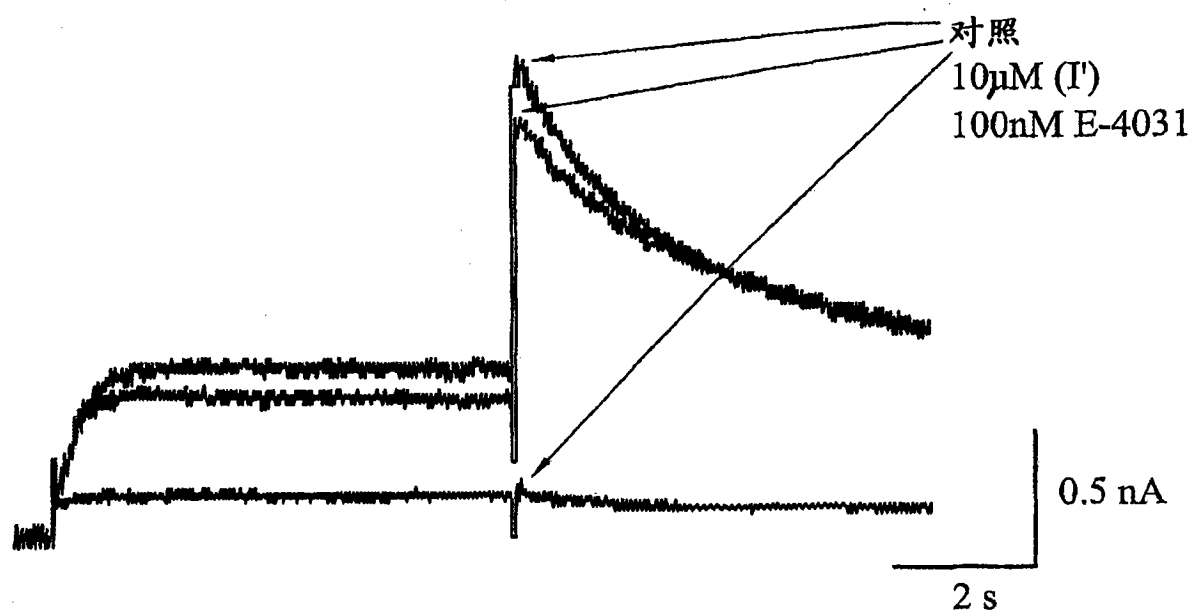


图 3E

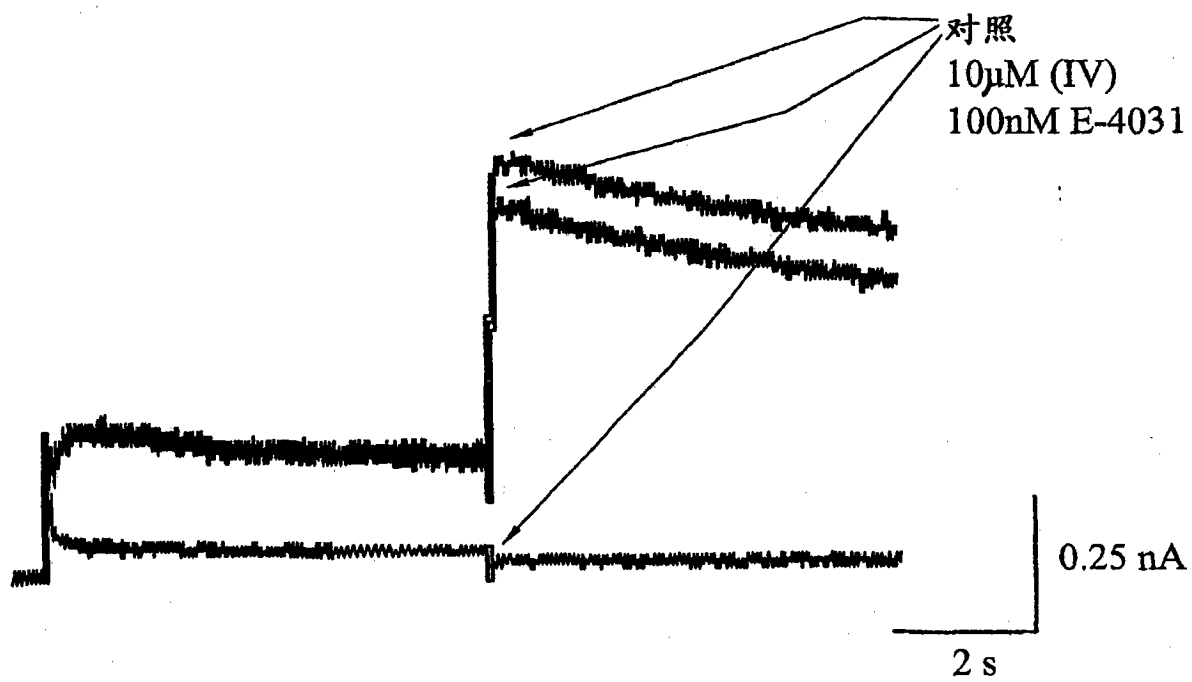


图 3F

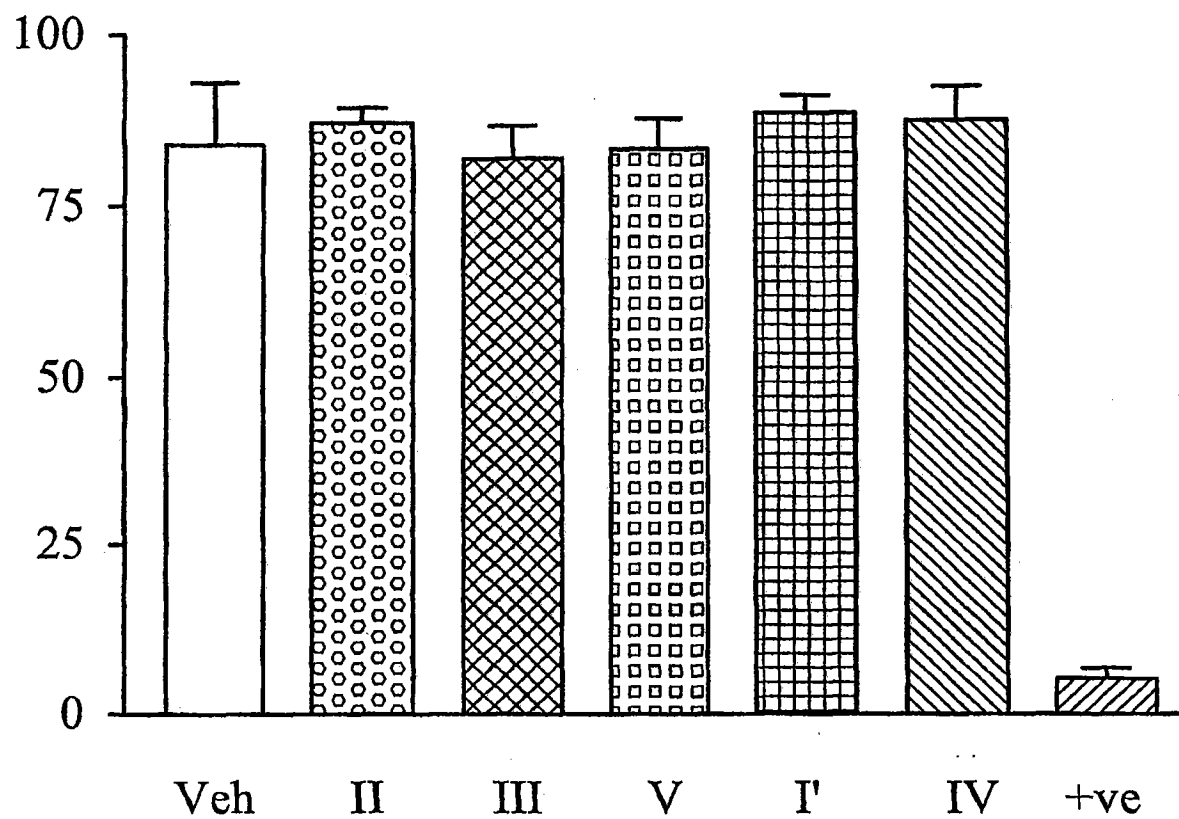


图 3G

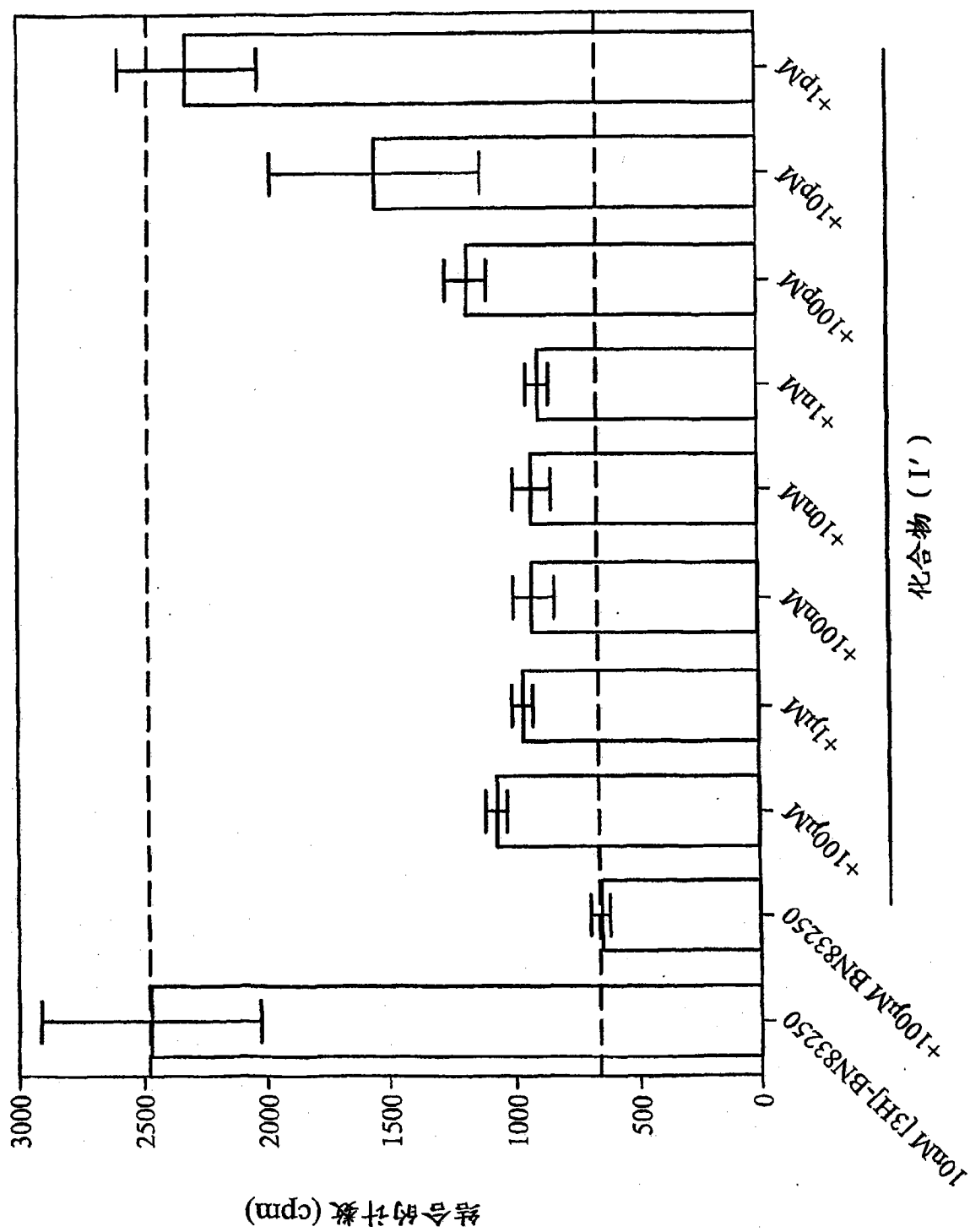


图 4

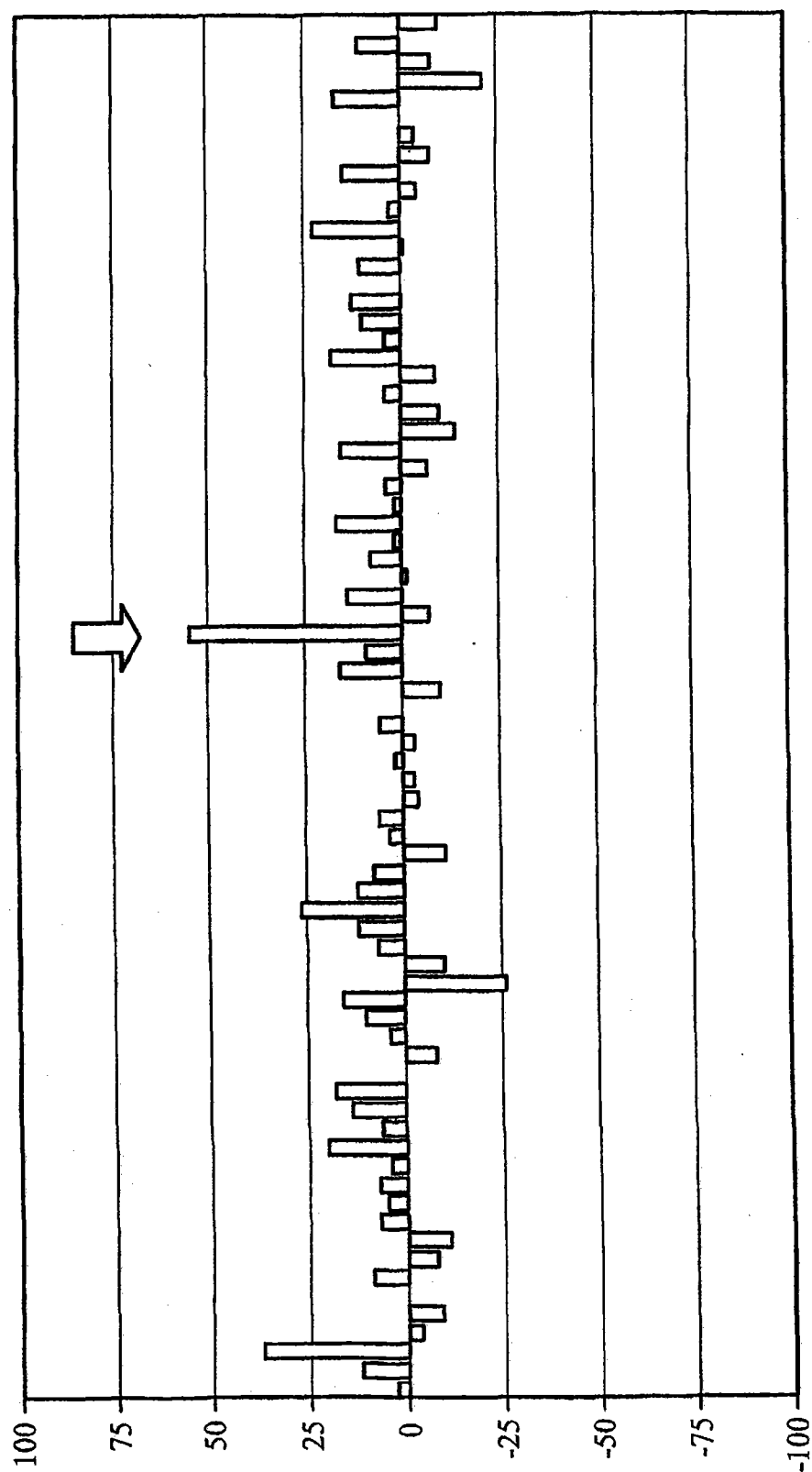


图 5A

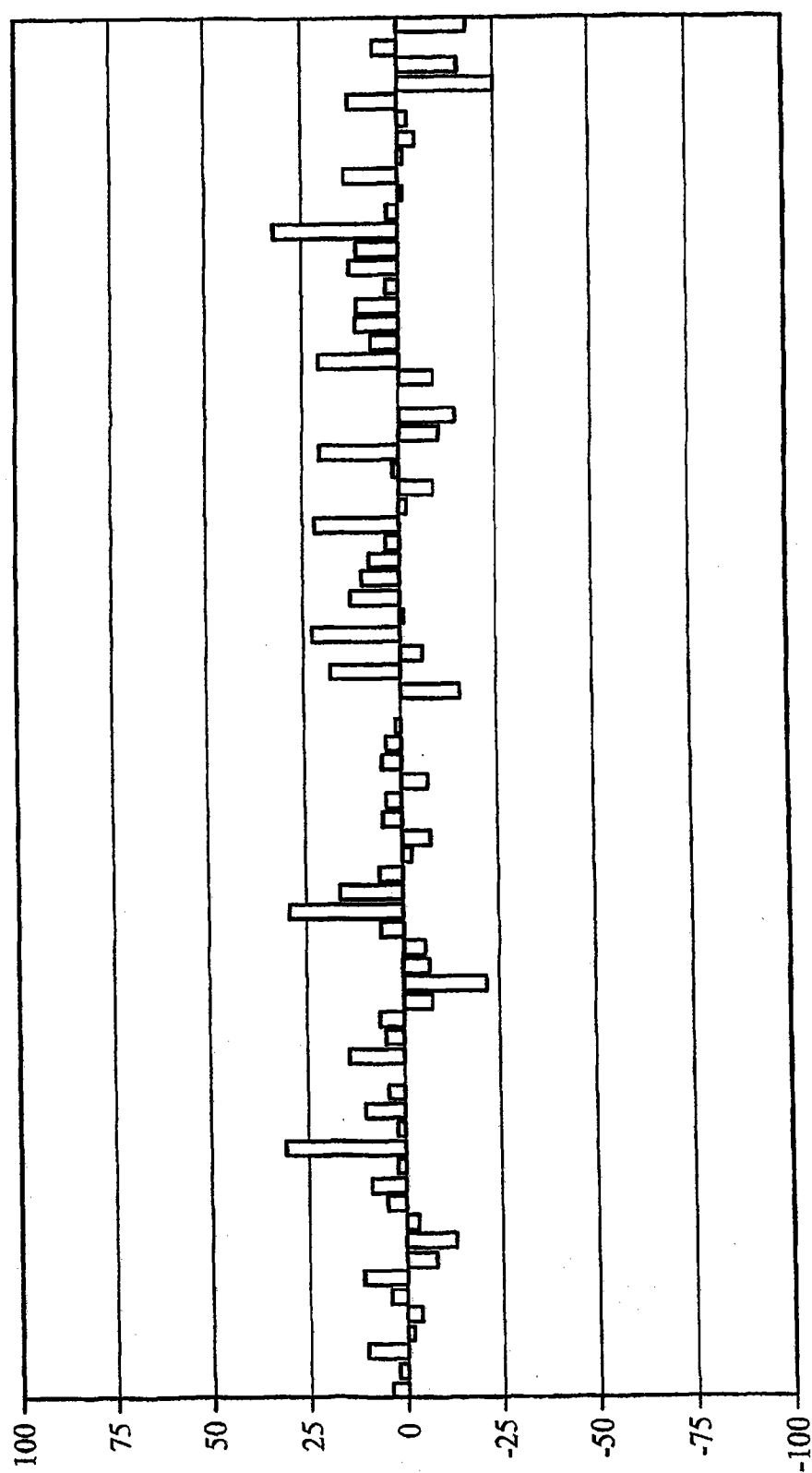


图 5B

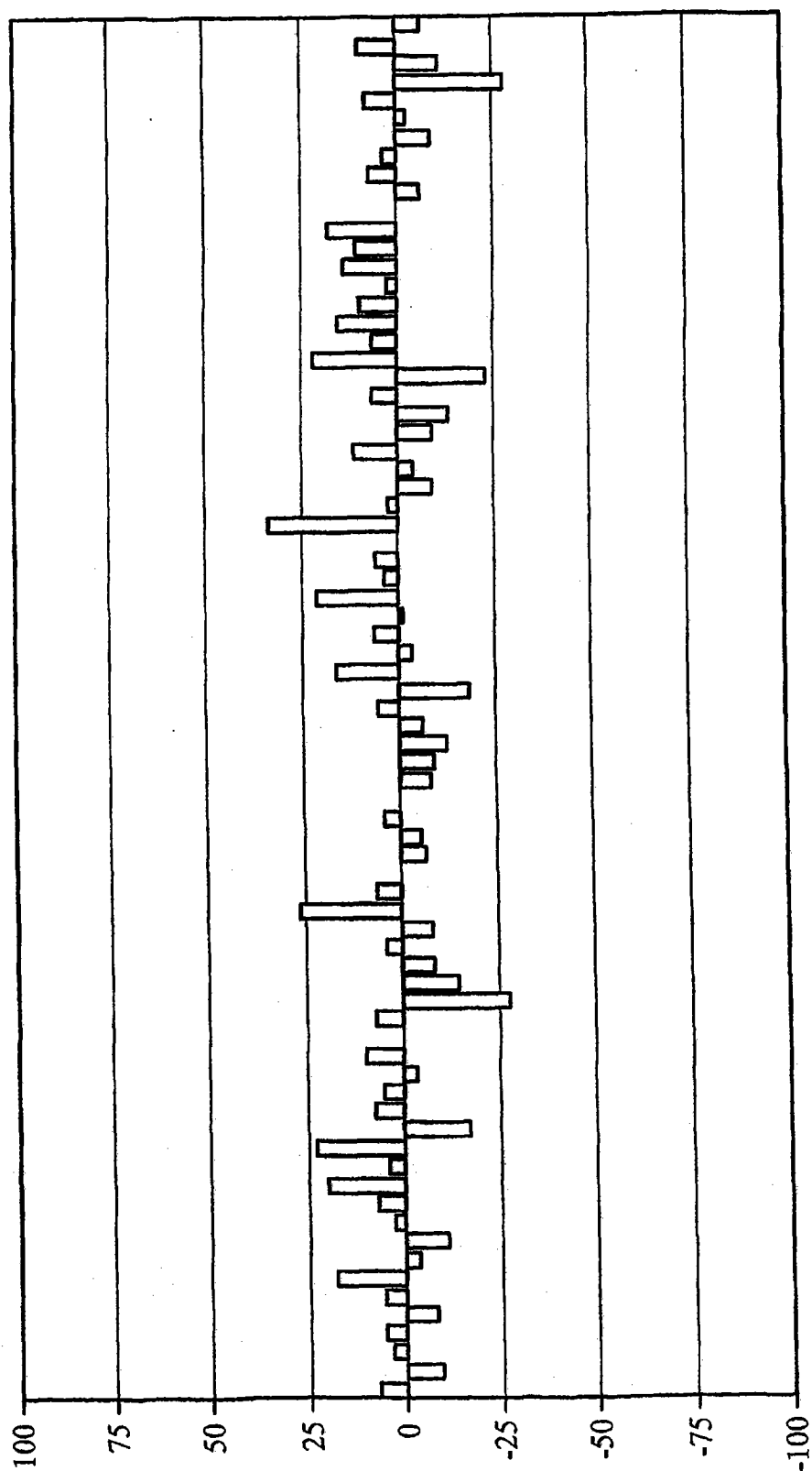


图 5C

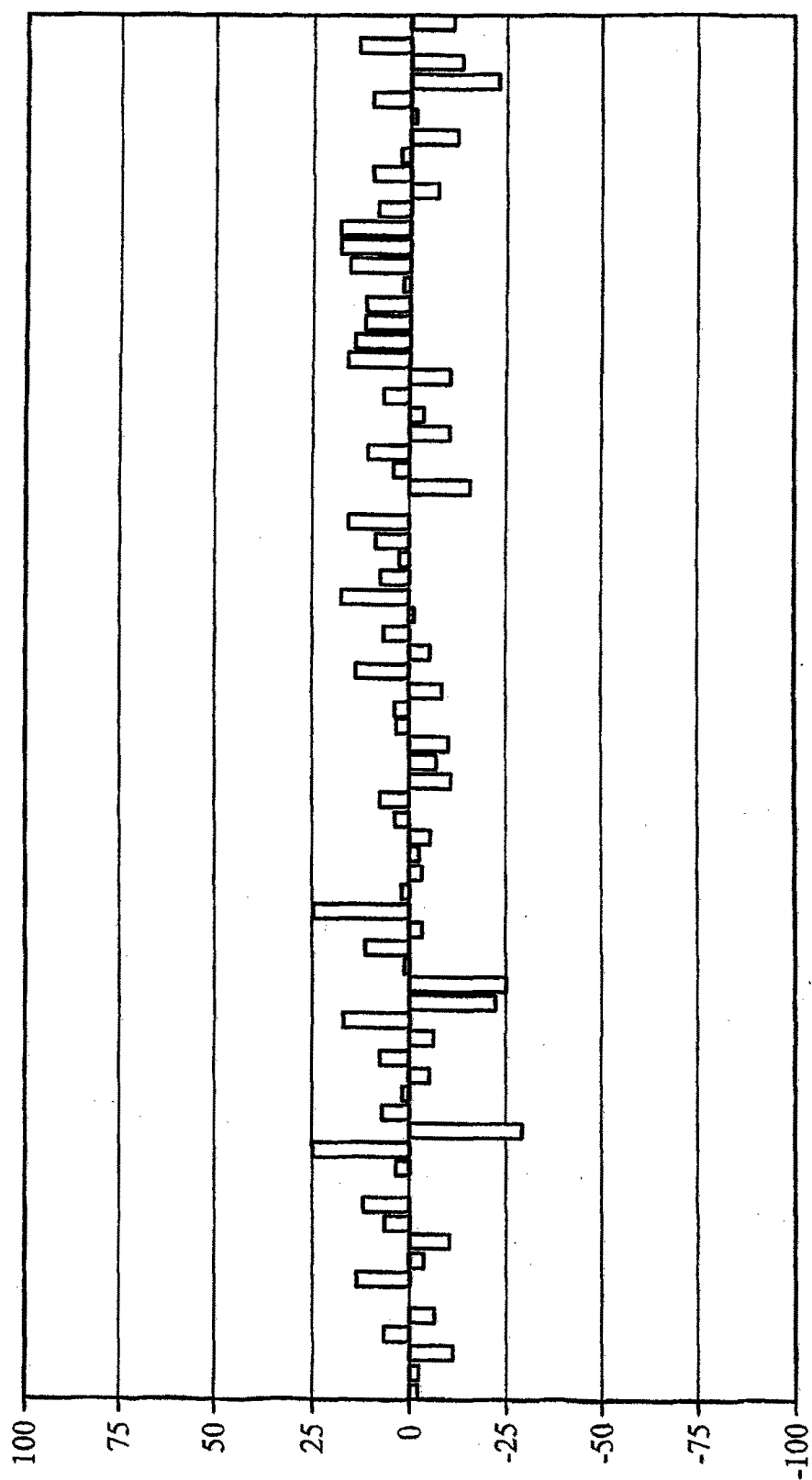


图 5D

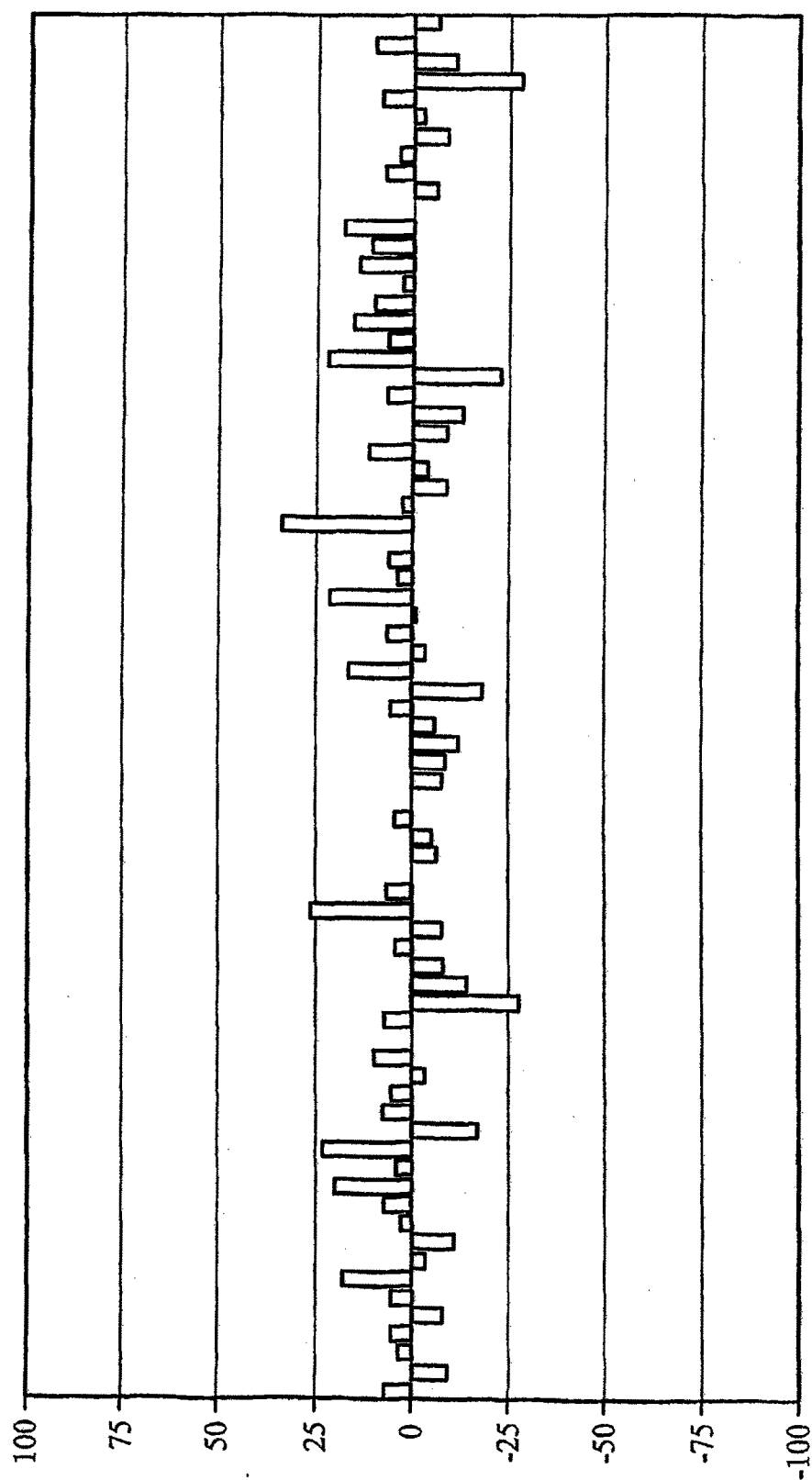


图 5E

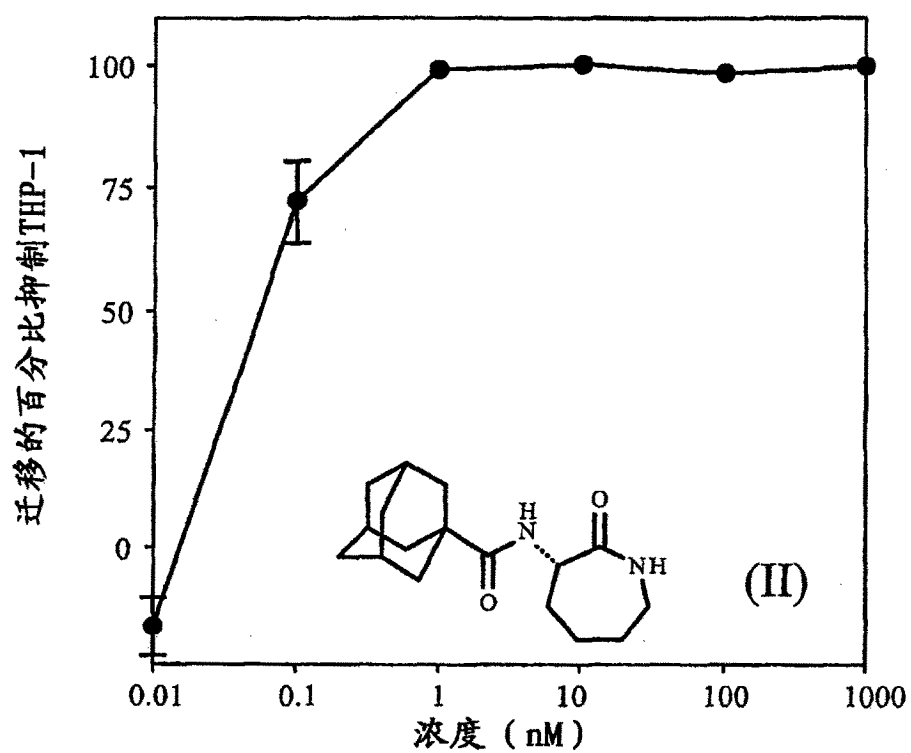


图 6A

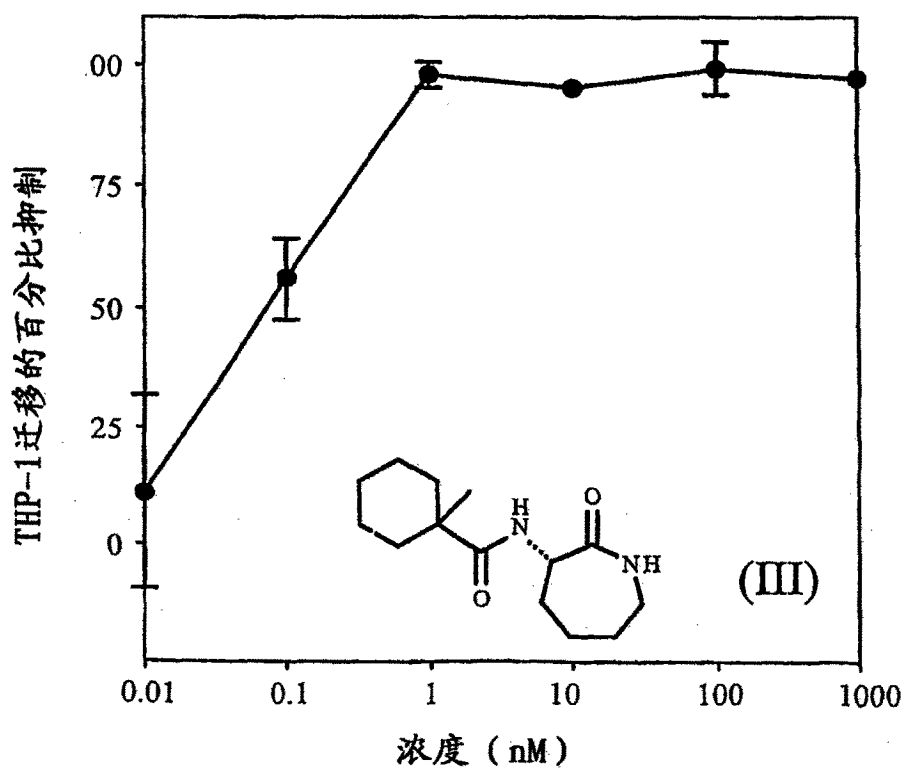


图 6B

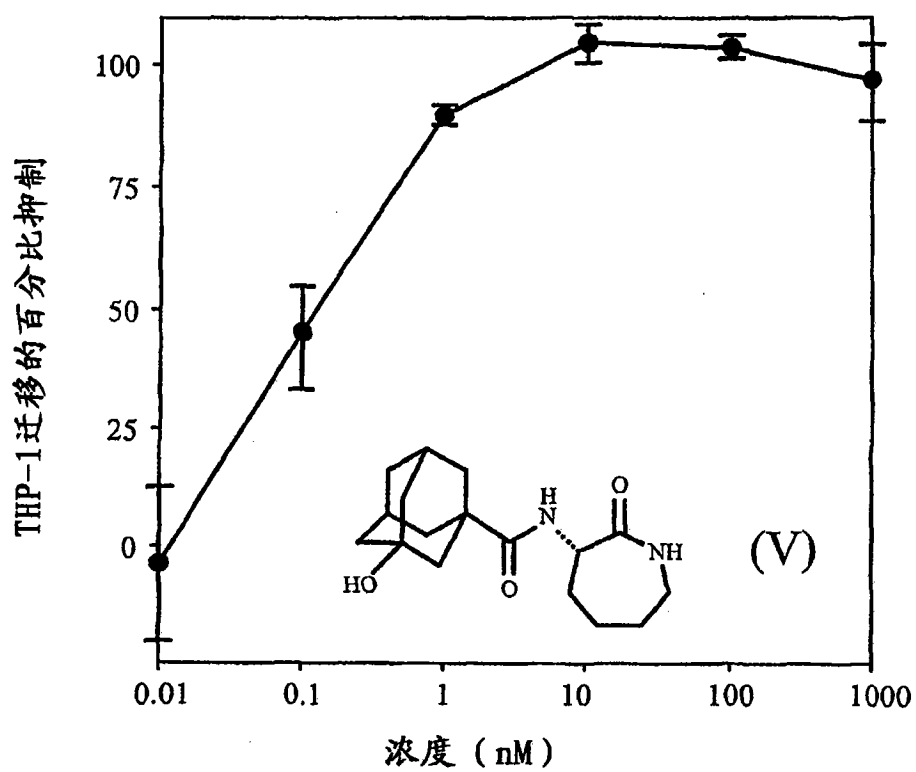


图 6C

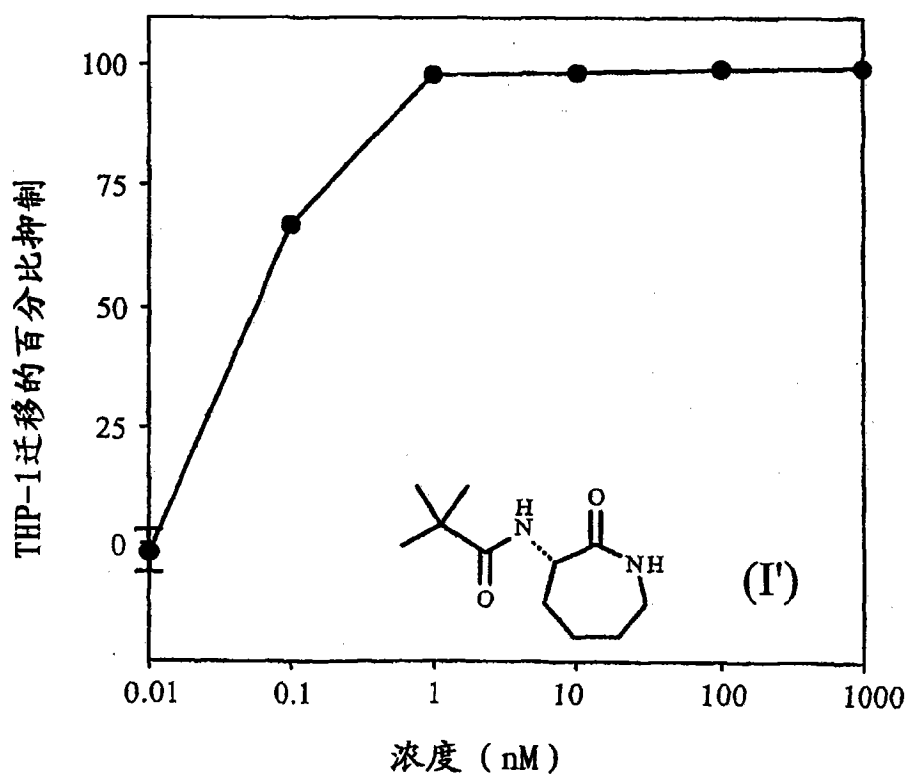


图 6D

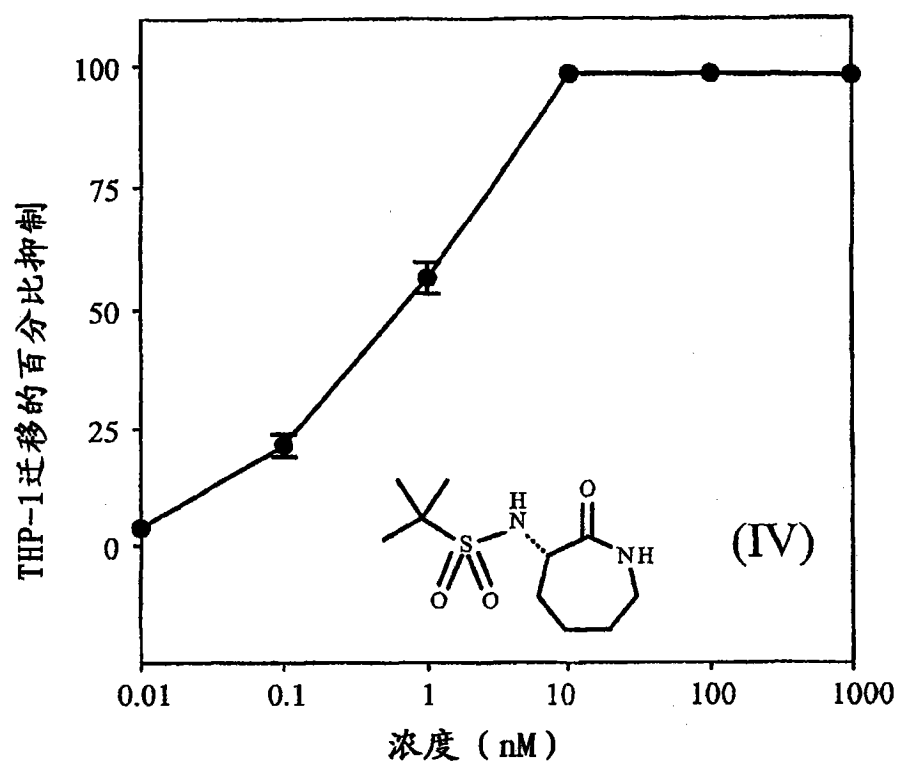


图 6E

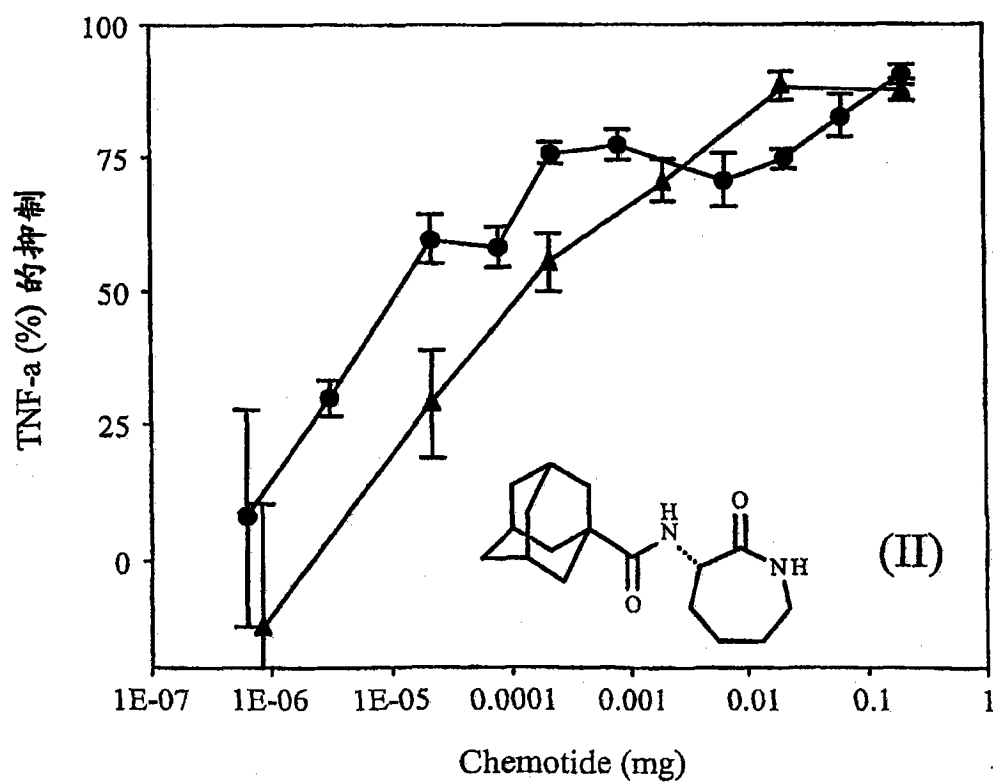


图 7A

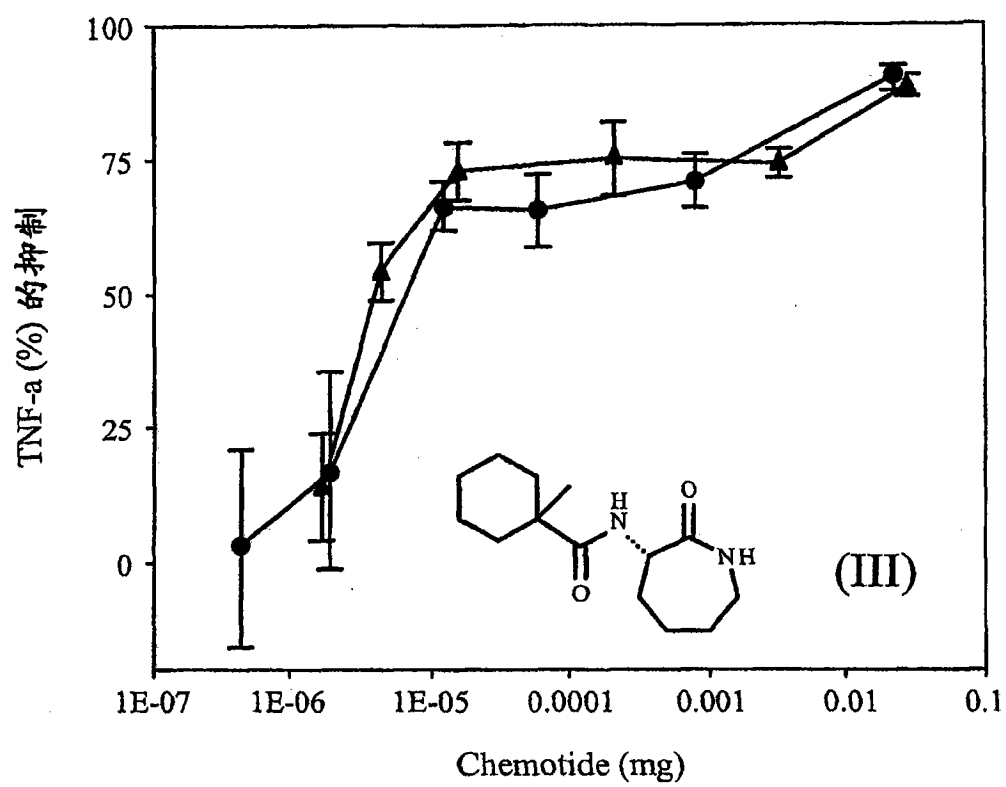


图 7B

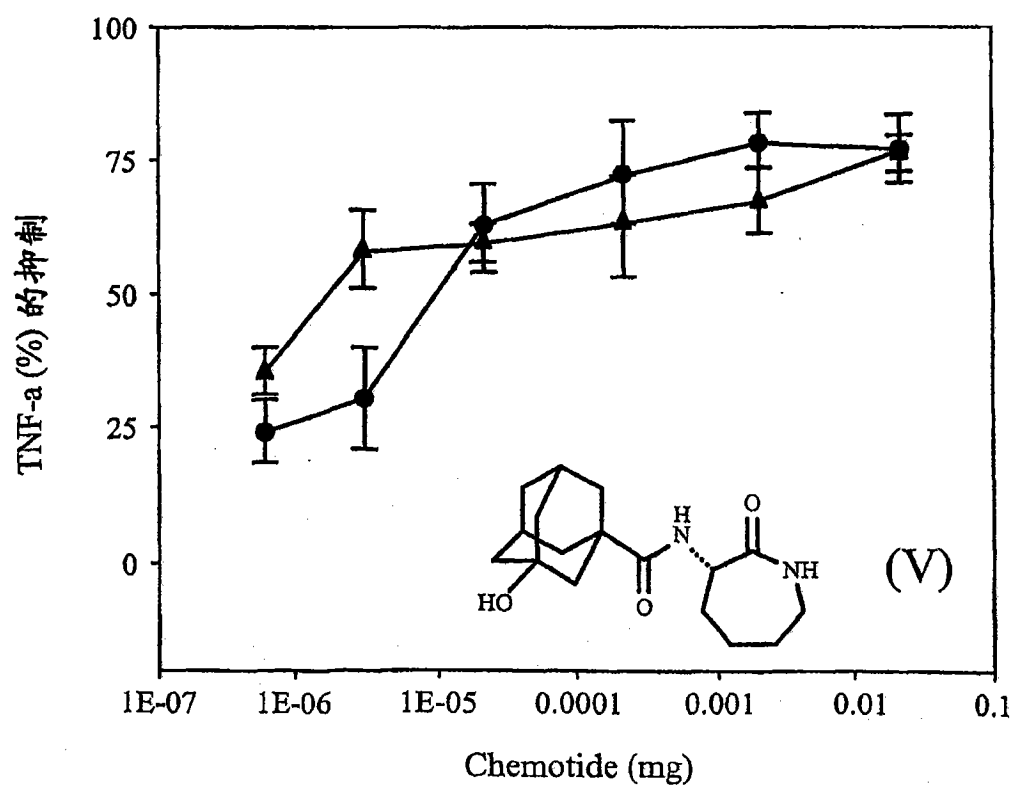


图 7C

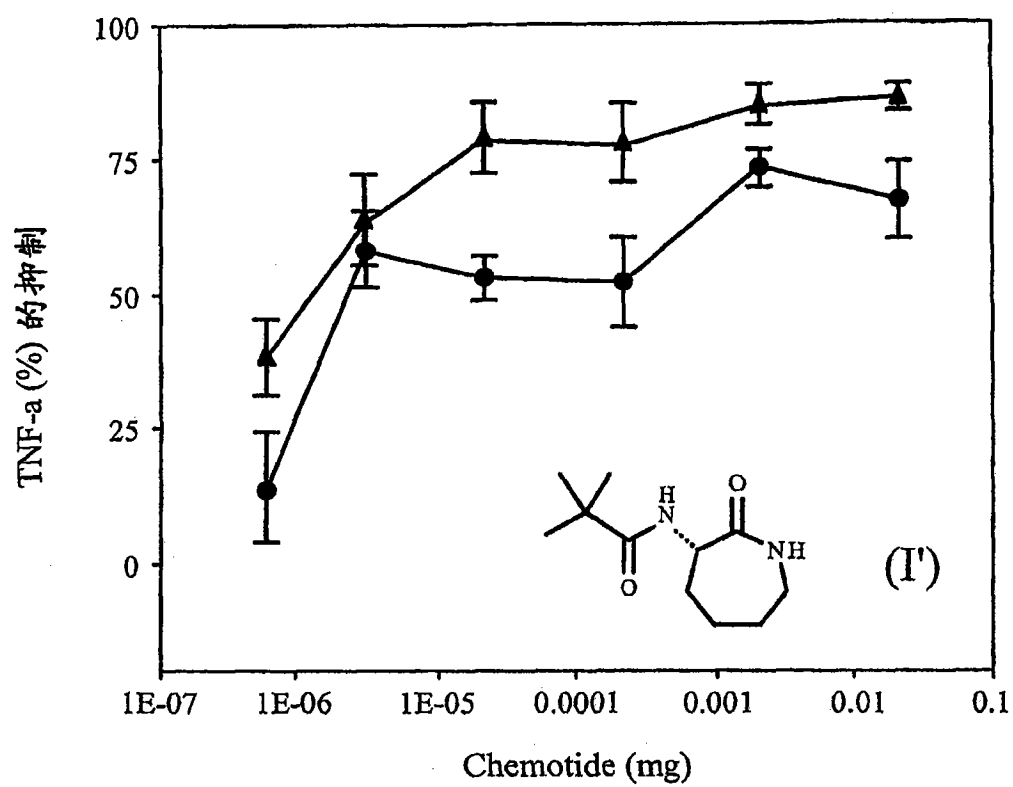


图 7D

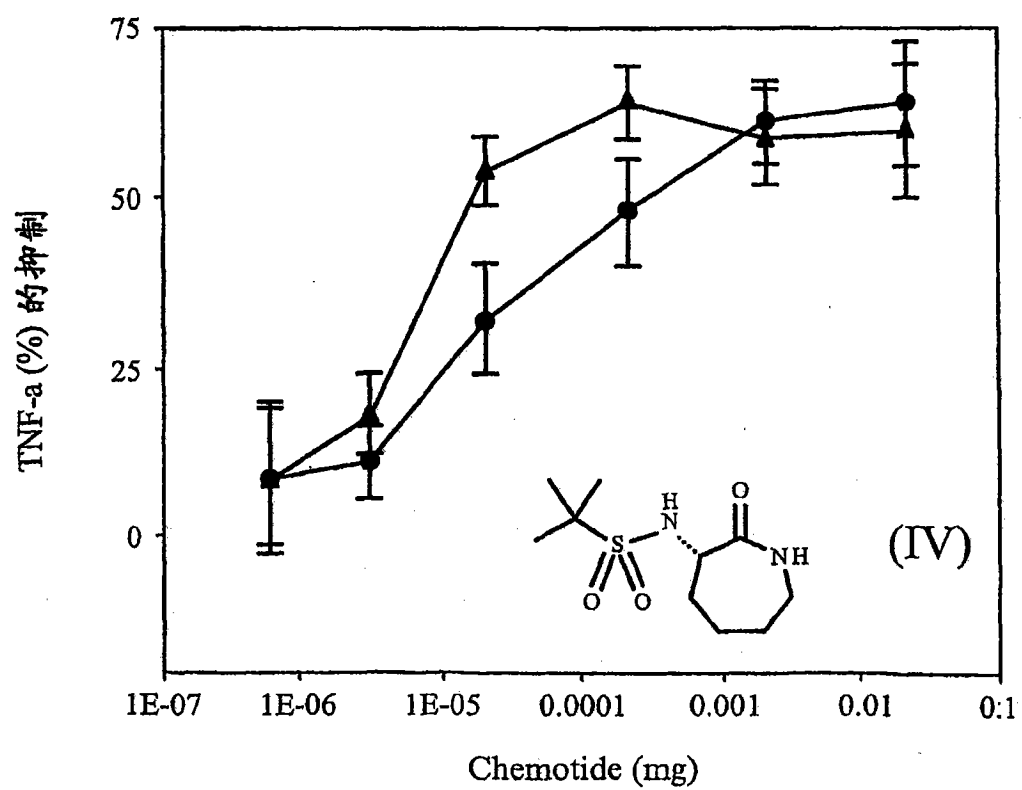


图 7E

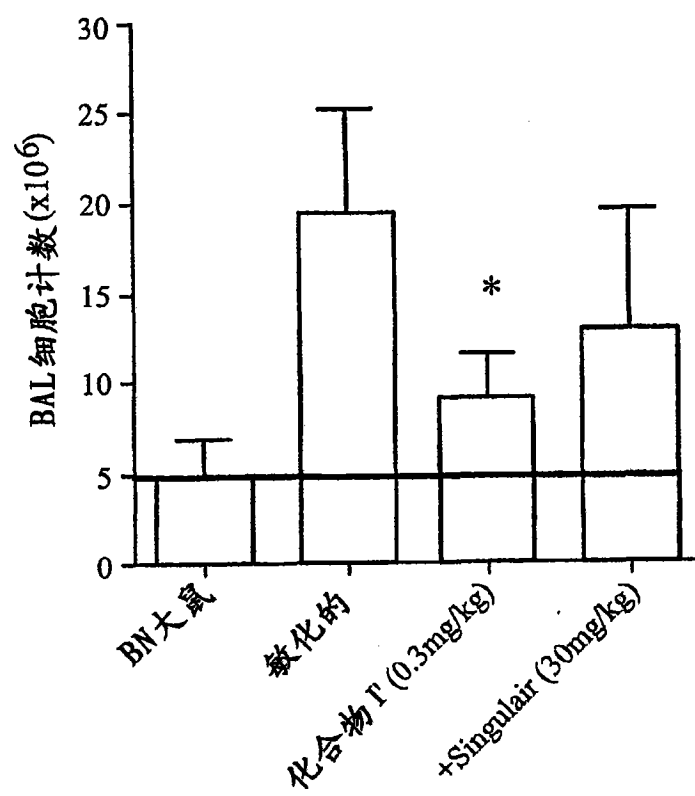


图 8

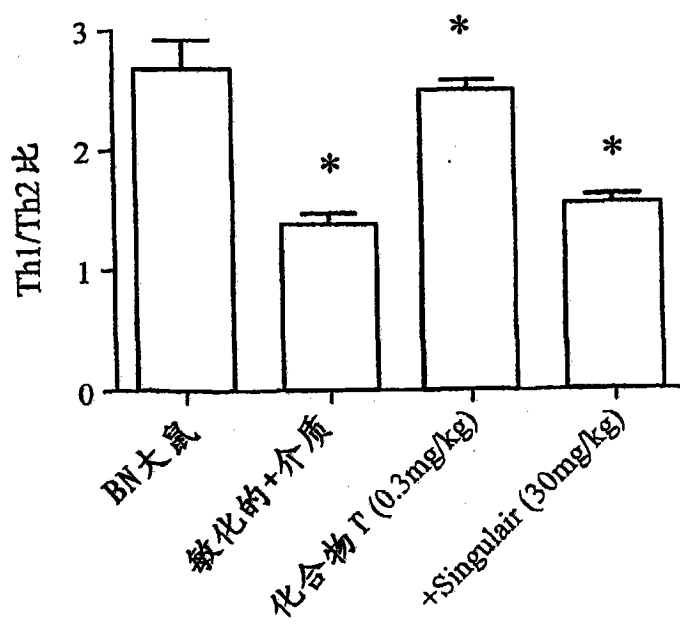


图 9

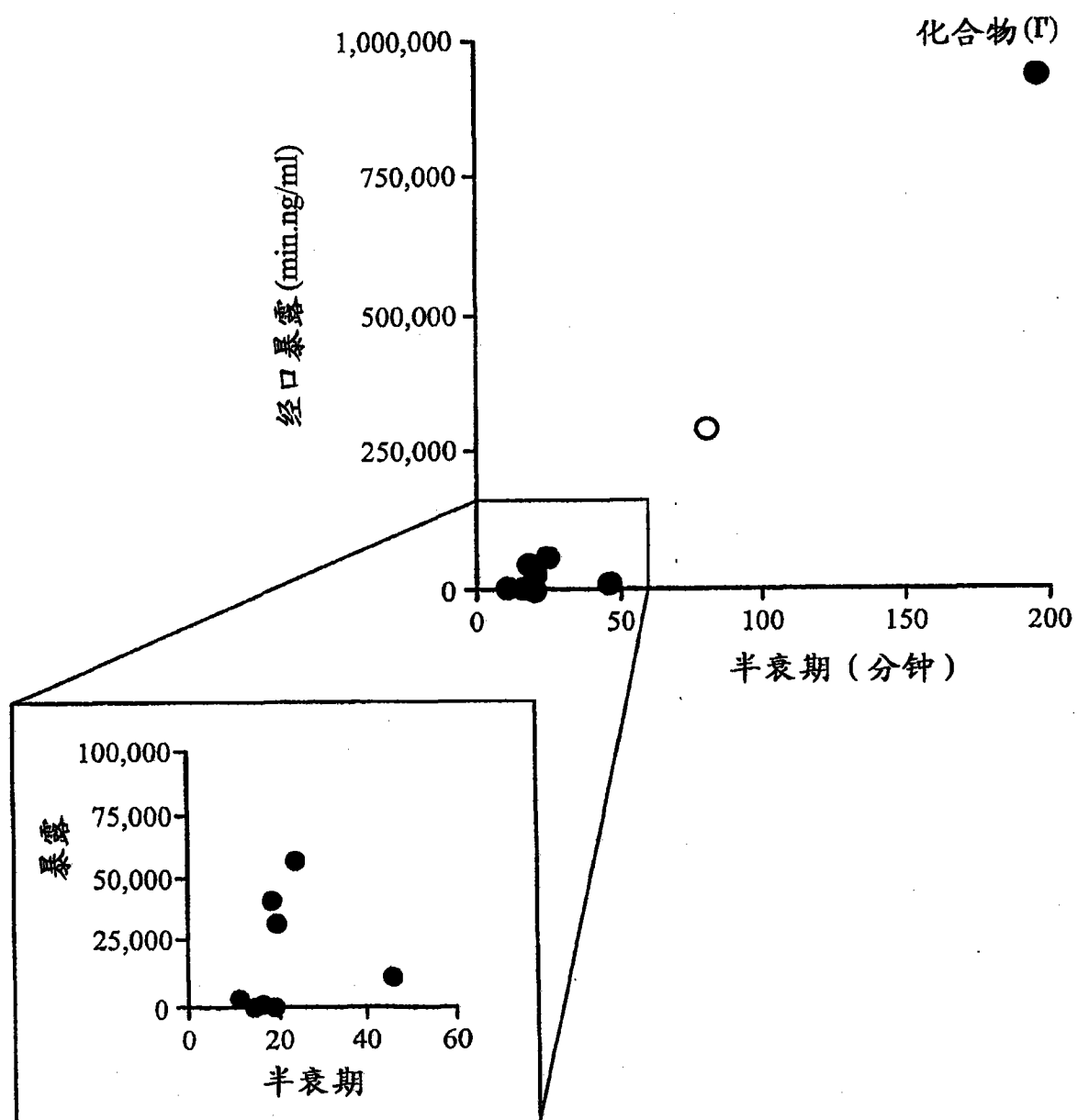


图 10