



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104302275 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201380025996. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 04. 22

A61K 9/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 45/06 (2006. 01)

61/637, 390 2012. 04. 24 US

A61K 31/4155 (2006. 01)

61/782, 565 2013. 03. 14 US

A61P 17/00 (2006. 01)

A61P 17/06 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 11. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/058249 2013. 04. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/160222 EN 2013. 10. 31

(71) 申请人 葛兰素史密斯克莱知识产权(第2号)有限公司

地址 英国米德尔塞克斯

(72) 发明人 P. 阿加瓦尔 V. 库马尔 谢青

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 曹立莉

权利要求书2页 说明书10页

(54) 发明名称

类固醇反应性皮肤病的治疗方法

(57) 摘要

本发明是在有需要的哺乳动物(包括人)中治疗类固醇反应性皮肤病的方法,其包括对这样的哺乳动物给药治疗有效量的选自以下的化合物:N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡啶-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐,和化合物N-{(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡啶-5-基)-2-咪喃甲酰胺或其药学上可接受的盐。

1. 在有此需要的哺乳动物中治疗类固醇反应性皮肤病的方法,其包括向该哺乳动物给药治疗有效量的选自以下的化合物:N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐;和N-{(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-呋喃甲酰胺或其药学上可接受的盐。

2. 权利要求1的方法,其中所述哺乳动物为人。

3. 权利要求2的方法,其中所给药的化合物为N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐。

4. 权利要求2的方法,其中所给药的化合物为N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺盐酸盐。

5. 权利要求2的方法,其中所给药的化合物为N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺。

6. 权利要求2的方法,其中所给药的化合物为N-{(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-呋喃甲酰胺或其药学上可接受的盐。

7. 权利要求1的方法,其中所述类固醇反应性皮肤病选自:接触性皮炎、湿疹、婴儿湿疹、特应性皮炎、鱼鳞病、银屑病、干皮症、脂溢性皮炎、钱币状皮炎、疱疹样皮炎、神经性皮炎、停滞性皮炎、慢性单纯性苔藓、皮肤癣菌疹、念珠菌病、擦烂、疥疮、玫瑰糠疹、扁平苔癣、毛发红糠疹、大疱性类天疱疮、汗疹、急性和慢性湿疹、红斑狼疮、光过敏反应、瘙痒症及其组合。

8. 权利要求7的方法,其中所述类固醇反应性皮肤病为银屑病。

9. 权利要求7的方法,其中所述化合物为口服给药。

10. 权利要求7的方法,其中所述化合物为局部给药。

11. 权利要求7的方法,其中所述哺乳动物为人。

12. 在有此需要的哺乳动物中治疗类固醇反应性皮肤病的方法,其包括:对该哺乳动物给药治疗有效量的

a)N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐;和

b)至少一种已知治疗类固醇反应性皮肤病的其他药物。

13. 权利要求12的药物组合,其用于治疗。

14. 权利要求12的药物组合在制备用于治疗类固醇反应性皮肤病的药物中的用途。

15. N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于治疗类固醇反应性皮肤病的药物中的用途。

16. 用于治疗哺乳动物中类固醇反应性皮肤病的药物组合物,其包含N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐。

17. 权利要求10的方法,其中所述哺乳动物为人。

18. 适用于局部给药的药物组合物,其包含 N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐。

19. 在有此需要的哺乳动物中治疗类固醇反应性皮肤病的方法,其包括:向该哺乳动物给药治疗有效量的

a) N-{(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-呋喃甲酰胺或其药学上可接受的盐;和

b) 至少一种已知治疗类固醇反应性皮肤病的其他药物。

20. 权利要求 1 的化合物在制备用于治疗类固醇反应性皮肤病的药物中的用途。

21. N-{(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-呋喃甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于治疗类固醇反应性皮肤病的药物中的用途。

22. 权利要求 19 的药物组合,其用于治疗。

23. 权利要求 19 的药物组合在制备用于治疗类固醇反应性皮肤病的药物中的用途。

24. 适用于局部给药的药物组合物,其包含 N-{(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-呋喃甲酰胺或其药学上可接受的盐。

25. 权利要求 2 的方法,其中所给药的化合物为 N-{(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-呋喃甲酰胺。

26. 用于治疗哺乳动物中类固醇反应性皮肤病的药物组合物,其包含 N-{(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-呋喃甲酰胺或其药学上可接受的盐。

类固醇反应性皮肤病的治疗方法

技术领域

[0001] 本发明涉及通过给药选自以下的化合物： $N-\{(1S)-2\text{-氨基}-1-[(3\text{-氟苯基})\text{甲基}]\text{乙基}\}-5\text{-氯}-4-(4\text{-氯}-1\text{-甲基}-1H\text{-吡唑}-5\text{-基})-2\text{-噻吩甲酰胺}$ 或其药学上可接受的盐（合适地为盐酸盐）；和 $N-\{(1S)-2\text{-氨基}-1-[(3,4\text{-二氟苯基})\text{甲基}]\text{乙基}\}-5\text{-氯}-4-(4\text{-氯}-1\text{-甲基}-1H\text{-吡唑}-5\text{-基})-2\text{-呋喃甲酰胺}$ 或其药学上可接受的盐，在哺乳动物（合适地为人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法。

背景技术

[0002] $N-\{(1S)-2\text{-氨基}-1-[(3\text{-氟苯基})\text{甲基}]\text{乙基}\}-5\text{-氯}-4-(4\text{-氯}-1\text{-甲基}-1H\text{-吡唑}-5\text{-基})-2\text{-噻吩甲酰胺}$ （下文称化合物 A）及其药学上可接受的盐为公开且申请专利于国际申请号 PCT/US08/053269（国际申请日 2008 年 2 月 7 日）；国际公开号 W0 08/098104（国际公开日期 2008 年 8 月 14 日）（实施例 96 的化合物）中的化合物，其适用于治疗癌症和关节炎。其全部公开内容引入本文。

[0003] 化合物 A 的结晶盐酸盐： $N-\{(1S)-2\text{-氨基}-1-[(3\text{-氟苯基})\text{甲基}]\text{乙基}\}-5\text{-氯}-4-(4\text{-氯}-1\text{-甲基}-1H\text{-吡唑}-5\text{-基})-2\text{-噻吩甲酰胺盐酸盐}$ （下文称化合物 B）为公开并申请专利于国际申请号 PCT/US2010/022323（国际申请日为 2010 年 1 月 28 日）；国际公开号 W0 2010/088331（国际公开日为 2010 年 8 月 5 日）的化合物，其用于治疗癌症和关节炎。其全部公开内容引入本文。

[0004] $N-\{(1S)-2\text{-氨基}-1-[(3,4\text{-二氟苯基})\text{甲基}]\text{乙基}\}-5\text{-氯}-4-(4\text{-氯}-1\text{-甲基}-1H\text{-吡唑}-5\text{-基})-2\text{-呋喃甲酰胺}$ ，或其药学上可接受的盐（下文称化合物 C）为公开并申请专利于国际申请号 PCT/US08/053269（国际申请日为 2008 年 2 月 7 日）；国际公开号 W0 08/098104（国际公开日为 2008 年 8 月 14 日）（实施例 224 的化合物）的化合物，其用于治疗癌症和关节炎。

[0005] 适宜地，本发明涉及化合物 A 或其药学上可接受的盐新的治疗用途，适宜地化合物 B 的新的治疗用途，适宜地化合物 C 新的治疗用途。

发明内容

[0006] 本发明涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的选自以下的化合物： $N-\{(1S)-2\text{-氨基}-1-[(3\text{-氟苯基})\text{甲基}]\text{乙基}\}-5\text{-氯}-4-(4\text{-氯}-1\text{-甲基}-1H\text{-吡唑}-5\text{-基})-2\text{-噻吩甲酰胺}$ 或其药学上可接受的盐，和 $N-\{(1S)-2\text{-氨基}-1-[(3,4\text{-二氟苯基})\text{甲基}]\text{乙基}\}-5\text{-氯}-4-(4\text{-氯}-1\text{-甲基}-1H\text{-吡唑}-5\text{-基})-2\text{-呋喃甲酰胺}$ 或其药学上可接受的盐。

[0007] 本发明还涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的化合物 $N-\{(1S)-2\text{-氨基}-1-[(3\text{-氟苯基})\text{甲基}]\text{乙基}\}-5\text{-氯}-4-(4\text{-氯}-1\text{-甲基}-1H\text{-吡唑}-5\text{-基})-2\text{-噻吩甲酰胺盐酸盐}$ ，其中所述化合物为局部给药。

[0008] 本发明还涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的化合物 N-[(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基]-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐，其中所述化合物为局部给药。

[0009] 本发明还涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的化合物 N-[(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基]-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺，其中所述化合物为局部给药。

[0010] 本发明还涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的化合物 N-[(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基]-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-咪喃甲酰胺或其药学上可接受的盐，其中所述化合物为局部给药。

[0011] 本发明还涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的化合物 N-[(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基]-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-咪喃甲酰胺，其中所述化合物为局部给药。

[0012] 本发明还涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的化合物 N-[(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基]-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐，其中所述化合物为口服给药。

[0013] 本发明还涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的化合物 N-[(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基]-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-咪喃甲酰胺或其药学上可接受的盐，其中所述化合物为口服给药。

[0014] 本发明还涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的化合物 N-[(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基]-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺或其药学上可接受的盐，其中所述化合物为肠胃外给药。

[0015] 本发明还涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的化合物 N-[(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基]-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-咪喃甲酰胺或其药学上可接受的盐，其中所述化合物为肠胃外给药。

[0016] 本发明包括药物组合物，其包含药物载体和适用于本发明方法的化合物。

[0017] 本发明还包括共同给药适用于本发明方法的化合物与其他活性成分的方法。

[0018] 发明详述

[0019] 本发明涉及在有此需要的哺乳动物（包括人）中治疗类固醇反应性皮肤病的方法，其包括向该哺乳动物中给药治疗有效量的选自以下的化合物：N-[(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基]-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺（化合物 A）或其药学上可接受的盐，和 N-[(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]

乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-咪喃甲酰胺或其药学上可接受的盐。化合物 A 的药学上可接受的盐适宜为盐酸盐或 N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺盐酸盐(化合物 B)。

[0020] 类固醇反应性皮肤病为对局部皮质类固醇治疗有反应的皮肤病。具体的类固醇反应性皮肤病可依据当前发明的方法治疗。适宜地,本发明涉及在哺乳动物(包括人)中治疗类固醇反应性皮肤病的方法,其中所述皮肤病选自:接触性皮炎、湿疹、婴儿湿疹、特应性皮炎、鱼鳞病、银屑病、干皮症、脂溢性皮炎、钱币状皮炎、疱疹样皮炎、神经性皮炎、停滞性皮炎、慢性单纯性苔藓、皮肤癣菌疹、念珠菌病、擦烂、疥疮、玫瑰糠疹、扁平苔藓、毛发红糠疹、大疱性类天疱疮、汗疹、急性和慢性湿疹、红斑狼疮、光过敏反应、瘙痒症和其组合。

[0021] 适宜地,所述皮肤病选自:接触性皮炎、湿疹、婴儿湿疹、特应性皮炎、银屑病、脂溢性皮炎、钱币状皮炎、疱疹样皮炎、神经性皮炎、停滞性皮炎、皮肤癣菌疹、急性湿疹、慢性湿疹。

[0022] 适宜地,所述皮肤病选自:湿疹、特应性皮炎和银屑病。

[0023] 适宜地,所述皮肤病为:银屑病。

[0024] 本发明方法治疗的类固醇反应性皮肤病可具有多种原因。这些原因的多个非限制性实施例包括过敏症、IgE 介导、抗膜抗体、免疫复合物疾病、细胞介导的免疫及其组合。

[0025] 所述类固醇反应性皮肤病还可由具有皮肤病的哺乳动物的组织的损伤引起。这些损伤的多个非限制性实施例包括物理损伤、化学损伤、环境损伤、局部介导的损伤、内部介导的损伤及其组合。

[0026] 该类固醇反应性皮肤病可为对原发病响应的继发性生理反应。引起该类固醇反应性皮肤病的这些原发病的多个非限制性实施例包括感染、过敏性反应、过度增殖性疾病、免疫疾病、代谢障碍、药物诱导的反应、与器官功能适当或不适当的病症及其组合。

[0027] 无论疾病原因,本发明的方法和组合物皆适用于治疗类固醇反应性皮肤病。

[0028] 银屑病为 T 细胞介导的病变,其特征存在于存在记忆效应 T 细胞(CD45RO+),并在皮肤病损的角质化细胞中促进增生及降低分化(Schön and Boehncke. N Engl J Med. 2005)。适宜地,本发明涉及治疗银屑病的方法。

[0029] 本文使用的术语“治疗”及其衍生物,是指预防性和治疗性疗法。预防性疗法适用于例如,当患者被认为具有发展类固醇反应性皮肤病的较高风险,例如当患者具有类固醇反应性皮肤病的强家族病史,或当患者具有重复或季节性类固醇反应性皮肤病的病史时。

[0030] 患者中存在的多种诱发因素都包含在本发明的化合物的预防性用途中。本发明的方法的预防性用途包括但不限于在检测到疾病之前,治疗具有重复或季节性类固醇反应性皮肤病病史的患者。

[0031] 本文使用的短语“达到治疗程度”、“治疗”和“治疗有效量”及其衍生物,除非另有说明,是指可引起被例如研究者或临床医生所寻找的组织、系统、哺乳动物或人的生物学或药学反应的化合物 A 或其药学上可接受的盐、或化合物 B、或化合物 C 的量。此外,术语“治疗有效量”指的是与没有接受该量的患者相比较,可导致对类固醇反应性皮肤病的改进治疗、治愈、预防,减轻严重性或缓解类固醇反应性皮肤病的任何用量。

[0032] 如上文所述,类固醇反应性皮肤病已知具有许多诱发因素。本发明涉及类固醇反应性皮肤病的治疗,无论该病症的一种或多种原因。当病症的一种或多种原因不明或尚未

被识别时,本发明的药物活性化合物仍适用于治疗类固醇反应性皮肤病,合适地为银屑病。

[0033] 有经验的医生能为患有类固醇反应性皮肤病(合适地为银屑病)或易受该疾病影响的患者决定通过本发明的方法给药的适当状态。

[0034] 本文所述的一些化合物可含有一个或多个手性原子,或否则可存在两种对映体。因此,本发明的化合物包括对映体的混合物以及纯对映体或富含对映体的混合物。此外,应了解所有的互变异构体和互变异构体的混合物都在本发明化合物的范围内。

[0035] 本文所述的一些化合物可形成溶剂化物,应了解其是由溶质(例如,化合物A或其药学上可接受的盐)和溶剂以可变化学计量形成的复合物。用于本发明目的的该溶剂不能干扰溶质的生物活性。合适的溶剂的实例包括但不限于,水、甲醇、乙醇和乙酸。优选地,使用的溶剂为药学上可接受的溶剂。合适的药学上可接受的溶剂的实例包括但不限于,水、乙醇和乙酸。适宜地,使用的溶剂为水。

[0036] 本发明的化合物的药学上可接受的盐由本领域技术人员容易地进行制备。

[0037] 本文所述的类固醇反应性皮肤病的治疗是通过给药化合物A或其药学上可接受的盐、或化合物B、或化合物C,并不限于任何特定作用机理实现。

[0038] 当提及治疗类固醇反应性皮肤病,本文所用的术语“共同给药”及其衍生物是指同时给药或任何方式的分开依序给药化合物A或其药学上可接受的盐、或化合物B、或化合物C以及已知可用于治疗类固醇反应性皮肤病一种或多种其他活性成分。本文所用的术语一种或多种其他活性成分包括,当给药有治疗类固醇反应性皮肤病需要的病人时,已知或已证实具有有利性质的任何化合物或治疗药。优选地,若非同时给药,该化合物在互相接近的时间间隔给药。此外,化合物不一定要以同种剂型给药,例如一种化合物可局部给药且另一种其他化合物可口服给药。

[0039] 通常,任何对治疗类固醇反应性皮肤病具有活性的药剂可共同给药以治疗本发明的类固醇反应性皮肤病。

[0040] 本发明涉及化合物A或其药学上可接受的盐、化合物B和化合物C在哺乳动物(包括人)中治疗类固醇反应性皮肤病的用途。

[0041] 本发明的化合物治疗类固醇反应性皮肤病的能力已由下列检测,证明其活性。

[0042] 检测 #1

[0043] 采用高通量筛选法比较银屑病病人的皮肤(临床样本)和正常人皮肤(临床样本)之间的mRNA表达模式,并将该差异与药物活性化合物的效果联系起来。该筛选法通常依照Lamb等,Science 313, 1929(2006)的方法。

[0044] 实验方案概述如下。

[0045] 常规实验方案

[0046] 接种细胞:第1天

[0047] 细胞生长于培养基中约24小时以准备MCF7的T-225烧瓶,其准备用于接种并进行分析。

[0048] • 自细胞中吸出培养基。

[0049] • 细胞单层用10-15mL DPBS洗涤一次,然后吸出。

[0050] • 将2ml 0.05%胰蛋白酶-EDTA加入其中,且烧瓶倾斜以铺满底层。将烧瓶于37°C培养约2分钟以解离细胞。

- [0051] • 将被解离的细胞用培养基收获,约 10ml/ 烧瓶。
- [0052] • 将收获的细胞悬浮液混合,并再悬浮以确保成均匀悬浮液。
- [0053] • 将悬浮液分配成 1×10^6 细胞 / 孔。
- [0054] • 细胞经离心沉降后,再悬浮于新鲜培养基中以获得 1×10^6 细胞 /2mL 培养基。
- [0055] • 将 2ml 的经调整的细胞悬浮液分配至 6- 孔板的各孔中。
- [0056] • 将该 6- 孔板在约 37°C :5% CO_2 培养过夜。
- [0057] 化合物处理 :第 2 天 (AM)
- [0058] • 将检测板 (含有 3u1 10mM 化合物 (小分子)/ 孔) 回升至室温。
- [0059] • 培养基温热至 37°C 。
- [0060] • 将 600u1 培养基加至检测板 (含有 3u1 10mM 化合物) 的各孔中。(=稀释 200x)
- [0061] • 然后中间稀释液为 50uM。
- [0062] • 将 500u1 的中间稀释液直接移至前一天的 6- 孔板 (2ml) 的细胞上。(=稀释 5x)
- [0063] • 然后细胞上含有 2.5ml 培养基。然后最终化合物浓度为 10uM,然后最终 DMSO 浓度为 0.1%。
- [0064] • 然后将处理过的细胞送回培养箱,并记录处理时间。
- [0065] • 例如,若最终处理浓度不是 10uM,则应先将母液在 DMSO 中调整,使得 1000x 稀释液仍可递送 0.1% DMSO 终浓度。例如,化合物被检测为 1uM 最终浓度时,其应在 100% DMSO 中制备 1mM 母液,然后同时将 3u1 加至 600u1 培养基中,并将 500u1 加至 2mL 上。
- [0066] • 或者,肽或非 -DMSO 母液化合物应稀释于 600u1 的培养基 (其中已溶解于 3u1 的 DMSO) 中。
- [0067] 样本收集 :第 2 天 (PM)
- [0068] • 制备新鲜 RLT 缓冲液 (QIAGEN)+2-Me
- [0069] • 在 6 小时的处理后,将 6- 孔板从培养箱中取出。
- [0070] • 实验化合物从细胞单层中吸出。
- [0071] • 将 350u1 的 RLT 缓冲液加入每孔。
- [0072] • 刮下细胞,然后将每孔的内容物移至适当标记的微离心管。
- [0073] • 冷冻并储存样本于 -80°C 。
- [0074] RNA 图谱分析和数据生成
- [0075] 将冷冻样本送至 Expression Analysis, Inc. Durham NC (EA) 以生产 RNA 图谱数据。为了得到完整基因组 RNA 表达图谱,加工样本以纯化 RNA 并与 Illumina HT-12-V4 Expression BeadChips 杂交。将从 EA 生成的 RNA 图谱原始数据进一步分析,以产生化合物诱导的 mRNA 表达变化产生基因排序列表。
- [0076] 通常,所得样本的分析包括依据 Kolmogorov-Smirnov 统计学 (Subramanian 等 Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 102no. 4315, 545-15550 (2005)), 使用非参数性分类模式匹配排序法,在查询疾病特征和各化合物特异性表达图谱之间产生富集得分。将特定的兴趣化合物实例的显著性用排列法 P 值评估。化合物 C 和 B 的检测结果显示于表 1。
- [0077] 表 1
- [0078]

化合物	P-值	特异性	n	CMap 得分平均值	富集得分	CMap 得分分布	化合物浓度	细胞类型
C	0	0.0104	6	-0.1867	-0.8835	(-0.17 -0.17 -0.17 -0.20 -0.20 -0.21)	10 uM	MCF7
B	0.013	0.2304	3	-0.1633	-0.8121	(-0.13 -0.16 -0.20)	10 uM	MCF7

[0079] 表 1. 采用银屑病特征相对于衍生自用化合物 C 和 B 处理的 MCF7 细胞的化合物图谱的 CMap 分析结果。

[0080] 依据上述检测的结果, 化合物 B 和 C 产生一组基因表达的变化, 其与银屑病中观察到基因表达变化呈负相关性, 表示其适用于银屑病和其他类固醇反应性皮肤病。

[0081] 检测 #2

[0082] 用化合物 C 重复检测 #1 的一般程序, 但用原代角质细胞代替。原代角质细胞购自 Zen-Bio, Inc 并生长于 Zen-Bio, Inc. 成人角质细胞生长培养基 (cat#KM-2)。

[0083] 依据检测 #1 的一般程序的第 1 天, 铺在 T225 烧瓶上的角质细胞经过胰蛋白酶处理, 并悬浮于 17.4mL 的 KM-2 培养基。然后细胞被接种于 6-孔板, 每孔 0.5×10^6 细胞, 于共 4mL 的 KM-2 培养基。

[0084] 依据检测 #1 的一般程序的第 2 天, 将角质细胞用最终浓度为 1uM 和 10uM 的化合物处理 6 小时。包含测试化合物的 KM-2 培养基从细胞单层中吸出。将 350uL 的 RLT 缓冲液加至每孔, 将各孔内容物刮下并移至合适的标记的微离心管。将样本于 -80°C 冷冻及储存。

[0085] 随后的样本处理, RNA 纯化和与晶片杂化的微阵列实验是由 Expression Analysis, Inc. Durham NC (EA) 进行。由 EA 产生的原始数据经过进一步分析, 由化合物诱导的 mRNA 表达变化产生基因排序列表。化合物 C 的检测 2 的结果示于表 2。

[0086] 表 2

[0087]

化合物	原始分数	量表分数	Ks 上升	Ks 下降	天	化合物	细胞类型
-----	------	------	-------	-------	---	-----	------

[0088]

						浓度	
C	-0.332382	-0.6723	-0.22	0.112	1	1 uM	角质细胞
C	-0.420439	-0.85041	-0.248	0.172	2	1 uM	角质细胞
C	-0.262476	-0.530904	-0.139	0.124	3	1 uM	角质细胞
C	-0.325131	-0.657634	-0.213	0.112	1	10 uM	角质细胞
C	-0.41045	-0.830207	-0.296	0.115	2	10 uM	角质细胞
C	-0.355069	-0.718188	-0.241	0.114	3	10 uM	角质细胞

[0089] 表 2. 采用银屑病特征相对于衍生自用化合物 C 处理的角质细胞的化合物图谱的 CMap 分析结果。

[0090] 依据上述检测 #2 的结果, 化合物 C 产生一组基因表达的变化, 其与银屑病中观察

到基因表达变化呈负相关性,表示其适用于银屑病和其他类固醇反应性皮肤病。

[0091] 临床结果

[0092] 在人类临床试验中,使用化合物 C 治疗癌症,在试验 PCS113124,1200 个患有银屑病的轻度斑块的患者参与,在用化合物 C 治疗期间,一般有好转有时甚至消退的结果。

[0093] 此外,判定在银屑病中存在治疗活性的化合物的有效的检测为本领域技术人员熟知。这样的检测同样可用于确认化合物 A 或其药学上可接受的盐、化合物 B 和化合物 C 在治疗银屑病和其他类固醇反应性皮肤病是有效的。

[0094] 许多目前的类固醇反应性皮肤病的疗法,尤其是类固醇治疗,对患者有毒害和/或已知会引发不良反应,其包括视力模糊、光周围的晕圈 (halos around lights)、心律不齐、失眠、情绪变化、体重增加、疲劳、发红、起泡、灼热、发痒、脱皮、变薄或皮肤纹、妊娠纹。这些不良反应在儿童身上特别普遍。本发明的化合物的一个优点是化合物为非类固醇化合物,且不会与类固醇化合物的不良反应相关。该治疗类固醇反应性皮肤病的优点可通过将化合物 A 或其药学上可接受的盐、化合物 B、或化合物 C 单独给药,或与其他类固醇反应性皮肤病药剂共同给药来实现。

[0095] 因此,本发明提供在哺乳动物(包括人)中治疗类固醇反应性皮肤病的方法,其中的皮肤病选自以下:接触性皮炎、湿疹、婴儿湿疹、特应性皮炎、鱼鳞病、银屑病、干皮症、脂溢性皮炎、钱币状皮炎、疱疹样皮炎、神经性皮炎、停滞性皮炎、慢性单纯性苔藓、皮肤癣菌疹、念珠菌病、擦烂、疥疮、玫瑰糠疹、扁平苔癣、毛发红糠疹、大疱性类天疱疮、汗疹、急性和慢性湿疹、红斑狼疮、光过敏反应、瘙痒症及其组合,其包含给药有效量的化合物 A 或其药学上可接受的盐、或化合物 B、或化合物 C,于有此需要的哺乳动物(包括人)。

[0096] 在本发明的其他实施方式中,所述人为儿科病人。

[0097] 本发明的化合物可通过常规给药途径给药于有此需要的病人,所述给药途径包括但不限于,局部、静脉内、肌内、口服、皮下、皮内、和肠胃外。适宜地,本发明的化合物可局部给药。当组合使用时,各活性化合物可单独给药或共同给药。化合物可局部给药,可彼此组合或依任何顺序给药(例如第一种活性化合物可给药,然后给药第二种活性化合物)。在本发明的其他实施方式中,至少一种活性化合物可用不同于另一种化合物的途径给药。例如,第一种活性化合物可局部给药,且第二活性化合物可口服给药,等。

[0098] 可将本发明的化合物混入方便的剂型,例如局部制剂、胶囊、片剂或注射剂。可采用固体或液体药物载体。固体载体包括,淀粉、乳糖、硫酸钙二水合物、石膏粉、蔗糖、滑石粉、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁和硬脂酸。液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、盐水和水。类似地,该载体或稀释剂可以包括任何缓释材料,例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯,可单独使用或与蜡一起使用。固体载体的量变化很大,但优选地是从每剂量单位约 25mg 至约 1g。当使用液体载体时,制剂适宜地是糖浆、酞剂、乳剂、软明胶胶囊、无菌注射液如安瓿或含水或不含水的液体悬浮液的形式。

[0099] 药物制剂是由下列药物化学常规技术制造,其包括混合、制粒和压缩,在必要时,为片剂形式,或适当混合、填充和溶解各成分,以得到所期望的口服或肠胃外形式的产品。

[0100] 适宜地,本发明的化合物是局部给药。适于局部给药的药物制剂可配制成软膏剂、乳膏剂、混悬剂、洗剂、粉剂、溶液、糊剂、凝胶剂、喷雾剂、气雾剂或油剂。

[0101] 对于局部给药达到所需的治疗效果的活性成分的量,当然会因选择的化合物、性

质与疾病状态的严重程度、及接受治疗的哺乳动物而不同,并最终由医生决定。每种活性成分的合适剂量可独立地为局部给药约 0.5mg 至 500mg,合适地从 1mg 至 100mg,例如给药 2 至 25mg 每日一至六次,适宜地每日一到三次。

[0102] 通过局部给药指非全身给药,并且包括将活性成分外部应用到表皮、到口腔和将此化合物滴注到耳朵、眼睛和鼻子,并且其中所述化合物不显著进入血流,适宜地将该活性成分外部应用到表皮。通过全身给药是指口服、静脉内,腹膜内和肌内给药。

[0103] 虽然活性成分可以原始化学物质单独给药,优选其以药物制剂呈现。各活性成分可包含,对于局部给药而言,以制剂的重量计从 0.001% 至 10% w/w,例如从 1% 至 2%,尽管其可包含高达 10% w/w,但优选不超过 5% w/w,并更优选从制剂的 0.1% 至 1% w/w。

[0104] 本发明的局部制剂,包括用于兽医和人类医学用途,包括活性成分与一种或多种可接受的载体和任选的任何其它治疗成分。该载体必须是在与制剂中的其它成分相兼容的意义上“可接受的”,且对其接受者无害。

[0105] 适合于局部给药的制剂包括适于透过皮肤到炎症部位的液体或半液体制剂,如搽剂、洗剂、霜剂、软膏或糊剂。

[0106] 根据本发明的洗剂包括那些适于施用于皮肤或眼睛的洗剂。眼洗剂可包括任选地含有杀菌剂的无菌水溶液,并可通过类似于那些用于制备滴剂的方法来制备。应用到皮肤上的洗剂或搽剂还可以包括用于加速干燥和冷却皮肤的制剂,如醇或丙酮,和 / 或保湿剂,如甘油或油(如蓖麻油或花生油)。

[0107] 根据本发明的霜剂、软膏或糊剂,是外用的活性成分的半固体制剂。它们可通过在具有适当的机械的帮助下,将细碎或粉末形式的,单独或在水性或非水性液体溶液或悬浮液中的活性成分与油脂性或非油脂性的基质混合来制备。该基质可包含烃类,如硬石蜡、软石蜡或液体石蜡、甘油、蜂蜡、蜡、金属皂;胶浆;天然来源的油类,例如杏仁、玉米油、花生油、蓖麻油或橄榄油的油;羊毛脂或其衍生物,或脂肪酸(如硬脂酸或油酸)以及醇(如丙二醇)。该制剂可掺入任何合适的表面活性剂,如阴离子、阳离子或非离子表面活性剂,如酯或其聚氧乙烯衍生物。还可包括助悬剂,如天然树胶、纤维素衍生物或无机材料如硅质二氧化硅(siliceous silicas),和其它成分如羊毛脂。

[0108] 药物剂量单位中本发明化合物的口服剂量将是一种有效的,无毒的量,优选为选自 0.001-100mg/kg 范围的活性化合物,优选 0.001-50mg/kg。当治疗有类固醇反应性皮肤病治疗需要的人类患者时,所选择的剂量优选每日 1-6 次给药。对于人类给药的口服剂量单位适宜包含 0.05 至 350mg,适宜为 0.1 至 300mg,适宜为 5 至 250mg 的活性化合物。

[0109] 给药的理想剂量可以被本领域技术人员容易地确定,并且将随使用中的特定的化合物、制剂的强度、给药方式和疾病状况的进展而不同。取决于所治疗的具体患者的其他因素将导致需要调整剂量,所述的因素包括患者年龄、体重、饮食和给药时间。

[0110] 在哺乳动物(包括人)中治疗类固醇反应性皮肤病的本发明的方法,包括给药有此需要的患者治疗有效量的化合物 A 或其药学上可接受的盐、化合物 B、或化合物 C。

[0111] 本发明涉及化合物 A 或其药学上可接受的盐、化合物 B、或化合物 C 在治疗哺乳动物(包括人)中类固醇反应性皮肤病中的用途。

[0112] 本发明涉及体内给药化合物 A 或其药学上可接受的盐、化合物 B、或化合物 C,以在哺乳动物(包括人)中治疗类固醇反应性皮肤病。

[0113] 本发明还提供化合物 A 或其药学上可接受的盐、化合物 B、或化合物 C 在制备用于治疗哺乳动物（包括人）中类固醇反应性皮肤病的药物中的用途。

[0114] 本发明还提供化合物 A 或其药学上可接受的盐、化合物 B、或化合物 C 在制备用于治疗的药物中的用途。

[0115] 本发明还提供药物组合物，其用于治疗类固醇反应性皮肤病，其包含化合物 A 或其药学上可接受的盐、化合物 B、或化合物 C 和药学上可接受的载体。

[0116] 此外，本发明的药物活性化合物可与其他活性成分，例如其他已知能治疗类固醇反应性皮肤病的化合物共同给药。

[0117] 在未进一步说明下，应相信本领域技术人员可利用前述说明，利用本发明至最大程度。因此，下列实施例仅供说明，且未以任何方式限制本发明范围。

[0118] 实验细节

[0119] 实施例 1- 胶囊混合物

[0120] 本发明给药的口服剂型通过按照下表 3 中所示比例将各成分填充至标准的两片式硬明胶胶囊中来制备。

[0121] 表 3

[0122]

成分	量
N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺盐酸盐	25 mg
甘露醇	55 mg
滑石	16 mg
硬脂酸镁	4 mg

[0123] 实施例 2 - 可注射肠胃外组合物

[0124] 本发明给药的注射用剂型可通过以下方法制备：在 10 体积% 的丙二醇的水溶液中搅拌 1.5 重量% 的 N-{(1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺。

[0125] 实施例 3 - 片剂组合物

[0126] 将如下表 4 所示的蔗糖、微晶纤维素和本发明的化合物，依所示的比例，与 10% 明胶溶液混合并造粒。将湿颗粒过筛、干燥、与淀粉、滑石和硬脂酸混合，然后过筛并压制成片剂。

[0127] 表 4

[0128]

成分	量
N-{(1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基}-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺盐酸盐	20 mg
微晶纤维素	30 mg
蔗糖	4 mg
淀粉	2 mg
滑石	1 mg
硬脂酸	0.5 mg

[0129] 实施例 4 局部用组合物 #1

[0130] 将硬脂醇 (60g) 加热至 80°C。将 USP 橄榄油 (940g) 加热至相同温度。在 80°C，将硬脂醇加至已预热的橄榄油中。将 20g 甘油、20g 三硬脂精、1g 的抗氧化剂混合物搅拌加入。将 1g 的 N-((1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基)-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺加入，并将混合物倒至容器 (25g 试管) 中，并让其自然冷却。当混合物冷却至环境温度时，会逐渐变成半固体。

[0131] 实施例 5 局部用组合物 #2

[0132] 将二十二醇 (10g) 加热至 80°C。将轻石蜡油 (90g) 加热至相同温度。在 80°C，将二十二醇加至预热的油。将 1g 的 N-((1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基)-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺盐酸盐加入，并将混合物倒至容器 (5g 试管) 中，并让其自然冷却。当混合物冷却至环境温度时，会逐渐变成半固体。

[0133] 实施例 6 局部用组合物 #3

[0134] 将二十二酸 (10g) 加热至 80°C。将轻石蜡油 (90g) 加热至相同温度。在 80°C，将二十二酸加至预热的油。将 10g 的甘油、10g 三硬脂精和 1g 的抗氧化剂混合物搅拌加入。将 1g 的 N-((1S)-2-氨基-1-[(3,4-二氟苯基)甲基]乙基)-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-咪喃甲酰胺加入，并将混合物倒至容器 (5g 试管) 中，并让其自然冷却。当混合物冷却至环境温度时，会逐渐变成半固体。

[0135] 实施例 7 - 局部用组合物 #4

[0136] 将 12-羟基硬脂酸 (10g) 加热至 80°C。将轻石蜡油 (90g) 加热至相同温度。在 80°C，将 12-羟基硬脂酸加至预热的油。将 10g 甘油，10g 三硬脂精和 1g 的抗氧化剂混合物搅拌加入。将 2.4g 的 N-((1S)-2-氨基-1-[(3-氟苯基)甲基]乙基)-5-氯-4-(4-氯-1-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-噻吩甲酰胺盐酸盐加入，并将混合物倒至容器 (10g 试管) 中，并让其自然冷却。当混合物冷却至环境温度时，会逐渐变成半固体。

[0137] 虽然本发明的优选实施方式由上文说明，应理解本发明不受限制于本文公开的精确的指示，并保留权利要求范围内的所有修改的权利。