



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102695510 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 26

(21) 申请号 201080042735. 0

代理人 王达佐 阴亮

(22) 申请日 2010. 08. 10

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 31/535(2006. 01)

61/232, 741 2009. 08. 10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/045052 2010. 08. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02011/019737 EN 2011. 02. 17

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 艾伦·S·韦克曼

鲁克曼尼·特拉特兰迪普

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

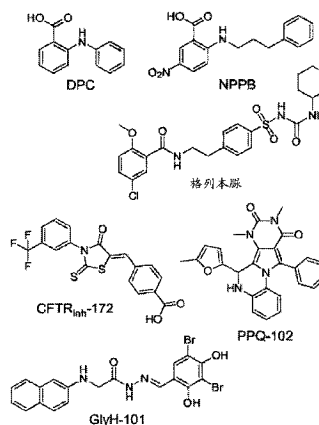
权利要求书 8 页 说明书 65 页 附图 7 页

(54) 发明名称

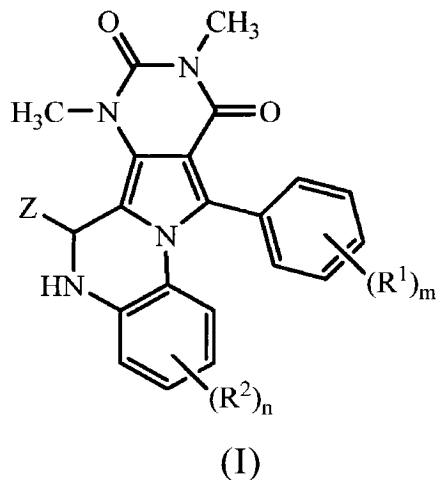
囊性纤维化跨膜传导调节蛋白的嘧啶并-吡咯并-喹喔啉二酮抑制剂及其用途

(57) 摘要

本文提供了嘧啶并-吡咯并-喹喔啉二酮 (PPQ) 化合物, 以及包含这些化合物的组合物, 所述化合物抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)- 介导的离子运输, 并用于治疗与异常增加的 CFTR 氯化物通道活性有关的疾病和病症。将本文所述的化合物和包含所述化合物的组合物用于治疗与异常增加的 CFTR 活性有关的疾病、病症以及疾病、病症和疾病状态的后遗症, 例如多囊肾病。化合物可以用于抑制患有 多囊肾病的个体的囊肿扩张或防止囊肿形成。



1. 药物组合物,其包含生理可接受的赋形剂和具有下列结构的化合物,其分离的对映异构体或对映异构体的外消旋混合物,或者其药物可接受的盐、水合物、溶剂化物、N-氧化物或前药:



其中:

m 为 1、2、3、4 或 5;

n 为 1、2、3 或 4;

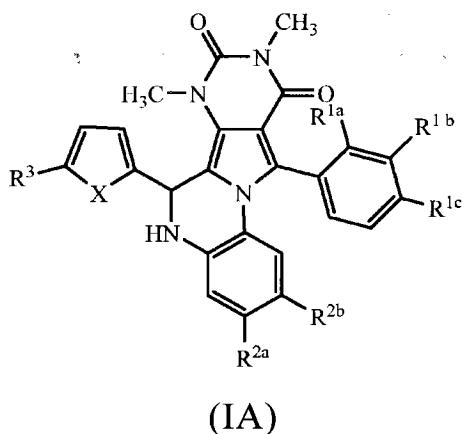
每一  $R^1$  相同或不同,并且独立地为氢、烷基、卤素或烃氧基;

每一  $R^2$  相同或不同,并且独立地为氢、烷基、卤素或烃氧基;以及

Z 为芳基或杂芳基,

其中所述化合物能够抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 介导的离子运输。

2. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中 Z 为杂芳基,并且所述化合物、其分离的对映异构体或对映异构体的外消旋混合物,或者其药物可接受的盐、水合物、溶剂化物、N-氧化物或前药具有下列结构 (IA):



其中:

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、烷基、卤素或烃氧基;

$R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、烷基、卤素或烃氧基;

$R^3$  为氢或烷基,以及

X 为 -O- 或 -S-,

其中所述化合物能够抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 介导的离子运输。

3. 如权利要求 2 所述的药物组合物, 其中:

X 为 -O-,

R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup> 和 R<sup>1c</sup> 各自相同或不同, 并且独立地为氢、烷基、卤素或烃氧基;

R<sup>2a</sup> 和 R<sup>2b</sup> 各自相同或不同, 并且独立地为氢或烷基; 以及

R<sup>3</sup> 为氢或烷基。

4. 如权利要求 3 所述的药物组合物, 其中:

R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup> 和 R<sup>1c</sup> 各自相同或不同, 并且独立地为氢、C<sub>1-6</sub> 烷基、卤素或 C<sub>1-6</sub> 烃氧基;

R<sup>2a</sup> 和 R<sup>2b</sup> 各自相同或不同, 并且独立地为氢或 C<sub>1-6</sub> 烷基; 以及

R<sup>3</sup> 为氢或 C<sub>1-6</sub> 烷基。

5. 如权利要求 4 所述的药物组合物, 其中:

R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup> 和 R<sup>1c</sup> 各自相同或不同, 并且独立地为氢、甲基、氯、氟或甲氧基;

R<sup>2a</sup> 和 R<sup>2b</sup> 各自相同或不同, 并且独立地为氢或甲基; 以及

R<sup>3</sup> 为氢或甲基。

6. 如权利要求 5 所述的药物组合物, 其中所述结构 (IA) 的化合物选自:

7,9- 二甲基 -11-(3- 甲基苯基) -6-(5- 甲基呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

7,9- 二甲基 -11- 苯基 -6-(5- 甲基呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

7,9- 二甲基 -11-(2- 甲基苯基) -6-(5- 甲基呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

2,3,7,9- 四甲基 -11- 苯基 -6-(5- 甲基呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

2,3,7,9- 四甲基 -11-(2- 氟苯基) -6-(5- 甲基呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

7,9- 二甲基 -11-(3- 甲基苯基) -6-(呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

2,3,7,9- 四甲基 -11- 苯基 -6-(呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

7,9- 二甲基 -11-(2- 甲基苯基) -6-(呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

7,9- 二甲基 -11-(4- 甲氧基苯基) -6-(5- 甲基呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

7,9- 二甲基 -11-(4- 甲基苯基) -6-(5- 甲基呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮;

7,9- 二甲基 -11-(4- 氯苯基) -6-(5- 甲基呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮; 以及

7,9- 二甲基 -11- 苯基 -6-(5- 呋喃 -2- 基) -5,6- 二氢 - 嘧啶并 [4', 5' -3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹啉 -8,10-(7H,9H)- 二酮。

7. 如权利要求 2 所述的药物组合物, 其中:

X 为 -S-

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基;

$R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢或烃基; 以及

$R^3$  为氢或烃基。

8. 如权利要求 7 所述的药物组合物, 其中:

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、 $C_{1-6}$  烃基、卤素或  $C_{1-6}$  烃氧基;

$R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢或  $C_{1-6}$  烃基; 以及

$R^3$  为氢或  $C_{1-6}$  烃基。

9. 如权利要求 8 所述的药物组合物, 其中:

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、甲基、氯、氟或甲氧基;

$R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢或甲基; 以及

$R^3$  为氢或甲基。

10. 如权利要求 9 所述的药物组合物, 其中所述结构 (IA) 的化合物选自:

7,9-二甲基-11-苯基-6-(噁吩基-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

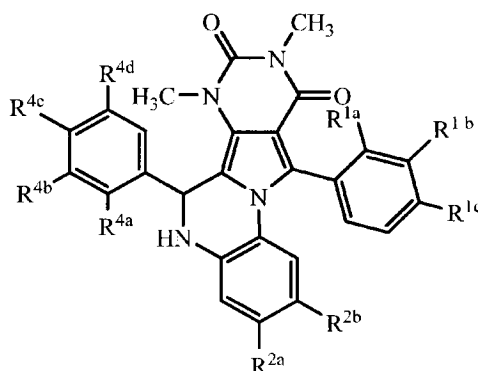
7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(噁吩基-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(噁吩基-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(噁吩基-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮; 以及

7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(噁吩基-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮。

11. 如权利要求 1 所述的药物组合物, 其中 Z 为任选取代的苯基, 所述化合物, 其分离的对映异构体或对映异构体的外消旋混合物, 或者其药物可接受的盐、水合物、溶剂化物、N-氧化物或前药具有下列结构 (IB):



(IB)

其中:

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基;

$R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基; 以及

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$  和  $R^{4d}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、烃基、烯基、卤素、烃氧基、硝基或

羟基；

其中所述化合物能够抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 介导的离子运输。

12. 如权利要求 11 所述的药物组合物, 其中:

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、烷基、卤素或烷氧基;

$R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢或烷基; 以及

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$  和  $R^{4d}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、烷基、烯基、卤素、烷氧基、硝基或羟基。

13. 如权利要求 12 所述的药物组合物, 其中:

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、 $C_{1-6}$  烷基、卤素或  $C_{1-6}$  烷氧基;

$R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢或  $C_{1-6}$  烷基; 以及

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$  和  $R^{4d}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、 $C_{1-6}$  烷基、卤素、 $C_{1-6}$  烷氧基、硝基或羟基。

14. 如权利要求 13 所述的药物组合物, 其中:

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、甲基、氯、氟或甲氧基;

$R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢或甲基; 以及

$R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$  和  $R^{4d}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、甲基、氯、氟、甲氧基、硝基或羟基。

15. 如权利要求 14 所述的药物组合物, 其中所述结构 (IB) 的化合物选自:

7,9-二甲基-11-苯基-6-(2,3-二氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-苯基-6-(3-硝基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-苯基-6-(3-甲氧基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-苯基-6-(2-氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-苯基-6-苯基-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-苯基-6-(4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-苯基-6-(2-甲氧基-4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3-甲氧基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(3-甲氧基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(2-氟-3-硝基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-硝基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(3-氯苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(2-氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-甲氧基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-甲基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-苯基-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3-氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(4-甲基苯基)-6-(2-羟基-4-甲基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(2,3-二氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(3-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(3,4-二羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3-硝基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-苯基-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(3-氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(2-乙氧基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,

4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-苯基 -6-(3-甲基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(2-氟苯基) -6-(4-氟苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(2-甲基苯基) -6-(2-氟苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

2,3,7,9-四甲基 -11-苯基 -6-(2,4-二羟基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

2,3,7,9-四甲基 -11-苯基 -6-(2,3-二羟基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(2-氟苯基) -6-(4-甲基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(3-甲基苯基) -6-(4-氟苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-苯基 -6-(3-氟苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-苯基 -6-(3-羟基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(3-甲基苯基) -6-(3-甲氧基 -4-羟基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(2-甲基苯基) -6-(3-羟基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(3-甲基苯基) -6-(3,4-二羟基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(2-氟苯基) -6-(2,4-二氟苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(3-甲基苯基) -6-(2-甲氧基 -4-羟基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(3-甲基苯基) -6-(2-羟基 -5-甲氧基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

2,3,7,9-四甲基 -11-苯基 -6-(2,5-二羟基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-苯基 -6-(3-甲氧基 -4-羟基苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-苯基 -6-(4-氟苯基) -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基 -11-(3-甲基苯基) -6-苯基 -5,6-二氢 -嘧啶并 [4',5'-3,4] 吡咯并 [1,2-a] 喹喔啉 -8,10-(7H,9H)-二酮;

7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮;以及

7,9-二甲基-11-(4-甲氧基苯基)-6-(2,3-二氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮。

16. 如权利要求1所述的药物组合物,其中Z为任选取代的1,3-苯并间二氧杂环戊烯基;

每一R<sup>1</sup>相同或不同,并且独立地为氢、烷基、卤素或烃氧基;以及

每一R<sup>2</sup>相同或不同,并且独立地为氢或烷基。

17. 如权利要求16所述的药物组合物,其中每一R<sup>1</sup>相同或不同,并且独立地为氢、C<sub>1-6</sub>烷基、卤素或C<sub>1-6</sub>烃氧基;以及

每一R<sup>2</sup>相同或不同,并且独立地为氢或C<sub>1-6</sub>烷基。

18. 如权利要求16所述的药物组合物,其中每一R<sup>1</sup>相同或不同,并且独立地为氢、甲基、氯、氟或甲氧基;

并且每一R<sup>2</sup>相同或不同,并且独立地为氢或甲基。

19. 如权利要求16所述的药物组合物,其中所述化合物为7,9-二甲基-11-苯基-6-(1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮或者7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮。

20. 抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)-介导的离子运输的方法,所述方法包括在一定条件下使(a)包含CFTR的细胞与(b)权利要求1所述的药物组合物接触,并持续足以允许CFTR和所述化合物相互作用的时间,从而抑制所述CFTR-介导的离子运输。

21. 抑制囊肿形成或抑制囊肿扩大的方法,所述方法包括在一定条件下使(a)包含CFTR的细胞与(b)权利要求1所述的药物组合物接触,并持续足以允许CFTR和所述化合物相互作用的时间,其中所述化合物抑制CFTR-介导的离子运输。

22. 治疗多囊肾病的方法,其包括向个体给予权利要求1所述的组合物。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述多囊肾病为常染色体显性多囊肾病或常染色体隐性多囊肾病。

24. 用于可通过抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)-介导的离子运输而为可治疗的疾病、疾病状态或病症的治疗方法,所述方法包括向个体给予权利要求1所述的药物组合物,从而抑制CFTR-介导的离子运输。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述疾病、疾病状态或病症选自多囊肾病、异常增加的肠液分泌和分泌性腹泻。

26. 如权利要求25所述的方法,其中所述分泌性腹泻(a)由肠病原体而导致;(b)由肠毒素而诱导;或者为(c)溃疡性结肠炎、肠易激综合征(IBS)、AIDS、化疗或肠病毒感染的后遗症。

27. 权利要求1至19中任一权利要求所述的药物组合物在治疗选自多囊肾病、异常增加的肠液分泌和分泌性腹泻的疾病、疾病状态或病症中的用途。

28. 权利要求1至19中任一权利要求所述的药物组合物在制备用于治疗选自多囊肾

病、异常增加的肠液分泌和分泌性腹泻的疾病、疾病状态或病症的药物中的用途。

29. 用于治疗选自多囊肾病、异常增加的肠液分泌和分泌性腹泻的疾病、疾病状态或病症的权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的药物组合物。

## 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白的嘧啶并 - 吡咯并 - 喹喔啉 二酮抑制剂及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 8 月 10 日提交的第 61/232,741 号美国临时申请的优先权,所述申请以引用形式以其整体并入本文中。

[0003] 政府权利声明

[0004] 本发明是基于国立卫生研究院授予的授权号为 P30DK72517、R01HL73856 和 R37DK35124 的政府支持下而进行的。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 背景

[0006] 领域

[0007] 亟需用于治疗与异常囊性纤维化跨膜传导调节蛋白 (CFTR) - 介导的离子运输有关的疾病和病症 (例如多囊肾病、增加的肠液分泌和分泌性腹泻) 的疗法。本文描述了为 CFTR 活性的强效抑制剂并且可用于治疗这类疾病和病症的小分子化合物。

[0008] 相关领域的描述

[0009] 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白 (CFTR) 是在哺乳动物气道、肠、胰腺和睾丸中的上皮细胞中表达的 cAMP- 激活的氯 ( $\text{Cl}^-$ ) 通道 (参见例如, Sheppard 等人, *Physiol. Rev.* 79 : S23-45(1999) ;Gadsby 等人, *Nature* 40 :477-83(2006))。诸如  $\beta$  - 肾上腺素激动剂的激素,或诸如霍乱毒素的毒素导致 cAMP 增加、cAMP- 依赖性蛋白激酶激活以及 CFTR  $\text{Cl}^-$  通道磷酸化,这导致该通道打开。细胞  $\text{Ca}^{2+}$  的增加也能够激活不同的顶膜通道。蛋白激酶 C 的磷酸化能够打开或者关闭顶膜的  $\text{Cl}^-$  通道。CFTR 多数位于上皮细胞,其提供  $\text{Cl}^-$  离子横跨顶膜移动的通路并提供用于调节跨上皮细胞的盐和水运输速率的关键点。

[0010] CFTR 氯通道功能与包括囊性纤维化 (CF) 在内的众多疾病有关,并且与某些形式的男性不育症、多囊肾病和分泌性腹泻有关。囊性纤维化是由 CFTR 突变导致的遗传性致死性疾病 (参见例如, Quinton, *Physiol. Rev.* 79 :S3-S22(1999) ;Boucher, *Eur. Respir. J.* 23 :146-58(2004))。对患有 CF 的人类患者和 CF 的小鼠模型观察显示 CFTR 在肠和胰腺液体运输以及男性生育能力中的功能重要性 (Grubb 等人, *Physiol. Rev.* 79 : S193-S214(1999) ;Wong, PY., *Mol. Hum. Reprod.* 4 :107-110(1997))。CFTR 还在肠道的肠上皮细胞和多囊肾病的囊肿上皮细胞中表达 (参见例如, O' Sullivan 等人, *Am. J. Kidney Dis.* 32 :976-983(1998) ;Sullivan 等人, *Physiol. Rev.* 78 :1165-91(1998) ;Strong 等人, *J. Clin. Invest.* 93 :347-54(1994) ;Mall 等人, *Gastroenterology* 126 :32-41(2004) ;Hanaoka 等人, *Am. J. Physiol.* 270 :C389-C399(1996) ;Kunzelmann 等人, *Physiol. Rev.* 82 : 245-289(2002) Davidow 等人, *Kidney Int.* 50 :208-18(1996) Li 等人, *Kidney Int.* 66 : 1926-38(2004) ;Al-Awqati, *J. Clin. Invest.* 110 :1599-1601(2002) ;Thiagarajah 等人, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3 :594-99(2003))。

[0011] 多囊肾病 (PKD) 的特征为大规模扩大损害正常肾实质并导致肾衰竭的肾小管起源的流体填充囊肿 (Arnaout, *Annu Rev Med* 52 :93-123,2001 ;Gabow *N Engl J Med* 329 : 332-342,1993 ;Harris 等人, *Mol Genet Metab* 81 :75-85,2004 ;Wilson *N Engl J Med*

350 :151-164,2004 ;Sweeney 等人, Cell Tissue Res 326 :671-685,2006 ;Chapman J Am Soc Nephrol 18 :1399-1407,2007)。人类常染色体显性 PKD (ADPKD) 是由两种基因中的一种突变而导致的,所述基因为分别编码相互作用蛋白多囊蛋白 -1 和多囊蛋白 -2 的 PKD1 和 PKD2 (Wilson, supra ;Qian 等人, Cell 87 :979-987,1996 ;Wu 等人, Cell 93 :177-188,1998 ;Watnick 等人, Torres 等人, Nat Med 10 :363-364,2004 Nat Genet 25 :143-144,2000)。PKD 的囊肿生长需要将液体分泌入与上皮细胞增生连接的囊肿腔 (cyst lumen)。

[0012] 已经发现了若干 CFTR 抑制剂,虽然许多表现出弱效能并缺乏 CFTR 特异性。口服降血糖药格列本脲以高微摩尔级浓度通过打开的通道阻滞机制而抑制 CFTR  $Cl^-$  从细胞内侧传导 (Sheppard 等人, J. Physiol, 503 :333-346 (1997) ;Zhou 等人, J. Gen. Physiol. 120 :647-62 (2002)), 其中其影响其它  $Cl^-$  和钙通道 (Edwards & Weston, 1993 ; Rabe 等人, Br. J. Pharmacol. 110 :1280-81 (1995) ;Schultz 等人, Physiol. Rev. 79 :S109-S144 (1999))。包括二苯基胺 -2- 羧酸酯 (DPC)、5- 硝基 -2 (3- 苯基丙基 - 氨基) 苯甲酸酯 (NPPB) 和氟灭酸在内的其它非选择性阴离子运输抑制剂也通过在细胞内位点堵塞孔隙而抑制 CFTR (Dawson 等人, Physiol. Rev. , 79 :S47-S75 (1999) ;McCarty, J. Exp. Biol, 203 :1947-62 (2000))。

[0013] 高亲和力 CFTR 抑制剂在分泌性腹泻治疗中还具有临床应用。细胞培养和动物模型显示肠毒素介导的分泌性腹泻中的肠氯化物分泌主要通过 CFTR 而发生 (参见例如, Clarke 等人, Science 257 :1125-28 (1992) ;Gabriel 等人, Science 266 :107-109 (1994) ;Kunzelmann 和 Mall, Physiol. Rev. 82 :245-89 (2002) ;Field, M. J. Clin. Invest. 111 :931-43 (2003) ;和 Thiagarajah 等人, Gastroenterology 126 :511-519 (2003))。

[0014] 儿童腹泻疾病是全球健康关注点 :在儿童中每年发生约四十亿例病例,导致至少二百万人死亡。旅游者腹泻每年影响了约六百万人。抗生素通常用于治疗腹泻 ;然而,抗生素对治疗许多病原体无效,并且使用这些药物导致在其它病原体中抗生素耐药性发展。液体损失的口服更新也通常用于治疗腹泻,但是主要是缓解剂。旨在减少肠液体分泌的治疗 (“抗分泌治疗”) 具有克服现有疗法限制的潜力。

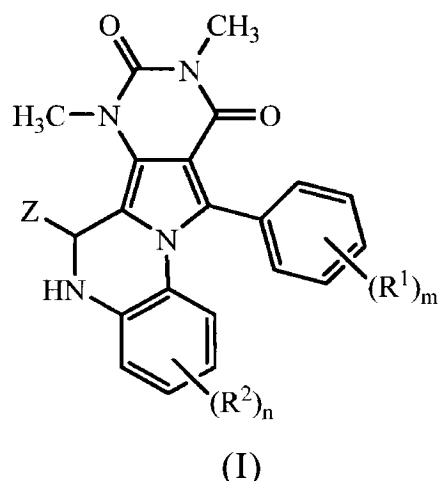
[0015] 现在亟需 CFTR 抑制剂,特别是安全的、不能吸收的、高效能的、便宜的并且化学稳定的那些。

[0016] 简述

[0017] 简言之,本文提供了嘧啶并 - 吡咯并 - 喹啉二酮 (PPQ) 化合物和包含所述化合物的组合物,所述化合物抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 介导的离子运输并且用于治疗与异常增加的 CFTR 氯通道活性有关的疾病和病症。本文所述的为高效 CFTR 抑制剂的 PPQ 化合物和包含这些化合物的组合物可用于治疗通过抑制 CFTR- 介导的离子运输而为治疗的疾病和病症。提供了抑制肾囊肿扩大或者预防或抑制囊肿形成并由此治疗多囊肾病的方法。还提供了治疗与异常增加的肠液分泌有关的疾病和病症的方法,所述疾病和病症例如分泌性腹泻和旅游者腹泻。

[0018] 因此,本文提供了药物组合物,其包含生理可接受的赋形剂和具有下列结构 (I) 的化合物,其分离的对映异构体或对映异构体的外消旋混合物,或者其药物可接受的盐、水合物、溶剂化物、N- 氧化物或前药 :

[0019]



[0020] 其中：

[0021] m 为 1、2、3、4 或 5；

[0022] n 为 1、2、3 或 4；

[0023] 每一  $R^1$  相同或不同，并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基；

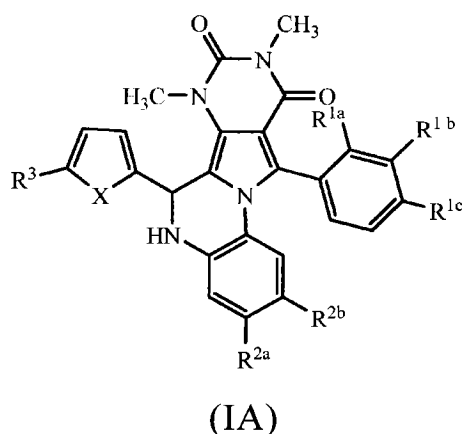
[0024] 每一  $R^2$  相同或不同，并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基；以及

[0025] Z 为芳基或杂芳基，

[0026] 其中所述化合物能够抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)- 介导的离子运输。

[0027] 本文还提供了药物组合物，其包含生理学可接受的赋形剂和具有下列结构 (IA) 的化合物，其分离的对映异构体或对映异构体的外消旋混合物，或者其药物可接受的盐、水合物、溶剂化物、N-氧化物或前药：

[0028]



[0029] 其中：

[0030]  $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同，并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基；

[0031]  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同，并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基；

[0032]  $R^3$  为氢或烃基，以及

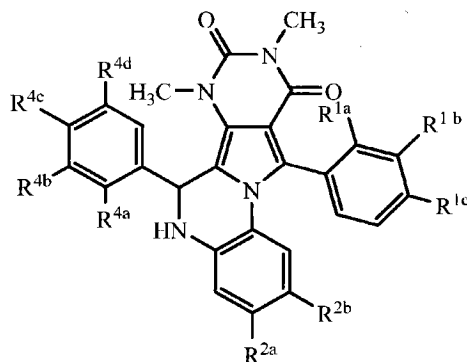
[0033] X 为 -O- 或 -S-，

[0034] 其中所述化合物能够抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)- 介导的离子运输。

[0035] 本文还提供了药物组合物，其包含生理学可接受的赋形剂和具有下列结构 (IB)

的化合物,其分离的对映异构体或对映异构体的外消旋混合物,或者其药物可接受的盐、水合物、溶剂化物、N-氧化物或前药:

[0036]



(IB)

[0037] 其中:

[0038]  $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、烷基、卤素或炔氧基;

[0039]  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、烷基、卤素或炔氧基;

[0040]  $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$  和  $R^{4d}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、烷基、烯基、卤素、炔氧基、硝基或羟基;

[0041] 其中所述化合物能够抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)-介导的离子运输。

[0042] 本文还提供了抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)-介导的离子运输的方法,所述方法包括在一定条件下使 (a) 包含 CFTR 的细胞和 (b) 包含生理学可接受的赋形剂和结构 (I)、结构 (IA) 和 (IB) 以及上述和本文所述的具体结构中的任意一个的化合物的组合物接触,并且持续足以允许 CFTR 和所述化合物相互作用的时间,由此物抑制 CFTR-介导的离子运输。

[0043] 本文还提供了抑制囊肿形成或抑制囊肿扩大的方法,所述方法包括在一定条件下使 (a) 包含 CFTR 的细胞和 (b) 包含生理学可接受的赋形剂和结构 (I)、结构 (IA) 和 (IB) 以及上述和本文所述的具体结构中的任意一个的化合物的组合物接触,并且持续足以允许 CFTR 和所述化合物相互作用的时间,其中该化合物抑制 CFTR-介导的离子运输。

[0044] 本文还提供了治疗多囊肾病的方法,所述方法包括向个体给予包含生理学可接受的赋形剂和结构 (I)、结构 (IA) 和 (IB) 以及上述和本文所述的具体结构中的任意一个的化合物的组合物。在这样的方法中,多囊肾病为常染色体显性多囊肾病或常染色体隐性多囊肾病。

[0045] 本文还提供了治疗通过抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)-介导的离子运输而为可治疗的疾病、疾病状态或病症的方法,所述方法包括向个体给予本文所述的包含生理学可接受的赋形剂和结构 (I)、结构 (IA) 和 (IB) 以及上述和本文所述的具体结构中的任意一个的化合物的药物组合物,由此抑制 CFTR-介导的离子运输。在这样的方法中,所述疾病、疾病状态或病症能够选自多囊肾病、异常增加的肠液分泌和分泌性腹泻。更具体地,分泌性腹泻为 (a) 由肠病原体而导致;(b) 由肠毒素而诱导;或者 (c) 溃疡性结肠炎、肠易激综合征 (IBS)、AIDS、化疗或肠病毒感染的后遗症。

[0046] 本文还提供了包含生理学可接受的赋形剂和结构 (I)、结构 (IA) 和 (IB) 以及上述和本文所述的具体结构中的任意一个的化合物的药物组合物在用于治疗选自多囊肾病、异常增加的肠液分泌和分泌性腹泻的疾病、疾病状态或病症中的用途。本文还提供了包含生理学可接受的赋形剂和结构 (I)、结构 (IA) 和 (IB) 以及上述和本文所述的具体结构中的任意一个的化合物的药物组合物在用于制备治疗选自多囊肾病、异常增加的肠液分泌和分泌性腹泻的疾病、疾病状态或病症的药物中的用途。在另一实施方案中,提供了在治疗选自多囊肾病、异常增加的肠液分泌和分泌性腹泻的疾病、疾病状态或病症中使用的包含生理学可接受的赋形剂和结构 (I)、结构 (IA) 和 (IB) 以及上述和本文所述的具体结构中的任意一个的化合物的药物组合物。

[0047] 如本文和附属权利要求中所用的,除非本文另外明确指出,单数形式“a(一个)”、“an(一个)”、“the(一个)”包括复数指代物。因此,例如,提及“试剂”时包括这类试剂的复数,并且提及“a cell(细胞)”“the cell(细胞)”时包括本领域技术人员已知的提及一个或多个细胞及其等价物(例如,许多细胞)等。类似地,除非本文另外明确指出,提及“化合物”或“组合物”时包括这类化合物或组合物的复数,并且分别是指一种或多种化合物或组合物。当是指数字或数字范围时,术语“约”是指所指的数字或数字范围是实验变化值内(或统计实验误差内)的近似值,所以该数字或数字范围可以在指出的数字或数字范围的1%至15%内变化。术语“包含(comprising)”(和诸如“包含(comprise)”或“包含(comprises)”或“具有(having)”或“包含(including)”的相关术语)不意图排除在某些其它实施方案中,例如本文所述的任意物质的组合物、组合物、方法或过程等的实施方案可以“由所述特征组成”或“基本由所述特征组成”。

[0048] 附图简述

[0049] 图 1A 和 1B:图 1A 表示 CFTR 抑制剂的化学结构:本文更详细描述的二苯基胺-2-羧酸酯(DPC);5-硝基-2-(3-苯基丙基-氨基)苯甲酸酯(NPPB);格列本脲;CFTR<sub>inh</sub>-172 命名的噻唑啉二酮化合物;GlyH-101 命名的甘氨酸酰肼,以及 PPQ-102 命名的 PPQ 化合物。图 1B 表示来自筛选检验的典型数据。在包含表达人类 CFTR 和 YFP(黄色荧光蛋白)卤化物传感器 YFP-H148Q/I152L 的 FRT 细胞的 96 孔板中进行基于细胞的筛选。主要通过激动剂混合物刺激 CFTR,并且以 YFP 荧光淬灭形式检测 CFTR-介导的碘化物流入。在缺少激动剂(没有激活物)和存在激动剂时由各个孔示出负对照(单独的 DMSO 介质),正对照(10 μM CFTR<sub>inh</sub>-172)和测试化合物(25 μM 处)的荧光数据(显示示例性钝性化合物和活性化合物的数据)。

[0050] 图 2A 和 2B 分别显示 PPQ-102 的结构活性分析和合成的概述。图 2A:结构活性分析的概述,列出了由 CFTR 氯化物传导的 PPQ 抑制剂共有的结构决定因素。图 2B:PPQ-102(化合物 7)和 PPQ-102B(化合物 8)的合成。反应物和条件:(a)Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,NaOH,40°C,4h,43%;(b)PhCOCl,ZnCl<sub>2</sub>,甲苯,回流,6h,28%;(c)Br<sub>2</sub>,CHCl<sub>3</sub>,室温,2h,57%;(d)N-(2-氨基苯基)乙酰胺,微波,170°C,1h,51%;(e)HCl,回流,6h,67%;(f)5-Me-呋喃-2-甲醛,170°C,10min,43%;(g)KMnO<sub>4</sub>,Me<sub>2</sub>CO,1h,40%。

[0051] 图 3A-E 表示证明由 PPQ-102 进行 CFTR 抑制的数据。图 3A:在存在跨膜氯化物梯度和具有基底膜的两性霉素 B 透化作用的情况下,在 CFTR 表达 FRT 细胞中检测的顶膜电流。随着所示添加的 PPQ-102 浓度的增加,通过 CPT-cAMP(氯苯基硫代-cAMP)(100 μM)激

活 CFTR。左侧：原始记录。右侧：剂量-应答 (S. E.  $n = 4$ )。图 3B：图 3A 所示的检测，但是用芹菜昔配基 (100  $\mu\text{M}$ ) 或 IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) 作为激动剂。该数据为 3 组实验的代表。图 3C：在 T84 (左侧) 和人类支气管气道上皮细胞 (右侧) 中检测的短路电流。主要通过 10  $\mu\text{M}$  福斯高林和 100  $\mu\text{M}$  IBMX (“forsk”) 激活 CFTR。缺少抑制剂的电流为“对照”。图 3D：通过囊性纤维化 (CFTR- 缺乏) 人类支气管气道上皮细胞中的 UTP (100  $\mu\text{M}$ ) 激活钙激活氯通道，按照标示添加 PPQ-102。通过阿米洛利 (10  $\mu\text{M}$ ) 抑制 ENaC (上皮钠通道)。图 3E：在基础条件下并且在添加 20  $\mu\text{M}$  福斯高林之后，在 CHO-K1 细胞中检验的细胞 cAMP (S. E.  $n = 4$ , 与 PPQ-102 不同，不显著)。

[0052] 图 4A 和 4B 表示 CFTR 的 PPQ-102 抑制的膜片钳分析。图 4A (左侧)：没有和存在 500nM PPQ-102 的情况下，在 0mV 的恒定电压下记录的在 CFTR- 表达的 FRT 细胞中检测的全部细胞电流，以及 20mV 阶跃的在  $\pm 100\text{mV}$  间的电压脉冲。通过 10  $\mu\text{M}$  福斯高林刺激 CFTR。图 4A (右侧)：平均电流的电流/电压 (I/V) 曲线。数据为 4 组检测的代表。图 4B (左侧)：在细胞连接的构造中的单一通道记录。通过 10  $\mu\text{M}$  福斯高林和 100  $\mu\text{M}$  IBMX 激活 CFTR。移液管电压为 +80mV。图 4B (右侧)：1  $\mu\text{M}$  PPQ-102 对 CFTR 通道打开可能性 ( $P_o$ )、平均通道打开时间和平均通道关闭时间的影响 (S. E.,  $n = 3-4$ , \* $P < 0.01$ )。O, 打开; C, 关闭。

[0053] 图 5A-C 例示在 PKD 的胚肾器官培养模型中 PPQ-102 阻止的和逆转的囊肿扩张。在确定成分的培养基中的器官培养物中保持 E13.5 胚肾。图 5A：抑制囊肿形成。图 5A (左侧)：培养物中肾的透射光显微照片。如所标示的，培养基包含 0  $\mu\text{M}$  或 100  $\mu\text{M}$  的 8-Br-cAMP 和 / 或 0  $\mu\text{M}$ 、0.5  $\mu\text{M}$  或 5  $\mu\text{M}$  的 PPQ-102。图 5A (右侧)：4 天后培养物中囊肿占有的部分肾面积所示的囊肿体积的概述 (S. E., 6-8 枚肾，与 +8-Br-cAMP 相比，\* $P < 0.001$ , 0  $\mu\text{M}$  PPQ-102)。图 5B：4 天后培养物中 0 或 100  $\mu\text{M}$  8-Br-cAMP 和标示浓度的 PPQ-102 存在下，苏木精和伊红染液色的肾石蜡切片。对于每一条件在 3 枚肾上进行示例性研究。图 5C：预形成的肾囊肿的逆转。图 5C (左侧)：在 8-Br-cAMP 中培养 3 天，并在第 3 天添加了 5  $\mu\text{M}$  PPQ-102 的肾的透射光显微照片 (每种条件下显示两枚肾)。右侧的显微照片显示未暴露于 PPQ-102 的在第 5 天的肾。图 5C (右侧)：在第 5 天囊肿体积的概述 (S. E., 6 枚肾，\* $P < 0.001$ )。

[0054] 详述

[0055] 本文提供了嘧啶并-吡咯并-喹啉二酮 (PPQ) 化合物，所述化合物抑制了囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 氯通道的活性。本文所述的 PPQ 化合物能够抑制 CFTR- 介导的离子运输 (例如，CFTR- 介导的  $\text{Cl}^-$  运输) (即，抑制 CFTR 传导)。因此，所述化合物和包含所述 PPQ 化合物的组合物用于给予患有或处于患有通过抑制 CFTR 介导的离子运输而为可治疗的疾病、病症或疾病状态的风险中的个体 (即，给予所述化合物和组合物将提供治疗或预防益处)。

[0056] 本文所述的 PPQ 化合物是无电荷的高效 CFTR 抑制剂，并由此为膜电压不敏感的。预测 CFTR 抑制剂延缓多囊肾病 (PKD) 的肾囊肿扩张，其中肾囊肿的液体累积是 CFTR- 依赖性的 (参见例如，Hanaoka 等人，J. Am. Soc. Nephrol. 2000, 11:1179-1187; Brill 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996, 93:10206-10211; Torres 等人，Nat. Clin. Pract. Nephrol. 2006, 2:40-55; O’ Sullivan 等人，Am. J. Kidney Dis. 1998, 32:976-983; Xu 等人，J. Nephrol. 2006, 19:529-534; Cotton 等人，Am. J. Kidney Dis. 1998, 32:1081-1083; Davidow 等人，Kidney Int. 1996, 50:208-218; Li 等人，Kidney Int. 2004, 66:1926-1938)

并且减少分泌性腹泻的肠液损失（参见例如，Thiagarajahet al., Gastroenterol. 2004, 126 :511-519 ;Sonawane 等人, Gastroenterol. 2007, 132 :1234-1244 ;Kunzelmann 等人, Physiol. Rev. 2002, 82 :245-289）。

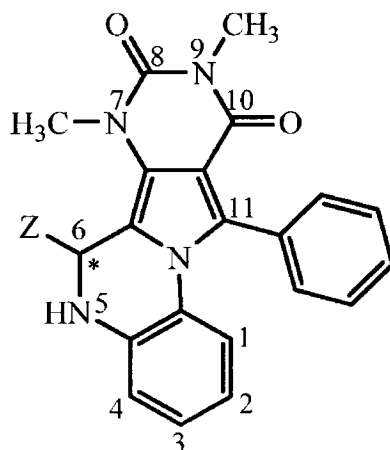
[0057] 前面确认的 CFTR 抑制剂包括格列本脲、二苯基胺-2-羧酸酯 (DPC) 和 5-硝基-2-(3-苯基丙基-氨基) 苯甲酸酯 (NPPB) (参见图 1A) ;然而,这些抑制剂在其行为上是非选择性的并且具有低效能。一项研究报道了通过  $\alpha$ -氨基氮杂杂环-甲基乙二醛加合物进行的强 CFTR 抑制 (参见例如, Routaboul 等人, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007, 322 :1023-1035), 尽管随后 CFTR 抑制没有被确认 (参见例如, Sonawane 等人, J. Pharm. Exper. Ther. 2008, 325 :529-535)。通过高通量筛选已经预先确认了两类改进的 CFTR 抑制剂 (参见例如, 第 7, 235, 573、7, 414, 037 号美国专利 ;第 2008-0064666 号美国专利申请公开 ;Namkung 等人, J. Biol. Chem. 2009, 284 :15916-926 ;Sonawane 等人, FASEB J. 2006, 20 :130-132 ;Sonawane 等人, Bioorg. Med. Chem. 2008, 16 :8187-95 ;Verkman 等人, Nat. Rev. Drug Disc. 2009, 8 :153-171)。噻唑啉二酮 CFTR<sub>inh</sub>-172 化合物 (参见图 1A) 从质膜的细胞质侧起作用以阻止 CFTR 氯传导, 根据细胞类型和膜电位 IC<sub>50</sub> 约为 0.3-3  $\mu$  M (参见例如, Ma 等人, J. Clin. Invest. 2002, 110 :1651-1658)。膜片钳分析表示电压依赖性通道阻滞机制, 其中 CFTR<sub>inh</sub>-172 稳定了通道关闭状态 (参见例如, Taddei 等人, FEBS Lett. 2004, 558 :52-56) ; CFTR 突变表示 CFTR<sub>inh</sub>-172 在位于邻近 CFTR 孔的细胞质入口的精氨酸-347 处相互作用 (参见例如, Caci 等人, Biochem. J. 2008, 413 :135-142)。CFTR<sub>inh</sub>-172 具有低毒性, 经历具有最小新陈代谢的肾排泄, 并且通过肝肠再循环而在肠中累积 (Sonawane 等人, J. Pharm. Sci. 2005, 94 :134-143)。第二化合物种类, 甘氨酸酰肼 (例如, GlyH-101 参见图 1A) 抑制 CFTR, IC<sub>50</sub> 约为 5  $\mu$  M (参见例如, Muanprasat 等人, J. Gen. Physiol. 2004, 124 :125-137 ;第 7, 414, 037 号美国专利)。膜片钳分析显示 GlyH-101 应用后用快速通道微跳进行内部修正氯电流, 这表示外部孔堵塞机制。

[0058] 本文所述的 PPQ 化合物与噻唑啉化合物和甘氨酸酰肼化合物相比提供了某些优势。通过本文所述的 PPQ 化合物进行的 CFTR 活性抑制是电压依赖性的并且由此有利于在内部膜负电位细胞中保持 CFTR 抑制效能。因此, PPQ CFTR 抑制剂可以不进行膜电位-依赖性细胞分隔或效能的降低 (例如通过 IC<sub>50</sub> 增加所表明的)。最有效的 PPQ 化合物抑制 CFTR 氯传导, IC<sub>50</sub> 约为 90nM。不希望受特定理论的显示, 本文所述的 PPQ 化合物稳定了 CFTR 通道关闭状态, 其结合化合物的中性电荷并相对减缓了抑制的时间进程, 这表明化合物在与其孔不同的 CFTR 的细胞质覆盖表面上的位点起作用。示例性 PPQ 化合物阻止囊肿扩张并减少了多囊肾病的新生器官培养模型的预形成囊肿的尺寸。因此, PPQ 化合物可以用于给予患有多囊肾病的患者。

[0059] 嘧啶并-吡咯并-喹啉二酮 (PPQ) 化合物

[0060] 本文所述的 PPQ 化合物共有稠合的四环核结构, 更具体地, 嘧啶并 [4', 5'-3, 4] 吡咯并 [1, 2-a] 喹啉环体系。下面显示结构 (I) 的 PPQ 化合物的稠合环原子的数目体系 :

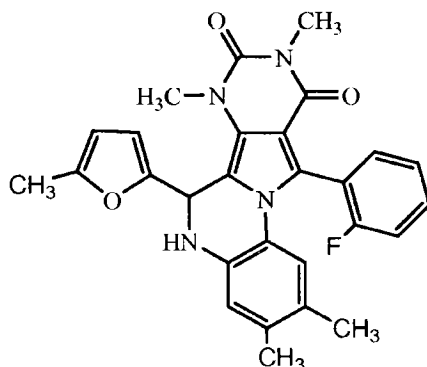
[0061]



[0062] (\*表示手性中心)

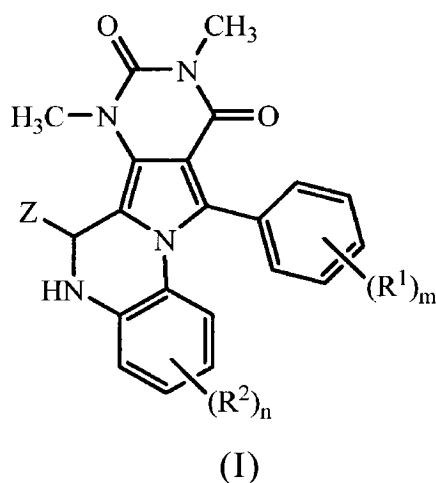
[0063] 例如,下列结构的化合物(PPQ 105)在本文称为2,3,7,9-四甲基-11-(2-氟苯基)-6-(5-甲基咪唑-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮。

[0064]



[0065] 因此,在一个实施方案中,本文提供了下列结构(I)的化合物和包含生理可接受的赋形剂(即,药物可接受的或适当的赋形剂)和结构(I)的化合物,其分离的对映异构体或对映异构体的外消旋混合物,或者其药物可接受的盐、水合物、溶剂化物、N-氧化物或前药的药物组合物:

[0066]



[0067] 其中:

[0068] m为1、2、3、4或5;

[0069] n 为 1、2、3 或 4；

[0070] 每一  $R^1$  相同或不同，并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基；

[0071] 每一  $R^2$  相同或不同，并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基；以及

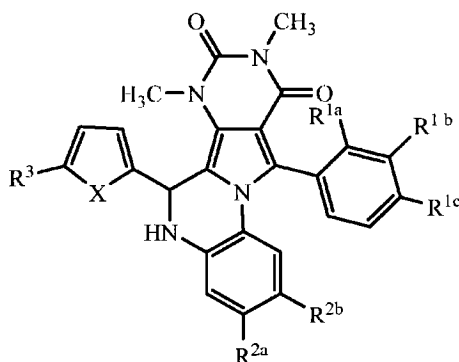
[0072] Z 为芳基或杂芳基，

[0073] 其中所述化合物能够抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)- 介导的离子运输。

[0074] 在某些实施方案中，Z 是芳基并且是任选取代的苯基。在更具体的实施方案中，苯基被至少一个烃基、卤素、烃氧基、硝基或羟基取代。在其它某些实施方案中，Z 是杂芳基，其选自任选取代的咪喃基、任选取代的噻吩基和任选取代的 1,3- 苯并间二氧杂环戊烯基。在更特定的实施方案中，Z 是被烃基任选取代的咪喃基。在另一特定的实施方案中，Z 是被烃基任选取代的噻吩基。在另一特定的实施方案中，Z 是 1,3- 间二氧杂环戊烯-5- 基。

[0075] 在更具体的实施方案中，Z 是杂芳基，其选自任选取代的咪喃基和任选取代的噻吩基，并且下列子结构 (IA) 能够表示结构 (I) 的化合物，所述化合物的分离的对映异构体或对映异构体的外消旋混合物，或者其药物可接受的盐、水合物、溶剂化物、N- 氧化物或前药：

[0076]



(IA)

[0077] 其中：

[0078]  $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同，并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基；

[0079]  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同，并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基；

[0080]  $R^3$  为氢或烃基，以及

[0081] X 为 -O- 或 -S-

[0082] 并且其中所述化合物能够抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)- 介导的离子运输。

[0083] 在某些实施方案中，其中 X 为 -O- (即，Z 为咪喃基)， $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同，并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基；并且  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同，并且独立地为氢或烃基；并且  $R^3$  为氢或烃基。在特定的实施方案中， $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同，并且各自为氢或各自为烃基。在更特定的实施方案中， $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同，并且各自为氢或各自为甲基。

[0084] 在某些实施方案中，其中 X 为 -O- (即，Z 为咪喃基)， $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同，并且独立地为氢、 $C_{1-6}$  烃基、卤素或  $C_{1-6}$  烃氧基；并且  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同，并且独立地为氢或  $C_{1-6}$  烃基；并且  $R^3$  为氢或  $C_{1-6}$  烃基。在特定的实施方案中， $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同，并且

各自为氢或各自为  $C_{1-6}$  烷基。在更特定的实施方案中,  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同, 并且各自为氢或各自为甲基。

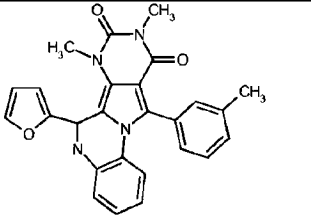
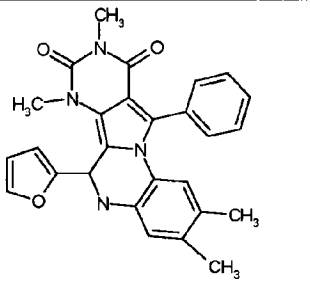
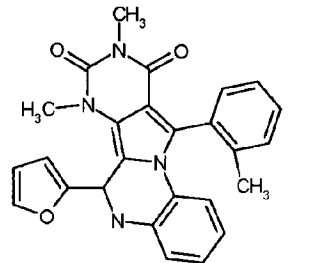
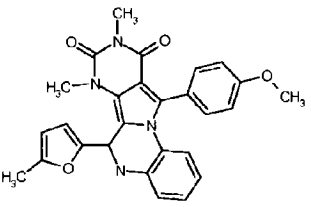
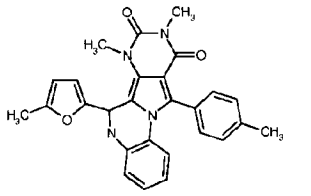
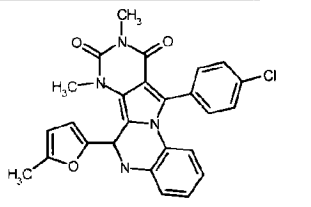
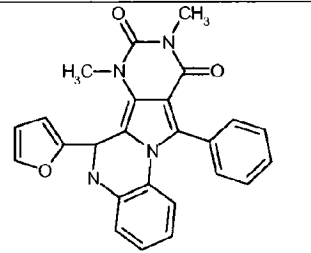
[0085] 在更具体的实施方案中, 其中 X 为 -O- (即, Z 为呋喃基),  $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、甲基、氯、氟或甲氧基; 并且  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢或甲基; 并且  $R^3$  为氢或甲基。在特定的实施方案中,  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同, 并且各自为氢或各自为甲基。

[0086] 在某些具体的实施方案中, 结构 (IA) 的 PPQ 化合物如下:

[0087]

PPQ-101		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(5-甲基呋喃-2-基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-102		7,9-二甲基-11-苯基-6-(5-甲基呋喃-2-基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-103		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(5-甲基呋喃-2-基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-104		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(5-甲基呋喃-2-基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-105		2,3,7,9-四甲基-11-(2-呋喃苯基)-6-(5-甲基呋喃-2-基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0088]

PPQ-106		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(呋喃-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-107		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(呋喃-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-108		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(呋喃-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-109		7,9-二甲基-11-(4-甲氧基苯基)-6-(5-甲基呋喃-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-110		7,9-二甲基-11-(4-甲基苯基)-6-(5-甲基呋喃-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-111		7,9-二甲基-11-(4-氯苯基)-6-(5-甲基呋喃-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-112		7,9-二甲基-11-苯基-6-(5-呋喃-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0089] 在其它某些实施方案中,其中 X 为 -S- (即, Z 为噻吩基),  $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基;并且  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同,并且独立地

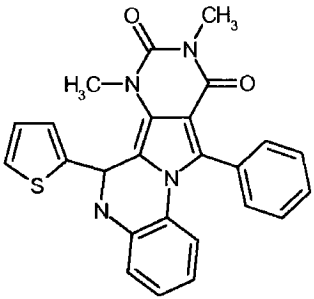
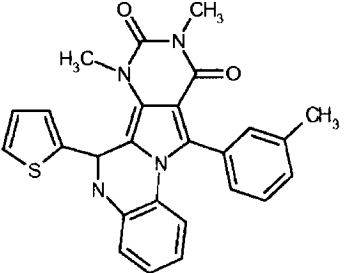
为氢或烃基；并且  $R^3$  为氢或烃基。在特定的实施方案中， $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同，并且各自为氢或各自为烃基。在更特定的实施方案中， $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同，并且各自为氢或各自为甲基。

[0090] 在某些实施方案中，其中 X 为 -S-（即，Z 为噻吩基）， $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同，并且独立地为氢、 $C_{1-6}$  烃基、卤素或  $C_{1-6}$  烃氧基；并且  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同，并且独立地为氢或  $C_{1-6}$  烃基；并且  $R^3$  为氢或  $C_{1-6}$  烃基。在特定的实施方案中， $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同，并且各自为氢或各自为  $C_{1-6}$  烃基。在更特定的实施方案中， $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同，并且各自为氢或各自为甲基。

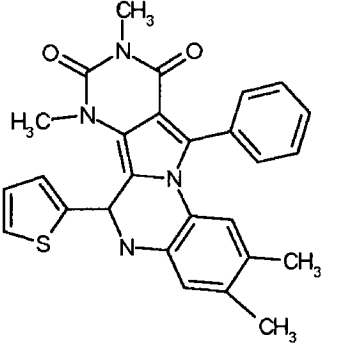
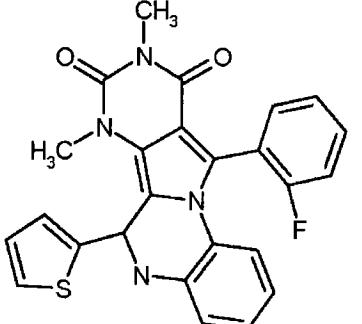
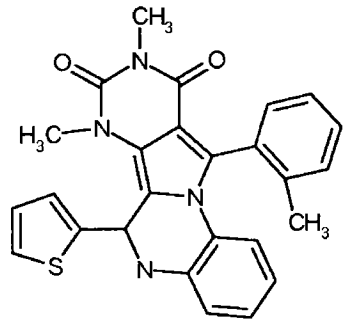
[0091] 在更具体的实施方案中，其中 X 为 -S-（即，Z 为噻吩基）， $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同，并且独立地为氢、甲基、氯、氟或甲氧基；并且  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同，并且独立地为氢或甲基；并且  $R^3$  为氢或甲基。在特定的实施方案中， $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同，并且各自为氢或各自为甲基。

[0092] 在某些具体的实施方案中，结构 (IA) 的 PPQ 化合物如下：

[0093]

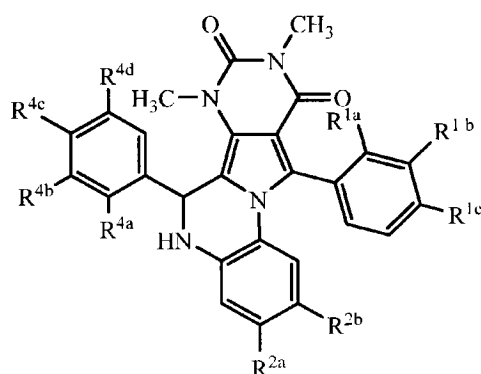
PPQ-113		7,9-二甲基-11-苯基-6-(噻吩基-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-114		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(噻吩基-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0094]

PPQ-115		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(噻吩基-2-基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-116		7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(噻吩基-2-基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-117		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(噻吩基-2-基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0095] 在另一具体实施方案中, Z 为任选取代的苯基, 并且通过下列子结构 (IB) 表示结构 (I) 的化合物, 所述化合物的分离的对映异构体或对映异构体的外消旋混合物, 或者其药物可接受的盐、水合物、溶剂化物、N-氧化物或前药:

[0096]



(IB)

[0097] 其中:

[0098]  $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、烷基、卤素或烃氧基;

[0099]  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同, 并且独立地为氢、烷基、卤素或烃氧基;

[0100]  $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$  和  $R^{4d}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、烷基、烯基、卤素、炔氧基、硝基或羟基;

[0101] 并且其中所述化合物能够抑制囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)-介导的离子运输。

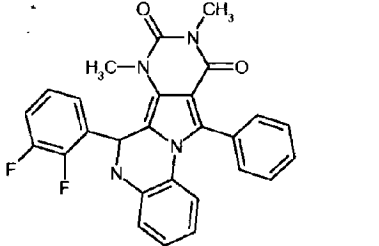
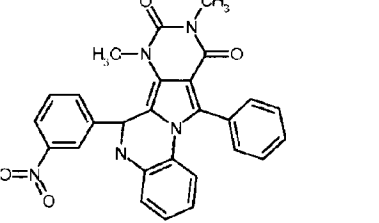
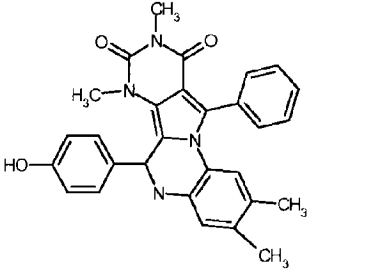
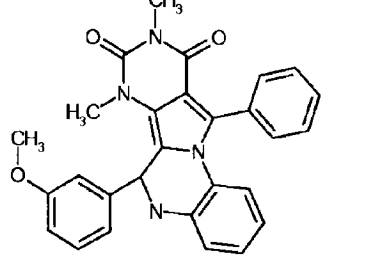
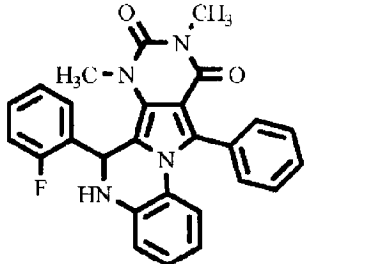
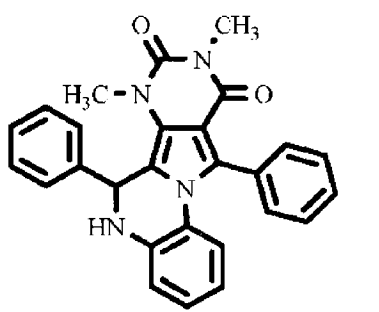
[0102] 在某些实施方案中, $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、烷基、卤素或炔氧基;并且  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同,并且独立地为氢或烷基;并且  $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$  和  $R^{4d}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、烷基、烯基、卤素、炔氧基、硝基或羟基。在特定的实施方案中, $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同,并且各自为氢或各自为烷基。在更特定的实施方案中, $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同,并且各自为氢或各自为甲基。

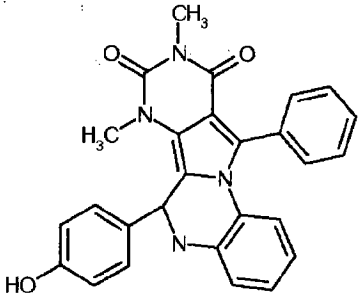
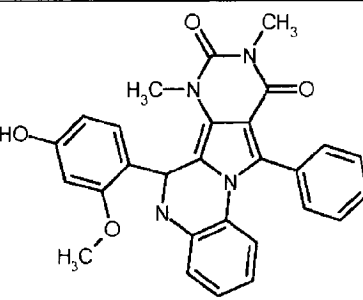
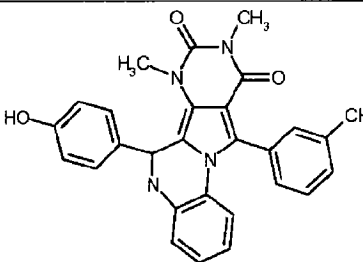
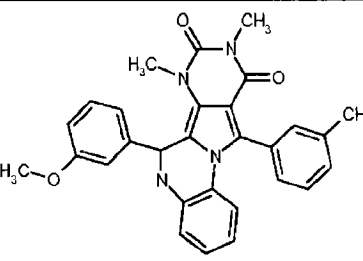
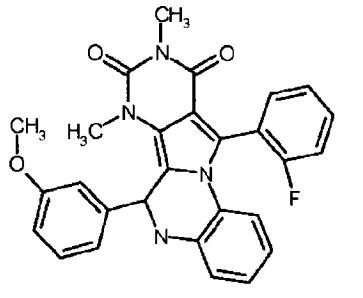
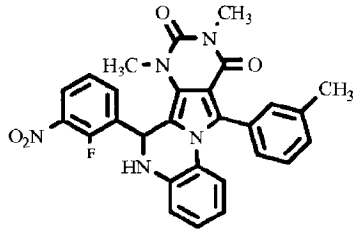
[0103] 在某些实施方案中, $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、 $C_{1-6}$  烷基、卤素或  $C_{1-6}$  炔氧基;并且  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同,并且独立地为氢或  $C_{1-6}$  烷基;并且  $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$  和  $R^{4d}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、 $C_{1-6}$  烷基、卤素、 $C_{1-6}$  炔氧基、硝基或羟基。在特定的实施方案中, $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同,并且各自为氢或各自为  $C_{1-6}$  烷基。在更特定的实施方案中, $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同,并且各自为氢或各自为甲基。

[0104] 在更具体的实施方案中, $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$  和  $R^{1c}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、甲基、氯、氟或甲氧基;并且  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  各自相同或不同,并且独立地为氢或甲基;并且  $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$  和  $R^{4d}$  各自相同或不同,并且独立地为氢、甲基、氯、氟、甲氧基、硝基或羟基。在特定的实施方案中, $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  相同,并且各自为氢或各自为甲基。

[0105] 在某些具体的实施方案中,结构 (IB) 的 PPQ 化合物如下:

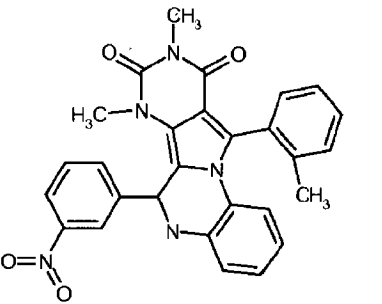
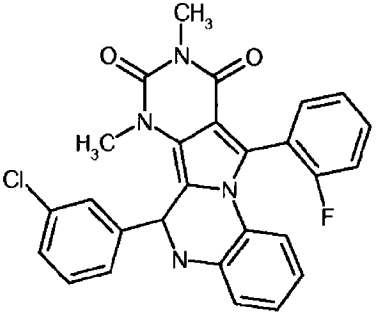
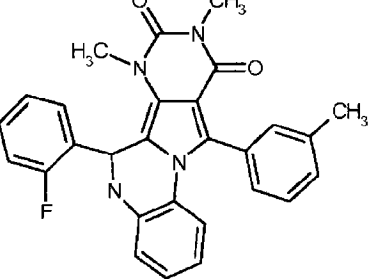
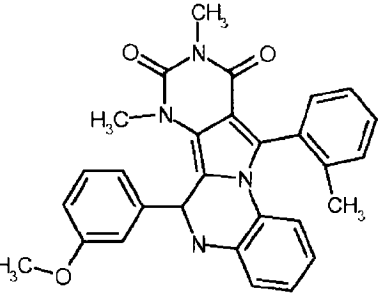
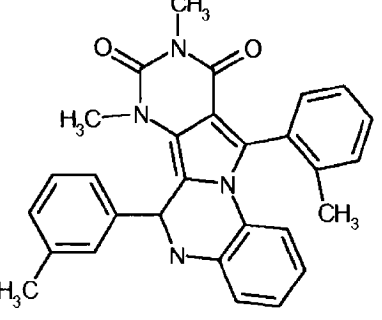
[0106]

PPQ-201		7,9-二甲基-11-苯基-6-(2,3-二氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-202		7,9-二甲基-11-苯基-6-(3-硝基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-203		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-204		7,9-二甲基-11-苯基-6-(3-甲氧基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-205		7,9-二甲基-11-苯基-6-(2-氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-206		7,9-二甲基-11-苯基-6-苯基-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

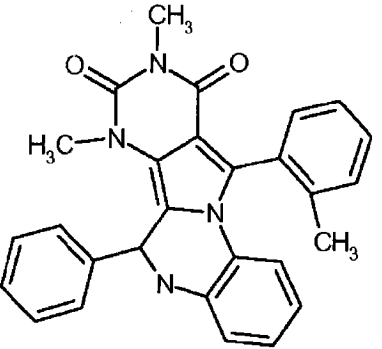
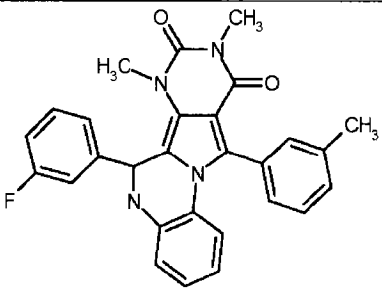
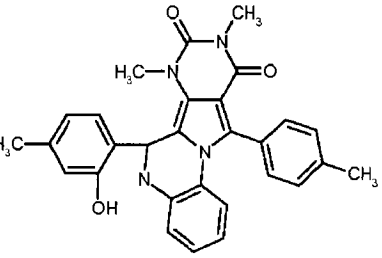
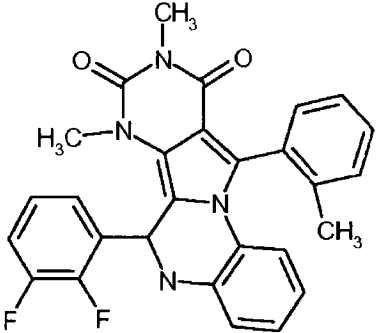
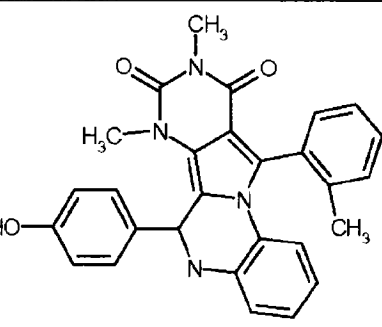
PPQ-207		7,9-二甲基-11-苯基-6-(4-羟基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-208		7,9-二甲基-11-苯基-6-(2-甲氧基-4-羟基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-209		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(4-羟基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-210		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3-甲氧基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-211		7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(3-甲氧基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-212		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(2-氟-3-硝基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0107]

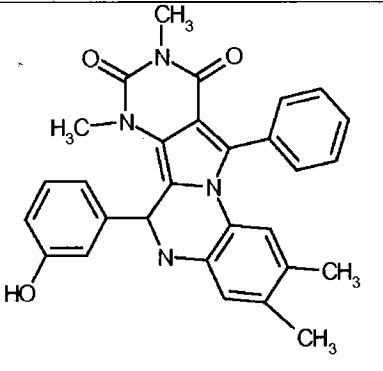
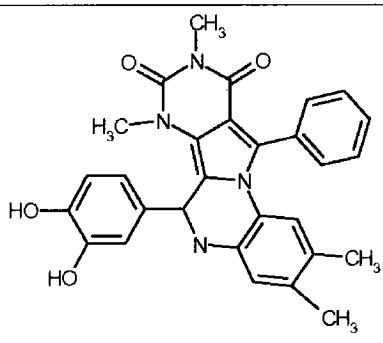
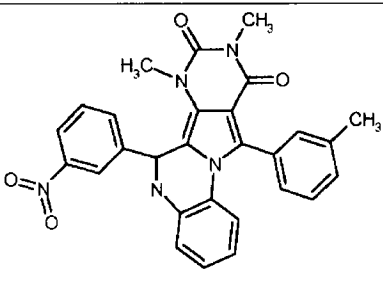
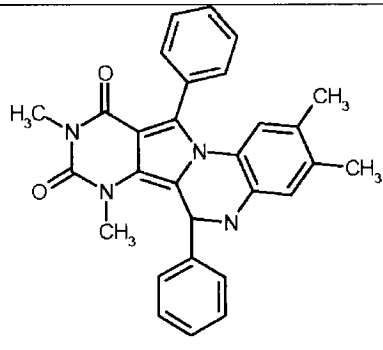
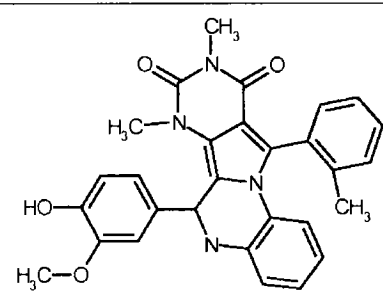
[0108]

PPQ-213		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-硝基苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-214		7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(3-氯苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-215		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(2-氟苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-216		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-甲氧基苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-217		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-甲基苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮

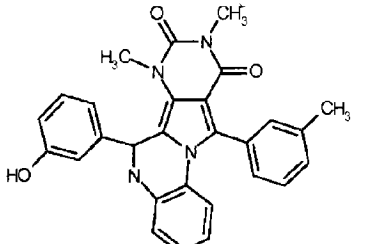
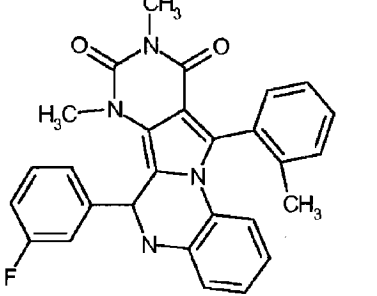
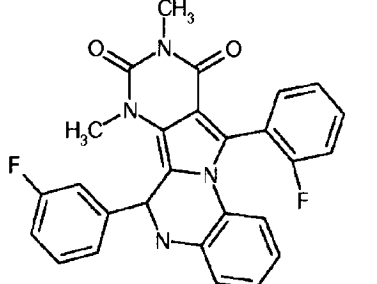
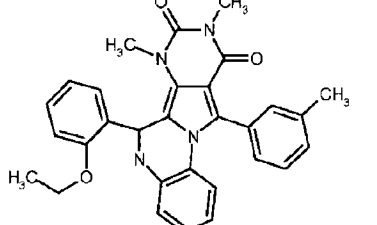
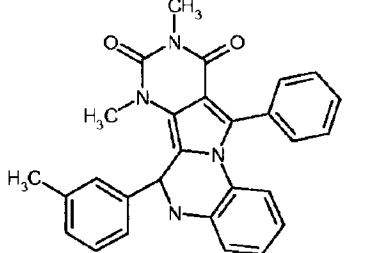
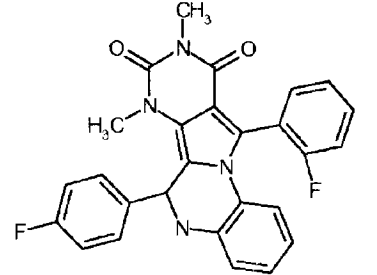
[0109]

PPQ-218		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-苯基-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-219		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3-氟苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-220		7,9-二甲基-11-(4-甲基苯基)-6-(2-羟基-4-甲基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-221		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(2,3-二氟苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-222		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(4-羟基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

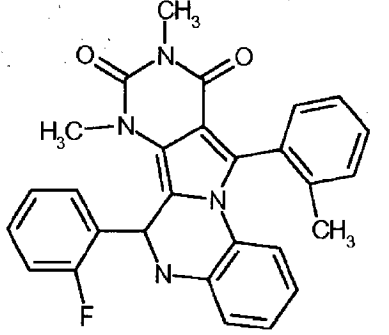
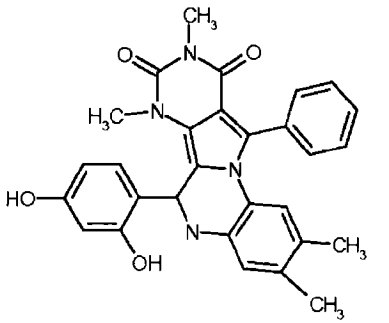
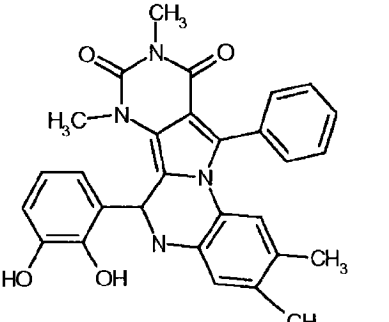
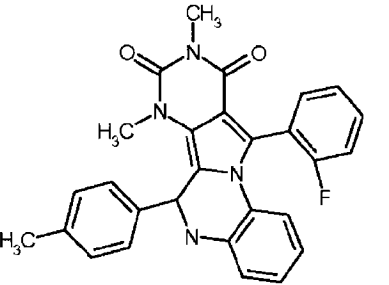
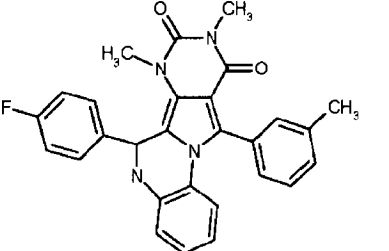
[0110]

PPQ-223		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(3-羟基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-224		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(3,4-二羟基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-225		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3-硝基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-226		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-苯基-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-227		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

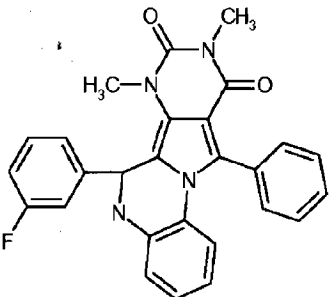
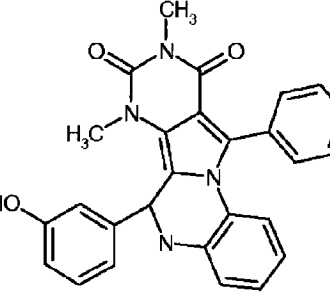
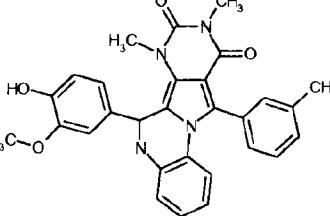
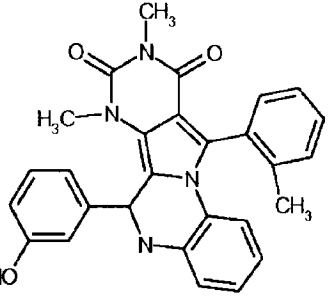
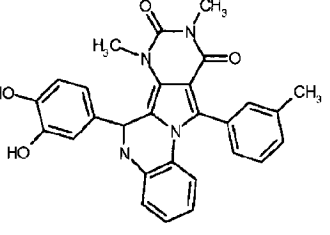
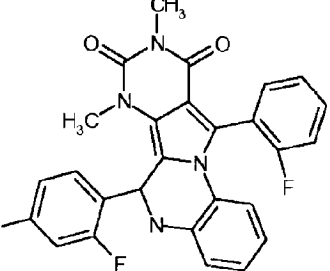
[0111]

PPQ-228		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3-羟基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-229		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-氟苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-230		7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(3-氟苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-231		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(2-乙氧基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-232		7,9-二甲基-11-苯基-6-(3-甲基苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-233		7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(4-氟苯基)-5,6-二氢-咪啉并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0112]

PPQ-234		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(2-氟苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-235		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(2,4-二羟基苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-236		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(2,3-二羟基苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-237		7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(4-甲基苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-238		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(4-氟苯基)-5,6-二氢-吡啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

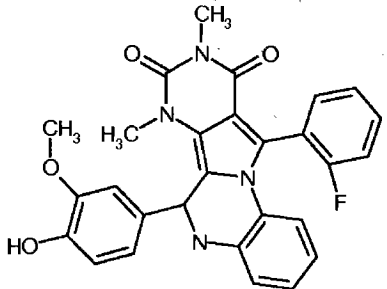
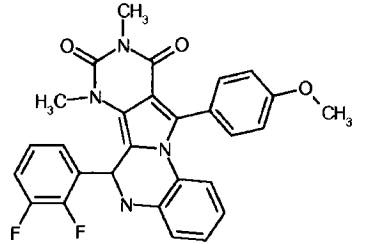
[0113]

PPQ-239		7,9-二甲基-11-苯基-6-(3-氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-240		7,9-二甲基-11-苯基-6-(3-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-241		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-242		7,9-二甲基-11-(2-甲基苯基)-6-(3-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-243		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(3,4-二羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-244		7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(2,4-二氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0114]

PPQ-245		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(2-甲氧基-4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5':3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-246		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(2-羟基-5-甲氧基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5':3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-247		2,3,7,9-四甲基-11-苯基-6-(2,5-二羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5':3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-248		7,9-二甲基-11-苯基-6-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5':3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-249		7,9-二甲基-11-苯基-6-(4-氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5':3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-250		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-苯基-5,6-二氢-嘧啶并[4',5':3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0115]

PPQ-251		7,9-二甲基-11-(2-氟苯基)-6-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-252		7,9-二甲基-11-(4-甲氧基苯基)-6-(2,3-二氟苯基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0116] 在其它实施方案中,提供了结构(I)的化合物,其中Z为任选取代的1,3-苯并间二氧杂环戊烯基,每一 $R^1$ 相同或不同,并且独立地为氢、烃基、卤素或烃氧基;并且每一 $R^2$ 相同或不同,并且独立地为氢或烃基。

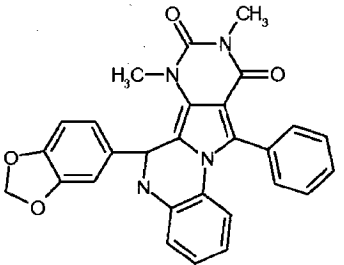
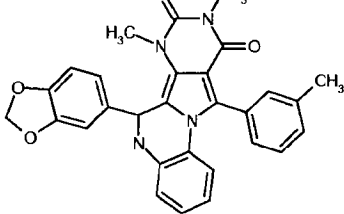
[0117] 在特定的实施方案中,m为1,并且n为0。在其它实施方案中,m为1,并且n为2。

[0118] 在其它某些实施方案中,提供了结构(I)的化合物,其中Z为任选取代的1,3-苯并间二氧杂环戊烯基,每一 $R^1$ 相同或不同,并且独立地为氢、 $C_{1-6}$ 烃基、卤素或 $C_{1-6}$ 烃氧基;并且每一 $R^2$ 相同或不同,并且独立地为氢或 $C_{1-6}$ 烃基。在特定的实施方案中,m为1,并且 $R^1$ 为 $C_{1-6}$ 烃基。

[0119] 在更具体的实施方案中,提供了结构(I)的化合物,其中Z为任选取代的1,3-苯并间二氧杂环戊烯基,每一 $R^1$ 相同或不同,并且独立地为氢、甲基、氯、氟或甲氧基;并且每一 $R^2$ 相同或不同,并且独立地为氢或甲基。在特定的实施方案中,m为1,n为0,并且 $R^1$ 为甲基。在其它实施方案中,m为0,并且n为0。

[0120] 在某些具体实施方案中,结构(I)的PPQ化合物如下:

[0121]

PPQ-301		7,9-二甲基-11-苯基-6-(1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-5,6-二氢-咪唑并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮
PPQ-302		7,9-二甲基-11-(3-甲基苯基)-6-(1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-5,6-二氢-咪唑并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹喔啉-8,10-(7H,9H)-二酮

[0122] 上述 PPQ 化合物和包含所述化合物的组合物能够抑制（即，减缓、延迟、降低、减少）CFTR<sup>-</sup> 介导的离子运输（即，以统计学显著、临床学显著和 / 或生物学显著的方式抑制），例如抑制 CFTR<sup>-</sup> 介导的氯离子（即，Cl<sup>-</sup>）运输。在本文提供的其它实施方案中，PPQ 化合物和包含上述和本文所述 PPQ 化合物的组合物可以用于治疗通过抑制 CFTR<sup>-</sup> 介导的离子运输而为可治疗的疾病、疾病状态或病症的方法。示例性的疾病、疾病状态或病症包括但不限于多囊肾病（PKD）（包括常染色体显性 PDK 和常染色体隐性 PDK）、异常增加的肠液分泌以及分泌性腹泻。在特定的实施方案中，PPQ 化合物和包含所述 PPQ 化合物的组合物可以用于抑制（即，阻止、推迟、减缓）囊肿形成（即，减少一种或多种囊肿形成发生的可能性）和 / 或抑制囊肿扩大或扩张（即，减缓、减少、阻止、延迟、逆转、降低囊肿扩大或扩张）的方法，特别是在人类或非人类动物的一枚或两枚肾中抑制囊肿形成或抑制囊肿扩大。抑制囊肿扩大或扩张可以由此减少或降低一种或多种液体填充的囊肿的体积。在本文中更详细地描述了这些方法和用途中的每一个。

#### [0123] 化学定义

[0124] 本文命名的某些化学基团前面的简化符号表示在标示的化学基团中发现的碳原子总数。例如，C<sub>1-6</sub> 烷基描述具有总共 1 至 6 个碳原子的烷基，如下文所定义。简化符号中的碳总数不包括可以存在于所述基团的取代基中的碳。除了前面提到的，除非相反规定，如本文所用的下列术语具有指出的含义。

[0125] “烷基”是指含 1 至 12 个碳原子的直链或支链、非环状或环状、不饱和或饱和脂肪族烃，而术语“低级烷基”和“C<sub>1-6</sub> 烷基”具有与烷基相同的含义，但包含 1 至 6 个碳原子。典型的饱和直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等，而饱和支链烷基包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。典型的饱和环状烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、-CH<sub>2</sub> 环丙基 -、-CH<sub>2</sub> 环丁基 -、-CH<sub>2</sub> 环戊基、-CH<sub>2</sub> 环己基等；不饱和环状烷基包括环戊烯基和环己烯基。也称为“同素环”的环状烷基包括二和多 - 同素环，例如萘烷和金刚烷基。不饱和烷基包含至少一个相邻碳原子间的双键或三键（分别称为“烯基”或“炔基”）。典型的直链和支链烯基包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基等；典型

的直链和支链炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。除非另外明确指出,应当理解在目前公开的文本中,能够任选取代术语“烃基”,即“任选取代的烃基”包括如本文所定义的未取代的烃基和取代的烃基。

[0126] 如本文所用,在烃基、烯基、芳基、杂芳基和烃氧基的上下文中的术语“取代的”是指烃基、芳基和杂芳基部分的至少一个氢原子被取代基取代。在氧取代基(“=O”)的实例中,取代了两个氢原子。在本文中使用的“取代基”包括氧、卤素、羟基、氰基、硝基、氨基、烃基氨基、二烃基氨基、烃基、烃氧基、硫代烃基、卤代烃基、取代的烃基、杂烃基、芳基、取代的芳基、芳基烃基、取代的芳基烃基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳基烃基、取代的杂芳基烃基、杂环、取代的杂环、杂环烃基、取代的杂环烃基、 $-NR_aR_b$ 、 $-NR_aC(=O)R_b$ 、 $-NR_aC(=O)NR_aR_b$ 、 $-NR_aC(=O)OR_b$ 、 $-NR_aS(=O)_2R_b$ 、 $-OR_a$ 、 $-C(=O)R_a$ 、 $-C(=O)OR_a$ 、 $-C(=O)NR_aR_b$ 、 $-OCH_2C(=O)NR_aR_b$ 、 $-OC(=O)NR_aR_b$ 、 $-SH$ 、 $-SR_a$ 、 $-SOR_a$ 、 $-S(=O)_2NR_aR_b$ 、 $-S(=O)_2R_a$ 、 $-SR_aC(=O)NR_aR_b$ 、 $-OS(=O)_2R_a$  和  $-S(=O)_2OR_a$ , 其中  $R_a$  和  $R_b$  相同或不同,并且独立地选自氢、烃基、杂烃基、取代的烃基、烃氧基、芳基、取代的芳基、芳基烃基、取代的芳基烃基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳基烃基、取代的杂芳基烃基、杂环、取代的杂环、杂环烃基或取代的杂环烃基。

[0127] 典型的取代基包括(但不限于)烃氧基(即,烃基-O-,例如,甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基)、芳氧基(例如,苯氧基、氯苯氧基、甲苯氧基、甲氧基苯氧基、苄氧基、羟氧基羰基苯氧基、羟氧基羰氧基、酰氧基苯氧基)、酰氧基(例如,丙酰氧基、苯甲酰氧基、乙酰氧基)、氨基甲酰氧基、羧基、巯基、烃基硫代、酰基硫代、芳基硫代(例如,苯基硫代、氯苯基硫代、烃基苯基硫代、羟氧基苯基硫代、苄基硫代、羟氧基羰基-苯基硫代)、氨基(例如,氨基、单-和二- $C_{1-3}$ 链烷基氨基(alkanylamino)、甲基苯基氨基、甲基苄基氨基、 $C_{1-3}$ 链烷基酰氨基、酰基氨基、carbamamido、脲基、胍基、硝基和氰基)。此外,任何取代基都可以具有1-5个与其连接的其它取代基。

[0128] “烯基”是指仅由碳和氢原子组成的含至少一个双键并且具有二至十二个碳原子的直形或支形的烃链基团。在某些实施方案中,烯基可以包括二至八个碳原子。在其它实施方案中,烯基可以包括二至四个碳原子。烯基通过单键与分子的剩余部分连接,例如乙烯基(ethenyl)(即乙烯基(vinyl))、丙-1-烯基(即,烯丙基)、丁-1-烯基、戊-1-烯基、戊-1,4-二烯基等。除非另外指出,应当理解在目前公开的文本中,术语“烯基”能被任选取代,即“任选取代的烯基”包括如本文所定义的未取代的烃基和取代的烯基。

[0129] “芳基”是指仅由氢和碳组成并含有六至十八个碳原子的芳香性单环或多环烃体系,其中环体系可以被部分或全部饱和。芳基包括,但不限于诸如苄基、苯基和萘基的基团。除非另外指出,应当理解在目前公开的文本中,术语“芳基”能够被任选取代,即“任选取代的芳基”包括如本文所定义的未取代的芳基和取代的芳基(例如,取代的苯基)。

[0130] “杂芳基”是指5至10元的并且具有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子并含有至少一个碳原子的芳香性杂环,其包括单环、双环和三环体系。稠合的杂芳基(例如,双环杂芳基)包含至少一个芳香环,其可以为苯并环(例如,苯并呋喃基、1,3-苯并间二氧杂环戊烯基或吡啶基)。典型的杂芳基为呋喃基、苯并呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、1,3-苯并间二氧杂环戊烯基、吡咯基、吡啶基、异吡啶基、氮杂吡啶基、吡啶基、喹啉基、异喹啉基、噁唑基、异噁唑基、苯并噁唑基、吡唑基、咪唑基、苯并咪唑基、噻唑基、苯并噻唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、噌嗪基、酞嗪基和喹唑啉基。除非另外指出,应当理解在目前公开

的文本中,术语“杂芳基”能够被任选取代,即“任选取代的杂芳基”包括如本文所定义的未取代的杂芳基和取代的杂芳基(例如,取代的呋喃基)。

[0131] “杂环(heterocycle)”(本文也称为“杂环(heterocyclic ring)”)是指饱和、不饱和或芳香性的4至7元单环或7至10元双环的杂环,并且其含有1至4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子,并且其中氮和硫杂原子可以被任选氧化,并且氮杂原子可以被任选季铵化,所述杂环包括双环,其中任意上述杂原子与苯环稠合。可以通过任意杂原子或碳原子连接杂环。杂环包括上面定义的杂芳基。因此,除了上面所列的杂芳基,杂环还包括吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、乙内酰胺基、戊内酰胺基、环氧乙烷基、环氧丙烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢硫代苯基、四氢硫代吡喃基、四氢嘧啶基、四氢硫代苯基、四氢硫代吡喃基等。

[0132] “卤素”或“卤代”是指氟、氯、溴和碘。

[0133] “烃氧基”是指基团: -O- 烃基,例如甲氧基、乙氧基等。C<sub>1-6</sub> 烃氧基是指烃基部位为 C<sub>1-6</sub> 烃基。

[0134] 关于立体异构体,结构(I)的化合物,以及本文的任何子结构(例如,IA和IB)可以具有一个或多个手性中心(例如,在嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉环体系的6位)。因此,化合物可以为任意立体异构体形式,包括外消旋体、外消旋混合物和独立的对映异构体或非对映异构体。此外,本文所述的任意化合物的晶体形式中的某些可以以多晶型物的形式存在,其也被本公开包括并关注。另外,某些化合物可以与水或其它有机溶剂形成溶剂化物。这样的溶剂化物也包括在本文所述的化合物和组合物的范围内。

[0135] 通常,可以根据本领域技术人员已知的有机合成技术,从商购的化学制品和/或在化学文献中描述的化合物开始制备在本文所述的反应中使用的化合物。“商购的化学制品”可以购自标准商业来源,包括Acros Organics(Pittsburgh PA)、Aldrich Chemical(Milwaukee WI,包括Sigma Chemical和Fluka)、Apin Chemicals Ltd.(Milton Park UK)、Avocado Research(Lancashire U.K.)、BDH Inc.(Toronto,加拿大)、Bionet(Cornwall, U.K.)、Chemservice Inc.(West Chester PA)、Crescent Chemical Co.(Hauppauge NY)、Eastman Organic Chemicals、Eastman Kodak Company(Rochester NY)、Fisher Scientific Co.(Pittsburgh PA)、Fisons Chemicals(Leicestershire UK)、Frontier Scientific(Logan UT)、ICN Biomedicals, Inc.(Costa Mesa CA)、Key Organics(Cornwall U.K.)、Lancaster Synthesis(Windham NH)、Maybridge Chemical Co.Ltd.(Cornwall U.K.)、Parish Chemical Co.(Orem UT)、Pfaltz & Bauer, Inc.(Waterbury CN)、Polyorganix(Houston TX)、Pierce Chemical Co.(Rockford IL)、Riedel de Haen AG(Hanover,德国)、Spectrum Quality Product, Inc.(New Brunswick, NJ)、TCI America(Portland OR)、Trans World Chemicals, Inc.(Rockville MD)和Wako Chemicals USA, Inc.(Richmond VA)。

[0136] 可以通过多种参考书籍和数据库确认本领域技术人员已知的方法。详述用于制备本公开化合物的反应物合成或提供描述该制备的参考文献的适当的参考书籍和专著包括,例如“Synthetic Organic Chemistry(合成有机化学)”John Wiley & Sons, Inc., New York; S. R. Sandler等人,“Organic Functional Group Preparations(有机官能团制备)”第二版,Academic Press, New York, 1983; H. O. House, “Modern Synthetic Reactions(现

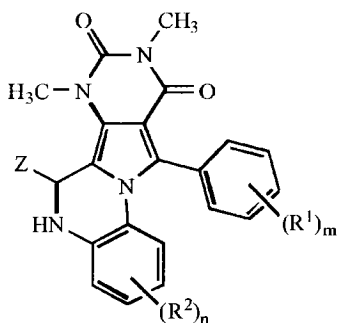
代合成反应)”,第二版,W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif. 1972; T. L. Gilchrist, “Heterocyclic Chemistry(杂环化学)”,第二版, John Wiley & Sons, New York, 1992; J. March, “Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure(高等有机化学:反应、机理和结构)”第四版, Wiley-Interscience, New York, 1992。详述用于制备本公开化合物的反应物合成或提供描述该制备的参考文献的其它适当的参考书籍和专著包括,例如 Fuhrhop, J. 和 Penzlin G. “Organic Synthesis: Concepts, Methods, Starting Materials(有机合成:概念、方法、起始材料)”,第二、修正和增补版(1994) John Wiley & Sons ISBN: 3-527-29074-5; Hoffman, R. V. “Organic Chemistry, An Intermediate Text(有机化学,中间体教科书)”(1996) Oxford University Press, ISBN 0-19-509618-5; Larock, R. C. “Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations(综合有机转化:官能团制备指南)”第二版(1999) Wiley-VCH, ISBN: 0-471-19031-4; March, J. “Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure(高等有机化学:反应、机理和结构)”第四版(1992) John Wiley & Sons, ISBN: 0-471-60180-2; Otera, J. (编辑) “Modern Carbonyl Chemistry(现代羰基化学)”(2000) Wiley-VCH, ISBN: 3-527-29871-1; Patai, S. “Patai’s 1992 Guide to the Chemistry of Functional Groups(Patai的1992官能团化学指南)”(1992) Interscience ISBN: 0-471-93022-9; Quin, L. D. 等人 “A Guide to Organophosphorous Chemistry(有机磷化学指南)”(2000) Wiley-Interscience, ISBN: 0-471-31824-8; Solomons, T. W. G. “Organic Chemistry(有机化学)”第7版(2000) John Wiley & Sons, ISBN: 0-471-19095-0; Stowell, J. C., “Intermediate Organic Chemistry(中间体有机化学)”第二版(1993) Wiley-Interscience, ISBN: 0-471-57456-2; “Industrial Organic Chemicals: Starting Materials and Intermediates: An Ullmann’s Encyclopedia(工业有机化学制品:起始材料和中间体:Ullmann的百科全书)”(1999) John Wiley & Sons, ISBN: 3-527-29645-X, 第八卷; “Organic Reactions(有机反应)”(1942-2000) John Wiley & Sons, 超过55卷; 和 “Chemistry of Functional Groups(官能团化学)” John Wiley & Sons, 第73卷。

[0137] 也可以通过美国化学学会的化学文摘社制备的已知化学制品索引来确定具体和类似的反应物,其在大多数公共和大学图书馆以及通过在线数据库中是可得的(对于等过细节,可以联系 Washington, D. C. 的美国化学协会)。可以由定制化学合成室来制备目录中已知但不可商购的化学制品,其中许多标准化学供应室(例如,上面所列的那些)提供定制合成服务。制备和选择本公开的盐的参考文献是 P. H. Stahl & C. G. Wermuth “Handbook of Pharmaceutical Salts(药物盐手册)” Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, 2002.

#### [0138] PPQ 化合物的制备

[0139] 下列反应方案例示制备本公开化合物的方法,即结构(I)、(IA)和(IB)的化合物,所述化合物的分离的对映异构体或外消旋混合物,或者其药物可接受的盐:

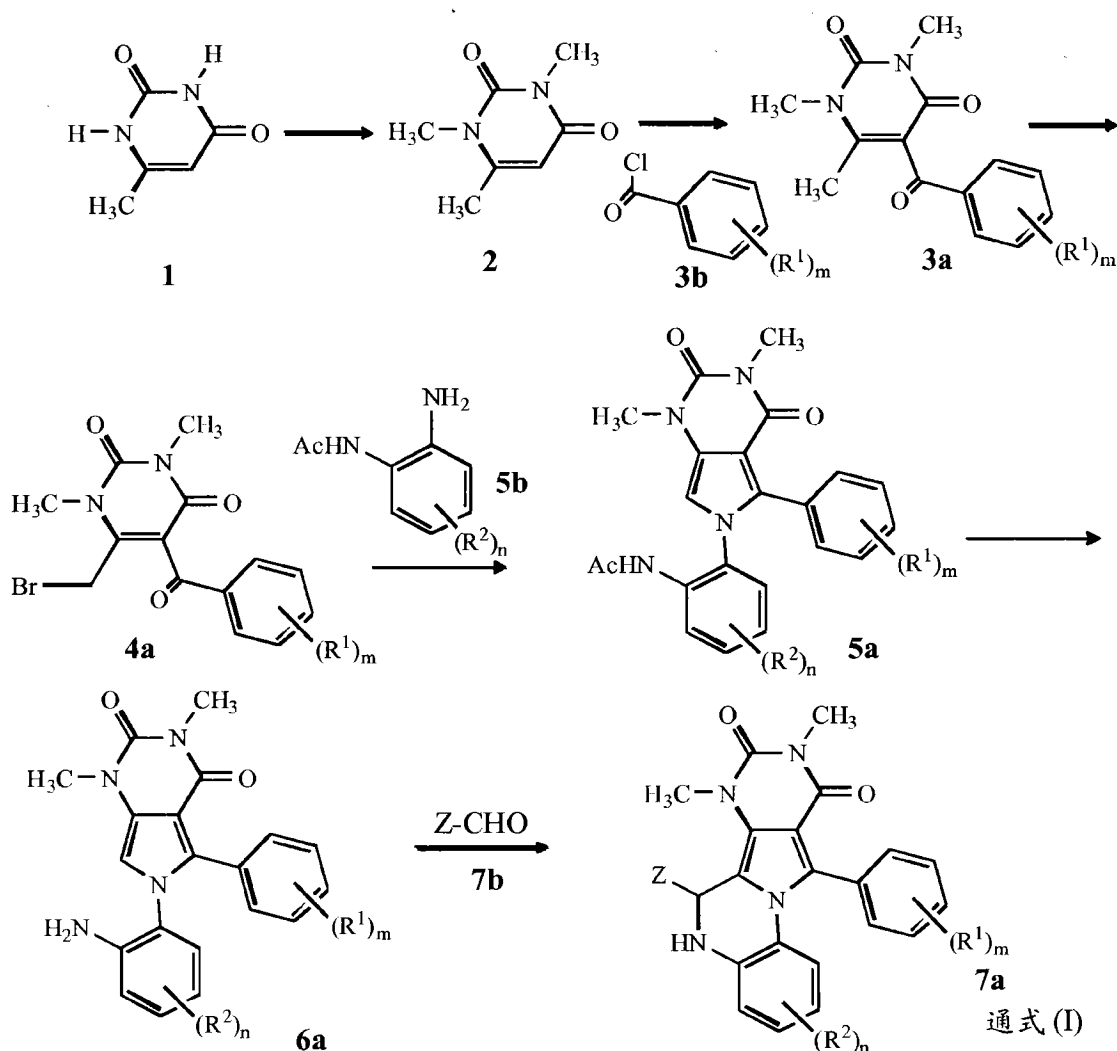
[0140]



[0141] 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^{1c}$ 、 $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、 $R^{4a}$ 、 $R^{4b}$ 、 $R^{4c}$ 、 $R^{4d}$  和  $Z$  为概述中所述的。应当理解在下列反应方案中,取代基和/或所述结构的变体的组合是允许的,只要这样的贡献导致稳定的化合物。

[0142] 反应方案 1

[0143]



[0144] 一般来说,能够首先甲基化商购的 6-甲基尿嘧啶 (1) 以提供 1,3,6-三甲基尿嘧啶 (2)。适当的甲基化试剂包括硫酸二甲酯、碘甲烷等。此外,进一步通过例如 Friedel-Crafts 机理,在适当取代的苯甲酰氯 (3b) 和路易斯酸催化剂 (例如,  $ZnCl_2$ ) 的存在下,乙酰化 1,3,6-三甲基尿嘧啶 (2) 以提供 3a。然后能将化合物 (3a) 溴化以提供化合

物 (4a)。化合物 (4a) 和适当取代的 N-(2-氨基苯基) 乙酰胺 (5b) 的反应提供了环缩合产物 (5a)。通过常规方法 (例如, 水解) 进行 (5a) 的氨基脱保护之后, 脱保护的化合物 (6a) 能与 Z-CHO (7b) 混合以产生环缩合产物 (7a), 即结构 (I)。

#### [0145] 使用和表征 PPQ 化合物和包含 PPQ 化合物的组合物的方法

[0146] 如本文更详细描述, 本文提供了药物组合物, 其中所述药物组合物包含药物适当的赋形剂 (即, 药物可接受的赋形剂或生理学适当的或可接受的赋形剂) 和本文所述的结构、子结构和具体结构中的任一种的至少一种 PPQ 化合物, 其包括结构 I、子结构 (IA)、(IB) 和具体结构的化合物。本文所述的能够抑制 (即, 以统计学、临床学和 / 或生理显著方式抑制、减少、降低、阻止 CFTR 通道或孔中的氯离子运输) 细胞中 CFTR 活性的结构 I、子结构 (IA)、(IB) 和具体结构的 PPQ 化合物可以用于治疗通过抑制 CFTR 活性而为可治疗的疾病、病症和疾病状态, 并且所述疾病、病症和疾病状态包括由异常增加的 CFTR 活性产生的或与异常增加的 CFTR 活性有关的疾病、病症和疾病状态。因此, 本文提供了通过 CFTR 抑制离子运输的方法。

[0147] 还如本文所述, 将为 CFTR 抑制剂的结构 I (及其子结构) 的 PPQ 化合物用于治疗 CFTR- 介导的或有关的疾病状态, 即, 由诸如 CFTR 介导的离子运输的 CFTR 活性导致的任意疾病状态、病症或疾病。所述疾病状态、病症或疾病可以由异常增加的 CFTR 活性导致, 特别是异常增加的 CFTR- 介导的离子运输。这些疾病状态、病症和疾病可通过抑制 CFTR 活性治疗、例如抑制 CFTR- 介导的诸如氯离子的离子运输而进行治疗。

[0148] 因此, 提供了治疗通过抑制 CFTR- 介导的离子运输而为可治疗的疾病状态、病症或疾病的方法。在某些实施方案中, 提供了抑制囊肿形成和 / 或囊肿扩大、特别是肾囊肿形成或扩大的方法。下文和本文更详细地描述这些方法。

[0149] 本文所述的结构 I、子结构 (IA)、(IB) 和具体结构的 PPQ 化合物能够堵塞或阻碍 CFTR 孔或通道并通过位于细胞外部细胞膜的 CFTR 抑制离子运输 (例如, 抑制氯离子 (Cl<sup>-</sup>) 运输 (也称为抑制离子传导))。本文提供了通过 CFTR 抑制离子运输的方法, 所述方法包括使具有位于外部细胞膜的 CFTR 的细胞与本文所述的任意一种或多种 PPQ 化合物接触, 由此允许 CFTR 和一种或多种化合物相互作用。本文所述的 PPQ 化合物的相互作用导致与 CFTR 连接, 由此抑制氯离子运输。

[0150] 在一个实施方案中, 提供了抑制 (即, 防止、延迟、减缓) 囊肿形成和 / 或抑制 (即, 防止、延迟、减缓) 或减少囊肿扩大或减少一种或多种囊肿的尺寸和 / 或体积的方法, 所述方法在一定条件下包括使 (a) 包含 CFTR 的细胞和 (b) 本文所述的结构 I 或任意子结构 (IA)、(IB) 和具体结构的至少一种化合物接触, 并持续足以使 CFTR 和所述化合物相互作用的时间, 其中所述化合物通过 CFTR 抑制离子 (例如氯离子) 运输 (即, PPQ 化合物以统计学显著、临床学显著和 / 或生理学显著方式抑制 CFTR- 介导的离子运输)。在特定的实施方案中, 被抑制的囊肿形成或囊肿扩大是肾囊肿形成或肾囊肿扩大 (即, 抑制至少一枚肾中的囊肿形成或囊肿扩大)。

[0151] 通过本文所述的 PPQ 化合物抑制肾囊肿形成和 / 或囊肿扩大对治疗被诊断患有多囊肾病或处于患有发展多囊肾病风险中的患者是有用的。因此, 本文提供了治疗多囊肾病的方法, 所述方法包括向需要的个体给予 (a) 药物适当的赋形剂和 (b) 本文所述的结构 I 或任意子结构 (IA)、(IB) 和具体结构的至少一种化合物 (即, 本文所述的药物组合物)。在

具体的实施方案中,多囊肾病是常染色体显性多囊肾病。在另一具体的实施方案中,多囊肾病是常染色体隐性多囊肾病。

[0152] 在另一实施方案中,治疗通过抑制 CFTR<sup>-</sup> 介导的离子运输而为治疗的疾病、病症或疾病状态的方法包括与异常增加的 CFTR<sup>-</sup> 介导的离子运输有关的疾病、病症或疾病状态。因此,在具体的实施方案中,提供了通过囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 治疗与异常增加的离子运输有关的疾病、病症或疾病状态的方法,其中所述方法包括向需要的个体给予药物适当的赋形剂和本文所述的结构 I、子结构 (IA)、(IB) 的至少一种化合物 (即,本文所述的药物组合物),其中抑制通过 CFTR 介导的离子运输。在具体的实施方案中,疾病、疾病状态或病症是异常增加的肠液分泌,其可以为急性异常增加的肠液分泌。

[0153] 在另一实施方案中,将结构 I (及其子结构) 的 PPQ 化合物用于治疗与异常增加的肠液分泌有关的疾病状态,特别是急性异常增加的肠液分泌,其包括分泌性腹泻。易受使用任一本文所述 PPQ 化合物治疗控制的腹泻能够由暴露于多种试剂或病原体导致,包括导致肠病毒感染的。在更具体的实施方案中,分泌性腹泻由肠病原体导致。示例性肠病原体包括但不限于,霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (特别是产肠毒素的大肠杆菌 (ETEC))、志贺氏菌属 (*Shigella*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、弯曲杆菌属 (*Campylobacter*) (包括空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*))、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、寄生虫 (例如,梨形鞭毛虫属 (*Giardia*) (例如,肠兰伯式鞭毛虫 (*Giardia lamblia*))、痢疾阿米巴虫 (*Entamoeba histolytica*)、隐孢子虫属 (*Cryptosporidium*)、环隐孢子虫属 (*Cyclospora*)),或腹泻病毒 (例如,轮状病毒)。由 CFTR 介导的肠液分泌增加而导致的分泌性腹泻也可以为与食物中毒,或暴露于毒素有关的病症或后遗症,所述毒素包括但不限于细菌肠毒素,例如霍乱毒素 (霍乱弧菌 (*V. cholerae*))、大肠杆菌 (*E. coli*) 毒素、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 毒素、弯曲杆菌属 (*Campylobacter*) 毒素或志贺氏菌属 (*Shigella*) 毒素,或者导致异常增加的肠液分泌的任何其它细菌毒素。

[0154] 其它可以通过给予本文所述的任何一种或多种结构 I (及其子结构) 的 PPQ 化合物而治疗的分泌性腹泻包括:与 AIDS 有关的腹泻或 AIDS 的后遗症;与诸如蛋白酶抑制剂的抗 AIDS 药物的效果有关的疾病状态的腹泻;为给予化疗药物的疾病状态或与给予化疗药物有关的腹泻;炎性胃肠病症,例如溃疡性结肠炎、炎性肠病 (IBD)、克罗恩病、憩室病等。肠炎调节肠的盐运输的三种主要调节剂的表达,并且可以通过增加跨上皮 Cl<sup>-</sup> 分泌和通过抑制上皮 NaCl 吸收二者对溃疡性结肠炎腹泻起作用 (参见例如, Lohi 等人, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283 :G567-75(2002))。因此,可以以对抑制 CFTR 离子运输并由此降低肠液分泌有效的量来给予一种或多种本文所述的结构 I 及其子结构 (例如, (IA) 和 (IB)) 和具体结构的 PPQ 化合物。

[0155] 如医药领域技术人员所理解的,术语“治疗 (treat)”和“治疗 (treatment)”是指个体 (即,患者) 疾病、病症或疾病状态的医学管理 (参见例如, Stedman 的医学辞典)。通常,适当的剂量和治疗方案提供了具有足以提供治疗和 / 或预防益处的量的 PPQ 化合物。治疗和 / 或预防益处包括,例如改进的临床结果,治疗性治疗和预防性 (prophylactic) 或预防性 (preventative) 检测,其中目标是预防或减缓或延迟 (减少) 不期望的生理学变化或病症,或者是预防或减缓或延迟 (减少) 这类病症的扩大或严重性。如本文所讨论的,来自治疗个体的有益的或期望的临床结果包括,但不限于减轻、减少或改善由要治疗的疾病、

疾病状态或病症导致的症状或与要治疗的疾病、疾病状态或病症有关的症状；降低的症状发生率；改善的生命治疗；更长的无疾病状态（即，根据进行的疾病诊断，降低个体将存在症状的可能性或倾向）；减小疾病程度；稳定（即，不恶化）疾病的状态；延长或减缓疾病发展；改善或缓和疾病状态；以及可检测的或不可检测的减轻（部分或全部）；和/或总体存活。“治疗（treatment）”也能指当与若个体不接受治疗的期望存活相比时，使存活延长。需要治疗的个体包括已经患有疾病状态或病症的那些以及倾向于患有疾病、疾病状态或病症或处于患有发展疾病、疾病状态或病症的风险中的个体，以及其中要预防疾病、疾病状态或病症（即，降低疾病、病症或疾病状态发生的可能性）的那些。

[0156] 本文提供的其它实施方案包括本文所述的结构 I、子结构 (IA)、(IB) 和具体结构的至少一种 PPQ 化合物在治疗任一本文所述的通过抑制 CFTR 离子运输（例如氯离子运输）而为可治疗的疾病或病症（例如，多囊肾病、异常增加的肠液分泌、分泌性腹泻）中的用途。在一个实施方案中，提供了制备用于治疗任一本文所述的通过抑制 CFTR 离子运输（例如氯离子运输）而为可治疗的疾病、疾病状态或病症（例如，多囊肾病、异常增加的肠液分泌、分泌性腹泻）的药物中的用途。

[0157] 在其它实施方案中，提供了用于治疗本文所述疾病、病症或疾病状态（包括但不限于 PCKD、分泌性腹泻或与异常增加的肠液分泌有关的其它疾病状态）的方法。这类方法包括给予药物组合物，其包含在相同组合物或分离（或第二）的组合物中组合的至少一个 PPQ 化合物和药物适当的（即，药物可接受的或生理学适当的或可接受的）赋形剂、抑制 CFTR- 介导的离子运输的至少一种噻唑啉二酮化合物和/或至少一种甘氨酸酰肼化合物（参见例如，第 7, 235, 573 号；第 7, 414, 037 号美国专利；第 2008-0064666 号美国专利申请公开；第 WO 2008/079897 号国际专利申请公开；第 12/418, 147 号美国专利申请；第 PCT/US2009/038292 号国际专利申请，上述专利以引用的形式以其整体并入本文中），从而治疗任一本文所述的通过抑制 CFTR 离子运输（例如氯离子运输）而为可治疗的疾病或病症。当向有需要的个体给予包含至少一个 PPQ 化合物的第一组合物和包含至少一个噻唑啉二酮化合物和/或至少一个甘氨酸酰基化合物的第二组合物时，可以在给予第二组合物之前、同时或之后给予第一组合物。

[0158] 在本文所述方法的特定实施方案中，个体为人或非人动物。需要本文所述治疗的个体可以显示出本文所述疾病、病症或疾病状态的症状或后遗症，或者可为处于发展疾病、病症或疾病状态的风险中。可被治疗的非人动物包括哺乳动物，例如，非人灵长类动物（例如，猴、黑猩猩、大猩猩等）、啮齿目动物（例如，大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔）、兔类动物、猪类动物（例如，猪、小型猪）、马、犬、猫、牛和其它驯养、农场和动物园动物。

[0159] 在另一实施方案中，提供了通过囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 抑制离子运输的方法，所述方法包括在一定条件下，使 (a) 包含 CFTR 的细胞和 (b) 本文所述的结构 I 或子结构 (IA)、(IB) 和具体结构的至少一种化合物接触，并且持续足以允许 CFTR 和所述化合物相互作用的时间，由此通过 CFTR 抑制离子（例如氯离子运输）运输，即，抑制 CFTR- 介导的离子运输。

[0160] 在另一实施方案中，提供了治疗分泌性腹泻的方法，所述方法包括向需要的个体给予药物可接受的赋形剂和本文所述的结构 I、子结构 (IA)、(IB) 和具体结构的至少一种化合物（即，本文所述的药物组合物）。在特定的实施方案中，个体为人或非人动物。

[0161] 本文更详细地描述了药物组合物和使用 PPQ 化合物和包含这些化合物的组合物的方法。

[0162] 表征和使用 PPQ 化合物的方法

[0163] 本文还提供了可用于例如表征 PPQ 化合物（及其衍生物和类似物）抑制 CFTR- 介导的离子运输（特别是 CFTR- 介导的氯离子运输）的效能的方法；监测已经给予个体的 PPQ 化合物水平（即，例如，浓度水平、重量水平或  $IC_{50}$  水平）的方法；以及例如在活体外组织（例如，人类组织）和动物中，通过阻滞或抑制作为囊性纤维化疾病模型的 CFTR 功能来检测囊性纤维化中的疾病发病机理。

[0164] 在某些实施方案中，这些方法可以在体外进行，例如使用本文所述的包括例如从组织、体液或者培养适当的细胞系或者其它下文详述的生物源中获得的细胞的生物样本。接触步骤是指组合、混合或以本领域技术人员熟悉的某些方式，其允许化合物和细胞相互接触以使得能根据本文所述的方法和本领域常规实践的方法检测化合物对 CFTR 活性的任意影响（例如，PPQ 化合物抑制 CFTR 离子运输的能力，或者化合物抑制 CFTR 离子运输的水平）。本文所述的通过 CFTR 抑制离子运输的方法应被理解为在一定条件下进行，并且进行足以允许 CFTR 和化合物相互作用的时间。可以通过抑制 CFTR 离子运输的方法确定和 / 或表征另外的 PPQ 化合物，这用体外分离细胞进行。特定检验的条件包括温度、缓冲剂（包括盐、阳离子、介质）和保持细胞完整性的其它成分，以及本领域技术人员熟悉的和 / 或容易确定的化合物。本领域技术人员也容易意识到当进行本文所述的体外方法和体内方法时能够设计并包括适当的控制。

[0165] 在分泌性腹泻中，液体分泌首先通过横跨细胞顶膜的氯化物出口而发生，其然后促使跨上皮钠和水分泌（参见例如，Barrett 等人，*Annu. Rev. Physiol.* 62 :535-72 (2000)）。在肾细胞中，内腔液体累积直接通过净水涌入囊肿内腔导致逐渐上升的囊肿扩张，并且间接通过拉伸囊肿壁上皮细胞来促进其分裂和变薄（Ye 等人，*N. Engl. J. Med.* 329 :310-13 (1993) ;Sullivan 等人，*Physiol. Rev.* 78 :1165-91 (1998) ;Tanner 等人，*J. Am. Soc. Nephrol.* 6 :1230-41 (1995)）。为了不受特定理论的限制，CFTR 抑制在顶部氯离子步骤干扰液体分泌。

[0166] 可以使用本文所述的和本领域技术人员常规实践的技术和步骤来进行表征 PPQ 化合物的方法、确定实现治疗益处有效浓度的方法、在生物样本中监测 PPQ 化合物水平的方法以及用于本文所述和本领域技术人员显而易见的其它目的的方法。示例性的方法包括但不限于 CFTR 抑制的基于荧光细胞的检验（参见例如，Galietta 等人，*J. Physiol.* 281 :C1734-C1742 (2001)）、短循环顶部氯离子电流检测和膜片钳分析（参见例如，Muanprasat 等人，*J. Gen. Physiol.* 124 :125-37 (2004) ;Ma 等人，*J. Clin. Invest.* 110 :1651-58 (2002) ;还参见，例如 Carmeliet, *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* 55 :5-26 (1993) ;Hamill 等人，*Pflugers Arch.* 391 :85-100 (1981)）。

[0167] 可以用于表征包括本文所述的那些的 PPQ 化合物的方法和确定化合物减少、抑制或防止囊肿扩大和 / 或防止或抑制囊肿形成的效力的方法、以及由此确定哪种化合物可用于治疗患有 PKD 或处于患有发展 PKD 的风险中的患者的方法，包括本领域和本文所述的方法。可以使用胚胎或新生肾器官培养物在模型中分析 PPQ 化合物，例如（参见例如，Yang 等人，*J. Am. Soc. Nephrol.* 19 :1300-1310 (2008) ;Magenheimer 等人，*J. Am. Soc. Nephrol.* 17 :

3424-37(2006))。为了不受任何特定理论的限制,某些科学发现支持使用 CFTR 抑制剂来减缓常染色体显性 PKD(ADPKD) 中的囊肿生长:(a)CFTR 主要在 ADPKD 的上皮细胞层囊肿中表达;(b) 囊性纤维化(CFTR- 缺乏)小鼠耐受囊肿形成;(c)CFTR 抑制剂阻滞细胞/器官培养物和体内模型中的囊肿形成;以及(d)在某些被 ADPKD 和囊性纤维化影响的家族中,患有 ADPKD 和 CF 二者的个体比仅患有 ADPKD 的那些相比具有较不严重的肾病(参见例如, O' Sullivan 等人, Am. J. Kidney Dis. 1998, 32 :976-983 ;Cotton 等人, Am. J. Kidney Dis. 1998, 32 :1081-1083)。研究囊肿形成的完整肾模型对概括当地肾解剖和细胞显型是有用的(参见例如, Magenheimer 等人, J. Am. Soc. Nephrol. 2006, 17 :3424-3437)。

[0168] 确定化合物是否抑制囊肿形成或扩大的细胞培养模型的其它实例包括 PKD 的 MDCK 细胞(Madin-Darby 犬肾上皮细胞)模型(Li 等人, Kidney Int 66 :1926-1938(2004); 还参见例如, Neufeld 等人, Kidney Int. 41 :1222-36(1992); Mangoo-Karim 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :6007-6011(1989); Mangoo-Karim 等人, FASEB J. 3 :2629-32(1989); Grantham 等人, Trans. Assoc. Am. Physic. 102 :158-62(1989); Mohamed 等人, Biochem J 322 :259-265(1997) 参见例如 Murcia 等人, Kidney Int. 55 :1187-97(1999); Igarishi 等人, J. Am. Soc. Nephrol. 13 :2384-88(2002))。因此,本文提供了通过确定化合物在体外细胞培养模型中抑制囊肿扩大或防止或抑制囊肿形成的能力,从而确定和/或表征结构 I(及其子结构)的 PPQ 化合物的方法。

[0169] MDCK 细胞系也用于例如使用诸多本领域已知和本文所述的技术和方法中的任何一种,通过评价细胞生存力(例如,通过本领域常规实践的任许多细胞染色(numerous cell staining)方法和显微镜方法)、细胞增殖(例如,通过确定并入核苷酸类似物的水平和其它检测细胞分裂的方法)和/或细胞凋亡来确定化合物缺乏细胞毒性的方法和技术。确定或量化本文所述的化合物抑制或逆转囊肿扩大或扩张和/或抑制或防止囊肿形成和/或减少形成的囊肿数量的能力的其它方法包括在本领域中实践的和本文所述的胚肾器官培养模型(参见例如, Magenheimer 等人, J. Am Soc. Nephrol. 17 :3424-37(2006); Steenhard 等人, J. Am. Soc. Nephrol. 16 :1623-1631(2005); Yang 等人, J. Am. Soc. Nephrol. 19 :1300-1310(2008))。在这样的胚肾培养模型中,能够在不存在通过循环激素和肾小球过滤而产生的任何效应或影响的情况下,在规定介质中监测肾组织的器官型生长和分化(Magenheimer 等人, supra; Gupta 等人, Kidney Int. 63 :365-376(2003))。在后肾器官培养中,早期小鼠肾小管通过对 cAMP 反应的 CFTR- 依赖性机制而具有对分泌液体的本征能力(Magenheimer 等人, supra)。

[0170] 本领域技术人员也可以使用动物模型来表征包括本文所述的那些的 PPQ 化合物,并且确定化合物减少、抑制、逆转或防止囊肿扩大和/或防止或抑制囊肿形成由此减少形成的囊肿数量的效力,以及确定这类化合物治疗患有 PKD 或处于发展 PKD 的风险中的个体的有效性。例如,如本文所述的和本领域中所实践的,可以在 C57BL/6 背景下产生 Pkd1<sup>flax</sup> 小鼠和 Ksp-Cre 转基因小鼠(参见例如, Shibasaki 等人, J. Am. Soc. Nephrol. 13 :10-11(2004)(摘要); Shao 等人, J. Am. Soc. Nephrol. 13 :1837-46(2002))。Ksp-Cre 小鼠在 Ksp- 钙粘着蛋白促进剂的控制下表达 Cre 重组酶(参见例如, Shao 等人, supra)。可以通过用 Pkd1<sup>+/-</sup>:Ksp-Cre 小鼠杂交 Pkd1<sup>flax/flax</sup> 小鼠而产生 Pkd1<sup>flax/-</sup>:Ksp-Cre 小鼠。可以通过定量囊肿尺寸以及后肾和肾切片的生长、组织和细胞的组织学分析以及肾衰竭和死亡的

延迟和预防来确定测试化合物的影响（参见例如，Shibazaki 等人，supra）。

[0171] 也可以在本领域接受的增加肠液分泌的动物模型中分析 PPQ 化合物。例如，霍乱的闭合性肠环模型、霍乱乳鼠模型以及胃肠运输的体内镜像可以用于表征本文所述的 PPQ 化合物（参见例如，Takeda 等人，*Infect. Immun.* 19 :752-54(1978) ;还参见例如 Spira 等人，*Infect. Immun.* 32 :739-747(1981)）。

[0172] 抑制 CFTR- 介导的离子运输的方法包括体外方法，其包括在一定条件下使细胞与任意一种或多种本文所述的结构 I（及其子结构）的 PPQ 化合物接触，并持续足以使细胞外膜中存在的 CFTR 和化合物相互作用的时间。可以用于这类方法的细胞（或细胞系）为表达 CFTR 的细胞并且具有由细胞膜的 CFTR 形成的通道或孔。示例性的细胞和细胞系包括而不仅限于：Fischer 大鼠甲状腺（FRT）细胞（包括共表达人类或其它动物野生型 CFTR 和卤化物引发剂 YFP-H148Q 或其它可比较的黄色荧光蛋白的 FRT 细胞）；培养的人类支气管上皮细胞；以及在细胞外膜中包含 CFTR 的胃肠细胞（例如 T84 人肠上皮细胞）。这类方法用于确定本文所述的 PPQ 化合物的类似物（即，结构 I 的物质，其包括子结构（IA）和（IB）的物质）并且用于表征本文所述的 PPQ 化合物。

[0173] 在某些实施方案中，在体外检验中接触细胞，并且从个体或从生物样本中获得细胞。生物样本可以为血液样本（可以由其制备血清或血浆，并分离细胞）、活检样本、体液（例如，肺灌洗、腹水、黏膜洗液、滑液）、骨髓、淋巴腺、组织移植物（例如肾细胞）、器官培养物（例如肾）、或来自个体或生物源的任何其它组织或细胞制品。样本还可以指组织或细胞制品，其中例如已通过解剖、分离、溶解、分馏、均质化、生物化学或化学提取、粉碎、冻干、超声降解或用于处理源自个体或生物源的样本的任何其它方法来破坏形态完整性或物理状态。个体或生物源可以为人类或非人类动物、初级细胞培养物（例如，免疫细胞、病毒感染细胞）或适合培养的细胞系，其包括但不限于可包含染色体完整或游离重组核酸序列的遗传学设计的细胞系、永生的或可永生的细胞系、体细胞杂交细胞系、分化的或可分化的细胞系、改变的细胞系等。

#### [0174] 药物组合物和使用药物组合物的方法

[0175] 本文还提供了药物组合物，其包含任意一种或多种结构 I（及其子结构）的 PPQ 化合物。可以在用于治疗或预防性（preventive）（或预防性（prophylactic））治疗（例如，减少囊肿形成的发生可能性）多囊肾病（PKD）的药物组合物中配制本文所述的化合物，所述多囊肾病包括常染色体显性 PKD（ADPKD）和常染色体隐性 PKD（ARPKD）。在其它实施方案中，可以配制包含至少一种 PPQ 化合物的药物组合物以在治疗或预防性治疗（即，减少发生的可能性）由增加的肠液分泌显现的疾病、疾病状态或病症（例如分泌性腹泻）中使用。

[0176] 在药物剂型中，可以以药物可接受的衍生物，例如盐的形式给予任意一种或多种本文所述的结构 I、结构（IA）、（IB）和具体结构的 PPQ 化合物，或者它们也可以单独使用或与其它药物活性化合物适当结合以及组合的形式而使用。本文所述的方法和赋形剂仅是示例性的而非限制性的。

[0177] 通常使用实验模型和 / 或临床实验确定最佳剂量。最佳剂量可以依赖于个体的体重、重量或血液体积。通常，本文所述的结构 I（及其子结构）的 PPQ 化合物存在于药剂中的量为约 0.01  $\mu$ g 至约 1000  $\mu$ g 每 kg 宿主体重。使用足以提供有效治疗的最小剂量通常是优选的。通常可以使用适于治疗或预防的疾病状态的检验来监测个体的治疗效果，所述

检验是本领域技术人员所熟悉的,并且在本文中描述。可以通过确定生物液体中化合物水平来检测给予个体的化合物水平,所述生物液体例如血液、血液组分(例如血清)和/或尿和/或来自个体的其它生物样本。可以使用本领域实践的检测化合物的任何方法来检测治疗方案期间的化合物水平。

[0178] 包含至少一个本文所述的 PPQ 化合物的组合物用于治疗 PCKD 的剂量可以依赖于个体情况,即疾病的状态、肾功能、由扩大囊肿导致的症状严重性、一般健康状态及年龄、性别和体重以及医药领域技术人员显而易见的其它因素。类似地,可以根据医药领域技术人员理解的参数来确定用于治疗与异常增加的 CFTR 功能相关的疾病或病症的 PPQ 化合物剂量,所述疾病或病症包括但不限于肠液分泌,分泌性腹泻(诸如毒素诱导的腹泻)或与致肠病感染、旅行者腹泻、溃疡性结肠炎、肠易激综合征(IBS)、AIDS、化疗或本文所述的其它疾病或疾病状态有关的分泌性腹泻,或致肠病感染、旅行者腹泻、溃疡性结肠炎、肠易激综合征(IBS)、AIDS、化疗或本文所述的其它疾病或疾病状态的后遗症。因此,适当的剂量可以依赖于个体情况,即,疾病的状态、一般健康状态以及年龄、性别和体重以及医药领域技术人员考虑的其它因素。

[0179] 可以以医药领域技术人员所确定的适于要治疗的疾病或病症的方式给予药物组合物。通过患者的疾病状态、患者疾病的类型和严重程度、活性成分的特定形式以及给药方法在内的这类因素确定适当的剂量和适当的给药持续时间和频率。通常,适当剂量(或有效剂量)和治疗方案提供了以足以提供治疗和/或预防益处(例如,改进的临床结构,例如更常见的完整或部分缓解或更长的无疾病和/或总存活或减小症状严重性或其它上面详细描述的好处)的量包含至少一种 PPQ 化合物的组合物。当治疗个体的异常增加的肠液分泌时,可以进行脱水水平和/或电解质不平衡的临床评价以确定化合物有效性水平,以及是否应调节剂量或其它给药参数(例如,给药频率或给药途径)。

[0180] 多囊肾病(polycystic kidney disease)(PKD)(或 PCKD)和多囊肾病(polycystic renal disease)可以交换使用,并且是指病症组,其特征为在整个扩大的肾中分布的大量囊肿。所得的囊肿发展导致肾功能损坏并能够最终导致肾衰竭。在发展的所有阶段,不管根本的病因或诱因,PKD 包括常染色体显性多囊肾病(ADPKD)和常染色体隐性多囊肾病(ARPKD)。可以通过一种或多种医药领域实践的若干方法监测治疗 PKD 的有效性,其包括例如,通过标准检测来监测肾功能,以及通过用超声、计算机 X 射线断层摄影(CT)或磁共振成像进行的放射性研究,其可用于评价肾囊肿形态和体积以及估计残余肾实质的量。

[0181] 为了评价和监测任意一种本文所述 PPQ 化合物治疗 PKD 或相关疾病或疾病状态的有效性,可以进行临床领域技术人员熟悉的一种或多种若干临床检验方法。例如,可以进行称为尿素清除率试验的临床方法。从被给予化合物的个体中获得血液样本,从而能够确定血流中尿素的量。另外,从个体收集第一尿样本,并且在至少一个小时之后,收集第二尿样本。在尿中确定的尿素量表示通过肾而过滤或清除进入尿的尿素量。其它临床检验方法检测尿同渗重摩(即,尿中溶解的溶质颗粒的量)。在同渗重摩试验期间,肾不能浓缩对受限液体摄取反应的尿,或者不能稀释对增加的液体摄取反应的尿可以表示降低的肾功能。

[0182] 尿素是蛋白代谢的副产品,并且在肝中形成。然后从血液过滤尿素,并通过肾在尿中排出。BUN(血液尿素氮)试验检测了尿素中包含的氮量。高 BUN 水平可以表示肾功能失

调,但因为血液尿素氮也受蛋白摄取和肝功能影响,因此通常结合血肌酐测定来进行试验,其被认为是更具体的肾功能指标。低肌酐和尿素清除率值表示肾从血液过滤这些废物并在尿中排出它们的能力降低。随着清除率水平降低,肌酐和尿素的血液水平增加。作为比 BUN 更具体和敏感的肾病指标,异常升高的血肌酐可诊断损坏的肾功能。

[0183] 可以通过有效递送有效量化合物的若干途径中的任一种来向需要的个体给予本文所述的包含至少一种 PPQ 化合物的药物组合物。这类给药途径包括,例如口服、肠胃外、肠、直肠、鼻内、口、舌下、肌内和经皮。例如,可以将至少一种或多种化合物给予至胃肠道的黏膜表面(例如,通过肠途径,其包括通过插入鼻、胃或小肠的管直接给予胃肠道)或者给予至口或鼻腔的黏膜表面,或者(例如,鼻内、口腔、舌下等)。这些给药方法和其它方法在本文中以更详细的方式讨论。

[0184] 药物组合物可以为无菌水性或非水性溶液、悬浮液或乳液,其另外包含生理学可接受的赋形剂(药物可接受的或适当的赋形剂或载体)(即,不干扰活性成分的活性的无毒材料)。这样的组合物可以为固体、液体或气体(气雾剂)的形式。或者,可以将本文所述的组合物配制为冻干产物,或可以使用本领域已知技术将化合物封装在脂质体中。药物组合物也可以包含其它成分,其可以为生物活性或无活性的。这样的成分包括但不限于,缓冲剂(例如,中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水)、碳水化合物(例如,葡萄糖、甘露糖、蔗糖或右旋糖)、甘露醇、蛋白质、多肽或诸如氨基乙酸的氨基酸、抗氧化剂、诸如 EDTA 或谷胱甘肽的螯合剂、稳定剂、染料、调味剂和悬浮剂和 / 或防腐剂。

[0185] 可以在本文所述组合物中使用用于药物组合物的任何本领域技术人员已知的适当赋形剂或载体。用于治疗用途的赋形剂是公知的,并已被描述,例如,在 Remington :The Science and Practice of Pharmacy(雷氏:药物的科学和实践)(Gennaro,第 21 版. Mack Pub. Co., Easton, PA(2005))。通常,基于给药方式选择赋形剂类型。可以配制用于任何适当给药方式的药物组合物,所述给药包括,例如局部、口服、鼻内、膜内、直肠、阴道、眼内、结膜内、舌下或肠胃外给药,肠胃外给药包括皮下、静脉内、肌内、胸骨内、海绵窦内、耳道内或尿道内注射或灌注。对于肠胃外给药,载体优选包括水、盐水、醇、脂肪、蜡或缓冲剂。对于口服给药,可以使用任意上述赋形剂或固体赋形剂或载体,例如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、高岭土、甘油、淀粉糊精、海藻酸钠、羧甲基纤维素、乙基纤维素、葡萄糖、蔗糖和 / 或碳酸镁。

[0186] 药物组合物(例如,用于口服给药或通过注射递送)可以为液体形式。液体药物组合物可以包含,例如下列的一种或多种:无菌稀释剂,例如注射用水、盐溶液,优选生理盐水、林格溶液、等张氯化钠,可以充当溶剂或悬浮介质的不挥发性油,聚乙二醇、甘油、丙二醇、或其它溶剂;抗菌剂;抗氧化剂;螯合剂;缓冲剂和用于调节毒性的试剂,例如氯化钠或右旋糖。能够将肠胃外制剂装入安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。优选使用生理盐水,并且可注射药物组合物优选是无菌的。

[0187] 可以配置用于持久释放或缓释的包含本文所述结构 (I) 和子结构 (IA) 和 (IB) 的任一化合物的组合物。通常可以使用已知技术制备这样的组合物并通过例如口服、直肠或皮下植入或通过期望靶点植入而给药。持久释放制剂可以包含在载体中分散的化合物和 / 或包含在由速率控制膜围绕的储存器内的化合物。在这类制剂中使用的赋形剂为生物相容的,并且也可以为生物降解的;优选地,制剂提供了相对恒定水平的活性成分释放。持

久释放制剂中包含的活性化合物的量依赖于植入位点、释放速率和期望持续时间以及要治疗或预防的疾病状态的性质。

[0188] 对于口服制剂,结构(I)和子结构(IA)和(IB)的PPQ化合物能够单独使用或与适当添加剂组合使用以制备片剂、粉末剂、颗粒剂或胶囊剂,所述添加剂例如:常规添加剂,例如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉;粘合剂,例如淀粉,凝胶,诸如葡萄糖或 $\beta$ 乳糖的天然糖,玉米甜味剂,诸如阿拉伯树胶、黄芪胶的天然和合成胶,或海藻酸钠,羧甲基纤维素,聚乙二醇,蜡,微晶纤维素,纤维素衍生物和阿拉伯树胶;崩解剂,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、琼脂、班脱土或黄原胶;润滑剂,例如滑石、油酸钠、硬脂酸镁硬脂酸钠、苯甲酸钠、乙酸钠或氯化钠;并且若需要,可使用稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、着色剂和调味剂。用缓冲剂配制化合物以提供对化合物的保护防止其受胃部环境和/或肠溶衣的低pH影响。可以例如以液体、固体或半固体制剂形式由调味剂和/或由肠溶衣配制用于口服递送的结构I(及其子结构)的PPQ化合物。

[0189] 提供了明胶胶囊形式的口服制剂,其可以包含活性化合物以及粉末状载体,例如乳糖、淀粉、纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸等。类似的载体和稀释剂可以用于制备压缩片剂。能够将片剂和胶囊剂制作成持久释放的产品以提供一定时间内活性成分连续释放。压缩片剂能够为糖包衣的或膜包衣的,以掩盖任何不合意的味道并保护片剂免受大气影响,或者压缩片剂能够为肠溶衣以用于在胃肠道中选择性崩解。用于口服给药的液体剂型可以包含着色剂和/或调味剂以增加个体对化合物的接受度。

[0190] 能够通过多种基质混合将本文所述的结构I(及其子结构)的PPQ化合物制成栓剂,所述基质例如乳化基质或水溶性基质。能够通过栓剂直肠给予本文所述化合物。栓剂能够包括介质,例如可可油、聚乙二醇(carbowax)和聚乙二醇,其在体温下融化,而在室温中固化。

[0191] 可以气雾剂制剂的形式使用本文所述的结构I(及其子结构)的PPQ化合物以通过吸入而给药。可以将化合物配制成增压的可接受推进剂,例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等。

[0192] 可以局部给予(例如,通过经皮给药)任意一种或多种本文所述的结构I(及其子结构)的PPQ化合物。局部制剂可以为经皮贴剂、软膏剂、糊剂、洗剂、乳膏剂、凝胶剂等形式。局部制剂可以包括一种或多种渗透剂、增稠剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。当将PPQ化合物配制为经皮递送时,可以用渗透增强剂配制化合物,或者可以配制化合物以与渗透增强剂一起使用。包括化学渗透增强剂和物理渗透增强剂的渗透增强剂促进化合物通过皮肤递送,并且也可以替换地称为“渗入增强剂”。例如物理渗透增强剂包括诸如离子电渗疗法的电泳技术、应用超声(或“超声渗入疗法”)等。化学渗透增强剂为在化合物给药之前、同时、或之后立即给予的试剂,其增加了皮肤渗透性,特别是角质层渗透性,以提供药物通过皮肤的增强渗透。例如,另外的化学和物理渗透增强剂描述在Transdermal Delivery of Drugs(药物的经皮递送),A. F. Kydonieus(ED)1987 CRL Press;Percutaneous Penetration Enhancers(经皮渗透增强剂),eds. Smith等人(CRC Press,1995);Lenneruas等人,J. Pharm. Pharmacol. 2002;54(4):499-508;Karande等人,Pharm. Res. 2002;19(5):655-60;Vaddi等人,Int. J. Pharm. 2002年7月;91(7):1639-51;Ventura等人,J. Drug Target 2001;9(5):379-93;Shokri等人,Int. J. Pharm. 2001;228(1-2):99-107;Suzuki等人,Biol. Pharm. Bull. 2001;24(6):698-700;Alberti等

人, J. Control Release 2001 ;71(3) :319-27 ;Goldstein 等人, Urology 2001 ;57(2) :301-5 ;Kiijavainen 等人, Eur. J. Pharm. Sci 2000 ;10(2) :97-102 ;和 Tenjarla 等人, Int. J. Pharm. 1999 ;192(2) :147-58。

[0193] 当用化学渗透增强剂配制结构 I (及其子结构) 的 PPQ 化合物时, 选择与化合物匹配的渗透增强剂, 并且其以足以促进化合物通过个体皮肤而递送的量存在, 例如, 用于将化合物递送至体循环。可以以诸如透黏膜或经皮贴剂的药物递送贴剂形式来提供结构 I (及其子结构) 的 PPQ 化合物, 并且能够与渗透增强剂一起配制。贴剂通常包括: 不可透过化合物和其它制剂成分的支持层 (backing layer); 与支持层接触的基质, 所述基质提供化合物的可以为控释的持久释放; 以及与基质在支持层同一侧的粘合层。能够选择适于给药途径的基质, 并且能够为例如聚合或水凝胶基质。

[0194] 在一个实施方案中, 将结构 I (及其子结构) 的 PPQ 化合物递送至个体胃肠道以提供减少的液体分泌。本实施方案的适当制剂包括提供化合物到胃肠表面、特别是到肠道表面的递送的任意制剂。

[0195] 对于本文所述的方法的用途, 可以用其它药物活性试剂或化合物配制一种或多种本文所述的结构 I (及其子结构) 的 PPQ 化合物, 所述药物活性试剂或化合物包括其它 CFTR 抑制剂和化合物, 或阻断肠氯通道的试剂和化合物 (例如, 本文讨论的甘氨酸酰肼化合物或噻唑烷酮化合物)。类似地, 可以用其它药物活性试剂或化合物配制一种或多种本文所述的结构 I (及其子结构) 的 PPQ 化合物, 所述药物活性试剂或化合物包括其它 CFTR 抑制剂和化合物, 或为了治疗 PKD 而给予个体的其它试剂和化合物。

[0196] 提供了通常为口服或可注射剂量形式的具有单位剂量的本文所述结构 I (及其子结构) 的 PPQ 化合物的试剂盒。这类试剂盒可以包括: 包含单位剂量的容器、描述药物在治疗目标病理学疾病状态中的用途和伴随的益处的药品包装说明书, 并且任选地包括用于递送组合物的器具或装置。

[0197] 本文还提供了制备包含至少一种本文所述的结构 I、子结构 (IA)、(IB) 和具体结构的 PPQ 化合物的本文所述药物组合物的方法。在一个实施方案中, 制备方法包括化合物的合成。可以根据本文所述的和本领域实践的方法进行本文所述的多种化合物中的任一种的合成。在其它制备方法中, 所述方法包括配制 (即, 组合、混合) 至少一种本文所述化合物与药物适当的赋形剂。在允许配制和 / 或保持每一化合物和赋形剂的期望状态 (即, 例如, 液态或固体) 的条件下进行这些方法。制备方法可以包括合成至少一种化合物、用至少一种药物适当的赋形剂配制化合物以形成药物组合物、以及将配制的药物组合物分散在适当容器中 (即, 适于药物组合物的储存和 / 或分布的容器) 中的一个或多个步骤。

[0198] 根据本公开, 其它实施方案和用途对本领域技术人员是显而易见的。下列实施例仅以多种实施方案的示例性说明的方式提供, 不应被解释为以任何方式限制本发明。

## 实施例

[0199] 实施例 1

[0200] 合成 PPQ-102

[0201] 合成步骤 (常用): 使用 400-MHz Varian 分光计参照 DMSO 在氘化的二甲基亚砜 (DMSO-d<sub>6</sub>) 中获得 <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C NMR 谱。使用 Waters LC/MS 系统进行质谱分析 (Alliance

HT 2790+ZQ, HPLC :Waters model 2690, Milford, MA)。使用 EM 硅胶 (230-400 目) 进行快速色谱, 并使用 Merck 硅胶 60 F254 板 (Darmstadt, 德国) 进行薄层色谱。在 Biotage Initiator™ (Biotage, Uppsala, 瑞典) (0.5-2mL 小瓶) 中进行微波反应, 在 ~ 55 瓦下, 在 30s 内达到目标温度。未修正熔点。通过 LCMS 确定纯度 > 98%。

[0202] 合成 PPQ-102 : 如图 2B 所示, 在六步内实现合成 PPQ-102。使用硫酸二甲酯来甲基化商购的 6- 甲基尿嘧啶 1 以产生 1,3,6- 三甲基尿嘧啶 2, 其在 Friedel-Crafts 酰基化时使用氯化锌作为催化剂, 产生白色粉末形式的 5- 苯甲酰基 -1,3,6- 三甲基嘧啶 -2,4(1H, 3H)- 二酮 3。溴化 3, 然后与 N-(2- 氨基苯基) 乙酰胺反应产生氨基保护的中间体 5。水解 5 的乙酰氨基官能团, 并用 5- 甲基糠醛来环化缩合 (cyclocondense) 所得的中间体 6 以产生淡黄色-白色外消旋 PPQ-1027。通过用高锰酸钾氧化由 7 制备的缺少立构中心的芳香族化合物 8。

[0203] 图 2B 所示的的反应的反应物和条件 : (a)  $\text{Me}_2\text{SO}_4$ , NaOH, 40 °C, 4h, 43% ; (b)  $\text{PhCOCl}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ , 甲苯, 回流, 6h, 28% ; (c)  $\text{Br}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , 室温, 2h, 57% ; (d) N-(2- 氨基苯基) 乙酰胺, 微波, 170 °C, 1h, 51% ; (e) HCl, 回流, 6h, 67% ; (f) 5-Me- 呋喃 -2- 甲醛, 170 °C, 10min, 43% ; (g)  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{Me}_2\text{CO}$ , 1h, 40%。在下面更详细地描述了 PPQ-102 和中间体的合成。

[0204] 1,3,6- 三甲基 -1H,3H- 嘧啶 -2,4- 二酮 (2)。(参见例如, Azas 等人, *Farmaco*. 58 : 1263-1270 (2003))。在 40 °C 下, 向 2,4- 二羟基 -6- 甲基嘧啶 (30g, 238mmol) 的 280mL 4N NaOH 溶液中逐滴加入硫酸二甲酯 (106g, 80ml, 844mmol)。在 40 °C 下搅拌 4 小时之后, 通过仔细加入乙酸来中和反应混合物, 并用 100mL 乙酸乙酯萃取 3 次。在  $\text{MgSO}_4$  上干燥混合的有机物, 并浓缩至真空以产生白色固体。从乙醇重结晶来产生 2 (15.8g, 43%) : mp 113-114 °C ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ) :  $\delta$  5.58 (s, 1H), 3.26 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 2.19 (s, 3H) ; MS ( $\text{ES}^+$ ) (m/z) :  $[\text{M}+1]^+ \text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$  计算值 155.17, 实测值 155.93。该化合物符合报道的分析数据 (参见例如, Azas 等人, *Farmaco*. 58 : 1263-1270 (2003))。

[0205] 5- 苯甲酰基 -1,3,6- 三甲基嘧啶 -2,4(1H,3H)- 二酮 (3)。将 1,3,6- 三甲基 - 化合物 2 (12.3g, 80mmol)、苯甲酰氯 (11.5g, 9.5mL, 82mmol) 和无水氯化锌 (10.8g, 79mmol) 的甲苯 (100mL) 混合物加热至回流, 时间为 6 小时。将混合物倒在冰 (200g) 上, 在真空中浓缩分离的甲苯层。通过快速色谱纯化粗残留物以产生 3 (5.8g, 28%) : mp 132-134 °C ; MS ( $\text{ES}^+$ ) (m/z) :  $[\text{M}+1]^+ \text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$  计算值 259.28, 实测值 259.09。该化合物符合报道的分析数据 (参见例如, Tsupak 等人, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii*. 7 : 1096-1102 (2003))。

[0206] 5- 苯甲酰基 -6-( 溴甲基) -1,3- 二甲基嘧啶 -2,4(1H,3H)- 二酮 (4)。(参见例如, Tsupak 等人, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii*. 7 : 1096-1102 (2003) ; Tsupak 等人, *Russ. Chem. Bull.* 55 : 2265-2270 (2006))。在室温下, 在 30 分钟内, 向 3 (2.61g, 10.1mmol) 的氯仿 (13mL) 溶液中逐滴加入溴 (1.62g, 0.52mL, 20.3mmol 的 3mL 氯仿)。在真空下浓缩之前, 在室温下进一步搅拌反应混合物 1 分钟。通过快速色谱纯化粗反应混合物以产生 4 (1.96g, 57%) ; mp 164-167 °C ; MS ( $\text{ES}^+$ ) (m/z) :  $[\text{M}+1]^+ \text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}_3$  计算值 338.18, 实测值 337.15, 338.93。该化合物符合报道的分析数据 (参见例如, Tsupak 等人, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii*. , supra ; Tsupak 等人, *Russ. Chem. Bull.* , supra)。

[0207] N-(2-(1,3- 二甲基 -2,4- 二氧代 -5- 苯基 -3,4- 二氢 -1H- 吡咯并 [3,4-d] 嘧啶 -6(2H)- 基) 苯基) 乙酰胺 (5)。在 170 °C 下微波加热 N-(2- 氨基苯基) 乙酰胺 (315mg,

2.1mmol)、溴化合物 4(680mg,2mmol)、三乙胺(200mg,280  $\mu$ L,2mmol)和乙醇(2mL)的混合物 1 小时(2-5mL 小瓶,压力 13 巴)。过滤、洗涤明亮的白色晶体,并将其从乙醇中重结晶以产生 5(392mg,产率 51%);mp > 250 $^{\circ}$ C; $^1$ H NMR(DMSO- $d_6$ ): $\delta$  9.17(s,1H),7.69(d,1H,吡咯 CH, J = 8.06Hz),7.33-7.14(m,6H),7.10-6.94(m,3H),3.31(s,3H),3.17(s,3H),1.87(s,3H).MS(ES $^+$ )(m/z):[M+1] $^+$ C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 计算值 389.43,实测值 389.19。

[0208] 6-(2-氨基苯基)-1,3-二甲基-5-苯基-1H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-2,4(3H,6H)-二酮(6)。在盐酸(4N,10mL)中回流乙酰胺化合物 5(200mg,0.5mmol),持续 6 小时。在真空下蒸发反应混合物,并将残留物溶于水中并中和,以得到白色沉淀形式的 6(120mg,67%);mp > 300 $^{\circ}$ C; $^1$ H NMR(DMSO- $d_6$ ): $\delta$  7.32-7.26(m,2H),7.23-7.15(m,3H),7.00(t,1H, J = 7.32Hz),6.87(s,1H),6.80(d,1H, J = 7.69),6.70(d,1H, J = 8.06Hz),6.41(t,1H, J = 7.32Hz),5.00(s,2H),3.29(s,3H),3.16(s,3H);MS(ES $^+$ )(m/z):[M+1] $^+$ C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 计算值 347.39,实测值 347.10。

[0209] 7,9-二甲基-11-苯基-6-(5-甲基咪唑-2-基)-5,6-二氢-嘧啶并[4',5'-3,4]吡咯并[1,2-a]喹啉-8,10-(7H,9H)-二酮(PPQ-102,7)。在 170 $^{\circ}$ C,在微波反应器中加热 5-甲基咪唑-2-甲醛(32mg,29  $\mu$ L,0.29mmol)、化合物 6(101mg,0.29mmol)和乙醇(1mL),持续 10 分钟。分离、洗涤白色产物,并从乙醇中重结晶以得到 51mg 的 7(产率 42%);m.p. > 300 $^{\circ}$ C; $^1$ H NMR(DMSO- $d_6$ ): $\delta$  7.41(宽 m,4H),6.95(d,2H, J = 8.42Hz),6.90-6.83(m,2H),6.29(d,2H, J = 2.93Hz),6.08(d,1H, J = 2.19Hz),5.80(d,1H, J = 2.93Hz),5.69(d,1H, J = 2.93Hz),3.50(s,3H),3.12(s,3H),2.11(s,3H)。 $^{13}$ C NMR(DMSO):159.2,153.1,151.9,151.9,139.2,131.5,129.6,129.4,128.8,126.9,124.3,122.8,120.6,118.2,117.6,111.9,108.9,107.1,105.2,47.8,32.3,28.2,13.9。HRMS(ES $^+$ )(m/z):[M+1] $^+$ C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 计算值 439.1765,实测值 439.1771。

[0210] N-(2-(1,3-二甲基-2,4-二氧化-5-苯基-3,4-二氢-1H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6(2H)-基)苯基)-5-甲基咪唑-2-甲酰胺(8)。向 7 的溶液(12mg,27  $\mu$ mol 的 2mL 丙酮)中逐滴加入高锰酸钾饱和溶液(13mg,80  $\mu$ mol,200  $\mu$ L)。在室温下搅拌反应混合物 1 小时并过滤。通过标准方法处理残留物(参见例如,0e1s 等人,J. Chem. Soc. Perkin Trans. 23:2546-2551(1977)),并蒸发丙酮溶液以产生 8(5mg,40%)。MS(ES $^+$ )(m/z):[M+1] $^+$ C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 计算值 437.47,实测值 437.12。

[0211] 实施例 2

[0212] 生物方法

[0213] A. 细胞系和化合物:按照所述方式产生共表达人类野生型 CFTR 和卤化物指示剂 YFP-H 148Q/1152L 的 Fischer 大鼠甲状腺(FRT)细胞(参见例如,Ma 等人,J. Clin. Invest. 110:1651-1658(2002))。在补充了 5%胎牛血清、2mM L-谷氨酸盐、100U/mL 盘尼西林和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 Coon 修饰的 F 12 培养基中,在 96 孔黑色包围(walled)微板(Corning Costar)中放置细胞,密度为 20,000 细胞每孔。在放置细胞后的 48 小时,当细胞恰好汇合时进行检验。对于某些实验,使用 T84 人肠上皮细胞进行检测,而对于其它实验,使用人支气管上皮细胞的原始培养物获得检测,所述细胞为原发地获得和培育的,如前所述(参见例如,3 和 27)。

[0214] 用于筛选以确定 CFTR 抑制剂的化合物收集物包括来自 ChemDiv(San Diego, CA)

和 Asinex (San Diego, CA) 的约 105,000 个合成小分子,以及来自 Analyticon (Potsdam, 德国)、Timtek (Newark, NJ) 和 Biomol (Plymouth Meeting, PA) 的约 7500 纯天然化合物。将化合物保持为 DMSO 原液。使用购自 ChemDiv 和 Asinex 的类似物进行结构活性分析。

[0215] **B. 化合物筛选:** 使用装有所述 FLUOStar 荧光板读书器 (BMG Lab Technologies, Offenburg, 德国) 的自动筛选板 (Beckman) 进行检验,如上所述 (参见 Ma 等人, supra)。在 PBS (300  $\mu$  L 每次洗涤) 中将包含 FRT 细胞的 96 孔板的每一孔洗涤 3 次,剩余 50  $\mu$  L PBS。添加 10  $\mu$  L 的 CFTR 激活混合物 (5  $\mu$  M 毛喉素, 100  $\mu$  M IBMX, 25  $\mu$  M 芹菜素的 PBS), 并在 5 分钟后,向每孔添加最终浓度为 25  $\mu$  M 的试验化合物 (0.5  $\mu$  L 的 1mM DMSO 溶液)。15 分钟后,将 96 孔板转移至用于荧光检验的板读书器。通过连续记录 (每点 200ms) 荧光 2 秒 (基线),然后在快速添加 160  $\mu$  L 的等渗 PBS (其中用碘化物替换 137mM 氯化物) 之后记录 10 秒,从而单独分析每孔的 CFTR 介导的碘化物流入。通过非线性回归从荧光数据计算初始碘化物流入速率。每板包含负对照 (DMSO 介质) 和正对照 (10  $\mu$  M CFTR<sub>inh</sub>-172)。

[0216] **C. 短路电流检测:** 在尤斯室中安装含 CFTR 表达的 FRT 细胞 (稳定表达人类野生型 CFTR)、T84 细胞或人支气管上皮细胞的 Snapwell 插入物。对于 FRT 细胞,用 5mL 的 75mM NaCl 和 75mM 葡萄糖酸钠 (顶部) 及 150mM NaCl (基底外侧) (pH 7.3) 填充半室 (hemichamber),并用 250  $\mu$  g/mL 两性霉素 B 渗透基底外侧膜。对于支气管上皮细胞和 T84 细胞,两个半室均包含 Krebs-碳酸氢盐溶液。连续向半室吹入空气 (FRT 细胞) 或含 5% CO<sub>2</sub> 的空气 (支气管和 T84 细胞),并保持在 37°C。使用 DVC-1000 电压钳 (World Precision Instruments, Sarasota, FL),使用 Ag/AgCl 电极和 3M KCl 琼脂桥来连续记录短路电流。

[0217] **D. 膜片钳分析:** 使用稳定表达人类野生型 CFTR 的 FRT 细胞进行整个细胞记录。吸液管溶液包含 140mM N-甲基 D-葡萄糖胺氯化物 (NMDG-Cl)、5mM EGTA、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM Tris-ATP 和 10mM HEPES (pH 7.2),并且溶液包含 140mM N-甲基 D-葡萄糖胺氯化物、1mM CaCl<sub>2</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>、10mM 葡萄糖和 10mM HEPES (pH 7.4)。在室温 (22-25°C) 下进行实验。从硼硅酸盐玻璃拉出吸液管并在火焰抛光后电阻为 3-5M $\Omega$ 。密封电阻通常为 3 至 10G $\Omega$ 。在建立整个细胞构型之后,通过添加毛喉素和 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 激活 CFTR。以 20mV 的阶跃,通过实施将脉冲电压从 0mV 的保持电压超极化和去极化为 -100mV 至 +100mV 的电压,从而引出整个细胞电流。在 5kHz 过滤电流并使用 AxoScope 10.0 系统和 Digidata<sup>®</sup> 1440A AC/DC 转换器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 将电流数字化并分析。使用电阻为 10-15M $\Omega$  的火焰抛光的移液管在细胞吸附的构型中分析 CFTR 的单通道特征。移液管溶液包含 (单位为 mM): 140NMDG-Cl、1CaCl<sub>2</sub>、1MgCl<sub>2</sub>、5 葡萄糖和 10HEPES (pH 7.4),并且溶液包含 140KCl、1CaCl<sub>2</sub>、1MgCl<sub>2</sub>、5 葡萄糖和 10HEPES (pH 7.4)。使用 Axopatch-200B (Axon Instruments, Foster City, CA) 在室温下进行记录。在 1kHz 低通过滤电压和电流数据,并储存用于后期分析。在 25Hz 下,数字过滤单通道数据,并使用 Clampfit 10.0 软件 (Axon Instruments) 进行分析。

[0218] **E. PKD 的胚胎器官培养模型:** 在胚胎期 13.5 天 (E 13.5) 获得小鼠晶胎。将后肾切割并放置在所述透明 Falcon 0.4-mm 直径多孔细胞培养插入物上 (参见例如, Sonawane 等人, Chem. Biol. 15 :718-728 (2008))。向培养插入物中加入补充了 2mM L-谷氨酸盐、10mM HEPES、5  $\mu$  g/mL 胰岛素、5  $\mu$  g/mL 铁转移蛋白、2.8nM 硒、25ng/ml 前列腺素 E、32pg/ml T3、250U/ml 盘尼西林和 250  $\mu$  g/ml 链霉素的 DMEM/Ham's F-12 营养培养液。在 37°C 潮湿的

CO<sub>2</sub> 孵育器中保持肾直到 8 天。每隔 12h 替换（在下室中）包含 100 μM 8-Br-cAMP、具有或没有 CFTR 抑制剂的培养基。在某些研究中，在 8-Br-cAMP 之后在第 3 天添加 CFTR 抑制剂以检测其逆转预形成的囊肿的效力。使用装有 2× 物镜、520nm 带通滤波器和高分辨率 CCD 照相机的 Nikon 倒置显微镜 (Nikon TE 2000-S) 对肾拍照。用总囊肿面积除以总肾面积来计算囊肿面积百分比。

#### [0219] 实施例 3

##### [0220] 作为 CFTR 抑制剂的 PPQ 化合物的确定

[0221] 根据实施例 2 所述的筛选步骤筛选合成和天然化合物收集物。将基于细胞的荧光检验用于通过 FRT 细胞共表达的人类 CFTR 和 YFP 卤化物传感器中减少的碘化物流入来确定为哪一种 CFTR 抑制剂。通过具有不同激活机制的激动剂混合物来最大程度地激活 CFTR。根据对 96 孔板的每一孔的快速碘化物添加响应的减少的 YFP 荧光淬灭，来观察碘流入的抑制。基于由化合物的随机筛选来确定小百分比的活性 CFTR 抑制剂的现有知识，对在检测荧光之前预孵育 15 分钟的 25 μM 测试化合物进行初级筛选。

[0222] 图 1B 显示在负对照（仅有介质）孔、正对照（10 μM CFTR<sub>inn</sub>-172）孔和含测试化合物的孔中的示例性 YFP 荧光数据。示出两个活性化合物的示例性数据。五十四种化合物显示出在 25 μM 时大于 50% 的 CFTR 抑制。在第二筛选检验中包括这些五十四种化合物；电生理学检测显示三种化合物表现出在 5 μM 时大于 50% 的 CFTR 抑制。在筛选中确定的若干活性化合物与前面确定的 CFTR 抑制剂相关。还确定了新的抑制剂类别，即嘧啶并 - 吡咯并 - 喹啉二酮 (PPQ) 化合物。具有最大 CFTR 抑制效力的 PPQ 类似物 (PPQ-102) 的结构显示在图 1A 中。不像前面确定的 CFTR 抑制剂，在生理学 pH 下 PPQ 化合物没有电荷。

#### [0223] 实施例 4

##### [0224] 在筛选检验中确定的 PPQ 化合物的结构 - 活性分析

[0225] 为了进一步表征和生物测试，进行结构活性分析以确定最有效的 PPQ 类 CFTR 抑制剂。使用荧光筛选检验而筛选的 347 个商购 PPQ 类似物中，54 个化合物在 25 μM 时抑制大于 50% 的 CFTR 介导的碘化物流入。表 1 总结了示例性 PPQ 化合物抑制 CFTR 的 CFTR 抑制数据。图 2A 总结了与 PPQ 化合物的多种取代基效力有关的 PPQ 化合物的 CFTR 抑制活性。具有 5- 甲基咪喃基部分 (PPQ-101 至 PPQ-105) 的 PPQ 类似物显示与未取代的咪喃基和噻吩类似物（组 1，表 1）相比更大的抑制效力。包含诸如 1H- 苯并咪唑 -2- 基和代替咪喃的苯并吡喃酮的其它杂环的化合物是无活性的。包含苯基、PPQ-201 至 PPQ-203、PPQ-209 和 PPQ-210（组 2，表 1）的类似物的效力略低于咪喃类似物 PPQ-101 和 PPQ-102。总之，如表 1 和图 2A 所示，表现出最大 CFTR 抑制活性的 PPQ 化合物具有 5- 甲基咪喃环、3- 甲基苯基部分和嘧啶并 [4', 5'-3, 4] 吡咯并 [1, 2-a] 喹啉模板。能用相对稳定的苯基部分替换许多活性化合物的咪喃部分，以使活性损失最小。所有活性类似物在吡咯的 2- 位具有苯环（取代的或未取代的）。在该苯环上的甲基取代基增加了 CFTR 抑制效力，如 PPQ-101、102、103 和 PPQ-215、202、213 所观察到的。除去立构中心并产生平面结构的 PPQ-102 至 PPQ-102b（化合物 8，参见图 2B）的芳香化破坏了 CFTR 抑制活性。

##### [0226] 表 1. PPQ 化合物的 CFTR 抑制

##### [0227]

<p>(IA) X 是 O, R<sup>3</sup> 是甲基, R<sup>1c</sup> 是 H</p>		<p>(IB) R<sup>4d</sup> 和 R<sup>1c</sup> 是 H</p>			
组 1	R <sup>2a</sup> =R <sup>2b</sup>	R <sup>1a</sup>	R <sup>1b</sup>	25/5 $\mu$ M 的抑制%	IC <sub>50</sub> <sup>app</sup> ( $\mu$ M)
PPQ-101	H	H	CH <sub>3</sub>	98/82	0.7
PPQ-102	H	H	H	97/87	0.8

[0228]

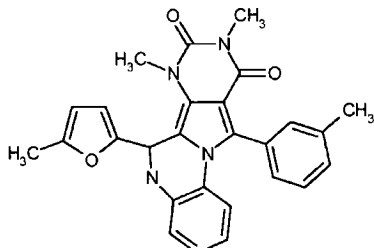
PPQ-103	H		CH <sub>3</sub>		H		97/86	0.8
PPQ-104	CH <sub>3</sub>		H		H		90/84	0.8
PPQ-105	CH <sub>3</sub>		F		H		87/80	1.5
组 2	R <sup>4a</sup>	R <sup>4b</sup>	R <sup>4c</sup>	R <sup>2a</sup> = R <sup>2b</sup>	R <sup>1a</sup>	R <sup>1b</sup>		
PPQ-201	F	F	H	H	H	H	93/72	1.2
PPQ-202	H	NO <sub>2</sub>	H	H	H	H	90/60	1.2
PPQ-203	H	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	99/80	1.5
PPQ-204	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	86/63	1.7
PPQ-205	F	H	H	H	H	H	81/61	2
PPQ-206	H	H	H	H	H	H	92/61	2.5
PPQ-207	H	H	OH	H	H	H	86/64	4.5
PPQ-208	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	H	H	56/5	100
PPQ-209	H	H	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	94/71	1.7
PPQ-210	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>	98/73	1.7
PPQ-211	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	F	H	97/62	2
PPQ-212	F	NO <sub>2</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>	94/61	2
PPQ-213	H	NO <sub>2</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H	96/64	2
PPQ-214	H	Cl	H	H	F	H	98/70	2.5
PPQ-215	F	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	80/67	2.5
PPQ-216	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H	94/62	3
PPQ-217	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H	100/46	3
PPQ-218	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	97/51	5
PPQ-219	H	F	H	H	H	CH <sub>3</sub>	93/53	8

[0229] IC<sub>50</sub><sup>app</sup> 是从荧光板阅读器检验中的浓度抑制数据而测定的明显的 IC<sub>50</sub>。

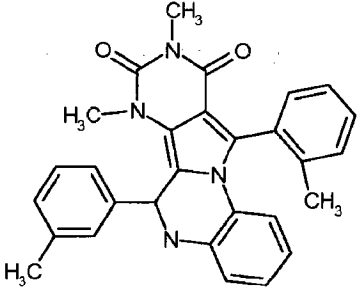
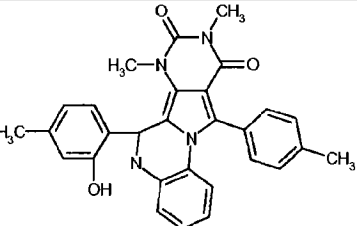
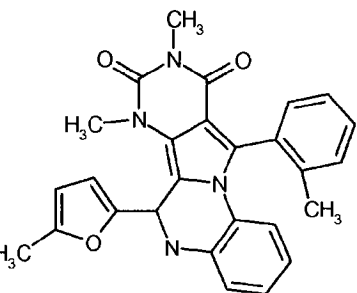
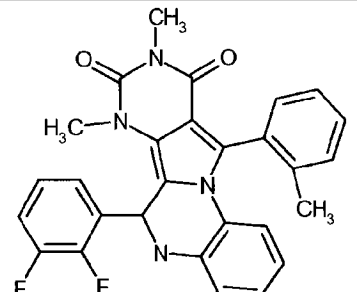
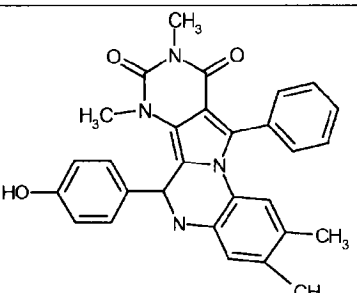
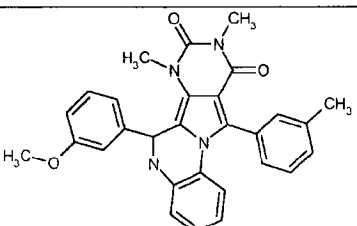
[0230] 检测结构 I、子结构 (IA)、(IB) 的 PPQ 化合物, 从筛选得到的抑制百分数数据显示在下表 2 中。

[0231] 表 2

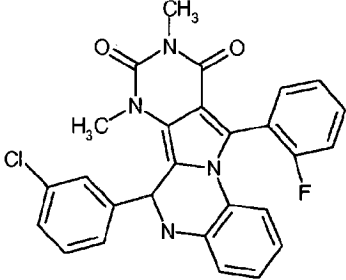
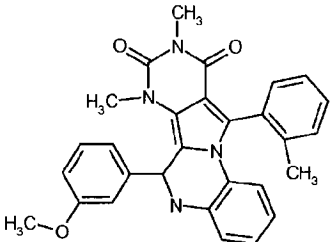
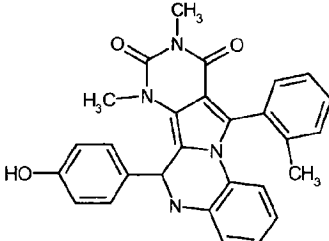
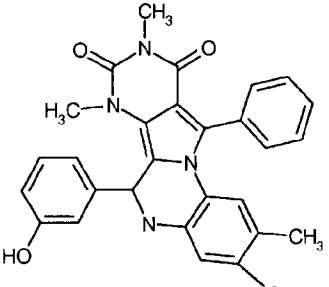
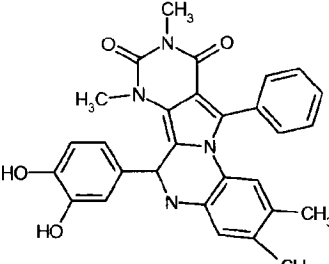
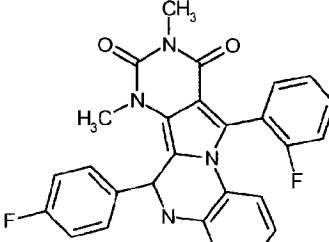
[0232]

PPQ 化合物	25 $\mu$ M 的抑制%	5 $\mu$ M 的抑制%	PPQ#
	>95	>95	PPQ-101

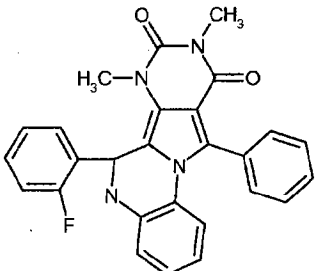
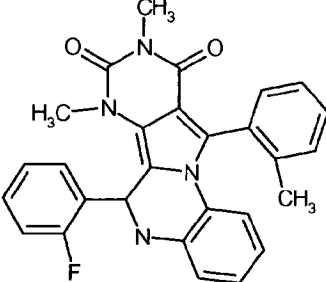
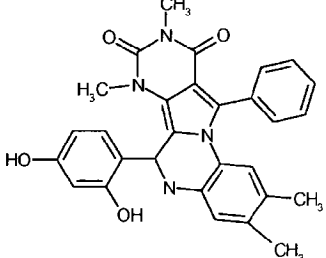
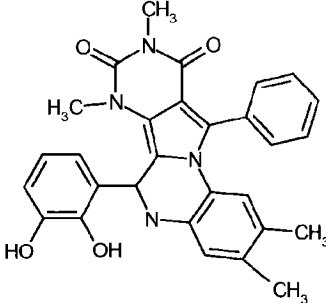
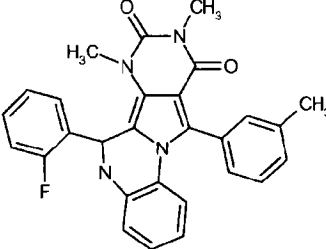
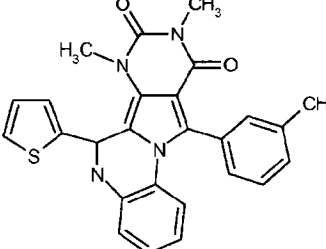
[0233]

	>95	46	PPQ-217
	>95	<10	PPQ-220
	>95	63	PPQ-103
	>95	50	PPQ-221
	>95	80	PPQ-203
	>95	73	PPQ-210

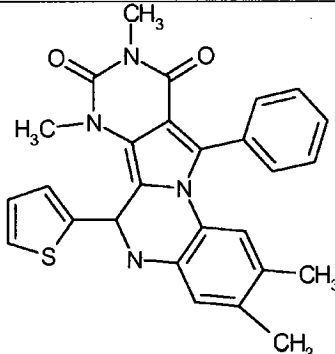
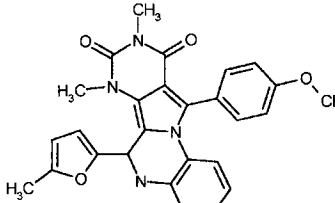
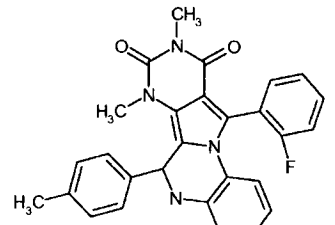
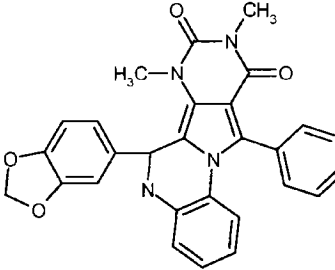
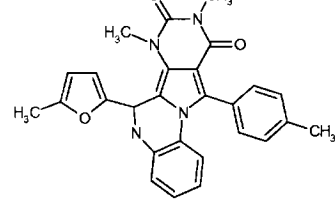
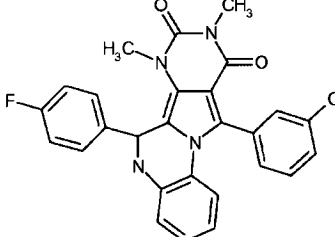
[0234]

	>95	70	PPQ-214
	>95	62	PPQ-216
	84	32	PPQ-222
	92	36	PPQ-223
	82	24	PPQ-224
	82	28	PPQ-233

[0235]

	81	61	PPQ-205
	81	53	PPQ-234
	80	12	PPQ-235
	80	14	PPQ-236
	80	67	PPQ-215
	79	29	PPQ-114

[0236]

	61	14	PPQ-115
	68	42	PPQ-109
	58	20	PPQ-237
	58	28	PPQ-301
	57	21	PPQ-110
	57	22	PPQ-238

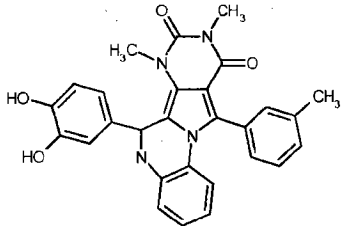
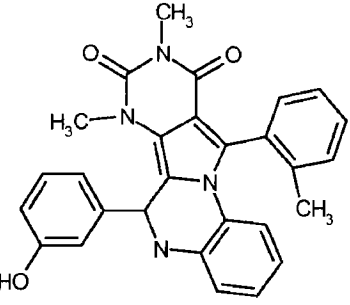
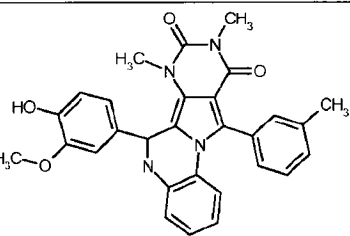
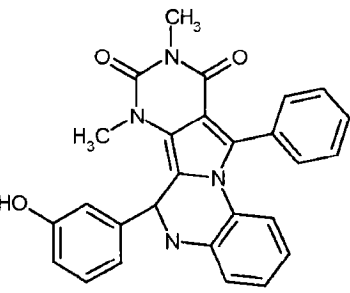
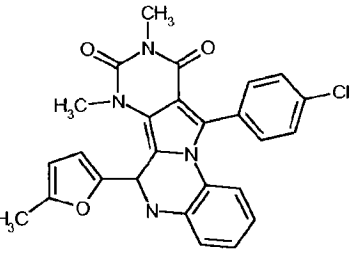
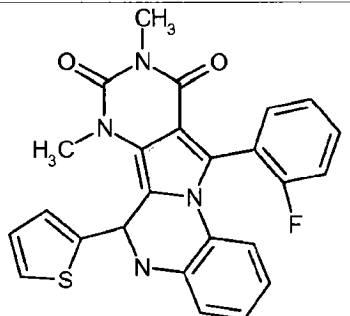
[0237]

	56	32	PPQ-244
	56	13	PPQ-208
	55	20	PPQ-245
	54	11	PPQ-112
	38	<10	
	41	<10	

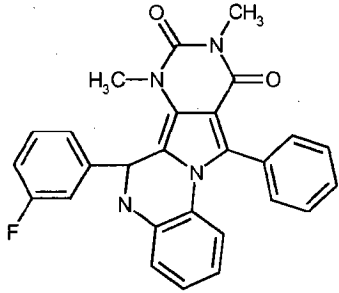
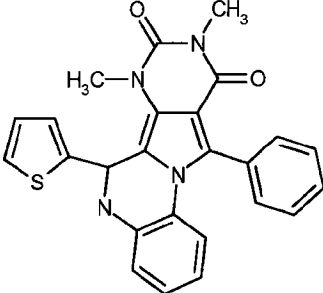
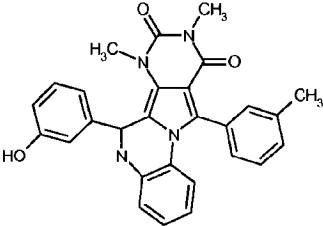
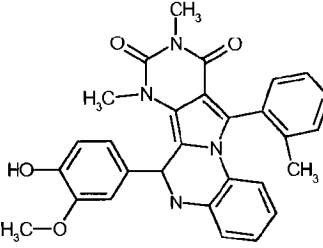
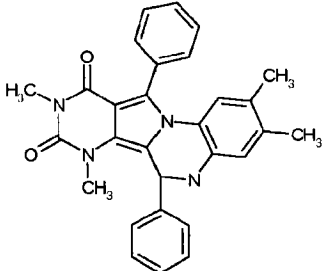
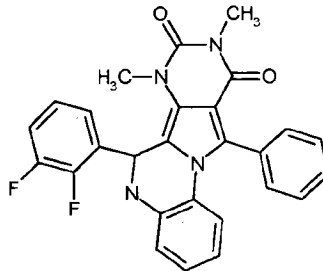
[0238]

	38	<10	
	37	<10	
	36	<10	
	35	<10	
	58	13	PPQ-247
	50	<10	PPQ-246

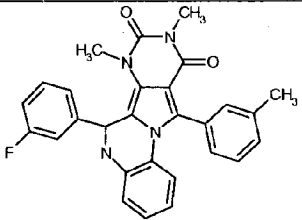
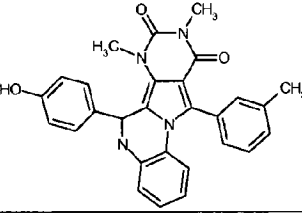
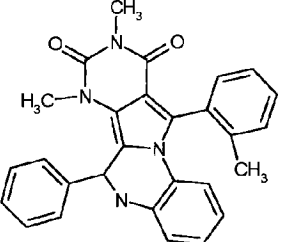
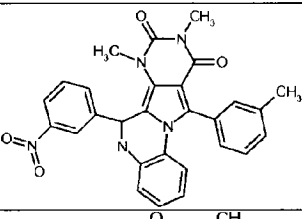
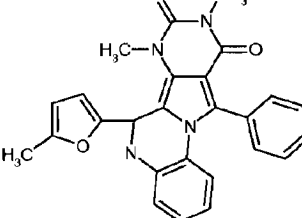
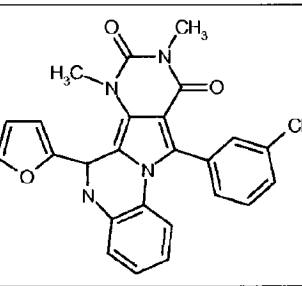
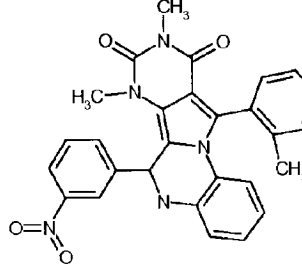
[0239]

	72	12	PPQ-243
	74	15	PPQ-242
	74	16	PPQ-241
	74	30	PPQ-240
	75	31	PPQ-111
	76	47	PPQ-116

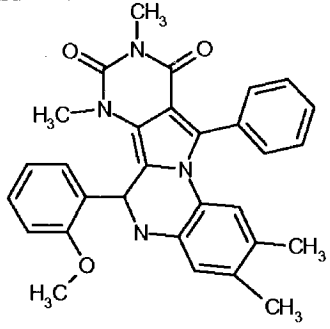
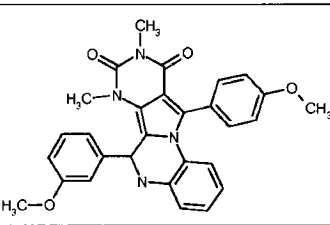
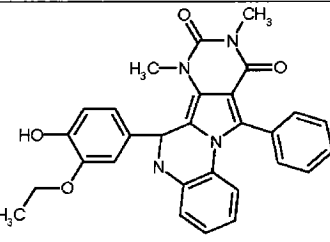
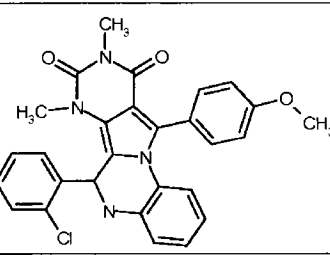
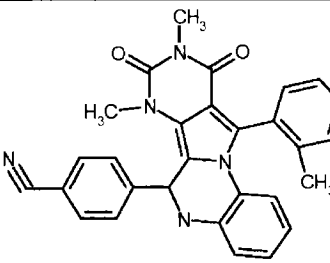
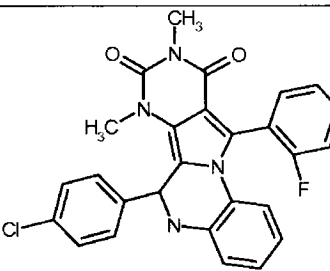
[0240]

	76	45	PPQ-239
	77	34	PPQ-113
	83	30	PPQ-228
	78	10	PPQ-227
	92	61	PPQ-226
	93	72	PPQ-201

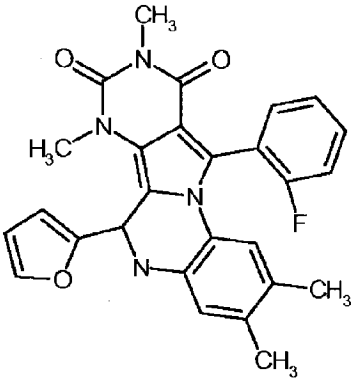
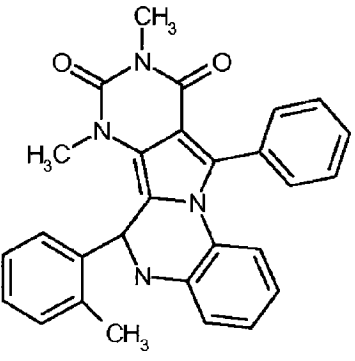
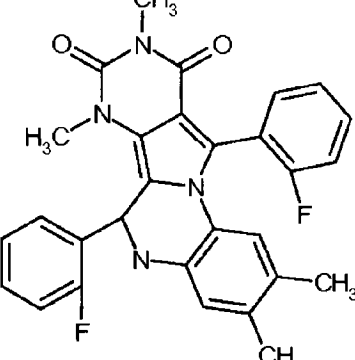
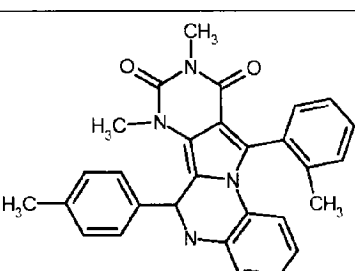
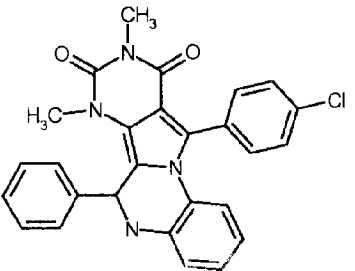
[0241]

	93	53	PPQ-219
	94	71	PPQ-209
	94	41	PPQ-218
	94	61	PPQ-225
	97	85	PPQ-102
	96	49	PPQ-106
	96	64	PPQ-213

[0242]

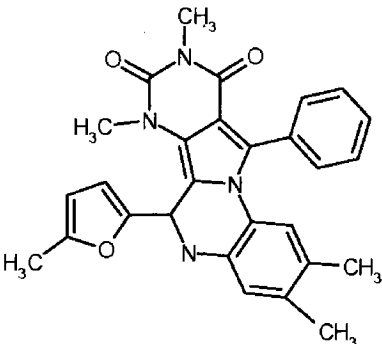
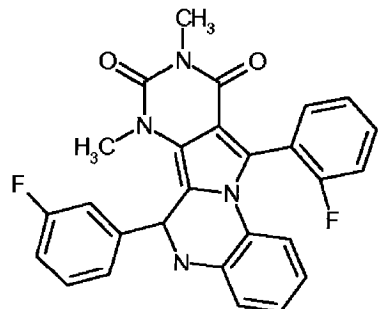
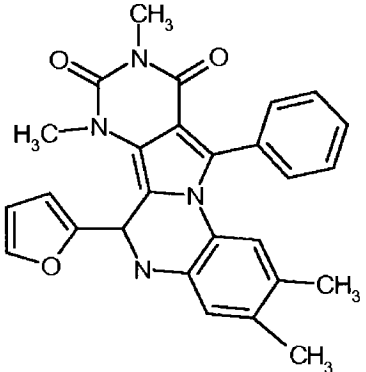
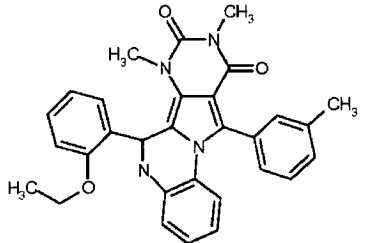
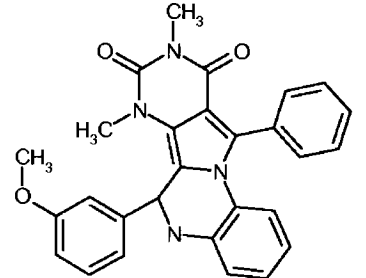
	47	<10	
	47	13	
	47	<10	
	47	<10	
	45	<10	
	44	<10	

[0243]

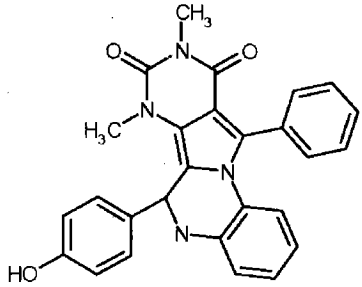
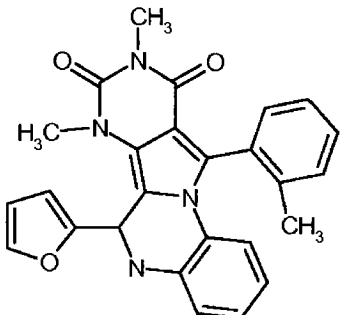
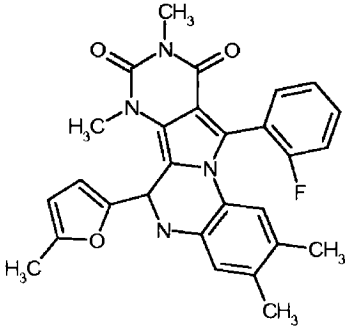
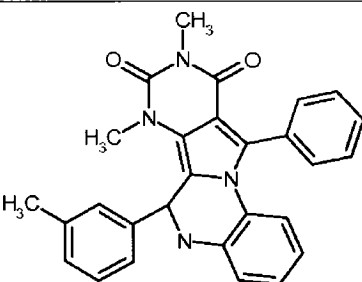
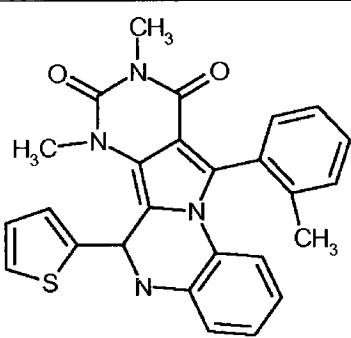
	44	41	
	41	13	
	35	23	
	38	13	
	34	<10	

		33	<10	
		33	<10	
		31	<10	
[0244]		>95	62	PPQ-211
		90	57	PPQ-229
		90	60	PPQ-202

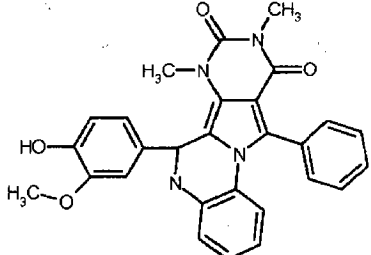
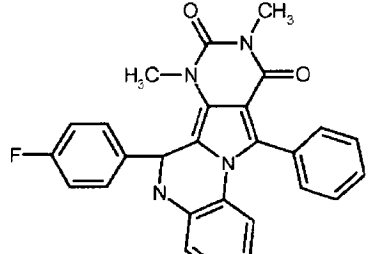
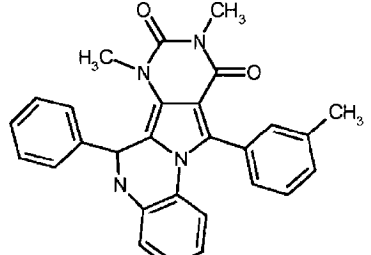
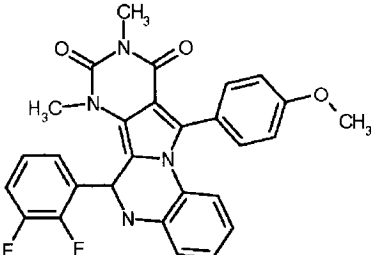
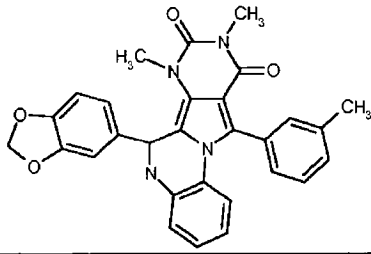
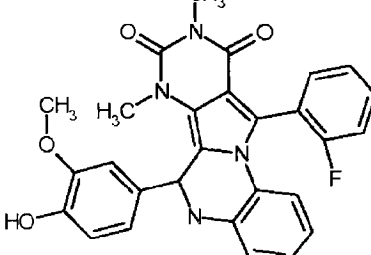
[0245]

	90	84	PPQ-104
	87	51	PPQ-230
	87	24	PPQ-107
	87	<10	PPQ-231
	86	63	PPQ-204

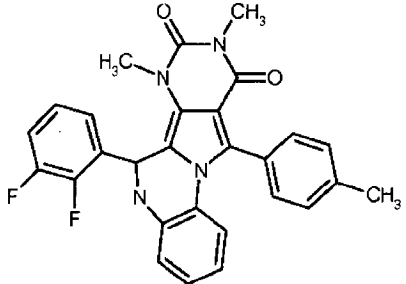
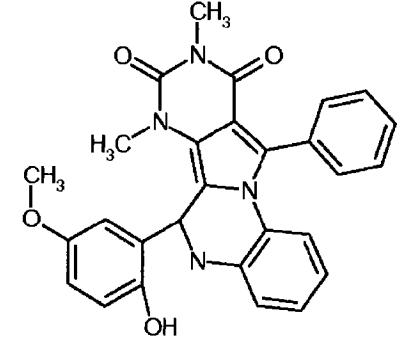
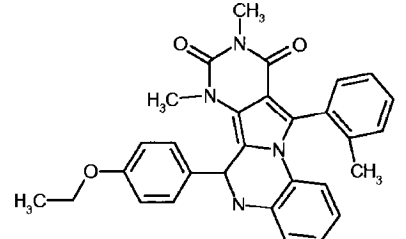
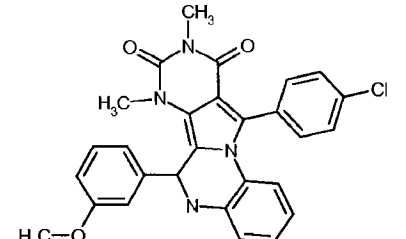
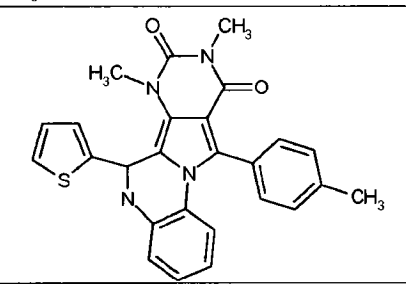
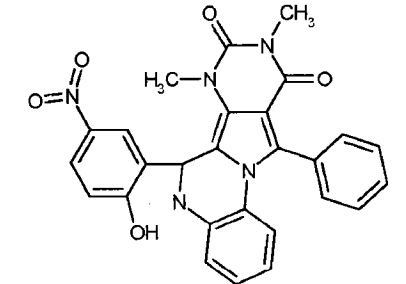
[0246]

	86	64	PPQ-207
	70	18	PPQ-108
	78	78	PPQ-105
	67	67	PPQ-232
	67	19	PPQ-117

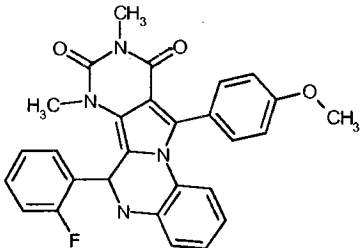
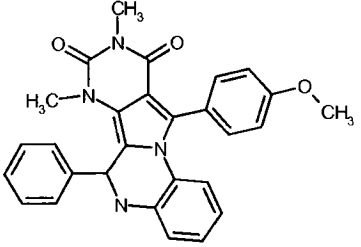
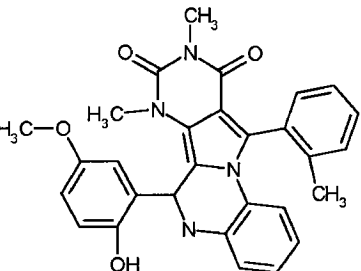
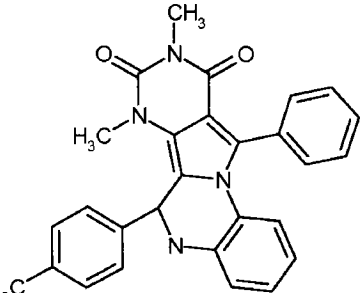
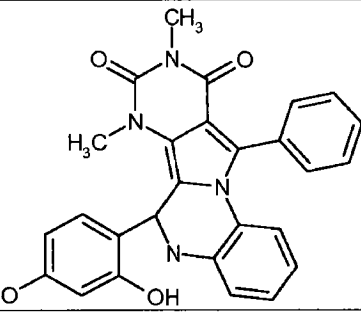
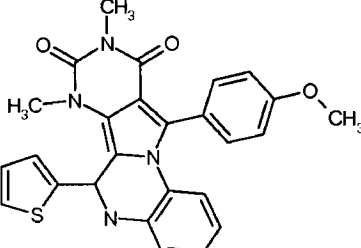
[0247]

	64	5	PPQ-248
	64	21	PPQ-249
	64	49	PPQ-250
	78	<10	PPQ-252
	63	26	PPQ-302
	62	13	PPQ-251

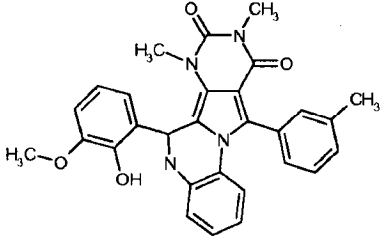
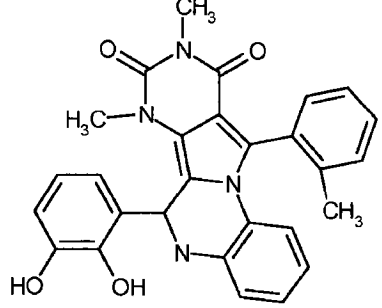
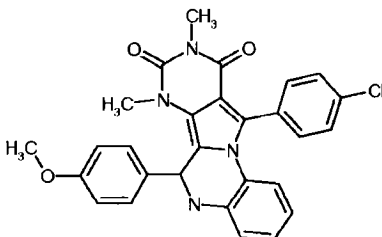
[0248]

	31	27	
	33	<10	
	32	<10	
	41	<10	
	35	<10	
	40	12	

[0249]

	39	<10	
	39	<10	
	38	<10	
	38	<10	
	35	<10	
	34	<10	

[0250]

	31	<10	
	30	<10	
	31	<10	

[0251] 实施例 5

[0252] 通过 PPQ 化合物抑制 CFTR 介导的氯化物电流

[0253] 本实施例描述了通过 CFTR 氯化物传导而确定的示例性 PPQ 化合物,即 PPQ-102 的效力、可逆性和特异性。

[0254] 按实施例 1 所述来合成由电生理学测试确定为最有效的 CFTR 抑制剂、即 PPQ-102, 并对其确定和进一步表征。如实施例 2 所述进行短路电流分析。图 3A(左侧)显示出在由 cAMP 激动剂 CPT-cAMP 进行 CFTR 刺激之后,在 CFTR-表达 FRT 细胞中的氯化物电流的 PPQ-102 抑制。在横跨上皮氯化物梯度的存在下并在用两性霉素 B 进行基底侧膜透化之后进行检测,以使得检测电流为 CFTR 氯化物传导的直接、定量检测。CFTR 的 PPQ 抑制在较高浓度下为约 100%,  $IC_{50}$  为约 90nM(参见图 3A,右侧)。在低 PPQ-102 浓度下在若干分钟内发生抑制,这表明作用的细胞内位点。在用 2  $\mu$ M PPQ-102 孵育 30 分钟后,然后进行 10 分钟的洗涤,通过完整的 CFTR 氯化物电流复位而观察到的抑制是可逆的。

[0255] 图 3B 显示在芹菜素以及 IBMX 进行 CFTR 激活之后的 CFTR 氯化物电流的 PPQ-102 抑制,其中芹菜素是通过直接结合 CFTR 而发挥作用的黄酮类 CFTR 激活剂,IBMX 是同样与 CFTR 直接连接的磷酸二酯酶抑制剂。与通过生理学磷酸化机制激活 CFTR 的纯 cAMP 激动剂(CPT-cAMP)相比,对这些激动剂反应的轻微减少的 PPQ-102 效力与在细胞内 CFTR 表面的核苷酸连接域处的 PPQ-102 作用相同。如图 3C 所示,在通过毛喉素和 IBMX 进行最大 CFTR 激活之后,PPQ-102 抑制了在(非透化的)人肠(T84)和支气管细胞内的短路电流。CFTR 抑制在 10  $\mu$ M PPQ-102 接近 100%,  $IC_{50}$  显著低于 1  $\mu$ M。在具有强内部负膜电位的非透化 T84 和支气管上皮细胞中,PPQ 的 CFTR 抑制的  $IC_{50} \ll 1 \mu$ M,这基本优于以前观察到的 CFTR<sub>inh</sub>-172 和 GlyH-101 的 3-5  $\mu$ M(参见例如, Ma 等人, supra; Muanprasat 等人, J. Gen. Physiol. 124 :

125-137(2004))。

[0256] PPQ-102 没有抑制钙激活的氯通道或细胞 cAMP 产生。图 3D 显示囊性纤维化人支气管细胞中,由 10  $\mu$  M 或 20  $\mu$  M PPQ-102 产生的 UTP 诱导的氯化物电流的微小抑制。图 3E 显示 10  $\mu$  M PPQ-102 对基底或毛喉素 - 刺激的 cAMP 产生没有显著影响。

[0257] 在 CFTR 表达的 FRT 细胞中通过膜片钳检测整个细胞膜电流 (参见实施例 2)。结果显示在图 4 中。10  $\mu$  M 的毛喉素刺激在 +100mV (总膜电容  $13 \pm 1$  pF) 产生的膜电流为  $172 \pm 39$  pA/pF ( $n = 4$ ) (参见图 4A, 左侧)。0.5  $\mu$  M 的 PPQ-102 表现出约 65% 的 CFTR 氯化物电流抑制。如图 4A (右侧) 所示,观察到了 CFTR 的近似线性的电流电压关系 (还参见例如, Sheppard 等人, *Physiol. Rev.* 79 :S23-452(1999) ;Gadsby 等人, *Nature* 40 :477-483(2006))。CFTR 电流电压关系在 PPQ-102 添加之后保持线性,这表示电压独立性阻滞机制,如不带电荷的抑制剂所期望的。

[0258] 进行细胞吸附膜片记录以检测单通道 CFTR 功能。结果显示在图 4B 中。向浴中添加 10  $\mu$  M 毛喉素和 100  $\mu$  M IBMX 导致 CFTR 通道打开。CFTR 单一性传导在 +80mV 为 7pS。如图 4B (左侧) 例示的较低频率通道打开所显示的,施加 1  $\mu$  M PPQ-102 不改变单一性传导,但显著减少通道活性。通道打开概率 ( $P_o$ ) 从  $0.50 \pm 0.04$  减小到  $0.14 \pm 0.03$ 。平均通道打开时间没有显著改变,但平均通道关闭时间显著增加 (参见图 4B, 右侧)。不希望受理论的限制,这些结果表明 PPQ-102 通过改变的通道门控机制来抑制 CFTR,同时具有通道关闭状态的稳定性。

[0259] 实施例 6

[0260] PPQ 化合物在多囊肾病模型中的有效性

[0261] 该实施例描述了在多囊肾病的胚肾培养模型中对 PPQ 化合物 PPQ-102 的分析。

[0262] 从第 13.5 天的胚胎小鼠中除去肾并保持在器官培养物中,其中它们继续生长。由透射光学显微镜对肾的检测显示在对照条件下器官培养物中的肾没有形成囊肿。当培养基补充了 CFTR 激动剂 8-Br-cAMP 时,多个囊肿形成并且逐渐扩大 (参见图 5A, 左侧)。培养基中包含 PPQ-102 不影响肾生长,但显著减小了在含 8-Br-cAMP- 培养基中形成的肾囊肿的数量和大小。图 5A (右侧) 总结了由对许多肾进行研究而得到的囊肿覆盖的面积百分比,这显示 0.5  $\mu$  M PPQ-102 抑制了约 60% 的囊肿形成,并在 2.5  $\mu$  M 和 5  $\mu$  M PPQ-102 时几乎完全不存在囊肿。在器官培养物中在 3 日后除去 2.5  $\mu$  M PPQ-102 的对照研究中,在连续存在 8-Br-cAMP 的情况下快速扩大的囊肿表明 PPQ-102 的抑制效应是可逆的。图 5B 显示在标示浓度的 PPQ-102 存在下,培养 4 日的对照和 8-Br-cAMP- 处理的肾的苏木精和伊红染色的代表性石蜡切片。与完整肾的透射光学显微照片一致,PPQ-102 减小了囊肿尺寸。

[0263] 在 8-Br-cAMP 存在下,在将肾培养 3 日之后,通过向含 8-Br-cAMP 的培养基中添加 PPQ-102 来检测 PPQ-102 在预形成的囊肿中减少流体累积的能力。图 5C 显示在培养基中包含 PPQ-102 之后,在 1 和 2 日内的囊肿尺寸的减小。不希望受理论的束缚,通过 PPQ-102 对预形成的囊肿进行收缩,这证明了肾囊肿形成涉及活性流体分泌入囊肿内腔与从囊肿内腔中吸收之间的平衡。

[0264] 通过引用以整体形式将本说明书所指的和 / 或申请数据表所列的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、国外专利、国外专利申请和非专利公开并入本文。

[0265] 从前述可知,虽然本文为了示例性说明的目的已经描述了具体实施方案,但是可

以进行多种修改而不偏离本发明的主旨和范围。本领域技术人员仅用常规实验就将认可或能够确定本文所述具体实施方案的许多等价物。旨在将这类等价物涵盖在下列权利要求书中。

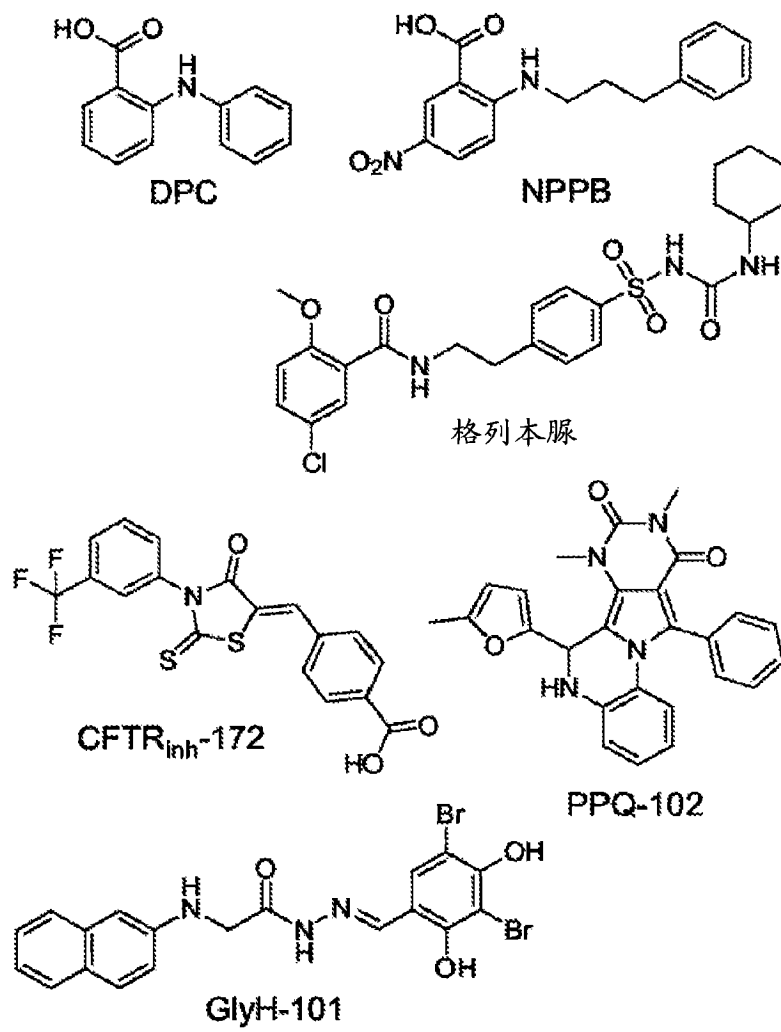


图 1A

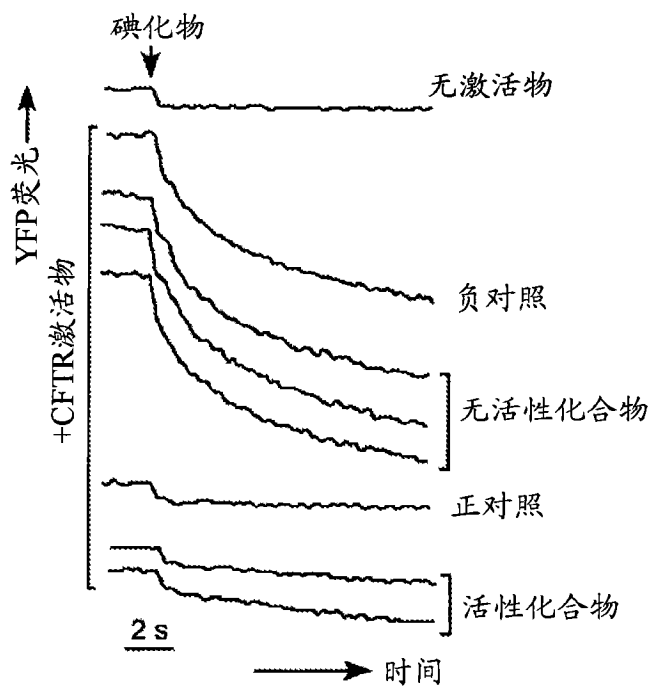


图 1B

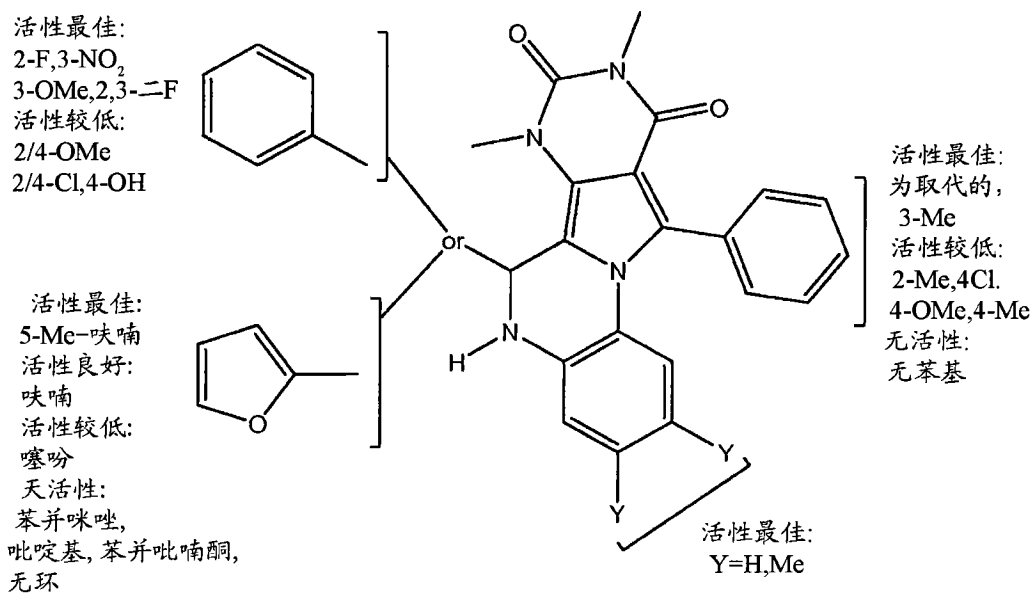


图 2A

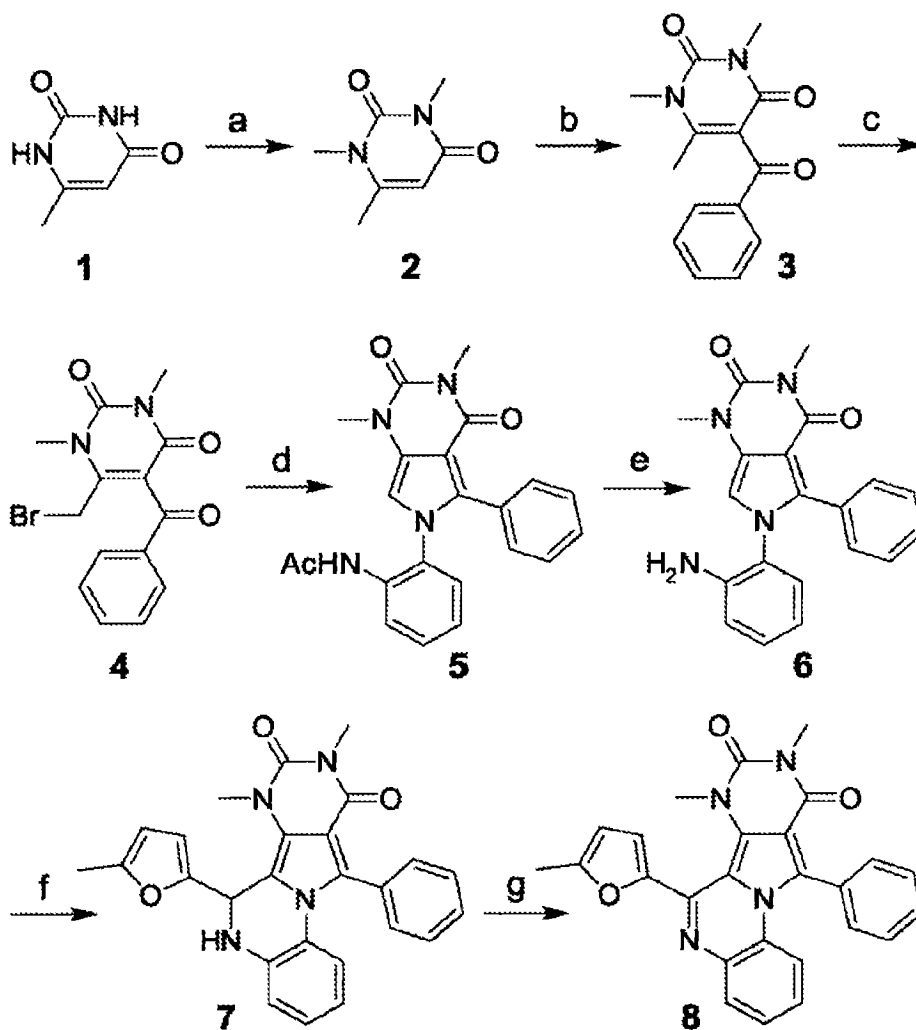


图 2B

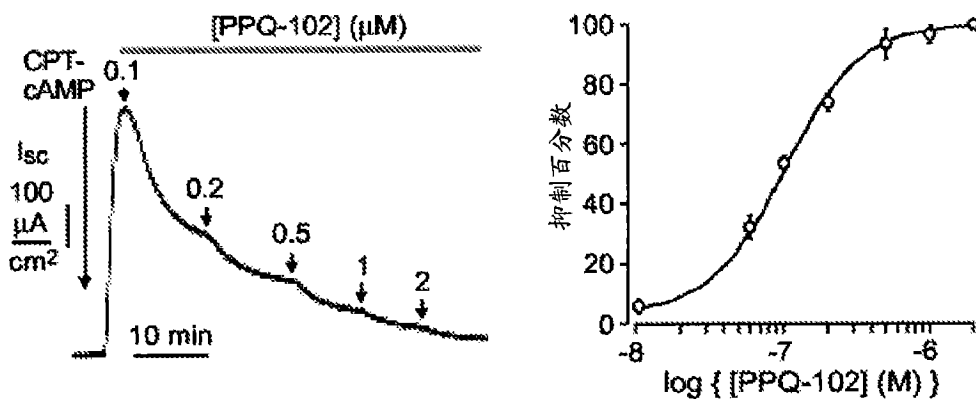


图 3A

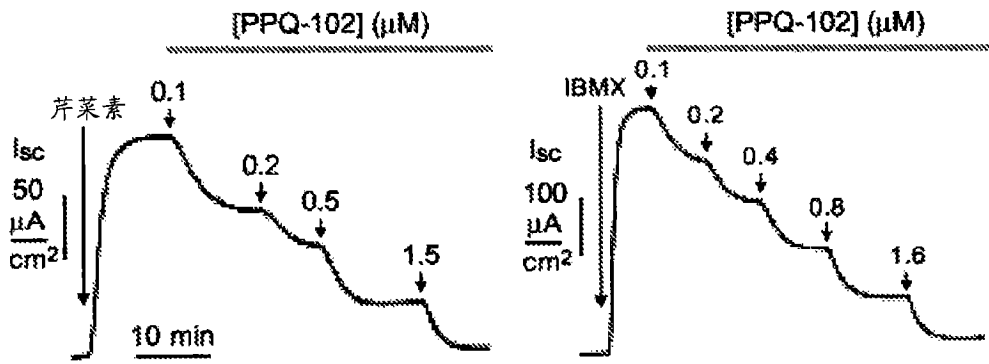


图 3B

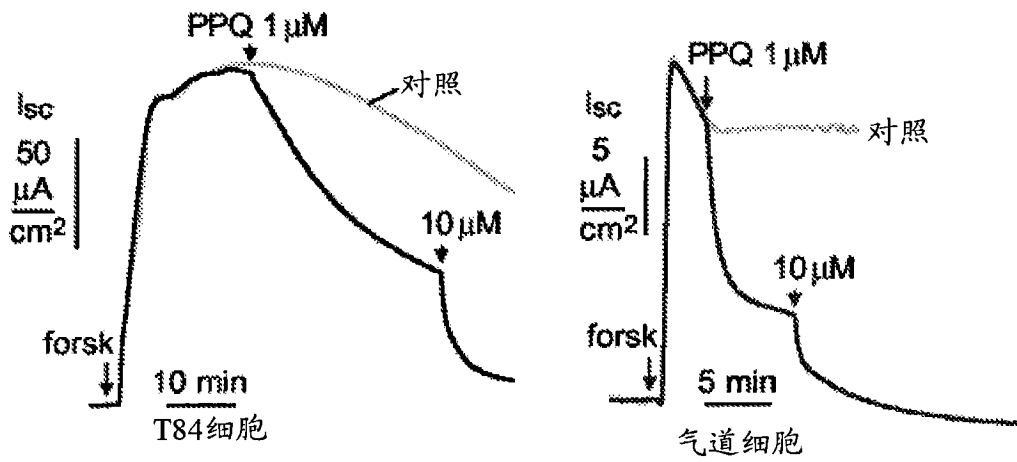


图 3C

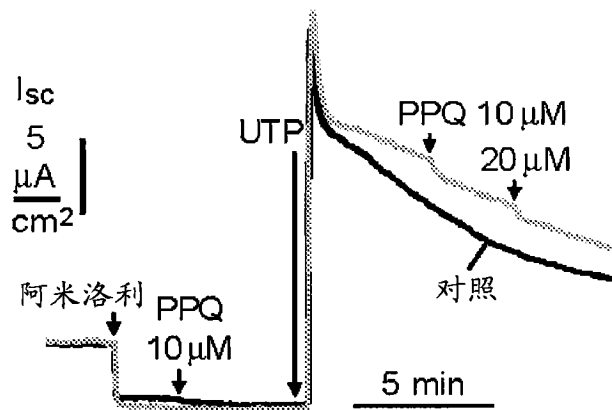


图 3D

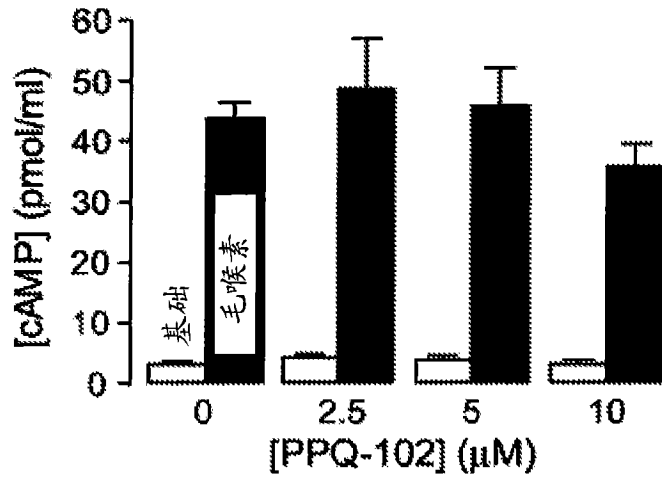


图 3E

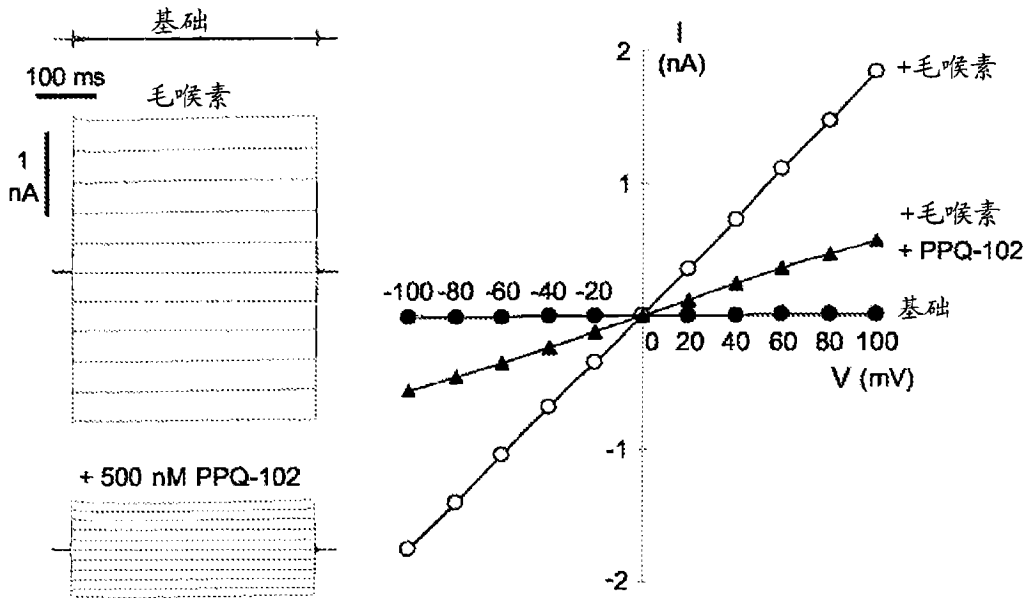


图 4A

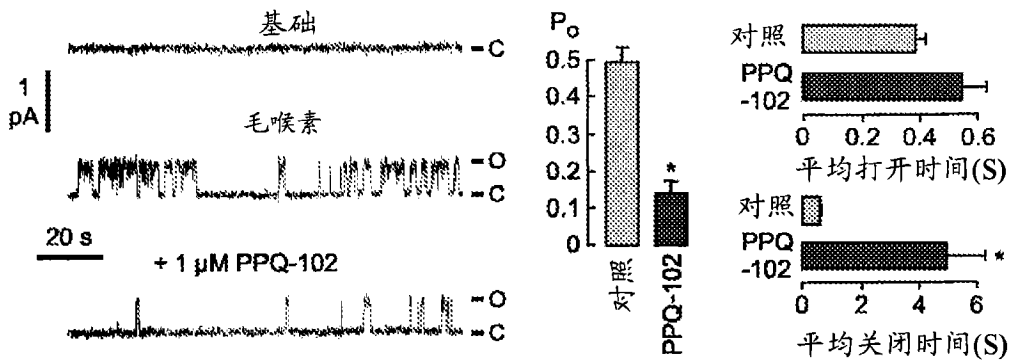


图 4B

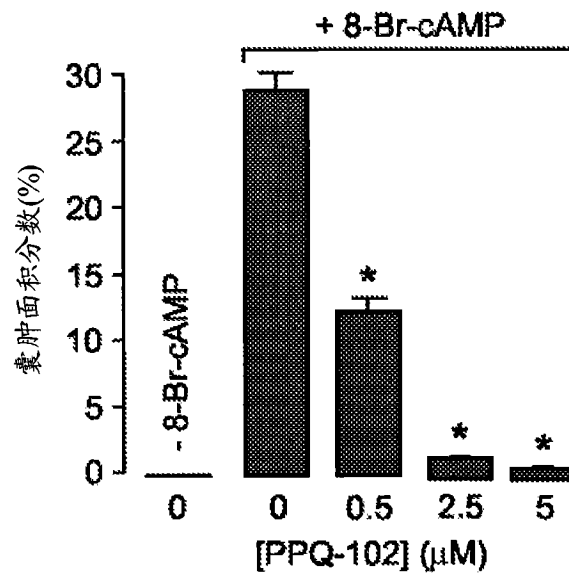
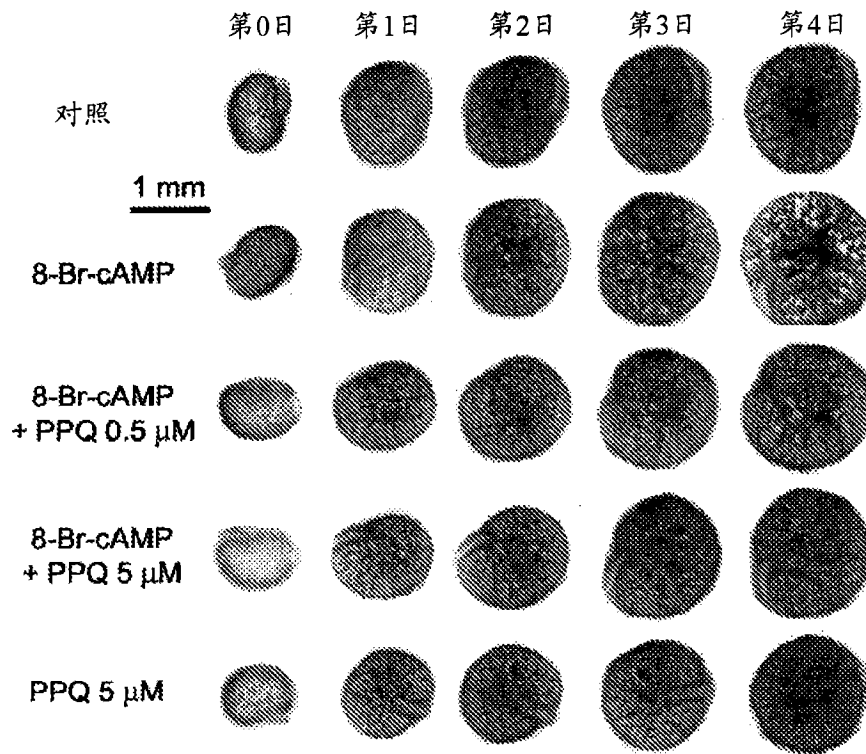


图 5A

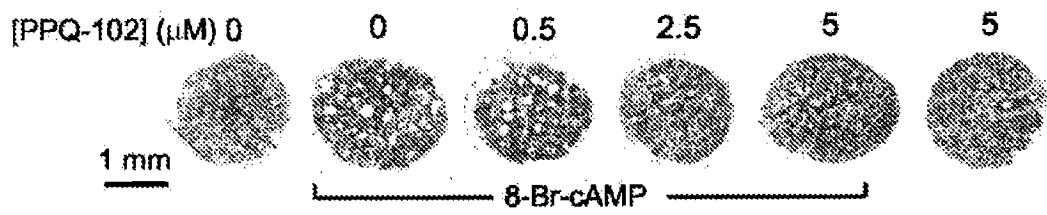


图 5B

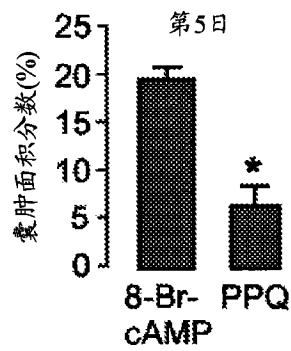
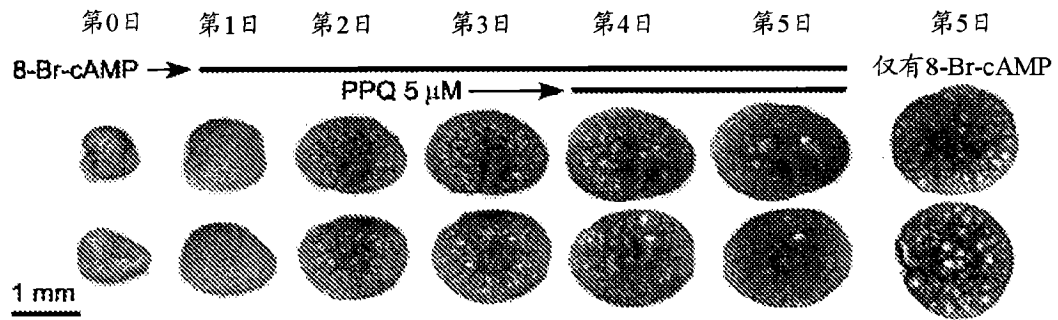


图 5C