(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113613650 B
(45)授权公告日 2024.12.10

(21)申请号 202080024089.9

(22)申请日 2020.03.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113613650 A

(43)申请公布日 2021.11.05

(30)优先权数据
62/823,214 2019.03.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/023989 2020.03.20

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/198054 EN 2020.10.01

(73)专利权人 冷泉港实验室
地址 美国纽约州
专利权人 范斯坦医药研究院

(72)发明人 Y·阿尔阿贝 L·张

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 龙淳 叶占洋

(51)Int.Cl.
A61K 31/404(2006.01)
A61K 31/4725(2006.01)
A61P 7/06(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)

(56)对比文件
US 2011160197 A1,2011.06.30
WO 2019010491 A1,2019.01.10
US 2002068752 A1,2002.06.06
US 2013059783 A1,2013.03.07
Corinne E. Augelli-Szafran等.IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF m4 SELECTIVE MUSCARINIC ANTAGONISTS.《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.1998,第8卷(第15期),第1991-1996页.
Thomas M. Bohme等.Synthesis and Pharmacology of Benzoxazines as Highly Selective Antagonists at M4 Muscarinic Receptors.《J. Med. Chem.》.2002,第45卷(第14期),第3049-3102页.
Boehme Thomas M等. Analogs of M4 selective synthetic muscarinic receptor antagonists: synthesis, binding and pharmacokinetic properties.《Medicinal chemistry research》.2002,第11卷(第8期),第423-433页.

审查员 柴伟

权利要求书4页 说明书36页 附图10页

(54)发明名称

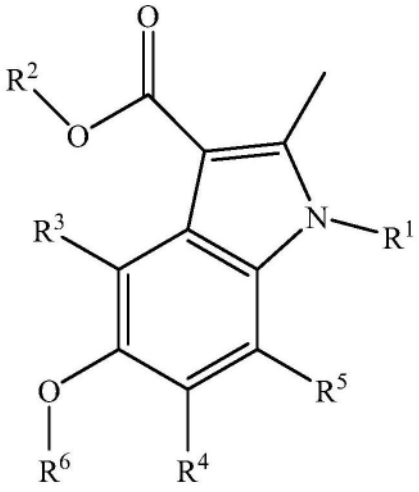
治疗贫血的毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型4拮抗剂

(57)摘要

本公开总体上涉及治疗贫血。更具体地,本公开涉及毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型4拮抗剂(诸如小分子化合物)用于促进爆式红系集落形成单位(BFU-E)细胞的自我更新和治疗贫血的用途。

CN 113613650 B

1.一种化合物,其由下式所示:



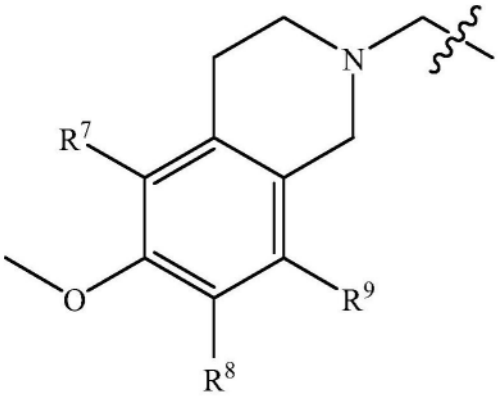
(1)

其中:

R^1为H或CH_3;

R^2为具有1-3个碳原子的烃基;

R^3、R^4和R^5独立地选自氢原子和以下结构(1-1):



(1-1)

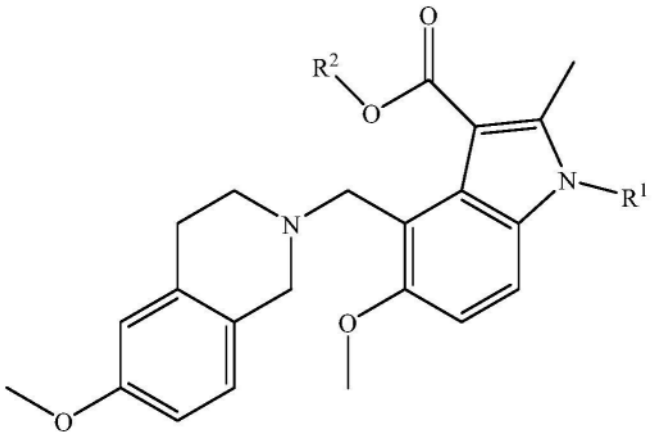
前提是R^3、R^4和R^5中的一个为式(1-1)的结构;

R^6为CH_3;

R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子;

并且其中式(1)化合物包括所述式(1)化合物的药学上可接受的盐。

2.根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物具有下式:



(1b)。

3.根据权利要求1或2所述的化合物,其中R^1为氢原子。

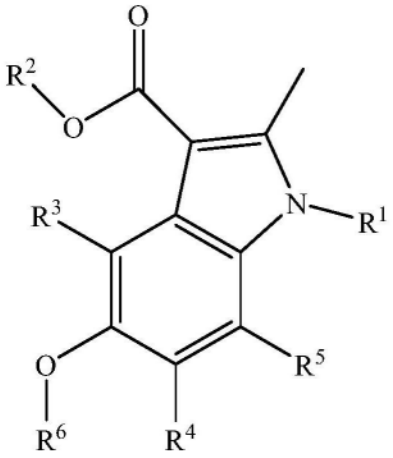
4.根据权利要求1或2所述的化合物,其中R^1为甲基。

5.根据权利要求1或2所述的化合物,其中R^2为乙基。

6.根据权利要求1或2所述的化合物,其中R^1为氢原子且R^2为乙基。

7.根据权利要求1或2所述的化合物,其中R^1为甲基且R^2为乙基。

8.药学有效量的M4特异性拮抗剂在制备用于治疗受试者中由毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型4(M4)活性引起的疾病或病症的药物中的应用,其中所述M4特异性拮抗剂为具有下式的化合物:



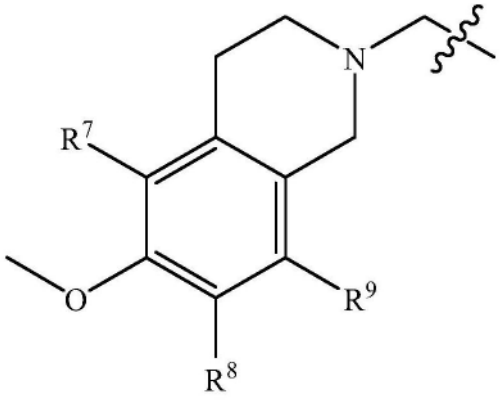
(1)

其中:

R^1为H或CH_3;

R^2为具有1-3个碳原子的烃基;

R^3、R^4和R^5独立地选自氢原子和以下结构(1-1):



(1-1)

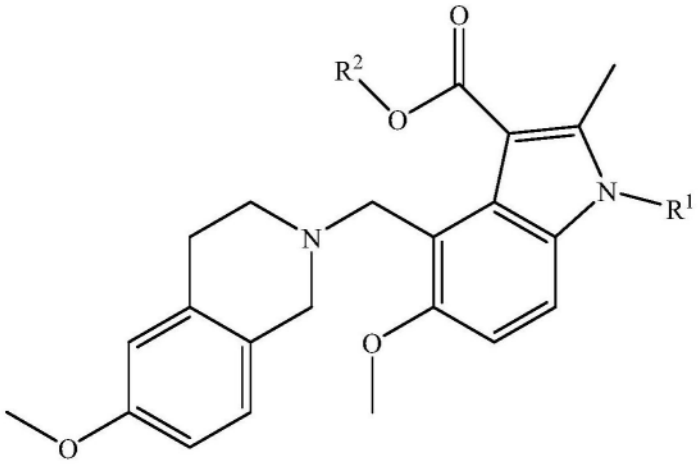
前提是R^3、R^4和R^5中的一个为式(1-1)的结构;

R^6为CH_3;

R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子;

并且其中式(1)化合物包括所述式(1)化合物的药学上可接受的盐。

9.根据权利要求8所述的应用,其中所述化合物具有下式:



(1b)。

10.根据权利要求8或9所述的应用,其中R^1为氢原子。

11.根据权利要求8或9所述的应用,其中R^1为甲基。

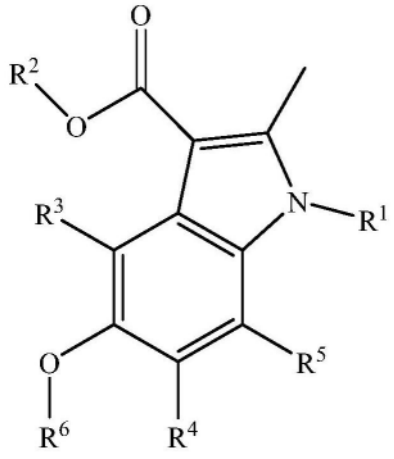
12.根据权利要求8或9所述的应用,其中R^2为乙基。

13.根据权利要求8或9所述的应用,其中R^1为氢原子且R^2为乙基。

14.根据权利要求8或9所述的应用,其中R^1为甲基且R^2为乙基。

15.M4特异性拮抗剂在制备用于促进爆式红系集落形成单位(BFU-E)细胞自我更新的药物中的应用;

其中所述M4特异性拮抗剂为具有下式的化合物:



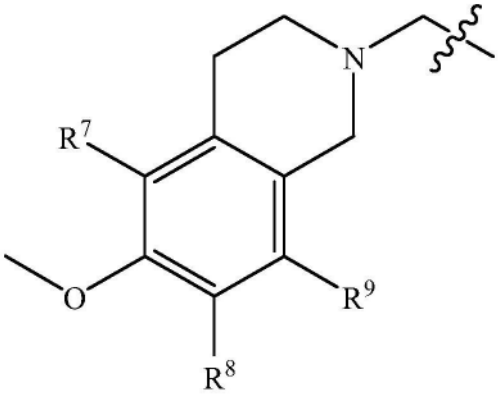
(1)

其中:

R^1为H或CH_3;

R^2为具有1-3个碳原子的烃基;

R^3、R^4和R^5独立地选自氢原子和以下结构(1-1):



(1-1)

前提是R^3、R^4和R^5中的一个为式(1-1)的结构;

R^6为CH_3;

R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子;

其中所述药物致使所述BFU-E细胞的自我更新增加;并且

其中式(1)化合物包括所述式(1)化合物的药学上可接受的盐。

16.根据权利要求15所述的应用,其中增加的所述BFU-E细胞的自我更新用于治疗贫血。

治疗贫血的毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型4拮抗剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年3月25日提交的美国临时申请第62/823,214号的利益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的HL127522的政府支持下完成的。政府对这项发明享有一定的权利。

技术领域

[0005] 本公开总体涉及治疗由毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型4(M4)活性引起的疾病和病症。更具体地,本公开涉及促进爆式红系集落形成单位(BFU-E)细胞自我更新的小分子M4拮抗剂化合物用于治疗贫血的用途。

背景技术

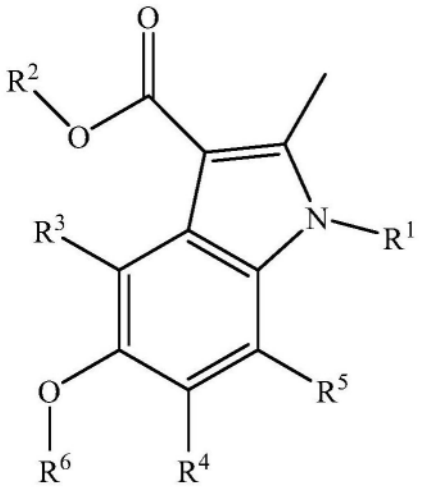
[0006] 许多成体谱系的干细胞和祖细胞经历自我更新,这是组织内稳态、维持和再生的关键方面(North T.E.等人,Nature,447:1007-1011(2007);He S.等人,Annu Rev Cell Dev Biol,25:377-406(2009);Simons B.D.等人,Cell,145:851-862(2011);Seita J.等人,Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med,2:640-653(2010);Xu Y.等人,Nature,453:338-344(2008);Sun J.等人,Nature,514:322-347(2014);Sharpless N.E.等人,Nat Rev Mol Cell Biol,8:703-713(2007);Rossi D.J.等人,Cell,132:681-696(2008))。在造血系统中,爆式红系集落形成单位(BFU-E)是第一个由谱系决定的红系祖细胞,具有自我更新以生成数千个红细胞的巨大潜力。BFU-E经历分化,致使形成晚期红系祖细胞,即集落形成单位红系(CFU-E),在经历有限的3-4个细胞分裂后形成红细胞(Zhang L.等人,Genes Dev,25:119-124(2011)。尽管CFU-E的存活和分化主要由促红细胞生成素(EPO)控制,但对BFU-E自我更新和分化的调控尚不清楚。EPO主要用于治疗由EPO产生缺陷引起的贫血,如慢性肾病中所见。然而,许多贫血患者没有足够的BFU-E,随后没有足够的CFU-E对EPO治疗做出反应(Flygare J.等人,Blood,117:3435-3444(2011);Zhang L.等人,Nature,499:92-96(2013);Sankaran V.G.等人,Nat Med,21:221-230(2015);Bauer等人,Genes Dev,13:2996-3002(1999);Komrokji R.S.等人,Curr Hematol Malig Rep,6:145-153(2011);Kotla V.等人,Hematol Onco.,2:36(2009))。为了治疗这些EPO耐药贫血,需要更好地理解BFU-E自我更新的分子机制。先前的报告表明,化合物PD102807相对于毒蕈碱乙酰胆碱受体家族的其他成员选择性地抑制CHRM4(C.H.Croy等人,PCS1055(一种新型毒蕈碱M4受体拮抗剂)的表征,Eur.J.Pharmacol,782,70-76,2016;T.M.Böhme等人,“苯并恶嗪作为M(4)毒蕈碱受体高选择性拮抗剂的合成和药理学”,J Med.Chem,45,3094-3102,2002)。

发明内容

[0007] 在一个方面,本发明涉及用作毒蕈碱乙酰胆碱受体4亚型(M4)拮抗剂的化合物。与

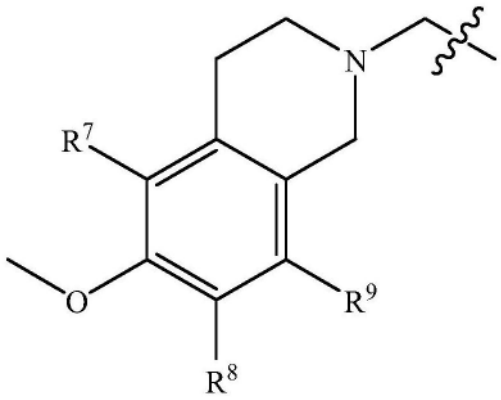
其他毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型(例如M1、M2、M3和/或M5)相比,M4拮抗剂化合物优选至少在某种程度上对M4具有选择性(即特异性)。M4特异性拮抗剂的功效被认为是由于其结合M4正构口袋的能力而产生的。与本领域的其他M4拮抗剂化合物(诸如PD102807)相比,M4拮抗剂化合物在血脑屏障穿透方面也优选减少。

[0008] 在第一组实施方式中,M4拮抗剂化合物具有以下结构:

[0009] 

(1)

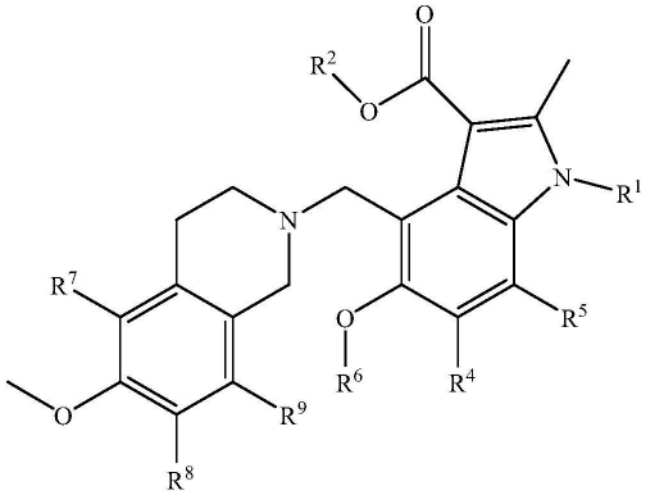
[0010] 其中:R^1为H或CH_3;R^2为具有1-3个碳原子的烃基;R^3、R^4和R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH、SCH_3和以下结构(1-1):

[0011] 

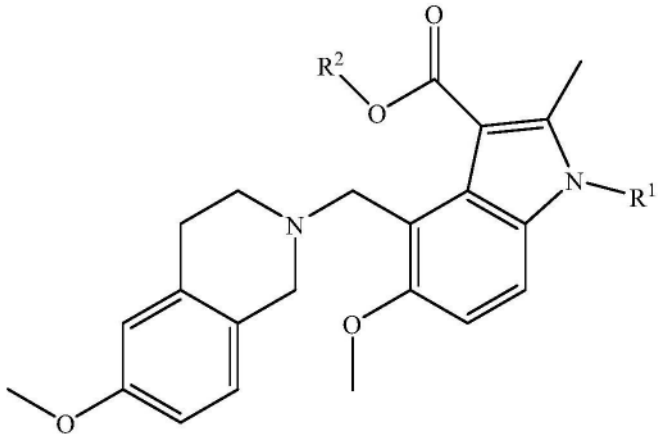
(1-1)

[0012] 前提是R^3、R^4和R^5中的一个或两个为式(1-1)的结构;R^6为H或CH_3;R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;并且其中式(1)化合物包括式(1)化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、对映异构体和多晶型物。

[0013] 在具体实施方式中,式(1)化合物具有以下结构:

[0014] 

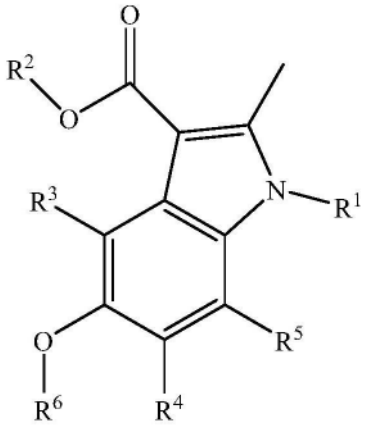
（1a），或



（1b）

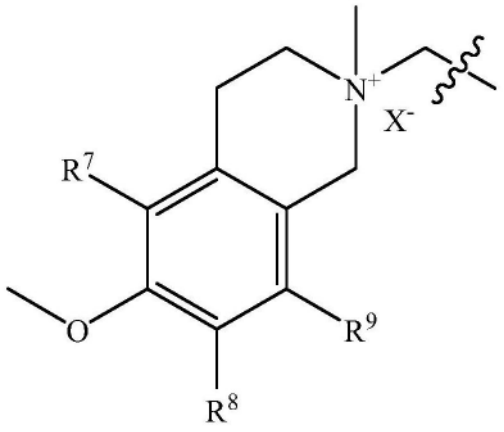
[0015] 其中上文所示式中的R基团如上文或下文所定义，包括所提供的任何特定选择。

[0016] 式(1)化合物也可为具有以下结构的甲基化盐：

[0017] 

（1c）

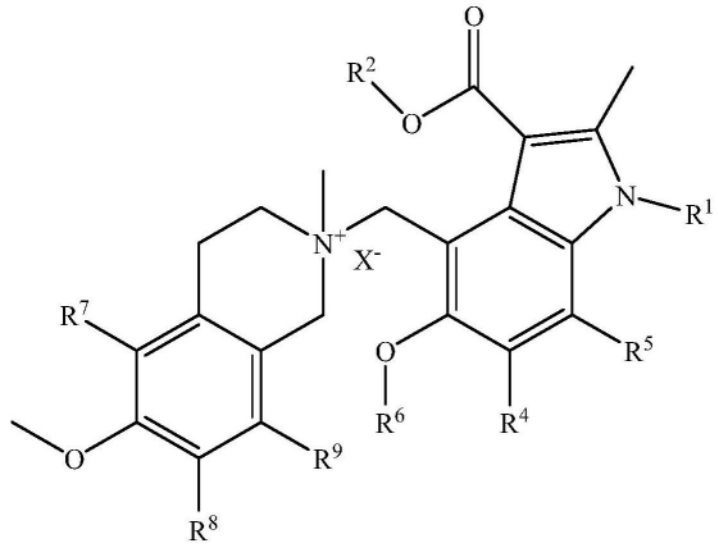
[0018] 其中：R^1为H或CH_3；R^2为具有1-3个碳原子的烃基；R^3、R^4和R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH、SCH_3和以下结构(1-2)：

[0019] 

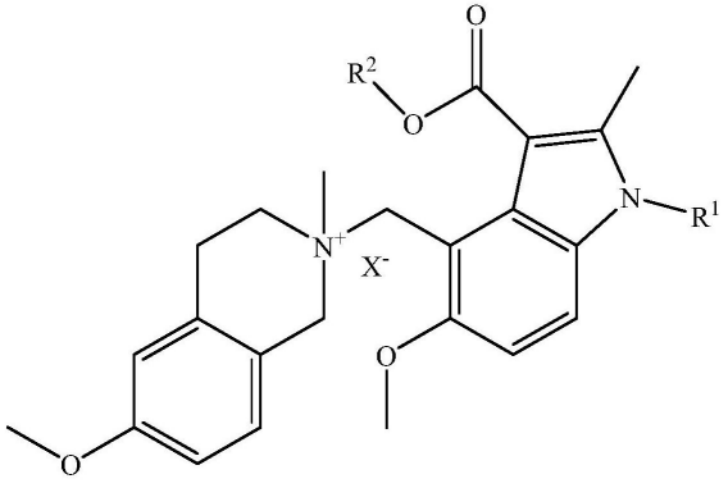
(1-2)

[0020] 前提是R^3、R^4和R^5中的一个或两个为式(1-2)的结构;R^6为H或CH_3;R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;X^-为平衡化合物的正电荷部分的负离子;并且其中式(1c)化合物包括式(1c)化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、对映异构体和多晶型物。

[0021] 在具体实施方式中,式(1c)的甲基化盐化合物具有以下任一结构:

[0022] 

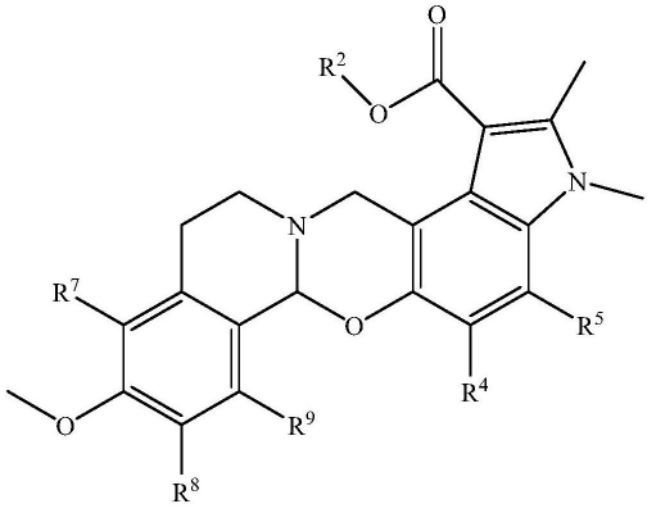
(1d)



(1e)

[0023] 其中上文所示式中的R基团和X^-如上文或下文所定义,包括所提供的任何特定选择。

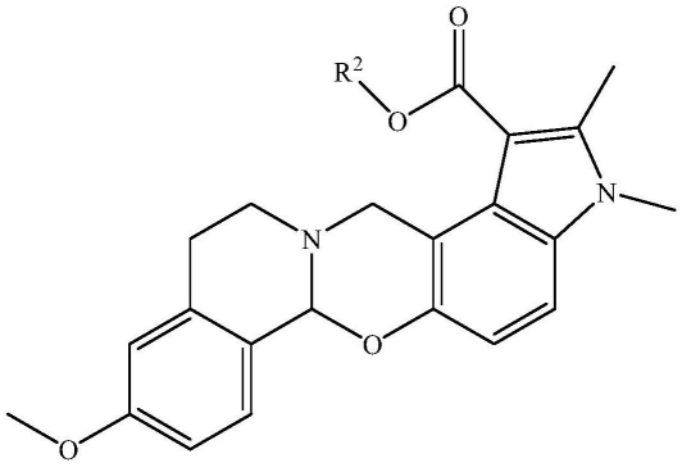
[0024] 在第二组实施方式中,M4拮抗剂化合物具有以下结构:

[0025] 

(2)

[0026] 其中:R^2为具有1-3个碳原子的烃基;R^4、R^5、R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;并且其中式(2)化合物包括式(2)化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、对映异构体和多晶型物。

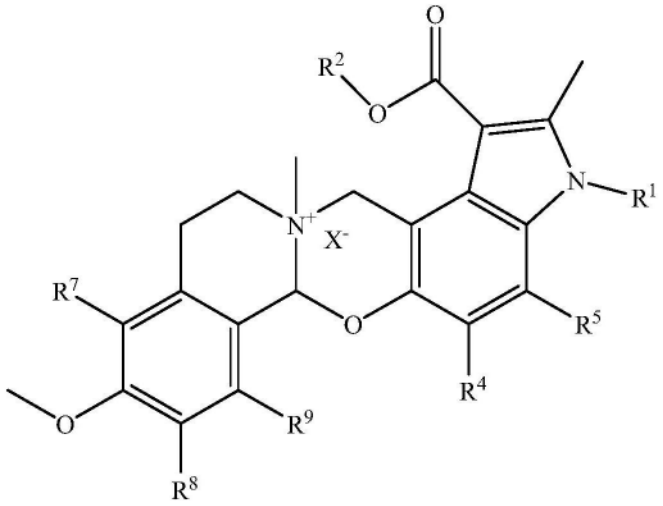
[0027] 在具体实施方式中,式(2)化合物具有以下结构:

[0028] 

(2a)

[0029] 其中R^2如上文或下文所定义,包括所提供的任何特定选择。

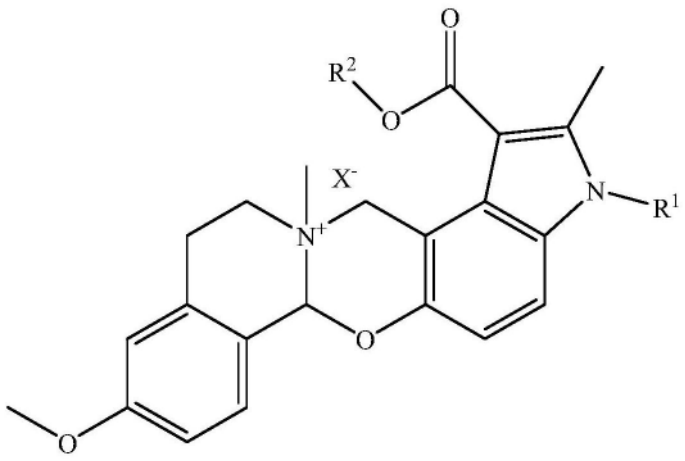
[0030] 在第三组实施方式中,M4拮抗剂化合物具有以下结构:

[0031] 

(2b)

[0032] 其中:R^1为H或CH_3;R^2为具有1-3个碳原子的烃基;R^4、R^5、R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;并且其中式(2b)化合物包括式(2b)化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、对映异构体和多晶型物。

[0033] 在具体实施方式中,式(2b)化合物具有以下结构:

[0034] 

(2c)

[0035] 其中R^1、R^2和X^-如上文或下文所定义,包括所提供的任何特定选择。

[0036] 另一方面,本发明涉及治疗受试者中由毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型4(M4)活性引起的疾病或病症,该方法包括向受试者施用药学有效量的M4特异性拮抗剂,其中M4特异性拮抗剂是上述M4特异性拮抗剂化合物中的任何一种。在具体实施方式中,所治疗的疾病或病症为贫血。在一些实施方式中,贫血与溶血、骨髓增生异常综合征(MDS)、衰老、手术、化疗或放射治疗相关。在一些实施方式中,对受试者口服施用M4拮抗剂。本发明的其他方面涉及含有一种或多种上述M4特异性拮抗剂的药物组合物,以及这些M4特异性拮抗剂中的任何一种或多种在制备用于治疗受试者中由M4活性引起的疾病或病症(诸如贫血)的药物中的用途。

[0037] 另一方面,本发明涉及一种促进爆式红系集落形成单位(BFU-E)细胞自我更新的方法,其中该方法包括使BFU-E细胞与M4特异性拮抗剂接触。例如,当与M4特异性拮抗剂接触时,BFU-E细胞可位于活体(例如,人类)受试者体内,或者BFU-E细胞可取自受试者并与M4特异性拮抗剂体外接触。M4特异性拮抗剂可包括本文所述的任何M4特异性拮抗剂。在具体实施方式中,增加的BFU-E细胞的自我更新用于治疗受试者的贫血。

附图说明

[0038] 图1A-1E.毒蕈碱乙酰胆碱受体拮抗剂通过调节BFU-E自我更新增加红细胞生成。1A,显示溴化羟苯乙铵(OB)化学结构的示意图。1B,小鼠BFU-E在具有或没有100μM溴化羟苯乙铵的情况下进行培养,并且对培养系统中的细胞数进行计数;用OB处理的培养物中的细胞扩增倍数明显高于未用OB处理的培养物。显示了3个重复的平均值和标准偏差(STDEV)。1C,第14天培养的细胞用抗Ter119抗体染色并用流式细胞术分析。显示了3个重复的Ter119+细胞百分比的平均值和STDEV;用OB处理或未处理的培养物中Ter119+细胞的百分比没有差异。1D,第6天将培养的细胞接种于甲基纤维素培养基上。接种后9天对BFU-E集落数计数。显示了3个重复的平均值和STDEV;用OB处理的培养物产生的BFU-E集落明显多于未用OB处理的培养物。1E,人CD34+细胞在具有或没有溴化羟苯乙铵(200μM)的情况下进行培养,并且对培养系统中的细胞数进行计数。显示了3个重复的平均值和STDEV;用OB处理的培养物中的扩增倍数明显高于未用OB处理的培养物。“NS”代表统计学上无差异;“*”代表t检验的$p<0.05$;“**”代表t检验的$p<0.01$。

[0039] 图2A-2D.CHRM4负调节BFU-E自我更新。图2A:使用RNA-Seq测量毒蕈碱乙酰胆碱受体家族成员(包括Chrm1、Chrm2、Chrm3、Chrm4和Chrm5)在BFU-E、CFU-E和成红细胞阶段的表达水平。显示了RPKM值。图2B:BFU-E感染了对照病毒或编码靶向Chrm4的shRNA的病毒。从第0天到第9天,对培养系统中GFP+细胞的数量进行计数。显示3个重复的平均值和标准偏差(STDEV);GFP+Chrm4病毒shRNA感染细胞中的细胞扩增倍数显著高于GFP+对照病毒shRNA感染细胞。图2C:在培养的第3天,使用蛋白质印迹法测量感染对照病毒或编码靶向Chrm4的shRNA的病毒的BFU-E中Chrm4的表达水平。显示了3个重复的平均值和标准偏差(STDEV);在用靶向Chrm4的shRNA处理后,Chrm4的表达显著降低。图2D:BFU-E感染了对照病毒或编码靶向Chrm4的shRNA的病毒。将GFP+细胞分选用于BFU-E集落形成测定。显示了4个重复的平均值和STDEV;GFP+Chrm4病毒shRNA感染细胞中的BFU-E集落形成倍数显著高于GFP+对照病毒shRNA感染细胞。“*”代表t检验的$p<0.05$;“**”代表$p<0.01$,“***”代表t检验的$p<0.001$。

[0040] 图3A-3D.CHRM4通路调节对维持BFU-E祖细胞状态重要的基因。图3A:在不存在或存100μM的福司可林的情况下培养小鼠BFU-E。第10天对培养系统中的细胞总数进行计数。显示3个重复的细胞扩增倍数的平均值和STDEV;用cAMP活化剂福司可林处理的培养物中的细胞扩增倍数显著高于未处理的培养物。图3B:用指示化合物(3nM PD102807和5μM KT5720)培养小鼠BFU-E。第9天对培养系统中的细胞总数进行计数。显示3个重复的细胞扩增倍数的平均值和STDEV;用PKA抑制剂KT5720处理的培养物中的细胞扩增倍数比未处理的培养物显著减少。图3C:x轴代表相对于BFU-E的CFU-E中每个基因表达的比率,以log2比率计算。y轴代表累积分数,并且绘制为相对表达(x轴)的函数。“CREB靶标”代表通过ChIP-Seq鉴定的BFU-E中CREB的直接靶基因。“ZFP36L2靶标”代表先前报道的通过RIP-ChIP鉴定的BFU-E中ZFP36L2的直接靶基因(Zhang L.等人,Nature,499:92-96(2013))。“所有基因”代表先前报道的BFU-E中表达的所有基因(Zhang L.等人,同上)。使用Kolmogorov-Smirnov检验计算P值。图3D:在不存在或存在100μM溴化羟苯乙铵的情况下培养小鼠BFU-E,并且对第3天培养的细胞进行RNA-Seq。在用100μM溴化羟苯乙铵培养45分钟后,对BFU-E进行CREB-ChIP-Seq。RNA-Seq结果和CREB-ChIP-Seq结果合并用于BETA分析(Wang S.等人,Nat Protoc,8:2502-2515(2013))。“*”代表t检验的$p<0.05$,和“**”代表$p<0.01$。

[0041] 图4A-4E.化合物PD102807在体内促进BFU-E自我更新并纠正贫血。图4A:PD102807的化学结构。图4B:使用或不使用3nM PD102807培养小鼠BFU-E,并且对培养系统中的细胞数进行计数。显示了9个重复的平均值和标准偏差(STDEV);用OB处理的培养物中的BFU-E的倍数扩增明显高于未用OB处理的培养物。“***”代表p<0.001。图4C:通过口服递送DMSO或100mg/kg PD102807,每天对小鼠进行一次处理。给小鼠注射PHZ以诱导溶血性贫血。第6天进行CBC。显示HCT的平均值和STDEV;与DMSO对照组相比,用PD102807处理的小鼠中PHZ诱导的贫血得到显著改善。图4D:显示了RBC的平均值和STDEV;与DMSO对照组相比,用PD102807处理的小鼠中PHZ诱导的贫血得到显著改善。“**”代表p<0.01。图4E:浓度为1×10^{-9}M、1×10^{-8}M、1×10^{-7}M、1×10^{-6}M和1×10^{-5}M的PD102807在具有放射配体和具有受体的细胞膜的标准结合测定中进行测试。化合物结合被计算为放射性标记的配体对每个靶标的特异性结合的抑制百分比,并且测定Ki值。相对于M1、M2、M3或M5受体,PD102807对M4具有指示的选择性/特异性。

[0042] 图5.命名为化合物A-K的一系列M4拮抗剂化合物的结构。

[0043] 图6.受体CHRM1-5(M1-M5)上PD102807和化合物A-K的受体结合测定结果。

[0044] 图7和8.原代小鼠BFU-E培养测定的结果。图7显示了化合物A、B、C、H和I的结果,而图8显示了化合物D、E、F、G、J和K的结果。小鼠原代细胞BFU-E培养测定的结果显示,化合物A-K在刺激BFU-E扩增方面的功效大致与PD相同;所有化合物在低纳摩尔范围内均有效,其中化合物B和F的功效略低于其他化合物。

[0045] 图9.PD102807和化合物A和B的药代动力学图谱(血浆)和脑渗透测定。浓度显示在上面板中,而浓度比(血浆/脑)显示在下面板中。

[0046] 图10.针对化合物A(上面板)和化合物B(下面板)的化合物在体内贫血动物模型中的功效测定结果。

[0047] 图11.针对化合物B(上面板)和化合物I(下面板)的化合物在体内贫血动物模型中的功效测定结果。

[0048] 图12.化合物G的药代动力学图谱(血浆)和脑渗透测定。浓度图显示在上面板中,而浓度比(血浆/脑)图显示在下面板中。

具体实施方式

[0049] 根据本发明,本文已发现毒蕈碱乙酰胆碱受体CHRM4通路是BFU-E自我更新的关键调节因子。本文已证明,毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型4拮抗剂促进BFU-E自我更新和扩增,并且纠正溶血、MDS和衰老小鼠模型中的贫血。因此,本文提供M4特异性拮抗剂在治疗贫血的治疗方法中的用途。

[0050] 毒蕈碱乙酰胆碱受体

[0051] 毒蕈碱乙酰胆碱受体是G蛋白偶联受体家族的成员,即这些受体在结合配体(乙酰胆碱)后在细胞膜上形成G蛋白受体复合物,从而触发下游信号转导。已鉴定出毒蕈碱受体的五种亚型,命名为M1至M5(参见,例如,Felder等人,FASEB J.:Off.Publ.Fed.Am.Soc.Exp.Biol.9,619-625(1995))。M1、M3和M5受体主要与Gq/G11型G蛋白偶联,并且G蛋白-受体复合物的形成致使二酰基甘油的形成,二酰基甘油活化蛋白激酶C并增加三磷酸肌醇(IP3)的释放,致使细胞内游离Ca2+的释放。M2和M4受体主要与Gi/Go型G

蛋白偶联,并且在cAMP生成中发挥抑制作用(Felder等人(1995),同上)。

[0052] 毒蕈碱乙酰胆碱受体包括七个跨膜结构域,通过交替的细胞内和细胞外环连接。尽管M1-M5受体亚型彼此之间显示出高度的序列一致性,但研究揭示了正构口袋形状的结构差异(Bonner等人,Science,237:527-532(1987));Caulfield等人,Pharmacol.Rev.,50:279-290(1998);和Hulme等人,Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.,30:633-673(1990)),以及激动剂或拮抗剂结合中的药理学差异(Bohme等人,J.Med.Chem.,45:3094-3102(2002);和Croy等人,Europ.J.Pharmacol,782:70-76(2016))。与这些结构和药理学差异相一致,亚型特异性拮抗剂已被开发和记录。

[0053] M4特异性拮抗剂

[0054] 如本文所用,毒蕈碱乙酰胆碱受体的术语“拮抗剂”是指能够结合毒蕈碱乙酰胆碱受体但不会触发下游信号转导(例如,蛋白质偶联和/或活化)的化合物。因此,毒蕈碱乙酰胆碱受体的拮抗剂在与受体结合时与天然配体乙酰胆碱竞争,从而干扰、阻断或以其他方式阻止乙酰胆碱与受体的结合,并且抑制毒蕈碱乙酰胆碱受体的生物活性。在一些实施方式中,通过抑制G蛋白活化来反映对毒蕈碱乙酰胆碱受体生物活性的抑制。G蛋白活化可通过与Gα亚基结合的不可水解的GTP-γ-[^{35}S]的量来测量,如Croy等人,Europ.J.Pharmacol,782:70-76(2016)所述。

[0055] 术语“M4特异性”拮抗剂是指相对于其他毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型(即M1-M3和M5)表现出与M4结合的偏好的拮抗剂。在一些实施方式中,与M4结合的偏好通过对M4的亲和力高于对其他受体亚型的亲和力来反映。在具体实施方式中,M4特异性拮抗剂对M4的亲和力比其对一种或多种其他受体亚型(例如M1、M2、M3和/或M5)的亲和力大至少50%、60%、70%、80%、90%或100%,其中“大100%”相当于比其亲和力大1倍或2倍。在一些实施方式中,M4特异性拮抗剂对M4的亲和力是其对一种或多种其他受体亚型的亲和力的至少2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍或更大。

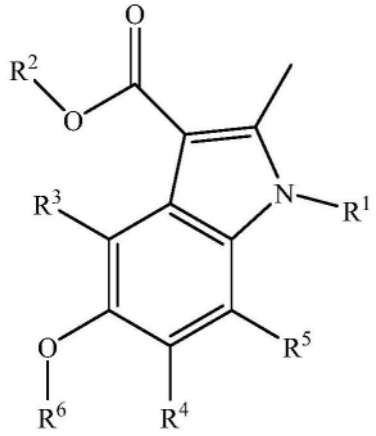
[0056] 本文使用的术语“选择性”是指拮抗剂对一种受体亚型的亲和力大于对另一种受体亚型的亲和力。选择性可基于被比较受体的结合亲和力的比率来确定。例如,M4和M2之间拮抗剂的选择性通过M4的结合亲和力相对于M2的结合亲和力的比率来测量。作为另一个示例,M4和M3之间拮抗剂的选择性通过M4的结合亲和力相对于M3的结合亲和力的比率来测量。由于Ki与结合亲和力呈负相关,因此选择性也可基于M2或M3的Ki与M4的Ki之比来确定,其中大于1的比率指示M4优于M2或M3。在具体实施方式中,M4特异性拮抗剂的选择性是一种或多种其他受体亚型的至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100倍。

[0057] 本领域已记载了测量化合物对毒蕈碱乙酰胆碱受体的结合亲和力的方法;例如通过使用来自转染的CHO细胞的膜的[3H]NMS结合。见Bohme等人(J.Med.Chem,2002,45:3094-3192),Dorje等人(J.Pharmacol.Exp.Ther.,1991,256:727-733)和Buckley等人(Mol.Pharmacol.,1989,35:469-476)。测试化合物的Ki值(即平衡离解常数)由IC50值通过Cheng-Prusoff方程得出,Ki=IC50/(1+L/Kd)。Ki值越低,亲和力越高。相比之下,pKi是Ki的负对数,因此pKi值越高,亲和力越高。

[0058] 在一些实施方式中,M4特异性拮抗剂具有6.0、6.25、6.5、6.75、7.0、7.25、7.5、7.75、8.0、8.25、8.5、8.75、9.0或更大的pKi值,用于与M4结合。在一些实施方式中,M4特异性拮抗剂的pKi值为6.0、6.25、6.5、6.75、7.0、7.25、7.75、8.0、8.25、8.5、8.75、9.0或更大,

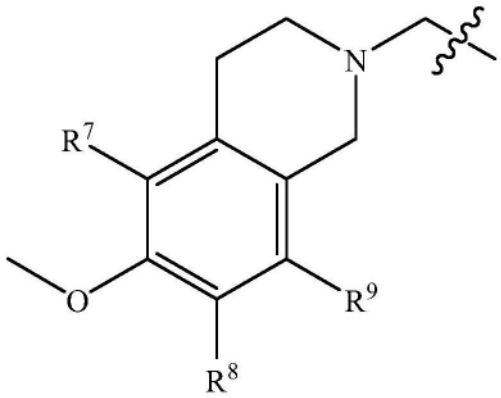
并且对M4的选择性为对一种或多种其他受体亚型的至少30、40、50、60、70、80、90、100倍。

[0059] 在一组实施方式中,M4拮抗剂化合物具有以下结构:

[0060] 

(1)

[0061] 在上面的式(1)中,变量R^1和R^6独立地选自氢原子(H)和甲基(CH_3)(即,每一个均为H或CH_3),变量R^2为具有1-3个碳原子的烃基(例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、乙烯基或丙烯-2-基);变量R^3、R^4和R^5独立地选自氢原子、卤素原子(即F、Cl、Br或I)、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH、SCH_3和以下结构(1-1):

[0062] 

(1-1)

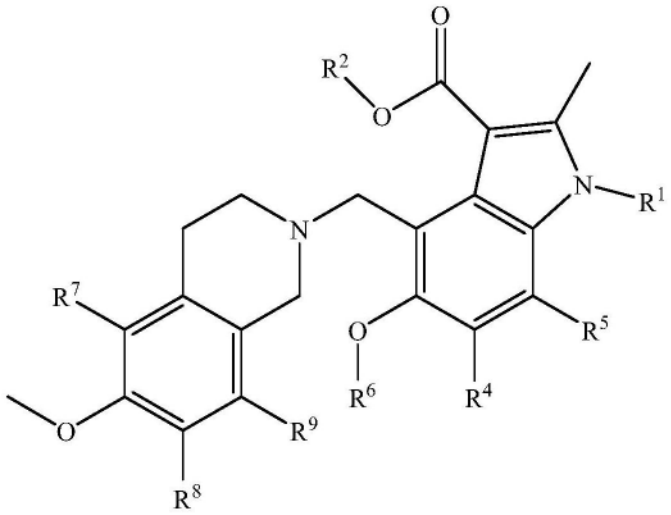
[0063] 前提是R^3、R^4和R^5中的一个或两个为式(1-1)的结构。在一些实施方式中,R^3、R^4和R_5中的一个为式(1-1)的结构。在其他实施方式中,R^3、R^4和R^5中的两个(例如,R^3和R^4;或R^3和R^5;或R^4和R^5)为式(1-1)的结构。式(1-1)中的变量R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3。当R^3、R^4和R^5中的两个为式(1-1)的结构时,式(1-1)中的R^7、R^8和R^9在式(1-1)的两个实例之间可相同或不同(即独立选择)。式(1)还包括式(1)化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、对映异构体和多晶型物。

[0064] 在式(1)的第一组实施方式中,R^1为H且R^2为甲基、乙基、正丙基或异丙基;或R^1为H且R^2为甲基或乙基;或者R^1为H且R^2为乙基。在式(1)的第二组实施方式中,R^1为甲基且R^2为甲基、乙基、正丙基或异丙基;或R^1为甲基且R^2为甲基或乙基;或者R^1为甲基且R^2为乙基。在式(1)的第三组实施方式中,至少或仅R^3为式(1-1)且R^4和/或R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;或R^3为式(1-1)且R^4和/或R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3;或者R^3为式(1-1)且R^4和R^5中的一个或两个为氢原子。在式(1)的第四组实施方式中,至少或仅R^4为式(1-1)且R^3和/或R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;或R^4为式(1-1)且R^3和/或R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3;或者R^4为式(1-1)且R^3和R^5中的一个或两个为氢原子。在式(1)的第五组实施方式中,至少或仅R^5为式(1-1)且R^3

和/或R^4独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3；或R^5为式(1-1)且R^3和/或R^4独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3；或者R^5为式(1-1)且R^3和R^4中的一个或两个为氢原子。在一些实施方式中，上面提供的任何第一或第二实施方式与上面提供的任何第三、第四或第五实施方式相结合。在上述实施方式的任何组合中，R^6可被选择为H或CH_3。在上述实施方式的任何组合中，式(1-1)中的R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3；或式(1-1)中的R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3；或者式(1-1)中的R^7、R^8和R^9中的一个、两个或全部为氢原子。

[0065] 在具体实施方式中，式(1)化合物具有以下结构，其中至少R^3被选择为式(1-1)的结构：

[0066]

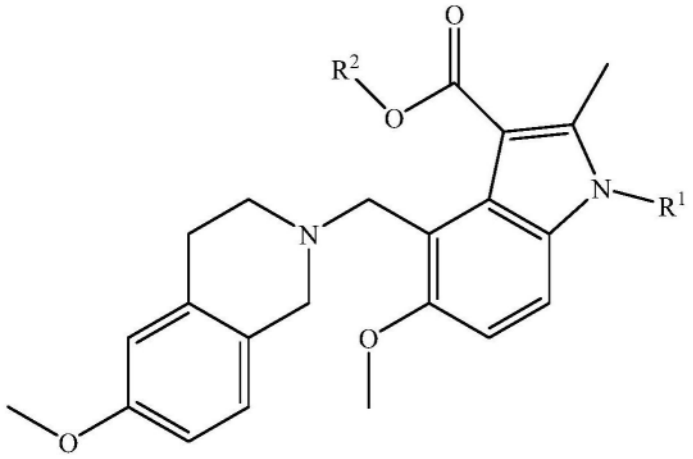


(1a)

[0067] 在上面的式(1a)中，第一、第二和第三实施方式中的任何一个，以及它们彼此之间的组合，以及与如上式(1)中所述的R^6、R^7、R^8和R^9的具体选择的组合，均是可以的。

[0068] 在具体实施方式中，式(1a)化合物具有以下结构：

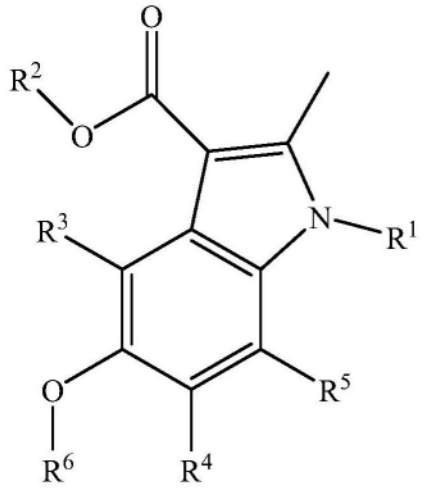
[0069]



(1b)

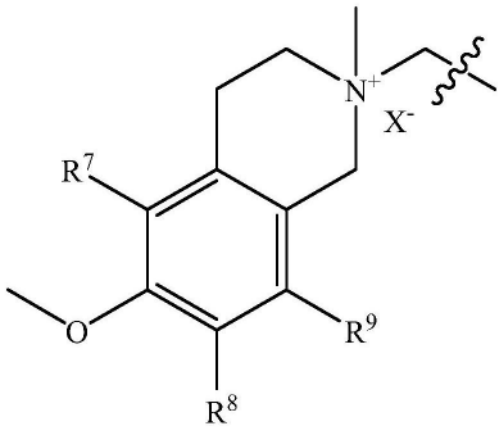
[0070] 在上面的式(1b)中，如上文对式(1)的R^1和R^2所述地第一和第二实施方式中的任何一个，均是可以的。

[0071] 在一些实施方式中，式(1)化合物为具有以下结构的甲基化盐：

[0072] 

（1c）

[0073] 其中：R^1为H或CH_3；R^2为具有1-3个碳原子的烃基；R^3、R^4和R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH、SCH_3和以下结构(1-2)：

[0074] 

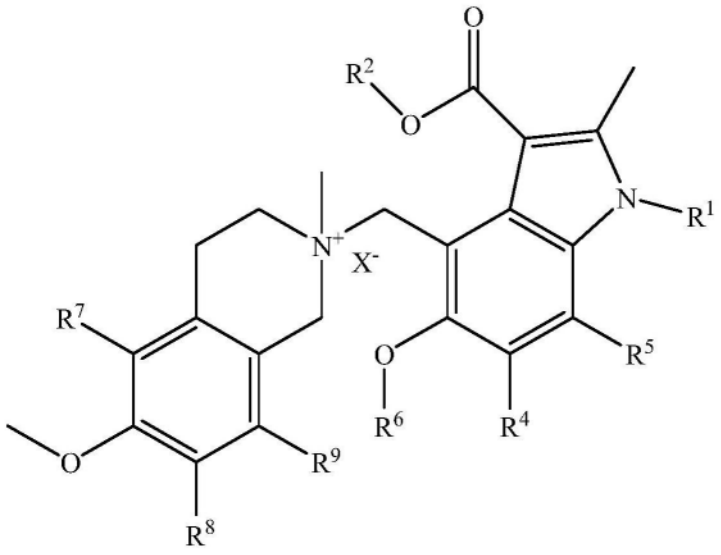
（1-2）

[0075] 前提是R^3、R^4和R^5中的一个或两个为式(1-2)的结构；R^6为H或CH_3；R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3。当R^3、R^4和R^5中的两个为式(1-2)的结构时，式(1-2)中的R^7、R^8和R^9在式(1-1)的两个实例之间可相同或不同(即独立选择)。变量X^-为平衡化合物的正电荷部分的负离子。式(1c)还包括式(1c)化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、对映异构体和多晶型物。

[0076] 在式(1c)的第一组实施方式中，R^1为H且R^2为甲基、乙基、正丙基或异丙基；或R^1为H且R^2为甲基或乙基；或者R^1为H且R^2为乙基。在式(1c)的第二组实施方式中，R^1为甲基且R^2为甲基、乙基、正丙基或异丙基；或R^1为甲基且R^2为甲基或乙基；或者R^1为甲基且R^2为乙基。在式(1c)的第三组实施方式中，至少或仅R^3为式(1-2)且R^4和/或R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3；或R^3为式(1-2)且R^4和/或R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3；或者R^3为式(1-2)且R^4和R^5中的一个或两个为氢原子。在式(1c)的第四组实施方式中，至少或仅R^4为式(1-2)且R^3和/或R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3；或R^4为式(1-2)且R^3和/或R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3；或者R^4为式(1-2)且R^3和R^5中的一个或两个为氢原子。在式(1c)的第五组实施方式中，至少或仅R^5为式(1-2)且R^3和/或R^4独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3；或R^5为式(1-2)且R^3和/或R^4独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3；或者R^5为式(1-2)且R^3和R^4中的一个或两个为氢原子。在一些实施方式中，上面提供的任何第一或第二实施方式与上面提供的任何第

三、第四或第五实施方式相结合。在上述实施方式的任何组合中，R^6可被选择为H或CH_3。在上述实施方式的任何组合中，式(1-2)中的R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3；或式(1-2)中的R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3；或者式(1-2)中的R^7、R^8和R^9中的一个、两个或全部为氢原子。

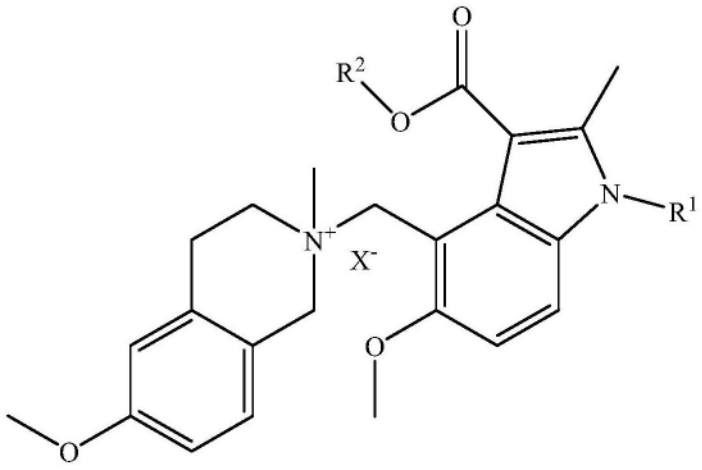
[0077] 在具体实施方式中，式(1c)的甲基化盐化合物具有以下结构：

[0078] 

(1d)。

[0079] 在上面的式(1d)中，第一、第二和第三实施方式中的任何一个，以及它们彼此之间的组合，以及与上述式(1c)中所述的R^6、R^7、R^8和R^9的具体选择的组合均为可能的。

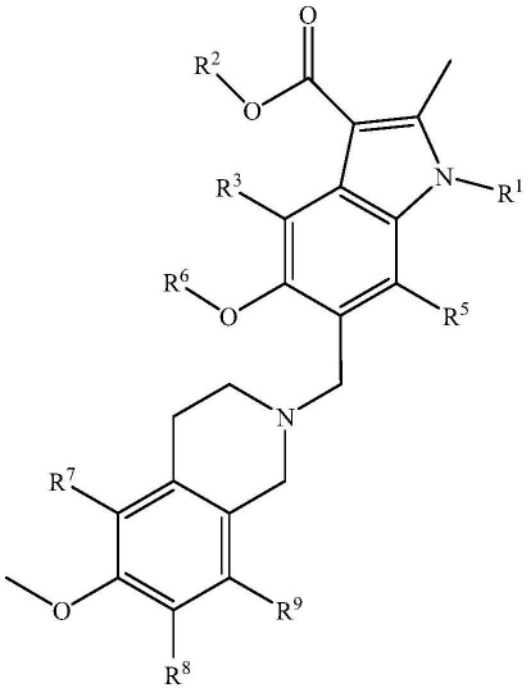
[0080] 在具体实施方式中，式(1c)化合物具有以下结构：

[0081] 

(1e)

[0082] 在上述式(1e)中，如上文式(1c)中对R^1和R^2所述的任何第一和第二实施方式的任一个均为可能的。

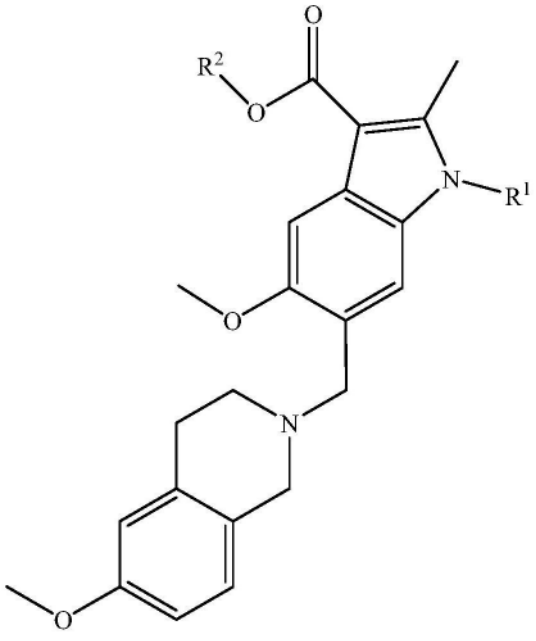
[0083] 在其他实施方式中，式(1)化合物具有以下结构，其中至少R^4被选择为式(1-1)的结构：

[0084] 

(1f)

[0085] 在上述式(1f)中,第一、第二和第四实施方式中的任何一个,以及它们彼此之间的组合,以及与上述式(1)中所述的R^6、R^7、R^8和R^9的具体选择的组合均为可能的。

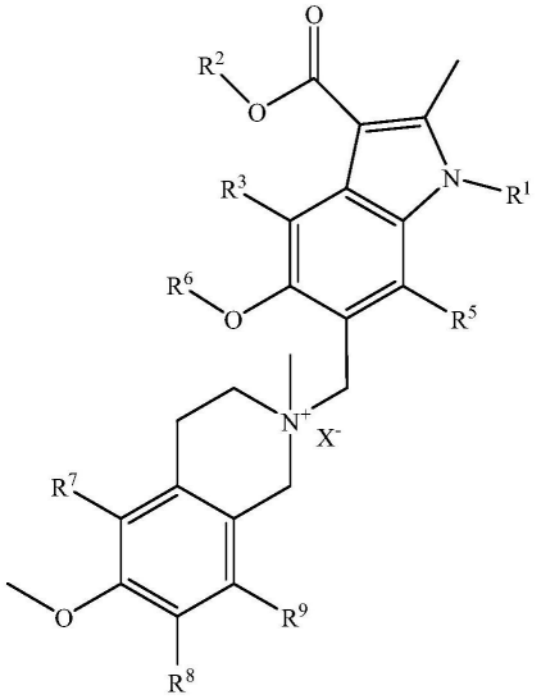
[0086] 在具体实施方式中,式(1f)化合物具有以下结构:

[0087] 

(1g)

[0088] 在上述式(1g)中,如上文在式(1)下对R^1和R^2所述的第一和第二实施方式的任一个均为可能的。

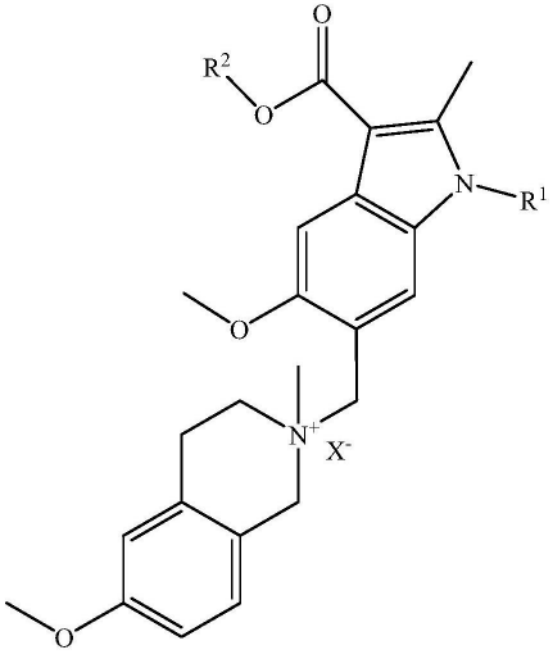
[0089] 在其他实施方式中,式(1)化合物具有以下甲基化盐结构,其中至少R^4被选择为式(1-1)的结构:

[0090] 

(1h)

[0091] 在上述式(1h)中,第一、第二和第四实施方式中的任何一个,以及它们彼此之间的组合,以及与上文式(1)中所述的R^6、R^7、R^8和R_9的具体选择的组合均为可能的。

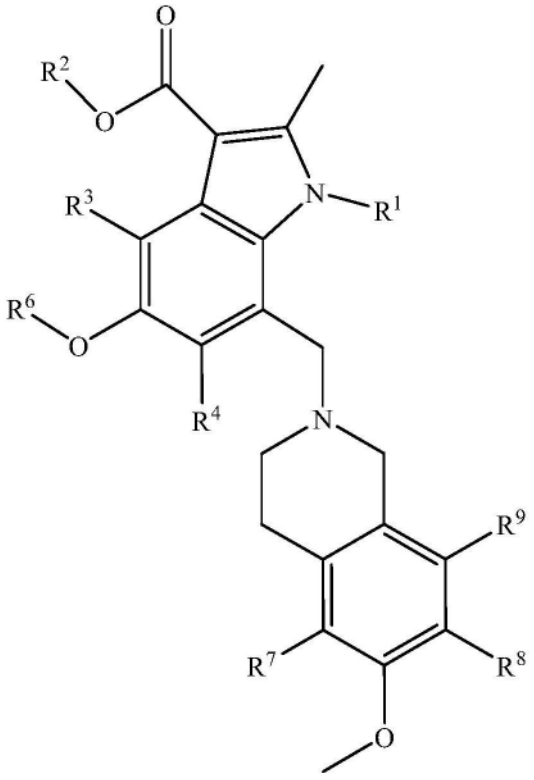
[0092] 在具体实施方式中,式(1h)化合物具有以下结构:

[0093] 

(1i)

[0094] 在上面的式(1i)中,如上文对式(1c)下的R^1和R^2所述的第一和第二实施方式中的任一个均为可能的。

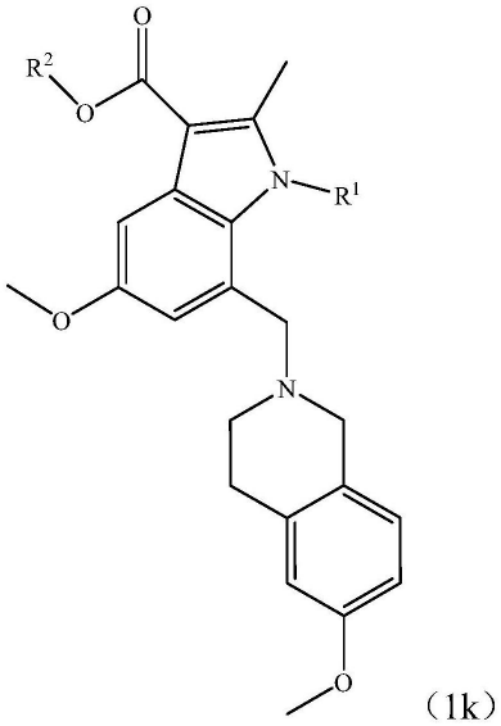
[0095] 在其他实施方式中,式(1)化合物具有以下结构,其中至少R^5被选择为式(1-1)的结构:

[0096] 

(1j)

[0097] 在上面的式(1j)中,第一、第二和第五实施方式中的任何一个,以及它们彼此之间的组合,以及与上述式(1)中所述的R^6、R^7、R^8和R^9的具体选择的组合均为可能的。

[0098] 在具体实施方式中,式(1j)化合物具有以下结构:

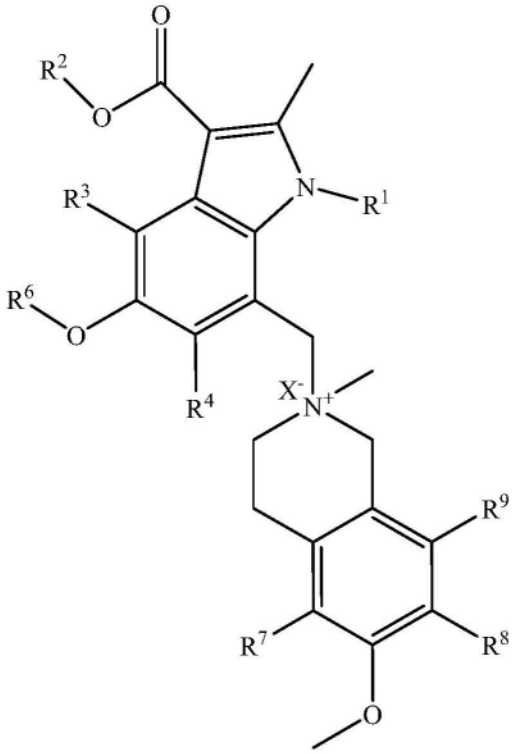
[0099] 

(1k)

[0100] 在上面的式(1k)中,如上文在式(1)下对R^1和R^2所述的第一和第二实施方式中的任何一个均为可能的。

[0101] 在其他实施方式中,式(1)化合物具有以下甲基化盐结构,其中至少R^5被选择为式

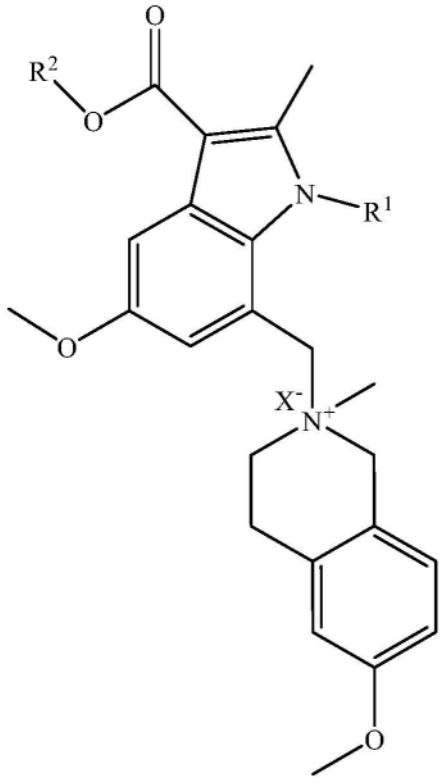
(1-1)的结构：

[0102] 

（1m）

[0103] 在上面的式(1m)中,第一、第二和第五实施方式中的任何一个,以及它们彼此之间的组合,以及与上述式(1)中所述的R^6、R^7、R^8和R^9的具体选择的组合均为可能的。

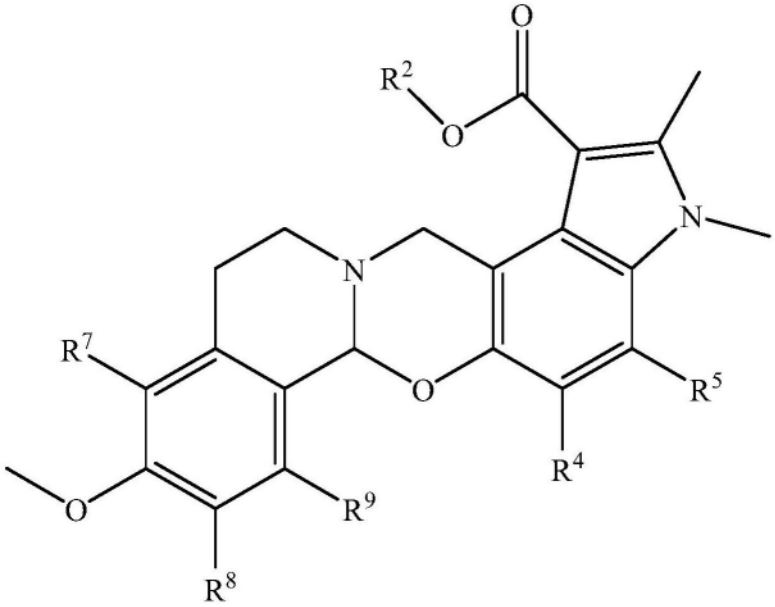
[0104] 在具体实施方式中,式(1m)化合物具有以下结构：

[0105] 

（1n）

[0106] 在上面的式(1n)中,如上文在式(1c)下对R^1和R^2所述的第一和第二实施方式的任一个均为可能的。

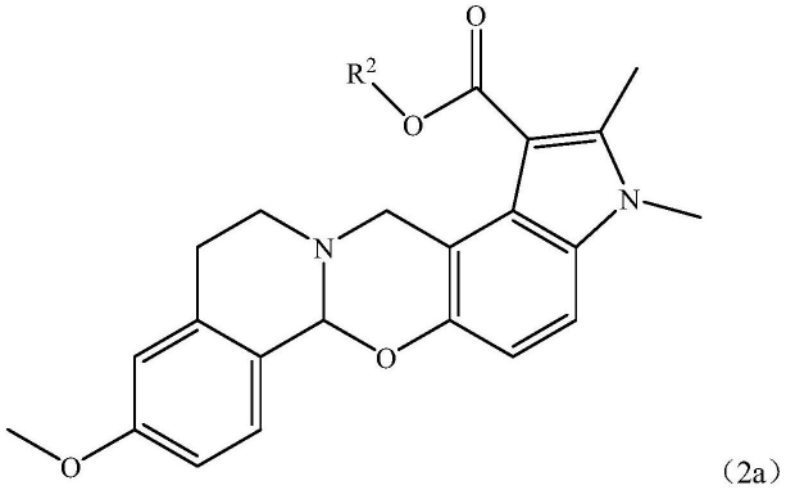
[0107] 在另一组实施方式中,M4拮抗剂化合物具有以下结构:

[0108] 

(2)

[0109] 在上述式(2)中,R^2、R^4、R^5、R^7、R^8和R^9的定义见上述式(1)。式(2)还包括式(2)化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、对映异构体和多晶型物。在式(2)的第一组实施方式中,R^2为甲基、乙基、正丙基或异丙基;或R^2为甲基或乙基;或者R^2为乙基。在式(2)的第二组实施方式中,R^4和R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;或R^4和R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3;或者R^4和R^5中的一个或两个均为氢原子。在一些实施方式中,组合上面提供的任何第一或第二实施方式。在上述实施方式的任何组合中,R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;或R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3;或者R^7、R^8和R^9中的一个、两个或全部均为氢原子。

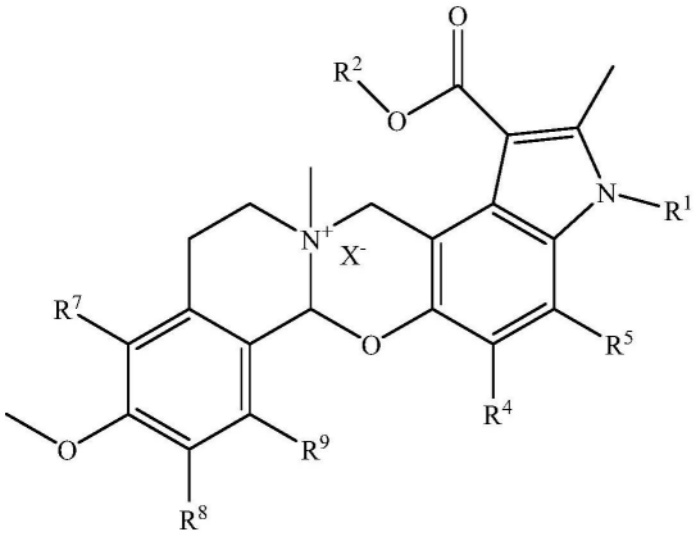
[0110] 在具体实施方式中,式(2)化合物具有以下结构:

[0111] 

(2a)

[0112] 在上述式(2a)的具体实施方式中,R^2为甲基、乙基、正丙基或异丙基;或R^2为甲基或乙基;或者R^2为乙基。

[0113] 在另一组实施方式中,M4拮抗剂化合物具有以下结构:

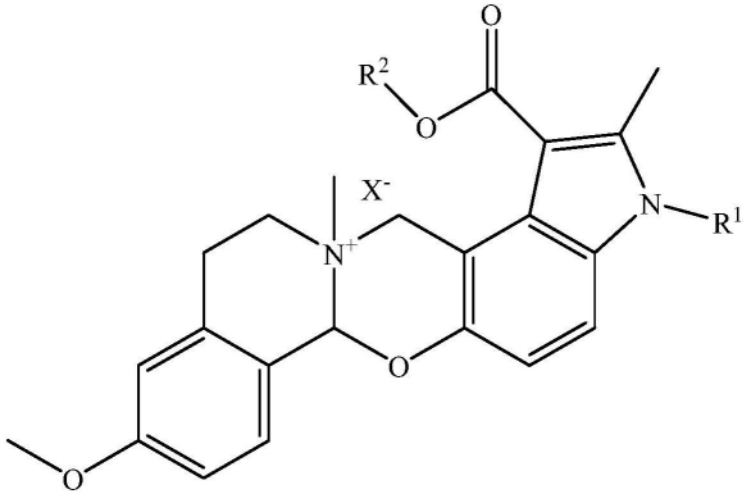
[0114] 

（2b）

[0115] 在上述式(2b)中,R^1、R^2、R^4、R^5、R^7、R^8和R^9的定义见上述式(1)。式(2b)还包括式(2b)化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、对映异构体和多晶型物。在一些实施方式中,式(2b)代表外消旋混合物;在其他实施方式中,式(2b)代表单一对映异构体,其可被指定为R或S,或(+)或(-)光学形式。变量X^-为平衡化合物的正电荷部分的负离子。

[0116] 在式(2b)的第一组实施方式中,R^1为H且R^2为甲基、乙基、正丙基或异丙基;或R^1为H且R^2为甲基或乙基;或者R^1为H且R^2为乙基。在式(2b)的第二组实施方式中,R^1为甲基且R^2为甲基、乙基、正丙基或异丙基;或R^1为甲基且R^2为甲基或乙基;或者R^1为甲基且R^2为乙基。在式(2b)的第三组实施方式中,R^4和R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;或R^4和R^5独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3;或者R^4和R^5中的一个或两个均为氢原子。在一些实施方式中,上述第一或第二实施方式中的任何一个与第三组实施方式中的任何一个组合。在上述实施方式的任何组合中,R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3、CF_3、OH、OCH_3、SH和SCH_3;或R^7、R^8和R^9独立地选自氢原子、卤素原子、CH_3和CF_3;或者R^7、R^8和R^9中的一个、两个或全部均为氢原子。

[0117] 在具体实施方式中,式(2b)化合物具有以下结构:

[0118] 

（2c）

[0119] 在上文式(2c)中,如上文针对式(2b)下的R^1和R^2所述的第一和第二实施方式的任一个均为可能的。

[0120] 在一些实施方式中,M4特异性拮抗剂具有用于与M4结合的至少6.0×10^{-6}M的pKi。在一些实施方式中,M4特异性拮抗剂对M1/M4、M2/M4、M3/M4和M5/M4中的任何一个、两个、三个或全部具有至少5倍、10倍、15倍、20倍或25倍的选择性。

[0121] 本文所述化合物可形成为和/或用作药学上可接受的盐。药学上可接受的盐可由中性化合物(即,具有吲哚基和/或异喹啉基环上的环氮)与亲电有机物种或药学上可接受的有机或无机酸反应产生。通过这种方式,吲哚基和/或异喹啉环氮中的一个或两个被质子化或烷基化。亲电有机物种的一些实例包括烷基卤化物,诸如甲基溴、乙基溴、正丙基溴和异丙基溴。有机酸的一些实例包括乙酸、丙酸、丁酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、马来酸、酒石酸、富马酸、三氟乙酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、2-萘磺酸、3-苯丙酸、三甲基乙酸、葡萄糖酸、谷氨酸、水杨酸、羟基萘甲酸、硬脂酸、粘酸等。无机酸的一些实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、磷酸、偏磷酸等。阴离子(X^-)可为与上述酸或亲电物种相关的任何阴离子,或阴离子可由其与本领域任何其它药学上可接受的阴离子交换而产生。

[0122] 在一些实施方式中,当R^6为氢原子时,药学上可接受的盐可由R^6的脱质子化产生。脱质子化通常通过中性化合物与具有适当强度的碱反应来脱质子化苯酚(即-OR^6基团)而产生。例如,碱可为碱金属(例如锂、钠、钾)的氢氧化物、碱土金属(例如镁或钙)的氢氧化物或铝的氢氧化物。

[0123] 上述任何化合物也可为溶剂化物。如本领域所知,溶剂化物为化合物与一个或多个溶剂分子的加成物。出于本发明的目的,溶剂分子应为药学上可接受的。药学上可接受的溶剂分子的一些实例包括水、醇(例如,乙醇)和二醇(例如,乙二醇和丙二醇)。在溶剂分子为水的情况下,溶剂化物通常称为水合物。化合物也可为任何多晶形式,例如,无定形、单晶或多晶。结晶形式也可为由例如晶体堆积和晶体(对称)空间群控制的几种可能结晶形式中的一种。药物溶剂化物、水合物、多晶型物和晶体形式描述于,例如A.M.Healy等人,Advanced Drug Delivery Reviews,117,25-46,2017和S.L.Morissette等人,Advanced Drug Delivery Reviews,56,275-300,2004,其全部内容通过引用并入本文。

[0124] 含有M4特异性拮抗剂的药物组合物

[0125] 通常,为了使M4拮抗剂化合物可施用于受试者,该化合物与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂一起配制,这在药物组合物领域是众所周知的。本发明的药物组合物可特别配制成固体或液体形式施用,包括适于以下情况的那些:(1)口服施用,例如,药液剂(水溶液或非水溶液或悬浮液)、片剂(例如用于口腔、舌下和全身吸收的片剂)、丸剂、粉剂、颗粒剂、应用于舌头的糊剂;(2)肠外施用,例如通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射,例如作为无菌溶液或悬浮液或缓释制剂;(3)局部应用,例如,涂抹在皮肤上的乳霜、药膏或控释贴剂或喷雾剂;(4)舌下施用;(5)经眼施用;(6)经皮施用;或(7)鼻腔施用。

[0126] 本文中使用的短语“药学上可接受”是指在合理的医学判断范围内,适合进入活的生物体或活的生物组织,优选没有显著毒性、刺激或过敏反应的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。如本文所用的短语“药学上可接受的载体”通常是指药学上可接受的组合物,诸如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如,润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或立体酸)或溶剂封装材料,用于将活性剂引入体内。每种载体必须为“可接受的”,即与制

剂的其他成分相容,并且对患者无害。可用于本发明药物组合物的合适的水性和非水性载体的实例包括,例如,水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、植物油(诸如橄榄油)和可注射有机酯(诸如油酸乙酯),及其合适的混合物。例如,可通过使用包衣材料(诸如卵磷脂),通过在分散的情况下维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0127] 可用作药学上可接受载体的材料的其他实例包括:(1)糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)黄蓍粉;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石粉;(8)赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;(9)油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇类,诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐;以及(22)药物制剂中使用的其它无毒相容物质。

[0128] 片剂可通过压缩或模压制成,任选地含有一种或多种辅助成分。压缩片剂可使用粘合剂(例如,明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,乙醇酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂来制备。片剂和活性剂的其他固体剂型,诸如胶囊、丸剂和颗粒剂,可任选地用包衣和壳(诸如肠溶包衣和药物配制领域中众所周知的其他包衣)进行刻痕或制备。剂型也可被配制成提供活性成分在其中的缓慢或受控释放,使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素以提供期望的释放曲线、其他聚合物基质、脂质体和/或微球体。该剂型也可配制成快速释放。

[0129] M4特异性拮抗剂的用途

[0130] 在一个实施方式中,向受试者施用M4特异性拮抗剂,以治疗由毒蕈碱乙酰胆碱受体亚型4(M4)活性引起的疾病或病症,诸如贫血。本文使用的术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”包括疾病或病症的改善、减缓进展、纠正、预防或延迟复发。例如,贫血治疗可降低包括与贫血相关联的一个或多个症状(例如疲劳、呼吸急促)的贫血的严重程度,如通过恢复或维持血红蛋白、红细胞比容和/或红细胞(RBC)计数水平所反映的。

[0131] 在一些实施方式中,治疗贫血或其他疾病或病症的方法是通过向需要的受试者施用药学有效量的M4拮抗剂来实现的。M4特异性拮抗剂可为上述任何M4拮抗剂化合物,包括式(1)和(2)范围内的任何结构以及其中的子式。

[0132] 需要本治疗的受试者包括任何受试者,特别是患有或有可能患有由M4活性引起的贫血或其他疾病或病症的人类受试者。在一些实施方式中,受试者患有Epo耐药贫血,这是一种施用Epo不会导致期望的反应或预期不会导致期望的反应的贫血。受试者的贫血是否对EPO有耐药性可通过在用重组人Epo进行标准治疗后评估受试者的Hb或红细胞比容来确定。例如,如果受试者在接受重组人促红细胞生成素(Epo)的标准治疗后,未能达到至少12g/dLHb的水平,未能实现Hb水平增加超过2g/dL,或未能保持至少10g/dL的Hb浓度,则受试者的贫血被认为是Epo耐药贫血。作为另一个实例,如果受试者在接受重组人Epo标准治疗后,未能将红细胞比容提高至少30%、32%、34%、36%或38%,则受试者的贫血被认为是Epo耐药贫血。

[0133] 受试者的贫血可能由不同的原因引起。在一些实施方式中,受试者中的贫血与溶

血相关联(即,溶血性贫血)。在一些实施方式中,受试者的贫血与骨髓增生异常综合征(MDS)相关联。在一些实施方式中,受试者的贫血与衰老相关联。因此,在一些实施方式中,向至少60、65、70、75、80或85岁的人类受试者提供本治疗。在其它实施方式中,预期贫血;例如,在预期接受手术、化疗或放射治疗的受试者中。M4拮抗剂也可用于治疗技术上不符合贫血条件但以贫血样症状为特征的病症或疾病。溶血模型能够在体内证实该化合物的一般抗贫血活性。

[0134] 向需要M4特异性拮抗剂的受试者施用治疗有效量(即治疗有效剂量)的M4特异性拮抗剂。如本文所用的术语"治疗有效量"或"治疗有效剂量"对应于有效用于提供上述任何期望治疗效果的活性剂的量,优选对受试者没有实质性毒性作用。在具体实施方式中,有效量是足以实现Hb、红细胞比容或RBC计数增加至期望水平或Hb、红细胞比容或RBC计数增加期望量,或更具体地,实现一种或多种贫血症状减轻的量。有效的确切剂量可取决于化合物的结构和药理特性而变化。评估M4特异性拮抗剂可能是有用的,例如,通过评估其对培养物中BFU-E的自我更新和扩增的影响,以及其药理学特征(例如血浆中的半衰期),以便确定此类拮抗剂的有效量。在一些实施方式中,以单剂量施用M4特异性拮抗剂。在一些实施方式中,以多剂量施用M4特异性拮抗剂,例如,每天、每隔一天、每周、每两周或每月施用2、3或更多次。特别是对于全身施用模式,例如,剂量可在每天每公斤体重约0.01、0.1、0.5、1、5或10mg至每天每公斤体重约20、50、100、500或1000mg范围内,或每天两次、三次、四次或更多次。一般而言,小分子化合物的有效量可在1μg至5000mg,10μg至1000mg,10μg至10mg,100μg至500μg范围内,每天、每周或每月一次或多次。在一些实施方式中,剂量范围可为约1、5、10、20、50、100μg/kg/天,或1、5、10、15、20、50、100、150、200mg/kg/天,或规定剂量之间的任何数值范围。

[0135] 可通过标准途径向受试者施用M4特异性拮抗剂,包括口服、鼻腔、经皮、肠外(例如静脉、腹腔、皮内、皮下或肌肉内)途径。在具体实施方式中,经由口服施用向受试者给予M4特异性拮抗剂。

[0136] 可提供M4特异性拮抗剂或将其与药学上可接受的载体混合以进行适当的施用。如上所述,药学上可接受的载体包括任何及所有溶剂、分散介质、等渗剂等。载体可为液体、半固体,例如糊状物或固体载体。载体的实例包括油、水、盐溶液、醇、糖、凝胶、脂类、脂质体、树脂、多孔基质、粘合剂、填料、包衣、防腐剂等,或其组合。

[0137] 在其他实施方式中,M4特异性拮抗剂用于通过将爆式红系集落形成单位(BFU-E)细胞与M4特异性拮抗剂接触来促进BFU-E细胞的自我更新。例如,当与M4特异性拮抗剂接触时,BFU-E细胞可位于活体(例如,人类)受试者体内,或者BFU-E细胞可取自受试者并与M4特异性拮抗剂体外接触。M4特异性拮抗剂可为任何M4特异性拮抗剂,包括上述任何M4特异性拮抗剂。在具体实施方式中,增加的BFU-E细胞的自我更新用于治疗受试者的贫血。在一些实施方式中,由于与M4特异性拮抗剂接触,BFU-E细胞的自我更新增加了至少50%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更大。

[0138] 为了说明和描述本发明的某些具体实施方式,下面列举了一些实施例。然而,本发明的范围不以任何方式受到本文所述实施例的限制。所有引用的参考文献(包括本申请中引用的文献参考文献、公开的的专利和公开的专利申请)的内容在此通过引用明确并入。

[0139] 实施例1.

[0140] 本实施例描述了为研究毒蕈碱乙酰胆碱受体CHRM4通路在BFU-E自我更新中的作用以及小分子毒蕈碱乙酰胆碱受体抑制剂溴化羟苯乙铵对小鼠模型贫血的影响而进行的实验。

[0141] 结果

[0142] 为了鉴定调节BFU-E自我更新的G蛋白偶联受体(“GPCR”),分析了全基因组基因表达谱,重点是在BFU-E中大量表达的GPCR。为了进一步将候选名单缩小到最有可能在功能上对BFU-E自我更新与分化的调节起重要作用的GPCR,发明人利用了分化和自我更新是两种可能具有对比鲜明的基因表达谱的相反细胞命运的概念。

[0143] 在检查的358个可用药的GPCR中,发现包括P2ry2、Gpr124和Calcrl在内的3个GPCR在BFU-E分化期间下调,而在自我更新期间上调;包括Chrm4、Fzd5和Darc在内的3个GPCR在BFU-E分化期间上调,而在自我更新期间下调。对于BFU-E自我更新期间上调的GPCR,测试了作为这些GPCR的激动剂的小化合物;对于在BFU-E自我更新期间下调的GPCR,测试了拮抗剂促进BFU-E自我更新和扩增的能力。在所有被测试的小化合物中,溴化羟苯乙铵和柠檬酸邻甲苯海拉明(orphenadrine citrate)这两种密切相关的毒蕈碱乙酰胆碱受体拮抗剂触发了BFU-E的扩增(图1A-1B)。

[0144] 之前已证明,一个BFU-E可产生约500个红细胞。当在100μM溴化羟苯乙铵存在下培养时,BFU-E经历了延长的扩增,导致产生约10倍多的红细胞(图1A-1B)。培养12天后,大多数培养细胞经历终末分化,在具有或没有溴化羟苯乙铵的培养条件下,Ter119+分化细胞的百分比没有差异,表明所有细胞在具有或没有溴化羟苯乙铵的培养条件下均是Ter119+分化的红系细胞(图1C)。如图1D所示,将第6天培养的BFU-E接种于甲基纤维素培养基上,9天后计数形成的BFU-E集落数量。溴化羟苯乙铵的存在触发了约2倍的BFU-E集落形成。在人CD34+造血干细胞和祖细胞(HSPC)培养系统中,溴化羟苯乙铵也促进了红系细胞约2至4倍的扩增(图1E)。综上所述,这表明毒蕈碱型乙酰胆碱受体拮抗剂溴化羟苯乙铵通过促进BFU-E自我更新而增加红细胞生成。

[0145] 本文显示Chrm4是在BFU-E中表达的毒蕈碱乙酰胆碱受体家族中最丰富的成员(图2A)。在所有测试的细胞类型中,红系祖细胞被发现具有第二丰富的Chrm4表达,就在Chrm4的功能作用被很好地确立的视网膜细胞之后。发现Chrm4在从BFU-E到CFU-E阶段的红系分化期间上调,在自我更新期间下调(图2A)。如图2B-2D所示,使用两个靶向Chrm4的独立shRNA敲除Chrm4可促进BFU-E扩增。一个感染病毒编码的对照shRNA的BFU-E产生约100个红系细胞,而感染编码靶向Chrm4的shRNA的病毒的BFU-E产生约3-5倍的红系细胞。这概括了溴化羟苯乙铵对BFU-E扩增的积极影响(图1B)。一致地,Chrm4的敲除也上调了自我更新标志物的表达,诸如Zfp36l2。

[0146] 据报道,毒蕈碱乙酰胆碱拮抗剂通过提高环腺苷酸(cAMP)水平和调节CREB转录程序来抑制CHRM4通路(Kruse等人,Nat Rev Drug Discov,13,549-560(2014);Wess等人,Nat Rev Drug Discov,6,721-733(2007);Shaywitz,Annu Rev Biochem,68,821-861(1999))。一致地,本文显示用腺苷酸环化酶活化剂福司可林培养BFU-E可促进BFU-E扩增(图3A)。此外,磷酸化的CREB在溴化羟苯乙铵处理后显示核定位的增加(图3B)。这些结果表明,CREB可作为再生和纠正老年人干细胞和祖细胞衰竭的一个因素。

[0147] 为了鉴定CREB的直接靶基因,在BFU-E上进行了ChIP-Seq。据报道,RNA结合蛋白

ZFP36L2优先与红系分化期间诱导的基因的mRNA结合,并且触发其降解,进而有助于自我更新。与ZFP36L2相反,发现CREB优先与BFU-E中高度表达的基因附近的基因组位点结合(图3C),并且触发这些基因的上调(图3D),通过这种上调,CREB被认为有助于BFU-E祖细胞状态的维持。这些基因包括足以诱导红系祖细胞扩增的转录因子Gata2(Tsai等人,Blood,89,3636-3643(1997))和对维持BFU-E祖细胞状态不可或缺的RNA结合蛋白Zfp3612(Zhang等人,Nature,499,92-96(2013))。总之,这些结果表明CHRM4-CREB通路通过上调对维持BFU-E祖细胞状态重要的基因的表达促进BFU-E自我更新。

[0148] 总之,上述实验表明,毒蕈碱乙酰胆碱受体CHRM4通路是BFU-E自我更新的关键调节因子;毒蕈碱型乙酰胆碱受体拮抗剂溴化羟苯乙铵触发BFU-E自我更新和扩增。实验还表明,在溶血、MDS和衰老小鼠模型中,毒蕈碱乙酰胆碱受体拮抗剂可在体内纠正贫血。此外,实验表明下游转录因子CREB介导毒蕈碱乙酰胆碱受体在促进BFU-E自我更新中的作用。

[0149] 材料和方法

[0150] 从小鼠胚胎第14.5天(E14.5)胎肝中分离原代小鼠BFU-E,并且在StemSpan无血清扩增培养基中培养,并且在培养期间计数形成的细胞数量。用编码对照shRNA的病毒或编码靶向Chrm4的shRNA的病毒感染BFU-E,并且计数培养期间形成的GFP+细胞的数量。向溶血小鼠模型、Mx1-cre Srsf2 P95H/WT MDS小鼠模型和衰老小鼠模型中腹腔注射DMSO或25mg/kg溴化羟苯乙铵。化合物注射液注射后进行全血细胞计数(CBC)。在用100μM溴化羟苯乙铵培养45分钟后,对BFU-E进行CREB ChIP-Seq。在与DMSO或溴化羟苯乙铵培养3天后,对BFU-E进行RNA-Seq。

[0151] BFU-E分离和培养系统

[0152] 使用之前描述的荧光活化细胞分选(FACS)方法从小鼠胚胎第14.5天胎肝中分离出BFU-E(Flygare等人,Blood,117,3435-3444(2011))。BFU-E在含有rmSCF(100ng/ml)、EPO(2U/ml)、rmIGF-1(40ng/ml)、地塞米松(1nmol/ml或10nmol/ml)、溴化羟苯乙铵(100μmol/ml)和柠檬酸邻甲苯海拉明(1μmol/ml)的StemSpan SFEMII培养基中培养。

[0153] BFU-E集落形成、Ter119抗体染色和逆转录病毒感染测定

[0154] 培养3天后,将培养的细胞接种于甲基纤维素培养基Methocult SF M3436中,9天后计数BFU-E集落。在培养第14天,用Ter119 APC抗体对培养细胞进行染色,并且通过流式细胞术测定Ter119+细胞的百分比。对于逆转录病毒感染,用编码对照shRNA或靶向Chrm4的shRNA的病毒感染BFU-E。

[0155] 人CD34+细胞培养、计数和集落形成测定

[0156] 在StemSpan™SFEM培养基中培养人CD34+造血干细胞和祖细胞(HSPC),该培养基含有rhSCF(20ng/ml)、rhIL-3(5ng/ml)和EPO(1U/ml)以及不同浓度地塞米松和奥芬铵。用流式细胞术对细胞总数进行计数。对于集落形成测定,将第8天培养的细胞接种于甲基纤维素培养基MethoCult™H4034 Optimum中,13天后对BFU-E集落进行计数。

[0157] PHZ诱导的溶血性贫血小鼠模型

[0158] 4-6周龄C57bl/6小鼠每天腹腔注射对照DMSO或化合物,持续3天。第4天,小鼠腹腔注射60mg/kg PHZ。然后每天给小鼠腹腔注射化合物或对照DMSO,持续3天。使用肝素化毛细管在含K2-EDTA的采血管中逆行采集外周血样本。CBC使用Hemavet®950进行。

[0159] 脾脏细胞的BFU-E集落形成和流式细胞术分析

[0160] 4-6周龄C57bl/6小鼠每天腹腔注射化合物或对照DMSO,持续3天。第4天,小鼠腹腔注射60mg/kg PHZ。然后每天给小鼠腹腔注射化合物或对照DMSO,持续2天。分离小鼠脾脏并匀浆以获得单细胞悬浮液。将细胞悬浮液与氯化铵溶液在冰上孵育5分钟来溶解红细胞。然后将脾细胞置于甲基纤维素培养基Methocult SF M3436中,9天后对BFU-E集落进行计数,或用Ter119 APC抗体染色,然后进行流式细胞术分析。

[0161] 条件敲入Cre-Mx1 Srsf2 P95H/WT MDS小鼠模型和衰老小鼠模型

[0162] 对于MDS小鼠模型,如前所述,骨髓细胞取自Mx1-cre Srsf2 f1/WT和Mx1-Cre Srsf2 P95H/WT小鼠新鲜解剖的股骨和胫骨(Kim等人,Cancer Cell,27,617-630(2015))。通过尾静脉注射将来自Mx1-cre Srsf2 f1/WT或Mx1-Cre Srsf2 P95H/WT小鼠的1×10^6个骨髓细胞移植到致死辐射(450cGy两次)CD45.1受体小鼠中。移植后3周,注射polyI:polyC(pIpC)诱导Mx1-cre表达。在确认MDS疾病表型后,每天给小鼠腹腔注射化合物或对照DMSO,持续45天。逆行采集外周血样以使用Hemavet 950进行CBC。

[0163] 对于衰老小鼠模型,对6-8周或18-21月龄C57bl/6小鼠进行CBC。18-21月龄小鼠每天腹腔注射化合物或对照DMSO。在第7天采集血液样本用于CBC。

[0164] RNA测序

[0165] 对于RNA分离,BFU-E在具有奥芬铵(100μM)或DMSO对照的含有SCF(100ng ml^{-1})、EPO(2Uml^{-1})、IGF-1(40ng ml^{-1})和地塞米松(1nM)的SFEMII中于37℃下培养。在第3天收集细胞,并且使用RNeasy®迷你试剂盒(Qiagen)分离RNA。使用RNA-Seq样本制备试剂盒v2(Illumina)生成测序文库,并且通过HiSeq®2500平台(Illumina)测序。STAR映射器用于将序列读取映射回小鼠基因组(GRCm38,mm10)。读取数据按照其接头进行解复用,并且用于不同的映射后分析。

[0166] 染色质免疫沉淀测序(ChIP-Seq)

[0167] 使用ChIP-IT高灵敏度试剂盒(活性基序)执行ChIP-Seq。从E14.5小鼠胎肝中分离出5×10^6BFU-E。BFU-E在含有SCF(100ng ml^{-1})、EPO(2Uml^{-1})和IGF-1(40ng ml^{-1})的StemSpan SFEMII培养基中于37℃下培养。细胞用奥芬铵(100μM)处理45分钟。处理后,细胞用1%甲醛溶液在室温下轻轻摇动下交联15分钟。使用新制备的2.5M甘氨酸溶液在室温下使交联猝灭5分钟。使用细胞核溶解缓冲液溶解细胞,并且使用Bioruptor®2000(Diagenode)超声处理30分钟,3×10分钟循环,30秒开,30秒关。取少量样本(30μl)并使用蛋白酶K和核糖核酸酶A反向交联,在2%琼脂糖凝胶上运行以检查超声处理的片段大小。然后将超声处理的DNA与IgG对照(10μg,EMD微孔17-600)或CREB抗体(10μg,EMD微孔17-600)置于4℃下的试管旋转器上过夜。将DNA溶液与琼脂糖G珠在4℃下孵育4小时,使用DNA洗脱和纯化柱(活性基序)对免疫沉淀的DNA进行洗脱和纯化。

[0168] 使用TruSeq®ChIP-Seq样本制备试剂盒(Illumina)生成测序文库。简单地说,在修复末端后,连接接头并通过使用大小选择2%琼脂糖凝胶电泳系统(Invitrogen)收集250-300bp之间的DNA片段来纯化带有接头的DNA样本。使用PCR扩增试剂盒(Illumina)对纯化的DNA文库进行18个循环的扩增,并且使用AMPure XP磁珠(Beckman Coulter)进行纯化。使用Bioanalyzer™2100(安捷伦)中的高灵敏度DNA芯片验证测序文库的大小。序列读取使用Bowtie2与小鼠基因组(GRCm38,mm10)进行比对,并且根据它们的接头序列进行解复用。

MACS平台用于峰值调用。结合和表达靶标分析(BETA)如前所述进行(Wang等人,Nat Protoc,8,2502-2515(2013))。

[0169] RT-PCR

[0170] 对于RT-PCR,使用上标逆转录酶III(Invitrogen)进行逆转录。PCR使用SYBR® Green PCR主混合物(Life Technologies)和7900HT™实时PCR系统(Applied Biosystems)进行。引物序列为:Gapdh,正向引物,CATGGCCTTCCGTGTTCCTA(SEQ ID NO:1),反向引物,GCGGCACGTCAGATCCA(SEQ ID NO:2);Chrm4,正向引物,ATGGCGAACTTCACACCTGTC(SEQ ID NO:3),反向引物,CTGTCGCAATGAACACCATCT(SEQ ID NO:4);C-Kit,正向引物,GGCCTCACGAGTTCTATTTACG(SEQ ID NO:5),反向引物,GGGGAGAGATTTCCCATCACAC(SEQ ID NO:6);Zfp36l2,正向引物,AGCGGCTCCCAGATCAACT(SEQ ID NO:7),反向引物,CGAAAGCGAAGGCGTTGTTA(SEQ ID NO:8)。

[0171] 免疫荧光

[0172] 新鲜分离的BFU-E血清饥饿1小时,并且用DMSO或100μM奥芬铵处理45至60分钟。使用细胞离心涂片器(cytospin)在聚L-赖氨酸包被的载玻片上收集10^4个细胞。用2%多聚甲醛固定细胞15分钟,然后用0.1% Triton X-100渗透15分钟,用2% BSA溶液封闭30分钟。用在2%的BSA中的磷酸化CREB抗体(磷酸化S133,Abcam,ab32096,1:250)将细胞孵育1小时,然后与FITC结合的山羊抗小鼠二抗(Abcam,ab97022,1:500)和在2%的BSA溶液中的FITC结合的山羊抗兔二抗(Abcam,ab97050,1:500)孵育30分钟。然后用DAPI将细胞孵育5分钟,然后用固定液固定。

[0173] 质粒

[0174] 将以下寡核苷酸退火并克隆到经BbsI消化的MSCV-IRES-GFP载体中:Chrm4 shRNA1,aaaaTCTGATGAAGCCGACATTAAgtcgacTTAATGCTCGGCTTCATCAGA(SEQ ID NO:9);Chrm4 shRNA2,aaaaTCTGATGAAGCCGACATTAAgtcgacTTAATGCTCGGCTTCATCAGA(SEQ ID NO:10)。

[0175] 实施例-2

[0176] 本例描述了为研究其他小分子M4拮抗剂(诸如PCS1055和PD102807)是否促进BFU-E自我更新和纠正体内贫血而进行的实验。

[0177] 结果

[0178] 图4A显示了PD102807的化学结构。发现PD102807可增加细胞培养中BFU-E细胞的扩增(图4B)。此外,还发现PD102807在对小鼠施用时(PD102807为静脉注射或口服)可增加HCT和RBC的水平(分别见图4C和4D)。图4E显示了在使用放射性配体和具有受体的细胞膜的标准结合测定中,在1×10^{-9}M、1×10^{-8}M、1×10^{-7}M、1×10^{-6}M和1×10^{-5}M浓度下测试PD102807的结果。

[0179] 材料和方法

[0180] 小鼠BFU-E培养系统

[0181] 使用荧光活化细胞分选(FACS)方法从小鼠胚胎14.5天的胎肝中分离出BFU-E。BFU-E在含有rmSCF(100ng/ml)、EPO(2U/ml)、rmIGF-1(40ng/ml)、地塞米松(1nM)以及DMSO、PCS1055(5nM)或PD102807(3nM)的StemSpan SFEMII培养基中培养。在体外培养期间对形成的细胞数进行计数。

[0182] 贫血小鼠模型

[0183] 根据机构动物护理和使用委员会批准的程序,在冷泉港实验动物共享资源中进行动物实验。购自杰克逊实验室的4-6周龄C57bl/6小鼠随机分配到化合物治疗组和对照治疗组,通过口服递送PCS1055(50mg/kg或100mg/kg)每天两次或PD102807(50mg/kg或100mg/kg)每天一次,连续3天。第3天,小鼠腹腔注射60mg/kg PHZ。然后通过口服递送小鼠PD102807(50mg/kg或100mg/kg),每天一次,持续2天。在第6天,使用肝素化毛细管在含有K2-EDTA的采血管中逆行采集外周血样本。CBC使用Hemavet 950进行。

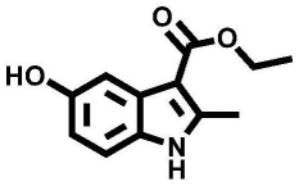
[0184] M4拮抗剂化合物的合成和分析

[0185] 合成并分析了一系列M4拮抗剂化合物,命名为化合物A-K。这些化合物的结构如图5所示。

[0186] 化合物A-K的合成

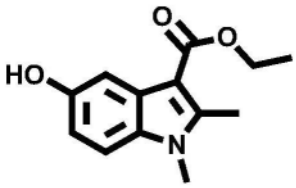
[0187] 除非另有说明,所有起始材料均直接从供应商处使用,无需进一步纯化。所有反应均在烘箱干燥的玻璃器皿中使用注射器和隔膜技术进行,在500或600MHz的机器上收集NMR光谱。记录相对于氘化溶剂峰或内标四甲基硅烷(TMS)峰在(δ0.00)的化学位移,并且以百万分之几(ppm)报告。根据^{1}H COSY确定选定核的分配。通过HPLC分析确定最终化合物的纯度。薄层色谱(TLC)在0.25mm厚的包衣硅胶铝板上进行。TLC板在短波和长波紫外光下观察,或在碘染色后观察,或在暴露于四水合钼酸铵(VI)和四水合硫酸铈(IV)溶液时通过加热板而显现。使用硅胶60(230-400目)进行快速柱色谱(FCC),并且采用逐步溶剂极性梯度,与TLC流动性相关。

[0188] 5-羟基-2-甲基吲哚-3-羧酸乙酯(吲哚1)

[0189] 

[0190] 通过使用冰水浴将反应温度控制在45℃以下,向1,4-苯醌(27g,0.25摩尔)的450mL冰乙酸溶液中分次加入3-氨基巴豆酸乙酯(16.2g,0.125摩尔)。反应混合物在室温下搅拌5小时。用乙酸和水洗涤沉淀固体,得到17g(62%)灰色结晶固体,用乙酸进一步洗涤得到白色固体,产率为55%。^{1}HNMR(600MHz,DMSOd_6)δ11.51(s,1H),8.82(s,1H),7.31(d,J=2.4Hz,1H),7.13(d,J=8.52Hz,1H),6.60(dd,J=2.4,8.6Hz,1H),4.24(q,J=7.08Hz,2H),2.59(s,3H),1.33(t,J=7.08Hz,3H);^{13}C NMR(150MHz,DMSOd_6)δ165.2,152.2,144.4,128.9,127.9,111.4,111.2,105.2,102.1,58.4,14.5,13.8。

[0191] 5-羟基-1,2-二甲基-1H-吲哚-3-羧酸乙酯(吲哚2)

[0192] 

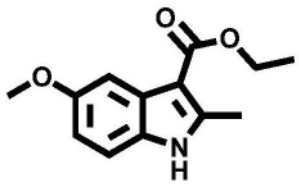
[0193] 向吲哚1(3.0g,13.76mmol)的无水DCM(100mL)溶液中加入咪唑(2.0g,28.9mmol)和TBDPS(3.7mL,14.45mmol)。反应混合物在室温下搅拌16小时。基于TLC的起始原料消失后,用5%盐酸溶液处理反应混合物。用盐水洗涤有机相,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下

蒸发,得到灰色固体,直接用于下一步,无需进一步纯化。

[0194] 向上述硅烷化衍生物(3.2g,7.0mmol)的无水DMF(10mL)溶液中加入NaH(60%分散在油中)(440mg,10.5mmol)和MeI(0.7mL,10.5mmol)。反应混合物在0℃下搅拌,并且逐渐升温至室温(RT)1小时,以完全消耗基于TLC的起始材料。然后用冰水处理反应混合物,并且用EtOAc(25mL x 4)萃取,合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,真空蒸发,得到不经纯化进入下一步的粗物质。

[0195] 向上述制备的甲基化衍生物(3.0g,6.4mmol)的无水THF(20mL)溶液中加入1M TBAF(9.5mL,9.55mmol)溶液。反应混合物在室温下搅拌2小时或直到起始材料消失。将反应混合物与5% HCl溶液混合,并且用EtOAc(25mL x 3)萃取水层,合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并真空蒸发。使用快速色谱法纯化粗物质,经过3步得到白色固体,产率为55%。^{1}HNMR(600MHz,$Acetoned_6$)δ7.87(s,1H),7.56(d,J=2.28Hz,1H),7.24(d,J=8.7Hz,1H),6.76(dd,J=2.46,8.7Hz,1H),4.30(q,J=7.14Hz,1H),3.71(s,3H),2.72(s,3H),1.38(t,J=7.14Hz,3H);^{13}C NMR(150MHz,$Acetond_6$)δ166.3,153.8,146.2,132.4,128.7,112.2,112.1,110.8,107.0,106.9,103.7,59.5,15.1,12.0。

[0196] 5-甲氧基-2-甲基-1H-吲哚-3-羧酸乙酯(吲哚3)

[0197] 

[0198] 向吲哚1(3.0g,13.76mmol)的无水DCM(100mL)溶液中加入咪唑(2.0g,28.9mmol)和TBDPS(3.7mL,14.45mmol)。基于TLC的起始材料消失后,反应混合物在室温下搅拌16小时。然后用5%盐酸溶液处理反应混合物。用盐水洗涤有机相,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发,得到灰色固体,直接用于下一步,无需进一步纯化。

[0199] 向上述甲硅烷基化吲哚(3.1g,6.8mmol)的无水THF(60mL)溶液中加入二碳酸二叔丁酯(3.0g,13.6mmol)和DMAP(85mg,0.68mmol),将反应混合物加热至50℃并持续搅拌1小时。然后将反应混合物与水混合,并且用EtOAc(25mL x 3)萃取。合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发。使用EtOAc/己烷进行快速色谱后,收集N-Boc保护的吲哚作为白色固体(3.22g,85%)。

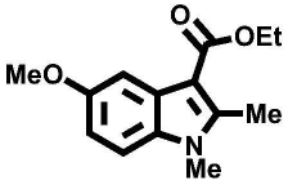
[0200] 向上述制备的N-boc保护的吲哚(3.0g,5.4mmol)的无水THF(15mL)溶液中加入1M TBAF(8.1mL,8.1mmol)溶液。反应混合物在室温下搅拌2小时或直到起始材料消失。将反应混合物与5% HCl溶液混合,并且用EtOAc(25mL x 3)萃取水层,合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发。用快速色谱法纯化粗品,得到1.45g白色固体,产率为84.2%。

[0201] 向上述5-羟基吲哚衍生物(1.0g,3.1mmol)的无水DMF(10mL)溶液中加入NaH(60%分散在油中)(190mg,4.7mmol)和MeI(0.3mL,4.7mmol)。反应混合物在0℃下搅拌,并且在1小时内逐渐升温至室温,以完全消耗基于TLC的起始材料。然后用冰水处理反应混合物,并且用EtOAc(25mL x 4)萃取,合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发,得到粗物质,然后使用EtOAc/己烷通过快速色谱纯化,得到(922mg,89%产率)。

[0202] 上述制备的5-甲氧基吲哚衍生物(900mg,2.8mmol)用4M盐酸的二氧六环(8mL)溶

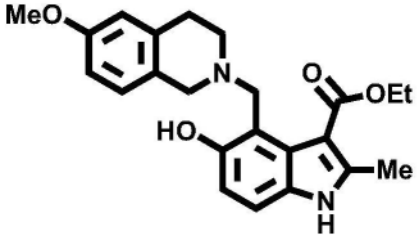
液处理,并且加热至100℃达2小时。在真空下蒸发挥发物后,使用EtOAc/已烷对粗物质进行快速色谱纯化,得到白色固体(340mg,52%)或在五个步骤中30%的产率。^{1}HNMR(600MHz,Acetoned$_6$)δ10.61(bs,1H),7.60(d,J=2.6Hz,1H),7.25(d,J=8.4,1H),6.77(dd,J=2.5,8.7Hz,1H),4.33(q,J=7.14Hz,2H),3.81(s,3H),2.69(s,3H),1.40(t,J=7.08Hz,3H);^{13}C NMR(150MHz,Acetond$_6$)δ166.3,156.4,145.4,131.0,129.3,112.4,112.3,104.7,104.2,59.6,55.8,15.0,14.3。

[0203] 5-甲氧基-1,2-二甲基-1H-吲哚-3-羧酸乙酯(吲哚4)。

[0204] 

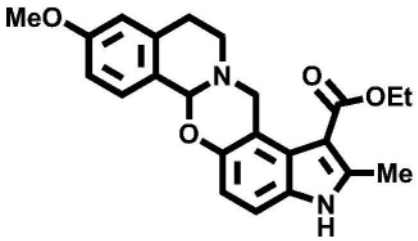
[0205] 向吲哚1(440mg,2.0mmol)的无水DMF(10mL)溶液中加入NaH(60%分散在油中)(160mg,4.0mmol)和MeI(570μL,10mmol)。反应混合物在0℃下搅拌,并且逐渐升温至室温,持续30分钟,在此温度下,基于TLC观察起始材料的完全消耗。然后用冰水处理反应混合物,并且用EtOAc(25mLX 4)萃取,合并的有机层用盐水洗涤,经Na$_2$SO$_4$干燥,过滤,并且在真空下蒸发,得到粗物质,使用FCC和EtOAc/已烷纯化,得到380mg,77%的甲基化吲哚4。^{1}HNMR(600MHz,Acetoned$_6$)δ7.62(d,J=2.6Hz,1H),7.30(d,J=8.8,1H),6.82(dd,J=2.6,8.9Hz,1H),4.32(q,J=7.1Hz,2H),3.82(s,3H),3.72(s,3H),2.72(s,3H),1.41(t,J=7.14Hz,3H);^{13}C NMR(150MHz,Acetond$_6$)δ166.3,156.6,146.3,132.7,128.5,112.0,111.0,104.5,104.1,59.6,55.8,15.0,12.1。

[0206] 5-羟基-4-((6-甲氧基-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-2-甲基-1H-吲哚-3-羧酸乙酯(吲哚衍生物5)。

[0207] 

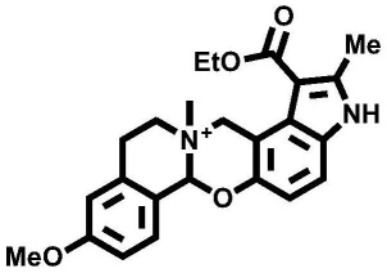
[0208] 向吲哚1(30mg,0.135mmol)的冰醋酸/水溶液5:1(250μL)的溶液中加入6-甲氧基-四氢异喹啉(20mg,0.12mmol)和福尔马林37%溶液(12μL,0.12mmol)。将反应混合物在90℃下搅拌30分钟,在此温度下,基于TLC观察起始材料的完全消耗,然后在真空下蒸发反应混合物以去除乙酸。将所得粗物质溶解在EtOAc(5mL)中,并且用饱和NaHCO$_3$和盐水冲洗有机层。有机层经Na$_2$SO$_4$干燥,过滤并蒸发,所得粗产物使用80%的EtOAc/已烷进行FCC,得到(27mg,58%)标题化合物。^{1}HNMR(600MHz,CDCl$_3$)δ8.27(bs,1H),7.09(d,J=8.6Hz,1H),6.90(d,J=8.5,1H),6.76(d,J=8.6Hz,1H),6.68(dd,J=2.6,8.4Hz,1H),6.62(d,J=2.6Hz,1H),4.45(s,2H),4.33(q,J=4.3Hz,2H),3.75(m,5H),2.91(bs,3H),2.59(s,3H),1.38(t,J=7.14Hz,3H);^{13}C NMR(150MHz,CDCl$_3$)δ166.6,158.4,154.7,143.0,135.1,129.5,127.8,126.2,126.1,113.7,113.4,112.5,111.8,110.7,105.7,60.1,58.2,55.5,54.9,50.1,29.9,29.5,15.4,14.8,14.3。

[0209] 9-甲氧基-2-甲基-3,6a,11,14-四氢-12H-吲哚[4',5':5,6][1,3]恶嗪并[2,3-a]异喹啉-1-羧酸乙酯(衍生物6)

[0210] 

[0211] 向吲哚衍生物5(2.2g,5.6mmol)的无水乙醇(12.0mL)溶液中加入乙酸钾(602mg,6.14mmol)和溶解在2.0mL乙醇中的碘(1.42g,5.6mmol)。在回流温度下滴加碘溶液。添加完成后,反应混合物在相同温度下再搅拌30分钟,并且通过饱和硫代硫酸钠溶液处理使反应停止,直到碘颜色消失。然后用5% MeOH/EtOAc(25mL x 4)萃取反应混合物。用饱和$NaHCO_3$盐水洗涤有机层,经Na_2SO_4干燥,过滤并蒸发,所得粗产物使用5% MEOH/EtOAc进行FCC,得到1.45g(6%)标题化合物。^{1}HNMR(600MHz,$DMSOd_6$)δ11.63(s,1H),7.30(d,J=8.5Hz,1H),7.10(d,J=8.6Hz,1H),6.82(dd,J=2.6,8.5,1H),6.76(d,J=2.5Hz,1H),6.55(d,J=8.6Hz,1H),5.64(s,1H),4.70(d J=17.6Hz,1H),4.24(m,3H),3.76(s,3H),3.32(m,5H),3.08-2.93(m,2H),2.80-2.72(m,2H),2.55(s,3H),1.33(t,J=7.14Hz,3H);^{13}C NMR(150MHz,$DMSOd_6$)δ165.0,159.1,148.4,143.4,136.3,129.6,129.3,126.3,123.9,112.7,112.1,112.0,110.4,110.1,104.1,85.0,58.9,55.0,53.5,43.6,28.7,14.4。

[0212] 化合物A和B:1-(乙氧羰基)-9-甲氧基-2,13-二甲基-3,6a,11,12,13,14-六氢吲哚[4',5':5,6][1,3]恶嗪并[2,3-a]异喹啉-13-鎓碘化物。

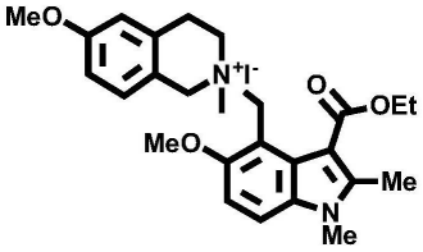
[0213] 

[0214] 向吲哚恶嗪并异喹啉衍生物6(580mg,1.48mmol)的工业级丙酮(10mL)溶液中加入MeI(420μL,7.4mmol),反应混合物在室温下搅拌16小时。然后在真空下完全蒸发有机溶剂,并且使用15%的DMF和85%的$CHCl_3$对原料进行FCC,以2:1的比例得到两种非对映异构体(A和B)(对于低极性材料为260mg,而对于高极性材料为409mg,总收率为85%)。为低极性衍生物(化合物A)列出的^{1}HNMR(600MHz,$DMSOd_6$)δ12.16(s,1H),7.64(d,J=8.7Hz,1H),7.47(d,J=8.8Hz,1H),7.13(d,J=8.7Hz,1H),7.07(dd,J=2.5,8.7Hz,1H),6.99(d,J=2.3Hz,1H),6.51(s,1H),5.28(q,J=16.3Hz,1H),4.29-4.27(m,2H),4.19(dd,J=6.0,12.5Hz,1H),4.04(dt,J=5.2,12.8Hz,1H),3.83(s,1H),3.40-3.37(m,1H),3.21(dd,J=5.3,19.0Hz,1H),2.87(s,3H),2.64(s,3H),1.39(t,J=7.14Hz,3H);为低极性列出的^{13}C NMR(150MHz,$DMSOd_6$)δ164.7,160.1,145.5,145.2,133.0,131.5,127.7,123.2,118.9,114.1,113.2,112.9,112.3,105.7,104.2,89.4,62.9,59.6,57.4,55.4,37.9,23.0,14.7,14.3。

[0215] 为极性衍生物化合物B列出的^{1}HNMR(600MHz,$DMSOd_6$)δ12.10(s,1H),7.43(d,J=8.8Hz,1H),7.38(d,J=8.8Hz,1H),6.99-6.94(m,3H),6.42(s,1H),5.24(q,J=16.9Hz,

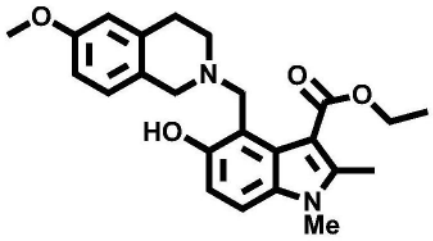
1H),4.30(m,2H),3.90(m,2H),3.79(s,3H),3.32(m,2H),3.23(s,3H),2.61(s,3H),1.36(t,J＝7.14Hz,3H);为极性衍生物列出的^{13}C NMR(150MHz,DMSOd_6)δ164.7,160.8,145.3,143.1,133.0,131.3,129.6,122.7,119.4,113.8,113.5,112.9,112.2,104.9,104.1,87.7,59.6,55.4,51.8,47.6,45.7,23.0,14.6,14.3。

[0216] 化合物G:2-((3-(乙氧羰基)-5-甲氧基-1,2-二甲基-1H-吲哚-4-基)甲基)-6-甲氧基-2-甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉-2-鎓碘化物

[0217] 

[0218] 向吲哚衍生物5(394mg,1.0mmol)的无水DMF(5.0mL)溶液中加入NaH(60％分散在油中)(120mg,3.0mmol)和MeI(200μL,3.0mmol)。反应混合物在0℃下搅拌,并且逐渐升温至室温30分钟,在此温度下,基于TLC观察起始材料的完全消耗。然后用冰水处理反应混合物,并且用EtOAc(25mL x 4)萃取,合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发,得到粗物质,使用FCC和20％MeOH/1％Et3N/DCM溶液纯化,得到336.5mg,60％甲基化吲哚8。^{1}HNMR(600MHz,Acetoned_6)δ7.79(d,J＝9.0Hz,1H),7.24(d,J＝9.0Hz,1H),7.15(d,J＝9.3Hz,1H),6.91(m,2H),4.65(ABq,J＝14.9Hz,δ＝0.17,2H),4.13(m,2H),3.94(m,4H),3.87(s,3H),3.81(s,3H),3.34(m,2H),3.04(s,3H),2.81(s,2H),2.78(s,3H),1.41(t,J＝7.14Hz,1H);^{13}C NMR(150MHz,Acetoned_6)δ167.6,160.7,156.9,149.1,134.0,132.1,129.6,129.5,120.5,114.9,114.7,114.0,108.6,107.6,105.5,62.3,61.3,59.1,57.2,55.8,30.9,25.1,14.8,14.0。

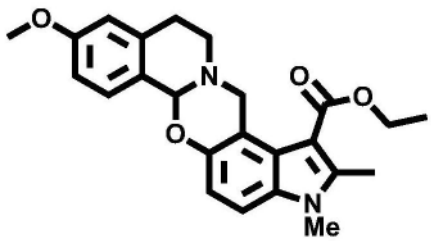
[0219] 化合物D:5-羟基-4-((6-甲氧基-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-1,2-二甲基-1H-吲哚-3-羧酸乙酯

[0220] 

[0221] 向吲哚衍生物2(2.1g,9.0mmol)的冰醋酸/水溶液5:1(11mL)溶液中加入6-甲氧基-四氢异喹啉(1.83g,9.23mmol)和福尔马林37％溶液(766μL,9.45mmol)。反应混合物在90℃下搅拌30分钟,在此温度下,基于TLC观察起始材料的完全消耗。然后在真空下蒸发反应混合物以除去乙酸。将所得粗物质溶解在EtOAc(5mL)中,并且用饱和$NaHCO_3$和盐水冲洗有机层。有机层经Na_2SO_4干燥,过滤并蒸发,所得粗产物使用80％的EtOAc/己烷进行FCC,得到2.2g(63％)标题化合物。^{1}HNMR(600MHz,Acetoned_6)δ11.34(bs,1H),7.21(d,J＝8.7Hz,1H),6.95(d,J＝8.9Hz,1H),6.71-6.68(m,3H),4.34(s,2H),4.30(q,J＝7.1Hz,2H),3.75(s,3H),5.70(m,5H),2.90-2.84(m,5H),2.60(s,3H),1.36(t,J＝7.14Hz,3H);^{13}C NMR(150MHz,Acetoned_6)δ167.0,159.3,155.2,144.1,135.8,132.4,128.4,127.0,126.1,

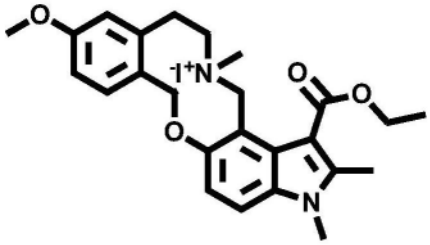
113.9,113.4,113.2,112.0,110.1,105.6,60.2,58.8,55.5,55.4,50.8,15.0,12.3。

[0222] 化合物C:9-甲氧基-2,3-二甲基-3,6a,11,14-四氢-12H-吲哚[4',5':5,6][1,3]恶嗪并[2,3-a]异喹啉-1-羧酸乙酯

[0223] 

[0224] 向化合物D的无水乙醇溶液中加入乙酸钾和溶解在2.0mL乙醇中的碘。在回流温度下滴加碘溶液。添加完成后,反应混合物在相同温度下再搅拌30分钟,用饱和硫代硫酸钠溶液处理使反应停止,直到碘颜色消失,然后用5% MeOH/EtOAc(5mL x 4)萃取反应混合物。用饱和$NaHCO_3$洗涤有机层,然后经Na_2SO_4干燥,过滤并蒸发。使用5%的MEOH/EtOAc对所得粗产物进行FCC,得到标题化合物。^{1}HNMR(600MHz,$DMSOd_6$)δ7.31(d,J=8.5Hz,1H),7.27(d,J=8.8Hz,1H),6.82(dd,J=2.6,8.4,1H),6.75(d,J=2.5Hz,1H),6.62(d,J=8.6Hz,1H),5.68(s,1H),4.40(ABq,J=17.5Hz,δ=0.52,2H),4.27(q,J=7.1Hz,2H),3.76(s,3H),3.66(s,3H),3.03(m,1H),2.95(m,1H),2.79-2.70(m,2H),2.60(s,3H),1.33(t,J=7.14Hz,3H);^{13}C NMR(150MHz,$DMSOd_6$)δ165.2,159.1,148.7,143.8,136.3,131.2,129.4,126.2,123.1,112.8,112.0,109.9,109.3,104.1,85.1,59.3,55.1,53.4,43.5,29.8,28.7,14.4,12.1。

[0225] 化合物H&I:1-(乙氧羰基)-9-甲氧基-2,3,13-三甲基-3,6a,11,12,13,14-六氢吲哚[4',5':5,6][1,3]恶嗪并[2,3-a]异喹啉-13-鎓碘化物。

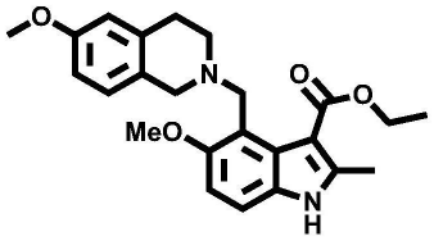
[0226] 

[0227] 向化合物C的工业级丙酮溶液中加入MeI,并且反应混合物在室温下搅拌16小时。然后在真空下完全蒸发有机溶剂,并且使用15%DMF和85% $CHCl_3$对原料进行FCC,以2:1的比例得到两种非对映异构体。为低极性衍生物(化合物H)列出^{1}HNMR(600MHz,$DMSOd_6$)δ7.68(d,J=8.9Hz,1H),7.64(d,J=6.7Hz,1H),7.20(d,J=8.9Hz,1H),7.07(dd,J=2.5,8.6Hz,1H),6.98(d,J=2.4Hz,1H),6.53(s,1H),5.23(ABq,J=16.1Hz,Δδ=0.13,2H),4.39-4.27(m,2H),4.16(dd,J=5.9,12.5Hz,1H),4.03(dt,J=5.0,12.7Hz,1H),3.82(s,3H),3.78(s,3H),3.41-3.32(m,1H),3.20(dd,J=5.2,18.4Hz,1H),2.89(s,3H),2.69(s,3H),1.39(t,J=7.14Hz,3H);为低极性列出^{13}C NMR(150MHz,$DMSOd_6$)δ164.7,160.2,146.0,145.5,133.1,133.0,127.8,122.4,118.9,114.2,113.2,112.2,111.9,105.6,104.1,89.4,62.8,59.9,57.5,55.5,37.9,30.3,23.0,14.4,12.4。

[0228] 为极性衍生物(化合物I)列出^{1}HNMR(600MHz,$DMSOd_6$)δ7.60(d,J=8.9Hz,1H),7.44(d,J=8.6Hz,1H),7.01(d,J=8.9Hz,1H),6.98(d,J=2.3Hz,1H),6.95(dd,J=2.6,8.5Hz,1H),6.44(s,1H),5.19(q,J=16.8Hz,1H),4.36-4.27(m,2H),3.86(t,J=6.9Hz,2H),3.79

(s,3H),3.74(s,3H),3.33(m,2H),3.22(s,3H),2.66(s,3H),1.36(t,J＝7.14Hz,3H);为极性衍生物列出^{13}C NMR(150MHz,DMSOd_6)δ164.7,160.8,145.8,143.3,133.0,132.8,129.7,121.9,119.4,113.9,113.6,112.2,111.9,104.8,104.0,87.7,59.8,55.4,47.6,30.2,23.1,14.3,12.3。

[0229] 化合物E:5-甲氧基-4-((6-甲氧基-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-2-甲基-1H-吲哚-3-羧酸乙酯(20180705-A688Y)

[0230] 

[0231] 向吲哚1(3.0g,13.76mmol)的无水DCM(100mL)溶液中加入咪唑(2.0g,28.9mmol)和TBDPS(3.7mL,14.45mmol)。反应混合物在室温下搅拌16小时。基于TLC的起始原料消失后,用5%盐酸溶液处理反应混合物。用盐水洗涤有机相,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发,得到灰色固体,直接用于下一步,无需进一步纯化。

[0232] 向上述甲硅烷基化吲哚(3.1g,6.8mmol)的无水THF(60mL)溶液中加入二碳酸二叔丁酯(3.0g,13.6mmol)和DMAP(85mg,0.68mmol)。将反应混合物加热至50℃并持续搅拌1小时。然后将反应混合物与水混合,并且用EtOAc(25mL x 3)萃取。合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发。使用EtOAc/己烷进行快速色谱后,收集N-Boc保护的吲哚作为白色固体(3.22g,85%)。

[0233] 向上述制备的N-boc保护的吲哚(3.0g,5.4mmol)的无水THF(15mL)溶液中加入1M TBAF(8.1mL,8.1mmol)溶液。反应混合物在室温下搅拌2小时或直到起始材料消失。将反应混合物与5% HCl溶液混合,并且用EtOAc(25mL x 3)萃取水层,合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发。使用快速色谱法纯化粗物质,得到白色固体(1.45g,84.2%产率)。

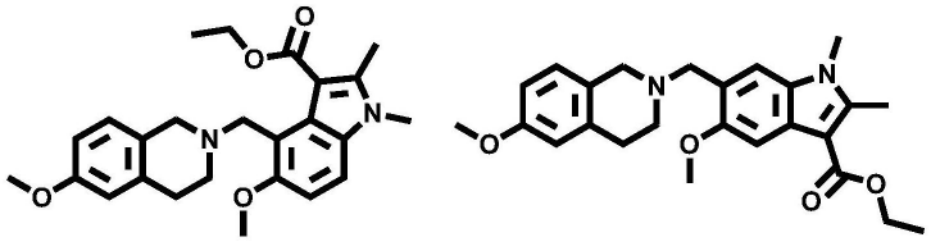
[0234] 向来自前一步骤中的吲哚衍生物(319.0mg,1.0mmol)的冰醋酸/水溶液5:1(1.33mL)溶液中加入6-甲氧基-四氢异喹啉HCl盐(198g,1.0mmol)和福尔马林37%溶液(81μL,1.0mmol)。反应混合物在90℃下搅拌30分钟,在此温度下,基于TLC观察起始材料的完全消耗。然后在真空下蒸发反应混合物以除去乙酸。将所得粗物质溶解在EtOAc(5mL)中,并且用饱和$NaHCO_3$和盐水冲洗有机层。有机层经Na_2SO_4干燥,过滤并蒸发。使用80%乙醇酸/己烷对所得粗产物进行FCC,得到316mg(64%)。

[0235] 向上述所得5-羟基吲哚衍生物(135mg,0.27mmol)的无水DMF(2.0mL)溶液中加入NaH(60%分散在油中;11.0mg,0.27mmol)和MeI(17.5μL,0.27mmol)。反应混合物在0℃下搅拌,并且在1小时内逐渐升温至室温,在此温度下,基于TLC观察到起始材料的完全消耗。然后用冰水处理反应混合物,并且用EtOAc(5mL x 4)萃取,合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发,得到粗物质,通过使用EtOAc/己烷的快速色谱纯化得到(98mg,71%产率)。

[0236] 向上述制备的5-甲氧基吲哚衍生物溶液(80mg,0.16mmol)中加入4M盐酸二恶烷溶液(4.0mL),并且将溶液加热至100℃达2小时。在真空下蒸发挥发物后,使用EtOAc/己烷对

粗物质进行快速色谱纯化,得到白色固体(45mg,69.0%)。^{1}HNMR(600MHz,Acetoned$_6$)δ7.23(d,J=8.8Hz,1H),6.93(d,J=8.8Hz,1H),6.82(d,J=8.4Hz,1H),6.61(dd,J=2.6,8.8Hz,1H),6.57(d,J=2.5Hz,1H),4.16(s,2H),4.09(q,J=7.1Hz,2H),3.83(s,3H),3.70(s,3H),3.39(s,2H),2.82(s,2H),2.63(t,J=5.8Hz,2H),2.50(m,5H),1.16(t,J=7.1Hz,3H);为极性衍生物列出^{13}C NMR(150MHz,DMSOd$_6$)δ 166.5,158.8,154.3,137.0,132.4,129.0,128.0,127.6,113.8,112.5,111.0,109.8,109.1,60.1,58.2,55.7,55.4,52.4,50.5,30.7,14.8,13.8。

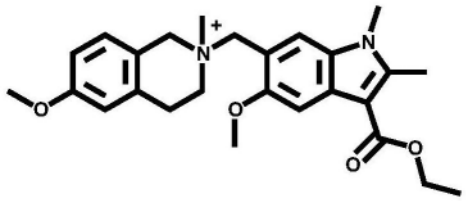
[0237] 化合物F和J:

[0238] 

F J

[0239] 向上述所得5-羟基吲哚衍生物(40.0mg,0.1mmol)的无水DMF(1.0mL)溶液中加入NaH(60%分散在油中;4.0mg,0.1mmol)和MeI(14.0μL,0.1mmol)。反应混合物在0℃下搅拌,并且在1小时内逐渐升温至室温,在此温度下,基于TLC观察到起始材料的完全消耗。然后用冰水处理反应混合物,并且用EtOAc(2.0mL X 4)萃取,合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发,得到粗物质,使用EtOAc/己烷通过快速色谱纯化,得到19.0mg(37%产率)。

[0240] 化合物K:

[0241] 

[0242] 化合物的合成如下:向化合物J的溶液中加入NaH(60%分散在油中;11.0mg,0.27mmol)和MeI(17.5μL,0.27mmol)。反应混合物在0℃下搅拌,并且在1小时内逐渐升温至室温,在此温度下,基于TLC观察到起始材料的完全消耗。然后用冰水处理反应混合物并用EtOAc萃取,合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并且在真空下蒸发以得到粗物质,其通过使用EtOAc/己烷的快速色谱纯化。

[0243] 结合分析结果

[0244] 图6显示了受体CHRM1-5(M1-M5)上PD102807和化合物A-K的受体结合分析结果。在含有放射配体和带有受体的细胞膜的标准结合试验中测试了浓度为1×10^{-9}M、1×10^{-8}M、1×10^{-7}M、1×10^{-6}M和1×10^{-5}M的PD102807和化合物A-K。化合物结合被计算为放射性标记的配体对每个靶标的特异性结合的抑制百分比,并且测定Ki值。Ki值见下表1。对于CHRM1,使用[^{3}H]哌仑西平(2nM)作为放射性配体和具有人重组CHRM1受体的CHO细胞膜进行结合测定。室温下孵育时间为60分钟。对于CHRM2,使用[^{3}H]AF-DX 384(2nM)作为放射配体和具有

人重组CHRM2受体的CHO细胞膜进行结合测定。在室温下孵育时间也为60分钟。对于CHRM3，使用[^{3}H]4-DAMP(0.2nM)作为放射配体和具有人重组CHRM3受体的CHO细胞膜进行结合测定。在室温下孵育时间也为60分钟。对于CHRM4，使用[^{3}H]4-DAMP(0.2nM)作为放射配体和具有人重组CHRM4受体的CHO细胞膜进行结合测定。在室温下孵育时间也为60分钟。对于CHRM5，使用[^{3}H]4-DAMP(0.3nM)作为放射配体和具有人重组CHRM5受体的CHO细胞的膜进行结合测定。在室温下孵育时间也为60分钟。

[0245] 表1.各种化合物的Ki值

[0246]

	M4	M3	M1	M2	M5
A	1.8E-06	*	5.2E-06	2.2E-06	3.5E-06
B	4.3E-06	*	6.6E-06	*	*
C	4.6E-09	6.0E-07	5.2E-06	8.5E-07	*
D	4.2E-08	7.4E-07	2.8E-07	5.9E-08	*
E	1.5E-06	*	8.5E-06	2.6E-06	*
F	9.5E-07	3.9E-06	*	3.9E-06	*
G	1.5E-06	4.0E-07	4.4E-06	7.6E-07	*
I	7.4E-07	*	8.5E-06	1.7E-06	1.0E-05
J	8.9E-09	1.7E-06	1.3E-06	7.5E-07	*
K	5.4E-08	4.0E-07	5.4E-08	1.0E-07	9.8E-07
PD	5.1E-09	2.1E-07	*	2.5E-06	*

[0247] 值为Ki(M)

[0248] *代表没有结合

[0249] 图7和8显示了原代BFU-E培养试验的结果。图7显示了化合物A、B、C、H和I的结果，而图8显示了化合物D、E、F、G、J和K的结果。图7和8中的数据证明了PD102807和化合物A-K诱导BFU-E扩增。使用荧光活化细胞分选(FACS)方法，将高度纯化的BFU-E分离为lin-Ter-119-CD16/CD32-Sca-1-CD41-c-Kit+CD71/Cd24a$^{10\%低}$群体。BFU-E在含有rmSCF、EPO和rmIGF-1的培养基中，在指定浓度的PD102807或化合物A-K存在下培养。显示第9天培养系统中的细胞数；在用化合物A-K处理的培养物中，细胞扩增倍数显著高于未处理的培养物。

[0250] 图9显示了PD102807和化合物A和B的药代动力学图谱(血浆)和脑渗透测定。浓度(上面板)和浓度比(血浆/脑)(下面板)如图9所示。图9中的数据表明，与PD102807相比，化合物A和B显示出降低的脑渗透。将PD102807和化合物A和B腹腔注射到小鼠体内。在每个时间点采集血液，并且将含有抗凝剂的转移管离心以获得血浆。在每个时间点采集脑样本，然后在液氮中快速冷冻，并且保持在-75±15℃。脑样本均化。使用LC-MS/MS方法分析血浆和脑样本中PD102807和化合物A和B的浓度。

[0251] 图10显示了化合物在体内贫血动物模型疗效测定中的结果，并且证明化合物A和B在体内治疗贫血。C57bl/6小鼠注射60mg/kg苯肼诱导溶血。给小鼠注射溶媒对照品或化合物A或B(30mg/kg或100mg/kg)。使用肝素化毛细管将外周血样本逆向收集到带有K2-EDTA的采血管中。使用Hemavet 950进行全血计数。显示了红细胞比容(HCT)、红细胞(RBC)和血红蛋白(Hb)值。

[0252] 图11显示了化合物在体内贫血动物模型疗效测定中的结果，并且证明化合物B和I

在体内治疗贫血。C57bl/6小鼠注射60mg/kg苯肼诱导溶血。给小鼠皮下注射溶媒对照品或化合物B(1.5mg/kg、3mg/kg或5mg/kg)或I(0.5mg/kg、0.7mg/kg或1mg/kg)。使用肝素化毛细管将外周血样本逆向收集到带有K2-EDTA的采血管中。使用Hemavet 950进行全血计数。显示了红细胞比容(HCT)、红细胞(RBC)和血红蛋白(Hb)值。

[0253] 图12显示了化合物G的药代动力学图谱(血浆)和脑渗透测定。浓度(上面板)和浓度比(血浆/脑)(下面板)显示在图12中。图12中的数据表明,与PD102807相比,化合物G的脑渗透性降低。将化合物G腹腔注射到小鼠体内。在每个时间点采集血液,并且将含有抗凝剂的转移管离心以获得血浆。在每个时间点采集脑样本,然后在液氮中快速冷冻,并且保持在-75±15℃。脑样本均化。使用LC-MS/MS方法分析血浆和脑样本中化合物G的浓度。

[0254] 尽管已示出并描述了目前被认为是本发明的优选实施方式,但本领域技术人员可进行各种更改和修改,这些更改和修改仍在所附权利要求书定义的本发明的范围内。

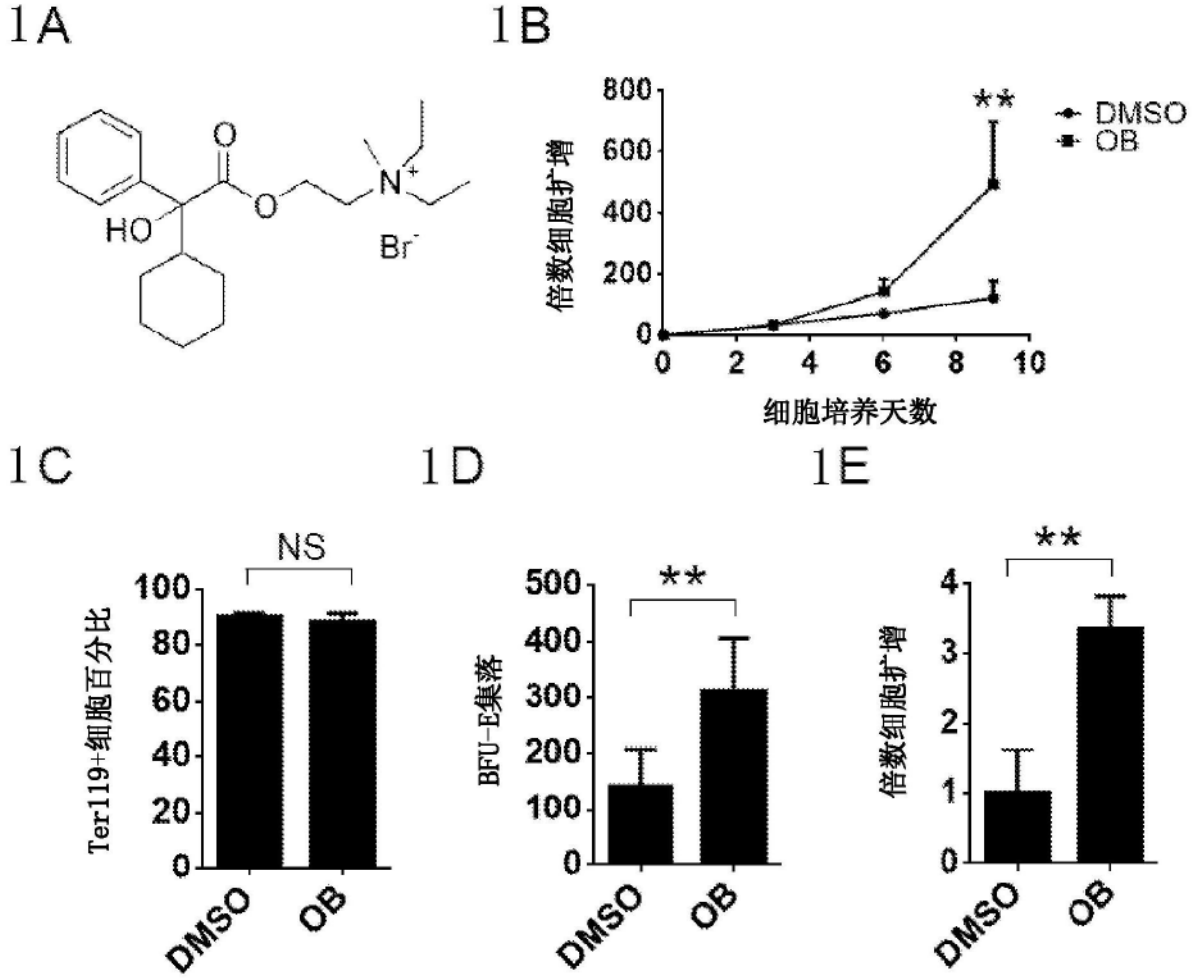

1A
1B
HO
O
O
N+
Br-
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
**
DMSO
OB
倍数细胞扩增
细胞培养天数
1C
1D
1E
NS
Ter119+细胞百分比
100
80
60
40
20
0
DMSO
OB
**
BFU-E集落
500
400
300
200
100
0
DMSO
OB
**
倍数细胞扩增
4
3
2
1
0
DMSO
OB

图1A-1E

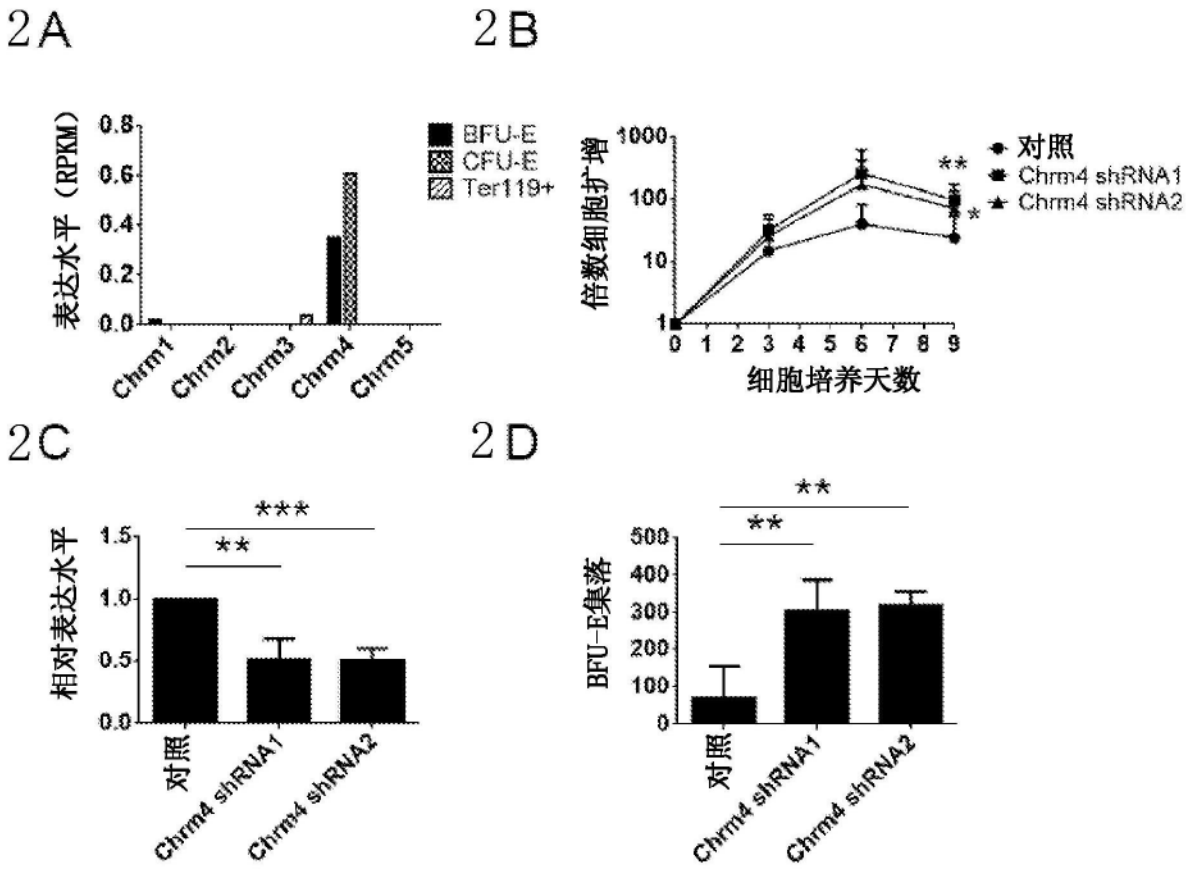

2A
表达水平（RPKM）
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
BFU-E
CFU-E
Ter119+
Chrm1
Chrm2
Chrm3
Chrm4
Chrm5
2B
倍数细胞扩增
1000
100
10
1
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
细胞培养天数
**
*
对照
Chrm4 shRNA1
Chrm4 shRNA2
2C
相对表达水平
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
对照
Chrm4 shRNA1
Chrm4 shRNA2
2D
BFU-E集落
500
400
300
200
100
0
**
**
对照
Chrm4 shRNA1
Chrm4 shRNA2

图2A-2D

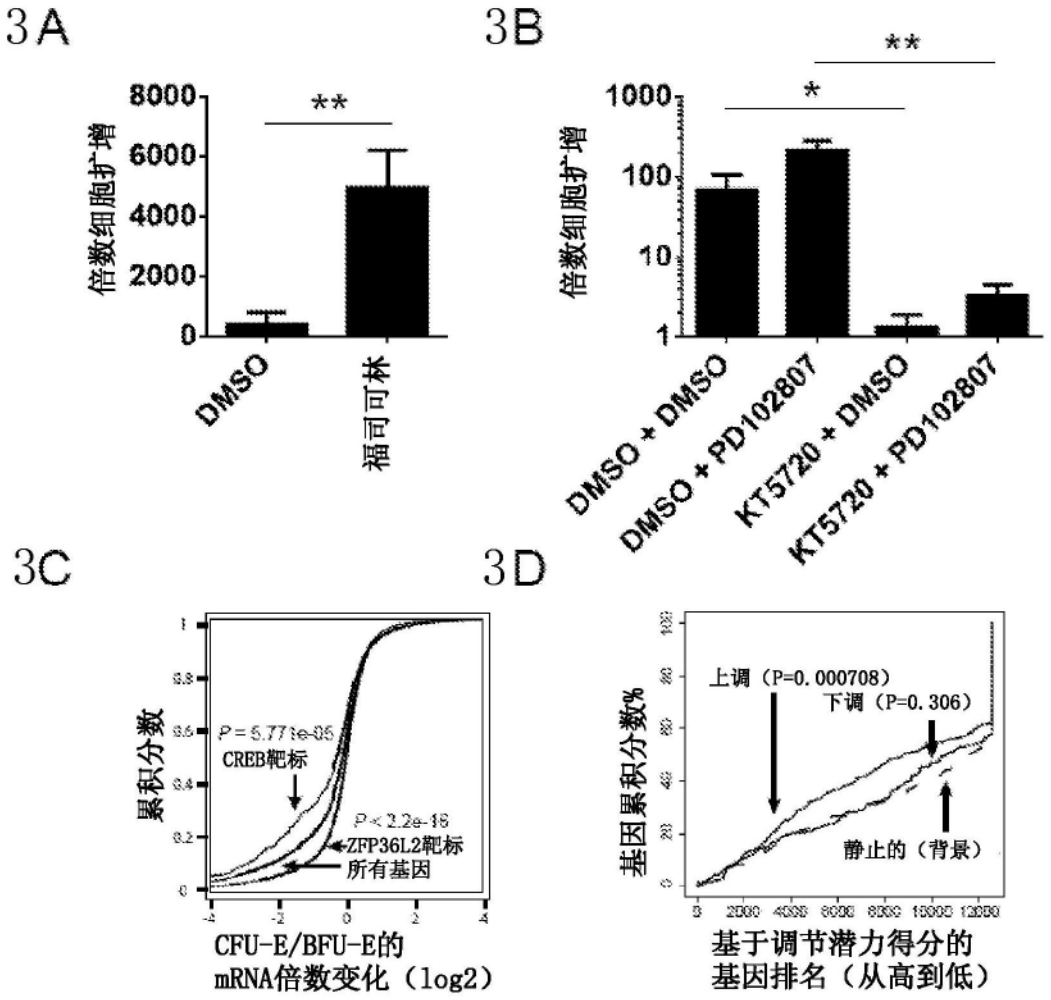

3A
倍数细胞扩增
8000
6000
4000
2000
0
**
DMSO
福可可林
3B
倍数细胞扩增
1000
100
10
1
*
**
DMSO + DMSO
DMSO + PD102807
KT5720 + DMSO
KT5720 + PD102807
3C
累积分数
P = 5.77 1e-05
CREB靶标
P < 2.2e-16
ZFP36L2靶标
所有基因
CFU-E/BFU-E的
mRNA倍数变化（log2）
3D
基因累积分数%
上调（P=0.000708）
下调（P=0.306）
静止的（背景）
基于调节潜力得分的
基因排名（从高到低）

图3A-3D

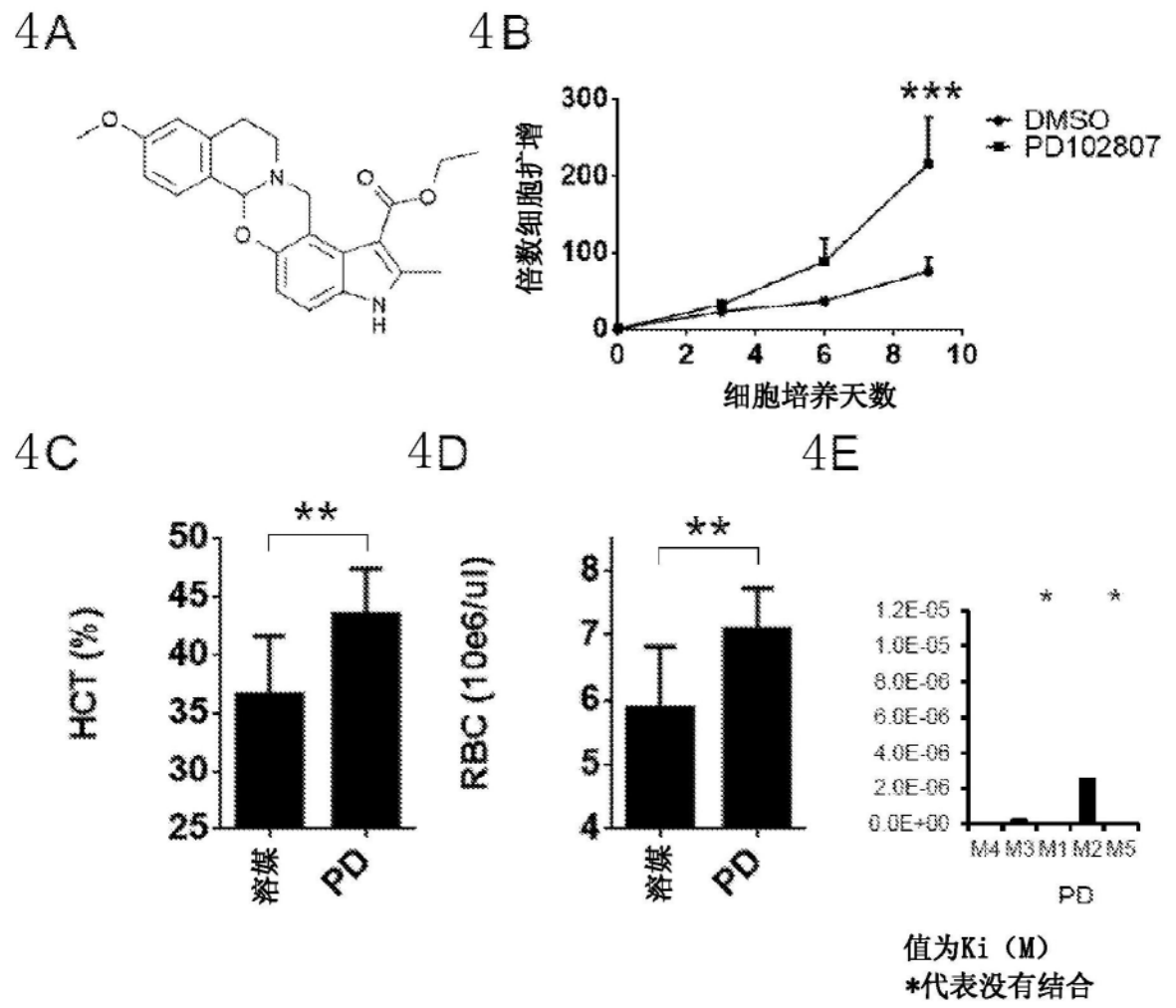

4A
4B
***
DMSO
PD102807
倍数细胞扩增
300
200
100
0
0 2 4 6 8 10
细胞培养天数
4C
4D
4E
**
HCT (%)
50
45
40
35
30
25
溶媒
PD
**
RBC (10e6/ul)
8
7
6
5
4
溶媒
PD
1.2E-05
1.0E-05
8.0E-06
6.0E-06
4.0E-06
2.0E-06
0.0E+00
* *
M4 M3 M1 M2 M5
PD
值为Ki（M）
*代表没有结合

图4A-4E

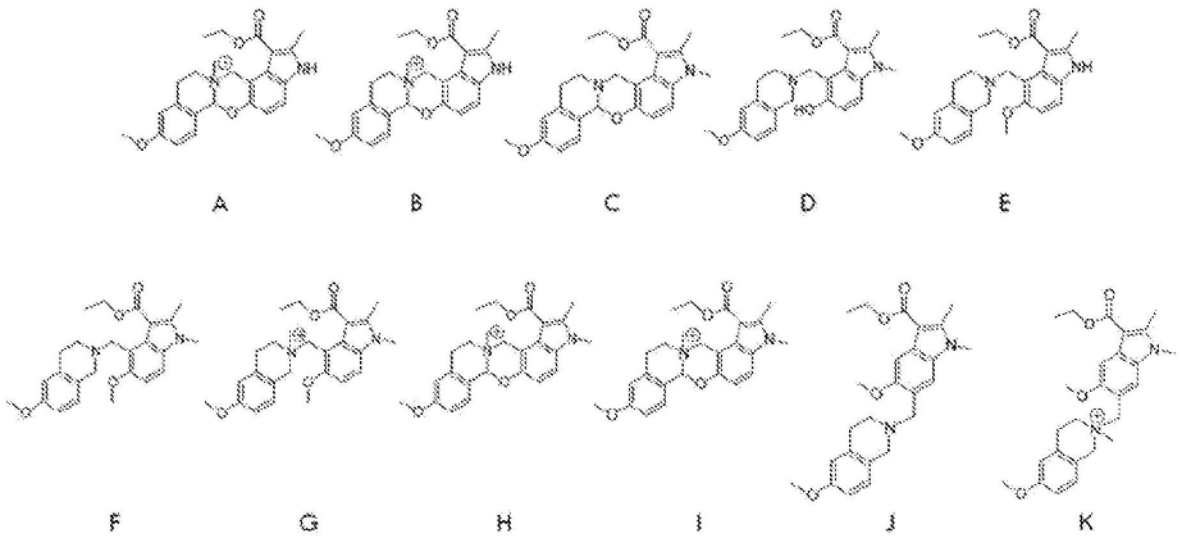

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K

图5

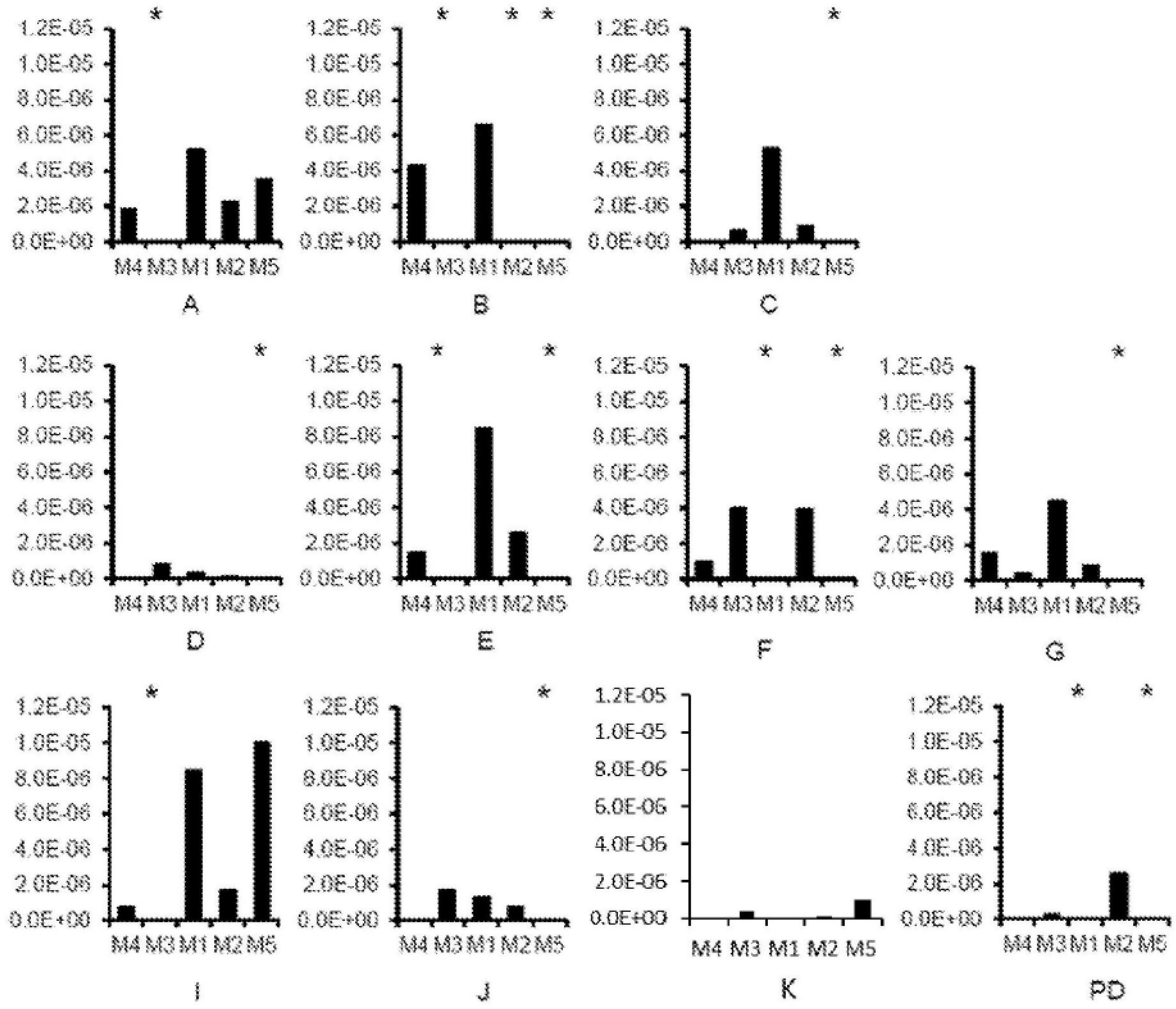

1.2E-05
1.0E-05
8.0E-06
6.0E-06
4.0E-06
2.0E-06
0.0E+00
M4 M3 M1 M2 M5
A
B
C
D
E
F
G
I
J
K
PD
值为Ki（M）
*代表没有结合

图6

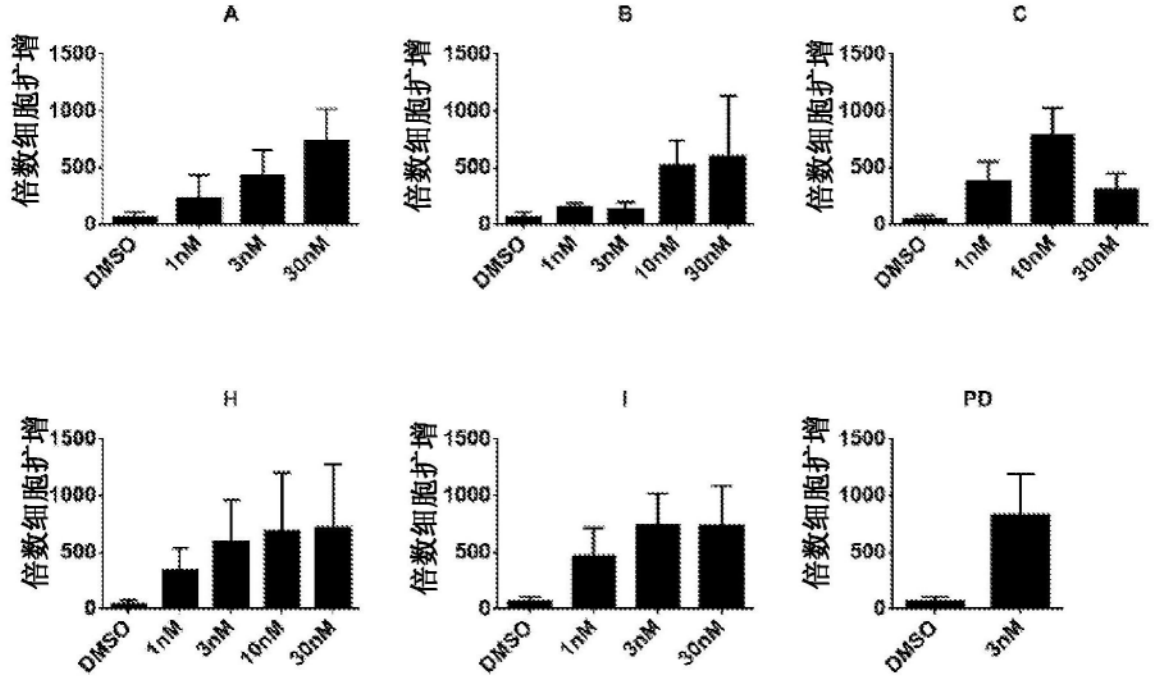

A
B
C
H
I
PD
倍数细胞扩增
1500
1000
500
0
DMSO
1nM
3nM
10nM
30nM

图7

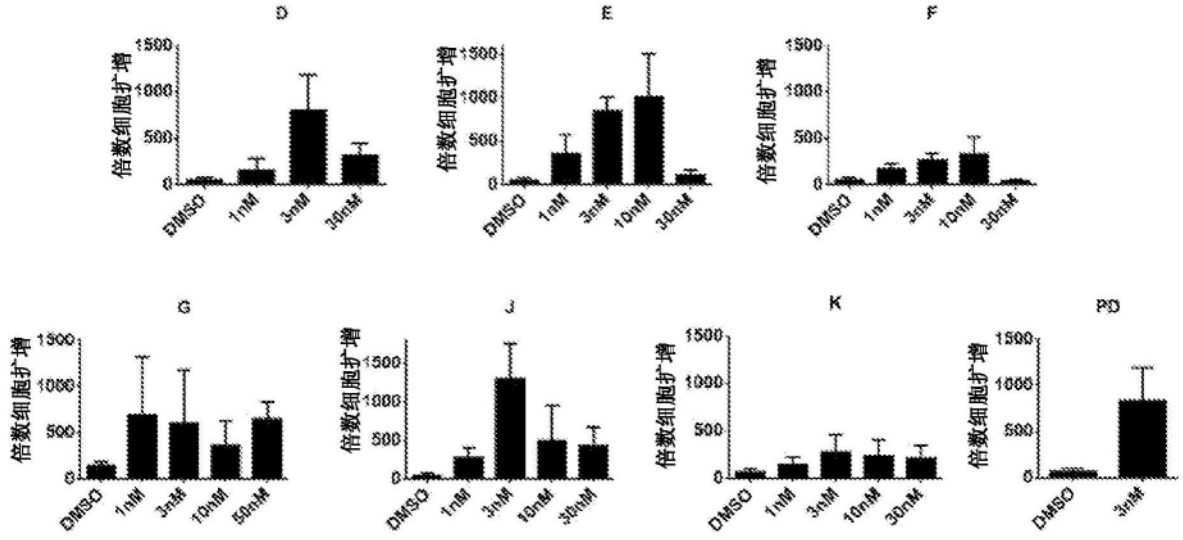

D
E
F
G
J
K
PD
倍数细胞扩增
1500
1000
500
0
DMSO
1nM
3nM
10nM
30nM
50nM

图8

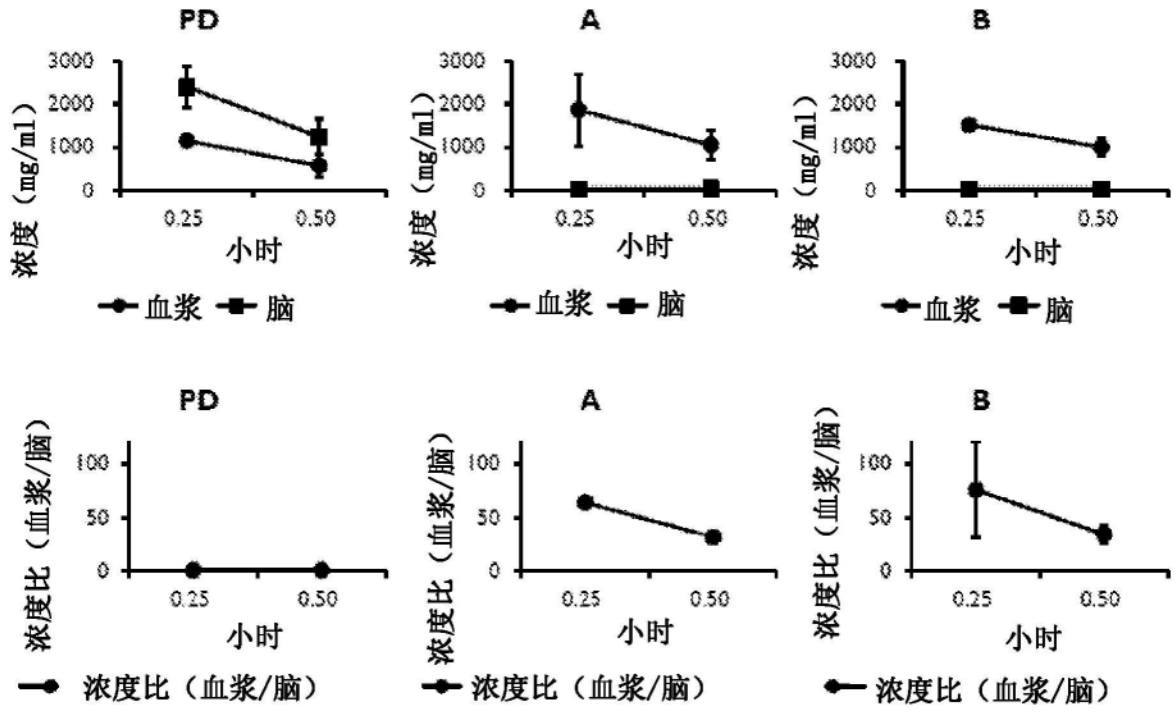

PD
A
B
浓度（mg/ml）
3000
2000
1000
0
0.25
0.50
小时
血浆
脑
浓度比（血浆/脑）
100
50
浓度比（血浆/脑）

图9

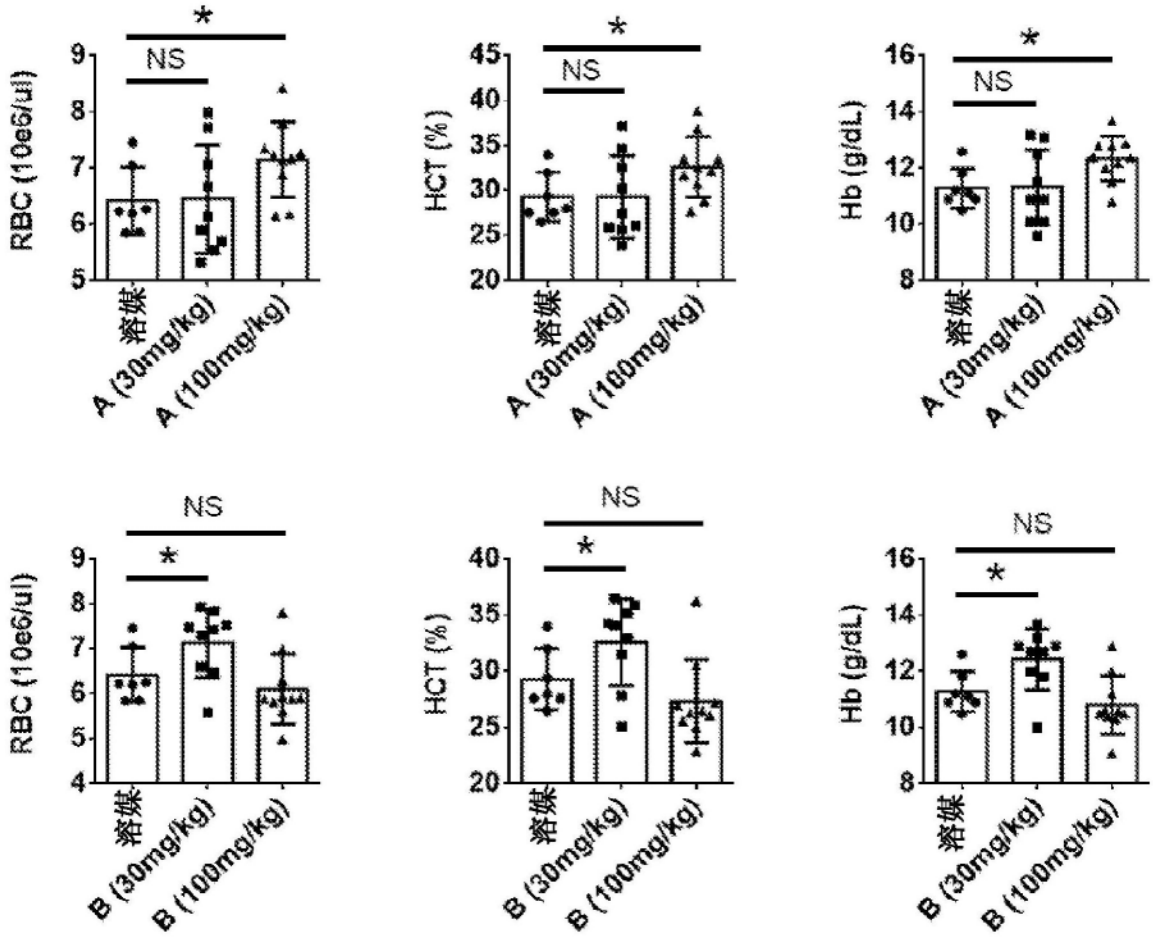

RBC (10e6/ul)
HCT (%)
Hb (g/dL)
NS
*
溶媒
A (30mg/kg)
A (100mg/kg)
B (30mg/kg)
B (100mg/kg)

图10

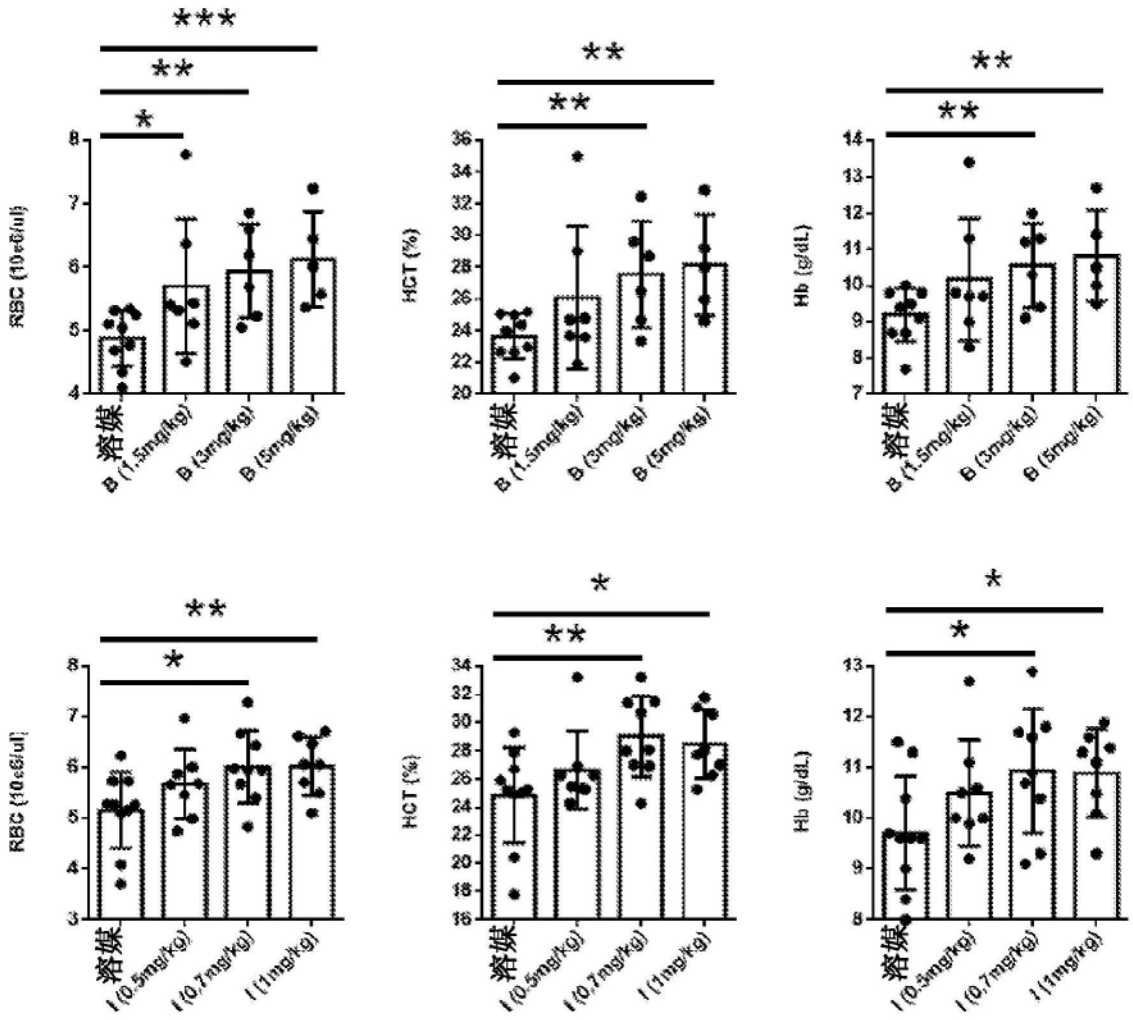

RBC (10e6/ul)
HCT (%)
Hb (g/dL)
溶媒
B (1.5mg/kg)
B (3mg/kg)
B (5mg/kg)
I (0.5mg/kg)
I (0.7mg/kg)
I (1mg/kg)

图11

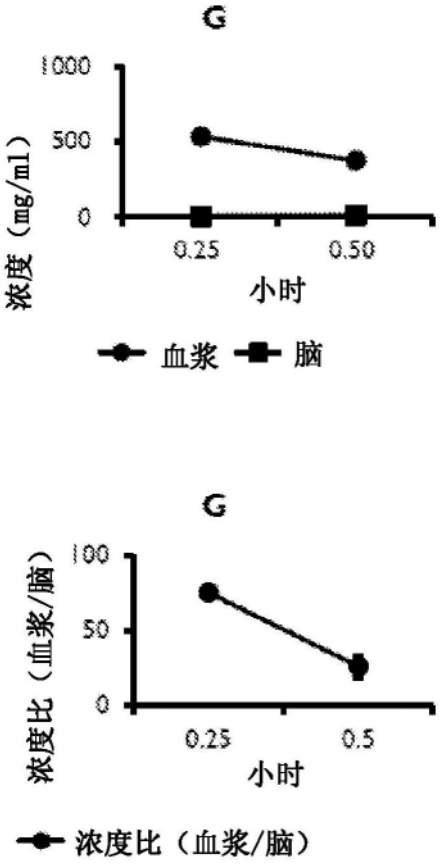

G
1000
500
0
浓度（mg/ml）
0.25
0.50
小时
血浆
脑
G
100
50
0
浓度比（血浆/脑）
0.25
0.5
小时
浓度比（血浆/脑）

图12