

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D295/096

C07D243/08

A61K 31/495

A61K 31/551

A61P 13/02

A61P 13/10

A61P 25/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03814264.3

[43] 公开日 2005 年 8 月 31 日

[11] 公开号 CN 1662516A

[22] 申请日 2003.6.16 [21] 申请号 03814264.3

[30] 优先权

[32] 2002.6.14 [33] IT [31] MI2002A001328

[86] 国际申请 PCT/EP2003/006280 2003.6.16

[87] 国际公布 WO2003/106444 英 2003.12.24

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.29

[71] 申请人 瑞寇达蒂爱尔兰有限公司

地址 爱尔兰利默里克

[72] 发明人 A·里奥那迪 G·莫塔 C·里瓦

R·泰斯塔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

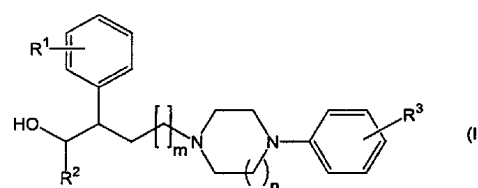
代理人 周承泽

权利要求书 3 页 说明书 32 页 附图 2 页

[54] 发明名称 N,N-双取代的重氮环烷

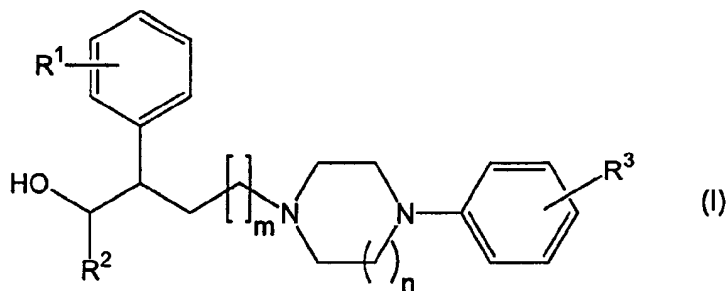
[57] 摘要

式 I 的 N,N-双取代的重氮环烷, (R^1 = 卤原子, R^2 = ($C_3 - C_8$) - 环烷基, R^3 = ($C_1 - C_4$) - 烷氧基或 ($C_1 - C_4$) - 卤烷氧基, m 是 1 或 2, n 是 1 或 2), 对立羟色胺能受体有亲和性。这些化合物和其对映异构体、非对映异构体、N-氧化物、多形体、溶剂化物和药学上可接受的盐用于治疗患下尿道神经肌肉功能障碍和 5-HT_{1A} 受体相关疾病的病人。优选 1, 4-双取代的哌嗪 (n=1)。R¹ 优选 2-位的 F, R² 优选环己基, R³ 优选甲氧基或 2, 2, 2-三氟乙基。优选 m=1。



ISSN 1008-4274

1. 一种化合物，其特征在于，所述化合物具有通式 I



5 其中：

R^1 代表卤原子，

R^2 代表 (C_3-C_8) -环烷基，

R^3 代表 (C_1-C_4) -烷氧基或 (C_1-C_4) -卤烷氧基，

m 是 1 或 2，和

10 n 是 1 或 2，

或其对映异构体、旋光异构体、非对映异构体、N-氧化物、晶形、水合物、溶剂化物或其药学上可接受的盐。

2. 如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于， R^3 代表 (C_1-C_4) -烷氧基。

3. 如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于， R^3 代表 (C_1-C_4) -卤烷氧基。

15 4. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的化合物，其特征在于，携带 R^1 -苯基的碳原子有(R)构型。

5. 如权利要求 4 所述的化合物，其特征在于，携带 R^2 和羟基的碳原子有(S)构型。

6. 如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于，1-[4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪的形式为其任何分离的立体异构体：

1-[(3R, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪，

1-[(3S, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪，

25 1-[(3R, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪，

1-[(3S, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪,

或其中任何两个或多个以任意比例的混合物。

7. 如权利要求1所述的化合物, 其特征在于, 1-[4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪的形式为其任何分离的立体异构体:

1-[(3R, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪,

1-[(3S, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪,

1-[(3R, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪,

1-[(3S, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪,

或其中任何两个或多个以任意比例的混合物。

8. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物含有权利要求1到7中任一项所述化合物或其对映异构体、旋光异构体、非对映异构体 N-氧化物、晶形、水合物、溶剂化物或其药学上可接受的盐, 与药学上可接受的稀释剂或载体混合。

9. 一种在有此需要的哺乳动物中治疗尿道疾病的方法, 其特征在于, 所述方法包括施用有效量的至少一种权利要求1到7中任一项所述化合物, 或其对映异构体、旋光异构体、非对映异构体、N-氧化物、晶形、水合物、溶剂化物或其药学上可接受的盐, 以改善尿急、膀胱活动过度、尿频增加、尿顺应性(膀胱贮存量降低)减少、膀胱炎(包括间隙膀胱炎)、失禁、尿漏、遗尿、排尿困难、尿踌躇和膀胱清空困难中的至少1种症状。

10. 如权利要求9所述的方法, 其特征在于, 权利要求1到7中任一项所述化合物或其对映异构体、旋光异构体、非对映异构体、N-氧化物、晶形、水合物、溶剂化物或其药学上可接受的盐与抗毒蕈碱药联合施用。

11. 如权利要求9所述的方法, 其特征在于, 权利要求1到7中任一项所述化合物或其对映异构体、旋光异构体、非对映异构体、N-氧化物、晶形、水合物、溶剂化物或其药学上可接受的盐与 α_1 -肾上腺素能拮抗剂联合施用。

12. 如权利要求9到11中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述哺乳动物是

人。

13. 如权利要求 9 到 12 中任一项所述的方法，其特征在于，施用是经口、肠、静脉内、肌肉内、皮下、经粘膜、经皮或吸入途径。

14. 如权利要求 9 到 13 中任一项所述的方法，其特征在于，所述化合物以预
5 定量施用。

N, N-双取代的重氮环烷

5 描述

发明涉及对 5-羟色胺能受体有亲和性的新 N, N-双取代的重氮环烷、其药物组合物以及这种化合物和组合物的用途。

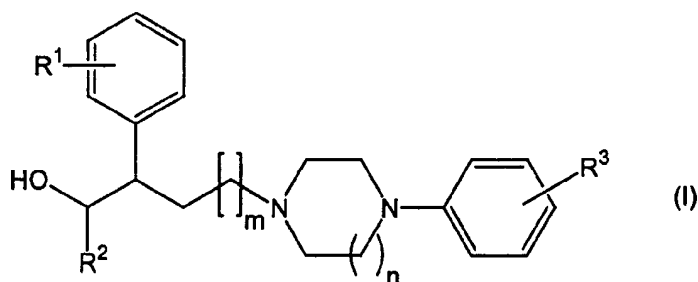
在哺乳动物中，排尿是一个复杂的过程，需要完整的膀胱作用、其内部和外部括约肌、骨盆底的肌肉系统和在三个水平(膀胱壁或括约肌本身、脊髓自主中枢和在大脑皮层控制下脑干(桥)的脑桥排尿中心(PMC)水平的中枢神经系统)中神经控制这些肌肉(De Groat, *Neurobiology of Incontinence*, Ciba Foundation Symposium 151:27, 1990)。排尿产生自逼尿肌肉收缩，逼尿肌肉由交叉平滑肌纤维组成，在起源自骶脊髓的副交感神经自主系统控制下。简单的排泄反射由用于疼痛、温度和膨胀的感觉神经激发，膨胀从膀胱蔓延到骶脊髓。然而，来自的膀胱感觉通道也到达 PMC，产生的神经脉冲一般抑制骶脊髓对皮层抑制反射弧的抑制，放松骨盆底的肌肉和外部括约肌。最后，逼尿肌肉收缩且产生排泄。下尿道功能异常如排尿困难、失禁和遗尿在一般人群中普遍。排尿困难包括尿频、夜尿和尿急，可能由膀胱炎(包括间隙膀胱炎)、前列腺炎或良性前列腺增生(BPH)(影响约 70%的年老男性)或者神经紊乱引起。失禁综合征包括应力性尿失禁、紧迫性尿失禁、溢流性尿失禁和混合性尿失禁。遗尿指晚上或睡眠中的不自觉地排尿。

以前，治疗下尿道神经肌肉功能障碍包括施用直接作用于膀胱肌肉的化合物，如解痉药黄酮哌酯(Ruffman, *J. Int. Med. Res.*, 16:317, 1988)，它也作用于 PMC(Guarneri 等, *Drugs of Today*, 30:91, 1994)，或者抗胆碱能化合物如羟丁宁(Andersson, *Drugs* 36:477, 1988)和托特罗定(Nilvebrant, *Life Sci.* 68(22-23):2549, 2001)。也通常使用 α_1 -肾上腺素能受体治疗 BPH，但是在不同作用机制的基础上(Lepor, *Urology*, 42:483, 1993)。然而，涉及直接抑制骨盆肌肉系统(包括逼尿肌肉)的治疗可能有不需要的副作用，如不完全排泄或调节性瘫痪、心动过速和干口(Andersson, *Drugs* 35:477, 1988)。因此，优选使用经中枢神经系统作用的化合物，例如以恢复排尿机制的正常功能的方式影响骶脊髓反射和/或 PMC 抑制途径。

美国专利号 5, 346, 896 公开了 5-HT_{1A} 结合剂, 它可用于治疗 CNS 紊乱如焦虑。

EP 0924205 公开了结合 5-HT_{1A} 受体的芳基哌嗪化合物。

发明提供由通式 I 表示的化合物:



其中:

R¹ 表示卤原子,

R² 表示 (C₃-C₈)-环烷基,

R³ 表示 (C₁-C₄)-烷氧基或 (C₁-C₄)-卤烷氧基,

m 是 1 或 2,

n 是 1 或 2,

和对映异构体、旋光异构体、非对映异构体、N-氧化物(如 N-哌嗪氧化物)、晶形、水合物、溶剂化物或其药学上可接受的盐。

通式 I 的化合物能作为 4 种立体异构体存在, 它们可存在于外消旋混合物或任何其它组合。外消旋混合物可进行对映异构富集以产生富有特定对映异构体的组合物或者完全分解成单对映异构体和含单对映异构体的组合物。对映异构富集可表示为下面定义的 ee(对映异构过量)。

优选通式 I 的化合物, 其中携带 R¹-苯基的碳原子有(R)构型。最优选的化合物中携带 R¹-苯基的碳原子有(R)构型且同时携带 R² 和羟基的相邻碳原子有(S)构型。

发明也包括上述通式 I 化合物的代谢物, 具有相同活性类型, 本文称为活性代谢物。

发明同样包括前体药物, 它们在体内代谢以产生任何上述化合物。

在另一个实施方案中, 发明提供药物组合物, 包括通式 I 的化合物、对映异构体、非对映异构体、N-氧化物、晶形、水合物、溶剂化物或通式 I 的这些化合物的药学上可接受的盐, 它们与药学上可接受的稀释剂或载体混合。

在其它实施方案中，发明提供减少有此需要的哺乳动物(如人)中膀胱收缩频率的方法，膀胱收缩是由于膀胱膨胀，这是通过施用有效量的至少一种本发明化合物以降低哺乳动物膀胱膨胀引起的膀胱收缩频率。

在其它实施方案中，发明提供增加有此需要的哺乳动物(如人)中尿膀胱容量的方法，这是通过施用有效量的至少一种本发明化合物以增加哺乳动物的尿膀胱容量。

另外的实施方案是治疗有此需要的哺乳动物(如人)中尿道疾病的方法，这是通过施用有效量的至少一种本发明化合物以改善尿急、膀胱活动过度、尿频率增加、尿顺应性(膀胱贮存量)减少、膀胱炎(包括间隙膀胱炎)、失禁、尿漏、遗尿、排尿困难、尿踌躇和膀胱清空困难中的至少1种症状。

为治疗上面的障碍，发明化合物可联合其它药剂施用，例如抗毒蕈碱药、 α_1 -肾上腺素能拮抗药、环加氧酶抑制剂，环加氧酶抑制剂可抑制 COX1 和 COX2 同工酶或对 COX2 同工酶和其 NO 供体衍生物有选择性。

在又一个实施方案中，本发明提供治疗罹患中枢神经系统(CNS)障碍的哺乳动物的方法，哺乳动物明显有5-羟色胺能功能不良，通过施用有效量的至少一种本发明化合物以治疗 CNS 障碍。这些功能不良包括但不限于哺乳动物(特别是人)中与卒中、损伤、痴呆相关的焦虑、抑郁、高血压、睡眠/觉醒循环紊乱、摄食紊乱、行为紊乱、性功能障碍和认知紊乱，并起源于神经发育、注意缺陷多动障碍(ADHD)、药瘾、停药、肠易激综合症。传递发明化合物到5-HT_{1A}5-羟色胺能受体的环境可影响治疗，例如传递有效治疗上述紊乱的发明化合物量到胞外介质(或全身或局部施用化合物给有这种5-HT_{1A}受体的哺乳动物)。

在一个较佳实施方案中，发明提供治疗罹患尿道疾病的哺乳动物(包括人)的方法，这是通过施用至少一种发明化合物到5-HT_{1A}受体的环境，施用量有效增加具有无收缩的膀胱静止的持续时间。更优选实现膀胱静止的持续时间增加而对排尿压力作用小或没有(如减少或增加)。

优选的环烷基 R² 有3到6个碳原子，例如环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

术语“卤素”涵盖氟、氯、溴和碘。

术语“卤烷氧基”包括单卤烷氧基，即有1个卤原子取代的烷氧基以及多卤烷氧基，即有至少2个卤原子取代的烷氧基。优选的卤烷氧基是2,2,2-三氟乙氧基。

本文所示化合物“代谢物”是化合物代谢时形成的化合物的衍生物。术语“活

性代谢物”指化合物代谢时形成的化合物的生物活性衍生物。术语“代谢”指特定物质在活体内改变的过程总和。体内存在的所有化合物由体内的酶控制以获得能量和/或从体内去除它们。特定酶使化合物产生特定结构改变。例如，细胞色素 P450 催化多种氧化和还原反应。例如，尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶催化活性葡萄糖醛酸分子转移到芳族醇、脂肪族醇、羧酸、胺和游离巯基。关于代谢的进一步信息可获得自《治疗剂的药理学基础》(*The Pharmacological Basis of Therapeutics*), 第 9 版, McGraw-Hill(1996), 11-17 页。

可鉴定本文所示化合物的代谢物, 通过施用化合物给宿主和分析来自宿主的组织样品或者用肝细胞或其它体外系统如细胞色素或微粒体培养化合物并分析所得化合物。这 2 种方法在本领域熟知。

如本文所用, 术语“立体异构体”指化合物由相同键结合的不同原子组成, 但有不能互换的不同三维结构。三维结构称为构型。如本文所用, 术语“对映异构体”指 2 种立体异构体, 其分子是彼此的非重叠镜像。如本文所用, 术语“旋光异构体”相当于术语“对映异构体”。是彼此立体异构体但不是彼此对映异构体的化合物称为非对映异构体。术语“外消旋物”或“外消旋混合物”指相等部分的对映异构体的混合物。术语“手性中心”指附着 4 个不同基团的碳原子。如本文所用, 术语“对映异构富集”指一种对映异构体的量相比另一种增加。一种表示对映异构富集完成的简便方法是对映异构过量或“ee”的概念, 它用下列等式发现:

$$ee = \frac{E1 - E2}{E1 + E2} * 100$$

其中 E1 是第 1 种对映异构体的量且 E2 是第 2 种对映异构体的量。因此, 如果 2 种对映异构体的初始比例是 50:50, 如存在于外消旋混合物, 获得足以产生 50:30 终比例的对映异构富集, 关于第 1 种对映异构体的 ee 是 25%。然而, 如果终比例是 90:10, 关于第 1 种对映异构体的 ee 是 80%。根据发明的一个实施方案, 优选大于 90%的 ee, 最优选大于 95%的 ee 且最特别优选大于 99%的 ee。本领域普通技术人员用标准技术和方法确定对映异构富集, 如有手性柱的高效液相色谱。选择有效分离对映异构对必需的适当手性柱、洗脱液和条件在本领域普通技术人员的知识范围内。另外, 本领域普通技术人员能用本领域熟知的标准技术分离通式 I 化合物的对映异构体, 如 J. Jacques 等, 《对映异构体、外消旋物和分离》(Enantiomers, Racemates, and Resolutions), John Wiley and Sons, Inc.,

1981 描述。分离的例子包括重结晶技术或手性层析。

非对映异构体的差异在于物理性质和化学反应性。非对映异构体的混合物能在溶解度、分级结晶或层析性质如薄层层析、柱层析或 HPLC 基础上分离成对映异构体对。

- 5 复杂的非对映异构体混合物纯化成对映异构体通常需要 2 个步骤。在第 1 步中，非对映异构体混合物如上所述分离成对映异构体对。在第 2 步中，对映异构体对进一步纯化为富集 1 种或另 1 种对映异构体的组合物，或更优选分离成含纯对映异构体的组合物。分离对映异构体一般需要反应或与手性剂如溶剂或柱基质的分子相互作用。可完成对映异构体分离，例如通过与第 2 种试剂即分离剂的纯
- 10 对映异构体反应将对映异构体混合物如外消旋混合物转变成非对映异构体混合物。随后能分离所得 2 种非对映异构体产物。然后分离的非对映异构体通过逆转初始的化学转化再转变成纯的对映异构体。

- 通过非共价结合手性物质的差异也能完成对映异构体分离，如同手性吸收剂层析。对映异构体与层析吸收剂间的非共价结合建立了非对映异构复合物，导致
- 15 层析系统中流动和结合状态的分配不同。因此 2 种对映异构体以不同速度通过层析系统如柱，从而分离。

- 手性分离柱在本领域熟知且可商业购买(如购自 MetaChem Technologies Inc., ANSYS Technologies, Inc. 的分公司, Lake Forest, CA)。能分析和纯化对映异构体，例如使用 HPLC 的手性固定相(CSPs)。手性 HPLC 柱通常包含 1 种对
- 20 映异构体化合物形式，它固定于硅填充物质的表面。为产生手性分离，必须有至少 3 个点的 CSP 与 1 种分析物对映异构体间的同时相互作用，一个或多个这些相互作用在立体化学上是依赖的。

- D-苯甘氨酸和 L-亮氨酸是 I 型 CSPs 并组合使用 p-p 相互作用、氢键、偶极-偶极相互作用和空间相互作用以完成手性识别。为在 I 型柱上分离，分析物对映
- 25 异构体必须包含与 CSP 功能性互补，从而分析物与 CSP 发生必需的相互作用。样品应优选包含 1 个下列官能团：p-酸或 p-碱、氢键供体和/或受体或者酰胺偶极。衍生有时用于将相互作用位点加入那些缺乏位点的化合物。最普通的衍生物包括从胺和羧酸形成酰胺。

- Meta Chiral ODM™ 是 II 型 CSP。形成溶质-CSP 复合物的主要机制是通过引力
- 30 相互作用，但包含复合物也发挥重要作用。氢键合、pi-pi 和偶极堆对在 MetaChiral™ ODM 上手性分离是重要的。当溶质分子不包含溶质-柱相互作用所需

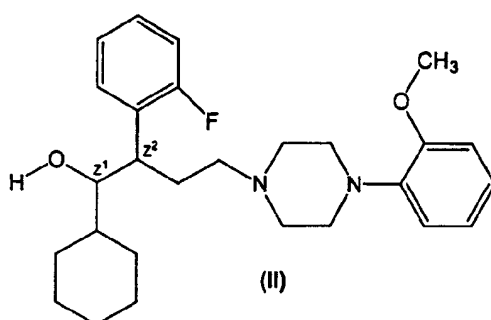
的基团时，通常必需衍生。通常对于苯酰胺，衍生也需要一些强极性分子像胺和羧酸，否则会通过非立体特异相互作用与固定相的相互作用太强。

根据发明的较佳实施方案，通式 I 的 R^1 是氟原子。更优选 R^1 是苯环的 2-位上的氟原子。

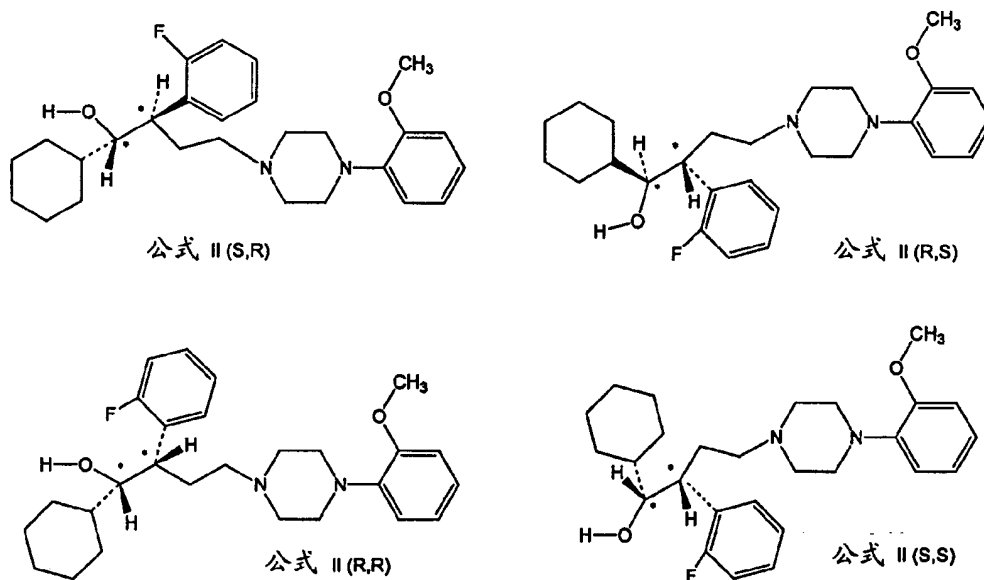
5 R^2 所示优选基团是未取代的环己基。

R^3 所示优选取代基是烷氧基，更优选甲氧基且最优选苯环的 2 位上的甲氧基。

本发明的优选化合物是 1-[4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪，它具有通式 II：



10 其中 Z^1 和 Z^2 代表手性中心。通式 II 的化合物能以下列 4 种立体异构体之一存在。



这些化合物可命名为：

1-[(3R, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪，

15 1-[(3S, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌

嗪，

1-[(3R, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌

嗪，

和 1-[(3S, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-

5 哌嗪。

通式 II 的化合物能分离成非对映异构体对，例如在 TLC 上分离。这些非对映异构体对在本文称为具有上 TLC R_f 的非对映异构体；具有下 TLC R_f 的非对映异构体。

非对映异构体可进一步对特定对映异构体富集或分离成单对映异构体，使用
10 本领域熟知方法如本文所述方法。

在另一个较佳实施方案中，发明提供化合物 1-[4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪，它可以 4 种立体异构体存在：

1-[(3R, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-([2-(2, 2, 2-三氟
15 乙氧基)-苯基]-哌嗪，

1-[(3S, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-([2-(2, 2, 2-三氟
乙氧基)-苯基]-哌嗪，

1-[(3R, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-([2-(2, 2, 2-三氟
乙氧基)-苯基]-哌嗪，

20 1-[(3S, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-([2-(2, 2, 2-三氟
乙氧基)-苯基]-哌嗪，

对映异构体、旋光异构体、非对映异构体、N-氧化物(如 N-哌嗪氧化物)、晶形、水合物、溶剂化物或其药学上可接受的盐。

优选 3R, 4S 和 3R, 4R。最优选 3R, 4S。

25 联合治疗

在某些实施方案中，通过施用通式 I 的化合物治疗尿道疾病，联合另外的 5-HT_{1A} 拮抗剂或一种或多种其它受体种类的拮抗剂。在较佳实施方案中，通式 I 的化合物联合 α_1 -肾上腺素能或毒蕈碱受体施用。

在进一步的实施方案中，通过施用通式 I 的化合物治疗下尿道疾病，联合一
30 种或多种环加氧酶抑制剂，环加氧酶抑制剂可抑制 COX1 和 COX2 同工酶或另外对 COX2 同工酶和其 NO 供体衍生物有选择性。

联合通式 I 的化合物施用抗毒蕈碱药的例子是羟丁宁、托特罗定、达非那新和替米维林。

通式 I 的化合物可联合 α_1 -肾上腺素能拮抗剂施用，用于治疗下尿道症状，无论这些是否与 BPH 相关。适于与通式 I 的化合物联合施用的优选 α_1 -肾上腺素能拮抗剂是例如哌唑嗪、多沙唑嗪、特拉唑嗪、阿夫唑嗪和坦舒洛辛。适于与通式 I 的化合物联合施用的另外 α_1 -肾上腺素能拮抗剂描述于美国专利号 5,990,114;6,306,861;6,365,591;6,387,909 和 6,403,594。

可与通式 I 的化合物联合施用的 5-HT_{1A} 拮抗剂的例子发现于 Leonardi 等, J. Pharmacol. Exp. Ther. 299:1027-1037, 2001 (如 Rec 15/3079)、美国专利号 6,071,920, 其它苯基哌嗪衍生物描述于 WO 99/06383 和 2000 年 10 月 7 日提交的待审批美国专利申请序列号 10/266,088 和 10/266,104。另外的 5-HT_{1A} 拮抗剂包括 DU-125530 且相关化合物描述于美国专利号 5,462,942, 罗巴佐坦和相关化合物描述于 WO 95/11891。

能与通式 I 的化合物联合施用的选择性 COX2 抑制剂的例子包括但不限于是尼美舒利、美洛昔康、罗非昔布、塞来昔布、帕瑞昔布和伐地昔布。另外的选择性 COX2 抑制剂的例子不限于 US 6,440,963 所述。非选择性 COX1-COX2 抑制剂的例子无限制地是乙酰水杨酸、尼氟酸、氟芬那酸、思芬那酸、甲氯灭酸、托芬那酸、thiaprophenic acid、布洛芬、萘普生、酮洛芬、氟比洛芬、呋洛芬、吲哚美辛、阿西美辛、丙谷美辛、酮咯酸、双氯芬酸、乙哌乙酸、舒林酸、芬替酸、替诺昔康、氯诺昔康、西奥昔康、异丁普生、萘丁美酮、托美丁、氨托美丁。因此，上述各项是可与通式 I 的化合物联合施用的 COX 抑制剂的无限制性例子。

可与通式 I 的化合物联合施用的 COX 抑制剂衍生物的例子是携带硝酸盐(硝基氧)或亚硝酸盐基团的 COX 抑制剂的衍生物，例如 WO 98/09948 中给出能体内释放 NO 的那些。

25 药物组合物

发明进一步提供药物组合物，它包括通式 I 的化合物或化合物的对映异构体、非对映异构体、N-氧化物、晶形、水合物、溶剂化物、活性代谢物或其药学上可接受的盐。药物组合物也可包括任选的添加剂，如药学上可接受的载体或稀释剂、矫味剂、甜味剂、防腐剂、染料、粘合剂、悬浮剂、分散剂、着色剂、崩解剂、赋形剂、稀释剂、滑润剂、吸收增强剂、杀菌剂等、稳定剂、增塑剂、食用油或者两种或多种所述添加剂的任何组合。

合适的药学上可接受的载体或稀释剂包括但不限于乙醇、水、甘油、芦荟 维拉胶、尿囊素、甘油、维生素-A 和 E 油、矿物油、磷酸缓冲盐水、PPG2 豆蔻基丙酸、碳酸镁、磷酸钾、植物油、动物油和亚异丙基甘油(solketal)。

合适结合剂包括但不限于淀粉，明胶，天然糖如葡萄糖、蔗糖和乳糖，玉米
5 甜味剂，天然和合成树胶如阿拉伯树胶、黄蓍胶、植物胶，藻酸钠，羧甲基纤维素，聚乙二醇，蜡等。

合适崩解剂包括但不限于淀粉如玉米淀粉、甲基纤维素、琼脂、皂土、黄原胶等。

合适的滑润剂包括但不限于油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸
10 钠、氯化钠等。

合适的悬浮剂包括但不限于皂土。

合适的分散剂和悬浮剂包括但不限于合成和天然树胶如植物胶、黄蓍胶、阿拉伯树胶、藻酸盐、葡聚糖、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和明胶。

15 合适食用油包括但不限于棉子油、芝麻油、椰子油和花生油。

另外添加剂的例子包括但不限于山梨醇、滑石、硬脂酸和磷酸二钙。

单位剂型

药物组合可制成单位剂型，如片剂、丸剂、胶囊、药团、粉末、颗粒、无
菌肠胃外溶液、无菌肠胃外悬浮液、无菌肠胃外乳剂、酞剂、酞剂、计量气雾剂
20 或液体喷雾、滴剂、安瓿、自动注射装置或栓剂。单位剂型可用于口服、肠胃外、鼻内、舌下或直肠施用，或者用于吸入或吹入、经皮贴片和冻干组合物施用。一般，可使用的任何活性成分的传递使这些成分具全身有效性。优选的单位剂型是口服剂型，最优选固体口服剂型；因此剂型优选是片剂、丸剂和胶囊。然而，也优选肠胃外制剂。

25 制备固体单位剂型可通过混合本发明活性剂与药学上可接受的载体和上述任何其它所需添加剂。混合物通常混合直到获得均匀的本发明活性剂的混合物并形成载体和任何其它所需添加剂，即活性剂在组合物中均匀分散。在此情况中，组合物能作为干或湿颗粒形成。

剂型可制成例如“即释”剂型。“即释”剂型一般制成片剂，当在药物溶出试
30 验如美国药典标准<711>中测试时，于 30-60 分钟内释放至少 60%-90%活性成分。在一个较佳实施方案中，即释剂型在约 45 分钟内释放 75%活性成分。

剂型也能制成例如“控释”剂型。“控释”、“缓释”、“延释”或“定时释放”剂型是相等的术语，描述活性剂以确定和可操纵速度从传递载体释放活性剂一段时间时发生的活性剂传递类型，时间一般以分钟、小时或天的顺序，通常范围从约 60 分钟到约 3 天，而不是在进入消化道或接触胃液时立接分散。控释速度可随许多重因素而变化。影响控制释放中传递速度的因素包括颗粒大小、组成、孔隙率、电荷结构、传递载体和活性成分的水合程度、环境酸度(传递载体的内部或外部)、生理环境即沿消化道特定位置的活性剂的溶解度。用于控释剂形的溶出试验的典型参数发现于美国药典标准<724>。

因此，可制成剂型在多相阶段中传递活性剂，由此第 1 部分活性成分以第一种速度释放且至少第 2 部分活性成分以第二种速度释放。在一个较佳实施方案中，可制成剂型以两相方式传递活性剂，包括第 1 个“即释相”，其中活性成分部分以上述用于即释剂型的速度传递，以及第 2 个“控释相”，其中剩余活性成分以上述用于控释剂型的控释方式释放。

可包衣片剂或丸剂或另外制备以形成有延迟和/或持续作用的单位剂型，如控释和延释单位剂型。例如，片剂或丸剂能包括内剂量和外剂量组分，后者呈覆盖前者的层或包膜的形式。2 种组分可通过肠层分离，肠层用于抗胃中崩解且允许内部组分完整进入十二指肠或延缓释放。

控制活性剂释放的可生物降解聚合物包括但不限于聚乳酸、聚 ϵ 己内酯、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基丙烯酸盐和水交联的交联或两亲阻断共聚物。

对于液体剂型，溶解、悬浮或乳化活性物质或其生理上可接受盐，任选用常用的物质如增溶剂、乳化剂或其它助剂。用于活性组合物和相应生理上可接受盐的溶剂可包括水、生理盐水溶液或醇如乙醇、丙二醇或甘油。另外，可使用糖溶液如葡萄糖或甘露糖醇溶液。所述多种溶剂的混合物也能用于本发明。

本发明也考虑经皮剂型。经皮形式可以是扩散性经皮系统(经皮贴片)，使用液体贮库或粘合剂包药物(drug-in-adhesive)基质系统。其它经皮剂型包括但不限于局部凝胶、洗液、软膏剂、经粘膜系统和装置、离子电渗(电扩散)传递系统。经皮剂型可用于延释和缓释本发明活性剂。

本发明用于肠胃外施用且特定是注射的药物组合物和单位剂型通常包括上述药学上可接受的载体。优选的液体载体是植物油。注射可以是例如静脉内、硬膜外、鞘内、肌肉内、管腔内、气管内或皮下。

活性剂也能以脂质体传递系统形式施用，如小单层脂质体、大单层脂质体和多层脂质体。脂质体能从多种磷脂形成，如胆固醇、硬脂胺或卵磷脂。

本发明活性剂也能偶联可溶性聚合物如可靶向药物载体。这种聚合物包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基甲基丙烯酰基氨基酚
5 (polyhydroxypropylmethacrylamidophenol)、聚羟乙基天冬氨酸氨基酚和棕榈酰残基取代的聚乙烯氧聚赖氨酸。

施用

本发明药物组合物或单位剂型可通过多种途径施用，如口和肠、静脉内、肌肉内、皮下、经皮、经粘膜(包括直肠和含服)和吸入途径。优选使用口或经皮途径(即分别用固体或液体制剂或皮肤贴片)。

包含有效量本发明的药物组合物或单位剂型可施用给需要治疗下尿道神经肌肉功能不良的动物，优选是人，如 E. J. McGuire, 《Campbell 泌尿学》(Campbell's UROLOGY), 第 5 版, 616-638, 1986, W. B. Saunders Company 所述, 以及受任何与
15 5-HT_{1A}受体功能损伤有关的生理功能不良影响的病人。这种功能不良包括但不限于中枢神经系统紊乱如抑郁、焦虑、进食障碍、性功能障碍、成瘾性和相关问题。

如本文所用，术语“有效量”指使特定疾病的至少 1 个症状或参数可测量改善的量。在一个较佳实施方案中，化合物治疗尿道疾病，如尿急、膀胱活动过度、尿频增加、尿顺应性(膀胱贮存量)减少、膀胱炎(包括间隙膀胱炎)、失禁、尿漏、
20 遗尿、排尿困难、尿踌躇和膀胱清空困难、或哺乳动物(特别是人)中 5-羟色胺能功能不良导致的中枢神经系统紊乱(如焦虑、抑郁、高血压、睡眠/觉醒循环紊乱、摄食行为、性功能和认知紊乱，这些与卒中、损伤、痴呆相关，且由于神经发育，以及来自注意缺陷多动障碍(ADHD)、药瘾、停药、肠易激综合征有关的活动过度障碍。

25 本发明药物组合物或单位剂型可根据常规测试定义的剂量和施用方案施用，遵循上面给出的指导以获得最佳活性而同时将特定病人的毒性或副作用减少到最低程度。然而，根据本文给出的指导，这种治疗方案的精调是常规性的。

本发明活性剂剂量可根据多种因素变化，如基本疾病情况、个体情况、重量、性别和年龄、施用方式。容易通过本领域普通技术人员已知的经验方法确定治疗
30 疾病的有效量，例如确立施用剂量和频率的矩阵并比较实验单位组或矩阵中各点的受试者。待施用给病人的确切量将视疾病状态和严重性及病人的身体情况而变

化。本领域技术人员能确定任何症状或参数的可测量改善或由病人报告给医生。要理解尿道疾病的任何症状或参数的任何临床或统计上显著衰减或改善在发明的范围内。临床显著衰减或改善意味着病人和/或医生可察觉到。

例如，单个病人可能同时罹患一些排尿困难症状，例如尿急和排尿频繁殖或两者都有，这些能用本发明方法减少。在失禁的病例中，认为尿频或不需要排尿体积的任何降低是本治疗方法的有益效果。

待施用药剂的量可在约 0.01 和约 25mg/kg/天之间，优选约 0.1 和约 10mg/kg/天之间，最优选 0.2 和约 5mg/kg/天之间。应理解本发明药物制剂不一定包含有效治疗疾病的整个药剂量，通过施用这些药物制剂的许多剂量能达到这种有效量。

在本发明的一个较佳实施方案中，化合物制成胶囊或片剂，优选包含 50 到 200mg 的发明化合物，优选以 50 到 400mg 的总日剂量施用给病人，优选 150 到 250mg 且最优选约 200mg，用于在 5-HT_{1A}受体配体治疗下减轻尿失禁和功能不良。总日剂量可复合施用，如每天 4 个亚剂量。在一个较佳实施方案中，总日剂量以 1 到 2 个剂量每天施用。

用于肠胃外施用的药物组合物包含约 0.01%到约 100%重量的本发明活性剂，以 100%重量的总药物组合物为基础。

一般，经皮剂型包含约 0.01%到约 100%重量的活性剂，相比 100%总重量的剂型。

药物组合物或单位剂型可以单一日剂量施用，或总日剂量可以均分剂量施用。此外，需要共施用或连续施用另一种化合物以治疗疾病。上面列出这种联合治疗的例子。

对于化合物是单独剂量制剂的联合治疗，可同时施用化合物，或各以分开的交错时间施用。例如，可在早晨施用发明化合物且晚上施用抗毒蕈碱化合物，或反之亦然。另外的化合物也可以特定间隔施用。施用顺序取决于多种因素，包括病人年龄、体重、性别和医学状况；待治疗疾病的严重性和病因学、施用途径、病人的肾和肝功能、病人的治疗史和病人的反应性。可精调施用顺序的确定且根据上面给出的指导，这种精调是常规性的。

使用的治疗方法

不想受理论约束，认为施用 5-HT_{1A}受体拮抗剂减少或防止不需要的骶反射活性和/或控制排尿的皮层机制。因此，预期能用本发明化合物可治疗范围广的下尿道神经肌肉功能障碍，包括但不限于排尿困难、失禁和遗尿(膀胱活动过度)。排

尿困难包括尿频、夜尿、尿顺应性减少(膀胱贮存量降低)、膀胱清空困难即排尿中排出的尿是亚最佳体积。失禁综合征包括应力性尿失禁、紧迫性尿失禁、遗尿性尿失禁以及混合形式的尿失禁。遗尿指晚上或睡眠中的不自觉地排尿。

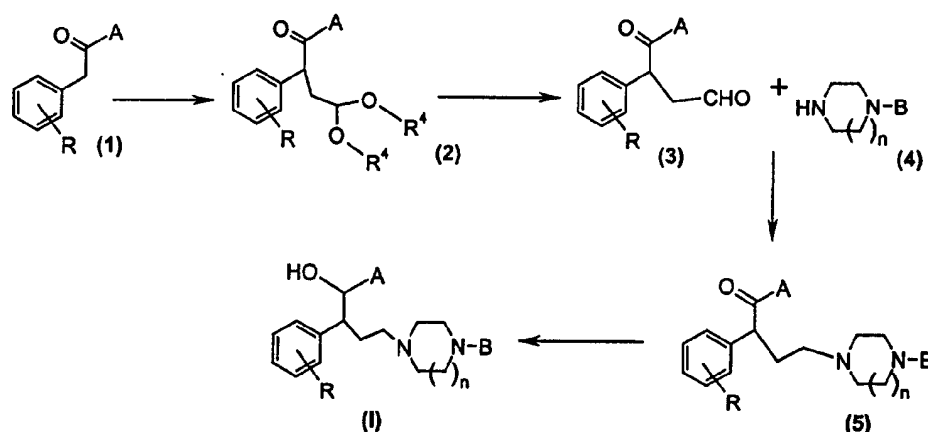
本发明化合物也用于治疗 5-羟色胺能功能不良引起的中枢神经系统疾病。

5 发明化合物的合成

一般根据下列流程制备发明的化合物：

10

流程 1



基团 A 和 R 与通式(I)定义的 R²和 R¹相同。基团 B 相等于通式(I)定义的 R³-苯基。R⁴代表烷基。

用碱处理起始材料(1)，优选叔丁氧化钾(Potassium tert-butoxide)，接着用 2-溴代乙醛二烷基乙缩醛或其它羰基保护的 2-卤乙醛烷化(如 R⁴烷基也能加入环以产生二氧戊环或二噁烷环)。其它进行缩合的可选择和适当的碱包括氨基化锂、氢化钠、氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钾、碳酸铯等，有或没有相转移催化剂协助。

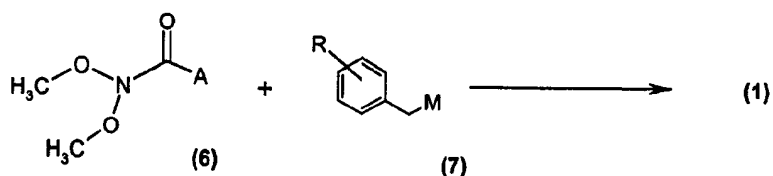
反应优选在 0℃到回流温度下的溶剂如二甲基亚砷或甲苯中进行。

酸处理(2)，如合适有机溶剂中的盐酸或 p-甲苯-磺酸或三氟乙酸，获得醛(3)。一般，反应在质子溶剂中进行，如酸溶液和丙酮或四氢呋喃的混合物，温度从约 5℃到 75℃，优选环境温度。优选和相似的方法由在含水三氟乙酸的混合物中室温完成反应组成，含水三氟乙酸在氯化的溶剂中。

醛(3)偶联所需芳基重氮环烷(4)，通过还原胺化过程制备(5)。反应优选在非反应性溶剂如二氯乙烷或二氯甲烷或氯仿中室温进行，存在三乙酸氢硼化钠，且在1到24小时内基本完成(参见例如 A. F. Abdel-Magid, 等, J. Org. Chem., 61, 3849 (1996))或它能在质子溶剂(如甲醇)中进行，有氰基氢硼化钠协助，任选存在分子筛。

(5) 还原成醇(I) 易用还原剂完成, 如硼氢化钠或二异丁基氢化铝或其它氢化铝或氢化硼, 或者本领域技术人员熟知的其它使酮转变成醇的还原方法, 用于制备羟基化合物(I)。反应优选在有机溶剂中进行, 如甲醇或二氯甲烷或四氢呋喃, 温度从约-20℃到环境温度。

流程 2



起始材料(1)可商业购买或能通过偶联适当 Weinreb 酰胺(6)(参见 Nahm 和
15 Weinreb, Tetrahedron Lett., 22, 3815, (1981))与(7)来制备, 如上面流程 2
所述, 其中 M 是金属盐, 如卤化锂或卤化镁。

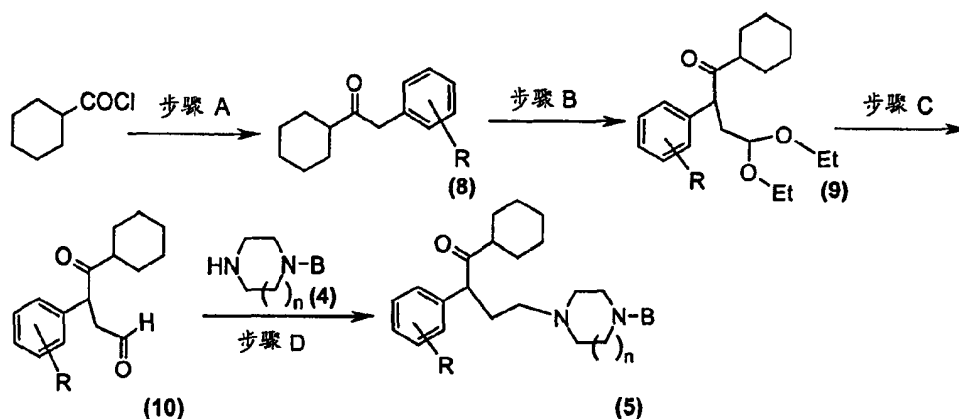
反应优选在惰性气体下优选氮，在非质子溶剂如四氢呋喃，室温或下至-78℃的更低温度进行。

另外，可用取代的苄基氯硼化镁基溴或苄化镁在本领域熟知标准条件下处理
20 结构 AC00 烷基的酯以提供结构(1)的酮。

优选和类似的(1)合成方法是钯催化酰基卤与化合物(7)偶联，其中 M 是卤化锌。

更具体地，通式(5)的化合物可用流程3所述方法制备。除非另有说明，所有取代基如上所定义。本领域普通技术人员可容易获得试剂和起始材料。

流程 3



例如，在流程 3 步骤 A 中，环己烷碳酰氯加入合适苄基氯化锌或溴化锌与适当钯催化剂如二氯二(三苯基膦)钯(II)的混合物，在溶剂如四氢呋喃中 0℃ 搅拌。然后，搅拌在室温连续 4-24 小时。随后骤冷反应，例如用氯化铵饱和水溶液。通过提取的常规工作过程提供酮(8)。可用本领域熟知技术纯化酮(8)，例如硅胶上的急骤层析，用合适的洗脱液如乙酸乙酯/己烷以提供纯化的物质。另外，粗酮(8)可进行到步骤 B。

在流程 3 步骤 B 中，在本领域熟知条件下用溴乙醛二乙基乙缩醛烷化酮(8)以提供结构(9)的化合物。例如，酮(8)溶于合适的有机溶剂如二甲基亚砜或甲苯并用稍过量的合适碱如叔丁氧化钾处理。反应搅拌约 15 到 30 分钟，温度在 0℃ 和溶剂回流温度间，溴乙醛二乙基乙缩醛逐滴加入反应。本领域普通技术人员易理解溴乙醛二乙基乙缩醛、溴乙醛乙烯乙缩醛等可用于取代相应二乙基乙缩醛。

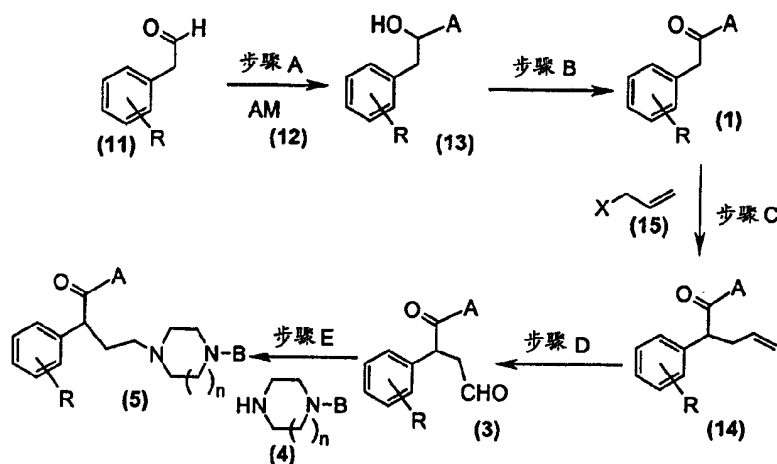
在流程 3 步骤 C 中，在酸性条件下化合物(9)水解以提供醛(10)，方式与流程 I 所述过程类似。具体地，例如，化合物(9)溶于合适的有机溶剂如二氯甲烷并用合适的酸处理，如含水三氟乙酸。反应混合物在室温搅拌约 1 到 6 小时。反应混合物随后用相同溶剂稀释，盐水洗，分离有机层，用无水硫酸钠干燥，过滤并真空浓缩以提供醛(10)。可用本领域熟知技术纯化醛(10)，例如硅胶上的急骤层析，有合适的洗脱液如乙酸乙酯/己烷以提供纯化物质。另外，粗醛(10)可直接用于步骤 D。

在流程 3 步骤 D 中，在本领域熟知条件下用重氮环烷(4)还原性地胺化醛(10)以提供酮(5)，方式与流程 I 所述过程类似。更具体地，例如，醛(10)溶于合适的有机溶剂如二氯甲烷。此溶液中加入约 1.05 或更多当量的重氮环烷(4)。可任选加入乙酸以协助重氮环烷(4)溶解。随后加入约 1.4 到 1.5 当量的三乙酰氧基氢硼化钠且反应在室温搅拌约 3 到 5 小时。然后加入合适的碱来骤冷反应，如碳酸钠

或氢氧化钠溶液以产生约 8 到约 12 的 pH。然后用合适的有机溶剂如二氯甲烷提取骤冷的反应物。混合有机提取物，盐水洗，干燥，过滤并真空浓缩以提供通式(5)的化合物。随后可用本领域熟知技术纯化此物质，例如硅胶上的急骤层析，用合适的洗脱液如乙酸乙酯/石油醚或己烷。

5

流程 4



另外，结构(5)的化合物可用流程 4 所述方法制备。除非另有说明，所有取代基如上所定义。本领域普通技术人员可容易获得试剂和起始材料。

- 10 在流程 4 步骤 A 中，在本领域熟知条件下醛(11)与合适的有机金属试剂结合以提供醇(13)。合适的有机金属试剂的例子包括格利雅试剂、烷基锂试剂、烷基锌试剂等。优选格利雅试剂。典型格利雅试剂和反应条件的例子参见 J. March, 《高级有机化学：反应、机制和结构》(Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure), 第 2 版, McGraw-Hill, 836-841 页(1977)。更具体地，醛(11)溶于合适有机溶剂如四氢呋喃或甲苯，冷却到约-5℃并用约 1.1 到 1.2 当量的通式(12)的格利雅试剂处理，其中 M 是 MgCl 或 MgBr。反应搅拌约 0.5 到 6 小时，随后骤冷，通过熟知的工艺程序分离醇(13)。

- 在流程 4 步骤 B 中，醇(13)在本领域熟知标准条件下氧化，如 J. March, 《高级有机化学：反应、机制和结构》，第 2 版, McGraw-Hill, 1082-1084 页(1977)所述，用于提供酮(1)。[酮(1)是上面流程 1 所用的起始材料。]

例如，也用本领域普通技术人员熟知的标准 Swern 氧化条件进行上面的氧化 (Marx, Tidwell-J. Org. Chem. 49, 788, 1984) 或醇(13)溶于合适的有机溶剂如二氯甲烷，溶液用湿冰-丙酮浴冷却，用 2.5 到 3.0 当量的二甲基亚砷处理。搅拌约

30 分钟后, 反应随后用约 1.8 当量的 P_2O_5 处理。反应搅拌约 3 小时, 然后优选约 3.5 当量的合适胺处理, 如三乙胺。然后移去冷却浴, 反应搅拌约 8-16 小时。通过本领域熟知的标准提取技术分离酮(1)。

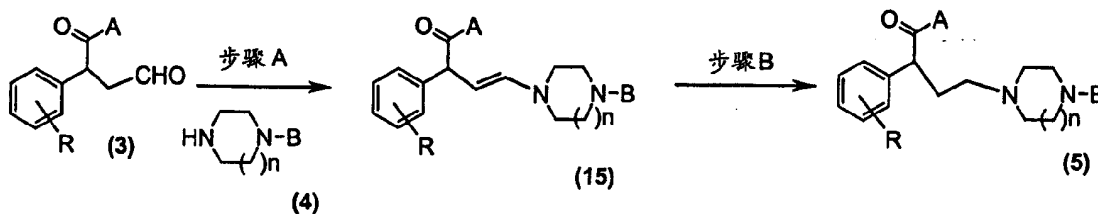
在流程 4 步骤 C 中, 酮(1)然后用合适的碱处理, 接着加入烯烃(15), 其中 X 是合适的离去基团, 用于提供化合物(14)。例如, 酮(1)结合合适有机溶剂如四氢呋喃中的过量烯烃(15), 用湿冰丙酮浴冷却。合适离去基团的例子是 Cl、Br、I、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐等。优选的离去基团是 Cl 和 Br。加入约 1.1 当量的合适碱且反应可在室温搅拌约 2 小时。合适碱的例子是叔丁氧化钾、氢化钠、 $NaN(Si(CH_3)_3)_2$ 、二异丙基氨基化锂、 $KN(Si(CH_3)_3)_2$ 、 $NaNH_2$ 、乙醇钠、甲醇钠等。叔丁氧化钾是优选的合适碱。随后用酸溶液骤冷反应并通过常规工艺程序分离化合物(14)。

在流程 4 步骤 D 中, 化合物(14)用合适的氧化剂处理以提供醛(3)。(醛(3)也在流程 1 中制备)。合适氧化剂的例子是臭氧、 $NaIO_4$ /钨催化剂等。臭氧是优选的氧化剂。合适氧化试剂和条件的例子描述于 J. March, 《高级有机化学: 反应、机制和结构》, 第 2 版, McGraw-Hill, 1090-1096 页(1977)。

例如, 化合物(14)溶于合适的有机溶剂如甲醇, 加入少量 Sudan III, 溶液冷却到约 $-20^\circ C$ 。臭氧起泡到溶液约 4 小时, 直到粉红色变成浅黄色。然后加入还原剂如 Me_2S 或三丁基膦。浓缩产生醛(3)的中间二甲基乙缩醛。此二甲基乙缩醛易在标准酸性条件下水解以提供醛(3)。另外, 直接酸处理粗反应混合物产生醛(3)。另外, 可通过在非缩醛形成溶剂如二氯甲烷中臭氧分解(14)直接获得醛(3)。

在流程 4 步骤 E 中, 在与上面流程 3 步骤 D 所述类似的条件下, 还原性地胺化醛(3), 以提供化合物(5)。(化合物 5 也在流程 I 中制备)。

流程 5



流程 5 提供制备酮(5)的另外合成。除非另有说明, 所有取代基如上所定义。本领域普通技术人员可容易获得试剂和起始材料。

在流程 5 步骤 A 中, 在本领域熟知的标准条件下醛(3)与重氮环烷(4)缩合以

提供烯胺(15)。例如，约 1.05 当量的醛(3)溶于合适的有机溶剂如乙酸异丙酯或异丙醇，加入纯游离碱重氮环烷(4)。加入另外的有机溶剂以生成浆且反应搅拌约 1 到 2 小时。随后通过标准技术分离烯胺(15)，如过滤收集。

在流程 5 步骤 B 中，在本领域普通技术人员熟知的条件下烯胺(15)氢化以提供化合物(5)。例如，烯胺(15)与合适的有机溶剂结合，如异丙醇和 Parr 瓶中碳上催化量的 5%钯。混合物置于 50psi (344850 帕斯卡)氢下并室温振荡约 2 天。然后过滤浆以去除催化剂且浓缩过滤物以提供化合物(5)。

无论以哪种方法制备，酮中间物(5)可转化成通式 I 的相应的终化合物，这是通过与还原剂反应，特定是产生氢阴离子的，如硼氢化钠或 DIBAL-H。

10 这种前面没有分离而还原的酮中间物(5)一般产生非对映立体异构体混合物，其中(RS, SR)对在数量上比(RR, SS)对占优势。随后通过硅凝胶上的柱层析分离(RS, SR)对并分离成单(RS)和(SR)对映异构体，通过例如手性固定相上的层析或本领域技术人员熟知的其它方法。

另外，外消旋酮(5)可通过已知方法分离成其 2 种对映异构体，然后还原(R)-5，
15 优选产生(S, R)对映异构体即本发明的优选对映异构体，且易用物理方法纯化。

立体化学

在流程 1 中，在非对映立体异构体顺/反混合物中获得化合物 I，比例取决于所用反应条件。可通过本领域技术人员已知的常规技术分离非对映立体异构体，包括分部结晶碱或其盐或者层析技术如 LC 或急骤层析。对于 2 种非对映立体异构体，(+)对映异构体可与(-)对映异构体分开，使用本领域熟知技术和方法，如
20 J. Jacques 等，《对映异构体、外消旋物和分离》，John Wiley and Sons, Inc., 1981 所述。例如。手性层析用合适的有机溶剂如乙醇/乙腈和 Chiralpak AD 填充，20 微米，也能用于有效分离对映异构体。

通式 I 的游离碱、其非对映立体异构体或对映异构体可在本领域熟知的标准
25 条件下转变成相应的药学上可接受的盐。例如，通式 I 的游离碱溶于合适的有机溶剂如甲醇，用例如 1 当量马来酸或草酸处理，例如 1 或 2 当量盐酸或甲基磺酸处理，随后真空浓缩以提供相应的药学上可接受的盐。然后可通过从合适的有机溶剂或有机溶剂混合物如甲醇/二乙醚中重结晶来纯化剩余物。

通式 I 的 N-氧化物可通过本领域技术人员熟知的简单氧化方法合成。
30 P. Brougham 等(*Synthesis*, 1015-1017, 1987)所述氧化方法可区分哌嗪环的 2 个氮，能获得 N-氧化物和 N, N' -二氧化物。

以下例子代表上面一般描述的通式 I 化合物的典型合成。这些例子仅用于阐明且不想以任何方式限制发明。本领域普通技术人员可容易获得试剂和起始材料。

实施例 1

5 1-[(SR, RS)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪(具有上 TLC R_f 的非对映立体异构体)(Ex. 1)

1-[(3S, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪(Ex. 1X)

10 1-[(3R, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪(Ex. 1Y)

实施例 2

1-[(RR-SS)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪(具有下 TLC R_f 的非对映立体异构体)(Ex. 2)

15 1-[(3R, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪(Ex. 2X)

1-[(3S, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪(Ex. 2Y)

环己基 2-氟苄基酮(化合物 1a)

20 2.14ml 环己烷碳酰氯经注射器逐滴加入 0℃ 搅拌的 36ml 2-氟苄基氯化锌(四氢呋喃中 0.5M 溶液)与 0.008g 二氯二(三苯基膦)钨(II)的混合物。然后,反应混合物室温搅拌 4 小时,用氯化铵饱和水溶液(25ml)骤冷,20ml EtOAc 提取,(Na₂SO₄)干燥并真空蒸干,产生 3.52g 标题化合物作为粗产物,它可用于下列步骤而不需进一步纯化。

25 ¹H-NMR(CDCl₃, δ): 1.10-2.05(m, 10H), 2.47(tt, 1H), 3.77(s, 2H), 6.97-7.32(m, 4H)

4-环己基-4-氧-3-(2-氟苯基)-丁醛二乙基乙缩醛(化合物 1b)

30 加热 136ml 甲苯中的 5.02g 化合物 1a 的溶液,通过蒸馏去除水来回流回收 35ml 甲苯。然后,加入 3.18g 叔丁氧化钾且继续回流搅拌 30 分钟;反应混合物冷却到 80℃ 并加入 4.27ml 2-溴乙醛二乙基乙缩醛。回流 18 小时后,反应混合物冷却到室温,用氯化铵饱和水溶液(30ml)骤冷,用 30ml EtOAc 提取。干燥(Na₂SO₄)也能用于有效分离对映异构体提取物且真空蒸干,产生的粗产物用急骤层析(石油

醚-EtOAc 92.5:7.5)纯化,产生2.97g纯标题产物。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta)$: 1.00-2.10(m, 17H), 2.20-2.52(m, 2H), 3.30-3.72(m, 4H), 4.25-4.45(m, 2H), 6.90-7.35(m, 4H)

4-环己基-4-氧-3-(2-氟苯基)-丁醛(化合物 1c)

- 5 1.12g 化合物 1b、9ml 50%三氟乙酸水溶液和 18ml CH_2Cl_2 的混合物室温搅拌 2 小时,随后用 10 ml CH_2Cl_2 稀释。分离有机层,盐水洗(2x15ml), (Na_2SO_4)干燥并真空蒸干以产生粗产物(0.88g),粗产物用于下一步骤而不需进一步纯化。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta)$: 0.90-2.10(m, 10H), 2.25-2.70(m, 2H), 3.12-3.52(m, 1H), 4.60-4.80(m, 1H), 6.95-7.40(m, 4H), 9.75(s, 1H)

- 10 1-[4-环己基-4-氧-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪(化合物 1d)

0.88g 化合物 1c、0.84g 盐酸 1-(2-甲氧基苯基)-哌嗪、1.06g 三乙酰氧基硼氢化钠和 33 ml CH_2Cl_2 的混合物室温搅拌 1 小时,静止过夜,用 20%含水 Na_2CO_3 碱化。分离有机层,盐水洗(2x30ml), (Na_2SO_4)干燥并真空蒸干以产生粗产物(1.46g),粗产物用于下一步骤而不需进一步纯化。样品用急骤层析(石油醚-EtOAc 6:4)纯化,产生纯样品。

- 15 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta)$: 1.05-2.00(m, 11H), 2.20-2.44(m, 4H), 2.45-2.72(m, 4H), 2.90-3.20(m, 4H), 3.85(s, 3H), 4.38(t, 1H), 6.80-7.30(m, 8H)

(SR, RS)-1-环己基-4-[4-(2-甲氧基苯基)哌嗪-1-基]-2-(2-氟苯基)丁(烷)-1-醇
(具有上 TLC Rf 的非对映立体异构体)

- 20 和

(RR, SS)-1-环己基-4-[4-(2-甲氧基苯基)哌嗪-1-yl]-2-(2-氟苯基)丁烷-1-醇
(具有下 TLC Rf 的非对映立体异构体)

- 25 33ml 甲醇中的 1.46g 化合物 1d 的溶液在 0℃搅拌,加入 0.19g 硼氢化钠且混合物室温搅拌 4 小时。蒸发溶剂,反应粗产物用水吸收并用 EtOAc 提取。分离有机层,盐水洗(2x15ml), (Na_2SO_4)干燥并真空蒸干以产生粗产物,粗产物通过连续急骤层析(甲醇中的石油醚-EtOAc-2 N 氨 75:25:2;甲醇中的石油醚-EtOAc-2 N 氨 80:20:2;)纯化,生成 0.82g 实施例 1 的化合物(上 TLC Rf;洗脱液:甲醇中的石油醚-EtOAc-2 N 氨 70:30:2),接着是 0.062g 实施例 2 的化合物(下 TLC Rf;相同洗脱液)。

- 30 Ex. 1: $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta)$: 0.80-1.40(m, 6H), 1.50-1.82(m, 4H), 1.85-2.10(m, 3H), 2.21-2.45(m, 2H), 2.52-2.85(m, 4H), 2.98-3.26(m, 4H), 3.28-3.42(m,

1H), 3.50-3.60(m, 1H), 3.85(s, 3H), 6.80-7.30(m, 7H), 7.62-7.80(m, 1H);
检测到 OH 峰

Ex. 2: $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta)$: 0.75-2.00(m, 13H), 2.00-2.30(m, 1H), 2.31-2.55(m, 2H), 2.56-2.95(m, 4H), 3.00-3.30(m, 4H 和 OH), 3.60(dd, 1H), 3.85(s, 3H),
5 6.80-7.38(m, 8H)

1-[(3S, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪
(实施例 1X)

获得此化合物是通过手性柱层析实施例 1 的化合物, 使用 Chiralpak AD(0.46x25cm), 用 n-己烷-EtOH 95:5 洗脱(流进=0.5ml/分钟; 检测器 UV 247nm)。

10 1-[(3R, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪
(实施例 1Y)

获得此化合物是通过手性柱层析实施例 1 的化合物, 使用 Chiralpak AD(0.46x25cm), 用 n-己烷-EtOH 95:5 洗脱(流进=0.5ml/分钟; 检测器 UV 247nm)。

15 1-[(3R, 4R)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪
(实施例 2X)

获得此化合物是通过手性柱层析实施例 2 的化合物, 使用 Chiralpak AD(2x25cm), 用 n-己烷-乙醇 85:15 洗脱(流进=8ml/分钟; 检测器 UV 254nm)。

1-[(3S, 4S)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪
(实施例 2Y)

20 获得此化合物是通过手性柱层析实施例 2 的化合物, 使用 Chiralpak AD(2x25cm), 用 n-己烷-乙醇 85:15 洗脱(流进=8ml/分钟; 检测器 UV 254nm)。

以其盐与溴化氢形式的化合物 1X 和 2Y 的绝对立体化学通过单晶 X 光衍射确定如下。

单晶 X 光衍射实验:

25 选择针形单晶用于 X 光衍射分析并置于玻璃纤维上。收集 Rigaku Rapid 圆柱形图象板 X 光区检测器上的数据, 检测器孔径=45.0 x 25.6 cm。它由以 Windows 2000 为基础的 PC 电脑在低温(-120° K)控制, 电脑具有 Rapid Auto 版本 1.06 软件(Rigaku, 2000), 有 Micromax-002 微共聚焦镜 CuK α 辐射[λ (CuK α)=1.5405 Å]。从暴露 360 秒的三个 3° 振动框进行指数标定。所有反射在 5 个图象组中测量, 各
30 组有 6 个框; 暴露时间是 160 秒每度。其中, 5 组图象在角 $\phi=0^\circ$ 、 90° 、 180° 、 270° , $\chi=50^\circ$ 和 $\phi=0^\circ$ $\chi=0^\circ$, 所有框是 $\delta\Omega=30^\circ$, 使 $2\theta_{max}=136.3^\circ$ 。

样品/检测器距离为 12.74cm。数据简化程序 Rapid Auto 版本 1.06(Rigaku, 2000), 确定的 Laue 组是-1, 汇集总共 7, 98 6 个反射用于结构解答和加细。

单晶结果:

- 结构通过直接方法解答, 使用 SIR92(Altomare 等 1994)。所有计算用
- 5 CrystalStructure 3.0(MSC/Rigaku, 2002; Watkin 等, 1996, Carruthers 和 Watkin, 1979) 晶体软件包进行。试验解答获得不对称单位中的 38 个非氢原子。最小二乘方加细包括所有非氢原子配位和各向异性热参数。对 F 的完全矩阵最小二乘加油的终循环以 6, 297 个反射为基础, $I > 3\sigma(I)$, 用一致性因子收敛: $R=0.071$, $S=2.224$, $R_w=0.073$ 。用计算的 Flack x 参数确定绝对构型, 此参数是 0.00 具有 $esd=0.04$ 。
- 10 用于纠正的预期值是 0.0(3 esd 内), 用于反向绝对结构的值是 +1.0。

参考文献:

- Altomare, A., Cascarano, G., Giacovazzo, C. Guagliardi, A., Burla, M., Polidori, G., 和 Camalli, M., (1994) SIR92, J. Appl. Cryst., 27, 435.
- Carruthers, J. R. 和 Watkin, D. J. (1979), Acta Cryst, A35, 698-699.
- 15 Rigaku(2000), Rapid Auto, Rigaku Corporation, Tokyo, Japan.
- Rigaku 和 Rigaku/MS, (2000-2002), 晶体结构分析软件, 晶体结构版本 3.00, Rigaku/MS, 9009 New Trails Drive, The Woodlands, TX, USA 77381-5209.
- Rigaku, 3-9-12 Akishima, Tokyo 196-8666, Japan.
- Watkin, D. J., Prout, C. K. Carruthers, J. R. & Betteridge, P. W., CRYSTALS Issue
- 20 10, Chemical Crystallography Laboratory, Oxford, UK.

实施例 3

1-[(RS, SR)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪(具有上 TLC R_f 的非对映立体异构体)

实施例 4

- 25 1-[(RR, SS)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪(具有下 TLC R_f 的非对映立体异构体)

1-[4-环己基-4-氧-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪(化合物 3a)

- 遵循化合物 1d 所述方法制备标题化合物, 但用 1-(2, 2, 2-三氟乙氧基苯基)-
- 30 哌嗪 HCl 而不是盐酸 1-(2-甲氧基苯基)-哌嗪。用急骤层析(石油醚-EtOAc 7:3)纯化产生标题化合物(51%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta): 1.00-1.85(\text{m}, 10\text{H}), 1.86-2.05(\text{m}, 1\text{H}), 2.20-2.44(\text{m}, 4\text{H}), 2.45-2.70(\text{m}, 4\text{H}), 2.95-3.18(\text{m}, 4\text{H}), 4.25-4.60(\text{m}, 3\text{H}), 6.850-7.30(\text{m}, 8\text{H})$
 1-[(RS, SR)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪(具有上 TLC Rf 的非对映立体异构体)

5 和

1-[(RR, SS)-4-环己基-4-羟基-3-(2-氟苯基)-丁基]-4-[2-(2, 2, 2-三氟乙氧基)-苯基]-哌嗪(具有下 TLC Rf 的非对映立体异构体)

用实施例 1 和 2 化合物所述方法合成标题化合物, 但使用化合物 3a 作为起始材料而不是化合物 1d。用急骤层析(甲醇中的石油醚-EtOAc-2 N 氨 60:40:2)纯化
 10 产生实施例 3 的化合物, 作为具有上 Rf 的非对映立体异构体(79%); 实施例 4 的化合物作为具有下 Rf 的非对映立体异构体, 含此化合物的部分用急骤层析(甲醇中的石油醚-EtOAc-2 N 氨 75:25:2)纯化以产生纯产物(3.5%)。

Ex. 3: $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta): 0.80-1.40(\text{m}, 6\text{H}), 1.45-1.80(\text{m}, 4\text{H}), 1.85-2.10(\text{m}, 3\text{H}), 2.21-2.45(\text{m}, 2\text{H}), 2.50-2.75(\text{m}, 4\text{H}), 2.95-3.26(\text{m}, 4\text{H}), 3.30-3.42(\text{m}, 1\text{H}), 3.50-3.60(\text{m}, 1\text{H}), 3.70-4.30(\text{br}, 1\text{H}, \text{OH}), 4.38(\text{q}, 2\text{H}), 6.85-7.30(\text{m}, 7\text{H}), 7.65-7.75(\text{m}, 1\text{H})$
 15

Ex. 4: $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta): 0.75-1.95(\text{m}, 12\text{H}), 2.05-2.90(\text{m}, 7\text{H} \text{ 和 } \text{OH}), 3.00-3.30(\text{m}, 5\text{H}), 3.65(\text{d}, 1\text{H}), 4.38(\text{q}, 2\text{H}), 6.85-7.40(\text{m}, 8\text{H})$

实施例 5(比较)

20 1-[(RS, SR)-4-环己基-4-羟基-3-苯基-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪
苄基环己基酮(化合物 5a)

5mg 二-三苯基膦二氯化钨和 0.66ml 环己烷碳酰氯于 0°C 加入 11ml 无水四氢呋喃中的 0.5M 苄基溴化锌溶液。混合物室温搅拌 1.5 小时, 用氯化铵饱和溶液骤冷且用乙酸乙酯提取。收集的有机层用水洗, (Na_2SO_4)干燥并真空蒸发溶剂。粗产
 25 物用急骤层析纯化, 用石油醚-EtOAc 95:5 洗脱以产生 0.78g (52%) 标题化合物。

$^1\text{H-NMR}(200\text{MHz}, \text{CDCl}_3, \delta): 1.09-1.92(\text{m}, 10\text{H}), 2.32-2.53(\text{m}, 1\text{H}), 3.72(\text{s}, 2\text{H}), 7.12-7.39(\text{m}, 5\text{H})$

4-环己基-4-氧-3-苯基-丁醛二乙基乙缩醛(化合物 5b)

0.37g 60%氢化钠油分散体室温加入 30ml 无水二甲基甲酰胺中的 1.78g 化合物 5a
 30 的溶液中, 混合物室温搅拌 1 小时。加入 1.46ml 2-溴乙醛二乙基乙缩醛, 混合物室温搅拌 1 小时且 80°C 搅拌 1 小时, 冷却到室温, 用水骤冷且用 EtOAc 提取。收

集的有机层用水洗, (Na₂SO₄)干燥并真空蒸发溶剂。粗产物用急骤层析纯化, 用石油醚-EtOAc 95:5 洗脱以产生 1.17g (42%) 标题化合物。

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ): 1.01-1.98 (m, 17H), 2.28-2.48 (m, 2H), 3.30-3.71 (m, 4H), 3.98 (t, 1H), 4.25 (t, 1H), 7.12- 7.39 (m, 5H)

5 4-环己基-4-氧-3-苯基-丁醛(化合物 5c)

10ml 丙酮中的 1.17g 化合物 5b 溶液和 22.1ml 2N HCl 的溶液室温搅拌 5 小时。静止过夜后, 用 EtOAc 提取含水层。收集的有机层用水洗, (Na₂SO₄)干燥并真空蒸发溶剂以产生 0.84g (100%) 标题化合物, 化合物直接使用而不需进一步纯化。

1-(4-环己基-4-氧-3-苯基-丁基)-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪(化合物 5d)

- 10 1.48g 三乙酰氧基硼氢化钠和 0.98ml 乙酸加入 30ml 二氯甲烷中的 0.84g 化合物 5c 和 1.19g 1-(2-甲氧基苯基)-哌嗪的溶液中, 所得混合物室温搅拌 5 小时。静止过夜后, 有机层用过量 1M NaOH 洗, 随后用水洗, (Na₂SO₄)干燥并真空蒸发溶剂。粗产物用急骤层析纯化, 用石油醚-EtOAc 7:3 洗脱以产生 1.45g (99%) 标题化合物。
- ¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ): 1.01-2.05 (m, 11H), 2.20-3.30 (m, 12H), 3.82 (s, 3H), 3.91- 4.02 (m, 1H), 6.75-7.08 (m, 4H), 7.12- 7.39 (m, 5H)

1-[(RS, SR)-4-环己基-4-羟基-3-苯基-丁基]-4-(2-甲氧基苯基)-哌嗪

11.5ml 甲苯中的 1M 二异丁基氢化铝 (DIBAL-H) 溶液在 -78°C 滴入 60ml 二氯甲烷中的 1.21g 化合物 5d 的溶液中。混合物在 -78°C 搅拌 1 小时, 用 NH₄Cl 饱和水溶液于 -60°C 骤冷, 用氯仿提取。收集的有机层用水洗, (Na₂SO₄)干燥并真空蒸发溶剂。

- 20 粗产物用急骤层析纯化, 用甲醇中的石油醚-EtOAc-2 N 氨 30:70:2 洗脱以产生 1.06g (80%) 标题化合物。

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ): 1.01-1.38 (m, 6H), 1.51-1.78 (m, 4H), 1.86-2.02 (m, 3H), 2.22-2.38 (m, 3H), 2.52-2.78 (m, 4H), 2.75-2.95 (m, 1H), 3.02-3.20 (m, 4H), 3.48 (t, 1H), 3.82 (s, 3H), 6.80-7.03 (m, 4H), 7.10- 7.38 (m, 5H)

25 **实施例 6: 放射性配基结合不同受体**

6A. 人重组 5-HT_{1A}受体

方法:

- 编码人重组 5-HT_{1A}-5-羟色胺能受体的基因组克隆在人细胞系(海拉细胞)中稳定转染。海拉细胞在 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 中 37°C 5%二氧化碳单层生长, DMEM 含 10%胎牛血清、庆大霉素 (0.1mg/ml)。95%汇合时通过细胞刮器使细胞脱离生长瓶并在冷的 5mM Tris 和 5mM EDTA 缓冲液 (pH7.4) 中裂解。匀浆以 40000
- 30

x g x 20 分钟离心且沉淀重悬浮于小体积的冷 5mM Tris 和 5mM EDTA 缓冲液 (pH7.4), 立即冷冻并-70℃贮存直到使用。

[³H]8-OH-DPAT 结合: 在实验当天, 细胞膜重悬浮于培养缓冲液: 50mM Tris HCl (pH7.4)、2.5mM MgCl₂、10mM 帕吉林 (Fargin 等, *Nature* 335, 358-360, 1988)。

- 5 膜在 1ml 的终体积中用 1nM [³H]8-OH-DPAT 于 30℃培育 30 分钟, 没有或存在测试化合物。非特异结合在 10 μM 5-HT 存在时确定。通过加入冷 Tris HCl 缓冲液终止培育并经 0.2% 聚乙烯亚胺-预处理的 Whatman-GF/B 或 Schleicher-&-Schuell-GF52 滤器快速过滤。

- 测试化合物的亲和性通过抑制放射性配体特异结合 5-HT_{1A} 受体 (IC₅₀) 评估, 使用非线性曲线拟合程序 (De Lean 等, *Am. J. Physiol.* 235, E97-E102, 1978)。IC₅₀ 值根据 Cheng 等的等式转化成亲和性常数 (K_i) (*Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108, 1973)。

- [³⁵S]GTP γ S 结合: 在实验当天, 来自用人克隆 5-HT_{1A} 受体转染的海拉细胞的细胞膜重悬浮于缓冲液 pH7.4, 缓冲液含 20mM HEPES、3 mM MgCl₂ 和 120mM NaCl (Stanton, J. A.; Beer, M. S. *Eur. J. Pharmacol.* 320, 267-275, 1997)。膜用 10 μM GDP 在约 0.25ml 终体积中 30℃培育 20 分钟, 测试药物浓度减少 (从 100 μM 到 0.1nM) 或 5-HT 浓度减少 (从 100 μM 到 0.1nM, 参考曲线)。[³⁵S]GTP γ S (10 μl 中的 200-250pM) 加入样品并于 30℃再培养 30 分钟。非特异结合在 10 μM GTP γ S 存在时确定。通过加入冷 HEPES 缓冲液终止培育并在 Unifilter GF/C 滤器上快速
20 过滤, 使用 Filtermate 细胞收集器 (Packard)。滤器用总共 1.2ml 相同缓冲液洗 4 次。通过液体闪烁光谱测定计数放射性, 效率>90% (Top Count Packard)。测试化合物诱导的 [³⁵S]GTP γ S 结合的刺激表示为结合的%增加在基值以上, 用 5-HT 观察到的最大刺激作为 100%。通过非线性拟合程序分析激动剂活性的浓度-反应曲线 (De Lean 等, *Am. J. Physiol.* 235, E97-E102, 1978)。

- 25 刺激 [³⁵S]GTP γ S 结合表示激动剂化合物在 5-HT_{1A} 受体结合的功能相关。认为内源性配基 5-HT 诱导的刺激是可达到的最大刺激。认为在较低水平刺激 [³⁵S]GTP γ S 结合的化合物是部分激动剂。认为不刺激 [³⁵S]GTP γ S 结合的化合物是中性拮抗剂。

结果

- 30 表 1 报导的结果显示测试的发明化合物对 5-HT_{1A} 受体有高亲和性。Ex. 1、Ex. 1Y、Ex. 2 和 Ex. 2X 的化合物比 Ex. 5 更有效 (统计显著性 p<0.01)。关于 [³⁵S]GTP

γ S 结合, Ex. 1X 和 2Y 的化合物是诱导刺激 [^{35} S]GTP γ S 结合的部分激动剂。其它化合物不刺激 [^{35} S]GTP γ S 结合, 表现为中性拮抗剂。

表 1

在 5-HT_{1A} 受体结合

化合物	亲和性: Ki (nM)	功能效果 ([^{35} S]GTP γ S 结合)
Ex. 1	0.13	中性拮抗剂
Ex. 1X	0.50	部分激动剂
Ex. 1Y	0.37	中性拮抗剂
Ex. 2	0.29	中性拮抗剂
Ex. 2X	0.24	中性拮抗剂
Ex. 2Y	0.98	部分激动剂
Ex. 3	0.29	中性拮抗剂
Ex. 4	0.68	中性拮抗剂
Ex. 5	0.65	中性拮抗剂

5

6B. 人重组 α_1 -肾上腺素受体亚型

方法:

与克隆的人 α_1 -肾上腺素受体亚型的结合在来自 CHO 细胞(中国仓鼠卵巢细胞)的膜中进行, CHO 细胞通过电穿孔转染 DNA, DNA 表达编码各 α_1 -肾上腺素受体亚型的基因。克隆和稳定表达人 α_1 -肾上腺素受体基因如前所述进行(Testa 等, Pharmacol. Comm., 6:79-86, 1995)。

CHO 细胞悬浮生长于 Iscove 改良的 Dulbecco 培养基, 培养基补充 10%胎牛血清、艮大霉素(50 μ g/ml), 在增湿培养箱中 37°C 7%CO₂ 生长。离心收集细胞, 在冰冷 Tris 5mM 和 EDTA 5mM 缓冲液(pH7.4)中裂解并温和匀浆。匀浆液以 40000 x g x 20 分钟离心且沉淀重悬浮于小体积的冰冷 Tris 5mM 和 EDTA 5mM 缓冲液(pH7.4), 立即冷冻并-80°C 贮存直到使用。

CHO 细胞膜重悬浮于 50mM Tris, pH7.4, 有 0.2nM [^{3} H]哌唑嗪, 终体积为 1.02ml, 于 25°C 培育 30 分钟, 没有或存在竞争性药物。非特异结合在 10 μ M 芬妥胺存在时确定。经 0.2%聚乙烯亚胺预处理的 Schleicher & Schuell GF52 滤器快速过滤终止培育, 使用 Tomtec(PerkinElmer)细胞收集器。滤器用 3x1ml 冰冷 Tris 缓冲液洗, 干燥, 在 Betplate(Wallac)液体闪烁计数器中测量放射性。

分析化合物抑制特异结合以通过非线性曲线拟合程序 Allfit 估计 IC₅₀ 值(De Lean 等, Am. J. Physiol. 235, E97-E102, 1978)。IC₅₀ 值根据 Cheng 和 Prusoff 的

等式转化成亲和性常数(Ki) (Biochem. Pharmacol. **22**, 3099-3108 , 1973)。

结果

表 2 报导的结果显示测试的发明化合物对 α₁-肾上腺素受体亚型有不同亲和性，以 α_{1d}-亚型特别有效。发明化合物的选择性(作为 α₁-肾上腺素受体亚型 Ki 值与 5-HT_{1A}受体 Ki 值间的比例评估)一般比先有技术中所述化合物好(Ex. 5)。

表 2

对 α₁-肾上腺素受体亚型的结合亲和性(Ki, nM)和相对 5-HT_{1A}受体的选择性

化合物	α _{1a}	α _{1b}	α _{1d}	α _{1a} /5-HT _{1A}	α _{1b} /5-HT _{1A}	α _{1d} /5-HT _{1A}
Ex. 1	18	5.9	1.0	138	45	7.7
Ex. 1Y	24	11	1.2	65	30	3.2
Ex. 2X	44	11	0.5	183	46	2.1
Ex. 5	51	12	0.5	78	18	0.8

6C. 大鼠重组 D₃多巴胺受体

方法:

使用 CHO 细胞中永久表达的克隆大鼠 D₃多巴胺受体(Chio 等, *Mol. Pharmacol.* **45**, 51-60, 1994)。制备膜是通过在冰冷的 50mM Tris、5mM EDTA、5mM EGTA, pH7.4 中机械破裂细胞沉淀，接着是低(1000g)、中等(20000g)和高(80000g)速离心步骤。竞争放射性配体结合实验使用 11 个药物浓度运行，在闪烁近似测定(SPA)模式中进行两次。所用放射性配体是 [³H]-7-OH-DPAT(154 Ci/mmol)。非特异结合(总数的 75%-95%)用过量加入的冷氟哌啶醇(3 μM)确定。终止培养确定总结合用缓冲液：20mM HEPES、10mM MgSO₄、150mM NaCl 、1mM EDTA(pH 7.4)。通过加入 11 μl 药物稀释剂、11 μl 放射性配体和 178 μl 膜/SPA 珠悬浮液(100mg WGA-涂敷的 SPA 珠，用 10ml 结合缓冲液中的 5-15 μg 蛋白/板室温孵育 30 分钟，接着低速离心并重悬于 2ml 结合缓冲液)在灵活的 96 孔 Wallac Micro-Beta 板中制成结合混合物。密封和室温孵育 1 小时后，板在 Wallac Micro-Beta 闪烁计数器中计数。

估计 2 种测定方法的 IC₅₀ 值，这是通过将数据与一位点竞争模型拟合： $Y=T/(1+10^{log(X)-log(IC50)})$ ，其中 Y 是在浓度 X 时的特异 CPM 结合且 T 是没有竞争物时的特异 CPM 结合。用 Cheng-Prusoff 等式计算抑制常数(Ki) (Biochem. Pharmacol. **22**, 3099-3108 , 1973)。

结果

表 3 报导的结果显示测试的发明化合物对多巴胺能受体的 D₃亚型有亲和性。

发明化合物的选择性(作为 D₃-多巴胺能受体亚型 Ki 值与 5-HT_{1A}受体 Ki 值间的比例评估)经先有技术中所述化合物好(Ex. 5)。

表 3

对 D₃多巴胺受体的结合亲和性和相对 5-HT_{1A}受体的选择性

化合物	Ki (nM)	D ₃ /5-HT _{1A}
Ex. 1	12.5	96
Ex. 1Y	20	54
Ex. 2X	3	12
Ex. 5	7	11

5

实施例 7: 麻醉大鼠中膀胱充盈诱导的对节律性膀胱-排尿收缩的影响

A. 方法:

使用重 225-275g 的雌性 Sprague-Dawley 大鼠(Cr1:CD (SD) IGS BR, Charles River Italia)。安排动物居住,可自由获得食物和水且维持至少 1 周在 22-24℃
 10 的强制性 12 小时交替亮-暗循环,除了在实验期间。根据 Dray 方法(Dray, *Pharmacol. Methods*, **13**:157, 1985)评估对节律性膀胱-排尿收缩的活性,相对 Guarneri(Guarneri, *Pharmacol. Res*, **27**:173, 1993)有一些修改。简要地,通过皮下注射 1.25g/kg(5ml/kg)氨基甲酸乙酯麻醉大鼠,之后经尿道将导管插入尿膀胱,用充满生理盐水的 PE 50 聚乙烯管。导管在外尿道孔周围用结扎线原位打结
 15 并连接到常规压力变换器(Statham P23 ID/P23 XL)。膀胱内压力在图表记录器(Battaglia Rangoni KV 135, 装有 DCI/TI 放大器)上连续显示。随后经记录导管通过温(37℃)盐水体积增加填充膀胱,直到发生反射性膀胱-排尿收缩(通常 0.8-1.5ml)。对于静脉内注射生物活性化合物,充满生理盐水的 PE 50 聚乙烯管插入颈静脉。

20 根据膀胱内压测量图,评估治疗前(基值)和治疗后 15 分钟记录的收缩数以及这些收缩的平均幅度(平均峰高,以 mmHg)。

由于大部分化合物产生的效果在开始时相对迅速且导致膀胱收缩完全停止,通过测量膀胱静止的持续时间(即没有收缩发生的时间长度)可方便估计生物活性。也记录测试动物的数量,显示出收缩数减少高于基本阶段中观察到的终止培养。
 25 养。

为比较测试化合物抑制膀胱排尿收缩的效力,通过线性回归用最小二乘方法计算导致收缩消失 10 分钟的等有效剂量(ED_{10 分钟})。诱导 50%治疗大鼠中收缩数减

少大于 30%的外推剂量 (ED₅₀) 通过 Bliss 方法 (Bliss C.I. , *Quart J. Pharm. Pharmacol.* **11**:192-216, 1938) 评估。

B. 结果

氨基甲酸乙酯-麻醉大鼠中的尿膀胱的迅速膨胀产生一系列节律性膀胱-排尿收缩，其特征被描述 (Maggi 等, *Brain Res.* 380:83, 1986; Maggi 等, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* , **230**: 500, 1984)。这些收缩频率涉及反射排尿的感觉传入臂和排尿中心的完整性，而其幅度取决于反射传出臂的功能。在此模型系统，主要作用于中枢神经系统的化合物(如吗啡)引起排尿收缩阻断，其中在逼尿肌水平作用的药物降低膀胱收缩幅度，如羟丁宁。

施用先有技术化合物和发明化合物后获得的结果示于表 4。

发明化合物优于阻断体积诱导的节律性膀胱收缩的参考标准。Ex. 1Y 比 Ex. 5 更有效，其诱导收缩消失 10 分钟的外推剂量至少低 2 倍。此外，施用 0.3mg/kg Ex. 1Y 后，膀胱收缩消失 24 分钟，而施用 0.3mg/kg Ex. 5 后，此时间仅为 14 分钟。

与发明化合物相比，羟丁宁有以剂量相关方式减小收缩幅度的效果，ED₅₀ 值(诱导 50%治疗大鼠中收缩幅度减少超过 30%的外推剂量)为 240 μg/kg。在此剂量，羟丁宁不引起膀胱收缩的阻断且这是由于不同于发明化合物的特定作用机制(抗毒蕈碱性)。

表 4
静脉内施用后对节律性膀胱-排尿收缩的效果

数据代表 ED_{10 分钟} 值(诱导收缩消失 10 分钟的外推剂量)、ED₅₀(频率)值(诱导 50% 治疗大鼠中收缩数减少>30%的外推剂量)和 ED₅₀(幅度)值(诱导 50%治疗大鼠中收缩幅度减少 30%的外推剂量)。

化合物	ED _{10 分钟} μg/kg	ED ₅₀ (频率) μg/kg	ED ₅₀ (幅度) μg/kg
Ex. 1	198	30	n. a.
Ex. 1Y	23	15	n. a.
Ex. 5	66	18	n. a.
黄酮哌酯	>10000	2648	n. a.
羟丁宁	7770	>10000	240

n. a. =无活性；峰高度无显著降低

实施例 8：有知觉大鼠中口服后对膀胱内压测量参数的效果

A. 方法：

使用重 300-400g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠[Cr1:CD (SD) IGS BR]，由 Charles River Italia 提供。安排动物居住，可自由获得食物和水且维持在 22-24
5 °C 的强制性 12 小时亮/12 小时暗循环，除了在实验期间。为定量有知觉大鼠中的尿动力学参数，根据前面报导的方法 (Guarneri 等, Pharmacol. Res, 24:175, 1991) 进行膀胱内压测量研究。

简要地，通过腹膜内施用 3ml/kg Equithensin 溶液 (戊巴比妥 30mg/kg 和水合氯醛 125mg/kg) 麻醉大鼠并置于仰卧位。在刮过和干净的腹壁中进行约 10mm 长的
10 的中线切开。从粘连组织中轻轻脱离尿膀胱，清空且随后经膀胱体内切开插入导管，使用聚乙烯插管 (0.58mm 内径, 0.96mm 外径)，它用丝线永久性缝合。通过肩胛后区域中的皮下通道使插管外置，其中插管连接塑料适配器以避免被动物移动的危险。对于药物测试，大鼠在移植后一天使用。

在实验当天，大鼠置于改良的 Bollman 笼，即限制笼大到足以使大鼠接受正
15 常蜷缩姿势但窄到足以防止转向。约 20 分钟稳定段后，膀胱插管的自由顶端经 T 形管连接到压力变换器 (Statham P23 XL) 和蠕动泵 (Gilson minipuls 2)，用于连续输注温 (37°C) 盐水溶液到尿膀胱中，恒定速度为 0.1ml/分钟。盐水输注入膀胱期间的管腔内压力信号在多导记录仪 (有 BM614/2 放大器的 Rectigraph-8K San-ei, 来自 Biomedica Mangoni) 上连续记录。膀胱内压测量图用于评估膀胱体
20 积容量 (BVC) 的尿动力学参数和排尿压力 (MP)。BVC (ml) 定义为排尿后诱导逼尿肌收缩所必需的输注到膀胱中的盐水体积。MP (mmHg) 定义为排尿中收缩引起的最大膀胱内压力。基底 BVC 和 MP 值作为 30-60 分钟起始阶段记录的膀胱内压测量图中观察到的平均值评估。确定基本 BVC 和 MP 后，中断输注且通过胃管口服测试化合物。恢复膀胱输注，从治疗后 1、2、3、4 和 5 小时中观察到的膀胱内压测量图所
25 得平均值评估 BVC 和 MP 的变化。化合物以 2ml/kg 体积施用且对照动物组口服接受相同量的载体 (水中的 0.5% 美素希尔)。

结果示于附图，其中：

图 1 是口服载体 (圆形) 或 10.0mg/kg 实施例 1 化合物 (1-环己基-4-[4-(2-甲
氧基苯基)-1-哌嗪]-2-(2-氟苯基) 丁烷-1-醇；上 TLC Rf) (正方形) 后大鼠中的 BVC
30 和 MP 时程。数据代表在不同治疗时间相对基值的 % 变化。“n”= 大鼠数/组。以 $P < \dots$ 表示的显著性 (治疗间：对比变量的 ANOVA) 指示对照 (载体) 和治疗组中观察到的趋

势间的差异。星号(*=p<0.05, **=p<0.01 和***=p<0.001)表明报告时间观察值与基值间的显著性(治疗内)。

图2是口服载体(圆形)或3.0mg/kg 羟丁宁(正方形)后大鼠中的BVC和MP时程。数据如图1所示。

5 统计分析

数据表示为平均值±标准误差。也评估各大鼠/时间的BVC和MP相对基值的百分比变化以及BVC和MPΔ值(ml或mmHg差异)(时间“x”的BVC和MP减去基值)。在图中,数据报导为相对基值的%变化。

也通过S.A.S./STAT软件6.12版本进行统计分析BVC和MP值以及Δ值。载体(对照)和测试治疗间的观察差异在BVC和MP的Δ值上评估,而不同时间值相对基值间的差异在原始BVC和MP数据上分析。

实施例9:

大鼠中对8-OH-DPAT诱导的刻板型(节律性前爪踩踏)的抑制作用(突触后拮抗作用)

15 A. 方法:

5-HT_{1A}受体拮抗剂对大鼠中皮下注射8-OH-DPAT诱导的刻板型前爪踩踏的抑制作用通过Tricklebank方法评估(Tricklebank等, *Eur. J. Pharmacol.*, **117**:15, 1985),方法如下述有小修改。

使用重150-175g的雄性Sprague-Dawley大鼠[Cr1:CD(SD)IGS BR],来自Charles River Italia。安排动物居住,可自由获得食物和水且维持在22-24℃的强制性12小时亮/12小时暗循环。实验当天,在施用载体和待测试化合物前10-15分钟,大鼠单独置于干净的塑料容器。为评估静脉内或口服后的拮抗活性,8-OH-DPAT(1mg/kg皮下)诱导刻板前1和4小时施用化合物。观察持续30秒并8-OH-DPAT处理后3分钟开始,在15分钟段中每3分钟重复。

25 注意到出现突触后刺激5-HT_{1A}受体诱导的症状,强度用强度等级打分,其中:0=没有,1=不确定,2=存在且3=强。治疗大鼠的行为分数在整个观察时间(5个观察段)中积累且表示为4只大鼠/剂量的平均值。治疗动物的平均值相比对照(载体)组的变化表示为百分比抑制,用于定量拮抗活性,

B. 结果:

30 结果示于表5。这些结果证明施用发明化合物产生显著和长期的突触后5-HT_{1A}受体拮抗活性。为评估发明化合物抑制8-OH-DPAT诱导刻板型(节律性前爪踩踏)

的效力,用最小二乘法通过线性回归估计 ED_{75} 值(抑制75%前爪踩踏的等效剂量)。

静脉内施用后, Ex. 2X、Ex. 1Y 和 Ex. 5 的化合物几乎等效。口服后, Ex. 1Y 比 Ex. 5 更有效, 特别是在施用后 4 小时。

表 5

5

抑制大鼠中 8-OH-DPAT 诱导的前爪踩(突触后拮抗作用)

化合物	剂量 (mg/kg)	前爪踩的%抑制	
		1 小时	4 小时
Ex. 1	10 p. o.	100	96
Ex. 1	3 p. o.	84	72
Ex. 1	1 p. o.	35	37
Ex. 1	1 h p. o. : $ED_{75}=3.3\text{mg/kg}$ / 4 h p. o. : $ED_{75}=4.0\text{mg/kg}$		
Ex. 1Y	0.3 i. v.	100	84
Ex. 1Y	0.1 i. v.	100	65
Ex. 1Y	0.03 i. v.	72	35
Ex. 1Y	0.01 i. v.	37	11
Ex. 1Y	1 h i. v. : $ED_{75}=0.038\text{mg/kg}$ / 4 h i. v. : $ED_{75}=0.182\text{mg/kg}$		
Ex. 1Y	3 p. o.	92	85
Ex. 1Y	1 p. o.	58	38
Ex. 1Y	0.3 p. o.	18	18
Ex. 1Y	1 h p. o. : $ED_{75}=1.7\text{mg/kg}$ / 4 h p. o. : $ED_{75}=2.6\text{mg/kg}$		
Ex. 2X	0.3 i. v.	100	89
Ex. 2X	0.1 i. v.	100	63
Ex. 2X	0.03 i. v.	65	49
Ex. 2X	0.01 i. v.	39	6
Ex. 2X	1 h i. v. : $ED_{75}=0.041\text{mg/kg}$ / 4 h i. v. : $ED_{75}=0.152\text{mg/kg}$		
Ex. 5	0.3 i. v.	100	85
Ex. 5	0.1 i. v.	100	72
Ex. 5	0.03 i. v.	82	54
Ex. 5	0.01 i. v.	41	26
Ex. 5	1 h i. v. : $ED_{75}=0.032\text{mg/kg}$ / 4 h i. v. : $ED_{75}=0.138\text{mg/kg}$		
Ex. 5	3	90	67
Ex. 5	1	42	46
Ex. 5	0.3	8	20
Ex. 5	1 h p. o. : $ED_{75}=2.1\text{mg/kg}$ / 4 h p. o. : $ED_{75}=4.6\text{mg/kg}$		

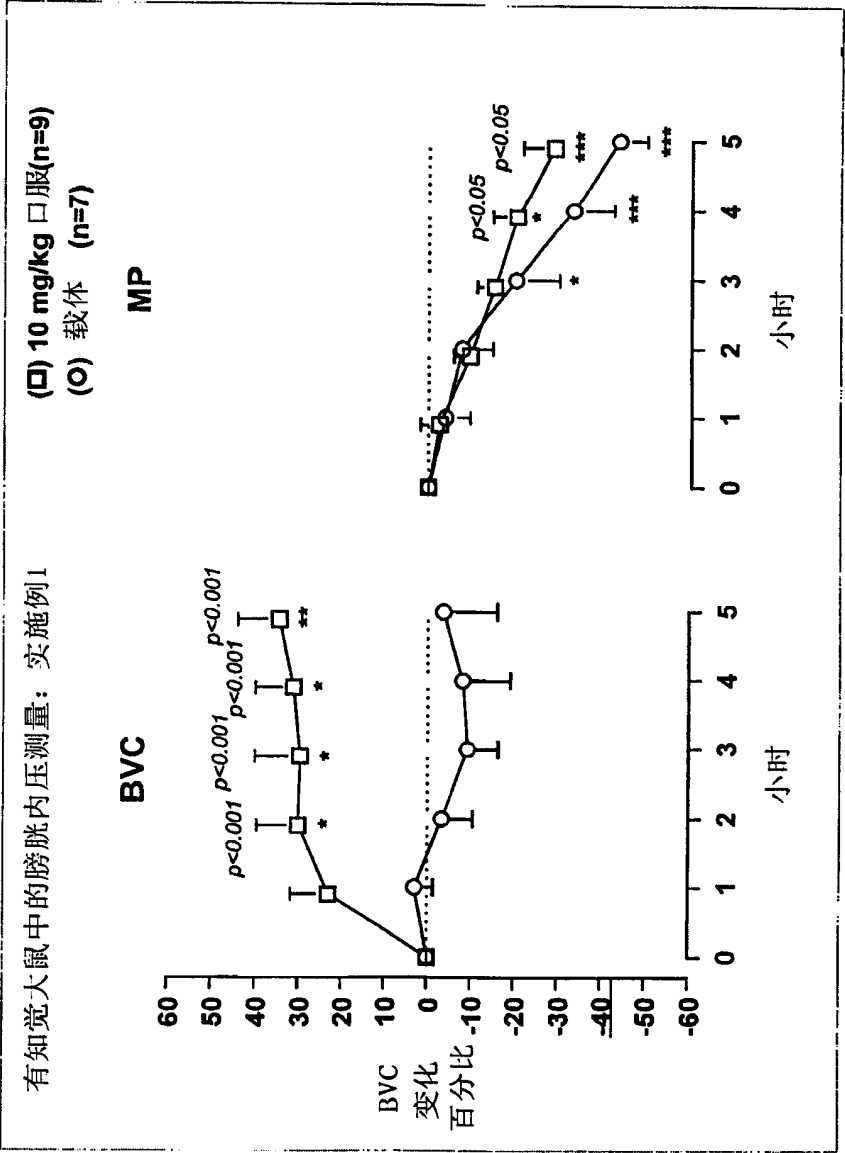


图 1

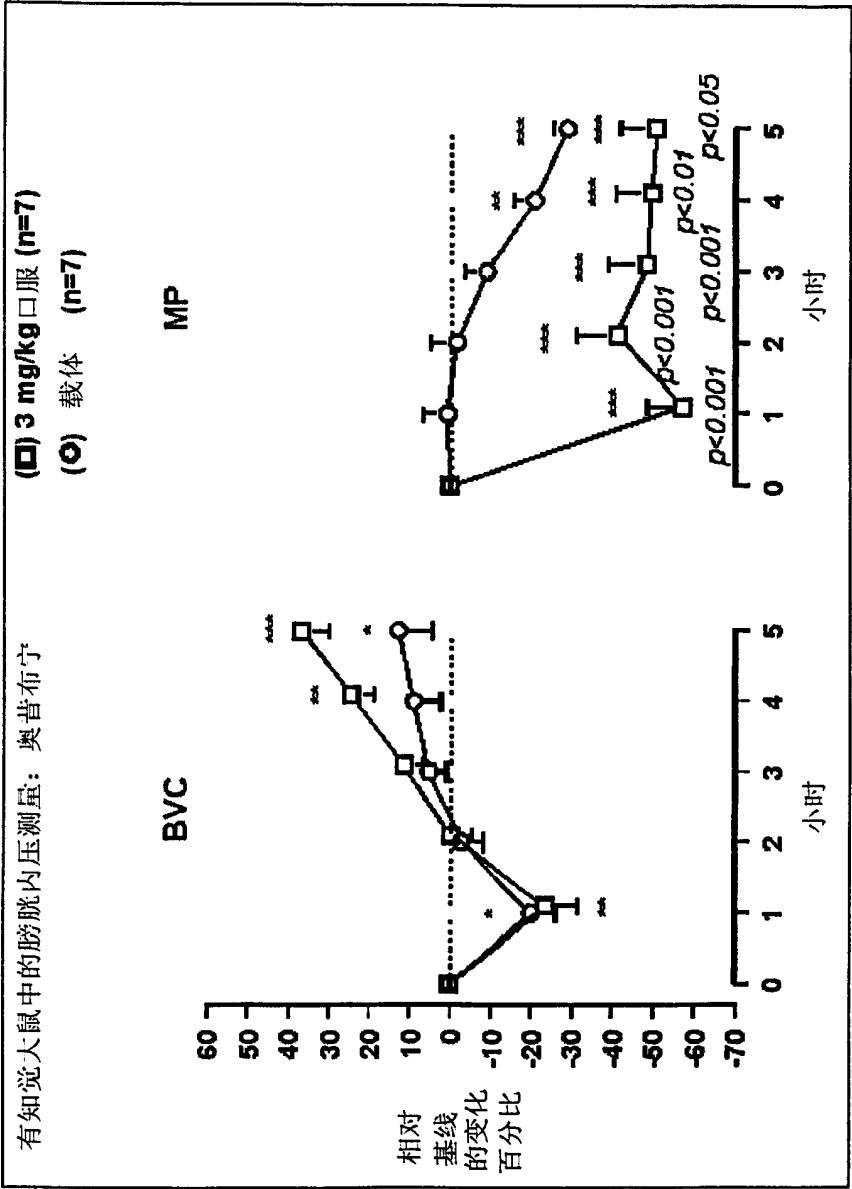


图 2