



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110730781 B

(45) 授权公告日 2023.05.05

(21) 申请号 201880038831.4

(22) 申请日 2018.06.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110730781 A

(43) 申请公布日 2020.01.24

(30) 优先权数据
62/520,430 2017.06.15 US
62/591,247 2017.11.28 US
62/649,856 2018.03.29 US
62/672,261 2018.05.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/037687 2018.06.15

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/232202 EN 2018.12.20

(73) 专利权人 武田药品工业株式会社
地址 日本大阪

(72) 发明人 J·W·布朗 S·希驰库克

M·霍普金斯 菊地正太

H·蒙恩斯城 H·雷查德

K·施莱克尔 孙会凯 T·麦克林

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

专利代理师 刘文娜 郗名悦

(51) Int. Cl.

G07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

G07D 211/46 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105829309 A, 2016.08.03

WO 2015123505 A1, 2015.08.20

US 2012101106 A1, 2012.04.26

US 7229557 B2, 2007.06.12

CN 106103421 A, 2016.11.09

审查员 蒋薇薇

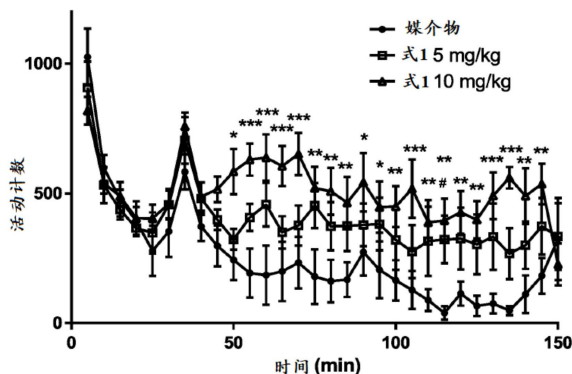
权利要求书3页 说明书24页 附图1页

(54) 发明名称

GPR6的四氢吡啶并吡嗪调节剂

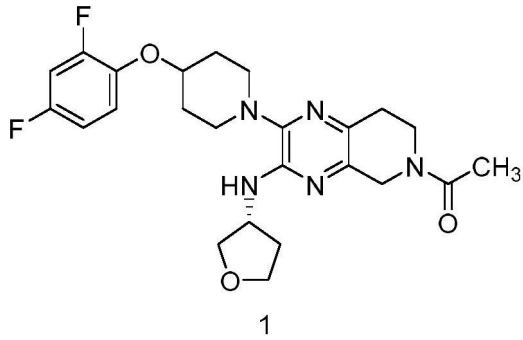
(57) 摘要

公开了一种如说明书中所述的式1化合物及其药学上可接受的盐。本公开还涉及用于制备所述式1化合物的材料和方法,涉及含有所述式1化合物的药物组合物,并且涉及所述式1化合物用于治疗与GPR6相关的疾病、病症和疾患的用途。



成对重复测量显著治疗作用
F=4.91; p=0.0406. * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 10mg/kg; # p<0.05 5mg/kg

1. 一种式1化合物,



或其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物或药学上可接受的盐,其具有等于或大于90%对映体过量(ee)的对映体纯度。

3. 根据权利要求1所述的化合物或药学上可接受的盐,其具有等于或大于98%ee的对映体纯度。

4. 根据权利要求1所述的化合物或药学上可接受的盐,其具有等于或大于99%ee的对映体纯度。

5. 根据权利要求1所述的化合物或药学上可接受的盐,其具有等于100%ee的对映体纯度。

6. 根据权利要求1所述的化合物或药学上可接受的盐,其中所述化合物以游离形式存在。

7. 一种药物组合物,所述药物组合物包含:

(a) 根据权利要求1-6中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐;以及

(b) 药学上可接受的赋形剂。

8. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中所述化合物或药学上可接受的盐适合于以0.5mg/kg至5.0mg/kg范围内的剂量施用。

9. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中所述化合物或药学上可接受的盐适合于口服施用。

10. 根据权利要求1-6中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐,或根据权利要求7-9中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗与GPR6相关的疾病、病症或疾患的药物中的用途。

11. 根据权利要求1-6中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐,或根据权利要求7-9中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗选自以下组成的组的疾病、病症或疾患的药物中的用途:帕金森病、左旋多巴诱发的运动障碍、亨廷顿病、药物成瘾、进食障碍、认知障碍、精神分裂症、躁郁症、癫痫、阿尔茨海默病、焦虑症以及抑郁症。

12. 根据权利要求10或根据权利要求11所述的用途,其中所述疾病、病症或疾患是帕金森病。

13. 根据权利要求10或根据权利要求11所述的用途,其中所述疾病、病症或疾患是受试者中的帕金森病,其中所述治疗改善所述受试者的运动症状。

14. 根据权利要求10或根据权利要求11所述的用途,其中所述疾病、病症或疾患是帕金

森病,其中所述药物用于治疗帕金森病的非运动临床表现。

15. 根据权利要求10或权利要求11所述的用途,其中所述化合物或药学上可接受的盐适于以0.5mg/kg至5.0mg/kg范围内的剂量施用。

16. 根据权利要求10或权利要求11所述的用途,其中所述药物适于口服施用。

17. 一种组合产品,所述组合产品包含根据权利要求7-9中任一项所述的药物组合物和至少一种另外的药理学活性剂。

18. 根据权利要求17所述的组合产品,其中所述组合产品适合于同时地、依序地或分开地施用所述药物组合物和所述至少一种另外的药理学活性剂。

19. 药盒,所述药盒包括根据权利要求7-9中任一项所述的药物组合物和包含至少一种另外的药理学活性剂的药物组合物。

20. 根据权利要求17所述的组合产品,或根据权利要求19所述的药盒,其中所述另外的药理学活性剂是:

(a) 选自由以下组成的组:左旋多巴、DOPA脱羧酶抑制剂、多巴胺激动剂、抗胆碱能药、B选择性单胺氧化酶抑制剂以及儿茶酚O-甲基转移酶抑制剂;和/或

(b) 金刚烷胺;和/或

(c) 左旋多巴与DOPA脱羧酶抑制剂的组合;和/或

(d) 选自由以下组成的组:卡比多巴;苄丝肼;甲基多巴; α -二氟甲基-DOPA;3',4',5,7-四羟基-8-甲氧基异黄酮;盐酸阿扑吗啡;溴隐亭;罗替戈汀;普拉克索;罗匹尼罗;苯海索;甲磺酰苯扎托品;沙芬酰胺;司来吉兰;雷沙吉兰;恩他卡朋;以及托卡朋;和/或

(e) 选自由以下组成的组: β -分泌酶抑制剂、 γ -分泌酶抑制剂、HMG-CoA还原酶抑制剂以及非类固醇抗炎药(NSAID);和/或

(f) 选自由以下组成的组:阿扎丙宗、阿司匹林、塞来昔布、与米索前列醇一起的双氯芬酸、二氟尼柳、依托度酸、非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、甲氯芬那酸钠、甲芬那酸、美洛昔康、萘丁美酮、萘普生、奥沙普秦、苯基丁氮酮、吡罗昔康、胆碱和水杨酸镁、双水杨酯以及舒林酸;和/或

(g) 选自由以下组成的组:多奈哌齐、卡巴拉汀、美金刚以及加兰他敏;和/或

(h) 选自由以下组成的组:镇静剂、催眠药、抗焦虑药、抗精神病药以及镇定剂;和/或

(i) 选自由以下组成的组:阿米替林、阿莫沙平、阿立哌唑、阿塞那平、安非他酮、利眠宁、西酞普兰、氯丙嗪、氯氮平、地昔帕明、去甲文拉法辛、多塞平、度洛西汀、依他普仑、氟西汀、氟非那嗪、氟哌啶醇、伊潘立酮、丙咪嗪、异卡波肼、拉莫三嗪、左米那普仑、鲁拉西酮、米氮平、奈法唑酮、去甲替林、奥氮平、帕潘立酮、帕罗西汀、奋乃静、苯乙肼、普罗替林、奎硫平、利培酮、沙芬酰胺、司来吉兰、舍曲林、反苯环丙胺、曲唑酮、曲米帕明、文拉法辛、维拉佐酮、沃替西汀以及齐拉西酮;和/或

(j) 选自由以下组成的组:阿普唑仑、利眠宁、clobazepam、氯硝西洋、氯氮卓、地西洋、艾司唑仑、氟西洋、劳拉西洋、咪达唑仑、奥沙西洋、普拉西洋、夸西洋、替马西洋、三唑仑、羟嗪、右佐匹克隆、扎来普隆、唑吡坦、佐匹克隆以及丁螺环酮;和/或

(k) 选自由以下组成的组:乙酰唑胺、卡马西平、氯巴占、氯硝西洋、乙酸艾司利卡西平、乙琥胺、加巴喷丁、拉科酰胺、拉莫三嗪、左乙拉西坦、硝西洋、奥卡西平、吡仑帕奈、吡拉西坦、苯巴比妥、苯妥英、普瑞巴林、普里米酮、瑞替加滨、卢非酰胺、丙戊酸钠、司替戊醇、噻加

宾、托吡酯、氨己烯酸以及唑尼沙胺。

21. 一种剂型,所述剂型包含根据权利要求1-6中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂,其中所述剂型适合于口服施用所述化合物或药学上可接受的盐。

22. 根据权利要求21所述的剂型,其中所述化合物或药学上可接受的盐的剂量在0.5mg/kg至5.0mg/kg的范围内。

GPR6的四氢吡啶并吡嗪调节剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年6月15日提交的美国临时申请62/520,430、2017年11月28日提交的美国临时申请62/591,247、2018年3月29日提交的美国临时申请62/649,856以及2018年5月16日提交的美国临时申请62/672,261的权益,所述临时申请各自特此以引用的方式整体并入。

发明领域

[0003] 本发明涉及为G蛋白偶联受体6(GPR6)的调节剂的四氢吡啶并吡嗪衍生物,涉及含有所述四氢吡啶并吡嗪衍生物的药物组合物,并且涉及所述四氢吡啶并吡嗪衍生物用于治疗与GPR6相关的疾病、病症和疾患的用途。

[0004] 发明背景

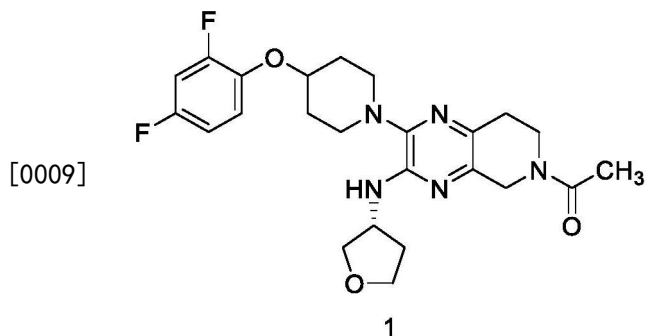
[0005] GPR6是跨膜受体的G蛋白偶联受体(GPCR)家族的成员。GPR6通过G蛋白(Gs)途径发出信号。它在中枢神经系统(CNS)中、特别是在纹状体的中型多棘神经元(MSN)中高度表达,并且在周围组织中表现出最少表达。多巴胺能神经支配的主要纹状体靶标位于纹状体苍白球(间接)和纹状体黑质(直接)输出途径的MSN中。直接输出途径的MSN表达D1多巴胺受体,而间接途径中的MSN表达D2受体。GPR6在纹状体的表达D2受体的MSN中富集,其中GPR6活性增加细胞内第二信使cAMP的水平,其在功能上与D2受体信号传导相反。Gs偶联的GPR6的拮抗作用或反向激动作用降低MSN中的cAMP,并且因此提供多巴胺介导的D2受体活化的功能性替代物。

[0006] 公布的国际专利申请WO 2015/095728A1(其特此以引用的方式整体并入)描述了许多四氢吡啶并吡嗪衍生物,所述四氢吡啶并吡嗪衍生物是GPR6的调节剂。这些化合物包括(S)-1-(2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)-3-((四氢咪喃-3-基)氨基)-7,8-二氢吡啶并[3,4-b]吡嗪-6(5H)-基)乙-1-酮(“化合物A”)。尽管化合物A是GPR6的潜在有效调节剂,但它相对于抑制hERG(人类ether-a-go-go相关基因)活性具有次优的安全界限。参见例如,X.Yao等人,British Journal of Pharmacology(2008)154:1446-56。hERG的抑制是与潜在QT间期延长和心律失常相关的一种因素。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种四氢吡啶并吡嗪衍生物和含有所述四氢吡啶并吡嗪衍生物的药物组合物。四氢吡啶并吡嗪衍生物是GPR6的调节剂,并且可用于治疗与GPR6相关的疾病、病症和疾患,包括诸如帕金森病的神经系统病症。

[0008] 本发明的一方面提供了一种式1化合物:



[0010] 或其药学上可接受的盐。式1描绘化合物(R)-1-(2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)-3-((四氢呋喃-3-基)氨基)-7,8-二氢吡啶并[3,4-b]吡嗪-6(5H)-基)乙-1-酮。

[0011] 在某些实施方案中,式1的化合物或药学上可接受的盐具有等于或大于20%对映体过量(ee)、40%ee、60%ee、80%ee、90%ee、98%ee、99%ee或100%ee的对映体纯度。在某些实施方案中,所述化合物以游离形式存在。

[0012] 本发明的另一方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的式1化合物或其药学上可接受的盐;以及药学上可接受的赋形剂。

[0013] 本发明的另一方面提供了一种包含如本文所述的式1化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物,所述药物组合物用作药物。在某些实施方案中,所述药物组合物用于治疗帕金森病、左旋多巴诱发的运动障碍、亨廷顿病、药物成瘾、进食障碍、认知障碍、精神分裂症、躁郁症、癫痫、阿尔茨海默病、焦虑症以及抑郁症。在某些实施方案中,所述药物组合物还包含金刚烷胺。本发明的另一方面提供了所述药物组合物,其用作与GPR6相关的疾病、病症或疾患的治疗。

[0014] 本文所述的本发明的各种实施方案提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的式1化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,所述药物组合物用作药物。在某些实施方案中,所述药物组合物的用途是治疗选自以下组成的组的疾病、病症或疾患:帕金森病、左旋多巴诱发的运动障碍、亨廷顿病、药物成瘾、进食障碍、认知障碍、精神分裂症、躁郁症、癫痫、阿尔茨海默病、焦虑症以及抑郁症。

[0015] 本发明的另一方面提供了式1化合物或其药学上可接受的盐用于制造用于治疗与GPR6相关的疾病、病症或疾患的药物的用途。在某些实施方案中,所述疾病、病症或疾患选自以下组成的组:帕金森病、左旋多巴诱发的运动障碍、亨廷顿病、药物成瘾、进食障碍、认知障碍、精神分裂症、躁郁症、癫痫、阿尔茨海默病、焦虑症以及抑郁症。

[0016] 本发明的另一方面提供了一种治疗与GPR6相关的疾病、病症或疾患的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的如本文所述的式1化合物或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,所述式1化合物或其药学上可接受的盐经口施用。

[0017] 本发明的另一方面提供了一种治疗受试者的疾病、病症或疾患的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的式1化合物或其药学上可接受的盐,其中所述疾病、病症或疾患选自帕金森病、左旋多巴诱发的运动障碍、亨廷顿病、药物成瘾、进食障碍、认知障碍、精神分裂症、躁郁症、癫痫、阿尔茨海默病、焦虑症以及抑郁症。

[0018] 在某些实施方案中,在本文所述的方法中施用的式1化合物或其药学上可接受的盐以选自约0.1mg/kg至约1.0mg/kg或约0.5mg/kg至约5.0mg/kg的范围的剂量施用。在某些实施方案中,所述化合物或药学上可接受的盐以约40mg/kg至约60mg/kg范围内的剂量施

用。在某些实施方案中,在本文所述的方法中施用的式1化合物或其药学上可接受的盐以选自由以下组成的组中的范围的剂量施用:约5mg/kg至约15mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg、约15mg/kg至约25mg/kg、约20至约30mg/kg、约25mg/kg至约35mg/kg、约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg以及约45mg/kg至约55mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量在选自由以下组成的组的范围内:约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg、约40mg/kg至约50mg/kg、约45mg/kg至约55mg/kg、约50mg/kg至约60mg/kg、约55mg/kg至约65mg/kg以及约60mg/kg至约70mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量可以是约50mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量大于约1mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是约1mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量在选自由以下组成的组的范围内:约50mg/kg至约100mg/kg、约100mg/kg至约150mg/kg、约150mg/kg至约200mg/kg、约200mg/kg至约250mg/kg、约250mg/kg至约350mg/kg、约300mg/kg至约350mg/kg、约350mg/kg至约400mg/kg、约400mg/kg至约450mg/kg、约450mg/kg至约500mg/g。在某些实施方案中,所述剂量是约500mg/kg。或者,所述剂量小于500mg/kg。

[0019] 在某些实施方案中,所述剂量是35mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是36mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是37mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是38mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是39mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是40mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是41mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是42mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是43mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是44mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是45mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是46mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是47mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是48mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是49mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是50mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是51mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是52mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是53mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是54mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是55mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是56mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是57mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是58mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是59mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是60mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是61mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是62mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是63mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是64mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是65mg/kg。在某些实施方案中,所述施用步骤以口服方式发生。

[0020] 本发明的另一方面提供了一种组合疗法,所述组合疗法包含有效量的所述药物组合物;以及至少一种另外的药理学活性剂。在某些实施方案中,所述另外的药理学活性剂选自由以下组成的组:左旋多巴、DOPA脱羧酶抑制剂、多巴胺激动剂、抗胆碱能药、B选择性单胺氧化酶抑制剂以及儿茶酚O-甲基转移酶抑制剂。在其他实施方案中,所述另外的药理学活性剂是左旋多巴与DOPA脱羧酶抑制剂的组合。在某些实施方案中,所述另外的药理学活性剂选自由以下组成的组:卡比多巴;苄丝肼;甲基多巴; α -二氟甲基-DOPA;3',4',5,7-四羟基-8-甲氧基异黄酮;盐酸阿扑吗啡;溴隐亭;罗替戈汀;普拉克索;罗匹尼罗;苯海索;甲磺酰苯扎托品;沙芬酰胺;司来吉兰;雷沙吉兰;恩他卡朋;以及托卡朋。在某些实施方案中,所述另外的药理学活性剂选自由以下组成的组: β -分泌酶抑制剂、 γ -分泌酶抑制剂、HMG-辅酶A还原酶抑制剂、非类固醇抗炎药(NSAID)。在某些实施方案中,所述另外的药理学活性剂选自由以下组成的组:阿扎丙宗、阿司匹林、塞来昔布、双氯芬酸(与或不与米索前列醇一

起)、二氟尼柳、依托度酸、非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、甲氯芬那酸钠、甲芬那酸、美洛昔康、萘丁美酮、萘普生、奥沙普秦、苯基丁氮酮、吡罗昔康、胆碱和水杨酸镁、双水杨酯以及舒林酸。在某些实施方案中,所述另外的药理学活性剂选自自由以下组成的组:多奈哌齐、卡巴拉汀、美金刚和加兰他敏。在某些实施方案中,所述另外的药理学活性剂选自自由以下组成的组:镇静剂、催眠药、抗焦虑药、抗精神病药以及镇定剂。在某些实施方案中,所述另外的药理学活性剂选自自由以下组成的组:阿米替林、阿莫沙平、阿立哌唑、阿塞那平、安非他酮、利眠宁、西酞普兰、氯丙嗪、氯氮平、地昔帕明、去甲文拉法辛、多塞平、度洛西汀、依他普仑、氟西汀、氟西汀、氟非那嗪、氟哌啶醇、伊潘立酮、丙咪嗪、异卡波肼、拉莫三嗪、左米那普仑、鲁拉西酮、米氮平、奈法唑酮、去甲替林、奥氮平、帕潘立酮、帕罗西汀、奋乃静、苯乙肼、普罗替林、奎硫平、利培酮、沙芬酰胺、司来吉兰、舍曲林、反苯环丙胺、曲唑酮、曲米帕明、文拉法辛、维拉佐酮、沃替西汀以及齐拉西酮。在某些实施方案中,所述另外的药理学活性剂选自自由以下组成的组:阿普唑仑、利眠宁、clobazepam、氯硝西洋、氯氮卓、地西泮、艾司唑仑、氟西洋、劳拉西洋、咪达唑仑、奥沙西洋、普拉西洋、夸西洋、替马西洋、和三唑仑、羟嗪、右佐匹克隆、扎来普隆、唑吡坦、和佐匹克隆以及丁螺环酮。在某些实施方案中,所述另外的药理学活性剂选自自由以下组成的组:乙酰唑胺、卡马西平、氯巴占、氯硝西洋、乙酸艾司利卡西平、乙琥胺、加巴喷丁、拉科酰胺、拉莫三嗪、左乙拉西坦、硝西洋、奥卡西平、吡仑帕奈(perampanel)、吡拉西坦、苯巴比妥、苯妥英、普瑞巴林、普里米酮、瑞替加滨、卢非酰胺、丙戊酸钠、司替戊醇、噻加宾、托吡酯、氨己烯酸以及唑尼沙胺。

[0021] 本文的本发明的各种实施方案提供了一种治疗受试者的帕金森病的方法,所述方法包括:向所述受试者施用如本文所定义的药物组合物。在一些实施方案中,施用所述药物组合物改善所述受试者的运动症状。在某些实施方案中,所述施用步骤口服进行。

[0022] 本文的本发明的各种实施方案提供了一种式1化合物或其药学上可接受的盐的剂型,所述剂型适合于以选自自由以下组成的组中的范围的剂量口服施用所述化合物或药学上可接受的盐:约0.1mg/kg至约1.0mg/kg或约0.5mg/kg至约5.0mg/kg的范围。在某些实施方案中,所述化合物或药学上可接受的盐以约40mg/kg至约60mg/kg范围内的剂量施用。在某些实施方案中,所述式1化合物或其药学上可接受的盐以选自自由以下组成的组中的范围的剂量施用:约5mg/kg至约15mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg、约15mg/kg至约25mg/kg、约20至约30mg/kg、约25mg/kg至约35mg/kg、约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg以及约45mg/kg至约55mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量在选自自由以下组成的组的范围内:约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg、约40mg/kg至约50mg/kg、约45mg/kg至约55mg/kg、约50mg/kg至约60mg/kg、约55mg/kg至约65mg/kg以及约60mg/kg至约70mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量可以是约50mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量大于约1mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是约1mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量在选自自由以下组成的组的范围内:约50mg/kg至约100mg/kg、约100mg/kg至约150mg/kg、约150mg/kg至约200mg/kg、约200mg/kg至约250mg/kg、约250mg/kg至约350mg/kg、约300mg/kg至约350mg/kg、约350mg/kg至约400mg/kg、约400mg/kg至约450mg/kg、约450mg/kg至约500mg/g。在某些实施方案中,所述剂量是约500mg/kg。或者,所述剂量小于500mg/kg。

[0023] 在某些实施方案中,所述剂量是35mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是36mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是37mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是38mg/kg。在某

些实施方案中,所述剂量是39mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是40mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是41mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是42mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是43mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是44mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是45mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是46mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是47mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是48mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是49mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是50mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是51mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是52mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是53mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是54mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是55mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是56mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是57mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是58mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是59mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是60mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是61mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是62mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是63mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是64mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是65mg/kg。

附图说明

[0024] 前述和其他目标、特征以及优点将从以下如附图中所示出的、对本发明的特定实施方案的描述显而易见。附图不一定按比例绘制;而是将重点放在示出本发明的各种实施方案的原理上。

[0025] 图1是示出治疗对帕金森氏病的6-羟基多巴胺(6-OHDA)模型的影响的图。

具体实施方式

[0026] 本申请涉及W0 2015/095728,其特此以引用的方式整体并入。

[0027] I. 定义

[0028] 除非另外指明,否则本公开使用以下提供的定义。

[0029] 当与可测量的数值变量结合使用时,“约(about)”或“大约(approximately)”是指所述变量的指示值并且是指处于所述指示值的实验误差内或处于所述指示值的±10%内的所述变量的所有值,无论哪个更大。

[0030] “对映体过量”或“ee”是指一种对映体相对于另一种对映体的过量(以占整体的百分比表示),并且是含有所述对映体的样品的对映体(手性)纯度的量度。例如,如果样品含有过量的R-对映体,则可根据以下表达式确定ee

$$[0031] \quad ee = \frac{A_R - A_S}{A_R + A_S} \times 100$$

[0032] 其中 A_R 和 A_S 是所述样品中R-和S-对映体的量。

[0033] “组合疗法”是指包括多于一种治疗方式的用于治疗疾病、病症或疾患的方法。例如,所述治疗方式可以是多于一种药物组合物或药物活性剂或其组合。所述治疗方式可同时地、依序地或以任何顺序施用。它们可以不同的剂量、以不同的给药频率或经由不同的途径施用,无论哪个适合。所述治疗方式的摩尔比没有特别限制。

[0034] “运动症状”是指在患有与GPR6相关的疾病、病症和疾患(如帕金森病)的受试者中发生的活动减少。

- [0035] “基本上纯的对映体”及其变体是指以90%ee或更高存在于样品中的对映体。
- [0036] “纯对映体”及其变体是指以98%ee或更高存在于样品中的对映体。
- [0037] “受试者”是指哺乳动物,包括人。
- [0038] “药学上可接受的”物质是指适合于施用至受试者的那些物质。
- [0039] “治疗(Treating)”是指逆转、缓解、抑制此类术语所适用的疾病、病症或疾患的进展,或预防所述疾病、病症或疾患,或逆转、缓解、抑制这种疾病、病症或疾患的一种或多种症状的进展,或预防所述疾病、病症或疾患的一种或多种症状。
- [0040] “治疗(Treatment)”是指如上刚刚定义的“治疗(treating)”的行为。
- [0041] “药物”、“药物物质”、“活性药物成分”等是指可用于治疗需要治疗的受试者的化合物(例如,式1化合物)。
- [0042] 药物的“有效量”、药物的“治疗有效量”等是指药物可用于治疗受试者并且可尤其取决于受试者的体重和年龄以及施用途径的量。
- [0043] “赋形剂”是指药物的任何稀释剂或媒介物。
- [0044] “药物组合物”是指一种或多种药物物质与一种或多种赋形剂的组合。
- [0045] “药物产品”、“药物剂型”、“剂型”、“最终剂型”等是指适用于治疗有治疗需要的受试者,并且通常可呈片剂、胶囊、含有粉末或颗粒的囊剂、液体溶液或混悬液、贴片、膜剂等形式的药物组合物。
- [0046] “与GPR6相关的疾患”以及类似短语涉及在受试者中调节GPR6(包括拮抗作用或反向激动作用)可提供治疗或预防益处的疾病、病症或疾患。
- [0047] 以下缩写可用于本说明书中:Ac(乙酰基);ACN(乙腈);AIBN(偶氮-双-异丁腈);API(活性药物成分);aq(水性);BINAP(2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘基);Boc(叔丁氧羰基);Cbz(苄氧羰基);dba(二亚苄基丙酮);DCC(1,3-二环己基碳二亚胺);DCE(1,1-二氯乙烷);DCM(二氯甲烷);DIPEA(N,N-二异丙基乙胺,许尼希氏碱(Hünig'sBase));DMA(N,N-二甲基乙酰胺);DMAP(4-二甲氨基吡啶);DME(1,2-二甲氧基乙烷);DMF(N,N-二甲基甲酰胺);DMSO(二甲亚砜);dppf(1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁);DTT(二硫苏糖醇);EC₅₀(半数最大应答时的有效浓度);EDA(乙氧基化十二烷醇,BRIJ®35);EDC(N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺);EDTA(乙二胺四乙酸);ee(对映体过量);eq(当量);Et(乙基);Et₃N(三乙胺);EtOAc(乙酸乙酯);EtOH(乙醇);HATU(2-(3H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-3-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(V));HEPES(4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸);HOAc(乙酸);HOBt(1H-苯并[d][1,2,3]三唑-1-醇);IC₅₀(50%抑制时的浓度);IPA(异丙醇);iPrOAc(乙酸异丙酯);IPE(异丙醚);Ki(抑制常数;竞争测定中竞争配体的浓度,如果不存在配体,则其将占据受体的50%);LDA(二异丙基氨基锂);LiHMDS(双(三甲基甲硅烷基)氨基锂);mCPBA(间-氯过氧苯甲酸);Me(甲基);MeOH(甲醇);MTBE(甲基叔丁基醚);mp(熔点);NaOt-Bu(叔丁醇钠);NMM(N-甲基吗啉);NMP(N-甲基-吡咯烷酮);OTf(三氟甲磺酸酯);PE(石油醚);Ph(苯基);pEC₅₀(-log₁₀(EC₅₀),其中EC₅₀以摩尔(M)单位给出);pIC₅₀(-log₁₀(IC₅₀),其中IC₅₀以摩尔(M)单位给出);Pr(丙基);c-Pr(环丙基);i-Pr(异丙基);PTFE(聚四氟乙烯);RT(室温,大约20°C至25°C);T3P(2,4,6-三丙基-1,3,5,2,4,6-三氧杂三磷烷2,4,6-三氧化物);TCEP(三(2-羧乙基)膦);TFA(三氟乙酸);TFAA(2,2,2-三氟乙酸酐);THF(四氢呋喃);TMEDA(N¹,N¹,N²,N²-四甲基乙烷-1,2-二胺);TMS(三甲基甲硅烷基);以及Tris缓冲液(2-氨

基-2-羟甲基-丙烷-1,3-二醇缓冲液)。

[0048] II. 本发明的组合物

[0049] 如下文所述,本公开涉及式1化合物及其药学上可接受的盐。本公开还涉及用于制备式1化合物的材料和方法、含有所述式1化合物的药物组合物以及所述式1化合物及其药学上可接受的盐(任选地与其他药理学活性剂组合)用于治疗CNS的疾病、病症或疾患(包括帕金森病以及与GPR6相关的其他疾病、病症或疾患)的用途。

[0050] 所述式1化合物可以盐、复合物、溶剂合物、水合物和液晶的形式存在。同样地,式1化合物的盐可以复合物、溶剂合物、水合物和液晶的形式存在。

[0051] 所述式1化合物可形成药学上可接受的盐。这些盐包括酸加成盐(包括二酸)和碱盐。药学上可接受的酸加成盐可包括衍生自无机酸的盐,所述无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、氢氟酸和亚磷酸;以及衍生自有机酸的无毒盐,所述无机酸如脂族一元和二元羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、链烷二酸、芳族酸、脂族酸和芳族磺酸等。此类盐可包括乙酸盐、己二酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、硫酸氢盐、硫酸盐、硼酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环磺酸盐、乙二磺酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、六氟磷酸盐、海苯酸盐(hibenzate)、盐酸盐/氯化物、氢溴酸盐/溴化物、氢碘酸盐/碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、萘酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、焦谷氨酸盐、蔗糖酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、单宁酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐、三氟乙酸盐以及昔萘酸盐。

[0052] 药学上可接受的碱盐可包括衍生自碱的盐,所述碱包括金属阳离子(如碱金属或碱土金属阳离子)以及胺。适合的金属阳离子的实例可包括钠、钾、镁、钙、锌以及铝。适合的胺的实例可包括精氨酸、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙胺、二乙醇胺、二环己胺、乙二胺、甘氨酸、赖氨酸、N-甲葡糖胺、乙醇胺、2-氨基-2-羟甲基-丙烷-1,3-二醇以及普鲁卡因。对于适用酸加成盐和碱盐的论述,参见S.M.Berge等人,J.Pharm.Sci.(1977)66:1-19;还参见Stahl和Wermuth,Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties, Selection,and Use(2002);所述文献两者均特此以引用的方式整体并入。

[0053] 可使用各种方法来制备药学上可接受的盐。例如,式1化合物可与适当酸或碱反应以得到所需盐。或者,式1化合物的前体可与酸或碱反应以移除酸不稳定性或碱不稳定性保护基团或打开前体的内酯或内酰胺基团。另外,式1化合物的盐可通过用适当的酸或碱处理或通过离子交换树脂接触而转化为另一种盐(或游离形式)。在反应之后,盐可通过过滤(如果它自溶液中沉淀出)或通过蒸发来分离以回收盐。盐的电离程度可在完全电离至几乎非电离之间变化。

[0054] 式1化合物可以在完全非晶形至完全结晶范围内的固态连续体形式存在。术语“非晶形”是指一种状态,在所述状态下材料缺乏分子层面上的长程有序,并且取决于温度可展现固体或液体的物理性质。通常,此类材料不给出独特X-射线衍射图案,并且虽然展现固体性质,但更正式来说,描述为液体。在加热后,发生自固体性质至液体性质的变化,所述变化的特征是状态变化,通常是二级的(“玻璃转移”)。术语“结晶”是指一种固相,在所述固相下材料具有分子层面上的规则有序内部结构,并且给出具有确定峰的独特X-射线衍射图案。此类材料在充分加热时还将展现液体的性质,但自固体至液体的变化的特征是相变化,通

常是一级的(“熔点”)。

[0055] 式1化合物也可以非溶剂化形式和溶剂化形式存在。术语“溶剂合物”描述包含化合物和一个或多个药学上可接受的溶剂分子(例如乙醇)的分子复合物。术语“水合物”是其中溶剂为水的溶剂合物。药学上可接受的溶剂合物包括其中溶剂可以是同位素取代的那些(例如, D_2O 、丙酮- d_6 、DMSO- d_6)。

[0056] 用于有机化合物的溶剂合物和水合物的目前公认的分类系统是区别孤立晶格点、通道和金属离子配位的溶剂合物和水合物的分类系统。参见例如, K.R.Morris (H.G.Brittain编辑) *Polymorphism in Pharmaceutical Solids* (1995), 其特此以引用的方式整体并入。孤立晶格点溶剂合物和水合物是其中溶剂(例如水)分子通过介入有机化合物的分子而孤立使得彼此不直接接触的溶剂合物和水合物。在通道溶剂合物中, 溶剂分子位于晶格通道中, 在所述晶格通道中, 它们紧邻其他溶剂分子。在金属离子配位溶剂合物中, 溶剂分子键合于金属离子。

[0057] 当溶剂或水紧密结合时, 复合物将具有不依赖于湿度的明确确定的化学计量。然而, 当溶剂或水微弱结合时(如在通道溶剂合物和在吸湿性化合物中), 水或溶剂含量将取决于湿度和干燥条件。在所述情况下, 通常将观察到非化学计量。

[0058] 式1化合物也可以多组分复合物(除盐和溶剂合物以外)形式存在, 其中化合物(药物)和至少一种其他组分是以化学计量的量或非化学计量的量存在。此类型的复合物包括包合物(药物-基体包合复合物)和共结晶体。后者通常定义为通过非共价相互作用来结合在一起的中性分子成分的结晶复合物, 但也可中性分子与盐的复合物。共晶体可通过熔融结晶、通过自溶剂中再结晶、或通过将组分物理研磨在一起来制备。参见例如, O.Almarsson和M.J.Zaworotko, *Chem. Commun.* (2004) 17:1889-1896, 其特此以引用的方式整体并入。对于多组分复合物的一般性综述, 参见J.K.Haleblian, *J.Pharm.Sci.* (1975) 64 (8):1269-88, 其特此以引用的方式整体并入。

[0059] 当经受适合条件时, 式1化合物可以介晶态(中间相或液晶)存在。介晶态处于真正结晶状态与真正液体状态(熔融或溶液)之间。由于温度变化而引起的介晶性被描述为“热致的”, 而由添加第二组分, 如水或另一溶剂而造成的介晶性被描述为“溶致的”。具有形成易溶中间相的可能性的化合物被描述为“两亲的”并且包括具有极性离子部分(例如, $-COO^-Na^+$ 、 $-COO^-K^+$ 、 $-SO_3^-Na^+$)或极性非离子部分(如 $-N^+N(CH_3)_3$)的分子。参见例如, N.H.Hartshorne和A.Stuart, *Crystals and the Polarizing Microscope* (第4版, 1970), 其特此以引用的方式整体并入。

[0060] 式1化合物可以多晶型物形式存在, 可被同位素地标记, 可由施用前药而产生, 或可在施用后形成代谢产物。

[0061] “前药”是指具有很少或没有药理学活性的化合物, 这些化合物当在体内被代谢时, 可以经历转化而成为具有所希望的药理活性的化合物。前药可通过用“前体部分(promoiety)”置换存在于药理学活性化合物中的适当官能团来制备, 例如, 如H.Bundgaard, *Design of Prodrugs* (1985) 所描述的, 所述文献特此以引用的方式整体并入。前药的实例包括式1化合物的分别具有羧酸、羟基或氨基官能团的酯、醚或酰胺衍生物。对于前药的进一步论述, 参见例如T.Higuchi和V.Stella “Pro-drugs as Novel Delivery Systems,” *ACS Symposium Series 14* (1975) 和E.B.Roche编辑, *Bioreversible Carriers in Drug*

Design(1987),所述文献各自特此以引用的方式整体并入。

[0062] “代谢产物”是指施用药理学活性化合物后在体内形成的化合物。实例包括式1化合物的分别具有甲基、烷氧基、叔氨基、仲氨基、苯基和酰胺基团的羟甲基、羟基、仲氨基、伯氨基、苯酚以及羧酸衍生物。

[0063] 式1化合物可具有同位素变型,其中至少一个原子被具有相同原子序数、但原子质量不同于通常在自然中发现的原子质量的原子替换。适合包含在式1化合物中的同位素包括例如氢的同位素,如²H和³H;碳的同位素,如¹¹C、¹³C和¹⁴C;氮的同位素,如¹³N和¹⁵N;氧的同位素,如¹⁵O、¹⁷O和¹⁸O;以及氟的同位素,如¹⁸F。使用同位素变型(例如,氘,²H)可提供由较大代谢稳定性带来的某些治疗优点,例如体内半衰期增加或剂量需求减少。另外,所公开的化合物的某些同位素变型可并入放射性同位素(例如氚³H或¹⁴C),其可适用于药物和/或底物组织分布研究中。被正电子发射同位素(如¹¹C、¹⁸F、¹⁵O和¹³N)取代可适用于检查底物受体占用的正电子发射断层成像(PET)研究。经同位素标记的化合物可通过与本公开中的其他地方所述的那些方法类似的方法,使用适当同位素标记的试剂替代非标记试剂来制备。

[0064] III. 制备本发明的组合物的方法

[0065] 可使用下文描述的技术来制备式1化合物。一些方案和实施例可省略为有机化学领域普通技术人员所知的常见反应(包括氧化、还原等)、分离技术(萃取、蒸发、沉淀、色谱、过滤、研磨、结晶等)以及分析程序的细节。此类反应和技术的细节可见于许多专著论文中,包括Richard Larock, *Comprehensive Organic Transformations* (1999) 和由Michael B. Smith等编辑的多卷系列, *Compendium of Organic Synthetic Methods* (1974及后续), 所述文献各自特此以引用的方式整体并入。起始材料和试剂可自商业来源获得或可使用文献方法来制备。一些反应方案可省略由化学转化产生的次要产物(例如,来自酯水解的醇、来自二酸脱羧的CO₂等)。此外,在一些情况下,反应中间体可在不分离或纯化的情况下即用于后续步骤中(即原位)。

[0066] 在一些以下反应方案和实施例中,某些化合物可使用保护基团来制备,所述保护基团防止在另外反应位点处发生不合乎需要的化学反应。保护基团还可用于增强溶解度或以其他方式改进化合物的物理性质。对于保护基团策略的论述、用于安置和移除保护基团的材料和方法的描述以及对适用于常见官能团(包括胺、羧酸、醇、酮、醛等)的保护基团的汇编,参见T.W. Greene和P.G. Wuts; *Protective Groups in Organic Chemistry*; 第3版; John Wiley & Sons, Inc.; New York (1999) 以及P. Kocienski, *Protective Groups*, Georg Thieme, Stuttgart (2000), 所述文献各自特此以引用的方式整体并入。

[0067] 一般来说,在整篇说明书中描述的化学转化可使用大致上化学计量的量的反应物来进行,但某些反应可受益于使用过量的一种或多种反应物。另外,在整篇说明书中公开的许多反应可在约室温(RT)和环境压力下进行,但取决于反应动力学、产率等,一些反应可在高压下操作或采用较高温度(例如回流条件)或较低温度(例如-78°C至0°C)。在本公开和权利要求书中对化学计量范围、温度范围、pH范围等的任何提及(无论是否明确使用词语“范围”)还包括指示的端点。

[0068] 许多化学转化也可采用一种或多种可相容溶剂,所述溶剂可影响反应速率和产率。取决于反应物的性质,一种或多种溶剂可以是极性质子溶剂(包括水)、极性非质子溶剂、非极性溶剂或某一组合。代表性溶剂包括饱和脂族烃(例如正戊烷、正己烷、正庚烷、正

辛烷、环己烷、甲基环己烷)；芳族烃(例如苯、甲苯、二甲苯)；卤化烃(例如二氯甲烷、氯仿、四氯化碳)；脂族醇(例如甲醇、乙醇、丙-1-醇、丙-2-醇、丁-1-醇、2-甲基-丙-1-醇、丁-2-醇、2-甲基-丙-2-醇、戊-1-醇、3-甲基-丁-1-醇、己-1-醇、2-甲氧基-乙醇、2-乙氧基-乙醇、2-丁氧基-乙醇、2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙醇、2-(2-乙氧基-乙氧基)-乙醇、2-(2-丁氧基-乙氧基)-乙醇)；醚(例如乙醚、二异丙醚、二丁醚、1,2-二甲氧基-乙烷、1,2-二乙氧基-乙烷、1-甲氧基-2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙烷、1-乙氧基-2-(2-乙氧基-乙氧基)-乙烷、四氢呋喃、1,4-二噁烷)；酮(例如丙酮、甲基乙基酮)；酯(乙酸甲酯、乙酸乙酯)；含氮溶剂(例如甲酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、乙腈、N-甲基-吡咯烷酮、吡啶、喹啉、硝基苯)；含硫溶剂(例如二硫化碳、二甲亚砷、四氢-噻吩-1,1,-二氧化物)；以及含磷溶剂(例如六甲基磷酰三胺)。

[0069] IV. 制剂和施用

[0070] 应对式1化合物(其包括它的药学上可接受的复合物、盐、溶剂合物和水合物)的生物药物性质进行评估以选择适当剂型和施用途径,所述性质如溶解度和在各pH下的溶液稳定性、渗透性等。意图用于药物用途的化合物可以结晶或非晶形产物形式施用,并且可通过如沉淀、结晶、冷冻干燥、喷雾干燥、蒸发干燥、微波干燥、或射频干燥的方法,例如以固体栓、粉末或膜剂形式获得。

[0071] 式1化合物可单独施用或与一种或多种药理学活性化合物组合施用。通常,一种或多种这些化合物一种或多种药学上可接受的赋形剂以药物组合物(制剂)形式施用。对赋形剂的选择尤其取决于特定施用模式、赋形剂对溶解度和稳定性的影响以及剂型的性质。有适用药物组合物和它们的制备方法可见于例如A.R.Gennaro(编辑),Remington:The Science and Practice of Pharmacy(第20th版,2000)中。

[0072] 式1化合物可口服施用。口服施用可涉及吞咽,在所述情况下,化合物通过胃肠道进入血流。或者或另外,口服施用可涉及粘膜施用(例如经颊施用、舌下施用、舌上施用)以使得化合物通过口腔粘膜进入血流。

[0073] 适用于口服施用的制剂包括固体、半固体和液体系统,如片剂;含有多颗粒或纳米颗粒、液体或粉末的软胶囊或硬胶囊;糖锭,其可被液体填充;咀嚼剂;凝胶剂;快速分散剂型;膜剂;卵形体;喷雾剂;和经颊或粘膜粘附贴片。液体制剂包括悬浮液、溶液、糖浆以及酞剂。此类制剂可作为填充剂在软胶囊或硬胶囊(例如由明胶或羟丙基甲基纤维素制得)中采用,并且通常包含载体(例如水、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、甲基纤维素或适合油)和一种或多种乳化剂、悬浮剂或两者。液体制剂也可通过复原固体(例如由囊剂)来制备。

[0074] 式1化合物也可用于快速溶解、快速崩解剂型,如在Liang和Chen,Expert Opinion in Therapeutic Patents(2001)11(6):981-986中描述的那些剂型中,所述文献特此以引用的方式整体并入。

[0075] 对于片剂剂型,取决于剂量,活性药物成分(API)可占剂型的约1wt%至约80wt%,或更通常,剂型的约5wt%至约60wt%。除API之外,片剂也可包括一种或多种崩解剂、粘合剂、稀释剂、表面活性剂、助流剂、润滑剂、抗氧化剂、着色剂、调味剂、防腐剂 and 掩味剂。崩解剂的实例包括淀粉乙醇酸钠、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、微晶纤维素、C₁₋₆烷基取代的羟丙基纤维素、淀粉、预胶凝化淀粉和海藻酸钠。通常,崩解剂将占剂型的约1wt%至约25wt%或约5wt%至约20wt%。

[0076] 粘合剂通常用于向片剂制剂赋予粘着品质。适合的粘合剂包括微晶纤维素、明胶、糖、聚乙二醇、天然和合成胶、聚乙烯吡咯烷酮、预胶凝化淀粉、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。片剂还可含有稀释剂,如乳糖(单水合物、喷雾干燥的单水合物、无水物)、甘露糖醇、木糖醇、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、微晶纤维素、淀粉和磷酸氢钙二水合物。

[0077] 片剂还可包含表面活性剂,如月桂基硫酸钠和聚山梨醇酯80;以及助流剂,如二氧化硅和滑石。当存在时,表面活性剂可占片剂的约0.2wt%至约5wt%,并且助流剂可占片剂的约0.2wt%至约1wt%。

[0078] 片剂还可含有润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酰反丁烯二酸钠、以及硬脂酸镁与月桂基硫酸钠的混合物。润滑剂可占片剂的约0.25wt%至约10wt%或约0.5wt%至约3wt%。

[0079] 片剂掺合物可被直接压制或通过碾压以形成片剂。或者,片剂掺合物或掺合物的部分可在制片之前湿法造粒、干法造粒或熔融造粒、熔融凝结或挤出。如果需要,则可在掺合一种或多种组分之前通过筛选或碾磨或两者来调整尺寸。最终剂型可包括一个或多个层并且可以是包衣的、未包衣的或囊封的。示例性片剂可含有多达约80wt%的API、约10wt%至约90wt%的粘合剂、约0wt%至约85wt%的稀释剂、约2wt%至约10wt%的崩解剂以及约0.25wt%至约10wt%的润滑剂。对对于掺合、制粒、碾磨、筛选、制片、包衣的论述以及用于制备药物产品的替代性技术的描述,参见A.R.Gennaro(编辑),Remington:The Science and Practice of Pharmacy(第20版,2000);H.A.Lieberman等人(编辑),Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets,第1-3卷(第2版,1990);以及D.K.Parikh&C.K.Parikh,Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology,第81卷(1997),所述文献各自特此以引用的方式整体并入。

[0080] 供人或兽医学使用的可消耗口服膜剂是柔韧水溶性或水可膨胀性薄膜剂型,其可迅速溶解或粘附粘膜。除API之外,典型膜剂还包含一种或多种成膜聚合物、粘合剂、溶剂、湿润剂、增塑剂、稳定剂或乳化剂、粘度调节剂和溶剂。其他膜剂成分可包括抗氧化剂、着色剂、调味剂和增味剂、防腐剂、唾液刺激剂、冷却剂、共溶剂(包括油)、软化剂、增积剂、消泡剂、表面活性剂和掩味剂。制剂的一些组分可执行多于一种功能。

[0081] 除给药要求之外,膜剂中的API的量可取决于它的溶解度。如果是水溶性的,则API通常将占膜剂中的非溶剂组分(溶质)的约1wt%至约80wt%或膜剂中的溶质的约20wt%至约50wt%。溶解性较低的API可占组合物的较大比例,通常多达膜剂中的非溶剂组分的约88wt%。

[0082] 成膜聚合物可选自天然多糖、蛋白质或合成水胶体,并且通常占膜剂的约0.01wt%至约99wt%或约30wt%至约80wt%。

[0083] 膜剂剂型通常通过对涂布在可剥离背衬载体或纸上的水性薄膜进行蒸发干燥来制备,所述干燥可在干燥烘箱或烘道(例如在组合的涂层干燥器件中)中、在冷冻干燥设备、或在真空烘箱中进行。

[0084] 适用于口服施用的固体制剂可包括立即释放型制剂和改良释放型制剂。改良释放型制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、受控释放、靶向释放以及程序化释放。关于适合的改良释放型制剂的一般说明,参见美国专利6,106,864,其特此以引用的方式整体并入。关于其他适用释放技术,如高能量分散以及渗透和包衣粒子的细节,参见Verma等人,

Pharmaceutical Technology On-line(2001)25(2):1-14,其特此以引用的方式整体并入。

[0085] 式1化合物也可直接施用至受试者的血流、肌肉或内部器官中。用于胃肠外施用的适合技术包括静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、鞘内施用、心室内施用、尿道内施用、胸骨内施用、颅内施用、肌肉内施用、滑膜内施用和皮下施用。用于胃肠外施用的适合装置包括针型注射器,包括微针注射器、无针注射器和输注装置。

[0086] 胃肠外制剂通常是水溶液,所述水溶液可含有赋形剂,如盐、碳水化合物和缓冲剂(例如pH约3至约9)。然而,对于一些应用,式1化合物可更适合被配制成无菌非水溶液或配制成待与适合媒介物,如无菌无热原水一起使用的干燥形式。在无菌条件下制备(例如通过冷冻干燥)胃肠外制剂可易于使用标准药物技术来完成。

[0087] 用于制备胃肠外溶液的化合物的溶解度可通过适当配制技术(如并入增溶剂)来增加。用于胃肠外施用的制剂可被配制成立即释放型或改良释放型。改良释放型制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放和程序化释放。因此,式1化合物可被配制成悬浮液、固体、半固体或触变性液体以便以提供活性化合物的改良释放的植入型储库形式来施用。此类制剂的实例包括药物涂覆的支架和半固体以及包含载有药物的聚(DL-乳酸-共乙醇酸)(PGLA)微球体的悬浮液。

[0088] 式1化合物也可局部施用、皮内施用或经皮施用至皮肤或粘膜。出于此目的的典型制剂包括凝胶剂、水凝胶、洗剂、溶液、霜剂、软膏、撒布剂、敷料、泡沫剂、膜剂、皮肤贴片、糯米纸囊剂、植入物、海绵、纤维、绷带和微乳剂。还可使用脂质体。典型载体可包括醇、水、矿物油、液体石蜡、白凡士林、甘油、聚乙二醇和丙二醇。局部制剂还可包含渗透增强剂。参见例如,Finnin和Morgan,J.Pharm.Sci.88(10):955-958(1999),其特此以引用的方式整体并入。

[0089] 局部施用的其他手段包括通过电穿孔、离子电渗法、声透疗法、超声导入和微针或无针(例如POWDERJECT™和BIOJECT™)注射来递送。用于局部施用的制剂可被配制成如上所述的立即释放型或改良释放型。

[0090] 式1化合物也可通常以干燥粉末、气溶胶喷雾或滴鼻剂形式鼻内施用或通过吸入来施用。吸入器可用于施用干燥粉末,所述干燥粉末包含单独API、API与稀释剂(如乳糖)的粉末掺合物、或包括API和磷脂(如磷脂酰胆碱)的混合组分粒子。对于鼻内使用,粉末可包括生物粘附剂,例如聚葡萄糖或环糊精。加压容器、泵、喷雾器、雾化器或喷洒器可用于自溶液或悬浮液产生气溶胶喷雾,所述溶液或悬浮液包含:API;一种或多种用于分散、溶解、或延长API释放的试剂(例如具有或不具有水的EtOH);一种或多种充当推进剂的溶剂(例如1,1,1,2-四氟乙烷或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷);和任选表面活性剂,如脱水山梨醇三油酸酯、油酸或低聚乳酸。使用电流体动力学的雾化器可用于产生细雾。

[0091] 在用于干燥粉末或悬浮液制剂中之前,药物产品通常被粉碎成适用于通过吸入来递送的粒子尺寸(通常以体积计,90%的粒子具有小于5微米的最大尺寸)。这可通过任何适当尺寸减小方法,如螺旋喷射碾磨、流化床喷射碾磨、超临界流体加工、高压均质化或喷雾干燥来达成。

[0092] 用于吸入器或吹入器中的胶囊、泡罩和药筒(例如由明胶或羟丙基甲基纤维素制得)可被配制来含有活性化合物、适合粉末基质(如乳糖或淀粉)和效能改进剂(如L-亮氨酸、甘露糖醇或硬脂酸镁)的粉末混合物。乳糖可为无水的或单水的。其他适合赋形剂包括

葡聚糖、葡萄糖、麦芽糖、山梨糖醇、木糖醇、果糖、蔗糖和海藻糖。

[0093] 用于使用电流体动力学来产生细雾的雾化器中的适合溶液制剂可含有每次传动约1 μ g至约20mg的API,并且传动体积可在约1 μ L至约100 μ L之间变化。典型制剂可包含式1化合物、丙二醇、无菌水、EtOH和NaCl。可替代丙二醇使用的替代性溶剂包括甘油和聚乙二醇。

[0094] 用于吸入施用、鼻内施用或两者的制剂可被配制成例如使用PGLA的立即释放型或调节释放型。适合调味剂(如甲醇和左薄荷脑)或甜味剂(如糖精或糖精钠)可添加至意图吸入/鼻内施用的制剂中。

[0095] 在干燥粉末吸入剂和气溶胶的情况下,借助于递送计量的量的阀来确定剂量单位。单位通常被安排来施用含有约10 μ g至约1000 μ g的API的计量的剂量或“喷出物(puff)”。总每日剂量通常将在约1mg/kg至约500mg/kg的范围内,其可以单次剂量或更通常以一整天的分次剂量来施用。

[0096] 活性化合物可例如以栓剂、子宫托、或灌肠剂的形式经直肠或经阴道施用。可可脂是传统栓剂基质,但适当时可使用各种替代物。用于经直肠或经阴道施用的制剂可被配制成如上所述的立即释放型或调节释放型。

[0097] 式1化合物也可通常以于等渗的pH调节的无菌盐水中的微粒化悬浮液或溶液的滴剂形式直接施用至眼或耳。适用于眼施用和耳施用的其他制剂包括软膏、凝胶剂、生物可降解植入物(例如可吸收凝胶海绵、胶原蛋白)、非生物可降解植入物(例如聚硅酮)、糯米纸囊剂、透镜、以及颗粒或囊泡系统(如囊泡或脂质体)。制剂可包含一种或多种聚合物和防腐剂(如氯化苯甲烃铵)。典型聚合物包括交联聚丙烯酸、聚乙烯醇、透明质酸、纤维素聚合物(例如羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、甲基纤维素)和杂多糖聚合物(例如结冷胶)。此类制剂也可通过离子电渗法来递送。用于眼或耳施用的制剂可被配制成如上所述的立即释放型或调节释放型。

[0098] 为改进式1化合物的溶解度、溶解速率、掩味性、生物可用度或稳定性,可将式1化合物与可溶性大分子实体组合,所述可溶性大分子实体包括环糊精和它的衍生物以及含有聚乙二醇的聚合物。例如,API-环糊精复合物通常适用于大多数剂型和施用途径。可使用包合复合物与非包合复合物两者。作为与API直接复合的替代方案,环糊精可用作辅助添加剂,即作为载体、稀释剂或增溶剂。 α -、 β -和 γ -环糊精常见地用于这些目的。参见例如,WO 91/11172、WO 94/02518和WO 98/55148,其各自特此以引用的方式整体并入。

[0099] 如上所指示,式1化合物(包括其药学上可接受的复合物、盐、溶剂合物和水合物)可与一种或多种其他活性药物活性化合物组合来治疗各种疾病、病症和疾患。在此类情况下,活性化合物可以如上所述的单一剂型来组合,或可以适用于共施用组合物的药盒形式提供。药盒包括(1)两种或更多种不同药物组合物,其中至少一种含有式1化合物;和(2)用于分开保有两种药物组合物的装置,如分装的瓶或分装的箔片包。这种药盒的一个实例是用于包装片剂或胶囊剂的熟悉的泡罩包装。药盒适用于施用不同类型的剂型(例如经口和胃肠外),或适用于在分开的给药间隔下施用不同药物组合物,或适用于滴定彼此不同的药物组合物。为有助于患者顺从性,试剂盒通常包括施用说明书,并且可配备有记忆辅助工具。

[0100] 为了施用至人患者,所要求保护的化合物的总每日剂量通常在约0.1mg/kg至约1.0mg/kg或约0.5mg/kg至约5.0mg/kg的范围内。在某些实施方案中,所述化合物或药学上

可接受的盐以约40mg/kg至约60mg/kg范围内的剂量施用。在某些实施方案中,在本文所述的方法中施用的式1化合物或其药学上可接受的盐以选自由以下组成的组中的范围的剂量施用:约5mg/kg至约15mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg、约15mg/kg至约25mg/kg、约20至约30mg/kg、约25mg/kg至约35mg/kg、约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg以及约45mg/kg至约55mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量在选自由以下组成的组的范围内:约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg、约40mg/kg至约50mg/kg、约45mg/kg至约55mg/kg、约50mg/kg至约60mg/kg、约55mg/kg至约65mg/kg以及约60mg/kg至约70mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量可以是约50mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量大于约1mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是约1mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量在选自由以下组成的组的范围内:约50mg/kg至约100mg/kg、约100mg/kg至约150mg/kg、约150mg/kg至约200mg/kg、约200mg/kg至约250mg/kg、约250mg/kg至约350mg/kg、约300mg/kg至约350mg/kg、约350mg/kg至约400mg/kg、约400mg/kg至约450mg/kg、约450mg/kg至约500mg/g。在某些实施方案中,所述剂量是约500mg/kg。或者,所述剂量小于500mg/kg。

[0101] 在某些实施方案中,所述剂量是35mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是36mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是37mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是38mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是39mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是40mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是41mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是42mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是43mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是44mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是45mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是46mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是47mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是48mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是49mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是50mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是51mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是52mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是53mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是54mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是55mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是56mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是57mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是58mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是59mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是60mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是61mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是62mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是63mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是64mg/kg。在某些实施方案中,所述剂量是65mg/kg。总每日剂量可以单次或分次剂量形式施用,并且在医师的判断下,可处于以上给出的典型范围之外。尽管这些剂量是基于质量约60kg至约70kg的平均人受试者,但医师将能够确定质量超出此质量范围的患者(例如儿科患者)的适当剂量。

[0102] 式1化合物可用于治疗指示调节GPR6的疾病、病症或疾患。如上所述,Gs偶联的GPR6的拮抗作用或反向激动作用提供了多巴胺介导的D2受体活化的功能性替代物。因此,调节GPR6活性的化合物可用于治疗多种神经障碍和精神障碍,包括运动障碍,如帕金森病、左旋多巴诱发的运动障碍和亨廷顿病以及药物成瘾、进食障碍、认知障碍、精神分裂症、躁郁症、癫痫和抑郁症。在某些实施方案中,式1化合物改善受试者的运动症状以治疗帕金森病。在某些实施方案中,式1化合物包含于与金刚烷胺的组合疗法中以用于治疗这些病症。

[0103] 帕金森病的病理学标志是黑质内的神经元细胞损失。黑质纹状体途径的变性引起多巴胺的纹状体浓度降低,这导致运动和非运动临床表现。许多帕金森病患者用左旋多巴

(多巴胺的一种前药)治疗。左旋多巴具有常见的严重副作用,包括诱发的运动障碍(LID)、冲动控制障碍(ICD)、精神病性症状和睡眠紊乱。LID是一种进行性疾病,其中约90%的帕金森病患者在10年内发展LID。LID的啮齿动物模型中的MSN中的D1受体信号传导发生不可逆的适应,包括降低的脱敏作用,从而导致直接途径中的超敏反应。D1受体而非D2受体的遗传失活消除小鼠中的LID。但是,D1受体信号传导的阻断并不影响左旋多巴的抗帕金森病功效。6-OHDA模型模拟帕金森病的许多方面,包括多巴胺神经传递的丧失和运动障碍。

[0104] 所要求保护的化合物可与一种或多种其他药理学活性化合物或疗法组合以治疗与GPR6相关的一种或多种疾病、病症或疾患。此类组合可提供显著治疗优势,包括副作用较少、治疗服务匮乏的患者群体的能力提高或协同活性。例如,式1化合物(其包括其药学上可接受的复合物、盐、溶剂合物和水合物)可与一种或多种用于治疗运动障碍(包括帕金森病)的化合物或疗法同时、依序或分开施用。这些化合物包括左旋多巴;DOPA脱羧酶抑制剂,如卡比多巴、苄丝肼、甲基多巴、 α -二氟甲基-DOPA和3',4',5,7-四羟基-8-甲氧基异黄酮;多巴胺激动剂,如盐酸阿扑吗啡、溴隐亭、罗替戈汀、普拉克索和罗匹尼罗;金刚烷胺;抗胆碱能药,如苯海索和甲磺酰苯扎托品;B选择性单胺氧化酶(MAO-B)抑制剂,如沙芬酰胺、司来吉兰和雷沙吉兰;以及邻苯二酚O-甲基转移酶(COMT)抑制剂,如恩他卡朋和托卡朋。

[0105] 除了用于治疗运动障碍的药物外,式1化合物还可与用于治疗阿尔茨海默病和其他影响认知的疾病、病症和疾患的药物组合。此类药物包括 β -分泌酶抑制剂、 γ -分泌酶抑制剂、HMG-辅酶A还原酶抑制剂、非类固醇抗炎药(NSAID,如阿扎丙宗、阿司匹林、塞来昔布、双氯芬酸(与或不与米索前列醇一起)、二氟尼柳、依托度酸、非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、甲氯芬那酸钠、甲芬那酸、美洛昔康、萘丁美酮、萘普生、奥沙普秦、苯基丁氮酮、吡罗昔康、胆碱和水杨酸镁、双水杨酯以及舒林酸)、维生素E以及抗淀粉样蛋白抗体。用于治疗阿尔茨海默病的化合物的具体实例包括多奈哌齐、卡巴拉汀、美金刚和加兰他敏。

[0106] 另外或可替代地,式1化合物可与镇静剂、催眠药、抗焦虑药、抗精神病药和镇定剂以及用于治疗神经疾病或精神疾病的其他药物组合。例如,式1化合物可与用于治疗抑郁症(抗抑郁药)和/或精神分裂症(非典型或典型抗精神病药)的一种或多种剂组合,所述一种或多种剂包括阿米替林、阿莫沙平、阿立哌唑、阿塞那平、安非他酮、利眠宁、西酞普兰、氯丙嗪、氯氮平、地昔帕明、去甲文拉法辛、多塞平、度洛西汀、依他普仑、氟西汀、氟西汀、氟非那嗪、氟哌啶醇、伊潘立酮、丙咪嗪、异卡波肼、拉莫三嗪、左米那普仑、鲁拉西酮、米氮平、奈法唑酮、去甲替林、奥氮平、帕潘立酮、帕罗西汀、奋乃静、苯乙肼、普罗替林、奎硫平、利培酮、司来吉兰、舍曲林、反苯环丙胺、曲唑酮、曲米帕明、文拉法辛、维拉佐酮以及沃替西汀和齐拉西酮。

[0107] 同样地,式1化合物可与用于治疗焦虑症(抗焦虑药)的一种或多种剂组合,所述一种或多种剂包括苯二氮卓类(阿普唑仑、利眠宁、clobazepam、氯硝西洋、氯氮卓、地西洋、艾司唑仑、氟西洋、劳拉西洋、咪达唑仑、奥沙西洋、普拉西洋、夸西洋、替马西洋和三唑仑)、抗组胺药(羟嗪)、非苯二氮卓类(右佐匹克隆、扎来普隆、唑吡坦和佐匹克隆)以及丁螺环酮。

[0108] 式1化合物还可与用于治疗癫痫的一种或多种剂(抗癫痫药或抗惊厥药)组合,包括乙酰唑胺、卡马西平、氯巴占、氯硝西洋、乙酸艾司利卡西平、乙琥胺、加巴喷丁、拉科酰胺、拉莫三嗪、左乙拉西坦、硝西洋、奥卡西平、吡仑帕奈、吡拉西坦、苯巴比妥、苯妥英、普瑞

巴林、普里米酮、瑞替加滨、卢非酰胺、丙戊酸钠、司替戊醇、噻加宾、托吡酯、氨己烯酸以及唑尼沙胺。

[0109] 生物学活性

[0110] 作为GPR6调节剂的化合物的活性可通过多种方法,包括体外和体内方法来测定。

[0111] I. cAMP的体外抑制(EC₅₀)

[0112] 这种基于细胞的测定测量测试化合物抑制在CHO-K1细胞中表达的GPR6受体的组成型cAMP活性的能力。CHO细胞以GPR6受体稳定表达,所述受体的表达受四环素诱导型元件控制。将细胞在含有F12K、10%FBS、1%Penn/Strep、200μg/mL潮霉素的培养基中培养。在生长培养基中用2μg/mL强力霉素(Sigma D9891)诱导GPR6受体表达持续20小时。在添加强力霉素后,将细胞以450-750个细胞/孔的密度接种于96孔半体积黑色组织培养板(Costar)中,并在cAMP测定之前置于孵育箱(37°C, 5%CO₂)中20小时。

[0113] 从细胞中移除培养基,并将所述细胞用50μL/孔的林格氏缓冲液(MgCl₂ 0.047mg/mL、NaH₂PO₄ 0.18mg/mL、Na₂HPO₄ 0.1mg/mL、KCl 0.34mg/mL、NaHCO₃ 1.26mg/mL、D-葡萄糖 1.8mg/mL、NaCl 7mg/mL;pH=7.4)洗涤。将测试化合物悬浮于DMSO中,在含有0.5%无脂脂肪酸BSA加300μM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)的林格氏缓冲液中稀释,并在37°C和5%CO₂下于细胞上孵育45分钟。在孵育后,将细胞在室温下用来自PerkinElmer LANCE®Ultra cAMP测定试剂盒(TRF0263)的Eu-cAMP示踪剂溶液调理10分钟。然后添加来自 LANCE®试剂盒的ULIGHT™-抗cAMP溶液并在室温下在振荡器上孵育1小时,然后在PerkinElmer EnVision板阅读器中进行均相时间分辨荧光(HTRF)检测。使用GraphPad Prism 5.03通过四参数逻辑斯谛方程生成EC₅₀曲线。

[0114] II. cAMP的体外抑制(IC₅₀)

[0115] 这种基于细胞的测定还测量化合物抑制在CHO-K1细胞中表达的GPR6受体的组成型cAMP活性的能力。CHO细胞以GPR6受体稳定表达,所述受体的表达受四环素诱导型元件控制。将细胞在含有F12K、10%FBS、1%Penn/Strep、200μg/mL潮霉素的培养基中培养。在生长培养基中用1μg/mL强力霉素(Sigma D9891)诱导GPR6受体表达持续20小时。在添加强力霉素后,将细胞以250-500个细胞/孔的密度接种于半体积黑色透明底部板(Costar)中,并在cAMP测定之前置于孵育箱(37°C, 5%CO₂)中20小时。

[0116] 从细胞中移除培养基,并将所述细胞用50μL的林格氏缓冲液(MgCl₂ 0.047mg/mL、NaH₂PO₄ 0.18mg/mL、Na₂HPO₄ 0.1mg/mL、KCl 0.34mg/mL、NaHCO₃ 1.26mg/mL、D-葡萄糖 1.8mg/mL、NaCl 7mg/mL;pH=7.4)洗涤。将悬浮在DMSO中的化合物在含有0.5%无脂脂肪酸BSA的林格氏缓冲液中稀释,并在37°C和5%CO₂下于细胞上孵育45分钟。在孵育后,将细胞在室温下与来自PerkinElmer LANCE®Ultra cAMP测定试剂盒(TRF0264)的Eu-cAMP示踪剂溶液一起孵育10分钟。然后,添加来自 LANCE®试剂盒的ULIGHT™-抗cAMP溶液并在室温下在振荡器上孵育1小时,然后在BMG POLARSTAR®Omega板阅读器中进行HTRF检测。使用GraphPadPrism 5.03通过四参数逻辑斯谛方程生成IC₅₀曲线。

[0117] III. 与GPR6的体外竞争结合(K_i)

[0118] 使用基于过滤的形式的竞争结合测定来研究GPR6反向激动剂的结合特征。所述方法采用由表达通过强力霉素诱导型启动子驱动的人GPR6 cDNA的CHO-K1细胞制备的膜。使

用液体处理器(5 μ M,最终测定最高浓度),在DMSO中制备含有测试化合物(1 μ L测试配体/孔)的连续稀释液的测定准备96孔板(651201, Greiner, USA)。添加测定缓冲液(50mM Tris (pH 7.4)、50mM NaCl、6mM MgCl₂、不含脂肪酸的0.1%BSA、1:100蛋白酶抑制剂混合物, Sigma USA) (39 μ L/孔),并将板在板振荡器上混合10分钟。在测定缓冲液中制备GPR6特异性³H放射性配体,且将其添加至每个孔(40 μ L, 2.4nM最终测定浓度)。

[0119] 为了起始结合反应,添加从表达人GPR6受体的细胞获得的40 μ L总膜。将所述膜在测定缓冲液中制备且每孔添加至15 μ g/孔的最终测定浓度。将板密封,在300RPM下混合30秒,并在室温下孵育2小时。随后将反应混合物通过filtermate (1450-421, filtermate A, PerkinElmer, USA) 过滤,并使用Tomtec HARVERSTER96™仪器用缓冲液(50mM Tris (pH 7.4)、50mM NaCl、6mM MgCl₂、不含脂肪酸的0.1%BSA)洗涤5次。将过滤器在微波中干燥。将闪烁体片(1450-411, PerkinElmer, USA)在过滤器上熔融并加热封,然后在MICROBETA® Trilux仪器(PerkinElmer, USA)中对CPM/孔进行定量。在使用前,将filtermate在0.5%聚乙烯亚胺溶液中预浸泡3小时,同时轻轻振荡,然后风干过夜。使用Prism(GraphPad, USA)中的非线性回归分析来计算IC₅₀和Ki值。在标准放射性配体饱和度实验中测定Kd值。

[0120] IV. 体内帕金森病模型-氟哌啶醇诱发的僵住症

[0121] 帕金森病的运动症状包括运动不能、运动迟缓、僵硬、震颤和体位异常,并与黑质多巴胺能细胞的损失和纹状体多巴胺水平降低相关。氟哌啶醇施用至啮齿类动物导致短暂的帕金森病样状态,所述状态通过施用左旋多巴和其他已经过临床验证用于治疗帕金森病的药物逆转。参见Duty, S. & Jenner, P. Br. J. Pharmacol. 164: 1357-1391 (2011), 其特此以引用的方式整体并入。氟哌啶醇拮抗多巴胺D2、并在较小程度上拮抗中型多棘神经元中的D1受体,所述受体分别构成运动回路的间接和直接途径。所产生的纹状体多巴胺传递阻滞导致基底神经节回路内的异常下游发射,其表现为肌肉僵硬和僵住症的症状。僵住症被认为可反映帕金森病的临床特征,从而使患者无法发起运动。

[0122] 使用重25-35g的雄性C57B16小鼠。通过在垂直网格测试中测试动物前至少30分钟皮下(sc)施用多巴胺受体拮抗剂氟哌啶醇(0.45mg/kg)来诱发僵住症。对于此测试,将大鼠或小鼠置于与工作台成约70度角放置的25cm x 43cm有机玻璃笼的金属丝网盖上。将受试者置于网格上,使所有四条腿外展并延伸(“蛙样姿势”)。使用这种不自然的姿势对于针对僵住症的此测试的特异性至关重要。对于大鼠,对从放置脚爪直到第一次完全移除一个脚爪的时间跨度(下降延迟)进行最大测试持续120秒。对于小鼠,将其前爪置于Plexiglas平台上方升高2”的水平金属条上,并且每次试验最多记录30秒的时间。当动物的前爪返回平台或30秒后,测试结束。重复所述测试三次,并且将三次试验的平均值报告为僵住症的强度指数。在给药氟哌啶醇后60或90分钟重新评价在给药后30分钟时评价的动物。

[0123] 在向受试者给药0.45mg/kg ip(腹膜内注射)的氟哌啶醇以及GPR6调节剂测试化合物后30分钟、60分钟和/或90分钟,测量GPR6调节剂用于逆转氟哌啶醇诱发的僵住症的功效。式1化合物与氟哌啶醇结合以0.1至100mg/kg的剂量范围(于0.5%甲基纤维素中口服/经口)施用。腺苷A2A拮抗剂SCH 420814(瑞德南特)以3mg/kg ip给药作为阳性对照。

[0124] V. 经由膜片钳技术抑制人hERG

[0125] 自动全细胞膜片钳系统(QPATCH®16)用于记录来自单个细胞的外向钾电流。

所述测定采用用人hERG cDNA稳定转染的CHO-K1 (中国仓鼠卵巢) 细胞。通过胰蛋白酶化收获细胞,并在记录前在室温下保持在无血清培养基中。洗涤细胞并将其重悬于细胞外溶液中,然后再施加至自动膜片钳位点。在膜片钳测定当天,在水性细胞外溶液 (137mM NaCl、4mM KCl、1.8mM CaCl₂、1mM MgCl₂、10mM D(+)-葡萄糖、10mM HEPES,用NaOH将pH调节至7.4) 中制备测试溶液。使用七种浓度 (0.03、0.1、0.3、1、3、10和30 μ M) 的测试化合物来测定IC₅₀。水性细胞内溶液含有130mM KCl、10mM NaCl、1mM MgCl₂、10mM EGTA、5mM MgATP和10mM HEPES (用KOH将pH调节至7.2)。

[0126] 在实现全细胞配置之后,将细胞保持在-80mV。递送50ms脉冲至-40mV以测量泄漏电流,将所述泄漏电流从在线尾电流中减去。然后将细胞去极化至+20mV持续2秒钟,然后是1秒脉冲至-40mV,以显示hERG尾电流。这种范例每5秒递送一次,以监测电流振幅。所述测定在室温下进行。首先施加细胞外溶液 (对照),并且使细胞在所述溶液中稳定5分钟。然后将测试化合物从低到高的浓度依次施加在同一细胞上。将细胞用每种测试浓度孵育5分钟。同时以多种浓度测试了参考化合物E-4031 (N-(4-(1-(2-(6-甲基吡啶-2-基)乙基)哌啶-4-羰基)苯基)甲磺酰胺) 以获得IC₅₀值。通过比较化合物施用之前和之后的尾电流幅度来计算hERG通道的抑制百分比 (将电流差标准化至对照)。

[0127] 实施例

[0128] 以下实施例意图是说明性的并且是非限制性的,并且代表本发明的具体实施方案。

[0129] I. ¹H核磁共振谱 (NMR)

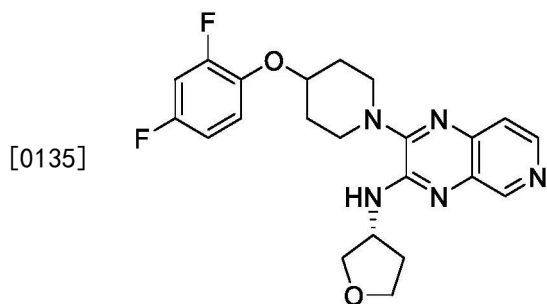
[0130] 在以下实施例中,获得许多所述化合物的¹H NMR谱。使用用于指示主峰的常规缩写,以相对于四甲基硅烷的低场的百万分率给出特征性化学位移 (δ),所述缩写包括s (单峰)、d (双重峰)、t (三重峰)、q (四重峰)、m (多重峰) 和br (宽峰)。以下缩写用于常见溶剂: CDCl₃ (氘代氯仿)、DMSO-d₆ (氘代二甲亚砜)、CD₃OD (氘代甲醇)、CD₃CN (氘代乙腈) 以及THF-d₈ (氘代四氢呋喃)。使用电喷雾电离 (ESI-MS) 或大气压化学电离 (APCI-MS) 质谱法记录质谱 ([M+H]⁺的m/z)。

[0131] II. 高效液相色谱法

[0132] 在指明的情况下,某些制备和实施例的产物通过质量触发的HPLC (例如,泵: WATERTM 2525;MS:ZQTM;软件:MASSLYNXTM)、快速色谱法或制备型薄层色谱法 (TLC) 进行纯化。反相色谱法通常在柱 (例如,Phenomenex GEMINITM 5 μ ,C18,30mm x 150mm;AXIATM,5 μ ,30mm x 75mm) 上在酸性条件 (“酸性模式”) 下用分别含有0.035%和0.05%三氟乙酸 (TFA) 的CH₃CN和水流动相洗脱,或者在碱性条件 (“碱性模式”) 下用二者均含有10mM NH₄HCO₃的水和20/80 (v/v) 水/乙腈流动相洗脱来进行。制备型TLC通常在硅胶60F₂₅₄板上进行。在通过色谱法分离后,除去溶剂并且通过在离心蒸发器 (例如,GeneVacTM)、旋转蒸发器、真空烧瓶等中干燥来获得产物。在惰的气氛 (例如,氮) 或反应气氛 (例如,H₂) 中的反应通常在约1个大气压 (14.7psi) 的压力下进行。

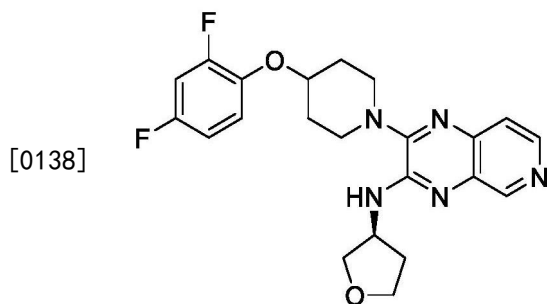
[0133] III. 合成

[0134] 制备1: (R)-2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)-N-(四氢呋喃-3-基)吡啶并[3,4-b]吡嗪-3-胺



[0136] 向3-氯-2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)吡啶并[3,4-b]吡嗪(10g,26.5mmol)于DMSO(50mL)中的溶液添加(R)-四氢呋喃-3-胺(ArkPharm,AK-75910,批次WZG082316-PB01)(5.32mL,61.0mmol)。将所述溶液在70℃加热10小时,然后用水(300mL)稀释,并用iPrOAc(300mL)萃取。用iPrOAc(100mL)进一步萃取水相。合并有机层,用饱和水性NH₄Cl(300mL)和盐水(200mL)洗涤,经MgSO₄干燥,真空浓缩并在室内真空下干燥以得到浅黄色固体(11.4g)。在搅拌下将固体溶解在iPrOAc(55mL)中并加热至回流。缓慢且分批添加庚烷(33mL),同时加热以防止沉淀。然后在搅拌(约400rpm)下将溶液冷却至20℃,在此期间形成沉淀物。将混合物缓慢冷却至环境温度,并搅拌过夜。通过真空过滤收集固体,用在庚烷中的冰冷20% iPrOAc冲洗,通过抽真空通过滤饼干燥至少30分钟,且收集以得到呈浅黄色固体的标题化合物(9.771g,86%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δppm 1.84-1.96(m,2H),2.01-2.16(m,3H),2.20-2.31(m,1H),3.22-3.31(m,2H),3.64-3.80(m,4H),3.85-3.93(m,1H),4.00(dd,J=9.28,6.35Hz,1H),4.55-4.67(m,2H),6.94(d,J=5.86Hz,1H),6.99-7.06(m,1H),7.25-7.37(m,2H),7.46(d,J=5.37Hz,1H),8.31(d,J=5.37Hz,1H),8.79(s,1H);ESI-MS m/z[M+H]⁺428。

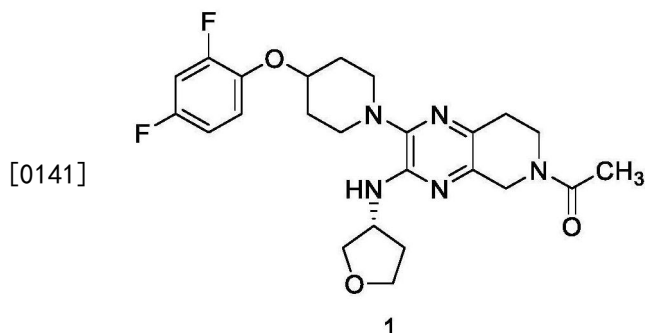
[0137] 制备2:(S)-2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)-N-(四氢呋喃-3-基)吡啶并[3,4-b]吡嗪-3-胺



[0139] 向3-氯-2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)吡啶并[3,4-b]吡嗪(1.0g,2.65mmol)于DMSO(5mL)中的溶液添加(S)-四氢呋喃-3-胺(AstaTech目录号37021)(0.578mL,6.64mmol)。将所述溶液在密封的微波小瓶中于70℃加热22小时,此时HPLC-MS显示反应完成。将反应混合物(5mL)用水(150mL)稀释,并用iPrOAc(150mL)萃取。用iPrOAc(50mL)进一步萃取水相。合并有机层,用饱和水性NH₄Cl(150mL)和盐水(100mL)洗涤,经MgSO₄干燥,并在真空下在CELITE®上浓缩。将粗产物通过柱色谱法(30g NH硅胶柱)以庚烷中的0%至60% EtOAc的梯度洗脱进行纯化以得到呈白色固体的标题化合物(1.05g,93%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δppm 1.90(td,J=8.54,3.91Hz,2H),2.01-2.16(m,3H),2.20-2.31(m,1H),3.21-3.32(m,2H),3.63-3.80(m,4H),3.89(q,J=7.49Hz,1H),4.00(dd,

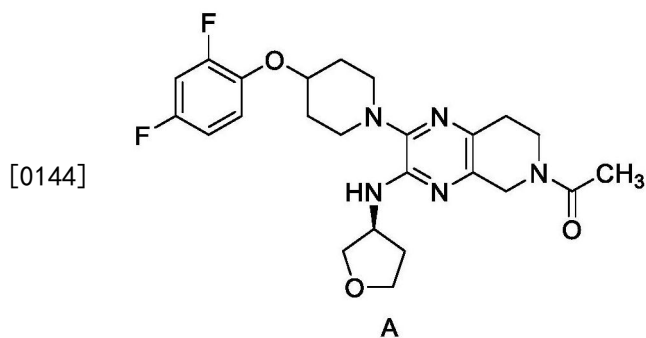
$J=9.28, 6.35\text{Hz}, 1\text{H}$), $4.54-4.67$ (m, 2H), 6.96 (d, $J=6.35\text{Hz}, 1\text{H}$), $7.00-7.08$ (m, 1H), $7.26-7.39$ (m, 2H), 7.46 (d, $J=5.37\text{Hz}, 1\text{H}$), 8.31 (d, $J=5.37\text{Hz}, 1\text{H}$), 8.79 (s, 1H); ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 428。

[0140] 实施例1: (R)-1-(2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)-3-((四氢呋喃-3-基)氨基)-7,8-二氢吡啶并[3,4-b]吡嗪-6(5H)-基)乙-1-酮



[0142] 在氮气下向装有HOAc (80mL) 和THF (80mL) 中的 (R)-2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)-N-(四氢呋喃-3-基)吡啶并[3,4-b]吡嗪-3-胺 (16g, 37.4mmol) 的烧瓶中添加乙酸酐 (17.66mL, 187mmol)。在氮气下添加钨碳 (10%, Aldrich 205699-10G, 批号MKBZ3284V) (3.19g, 2.99mmol)。将烧瓶连接至充满氢气的气球上, 并用室内真空抽空, 且用氢气重新填充八次。将反应混合物在氢气下搅拌40小时, 且然后通过CELITE®垫过滤, 注意不要让滤饼变干。将烧瓶和滤饼用EtOAc (48mL)、甲醇 (48mL) 和EtOAc (48mL) 冲洗。将滤液在真空中浓缩以除去THF、EtOAc和甲醇 (浴温 $<40^{\circ}\text{C}$)。将所述溶液用庚烷 (480mL) 稀释, 并且在真空中重新浓缩以共沸除去HOAc (浴温 $<45^{\circ}\text{C}$)。将残余物溶解在iPrOAc (320mL) 中, 用10wt% 水性 K_2CO_3 (320mL, 230mmol) (洗涤前pH 13, 洗涤后pH 10) 和盐水 (240mL, 洗涤后pH 7) 洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 在真空中浓缩, 并且在室内真空下干燥至少1小时以得到浅黄色固体 (16.71g)。将粗产物溶解在乙醇 (84mL) 中, 并在搅拌下在油浴中加热。在固体溶解后, 在搅拌下使溶液在油浴中缓慢冷却, 在此期间开始形成沉淀物, 并且溶液变得浑浊。使混合物在油浴中冷却至环境温度, 并搅拌过夜。在重结晶后, 通过真空过滤收集白色固体, 用冰冷的乙醇冲洗, 并在高真空下干燥以得到呈白色固体的标题化合物 (13.34g, 75%)。 ^1H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{ppm} 1.81-2.00 (m, 3H), 2.02-2.12 (m, 5H), 2.14-2.24 (m, 1H), 2.60 (t, $J=5.61\text{Hz}, 1\text{H}$), 2.72 (t, $J=5.86\text{Hz}, 1\text{H}$), 2.84-2.96 (m, 2H), 3.26-3.32 (m, 2H), 3.56 (dt, $J=8.79, 5.13\text{Hz}, 1\text{H}$), 3.65-3.78 (m, 3H), 3.81-3.94 (m, 2H), 4.33-4.47 (m, 3H), 4.52 (tt, $J=8.18, 4.03\text{Hz}, 1\text{H}$), 5.91 (dd, $J=13.42, 6.10\text{Hz}, 1\text{H}$), 6.97-7.05 (m, 1H), 7.24-7.36 (m, 2H); ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 474; mp 150°C (DSC峰); 手性纯度 (经由手性柱色谱法) $>98\%$ ee。

[0143] 化合物A: (S)-1-(2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)-3-((四氢呋喃-3-基)氨基)-7,8-二氢吡啶并[3,4-b]吡嗪-6(5H)-基)乙-1-酮



[0145] 在氮气下向装有HOAc (5mL) 和THF (5mL) 中的 (S) -2-(4-(2,4-二氟苯氧基)哌啶-1-基)-N-(四氢呋喃-3-基)吡啶并[3,4-b]吡嗪-3-胺(1.05g, 2.456mmol) 的烧瓶中添加乙酸酐(1.159mL, 12.28mmol)。在氮气下添加钨碳(10%, Aldrich 205699-10G, 批号MKBZ3284V) (0.523g, 0.491mmol)。将烧瓶连接至充满氢气的气球上, 并用室内真空抽空, 且用氢气重新填充八次。将反应混合物在氢气下搅拌18小时, 且然后通过 Celite® 垫过滤, 注意不要让滤饼变干。将烧瓶和滤饼用EtOAc (20mL)、甲醇 (20mL) 和EtOAc (20mL) 冲洗, 并将滤液在真空中在 CELITE® 上浓缩。将粗产物通过柱色谱法(120g NH硅胶柱, 尺寸200) 以庚烷中的0%至60%EtOAc的梯度洗脱进行纯化以得到白色固体(1.0g)。将白色固体溶解于乙醇(5mL) 中, 并在油浴中在搅拌下加热至80°C。在固体溶解后, 停止加热, 并在搅拌下使溶液在油浴中缓慢冷却至20°C。将混合物在室温下搅拌3天。通过真空过滤收集固体, 用冰冷的乙醇冲洗, 并在高真空下干燥以得到呈白色固体的标题化合物(848mg, 72.9%)。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δppm 1.82-2.00 (m, 3H), 2.02-2.12 (m, 5H), 2.13-2.24 (m, 1H), 2.60 (t, J=5.86Hz, 1H), 2.72 (t, J=5.86Hz, 1H), 2.83-2.96 (m, 2H), 3.24-3.32 (m, 2H), 3.56 (dt, J=8.79, 5.25Hz, 1H), 3.66-3.77 (m, 3H), 3.81-3.94 (m, 2H), 4.33-4.47 (m, 3H), 4.52 (tt, J=8.08, 3.87Hz, 1H), 5.93 (dd, J=13.30, 6.22Hz, 1H), 6.98-7.06 (m, 1H), 7.24-7.35 (m, 2H); ESI-MS m/z [M+H]⁺474; mp 149°C (DSC峰); 手性纯度(经由手性柱色谱法) >98% ee。

[0146] IV. cAMP的体外抑制(EC₅₀) 测定

[0147] 表1列出根据基于细胞的测定测试的式1化合物(实施例1) 和化合物A的生物学测定数据(cAMP的体外抑制), 所述基于细胞的测定测量测试化合物抑制在CHO-K1细胞中表达的GPR6受体的组成型cAMP活性的能力(报告为pEC₅₀)。所述测定在说明书中在标题“cAMP的体外抑制(EC₅₀)”下进行了描述。

[0148] 表1. GPR6受体的组成型cAMP活性的体外抑制

[0149]

化合物	pEC ₅₀
-----	-------------------

[0150]

式 1	7.2
化合物 A	7.2

[0151] 通过使用说明书中在标题“cAMP的体外抑制(IC₅₀)”下描述的测定确定化合物的IC₅₀来进行进一步分析。”

[0152] V. cAMP的体外抑制(IC₅₀) 测定

[0153] 表2列出对于式1化合物(实施例1) 和对于化合物A, 来自GPR6竞争结合测定的抑制

常数 (K_i) 和来自hERG功能测定的 IC_{50} 值。如上所述,使用竞争结合测定获得每种化合物的 K_i ,所述竞争结合测定使用基于过滤的形式,利用从表达人GPR6 cDNA的CHO-K1细胞制备的膜;使用hERG功能测定获得每种化合物的 IC_{50} ,所述测定采用自动化的全细胞膜片钳系统,所述系统利用用人hERG cDNA转染的CHO-K1细胞。

[0154] 表2中的数据表明与化合物A相比,式1化合物是hERG的显著效力较弱的抑制剂。如果假设在最大游离化合物(药物)浓度下GPR6的50%占用率,则表2中所示的比率($hERG\ IC_{50}/K_i$)可被视为游离药物的安全界限(“无SM”),如文献中所定义(参见X. Yao等人, *British Journal of Pharmacology* (2008) 154:1446-56, 50, 其特此以引用的方式整体并入)。比较安全界限,式1化合物展现可进展至体内研究的改进的无SM。小于300的无SM被认为适合进展至体内研究中,如Yao等人在第1452页中所定义(“发现表明300或更高的无SM可能表示没有引起QTc延长的潜力”)。

[0155] 表2. GPR6竞争抑制(K_i)和hERG抑制(IC_{50})

化合物	K_i (nM)	IC_{50} (nM)	($hERG\ IC_{50}$)/ K_i
式1	5.5	1970	358
化合物A	6.0	505	84

[0157] 还分析了式1化合物(实施例1)和化合物A逆转氟哌啶醇诱导的僵住症的能力。根据公开内容中在标题“体内帕金森病模型-氟哌啶醇诱发的僵住症”下描述的测定来对化合物进行测试。

[0158] VI. 6-羟基多巴胺(6-OHDA)大鼠模型的处理

[0159] 改善运动活动的化合物被认为是帕金森病的潜在疗法。帕金森病的6-OHDA模型的大鼠接受了双侧6-OHDA注射到纹状体中,并协调前部-后部(AP):内侧-外侧(ML):背侧-腹侧(DV), 1 ± 3 , 相对于麻醉下前囟-5mm。至少28天后测试大鼠的自发活动。在用式1(实施例1)或媒介物(对照)给药之前,将动物在自发活动箱中适应30分钟。

[0160] 在覆盖在红外光束阵列的开放现场场地中测量自发活动。使用AMLOGGER软件处理动物的束流分裂,以监测活动。如图1所示,与50分钟后施用媒介物(对照组)的大鼠相比,对于两种剂量(5mg/kg和10mg/kg),式1(实施例1)均显示自发活动的剂量依赖性改善。在施用10mg/kg剂量的大鼠中观察到活动的显著增加。这些数据表明,式1(实施例1)将有效改善帕金森病患者的症状。

[0161] VII. 使用遥测术,式1(实施例1)对心血管系统的作用

[0162] 在至少8个月大且体重7-15kg的有意识的比格犬(Marsahall BioResources, North Rose, NY)中,式1(实施例1)的潜在心血管作用。根据适当的查尔斯河实验室,蒙特利尔,QC标准操作程序(TB12-04-06),将比格犬配备来自DSI PHYSIOTEL® Digital L21发射器植入物的遥测装置。将生物电势导线置于改良的导线II构型中。为了使动物适应实验室环境,在动物到达与开始遥测装置的外科植入之间允许至少6天的适应期。在手术与开始处理之间允许至少4周的恢复期。除指定程序期间外,动物房间环境的目标条件是在 17°C 与 23°C 之间、30%-70%湿度下,伴随12小时光照和12小时黑暗。

[0163] 可将动物社交地安置在配备有自动浇水阀的不锈钢笼中,如实验动物的护理和使用指南(第8版,国家科学院出版社,2111)中所述,所述文献特此以引用的方式整体并入,除了给药和监测单独圈养动物的时期外。

[0164] 在外科手术植入DSI PHYSIOTEL® Digital L21发射器后,动物在手术后7天接受食物补充,所述食物补充包括与300g的PMI NUTRITION®国际认证的狗粮5005号混合的1罐AID处方饮食持续3天数,以及与300g的PMI NUTRITION®国际认证的狗粮5007号混合的1罐AID处方饮食持续4天。在给药当天,在给药开始之前至少5小时提供食物,使其可用于1小时的目标,且然后在给药之前至少4小时移除食物。在给药前的4小时时间段期间移除食物后,不提供牛肉点心。剩余的食物(如果有的话)在当天的死亡率/出生率检查结束时提供,并放置过夜。根据临床体征或其他变化所警示,向动物提供补充饮食。

[0165] 除了在指定的程序期间,通过反渗透和紫外线照射处理后的市政自来水可经由自动补水系统自由地提供给每只动物。如有需要,提供水碗。对水进行定期分析,并将这些分析的结果记录在测试设施中。水中没有已知的可能干扰研究目标的污染物。

[0166] 在开始给药之前,使用Data Sciences International (DSI) PONEMAH™系统收集ECG、LVP、血压和体温至少24小时,以评价心血管参数和ECG信号质量。收集至少30秒的心电图并发送给心脏病专家进行定性检查。只有表现出正常血液学/临床化学参数和正常血液动力学/ECG参数的动物才被纳入研究。

[0167] 在开始剂量制剂施用之前,使动物适应于口服管饲程序至少3天。使用衔接至塑料注射器的一次性导管以5mL/kg的剂量通过口服管饲施用笼/自来水。在给药之前以及在给药期间连续在动物室中将给药制剂搅拌至少30分钟。

[0168] 通过口服管饲施用在ULTRAPURE™水(Charles River Laboratories, Montreal, QC)中含有2%卵磷脂和0.5%甲基纤维素的单剂量媒介物(对照)或30、100和300mg/kg的测试化合物。在每次剂量过程中都准备好媒介物,并将其在搅拌板上避光储存在保持在4℃的冰箱中,并根据需要分配。在给药前将媒介物从冰箱中取出并在室温下搅拌至少30分钟,并在给药期间连续搅拌。将给药制剂在搅拌板上避光储存在设定为4℃的冰箱中,并根据需要分配。在给药前将给药制剂从冰箱中取出,在室温下搅拌至少30分钟,并在给药期间连续搅拌。

[0169] 四只雄性狗中的每只接受一个剂量的媒介物和三个剂量水平的式1(实施例1),每剂量之间间隔7天。所监测的参数包括:来自血压的心率、左心室压力(LVP)和心电图波形;LVP(峰值收缩期和舒张末期LVP以及最大正/负dP/dt值);心电图(PR间期(PR)、RR变异性(RR²)、QRS复合波群(QRS)、QT间期和使用Van de Water方程 $QT_{cv} = QT - 87(60/HR - 1)$ 计算的QT_{cv});以及体温。

[0170] 使用ECG模式识别软件对ECG区段进行标记。构建每只动物的来自昼夜周期的代表性周期的文库,并且根据相应的Charles River Laboratories, Montreal, QC在各个监测时机应用以确保对定量评估的适当标记。超出这种物种的电生理指标的任何数据值均排除在进一步分析之外。

[0171] 在给药日的每次遥测监测时机期间,在每个剂量之前(间隔至少30分钟)并在剂量后大约1(±5分钟)、2、4、6、8、10、12、15、18和23(±15分钟)小时两次评价ECG。每个时间点评价至少30秒。定性评价所有波形,以检测P-QRS-T波的节律或传导障碍或其他异常。在过夜食物匮乏(用于临床化学)后,从颈静脉收集血液样品。

[0172] 与来自媒介物的结果相比,在施用式1的动物(实施例1)的比格犬中未观察到用式

1 (实施例1) 给药的动物的动脉血压、收缩力或P-R间期、QRS复合波群或QT间期持续时间的变化。

[0173] 等效物和范围

[0174] 本领域的技术人员将认识到,或仅使用常规实验就能够确定本文描述的根据本发明的具体实施方案的许多等效物。本发明的范围不意图限于以上描述,而是如所附权利要求书所阐述。

[0175] 在权利要求中,除非相反指出或另外从上下文明显看出,否则冠词如“一个/种(a/an)”以及“所述(the)”可意指一个或多于一个。除非相反指出或另外从上下文明显看出,否则如果一个、多于一个或所有组成员出现于、被用于或以其他方式关联于给定的产品或过程,那么认为包括在组的一个或多个成员之间的“或”的权利要求或描述得到了满足。本发明包括其中恰有组中的一个成员出现于、被用于或以其他方式关联于给定的产品或过程的实施方案。本发明包括其中多于一个或全部组成员存在于、被用于或以其他方式关联于给定产物或方法的实施方案。

[0176] 还应该注意术语“包含”意图为开放的并且容许但并非要求包括另外的要素或步骤。当本文中使用时,因此还涵盖并且公开术语“由……组成”。

[0177] 在给出范围时,端点被包括在内。此外,应该理解,除非另外指出或另外从上下文和本领域普通技术人员的理解显而易见,否则在本发明的不同实施方案中,表述为范围的值可假定为任何特定值或所述范围内的子范围,到所述范围的下限的单位的十分之一,除非在上下文中另有明确规定。

[0178] 另外,应该理解,在现有技术内的本发明的任何具体实施方案可从任何一个或多个权利要求中明确排除。因为认为此类实施方案为本领域普通技术人员所已知的,即使本文没有明确阐述排除,也可排除它们。本发明的组合物的任何特定实施方案(例如,任何抗生素、治疗性或活性成分;任何产生方法;任何使用方法;等等)可出于无论是否与现有技术存在相关的任何原因而从任何一个或多个权利要求中排除。

[0179] 应理解,已使用的措辞为描述性措辞,而不是限制性措辞,并且可在随附权利要求的范围内做出改变,而不脱离在本发明的更宽的方面内的本发明的真实范围和精神。

[0180] 虽然已关于若干所描述的实施方案相当详细并相当具体地描述了本发明,但是并不预期本发明应限于任何所述细节或实施方案或任何具体实施方案,而是参考随附权利要求进行说明,以便考虑到现有技术提供所述权利要求的最广泛的可能解释,并且因此有效地涵盖本发明的预期范围。本发明通过本文的非限制性实施例进一步说明。

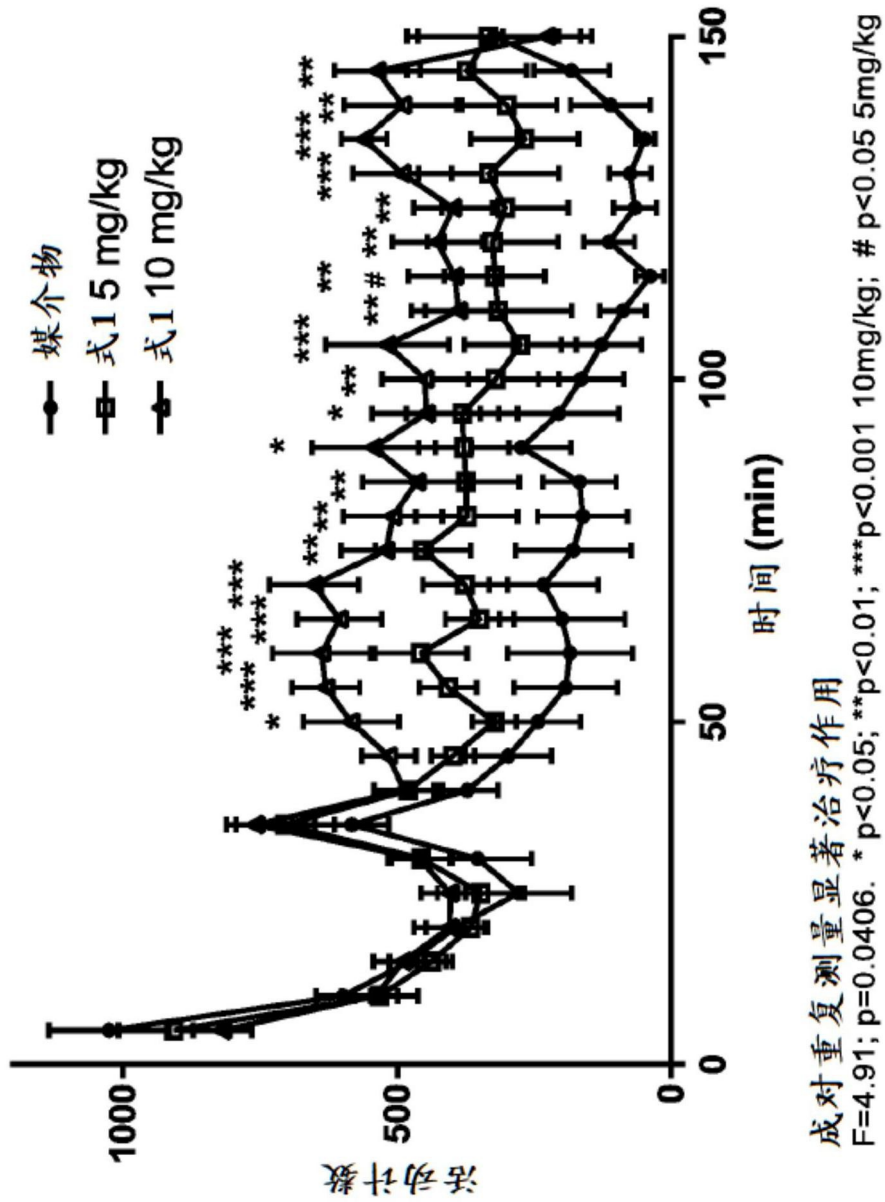


图1