

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07D 207/09 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00819118.2

[45] 授权公告日 2006年3月22日

[11] 授权公告号 CN 1246311C

[22] 申请日 2000.12.15 [21] 申请号 00819118.2

[30] 优先权

[32] 1999.12.23 [33] US [31] 60/172,023

[86] 国际申请 PCT/US2000/034116 2000.12.15

[87] 国际公布 WO2001/047879 英 2001.7.5

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.20

[71] 专利权人 艾科斯有限公司

地址 美国华盛顿州

[72] 发明人 T·J·马丁斯 K·W·福勒

J·奥丁戈 L·E·博格斯

S·T·施拉赫特尔

审查员 夏凤娟

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

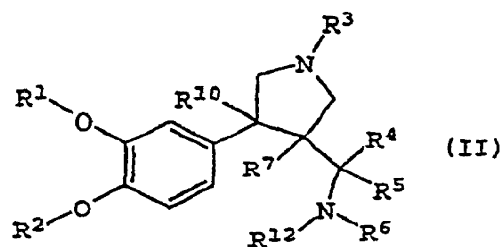
权利要求书6页 说明书71页

[54] 发明名称

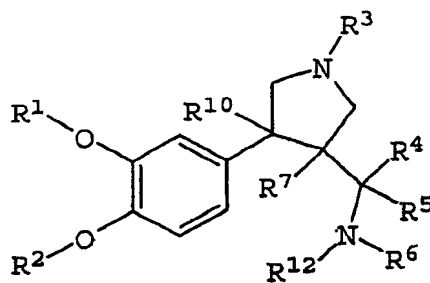
抑制环腺苷酸特异性磷酸二酯酶的吡咯烷

[57] 摘要

本发明公开了作为有效选择性 PDE4 抑制剂的新化合物(II)，以及制备所述化合物的方法。还公开了应用所述化合物治疗炎性疾病和其它涉及细胞因子水平升高的疾病以及中枢神经系统(CNS)疾病。R¹-R⁷、R¹⁰和 R¹²如本申请中所述。



1. 一种具有以下结构式的化合物及其盐和溶剂合物:



5 其中 R^1 为 C_{1-6} 烷基、苯基、 C_{3-7} 环烷基、与苯基稠合的 C_{3-7} 环烷基或 $C_{1,3}$ 亚烷基 C_{3-7} 环烷基;

R^2 为氢、甲基或卤基取代的甲基;

R^3 选自 $C(=O)OR^7$ 、 $C(=O)R^7$ 和 C_{1-3} 亚烷基苯基;

R^4 为氢或 C_{1-6} 烷基;

10 R^5 为氢或 C_{1-6} 烷基;

R^6 和 R^{12} 独立地为氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{7-22} 苯基烷基、 SO_2R^{11} 、 $C(=O)R^7$ 或 $C(=O)OR^7$;

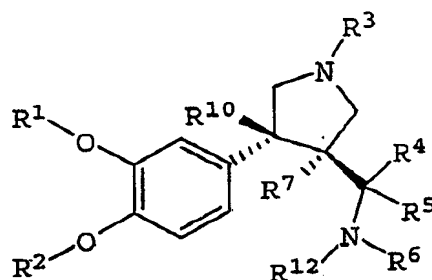
R^7 选自苯基、支链或直链 C_{1-6} 烷基, 并且 R^7 可以任选用一个或多个 OR^8 取代;

15 R^8 为氢;

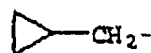
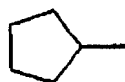
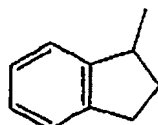
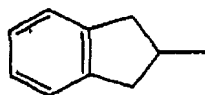
R^{10} 为氢;

R^{11} 为 C_{1-16} 烷基、 C_{3-7} 环烷基或苯基。

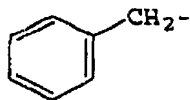
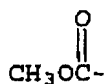
2. 权利要求 1 的化合物, 所述化合物具有以下结构:



3. 权利要求 1 的化合物，其中 R¹ 选自：



4. 权利要求 1 的化合物，其中 R³ 选自：



5

5. 权利要求 1 的化合物，其中 R⁴ 选自氢和甲基。

6. 权利要求 1 的化合物，其中 R⁶ 选自氢、C(=O)R⁷、C(=O)OR⁷、

乙基、苄基、 SO_2CH_3 和 $\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 。

7. 权利要求 1 的化合物，其中 R^7 为 C_{1-6} 烷基。

8. 权利要求 1 的化合物，其中 R^{12} 选自氢和 C_{1-6} 烷基。

9. 权利要求 1 的化合物，其中 R^1 选自环戊基、环丙基甲基、茚
5 满基； R^2 为甲基； R^3 选自苄基、 CO_2CH_3 和 $\text{C}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ ；

R^4 为氢； R^5 为氢或甲基； R^6 选自氢、甲基、乙基、苯甲酰基、 SO_2CH_3 、 $\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、苄基、 $\text{C}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 和乙酰基； R^{12} 为氢或甲基； R^7 为甲基；而 R^{10} 为氢。

10. 权利要求 1 的化合物，所述化合物选自：

(4S,3R)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[[苄氨基]甲基]吡咯烷羧酸甲酯

(4S,3R)-3-(氨基甲基)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基吡咯烷羧酸甲酯

(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[[甲磺酰基]氨基]甲基吡咯烷羧酸甲酯

(4S,3R)-3-[(乙酰氨基)甲基]-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基吡咯烷羧酸甲酯

(4S,3R)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[(苯基羰基氨基)甲基]吡咯烷羧酸甲酯

(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[[苯磺酰基]氨基]甲基吡咯烷羧酸甲酯

双{[(4S,3R)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-羧甲基吡咯烷-3-基]甲基}胺

1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙胺

1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙胺

N-{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-

基]乙基}苯甲酰胺

N-{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}苯甲酰胺

N-{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}乙酰胺

N-{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}乙酰胺

3-(S)-(1-乙酰氨基乙基)-4-(S)-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基吡咯烷-1-羧酸甲酯

{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}-(苯磺酰基)胺

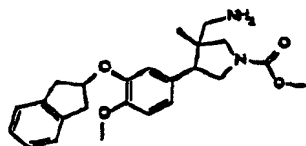
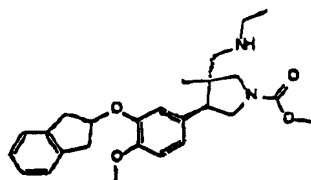
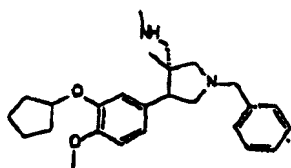
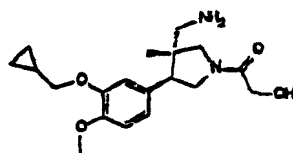
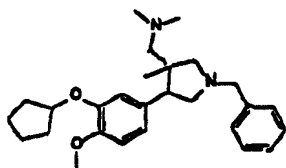
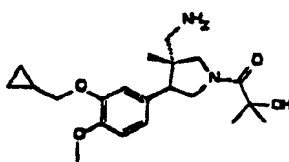
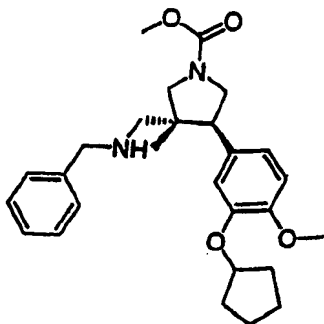
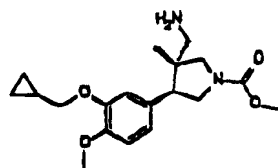
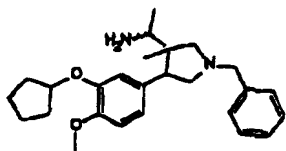
{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}-(苯磺酰基)胺

{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}-(甲磺酰基)胺

{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}-(甲磺酰基)胺, 和

(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[(甲基氨基)乙基]吡咯烷羧酸甲酯。

11. 权利要求 1 的化合物, 所述化合物选自:



12. 一种药用组合物，所述药用组合物包含权利要求 1 的化合物、药学上可接受的载体和任选的第二种抗炎治疗药物。

13. 权利要求 12 的组合物，其中所述第二种抗炎治疗药物能够靶向 $\text{TNF}\alpha$ 。

5 14. 权利要求 1 化合物在生产用于治疗患有抑制 cAMP 特异性 PDE 具有治疗益处的病症的哺乳动物的药物中的应用。

15. 权利要求 1 化合物在生产用于调节哺乳动物体内 cAMP 水平的药物中的应用。

10 16. 包含权利要求 1 化合物和药学上可接受的载体的药用组合物在生产用于治疗患有抑制 cAMP 特异性 PDE 具有治疗益处的病症的哺乳动物的药物中的应用。

17. 权利要求 16 的应用，其中所述哺乳动物表现出最低催吐反应。

18. 权利要求 16 的应用，其中所述哺乳动物没有催吐反应。

15 19. 权利要求 16 的应用，其中所述哺乳动物表现出最小的不利中枢神经系统副作用。

20. 权利要求 16 的应用，其中所述哺乳动物没有不利的中枢神经系统副作用。

20 21. 权利要求 1 的化合物在生产用于降低哺乳动物体内 TNF 水平的药物中的应用。

22. 权利要求 1 的化合物在生产用于抑制哺乳动物体内炎性细胞激活的药物中的应用。

23. 权利要求 1 的化合物在生产用于抑制哺乳动物体内 PDE4 功能的药物中的应用。

25

抑制环腺苷酸特异性磷酸二酯酶的吡咯烷

5

相关申请的交叉引用

本申请要求 1999 年 12 月 23 日递交的美国临时申请顺序号 60/172,023 的权益。

发明领域

10

本发明涉及一系列为有效的选择性环腺苷 3',5'-一磷酸特异性磷酸二酯酶(cAMP 特异性 PDE)抑制剂的化合物。本发明尤其涉及一系列可用于抑制 cAMP 特异性 PDE 功能、尤其是 PDE4 功能的新型化合物以及制备它们的方法、含有它们的药用组合物和它们用作例如治疗炎症性疾病和其它涉及细胞因子和促炎介质水平升高的疾病的治疗药物的用途。

15

发明背景

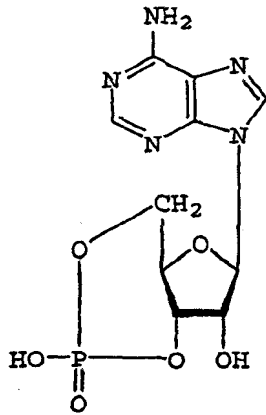
20

慢性炎症为一种多因素病症，其特征为激活多种类型的炎性细胞，尤其是淋巴系细胞(包括 T 淋巴细胞)和骨髓系细胞(包括粒性白细胞、巨噬细胞和单核细胞)。包括细胞因子例如肿瘤坏死因子(TNF)和白介素-1 (IL-1)在内的促炎介质由这些活化细胞产生。因此，抑制这些细胞的激活或抑制它们产生促炎细胞因子的药物可用于治疗性治疗炎症性疾病和其它涉及细胞因子水平升高的疾病。

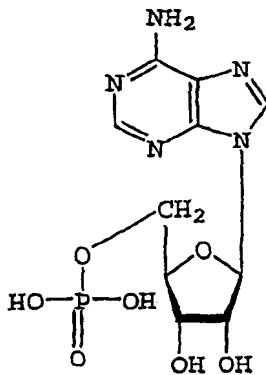
25

环腺苷酸(cAMP)为一种介导细胞对于广泛的胞外刺激的生物反应的第二信使。当合适的激动剂与特异性细胞表面受体结合时，激活腺苷酸环化酶，使腺苷三磷酸(ATP)转化为 cAMP。理论上在细胞内诱导 cAMP 作用的激动剂主要由 cAMP-依赖性蛋白激酶作用介导。cAMP 的细胞内作用因为 cAMP 转运到细胞外或环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)

酶促裂解作用而中止，PDE 水解 3'-磷酸二酯键以形成 5'-腺苷酸(5'-AMP)。5'-AMP 为一种无活性代谢物。以下图示说明 cAMP 和 5'-AMP 的结构。



cAMP



5'-AMP

- 5 在人骨髓系细胞和淋巴系细胞中 cAMP 水平升高与抑制细胞激活有关。因此，细胞内 PDE 酶家族调节细胞内 cAMP 的水平。PDE4 为这些细胞中的主要 PDE 同种型并且主要影响 cAMP 降解。因此，抑制 PDE 功能可防止 cAMP 转化为无活性代谢物 5'-AMP，从而维持较高的 cAMP 水平，因而抑制细胞激活(参见 Beavo 等, "Cyclic Nucleotide

Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action,” Wiley and Sons, Chichester, 第 3-14 页(1990)); Torphy 等, *Drug News and Perspectives*, 6, 第 203-214 页(1993); Giembycz 等, *Clin. Exp. Allergy*, 22, 第 337-344 页(1992))。

5 具体来说, 已证明 PDE4 抑制剂例如咯利普兰抑制 TNF α 的产生并且部分抑制单核细胞释放 IL-1 β (参见 Semmler 等, *Int. J. Immuno-pharmacol.*, 15, 第 409-413 页, (1993); Molnar-Kimber 等, *Mediators of Inflammation*, 1, 第 411-417 页, (1992))。还证明了 PDE4 抑制剂抑制人多形核白细胞产生超氧化物自由基(参见 Verghese 等, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 21 (增刊 2), S61 (1989); Nielson 等, *J. Allergy Immunol.*, 86, 第 801-808 页(1990)); 抑制人嗜碱性粒细胞释放血管活性胺和前列腺素类(参见 Peachell 等, *J. Immunol.*, 148, 第 2503-2510 页(1992)); 抑制嗜酸性粒细胞的呼吸爆发(参见 Dent 等, *J. Pharmacol.*, 103, 第 1339-1346 页(1991)); 以及抑制人 T-淋巴细胞的激活(参见 Robicsek 等, *Biochem. Pharmacol.*, 42, 第 869-877 页(1991))。

15 炎性细胞的激活和过量或不受调节的(unregulated)细胞因子(例如 TNF α 和 IL-1 β)产生参与变应性疾病、自身免疫病和炎性疾病, 例如类风湿性关节炎、骨关节炎、痛风性关节炎、脊椎炎、甲状腺相关性眼病、贝切特氏病、脓毒病、败血症性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒病、革兰氏阳性脓毒病、中毒性休克综合征、哮喘、慢性支气管炎、成人呼吸窘迫综合征、慢性肺部炎性疾病例如慢性阻塞性肺部疾病、硅肺、肺结节病、心肌、脑和肢端再灌注损伤、纤维变性、囊性纤维变性、瘢痕疙瘩形成、疤痕形成、动脉粥样硬化、移植排斥性疾病例如移植物抗宿主反应和同种异体移植排斥、慢性肾小球肾炎、狼疮、炎性肠病例如节段性回肠炎和溃疡性结肠炎、增生性淋巴细胞性疾病例如白血病以及炎性皮肤病例如特应性皮炎、牛皮癣和荨麻疹。

25 特征在于细胞因子水平升高的其它疾病包括由于中度外伤引起

的脑损伤(参见 Dhillon 等, *J. Neurotrauma*, 12, 第 1035-1043 页(1995); Suttorp 等, *J. Clin. Invest.*, 91, 第 1421-1428 页(1993))、心肌病例如充血性心力衰竭(参见 Bristow 等, *Circulation*, 97, 第 1340-1341 页(1998))、恶病质、感染或恶性肿瘤继发性恶病质、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)继发性恶病质、ARC (AIDS 相关综合征)继发性恶病质、由于感染引起的发烧和肌痛、脑型疟、骨质疏松和骨吸收疾病、瘢痕疙瘩形成、疤痕组织形成和发热。

具体来说,已经证实 $TNF\alpha$ 对于人获得性免疫缺陷综合征(AIDS)具有作用。AIDS 是由于人免疫缺陷病毒(HIV)感染 T-淋巴细胞引起的。尽管 HIV 也感染并存在于骨髓系细胞中,已经证实 TNF 上调 T-淋巴细胞和单核细胞中的 HIV 感染(参见 Poli 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 第 782-785 页(1990))。

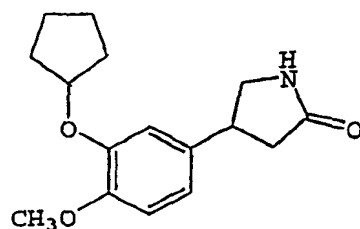
$TNF\alpha$ 的几种性质例如刺激胶原酶、刺激体内血管生成、刺激骨吸收和能够增强肿瘤细胞与内皮细胞的附着,与 TNF 对肿瘤在宿主体内形成和转移扩散的作用是一致的。最近报道, $TNF\alpha$ 直接参与促进肿瘤细胞生长和转移(参见 Orosz 等, *J. Exp. Med.*, 177, 第 1391-1398 (1993))。

PDE4 具有广泛的组织分布。对于 PDE4 具有至少 4 种基因,任一给定基因的 PDE4 多种转录物能够产生共有相同催化部位的几种不同的蛋白。4 种可能催化部位之间的氨基酸同一性大于 85%。它们对抑制剂的同样敏感性及其动力学相似性反映了这个水平氨基酸同一性的功能方面作用。推测这些可变表达的 PDE4 蛋白的作用在于细胞通过这种作用可以区别性细胞内定位这些酶和/或通过翻译后修饰调节催化效率。表达 PDE4 酶的任一给定细胞类型通常表达编码这些蛋白的 4 种可能基因中的一种以上基因。

研究者已经表现出对使用 PDE4 抑制剂作为消炎药的极大兴趣。早期的证据显示,抑制 PDE4 对于各种炎性细胞例如单核细胞、巨噬细胞、Th-1 系 T-细胞和粒性白细胞具有有益的作用。许多促炎介质例

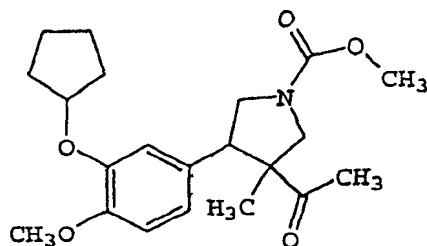
如细胞因子、脂质介质、超氧化物和生物胺例如组胺的合成和/或释放通过 PDE4 抑制剂的作用在这些细胞中减少。PDE4 抑制剂也影响其它细胞功能包括 T-细胞增殖、粒性白细胞在化学毒性物质作用下的移行和脉管系统内内皮细胞连接的完整性。

- 5 已经报告了各种 PDE4 抑制剂的设计、合成和筛选。甲基黄嘌呤例如咖啡因和茶碱是最早被发现的 PDE 抑制剂，但是，这些化合物对于抑制 PDE 是非选择性。药物咯利普兰(抗抑郁药)是最早报道的特异性 PDE4 抑制剂之一。已经报道，具有以下结构式的咯利普兰抑制重组人 PDE4 的 50%抑制浓度(IC₅₀)为约 200 nM (纳摩尔)。



10 咯利普兰

研究者一直在寻找这样的 PDE4 抑制剂：抑制 PDE4 的选择性更高，IC₅₀ 比咯利普兰更低，没有使用咯利普兰有关的不需要的中枢神经系统(CNS)副作用，例如干呕、呕吐和镇静作用。在 Feldman 等的美国专利号 5,665,754 中公开了一类化合物。其中所公开的化合物为具有与咯利普兰结构类似的取代吡咯烷。一种具有结构式(I)的具体化合物对人重组 PDE4 的 IC₅₀ 为约 2 nM。由于观察到催吐副作用与效果明显分离，所以这些化合物没有降低不需要的中枢神经系统作用。



15 (I)

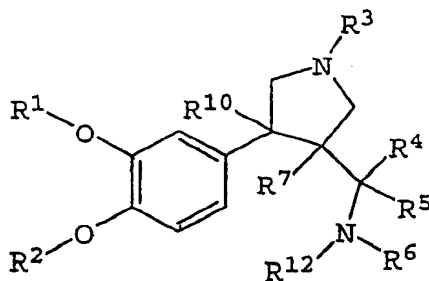
此外,有几家公司正在对其它 PDE4 抑制剂进行临床试验。然而,效果和毒副作用方面的问题例如呕吐和中枢神经系统紊乱仍未解决。

因此,选择性抑制 PDE4 并降低或消除与在先的 PDE4 抑制剂有关的不利的中枢神经系统副作用的化合物可用于治疗变应性疾病和炎症疾病以及其它与细胞因子例如 TNF 过度产生或不受调节地产生有关的疾病。此外,选择性 PDE4 抑制剂可用于治疗与在具体靶组织中 cAMP 水平增高或 PDE4 功能增强有关的疾病。

发明概述

本发明涉及可用于治疗其中抑制 PDE4 活性是非常有益的疾病和病症的有效的选择性 PDE4 抑制剂。本发明的 PDE4 抑制剂出人意料地降低或消除与在先的 PDE4 抑制剂有关的不利的中枢神经系统副作用。

本发明尤其涉及具有结构式(II)的化合物及其盐和溶剂合物(例如水合物):



(II)

其中 R¹ 为低级烷基、桥连烷基(例如降冰片烷基)、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基(例如茛满基)、5-或 6-元饱和杂环基(例如 3-四氢吡喃基)、C₁₋₄ 亚烷基芳基、C₁₋₄ 亚烷基 O 芳基、C₁₋₄ 亚烷基杂芳基、C₁₋₄ 亚烷基 Het、C₂₋₄ 亚烷基芳基 O 芳基、C₁₋₄ 亚烷基桥连烷基、C₁₋₃ 亚烷基环烷基(例如环戊基甲基)、取代或未取代的炔丙基(例如 -CH₂C≡C-C₆H₅)、取代或未取代的烯丙基(例如 -CH₂CH=CH-C₆H₅)或卤代环烷基

(例如氟代环戊基);

R^2 为氢、甲基或卤基取代的甲基, 例如 CHF_2 ;

R^3 选自 $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^7$ 、 $\text{NHC}(=\text{O})\text{OR}^7$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{R}^7$ 、 $\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^8\text{R}^9$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{NR}^8\text{R}^9$ 、低级烷基、桥连烷基、环烷基、卤代烷基、卤代环烷基、
5 C_{1-3} 亚烷基环烷基、5-或6-元饱和杂环基、芳基、杂芳基、 C_{1-3} 亚烷基
 $\text{C}(=\text{O})\text{R}^7$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{C}(=\text{O})\text{NR}^8\text{R}^9$ 、 C_{1-4} 亚烷基 OR^7 、 C_{1-3} 亚烷基芳基、 SO_2
杂芳基、Het、芳烷基、烷芳基、杂芳烷基、杂烷芳基、 C_{1-3} 亚烷基
 $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^7$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-3}$ 亚烷基 $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^7$ 、 C_{1-3} 亚烷基杂芳基、
10 $\text{C}(=\text{O})\text{C}(=\text{O})\text{OR}^7$ 、 C_{1-3} 亚烷基芳基、 SO_2 杂芳基、Het、 $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-3}$ 亚烷
基 $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^7$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-3}$ 亚烷基 $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{OR}^7$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-3}$ 亚烷基 NH_2
和 $\text{NHC}(=\text{O})\text{OR}^7$;

R^4 为氢、低级烷基、卤代烷基、环烷基或芳基;

R^5 为氢、低级烷基、链炔基、卤代烷基、环烷基或芳基;

R^6 和 R^{12} 独立地为氢、低级烷基、芳烷基、 SO_2R^{11} 或 $\text{C}(=\text{O})\text{R}^7$;

15 R^7 选自支链或直链低级烷基、杂芳基、杂环基、芳烷基和芳基,
并且 R^7 可以任选用一个或多个 OR^8 、 NR^8R^9 或 SR^8 取代;

R^8 和 R^9 相同或不同, 它们选自氢、低级烷基、环烷基、芳基、
杂芳基、烷芳基、杂芳烷基、杂烷芳基和芳烷基, 或者 R^8 和 R^9 可以
一起形成4-元环至7-元环;

20 R^{10} 为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、芳基、 $\text{C}(=\text{O})$ 烷基、 $\text{C}(=\text{O})$
环烷基、 $\text{C}(=\text{O})$ 芳基、 $\text{C}(=\text{O})\text{O}$ 烷基、 $\text{C}(=\text{O})\text{O}$ 环烷基、 $\text{C}(=\text{O})$ 芳基、
 CH_2OH 、 CH_2O 烷基、 CHO 、 CN 、 NO_2 或 SO_2R^{11} ;

R^{11} 为烷基、环烷基、三氟甲基、芳基、芳烷基或 NR^8R^9 。

25 本发明也涉及含有一种或多种结构式(II)化合物的药用组合物、所
述化合物和含所述化合物的组合物在治疗疾病中的用途以及化合物和
参与合成结构式(II)化合物的中间体的制备方法。

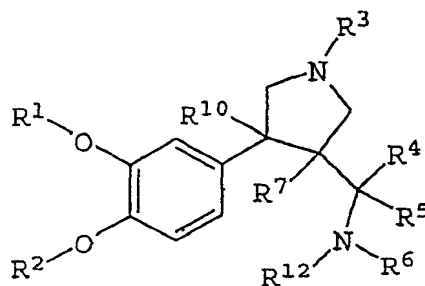
本发明也涉及通过给予哺乳动物治疗有效量的结构式(II)化合物
或含有结构式(II)化合物的组合物, 从而治疗所述哺乳动物病症的方

法,其中所述哺乳动物患有的病症如果抑制 PDE4,可有益地调节哺乳动物体内的 cAMP 水平、降低哺乳动物体内的 TNF α 水平、抑制哺乳动物体内的炎性细胞激活和抑制哺乳动物体内的 PDE4 功能。

5

优选实施方案的详述

本发明涉及具有结构式(II)的化合物及其盐和溶剂合物(例如水合物):



(II)

其中 R¹ 为低级烷基、桥连烷基(例如降冰片烷基)、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基(例如茛满基)、5-或 6-元饱和杂环基(例如 3-四氢吡喃基)、C₁₋₄ 亚烷基芳基、C₁₋₄ 亚烷基 O 芳基、C₁₋₄ 亚烷基杂芳基、C₁₋₄ 亚烷基 Het、C₂₋₄ 亚烷基芳基 O 芳基、C₁₋₄ 亚烷基桥连烷基、C₁₋₃ 亚烷基环烷基(例如环戊基甲基)、取代或未取代的炔丙基(例如 -CH₂C \equiv C-C₆H₅)、取代或未取代的烯丙基(例如 -CH₂CH=CH-C₆H₅)或卤代环烷基(例如氟代环戊基);

R² 为氢、甲基或卤基取代的甲基,例如 CHF₂;

R³ 选自 C(=O)OR⁷、NHC(=O)OR⁷、C(=O)R⁷、C(=NH)NR⁸R⁹、C(=O)NR⁸R⁹、低级烷基、桥连烷基、环烷基、卤代烷基、卤代环烷基、C₁₋₃ 亚烷基环烷基、5-或 6-元饱和杂环基、芳基、杂芳基、C₁₋₃ 亚烷基 C(=O)R⁷、C(=O)C(=O)NR⁸R⁹、C₁₋₄ 亚烷基 OR⁷、C₁₋₃ 亚烷基芳基、SO₂ 杂芳基、Het、芳烷基、烷芳基、杂芳烷基、杂烷芳基、C₁₋₃ 亚烷基 C(=O)OR⁷、C(=O)C₁₋₃ 亚烷基 C(=O)OR⁷、C₁₋₃ 亚烷基杂芳基、

$C(=O)C(=O)OR^7$ 、 $C(=O)C_{1-3}$ 亚烷基 $C(=O)OR^7$ 、 $C(=O)C_{1-3}$ 亚烷基 $NH(C=O)OR^7$ 、 $C(=O)C_{1-3}$ 亚烷基 NH_2 和 $NHC(=O)OR^7$;

R^4 为氢、低级烷基、卤代烷基、环烷基或芳基;

R^5 为氢、低级烷基、链炔基、卤代烷基、环烷基或芳基;

5 R^6 和 R^{12} 独立地为氢、低级烷基、芳烷基、 SO_2R^{11} 或 $C(=O)R^7$;

R^7 选自支链或直链低级烷基、杂芳基、杂环基、芳烷基和芳基，并且 R^7 可以任选用一个或多个 OR^8 、 NR^8R^9 或 SR^8 取代;

R^8 和 R^9 相同或不同，它们选自氢、低级烷基、环烷基、芳基、杂芳基、烷芳基、杂芳烷基、杂烷芳基和芳烷基，或者 R^8 和 R^9 可以
10 一起形成 4-元环至 7-元环;

R^{10} 为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、芳基、 $C(=O)$ 烷基、 $C(=O)$ 环烷基、 $C(=O)$ 芳基、 $C(=O)O$ 烷基、 $C(=O)O$ 环烷基、 $C(=O)$ 芳基、 CH_2OH 、 CH_2O 烷基、 CHO 、 CN 、 NO_2 或 SO_2R^{11} ;

R^{11} 为烷基、环烷基、三氟甲基、芳基、芳烷基或 NR^8R^9 。

15 本文单独或者结合使用的术语“烷基”，定义为包括含 1-16 个碳原子的直链和支链饱和烃基。术语“低级烷基”本文定义为具有 1-6 个碳原子(C_1-C_6)的烷基。低级烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、异丁基、正丁基、新戊基、正己基等。术语“炔基”是指含有碳-碳三键的不饱和烷基。

20 术语“桥连烷基”本文定义为 C_6-C_{16} 的双环或多环烃基，例如降冰片烷基、金刚烷基、双环[2.2.2]辛基、双环[2.2.1]庚基、双环[3.2.1]辛基或十氢萘基。

术语“环烷基”本文定义为包括任选与芳基稠合的 C_3-C_7 环烃基。环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环己基、环戊基、茚满基和四氢萘基。
25

术语“亚烷基”是指具有一个取代基的烷基。例如术语“ C_{1-3} 亚烷基环烷基”是指含有 1-3 个碳原子并用一个环烷基取代的烷基。

术语“卤代烷基”本文定义为用一个或多个卤代取代基例如氟代

基、氯代基、溴代基、碘代基或者其组合取代的烷基。同样，“卤代环烷基”定义为具有一个或多个卤代取代基的环烷基。

单独或结合使用的术语“芳基”，本文定义为单环或多环的芳族基团，优选单环或双环的芳族基团，例如苯基或萘基，它们可以为未取代或者取代芳族基团，例如被一个或多个、尤其是一个至三个选自以下的取代基取代：卤代基、烷基、苯基、羟基、羟基烷基、烷氧基、烷氧基烷基、卤代烷基、硝基、氨基、烷基氨基、酰基氨基、烷硫基、烷基亚磺酰基和烷基磺酰基。示例性的芳基包括苯基、萘基、四氢萘基、2-氯代苯基、3-氯代苯基、4-氯代苯基、2-甲基苯基、4-甲氧基苯基、3-三氟甲基-苯基、4-硝基苯基等。

术语“杂芳基”本文定义为含有一个或两个芳族环并且在芳环上含有至少一个氮原子、氧原子或硫原子的单环或双环系，所述环系可以为未取代或者取代环系，例如被一个或多个、尤其是1-3个如下的取代基取代：卤代基、烷基、羟基、羟基烷基、烷氧基、烷氧基烷基、卤代烷基、硝基、氨基、烷基氨基、酰基氨基、烷硫基、烷基亚磺酰基和烷基磺酰基。杂芳基的实例包括噻吩基、呋喃基、吡啶基、咪唑基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、三唑基、异噻唑基、异咪唑基、咪唑基、苯并噻唑基、吡嗪基、嘧啶基、噻唑基和噻二唑基。

术语“芳烷基”本文定义为这样的在先定义的烷基：其中所述烷基的一个氢原子被本文定义的芳基取代，例如任选具有一个或多个取代基(例如卤代基、烷基、烷氧基等)的苯基。芳烷基的实例是苄基。

术语“烷芳基”本文定义为这样的在先定义的芳基：其中所述芳基的一个氢原子被烷基、环烷基、卤代烷基或卤代环烷基取代。

术语“杂芳烷基”和“杂烷芳基”的定义类似术语“芳烷基”和“烷芳基”，然而，所述芳基被在先定义的杂芳基取代。

术语“杂环”定义为环中含有一个或多个杂原子的5-或6-元非芳族环，所述杂原子选自氧原子、氮原子和硫原子。非限制性实例包括四氢呋喃、哌啶、哌嗪、环丁砜、吗啉、四氢吡喃、二氧六环等。

术语“卤素”或“卤代基”本文定义为包括氟、氯、溴和碘。

术语“烷基氧基”、“芳氧基”和“芳烷基氧基”定义为-OR，其中R分别为烷基、芳基和芳烷基。

5 术语“烷基氧基烷基”定义为连接烷基的烷基氧基。术语“芳氧基烷基”和“芳烷基氧基烷基”类似地定义为连接烷基的芳氧基或芳烷基氧基。

术语“羟基”定义为-OH。

术语“羟基烷基”定义为连接烷基的羟基。

术语“氨基”定义为-NH₂。

10 术语“烷基氨基”定义为-NR₂，其中至少一个R为烷基，第二个R为烷基或氢。

术语“酰基氨基”定义为RC(=O)N，其中R为烷基或芳基。

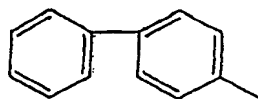
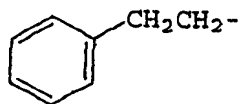
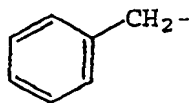
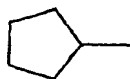
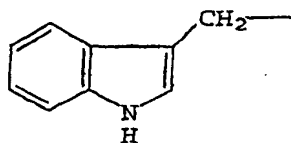
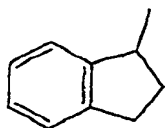
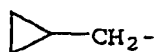
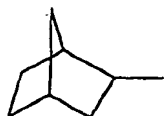
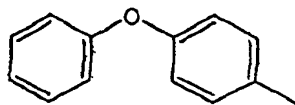
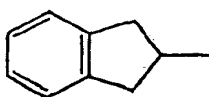
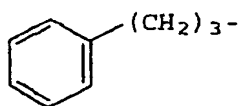
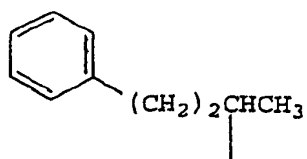
术语“硝基”定义为-NO₂。

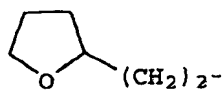
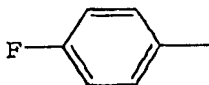
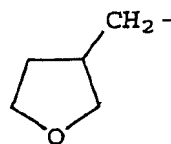
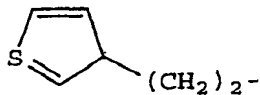
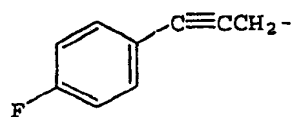
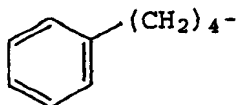
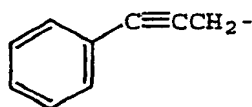
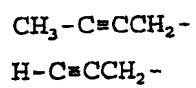
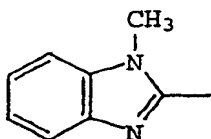
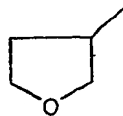
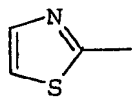
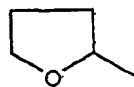
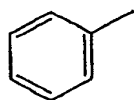
术语“烷基硫基”定义为-SR，其中R为烷基。

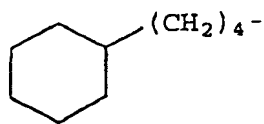
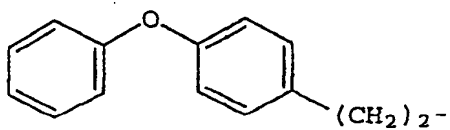
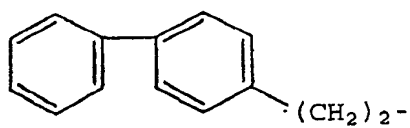
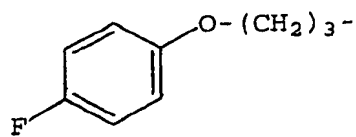
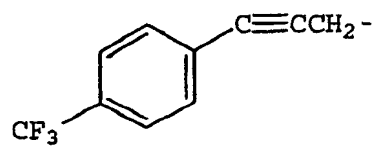
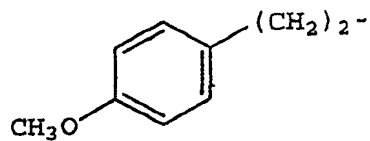
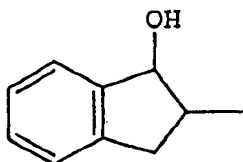
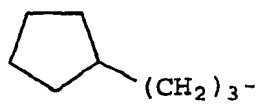
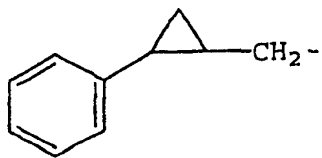
术语“烷基亚磺酰基”定义为R-SO₂，其中R为烷基。

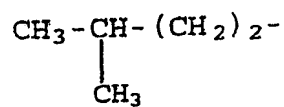
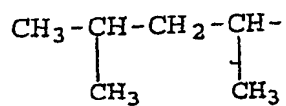
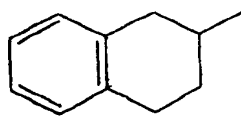
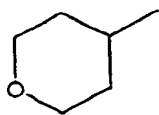
15 术语“烷基磺酰基”定义为R-SO₃，其中R为烷基。

在优选的实施方案中，R⁵为氢或甲基，R⁷为甲基，R²为甲基或二氟甲基，R⁴选自氢、低级烷基、苄基和苯基，R¹²为氢或甲基，R⁶选自氢、甲基、乙基、C(=O)R⁷、C(=O)OR⁷、苄基、SO₂CH₃和SO₂C₆H₅。R¹选自：

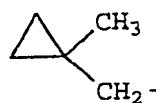
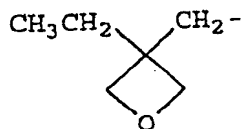
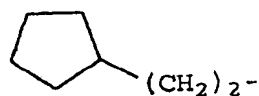
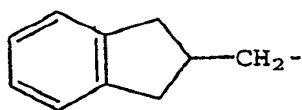
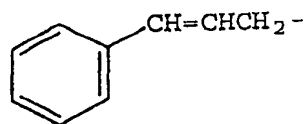
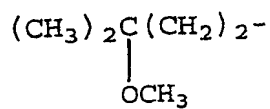


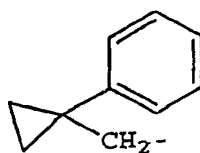
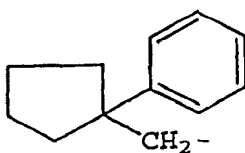
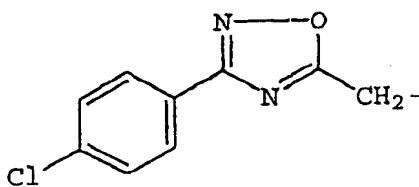
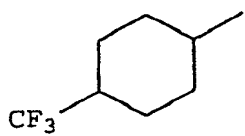
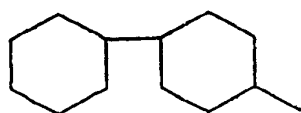
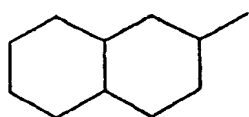
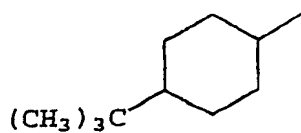
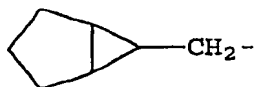
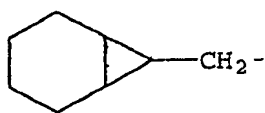
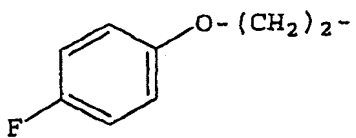


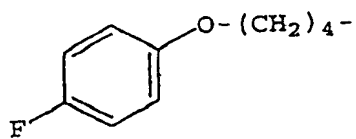
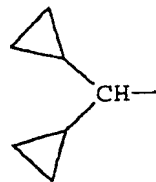
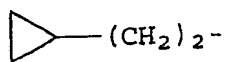




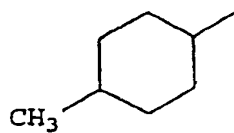
H-

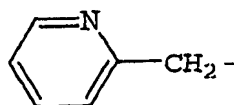
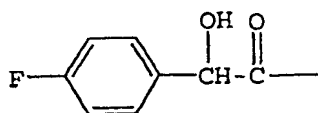
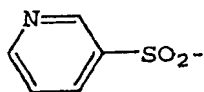
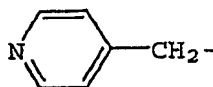
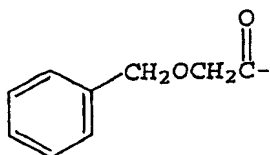
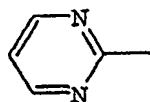
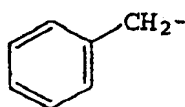
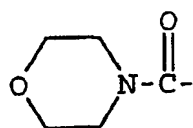
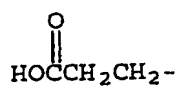
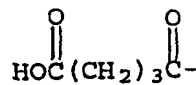
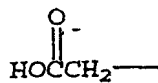
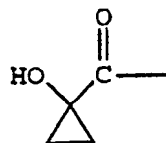
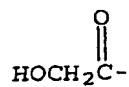
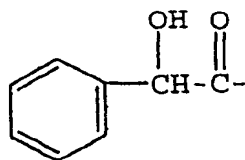
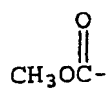
CH₃-(CH₃)₃C-(CH₃)₃C(CH₂)₂-

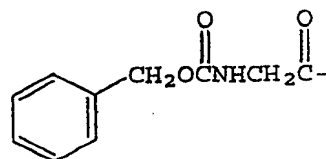
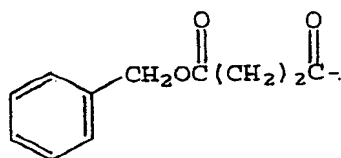
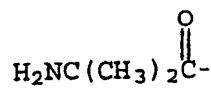
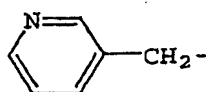
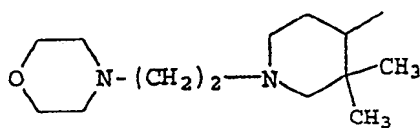
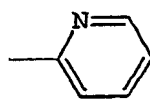
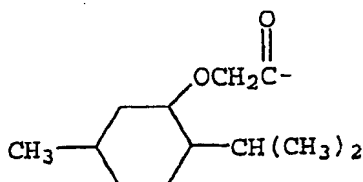
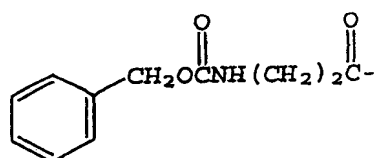
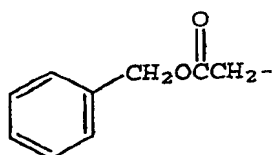
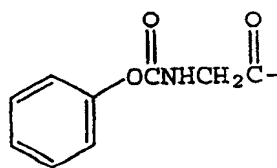
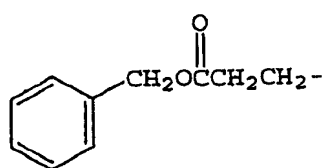


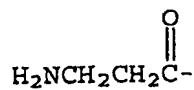
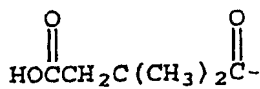
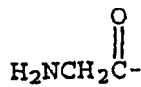
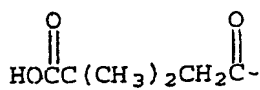
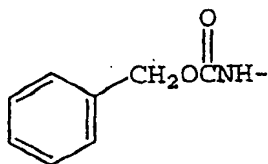
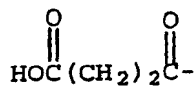
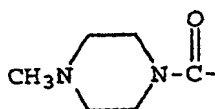
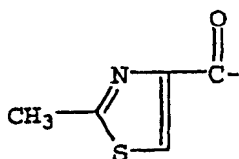
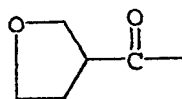
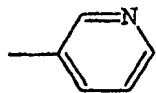
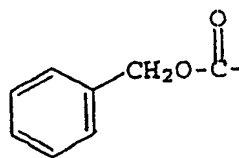
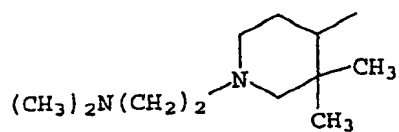


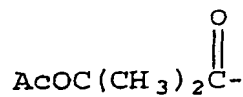
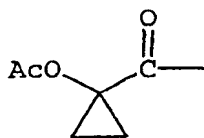
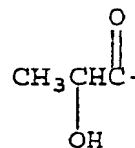
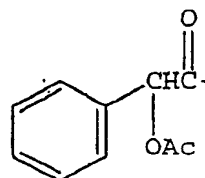
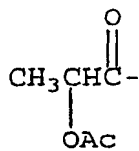
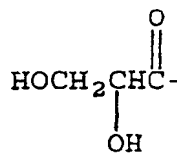
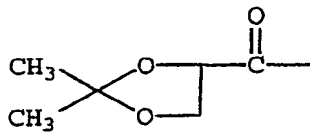
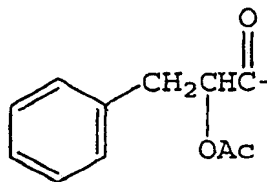
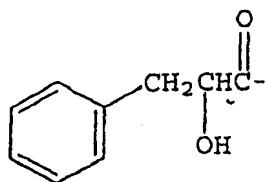
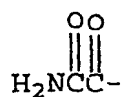
和

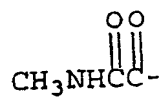
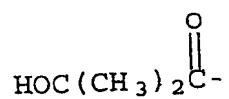
 R^3 选自:



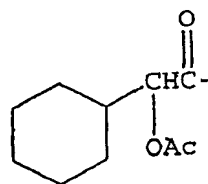
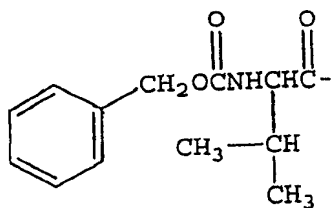
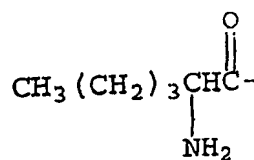
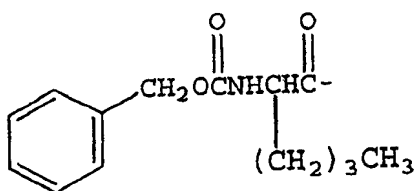
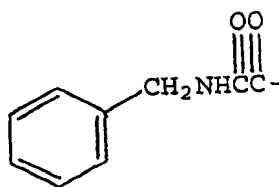
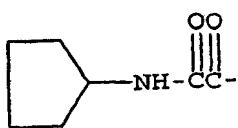
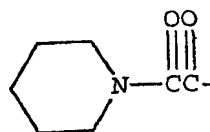


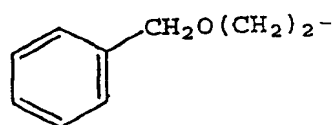
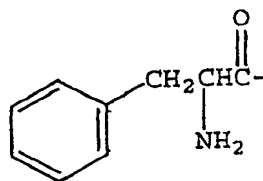
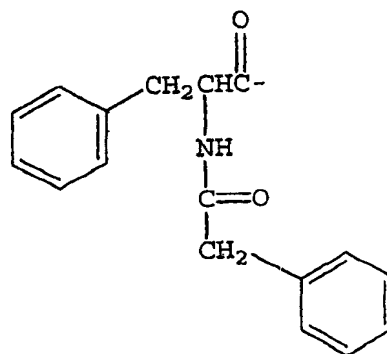
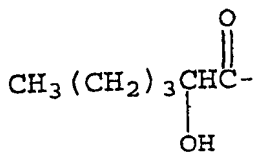
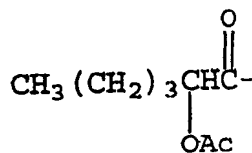
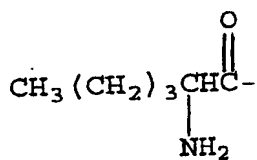
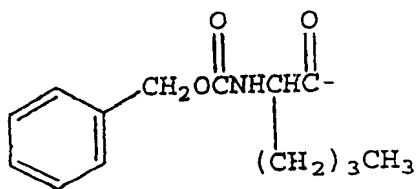
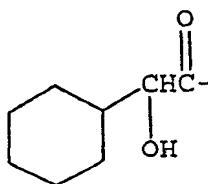


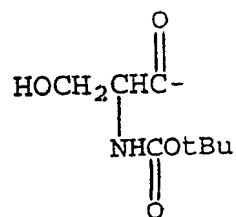
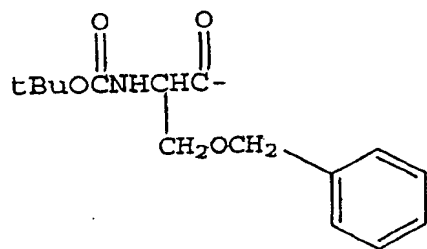
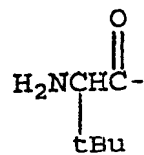
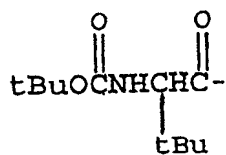
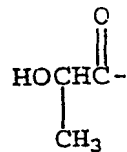
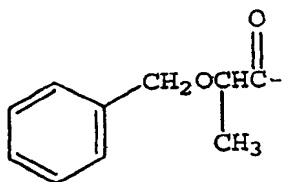
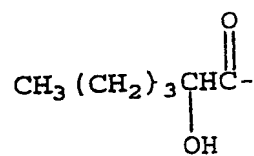
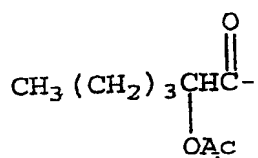


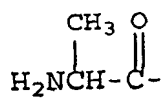
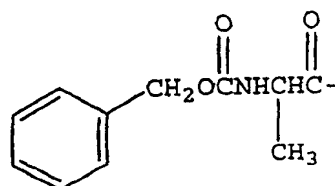
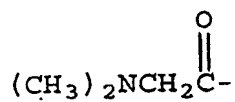
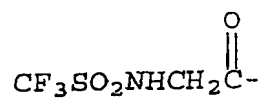
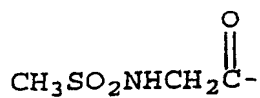
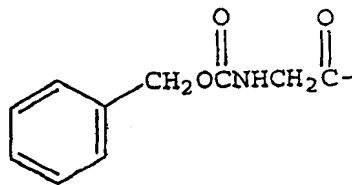
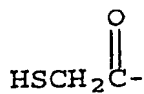
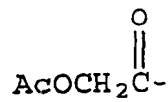
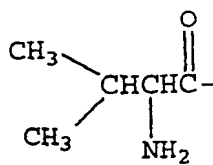
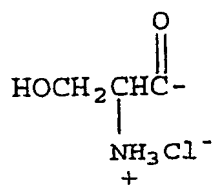


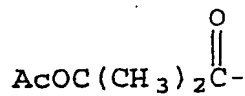
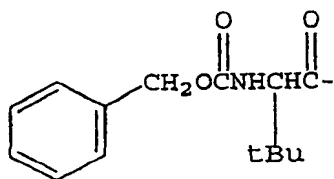
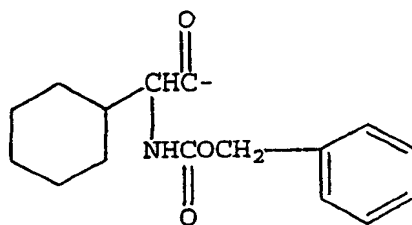
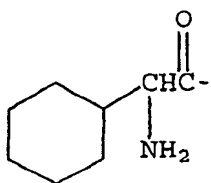
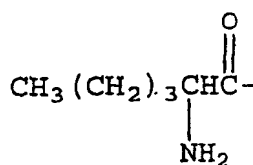
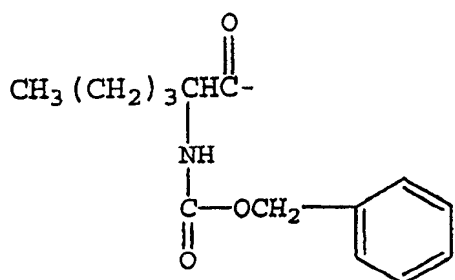
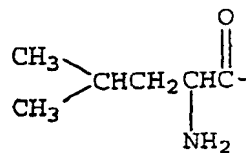
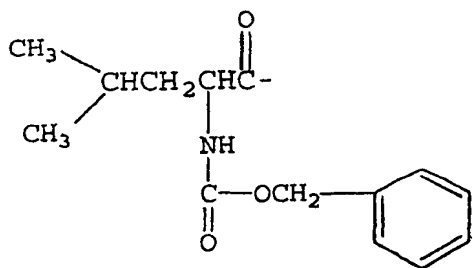
H-

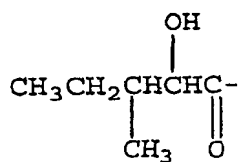
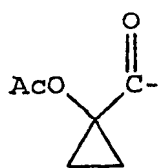
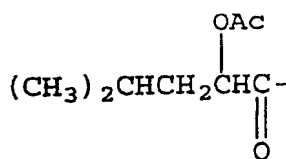
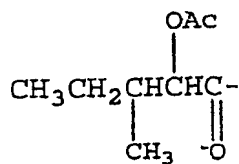
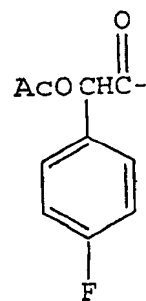
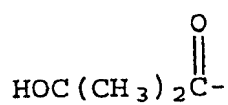




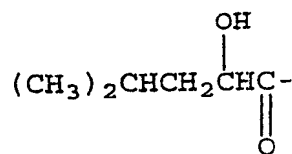






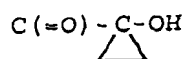


和



其中 Ac 为 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})$ ，而 tBu 为 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 。

在最优选的实施方案中，R¹选自环戊基、环丙基甲基、四氢呋喃基、茛菪满基、降冰片烷基、苯乙基和苯基丁基；R²选自甲基和二氟甲基；R³选自苄基、CO₂CH₃、C(=O)CH₂OH、C(=O)CH(CH₃)OH、C(=O)C(CH₃)₂OH和



5

;

R⁴为氢；R⁵为氢或甲基，R⁶为氢、甲基、乙基、苄基、SO₂CH₃、SO₂C₆H₅、苯甲酰基、C(=O)C(CH₃)₃或乙酰基；R¹²为氢或甲基；而R¹⁰为氢。

本发明包括结构式(II)化合物的所有可能的立体异构体和几何异构体，并且不仅包括外消旋化合物而且也包括旋光异构体。当需要结构式(II)化合物的单一对映体时，通过拆分终产物或者通过由异构体纯的原料或者使用手性辅助剂立体有择合成可以得到单一对映体(例如参见 Z. Ma 等, *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(6), 第 883-888 页(1997))。终产物、中间体或者原料的拆分可以通过本领域已知的任何合适的方法完成。此外，在其中结构式(II)化合物的互变异构体可能存在的情况下，本发明包括所述化合物的所有互变异构形式。如此后所证明的，特定的立体异构体显示抑制 PDE4 的优越能力，而没有通常与 PDE4 抑制剂有关的不利中枢神经系统副作用。

15

具体来说，普遍认为生物系统对于绝对立体化学性化合物具有非常敏感的活性。(参见 E. J. Ariens, *Medicinal Research Reviews*, 6:451-466 (1986); E. J. Ariens, *Medicinal Research Reviews*, 7:367-387 (1987); K. M. Fowler, *Handbook of Stereoisomers: Therapeutic Drugs*, CRC Press, Donald P. Smith 主编, 第 35-63 页(1989); S. C. Stinson, *Chemical and Engineering News*, 75:38-70 (1997))。

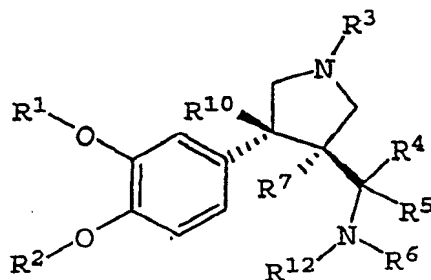
20

例如，咯利普兰为含有一个手性中心的立体有择 PDE4 抑制剂。咯利普兰的(-)-对映体比其(+)-对映体在涉及其潜在的抗抑郁作用方面具有更强的药理学作用。Schultz 等, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 333:23-30 (1986)。此外，咯利普兰的代谢作用似乎是立体

25

特异性的，(+)-对映体显示比(-)-对映体更快的清除率。Krause 等，*Xenobiotica*, 18:561-571 (1988)。最后，最新的观察显示，咯利普兰的(-)-对映体(R-咯利普兰)比其(+)-对映体(S-咯利普兰)的催吐作用强大约十倍。A. Robichaud 等，*Neuropharmacology*, 38:289-297 (1999)。这个观察结果与试验动物对咯利普兰异构体的处理和咯利普兰抑制 PDE4 酶的能力方面的差异非常不一致。本发明化合物可以具有三个或三个以上的手性中心。如下所示，特定立体化学取向的化合物能够显示类似的 PDE4 抑制活性和药理学活性，但是改变了中枢神经系统毒性和催吐潜能。

因此，本发明的优选的化合物具有结构式(III)：



(III)

结构式(III)化合物为有效的选择性 PDE4 抑制剂，并且没有结构式(III)化合物的立体异构体所显示的不利的中枢神经系统作用和催吐潜能。

含有酸性部分的结构式(II)化合物可以与合适的阳离子形成药学上可接受的盐。合适的药学上可接受的阳离子包括碱金属(例如钠或钾)和碱土金属(例如钙或镁)阳离子。含有碱性中心的结构式(II)化合物的药学上可接受的盐为与药学上可接受的酸形成的酸加成盐。实例包括盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐或硫酸氢盐、磷酸盐或磷酸氢盐、乙酸盐、苯甲酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、马来酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、葡糖酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐。根据前文所述，任何本文中提到的本发明化合物包括结构式(II)化合物以及其药

学上可接受的盐和溶剂合物。

5 本发明的化合物可以以纯化学品治疗性给药，但是优选以药用组合物或制剂给予结构式(II)化合物。因此，本发明还提供含有结构式(II)化合物以及一种或多种药学上可接受的载体并任选其它治疗和/或预防成分的药用制剂。所述载体在与所述制剂中的其它成分相容并且对其接受者无害的意义上为“可接受的”。

10 具体来说，本发明的选择性 PDE4 抑制剂可以单独使用或与第二种抗炎治疗药物联合使用，例如所述第二种抗炎药物为靶向 $\text{TNF}\alpha$ 的治疗药物，如用于治疗类风湿性关节炎的 ENBREL[®] 或 REMICADE[®]。同样，IL-1 拮抗作用的治疗用途在类风湿性关节炎的动物模型中也已经得到证明。因此，设想 IL-1 的拮抗作用与减弱 $\text{TNF}\alpha$ 的 PDE4 抑制作用结合将是有效的。

本发明的 PDE4 抑制剂可用于治疗各种变应性疾病、自身免疫病和炎性疾病。

15 术语“治疗”包括预防、缓解、阻止或逆转所治疗疾病或症状发展进程。因此术语“治疗”包括适当的医学治疗和/或预防给药。

20 具体来说，炎症是一种局限化保护性反应，它是由组织损伤或破坏引起的，它可以破坏、稀释或隔绝(即隔离)损伤因子和受损的组织。本文所用的术语“炎性疾病”，是指任何其中过度或不受调节的炎症反应导致过度炎症症状、宿主组织损伤或组织功能丧失的疾病。此外，本文所用的术语“自身免疫病”是指任何种类的其中组织损伤与对于身体自身成分的体液或细胞介导应答有关的疾病。本文所用的术语“变应性疾病”是指由变态反应引起的任何症状、组织损伤或组织功能丧失。本文所用的术语“关节疾病”是指特征在于各种病因引起的关节
25 炎性损伤的一大类任何疾病。本文所用的术语“皮炎”是指特征在于各种病因引起的皮肤炎症的一大类任何皮肤疾病。本文所用的术语“移植排斥”是指特征在于移植组织和周围组织功能丧失、疼痛、肿胀、白细胞增多和血小板减少的直接针对移植组织(包括器官和细胞(例如

骨髓))的任何免疫反应。

本发明也提供调节哺乳动物体内 cAMP 水平的方法以及治疗特征为细胞因子水平升高的疾病的方法。

5 本文所用的术语“细胞因子”是指任何分泌型多肽，该多肽影响其它细胞的功能并调节所述免疫或炎症反应中细胞之间的相互作用。细胞因子包括但不限于单核因子、淋巴因子和趋化因子，而不管是哪些细胞产生的。例如，单核因子通常指由单核细胞产生并分泌的因子，然而，许多其它细胞也产生单核因子，例如天然杀伤细胞、成纤维细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、内皮细胞、脑星形胶质细胞、骨髓基质细胞、表皮角质细胞和 B-淋巴细胞。淋巴因子通常指由淋巴细胞产生的因子。细胞因子的实例包括但不限于白介素-1 (IL-1)、白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)和肿瘤坏死因子 β (TNF β)。

15 本发明还提供降低哺乳动物体内 TNF 水平的方法，该方法包括给予所述哺乳动物有效量的结构式(II)化合物。本文所用的术语“降低 TNF 水平”是指以下情况之一：

a) 通过抑制所有细胞(包括但不限于单核细胞或巨噬细胞)体内释放 TNF，使哺乳动物体内过量的 TNF 水平降低至正常水平或者正常水平以下；或

20 b) 在翻译或转录水平上诱导哺乳动物体内过量的 TNF 水平下调至正常水平或者正常水平以下；或

c) 通过抑制作为翻译后事件的直接合成 TNF 诱导负调节。

此外，本发明化合物可用于抑制炎性细胞激活。本文所用的术语“炎性细胞激活”是指刺激(包括但不限于细胞因子、抗原或自身抗体)诱导的增殖性细胞反应，产生可溶性介质(包括但不限于细胞因子、氧自由基、酶、前列腺素类或血管活性胺)或者炎性细胞(包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、粒性白细胞、多形核白细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、树突细胞和内皮细胞)细胞表面表达新的或数量增加的介质(包括但不限于主要组织

相容性抗原或细胞粘着分子)。本领域技术人员知道, 这些细胞表型中的一种或其组合的激活可引起炎症的发生、持续或恶化。

本发明化合物也可用于引起气道平滑肌松弛、支气管扩张和防止支气管收缩。

5 因此, 本发明化合物可用于治疗以下疾病: 例如关节疾病(如类风湿性关节炎)、骨关节炎、痛风性关节炎、脊椎炎、甲状腺相关性眼病、贝切特氏病、脓毒病、败血症性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒病、革兰氏阳性脓毒病、中毒性休克综合征、哮喘、慢性支气管炎、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、春季结膜炎、嗜曙红细胞性肉芽肿、成人(急性)呼吸窘迫综合征(ARDS)、慢性肺部炎症性疾病(例如慢性阻塞性肺部炎症)、硅肺、肺结节病、心肌、脑或肢端再灌注损伤、由于轻度外伤引起的脑或脊髓损伤、包括囊性纤维变性的纤维变性、瘢痕疙瘩形成、疤痕组织形成、动脉粥样硬化、自身免疫病例如系统性红斑狼疮(SLE)和移植排斥性疾病(例如移植物抗宿主(GvH)反应和同种异体移植排斥)、慢性肾小球肾炎、炎性肠病例如节段性回肠炎和溃疡性结肠炎、增生性淋巴细胞性疾病如白血病(例如慢性淋巴细胞白血病; CLL) (参见 Mentz 等, *Blood* 88, 第 2172-2182 (1996))以及炎性皮肤病例如特应性皮炎、牛皮癣或荨麻疹。

10

15

20 这类疾病或有关病症的其它实例包括心肌病例如充血性心力衰竭、发热、恶病质、感染或恶性肿瘤继发性恶病质、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)继发性恶病质、ARC (AIDS 相关综合征)、脑型疟、骨质疏松和骨吸收疾病以及由于感染引起的发烧和肌痛。此外本发明化合物可用于治疗尿崩症和中枢神经系统疾病例如抑郁症和多发梗塞性痴呆。

25 本发明化合物也具有通常称作治疗药物以外的用途。例如, 本发明化合物也可以用作器官移植的保存剂(参见 Pinsky 等, *J. Clin. Invest.*, 92, 第 2994-3002 页 (1993))。

选择性 PDE4 抑制剂也可以用于治疗勃起功能障碍、尤其是血管

原性阳痿(Doherty, Jr.等, 美国专利第 6,127,363 号)、尿崩症(*Kidney Int.*, 37, 第 362 页, (1990); *Kidney Int.*, 35, 第 494 页, (1989))和中枢神经系统疾病例如多发梗塞性痴呆(Nicholson, *Psychopharmacology*, 101, 第 147 页(1990))、抑郁症(Eckman 等, *Curr. Ther. Res.*, 43, 第 291 页(1988))、焦虑症和应激反应(*Neuropharmacology*, 38, 第 1831 页(1991))、脑缺血(*Eur. J. Pharmacol.*, 272, 第 107 页(1995))、迟发性运动障碍(*J. Clin. Pharmacol.*, 16, 第 304 页(1976))、帕金森氏病(参见 *Neurology*, 25, 第 722 页(1975); *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26, 第 421 页(1999))和经前综合征。对于抑郁症而言, PDE4 选择性抑制剂在各种抑郁症的动物模型例如“行为绝望”或 Porsolt 试验(*Eur. J. Pharmacol.*, 47, 第 379 页(1978); *Eur. J. Pharmacol.*, 57, 第 431 页(1979); *Antidepressants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives*, Enna, Malick 和 Richelson 编著, Raven Press, 第 121 页(1981))和“尾悬浮试验”(*Psychopharmacology*, 85, 第 367 页(1985))中显示有效。最新的研究成果显示, 各种抗抑郁药长期体内治疗增加 PDE4 的脑性表达(*J. Neuroscience*, 19, 第 610 页(1999))。因此, 治疗中选择性 PDE4 抑制剂可以单独使用或者与第二种治疗方法联合使用, 四种主要抗抑郁治疗为电惊厥方法、单胺氧化酶抑制剂和 5-羟色胺或去甲肾上腺素的选择性重摄取抑制剂。选择性 PDE4 抑制剂也可以用于借助直接作用于支气管平滑肌细胞来调节支气管扩张活动, 从而用于治疗哮喘。

适用于本发明中的化合物和药用组合物包括其中以有效量给予哺乳动物所述有效成分以便达到其预定治疗目的的化合物和药用组合物。更准确地说, “治疗有效量”是指有效防止所治疗患者已有症状发展或者缓解该症状的剂量。特别是参照本发明所公开的细节, 有效剂量的确定完全在本领域技术人员知识范围内。

本文所用的术语“哺乳动物”包括雄性和雌性, 并且包括人、家养动物(例如猫、狗)、家畜(例如牛、马、猪)和野生生物(例如灵长类、大型猫科动物、动物园动物)。

“治疗有效剂量”是指达到所需作用的所述化合物量。这类化合物的毒性和治疗效果可以通过细胞培养或者实验动物标准药理学方法测定，例如测定 LD₅₀ (50%群体致死的剂量)和 ED₅₀ (50%群体有效治疗的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比率为治疗指数，它表示为 LD₅₀ 和 ED₅₀ 的比值。优选高治疗指数的化合物。由这类数据得出的资料可以用于计算用于人的剂量范围。这类化合物的剂量优选在包括几乎没有或者没有毒性的 ED₅₀ 的循环浓度范围内。根据所使用的剂型和所用的给药途径，所述剂量可以在该范围内变化。

每个医生可以根据患者的病情选择准确的制剂、给药途径和剂量。可以个别调整剂量和间隔时间以便提供足以维持治疗效果的活性部分的血浆浓度。

本领域技术人员知道，本文所述的治疗可以延伸为预防以及治疗确诊的疾病或者症状。进而还知道，所需用于治疗的本发明化合物剂量根据所治疗病症的性质、患者的年龄和状况而变化，并且最终由主治医师或兽医决定。然而，一般来说用于成人治疗的常用剂量在每日 0.001 mg/kg 至约 100 mg/kg 的范围内。所需剂量可以方便地以单一剂量给予或以合适的间隔时间，以多剂量给予，例如每日两个、三个、四个或更多个亚剂量给予。在实践中，医生决定最适合于每个患者的实际给药方案，所述剂量根据具体患者的年龄、体重和反应而改变。以上剂量为一般情况下的典型实例，个别情况可能需要较高或较低的剂量，这也在本发明的范围内。

本发明的制剂可以以标准方式给药，以用于治疗所指定疾病，例如口服、胃肠外、粘膜(例如舌下或者口腔含化给药)、局部、经皮、直肠、通过吸入(例如鼻或者肺深部吸入)。胃肠外给药包括但不限于静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌内、鞘内和关节内。胃肠外给药也可以使用高压技术象 POWDERJECT™完成。

对于口腔含化给药而言，所述组合物可以是以常规方式配制的片剂或者锭剂形式。例如，用于口服的片剂和胶囊剂可以含有常规的赋

形剂例如粘合剂(例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、西黄蓍胶、淀粉浆或者聚乙烯吡咯烷酮)、填充剂(例如乳糖、蔗糖、微晶纤维素、纤维素、玉米淀粉、磷酸钙或者山梨糖醇)、润滑剂(例如硬脂酸镁、硬脂酸、滑石粉、聚乙二醇或者二氧化硅)、崩解剂(例如马铃薯淀粉或者羟基乙酸淀粉钠)或者润湿剂(例如月桂基硫酸钠)。可以根据本领域熟知的方法将所述片剂包衣。

或者,本发明的化合物可以掺入口服液体制剂例如水性或者油性悬浮液、溶液、乳剂、糖浆或者酞剂中。而且,含有这些化合物的制剂可以以干燥产品提供,使用前用水或者其它合适的溶媒配制。这类液体制剂可以含有常规的添加剂,例如悬浮剂,如山梨糖醇糖浆、甲基纤维素、葡萄糖/糖浆、明胶、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶和氢化食用脂肪;乳化剂,例如卵磷脂、脱水山梨糖醇单油酸酯或者阿拉伯胶;非水性溶媒(可以包括食用油),例如杏仁油、分级分离的椰子油、油性酯、丙二醇和乙醇;和防腐剂,例如对羟基苯甲酸甲酯或者丙酯和山梨酸。

这类制剂也可以配制为栓剂,例如含有常规的栓剂基质如可可脂或者其它甘油酯。用于吸入的组合物一般可以以溶液、悬浮液或者乳液的形式提供,它们可以以干粉或者以使用常规抛射剂(例如二氯二氟甲烷或者三氯氟甲烷)的气雾剂形式给予。典型的局部和经皮制剂含有常规水性或者非水性介质,例如滴眼剂、乳油、软膏、洗剂和糊剂或者为加药的膏药、贴剂或者膜剂形式。

此外,本发明的组合物可以配制用于经注射或者连续输注胃肠外给药。注射剂可以是在油性或者水性溶媒中的悬浮剂、溶液剂或者乳剂形式并且可以含有组方剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,所述有效成分可以是粉末形式,使用前用合适的溶媒(例如无菌、无热原水)配制。

本发明的组合物也可以配制为储库型制剂。这类长效制剂可以植入给予(例如皮下或肌内)或者通过肌内注射给予。因此,本发明的化

合物可以用合适的聚合物或者疏水物质(例如在可接受的油中的乳剂)、离子交换树脂或者微溶衍生物(例如微溶性盐)配制。

5 对于兽用而言,式(II)化合物或其无毒性盐根据常规兽医实践以合适的可接受制剂给予。兽医可以容易地确定最适合具体动物的给药方案和给药途径。

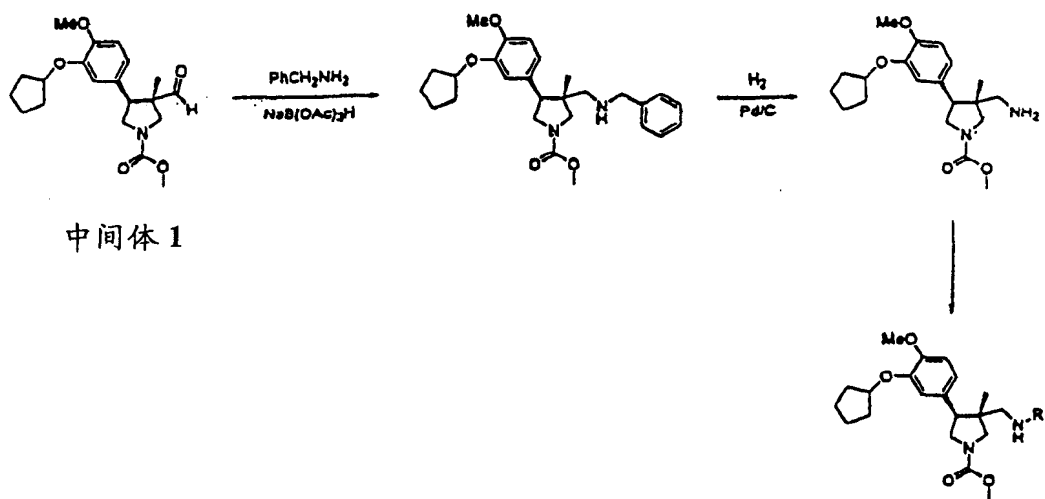
因此,另一方面,本发明提供含有式(II)化合物及其药学上可接受的稀释剂或载体的药用组合物。本发明进一步提供制备含有式(II)化合物的药用组合物的方法,该方法包括将式(II)化合物与其药学上可接受的稀释剂或载体混合。

10 以下提供结构式(II)化合物的具体非限制性实施例,其合成根据以下给出的方法进行。

一般而言,结构式(II)化合物可以根据以下合成方案制备。在下述方案中,本领域内知道,当需要时根据合成化学的一般原理可以使用保护基。这些保护基在合成的最终步骤中可以在本领域技术人员显而易见的碱性、酸性或者氢解条件下去除。通过对任何化学官能团使用合适的处理和保护,未在本文中专门提到的结构式(II)化合物的合成可以通过与以下给出的方案的类似方法完成。

20 除非另有说明,所有的原料均得自商业供应商,并且无需进一步纯化就可使用。所有反应物和层析流分通过在250mm硅胶板上的薄层层析分析,用UV(紫外)光或者I₂(碘)染色显现。产物和中间体经快速层析或者反相HPLC纯化。

25 如以下所提出的合成方案可以制备通用结构式(II)化合物。其它的合成途径对于本领域技术人员也是已知的。以下反应方案提供结构式(II)化合物,其中R¹和R²即CH₃和环戊基由原料所决定。适当选择其它原料或者对中间体和实例进行转化反应可提供具有其它所述R¹-R¹¹取代基的通用结构式(II)的化合物。

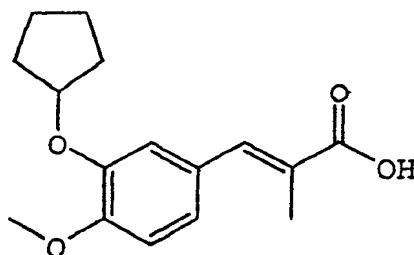


中间体 1 通过以下合成顺序制备。

以下说明各种中间体和结构式(II)化合物的合成。提供下列说明性的实施例，不应该解释为对本发明的限制。

中间体 A

5 (E)-3-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-2-甲基-丙烯酸的制备



首先，如下制备(E)-3-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-2-甲基-丙烯酸乙酯：

在氮气环境下，通过注射器向无水四氢呋喃(500 ml)中的磷酸丙酸三乙酯(50.6 ml; 236 mmol; 1.05 eq.)的冷却的(0°C)搅拌溶液中加入六甲基二甲硅烷基氯化锂的四氢呋喃溶液(247 ml 的 1.0 M 溶液; 1.1 eq.)。将所得的黄色溶液于 0°C 搅拌 1.5 小时，然后在 0.5 小时内，通过加液漏斗滴加 3-环戊氧基-4-甲氧基-苯甲醛(49.4 g; 225 mmol)的无水四氢呋喃(150 ml)溶液。将所得的橙色溶液于 0°C 搅拌 2 小时，然后温至室温，并且搅拌过夜。通过加入水(400 ml)将反应猝灭，用乙醚(2 × 300 ml)萃取。合并的有机层用 1N 盐酸水溶液(250 ml)、饱和碳酸氢盐溶液(250 ml)和盐水(250 ml)洗涤，然后经 MgSO₄ 干燥，过滤并真空浓缩，得到作为褐色液体的不饱和酯(68.4 g; 100%)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.64 (s, 1H), 7.01-6.96 (c, 2H), 6.87 (m, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.26 (q, 2H)。LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 305.3 (m+1)。

将(E)-3-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-2-甲基-丙烯酸乙酯(30 g, 98.6 mmol)和 LiOH•H₂O (氢氧化锂水合物) (5.0 g, 119.2 mmol, 1.2 eq.)在甲醇-水(4:1, 100 ml)中的悬浮液于室温搅拌 24 小时。减压除去甲醇，将

所得的残余物溶于水(100 ml)中,用3份100 ml的乙酸乙酯洗涤,用
1.0 N HCl (盐酸) (100 ml)中和,并用2份150 ml的乙酸乙酯萃取。萃
取液用盐水洗涤,经无水 Na₂SO₄ (硫酸钠)干燥,减压浓缩,得到作为
5 浅黄色粉末的所需产物(18.2 g, 66%收率)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ
(ppm): 12.4 (br.s, 1H, COOH), 7.56 (s, 1H, 烯的), 7.04 (m, 3H, 芳族),
4.81 (m, 1H), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.91-1.57 (m, 8H, 环
戊基)。

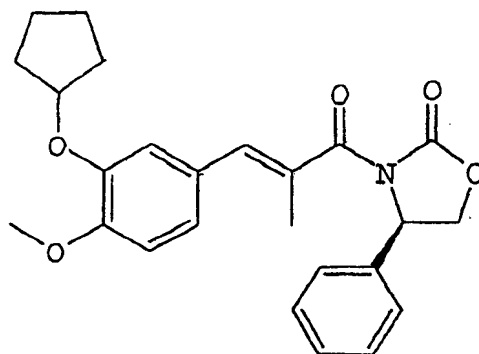
在另一可选的方法中,如下制备中间体 A:

在室温、氮气环境下,向所述乙酯(68.4 g; 225 mmol)的二噁烷(400
10 ml)的搅拌溶液中加入氢氧化锂一水合物(14.0 g; 332 mmol; 1.5 eq.)的
水(200 ml)溶液。观察到轻微的放热。将所得的浑浊黄色溶液加热至 80
°C(油浴)达 1.5 小时。加热 0.5 小时后,反应物变得澄清,但根据 TLC
评估,再需要 1.5 小时来完成反应。让所得溶液冷却至室温,用乙醚(500
15 ml)稀释,然后用 1 M 磷酸(H₃PO₄)水溶液洗涤。然后水层用乙酸乙酯(2
× 200 ml)萃取,合并的乙酸乙酯和乙醚层用盐水(250 ml)洗涤,经硫酸
镁干燥,过滤并真空浓缩,得到作为橙色固体的中间体 A (55 g; 88%)。
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.76 (s, 1H), 7.06-7.00 (c, 2H), 6.89 (m,
1H), 4.78 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.97-1.83 (c, 6H), 1.64-1.61
(c, 2H)。 LRMS (电离喷雾, 阴离子): Da/e 275.3 (M-1)。

20

中间体 B

3-[(2E)-3-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-2-甲基丙-2-烯酰基]-(4R)-4-苯基-1,3-噁唑烷-2-酮的制备



5 在氯化钙干燥的环境中,在 10 分钟内,通过注射器向中间体 A (55 g; 199 mmol) 在无二氯甲烷(400 ml)中的冷却(0℃)搅拌浆液中加入草酰氯的二氯甲烷溶液(109 ml 的 2.0 M 溶液; 218 mmol; 1.1 eq.)。观察到剧烈冒泡。将所得深色溶液于 0℃ 搅拌 15 分钟,然后通过注射器加入催化量的二甲基甲酰胺(0.3 ml)。当冒泡平息时,将所得溶液于 0℃ 继续搅拌 0.5 小时,然后让其温至室温并搅拌过夜(17 小时)。反应物用乙酸乙酯(500 ml)稀释,并小心地用水(250 ml)猝灭。在剧烈搅拌该混合物达 1 小时后,分离各层,有机层再用水(400 ml)和盐水(400 ml)洗涤,然后经硫酸镁干燥,过滤并真空浓缩,得到作为褐色固体的酰基氯(57.5 g; 98%)。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.98 (s, 1H), 7.11-7.02 (c, 2H), 6.92 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.01-1.82 (c, 6H), 1.68-1.62 (c, 2H)。

15 在氮气环境下,通过注射器,向 R-苯基噁唑烷酮(10.0 g; 61.3 mmol) 在无二氢呋喃(400 ml)中的冷却(-78℃)的机械搅拌溶液中加入正丁基锂的己烷溶液(27 ml 的 2.5 M 溶液; 1.1eq.)。将所得溶液于-78℃ 搅拌 0.8 小时,然后通过插管加入所述酰基氯(19.9 g; 67.4 mmol; 1.1 eq.)的四氢呋喃(100 ml)溶液。于-78℃ 搅拌 15 分钟后,让反应混合物在 40 分钟内缓慢温至 0℃,在此期间反应物变为稠浆液。于 0℃ 搅拌 2.5 小

5 时后，反应物用饱和的氯化铵水溶液(300 ml)猝灭，减压除去大部分四氢呋喃。然后残余物用氯仿(3 × 700 ml)萃取，合并的有机层用水(300 ml)和盐水(300 ml)洗涤，然后经硫酸镁干燥，过滤并真空浓缩，得到约 33 g 浅橙色固体。将该材料悬浮于 10% 乙酸乙酯的己烷溶液(1.2 L)中，并剧烈搅拌过夜。将所得细粉状固体经抽吸收集在布氏漏斗，然后真空浓缩，得到作为黄褐色粉末的中间体 B (21.8 g; 88%)。

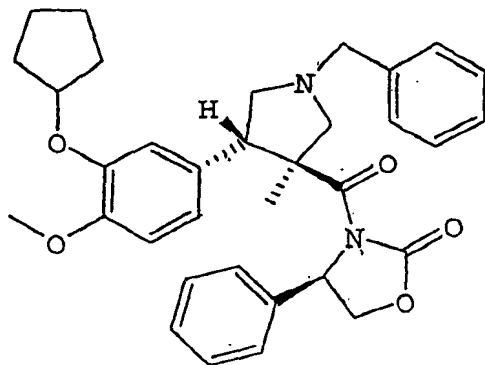
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.41-7.37 (c, 5H), 7.06 (s, 1H), 7.01-6.97 (c, 2H), 6.86 (m, 1H), 5.54 (t, 1H), 4.77-4.73 (c, 2H), 4.29 (t, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.97-1.82 (c, 6H), 1.62-1.56 (c, 2H).

同样，采用 S-(-)-4-苯基咪唑烷酮，可以制备中间体 B 的对映体。

10

中间体 C

(4R)-3-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]羰基}-4-苯基-1,3-咪唑烷-2-酮的制备



15

在氮气环境下，通过注射器向中间体 B (9.30 g; 22.8 mmol) 和 N-(甲氧基-甲基)-N-(三甲基甲硅烷基甲基)苄胺(11.7 ml; 45.6 mmol; 2 eq.) 的氯仿(65 ml)的冷却(-4°C)搅拌浆液中，加入三氟乙酸的氯仿溶液(4.6 ml 的 1.0 M 溶液; 4.6 mmol; 0.2 eq.)。将所得的浆液于约 0°C 搅拌 4 小时，然后于约 15°C 搅拌过夜(水浴)。然后将所得的浑浊溶液再冷却至 -4°C，并通过注射器再用 N-(甲氧基甲基)-N-(三甲基甲硅烷基甲基)苄胺(5.9

ml; 22.8 mmol; 1 eq.)进行处理, 将其搅拌 5 小时, 在此期间反应物变为均相。TLC (5% Et₂O 的二氯甲烷溶液)表明反应完成。减压除去大部分氯仿, 残余物用乙酸乙酯(250 ml)稀释, 然后顺序用 1 N 盐酸水溶液(2 × 50 ml)、1 N 氢氧化钠水溶液(50 ml)和盐水(50 ml)洗涤。然后有机层经硫酸镁干燥, 过滤并真空浓缩, 得到橙色半固体(13.9 g)。经快速硅胶层析(2% 乙醚的二氯甲烷溶液)纯化, 得到作为白色泡沫状物的主要非对映体吡咯烷(8.25 g; 65%)。

非对映体选择性约为 10:1 (HPLC)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.42-7.21 (c, 10H), 6.95 (s, 1H), 6.81 (s, 2H), 5.55 (dd, 1H), 4.74 (t, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.10 (dd, 1H), 3.93 (t, 1H), 3.70 (d, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.56 (d, 1H), 3.42 (d, 1H), 2.72 (m, 2H), 2.64 (d, 1H), 2.48 (m, 1H), 1.85-1.78 (c, 2H), 1.75-1.61 (c, 4H), 1.57-1.53 (c, 2H), 0.96 (s, 3H)。LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 555.2 (m+1)。

10

中间体 D

(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-甲醛的制备

还原/氧化法:

15 在氮气环境下, 通过注射器, 向中间体 C (15.09 g; 27.2 mmol)在甲苯(250 ml)的冷却(-78°C)的搅拌溶液中加入氢化铝锂的四氢呋喃溶液(16.3 ml; 1.0 M; 16.3 mmol; 0.6 eq.)。观察到剧烈冒泡。将所得溶液于-78°C 搅拌 2 小时, 然后除去冷却浴, 通过顺序加入水(0.62 ml)、15% 氢氧化钠水溶液(0.62 ml)和再加入水(1.9 ml)进行猝灭。让所得混合物温至室温, 搅拌 30 分钟, 然后用乙醚(500 ml)稀释, 并经硫酸镁干燥。20 过滤并真空浓缩, 得到作为半固体的所述醇(存在一些醛) (14.8 g)。将该物质不经进一步纯化而立即使用。

在氮气环境下, 通过注射器, 向冷却(-78°C)的草酰氯的二氯甲烷溶液(10.9 ml; 2.0 M; 21.8 mmol; 0.8 eq.)在二氯甲烷(75ml)中的搅拌溶

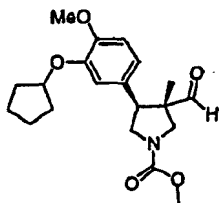
液中，加入二甲基亚砜(3.1 ml; 43.5 mmol; 1.6 eq.)。观察到剧烈冒泡。于-78℃搅拌 20 分钟后，通过插管加入所述粗制醇的二氯甲烷溶液(75 ml)。将所得的黄色溶液于-78℃搅拌 20 分钟，然后通过注射器加入三乙胺(15.2 ml; 109 mmol; 4 eq.)。将反应物于-78℃搅拌 20 分钟，然后温至室温，再搅拌 1 小时。通过加入盐水(150 ml)猝灭反应物，然后用二氯甲烷(2 × 100 ml)萃取。合并的有机部分经硫酸镁干燥，过滤，然后真空浓缩，得到粗制醛。通过快速硅胶层析(25%乙酸乙酯的己烷溶液)纯化，得到作为澄清、无色油状物的中间体 D (9.8 g; 92%)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.64 (s, 1H), 7.37-7.26 (c, 5H), 6.78-6.76 (c, 2H), 6.70 (m, 1H), 4.74 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.70 (m, 1H), 3.64-3.62 (c, 2H), 3.18-3.13 (c, 2H), 2.84 (t, 1H), 2.41 (d, 1H), 1.94-1.83 (c, 6H), 1.63-1.59 (c, 2H), 0.74 (s, 3H).
LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 394.3 (m+1).

10

中间体 1

4-(S)-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-(S)-甲酰基-3-甲基吡咯烷-1-羧酸甲酯的制备



15 将中间体 D 溶于乙腈(4.8 ml)中，用氯甲酸甲酯(176 μl, 2.3 mmol)处理。将所得溶液加热至回流达 4 小时，薄层层析显示出中间体 D 完全耗尽。然后将反应混合物真空浓缩，并用己烷/乙酸乙酯(3:1)作为洗脱液直接经 SiO₂ 柱层析纯化。回收作为浅黄色油状物的中间体 1 (110 mg)。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 9.62 (s, 1H), 6.83-6.79 (d, 1H), 6.65 (dd, 1H), 6.61 (d, 1H), 4.74-4.70 (brd s, 1H), 3.94-3.64 (m, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.62-3.55 (m, 1H), 3.38-3.28 (dd, 1H), 1.95-1.75 (m, 6H), 1.66-1.57 (m, 2H), 0.91 (s, 3H).

以下说明各种中间体和结构式(II)化合物的合成。提供以下实施例是为了说明，不应该将其解释为是限制性的。

在实施例中，使用以下缩写：NaOH (氢氧化钠)， CH_2Cl_2 (二氯甲烷)， Na_2SO_4 (硫酸钠)，EtOAc (乙酸乙酯)，Ph (苯基)，MeOH (甲醇)， K_2CO_3 (碳酸钾)， μmol (微摩尔)，atm (大气压)， MgSO_4 (硫酸镁)，LiOH (氢氧化锂)，N (当量)，mmol (毫摩尔)，ml (毫升)以及 H_3PO_4 (磷酸)。

使用以下通用方法制备实施例 1-28。

10 还原性胺化法：

在室温、氮气环境下，向醛(0.24 mmol)的二氯乙烷(1 ml)搅拌溶液中加入苄胺(0.24 mmol)，然后加入三乙酸基硼氢化钠(0.34 mmol)。搅拌 5 小时后，反应物用 1 N NaOH 水溶液(0.3 ml)和 CH_2Cl_2 (10 ml)稀释。分离各层，水层用另外 5 ml CH_2Cl_2 萃取。然后合并的有机层用水和盐水洗涤，干燥(Na_2SO_4)，过滤并真空干燥。残余物通过快速层析(3:2 EtOAc:己烷，硅胶)纯化，得到所述产物。

氢化法：

向所述原材料(75 μmol)在 95%乙醇(1 ml)中的搅拌溶液中加入 Pearlman 催化剂(碳负载的氢氧化钨, 10 mg)进行处理，然后将其置于氢气环境(1 atm)中。于室温搅拌 24 小时后，在布氏漏斗上将反应物通过 GF/F 滤纸抽吸过滤，用 20 ml 95%乙醇洗涤。浓缩滤液，得到所述产物。

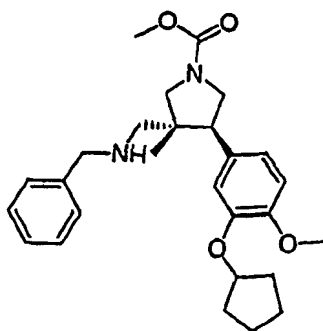
磺酰化法:

在室温下,向原材料(0.1 mmol)的 1,4-二噁烷(0.3 ml)搅拌溶液中顺序加入碳酸钾水溶液(0.6 ml 的 0.65 M 溶液; 4 eq.)和磺酰氯(0.12 mmol)的 1,4-二噁烷(0.3 ml)溶液。将所得溶液于室温搅拌 2 小时。反应物用 1:1 的己烷:EtOAc (30 ml)稀释,顺序用水(20 ml)和盐水(20 ml)洗涤,然后干燥(硫酸镁)、过滤并真空浓缩,得到所述磺酰胺。

Hunig 碱酰化法:

在室温、氮气环境下,通过注射器,向原材料(0.14 mmol)和 Hunig 碱(0.20 mmol)在无水二氯甲烷(1 ml)的搅拌溶液中加入酰基氯(0.14 mmol)。搅拌 1 小时后,反应物用二氯甲烷(30 ml)稀释,顺序用 1 N 盐酸水溶液(2 × 10 ml)和盐水(10 ml)洗涤,然后干燥(硫酸钠),过滤并真空浓缩。残余物通过径向色谱(1 mm chromatotron 板和 3% MeOH 的二氯甲烷溶液)纯化,得到所述酰胺。

15

实施例 1**R=CH₃Ph**

(4S,3R)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[[苄氨基]甲基]吡咯烷羧酸甲酯

20

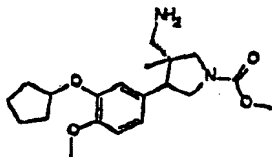
通过还原性胺化法制备。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz; 旋转异构体(rotomer)的混合物) δ:

7.34-7.28 (m, 5H), 6.77 (d, 1H), 6.67-6.64 (m, 2H),
4.70 (c, 1H), 3.84-3.65 (m, 9H), 3.45-3.24 (m, 4H),
2.54 (q, 2H), 1.86-1.79 (m, 6H), 1.62-1.55 (m, 2H),
0.78 (d, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 453.2 (m+1).

实施例 2



5 R=H

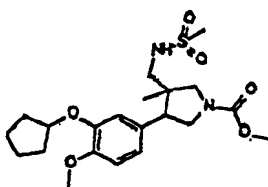
(4S,3R)-3-(氨基甲基)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基吡咯烷羧酸甲酯

通过氢化法制备。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz; 旋转异构体的混合物) δ: 6.80 (d, 1H), 6.71-6.65 (m, 2H),
10 4.73 (c, 1H), 3.86-3.68 (m, 7H), 3.43-3.17 (m, 4H), 2.65 (br s, 2H), 1.97-1.80 (m, 6H),
1.69-1.56 (m, 2H), 0.77 (d, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 363.3 (m+1).

实施例 3



15

R=SO₂CH₃

(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[[甲磺酰基)氨基]甲基}吡咯烷羧酸甲酯

通过磺酰化法制备。

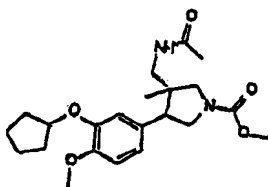
20 ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz; 旋转异构体的混合物) δ: 6.80

(d, 1H), 6.69-6.67 (m, 2H), 4.81-4.72 (m, 1.5H), 4.61 (t, 0.5H), 3.88-3.66 (m, 8H), 3.44-3.35 (m, 2H), 3.20 (t, 0.5H), 3.14-3.05 (m, 2.5H), 2.95 (s, 3H), 1.91-1.80 (m, 6H), 1.63-1.56 (m, 2H), 0.82 (d, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 441.2 (m+1).

LRMS (电离喷雾, 阴离子): Da/e 439.2 (m-1).

实施例 4



5

$R=COCH_3$

(4S,3R)-3-[(乙酰氨基)甲基]-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基吡咯烷羧酸甲酯

通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

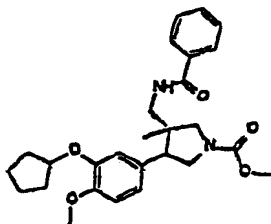
10

1H NMR (CDCl₃, 400 MHz; 旋转异构体的混合物) δ : 6.80

(d, 1H), 6.69-6.67 (m, 2H), 5.58 (br t, 0.5H), 5.52 (br t, 0.5H), 4.74 (c, 1H), 3.86-3.64 (m, 7H), 3.39-3.19 (m, 5H), 3.08 (t, 1H), 1.94 (s, 3H), 1.91-1.79 (m, 6H), 1.63-1.58 (m, 2H), 0.80 (d, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 405.3 (m+1).

实施例 5



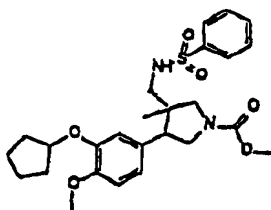
R=COPh

(4S,3R)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[[苯基羰基氨基]甲基]吡咯烷羧酸甲酯

通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

- 5 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz; 旋转异构体的混合物) δ :
 7.55-7.45 (m, 3H), 7.37 (t, 2H), 6.83 (d, 1H), 6.77-6.74 (m, 2H), 6.14 (br s, 1H), 4.73 (c, 1H), 3.90-3.59 (m, 9H), 3.50-3.30 (m, 3H), 3.18 (t, 1H), 1.97-1.74 (m, 6H), 1.64-1.55 (m, 2H), 0.94 (d, 3H).
 LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 467.3 (m+1).

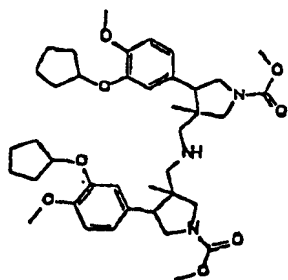
实施例 6



- 10 **R=SO₂Ph**
(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[[苯磺酰基]氨基]甲基吡咯烷羧酸甲酯

通过磺酰化法制备。

- $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz; 旋转异构体的混合物) δ : 7.84 (dd, 2H), 7.61-7.50 (m, 3H), 6.77 (dd, 1H), 6.64-6.60 (m, 2H), 5.01 (t, 0.5H), 4.93 (t, 0.5H), 4.72 (c, 1H), 3.95-3.59 (m, 9H), 3.32 (c, 1H), 3.19 (t, 0.5H), 3.07 (t, 0.5H), 2.93-2.82 (m, 2H), 1.97-1.74 (m, 6H), 1.64-1.53 (m, 2H), 0.75 (s, 3H).
 15 LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 503.2 (m+1).
 LRMS (电离喷雾, 阴离子): Da/e 501.2 (m-1).

实施例 7

R=二聚物

5 双{[(4S,3R)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-羧甲基吡咯烷-3-基]甲基}胺

通过还原性胺化法用乙酸铵制备。

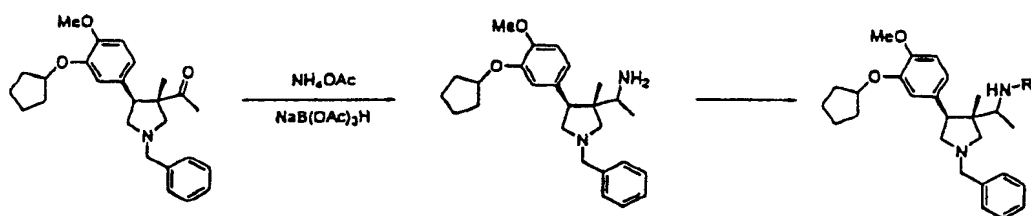
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz; 旋转异构体的混合物) δ : 6.80

(dd, 2H), 6.72-6.64 (m, 4H), 4.74 (m, 2H), 3.93-3.67

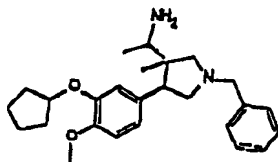
(m, 16H), 3.56-3.23 (m, 8H), 2.51 (q, 1H), 2.06-1.81

(m, 2H), 1.70-1.53 (m, 4H), d, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 708.1 (m+1).



10

实施例 8

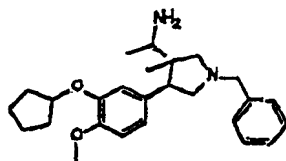
R=H

1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙胺 极性较弱的非对映体

通过还原性胺化法制备。

- 5 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.37-7.21 (c, 5H), 6.78 (d, 1H), 6.69-6.67 (c, 2H), 4.75 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.56 (s, 2H), 2.86 (m, 1H), 2.73 (m, 2H), 2.50 (t, 1H), 2.01 (t, 1H), 1.93-1.78 (c, 7H), 1.67-1.56 (c, 2H), 1.28 (br s, 2H), 0.89 (d, 3H), 0.86 (s, 3H).
LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 409.3 (m+1).

实施例 9



10

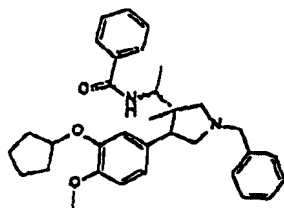
R=H

1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙胺 极性较强的非对映体

通过还原性胺化法制备。

- $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.39-7.22 (c, 5H), 6.93 (s, 1H), 6.78-6.69 (c, 2H), 4.75 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.68 (d, 1H), 3.56 (d, 1H), 3.17 (t, 1H), 2.92-2.81 (c, 3H), 2.62 (d, 1H), 2.37 (d, 1H), 1.98-1.81 (c, 6H), 1.67-1.57 (c, 2H), 1.05 (d, 3H), 0.63 (s, 3H).
LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 409.3 (m+1).

15

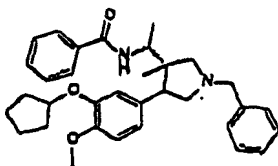
实施例 10**R=COPh**

5 **N-{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}苯甲酰胺 极性较低的非对映体**

通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 8.47 (d, 1H), 7.81 (d, 2H), 7.51 (t, 1H), 7.42 (t, 2H); 7.38-7.29 (m, 5H), 6.77 (t, 1H), 6.73 (d, 2H), 4.78 (c, 1H), 4.01 (c, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.72 (d, 1H), 3.62 (d, 1H), 3.40-3.26 (m, 3H), 2.58 (t, 1H), 2.13 (d, 1H), 1.96-1.74 (m, 6H), 1.70-1.53 (m, 2H), 1.22 (d, 3H), 0.60 (s, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 513.3 (m+1).

实施例 11

10

R=COPh

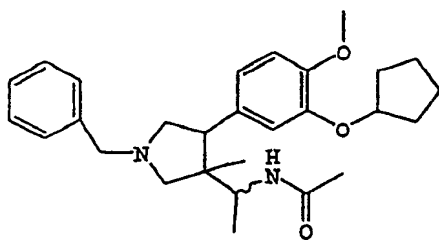
N-{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}苯甲酰胺 极性较强的非对映体

通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.92 (br s, 1H), 7.81 (d, 2H), 7.53 (t, 1H), 7.46 (t, 2H), 7.20-7.13 (m, 5H), 6.78-6.72 (m, 3H), 4.64 (c, 1H), 4.00 (c, 1H), 3.84-3.77 (m, 4H), 3.57 (q, 2H), 3.43 (t, 1H), 3.25 (t, 1H), 2.81 (d, 1H), 2.65 (t, 1H), 2.34 (d, 1H), 1.87-1.79 (m, 6H), 1.65-1.52 (m, 2H), 1.29 (d, 3H), 0.80 (s, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 513.3 (m+1).

实施例 12



5 $\text{R}=\text{COCH}_3$

N-{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}乙酰胺 极性较弱的非对映体

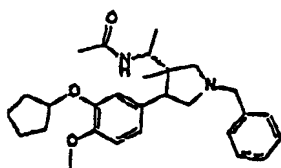
通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.35-7.24 (m, 5H), 6.87 (br s, 1H), 6.82 (d, 1H), 6.75 (d, 1H), 6.71 (dd, 1H), 4.74 (c, 1H), 3.85-3.80 (m, 4H), 3.68 (d, 1H), 3.49 (d, 1H), 3.26 (t, 1H), 3.12 (t, 1H), 2.66 (t, 1H), 2.31 (d, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.95-1.80 (m, 6H), 1.64-1.58 (m, 2H), 1.15 (d, 3H), 0.72 (s, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 451.3 (m+1).

10

实施例 13



$R=COCH_3$

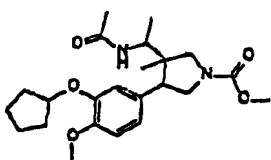
N-{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}乙酰胺 极性较强的非对映体

通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7.61 (br d, 1H), 7.36-7.26 (m, 5H), 6.78-6.70 (m, 3H), 4.77 (c, 1H), 3.86-3.78 (m, 5H), 3.63 (d, 1H), 3.27 (t, 1H), 3.22 (t, 1H), 3.06 (d, 1H), 2.58 (t, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.96-1.80 (m, 6H), 1.62-1.57 (m, 2H), 1.09 (d, 3H), 0.53 (s, 3H).

5 LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 451.3 (m+1).

实施例 14



$R=COCH_3$

10 3-(S)-(1-乙酰氨基乙基)-4-(S)-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基吡咯烷-1-羧酸甲酯

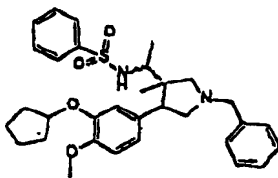
极性较弱的非对映体

通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7.61 (br d, 1H), 7.38-7.26 (m, 5H), 6.78-6.70 (m, 3H), 4.77 (c, 1H), 3.86-3.76 (m, 4H), 3.63 (d, 2H), 3.27 (t, 1H), 3.22 (t, 1H), 3.06 (d, 1H), 2.58 (t, 1H), 2.06 (d, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.96-1.78 (m, 6H), 1.65-1.55 (m, 2H), 1.09 (d, 3H), 0.53 (s, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 451.3 (m+1).

15

实施例 15

R=SO₂Ph

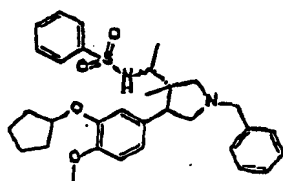
5 {1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}-(苯磺酰基)胺
极性较强的非对映体

通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.89 (d, 2H), 7.54-7.41 (m, 2H); 7.40-7.34 (m, 5H), 7.31 (c, 1H), 6.66 (dd, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.24 (d, 1H), 4.67 (c, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.66 (d, 1H), 3.57 (d, 1H), 3.14-3.06 (m, 3H), 2.69 (t, 1H), 2.39 (t, 1H), 1.96 (d, 1H), 1.91-1.77 (m, 6H), 1.69-1.55 (m, 2H), 1.11 (d, 3H), 0.40 (s, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 549.2 (m+1).

10 **实施例 16**



R=SO₂Ph

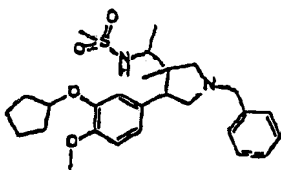
15 {1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}-(苯磺酰基)胺
极性较弱的非对映体

通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.64 (d, 2H), 7.52 (t, 1H), 7.43-7.31 (m, 7H), 6.77-6.66 (m, 3H), 4.73 (c, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.53 (d, 2H), 3.47 (t, 1H), 3.29 (t, 1H), 2.87 (q, 1H), 2.44 (c, 1H), 2.29 (d, 1H), 2.11 (d, 1H), 1.93-1.77 (m, 6H), 1.61-1.56 (m, 2H) 1.21 (d, 3H), 0.54 (s, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 549.2 (m+1).

实施例 17



5 **R=SO₂CH₃**

{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}-(甲磺酰基)胺

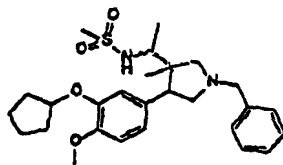
极性较强的非对映体

通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.37-7.28 (m, 5H), 6.78-6.71 (m, 3H), 4.76 (c, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.70 (d, 1H), 3.54 (d, 1H), 3.50 (d, 1H), 3.32 (t, 1H), 3.01 (d, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.56 (t, 1H), 2.02 (t, 1H), 1.98-1.83 (m, 6H), 1.62-1.53 (m, 2H), 1.18 (d, 3H), 0.52 (s, 3H).

10 LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 487.3 (m+1).

实施例 18



$R=SO_2CH_3$

{1-[(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙基}-(甲磺酰基)胺

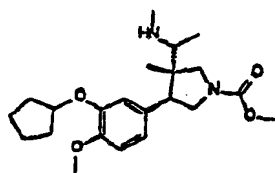
极性较弱的非对映体

5 通过 Hunig 碱介导的酰化法制备。

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7.40-7.27 (m, 5H), 6.80-6.75 (m, 3H), 4.75 (c, 1H), 3.87-3.78 (m, 4H), 3.47 (t, 1H), 3.38 (d, 1H), 3.36 (t, 1H), 3.22 (q, 1H), 2.78 (d, 1H), 2.63-2.57 (m, 4H), 2.26 (d, 1H), 1.95-1.79 (m, 1H), 1.70-1.58 (m, 2H), 1.28 (d, 3H), 0.68 (s, 3H).

LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 487.3 (m+1).

实施例 19



10 $R=CH_3$

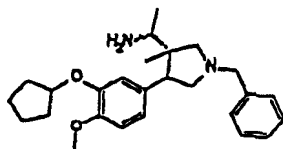
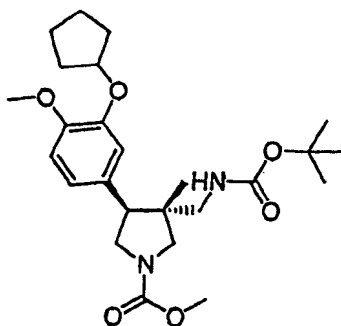
(3S,4S)-4-(3-环戊氧基-4-甲氧基苯基)-3-甲基-3-[(甲基氨基)乙基]吡咯烷羧酸甲酯

非对映体的混合物

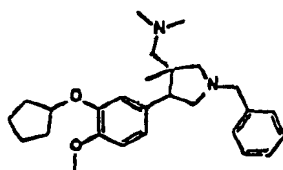
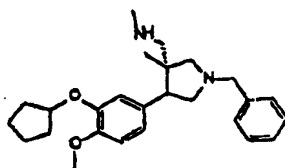
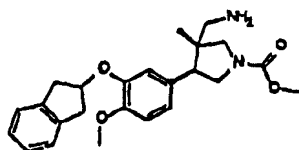
通过还原性胺化法, 用甲胺从甲基酮制备。

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6.79 (d, 1H), 6.68-6.65 (m, 2H); 4.71 (c, 1H), 3.96-3.62 (m, 11H), 3.37 (d, 0.5H), 3.27 (d, 0.5H), 2.15 (d, 3H), 2.01-1.74 (m, 6H), 1.62-1.55 (m, 2H), 1.01 (d, 3H).

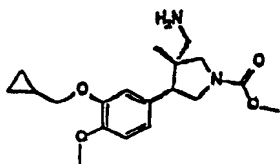
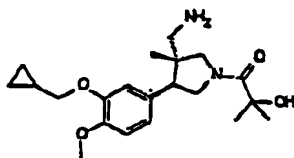
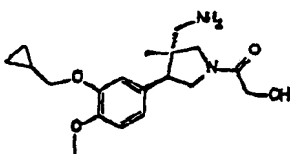
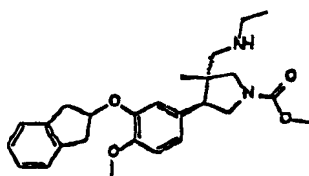
15 LRMS (电离喷雾, 阳离子): Da/e 391.4 (m+1).

实施例 20实施例 21

5

实施例 22实施例 23实施例 24

10

实施例 25**实施例 26**5 **实施例 27****实施例 28**

10 测试了结构式(II)化合物抑制PDE4的能力。一种化合物抑制PDE4活性的能力与该化合物的 IC_{50} 值即抑制50%酶活性所需的抑制剂浓度有关。使用重组人PDE4测定结构式(II)化合物的 IC_{50} 值。

15 本发明化合物通常表现出抑制重组人PDE4的 IC_{50} 值低于约100 μM ，优选低于约50 μM ，更优选低于约25 μM 。本发明化合物通常表现出抑制重组人PDE4的 IC_{50} 值低于约5 μM ，通常低于约1 μM 。为获得本发明的全部优点，本发明的PDE4抑制剂的 IC_{50} 为约1 nM至约25 μM 。

由一般使用在浓度范围0.1 pM-500 μM 的浓度-反应曲线，确定所

述化合物的 IC₅₀ 值。使用如 Loughney 等, *J. Biol. Chem.*, 271, 第 796-806 页(1996)中所述的标准方法, 针对其它 PDE 酶的试验也表明本发明的化合物对于 cAMP 特异性 PDE4 酶具有高度选择性。

5 也测试了结构式(II)化合物降低人外周血淋巴细胞分泌 TNF α 的能力。降低分泌 TNF α 的能力与 EC₅₀ 值(即能够抑制 50%总 TNF α 的化合物有效浓度)有关。

本发明化合物通常表现出 EC₅₀ 值低于约 50 μ M, 优选低于约 25 μ M, 更优选低于约 15 μ M。本发明化合物表现出的 PBL/TNF α EC₅₀ 值优选低于约 5 μ M, 通常低于约 0.10 μ M。为获得本发明的全部优点, 10 本发明的 PDE4 抑制剂的 EC₅₀ 值为约 10 nM 至约 20 μ M。

通过本领域众所周知的方法可以完成重组人 PDE 的制备以及 IC₅₀ 和 EC₅₀ 的测定。典型方法介绍如下:

人 PDE 的表达

15 在杆状病毒感染的草地贪夜蛾(*Spodoptera fugiperda*) (Sf9)细胞中的表达

使用 pBlueBacIII (Invitrogen)或者 pFastBac (BRL-Gibco)构建杆状病毒转移质粒。通过跨越所述载体接点进行测序并且通过对经 PCR 产生的所有区进行完全测序, 证实所有质粒的结构。质粒 pBB-PDE1A3/6 20 在 pBlueBacIII 中含有 PDE1A3 的完整可读框(Loughney 等, *J. Biol. Chem.*, 271, 第 796-806 页(1996))。质粒 Hcam3aBB 在 pBlueBacIII 中含有 PDE1C3 的完整可读框(Loughney 等(1996))。质粒 pBB-PDE3A 在 pBlueBacIII 中含有 PDE3A 的完整可读框(Meacci 等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 第 3721-3725 页(1992))。

25 按照生产商的方案, 使用 MaxBac 系统(Invitrogen)或者 FastBac 系统(Gibco-BRL)生产重组病毒原液。在这两种情况下, 重组人 PDE 在所得病毒中的表达由病毒多角体启动子驱动。当使用 MaxBac[®]系统时, 为了确保野生型(occ+)病毒不污染制剂, 将病毒噬斑纯化两次。如

下进行蛋白表达。让 Sf9 细胞在补充如下成分的 Grace's 昆虫培养基 (Gibco-BRL) 中于 27°C 生长: 10% 胎牛血清、0.33% TC yeastolate、0.33% 水解乳白蛋白、4.2 mM 碳酸氢钠、10 µg/ml 庆大霉素、100 单位/ml 青霉素和 100 µg/ml 链霉素。以每个细胞大约 2-3 个病毒颗粒的感染复数感染指数生长细胞, 然后孵育 48 小时。通过离心收集细胞, 用无补充组分的 Grace's 培养基洗涤并且快速冷冻保存。

在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) (酵母)中的表达

人 PDE1B、PDE2、PDE4A、PDE4B、PDE4C、PDE4D、PDE5 和 PDE7 的重组产生类似于美国专利第 5,702,936 号的实施例 7 中所述进行(该专利通过引用结合到本文中), 只是使用酵母转化载体, 该酵母转化载体衍生自 Price 等, *Methods in Enzymology*, 185, 第 308-318 页(1990)介绍的基础 ADH2 质粒, 该质粒中加入酵母 ADH2 启动子和终止序列, 所述酿酒酵母宿主为蛋白酶缺陷型菌株 BJ2-54, BJ2-54 于 1998 年 8 月 31 日保藏在美国典型培养物保藏中心(Manassas, Virginia), 保藏号为 ATCC 74465。使转化宿主细胞在 2x SC-leu 培养基(pH 6.2, 含有微量金属和维生素)中生长。24 小时后, 加入含有甘油的 YEP 培养基至终浓度为 2x YET/3%甘油。约 24 小时后, 收获细胞, 洗涤并且于 -70°C 保存。

人磷酸二酯酶制剂

磷酸二酯酶活性的测定

如下测定所述制剂的磷酸二酯酶活性。利用活性炭分离技术的 PDE 测定基本如 Loughney 等(1996)所述进行。在该测定中, PDE 活性将 [32P] cAMP 或者 [32P] cGMP 转化为相应的 [32P] 5'-AMP 或者 [32P] 5'-GMP 与存在的 PDE 活性量成正比。然后, 在蛇毒 5'-核苷酸酶的作用下, [32P] 5'-AMP 或者 [32P] 5'-GMP 被定量转化为游离的 [32P] 磷酸和未标记的腺苷或鸟苷。因此, 释放的 [32P] 磷酸的量与酶活性成正

比。该测定在 100 μ l 含有(终浓度)以下组分的反应混合物中于 30 $^{\circ}$ C 下进行: 40 mM Tris HCl (pH 8.0)、1 μ M 硫酸锌、5 mM 氯化镁和 0.1 mg/ml 牛血清白蛋白(BSA)。或者, 在评估 PDE1 比活的测定中, 孵育混合物还包括使用 0.1 mM 氯化钙和 10 μ g/ml 钙调蛋白。PDE 酶以产率 < 30% 总底物水解的量存在(线性测试条件)。通过加入底物(1 mM [32P] cAMP 或 cGMP), 并将该混合物孵育 12 分钟, 开始所述测试。然后加入 75 μ g 大响尾蛇(*Crotalus atrox*)毒液, 继续孵育 3 分钟(总共 15 分钟)。通过加入 200 μ l 活性炭(在 0.1 M 磷酸二氢钠 pH 4 中的 25 mg/ml 悬浮液)终止反应。离心(750 X g, 3 分钟)沉淀所述活性炭后, 取出上清液样品, 在闪烁计数器中测定放射性, 然后计算 PDE 活性。

类似于 Loughney 等, *J. Biol. Chem.*, 271, 第 796-806 页(1996)所述的方法进行抑制剂的的分析, 只是同时使用 cGMP 和 cAMP, 底物浓度保持在低于 32 nM, 该值远低于被测 PDE 的 K_m 。

15 人 PDE4A、4B、4C、4D 制剂

用酿酒酵母制备 PDE4A

通过与 50 ml 裂解缓冲液(50 mM MOPS pH 7.5, 10 μ M 硫酸锌, 2 mM 氯化镁, 14.2 mM 2-巯基乙醇, 各 5 μ g/ml 的抑胃酶肽、亮抑蛋白酶肽、抑蛋白酶肽, 各 20 μ g/ml 的钙蛋白酶抑制剂 I 和 II 和 2 mM 苯甲脒盐酸盐)混合, 在室温下, 解冻酵母细胞(50 g 带有 HDUN1.46 的酵母菌株 YI26)。将细胞在弗氏(French[®])压碎器(SLM-Aminco[®], Spectronic Instruments)中于 10 $^{\circ}$ C 裂解。用 Beckman JA-10 转子, 将所述提取物于 4 $^{\circ}$ C 以 9,000 rpm 离心 22 分钟。取出上清液, 用 Beckman TI45 转子, 于 4 $^{\circ}$ C 以 36,000 rpm 离心 45 分钟。

25 通过加入固体硫酸铵(0.26 g/ml 上清液), 同时在冰浴中搅拌并且维持 pH 在 7.0-7.5 之间, 从高速上清液沉淀 PDE4A。通过用 Beckman JA-10 转子以 9,000 rpm 离心 22 分钟, 收集含有 PDE4A 的沉淀蛋白。将所述沉淀物重悬于 50 ml 缓冲液 G (50 mM MOPS pH 7.5, 10 μ M 硫

酸锌, 5 mM 氯化镁, 100 mM 氯化钠, 14.2 mM 2-巯基乙醇, 2 mM 苯甲脒盐酸盐, 各 5 $\mu\text{g/ml}$ 的亮抑蛋白酶肽、抑胃酶肽和抑蛋白酶肽, 以及各 20 $\mu\text{g/ml}$ 的钙蛋白酶抑制剂 I 和 II) 中, 然后通过 0.45 μm 滤膜。

5 将所述重悬浮样品(50-100 ml)上样到在缓冲液 G 中平衡的 5 x 100 cm Pharmacia SEPHACRYL[®] S-300 柱中。以流速 2 ml/min 洗脱酶活性并将其合并, 以供稍后的分级分离用。

10 将经凝胶过滤层析分离的 PDE4A 上样到在缓冲液 A (50 mM MOPS pH 7.5, 10 μM 硫酸锌, 5 mM 氯化镁, 14.2 mM 2-巯基乙醇和 100 mM 苯甲脒盐酸盐) 中平衡的 1.6 x 20 cm Sigma Cibacron Blue Agarose-300 型柱(10 ml) 中。依次用 50-100 ml 缓冲液 A、20-30 ml 含有 20 mM 5'-AMP 的缓冲液 A、50-100 ml 含有 1.5 M 氯化钠的缓冲液 A 和 10-20 ml 缓冲液 C (50 mM Tris HCl pH 8, 10 μM 硫酸锌、14.2 mM 2-巯基乙醇和 2 mM 苯甲脒盐酸盐) 洗涤所述柱子。用 20-30 ml 含有 20 mM cAMP 的缓冲液 C 洗脱所述酶。

15 合并 PDE 活性峰, 用硫酸铵(0.33 g/ml 酶合并液)沉淀, 以便去除过量的环核苷酸。将沉淀蛋白重悬于缓冲液 X (25 mM MOPS pH 7.5, 5 μM 硫酸锌, 50 mM 氯化钠, 1 mM DTT 和 1 mM 苯甲脒盐酸盐) 中, 按照生产商的说明, 通过在 Pharmacia PD-10[®] 柱上凝胶过滤将其脱盐。将所述酶在干冰/乙醇浴中快速冷冻, 然后于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

20 通过 SDS-PAGE, 所得制剂的纯度约 > 80%。这些制剂水解 cAMP 的比活约 10-40 μmol cAMP/每分钟/毫克蛋白。

用酿酒酵母制备 PDE4B

25 在室温下, 通过与 100 ml 玻璃珠(0.5 mM, 酸洗)和 150 ml 裂解缓冲液(50 mM MOPS pH 7.2, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM 苯甲脒盐酸盐、各 5 $\mu\text{g/ml}$ 的抑胃酶肽、亮抑蛋白酶肽、抑蛋白酶肽、钙蛋白酶抑制剂 I 和 II) 混合, 解冻酵母细胞(150 g 带有 HDUN2.32 的酵母菌株 YI23)。将所述混合物冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$, 转移到 Bead-Beater[®] 中,

快速混合 6 个循环(每个循环 30 秒)使所述细胞裂解。在 Beckman J2-21M 离心机中, 使用 JA-10 转子, 将所述匀浆于 4°C 以 9,000 rpm 离心 22 分钟。回收上清液, 并且在 Beckman XL-80 超速离心机中, 使用 TI45 转子, 将其于 4°C 以 36,000 rpm 离心 45 分钟。回收上清液并且通过加入固体硫酸铵(0.26 g/ml 上清液), 同时在冰浴中搅拌并且维持 pH 在 7.0-7.5 的范围内, 沉淀 PDE4B。然后, 在 Beckman J2 离心机中, 使用 JA-10 转子, 将该混合物以 9,000 rpm (12,000 X g) 离心 22 分钟。弃去上清液, 将沉淀溶于 200 ml 缓冲液 A (50 mM MOPS pH 7.5, 5 mM 氯化镁, 1 mM DTT, 1 mM 苯甲脒盐酸盐, 以及各 5 µg/ml 的亮抑蛋白酶肽、抑胃酶肽和抑蛋白酶肽)中。将 pH 和电导率分别校正为 7.5 和 15-20 mS。

将所述重悬浮样品上样到在缓冲液 A 中平衡的 1.6 x 200 cm Sigma Cibacron Blue Agarose-300 型柱(25 ml)中。将所述样品在 12 个小时内循环通过所述柱 4-6 次。依次用 125-250 ml 缓冲液 A、125-250 ml 含有 1.5 M 氯化钠的缓冲液 A 和 25-50 ml 缓冲液 A 洗涤所述柱子。用 50-75 ml 缓冲液 E (50 mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM 苯甲脒盐酸盐和 20 mM cAMP)和 50-75 ml 含有 1 M 氯化钠的缓冲液 E 洗脱所述酶。合并 PDE 活性峰, 用硫酸铵(0.4 g/ml 酶合并液)沉淀, 以便去除过量的环核苷酸。将沉淀蛋白重悬于缓冲液 X (25 mM MOPS pH 7.5, 5 µM 硫酸锌, 50 mM 氯化钠, 1 mM DTT 和 1 mM 苯甲脒盐酸盐)中, 并且按照生产商的说明, 通过在 Pharmacia PD-10®柱上凝胶过滤将其脱盐。将该酶合并液对含有 50%甘油的缓冲液 X 透析过夜。将所述酶在干冰/乙醇浴中快速冷冻, 然后于 -70°C 保存。

通过 SDS-PAGE, 所得制剂的纯度约 > 90%。这些制剂水解 cAMP 的比活约 10-50 µmol cAMP/每分钟/毫克蛋白。

用酿酒酵母制备 PDE4C

在室温下，通过与 100 ml 玻璃珠(0.5 mM, 酸洗)和 150 ml 裂解缓冲液(50 mM MOPS pH 7.2, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM 苯甲脒盐酸盐, 各 5 μ g/ml 的抑胃酶肽、亮抑蛋白酶肽、抑蛋白酶肽、钙蛋白酶抑制剂 I 和 II)混合, 解冻酵母细胞(150 g 带有 HDUN3.48 的酵母菌株 YI30)。将所述混合物冷却至 4 $^{\circ}$ C, 转移到 BEAD-BEATER[®] 中并且快速混合 6 个循环(每个循环 30 秒)使所述细胞裂解。在 Beckman J2-21M 离心机中, 使用 JA-10 转子, 将所述匀浆于 4 $^{\circ}$ C 以 9,000 rpm 离心 22 分钟。回收上清液, 并且在 Beckman XL-80 超速离心机中, 使用 TI45 转子, 将其于 4 $^{\circ}$ C 以 36,000 rpm 离心 45 分钟。

回收上清液, 通过加入固体硫酸铵(0.26 g/ml 上清液), 同时在冰浴中搅拌并且维持 pH 在 7.0-7.5 的范围内, 沉淀 PDE4C。30 分钟后, 在 Beckman J2 离心机中, 使用 JA-10 转子, 将该混合物以 9,000 rpm (12,000 X g)离心 22 分钟。弃去上清液, 将沉淀溶于 200 ml 缓冲液 A (50 mM MOPS pH 7.5, 5 mM 氯化镁, 1 mM DTT, 2 mM 苯甲脒盐酸盐, 以及各 5 μ g/ml 的亮抑蛋白酶肽、抑胃酶肽和抑蛋白酶肽)中。将 pH 和电导率分别校正为 7.5 和 15-20 mS。

将所述重悬浮样品上样到在缓冲液 A 中平衡的 1.6 x 20 cm Sigma Cibacron Blue Agarose-300 型柱(25ml)中。将所述样品在 12 个小时内循环通过所述柱 4-6 次。依次用 125-250 ml 缓冲液 A、125-250 ml 含有 1.5 M 氯化钠的缓冲液 A 和 25-50 ml 缓冲液 A 洗涤所述柱子。用 50-75 ml 缓冲液 E (50 mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA, 2mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM 苯甲脒盐酸盐和 20 mM cAMP)和 50-75 ml 含有 1 M 氯化钠的缓冲液 E 洗脱所述酶。合并 PDE4C 活性峰, 用硫酸铵(0.4 g/ml 酶合并液)沉淀, 以便去除过量的环核苷酸。将沉淀蛋白重悬于缓冲液 X (25 mM MOPS pH 7.2, 5 μ M 硫酸锌, 50 mM 氯化钠, 1 mM DTT 和 1 mM 苯甲脒盐酸盐)中, 并且按照生产商的说明, 经在 Pharmacia PD-10[®]柱上凝胶过滤将其脱盐。将该酶合并液对含有 50%甘油的缓冲

液 X 透析过夜。将所述酶在干冰/乙醇浴中快速冷冻，然后于-70℃保存。

通过 SDS-PAGE，所得制剂的纯度约> 80%。这些制剂水解 cAMP 的比活约 10-20 μmol cAMP/每分钟/毫克蛋白。

5

用酿酒酵母制备 PDE4D

在室温下，通过与 150 ml 玻璃珠(0.5 mM, 酸洗)和 150 ml 裂解缓冲液(50 mM MOPS pH 7.2, 10 μM 硫酸锌, 2 mM 氯化镁, 14.2 mM 2-巯基乙醇, 2 mM 苯甲脒盐酸盐, 各 5 μg/ml 的抑胃酶肽、亮抑蛋白酶肽、抑蛋白酶肽、钙蛋白酶抑制剂 I 和 II)混合，解冻酵母细胞(100 g 带有 HDUN4.11 的酵母菌株 YI29)。将所述混合物冷却至 4℃，转移到 Bead-Beater® 中并且快速混合 6 个循环(每个循环 30 秒)使所述细胞裂解。在 Beckman J2-21M 离心机中，使用 JA-10 转子，将所述匀浆于 4℃ 以 9,000 rpm 离心 22 分钟。回收上清液，在 Beckman XL-80 超速离心机中，使用 TI45 转子，将其于 4℃ 以 36,000 rpm 离心 45 分钟。回收上清液，通过加入固体硫酸铵(0.33 g/ml 上清液)，同时在冰浴中搅拌并且维持 pH 在 7.0-7.5 的范围内，沉淀 PDE4D。30 分钟后，在 Beckman J2 离心机中，使用 JA-10 转子，将该混合物以 9,000 rpm (12,000 X g)离心 22 分钟。弃去上清液，将沉淀溶于 100 ml 缓冲液 A (50 mM MOPS pH 7.5, 10 μM 硫酸锌, 5 mM 氯化镁, 14.2 mM 2-巯基乙醇, 100 mM 苯甲脒盐酸盐, 以及各 5 μg/ml 的亮抑蛋白酶肽、抑胃酶肽、抑蛋白酶肽、钙蛋白酶抑制剂 I 和 II)中。将 pH 和电导率分别校正为 7.5 和 15-20 mS。

以流速 0.67 ml/min，将所述重悬浮样品上样到在缓冲液 A 中平衡的 1.6 x 20 cm Sigma Cibacron Blue Agarose-300 型柱(10 ml)中。依次用 50-100 ml 缓冲液 A、20-30 ml 含有 20 mM 5'-AMP 的缓冲液 A、50-100 ml 含有 1.5 M 氯化钠的缓冲液 A 和 10-20 ml 缓冲液 C (50 mM Tris HCl pH 8, 10 μM 硫酸锌, 14.2 mM 2-巯基乙醇, 2 mM 苯甲脒盐酸盐)洗涤

所述柱子。用 20-30 ml 含有 20 mM cAMP 的缓冲液 C 洗脱所述酶。

合并 PDE4D 活性峰，用硫酸铵(0.4 g/ml 酶合并液)沉淀，以便去除过量的环核苷酸。将沉淀蛋白重悬于缓冲液 X (25 mM MOPS pH 7.2, 5 μ M 硫酸锌, 50 mM 氯化钠, 1 mM DTT 和 1 mM 苯甲脒盐酸盐)中，
5 并且按照生产商的说明，通过在 Pharmacia PD-10[®]柱上凝胶过滤将其脱盐。将该酶合并液对含有 50%甘油的缓冲液 X 透析过夜。将所述酶的制剂在干冰/乙醇浴中快速冷冻，然后于-70 $^{\circ}$ C 保存。

通过 SDS-PAGE，所得制剂的纯度约 > 80%。该制剂水解 cAMP 的比活约 20-50 μ mol cAMP/每分钟/毫克蛋白。

10

脂多糖刺激的人外周血淋巴细胞释放 TNF α

为了评价化合物降低人外周血淋巴细胞(PBL)分泌 TNF α 的能力，进行以下试验。先前的研究已经证明，人 PBL 与 cAMP 升高的因子(例如前列腺素 E21、毛喉素、8-溴-cAMP 或二丁基-cAMP)一起孵育，
15 当用脂多糖(LPS, 内毒素)刺激时抑制所述细胞分泌 TNF α 。因此，已进行的初步实验证明，选择性 PDE4 抑制剂(例如咯利普兰)以依赖于剂量的方式抑制 LPS 诱导的人淋巴细胞分泌 TNF α 。因此，应用人 PBL TNF α 分泌量作为化合物升高细胞内 cAMP 浓度和/或抑制细胞内 PDE4 活性的能力的标准。

20

将取自人自愿者的肝素化血液(约 30 ml)以 1:1 与 Dulbecco 氏改进磷酸缓冲盐水混合。将该混合物以 1:1 与 HISTOPAQUE[®]混合，然后在 Beckman TJ6 型离心机的吊桶中，在室温下无需制动以 1,500 rpm 离心。红细胞离心后位于试管底部，血清保留在试管的表面。含有淋巴细胞的一层沉降在血清层和 HISTOPAQUE[®]层之间，通过抽吸将其取出，
25 置于一支新试管中。将该细胞定量并调至 3×10^6 细胞/ml，然后将 100 μ l 等份样品加到 96 孔板的各孔中。在加入细菌 LPS (25 mg/ml) 前 15 分钟，将试验化合物和 RPMI 培养基(Gibco/BRL Life Sciences)加到各种孔中。让混合物在湿润室中于 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 小时。然后在室温

下通过以 800 rpm 离心 5 分钟分离细胞。将 180 μ l 等份上清液转移到一个新的板上，用于测定 TNF α 的浓度。采用市售的酶联免疫测定 (ELISA) (CYTOSCREEN[®] 免疫测定试剂盒, Biosource International), 测定细胞上清液中的 TNF α 蛋白。

- 5 基于细胞的测定提供了以下本发明的各种吡咯烷化合物的结果。EC₅₀ 值(即能够抑制 50% 总 TNF α 的化合物有效浓度)说明本发明化合物抑制 LPS 刺激的人 PBL 释放 TNF α 的能力。

下表说明了式(II)化合物抑制体外 PDE4 活性和释放 TNF α 的能力。在下表中，确定了抑制人重组 PDE4 的 IC₅₀ 值。

实施例 编号 ¹⁾	PDE4 IC ₅₀ (M × 10 ⁻⁸)	PBL/TNFα EC ₅₀ (M × 10 ⁻⁸)
1	1400.0	775.5
2	28.5	142.0
3	3184.1	
4	3091.7	
5	2513.9	
6	506.5	730.0
7	57.0	52.5
8	673.2	1562.3
9	57.5	608.7
10	2951.1	
11	27,050.7	
12	14,695.9	
13	2436.0	
14	529.2	598.2
15	8967.0	
16	9075.7	
17	8663.4	
18	7392.7	
19	51.7	59.0
20	22.0	198.3
21	2204.7	
22	5888.2	
23	7549.3	
24	22.9	76.5
25	53.0	85.5
26	235.1	450.0
27	479.3	816.0
28	590.9	1392.0

上述数据说明, 本发明化合物为有效的 PDE4 抑制剂, 例如所述化合物对人重组 PDE4 的 IC_{50} 为约 700 pM 至约 15 μ M。优选化合物的 IC_{50} 为约 100 nM 或以下, 特别优选化合物的 IC_{50} 为约 50 nM 或以下。

同样, 优选的化合物的 PBL/TNF α EC_{50} 为约 500 nM 或以下, 最好是约 200 nM 或以下。更优选的化合物的 PBL/TNF α 为约 100 nM 或以下。

为获得本发明的全部优点, 所述化合物对人重组 PDE4 的 IC_{50} 为约 100 μ M 或以下, PBL/TNF α EC_{50} 为约 500 μ M 或以下。更优选的是, 所述化合物的 IC_{50} 为约 50 nM 或以下, PBL/TNF α EC_{50} 为约 100 nM 或以下。

动物模型

内毒素刺激的小鼠释放 TNF α 和运动能力联合测定

该项研究的目的是为了测定 PDE4 抑制剂在 LPS 小鼠模型中的体内作用, 以及测定表现为固有运动能力减少的中枢神经系统(CNS)副作用。

试验动物为雌性 Balb/c 小鼠, 平均体重约 20 g。以剂量为 0.1 mg/kg、1.0 mg/kg、10.0 mg/kg 和 100 mg/kg, 通过腹膜内(i.p.)注射给予配制在 30% Cremophor[®] EL 中的 PDE4 抑制剂。根据所测量的体重, 调整各种剂量体积(约 150 μ l)。1 小时后, 将 5 mg/kg LPS (终体积 200 μ l) 通过尾静脉注射到每只动物体内。LPS 处理后 90 分钟, 将动物放血, 收集血清样品, 然后于 -70 $^{\circ}$ C 贮存待用于测定。

对于效果测定, 将该血清样品稀释 2 倍, 采用 CYTOSCREEN[®] 免疫测定试剂盒(Biosource International), 测定 TNF α 水平。每种试验化合物有三个复份, 数据为三个复份样品的平均值。

X-Y 平面的运动或后腿直立(rearing up on the hind legs)次数通过对每单位时间内“光束”交叉次数进行计数来对其定量。活动事件次数的减少与该动物的运动能力或不活动成正比。定量计分与上述客观

测量有很好的相关性。

下表概述了通过上述方法获得的小鼠运动能力测定(运动性, %活动)结果:

实施例编号 ¹⁾	运动能力(50 mg/kg 剂量时的%活动)
7	16%
9	55%
19	145%
20	93%

5

还确定了,与咯利普兰和 Feldman 等的美国专利号 5,665,754 中公开的化合物相比,式(II)化合物的中枢神经系统副作用较低。还发现中枢神经系统活性与本发明化合物的绝对立体化学有关。

10 以上总结的结果表明,本发明的化合物可用于选择性地抑制哺乳动物体内的 PDE4 活性,而没有与在先 PDE4 抑制剂有关的不利的中枢神经系统作用和催吐作用。

显然,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,可以对本文以上提出的本发明内容作各种修改和变化,因此,本发明只受所附权利要求书的限制。