[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680048349.6

[51] Int. Cl.
C07D 231/38 (2006.01)
C07D 231/40 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01)
A61K 31/4155 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 1 月 7 日

[11] 公开号 CN 101341128A

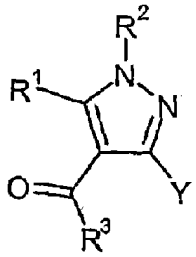
[22] 申请日 2006.12.21
[21] 申请号 200680048349.6
[30] 优先权
[32] 2005.12.23 [33] SE [31] 0502908 - 7
[86] 国际申请 PCT/SE2006/001461 2006.12.21
[87] 国际公布 WO2007/073297 英 2007.6.28
[85] 进入国家阶段日期 2008.6.20
[71] 申请人 阿斯利康（瑞典）有限公司
地址 瑞典南泰利耶
[72] 发明人 U·鲍尔
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 关立新 李连涛
权利要求书 10 页 说明书 25 页

[54] 发明名称

用于治疗 GERD 和 IBS 的吡唑

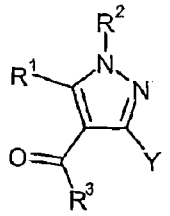
[57] 摘要

本发明涉及新的具有正变构 $GABA_B$ 受体(GBR)调节剂作用的吡唑衍生物，制备所述化合物的方法，以及它们任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在抑制暂时性食管下端括约肌松弛、治疗胃食管反流疾病、以及治疗功能性胃肠障碍和肠易激惹综合征(IBS)中的应用。该化合物由通式(I)表示，其中 R^1、R^2、R^3 和 Y 如说明书所定义。例如，R^1 可以是氢或烷基，R^2 可以是氢或烷基，R^3 可以是烷氧基，和 Y 可以是与含有芳基的取代基相连的羰基氨基。



(I)

1. 通式（I）的化合物：



(I)

其中

R^1 表示 C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；或 C_3-C_{10} 环烷基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基，C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、SO_3R^7、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^1 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基，巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代，其中在所定义的 R^1 中使用的任何芳基或杂芳基可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基取代，其中所述 C_1-C_{10} 烷基可进一步被一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^2 表示氢、C_1-C_6 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基；任选被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^2 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基，巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

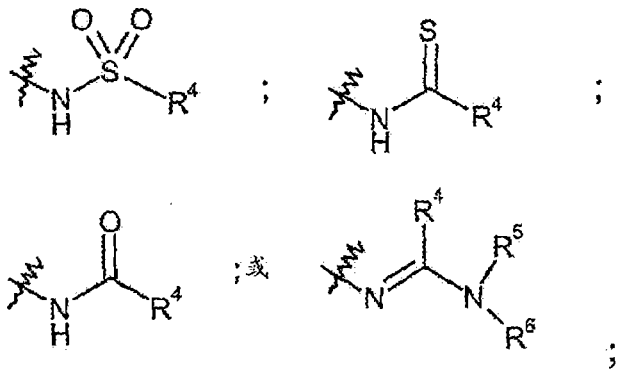
R^3 表示 C_1-C_{10} 烷氧基，任选被一个或多个 C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^3 表示 C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；或 C_1-C_{10} 环烷基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^3 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基，硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^3 表示氨基，任选被 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基或 C_3-C_{10} 环烷基单或双取代；

Y 表示



R^4 表示 C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；C_1-C_{10} 烷氧基；或 C_3-C_{10} 环烷基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、COR^{10}、腈、$SO_2NR^8R^9$、SO_2R^{11}、$NR^8SO_2R^9$、$NR^8C{=}ONR^9$、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^4 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、$SO_2NR^8R^9$、$NR^8SO_2R^9$、SO_3R^7、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代，其中在所定义的 R^4 中使用的所述芳基或杂芳基可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基取代，其中所述 C_1-C_{10} 烷基可进一步被一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^5 表示氢、C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；或 C_3-C_{10} 环烷

基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^5 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^6 表示氢、C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；或 C_3-C_{10} 环烷基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^6 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

或 R^5 和 R^6 一起形成包括 3 至 7 个选自 C、N 和 O 的原子的环，其中所述环任选被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、酮基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^7 各自独立地表示 C_1-C_{10} 烷基；

R^8 各自独立地表示氢、C_1-C_{10} 烷基、芳基或杂芳基，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基取代；

R^9 各自独立地表示氢、C_1-C_{10} 烷基、芳基或杂芳基，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基取代；

R^{10} 各自独立地表示 C_1-C_{10} 烷基，任选被芳基或杂芳基取代，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基取代；

R^{11} 表示 C_1-C_{10} 烷基，芳基或杂芳基，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、或 C_1-C_{10}

硫代烷氧基取代;

其中烷基、烯基、炔基和环烷基可各自独立地具有一个或多个可替换为 O、N 或 S 的碳原子;其中没有一个 O、N 或 S 位于与任何其他 O、N 或 S 邻近的位置;

其中烷基、烯基、炔基、烷氧基和环烷基可各自独立地具有一个或多个被氟代替的碳原子;

以及其药学上和药理学上可接受的盐,式(I)化合物的对映异构体及其盐;

以下除外:

吡唑-4-羧酸,3-苯甲酰氨基-1,5-二苯基-,乙酯和 2-丙烯酰胺,N-(4-乙酰基-5-甲基-1H-吡唑-3-基)-3-苯基-。

2. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R^1 表示 C_1-C_4 烷基,其任选被一个芳基或两个杂芳基取代。

3. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R^1 表示芳基,任选被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、SO_3R^7、卤素、羟基,巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代。

4. 根据权利要求 3 的化合物,其中 R^1 表示未被取代的苯基。

5. 根据权利要求 1-4 任一项的化合物,其中 R^2 表示 C_1-C_4 烷基。

6. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R^1 和 R^2 形成由 5 或 6 个选自 C、O 或 N 的原子组成的环。

7. 根据权利要求 1-6 任一项的化合物,其中 R^3 表示 C_1-C_4 烷氧基,任选被一个或多个 C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^8$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代。

8. 根据权利要求 1-6 任一项的化合物,其中 R^3 表示 C_1-C_{10} 烷基,任选被一个或多个 C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代。

9. 根据权利要求 1-8 任一项的化合物,其中 R^4 表示 C_1-C_7 烷基、C_2-C_7 烯基、C_2-C_7 炔基或 C_3-C_7 环烷基,任选被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧

基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、酰胺、磺酰胺、脲、或一个或两个芳基或杂芳基取代，其中在所定义的 R^4 中使用的任何芳基或杂芳基可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基取代，其中所述 C_1-C_{10} 烷基可进一步被一个或两个芳基或杂芳基取代。

10. 根据权利要求 9 的化合物，其中 R^4 表示 C_1-C_4 烷基，任选被一个或两个芳基或杂芳基取代。

11. 根据权利要求 9 的化合物，其中 R^4 表示 C_1-C_4 烷基，被一个或两个芳基或杂芳基取代。

12. 根据权利要求 1-8 任一项的化合物，其中 R^4 表示芳基或杂芳基，任选被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或一个或两个芳基或杂芳基取代。

13. 根据权利要求 1-12 任一项的化合物，其中 R^5 表示 C_{1-4} 烷基。

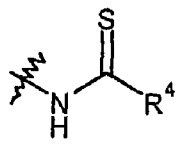
14. 根据权利要求 13 的化合物，其中 R^5 表示甲基。

15. 根据权利要求 1-14 任一项的化合物，其中 R^6 表示 C_{1-4} 烷基。

16. 根据权利要求 15 的化合物，其中 R^6 表示甲基。

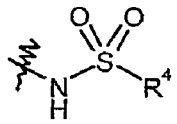
17. 根据权利要求 1-12 任一项的化合物，其中 R^5 和 R^6 形成由 5 或 6 个选自 C、O 或 N 的原子组成的环。

18. 根据权利要求 1-12 任一项的化合物，其中 Y 表示



。

19. 根据权利要求 1-12 任一项的化合物，其中 Y 表示



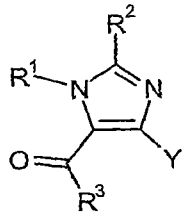
。

20. 根据权利要求 1 的化合物，选自：

乙基 3-[（2,3-二氢-1,4-苯并二氧芑-2-基羰基）氨基]-1-乙基-1*H*-吡唑-4-羧酸酯和乙基 1-乙基-3-[（2-苯基丁酰基）氨基]- 1*H*-吡唑-4-羧酸酯。

21. 药物组合物，包括根据权利要求 1-20 任一项的化合物和药学上可接受的载体和稀释剂。

22. 用于治疗的通式（I）的化合物：



(I)

其中

R^1 表示 C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；或 C_3-C_{10} 环烷基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基，C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、SO_3R^7、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^1 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基，巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代，其中在所定义的 R^1 中使用的任何芳基或杂芳基可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基取代，其中所述 C_1-C_{10} 烷基可进一步被一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^2 表示氢、C_1-C_6 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基；任选

被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^2 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基，巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

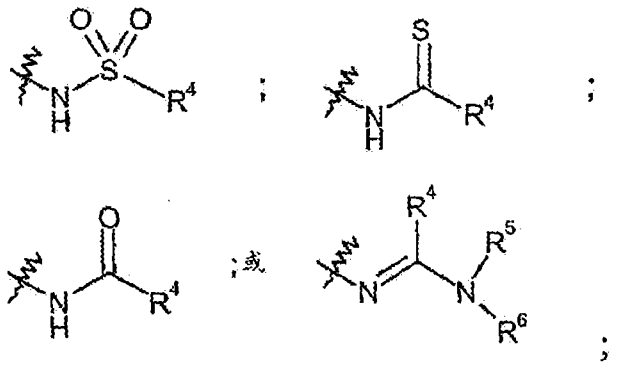
R^3 表示 C_1-C_{10} 烷氧基，任选被一个或多个 C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^3 表示 C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；或 C_1-C_{10} 环烷基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^3 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基，硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^3 表示氨基，任选被 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基或 C_3-C_{10} 环烷基单或双取代；

Y 表示



R^4 表示 C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；C_1-C_{10} 烷氧基；或 C_3-C_{10} 环烷基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、

CO_2R^{10}、COR^{10}、腈、$SO_2NR^8R^9$、SO_2R^{11}、$NR^8SO_2R^9$、$NR^8C{=}ONR^9$、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^4表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、$SO_2NR^8R^9$、$NR^8SO_2R^9$、SO_3R^7、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代，其中在所定义的R^4中使用的所述芳基或杂芳基可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基或C_1-C_{10}硫代烷氧基取代，其中所述C_1-C_{10}烷基可进一步被一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^5表示氢、C_1-C_{10}烷基；C_2-C_{10}烯基；C_2-C_{10}炔基；或C_3-C_{10}环烷基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷氧基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^5表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^6表示氢、C_1-C_{10}烷基；C_2-C_{10}烯基；C_2-C_{10}炔基；或C_3-C_{10}环烷基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷氧基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^6表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

或R^5和R^6一起形成包括3至7个选自C、N和O的原子的环，其中所述环任选被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、酮基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^7各自独立地表示C_1-C_{10}烷基；

R^8各自独立地表示氢、C_1-C_{10}烷基、芳基或杂芳基，其中所述芳

基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基、或 C_1-C_{10}硫代烷氧基取代；

R^9各自独立地表示氢、C_1-C_{10}烷基、芳基或杂芳基，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基、或 C_1-C_{10}硫代烷氧基取代；

R^{10}各自独立地表示 C_1-C_{10}烷基，任选被芳基或杂芳基取代，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基、或 C_1-C_{10}硫代烷氧基取代；

R^{11}表示 C_1-C_{10}烷基，芳基或杂芳基，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基、或 C_1-C_{10}硫代烷氧基取代；

其中烷基、烯基、炔基和环烷基可各自独立地具有一个或多个可替换为 O、N 或 S 的碳原子；其中没有一个 O、N 或 S 位于与任何其他 O、N 或 S 邻近的位置；

其中烷基、烯基、炔基、烷氧基和环烷基可各自独立地具有一个或多个被氟代替的碳原子；

以及其药学上和药理学上可接受的盐，式（I）化合物的对映异构体及其盐。

23. 如权利要求 1-20 任一项或权利要求 22 所定义的化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合在制备用于治疗胃食管反流疾病(GERD)的药物中的应用。

24. 如权利要求 1-20 任一项或权利要求 22 所定义的化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合在制备用于预防反流的药物中的应用。

25. 如权利要求 1-20 任一项或权利要求 22 所定义的化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合在制备用于抑制暂时性食管下端括约肌松弛(TLESRs)的药物中的应用。

26. 如权利要求 1-20 任一项或权利要求 22 所定义的化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合在制备用于治疗功能性胃肠道障碍的药物中的应用。

27. 根据权利要求 26 的应用，其中所述功能性胃肠障碍是功能性消化不良。

28. 如权利要求 1-20 任一项或权利要求 22 所定义的化合物，任

选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合在用于治疗肠易激综合征(IBS)的药物中的应用。

29. 根据权利要求 28 的应用，其中所述 IBS 是便秘为主的 IBS。

30. 根据权利要求 28 的应用，其中所述 IBS 是腹泻为主的 IBS。

31. 根据权利要求 28 的应用，其中所述 IBS 是交替肠运动为主的 IBS。

32. 治疗胃食管反流疾病(GERD)的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的如权利要求 1-20 任一项或权利要求 22 所定义的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

33. 治疗功能性胃肠道障碍的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的如权利要求 1-20 任一项或权利要求 22 所定义的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

34. 治疗肠易激综合征(IBS)的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的如权利要求 1-20 任一项或权利要求 22 所定义的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

用于治疗 GERD 和 IBS 的吡唑

技术领域

本发明涉及新的具有正变构 $GABA_B$ 受体(GBR)调节剂作用的化合物，制备所述化合物的方法，以及它们在抑制暂时性食管下端括约肌松弛、治疗胃食管反流疾病、以及治疗功能性胃肠障碍和肠易激惹综合征(IBS)中的应用。

背景技术

食管下端括约肌(LES)易于间歇性松弛。因而，由于在那时机械屏障暂时性消失，使得胃中的流体能够进入食管，从而发生下文中称为“反流”的现象。

胃食管反流疾病(GERD)是最为普遍的上胃肠道疾病。目前的药物疗法目的在于减少胃酸分泌，或者中和食管中的酸. 现已认为反流的主要机理取决于低渗的食管下端括约肌. 然而，最近的研究(例如，*Holloway & Dent (1990) Gastroentero1. Clin. N. Amer. 19, PP.517-535*)已经表明大多数的反流事件发生于暂时性食管下端括约肌松弛(TLESR)期间，即该松弛不是由吞咽引发的。还已发现经常性的胃酸分泌在患有 GERD 的患者中是正常的。

因此，需要一种治疗方法以降低 TLESR 的发病率，并由此预防反流。

现已发现 $GABA_B$-受体激动剂能够抑制 TLESR，这点在 WO98／11885 A1 中已经得到了公开。

$GABA_B$ 受体激动剂

GABA(4-氨基丁酸)是一种中枢和外周神经系统的内源性神经递质。通常将 GABA 受体分为 $GABA_A$ 和 $GABA_B$ 受体亚型。$GABA_B$ 受体属于 G-蛋白偶联受体(GPCRs)超家族。

研究最多的 $GABA_B$ 受体激动剂巴氯芬(4-氨基-3-(对氯苯基)丁酸；公开于 CH 449046 中)用作解痉药。EP 356128 A2 描述了 $GABA_B$ 受体激动剂(3-氨基丙基)甲基次膦酸在治疗中的应用，特别是在治疗中枢神

经系统障碍中的应用。

EP 463969 A1 和 FR 2722192 A1 公开了在丁基链的 3-碳上具有不同杂环取代基的 4-氨基丁酸衍生物。EP 181833 AI 公开了与 $GABA_B$ 受体位点有高度亲和力的取代的 3-氨基丙基次膦酸。EP 399949 A1 公开了(3-氨基丙基)甲基次膦酸的衍生物，它们被描述为有效的 $GABA_B$ 受体激动剂。在 WO 01／41743 A1 和 WO 01／42252 A1 中还分别公开了其他的(3-氨基丙基)甲基次膦酸和(3-氨基丙基)次膦酸. 在 *J. Med. Chem. (1995)，38，3297-3312* 中讨论了几种次膦酸类似物关于它们与 $GABA_B$ 受体亲和力的构效关系。在 *Bioorg. &Med. Chem. Lett. (1998)，8，3059-3064* 中讨论了亚磺酸类似物及其 $GABA_B$ 受体活性。关于 $GABA_B$ 配体更为综合性的描述可参见 *Curr. Med. Chem.-Central Nervous System Agents(2001)，1，27-42*。

$GABA_B$ 受体的正变构调节

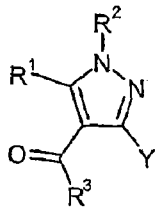
已公开了 2,6-二叔丁基-4-(3-羟基-2,2-二甲基丙基)苯酚(CGP7930)和 3-(3,5-二叔丁基-4-羟基苯基)-2,2-二甲基丙醛(公开于 US 5,304,685 中)能够对天然和重组的 $GABA_B$ 受体活性产生正变构调节(*Society for Neuroscience，30th Annual Meeting，New Orleans，La.，Nov，4-9，2000: Positive Allosteric Modulation of Native and Recombinant $GABA_B$ Receptor Activity，S. Urwyler 等; Molecular Pharmacol.(2001)，60，963-971*)。

已描述了 N,N-二环戊基-2-甲基硫烷基(sulfanyl)-5-硝基-嘧啶-4,6-二胺能够对 $GABA_B$ 受体产生正变构调节(The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics，307(2003)，322-330)。

最近有关 GPCR 变构调节的综述可参见：*Expert Opin. Ther. Patents(2001)，11，1889-1904*。

发明概述

本发明提供了通式（I）的化合物:



(I)

其中

R^1 表示 C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；或 C_3-C_{10} 环烷基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基，C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、SO_3R^7、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^1 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基，巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代，其中在所定义的 R^1 中使用的任何芳基或杂芳基可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基取代，其中所述 C_1-C_{10} 烷基可进一步被一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^2 表示氢、C_1-C_6 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基；任选被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^2 表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基，巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^3 表示 C_1-C_{10} 烷氧基，任选被一个或多个 C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

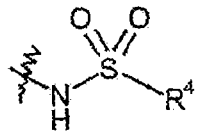
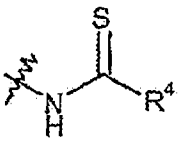
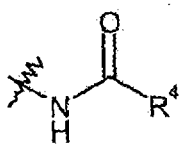
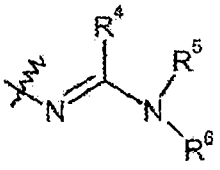
R^3 表示 C_1-C_{10} 烷基；C_2-C_{10} 烯基；C_2-C_{10} 炔基；或 C_1-C_{10} 环烷基，任选各自被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、

腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^3表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基，硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^3表示氨基，任选被C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基或C_3-C_{10}环烷基单或双取代；

Y表示


；

；

；或

；

R^4表示C_1-C_{10}烷基；C_2-C_{10}烯基；C_2-C_{10}炔基；C_1-C_{10}烷氧基；或C_3-C_{10}环烷基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷氧基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、COR^{10}、腈、$SO_2NR^8R^9$、SO_2R^{11}、$NR^8SO_2R^9$、$NR^8C{=}ONR^9$、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；或

R^4表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、$SO_2NR^8R^9$、$NR^8SO_2R^9$、SO_3R^7、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代，其中在所定义的R^4中使用的所述芳基或杂芳基可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基或C_1-C_{10}硫代烷氧基取代，其中所述C_1-C_{10}烷基可进一步被一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^5表示氢、C_1-C_{10}烷基；C_2-C_{10}烯基；C_2-C_{10}炔基；或C_3-C_{10}环烷基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷氧基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^5表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^6表示氢、C_1-C_{10}烷基；C_2-C_{10}烯基；C_2-C_{10}炔基；或C_3-C_{10}环烷基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷氧基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^6表示芳基或杂芳基，任选各自被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

或R^5和R^6一起形成包括3至7个选自C、N和O的原子的环，其中所述环任选被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、酮基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈，或者一个或两个芳基或杂芳基取代；

R^7各自独立地表示C_1-C_{10}烷基；

R^8各自独立地表示氢、C_1-C_{10}烷基、芳基或杂芳基，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基、或C_1-C_{10}硫代烷氧基取代；

R^9各自独立地表示氢、C_1-C_{10}烷基、芳基或杂芳基，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基、或C_1-C_{10}硫代烷氧基取代；

R^{10}各自独立地表示C_1-C_{10}烷基，任选被芳基或杂芳基取代，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基、或C_1-C_{10}硫代烷氧基取代；

R^{11}表示C_1-C_{10}烷基，芳基或杂芳基，其中所述芳基或杂芳基任选可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烷氧基、或C_1-C_{10}硫代烷氧基取代；

其中烷基、烯基、炔基和环烷基可各自独立地具有一个或多个可替换为O、N或S的碳原子；其中没有一个O、N或S位于与任何其

他 O、N 或 S 邻近的位置;

其中烷基、烯基、炔基、烷氧基和环烷基可各自独立地具有一个或多个被氟代替的碳原子;

以及其药学上和药理学上可接受的盐，式（I）化合物的对映异构体及其盐;

以下除外:

吡唑-4-羧酸，3-苯甲酰氨基-1,5-二苯基-，乙酯和 2-丙烯酰胺，N-（4-乙酰基-5-甲基-1H-吡唑-3-基）-3-苯基-。

在本发明的一个实施方案中，R^1 表示 C_1-C_4 烷基，其任选被一个芳基或两个杂芳基取代。

在本发明的另一个实施方案中，R^1 表示芳基，任选被一个或多个 C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、SO_3R^7、卤素、羟基，巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代。

根据本发明的另一个实施方案，R^1 表示未被取代的苯基。

在本发明的一个进一步的实施方案中，R^2 表示 C_1-C_4 烷基。

在本发明的又一个进一步的实施方案中，R^1 和 R^2 形成由 5 或 6 个选自 C、O 或 N 的原子组成的环。

在本发明的一个实施方案中，R^3 表示 C_1-C_4 烷氧基，任选被一个或多个 C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^8$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代。

根据本发明的又一个实施方案，R^3 表示 C_1-C_{10} 烷基，任选被一个或多个 C_1-C_{10} 硫代烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、酮基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或者一个或两个芳基或杂芳基取代。

在本发明另一个实施方案中，R^4 表示 C_1-C_7 烷基、C_2-C_7 烯基、C_2-C_7 炔基或 C_3-C_7 环烷基，任选被一个或多个 C_1-C_{10} 烷氧基、C_3-C_{10} 环烷基、C_1-C_{10} 硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、酰胺、磺酰胺、脲、或一个或两个芳基或杂芳基取代，其中在所定义的 R^4 中使用的任何芳基或杂芳基可进一步被一个或多个卤素、C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烷氧基或 C_1-C_{10} 硫代烷氧基取代，其中所述

C_1-C_{10}烷基可进一步被一个或两个芳基或杂芳基取代。

在本发明又一个实施方案，R^4表示C_1-C_4烷基，任选被一个或两个芳基或杂芳基取代。

在苯发明一个进一步的实施方案中，R^4表示C_1-C_4烷基，被一个或两个芳基或杂芳基取代。

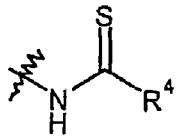
在本发明又一个进一步的实施方案，R^4表示芳基或杂芳基，任选被一个或多个C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_3-C_{10}环烷基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{10}硫代烷氧基、卤素、羟基、巯基、硝基、羧酸、$CONR^8R^9$、NR^8COR^9、CO_2R^{10}、腈、或一个或两个芳基或杂芳基取代。

根据本发明的一个实施方案，R^5表示C_{1-4}烷基。根据本发明的又一个实施方案，R^5表示甲基。

在本发明的另一个实施方案中，R^6表示C_{1-4}烷基。在本发明又一个实施方案中，R^6表示甲基。

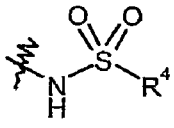
根据本发明的另一个实施方案，R^5和R^6形成由5或6个选自C、O或N的原子组成的环。

根据本发明的又一个实施方案，Y表示



。

根据本发明的一个进一步的实施方案，Y表示



。

本发明还涉及根据权利要求1的化合物，选自：

乙基 3-[（2,3-二氢-1,4-苯并二氧芑（benzodioxin）-2-基羰基）氨基]-1-乙基-1*H*-吡唑-4-羧酸酯和乙基 1-乙基-3-[（2-苯基丁酰基）氨基]-

1*H*-吡唑-4-羧酸酯。

以上式（I）化合物可用作正变构 $GABA_B$ 受体调节剂以及激动剂。

以上式（I）化合物的分子量通常在 300g/mol 至 700g/mol 的范围内。

应该理解本发明还涉及式（I）化合物的任何和全部互变异构形式。

式（I）的定义中使用的常用术语具有以下含义:

C_1-C_{10} 烷基是具有 1-10 个碳原子的直链或支链的烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基或庚基。烷基可以包含一个或多个选自 O、N 和 S 的杂原子，即一个或多个碳原子可以被此类杂原子取代. 此类基团的实例是甲基-乙基醚、甲基-乙基胺和甲基-硫代甲基。烷基可形成环的一部分。烷基的一个或多个氢原子可以被氟原子取代。

C_1-C_4 烷基是具有 1-4 个碳原子的直链或支链的烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基。烷基可以包含一个或多个选自 O、N 和 S 的杂原子，即一个或多个碳原子可以被此类杂原子取代。此类基团的实例是甲基-乙基醚、甲基-乙基胺和甲基-硫代甲基。烷基可形成环的一部分。烷基的一个或多个氢原子可以被氟原子取代。

C_2-C_{10} 烯基是具有 2-10 个碳原子的直链或支链的烯基，例如乙烯基、异丙烯基和 1-丁烯基。烯基可包含一个或多个选自 O、N 和 S 的杂原予，即一个或多个碳原子可以被此类杂原子取代。烯基的一个或多个氢原子可以被氟原子取代。

C_2-C_{10} 炔基是具有 2-10 个碳原子的直链或支链的炔基，例如乙炔基、2-丙炔基和丁-2-炔基。炔基可包含一个或多个选自 O、N 和 S 的杂原子，即一个或多个碳原子可以被此类杂原子取代。炔基的一个或多个氢原子可以被氟原子取代。

C_3-C_{10} 环烷基是具有 3-10 个碳原子的环烷基，例如环丙基、环丁基、环戊基或环己基。环烷基也可以是未饱和的。环烷基可以具有一个或多个选自 O、N 和 S 的杂原子，即一个或多个碳原子可以被此类杂原子取代。环烷基的一个或多个氢原子可以被氟原子取代。

C_1-C_{10} 烷氧基是具有 1-10 个碳原子的烷氧基，例如甲氧基、乙氧

基、正丙氧基、正丁氧基、异丙氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基或庚氧基。烷氧基可以是环状的，部分未饱和的或未饱和的，例如丙烯氧基或环戊氧基。烷氧基可以是芳族的，例如苯甲氧基或苯氧基。

C_1-C_{10}硫代烷氧基是具有 1-10 个碳原子的硫代烷氧基，例如硫代甲氧基、硫代乙氧基、正硫代丙氧基、正硫代丁氧基、硫代异丙氧基、硫代异丁氧基，仲硫代丁氧基、叔硫代丁氧基、硫代戊氧基、硫代己氧基或硫代庚氧基。硫代烷氧基可以是未饱和的，例如硫代丙烯氧基或者是芳族的，例如硫代苯甲氧基或硫代苯氧基。

本文中的术语“芳基”被定义为具有 6-14 个碳原子的芳环，其包含单环或多环化合物，例如苯基、苯甲基或萘基。多环是饱和的，部分未饱和或饱和的。

本文中的术语“杂芳基”被定义为具有 3-14 个碳原子的包含单环和多环化合物两者的芳族环，其中一个或几个环原子是氧、氮或硫，例如呋喃基、噻吩基或咪唑并吡啶。多环是饱和的，部分未饱和或饱和的。

本文中使用的卤素选自氯、氟、溴或碘。

本文中的术语“酮基”被定义为与碳原子双键结合的二价氧原子。碳原子位于邻近于与二价氧键合的碳原子处。

当式（I）化合物具有至少一个不对称碳原子时，它们能够存在几种立体化学形式。本发明包括了异构体的混合物以及单独的立体异构体。本发明进一步包括几何异构体、旋转异构体、对映异构体、外消旋体和非对映体。

在应用时，式（I）化合物可以是中性形式，例如羧酸，或者是盐的形式，优选药学上可接受的盐。例如所述化合物的钠盐、钾盐、铵盐、钙盐或镁盐。

式（I）化合物可用作正变构 GBR($GABA_B$ 受体)调节剂。正变构 $GABA_B$ 受体调节剂被定义为一种通过与 $GABA_B$ 受体蛋白在不同于内源性配体所使用的位点上相结合，从而能够使 $GABA_B$ 受体对 GABA 和 $GABA_B$ 受体激动剂更为敏感的化合物。正变构 GBR 调节剂与激动剂产生协同作用，从而增加了 $GABA_B$ 受体激动剂的效能和／或内在效力。还显示正变构 $GABA_B$ 受体调节剂能够产生激动作用。因此，式（I）

化合物能够有效用作完全激动剂或部分激动剂。

本发明的进一步的方面是用于治疗的式（I）的化合物。

由于施用了正变构调节剂而使得 $GABA_B$ 受体对 $GABA_B$ 受体激动剂更为敏感，因此观察到 $GABA_B$ 激动剂对暂时性食管下端括约肌松弛(TLESR)的抑制作用增强。因而本发明涉及式（I）的正变构 $GABA_B$ 受体调节剂，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于抑制暂时性食管下端括约肌松弛(TLESRs)的药物中的应用。

本发明的一个进一步的方面是式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于预防反流的药物中的应用。

本发明的另一个进一步的方面是式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗胃食管反流疾病(GERD)的药物中的应用。

对婴儿中的回流进行有效治疗将是预防以及治疗由反流的胃内容物的吸入引起的肺部疾病，以及治疗发育停滞，尤其是摄入的营养物的过量损失引起的发育停滞的一个重要途径。因此，本发明的另一个方面是式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗肺部疾病的药物中的应用。

本发明的另一个方面是（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗发育停滞的药物中的应用。

本发明的另一个方面是（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗或预防哮喘，例如与反流有关的哮喘的药物中的应用。

本发明的一个进一步的方面是（I）化合物，任选与 GABAB 受体激动剂组合，在制备用于治疗或预防喉炎或慢性喉炎的药物中的应用。

本发明的一个进一步的方面是抑制暂时性食管下端括约肌松弛(TLESRs)的方法，由此给需要这种抑制的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的另一个方面是预防反流的方法，由此给需要这种预防的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的又一个进一步的方面是治疗胃食管反流疾病(GERD)的方

法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的另一个方面是治疗或预防回流的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式(I)化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的又一个方面是治疗或预防婴儿中回流的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的又一个进一步的方面是治疗、预防或抑制肺部疾病的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。所治疗的肺部疾病尤其是由反流的胃内容物的吸入引起的。

本发明的又一个进一步的方面是治疗发育停滞的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的一个进一步的方面是治疗或预防哮喘，例如与反流有关的哮喘的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的一个进一步的方面治疗或预防喉炎或慢性喉炎的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的一个进一步的实施方案是式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗功能性胃肠道障碍(FGD)的药物中的应用。本发明的另一个方面是治疗功能性胃肠道障碍的方法，由此给患有所述病症的患者施用有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的一个进一步的实施方案是式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗功能性消化不良的药物中的应用。本发明的另一个方面是治疗功能性消化不良的方法，由此给患有所述病症的患者施用有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

功能性消化不良指的是集中于上腹部的疼痛或不适。不适的特征

在于上腹部发胀、早期过饱、胃气胀或恶心，或者不适可以与这些症状相组合。患有功能性消化不良的患者从病原学上可分为两类:

1-那些具有可确认的病理生理学或微生物学异常的患者，这些异常为不确定的临床关联性(例如幽门螺旋杆菌胃炎、组织十二指肠炎、胆结石、内脏过敏症、胃十二指肠蠕动障碍（dysmotility）)。

2-症状无法解释的患者。

功能性消化不良能通过以下所述进行诊断:

前 12 个月中的至少十二周出现如下情况，这些情况不必是连续的，

1-持续性或再发性消化不良(集中于上腹部的疼痛或不适)，以及

2-没有可能用于解释症状的器质性疾病迹象(包括上部内窥镜检查中出现的)，以及

3-没有迹象表明消化不良只能通过排便得到缓解，或伴随着发生排便频率或形式的变化.

功能性消化不良可根据特征性的症状模式分成几个亚型，例如溃疡样消化不良、蠕动障碍样消化不良以及未指定(非特异性)的消化不良。

当前，治疗功能性消化不良大多是根据经验并且直接缓解显著症状。最常使用的治疗方法还包括抗抑郁药。

本发明的一个进一步的方面是式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗或预防肠易激综合征(IBS)的药物中的应用，这些肠易激综合征例如便秘为主的 IBS，腹泻为主的 IBS 或交替肠运动为主的 IBS。

本发明的一个进一步的方面是治疗或预防肠易激综合征(IBS)的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

在本文 IBS 被定义为具有特定症状的慢性功能性障碍，它包括伴随有肠功能改变的持续性或复发性腹部疼痛和不适，其通常具有腹部气胀和腹胀. 一般根据主要的肠表现将 IBS 分成三个亚类:

1-腹泻为主的

2-便秘为主的

3-交替肠运动为主的。

腹部疼痛或不适是IBS的标志，其存在于三种亚类中。IBS症状现已根据Rome标准进行了分类，随后又按Rome II标准进行了修改。IBS症状表述中的这种一致性有助于在设计和评估IBS临床研究中实现意见一致。

Rome II诊断标准是:

1-在上年以内的至少 12 周中出现腹部疼痛或不适(不必是连续性的)

2-两种或两种以上的下列症状:

a)排便可以缓解

b)排便频率开始发生变化

c)粪便硬度开始发生变化

本发明的一个进一步的方面是式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗或预防CNS障碍，例如焦虑症的药物中的应用。

本发明的一个进一步的方面是治疗或预防CNS疾病，例如焦虑症的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的一个进一步的方面是式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗或预防抑郁症的药物中的应用。

本发明的一个进一步的方面是治疗或预防抑郁症的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

本发明的一个进一步的方面是式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在制备用于治疗或预防依赖性，例如酒精或尼古丁依赖性的药物中的应用。

本发明的一个进一步的方面是治疗或预防依赖性，例如酒精或尼古丁依赖性的方法，由此给需要这种治疗的患者施用药学和药理学上有效量的式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合。

对于本发明来说，术语“激动剂”应当理解为包括完全激动剂以及部分激动剂，由此“部分激动剂”应当理解为能够部分激活而非完全激活 $GABA_B$ 受体的化合物。

在本文中，词语“TLESR”，暂时性食管下端括约肌松弛可根据

Mittal, R. K, Holloway, R.H., Penagini, R., Blackshaw, L.A., Dent, J., 1995; Transient lower esophageal sphincter relaxation. Gastroenterology 109, pp.160-610. 进行定义。

词语“反流”被定义为从胃中能够进入食管的流体，其能够进入食管是由于那时机械屏障出现了暂时性消失。

词语“GERD”(胃食管反流疾病)可根据 *van Heerwarden, M.A., Smout A.J.P.M., 2000; Diagnosis of reflux disease. Baillière's Clin. Gastroentero1. 14, pp.759-774* 进行定义。

功能性胃肠障碍，例如功能性消化不良可根据 *Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Mueller-Lissner SA. C. Functional Bowel Disorders and Functional Abdominal Pain. In: Drossman DA, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE, Coraziarri E, 编辑. Rome II: Functional Gastrointestinal Disorders: Diagnosis, Pathophysiology and Treatment. 第2版. McLean, VA: Degnon Associates, Inc.; 2000: 351-432 and Drossman DA, Corazziari E, 5 Talley NJ, Thompson WG and Whitehead WE. Rome II: A multinational consensus document on Functional Gastrointestinal Disorders. Gut 45(Suppl.2), III -II81.9 -1-1999* 进行定义。

肠易激综合征（IBS）可根据 *Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Mueller-Lissner SA. C. Functional Bowel Disorders and Functional Abdominal Pain. In: Drossman DA, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE, Coraziarri E, 编辑. Rome II: Functional Gastrointestinal Disorders: Diagnosis, Pathophysiology and Treatment. 第2版. McLean, VA: Degnon Associates, Inc.; 2000: 351-432 and Drossman DA, Corazziari E, 5 Talley NJ, Thompson WG and Whitehead WE. Rome II: A multinational consensus document on Functional Gastrointestinal Disorders. Gut 45(Suppl.2), III -II81.9 -1-1999* 进行定义。

根据本发明的“组合”指的是“固定组合”或“多部件试剂盒的组合”。

“固定组合”被定义为一种组合，其中(i)式（I）的化合物和(ii)$GABA_B$受体激动剂在一个单元中存在。“固定组合”的一个实例是

药物组合物，其中(i)式（I）的化合物和(ii)$GABA_B$受体激动剂以混合物的形式存在。“固定组合”的另一个实例是药物组合物，其中(i)式（I）的化合物和(ii)$GABA_B$受体激动剂在一个单元中存在，而并非以混合物的形式存在。

“多部件试剂盒的组合”被定义为一种组合，其中(i)式（I）的化合物和(ii)$GABA_B$受体激动剂在一个以上的单元中存在。“多部件试剂盒的组合”的一个实例是一种组合，其中(i)式（I）的化合物和(ii)$GABA_B$受体激动剂分开存在。“多部件试剂盒的组合”的组分可以同时施用、顺序给药或分开施用，即分开施用或共同施用。

术语“正变构调节剂”被定义为一种通过与受体蛋白在不同于内源性配体所使用的位点上相结合，从而能够使受体对受体激动剂更为敏感的化合物。

除非另有说明，术语“治疗方法”和“治疗”还包括“预防”和／或预防方法．术语“治疗的”和“在治疗上”应当相应地进行解释。

药物制剂

式（I）的化合物能够单独进行配制，或者与 $GABA_B$ 受体激动剂组合进行配制。

对临床应用而言，按照本发明，式（I）的化合物，任选与$GABA_B$受体激动剂组合，适合于配制成口服施用的药物制剂。制剂领域的普通技术人员还可以考虑直肠、肠胃外或任何其他的施用途径。因此，式（I）的化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，可使用药学和药理学上可接受的载体或辅料进行配制。载体可以呈固体、半固体或液体稀释剂的形式。

根据本发明，制备口服药物制剂时，待配制的式（I）的化合物，任选与$GABA_B$受体激动剂组合，可以和固体、粉状成分，如乳糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、支链淀粉、纤维素衍生物，明胶或另外适合的成分，以及与崩解剂和润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂醇富马酸钠和聚乙二醇蜡混合。然后将所得到的混合物加工成颗粒剂或压制成片剂。

软明胶胶囊可用含有式（I）的化合物，任选与$GABA_B$受体激动剂组合，以及植物油、脂肪或其它适合于软明胶胶囊的载体的混合物

的胶囊来制备。硬明胶胶囊可包含式（I）的化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，与固体粉状成分如乳糖，蔗糖，山梨糖醇，甘露醇、土豆淀粉、玉米淀粉、支链淀粉、纤维素衍生物或明胶组合。

用于直肠施用的剂量单元可以制备成(i)栓剂形式，包含了与中性脂肪碱混合的活性物质；(ii)明胶直肠胶囊形式，包含式（I）的化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，以与植物油、石蜡油或其它适合于明胶直肠胶囊的载体的混合物的形式；(iii)预制微灌肠剂形式；或(iv)干燥的微灌肠剂制剂形式，施用前用适当溶剂进行重构。

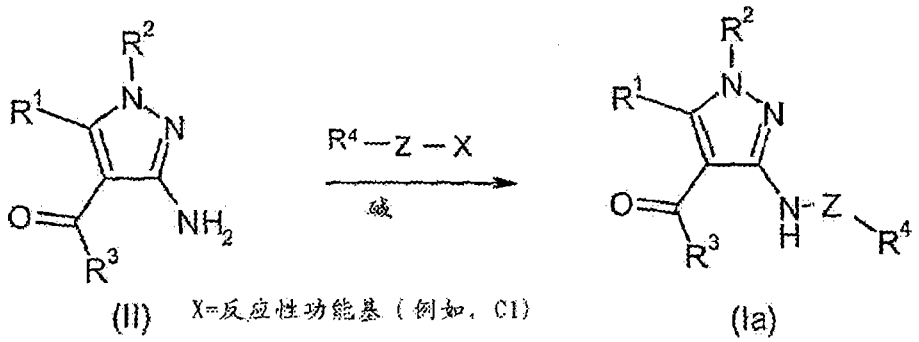
用于口服施用的液体制剂可以制备成糖浆剂或悬浮剂形式，例如溶液或悬浮液，其含有式（I）的化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，并且制剂的剩余部分由蔗糖或糖醇以及乙醇、水、甘油、丙二醇和聚乙二醇的混合物组成。如果需要，该液体制剂可含有着色剂、调味剂、糖精和羧甲基纤维素或其它增稠剂。用于口服施用的液体制剂也可制成干粉形式，使用前用适当溶剂重构。

用于肠胃外施用的溶液可制备成式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，在药学上可接受的溶剂中的溶液形式。这些溶液也可含有稳定成分和／或缓冲成分，并且可分配成安瓿或小瓶形式的单位剂量。用于肠胃外施用的溶液也可制成干粉制剂，使用前临时用适当溶剂重构。

在本发明的一个方面，式（I）化合物，任选与 $GABA_B$ 受体激动剂组合，可每日一次或两次进行施用，取决于患者病症的严重程度。式（I）化合物的典型日剂量为所治疗患者的每公斤体重 0.1 至 100mg，但是这取决于各种因素，例如施用途径、患者的年龄和体重以及患者病症的严重程度。

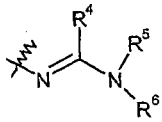
制备方法

本发明的式（I）化合物可根据以下通常的方法进行制备，其中 Y=-NH-Z-R^4 并且其中 R^1, R^2, R^3 和 R^4 如上文所定义，Z 是-SO_2-、-C(S)-或-C(O)-。

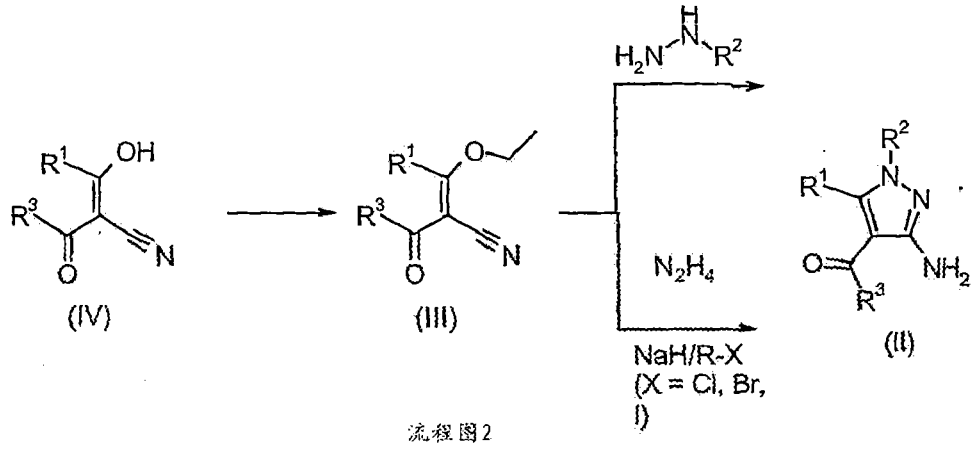


流程图1

其中在有机溶剂，例如 THF 等中使用亲电子试剂，例如酰氯、磺酰氯、氨基甲酰氯、异氰酸酯或异硫氰酸酯 (典型地为 1.5-2.5 当量)，可以将式(II)的氨基吡咯有效地转化为式(Ia)。该反应是在存在碱，例如三乙胺和温度为 25-50℃的情况下，或是在存在聚合物承载的二异丙基乙基胺(PS-DIPEA; 1.5-3 当量)的情况下，于环境温度至 50℃时搅拌 4-18 小时而进行的。通过亲核阴离子交换树脂 Isolute-NH2 过滤反应混合物，使用 THF 洗脱并在真空下蒸发，从而得到油状形式或无定形固体形式的预期产物。

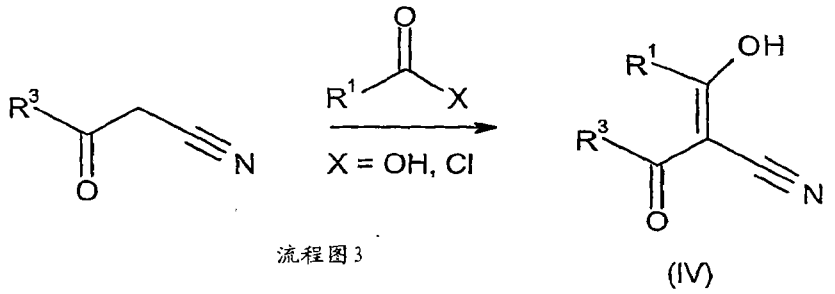
对于当 Y=  时的本发明根据式（I）的化合物，其制备可以根据本领域技术人员所熟悉的方法进行。

式(II)的氨基吡唑是通过加热试剂与取代的肼或肼本身，随后在碱，例如氢化钠存在的情况下用烷基卤使由此产生的未取代的吡唑烷基化来制备。在这些反应中，产生两种位置异构体（regioisomer），可通过色谱法将其分离（如流程图 2 所示；文献：Australian J. Chem. 1985，38，221 - 230；Helvetica Chimica Acta 1959，42，349 – 359）。中间体(III)可以通过在常规的 Mitsunobu 反应条件下使（IV）与乙醇反应来制备(文献：D.L. Huges in Organic Reactions，VoI 42，p. 335 - 656，1992.)。



流程图2

中间体(IV)可容易的通过已知的文献过程获得。例如，如 Shiori (J. Org. Chem. 1978，43，3631 - 3632)所述通过与氰基磷酸二乙酯和羧酸反应，或如 Rappoport (J. Org. Chem. 1982，47，1397 - 1408)所述通过与酰基氯反应使酮腈转化为中间体(IV)（参见流程图 3）。

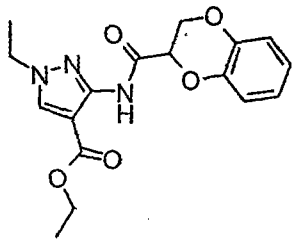


流程图3

实施例

实施例 1:

合成乙基 3-[（2,3-二氢-1,4-苯并二氧芑-2-基羰基）氨基]-1-乙基-1*H*-吡唑-4-羧酸酯

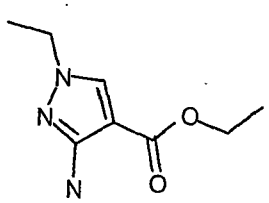


将 *1H*-吡唑-4-羧酸酯(0.03 mmol)溶解于 2 mL 无水 THF 中。然后，加入 PS-DIEA (25 mg，0.09 mmol)，随后加入酰基氯(0.07 mmol)。将反应混合物在室温振摇 48 小时。通过 isolute-NH2 离子交换柱过滤反应混合物，蒸发溶剂。通过快速色谱法，使用 30% EtOAc:庚烷作为洗脱剂来纯化粗制材料，得到预期的产物。产率：37.8%. ^{1}H NMR (400 MHz，$CDCl_3$) δ 10.27 (s，1H)，7.79 (s，1H)，7.18-7.08 (m)，7.00-6.86 (m)，4.86 (d，1H)，4.66 (d，1H)，4.40-4.15 (m)，1.53 (t，3H)，1.38 (t，3H)。

MS m/z 346.12 $(MH+H)^+$。

实施例 2:

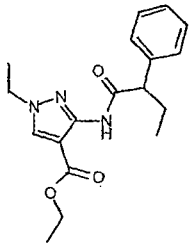
合成乙基-3-氨基- 1-乙基-1*H*-吡唑-4-羧酸酯(用作中间体)



室温向在 MeCN 中的乙基 3-氨基-*1H*-吡唑-4-羧酸酯(0.96 mmol；由 ACROS 商购获得)溶液中加入氢化钠(60%，46 mg)。在搅拌 30 分钟后，逐滴加入在 MeCN 中的碘乙烷(0.96 mmol)溶液。将反应混合物在室温搅拌 48 小时。然后，通过加入水，随后加入二氯甲烷来停止反应。使用分相器分离各相。收集有机相，$MgSO_4$ 上干燥，蒸发溶剂并通过快速色谱法，使用 30% EtOAc:庚烷作为洗脱剂来纯化粗制材料，得到位置异构体混合物，直接在下个合成步骤中使用该混合物而没有做任何进一步纯化。产率：68.2%. ^{1}H NMR (400 MHz，$CDCl_3$) δ 7.64 (s，IH)，5.50 (s，1H)，4.28-4.17 (m)，4.10-3.91 (m)，3.37-3.18 (m)，1.92 (s，IH)，1.48-1.18 (m)。MS m/z 184.15 $(M+H)^+$。

实施例 3:

乙基 1-乙基-3-[（2-苯基丁酰基）氨基]-1*H*-吡唑-4-羧酸酯



产率：33.4%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.14 (s, 1H), 7.43-7.20 (m), 4.28-4,07 (m), 3.44 (s, 1H), 2.36-2.16 (m), 1.98-1.75 (m), 1.47 (t, 3H), 1.29 (t, 3H) 0.93 (t, 3H)。

MS m/z 330.27 $(M+H)^+$

分析

使用 Micromass 8 probe MUX-LTC ESP+系统进行 LC-MS 分析，通过单一波长(254nm)UV 检测法测量纯度。通过 Xterra TM MS C8 3.5μm，4.6 x30 mm 柱，8 并联，进行色谱分析。通过 8 柱将流速 15ml／min 分流为 1.9ml／min 流速。10 分钟的色谱梯度如下：

流动相 A: 95 % ACN+5 % 0,010 M $NH_4$0Ac

流动相 B: 5 % ACN+95 % 0,010 M $NH_4$0Ac

10 分钟	0,0 分钟	0 % A
	8,0 分钟	100 % A
	9,0 分钟	100 % A
	9,1 分钟	0 % A

在 400MHz 进行 NMR 分析。

生物学评价

正变构 $GABA_B$ 受体调节剂在体外功能测定中的影响

在存在或不存在正变构调节剂的条件下，研究 GABA 和巴氯芬对 CHO 细胞中胞内钙释放的影响，其中 CHO 细胞表达 $GABA_{B(1A,2)}$ 受体异源二聚体。本发明的正变构调节剂能够增加 GABA 的效力和功效。

化合物的效力，即化合物降低 GABA 的 EC_{50} 的能力，可通过将 GABA 的 EC_{50} 降低 50 % 所需的浓度来反映。这些效力类似于 Urwyler

等报道的 CGP7930(可从 Tocris，Northpoint，Fourth Way，Avonmouth，Bristol，BS11 8TA，UK 购得)的效力。CGP7930 能够将 GABA 的效力由 EC_{50} 约 170-180 nM 增加至 EC_{50} 约 35-50 nM。

实验程序

材料

从 Life technologies(Paisley，Scotland)购得 Nut mix F-12(Ham)细胞培养基、OPTI-MEM I 还原型血清培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素／链霉素溶液(PEST)、遗传霉素、HEPES(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸(缓冲液)，1 M 溶液)、汉克平衡盐液(HBSS)和 zeocin；从 Sigma(St Louis，USA)购得聚乙烯亚胺、丙磺舒、巴氯芬和 γ-氨基丁酸(GABA)；从 Molecular Probes(Oregon，USA)购得 Fluo-3 AM。从 Amersham Pharmacia Biotech(Uppsala，Sweden)购得 4-氨基-正[2,3-^{3}H]丁酸([^{3}H]GABA)。

产生表达 $GABA_B$ 受体的细胞系

从人脑 cDNA 克隆 $GABA_BR1a$ 和 $GABA_BR2$，然后分别亚克隆入 pCl-Neo(Promega)和 pALTER-1(Promega)。使用 pCI-Neo-$GABA_BR1a$ cDNA 质粒和 pLEC1-$G_{\alpha qi5}$(Mole -cular Devices，CA)构建 $GABA_BR1a$-$G_{\alpha qi5}$ 融合蛋白表达载体。为了使 $G_{\alpha qi5}$ 百日咳毒素变得不敏感，使用标准的 PCR 方法，通过引物 5'-GGATCCATGGCATGCTGCCTGAGCGA-3'(正向)和 5'-GCGGCCGCTCAGAAGAGGCCGCCGTCCTT-3'(反向)将 Cys356 突变成 Gly。将 $G_{\alpha qi5nut}$cDNA 连接入 pcDNA3.0(Invitrogen)的 BamHI 和 NotI 位点。使用引物 5'-GGATCCCCGGGGAGCCGGGCCC-3'(正向)和 5'-GGATCCCTTATAAAGCAAATGCACTCGA-3'(反向)，通过 PCR 从 pCI-Neo-$GABA_BR1a$ 中扩增 $GABA_BR1a$ 编码序列，并且将其亚克隆入 pcDNA3.0-$G_{\alpha qi5nut}$ 的 BamHI 位点。

为优化 $GABA_BR2$ 的 Kozak 共有序列，使用 Altered Sites Mutagenesis 试剂盒根据制造商的说明书(Promega)进行原位诱变，所用引物为 5'-GAATTCGCACCATGGCTTCCC-3'。然后使用 Xho I+Kpn I 从 pALTER-1 限制性酶切优化后的 $GABA_BR2$，并将其亚克隆入哺乳动

物表达载体 pcDNA3.1(-)／Zeo(Invitrogen)，从而得到最终的构建体，pcDNA3.1(-)／Zeo-$GABA_BR2$。

为产生稳定的细胞系，37℃下在 Nut mix F. 12(Ham)培养基中培养 CHO-K1 细胞，该培养基置于增湿的 $C0_2$ 培养箱中并补充了 10％ FBS、100 U／ml 青霉素和 100 μg／ml 链霉素。用 1 mM EDTA 的 PBS 溶液分离细胞，并在 100 mm 培养皿中接种 1 百万细胞。24 小时后用 OptiMEM 取代培养基，在 $C0_2$ 培养箱中孵化 1 小时。

为产生表达 $GABA_BR1a$／$GABA_BR2$ 异源二聚体的细胞系，在 5 ml OptiMEM 中混合 $GABA_BR1a$ 质粒 DNA(4 μg)、$GABA_BR2$ 质粒 DNA(4 μg)和 lipofectamine(24 μl)，并在室温下孵化 45 分钟。将细胞暴露于转染培养基 5 小时，然后用培养基取代转染培养基。再培养细胞 10 天，然后加入选择性试剂(300μg／ml 潮霉素和 400 μg／ml 遗传霉素)。转染 24 天后，使用 FACS Vantage SE(Becton Dickinson，Palo Alto，CA)通过流式细胞计量法将单细胞分选入 96 孔板。扩增后使用下述的 FLIPR 分析法测试 $GABA_B$ 受体的功能应答。选择功能应答最高的克隆，进行扩增，然后通过单细胞分选进行亚克隆。在本研究中使用的是在 FLIPR 中具有最大峰响应的克隆细胞系。

为产生表达 $GABA_BR1a$-$G_{\alpha qi5}$ 融合蛋白和 $GABA_BR2$ 的稳定细胞系，在 5 ml Opti-MEM 中混合 $GABA_BR1a$-$G_{\alpha qi5mut}$ 质粒 DNA(8 μg)、$GABA_BR2$ 质粒 DNA(8 μg)和 lipofectamine(24 μl)，并在室温下孵化 45 分钟。将细胞暴露于转染培养基 5 小时，然后用培养基取代转染培养基。48 小时后，分离细胞并在 6 孔板中接种(2000 细胞／孔)，然后在补充了遗传霉素(400 μg／m1)和 zeocin(250 μg／m1)的培养基中培养。4 天后，收集单集落细胞并将其转移至 24 孔板。10 天后，在 T-25 烧瓶中接种细胞克隆，接着培养另外 16 天，然后将其用于 $GABA_B$ 受体介导的功能应答的测试。收集具有最高峰响应的克隆，并通过在 6 孔平板(1000 细胞／孔)中接种进行亚克隆，接着重复上述的步骤。在本研究中使用的是在 FLIPR 中具有最大峰响应的克隆细胞系。

在 FLIPR 中 $GABA_B$ 受体依赖性胞内钙释放的测量

根据 Coward 等，*Anal. Biochem. (1999)270，242-248* 中所述的内

容及对其一些修改，在荧光成像板读数器(FLIPR)中进行 $GABA_B$ 受体依赖性胞内钙释放的测量。在配有 Giutamax-I 的 Nut Mix F-12(HAM)中培养转染的 CHO 细胞，其中 Nut Mix F-12 中补充了 10％的 100 U／ml 青霉素、100 μg／ml 链霉素、250 μg／ml zeocin 和 400 μg／ml 遗传霉素。实验前 24 小时，在避光的聚 D-赖氨酸涂层的 96 孔板(Becton Dickinson，Bedford，UK)中接种细胞(35,000 细胞／孔)，其中培养基没有选择性试剂。吸出细胞培养基，然后加入 100 μl 载有 Fluo. 3 的溶液(在 Nut Mix F-12(Ham)中的 4 μM Fluo-3，2.5 mM 丙磺舒和 20 mM Hepes)。37℃下在 5％$C0_2$ 培养箱中孵育 1 小时，接着吸出染色溶液，使用 150 μl 洗液(在 HBSS 中的 2.5 mM 丙磺舒和 20 mM Hepes)洗涤细胞两次，然后加入 150 μl 洗液。使用荧光成像板读数器(Molecular Devices Corp.，CA，USA)分析细胞。在包含 20 mM Hepes 和 5％DMSO 的 HBSS 中将试验化合物稀释成 50 μM 浓度，然后加在 50 μl 体积中。在加入 GABA(50 μl 7.6 nM-150 μM)之前，荧光取样为每秒一次，持续 60 秒(加入试验化合物之前的 10 秒和之后的 50 秒)，此后每 6 秒取样一次，持续 120 秒。

GTPgS

30℃下在含 0.025μg/μl 膜蛋白质(由上述的细胞系制备)的膜缓冲液(100mM NaCl，5mM，1mM EDTA，50mM HEPES，pH 7. 4)中，使用总体积为 200 μl 的 0.01％牛血清白蛋白(无脂肪酸)、10μM GDP、100μM DTT 和 0.53nM [^{35}S]-GTPγS(Amersham. Pharmacia Biotech)进行 GTPγS 结合实验。在 20 μM GTPγS 存在的条件下测定非特异性结合。在有或没有所需浓度的 PAM 的条件下，通过加入浓度为 1mM-0.1nM 的 GABA 启动反应。通过加入冰冷的洗涤缓冲液(50 mM Tris-HCl，5mM $MgCl_2$，50mM NaCl，pH 7. 4)终止反应，接着在真空下通过 Printed Filtermat A 玻璃纤维过滤器(Wallac)(0.05％PEI 处理的)，使用 Micro 96 Harvester(Skatron Instruments)快速过滤。50℃下干燥过滤器 30 分钟，然后将石蜡闪烁体片熔融在该过滤器上，使用 1450 Microbeta Trilux(Wallac)闪烁计数器测定结合放射性。

计算

使用 4-参数逻辑方程建立在有或没有试验化合物的情况下的 GABA 剂量-应答曲线，$y=y_{max}+((y_{min}-y_{max}) / 1+(x / C)^{D})$，其中 $C=EC_{50}$，D=斜率因子。

通过对 GABA 的 EC_{50} 对数和进行测量时存在的正变构调节剂的浓度对数进行绘图，从而测定 GTPγS 分析中 PAM 的效力。

总而言之，式（I）化合物的效力为 EC_{50} 20 μM-0.001 μM。

IBS 模型中化合物的作用（结肠直肠膨胀）

结肠直肠膨胀（CRD）

对 CRD 而言，在轻度异氟烷麻醉法(Forene®，. Abbott Scandinavia. AB，Sweden)期间，将具有连接导管的 3 cm 聚乙烯球(室内制作)插入远端结肠，其中球的基体距肛门 2 cm。将导管用胶带固定至尾底部。同时，将静脉导管(Neoflon®，Becton Dickinson AB，Sweden)插入尾部静脉以施用化合物。此后，将大鼠置于 Bollman 笼中，在开始实验前使它们从镇静状态中恢复至少 15 分钟。

在 CRD 操作期间，这些球与压力换能器(P-602，CFM-k33，100 mmHg；Bronk horst Hi-Tec，Veenendal，The Netherlands)相连接。使用定制的恒压器(Astra Zeneca，Molndal，Sweden)控制空气膨胀和球内压力。使用在标准 PC 上运行的定制计算机软件控制恒压器，并进行数据收集和储存。通过模拟榆出方式产生脉冲波形，从而得到由恒压器产生的膨胀示例。所用的 CRD 示例建立在重复的时相性(phasic)膨胀上，在 80 mmHg 下出现 12 次，时间间隔 5 分钟，脉冲持续时间为 30 秒。

通过记录和定量膨胀脉冲期间的球内压力的时相性变化，从而评价 CRD 应答。在结肠内部球的等压膨胀期间的压力振荡反应了与膨胀过程相关联的腹部肌肉收缩，因此，它被认为是与内脏源疼痛的存在相关联的内脏运动应答(VMR)的有效评估手段。

数据收集和分析

在 50 Hz 对球压力信号进行抽样，之后将其进行数字滤波。使用 1 Hz 下的高通滤波器把收缩诱导的压力变化和恒压器产生的缓慢变化的压力分开。在压力发生器和压力换能器之间的气流阻力进一步增强了

由动物腹部收缩诱导的压力变化。此外，使用 49-51 Hz 的带阻滤波器移除线性频率干扰。使用定制的计算机软件(PharmLab off-line 4.0.1)定量球压力信号的时相性变化。计算脉冲前 30 秒内(基线作用)以及脉冲期间(作为对膨胀的 VMR 的度量)的球压力信号的平均校正值(ARV)。当进行脉冲分析时，应当排除每次脉冲的第一秒和最后一秒，这是由于它们显示了由恒压器在球膨胀和排气期间产生的假象信号，这些信号不是来自动物。

结果

在大鼠内等压 CRD 的 VMR 中研究了正变构调节剂的作用。使用的示例包括 80 mmHg 下 12 次膨胀。化合物的施用剂量为 1-50 μmol／kg，将 CRD 的 VMR 应答与载体对照进行比较。