



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102834120 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 19

(21) 申请号 201080016452. 9

C07D 249/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 04. 06

A61K 101/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 101/02 (2006. 01)

0906274. 6 2009. 04. 09 GB

61/167893 2009. 04. 09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 10. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/054517 2010. 04. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02010/115881 EN 2010. 10. 14

(71) 申请人 通用电气健康护理有限公司

地址 英国白金汉郡

(72) 发明人 A · 杰克逊 V · 莫里森 - 艾夫森

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公
司 72001

代理人 李进 林毅斌

(51) Int. Cl.

A61K 51/04 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 14 页

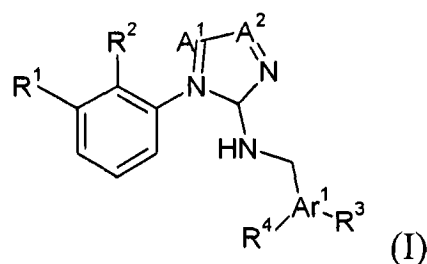
(54) 发明名称

用嘌呤能 P2X₇ 受体结合剂成像中枢神经系统

(57) 摘要

本发明提供可用作体内成像剂的新化合物。
作为促进一系列疾病状态诊断的手段, 本发明化
合物可用于受试者内 P2X₇受体表达的成像方法。

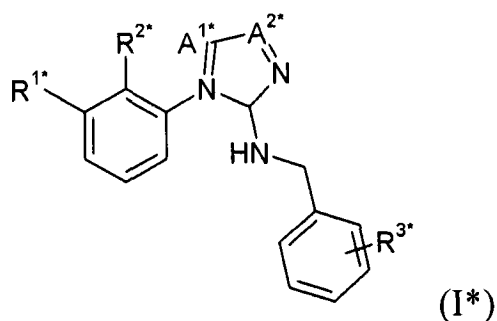
1. 体内成像剂,所述成像剂包括式 I 的化合物或其盐或溶剂化物,其中:
式 I 定义如下:



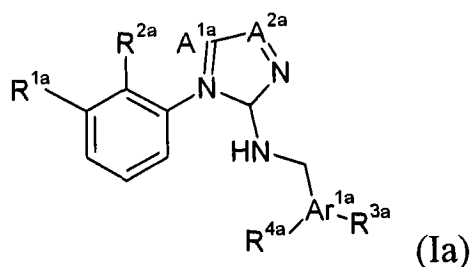
其中:

- R^1 和 R^2 独立地选自氢、卤代基、羟基、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 氟代烷基和 C_{1-3} 羟烷基;
 R^3 和 R^4 独立地选自氢、卤代基、羟基、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 氟代烷基、 C_{1-3} 羟烷基、 C_{1-3} 烷氧基、 C_{1-3} 氟代烷氧基、 C_{1-3} 烷硫基、 C_{1-3} 氟代烷硫基和 C_{1-6} 环烷基;
 A^1 和 A^2 中的一个为 N, 并且另一个为 CH;
 Ar^1 是可选地包括 1-3 个选自氮、氧和硫的杂原子的 C_{5-12} 芳基; 并且
 其中定义的 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 的任一个包括体内成像部分, 所述成像部分为发射 γ 的放射性卤素或发射正电子的放射性非金属。
2. 权利要求 1 限定的体内成像剂, 其中 R^1 和 R^2 独立地选自氢、卤代基和羟基。
3. 权利要求 1 或 2 限定的体内成像剂, 其中 R^3 和 R^4 独立地选自氢、羟基、卤代基和 C_{1-3} 氟代烷氧基。
4. 权利要求 1-3 任一项限定的体内成像剂, 其中 A^1 为 N 并且 A^2 为 CH。
5. 权利要求 1-4 任一项限定的体内成像剂, 其中 Ar^1 为可选地包括 1 个选自氮、氧和硫的杂原子的 C_{5-6} 芳基。
6. 权利要求 1-5 任一项限定的体内成像剂, 其中 R^3 和 R^4 中的一个包括所述体内成像部分。

7. 权利要求 1-6 任一项限定的体内成像剂, 所述成像剂为式 I* 的化合物:



- 其中 R^{1*} 和 R^{2*} 两者为卤代基, 并且 R^{3*} 为 C_{1-3} 烷基、氟代基、碘代基或 C_{1-3} 氟代烷氧基, 并且 A^{1*} 和 A^{2*} 分别如权利要求 1 或 4 对 A^1 和 A^2 的定义。
8. 权利要求 1-7 任一项限定的体内成像剂, 其中所述体内成像部分选自 ^{123}I 、 ^{11}C 和 ^{18}F 。
9. 权利要求 1-8 任一项限定的体内成像剂, 其中所述体内成像部分为 ^{18}F 。
10. 权利要求 1-9 任一项限定的体内成像剂的合成方法, 其中所述方法包括所述体内成像部分的合适来源与式 Ia 的非放射性前体化合物的反应:

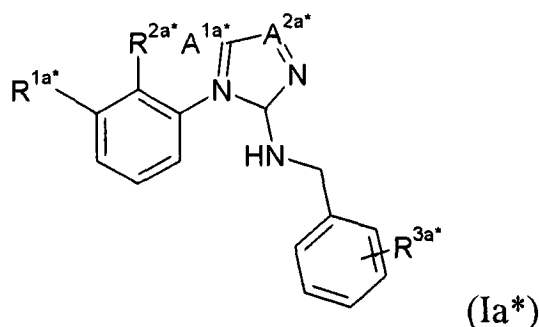


其中 R^{1a} 至 R^{4a} 中的一个包括前体基团,并且其余的 R^{1a} 至 R^{4a} 分别如权利要求 1-3 任一项对 R^1 至 R^4 的定义,并且可选地包括保护基团;

A^{1a} 和 A^{2a} 分别如权利要求 1 或 4 对 A^1 和 A^2 的定义;并且

Ar^{1a} 如权利要求 1 或 5 对 Ar^1 的定义。

11. 权利要求 10 限定的方法,其中所述式 Ia 的前体化合物是式 Ia* 的化合物:



其中 R^{1a*} 至 R^{3a*} 中的一个包括前体基团,并且其中剩下的 R^{1a*} 至 R^{3a*} 分别如权利要求 10 对 R^{1a} 至 R^{3a} 的定义,并且 A^{1a*} 和 A^{2a*} 分别如权利要求 10 或 4 对 A^{1a} 和 A^{2a} 的定义。

12. 权利要求 10 或 11 限定的方法,其中所述方法为自动化的。

13. 权利要求 10-12 任一项限定的方法,其中所述前体基团选自三烷基锡基团、 $B(OH)_2$ 、甲磺酸基、三氟甲磺酸基或甲苯磺酸基。

14. 权利要求 13 的方法中限定的前体化合物。

15. 用于实施权利要求 12 限定的方法的盒子,所述盒子包括:

(i) 含有权利要求 10-13 任一项的方法限定的前体化合物的容器;以及

(ii) 用于以体内成像部分的合适来源洗脱所述容器的装置,所述体内成像部分如权利要求 1、8 或 9 任一项的定义。

16. 权利要求 15 限定的盒子,所述盒子另外包括:

(iii) 用于除去过量的体内成像部分的离子交换柱;以及可选地

(iv) 用于去保护得到的放射性标记的产品以形成权利要求 1-9 任一项限定的体内成像剂的柱。

17. 放射性药物组合物,所述组合物包括适合哺乳动物给予形式的权利要求 1-9 任一项限定的体内成像剂和生物相容性载体。

18. 体内成像受试者以促进确定受试者的 CNS 中 $P2X_7$ 受体的存在、位置和 / 或量的方法,所述方法包括如下步骤:

(i) 提供受试者,已向该受试者给予可检测量的权利要求 1-9 任一项限定的体内成像剂;

(ii) 使所述被给予的体内成像剂结合到所述受试者内的 $P2X_7$ 受体;

- (iii) 通过体内成像方法检测由所述体内成像剂发射的信号 ;以及
- (iv) 生成代表所述信号的位置和 / 或量的图像。

19. 权利要求 18 限定的方法,其中所述受试者是完整哺乳动物活体。

20. 权利要求 18 或 19 限定的方法,其中所述受试者已知或疑似具有与 CNS 中 P2X₇ 受体的异常表达相关联的病理学病况。

21. 诊断方法,所述诊断方法包括权利要求 18 限定的步骤 (i)-(iv),并且进一步包括如下步骤:

(v) 评价步骤 (iv) 中生成的图像,以诊断与 CNS 中 P2X₇ 受体的异常表达相关联的病理学病况 (“P2X₇ 病况”)。

22. 权利要求 1-9 任一项限定的体内成像剂,所述成像剂用于权利要求 21 限定的诊断方法。

23. 权利要求 1-9 任一项限定的体内成像剂,所述成像剂用于制备权利要求 21 限定的诊断方法的药物。

用嘌呤能 P2X₇ 受体结合剂成像中枢神经系统

技术领域

[0001] 本发明涉及嘌呤能 P2 受体领域。更具体地,本发明涉及新型嘌呤能 P2X₇ 受体体内成像剂、它们的生产及其中间体。更详细地,本发明涉及本发明的体内成像剂在方法中的用途,所述方法提供可用于涉及 P2X₇ 受体表达的疾病状态的诊断的信息。

背景技术

[0002] P2X₇ 受体是直接由细胞外 ATP(唯一已知的生理学配体)和少数药理学 ATP 类似物门控的阳离子选择性离子通道(North 2002Physiol. Rev. 82:1013-1067)。ATP 从受损细胞的释放以及随后位于造血细胞(例如小胶质细胞、巨噬细胞和淋巴细胞)上的嘌呤能 P2X₇ 受体的激活对炎症级联至关重要(Ferrari D 等 2006J. Immunol. 176:3877-83)。与质膜 P2X₇ 通道的打开相关联的阳离子运动对于主要的促炎细胞因子,白介素-1 β (IL-1 β) 的成熟和释放是必须的。尽管正常组织中 P2X₇ 的表达低,炎症(无论中央或外围)期间,在周围区域中 P2X₇ 对细胞的反应性有着大的增大。

[0003] 中枢神经系统(CNS)中,在实验诱导中风(Franke 等 2004J. Neuropathol. Exp. Neurol. 63:686-99);多发性硬化(MS)(Yiangou 等 2006BMC. Neurol. 6:12);肌萎缩性侧索硬化(ALS)(Yiangou 等 2006supra);癫痫(Rappold 等 2006Brain Res. 1089:171-8)后;以及在转基因淀粉样阿尔兹海默氏病小鼠(Parvathenani 等 2003J. Biol. Chem. 278:13309-17)中,已表征了 P2X₇ 的增大。在外围,已显示 P2X₇ 受体上调伴随神经性疼痛(Chessell 等 2005Pain 114:386-96);多囊性肾病(Franco-Martinez 等 2006Clin. Exp. Immunol. 146:253-61);以及结核(Hillman 等 2005 Nephron. Exp. Nephrol. 101:e24-30)。在实验模型和患者两者中,P2X₇ 上调也已显示在多种癌症(例如宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、乳腺癌和皮肤癌)以及白血病中(Feng 等 2006 J. Biol. Chem. 281:17228-37;Greig 等 2003 J. Invest. Dermatol. 121:315-327;Slater 等 2004 Histopathology 44:206-215;Slater 等 2004 Breast Cancer Res. Treat. 83:1-10;Zhang 等 2004 Leuk. Res 28:1313-1322;Li 等 2006 Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 15:1906-13)。

[0004] 已从不同结构骨架合成了许多化合物类型,来生成治疗性 P2X₇ 拮抗剂。在 P2X₇ 受体起作用的激动剂与拮抗剂的综述已由 Baraldi 等发表(2004 Curr. Topics Med. Chem. 4:1707-17)。讨论了其中所公开的化合物作为潜在有用的治疗剂。关于体内成像应用,也已公开小分子 P2X₇ 结合化合物。WO 2007/141267 提供吡啶衍生物,它们是用于治疗疼痛、炎症和神经变性的 P2X₇ 拮抗剂。据教导,所述化合物的同位素标记形式可用于通过单光子发射断层成像(SPECT)或 PET 的体内成像。WO 2007/109154 和 WO 2007/109192 公开双环杂芳基化合物作为 P2X₇ 调节剂。据教导,包括 ¹¹C、¹⁸F、¹⁵O 或 ¹³N 的这些化合物的同位素变体可用于底物受体占用的 PET 研究。WO 2008/064432 公开用于诊断、治疗或监控其中涉及 P2X₇ 受体的病症的多环化合物。在 P2X₇ 受体功能试验中测试的 WO 2008/064432 的化合物证明,所述化合物是 P2X₇ 受体的拮抗剂。WO 2008/064432 的化合物可以用适合于体内成像(例如通过 SPECT 或 PET)的同位素来放射性标记。

[0005] 存在替代性体内成像剂的范围,所述成像剂适合于成像 P2X₇ 受体,以促进与 P2X₇

受体（特别是中枢神经系统（CNS）的那些）相关联的宽范围的疾病状态的诊断。

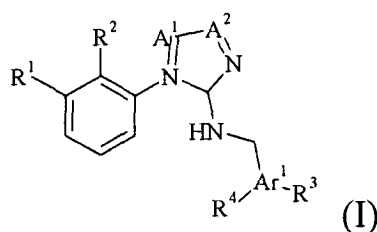
[0006] 发明概述

[0007] 本发明提供可用作体内成像剂的新化合物。作为促进一系列疾病状态诊断的手段，本发明的体内成像剂特别可用于受试者的 CNS 中 P2X₇ 受体表达的成像方法。

[0008] 发明详述

[0009] 一方面，本发明提供适合于体内成像受试者的中枢神经系统（CNS）的体内成像剂，其中所述体内成像剂包括式 I 的化合物或其盐或溶剂化物，其中式 I 定义如下：

[0010]



[0011] 其中：

[0012] R¹ 和 R² 独立地选自氢、卤代基、羟基、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 氟代烷基和 C₁₋₃ 羟烷基；

[0013] R³ 和 R⁴ 独立地选自氢、卤代基、羟基、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 氟代烷基、C₁₋₃ 羟烷基、C₁₋₃ 烷氧基、C₁₋₃ 氟代烷氧基、C₁₋₃ 烷硫基、C₁₋₃ 氟代烷硫基和 C₁₋₆ 环烷基；

[0014] A¹ 和 A² 中的一个为 N，并且另一个为 CH；

[0015] Ar¹ 是可选地包括 1-3 个选自氮、氧和硫的杂原子的 C₅₋₁₂ 芳基；并且

[0016] 其中定义的 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 的任一个包括体内成像部分，所述成像部分为发射 γ 的放射性卤素或发射正电子的放射性非金属。

[0017] 术语“体内成像剂”指可以借助于将其给予受试者并随后在所述受试者内检测，而用于检测活的受试者中特定生理学或病理生理学的化合物，其中所述检测在所述受试者外部进行。

[0018] 为了“适合于中枢神经系统（CNS）的体内成像”，体内成像剂需要能够穿过血脑屏障（BBB）。“CNS”是受试者神经系统的一部分，其包括被脑膜覆盖的大脑和脊髓。作为其被动转运的主要决定因素，普遍接受的 BBB 渗透的生物物理学 / 物理化学模型有：溶质的亲油性；氢键去溶剂化潜力；pKa / 电荷；以及分子尺寸。典型地，化合物渗透 BBB 的合适亲油性值将是 1.0-4.5，优选 2.0-3.5 范围内的 LogP。

[0019] 本发明的“受试者”优选为哺乳动物，最优选为完整哺乳动物活体。在尤其优选的实施方案中，本发明的受试者是人。

[0020] 术语“其盐或溶剂化物”中，合适的盐可以选自 (i) 生理上可接受的酸加成盐，例如衍生自矿物酸（例如氢氯酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸）的那些，以及衍生自有机酸（例如酒石酸、三氟乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡糖酸、琥珀酸、甲磺酸和对甲苯磺酸）的那些；以及 (ii) 生理上可接受的碱盐，例如铵盐、碱金属盐（例如钠和钾的那些）、碱土金属盐（例如钙和镁的那些）、与有机碱（例如三乙胺、N-甲基-D-葡糖胺、哌啶、吡啶、哌嗪和吗啉）的盐，以及与氨基酸（例如精氨酸和赖氨酸）的盐。合适的溶剂化物可以选自与乙醇、水、盐水、生理缓冲剂和乙二醇形成的那些。

[0021] 当取代基“包括体内成像部分”时，所述取代基或者是体内成像部分，或者所述取

代基是包括体内成像部分的化学基团,其中两种情形中所述体内成像部分或者是发射 γ 的放射性卤素,或者是发射正电子的放射性非金属。这样的放射性同位素以显著高于所述放射性同位素的天然丰度水平的水平存在于本发明的体内成像剂中。放射性同位素的这样的升高或富集的水平适当地为至少 5 倍,优选为至少 10 倍,最优选为至少 20 倍;并且理想地或者为所讨论的放射性同位素的天然丰度水平的至少 50 倍,或者以其中所讨论的放射性同位素的富集水平为 90 至 100% 的水平存在。包括适合于本发明的体内成像部分的化学基团的实例包括具有升高水平的 ^{123}I 的碘代苯基基团、具有升高水平的 ^{11}C 的 CH_3 基团以及具有升高水平的 ^{18}F 的氟代烷基基团,使得成像部分是化学结构内同位素标记的 ^{11}C 或 ^{18}F 原子。如何将这些以及其他合适的官能团并入本发明的体内成像剂的更详细讨论在本说明书中稍后给出。

[0022] “体内成像部分”使本发明的化合物在将其给予哺乳动物活体之后,使用合适的成像方式来检测。本发明的合适成像方式包括正电子 发射断层成像 (PET) 和单光子发射断层成像 (SPECT)。

[0023] 当体内成像部分是“发射 γ 的放射性卤素”时,放射性卤素适宜地选自 ^{123}I 、 ^{131}I 或 ^{77}Br 。 ^{125}I 因其不适合用于体内成像而被明确排除。优选用于体内成像的发射 γ 的放射性卤素是 ^{123}I 。

[0024] 当成像部分是“发射正电子的放射性非金属”时,合适的这样的正电子发射体包括: ^{11}C 、 ^{17}F 、 ^{18}F 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 或 ^{124}I 。优选的发射正电子的放射性非金属是 ^{11}C 、 ^{18}F 和 ^{124}I ,尤其是 ^{11}C 和 ^{18}F ,最尤其是 ^{18}F 。

[0025] 术语“卤代基”意指选自氟、氯、溴或碘的取代基。“卤代烷基”、“卤代酰基”、“卤代烷氧基”和“卤代芳基”分别是如本文定义的用一个或多个卤代基基团取代的烷基、酰基、烷氧基和芳基。“氟代烷基”、“氟代烷氧基”和“氟代烷硫基”是分别如本文定义的用一个或多个氟代基基团取代的烷基、烷氧基和烷硫基。

[0026] 除非另外指定,单独的或组合的术语“烷基”意指含有 1-6 个碳原子之间,并且优选 1 至 3 个碳原子之间的直链或支链烷基基团。这样的基团的实例包括,但不限于甲基、乙基、正丙基和异丙基。

[0027] “羟基”是基团 $-\text{OH}$ 。术语“羟烷基”代表如本文定义的用一个或多个羟基基团取代的烷基基团。优选地,羟烷基具有结构 $-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$,其中 n 为 1-6。

[0028] 除非另外指定,单独地或组合的术语“烷氧基”意指在链中包括醚基团(即,基团 $-\text{O}-$)的上文定义的烷基。合适的烷基醚基团的实例包括,但不限于,甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基。

[0029] 术语“硫基”意指基团 $-\text{SH}$ 。术语“烷硫基”和“氟代烷硫基”分别代表用一个或多个硫基取代的如本文定义的烷基和氟代烷基基团。

[0030] 术语“环烷基”指其中链的端部相连以形成环状结构的如本文定义的烷基。

[0031] 术语“芳基”指在环体系中具有 5 至 12 个碳原子,优选 5 至 6 个碳原子的芳香环或稠合芳香环体系,例如苯基或萘基。“杂原子”是代替 芳香环中的一个碳原子的选自氮、氧和硫的原子。包括一个或多个杂原子的芳基基团通常称作“杂芳基”。

[0032] 优选地, R^1 和 R^2 独立地选自氢、卤代基和羟基。

[0033] 优选地, R^3 和 R^4 独立地选自氢、羟基、卤代基和 C_{1-3} 氟代烷氧基。

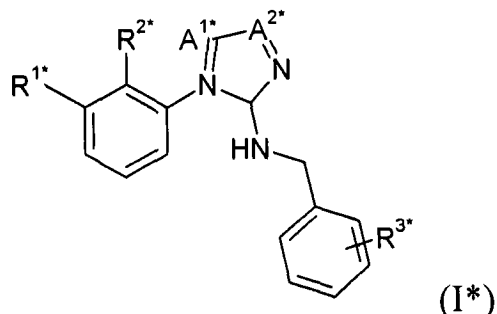
[0034] 优选地, A^1 为 N 并且 A^2 为 CH。

[0035] 优选地, Ar^1 为可选地包括 1 个选自氮、氧和硫的杂原子的 C_{5-6} 芳基。

[0036] 在一个优选的实施方案中, R^3 和 R^4 中的一个包括所述体内成像部分。

[0037] 在最优选的实施方案中, 本发明的体内成像剂为式 I^* 的化合物:

[0038]

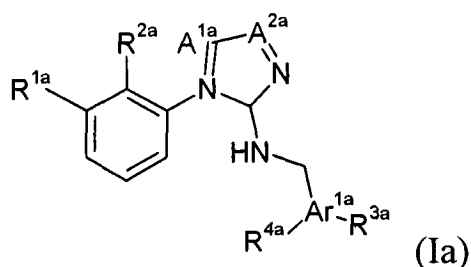


[0039] 其中 R^{1*} 和 R^{2*} 两者为卤代基, 并且 R^{3*} 为 C_{1-3} 烷基、氟代基、碘代基或 C_{1-3} 氟代烷氧基, 并且 A^{1*} 和 A^{2*} 分别如前面对 A^1 和 A^2 的定义。

[0040] 本发明的体内成像剂是 $P2X_7$ 受体的配体, 并且优选地展现对激动剂功能的至少 70% 抑制, 以在 HEK. 293 细胞中形成非选择性孔隙 (参见 Michel 等, B. J. Pharmacol. 1998 ; 125 :1194-1201)。在结合亲合力方面, $P2X_7$ 受体的配体具有在 0.01 和 100nM 之间, 优选在 0.01 和 10nM 之间并且最优选在 0.01 和 1nM 之间的 K_d 或 K_i (通过 :Humphreys 等 1998 Molecular Pharmacology, 54 :22-32 ;Chessell 等 1998 British Journal of Pharmacology, 124 :1314-1320 测量)。与对 $P2X_7$ 受体的结合亲合力一起, 本发明的体内成像剂优选在对其他 P2 受体最高 10 μ M 时没有亲合力。本发明的体内成像剂优选为 $P2X_7$ 受体的拮抗剂。

[0041] 本发明的体内成像剂可以通过期望的体内成像部分的合适来源 与式 Ia 的非放射性前体化合物反应获得:

[0042]



[0043] 其中 R^{1a} 至 R^{4a} 中的一个包括前体基团, 并且其余的 R^{1a} 至 R^{4a} 分别如上文对式 I 的 R^1 至 R^4 的定义, 并且可选地包括保护基团;

[0044] A^{1a} 和 A^{2a} 分别如上文对式 I 的 A^1 和 A^2 的定义;

[0045] Ar^{1a} 如上文对式 I 的 Ar^1 的定义。

[0046] 所述体内成像部分的“合适来源”意指所述体内成像部分的化学反应性形式。所述体内成像部分的合适来源与前体化合物的反应优选导致期望的本发明的体内成像剂的形成, 而不需要任何进一步的步骤。

[0047] “前体化合物”包括如上文定义的式 I 化合物的未标记的非放射性衍生物, 即前体化合物既不包括发射 γ 的放射性卤素, 也不包括发射正电子的放射性非金属。前体化合物

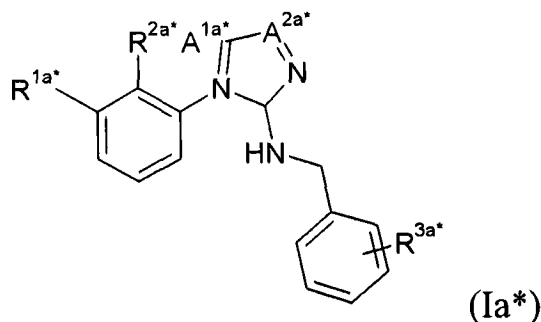
设计为使得与成像部分的方便化学形式的化学反应以位点特异的方式发生；可以在最小数目的步骤中实施（理想为单一步骤）；并且不需要大量纯化（理想为没有进一步纯化），以得到如本文定义的期望的式 I 的体内成像剂。这样的前体化合物是合成的，并且可以以良好的化学纯度方便地获得。前体化合物可以可选地包括针对前体化合物的某些官能团的保护基团。

[0048] 术语“保护基团”意指这样的基团，其抑制或阻止不期望的化学反应，但其被设计为有充分的反应性使其可以在不改变分子的其他部分的足够温和的条件下从所讨论的官能团分裂。去保护之后，获得如本文定义的期望的式 I 的体内成像剂。保护基团对本领域技术人员而言是公知的，并且适宜地针对胺基团选自：BOC（其中 BOC 是叔丁氧羰基）、Fmoc（其中 Fmoc 是芴基甲氧基羰基）、三氟乙酰基、烯丙基氧基羰基、Dde[即 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环亚己基)乙基]或 Npys（即 3-硝基-2-吡啶亚磺酰基（sulfonyl））；并且针对羰基基团选自：甲基酯、叔丁基酯或苄基酯。针对羟基基团，合适的保护基团是：甲基、乙基或叔丁基；烷氧基甲基或烷氧基乙基；苄基；乙酰基；苯甲酰基；三苯甲基（Trt）或三烷基甲硅烷基（例如四丁基二甲基甲硅烷基）。针对硫醇基基团，合适的保护基团是：三苯甲基和 4-甲氧基苄基。其它保护基团的使用描述于‘Protective Groups in Organic Synthesis’, Theodor W. Greene and Peter G. M. Wuts,（第 4 版, John Wiley & Sons, 2007）。

[0049] “前体基团”是与成像部分的方便化学形式反应，以位点特异的方式并入成像部分的化学基团。合适的这样的前体基团在下文更详细讨论。例如，这样的前体基团包括，但不限于碘代基、羟基、硝基、碘鎓盐、溴代基、甲磺酸基、甲苯磺酸基、三烷基锡、B(OH)₂ 以及三烷基铵盐。

[0050] 在一个优选的实施方案中，式 Ia 的前体化合物是式 Ia* 的化合物：

[0051]



[0052] 其中 R^{1a*} 至 R^{3a*} 中的一个包括前体基团，并且其中剩下的 R^{1a*} 至 R^{3a*} 分别如上文对 R^{1a} 至 R^{3a} 的定义，并且 A^{1a*} 和 A^{2a*} 分别如上文对 A^{1a} 和 A^{2a} 的定义。

[0053] 现在描述适合并入本发明的代表性体内成像部分的前体化合物的实例。

[0054] 当成像部分是放射性碘时，本文定义的体内成像剂可以借助于包括前体基团的前体化合物来获得，所述前体化合物或者经历亲电或亲核碘化，或者经历与标记的醛或酮的缩合。第一个类别的实例为：

[0055] (a) 有机金属衍生物，例如三烷基锡烷（如三甲基甲锡烷基或三丁基甲锡烷基），或三烷基硅烷（如三甲基甲硅烷基）或有机硼化合物（如硼酸酯或有机三氟硼酸酯）；

[0056] (b) 用于卤素交换的非放射性烷基溴，或用于亲核碘化的甲苯磺酸烷基酯、甲磺酸

烷基酯或三氟甲磺酸烷基酯；

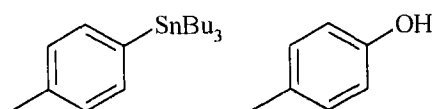
[0057] (c) 向着亲核碘化活化的芳香环（如芳基碘鎓盐、芳基重氮鎓、芳基三烷基铵盐或硝基芳基衍生物）。

[0058] 优选的这样的前体化合物包括选自以下的前体基团：非放射性卤素原子，如芳基碘化物或芳基溴（以允许放射性碘交换）；有机金属前体基团（如三烷基锡、三烷基甲硅烷基或有机硼化合物）；或有机前体基团（如三氮烯），或对于亲核取代而言为良好的离去基团的前体基团（如碘鎓盐）。

[0059] Bolton (J. Lab. Comp. Radiopharm., 2002 ;45 :485-528) 描述了前体化合物以及将放射性碘引入有机分子的方法。Kabalka 等 (Nucl. Med. Biol., 2002 ;29 :841-843, 和 Nuc. Med. Biol. 2003 ;30 :369-373) 描述了合适的硼酸酯有机硼化合物以及它们的制备。Kabalka 等 (Nucl. Med. Biol. 2004 ;31 :935-938) 描述了合适的有机三氟硼酸酯以及它们的制备。

[0060] 以下给出可以将放射性碘与其连接的芳基基团的实例：

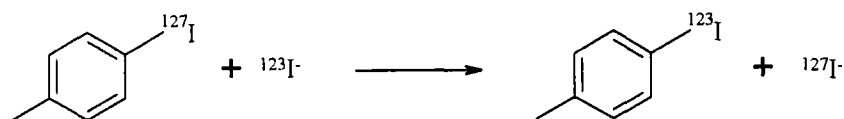
[0061]



[0062] 两者含有允许芳香环上容易的放射性碘取代的前体基团。

[0063] 或者，含有放射性碘的体内成像剂可以通过经由放射性卤素交换的直接碘化来合成，如

[0064]



[0065] 放射性碘原子优选经由直接的共价键连接到芳香环（如苯环），或乙烯基基团，因为已知结合到饱和和脂肪族体系的碘原子易于在体内代谢，因此损失放射性碘。

[0066] 优选地，为了获得其中成像部分为放射性碘的本发明的体内成像剂，前体化合物包括前体基团，所述前体基团为有机金属前体基团，最优选为三烷基锡。

[0067] 放射性溴化可以通过与上文针对放射性碘化所描述的那些相似的方法实现。Kabalka 和 Varma 已综述了用于合成放射性卤化的化合物（包括放射性溴化的化合物）的各种方法 (Tetrahedron 1989 ;45 (21) :6601-21)。

[0068] 一种用 ^{11}C 标记的方法是使前体化合物（它是甲基化的化合物的去甲基化形式）与 ^{11}C 甲基碘反应。也有可能通过以下来并入 ^{11}C ，使期望的体内成像剂的特定烃的格氏试剂与 ^{11}C CO_2 反应，以获得与前体化合物中的胺基团反应的 ^{11}C 试剂，而得到感兴趣的 ^{11}C 标记的体内成像剂。

[0069] ^{11}C 也可以作为芳香环上的甲基基团来引入，在该情形中，前体化合物将包括为三烷基锡基团或 $\text{B}(\text{OH})_2$ 基团的前体基团。

[0070] 由于 ^{11}C 的半衰期仅有 20.4 分钟，中间体 ^{11}C 部分具有高的比活性是重要的，因此，它们用尽可能快的反应过程生产。

[0071] 这样的 ^{11}C 标记技术的全面综述可见于 Antoni 等 "Aspects on the Synthesis

of ^{11}C -Labelled Compounds”, Handbook of Radiopharmaceuticals, M. J. Welch 和 C. S. Redvanly Eds. (2003, John Wiley and Sons)。

[0072] 优选地,为了获得其中成像部分为 ^{11}C 的本发明的体内成像剂,前体化合物包括为三烷基锡基团或 $\text{B}(\text{OH})_2$,最优选为三烷基锡的前体基团。

[0073] 放射性氟化可以经由直接标记进行,所述直接标记使用 ^{18}F -氟化物与具有良好离去基团(例如烷基溴基、烷基甲磺酸基或烷基甲苯磺酸基)的前体化合物中合适的化学基团反应。针对芳基体系,从芳基重氮鎓盐、芳基硝基化合物或芳基季铵盐的 ^{18}F -氟化物亲核置换是得到芳基- ^{18}F 衍生物的合适途径。

[0074] Bolton(J. Lab. Comp. Radiopharm., 2002 ;45 :485-528) 描述了得到 ^{18}F 标记的衍生物的合成路线的进一步细节。

[0075] 当体内成像部分是氟的放射性同位素时,放射性氟原子可以形成氟代烷基或氟代烷氧基基团的一部分,因为烷基氟对体内代谢有抵抗力。或者,放射性氟原子可以经由直接的共价键连接到芳香环,例如苯环。

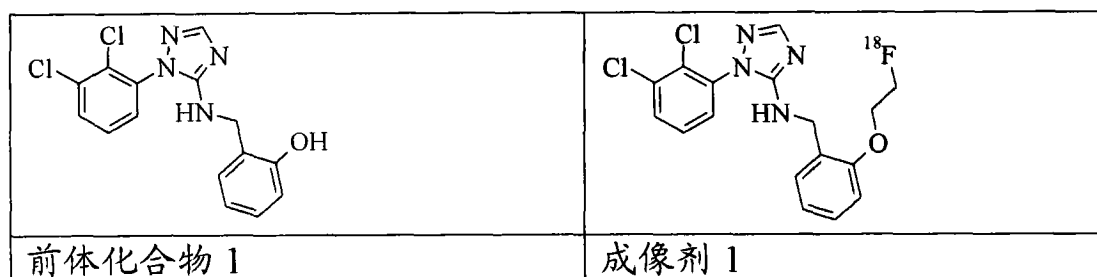
[0076] ^{18}F 可以通过羟基前体基团与 $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_3\text{OM}$ 或 $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_3\text{Br}$ 的 O-烷化来引入。对于芳基体系,从前体基团(为重氮鎓盐、硝基或季铵盐)的芳基基团的 ^{18}F -氟化物亲核置换是得到芳基- ^{18}F 衍生物的合适途径。放射性氟化也可以经由直接标记进行,所述直接标记使用 ^{18}F -氟化物与前体基团(它是良好的离去基团,例如溴基、甲磺酸基、三氟甲磺酸基或甲苯磺酸基)的反应。以此方式,前体化合物可以通过与 ^{18}F -氟离子($^{18}\text{F}^-$)的合适来源的反应在一个步骤中被标记,所述合适来源通常作为含水溶液从核反应 $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})^{18}\text{F}$ 获得,并且通过添加阳离子抗衡离子以及随后除去水而使之具有反应性。针对该方法,前体化合物通常选择性地被化学保护,以使放射性氟化发生在特定位点。合适的保护基团是前面已提及的那些。

[0077] 优选地,为了获得其中成像部分为 ^{18}F 的本发明的体内成像剂,前体化合物包括为离去基团,最优选为甲磺酸基、三氟甲磺酸基或甲苯磺酸基的前体基团。

[0078] 上文限定的优选的以及最优选的化合物连同本发明的方法本身形成本发明的另外方面。

[0079] 特别优选的本发明的体内成像剂以及用于获得它(实施例 2 中描述的合成)的前体化合物如下:

[0080]



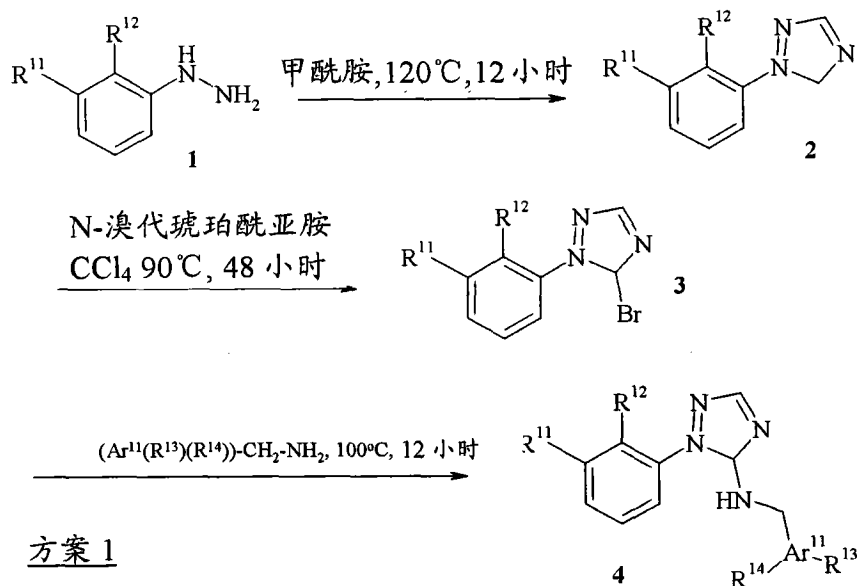
[0081] 在 P2X_7 受体功能试验中筛选了表 I 中说明的成像剂的非放射性类似物。该试验在实施例 3 中描述,并且是基于 P2X_7 受体在用激动剂激活时在 P2X_7 转染的 HEK. 293 细胞中形成非选择性孔隙,由此允许染料渗透细胞的能力。用作评价本发明的非放射性化合物的参比抑制剂的非选择性 P2X 通道拮抗剂是磷酸吡哆醛-6-偶氮苯基 2', 4' -二磺酸酯

(PPADS), 并且试验结果在以上表 I 中提供。发现表 I 中说明的本发明的成像剂的非放射性类似物在 $10\ \mu\text{M}$ 时抑制 P2X_7 功能, 并且一般在 100nM 浓度具有与 PPADS (参比化合物, 其在 $10\ \mu\text{M}$ 显示 70% 抑制) 相比的类似程度。

[0082] 用于获得表 I 中说明的成像剂的合成路线, 连同其非放射性类似物, 在实施例 1 和 2 中提供。类似的方法可以用于获得整个权利要求范围内的成像剂。用于合成本发明的体内成像剂的前体可以使用诸如由 Florjancic 等 (2008 Bioorg. Med. Chem. Lett. ;18 :2089 和其中引用的参考文献) 描述的方法获得。起始化合物和中间体或者为可商业获得的, 或者在 Florjancic 等 (supra) 和 / 或其中引用的参考文献中有描述。

[0083] 为了获得适合于制备本发明的体内成像剂 (其中 A^1 为 N 并且 A^2 为 CH) 的前体化合物, 可以使用如下通用反应方案:

[0084]

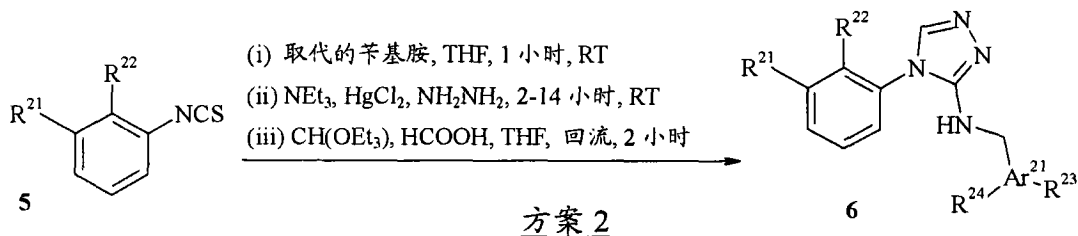


[0085] 以上方案 1 中, R^{11} 至 R^{14} 以及 Ar^{11} 分别如上文对 R^{1a} 至 R^{4a} 以及 Ar^{1a} 的定义。

[0086] 使合适的苯肼 1 起始化合物与甲酰胺在升高的温度反应, 以提供三唑 2, 转而将其溴化以提供中间体 3。3 与合适的苄基胺的直接反应得到 4。

[0087] 为了获得适合于制备本发明的体内成像剂 (其中 A^1 为 CH 并且 A^2 为 N) 的前体化合物, 使用如下略微不同的通用反应方案:

[0088]



[0089] 以上方案 2 中, R^{21} 至 R^{24} 以及 Ar^{21} 分别如上文对 R^{1a} 至 R^{4a} 以及 Ar^{1a} 的定义, NCS 代表 N-氯代琥珀酰亚胺, THF 代表四氢呋喃, RT 代表室温, 并且 NEt_3 代表三乙胺。

[0090] 方案 2 的起始材料是异硫代氰酸酯化合物 5。在 THF 中用苄基胺处理 5 提供硫脲中间体, 其通过在碱和 HgCl_2 存在下添加肼, 而得到相应的氨基胍。然后在酸性条件下在原甲酸酯的存在下将该氨基胍加热至回流, 以得到产品 6。

[0091] 用于合成本发明的成像剂的前体化合物可以方便地作为试剂盒 (kit) (例如用于放射性药理学) 的一部分。这样的试剂盒包括在密封容器中的如本文限定的前体化合物。密封的容器优选允许维持无菌完整性和 / 或放射性安全性, 加上可选地惰性顶部空间气体 (例如氮或氩), 同时允许通过注射器添加和抽出溶液。优选的密封容器是隔膜密封的小瓶, 其中该气密性封闭压接 (crimp on) 上密封 (overseal) (典型地为铝)。这样的密封容器具有该封闭可以在期望时承受真空 (以例如改变顶部空间气体或使溶液脱气) 的另外优势。

[0092] 当在本发明的试剂盒中采用时, 前体化合物的合适并且优选的实施方案如本文中已经描述的。

[0093] 用于试剂盒中的前体化合物可以在无菌制造条件下采用, 以得到期望的无菌、非热原 (non-pyrogenic) 材料。前体化合物或者可以在非 无菌条件下采用, 接着使用例如 γ 辐射、高压釜、干热或化学处理 (例如用环氧乙烷) 终端灭菌。优选地, 前体化合物以无菌、非热原形式提供。最优选地, 该无菌、非热原的前体化合物在上文描述的密封容器中提供。

[0094] 优选地, 试剂盒的所有组件为一次性的, 以使在运行 (run) 之间污染的可能性最小化, 并且确保无菌和品质保证。

[0095] 在一个优选的方面, 本发明的合成方法是自动化的。特别地, $[^{18}\text{F}]$ -放射性示踪剂现在常常方便地在自动化放射合成仪器上制备。有几种商业上可获得的这样的仪器的实例, 包括 Tracerlab™ 和 Fastlab™ (两者可从 GE Healthcare 获得)。通过将盒子 (cassette) 安装到自动化合成仪器, 在该仪器上进行放射化学。盒子一般包括流体通路、反应容器, 和用于接受试剂小瓶的端口以及在放射合成后的清理步骤中使用的任何固相提取柱。

[0096] 在另一方面, 本发明提供可以插入到适当改装的自动化合成器中用于自动化合成本发明的体内成像剂的盒子。

[0097] 用于自动化合成本发明的体内成像剂的盒子包括:

[0098] (i) 含有如本文限定的前体化合物的容器; 以及

[0099] (ii) 用于以体内成像部分的合适来源洗脱容器的装置, 所述体内成像部分如本文所定义。

[0100] 所述盒子可另外包括:

[0101] (iii) 用于除去过量的体内成像部分的离子交换柱; 以及可选地,

[0102] (iv) 用于去保护得到的放射性标记的产品, 以形成如本文限定的体内成像剂的柱。

[0103] 合成所需要的试剂、溶剂以及其他消耗品也可以与数据介质 (例如携带软件的光盘) 一起被包括, 所述数据介质允许自动化合成器以满足终端用户对浓度、体积、递送时间等的要求的方式来操作。

[0104] 本发明的体内成像剂对于通过受试者 CNS 中 P2X_7 受体的数目和 / 或位置的体内成像的评价特别有用。因此, 在另一方面, 本发明提供 成像受试者, 以促进确定受试者 CNS 中 P2X_7 受体的存在、位置和 / 或量的方法, 所述方法包括如下步骤:

[0105] (i) 提供受试者, 已向该受试者给予可检测量的本发明的体内成像剂;

[0106] (ii) 使所述体内成像剂结合到所述受试者内的 P2X_7 受体;

[0107] (iii) 通过体内成像方法检测由所述体内成像剂发射的信号; 以及

[0108] (iv) 生成代表所述信号的位置和 / 或量的图像。

[0109] 本发明的方法始于“提供”受试者,已向该受试者给予可检测量的本发明的体内成像剂。由于所述方法的最终目的是提供诊断上有用的图像,向受试者给予本发明的体内成像剂可以理解为促进所述图像的产生所必须的预备步骤。

[0110] 在一个替代实施方案中,本发明的成像方法的步骤 (i) 可以替换为:

[0111] (i) 向所述受试者给予可检测量的本发明的体内成像剂。

[0112] 体内成像剂的“给予”优选经肠胃外进行,并且最优选经静脉内进行。静脉内途径代表递送体内成像剂遍布受试者全身,并因此穿过所述受试者的血脑屏障 (BBB) 且进入中枢神经系统 (CNS) 的最有效方式。静脉内给予不代表实质性的物理干预或实质性的健康风险。本发明的体内成像剂优选作为如本文限定的本发明的药物组合物来给予。

[0113] 体内成像剂的“可检测量”是包括足够的可检测标记,以使由体内成像部分发射的信号 (在将所述体内成像剂给予所述受试者之后) 被成像仪器检测到的量。

[0114] 本发明的体内成像剂的性质使其适合于穿过 BBB 并结合到 CNS 内的 $P2X_7$ 受体。因此,在本发明的方法中,检测和生成步骤在所述受试者的 CNS (优选大脑) 上进行。

[0115] 本发明的方法可以用于研究健康受试者中 $P2X_7$ 受体的位置和 / 或量。然而,所述方法在所述受试者已知或疑似有与 CNS 中 $P2X_7$ 受体的异常表达相关联的病理学病况 (“ $P2X_7$ ”病况) 时特别有用。这样的病况包括中风、多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、癫痫和阿尔兹海默氏病,其各自的病理生理学包括神经炎。术语“神经炎”是指 CNS 中小胶质细胞和星形细胞响应和行为的基本炎症样特征。这些响应对于多种多样的神经学病症的致病机理和发展是重要的,所述神经学病症包括中风、癫痫、帕金森氏病、多发性硬化 (MS)、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、阿尔兹海默氏病和亨廷顿氏病。因此,通过本发明的方法生成的图像具有为临床医师在这样的病症的诊断中提供指导的用途。

[0116] 在一个替代方面,本发明提供诊断方法,其包括如上文限定的体内成像方法的步骤 (i)-(iv),并且进一步包括如下步骤:

[0117] (ii) 评价步骤 (iv) 中生成的图像,以诊断与 CNS 中 $P2X_7$ 受体的异常表达相关联的病理学病况 (“ $P2X_7$ ”病况)。

[0118] 步骤 (v) 的 $P2X_7$ 病况是本文描述的那些的任一种。评价步骤由医生或兽医,即有适当资格作出临床诊断的人来进行。这样的诊断代表推论性的医学或兽医学决定,作出该决定的目的是关于是否需要任何治疗来使受试者恢复健康而作出决定。

[0119] 在另一替代实施方案中,所述方法可以包括将本发明的体内成像剂给予受试者的预备步骤。本发明的体内成像剂的给予优选经肠胃外进行,并最优选经静脉内进行。静脉内途径代表递送本发明的体内成像剂穿过 BBB 并进入与 CNS 中的 $P2X_7$ 受体接触的最快方式。所述体内成像剂受试者的优选实施方案如前文限定。

[0120] 本发明的体内成像剂优选作为“放射性药物组合物”被给予,所述放射性药物组合物包括适合哺乳动物给予形式的式 I 的体内成像剂和生物相容性载体。

[0121] “生物相容性载体”是流体,尤其是液体,其中悬浮或溶解了式 I 的体内成像剂,使得放射性药物组合物在生理上可容忍,即,可以被给予哺乳动物身体而无毒性或过度不适。生物相容性载体介质适当地是可注射的载体液体,例如无菌、无热原的注射用水;含水溶液,例如盐水 (其可以有利地被平衡,以便用于注射的最终产品是等渗的或不是低渗的);

一种或多种渗透压调节物质（例如血浆阳离子与生物相容性抗衡离子的盐）、糖（例如葡萄糖或蔗糖）、糖醇（例如山梨糖醇或甘露糖醇）、甘醇（例如甘油），或其他非离子多元醇材料（例如聚乙二醇、聚丙二醇等）的含水溶液。生物相容性载体介质也可以包括生物相容性有机溶剂，例如乙醇。这样的有机溶剂对于增溶较亲油性化合物或制剂有用。优选地，生物相容性载体介质是无热原的注射用水、等渗盐水或含水乙醇溶液。用于静脉内注射的生物相容性载体介质的 pH 适宜在 4.0 至 10.5 的范围。

[0122] 这样的放射性药物组合物适宜在提供有密封的容器中供应，所述密封适合用皮下针头单次或多次穿刺（例如压接的隔膜密封封闭），同时维持无菌完整性。这样的容器可以含有单个或多个患者剂量。优选的多个剂量容器包括单个散装小瓶（例如，10 到 30cm³ 体积），所述小瓶含有多个患者剂量，藉此单个患者剂量可以由此在制剂的可行的寿命期间以各种时间间隔被抽吸到临床级注射器中，以适应临床病况。预填充式注射器设计为含有单个人用剂量，或“单位剂量”，并因此优选为适合于临床使用的一次性或其他注射器。预填充式注射器可以可选地提供有注射器屏蔽，以保护操作者免受放射性剂量。合适的这样的放射性药物注射器屏蔽在本领域是已知的，并且优选包括铅或钨。

[0123] 放射性药物组合物可以从试剂盒制备。或者，它们可以在无菌制造条件下制备，以得到期望的无菌产品。放射性药物组合物也可以在非无菌条件下制备，接着使用例如 γ 辐射、高压釜、干热或化学处理（例如用环氧乙烷）来终端灭菌。

[0124] 本发明的成像方法也可以用做研究工具。例如，用于进行竞争研究，所述竞争研究使药物与待研究的 P2X₇ 受体相互作用。这样的研究包括剂量 - 占用研究、最佳治疗剂量的确定、药物候选选择研究以及感兴趣的组织中 P2X₇ 受体分布的确定。

[0125] 在一个替代实施方案中，本发明的方法重复进行，例如在用药物抵抗 P2X₇ 病况的治疗之前、期间和之后进行。以此方式，所述治疗的效果可以随时间监测。

[0126] 本发明还提供的是本发明的体内成像剂用于医学，特别是用于受试者的 CNS 中炎症的存在、位置和 / 或量的确定方法。所述体内成像剂、方法和受试者的适当和优选的实施方案如前文限定。

[0127] 在本发明的另一方面，本发明的体内成像剂可以用于制备药物，所述药物用于确定受试者的 CNS 中炎症的存在、位置和 / 或量。所述体内成像剂和所述受试者的适当和优选的实施方案如本文在前面所限定。

[0128] 用于合成本发明的特定体内成像剂的详细方法在如下非限制性实施例中提供。

[0129] 实施例简述

[0130] 实施例 1 描述成像剂 1 的非放射性类似物的合成。

[0131] 实施例 2 描述成像剂 1 的合成。

[0132] 实施例 3 描述用于评价对 P2X₇ 受体的结合的试验。

[0133] 实施例中使用的缩写

[0134]

AIBN	偶氮二异丁腈
ATP	三磷酸腺苷
BOC	叔丁氧羰基
Bz-ATP	2'和 3'-O-(4-苯甲酰苯甲酰)-ATP
DEAD	偶氮二羧酸二乙酯
DMSO	二甲亚砜
DNA	脱氧核糖核酸
EDCI	1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺
HEPES	4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸
HPLC	高效液相色谱法
IC50	半数最大抑制浓度
LDA	二异丙基氨基锂
MeOH	甲醇

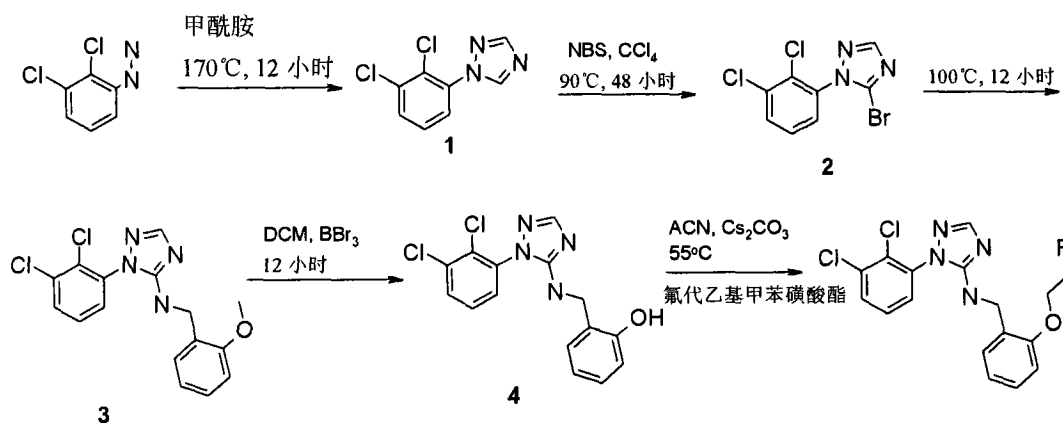
[0135]

NBS	N-溴代琥珀酰亚胺
PPADs	磷酸吡哆醛-6-偶氮苯基-2'4'-二磺酸
RNA	核糖核酸
RT	室温
THF	四氢呋喃

实施例

[0136] 实施例 1: 成像剂 1 的非放射性类似物 (1-(2,3-二氯苯基)-N-(2-(2-氟代乙氧基)苄基)-1H-1,2,4-三唑-5-胺) 的合成

[0137]



[0138] 1(i) 1-(2,3-二氯苯基)-1H-1,2,4-三唑 (1)

[0139] 添加 2,3-二氯苯肼 (2.5g, 14.12mmol) 到烘干的烧瓶。向该烧瓶添加甲酰胺 (15mL)。将混合物在 170℃ 保持 12 小时。用水 (50mL) 猝灭反应物料,并用乙酸乙酯 (3x 50mL) 萃取。然后用水 (4x 25mL) 洗涤合并的有机层,并经无水硫酸钠干燥,过滤并蒸发。将粗反应物料通过柱层析在硅胶上使用己烷和乙酸乙酯作为洗脱剂纯化,得到呈白垩色固体的产品 (1.8g, 60% 产率)。

[0140] $^1\text{H-NMR}$: (400MHz, CDCl_3) δ 8.55 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.64 (d, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 7.52 (d, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 7.40 (t, 1H, $J = 8\text{Hz}$)。

[0141] 1(ii) 5-溴代-1-(2,3-二氯苯基)-1H-[1,2,4]-三唑 (2)

[0142] 将 1-(2,3-二氯苯基)-1H-[1,2,4]-三唑 (1) (1.0g, 4.67mmol) 放入烘干的圆底烧瓶。向其添加无水四氯化碳 (15mL),接着添加新结晶的 NBS (1.1g, 6.18mmol) 和催化量的 AIBN。然后将反应加热至 90℃ 回流约 48 小时。减压下除去四氯化碳,并将反应物料通过柱层析在硅胶上使用己烷和乙酸乙酯作为溶剂纯化,得到产品 2 (900mg, 65% 产率)。

[0143] $^1\text{H-NMR}$: (400MHz, CDCl_3) δ 8.10 (s, 1H), 7.72 (d, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 7.41 (q, 2H, $J = 8\text{Hz}$)。

[0144] 1(iii) 1-(2,3-二氯苯基)-N-(2-甲氧基苄基)-1H-[1,2,4]-三唑-5-胺 (3)

[0145] 将起始材料 2 (500mg, 1.7mmol) 与 2-甲氧基苄基胺 (0.5mL) 两者放入圆底烧瓶中,并加热至 100℃ 回流 12 小时。然后用水 (20mL) 猝灭反应,并用乙酸乙酯 (3x 20mL) 萃取。用盐水 (15mL) 洗涤合并的萃取物,经无水硫酸钠干燥,过滤并蒸发。通过柱层析在硅胶上使用己烷和乙酸乙酯作为洗脱剂分离产品,得到 3 (500mg, 84% 产率)。

[0146] $^1\text{H-NMR}$: (400MHz, CDCl_3) δ 7.71 (s, 1H), 7.62 (t, 1H, $J = 4\text{Hz}$), 7.25-7.41 (m, 4H), 6.94 (t, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 6.88 (d, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 4.68 (s, 1H), 4.60 (s, 2H), 3.8 (s, 3H)。

[0147] 1(iv) 2-((1-(2,3-二氯苯基)-1H-[1,2,4]-三唑-5-基-氨基)甲基)苯酚 (4)

[0148] 将 1-(2,3-二氯苯基)-N-(2-甲氧基苄基)-1H-[1,2,4]-三唑-5-胺 (3) (500mg, 1.4mmol) 溶解在干燥烧瓶中的无水二氯甲烷 (5mL) 中。然后将反应物料冷却至 -78℃ 并搅拌 15 分钟。然后在保持相同温度的同时添加三溴化硼 (0.4ml, 1.6mmol)。使反应到达室温,并搅拌总计约 12 小时,之后用水 (20mL 缓慢添加) 猝灭,并用二氯甲烷 (3x 20mL) 萃取,通过柱层析在硅胶上使用己烷-乙酸乙酯洗脱剂纯化,得到产品 (160mg, 33% 产率)。

[0149] $^1\text{H-NMR}$: (400MHz, CDCl_3) δ 7.72 (s, 1H), 7.65 (m, 1H), 7.38 (d, 2H, $J = 4\text{Hz}$), 7.25 (t, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 7.14 (d, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 7.01 (d, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 6.88 (t, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 4.76 (s, 1H), 4.50 (s, 2H)。

[0150] 1(v) 1-(2,3-二氯苯基)-N-(2-(2-氟代乙氧基)苄基)-1H-[1,2,4]-三唑-5-胺) (成像剂 1 的非放射性类似物)

[0151] 将 4 (160mg, 0.48mmol) 溶解在乙腈 (2mL) 中,并添加碳酸铯 (1.2 当量),并于室温搅拌混合物 15 分钟。添加氟代乙基甲苯磺酸酯 (1.1 当量) 到该混合物,并在 55℃ 加热反应 12 小时。然后在减压下除去乙腈,并在乙酸乙酯和水之间分离残留物。然后将有机层浓缩,并通过柱层析在硅胶上使用己烷和乙酸乙酯作为洗脱剂纯化,得到期望的产品 (96mg, 53% 产率)。

[0152] $^1\text{H-NMR}$: (400MHz, CDCl_3) δ 7.50-7.82 (m, 2H), 7.11-7.49 (m, 5H), 6.98 (t, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 6.84 (d, 1H, $J = 8\text{Hz}$), 4.62 (m, 5H), 4.17 (m, 2H)。

[0153] 实施例 2 : 成像剂 1 的合成

[0154] 成像剂 1 使用如实施例 1 中描述的方法获得, 除了在碳酸钾和 Kryptofix 的存在下, 使 4 与 [^{18}F]- 氟代乙基甲苯磺酸酯 (例如按 Bauman 等 Tetrahedron Letts. 2003 ;44 : 9165-7 的描述合成) 在乙腈中反应。

[0155] 实施例 3 : 确定 P2X_7 结合的孔隙形成试验

[0156] 所用的试验方法是基于 DNA 结合染料 Yo Pro-1 (4[3- 甲基 -2(3H)- 苯并噻唑亚基] 甲基]-1-[3-(三甲基-氨) 丙基]- 二氧化喹啉鎓) 经过扩大的或“大孔隙形式”的 P2X_7 受体并结合到细胞内 DNA/RNA (于是它增大荧光强度) 的能力。Yo Pro-1 因此用于量化 P2X_7 功能的抑制。该试验是基于由 Michel 等发表的方法 (B. J. Pharmacol 1998 ;125 : 1194-1201)。

[0157] 最初, 使用 Lipofectamine TMLTX (Invitrogen), 用 P2X_7 cDNA 将 HEK. 293 细胞短暂地转染 72 小时。在使用前 48 小时, 以 30,000 细胞 / 孔的密度将细胞种到聚-D- 赖氨酸涂布的 96 孔黑壁透明底的盘中。以 40mM 的浓度在 100% DMSO 中制备测试化合物的储备溶液。

[0158] 48 小时培养之后, 从转染的细胞中除去培养基, 将细胞清洗一次, 并放入预加温的蔗糖试验缓冲剂 (蔗糖 : 280mM, KCl : 5mM, CaCl_2 : 0.5mM, 葡萄糖 : 10mM, HEPES : 10mM, N- 甲基 -D- 葡糖胺 : 10mM ; pH7.4)。将测试化合物以 10 μM 和 100nM 的浓度添加到盘中, 一式三份, 并于 37°C 培养 30 分钟。试验中最终 DMSO 浓度为 1%。此后, 于 37°C 分别以 1 μM 和 30 μM 的浓度添加 Yo Pro-1 染料和 Bz-ATP 溶液 60 分钟。然后以 485nm 激发和 530nm 发射读取荧光。

[0159] 将非选择性 P2X 通道拮抗剂磷酸吡哆醛 -6- 偶氮苯基 -2' 4' - 二磺酸 (PPADS) 用作试验中的参比抑制剂。在试验盘上使用 200 μM 的起始浓度接着用覆盖 200 μM 至 0.4nM 浓度范围的 1/6 (1 in 6) 系列稀释来进行对 PPADS 的剂量响应。对于每个化合物数据集, 基于生成的三个试验点计算百分比抑制值。对于成像剂, 发现 1% 抑制在 10 μM 为 77.0, 在 100 μM 为 68.0。