



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103703008 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201280031201. 7

A61K 31/55(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 07. 02

A61P 25/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/505685 2011. 07. 08 US

(56) 对比文件

CN 1777613 A , 2006. 05. 24, 全文 .

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 12. 24

WO 2007022068 A1 , 2007. 02. 22, 权利要求 1, 31-35, 说明书第 91 页最后一段, 第 70-72 页中表格化合物 106, 45, 57, 69.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/045254 2012. 07. 02

WO 9618629 A1 , 1996. 06. 20, 全文 .

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/009517 EN 2013. 01. 17

审查员 杨森

(73) 专利权人 伊莱利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 A. J. 勒加德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘健 李炳爱

(51) Int. Cl.

C07D 498/04(2006. 01)

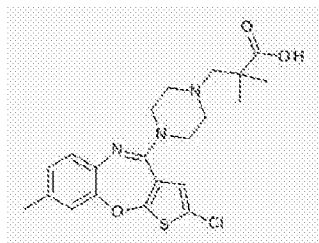
权利要求书1页 说明书18页

(54) 发明名称

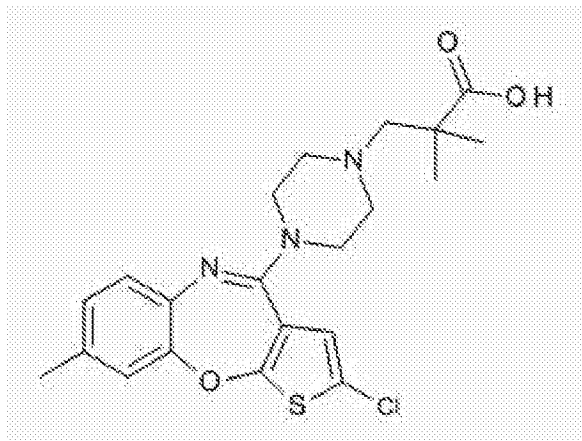
作为双重活性的 H1 反向激动剂 /5-HT_{2A} 拮抗剂的 (噻吩并 [2, 3-b] [1, 5] 苯并氧氮杂萘-4-基) 哌嗪-1-基化合物

(57) 摘要

本发明描述了下式的双重 H1/5-HT_{2A} 受体拮抗剂: 其用途和其制备方法。



1. 下式的化合物



或其可药用盐。

2. 按照权利要求 1 的化合物, 其是 HCl 盐。

3. 药物组合物, 其包含按照权利要求 1 的化合物或其可药用盐, 并结合至少一种可药用载体或稀释剂。

4. 按照权利要求 1 的化合物或其可药用盐在制备治疗失眠的药物中的用途。

5. 按照权利要求 4 的用途, 其中失眠的特点在于: 难以开始睡眠或难以保持睡眠或这两种情况。

6. 药物组合物, 其包含按照权利要求 1 的化合物或其可药用盐, 并结合至少一种可药用载体或赋形剂和另外的治疗组分, 该治疗组分是选择性的血清素再摄取抑制剂。

作为双重活性的 H1 反向激动剂 /5-HT_{2A}拮抗剂的（噻吩并 [2, 3-b] [1, 5] 苯并氧氮杂草 -4- 基）哌嗪 -1- 基化合物

[0001] 组胺通过其与至少四种不同的 G 蛋白偶联受体 (H1-H4 受体) 的相互作用, 在各种生理学过程中扮演重要角色。在 CNS 中, H1 受体在睡眠调节循环中起到关键作用, 并且已知 H1 拮抗剂 / 反向激动剂可引起嗜眠。

[0002] 同样, 血清素通过其与至少十四种不同的 G 蛋白偶联受体的相互作用, 在各种生理学过程中起到重要作用。调节 CNS 中的 5-HT_{2A}受体在睡眠调节循环中起到关键作用, 并且已经证明, 5-HT_{2A}拮抗剂可改善失眠患者的慢波睡眠和睡眠保持。

[0003] 具有 H1 或 5-HT_{2A}反向激动剂或拮抗剂活性的化合物已经用于治疗失眠 (例如, 分别为多塞平和曲唑酮), 并且在动物睡眠研究中显示出显著的药理效果。然而, 目前还不能商购得到选择性的双重活性 H1/5-HT_{2A}反向激动剂 / 拮抗剂。

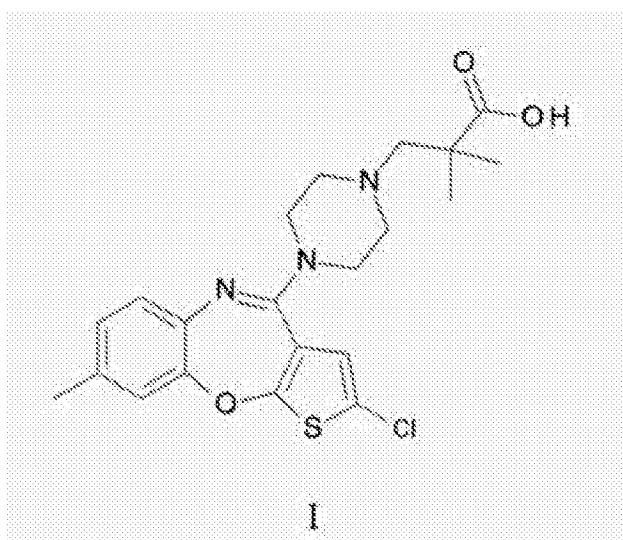
[0004] WO 2007/022068 描述了用于治疗睡眠障碍的某些取代的 (噻吩并 [2, 3-b] [1, 5] 苯并二氮杂草 -4- 基) 哌嗪 -1- 基和 (噻吩并 [2, 3-b] [1, 5] 苯并氧氮杂草 -4- 基) 哌嗪 -1- 基化合物。

[0005] 本发明提供了 3-[4-(2-氯-8-甲基-噻吩并 [2, 3-b] [1, 5] 苯并氧氮杂草-4-基) 哌嗪 -1- 基]-2, 2-二甲基-丙酸和其可药用盐, 尤其与其它组胺受体、血清素受体及其它生理学相关的受体相比较, 特别是与 5-HT_{2C}受体、GABA_A受体、毒蕈碱性受体、多巴胺能受体、肾上腺素能受体和 hERG 通道相比较, 其对于 H1 受体具有高反向激动剂效能, 对于 5-HT_{2A}受体具有高拮抗剂效能, 并且对于这些受体具有良好的选择性。这些化合物通过动物模型还表明, 可用于治疗以睡眠保持差为特征的睡眠障碍。因此, 认为该化合物可用于治疗以睡眠潜伏期 (sleep latency) 差或睡眠保持差或这两者为特征的睡眠障碍, 例如, 治疗失眠, 例如, 长期或暂时性原发性失眠, 或长期或暂时性继发性失眠, 或这两种失眠。继发性失眠的例子包括但不限于: 与抑郁症 (例如, 严重抑郁症、情绪不良和 / 或循环性精神病) 相关的失眠, 与焦虑症 (例如, 广泛性焦虑症和 / 或社交恐惧症) 相关的失眠, 与疼痛 (例如, 肌纤维痛、慢性骨或关节疼痛, 例如, 与炎性关节炎或骨关节炎相关的疼痛, 或糖尿病性的神经性疼痛) 相关的失眠, 与过敏性反应 (例如, 变应性哮喘、瘙痒、鼻炎 (rhinitis)、充血等等) 相关的失眠, 与肺或呼吸道病症 (例如, 阻塞性睡眠呼吸暂停, 反应性呼吸道疾病, 等等) 相关的失眠, 与精神病症、痴呆和 / 或神经变性疾病相关的失眠和 / 或与生理节奏睡眠障碍 (例如, 换班工作睡眠障碍、时差综合症、睡眠相位后移障碍、晚期睡眠障碍和非 24 小时睡眠-觉醒综合征, 等等) 相关的失眠。

[0006] 此外, 当共同给予本发明的化合物与选择性的血清素再摄取抑制剂时, 本发明的化合物能够显示它们对非快速动眼睡眠 (eye movement sleep) (NREM 睡眠) 效果的增强。

[0007] 本发明提供了式 I 的化合物

[0008]



[0009] 或其可药用盐。也就是 3-[4-(2-氯-8-甲基噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-基)哌嗪-1-基]-2,2-二甲基丙酸或其可药用盐。

[0010] 在本发明的另一个方面,提供了药物组合物,其包含与至少一种可药用载体、稀释剂或赋形剂联用的式 I 化合物或其可药用盐。此外,本发明的该方面提供了治疗失眠的药物组合物,例如,以睡眠潜伏期延长或睡眠保持差或这两种为特征的失眠,例如,原发性失眠,时差综合症,换班工作睡眠障碍,睡眠相位后移障碍,晚期睡眠障碍和 / 或非 24 小时睡眠-觉醒障碍,该药物组合物包含与一或多种可药用赋形剂、载体或稀释剂联用的式 I 化合物或其可药用盐。

[0011] 本发明该方面的进一步的实施方案提供了药物组合物,其包含与至少一种可药用载体、赋形剂或稀释剂和任选其它治疗组分联用的按照式 I 的化合物或其可药用盐。在本发明的该方面的更进一步的实施方案中,该药物组合物进一步包含第二个治疗剂,这种治疗剂是血清素再摄取抑制剂,例如,西酞普兰、帕罗西汀、氟西汀和 / 或氟戊肟胺 (fluvoxetine)。

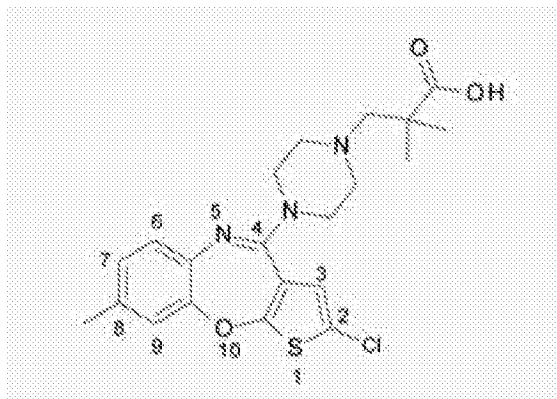
[0012] 本发明还提供了治疗哺乳动物的失眠的方法,例如,以睡眠潜伏期延长或睡眠保持差或这两种为特征的失眠,例如,原发性失眠、时差综合症、换班工作睡眠障碍、睡眠相位后移障碍、晚期睡眠障碍和 / 或非 24 小时睡眠-觉醒障碍,该方法包括:给予需要这种治疗的哺乳动物有效量的式 I 的化合物或其可药用盐。在本发明的该方面的另一个实施方案中,该方法进一步包括同时、分别或顺序联合给予第二个治疗剂,这种治疗剂是血清素再摄取抑制剂,例如,西酞普兰、帕罗西汀、氟西汀和 / 或氟戊肟胺 (fluvoxetine)。在这些治疗方法的一个具体实施方案中,哺乳动物是人。

[0013] 本发明还提供了用于治疗式 I 的化合物或其可药用盐。在该方面范围内,本发明提供了用于治疗失眠的式 I 的化合物或其可药用盐。在进一步实施方案中,所述失眠的特点在于:睡眠潜伏期延长或睡眠保持差或这两种特点,例如,原发性失眠、时差综合症、换班工作睡眠障碍、睡眠相位后移障碍、晚期睡眠障碍和 / 或非 24 小时睡眠-觉醒障碍。在该方面的另一个实施方案中,本发明提供了治疗失眠的按照式 I 的化合物或其可药用盐,与血清素再摄取抑制剂同时、分别或顺序联用,例如,西酞普兰、帕罗西汀、氟西汀和 / 或氟戊肟胺 (fluvoxetine)。在本发明的该方面的一个具体实施方案中,该用途是在哺乳动物中使用,特别是人。

[0014] 本发明的另一个方面提供了式 I 的化合物或其可药用盐在制备药物中的用途, 该药物用于治疗失眠, 例如, 以睡眠潜伏期延长或睡眠保持差或这两种为特征的原发性失眠, 例如, 原发性失眠、时差综合症、换班工作睡眠障碍、睡眠相位后移障碍、晚期睡眠障碍和 / 或非 24 小时睡眠 - 觉醒障碍。本发明该方面的另一个实施方案提供了式 I 化合物或其可药用盐和第二个治疗剂在制备药物中的用途, 其中第二个治疗剂是血清素再摄取抑制剂, 例如, 西酞普兰、帕罗西汀、氟西汀和 / 或氟戊肟胺 (fluvoxetine), 该药物用于治疗失眠, 例如, 以睡眠潜伏期延长和 / 或睡眠保持差为特征的失眠, 例如, 原发性失眠, 时差综合症, 换班工作睡眠障碍, 睡眠相位后移障碍, 晚期睡眠障碍和 / 或非 24 小时睡眠 - 觉醒障碍。

[0015] 为了清楚起见, 在整个该申请中, 使用三环结构的下列编号:

[0016]



[0017] 本发明的化合物具有碱性和酸性部分, 并且相应地与许多有机和无机酸和碱反应, 形成可药用盐。本发明化合物的可药用盐意在包括在本申请范围内。本文使用的术语“可药用盐”是指对于活性有机体基本上无毒的本发明化合物的任何盐。这种盐包括 Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19(1977) 中所列的那些盐, 它们为技术人员所知晓。

[0018] 本文使用的缩写定义如下:

[0019] “DMEM”是指 Dulbecco 最小量 Eagle 培养基。

[0020] “DMSO”是指二甲亚砜。

[0021] “EDTA”是指乙二胺四乙酸。

[0022] “FBS”是指胎牛血清。

[0023] “HEPES”是指 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸。

[0024] “HPLC”是指高压液相色谱。

[0025] “hr.”是指小时。

[0026] “IC₅₀”是指获得最大抑制的 50% 时的浓度。

[0027] “LC-MS”是指 HPLC-质谱。

[0028] “MeOH”是指甲醇。

[0029] “min.”是指分钟。

[0030] “MS”是指质谱。

[0031] “MS(ES+)”是指使用电喷射离子化的质谱。

[0032] “NMR”是指核磁共振。

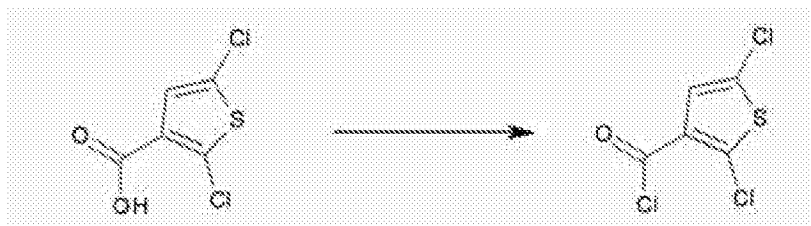
[0033] “THF”是指四氢呋喃。

[0034] 普通化学

[0035] 可以按照下列合成实施例可制备本发明的化合物。

[0036] 制备例 1. 2,5-二氯噻吩-3-甲酰氯

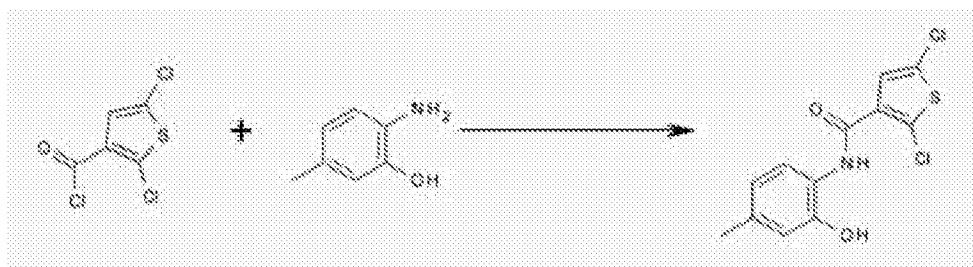
[0037]



[0038] 向 2,5-二氯-噻吩-3-甲酸 (49.7 g; 252.23 mmole; 1.00 当量) 的二氯甲烷 (500 mL) 悬浮液中加入二甲基甲酰胺 (0.5 mL; 6.47 mmole), 而后用 1.5 小时加入 2M 草酰氯的二氯甲烷溶液 (138.73 mL; 277.45 mmole; 1.1 当量) (通过苛性碱溶液排放逸出的气体)。将得到的澄清溶液在室温下搅拌 1 小时, 直到气体逸出停止为止, 用 LCMS 监测反应完成 (将样品在 7M NH_3/MeOH 中淬灭, 进行反应监测), 相应的伯酰胺的 $\text{MS}(\text{m/z})=195.9, 197.9(\text{M}+\text{H})^+$ 。蒸干, 得到标题中间体棕色油 (55g, 252 mmol, 定量)。

[0039] 制备例 2. 2,5-二氯-N-(2-羟基-4-甲基-苯基)噻吩-3-甲酰胺

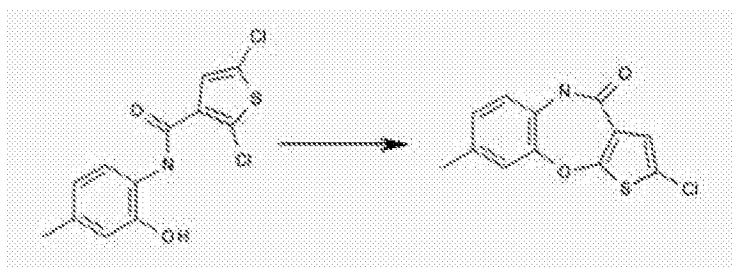
[0040]



[0041] 向 6-氨基-间甲酚 (34.14 g; 277.20 mmole; 1.1 当量) 的 THF (450 mL) 溶液中加入吡啶 (40.76 mL; 504.00 mmole; 2 当量), 而后用 30 分钟加入 2,5-二氯噻吩-3-甲酰氯 (54.30 g, 252 mmole, 1.00 当量) 的 THF (250 mL) 溶液, 使用冰浴, 保持 15-20°C 的温度。将得到的粘稠混合物在室温下搅拌 1 小时, 使得氨基苯酚完全消耗 (利用 LC-MS)。倾倒在 2M HCl 水溶液 (500 mL) 和冰 (250 mL) 的混合物上, 同时搅拌。过滤收集得到的米色固体, 用水充分洗涤, 并在空气中干燥。 $\text{MS}(\text{m/z})=301.84, 303.94(\text{M}+\text{H})^+$ 。在 40°C, 在真空烘箱中, 用 P_2O_5 干燥过夜, 得到标题中间体 (84.5g, 理论上定量)。

[0042] 制备例 3. 2-氯-8-甲基-5H-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-酮

[0043]

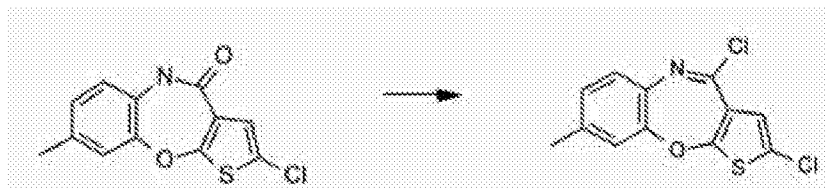


[0044] 向充分搅拌的 2,5-二氯-N-(2-羟基-4-甲基-苯基)噻吩-3-甲酰胺 (76.15 g; 252 mmole; 1.00 当量) 的二甲亚砜 (450 mL) 悬浮液中加入碳酸钾 (38.31 g; 277.20

mmole ;1.1 当量),并将该混合物加热至 100-110℃,保持 4.5 小时,LCMS 显示基本上完全转化。冷却至室温,慢慢地加到两个含有 1M 盐酸水溶液 (500 ml) 的独立烧杯中,观察到气体逸出。在室温下搅拌 0.5 小时,过滤收集所得到的暗灰色固体。用水、而后用少量的乙醇、接着用少量的二乙醚顺序洗涤。在 45℃,在真空烘箱中干燥过夜,得到标题中间体 (58.5g, 87%)。MS(m/z): =265.99(M+H)⁺。

[0045] 制备例 4. 2,4-二氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草

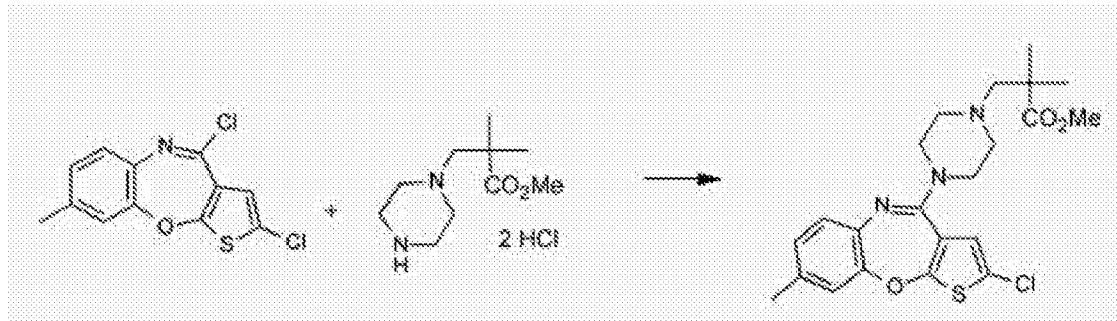
[0046]



[0047] 向 1 升圆底烧瓶中加入甲氧基苯 (225 mL, 5V)、2-氯-8-甲基-5H-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-酮 (45 g; 169.4 mmole; 1 当量) 和 N,N-二甲苯胺 (47.2 g; 389.5 mmole; 2.3 当量)。加热至 60℃,并用 0.5 小时逐滴加入磷酰氯 (85.7 g; 558.9 mmols; 3.3 当量)。加热至 100℃,并搅拌 2 小时,直到 TLC 分析显示反应完成为止。冷却至 40-60℃,蒸发,获得标题中间体暗褐色固体 (123.1 g, 433.2 mmols, 未经试验校正的产率 256%)。MS(m/z): 283.8(M+H)。

[0048] 制备例 5. 3-[4-(2-氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-基)哌嗪-1-基]-2,2-二甲基-丙酸甲酯

[0049]

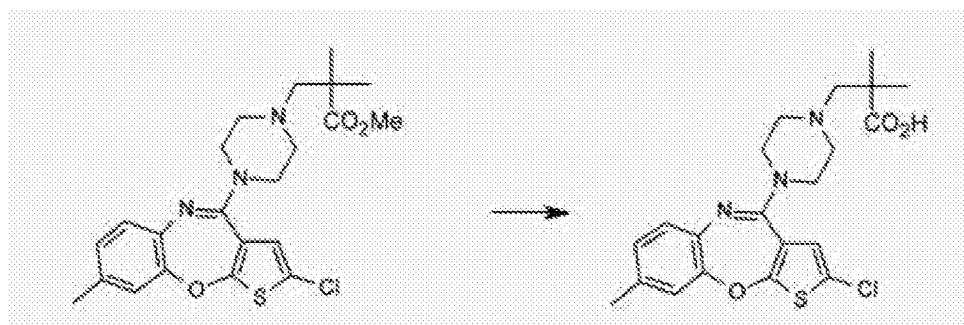


[0050] 向 1 升圆底烧瓶中加入 2,4-二氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草 (121.1 g; 169.4 mmols; 1.0 当量),而后加入乙腈 (600 mL, 12.5V),然后以一份形式加入碳酸钾 (119.4 g; 863.9 mmols)。搅拌 10-20 分钟,而后以一份形式加入 2,2-二甲基-3-(哌嗪-1-基)丙酸甲酯二盐酸盐 (55.54 g; 203.3 mmole; 1.2 当量)。加热至 80℃,搅拌 30 小时。将该混合物真空浓缩至干,然后将乙酸乙酯 (1920 mL, 40V) 和水 (1920 mL, 40V) 加入到该混合物中。搅拌,过滤,而后分离水相,并用乙酸乙酯 (960 mL, 20V) 提取。合并有机相,并用水 (960 mL×2) 和盐水 (200 mL, 4V) 洗涤。浓缩,用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯 (0 至 10%)),获得标题中间体黄色固体 (55.4 g, 123.7 mmole, 纯度 95.8%, 未经试验校正的产率 73.0%)。MS(m/z): 448.2(M+H)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.03(m, 1H), 6.91(m, 1H), 6.85(s, 1H), 6.50(s, 1H), 3.67(s, 3H), 3.47(m, 4H), 2.58-2.54(m, 6H), 2.28(s, 3H), 1.19(s, 6H)。

[0051] 实施例 1. 3-[4-(2-氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-基)

哌嗪-1-基]-2,2-二甲基-丙酸

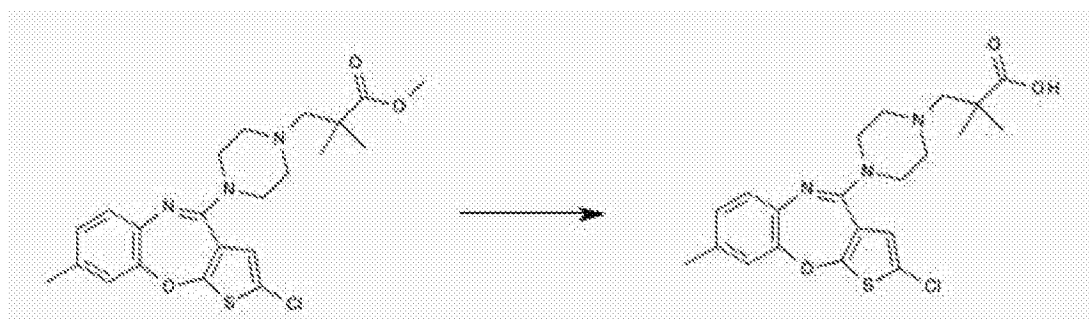
[0052]



[0053] 向2升圆底烧瓶中加入3-[4-(2-氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-基)哌嗪-1-基]-2,2-二甲基-丙酸甲酯(70.3 g;156.9 mmole;1.0当量)、异丙醇(469 mL;6.67V)和水(469 mL;6.67V)。然后加入氢氧化钠(18.83g;470.8 mmole;3.0当量),并将该混合物加热至80℃,搅拌3小时。冷却至20℃,用5M HCl水溶液中和至pH7。蒸发大部分异丙醇,然后用5M HCl水溶液将pH值调节至6-7,浓缩,除去溶剂。加入乙酸乙酯(2800 mL,40V)和水(2800 mL,40V),然后搅拌30分钟,而后过滤,获得粗品。分离水相,并用乙酸乙酯(700 mL,10V)提取。合并乙酸乙酯层,蒸发,获得粗品。将该粗品和异丙醇(500 mL,7V)加入到1升圆底烧瓶中。加热至80℃,搅拌1小时,然后慢慢地冷却至20℃。过滤,用异丙醇(70 mL,1V)洗涤滤饼,获得标题化合物黄色固体(60.4 g;138.6 mmole;纯度99.3%,试验校正的产率88.3%)。MS(m/z): 434.0(M+H)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.01(m, 1H), 6.94(m, 1H), 6.82(s, 1H), 6.50(s, 1H), 3.64(brs, 4H), 2.86(brs, 4H), 2.60(s, 2H), 2.29(s, 3H), 1.26(s, 6H)。¹³C NMR(400MHz, CDCl₃): δ 178.57, 161.10, 154.37, 152.00, 136.63, 135.64, 127.95, 127.14, 121.88, 121.20, 120.14, 118.58, 65.70, 54.46, 46.45, 41.54, 25.34, 20.70。

[0054] 实施例2. 3-[4-(2-氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-基)哌嗪-1-基]-2,2-二甲基-丙酸

[0055]

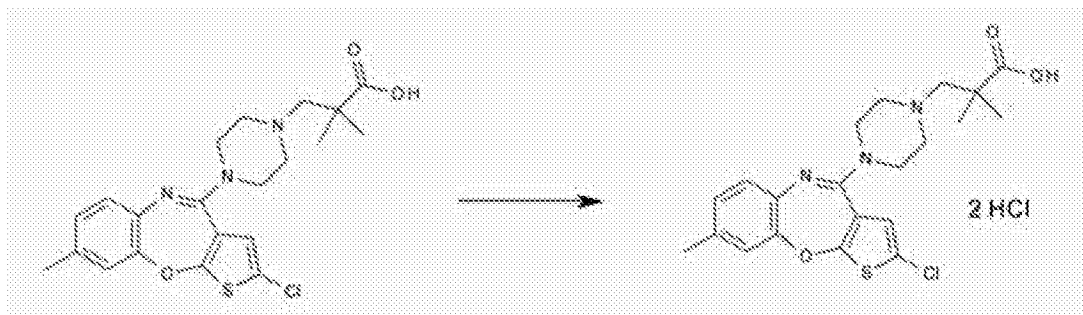


[0056] 向在异丙醇(150 mL;1.96摩尔)和水(150 mL)的混合物中的3-[4-(2-氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-基)哌嗪-1-基]-2,2-二甲基-丙酸甲酯(22.5 g;50.23 mmole;1.00当量)悬浮液中加入氢氧化钠(6.03 g;150.68 mmole;3当量),将该混合物在80℃(油浴)加热2.5小时,LC-MS显示完全转化。冷却,并用5M HCl水溶液中和至pH7。蒸发大部分异丙醇,得到精细的沉淀。用5M HCl水溶液将pH值再调节至pH7。将烧瓶在冰箱中静置0.5小时,然后过滤收集浅黄色固体,并用水洗涤。在45℃,

在真空烘箱中,用 P_2O_5 干燥过夜,得到标题化合物 (20.6g, 95%)。MS (m/z): =434.1 (M+H)⁺。

[0057] 实施例 3. 3-[4-(2-氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-基)哌嗪-1-基]-2,2-二甲基-丙酸二盐酸盐

[0058]



[0059] 使 3-[4-(2-氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-基)哌嗪-1-基]-2,2-二甲基-丙酸 (5.8 g; 13.3 mmol) 在少量的乙腈中形成浆液, 然后加入 4M 的盐酸二噁烷溶液 (14.06 g; 53.57 mmole; 4 当量), 并将得到的溶液蒸发至干。与少量的二乙醚一起研磨, 过滤收集, 在真空烘箱中干燥, 得到标题化合物 (4.74g, 70%)。MS (m/z): =434.1 (M+H)⁺。

[0060] 二盐酸盐的额外纯化

[0061] 获取 3-[4-(2-氯-8-甲基-噻吩并[2,3-b][1,5]苯并氧氮杂草-4-基)哌嗪-1-基]-2,2-二甲基-丙酸二盐酸盐 (7.5 g; 14.80 mmole; 1.00 当量), 并在乙醇 (150 mL) 中加热, 同时超声处理, 直到获得完全混合物为止。蒸干。与少量的二乙醚一起研磨, 过滤收集米色固体。研磨, 得到细粉末, 并在 50℃、在真空烘箱中干燥 2 个晚上, 得到标题化合物 (7.14g, 95%)。MS (m/z): =434.1 (M+H)⁺。

[0062] 文献数据 (Morairty SR, Hedley L, Flores J, Martin R, Kilduff TS. (2008) *Selective 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptor antagonists promote sleep in rats.* *Sleep* 31, 34-44; 以及 Barbier, A. J., 和 Bradbury, M. J., *Histaminergic Control of Sleep-Wake Cycles: Recent Therapeutic Advances for Sleep and Wake Disorders*, CNS & Neurological Disorders-Drug Targets, vol 6, pg. 31-43 (2007)), 以及非临床动物研究中得到的数据, 支持双重活性 H1 反向激动剂/5-HT_{2A}拮抗剂在治疗失眠和治疗与其它障碍, 例如, 抑郁症、焦虑症、疼痛、变态反应、肺或呼吸道障碍、精神病症、痴呆和 / 或神经变性疾病相关的失眠症状和 / 或生理节奏睡眠障碍中的作用。具体地说, 人们发现, 使用 EEG 监测的啮齿类, 某些双重活性 H1 反向激动剂/5-HT_{2A}拮抗剂可有效提高总的睡眠时间, 没有出现不相称的或临床上相关的活动减退、REM 睡眠降低或嗜睡病。

[0063] 为了进一步说明本发明化合物的特征, 他们可以进行下列体外和体内试验:

[0064] 体外结合和活性试验:

[0065] H1 竞争结合试验

[0066] 利用 SPA (闪烁近似测定法) 96 孔形式, 进行 [³H]-吡拉明结合实验。由稳定地表达重组 H1 受体 (人类) 的 HEK-293 细胞制备该试验使用的膜。通过向含有 3.5 nM [³H]-吡拉明和不同浓度的试验化合物的试验缓冲液 (67 mM Tris; pH 7.6) 中加入 WGA PVT SPA 微粒

(1mg/孔, Perkin Elmer(MA, USA) RPNQ0001) 和 3 μg 膜的混合物, 开始进行培养(10 点浓度响应曲线)。在 10 μM 曲普利啉的存在下, 测定非特异性的结合。将样品在室温下(22℃) 培养 4 小时, 而后在 Microbeta Trilux 中读数。

[0067] 5-HT_{2A}竞争结合试验

[0068] 利用 SPA 96 孔形式, 进行 [³H]-凯坦色林(Ketanserin) 结合实验。由稳定地表达重组 5-HT_{2A}受体(人类)的 AV-12 细胞制备该试验使用的膜。通过向含有 3.1 nM [³H]-凯坦色林(Ketanserin) 和不同浓度的试验化合物的试验缓冲液(67 mM Tris, 0.5 mM EDTA; pH7.6) 中加入 WGA YSi SPA 微粒(1mg/孔, Perkin Elmer(MA, USA), RPNQ0011) 和 2 μg 膜的混合物, 开始进行培养(10 点浓度响应曲线)。在 20 μM 1-(1-萘基)哌嗪的存在下, 测定非特异性的结合。将样品在室温下(22℃) 培养 4 小时, 而后在 Microbeta Trilux 中读数。

[0069] 5-HT_{2C}竞争结合试验

[0070] 利用 SPA 96 孔形式, 进行 [¹²⁵I]-(±)DOI 结合实验。由稳定地表达重组 5-HT_{2C}受体(人类)的 AV-12 细胞制备该试验使用的膜。通过向含有 0.2 nM [¹²⁵I]-(±)DOI 和不同浓度的试验化合物的试验缓冲液(50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 10 μM 优降宁, 0.1% 抗坏血酸, pH7.4) 中加入 WGA PVT SPA 微粒(0.5 mg/孔, Perkin Elmer(MA, USA), RPNQ0001) 和 2.5 μg 膜的混合物, 开始进行培养(10 点浓度响应曲线)。在 20 μM 1-(1-萘基)哌嗪的存在下, 测定非特异性的结合。将样品在室温下(22℃) 培养 4 小时, 而后在 Microbeta Trilux 中读数。

[0071] 结合数据分析

[0072] 为了获得抑制 50% 放射性配体结合时的竞争者的浓度(IC₅₀值), 使用 4 参数 logistic 非线性方程, 对曲线进行评价。按照方程式 $K_i = IC_{50} / (1 + L/K_d)$, 其中 L 等于实验中使用的放射性配体的浓度, K_d 等于放射性配体对受体的平衡离解常数(由标准饱和分析或同源竞争实验来测定), 计算平衡离解常数(K_i)。在表明 n 值的情况下, 用几何平均值 ± 标准平均误差(SEM) 来表示记录的 K_i 值, 用 n 表示平行测定的次数。利用下列方程式来计算几何平均值: $GeoMean = 10^{(平均值(\log K_{i1} + \log K_{i2} + \dots + \log K_{in}) / 平方根 n)}$ 。

[0073] 在原代神经元培养物中使用天然受体的 GABA_A的拮抗作用

[0074] 使用 96 孔 FLIPR® 系统(荧光成像读板仪(FLIPR®, Molecular Devices)), 通过监测钙流量, 评价化合物对天然 GABA_A受体的活性。简要地说, 从 E18 大鼠胚胎中分离胚性皮质神经元, 并以最佳密度涂覆在黑色壁、透明底的聚-D-赖氨酸涂渍的 96 孔 FLIPR® 板中。用钙敏感性染料(Fluo4-AM, Molecular Devices) 荷载细胞之后, 将细胞浸泡在含有低氯(被葡萄糖酸取代的氯化物)的溶液之中。在此条件下, GABA_A受体的活化引起氯离子流(沿着化学梯度的方向), 导致膜去极化, 并因此使电压门控的钙通道(VGCC) 活化。记录通过 VGCC 的钙流, 并使用 FLIPR® 系统进行脱线分析。为了药理学验证该试验, 记录标准激动剂(GABA) 和标准拮抗剂(克他命(Gabazine)) 的浓度响应曲线(CRC)。相对于 10 μM 的固定浓度的激动剂 GABA(相当于 EC₉₀ GABA 响应), 以 CRC 模式来测定任何效果。

[0075] 方法:

[0076] 在存在和不存在化合物的条件下, 使用 10 点剂量响应曲线, 将峰值荧光响应与激动剂 GABA 相比较, 定量化合物的拮抗剂效果。将试验窗口定义为: 预定 EC₉₀ 浓度的 GABA

所获得的最大响应减去完全抑制浓度的克他命 (gabazine) ($50 \mu\text{M}$) 所获得的响应。以试验窗口的百分数形式来计算拮抗剂效果。使用四参数逻辑曲线拟合程序 (Prism Graphpad® 3.01), 以相对 IC_{50} 值形式计算所有数据。将所有化合物的拮抗剂效能与克他命 (gabazine) 相比较, 每个试验操作进行三次重复试验。

[0077] 进一步的, 可以通过众所周知的方法, 针对其它生理学重要受体 (例如但不限于: hERG 通道, 其它血清素受体 (具体地说, 5-HT_{1B} 、 5-HT_{1D} 受体, 对 5-HT_{2B} 受体缺乏激动剂活性, 5-HT_{2C} 、 5-HT_5 、 5-HT_6 和 5-HT_7 受体), 多巴胺能受体 (具体地说, D_1 、 D_2 和 D_3), GABA_A 受体, 肾上腺素能受体和单胺转运体), 在结合试验和功能活性试验中检验本发明的化合物。

[0078] 基本上如上所述, 检验实施例 1 和 13 的化合物, 并且发现它们具有活性特征, 如表 1 所示。

[0079] 表 1. 选择性数据

	实施例 1	实施例 3
H1 K_i (nM)	20.6	58.8
5-HT_{2A} K_i (nM)	3.37	7.01
5-HT_{2B} K_i (nM)		121
5-HT_{2B} 激动剂 EC_{50} (nM)	—	>10,000
5-HT_{2B} 拮抗剂 K_b (nM)		78.6
5-HT_{2C} K_i (nM)	137	328
GABA_A IC_{50} (μM)		>100
hERG 通道 (μM)		>100
多巴胺 D_1 K_i (nM)		592
多巴胺 D_2 K_i (nM)	2780	>4570
多巴胺 D_3 K_i (nM)	>5510	>5680
5-HT_{1B} K_i (nM)		>5580
5-HT_{1D} K_i (nM)		>3980
5-HT_5 K_i (nM)		>8810
5-HT_6 K_i (nM)		>5830
5-HT_7 K_i (nM)		>2060
肾上腺素能 α_{1A} K_i (nM)		>10200
肾上腺素能 α_{1B} K_i (nM)		>14700
肾上腺素能 α_{2A} K_i (nM)		>8990
肾上腺素能 α_{2B} K_i (nM)		>5760
肾上腺素能 α_{2C} K_i (nM)		>4230
血清素转运体		>661
去甲肾上腺素转运体		>696
多巴胺转运体		>871

[0080] 因此, 预计生理学相关剂量的本发明化合物可基本上体内抑制 H1 和 5-HT_{2A} 受体, 同时基本上不与其它生理学相关的受体相互作用, 并由此预期可提供目标药理学活性, 同时避免不希望有的与脱靶活性相关的效果。这种不希望有的效果包括但不限于下列: 与治疗突然出现的体重增加相关的 5-HT_{2C} 拮抗剂活性, 与心脏瓣膜病相关的 5-HT_{2B} 激动剂活性, 与 QT 延长相关的 hERG 通道调节和与癫痫发作活性相关的 GABA_A 拮抗剂活性。此外, 通过优于多巴胺受体、其它血清素受体、肾上腺素能受体和单胺转运体的选择性, 避免了对睡眠 / 觉醒生理机能的干扰。

[0081] 5-HT_{2A} 受体占有率:

[0082] 为了说明对于 5-HT_{2A} 受体的体内拮抗剂 / 反向激动剂活性, 检验受体占有率。简要说, 使重量大约 230–280 克的雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (Harlan Sprague-Dawley,

Indianapolis, IN) 随意地接触食物和水, 直到 3 小时实验方案开始为止。为了建立试验有效性, 1 mg/kg 凯坦色林 (Ketanserin) (非选择性的 5-HT_{2A}拮抗剂) 用作阳性对照。通过口服填喂法给予试验化合物或对照物 (在由 20% 羟基丙基 β-环糊精组成的赋形剂中)。MDL 100907 ((R)-(+)-α-(2, 3-二甲氧基苯基)-1-[2-(4-氟苯基)乙基]-4-哌啶甲醇) (选择性的 5-HT_{2A}拮抗剂) 用作示踪物。将 MDL 100907 悬浮在含有 5 μl 稀乳酸 (1 mg/ml) 的水中, 用盐水稀释至 6 μg/ml, 并通过侧尾静脉静脉内给予 1 mL/kg 的体积, 得到 3 μg/kg 的示踪剂量。给予大鼠试验化合物、凯坦色林 (Ketanserin) 或赋形剂 (N=4), 1 小时以后, 静脉内给予 3 μg/kg 示踪剂量的 MDL 100907。在给予示踪物的时候, 认定为测定受体占有率 (RO) 的时间。给予示踪物之后十五分钟, 通过颈部脱位的方法杀死大鼠。收集血浆样品, 并取出额侧脑皮层和小脑的样品。测定每个皮层和小脑样品中的 MDL 100907 示踪物的水平。使用大家公认的比率法, 计算 RO, 这种方法使用表示总结合的高受体密度的区域 (额侧脑皮层), 利用不含有或含有极低水平受体的面积 (小脑) 对其归一化。该区域 (称为零位区域 (null region)) 代表配体探针的非特异性结合。相对于小脑, 脑皮层中的示踪物水平量 (tracer level) 的赋形剂比例代表 0% 占有率。比率 1 代表 100% 占有率, 当与 MDL 100907 示踪物的 5-HT_{2A}受体的所有特异性结合受到阻碍时, 获得该比率。为了测定 5-HT_{2A} RO 的百分比, 在赋形剂治疗动物中的示踪物水平量的比率 (0% 占有率) 和比率 1 (100% 占有率) 之间, 线性地内插法算出皮层与小脑示踪物 (得自于试验化合物预先处理的组) 的中间比率。

[0083] MDL 100907 分析:

[0084] 将脑皮层和小脑样品称重, 并放入尖底离心管 (在冰上) 中。将含有 0.1% 甲酸的四个体积 (w/v) 的乙腈加入到每个管中。然后将样品均化, 并在 14,000 RPM (21,920 x g) 下离心 16 分钟。在 HPLC 注射管瓶中, 加入 100 - 900 μL 无菌水, 将上清液稀释, 进行 LC/MS/MS 分析。使用 Agilent model 1200 HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 和 API 4000 质谱仪进行 MDL 100907 的分析。在 2.1 X 50 mm C18 柱 (Agilent 部件号: 971700-907) 上色谱分离, 移动相由 60% 乙腈 / 水组成, 总共含有 0.1% 甲酸成分。通过质量电荷比 (m/z) 由 374.2 至 123.0 监测前体物至产物离子转变, 检测 MDL 100907。向未治疗大鼠的脑组织样品中加入已知数量的分析物, 并按照上述方法处理, 由此制备标准样品。

[0085] 统计方法:

[0086] 使用 JMP® version 8.0 (SAS Institute Inc, Cary NC), 将每个研究的曲线与 4 参数逻辑函数拟合, 下限固定在 0%, 并利用该软件计算绝对 ED₅₀。以平均值、标准误差和 95% 置信区间形式得到数值。基本上如上所述, 检验实施例 3 的化合物, 并且发现达到高的 5-HT_{2A}受体占有率, ED₅₀为 0.09 mg/kg。

[0087] H1反激动作用:

[0088] 为了测定本发明化合物的反向激动剂性质, 在人类重组 H1 受体转染的 HEK293 细胞 (HEK293/hm H1 克隆 R-40) 中, 测定它们对 Wyo-肌醇 1 磷酸 (IP1) 的影响。简要地说, 使 HEK293/hm H1 细胞 (克隆 R-40) 生长至 ~90% 融合度 (confluency) (3:1 DMEM/F12, 5% FBS, 20 mM HEPES, G418 500 μg/ml, 1% 青霉素 / 链霉素 / 谷氨酰胺), 并在试验的当天使用 1x 胰蛋白酶 / EDTA (PAA Pasching, Austria L11-003) 进行收集。在刺激缓冲液 (NaCl :146 mM, CaCl₂:1 mM, KCl :4.2 mM, MgCl₂:0.5 mM, 葡萄糖 :5.5 mM, HEPES :10 mM, LiCl :50 mM) 中, 将 35 μl 细胞 (300K) 播种到 96W 半面积白色实底板 (Corning, UK 3688) 中。将试验

化合物最初溶于 100% DMSO 中,最后浓度为 100x。将其在刺激缓冲液中进一步稀释至 x2 最终试验浓度,然后将 35 μ l 此溶液加入到试验板中的细胞中。在 37°C /5% CO₂条件下,将细胞以及化合物培养 1 小时 30 分钟,而后每个加入 15 μ l HTRF IP1 检测试剂盒试剂 (CisBio 62P1APEC)。在室温下,将细胞板进一步培养一小时,而后测定 IP1 积聚状况 (Envision 读板机,Perkin Elmer)。由试验当天操作的标准 IP1 曲线外推,计算 IP1 积聚状况 (nM)。相对于正对照扑敏宁 (10 μ M, Sigma, UK P5514),表达负效果值。基本上如上所述,检测化合物 3,发现其充分抑制结构活性 (在 1 μ M 下达到 105%,在 10 μ M 下达到 85%(n=2))。

[0089] 抑制 DOI 诱导的摇头行为:

[0090] 通过本发明化合物的抑制 5-HT_{2A}受体激动剂 2,5-二甲氧基-4-碘代苯丙胺 (DOI) 诱导的头部摇动行为的能力,进一步说明本发明化合物的体内 5-HT_{2A}受体拮抗剂活性。(参见,例如 Bartoszyk GD, van Amsterdam C, Böttcher H, Seyfried CA. EMD 281014, a new selective serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 2003 473: 229-230.)。简要地说,使雄性 C57BL/6J 小鼠 (20-25 g, Charles River) 处于标准居住条件下 (32 个小鼠在一个大的 IVC 笼中,07.00 至 19.00 照明期,恒温 (19-23°C),湿度 (50% +/-10),随意地接触食物和水)。使小鼠接受赋形剂 (0.25% 甲基纤维素)、DOI (3 mg/kg,在盐水中) 或 10mg/kg 的试验化合物 PO 加上 DOI (3 mg/kg,在盐水中)。对于每个化合物,与赋形剂和 DOI+ 赋形剂 (n=8) 一起,在每个实验四个组 (且 n=4) 中,分别评价试验化合物。在用试验化合物预处理 60 分钟时间之后,使小鼠皮下接受赋形剂 (盐水) 或 3 mg/kg 剂量的 DOI,然后放入透明的有机玻璃 (perspex) 观察舱中。给予 DOI 或赋形剂之后五分钟,通过视觉观察记分,统计每个个体小鼠显示的头部摇动的数值,统计 15 分钟。使用 ANOVA 和 post-hoc Dunnet's 试验来分析数据。基本上如上所述,检验实施例 3 的化合物,并且发现它们在 10 mg/kg 下可以 100% 地抑制 DOI 诱导的摇头反应。

[0091] 监测大鼠的睡眠和行为:

[0092] 利用大鼠,检验本发明化合物的增加睡眠数量或减少睡眠中断或两者的能力,同时没有不希望的效果,例如,抑制 REM 睡眠、运动原觉醒削弱和 / 或反跳性失眠 (rebound insomnia)。利用脑电图 (EEG)、肌电图 (EMG) 和动作来连续地监测试验用动物,测定累积的非 REM 睡眠、累积的总睡眠、平均睡眠发作 (sleep bout) 持续时间、最长睡眠发作持续时间、反跳性失眠、REM 睡眠抑制和在觉醒期间的运动活性强度 (locomotor activity intensity)。这种研究的方法在本领域是已知的方法 (参见,例如,下列文献所描述的方法:Edgar DM, Seidel WF. Modafinil induces wakefulness without intensifying motor activity or subsequent rebound hypersomnolence in the rat.

J Pharmacology & Experimental Therapeutics 1997;283: 757-769; van Gelder RN, Edgar DM, Dement WC. Real-time automated sleep scoring: validation of a microcomputer-based system for mice. *Sleep* 1991,14: 48-55; 和 Gross BA, Walsh CM, Turakhia AA, Booth V, Mashour GA, Poe GR. . Open-source logic-based automated sleep scoring software using electrophysiological recordings in rats.

J Neurosci Methods. 2009;184(1):10-8)。研究进行如下:

[0093] 准备动物

[0094] 如下对成年雄性 Wistar 大鼠 (在手术时,大约 270-300 g) 进行手术式安装 EEG、

EMG 和动作的长期记录装置：将大鼠手术安装颅植入物，该植入物由记录 EEG 的四个不锈钢螺杆组成（两个在额侧 [在前凶前部 3.9 mm, 距离中间外侧 ± 2.0 mm], 两个在枕部 [在前凶后部 6.4 mm, 距离中间外侧 ± 5.5 mm]），并且安装两个 Teflon 涂渍的不锈钢丝，用于记录 EMG（位于颈背的斜方肌下）。在手术之前，将所有导线与小型连接器（Microtech, Boothwyn, PA）焊接。将不锈钢 EEG 记录螺杆、在植入物连接器和头骨之间施加的氰基丙烯酸酯以及牙科用的丙烯酸进行结合，使植入物组合件附着于头骨。通过手术放入腹部的微型传感器（Minimitter PDT4000G, Philips Respironics, Bend, OR），监测运动活性。康复至少 3 周。

[0095] 记录环境

[0096] 将每个大鼠单独放在微型隔离笼中，该笼带有嵌入的聚碳酸酯过滤器顶销（filter-top riser），使得垂向的顶部空间更大。将最低限度地限制移动的软电缆的一端与笼顶的换向器（commutator）连接，另一端与动物的颅植入物连接。将每个笼放在单独的、不锈钢睡眠-觉醒记录槽（sleep-wake recording chamber）的通风舱中。可以不限量地得到食物和水，环境温度维持在大约 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 。在整个研究过程中，使用荧光灯，保持 24 小时照明-黑暗循环（LD 12:12）。相对湿度平均大约 50%。在每个治疗前后，使动物处于未受干扰状态至少 30 小时。

[0097] 研究设计和给药

[0098] 伪随机口服给予 1 mL/kg 剂量水平的赋形剂（安慰剂，甲基纤维素，15 厘泊，0.25%，在水中）或一种试验化合物，使得大鼠不会接受两次相同的治疗，并且在任何一个研究中，使得大鼠不会接受 8 个治疗中的多于两个的治疗。从笼中取出每个大鼠，大约一分钟，进行称重和治疗。每个治疗的前后，至少 6 天“廓清”时间。

[0099] 数据收集

[0100] 可以自动辨别睡眠和失眠（wakefulness，例如，Van Gelder 等人 1991（上文）；Edgar 等人 1997（上文）；Winrow CJ 等人 *Neuropharmacology* 2010；58(1):185-94.；Gross 等人，2009（上文）。扩增 EEG，过滤（X10,000，带通 1-30 Hz），EMG 被扩增和整合（带通 10-100 Hz，RMS 整合），同时监测非特异性的运动活性（LMA）。将信号出现时间 10 秒钟内的觉醒（Arousal）状态分类为：非 REM 睡眠、REM 睡眠、失眠（wakefulness）或 theta 占优势的失眠（wakefulness）。以每分钟计数形式记录运动活性（LMA），并且利用商购的遥测接收机（ER4000, Minimitter, Bend, OR）来检测。

[0101] 统计分析

[0102] 在结果总结中概括了全部具有至少一种输出结果的动物（例如，包括了遥测数据可以使用、但 EEG 数据不能使用的动物治疗的合适数据）。将治疗后的观察期分成适合于每个结果的给药后的间隔时间，其中将给药的时间定义为：起始时刻 = 0，通过计算每小时的平均值或每个期间的累积值，将结果概括在观察期中（参见表 1 对每个结果的精确定义的说明）。为了使变化稳定，用对数标度分析睡眠发作，用线性标度分析所有其它变量。使用治疗组和治疗日期作为因子，相应的治疗前间隔时间（早于 24 小时）作为协变量，通过互变量分析来分析每个期间的每个结果。概括了每个治疗组的校正均值和自赋形剂所产生的均值的变化以及它们相应的标准误差。将对数标度分析的结果再反转化为记录几何平均值和与赋形剂结果的平均比值（mean ratio-to-vehicle results）。

[0103] 基本上如上所述,检验实施例 3 的化合物。发现 3 mg/kg 的实施例 3 的化合物显著地增加累积的 NREM 睡眠时间和累积总睡眠时间,没有显著的反跳性失眠、REM 睡眠抑制或活动强度的抑制 (LMI) (参见表 2 中的睡眠特性和运动活性强度)。

[0104]

表 2. 实施例 3 的化合物						
剂量(mg/kg PO)	效果变量			不希望的效果变量		
	累积 NREM 睡眠			反跳性失眠		
	N	校正平均值	SE	N	校正平均值	LCL
10	9	29.1	6.4	9	-3.1	-11.0
3	10	31.7	6.1	10	0.3	-7.3
1	4	34.0	9.0	4	1.6	-9.8
0.5	4	32.9	9.0	4	-5.0	-16.3
0.25	12	37.9	6.0	12	-2.2	-9.8
0.1	8	26.7	7.4	8	-3.7	-13.0
0.05	14	23.4	5.7	14	0.2	-7.0
0.035	7	19.2	7.1	7	1.3	-7.7
0.025	10	6.5	6.1	10	1.4	-6.3

[0105]

累积总睡眠				REM 抑制		
剂量(mg/kg PO)	N	校正平均值	SE	N	校正平均值	LCL
10	9	26.5	7.1	9	-9.4	-3.8
3	10	29.7	6.8	10	-4.6	0.7
1	4	33.6	10.1	4	-0.1	7.8
0.5	4	30.9	10.1	4	0.4	8.2
0.25	12	38.9	6.7	12	2.0	7.2
0.1	8	28.7	8.3	8	4.9	11.4
0.05	14	25.3	6.5	14	4.2	9.2
0.035	7	18.9	8.0	7	-1.8	4.4
0.025	10	7.7	6.9	10	0.5	5.8

平均睡眠发作				运动活性强度		
剂量(mg/kg PO)	N	校正平均值	SE	N	校正平均值	LCL
10	9	2.0	0.2	9	-1.9	-0.1
3	10	2.0	0.2	10	-3.1	-1.3
1	4	1.7	0.3	4	-1.6	0.9
0.5	4	1.8	0.3	4	0.6	3.1
0.25	12	2.1	0.2	10	-0.7	1.1
0.1	8	1.7	0.2	8	0.1	2.3
0.05	14	1.6	0.2	10	-0.3	1.6
0.035	7	1.3	0.2	6	0.2	2.4
0.025	10	1.2	0.1	9	0.2	2.1

最长睡眠发作			
剂量(mg/kg PO)	N	校正平均值	SE
10	9	2.3	0.3
3	10	2.7	0.3
1	4	2.0	0.3
0.5	4	2.2	0.4
0.25	12	2.0	0.2
0.1	8	1.5	0.2
0.05	14	1.4	0.2
0.035	7	1.1	0.2
0.025	10	1.1	0.1

[0106] 表 2. 结果统计：

[0107] 缩写：N= 试样量；校正平均值 = 相对于赋形剂对照物的校正组平均值；SE= 平均标准误差；LCL= 低于 95% 置信区间，NREM= 非 REM，即，REM 睡眠之外的所有睡眠。平行参考赋形剂组的试样量是 N=27。

[0108] 定义和单位—平均值是用与赋形剂对照物的差值来校正的：

[0109] ●累积睡眠：治疗后的第一个 6 小时内的睡眠时间（分钟）（‘总睡眠’表示 NREM 睡眠 +REM 睡眠）。

[0110] ●平均睡眠发作 :在治疗后的第一个 6 小时内,平均睡眠发作的平均小时值,表示为 :比赋形剂对照物提高 n 倍。

[0111] ●最长睡眠发作 :治疗后的第一个 6 小时内的最长睡眠发作,表示为 :比赋形剂对照物提高 n 倍。

[0112] ●反跳性失眠 :在照明期间的第一个 3 小时 (即,治疗后的 7th、8th和 9th小时) 期间的 NREM+REM 睡眠的累积分钟数。

[0113] ● REM 抑制 :在治疗后的第一个 12 小时期间的 REM 睡眠的累积分钟数。

[0114] ●运动活性 (LMA) 强度 :表示为 :EEG 确定的觉醒的每分钟 LMA 计数,其是治疗后第一个 6 小时的平均值。

[0115] 测定效果

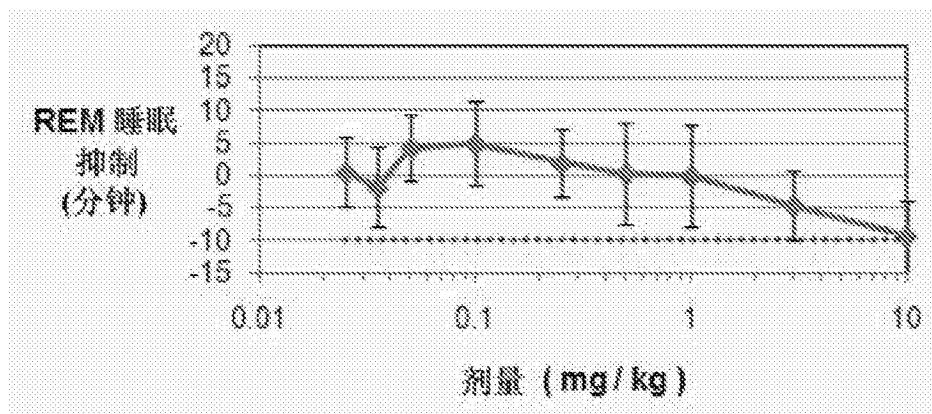
[0116] 将治疗之后 6 小时期间的每个变量的提高 (相对于赋形剂对照物) 对 log (剂量) 绘图,计算四个效果变量中的每个变量的阈值效果。每个变量的阈值效果是利用 4 参数逻辑非线性回归评估的剂量,这可以得到确定的效果阈值 ;+30 分钟的额外累积非 REM 睡眠, +25 分钟的额外累积总睡眠,平均睡眠发作持续时间提高 1.75x,最长睡眠发作持续时间提高 1.5x。发现实施例 3 的化合物具有如表 3 所示的阈值有效剂量。

[0117]

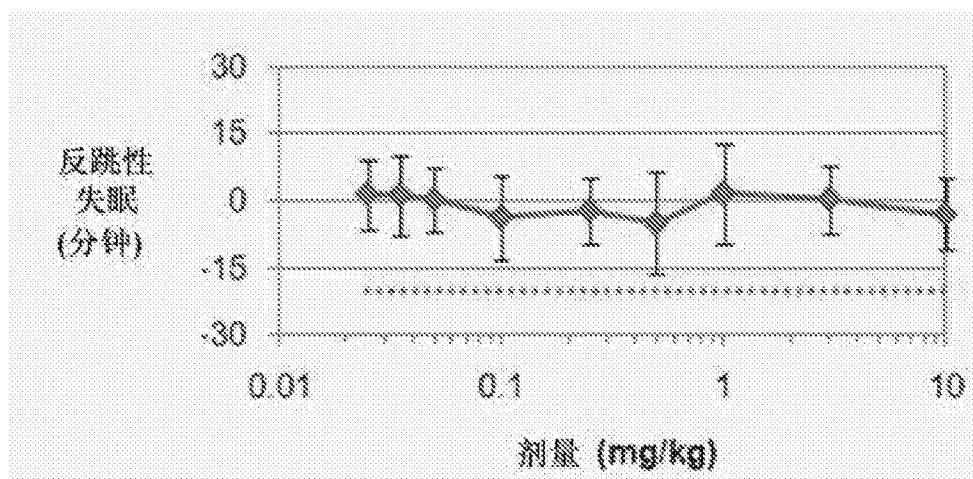
表 3	评估效果 剂量(mg/kg)	95%置信区间(mg/kg)
NREM 累积=30 分钟	0.09	0.04-n.e.*
总睡眠累积=25 分钟	0.05	0.03-0.09
最长睡眠发作(提高 1.75 倍)	0.12	0.07-0.20
平均睡眠发作(提高 1.5 倍)	0.04	0.03-0.06

*n.e.=统计上不可估计。

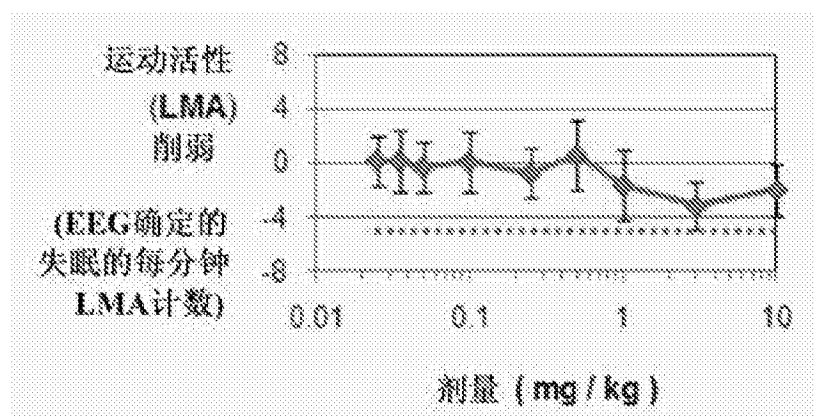
[0118]



[0119]



[0120]



[0121] 测定不希望有的效果

[0122] 画出每个‘不希望有的效果’结果变量（参见表2的定义说明）对 $\log(\text{剂量})$ 的曲线。REM抑制的阈值定义为：REM睡眠累计减少-10分钟。反跳性失眠的阈值定义为-20分钟。降低的LMI的阈值定义为：EEG确定的觉醒的每分钟-5运动活性计数（-5 locomotor activity counts per minute of EEG-defined wakefulness）。显著的不希望有的效果定义为：在10倍平均有效剂量或小于10倍平均有效剂量下，当下置信限低于任何剂量下的阈值时出现的效果，并且在高于阈值效果剂量的剂量下，剂量反应趋势明显。对于实施例3的化合物，在高达至少1.2 mg/kg的剂量下（1.2 mg/kg是最保守效果剂量0.12 mg/kg的10倍[表3]），没有观察到不希望有的REM抑制、反跳性失眠或LMI降低的出现。负值分别表示REM抑制、反跳性失眠和LMI降低。

[0123] 在进一步研究中，本发明的化合物可以与选择性的血清素再摄取抑制剂共同给予，显示增强它们对非快速动眼睡眠（NREM睡眠）和睡眠保持的效果。在基本上如上面对单独化合物所述的大鼠睡眠研究中，实施例3的化合物与西酞普兰共同给予，发现在显著低的剂量下可显著地增加NREM睡眠。

[0124] 血浆廓清率：

[0125] 在用于治疗睡眠障碍（例如，失眠）的化合物中，重要的是，它能够以合适的廓清率充分地、充分地清除，从而避免不希望有的效果，例如，超过目标睡眠时间的嗜睡延长、白天嗜睡、觉醒之后认知能力削弱，等等。本发明提供了具有改善的廓清率的化合物。可以基本上如下所述检验廓清率。

[0126] 从 Charles River, Wilmington, MA 01887, USA 获得内置股动脉套管的雄性 Sprague Dawley 大鼠 (体重范围 250-320 g)。静脉内给予试验化合物溶液 (1 mL/kg), 该溶液是在 20% Captisol®/22.5 mM 磷酸盐缓冲液中, pH2, 最终药物浓度为 1.0 mg/ml (游离碱当量)。使用内置套管用 24 小时获取血样。通过离心获得血浆样品, 并在分析之前冷冻 (-20°C) 保存或保存在干冰上。

[0127] 从 Marshall Bioresources, USA 获得雄性 Beagle 狗 (体重范围 10-12 kg)。静脉内给予试验化合物溶液 (1 mL/kg), 该溶液是在 20% Captisol®/22.5 mM 磷酸盐缓冲液中, pH2, 最终药物浓度为 1.0 mg/ml (游离碱当量)。用 24 小时从颈静脉获取血样。通过离心获得血浆样品, 并在分析之前冷冻 (-20°C) 保存。

[0128] 将冷冻血浆样品解冻至室温, 生物分析试验化合物的浓度。将相关的内部标准化合物 (在乙腈/甲醇 (1:1, v/v) 中) 加入到所有的血浆样品中 (1:1, v/v)。将样品离心, 去除沉淀的蛋白, 而后分析。如下分析上清液: 将上清液注射到 Javelin Betasil C18 柱上, 并进行快速的梯度洗脱 (20 x 2.1 mm 柱体, 移动相 A: 水/1M NH_4HCO_3 , 2000:10 v/v, 移动相 B: MeOH/1M NH_4HCO_3 , 2000:10 v/v)。使用 Sciex API 4000 三重四极质谱仪, 通过 LC-MS-MS 分析来检测洗脱的分析物。由相同条件下制备和分析的标准样品来测定化合物的浓度。使用 Watson 7.4 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 非隔室模型分析法 (Non-compartmental Analysis), 计算廓清率。

[0129]

$$\text{廓清率} = \frac{\text{剂量}}{\text{血浆浓度/时间曲线下的面积}}$$

[0130] 基本上如上所述, 检验实施例 1 和 3 的化合物, 并且发现它们具有有利的廓清率:

实施例	廓清率 (mL/min/Kg)	
	大鼠	狗
[0131] 1	14.1(+/-6.9, n=3)	-
3	14.5(+/-1.4, n=3)	3.2(+/-0.7, n=3)

[0132] 尽管可以在不利用任何制剂的条件下给予本发明方法所使用的化合物, 但通常以含有该化合物或其可药用盐 (作为活性组分) 和至少一种可药用载体、稀释剂和/或赋形剂的药物组合物形式给予该化合物。可以通过各种途径给予这些组合物, 包括口服、舌下、鼻部、皮下、静脉内和肌内。这种药物组合物和制备它们的方法在本领域为大家所熟知。参见, 例如, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (University of the Sciences in Philadelphia, ed., 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins Co., 2005)。

[0133] 优选, 将组合物配制成单位剂型, 每个剂量包含大约 0.1 至大约 60 mg 活性组分, 更通常含有大约 0.5 至大约 30 mg, 例如, 在大约 1 和大约 10 mg 之间。术语“单位剂型”是指适合作为人类个体及其它哺乳动物的单元剂量的物理离散单位, 每个单位包含预定数量的、经计算能产生目标治疗效果的活性物质以及至少一种合适的可药用载体、稀释剂和/

或赋形剂。

[0134] 式 I 的化合物通常在很宽的剂量范围内是有效的。例如,每天剂量通常落在大约 0.002 至大约 1.0 mg/kg 体重范围内,更通常为大约 0.008 至 0.5 mg/kg 体重,例如,在 0.015 和 0.15 mg/kg 体重之间。在有些情况下,低于上述范围下限的剂量水平可能是更合适的,而在其它情况下,在不引起任何不良反应的情况下,可以使用更大剂量,因此,上述剂量范围意在不是以任何方式来限制本发明的范围。应该理解,根据有关情况,包括所治疗的病症、选择的给药途径、实际给予的化合物、个体患者的年龄、重量和响应、和患者症状的严重程度,实际给予的化合物的量由医生来确定。