



(21) 申请号 202080089936.X

A61K 31/53 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.25

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114901665 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2022.08.12

CN 1056879 A, 1991.12.11

CN 111051309 A, 2020.04.21

(66) 本国优先权数据

201911364028.2 2019.12.26 CN

CN 111164084 A, 2020.05.15

Robert D. Leone et al..Targeting

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.24

adenosine for cancer

immunotherapy.JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY

OF CANCER.2018,第6卷第3页.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2020/139690 2020.12.25

W. Sihver et al..Binding of tritiated

and radioiodinated ZM241,385 to brain A2A

adenosine receptors.Nuclear Medicine and

Biology.2004,第31卷第173页第1-2段,第174页

fig 1,第175页右栏第2段.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/129843 ZH 2021.07.01

Peter W. R. Caulkett et al..Novel

adenosine A2Areceptor ligands: A

synthetic, functional and computational

investigation of selected literature

adenosine A2A receptor antagonists for

extending into extracellular space.HEJ.

CHEM. SOC. PERKIN TRANS..1995,第1卷第

3427-3428页,表1.

(73) 专利权人 浙江春禾医药科技有限公司

地址 311122 浙江省杭州市文一西路1500
号4幢1606室

(72) 发明人 孙三兴 陈正树 叶进启 赵龙

胡崇波 杨勇 管峰 潘姝花

胡宁 潘婷婷 宋国伟 侯方杰

(74) 专利代理机构 上海巔石知识产权代理事务

所(普通合伙) 31309

专利代理师 游琦 张琤

审查员 岳蓓蓓

(51) Int.Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书84页 附图3页

(54) 发明名称

三唑并三嗪衍生物在治疗疾病中的用途

(57) 摘要

本申请涉及一种三唑并三嗪衍生物或其药
学上可接受的溶剂化物或盐在制备治疗疾病的
药物中的用途,以及治疗疾病的方法。

1. 化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗疾病的药物中的用途,其中所述疾病为淋巴瘤,其中所述化合物为:2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述化合物的药学上可接受的盐包括乙酸盐。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物被制备为适于口服给药。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物还包含药学上可接受的载剂。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述药学上可接受的载剂包括环糊精。

三唑并三嗪衍生物在治疗疾病中的用途

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医药领域,具体的涉及一种三唑并三嗪衍生物,其能够治疗疾病。

背景技术

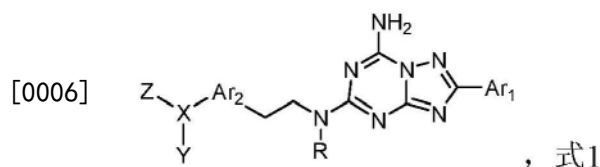
[0002] 帕金森氏病是由于神经元的慢性、进行性退化的结果而发生的,其原因目前还没有完全清楚。它在临床上表现出的主要症状形式有静止性震颤、僵硬、运动过缓和姿势不稳。目前的治疗方法主要基于一种多巴胺替代疗法,干扰多巴胺能和/或胆碱能的信号级联。然而,这些临床症状往往不能从现有疗法中得到令人满意的控制,体现为大脑、脊髓神经和外周植物神经系统的非多巴胺能病变,在现有疗法下,许多帕金森病患者患有残疾。因此,开发发展能减慢、制止或逆转疾病进展的新疗法是帕金森氏症研究中的当务之急。

[0003] 目前,癌症仍然是主要的全球健康负担。尽管在癌症的治疗方面有所进展,但对于更有效且毒性更小的治疗仍然存在未满足的医疗需求,尤其对于患有对现有治疗具有抗性的晚期疾病或癌症的那些患者。近年来,人们已深刻认识到淋巴细胞在肿瘤免疫中的重要性。机体对肿瘤的免疫反应包括免疫监测,在识别到肿瘤相关抗原后,这种与细胞介导的免疫有关的机制可以有效地清除新生成的肿瘤细胞。虽然抗体介导的抗癌作用也通常存在,但一般都比细胞免疫介导的抗癌作用小得多。因此,亟需开发有前景的抗癌新制剂以满足医学需求。

发明内容

[0004] 本申请提供了一种三唑并三嗪衍生物或其药学上可接受的溶剂化物或盐在制备治疗疾病的药物中的用途,以及治疗疾病的方法,所述疾病包括肿瘤、帕金森氏症。本申请的化合物在治疗疾病中至少具有以下一种性质:(1)良好的药代动力学性质,较高的体内暴露量和生物利用度;(2)改善帕金森受试者的运动能力;和/或(4)抑制肿瘤生长,减小肿瘤体积。

[0005] 一方面,本申请提供了式1的化合物在制备治疗疾病的药物中的用途,



[0007] 其中:

[0008] R为氢或甲基;Ar₁为任选地带取代基的呋喃基,任选地带取代基的苯基,或任选地带取代基的吡啶基;任意的任选地带取代基的芳环被卤素或氧代基取代;Ar₂为任选地带取代基的苯基,任选地带取代基的吡啶基,或任选地带取代基的嘧啶基;任意的任选地带取代基的芳环被卤素、羟基、氰基或甲氧基取代;X为氧或氮;

[0009] 且Y和Z各自独立地为氢、任选地带取代基的C₁₋₃烷基、任选地带取代基的C₁₋₅环烷基、任选地带取代基的杂环烷基、任选地带取代基的杂环烷基烷基、任选地带取代基的芳

基、任选地带取代基的C₁₋₃烷基羰基、任选地带取代基的C₁₋₅环烷基羰基、任选地带取代基的杂环烷基羰基、任选地带取代基的杂环烷基烷基羰基、任选地带取代基的芳基羰基,或任选地带取代基的杂芳基羰基;任意的所述任选地带取代基的基团被卤素、羟基、甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、烷基氨基、环烷基氨基、杂环基、芳基、杂芳基,或C₁₋₃烷基聚氧乙烯基取代;或者,Y和Z连接以形成任选地带取代基的具有5至7个环原子的杂环烷基;任意的所述任选地带取代基的环被卤素、氧代基、甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基,或三氟乙氧基取代;或者Y或Z不存在,或其药学上可接受的溶剂化物或盐。

[0010] 在某些实施方式中,的R为氢基;Ar₁为2-呋喃基;Ar₂为任选地带取代基的苯基;任意的所述任选地带取代基的苯基被卤素取代;X是氧或氮;且Y和Z各自独立地为氢、任选地带取代基的C₂₋₃烷基、任选地带取代基的杂环烷基,或任选地带取代基的杂环烷基烷基;任意的所述任选地带取代基的基团被甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基、三氟乙氧基,或C₁₋₂烷基聚氧乙烯基取代;或Y和Z连接以形成吗啉基环;或Y或Z不存在,或其药学上可接受的溶剂化物或盐。

[0011] 在某些实施方式中,所述式1的化合物中的R为氢;Ar₁为2-呋喃基;Ar₂为苯基;X为氮;且Y和Z各自独立地为氢、任选地带取代基的乙基或任选地带取代基的氧杂环丁烷基;任意的所述任选地带取代基的基团被甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基或三氟乙氧基取代;或Y和Z连接以形成吗啉基环,或其药学上可接受的溶剂化物或盐。

[0012] 在某些实施方式中,所述化合物选自下组:

[0013] N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-3-吗啉丙烷酰胺;

[0014] N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-2-吗啉丙烷酰胺;

[0015] N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)新戊酰胺;

[0016] N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-3-羟基-2,2-二甲基丙酰胺;

[0017] N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-2-羟基-2-甲基丙酰胺;

[0018] N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-4-甲基四氢-2H-吡喃-4-羧酰胺;

[0019] 2-(呋喃-2-基)-N5-(2-(嘧啶-4-基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0020] 2-(呋喃-2-基)-N5-(2-(吡啶-3-基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0021] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]-三嗪-5,7-二胺;

[0022] N5-(4-(2-(氮杂环丁烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0023] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并

[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0024] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙氧基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0025] N5-(4-(2-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0026] (R)-N5-(4-(2-(3-氟吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0027] (S)-N5-(4-(2-(3-氟吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0028] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((2-吗啉代乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0029] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0030] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((四氢呋喃-3-基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0031] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0032] N5-(4-(双(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0033] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁烷-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0034] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁-3-基甲基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0035] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((1-甲氧基丙烷-2-基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0036] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((2-甲氧基乙基)(甲基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0037] N5-(4-(乙基(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0038] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0039] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0040] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0041] N5-(4-((2-乙氧基乙基)氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0042] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((2-(2,2,2-三氟乙氧基)乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0043] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((3-甲氧基丙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0044] 2-((4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)-苯基)氨基)乙腈;

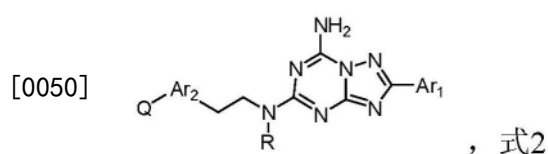
[0045] N5-(4-(1,3-二甲氧基丙烷-2-基氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0046] 2-(3-氟苯基)-N5-(4-((2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;和

[0047] 2-(3-氟苯基)-N5-(4-(氧杂环丁烷-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0048] 或其药学上可接受的溶剂化物或盐。

[0049] 另一方面,本申请提供式2的化合物在制备治疗疾病的药物中的用途,



[0051] 其中,R为氢或甲基;Ar1为任选地带取代基的呋喃基,任选地带取代基的苯基,或任选地带取代基的吡啶基;任意的任选地带取代基的芳环被卤素或氧代基取代;Ar2为任选地带取代基的苯基,任选地带取代基的吡啶基,或任选地带取代基的嘧啶基;任意的任选地带取代基的芳环被卤素、羟基、氰基或甲氧基取代;

[0052] 且Q为任选地被X取代的5-6元芳族环、任选地在氮上被Y和Z取代的氨基羰基基团、任选地在氮上被Y和Z取代的氨基磺酰基基团、硝基基团、或氰基基团;X为卤素或任选地被取代的C1-3烷基;任意的所述任选地被取代的烷基基团被卤素、氰基、甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、芳基或杂芳基取代;Y和Z各自独立地为氢或任选地被取代的C1-3烷基;任意的所述任选地被取代的烷基基团被卤素、羟基、甲基、烷基氨基或环烷基氨基取代;或者Y和Z连接以形成具有5至7个环原子的任选地被取代的环;任意的所述任选地被取代的环被卤素、甲基、乙基、三氟甲基或三氟乙基取代,或其药学上可接受的溶剂化物或盐。

[0053] 在某些实施方式中,所述式2的化合物中,R为氢;Ar₁为2-呋喃基;Ar₂为苯基或吡啶基;且Q为硝基、氰基,或任选地被X取代的5-6元芳族环;X为任选地被取代的C1-3烷基;任意的所述任选地被取代的烷基被卤素、氰基、甲氧基、芳基或杂芳基取代,或其药学上可接受的溶剂化物或盐

[0054] 在某些实施方式中,所述式2的化合物中,R为氢;Ar₁为2-呋喃基;Ar₂为苯基;且Q为任选地被X取代的四唑环;X为任选地被取代的C1-3烷基;任意的所述任选地被取代的烷基中被卤素、氰基或甲氧基取代,或其药学上可接受的溶剂化物或盐。

[0055] 在某些实施方式中,所述化合物选自下组:

[0056] 4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基氨基)乙基)-N,N-二甲基苯甲酰胺;

[0057] N5-(4-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0058] N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]

[1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0059] N5-(4-(2-乙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0060] N5-(4-(2-异丙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0061] N5-(4-(2-丙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0062] 2-(5-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基氨基)乙基)-苯基)-2H-四唑-2-基)乙腈;

[0063] 4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基氨基)乙基)-苄腈;

[0064] N5-(4-(2-(2,2,2-三氟乙基)-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0065] N5-(4-(2-(2-甲氧基乙基)-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0066] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(吡啶-2-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0067] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(吡啶-3-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0068] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(吡啶-4-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0069] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(嘧啶-2-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0070] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0071] N5-(4-(2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0072] 2-(呋喃-2-基)-N-(4-(甲基磺酰基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-胺;

[0073] 2-(3-氟苯基)-N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;和

[0074] N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-苯基-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;和

[0075] 2-(呋喃-2-基)-N5-(2-(6-(2-甲基-2H-四唑-5-基)吡啶-3-基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺,

[0076] 或其药学上可接受的溶剂化物或盐。

[0077] 在某些实施方式中,所述化合物选自下组:

[0078] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁烷-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0079] 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-((2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0080] N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;和

[0081] N5-(4-(2-乙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;

[0082] 及其药学上可接受的溶剂化物或盐。

[0083] 在某些实施方式中,所述化合物的药学上可接受的溶剂化物或盐包括乙酸盐和/或苯磺酸盐。

[0084] 在某些实施方式中,所述化合物的药学上可接受的溶剂化物或盐包括2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁烷-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺乙酸盐和/或N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺苯磺酸盐。

[0085] 在某些实施方式中,所述疾病包括帕金森氏症。

[0086] 在某些实施方式中,所述疾病包括肿瘤。在某些实施方式中,所述肿瘤包括实体瘤和非实体瘤。在某些实施方式中,所述实体瘤包括结肠癌和黑色素瘤。在某些实施方式中,所述非实体瘤包括淋巴瘤,例如,B细胞淋巴瘤。

[0087] 在某些实施方式中,所述药物被制备为适于口服给药和/或注射给药。

[0088] 在某些实施方式中,所述药物还包含药学上可接受的载剂。例如,所述药学上可接受的载剂可包括环糊精。

[0089] 另一方面,本申请提供了治疗疾病的方法,其包括以下的步骤:向有需要的受试者施用治疗有效剂量的本申请所述的化合物。

[0090] 在某些实施方式中,所述疾病包括帕金森氏症。

[0091] 在某些实施方式中,受试者表现出帕金森氏症的早期征兆。

[0092] 在某些实施方式中,所述受试者之前接受或未接受治疗帕金森氏症的药物。

[0093] 在某些实施方式中,所述受试者在施用所述化合物之前、同时或之后,接受治疗帕金森氏症的药物。

[0094] 在某些实施方式中,所述受试者产生对治疗帕金森氏症的药物的耐药性。

[0095] 在某些实施方式中,所述治疗帕金森氏症的药物包括多巴胺。

[0096] 在某些实施方式中,所述治疗包括降低所述受试者的帕金森氏病症的发展速度,和/或延缓所述受试者的帕金森氏病症的临床发展。

[0097] 在某些实施方式中,所述受试者的帕金森氏病症发展速度通过UPDRS评价。

[0098] 在某些实施方式中,所述治疗包括延迟所述受试者对抗帕金森病症对症治疗的需求。

[0099] 在某些实施方式中,所述治疗包括降低所述受试者对抗帕金森病症对症治疗需求的

风险。
[0100] 在某些实施方式中,所述疾病包括肿瘤。在某些实施方式中,所述肿瘤包括实体瘤和非实体瘤。在某些实施方式中,所述实体瘤包括结肠癌和黑色素瘤。在某些实施方式中,所述非实体瘤包括淋巴瘤,例如,B细胞淋巴瘤。

- [0101] 在某些实施方式中,所述化合物的给药方法为口服给药和/或注射给药。
- [0102] 在某些实施方式中,所述化合物的施用频率为每天一次或每天两次。
- [0103] 在某些实施方式中,所述化合物的给药剂量为约0.001mg/kg至约500mg/kg。
- [0104] 在某些实施方式中,所述化合物的给药剂量为约1mg/kg至约100mg/kg。
- [0105] 在某些实施方式中,所述受试者在施用所述化合物之前、同时或之后,接受治疗肿瘤的免疫疗法。
- [0106] 在某些实施方式中,所述治疗肿瘤的免疫疗法包括免疫检查点抑制剂。
- [0107] 在某些实施方式中,所述治疗肿瘤的免疫疗法包括PD-1抗体。
- [0108] 另一方面,本申请提供了药物组合或试剂盒,其包括(1)所述的化合物,和(2)治疗帕金森氏症的药物。
- [0109] 在某些实施方式中,所述治疗帕金森氏症的药物包括多巴胺。
- [0110] 另一方面,本申请提供了药物组合或试剂盒,其包括(1)所述的化合物,和(2)治疗肿瘤的免疫疗法。
- [0111] 在某些实施方式中,所述治疗肿瘤的免疫疗法包括免疫检查点抑制剂。
- [0112] 在某些实施方式中,所述治疗肿瘤的免疫疗法包括PD-1抗体。
- [0113] 本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的,本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地,本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的,而非为限制性的。

附图说明

- [0114] 本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述 of 示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下:
- [0115] 图1显示的是本申请化合物的盐的XRPD结果。
- [0116] 图2显示的是本申请化合物的盐的¹H-NMR的谱图结果。
- [0117] 图3显示的是本申请化合物的盐的DSC、TGA结果。

具体实施方式

- [0118] 以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。
- [0119] 术语定义
- [0120] 在本申请中,术语“烷基”通常是指包括含有一定碳原子数的直链和支链饱和脂肪族烃基。例如,C₄烷基包括正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。术语“环烷基”通常是指包括含有一定碳原子数的单环和双环饱和脂肪族烃基。
- [0121] 在本申请中,术语“烯基”通常是指包括含有至少一个碳-碳双键的直链和支链脂肪族烃基。例如,存在一个碳-碳双键。
- [0122] 除非另有说明,术语“芳基”通常是指包括含有5至14个环原子的单环和双环芳环,

在某些情形中,含有6至10个环原子。所述芳基可以任选地被一个或多个取代基取代。除非另有说明,术语“芳基”还可以包括含有5至14个环原子的单环和双环杂芳基环,在某西情形中,含有6至10个环原子。

[0123] 在本申请中,术语“杂环烷基”通常是指包括含有3至14个环原子的饱和单环和双环系统,例如含有4至10个环原子,其中,所述原子中的一个或一个以上是非碳元素,例如氮、氧或硫,这些杂元素既可单独存在,也可与其它杂元素一起存在。杂环烷基的例子包括,例如氮杂环丁烷基、六氢氮杂吡啶基、哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、吗啉基、四氢呋喃基、硫代吗啉基和四氢噻吩基,以及其N-氧化物。

[0124] 在本申请中,术语“卤素”通常是指包括氟、氯、溴和碘。术语“三氟甲基”通常是指“-CF₃”基团,术语“羟基(“hydroxyl”或“hydroxy”)"通常是指“-OH”基团。

[0125] 在本申请中,术语“抗帕金森氏症对症治疗”通常包括任何治疗帕金森氏症的治疗方法,包括但不限于溴隐亭、苯扎托品、左旋多巴、罗匹尼罗、普拉克索、罗替戈汀、卡麦角林、恩他卡朋、托卡朋、金刚烷胺、培高利特、阿朴吗啡、麦角乙脲或司来吉兰。术语“延迟对抗帕金森氏病对症治疗的需要”是指对照没有接受本申请所述化合物的患者,延迟接受本申请所述化合物的帕金森氏症患者对抗帕金森氏病对症治疗的需要。

[0126] 在本申请中,术语“减低帕金森氏症发展速度”通常是指减低帕金森氏症患者经历的恶化,例如此恶化可通过对照在一段时间里没有接受本申请所述的化合物的帕金森氏症患者所经历的恶化,借由UPDRS评分量化。发展速度通过总帕金森氏症统一评分量表(Total Unified Parkinson's Disease Rating Scale,总UPDRS)评分量化。总UPDRS评分增长代表帕金森氏症的症状发展,以及在一段时间内的UPDRS评分增长的增量代表帕金森氏症症状的进展程度。

[0127] 在本申请中,术语“功能衰退”通常是指在借由总UPDRS评分决定的帕金森氏症患者症状的随时间的恶化。

[0128] 在本申请中,术语“延迟对抗帕金森氏病对症治疗的需要”通常是指对照没有接受本申请所述的化合物的患者,延迟接受所述化合物的帕金森氏症患者对抗帕金森氏病对症治疗的需要。

[0129] 在本申请中,术语“帕金森氏症的早期征兆”通常包括以下一种或多种征兆:

[0130] a) 静止时单手4-8赫兹搓丸样震颤;

[0131] b) 在静止时震颤最大,在移动时减少,在睡眠时无震颤;

[0132] c) 活动僵硬和缓慢(心动过缓),活动下降(运动功能减退),启动活动困难(失去活动能力);

[0133] d) 脸变得面具样的,口张开,眨眼减慢,这可能会与沮丧混淆;

[0134] e) 体态变得弯曲;

[0135] f) 启动走路困难;步态蹒跚且是小步伐,手臂弯曲至腰间以至不会随步伐摇摆;

[0136] g) 有时步伐会无意的加快,患者有时会突然开始小跑以保持不跌倒(步伐慌张);

[0137] h) 由于失去姿势反射,当重心被移动了,趋于前倾(推进)或向后(逆向推进);

[0138] i) 发音变弱,特征单调,口吃,发声困难;

[0139] j) 运动功能减退以及末端肌肉组织控制受损,导致写字过小症和日常活动困难增加;

[0140] k) 少有的眨眼以及缺乏面部表情;

[0141] l) 运动减少;

[0142] m) 姿势反射障碍;和/或

[0143] n) 典型的步态异常。

[0144] 本申请中帕金森氏症患者所处的阶段是指由Hoehn和Yahr描述的取决于症状的以下5个显著阶段 (Hoehn MM, Yahr MD, Parkinsonism: onset, progression and mortality. Neurology 1967, 17: 427-42)。

[0145] 第I阶段: (轻度或早期的疾病): 症状影响身体的一侧。

[0146] 第II阶段: 身体的两侧都受影响, 但体态保持正常。

[0147] 第III阶段: (中度的疾病): 身体的两侧都受影响, 且在站立和行走中显示轻微的不平衡; 但患者能保持独立。

[0148] 第IV阶段 (晚期的疾病): 身体的两侧都受影响, 且在站立和行走中显示受损的不稳定性; 此阶段患者需要大量的帮助。

[0149] 第V阶段: 表现为严重的、全面发展的疾病; 患者被限制在床或椅子上。

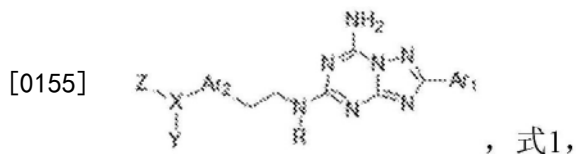
[0150] 在本申请中, “帕金森氏症早期患者” 是指处于由Hoehn和Yahr定义的帕金森症第I或第II阶段的患者, 其不需要抗帕金森氏症对症治疗。例如, 那些患者至少在随后的9个月内不需要抗帕金森氏症对症治疗。可通过执行相关的测试来确认那些处于早期的帕金森氏症患者。

[0151] 在本申请中, 术语“延缓帕金森氏症的临床发展” 通常是指对照没有接受本申请所述化合物的受试者, 接受所述化合物的受试者在经过所述化合物完全的对症作用后的期间里, 例如接受所述化合物12周后, 获得更低的总UPDRS评分增长速度。或对照延迟接受所述化合物治疗的受试者, 在经过一段足够的时间以消除由延迟开始所述化合物治疗引起的变化后, 总UPDRS评分显示更低的恶化。足够的时间为, 在初次接受所述化合物治疗后必要地超过52周 (例如, 至少超过72周)。或对照延迟接受所述化合物治疗的受试者, 在经过延迟开始所述化合物治疗的对症作用后的期间里, 总UPDRS评分显示实质相似的恶化速度, 如每周总UPDRS在0.15单位以内。

[0152] 在本申请中, 术语“癌症”与“肿瘤”可互相交换使用, 通常是指已经导致异常或无调控的生长或过度增殖的恶性转化或细胞变化的细胞。此种变化或恶性转化通常会使此类细胞对宿主有机体有致病性, 因此也预期包括会或可能会变成致病性且需要或可受益于干预的前期癌变或癌前细胞。所述肿瘤可包括实体瘤和非实体瘤。

[0153] 发明详述

[0154] 一方面, 本申请提供一种式1所示的化合物, 以及其水合物、溶剂化物、药学上可接受的盐、前药和其复合物, 在治疗疾病的药物中的用途:



[0156] 其中, R可以为氢或任选地带有取代基的C₁₋₅烷基; 任意的任选地带取代基的烷基被卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、环烷基氨基、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲

基、三氟乙基、三氟甲氧基或三氟乙氧基取代;Ar₁可以为5-6元芳环,所述5-6元芳环任选地被卤素、氧代基、氰基、甲基、甲氧基、三氟甲基或三氟甲氧基取代;Ar₂可以为单环或双环芳环,所述单环或双环芳环任选地被卤素、羟基、氰基、甲基、甲氧基、三氟甲基或三氟甲氧基取代;X选自下组:氧、硫、碳,和氮;

[0157] 且Y和Z可以各自独立地为氢、任选地带取代基的C₁₋₉烷基、任选地带取代基的单环或双环C₁₋₉环烷基、任选地带取代基的C₁₋₉烯基、任选地带取代基的单环或双环C₁₋₉环烯基、任选地带取代基的芳基、任选地带取代基的杂芳基、任选地带取代基的芳烷基、任选地带取代基的杂芳烷基、任选地带取代基的杂环烷基、任选地带取代基的杂环烯基、任选地带取代基的杂环烷基烷基、任选地带取代基的C₁₋₉烷基羰基、任选地带取代基的C₁₋₉环烷基羰基、任选地带取代基的杂环烷基羰基、任选地带取代基的杂环烷基烷基羰基、任选地带取代基的芳基羰基、或任选地带取代基的杂芳基羰基;所述任选地带取代基的基团可以被选自下组的取代基取代:卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、环烷基氨基、杂环基、氨基羰基、磺酰基、氨基磺酰基、羰基氨基、磺酰基氨基、甲基、乙基、芳基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、聚氧乙烯、聚氧丙烯、C₁₋₃烷基聚氧乙烯,或C₁₋₃烷基聚氧丙烯;或者,Y和Z可以连接以形成任选地带取代基的具有3至10个环原子的环;任意的所述任选地带取代基的环中的取代基可以被选自下组的取代基取代:卤素、氰基、羟基、氧代基、硝基、氨基、烷基氨基、环烷基氨基、氨基羰基、磺酰基、氨基磺酰基、羰基氨基、磺酰基氨基、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、聚氧乙烯、聚氧丙烯、C₁₋₃烷基聚氧乙烯,或C₁₋₃烷基聚氧丙烯;或者,Y或Z在结构中可以不存在

[0158] 在某些情形中,式1所示的化合物中的R可以为氢、甲基或三氟甲基。在某些具体的情形中,式1所示的化合物中的R可以为氢或甲基。例如,式1所示的化合物中的R可以为氢。

[0159] 在某些情形中,式1所示的化合物中的Ar₁可以为任选地带有取代基的咪唑基、三唑基、四唑基、呋喃基、噻吩基、恶唑基、异恶唑基、噻唑基、异噻唑基、恶二唑基、噻二唑基、苯基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基或三嗪基;所述任选地带取代基的芳香环被卤素、氧代基、氰基、甲基、甲氧基、三氟甲基或三氟甲氧基取代。

[0160] 在某些情形中,式1所示的化合物中的Ar₁可以选自表(1)中的芳香基团。

[0161] 表1式1中Ar₁的结构

[0162]					

[0163] 在某些情形中,式1所示的化合物中的Ar₁可以为2-呋喃基。

[0164] 在某些情形中,式1所示的化合物中的Ar₂可以为任选地带有取代基的咪唑基、三唑基、四唑基、呋喃基、噻吩基、恶唑基、异恶唑基、噻唑基、异噻唑基、恶二唑基、噻二唑基、

苯基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡啶基、异吡啶基、吡唑基、苯并咪唑基、氮杂吡啶基、氮杂吡唑基、嘌呤基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并异恶唑基、苯并异噻唑基、苯并恶唑基、苯并噻二唑基、喹啉基、异喹啉基、喹喔啉基、酞嗪基、喹唑啉基、噌啉基、萘啶基、吡啶并嘧啶基、吡啶并吡嗪、或蝶啶基；所述任选地带取代基的芳香环可以被卤素、羟基、氰基、硝基、甲基、甲氧基、三氟甲基或三氟甲氧基取代。

[0165] 在某些情形中，式1所示的化合物中的 Ar_2 可以为任选地带有取代基的苯基、吡啶基、哒嗪基或嘧啶基；所述任选地带取代基的芳香环可以被卤素、羟基、氰基、甲基、甲氧基、三氟甲基或三氟甲氧基取代。

[0166] 在某些情形中，式1所示的化合物中的 Ar_2 可以为苯基或吡啶基，所述苯基或吡啶基可以任选地被卤素或羟基取代。

[0167] 在某些情形中，式1所示的化合物中的X为氧或氮。例如，式1所示的化合物中的X为氮。

[0168] 在某些情形中，式1所示的化合物中的Y和Z可以各自独立地为氢、任选地带有取代基的 C_{2-5} 烷基、任选地带有取代基的 C_{3-5} 环烷基、任选地带有取代基的 C_{2-5} 烯基、任选地带有取代基的 C_{3-5} 环烯基、任选地带有取代基的芳基、任选地带有取代基的杂芳基、任选地带有取代基的芳烷基、任选地带有取代基的杂芳烷基、任选地带有取代基的杂环烷基，或任选地带有取代基的杂环烷基烷基；任意的所述任选地带取代基的基团可以被卤素、氰基、甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基、三氟乙氧基或 C_{1-3} 烷基聚氧乙烯取代；

[0169] 在某些情形中，式1所示的化合物中的Y和Z可以各自独立地为氢、任选地带有取代基的 C_{2-3} 烷基，或任选地带有取代基的杂环烷基；任意的所述任选地带取代基的基团可以被甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基或三氟乙氧基取代；

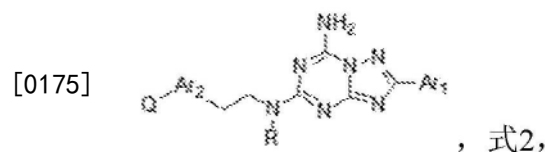
[0170] 在某些情形中，式1所示的化合物中的Y和Z可以各自独立地为氢、任选地带有取代基的乙基，或任选地带有取代基的氧杂环丁烷基；任意的所述任选地带取代基的基团可以被甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基或三氟乙氧基取代；

[0171] 在某些情形中，式1所示的化合物中的Y和Z可以连接以形成任选地带有取代基的具有4至8个环原子的环；任意的所述任选地带取代基基团中的取代基可以为卤素、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基或三氟乙氧基；

[0172] 在某些情形中，式1所示的化合物中的Y和Z可以连接以形成任选地带有取代基的具有5至7个环原子的杂环烷基；任意的所述任选地带取代基的基团可以被卤素、氧代基、甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基或三氟乙氧基取代；

[0173] 在某些情形中，式1所示的化合物中的Y和Z可以连接以形成任选地带有取代基的咪唑基环；任意的所述任选地带取代基的基团可以被卤素、甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基或三氟乙氧基取代。

[0174] 另一方面，本申请提供一种式2所示的三唑并三嗪化合物，以及其水合物、溶剂化物、药学上可接受的盐、前药和其复合物，在治疗疾病的药物中的用途：



[0176] 其中,R可以为氢或任选地带有取代基的C1-5烷基;任意的任选地带取代基的烷基可以被卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、环烷基氨基、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基或三氟乙氧基取代;

[0177] Ar_1 可以为5-6元芳环,所述5-6元芳环可以任选地被卤素、氧代基、氰基、甲基、甲氧基、三氟甲基或三氟甲氧基取代; Ar_2 可以为单环或双环芳环,所述单环或双环芳环可以任选地被卤素、羟基、氰基、甲基、甲氧基、三氟甲基或三氟甲氧基取代;

[0178] Q可以为任选地被X取代的单环或双环芳环,在氮原子上任选地被Y和Z取代的氨基羰基、在氮原子上任选地被Y和Z取代的氨基磺酰基、硝基,或氰基取代。X可以为卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、任选地被取代的 C_{1-9} 烷基,任选地带有取代基的 C_{1-9} 环烷基,任选地带有取代基的 C_{1-9} 烯基,任选地带有取代基的 C_{1-9} 环烯基,任选地带有取代基的芳基,任选地带有取代基的杂芳基,任选地带有取代基的芳烷基,任选地带有取代基的杂芳烷基,任选地带有取代基的杂环烷基,或任选地带有取代基的杂环烯基;前述任选地带取代基的基团可以被卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、环烷基氨基、氨基羰基、磺酰基、氨基磺酰基、羰基氨基、磺酰基氨基、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、杂环烷基、芳基、杂芳基、聚氧乙烯、聚氧丙烯、 C_{1-3} 烷基聚氧乙烯,或 C_{1-3} 烷基聚氧丙烯取代。Y和Z可以各自独立地为氢、任选地带有取代基的 C_{1-9} 烷基、任选地可带有取代基的单环或双环 C_{1-9} 环烷基、任选地带有取代基的 C_{1-9} 烯基、任选地带有取代基的单环或双环 C_{1-9} 环烯基、任选地带有取代基的芳基、任选地带有取代基的杂芳基、任选地带有取代基的芳烷基、任选地带有取代基的杂芳烷基、任选地带有取代基的杂环烷基,或任选地带有取代基的杂环烯基;任意所述任选地带取代基的基团可以被卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、环烷基氨基、氨基羰基、磺酰基、氨基磺酰基、羰基氨基、磺酰基氨基、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、聚氧乙烯、聚氧丙烯、 C_{1-3} 烷基聚氧乙烯,或 C_{1-3} 烷基聚氧丙烯取代;或Y和Z可以连接以形成任选地带有取代基的具有3至10个环原子的环;所述任选地带取代基的基团被卤素、氰基、羟基、氧代基、硝基、氨基、烷基氨基、环烷基氨基、氨基羰基、磺酰基、氨基磺酰基、羰基氨基、磺酰基氨基、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、聚氧乙烯、聚氧丙烯、 C_{1-3} 烷基聚氧乙烯,或 C_{1-3} 烷基聚氧丙烯取代。

[0179] 在某些情形中,式2所示的化合物中的R可以为氢、甲基或三氟甲基。在某些具体的情形中,式2所示的化合物中的R可以为氢或甲基。例如,式2所示的化合物中的R为氢。

[0180] 在另一些情形中,式2所示的三唑并三嗪化合物中的 Ar_1 可以为可带有取代基的咪唑基,三唑基,四唑基,呋喃基,噻吩基,恶唑基,异恶唑基,噻唑基,异噻唑基,恶二唑基,噻二唑基,苯基,吡啶基,哒嗪基,嘧啶基,或三嗪基;任意所述带取代基的基团可以被卤素,氧代基,氰基,甲基,甲氧基,三氟甲基或三氟甲氧基取代。

[0181] 在另一些情形中,式2所示的化合物中的 Ar_1 选自表2中的芳香基团。例如,式2所示的化合物中的 Ar_1 为2-呋喃基。

[0182] 表2式2中Ar1的结构

[0183]					
[0184]					

[0185] 在某些情形中,式2所示的化合物中的 Ar_2 可以为任选地带有取代基的咪唑基、三唑基、四唑基、呋喃基、噻吩基、恶唑基、异恶唑基、噻唑基、异噻唑基、恶二唑基、噻二唑基、苯基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡啶基、异吡啶基、吡唑基、苯并咪唑基、氮杂吡啶基、氮杂吡唑基、嘌呤基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并异恶唑基、苯并异噻唑基、苯并恶唑基、苯并噻二唑基、喹啉基、异喹啉基、喹喔啉基、酞嗪基、喹啉基、噌啉基、萘啶基、吡啶并嘧啶基、吡啶并吡嗪基,或蝶啶基;所述任选地带取代基的芳香环被卤素、羟基、氰基、硝基、甲基、甲氧基、三氟甲基或三氟甲氧基取代。

[0186] 在某些情形中,式2所示的化合物中的 Ar_2 可以为任选地带有取代基的苯基、吡啶基、哒嗪基或嘧啶基;任意所述任选地带取代基的芳香环可以被卤素、羟基、氰基、甲基、甲氧基、三氟甲基或三氟甲氧基取代。

[0187] 在某些情形中,式2所示的化合物中的 Ar_2 可以为任选地被卤素或羟基取代的苯基或吡啶基。

[0188] 在某些情形中,式2所示的化合物中的Q可以为任选地被X取代的单环或双环芳环;X可以为卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、任选地带有取代基的 C_{1-9} 烷基、任选地带有取代基的 C_{1-9} 环烷基、任选地带有取代基的 C_{1-9} 烯基、任选地带有取代基的 C_{1-9} 环烯基、任选地带有取代基的芳基、任选地带有取代基的杂芳基、任选地带有取代基的芳烷基、任选地带有取代基的杂芳烷基、任选地带有取代基的杂环烷基、或任选地带有取代基的杂环烯基;所述任选地带取代基的基团可以被卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、环烷基氨基、氨基羰基、磺酰基、氨基磺酰基、羰基氨基、磺酰基氨基、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、杂环烷基、芳基、杂芳基、聚氧乙烯、聚氧丙烯、 C_{1-3} 烷基聚氧乙烯、或 C_{1-3} 烷基聚氧丙烯取代。

[0189] 在某些情形中,式2所示的化合物中的Q可以为任选地带有取代基X的5-6元芳环。X可以为卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、可带有取代基的 C_{1-5} 烷基、可带有取代基的 C_{1-5} 环烷基、可带有取代基的 C_{1-5} 烯基、可带有取代基的 C_{1-5} 环烯基、可带有取代基的芳基、可带有取代基的杂芳基、可带有取代基的芳烷基、可带有取代基的杂芳烷基、可带有取代基的杂环烷基、或可带有取代基的杂环烯基;所述带取代基的基团被卤素、氰基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、环烷基氨基、氨基羰基、磺酰基、氨基磺酰基、羰基氨基、磺酰基氨基、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、杂环烷基、芳基、杂芳基、聚氧乙烯、聚氧丙烯、 C_{1-3} 烷基聚氧乙烯或 C_{1-3} 烷基聚氧丙烯取代。

[0190] 在某些情形中,式2所示的化合物中的Q可以为任选地被X取代的四唑环。X可以为任选地带有取代基的C₁₋₃烷基或任选地带有取代基的杂环烷基;任意的所述任选地带取代基地基团可以被卤素、氰基、羟基、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基、三氟乙基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、杂环烷基、芳基、或杂芳基取代。

[0191] 本申请所述化合物可以以一种或多种几何异构体、对映异构体、非对映异构体或互变异构体的形式存在。申请所述的化合物可以包括所有这些形式的异构体,包括外消旋体和其它形式的混合物。

[0192] 在某些情况下,本申请所述的化合物可以以溶剂化物或非溶剂化物的形式存在。术语“溶剂化物的”在本文中用于描述包含本发明的化合物和药学上可接受的溶剂分子例如水和乙醇分子的化合物复合体。本申请中所述的化合物包括其所有的溶剂化物或非溶剂化物形式。

[0193] 在某些情况下,本申请所述所示的化合物可以以药学上可接受的盐的形式存在。术语“药学上可接受的盐”是指生理上或毒理学上能够容许的盐,且在适当的时候,包括其药学上可接受的碱加成盐和酸加成盐。本申请所述的化合物包括其所有药学上可接受的盐。例如,所述药学上可接受的盐可以包括苯磺酸盐和/或乙酸盐。

[0194] 在某些情况下,本申请所述的化合物可以以药学上可接受的纳米颗粒的形式存在。包含所述化合物的纳米颗粒可以被设计以改善药物的药代动力学和生物分布性能。例如,可以把所述化合物包裹在脂质体中,这可能能够延长药物在体内分布过程中的寿命。由于纳米颗粒将优先在肿瘤细胞周围的多孔状血管中泄漏出,适当尺寸的纳米颗粒还可具有更好的安全性。这么做还有助于降低药物的有效剂量。

[0195] 在某些情况下,本申请中所述的化合物可以以前药的形式存在。术语“前药”通常是指能够通过体内代谢过程(例如,通过水解、还原或氧化)转化为本申请化合物的化合物。本申请所述的化合物包括其所有形式的前药。

[0196] 在某些情况下,本申请所述的化合物还包括药学上可接受的同位素变体,即其中有一个或多个原子被具有相同原子序数但不同原子质量的原子取代。适合进行这种同位素置换的原子包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯。某些所述化合物的同位素变体,例如氘取代的化合物,有可能因为具有更好的代谢稳定性而在有的情况下具有更好的治疗效果。本领域的技术人员可以用本领域已知的常规技术来制备所述化合物的同位素变体。

[0197] 在本申请中,所述化合物可以包括以下化合物,或其药学上可接受的盐:

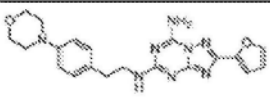
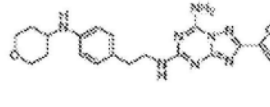
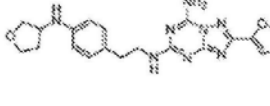
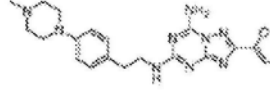
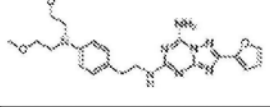
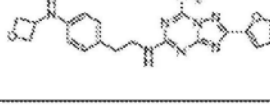
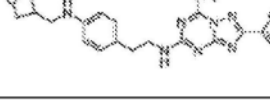
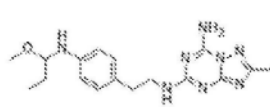
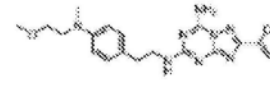
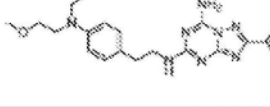
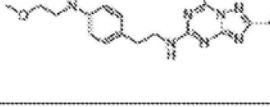
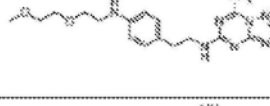
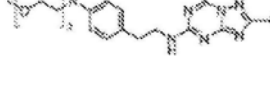
[0198] 表3本申请示例性的化合物

化合物编号	名称	结构式
化合物1	N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-3-吗啉丙烷酰胺;	
化合物2	N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-2-吗啉丙烷酰胺;	
化合物3	N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)新戊酰胺;	

[0200]

化合物4	N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-3-羟基-2,2-二甲基丙酰胺;	
化合物5	N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-2-羟基-2-甲基丙酰胺;	
化合物6	N-(4-(2-((7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-4-甲基四氢-2H-吡喃-4-羧酰胺;	
化合物7	2-(呋喃-2-基)-N5-(2-(嘧啶-4-基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物8	2-(呋喃-2-基)-N5-(2-(吡啶-3-基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物9	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物10	N5-(4-(2-(氮杂环丁烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物11	2-(呋喃-2-基)-N5-(2-(6-(2-甲基-2H-四唑-5-基)吡啶-3-基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺	
化合物12	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物13	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙氧基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物14	N5-(4-(2-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物15	(R)-N5-(4-(2-(3-氟吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物16	(S)-N5-(4-(2-(3-氟吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	

[0201]

化合物17	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-吗啉代乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物18	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物19	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(四氢呋喃-3-基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物20	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物21	N5-(4-(双(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物22	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物23	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁-3-基甲基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物24	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(1-甲氧基丙烷-2-基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物25	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-甲氧基乙基)(甲基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物26	N5-(4-(乙基(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物27	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物28	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物29	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	

[0202]

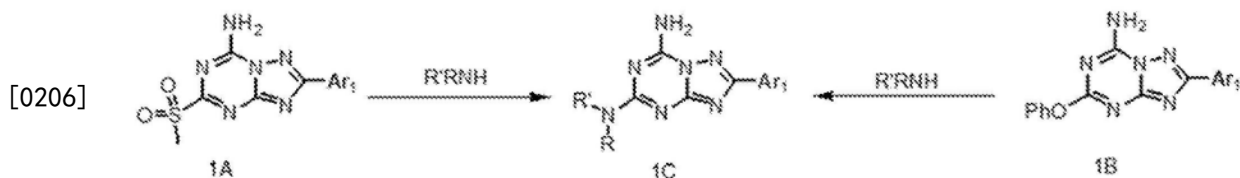
化合物30	N5-(4-(2-乙氧基乙基)氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物31	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(2,2,2-三氟乙氧基)乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物32	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(3-甲氧基丙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物33	N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-苯基-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺	
化合物34	2-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)-苯基)氨基)乙腈;	
化合物35	N5-(4-(1,3-二甲氧基丙烷-2-基氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物36	2-(3-氟苯基)-N5-(4-(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺	
化合物37	2-(3-氟苯基)-N5-(4-(氧杂环丁-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺	
化合物38	4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基氨基)乙基)-N,N-二甲基苯甲酰胺;	
化合物39	N5-(4-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物40	N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物41	N5-(4-(2-乙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物42	N5-(4-(2-异丙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	

[0203]

化合物43	N5-(4-(2-(丙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物44	2-(5-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基氨基)乙基)-苯基)-2H-四唑-2-基)乙腈;	
化合物45	4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基氨基)乙基)-苄腈;	
化合物46	N5-(4-(2-(2,2,2-三氟乙基)-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物47	N5-(4-(2-(2-甲氧基乙基)-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物48	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(吡啶-2-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物49	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(吡啶-3-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物50	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(吡啶-4-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物51	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(嘧啶-2-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物52	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物53	N5-(4-(2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物54	2-(呋喃-2-基)-N-(4-(甲基磺酰基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-胺;	
化合物55	2-(3-氟苯基)-N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	

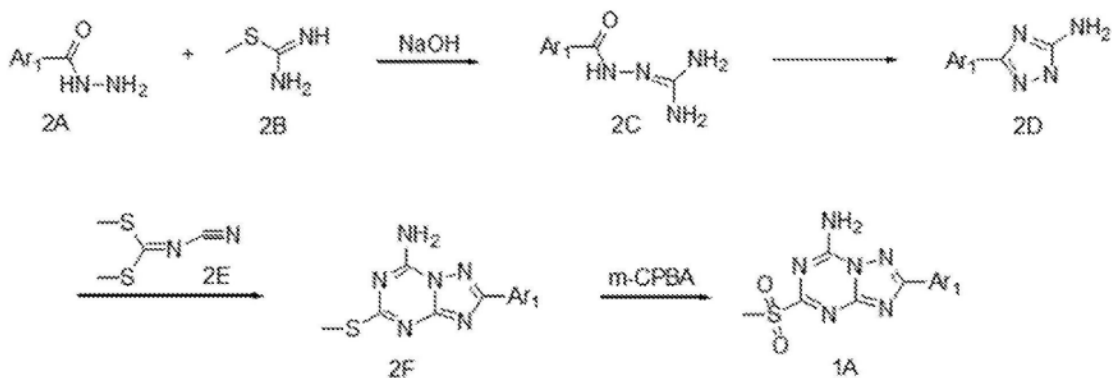
[0204] 本申请的化合物的制备

[0205] 本申请所述的化合物可以通过各种合成方法来制备。作为说明性的例子,合成路线(1)中列出了两种制备目标化合物的合成路线。在第一种方法中,在通过合适的制备方法得到中间体(1A)以后,用烷基氨基取代中间体(1A)上的甲磺酰基即得到三唑并三嗪化合物(1C)。在第二种方法中,在通过适当的方式得到中间体(1B)后,用烷基氨基取代中间体(1B)上的苯氧基也可得到三唑并三嗪化合物(1C)。



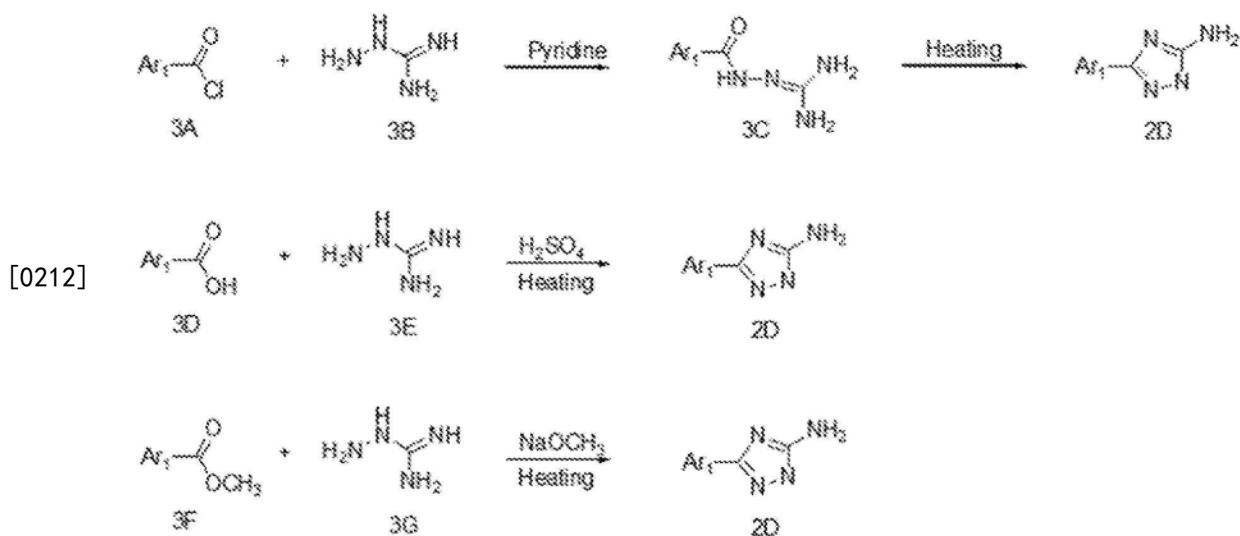
[0207] 合成路线1

[0208] 合成路线 (1) 中所需的中间体 (1A) 和 (1B) 也可以通过各种合成方法制备。作为说明性的例子,合成路线 (2) 中显示了中间体化合物 (1A) 的一种合成路线。在第一步,用适当的芳基酰肼 (2A) 与 S-甲基异硫脲 (2B) 在氢氧化钠水溶液中反应后得到中间体 (2C)。在后面的步骤中,先在水性介质中充分加热 (2C) 得到中间体 (2D), 中间体 (2D) 与 N-氰基二硫代亚氨基碳酸酯 (2E) 反应后得到硫化物中间体 (2F)。之后,用间氯过氧苯甲酸氧化中间体 (2F) 即得到所需的中间体砜 (1A)。如合成路线 (1) 所示,用合适的烷基胺亲核取代甲基磺酰基就可得到目标化合物 (1C) (J.Chem.Soc.,Perkin Trans.1 1995,801-808;Structural Chemistry.2013,24,1241-1251)。



[0210] 合成路线2

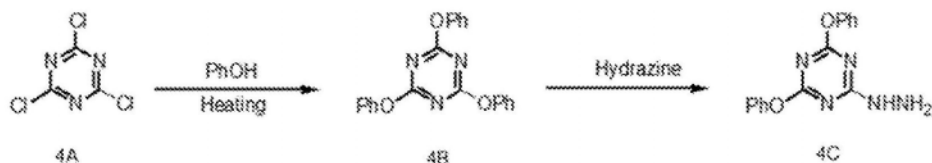
[0211] 合成路线 (2) 中的中间体 (2D) 也可以通过各种合成方法制备。作为说明性的例子,合成路线 (3) 显示了中间体 (2D) 的三种合成路线。值得强调的是,在这三种方法中,从甲酯或乙酯 (3F) 开始的合成路线通常可以提高效率,且取得更高的反应产率。



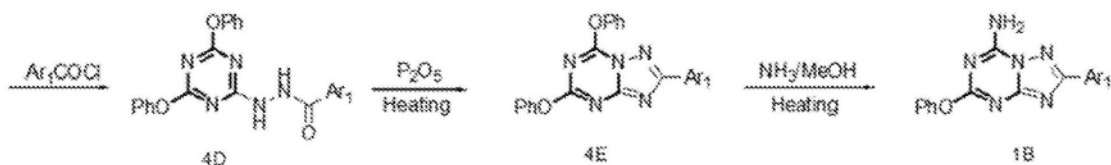
[0213] 合成路线3

[0214] 合成路线 (1) 中的中间体 (1B) 可以用合成路线 (4) 所示的合成路线制备。制备首先

从氰尿酸氯(4A)开始,在苯酚中回流得到2,4,6-三苯氧基-1,3,5-三嗪(4B)。下一步与水合肼反应后得到2-肼-4,6-二苯氧基-1,3,5-三嗪(4C),其与合适的酰氯反应后得到酰基酰肼(4D)。然后,酰肼(4D)在脱水条件下进行环化反应后得到2-取代的5,7-二苯氧基三唑并三嗪(4E),在最后一步,(4E)在甲醇氨中回流处理就可得到关键的中间体(1B)(J.Chem.Soc.,Perkin Trans.1 1995,801-808)。如路线(1)所示,用合适的烷基胺与(1B)反应后即制成目标化合物(1C)。



[0215]



[0216] 合成路线4

[0217] 本申请所述的化合物可以结合腺苷受体,例如,可以结合腺苷A2A受体。本申请所述的化合物可以结合游离的腺苷受体蛋白质,也可以结合细胞表面的腺苷受体。本申请所述化合物可以选择性结合腺苷受体,例如,本申请化合物结合腺苷A2A受体的能力是结合腺苷A1、A2B和A3受体的至少10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、300倍、500倍或更高。例如,使用放射性同位素配体竞争结合技术,本申请的化合物结合腺苷A2A受体的IC₅₀值是结合腺苷A1、A2B和A3受体的IC₅₀值的至少10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、300倍、500倍或更高。

[0218] 本申请所述的化合物可以抑制腺苷受体的活性,例如,可以抑制腺苷A2A受体的活性。本申请所述的化合物可以抑制游离的腺苷受体蛋白质的活性,也可以抑制细胞表面的腺苷受体的活性。本申请所述化合物可以选择性抑制腺苷受体的活性,例如,本申请化合物抑制腺苷A2A受体活性的能力是抑制腺苷A1、A2B和A3受体活性的至少10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、300倍、500倍或更高。例如,使用cAMP累积测定法或钙流实验,本申请的化合物抑制腺苷A2A受体活性的IC₅₀值是抑制腺苷A1、A2B和A3受体活性的IC₅₀值的至少10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、300倍、500倍或更高。

[0219] 用途和方法

[0220] 帕金森氏症

[0221] 本申请所述的化合物可以用于制备治疗疾病的药物,其中所述疾病可包括帕金森氏症。

[0222] 另一方面,本申请提供了治疗帕金森氏症的方法,其可包括以下的步骤:向有需要的受试者施用治疗有效剂量的本申请所述的化合物。

[0223] 在某些实施方式中,所述受试者可以表现出帕金森氏症的早期征兆,所述方法包括确认患者表现出帕金森氏症的早期迹象,并定期给予患者由此确定量的所述化合物或其药学上可接受的溶剂化物或盐,有效地治疗患者。

[0224] 早期征兆可以是脑的结构性或功能性变化,其例如在物理上是可以被检测的,例

如,通过PET和SPECT研究,通过经颅声图描记(Becker, J Neurol 249, Suppl 3, 2002, III/40); Prunier C, 等, Neuroimage. 2003 Jul; 19(3):810-6) 或通过检测生化标记如神经黑素(WO 02/31499)。

[0225] 在某些实施方式中,所述受试者的帕金森氏病症发展速度可以通过总帕金森氏症统一评分量表(Total Unified Parkinson's Disease Rating Scale, 总UPDRS)评分量化。早期征兆还可能是嗅觉障碍、抑郁症、视觉障碍和认知功能损伤或睡眠障碍,可以使用不同测试的组合进行早期诊断(Becker, J Neurol 249, Suppl 3, 2002 III/40; Stern, Annals of Neurol 56, 2004, 169)。

[0226] 在某些实施方式中,所述受试者可以表现出帕金森氏症的功能衰退,所述功能衰退通常是指借由总UPDRS评分决定的帕金森氏症患者症状的随时间的恶化。

[0227] 在某些实施方式中,所述受试者可以表现出帕金森氏症的疲劳,所述功能衰退通常是指借由总UPDRS评分决定的帕金森氏症患者的疲劳状态。

[0228] 在某些实施方式中,所述受试者可以表现出帕金森氏症的非运动症状,所述非运动症状通常是指借由总UPDRS评分决定的帕金森氏症患者的非运动症状。帕金森氏症的非运动症状可包括自主神经系统功能异常、神经精神疾患(包括情绪、认知、行为和思想改变)、感觉障碍和睡眠障碍等。

[0229] 在某些实施方式中,所述受试者之前接受或未接受治疗帕金森氏症的疗法,包括药物、复健(如体能锻炼、改善步姿、缓慢的旋转四肢或躯干、伸展运动、口语引导、李·西弗曼语音治疗、踏步运动、环境改造、节律启动、腹式呼吸和冥想)、缓和医疗、饮食疗法、重复性经颅磁刺激术、烧灼术、脑深层刺激手术、苍白球切除术。

[0230] 在某些实施方式中,所述受试者之前可接受或未接受治疗帕金森氏症的药物。治疗帕金森氏症的药物可包括但不限于L-多巴、多巴胺受体激动剂、单胺氧化酶抑制剂、其他药物如金刚烷胺和抗胆碱剂。治疗帕金森氏症的药物可包括:L-多巴、溴隐亭、苯扎托品、左旋多巴、罗匹尼罗、普拉克索、罗替戈汀、卡麦角林、沙芬酰胺、希利治林、雷沙吉兰、恩他卡朋、托卡朋、金刚烷胺、培高利特、阿朴吗啡、麦角乙脲或司来吉兰

[0231] 在某些实施方式中,所述治疗可以包括降低所述受试者的帕金森氏病症的发展速度,和/或延缓所述受试者的帕金森氏病症的临床发展。在开始给予本申请所述的化合物或其药用可接受的溶剂化物或盐后,疾病发展速度为总UPDRS评分增长平均值降低。

[0232] 在某些实施方式中,所述治疗可以包括延迟所述受试者对抗帕金森病症对症治疗的需求。在某些实施方式中,所述治疗可以包括确定患者处于帕金森氏症阶段,并定期给予患者由此确定量的所述化合物或其药学上可接受的溶剂化物或盐,有效地延迟其对抗帕金森病对症治疗的需求。

[0233] 在某些实施方式中,所述治疗可以包括降低所述受试者对抗帕金森病症对症治疗需求的风险。在某些实施方式中,所述治疗包括定期给予帕金森氏症患者一定量的本申请所述化合物或其药学上可接受的溶剂化物或盐,有效地降低对抗帕金森氏症治疗需求的风险。

[0234] 在某些实施方式中,所述治疗可以包括降低所述受试者的所述功能衰退。在某些实施方式中,所述方法包括确定患者处于帕金森氏症阶段,并定期给予患者由此确定量的所述化合物或其药学上可接受的溶剂化物或盐,有效地降低其功能衰退。在某些实施方式

中,帕金森氏症患者的功能衰退被通过总的帕金森氏症统一评分量表(总UPDRS)评分量化,总UPDRS评分增长代表功能衰退。

[0235] 在某些实施方式中,所述治疗可以包括降低所述受试者的所述疲劳。在某些实施方式中,所述方法包括确定患者处于帕金森氏症阶段,并定期给予患者由此确定量的本申请所述化合物或其药学上可接受的溶剂化物或盐,有效地减少疲劳。

[0236] 在某些实施方式中,所述治疗可以包括降低所述受试者的运动症状的严重程度。所述运动症状可主要包括颤抖(如静止性颤抖)、肢体僵硬、动作迟缓、姿态不稳、运动功能减退、运动迟缓、姿态、说话与吞咽异常等。

[0237] 在某些实施方式中,所述治疗可以包括降低所述受试者的所述非运动症状的严重程度。在某些实施方式中,所述方法包括确定患者处于帕金森氏症阶段,并定期给予患者由此确定量的所述化合物或其药学上可接受的溶剂化物或盐,有效地降低非运动症状的严重程度。在某些实施方式中,非运动症状是由帕金森氏症统一评分量表(UPDRS)第四版第一部分定义。

[0238] 总UPDRS(帕金森氏症统一评分量表,unified Parkinson's disease rating scale)评分代表了帕金森氏病症的严重水平,被用于治疗过程中衡量疗效参数自基线的变化。UPDRS由以下部分测试组成:

[0239] UPDRS由以下部分组成:第一部分:心理,行为和情绪的评估,第二部分:对日常生活活动(ADL)的自我评估,包括言语,吞咽,手写,穿衣,卫生,摔倒,流涎,卧床,行走和切割食物,第三部分:临床医生评分的监测运动评估,第四部分:治疗并发症,第五部分:帕恩森病严重程度的Hoehn和Yahr分期,第六部分:施瓦布和英格兰ADL量表。

[0240] 运动失调协会发布的MDS-UPDRS也可用于帕金森氏病评分,其包含四部分共50项子量表内容,分别为:(1)日常生活非运动经历(13项),(2)日常生活运动体验(13项),(3)身体运动检查(18项),和(4)运动并发症(6项)。每个子量表的评分为0-4,其中0=正常,1=轻微,2=轻度,3=中度和4=严重。完成每个项目获得一个0-4的分数,其中0代表无障碍,4代表最高程度的障碍。

[0241] 本申请所述的化合物可以使受试者的一个或多个UPDRS子量表项目的评分由4分降低为3分,4分降低为2分,4分降低为1分,4分降低为0分,3分降低为2分,3分降低为1分,3分降低为0分,2分降低为1分,2分降低为1分,或1分降低为0分。

[0242] 本申请的化合物可以延长受试者的行走距离、行走时间、直立次数和直立时间。

[0243] 例如,与未施用本申请化合物相比,使用了本申请化合物的受试者的行走距离可以延长至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%或更高,如在利血平诱导的小鼠运动障碍模型中所检测的。

[0244] 例如,与未施用本申请化合物相比,使用了本申请化合物的受试者的行走时间可以延长至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%或更高,如在利血平诱导的小鼠运动障碍模型中所检测的。

[0245] 例如,与未施用本申请化合物相比,使用了本申请化合物的受试者的直立次数可以延长至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%或更高,如在利血平诱导的小鼠运动障碍模型中所检测的。

[0246] 例如,与未施用本申请化合物相比,使用了本申请化合物的受试者的直立时间可

以延长至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%或更高,如在利血平诱导的小鼠运动障碍模型中所检测的。

[0247] 本申请的化合物可以降低受试者的在棒时间、增加站立时间,有效改善受试者的僵直症状。

[0248] 例如,与未施用本申请化合物相比,使用了本申请化合物的受试者的在棒时间可以减少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少200%、至少300%或更高,如氟哌啶醇诱导的大鼠帕金森病僵直模型中所检测的。

[0249] 例如,与未施用本申请化合物相比,使用了本申请化合物的受试者的站立时间可以增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少200%、至少300%或更高,如氟哌啶醇诱导的大鼠帕金森病僵直模型或MPTP诱导的小鼠帕金森模型中所检测的。

[0250] 例如,与未施用本申请化合物相比,使用了本申请化合物的受试者的行走距离可以增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少200%、至少300%或更高,如在MPTP诱导的小鼠帕金森模型中所检测的。

[0251] 在本申请中,治疗帕金森氏症中,所述化合物的施用剂量可以为约0.001至约500mg/kg、约0.001至约500mg/kg、约0.01至约500mg/kg、约0.1至约500mg/kg、约1至约500mg/kg、约0.001至约400mg/kg、约0.001至约300mg/kg、约0.001至约200mg/kg、约0.001至约100mg/kg、约0.001至约50mg/kg、约1至约200mg/kg、约1至约100mg/kg、约1至约50mg/kg、约1至约30mg/kg、约10至约30mg/kg、约3至约30mg/kg或约5至约30mg/kg。所述化合物的施用剂量可以为约1mg/kg、约3mg/kg、约5mg/kg、约7.5mg/kg、约10mg/kg、约30mg/kg、约50mg/kg或约100mg/kg。

[0252] 本申请所述化合物能够抑制受试者对帕金森药物的耐药性,例如,可以抑制受试者对左旋多巴(L-DOPA)或Benserazide的耐药性。

[0253] 肿瘤

[0254] 本申请所述的化合物还可以用于制备治疗或预防宿主的癌症及宿主中相关的细胞异常增殖相关疾病的药物,该宿主可以是任何多细胞脊椎动物,包括人类及非人类哺乳动物。所述宿主可以是人类。其中所述疾病包括肿瘤。所述肿瘤可包括实体瘤和非实体瘤。

[0255] 在本申请中,所述实体瘤可以包括结肠癌和黑色素瘤。在本申请中,所述非实体瘤可以包括淋巴瘤,例如,B细胞淋巴瘤。

[0256] 在本申请中,治疗肿瘤中,所述化合物的施用剂量可以为约0.001至约500mg/kg、约0.001至约500mg/kg、约0.01至约500mg/kg、约0.1至约500mg/kg、约1至约500mg/kg、约0.001至约400mg/kg、约0.001至约300mg/kg、约0.001至约200mg/kg、约0.001至约100mg/kg、约0.001至约50mg/kg、约1至约200mg/kg、约1至约100mg/kg、约1至约50mg/kg、约1至约30mg/kg、约10至约30mg/kg、约3至约30mg/kg或约5至约30mg/kg。所述化合物的施用剂量可以为约1mg/kg、约3mg/kg、约5mg/kg、约7.5mg/kg、约10mg/kg、约30mg/kg、约50mg/kg或约100mg/kg。

[0257] 本申请所述化合物可用于提高宿主免疫细胞的抗肿瘤活性。所述化合物能降低T

细胞的免疫无能或T细胞对癌症的耐受,能使癌细胞更容易受到免疫清除,能抑制调节性T细胞的增殖,以及能够有助于记忆性T细胞的形成。所述化合物既可以提高宿主自身具有的免疫反应,也可以提高其对各种适应性免疫疗法的功效。

[0258] 例如,本申请的药物可以抑制或延缓疾病的发展或进展,可以减小肿瘤大小(甚至基本消除肿瘤),和/或可以减轻和/或稳定疾病状态。抑制肿瘤或肿瘤细胞生长的实例包括:相对于干预之前的相应水平,肿瘤生长体积减小。

[0259] 另一方面,本申请提供了治疗肿瘤的方法,其可包括以下的步骤:向有需要的受试者施用治疗有效剂量的本申请所述的化合物。

[0260] 为了使之更加有效,本申请所述化合物还可以与其它抗肿瘤治疗方法(例如化学疗法、肿瘤疫苗及各种免疫检查点抑制剂)联合使用,从而实现协同效应。术语“联合治疗”指活性试剂的同时给药,也可以按不同顺序先后给药。

[0261] 在某些实施方式中,治疗或预防宿主中细胞异常增殖的方法可以包括给患者联合施用或交替施用本申请所述化合物和一种免疫检查点抑制剂。这里的免疫检查点抑制剂可以选自下组:PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、PD-L2抑制剂、CTLA-4抑制剂、BTLA抑制剂、LAG3抑制剂、TIM-3抑制剂、B7-H3抑制剂、B7-H4抑制剂、KIR抑制剂、TIGIT抑制剂或VISTA抑制剂等。例如,所述其它抗肿瘤治疗方法可以是所述PD-1抑制剂。

[0262] 在另一个实施方式中,治疗或预防宿主中细胞异常增殖的方法可以包括给患者联合使用或交替本申请所述化合物和一种细胞疫苗。所述细胞疫苗基于与要预防的肿瘤相匹配的细胞。例如,如果一个宿主患有前列腺癌,或者有患前列腺癌的风险,所述细胞疫苗将基于前列腺癌细胞。在这种情况下,通常是给所述细胞进行一定的放射性照射,或以其它方式使其失去复制功能。也可以通过对细胞进行基因改造使其能够分泌集落刺激因子。

[0263] 在另一个实施方式中,治疗或预防细胞异常增殖的方法包括给患者联合施用或交替施用所述化合物和嵌合抗原受体CAR-T细胞疗法。

[0264] 在另一个实施方式中,治疗或预防细胞异常增殖的方法可以包括给患者联合施用或交替施用所述化合物和一种其它抗癌药物以治疗细胞异常增殖。这种抗癌药物可以是烷基化试剂、抗代谢药物、蒽环类衍生物、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤抗生素、激酶抑制剂或抗肿瘤抗原的单克隆抗体等。

[0265] 本申请化合物具有良好的药代动力学性质,例如,本申请化合物具有较高的暴露量和生物利用度。在某些实施方式中,本申请化合物具有较高的口服体内暴露量和较高的口服生物利用度。例如,本申请化合物的血液 $T_{1/2}$ 为约0.1h至约10h,例如,约0.2h至约10h,约0.3h至约10h,约0.4h至约10h,约0.5h至约10h,约0.5h至约9h,约0.5h至约8h,约0.5h至约7h,约0.5h至约6h,约0.5h至约5h,约0.5h至约3h,约0.5h至约2h,约0.5h至约1h。

[0266] 药物组合物

[0267] 在用药时,本申请的化合物可以配制成适当的药物组合物。药物组合物的具体组成由所选定的给药途径决定,给药途径包括口服、肠外道、静脉、肌肉内、鼻、口腔、局部、经皮或皮下。在治疗疾病(如帕金森氏症或肿瘤)中,药物组合物中所含的本申请所述化合物的剂量应足以起到有效的治疗作用,同时不会给宿主带来严重的毒副作用。每天用药或每隔几天用药都可以,用药的时间可以持续数天、数周、数月、甚至数年。某一特定剂量可分为多次间隔给药,例如每天一次、每天两次或更多、每周一次、每两周一次、每三周一次、每月

一次或每两月或更多月一次。例如,所述药物可以每天一次施用或每天两次施用。

[0268] 所述化合物可以在其它抗肿瘤治疗方法之前或之后间隔给药。所述间隔的时间可以为1分钟、2分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小时、18小时、1天、2天、3天、1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月或更长。在一些实施方案中,本申请所述的化合物可以与其它抗肿瘤治疗方法以相同的给药途径给药或者以不同的给药途径给药。

[0269] 所述化合物可以在其它治疗帕金森氏症的药物之前或之后间隔给药。所述间隔的时间可以为1分钟、2分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小时、18小时、1天、2天、3天、1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月或更长。在一些实施方案中,本申请所述的化合物可以与其它治疗帕金森氏症的药物以相同的给药途径给药或者以不同的给药途径给药。

[0270] 在某些实施方式中,可以口服施用所述化合物。口服药物的成分通常包括惰性稀释剂或可食用载体。药物可封装于明胶胶囊中或压缩成片剂。药片、药丸、胶囊、锭剂以及其他剂型可含有以下成分:粘合剂如微晶纤维素、黄芪胶或明胶;辅料如淀粉或乳糖;崩解剂如海藻酸或玉米淀粉;润滑剂如硬脂酸镁;助流剂如胶质二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;调味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙子调味剂;润湿剂或乳化剂;防腐剂;以及pH缓冲剂等,如磷酸盐缓冲液、乙酸钠或山梨醇酐单月桂酸酯。当把药物组合物放在胶囊内时,其中还可以放入液体载体如脂肪油。此外,所述药物成分还可以包含各种其它材料,例如糖涂层、虫胶或其它的肠溶剂。

[0271] 本申请化合物也可以以酏剂、悬浮液、糖浆、饼块、或口香糖等的组分施用。除了含有三唑并三嗪衍生物外,糖浆中还可以含有甜味剂如蔗糖、防腐剂、着色剂和调味剂等。用于口服、肠道外的、皮肤内的、皮下的或局部的药物溶液或悬浮液可包括无菌稀释剂,如水、盐溶液、林格溶液、固定油、聚乙二醇(如PEG400)、甘油、丙二醇、脂肪酸如油酸及其衍生物,极性溶剂(如二甲基乙酰胺(DMAC))或其它合成溶剂;抗菌剂如苄基醇或甲基对苯,抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸钠,螯合剂如乙烯二胺四乙酸;缓冲剂如磷酸盐缓冲液、醋酸、柠檬酸或磷酸盐,以及张性或渗透压调节剂如氯化钠或葡萄糖,稳定剂如环糊精,表面活性剂如羟基硬脂酸酯等。药物原液可以装入安瓿,一次性的注射器,或由玻璃或塑料制成的多剂量的小瓶。

[0272] 为了防止药物从体内快速清除,本申请所述化合物也可以放置在能够起到这种保护作用的载体中。也可应用其它各种能够控制药物释放速度的方法,例如使用植入物和微胶囊输送系统的方法。

[0273] 本申请所述化合物也可以使用喷雾器、干粉吸入器、或定量喷雾吸入器等给药方式来实施给药。用这种方式给药的药物可以用盐水配制成溶液,并在其中加入苯甲醇或其它合适的防腐剂、吸收促进剂、碳氟化合物和其它常用的增溶或分散剂。

[0274] 一般地说,对于一个患者而言,所要采用的治疗方案和给药剂量将取决于多种因素,包括所用的特定化合物的性能、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、给药时间、排泄率、病人的病理状况、治疗的目标和医生的判断。如果是联合治疗,活性成分的用量也会取决于使用哪种药物进行联合治疗。

[0275] 另一方面,本申请提供了一种药物组合和/或试剂盒,其包含(1)本申请所述的化

合物,和(2)治疗肿瘤的免疫疗法。

[0276] 另一方面,本申请提供了一种药物组合和/或试剂盒,其包含(1)所述化合物,和(2)治疗帕金森氏症的药物。

[0277] 不欲被任何理论所限,下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的化合物、制备方法和用途等,而不适用于限制本申请发明的范围。

[0278] 实施例

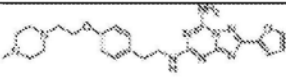
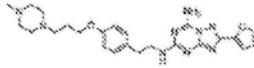
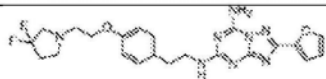
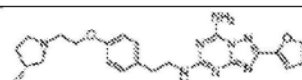
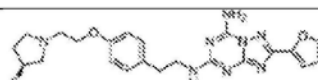
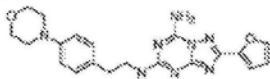
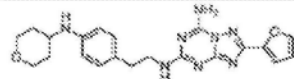
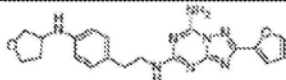
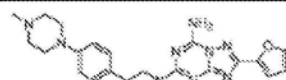
[0279] 在本申请的实施例中,所述化合物名称对应如下表4:

[0280] 表4 本申请实施例中的化合物

[0281]

化合物编号	名称	结构式
化合物1	N-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-3-吗啉丙烷酰胺;	
化合物2	N-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-2-吗啉丙烷酰胺;	
化合物3	N-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)新戊酰胺;	
化合物4	N-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-3-羟基-2,2-二甲基丙酰胺;	
化合物5	N-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-2-羟基-2-甲基丙酰胺;	
化合物6	N-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)苯基)-4-甲基四氢-2H-吡喃-4-羧酰胺;	
化合物7	2-(呋喃-2-基)-N5-(2-(嘧啶-4-基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物8	2-(呋喃-2-基)-N5-(2-(吡啶-3-基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物9	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物10	N5-(4-(2-(氮杂环丁烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物11	2-(呋喃-2-基)-N5-(2-(6-(2-甲基-2H-四唑-5-基)吡啶-3-基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺	

[0282]

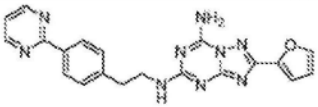
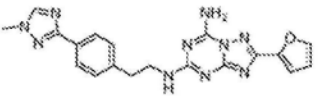
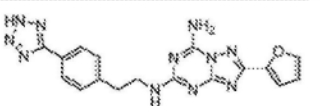
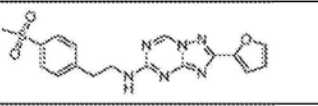
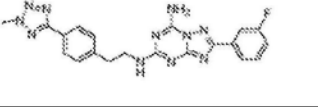
化合物12	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]三嗪-5,7-二胺;	
化合物13	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙氧基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物14	N5-(4-(2-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物15	(R)-N5-(4-(2-(3-氟吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物16	(S)-N5-(4-(2-(3-氟吡咯烷-1-基)乙氧基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物17	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(吗啉代乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物18	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(4-(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物19	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(4-(四氢呋喃-3-基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物20	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物21	N5-(4-(双(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物22	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物23	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁-3-基甲基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物24	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(1-甲氧基丙烷-2-基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	

[0283]

化合物25	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-甲氧基乙基)(甲基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物26	N5-(4-(乙基(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物27	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物28	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物29	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物30	N5-(4-(2-乙氧基乙基)氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物31	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(2-(2,2,2-三氟乙氧基)乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物32	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(3-甲氧基丙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物56	N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-苯基-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺	
化合物34	2-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基)氨基)乙基)-苯基)氨基)乙腈;	
化合物35	N5-(4-(1,3-二甲氧基丙烷-2-基氨基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物36	2-(3-氟苯基)-N5-(4-(2-甲氧基乙基)氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺	
化合物37	2-(3-氟苯基)-N5-(4-(氧杂环丁-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺	

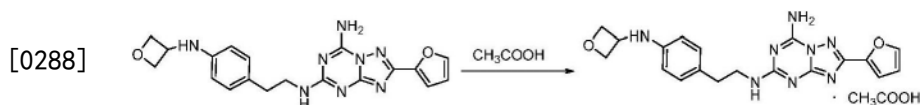
[0284]

化合物38	4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基氨基)乙基)-N,N-二甲基苯甲酰胺;	
化合物39	N5-(4-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物40	N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物41	N5-(4-(2-乙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物42	N5-(4-(2-异丙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物43	N5-(4-(2-丙基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物44	2-(5-(4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基氨基)乙基)-苯基)-2H-四唑-2-基)乙腈;	
化合物45	4-(2-(7-氨基-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-基氨基)乙基)-苄腈;	
化合物46	N5-(4-(2-(2,2,2-三氟乙基)-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物47	N5-(4-(2-(2-甲氧基乙基)-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物48	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(吡啶-2-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物49	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(吡啶-3-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
化合物50	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(吡啶-4-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	

[0285]	化合物51	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(嘧啶-2-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
	化合物52	2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
	化合物53	N5-(4-(2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	
	化合物54	2-(呋喃-2-基)-N-(4-(甲基磺酰基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5-胺;	
	化合物55	2-(3-氟苯基)-N5-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺;	

[0286] 实施例1 2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁烷-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺乙酸盐(化合物22乙酸盐)的制备与分析表征

[0287] A、2-(呋喃-2-基)-N5-(4-(氧杂环丁烷-3-基氨基)苯乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺乙酸盐的制备如下:



[0289] 将500mg游离碱(A05746-093A15)分散于7.5mL乙酸乙酯中。115mg乙酸溶解于2.5mL乙酸乙酯中得到乙酸溶液。在搅拌下将乙酸溶液缓慢滴加至游离碱的混悬液中。搅拌过夜,过滤得到固体,并在40°C真空条件下干燥过夜。得到的产物进行表征测试。

[0290] 按照相同步骤,使用甲基叔丁基醚(MTBE)、丙酮(Acetone)、乙酸甲酯(MAC)、异丙醇(IPA)采用相同的操作得到目标固体,进行表征测试。

[0291] B、分析方法

[0292] 1) X-射线粉末衍射(XRPD)

[0293] 固体样品采用Empyrean X射线粉末衍射仪(PANalytical)或D8 Advance X射线粉末衍射分析仪(Bruker)进行分析。Empyrean X射线粉末衍射仪配备了PIXcel1D检测器。在XRPD分析中,2θ扫描角度从3到40°,扫描步长为0.013°。光管电压和光管电流分别为45KV和40mA。D8 Advance X射线粉末衍射分析仪配备了LynxEye检测器。2θ扫描角度从3到40°,扫描步长为0.02°。光管电压和光管电流分别为40KV和40mA。

[0294] 2) 差示扫描量热分析(DSC)

[0295] 差示扫描量热分析的仪器型号为DSC 250(TA Instruments,US)。样品经精确称重后置于DSC穿孔样品盘中,并记录下样品的准确质量。样品以10°C/min的升温速率从25°C加热至最终温度。

[0296] 3) 热重分析(TGA)

[0297] 热重分析仪的型号为TGA 55(TA Instruments,US)。将样品置于已平衡的开口铝制样品盘中,质量在TGA加热炉内自动称量。样品以10°C/min的速率加热至最终温度。

[0298] 4) 动态水蒸气吸附(DVS)

[0299] 动态水分吸脱附分析采用的仪器型号为Vsorp动态水分吸附分析仪 (ProUmid GmbH&Co.KG, Germany) 或DVS Intrinsic (SMS, UK)。将样品置于已去皮的样品盘中, 自动称重。Vsorp Dynamic Moisture Sorption Analyzer仪器参数设置如下:

项目	参数
样品温度	25°C
循环时间	10min
每个循环最短时间	50min
每个循环最长时间	120min
重量限度	100%
平衡条件	0.01%/45min
循环#1	湿度0%到0%, 温度40°C 3小时
循环#2	温度为25°C, 湿度从0%升到90%
循环#3	温度为25°C, 湿度从80%回到0%
吸附	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90
脱附	80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0

[0300] DVS Intrinsic仪器参数设置如下:

项目	参数
阶跃时间	60min
样品温度	25°C
循环	全循环
吸附	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90
脱附	80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0
保存数据速率	5S
总流量	200sccm
总试验后流量	200sccm

[0301] 5) 偏光显微分析 (PLM)

[0302] PLM分析采用的仪器型号为ECLIPSE LV100POL偏光显微镜 (尼康, 日本)。

[0303] 6) 核磁共振 (1H-NMR)

[0304] ¹H-NMR采用布鲁克AVANCE III HD 300或400, 配备Sample Xpress 60自动进样器, 或者布鲁克Advance 300, 配备B-ACS 120自动进样器。

[0305] 7) 高效液相色谱法 (HPLC)

[0306] HPLC分析法采用Agilent HPLC 1260系列仪器。溶解度和稳定性测试的HPLC方法如下:

[0307]

色谱柱	Atlantis T3, 4.6*150 mm, 3 μ m
流动相	A: 10 mmol 醋酸铵水溶液 B: 乙腈
梯度(T/B%)	0/5%, 12/5%, 13/20%, 40/40%, 45/50%, 45.1/95%, 50/95%
柱温	25 °C
检测波长	DAD; 250 nm
流速	1.0 mL/min
进样量	5 μ L
运行时间	55 分钟
后运行时间	0
稀释剂	DMSO

[0308] C、数据与结论

[0309] 通过XRPD结果(图1)可知,在所有溶剂中均得到乙酸盐,具有与游离碱(free base)不同的晶体形式。在MTBE中反应得到的产物中仍含有少量的游离碱晶型。在不同溶剂中得到的乙酸盐具有相同的晶型。

[0310] 从¹H-NMR的谱图(图2),同时结合XRPD谱图(图1)可知,丙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯和异丙醇均能够成为乙酸盐。

[0311] DSC、TGA结果(图3)表明样品在210°C之前失重~13.4%,推测是脱去乙酸。在起始温度148.9°C处观察到一个宽的吸热峰,这是由于乙酸的脱去。而在起始温度226.0°C处的吸热峰则推测为游离碱无水晶型的溶化。

[0312] 4) 溶解度

[0313] 实验测定了游离碱晶型和乙酸盐晶型在生物溶媒(SGF(Simulated Gastric Fluid),FaSSIF(Fasted State Stimulated Intestinal Fluid)和FeSSIF(Fed State Stimulated Intestinal Fluid))中37°C下的溶解度。将3mg样品加入样品瓶中,加入1mL生物相关溶媒。混悬液在37°C下以500rpm的速度震荡。在0.5h和2h后分别取500 μ L混悬液,过滤,滤液进行HPLC测试得到溶解度。

[0314] 表5化合物22游离碱和乙酸盐形式的溶解度

[0315]

样品	溶媒	溶解度	
		0.5 h	2 h
游离碱	SGF	0.6223	0.7121
	FaSSIF	0.0037	0.0042
	FeSSIF	0.0070	0.0088
乙酸盐	SGF	>2.887	>2.887
	FaSSIF	0.0093	0.0099
	FeSSIF	0.0331	0.0338

[0316] 表5的结果显示,化合物22游离碱和乙酸盐形式的溶解度均和溶媒pH有很大关联。它们在SGF中有最大的溶解度,乙酸盐为>2.887mg/mL,游离碱0.712mg/mL。乙酸盐在三种生物相关溶媒中的溶解度均大于游离碱。

[0317] 5) 稳定性结果与结论

[0318] 一定量乙酸盐晶体分别放置于60℃闭口和40℃/75%RH开口条件下最长7天。在0、3和7天分别取样,用稀释剂稀释至~0.3mg/mL用于HPLC纯度测试。固体样品进行XRPD测试,确定晶型。

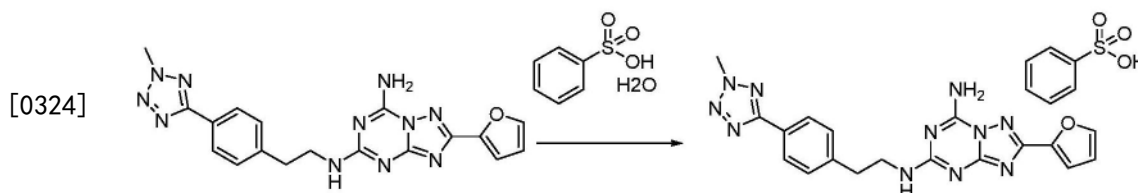
[0319] 表6化合物22乙酸盐的XRPD结果

样品	起始纯度 (面积%)	纯度-7天(面积%)		XPRD	
		40℃/75%RH	60℃	40℃/75%RH	60℃
乙酸盐	98.79	98.99	99.01	转变为游离碱晶型	未变化

[0321] 表6的结果表明,化合物22乙酸盐在测试条件下没有发现明显的降解。乙酸盐晶型在60℃条件下,物理和化学稳定。而在40℃/75%RH条件下,部分乙酸盐晶型会转化为游离碱晶型。

[0322] 实施例2 N⁵-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺苯磺酸盐(化合物40苯磺酸盐)的制备

[0323] 制备反应式如下:



[0325] 将苯磺酸水合物(4g, 25.4mmol)加入甲醇(18mL)中,常温下分批加入N⁵-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)苯乙基)-2-(呋喃-2-基)-[1,2,4]三唑[1,5-a][1,3,5]三嗪-5,7-二胺(2.56g, 6.35mmol),固体边溶解边分批加入,加完毕后,发现有少量固体不溶解,再超声后全部溶解,搅拌5min后,有大量白色固体析出,加入50mL乙酸乙酯打浆,过滤干燥得到目标化合物为白色固体(2.0g, 56%收率)。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 9.04-8.71 (m, 1H), 8.25 (d, J = 0.7Hz, 2H), 8.02-7.96 (m, 3H), 7.61 (dd, J = 7.7, 1.8Hz, 2H), 7.46 (t, J = 9.7Hz, 2H), 7.39-7.26 (m, 3H), 7.19 (d, J = 2.8Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.42 (s, 3H), 3.65-3.53 (m, 2H), 2.96 (t, 2H)。

[0326] 实施例3本申请化合物能够抑制腺苷受体A2A的活性

[0327] 1. 实验方法

[0328] 通过基于TR-FRET的cAMP累积测定法评估了测试化合物对腺苷受体A2A的抑制作用。该方法包括,在表达有A2AR的HEK293细胞(hADORA2A-HEK293)中,NECA刺激的cAMP的产生和A2A受体拮抗剂对其的抑制作用。所有细胞均采用完全培养基,培养在5%CO₂和37℃条件下进行。用胰酶消化细胞后,在200g离心5分钟收集细胞。再用新鲜完全培养基重悬细胞后采用台盼蓝排除法对细胞活力进行计数,仅当细胞活率大于95%时方可进行后续的cAMP产生测量实验。HEPES(5mM),BSA稳定剂(0.1%)和Rolipram(10μM)的Hank's缓冲溶液稀释细胞后,将细胞加入384孔白色非透明板(细胞/孔,10μl/孔),并在室温下与合适浓度(11个浓度)的测试化合物孵育20分钟。然后将A2A受体激动剂NECA(最终浓度=EC₈₀,该数值在稍早进行的同一实验中测定)添加到样品中,并在37℃下再次孵育30分钟。最后加入Eu-cAMP示踪剂和Ulight-anti-cAMP,通过测量665nm处的TR-FRET与615nm处的荧光发射的比值来

确定cAMP的产生量。选取ZM241385为参比化合物,伊曲茶碱(Istradefylline)为阳性对照化合物。伊曲茶碱是选择性的A2A受体拮抗剂,能通过改变神经元的活动而改善PD患者的运动机能,临床用于治疗PD和改善PD的运动障碍。

[0329] 2. 计算

[0330] 根据下式计算抑制率(%),根据从log转换后的浓度-抑制(%)曲线计算IC₅₀值。

$$[0331] \quad \%Inhibition = \left(1 - \frac{Ratio_{665nm,635nm,high} - Ratio_{665nm,635nm,compd}}{Ratio_{665nm,635nm,high} - Ratio_{665nm,635nm,low}}\right) \times 100\%$$

[0332] %Inhibitor: %抑制率;

[0333] Ratio_{665/615 high}: 参照化合物高荧光比值;

[0334] Ratio_{665/615 low}: 参照化合物低荧光比值;

[0335] Ratio_{665/615 compd}: 测试化合物荧光比值;

[0336] 利用XLfit软件拟合剂量相应曲线并确定IC₅₀。

[0337] 3. 结果与结论

[0338] 表7本申请化合物抑制腺苷受体A2A的活性

[0339]

化合物编号	A2AR活性 (IC ₅₀ , nM)
化合物6	9.24
化合物17	3.01
化合物18	3.83
化合物21	1.62
化合物22	7.07
化合物27	10.57
化合物28	6.77
化合物30	3.52
化合物35	4.88
化合物37	7.07
化合物38	8.71
化合物40	9.66
化合物41	7.87
化合物42	9.08
化合物47	13.88
ZM241385	9.00
伊曲茶碱	28.73

[0340] 从上表中的数据可以看出,列表中的本申请化合物均体现出优异的A2A受体拮抗作用,IC₅₀处于较低的水平,约为10nM。A2A受体抑制活性均比阳性对照化合物伊曲茶碱(Istradefylline)高。

[0341] 实施例4本申请化合物选择性抑制腺苷受体

[0342] 4.1 cAMP累积测定法检测本申请化合物对其他腺苷受体的抑制活性

[0343] 通过基于TR-FRET的cAMP累积测定法评估了测试化合物22和Istradefylline (阳性对照药) 对其他3个腺苷受体A2b、A1和A3的抑制作用。

[0344] 1. 实验方法

[0345] (1)Gs偶联的腺苷受体A2b cAMP实验:

[0346] 在本实验中使用稳定表达腺苷受体A2b的HEK293细胞株作为研究对象(PerkinElmer, ES-013-C)进行实验。细胞培养于含有10%FBS (Hyclone, SH30406.05)、100U/mL青霉素-链霉素混合液(Gibco, 15140-122)和100 μ g/mL G418(Gibco, 11811031)的EMEM培养基(ATCC, 30-2003)中。使用TrypLETMExpress(Gibco, 12604-013)每周将细胞消化、传代约3次,并保持约70%至90%的汇合度。在实验当天,将细胞以500个每孔的密度接种到384孔微孔板(Corning, 3570)里,细胞接种时的溶液体系为10 μ L cAMP实验缓冲液中。cAMP实验缓冲液的配制方法为:在14mL 1 $\times$ HBSS(Gibco, 14025-076)中添加75 μ L 1 M HEPES(Gibco, 15630080)、200 μ L 7.5%BSA稳定剂(PerkinElmer, TRF0263)和7.5 μ L 20mM rolipram(Sigma, R6520)。制备1mM(1000 $\times$ 最终浓度)的参比激动剂NECA(Sigma, E2387)和参比抑制剂CVT-6883(Aobious, A0B4675),之后于100%DMSO(Millipore, 1029312500)中进行3倍梯度稀释。同样10mM的测试化合物,也以100%DMSO中进行3倍梯度稀释。将梯度稀释的参比化合物和测试化合物加入384孔化合物板(Labcyte, PP-0200)中。使用Echo(Labcyte, 550)转移10nL每孔梯度稀释的参比激动剂NECA至含有细胞的试验板中,将测试板在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。向测试板中加入5 μ L每孔的Eu-cAMP示踪剂工作溶液和5 μ L每孔的ULight-anti-cAMP工作溶液(PerkinElmer, TRF0263),将测试板置于25 $^{\circ}$ C孵育30分钟。使用EnVision酶标仪(PerkinElmer, 2009-0030)读取测试板中每孔的荧光信号值(λ_{ex} =320nm, λ_{em} =615nm和665nm),利用输出的参比激动剂NECA的荧光信号比值(Ratio 665/615)以及浓度计算其EC50值和EC80值。使用100%DMSO制备1000 $\times$ EC80的NECA。使用Echo转移10nL每孔梯度稀释的参比抑制剂CVT-6883和测试化合物至含有细胞的测试板中。将测试板置于25 $^{\circ}$ C孵育20分钟后,转移10nL每孔1000 $\times$ EC80的NECA到测试板中。将测试板置于37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。向测试板中加入5 μ L每孔的Eu-cAMP示踪剂工作溶液和5 μ L每孔的ULight-anti-cAMP工作溶液,将测试板置于25 $^{\circ}$ C孵育30分钟。读取测试板中每孔的荧光信号比值,利用输出的参比抑制剂和测试化合物的数据以及化合物的浓度计算其IC50值。

[0347] (2)Gi偶联的腺苷受体A1 cAMP实验:

[0348] 在本实验中使用稳定表达腺苷受体A1的CHO细胞株作为研究对象(PerkinElmer, ES-010-C)进行实验。细胞培养于含有10%FBS(Hyclone, SH30406.05)、100U/mL青霉素-链霉素混合液(Gibco, 15140-122)和400 μ g/mL G418(Gibco, 11811031)的F12培养基(Gibco, 11765-062)中。使用TrypLETMExpress(Gibco, 12604-013)每周将细胞消化、传代约3次,并保持约70%至90%的汇合度。在实验当天,将细胞以2000个每孔的密度接种到384孔微孔板(Corning, 3570)里,细胞接种时的溶液体系为10 μ L cAMP实验缓冲液。cAMP实验缓冲液的配制方法为:在14mL 1 $\times$ HBSS(Gibco, 14025-076)中添加75 μ L 1M HEPES(Gibco, 15630080)、200 μ L 7.5%BSA稳定剂(PerkinElmer, TRF0263)和7.5 μ L 20mM rolipram(Sigma, R6520)。制备1mM(1000 $\times$ 最终浓度)的参比激动剂NECA(Sigma, E2387)和参比抑制剂DPCPX(Sigma,

C101),之后于100%DMSO(Millipore,1029312500)中进行3倍梯度稀释。同样10mM的测试化合物也以100%DMSO中进行3倍梯度稀释。以100%DMSO制备1mM forskolin(Sigma,F3917)。将梯度稀释的参比化合物、测试化合物和1mM forskolin加入384孔化合物板(Labcyte,PP-0200)中。使用Echo(Labcyte,550)转移10nL每孔1mM forskolin和10nL每孔梯度稀释的参比激动剂NECA到含有细胞的测试板中,将测试板置于37°C孵育30分钟。向测试板中加入5μL每孔的Eu-cAMP示踪剂工作溶液和5μL每孔的ULight-anti-cAMP工作溶液(PerkinElmer,TRF0263),将测试板置于25°C孵育30分钟。使用EnVision酶标仪(PerkinElmer,2009-0030)读取测试板中每孔的荧光信号值($\lambda_{ex}=320\text{nm}$, $\lambda_{em}=615\text{nm}$ 和 665nm),利用输出的参比激动剂NECA的数据以及浓度计算其EC50值和EC80值。使用100%DMSO制备1000×EC80的NECA。使用Echo转移10nL每孔梯度稀释的参比抑制剂DPCPX和测试化合物到含有细胞的测试板中,将测试板置于25°C孵育20分钟。转移10nL每孔1000×EC80的NECA和10nL每孔1mM forskolin到测试板中。将测试板置于37°C孵育30分钟。向测试板中加入5μL每孔的Eu-cAMP示踪剂工作溶液和5μL每孔的ULight-anti-cAMP工作溶液,将测试板置于25°C孵育30分钟。读取测试板中每孔的荧光信号比值,利用输出的参比抑制剂和测试化合物的数据以及化合物的浓度计算其IC50值。

[0349] (3)Gi偶联的腺苷受体A3 cAMP实验:

[0350] 同样地,使用稳定表达腺苷受体A3的CHO细胞株作为研究对象(PerkinElmer,ES-012-C)进行实验。计算化合物的IC50值。

[0351] 2.数据分析

[0352] 1)Gs偶联的腺苷受体A2b cAMP实验:

$$[0353] \quad \% \text{ Inhibition} = 100\% \times \frac{\text{Ratio}_{\text{Compound}} - \text{Ratio}_{\text{Low Control}}}{\text{Ratio}_{\text{High Control}} - \text{Ratio}_{\text{Low Control}}}$$

[0354] %Inhibitor:%抑制率;

[0355] $\text{Ratio}_{\text{High Control}}$:参照化合物高荧光比值;

[0356] $\text{Ratio}_{\text{Low Control}}$:参照化合物低荧光比值;

[0357] $\text{Ratio}_{\text{Compound}}$:测试化合物荧光比值;

[0358] 2)Gi偶联的腺苷受体A1和A3 cAMP实验:

$$[0359] \quad \% \text{ Inhibition} = \left(1 - \frac{\text{Ratio}_{\text{Compound}} - \text{Ratio}_{\text{Low Control}}}{\text{Ratio}_{\text{High Control}} - \text{Ratio}_{\text{Low Control}}} \right) \times 100\%$$

[0360] %Inhibitor:%抑制率;

[0361] $\text{Ratio}_{\text{High Control}}$:参照化合物高荧光比值;

[0362] $\text{Ratio}_{\text{Low Control}}$:参照化合物低荧光比值;

[0363] $\text{Ratio}_{\text{Compound}}$:测试化合物荧光比值;

[0364] 3.实验结果

[0365] 表8本申请化合物对腺苷受体的抑制活性

[0366]

	IC ₅₀ (nM)结果总结		
	CHO细胞 (ADORA1)	HEK293细胞 (ADORA2B)	CHO细胞 (ADORA3)
化合物22	928.06	379.79	584.94
化合物40	387.84	342.60	928.11
化合物27	679.02	307.38	458.34
伊曲茶碱	1199.34	236.07	2075.30

[0367] 结合实施例3中的数据,化合物22、27、40抑制腺苷A_{2A}受体ADORA_{2A}活性的IC₅₀约为10nM,而抑制腺苷A_{2b}、A₁和A₃受体活性的IC₅₀均大于300nM。结果表明,在本实验所用的实验条件下,化合物22、27、40和伊曲茶碱(Istradefylline)都对腺苷ADORA_{2A}表现出了优于其他三种腺苷受体的选择抑制活性。

[0368] 4.2钙流实验测定本申请化合物对腺苷受体的选择性抑制活性

[0369] 1. 试验原理:

[0370] 本实验采用高表达与人Gq偶联的腺苷受体稳转细胞系,通过测试细胞内钙离子浓度的变化对化合物22的拮抗功能进行评价。A_{2A}R激动剂与A_{2A}R结合后可以激活下游通路,使细胞内钙离子浓度增加。拮抗剂会竞争性占据激动剂结合A_{2A}R的结合位点,从而中断胞内信号的传导,并造成细胞内钙离子浓度发生变化,通过检测细胞内钙离子信号的强弱,确定化合物对人ADORA₁、ADORA_{2A}、ADORA_{2B}和ADORA₃腺苷受体的拮抗活性。

[0371] 2. 细胞株信息:

[0372] ADORA1、ADORA2A、ADORA2B和ADORA3受体稳转细胞系均由药明康德生物部构建,采用ThermoFisher公司的Lipofectamine 2000转染试剂,将受体质粒和G15质粒转入宿主细胞内,然后挑单克隆,构建稳转细胞株。具体信息及培养条件如下:

靶标	参考序列	宿主细胞	培养条件
ADORA1	NM_000674	HEK293	DMEM+10%FBS;G418 300μg/mL;BS:2μg/mL
ADORA2A	NM_000681	CHO	F12+10%FBS;G418 300μg/mL;BS:2μg/mL
ADORA2B	NM_000676.2	HEK293	DMEM+10%FBS;G418 300μg/mL;BS:2μg/mL
ADORA3	NM_000677	CHO	F12+10%FBS;G418 300μg/mL;BS:2μg/mL

[0373] 3. 试剂和耗材:

[0374]

试剂/化合物名称	货号	生产厂家
DMEM培养基	11960-051	Invitrogen

[0375]	F12培养基	11765-047	Invitrogen
	L-谷氨酸盐	25030-081	Invitrogen
	胎牛血清	SV30087.03	Hyclone
	G418	10131-027	Invitrogen
	杀稻瘟菌素	A11139-03	Invitrogen
	Fluo-4 Direct试剂盒	F10471	Invitrogen
	384 孔多聚赖氨酸包被细胞板	781946	Greiner
	384孔化合物板	781280	Greiner
	NECA (参考化合物, 激动剂)	E2387	Sigma
	CGS-15943 (参考化合物, 抑制剂)	C199	Sigma

[0376] 4. 仪器设备:

仪器	型号	厂家
FLIPR	FT-0249	Molecular devices
Echo	Echo555	Labcyte
细胞计数仪	AN16097	Beckman

[0377] 5. 试验方法:

[0378] 细胞板的准备:

[0379] 1) 从液氮罐中取1管细胞并快速的在37℃水浴中溶解。

[0380] 2) 将细胞悬液加到提前加入预热的20mL培养基的离心管中。

[0381] 3) 在室温下1000转离心5分钟。

[0382] 4) 缓慢的倒掉上清,避免影响到沉降的细胞。

[0383] 5) 用10-30mL培养基重悬细胞,用移液器轻柔的吹打细胞。

[0384] 6) 用细胞计数仪计算细胞的活力及数目。

[0385] 7) 用培养基将细胞稀释至 1.0×10^6 cells/mL, 20 μ L/孔种入384孔多聚赖氨酸包被细胞板, 5% CO₂, 37℃培养箱孵育16-20小时。

[0386] Note: 细胞活力达到90%以上才可用于试验。

[0387] Fluo4-Direct染料的配制:

[0388] 配制250mM Probenecid溶液: 按照试剂盒操作说明, 在77mg probenecid中加入1mL FLIPR缓冲盐溶液, 现用现配。

[0389] 配制2 $\times$ (8mM) Fluo-4 Direct™加样缓冲液: 提前融化实验用量管数Fluo-4 Direct™, 每管加入10mL FLIPR缓冲盐溶液, 加入0.2mL 250mM Probenecid溶液, 避光振荡涡旋>5分钟, 现用现配。

[0390] 化合物准备及实验操作:

[0391] 1) 在整个实验过程中将化合物稀释 $30000/900 \times 6 = 200$ 倍

[0392] 化合物的配制: 将待测4个化合物用DMSO配制成10mM的母液, 放于4℃冰箱保存。

[0393] 2) 激动剂参考化合物准备: 将激动剂用Echo进行1:4梯度稀释, 10个点, 左右复孔, 接着转移900nL至相应化合物板; 然后加30 μ L实验用缓冲盐溶液至相应的化合物板。

[0394] 3) 参考和待测化合物板制备:将2mM(用DMSO将10mM的母液稀释5倍至2mM)受试化合物做1:4梯度稀释的10点剂量反应曲线。参考化合物CGS-15943用Echo做1:4梯度稀释的10点剂量反应曲线,对于ADORA1、ADORA2B和ADORA3受体CGS-15943起始浓度为200 μ M,对于ADORA2A受体CGS-15943起始浓度为20 μ M。

[0395] 4) 加30 μ L FLIPR缓冲盐溶液至相应的化合物板,备用。

[0396] 5) 将前一天准备好的细胞板从培养箱中取出,每孔加入20 μ L 2 $\times$ Fluo-4 DirectTM缓冲液,5%CO₂,37 $^{\circ}$ C培养箱孵育50分钟,室温避光放置10分钟。

[0397] 6) 在FLIPR仪器中放好化合物板,细胞板和枪头。

[0398] 7) 运行FLIPR仪器软件,按照设定程序,添加10 μ L实验用缓冲盐溶液到细胞板中,读取荧光信号。再添加10 μ L既定浓度的激动剂参考化合物到细胞板中,读取荧光信号。读数后,通过软件中“Max-Min”,“Read 91 to Maximum allowed”方法导出数据,计算每个细胞系的EC80,准备6 $\times$ EC80浓度的激动剂。

[0399] 8) 用缓冲盐溶液配制相应细胞6 $\times$ EC80浓度的参考化合物激动剂,30 μ L/孔添加至相应的化合物板,备用。

[0400] 9) 运行FLIPR仪器软件,按照设定程序,添加10 μ L既定浓度的检测化合物及参考化合物到细胞板中,读取荧光信号。再添加10 μ L 6 $\times$ EC80浓度的参考化合物激动剂到细胞板中,读取荧光信号。对于化合物的拮抗剂检测,通过软件中“Max-Min”,“Read 1 to 90”方法导出数据。

[0401] 10) 用Prism统计软件进行数据分析。

[0402] 分析数据公式如下:

[0403] 拮抗剂%Inhibition=100-(RLU-LC)/(DMSO-LC)*100

[0404] RLU:相对光吸收值,1至90的读值;

[0405] HC:DMSO组荧光信号平均值;

[0406] LC:拮抗剂最高浓度点荧光信号平均值。

[0407] 用GraphPad Prism 5.0中“log(inhibitor)vs response-variable slope”对数数据进行拟合,得到的IC₅₀。

[0408] 5.结果与结论:

[0409] 表9本申请化合物对腺苷受体的抑制活性

化合物	腺苷受体结果			
	ADORA1 (IC ₅₀ , nM, n=3)	ADORA2A (IC ₅₀ , nM, n=3)	ADORA2B (IC ₅₀ , nM, n=3)	ADORA3 (IC ₅₀ , nM, n=3)
[0410] 化合物22	218.37 $\pm$ 147.67	0.35 $\pm$ 0.07	106.07 $\pm$ 29.18	930.90 $\pm$ 54.13
化合物40	228.27 $\pm$ 104.72	1.17 $\pm$ 0.62	194.30 $\pm$ 25.50	6300.00 $\pm$ 2886.45
CGS-15943	4.37 $\pm$ 2.01	0.50 $\pm$ 0.03	7.35 $\pm$ 2.12	32.14 $\pm$ 4.52

[0411] 结果表明,化合物22和化合物40对ADORA_{2A}介导的信号传导的抑制能力更强,对于腺苷的其它3个受体的抑制能力较弱,即对ADORA_{2A}的抑制具有高选择性。

[0412] 实施例5本申请化合物能够结合腺苷受体

[0413] 1. 试验原理

[0414] 本实验应用放射性同位素配体竞争结合技术,在生化水平上检测受试化合物和参

考化合物CGS-15943对腺苷受体ADORA1、ADORA2A、ADORA2B、ADORA3的结合作用。

[0415] 2. 试剂/化合物和耗材

试剂耗材名称	货号	供应商
人腺苷ADORA1受体膜蛋白	ES-010-M400UA	PerkinElmer
人腺苷ADORA2A受体膜蛋白	RBHA2AM400UA	PerkinElmer
人腺苷ADORA2B受体膜蛋白	ES-013-M400UA	PerkinElmer
人腺苷ADORA3受体膜蛋白	ES-012-M400UA	PerkinElmer
[3H]DPCPX	NET974001MC	PerkinElmer
[3H]CGS-21680	NET1021250UC	PerkinElmer
[3H]HEMADO	ART1456	ARC
CGS-15943	C199-25MG	Sigma
NECA	E2387	Sigma
PEI	P3143	Sigma
Microscint 20闪烁液	6013329	PerkinElmer
Top Seal-A封板膜	6005250	PerkinElmer
96孔锥形聚丙烯板	5042-1385	Agilent
Unifilter-96 GF/C过滤板	6005174	PerkinElmer

[0416] 3. 仪器设备

仪器	型号	厂家
Harvester	C961961	PerkinElmer
Microbeta2	2450 Microplate counter	PerkinElmer

[0417] 4. 试验方法

[0418] 1) 检测缓冲液配制:

[0419] ADORA1: 25mM HEPES pH 7.4, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 100mM NaCl

[0420] ADORA2A: 50mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA

[0421] ADORA2B: 50mM HEPES pH 7.0, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA

[0422] ADORA3: 25mM HEPES pH 7.4, 10mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 0.5% BSA

[0423] 2) 洗液配制:

[0424] ADORA1: 25mM HEPES pH 7.4, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 100mM NaCl.

[0425] ADORA2A: 50mM Tris-HCl pH 7.4, 154mM NaCl

[0426] ADORA2B: 50mM HEPES pH 6.5, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.2% BSA

[0427] ADORA3: 50mM Tris-HCl pH 7.4

[0428] 3) 反应体系: 100μL细胞膜、100μL同位素、1μL化合物

[0429] 4) 化合物配制: 将受试化合物及参考化合物用100% DMSO稀释。对于受试化合物: 起始浓度为10μM, 双副孔, 4倍梯度稀释, 10个点, 最终工作浓度为0.038nM ~ 10μM (受试化合物对于ADORA2A靶点的第二次和第三次检测: 起始浓度为2μM, 双副孔, 4倍梯度稀释, 10个点, 最终工作浓度为0.0076nM ~ 2μM)。对于ADORA1、ADORA2A、ADORA2B、ADORA3参照化合物: 起始浓度为1μM, 双副孔, 4倍梯度稀释, 10个点, 最终工作浓度为0.0038nM ~ 1μM。

[0430] 5) 细胞膜配制: 将ADORA受体细胞膜用检测缓冲液配制成相应的浓度。

[0431] 6) 同位素配制:将同位素用检测缓冲液配置成相应的浓度。

靶点	细胞膜浓度	同位素	同位素终浓度
ADORA1	2.5 μ g/孔	[3H]DPCPX	1nM
ADORA2A	5 μ g/孔	[3H]CGS-21680	6nM
ADORA2B	20 μ g/孔	[3H]DPCPX	8nM
ADORA3	2 μ g/孔	[3H]HEMADO	1nM

[0432] 7) 待测化合物和参考化合物IC50测定:

[0433] 在96孔板中依次加入1 μ L待测样品和参考化合物。高信号对照孔为0.5%DMSO, ADORA1、ADORA2A、ADORA2B、ADORA3低信号对照孔为CGS-15943。加入100 μ L细胞和100 μ L同位素到所有实验孔中。将96孔板密封,ADORA1、ADORA2B、ADORA3室温(22 $^{\circ}$ C)下于摇床上(300rpm)孵育1小时,ADORA2A室温(22 $^{\circ}$ C)下于摇床上(300rpm)孵育2小时。同时,ADORA1、ADORA2A、ADORA2B、ADORA3用0.3%的PEI,室温浸泡GF/C过滤板至少30分钟,50 μ L/孔。孵育完成后,把孵育好的反应体系用Harvester收集到GF/C过滤板上,洗4次后在50 $^{\circ}$ C烘箱干燥0.5小时。把干燥好的GF/C过滤板底部封膜,每孔加入50 μ L闪烁液,并用Top-seal-A膜密封。使用Microbeta读数,使用GraphPad Prism 5.0分析数据。

[0434] 5. 数据处理分析

[0435] $\% \text{Inhibition} = 100 \times (1 - (\text{Sample_raw value} - \text{Low control_Average}) / (\text{High control_Average} - \text{Low control_Average}))$

[0436] %Inhibitor: %抑制率;

[0437] Sample_raw value: 测试化合物原始读数;

[0438] Low control_Average: 参照化合物低水平读数;

[0439] High control_Average: 参照化合物高水平读数;

[0440] 用GraphPad Prism 5.0中“log(inhibitor)vs response-variable slope”对数数据进行拟合,得到的IC50。

[0441] 6. 试验结果

[0442] 表10腺苷受体结合试验结果(IC50)

	ADORA1 (IC50, nM, n=3)	ADORA2A (IC50, nM, n=3)	ADORA2B (IC50, nM, n=3)	ADORA3 (IC50, nM, n=3)
[0443] 化合物22	820.70 $\pm$ 54.21	0.96 $\pm$ 0.11	344.27 $\pm$ 181.41	872.10 $\pm$ 492.41
化合物40	552.47 $\pm$ 283.33	1.85 $\pm$ 0.27	268.43 $\pm$ 87.47	1995.50 $\pm$ 1033.89
CGS-15943	4.48 $\pm$ 2.06	0.99 $\pm$ 0.30	4.71 $\pm$ 0.90	18.02 $\pm$ 11.42

[0444] 表11腺苷受体结合试验结果

	ADORA1 (IC50, nM, n=3)	ADORA2A (IC50, nM, n=3)	ADORA2B (IC50, nM, n=3)	ADORA3 (IC50, nM, n=3)
[0445] 化合物22	563.61	0.85	309.82	702.89
化合物40	441.33	1.64	241.57	1608.32
CGS-15943	3.55	0.88	4.24	14.52

[0446] 结果表明,化合物22和40对ADORA_{2A}均具有极高的结合作用,对腺苷的其他3个受体结合较弱,说明本申请化合物对ADORA_{2A}的结合选择性高。

[0447] 实施例6本申请化合物在小鼠利血平诱导的运动障碍模型中的作用

[0448] 6.1化合物22在小鼠利血平诱导的运动障碍模型中的作用

[0449] 1. 试验原理

[0450] 利血平 (Reserpine) 是一种吲哚类生物碱药物, 它可以通过抑制去甲肾上腺素能神经元末梢的再摄取, 导致运动减慢或无能, 从而出现了帕金森病相似的临床症状。其机制是利血平可以封闭囊泡内不可逆的单胺如DA、5-羟色胺 (5-HT) 和去甲肾上腺素 (NA) 的运输, 使单胺类物质其在胞内被降解, 从而消耗中枢和外周的单胺, 快速降低单胺水平, 导致运动障碍等帕金森病类似症状。给予A2A受体拮抗剂, 评估待测化合物能否改善小鼠的运动障碍, 评价指标包括行走距离、行走时间、直立次数和直立时间。

[0451] 2. 试验设计

[0452] 第1组: 溶剂对照组 (Vehicle1+Vehicle2), Vehicle1 (0.1%乙酸, 10mL/kg, 皮下注射) +Vehicle2 (含0.5%MC的乙酸-乙酸钠, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0453] 第2组: 模型组 (Reserpine+Vehicle2), Reserpine (0.6mg/kg, 10mL/kg, 皮下注射) +Vehicle2 (含0.5%MC的乙酸-乙酸钠, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0454] 第3组: Reserpine+Istradefylline组, Reserpine (0.6mg/kg, 10mL/kg, 皮下注射) +Istradefylline (10mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0455] 第4组: Reserpine+化合物22乙酸盐组, Reserpine (0.6mg/kg, 10mL/kg, 皮下注射) +化合物22 (3mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0456] 第5组: Reserpine+化合物22乙酸盐组, Reserpine (0.6mg/kg, 10mL/kg, 皮下注射) +化合物22 (10mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0457] 第6组: Reserpine+化合物22乙酸盐组, Reserpine (0.6mg/kg, 10mL/kg, 皮下注射) +化合物22 (30mg/kg, 10mL/kg, 灌胃给药, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0458] 雄性CD1种小鼠体重 29.5 ± 0.1 g。实际使用动物总数90只。动物购自北京维通利华实验技术有限公司 (动物合格证号: 1100112011009984), 并饲养于上海睿智化学研究有限公司动物房 (实验动物使用许可证: SYXK (沪) 2017-0018)。动物房为SPF级环境。

[0459] 3. 主要仪器和试剂

名称	供应商	型号
Laboras动物自发活动平台	Metris B.V., 荷兰	NA
试剂耗材名称	货号/批号	供应商
甲基纤维素	M0430-100G/SLCB9094	SIGMA
三水乙酸钠	G70149B/P1536840	GENERAL-REAGENT
利血平	R007/UQNCN-EH	TCI
Istradefylline	I1100/2PJU0	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

[0460] 4. 试验步骤

[0461] 1) 化合物配制

[0462] 配置浓度为0.06mg/mL的利血平溶液, 浓度为1mg/ml的Istradefylline溶液, 浓度为3mg/ml (浓度1)、1mg/ml (浓度2) 和0.3mg/ml (浓度3) 的化合物22乙酸盐溶液 (浓度1)。

[0463] 2) 试验

[0464] 试验开始前一天需将试验需要的3通道计时器、注射器、不锈钢工作台和工作凳以及相关记录表格提前放置于测试实验室内备用,并检查动物状态后,未发现该批动物有体重过小、断尾、斑秃、身体状态不佳的情况。实验动物共90只,试验前产生随机分组序列。根据随机序列,在试验当天将实验动物随机分为溶剂对照组,模型组,Istradefylline组,及3、10、30mg/kg的化合物22乙酸盐组。

[0465] 在试验第一天,根据预先设定的分组和时间点分别单次皮下注射0.1%乙酸或0.6mg/kg利血平,注射后将动物放回至饲养笼盒并推回原饲养间。

[0466] 在试验第二天进行活动度测试,试验前需要提前校正Laboras系统,使其处于正常工作状态。然后根据预先设定的时间点(单次皮下注射0.1%乙酸或1mg/kg利血平后17hr)灌胃给予Vehicle 2(含0.5%MC的乙酸-乙酸钠(pH=4.0)缓冲液)、Istradefylline或化合物22乙酸盐。给药后50min将小鼠放入独立的Laboras测试盒里,适应10min后启动Laboras行为学记录系统,此时动物处于末次给药后1hr,并连续记录60min。

[0467] 试验结束后将实验动物放回饲养笼盒,清理Laboras测试笼盒。

[0468] 试验结束后,Laboras行为系统自动分析小鼠的0-30min,30-60min,0-60min及每10min的行走距离(m)、行走时间(sec)、直立次数和直立时间(sec)。

[0469] 所有计量资料均以均数±标准误(平均值±SEM)表示,采用Prism 8.0统计软件作检验分析。

[0470] 5.结果与结论

[0471] 表12本申请化合物对小鼠行走距离的影响

组别	行走距离 (m, 平均值±SEM, n=15)		
	0-30 min	30-60 min	0-60 min
第1组	8.9±1.0	4.6±1.6	13.6±2.3
第2组	2.4±0.7	0.3±0.1	2.8±0.7
第3组	11.9±1.4	11.8±2.0	23.7±3.2
第4组	4.3±0.7	2.6±1.6	6.9±2.1
第5组	10.7±1.0	8.5±2.3	19.2±2.9
第6组	11.3±1.1	15.9±1.9	27.1±2.5

[0474] 表13本申请化合物对小鼠自发行走时间的影响

组别	行走时间 (sec, 平均值±SEM, n=15)		
	0-30 min	30-60 min	0-60 min
第1组	164.1±17.1	62.7±15.5	226.8±29.7
第2组	43.9±11.4	7.4±2.7	51.3±10.9
第3组	177.5±16.0	120.8±16.0	298.3±28.4
第4组	77.8±11.0	30.7±13.9	108.5±23.0
第5组	160.5±10.8	84.9±22.4	245.4±29.1
第6组	175.6±12.4	135.4±12.8	311.0±22.3

[0476] 表14本申请化合物对小鼠直立次数的影响

组别	直立次数 (sec, 平均值±SEM, n=15)		
	0-30 min	30-60 min	0-60 min
第1组	86.8±12.1	35.9±11.6	122.6±21.5
第2组	17.4±5.6	2.4±1.5	19.8±5.5
第3组	94.3±11.1	70.6±10.6	164.8±20.0
第4组	36.7±5.9	12.9±6.8	49.6±12.2
第5组	75.6±8.0	40.3±11.4	115.9±15.7
第6组	98.7±12.6	79.4±10.1	177.9±20.9

[0477] 结果如表12-14所示,结果显示,口服(OP)给予10mg/kg和30mg/kg的化合物22乙酸盐可以显著地增加行走距离、行走时间、直立次数。试验表明化合物22乙酸盐在利血平诱导的小鼠运动障碍模型中具有治疗作用,且药效存在明显的剂量效应关系。另外,对照药 Istradefylline 在该试验中显示了大致相同的药效。小鼠利血平诱导的运动障碍模型试验支持化合物22乙酸盐应用于帕金森疾病的治疗。

[0479] 6.2 化合物22乙酸盐在大鼠利血平诱导的运动障碍模型中的作用

[0480] 1. 实验设计

[0481] 第1组:溶剂对照组 (Vehicle1+Vehicle2): Vehicle1 (0.1%乙酸, 1mL/kg, 皮下注射) + Vehicle2 (含0.5%MC的乙酸-乙酸钠, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0482] 第2组:模型组 (Reserpine+Vehicle2), Reserpine (1mg/kg, 1mL/kg, 皮下注射) + Vehicle2 (含0.5%MC的乙酸-乙酸钠, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0483] 第3组: Reserpine+Istradefylline组, Reserpine (1mg/kg, 1mL/kg, 皮下注射) + Istradefylline (15mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0484] 第4组: Reserpine+化合物22乙酸盐组, Reserpine (1mg/kg, 1mL/kg, 皮下注射) + 化合物22乙酸盐 (7.5mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0485] 第5组: Reserpine+化合物22乙酸盐组, Reserpine (1mg/kg, 1mL/kg, 皮下注射) + 化合物22乙酸盐 (15mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, 行为学测试前60min给药), n=15;

[0486] 第6组: Reserpine+化合物22乙酸盐组, Reserpine (1mg/kg, 1mL/kg, 皮下注射) + 化合物22乙酸盐 (30mg/kg, 10mL/kg, 灌胃给药, 行为学测试前60min给药), n=15。

[0487] 2. 采用与11.1相同的方法分析小鼠的0-30min, 30-60min, 0-60min及每10min的行走距离(m)、行走时间(sec)、直立次数和直立时间(sec)。

[0488] 3. 结果与结论

[0489] 表15本申请化合物对大鼠行走距离的影响

[0490]

组别	行走距离 (m, 平均值±SEM, n=15)		
	0-30min	30-60min	0-60min
第1组	2.5±0.4	1.8±0.4	4.3±0.7
第2组	0.4±0.1	0.1±0.0	0.4±0.1
第3组	1.6±0.6	1.3±0.4	2.9±0.9
第4组	0.9±0.3	1.0±0.3	2.0±0.6
第5组	1.8±0.4	2.0±0.4	3.8±0.6
第6组	2.5±1.0	1.4±0.4	3.9±1.4

[0491] 表16本申请化合物对大鼠自发行走时间的影响

[0492]

组别	行走时间 (sec, 平均值±SEM, n=15)		
	0-30min	30-60min	0-60min
第1组	37.5±6.0	32.5±10.6	62.1±10.7
第2组	3.4±1.5	1.2±0.5	4.1±1.5
第3组	19.6±5.9	32.0±13.7	35.1±10.1
第4组	9.3±4.3	16.2±7.6	17.8±7.5
第5组	26.3±5.6	40.3±15.6	48.5±8.2
第6组	35.8±12.6	33.2±12.2	52.9±17.5

[0493] 表17受试化合物对大鼠直立次数的影响

[0494]

组别	直立次数 (sec, 平均值±SEM, n=15)		
	0-30min	30-60min	0-60min
第1组	68.1±8.5	47.0±8.7	115.0±16.0
第2组	13.8±2.9	2.7±1.3	16.5±3.8
第3组	44.1±7.9	51.6±9.7	95.7±16.3
第4组	28.5±7.1	28.3±6.9	56.7±12.6
第5组	51.9±7.4	58.2±7.7	110.0±12.7
第6组	56.5±9.6	41.5±6.7	97.9±15.3

[0495] 试验结果显示,本申请化合物在15mg/kg和30mg/kg剂量下可以显著地增加动物行走距离、行走时间、直立时间及次数。试验表明化合物22乙酸盐在利血平诱导的大鼠运动障碍模型中具有治疗作用,且存在剂量效应关系。另外,对照药istradefylline在该试验中显示了大致相同的药效。大鼠利血平诱导的运动障碍模型试验支持化合物22乙酸盐应用于帕金森疾病的治疗。

[0496] 实施例7本申请化合物在氟哌啶醇诱导的大鼠帕金森病僵直模型上的作用

[0497] 帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一类常见的神经系统退行性疾病,主要病理变化为黑质多巴胺能神经元丢失,多巴胺递质含量减少,导致病人出现静止性震颤、肌僵直、运动不能及姿势反射障碍等多种临床症状。多巴胺D2受体阻断剂氟哌啶醇(Haloperidol)能够阻断纹状体内的多巴胺D2受体,导致小鼠张力障碍性姿态即僵直和运动减少症状,此模型是一种公认的帕金森综合征的动物模型。评价受试物对Haloperidol诱导CD-1小鼠引起的帕金森病僵直症状的改善作用。

[0498] 7.1化合物40苯磺酸盐、化合物27和化合物22乙酸盐在氟哌啶醇诱导的大鼠帕金森病僵直模型上的作用

[0499] 1. 试验设计与方法

[0500] 1) 实验一:

[0501] 57只雄性CD-1小鼠,SPF级,购入时4周龄,实验时为8周龄,体重40g左右,随机分为5组,分别为Vehicle组(n=11)、化合物40苯磺酸盐1mg/kg组(n=11)、化合物40苯磺酸盐3mg/kg组(n=12)、化合物40苯磺酸盐10mg/kg组(n=12)、化合物40苯磺酸盐30mg/kg组(n=11)。1mg/kg Haloperidol皮下注射,注射体积10ml/kg,注射30min后灌胃各剂量化合物40,灌胃体积10ml/kg,给药完成后1h和4h分别进行Rearing和Bar Test检测,统计小鼠站立次数及在棒时间,评价化合物40对Haloperidol对CD-1小鼠引起的帕金森病僵直症状的改善作用。

[0502] 2) 实验二:

[0503] 40只雄性CD-1小鼠,SPF级,购入时4周龄,实验时为5周龄,体重25g左右,随机分为5组,分别为Vehicle组(n=8)、化合物22乙酸盐3mg/kg组(n=8)、化合物22乙酸盐10mg/kg组(n=8)、化合物22乙酸盐30mg/kg组(n=8)和Istradefylline 10mg/kg(n=8)。先灌胃各剂量化合物22乙酸盐,灌胃体积10ml/kg,30min后1mg/kg Haloperidol皮下注射,注射体积10ml/kg,给药完成后1h和4h分别进行Rearing和Bar Test检测,统计小鼠站立次数及在棒时间,评价化合物22乙酸盐对Haloperidol对CD-1小鼠引起的帕金森病僵直症状的改善作用。

[0504] 3) 实验三:

[0505] 40只雄性CD-1小鼠,SPF级,购入时4周龄,实验时为5周龄,体重25-30g左右,随机分为5组,分别为Vehicle组(n=8)、化合物273mg/kg组(n=8)、化合物2710mg/kg组(n=8)、化合物27 30mg/kg组(n=8)和Istradefylline 10mg/kg(n=8)。先灌胃各剂量化合物27,灌胃体积10ml/kg,30min后1mg/kg Haloperidol皮下注射,注射体积10ml/kg,给药完成后1h和4h分别进行Rearing和Bar Test检测,统计小鼠站立次数及在棒时间,评价化合物27对Haloperidol对CD-1小鼠引起的帕金森病僵直症状的改善作用。

[0506] 2. 材料、试剂/化合物信息

[0507] 实验动物:CD-1小鼠,SPF级,8周龄/5周龄,雄性,40g左右/25g左右,实验动物提供商:上海斯莱克实验动物有限责任公司;生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005;质量合格证号:20170005023704、20170005024947。

试剂耗材名称	货号/批号	供应商
甲基纤维素	P10995	adamas-beta
Haloperidol	H113852-5g/G1411016	Aladdin
醋酸钠	P1246037	GENERAL-REAGENT
冰醋酸	P1480181	adamas-beta
2-羟丙基- β -环糊精	B1922043	Aladdin
Istradefylline	2PJUO-EB	TCI

[0508] 4. 实验步骤

[0509] 1) 药物配制

[0510] Vehicle溶剂对照:40%羟丙基 β -环糊精溶液

[0511] 称取20.00g羟丙基 β -环糊精,加入50ml超纯水,漩涡震荡超声20min至溶液澄清,室温保存备用。

[0512] Vehicle溶剂对照:含0.5%MC的乙酸-乙酸钠(pH≈4.0)缓冲液

[0513] 配2M乙酸溶液:取11.6mL乙酸于100mL量筒,再加超纯水至100mL,即为2M乙酸,于100mL棕色瓶保存。

[0514] 配含0.5%MC的乙酸-乙酸钠(pH≈4.0)缓冲液:称取乙酸钠0.0904g,加1.95mL 2M乙酸,至100mL量筒,再加超纯水至约80mL,pH试纸测pH,约3.5~4,再加超纯水至100mL,再加入0.5013g MC,混匀,至MC完全溶解,于100mL棕色瓶,室温保存。

[0515] Haloperidol配制(给药体积10ml/kg)

[0516] 现配现用,称取0.0037g Haloperidol,加入7.4ml 0.9%生理盐水,漩涡振荡,加20ul 1M HCl,室温漩涡振荡超声20min,混匀,此时浓度为0.5mg/ml,稀释5倍至0.1mg/ml为工作浓度,剩余室温避光保存。

[0517] 化合物40苯磺酸盐溶液配制(给药体积10ml/kg)

[0518] 现用现配,校正系数为1.415,称取0.0199g化合物,加入4.7ml 40%HP-β-CD,室温涡旋超声10min,混匀,此时的工作浓度为3mg/ml;吸取1ml浓度为3mg/ml的溶液,加入2ml 40%HP-β-CD,此时的工作浓度为1mg/ml;吸取0.2ml浓度为3mg/ml的溶液,加入1.8ml 40%HP-β-CD,此时的工作浓度为0.3mg/ml;吸取0.2ml浓度为1mg/ml的溶液,加入1.8ml 40%HP-β-CD,此时的工作浓度为0.1mg/ml。

[0519] 化合物22乙酸盐溶液配制(给药体积10ml/kg)

[0520] 现用现配,校正系数为1.153,称取0.0225g化合物,加入6.5ml含0.5%MC的醋酸-醋酸钠缓冲液,室温涡旋超声10min,混匀,此时的工作浓度为3mg/ml;吸取1ml浓度为3mg/ml的溶液,加入2ml含0.5%MC的醋酸-醋酸钠缓冲液,此时的工作浓度为1mg/ml;吸取0.2ml浓度为3mg/ml的溶液,加入1.8ml含0.5%MC的醋酸-醋酸钠缓冲液,此时的工作浓度为0.3mg/ml。

[0521] 化合物27配制(给药体积10ml/kg)

[0522] 现用现配,校正系数为1.013,称取0.0182g化合物,加入6ml 40%HP-β-CD,室温涡旋超声10min,混匀,此时的工作浓度为3mg/ml;吸取1ml浓度为3mg/ml的溶液,加入2ml 40%HP-β-CD,此时的工作浓度为1mg/ml;吸取0.2ml浓度为3mg/ml的溶液,加入1.8ml 40%HP-β-CD,此时的工作浓度为0.3mg/ml。

[0523] Istradefylline配制(给药体积10ml/kg)

[0524] 现配现用,配1mg/ml,称取0.0040g,加4ml 40%HP-β-CD或者含0.5%MC的醋酸-醋酸钠缓冲液,室温涡旋超声10min,混匀。

[0525] 2)Haloperidol造模

[0526] Haloperidol小鼠腹部皮下注射,剂量1mg/kg,工作液浓度为0.1mg/ml,注射体积为10ml/kg。

[0527] 3)给药

[0528] 按照实验设计进行。

[0529] 4)Rearing检测方法

[0530] 药物干预后1h及4h,将小鼠放入直径20cm,高21cm的白色透明塑料桶内,开始录像前让小鼠在桶内适应5min。记录小鼠10min内的自发活动行为,统计站立次数,站立次数越多,说明小鼠自发探索活动越频繁,僵直程度越低。

[0531] 5) Bar Test检测方法

[0532] 1h及4h时间点Rearing测试结束后,进行Bar Test检测,将小鼠置于直径6cm,高度为6cm的长条形木棒上,前肢握住木棒,仅臀部或者后肢着地,后肢离开台面或者前肢离开木棒时停止计时,记录小鼠在棒时间,每只小鼠测试3次,统计最大在棒时间及平均在棒时间,在棒时间越长,说明小鼠僵直情况越严重。

[0533] 6) 统计学分析

[0534] 应用Prism GraphPad 7.0独立样本T检验对数据进行组间统计学分析, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

[0535] 5. 实验结果与结论

[0536] 表18不同剂量化合物40苯磺酸盐对小鼠行为学检测结果的影响($\bar{x} \pm SEM$)

[0537]	时间点	1h			4h		
	组别	最大在棒时间（sec）	平均在棒时间（sec）	站立次数	最大在棒时间（sec）	平均在棒时间（sec）	站立次数
	溶剂空白对照组	399.22±54.66	295.11±47.47	9.56±2.11	378.89±60.31	253.78±44.36	4.56±1.54
	化合物40 苯磺酸盐 1mg/kg	356.43±55.79	237.67±40.20	17.00±1.99	361.29±53.92	241.14±31.32	8.71±2.68
[0538]	化合物40 苯磺酸盐 3mg/kg	184.00±50.55*	120.05±35.31*	17.00±2.99	225.14±51.96	171.76±52.86	14.86±1.89*
	化合物40 苯磺酸盐 10mg/kg	57.00±11.21***	36.10±5.88**	34.90±4.75**	96.10±23.06**	66.07±13.96**	17.80±4.32*
	化合物40 苯磺酸盐 30mg/kg	34.88±6.68**	26.50±5.88**	43.25±3.89**	24.13±1.67**	20.00±1.28**	25.13±3.25**

[0539] 注:与Vehicle组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

[0540] 表18显示,小鼠注射Haloperidol之后,出现少动的状态,自发活动减少,僵直时间延长;给药化合物40苯磺酸盐组小鼠行为出现明显改善,在棒时间减少,站立次数增加,呈现一定的剂效关系。

[0541] 表19不同剂量的化合物22乙酸盐对小鼠行为学检测结果的影响($\bar{x} \pm SEM$)

[0542]	时间点	1h		4h	
	组别	最大在棒时间 (sec)	平均在棒时间 (sec)	最大在棒时间 (sec)	平均在棒时间 (sec)
	溶剂空白对照组	248.25±49.94	177.54±32.84	233.50±44.36	182.13±32.98
	化合物22乙酸盐 3mg/kg	157.50±18.11	109.38±13.74	172.25±58.28	109.33±26.37
	化合物22乙酸盐 10mg/kg	77.13±25.78*	41.88±10.56**	50.50±12.24**	33.17±6.69**
	化合物22乙酸盐 30mg/kg	42.25±8.18**	26.17±3.88***	32.88±6.21***	24.13±4.28***
	Istradefylline 10mg/kg	30.38±5.84**	23.04±4.88***	35.75±8.73**	24.67±5.21***

[0543] 注:与Vehicle组相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001

[0544] 表19显示,在Bar Test检测中,化合物22乙酸盐能够减少在棒时间,延长小鼠站立时间,且结果呈现好的剂量效应依赖关系,随着化合物22乙酸盐剂量的升高,僵直时间减少,在棒时间缩短,10mg/kg组和30mg/kg组药效与阳性药相当。

[0545] 表20不同剂量的化合物27对小鼠行为学检测结果的影响($\bar{x} \pm SEM$)

[0546]	时间点	1h		4h	
	组别	最大在棒时间 (sec)	平均在棒时间(sec)	最大在棒时间 (sec)	平均在棒时间(sec)
	溶剂空白对照组	147.63±15.82	111.92±13.49	170.25±26.73	126.71±16.14
[0547]	化合物 27 3mg/kg	88.00±22.07	56.83±11.67*	109.33±28.68	75.11±19.52
	化合物 27 10mg/kg	61.38±15.59**	34.83±8.63***	55.13±18.32**	39.13±14.33**
	化合物 27 30mg/kg	35.00±8.59***	22.04±4.19***	31.88±5.75***	23.00±4.46***
	Istradefylline 10mg/kg	40.75±13.17***	23.71±6.50***	54.75±15.58**	34.08±6.69***

[0548] 注:与Vehicle组相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001

[0549] 表20显示,在Bar Test检测中,化合物27能够减少在棒时间,延长小鼠站立时间,且结果呈现好的剂量依赖关系,随着化合物剂量的升高,僵直时间减少,在棒时间缩短,10mg/kg组药效与阳性药相当,30mg/kg组药效稍好与阳性药组。

[0550] 试验结果显示,在氟哌啶醇诱导的僵直症小鼠中,单次口服给予3个受试化合物后,试验小鼠均能极显著,僵直时间减少,在棒时间缩短,显示受试化合物化可以对抗或预防氟哌啶醇诱导的僵直症状,且存在剂量效应关系。另外,对照药istradefylline在该试验中显示了大致相同的药效。氟哌啶醇诱导的小鼠帕金森病僵直模型试验支持受试化合物应用于帕金森疾病的治疗。

[0551] 7.2化合物22乙酸盐在氟哌啶醇诱导的大鼠帕金森病僵直模型上的作用

[0552] 检测以下给药方案中的化合物乙酸盐在氟哌啶醇诱导的大鼠帕金森病僵直模型

上的作用。

[0553] 1. 实验设计

[0554] 第1组:空白对照组 (Vehicle1+Vehicle2), Vehicle 1 (含0.5%MC的乙酸-乙酸钠, 10mL/kg, 灌胃, 氟哌啶醇 (Haloperidol) 注射前30min给药) + Vehicle 2 (乙酸水溶液, 5mL/kg, 腹腔给药, 测试前给药), n=10;

[0555] 第2组:模型组 (Vehicle1+Haloperidol), Vehicle 1 (含0.5%MC的乙酸-乙酸钠, 10mL/kg, 灌胃, 氟哌啶醇注射前30min给药) + Haloperidol (1mg/kg, 5mL/kg, 腹腔给药, 测试前给药), n=10;

[0556] 第3组:Istradefylline+Haloperidol组:Istradefylline (10mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, Haloperidol注射前30min给药) + Haloperidol (1mg/kg, 5mL/kg, 腹腔给药, 测试前给药), n=10;

[0557] 第4组:化合物22乙酸盐+Haloperidol组:化合物22乙酸盐 (3mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, Haloperidol注射前30min给药) + Haloperidol (1mg/kg, 5mL/kg, 腹腔给药, 测试前给药), n=10;

[0558] 第5组:化合物22乙酸盐+Haloperidol组:化合物22乙酸盐 (10mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, Haloperidol注射前30min给药) + Haloperidol (1mg/kg, 5mL/kg, 腹腔给药, 测试前给药), n=10;

[0559] 第6组:化合物22乙酸盐+Haloperidol组:化合物22乙酸盐 (30mg/kg, 10mL/kg, 灌胃, Haloperidol注射前30min给药) + Haloperidol (1mg/kg, 5mL/kg, 腹腔给药, 测试前给药), n=10。

[0560] 2. 实验方法

[0561] 提前将当天所需动物从饲养间转运至操作间, 并适应环境至少30min后开始试验。根据预先设定的分组, 将试验动物分为空白对照组, 模型组, Istradefylline组, 及3、10、30mg/kg的化合物22AC组。试验动物口服给予Vehicle 1 (含0.5%MC的乙酸-乙酸钠 (pH=4.0) 缓冲液)、Istradefylline、或化合物22乙酸盐, 然后把动物放回至原饲养笼盒。30min后, 给试验动物腹腔注射Haloperidol或不含Haloperidol的Vehicle 2, 并放回至原饲养笼盒。

[0562] 在Haloperidol或Vehicle 2注射后60和120min时, 将大鼠的前肢轻柔的垂直置于一根长20.5cm, 直径1.2cm, 并高于工作台8.5cm的水平金属杆上, 再将后肢轻放于测试盒上, 开始计时。

[0563] 当大鼠的前肢在金属杆上移动或爬下时即停止计时, 记录大鼠双前肢在金属杆上保持姿势的持续的时间, 即记录为僵直潜伏期。如果大鼠前爪一直没有放下, 600sec终止观察, 则该动物的僵直潜伏期记为600sec。当天爬杆试验完成时, 每组动物取5只灌流, 固定并取全脑保存。

[0564] 僵直潜伏期: 大鼠两前肢在金属杆上保持静止不动的时间, 最长的僵直潜伏期为600sec。

[0565] 僵直率% = (僵直潜伏期/600) * 100%

[0566] 所有计量资料均以均数±标准误 (平均值±SEM) 表示, 采用Prism 8.0统计软件作检验分析。

[0567] 3. 结果与结论

[0568] 表21本申请化合物对大鼠僵直潜伏期的影响

组别	60 min (sec, 平均值±SEM)	p 值	120 min (sec, 平均值±SEM)	p 值
第1组	0.1±0.1	n/a	0±0	n/a
第2组	295.1±61.6	p=0.0001	396.2±63.0	P<0.0001
第3组	1.4±0.8	P<0.0001	0.4±0.3	P<0.0001
第4组	9.3±4.5	P<0.0001	24.8±11.2	P<0.0001
第5组	0.7±0.4	P<0.0001	2.6±1.5	P<0.0001
第6组	0.6±0.3	P<0.0001	0.6±0.4	P<0.0001

[0570] 表22本申请化合物对大鼠僵直率的影响

组别	60 min (sec, 平均值±SEM)	p 值	120 min (sec, 平均值±SEM)	p 值
第1组	0.02±0.02	n/a	0±0	n/a
第2组	49.2±10.3	p=0.0001	66.0±10.5	P<0.0001
第3组	0.2±0.1	P<0.0001	0.07±0.05	P<0.0001
第4组	1.6±0.8	P<0.0001	4.1±1.9	P<0.0001
第5组	0.1±0.06	P<0.0001	0.4±0.2	P<0.0001
第6组	0.1±0.05	P<0.0001	0.1±0.07	P<0.0001

[0573] 试验结果显示,在氟哌啶醇诱导的僵直症大鼠中,单次口服给予3、10和30mg/kg等三个剂量的化合物22乙酸盐后,试验大鼠均能极显著地缩短僵直潜伏期(降低僵直率),显示化合物22乙酸盐可以对抗或预防氟哌啶醇诱导的僵直症状,且存在剂量效应关系。另外,对照药istradefylline在该试验中显示了大致相同的药效。氟哌啶醇诱导的大鼠帕金森病僵直模型试验支持化合物22乙酸盐应用于帕金森疾病的治疗。

[0574] 7.3化合物40苯磺酸盐在氟哌啶醇诱导Wistar大鼠僵直症模型中的药效学评价

[0575] 1. 试验设计与方法

[0576] 实验共设置5组,造模组Vehicle、化合物40苯磺酸盐(3mg/kg、10mg/kg、30mg/kg),伊曲茶碱10mg/kg,n=8,8,9,8,8。灌胃给药Vehicle、化合物40苯磺酸盐(3mg/kg、10mg/kg、30mg/kg),伊曲茶碱10mg/kg,给药体积为10mL/kg,30min后开始腹腔注射Haloperidol 1mg/kg,给药体积为5mL/kg,造模后1h Rearing测试站立次数,Rearing检测完成后大鼠休息30min再进行Bar Test检测。

[0577] 2. 实验步骤

[0578] 1) 药物配制

[0579] 溶媒选择:40%HP-β-CD(2-羟丙基)-β-环糊精)

[0580] Vehicle溶剂对照(Ctrl):40%HP-β-CD

[0581] 1.40%HP-β-CD:称取120.2g加约250mL超纯水,900rpm磁力搅拌,室温,完全溶解,再加超纯水至300mL,室温避光保存于500mL棕色瓶。

[0582] 化合物40苯磺酸盐:现配现用,配3mg/mL,称取0.1777g,加42.5mL 40%HP-β-CD,漩涡振荡,室温超声10min,吹匀,再用20mL注射器(换成2.5mL针头),吹匀,配1mg/mL,稀释3倍,配0.3mg/mL,稀释10倍。

[0583] Istradefylline:现配现用,配1mg/mL,称取0.0312g,加31.2mL 40%HP- β -CD,漩涡振荡。

[0584] 氟哌啶醇诱导:现配现用,配0.2mg/mL,称取0.0148g,加100 μ L乙酸,再加2mL超纯水,再加390 μ L 14M NaOH,再倒至约35mL,测pH(笔式pH计),pH=5.86,加超纯水至74mL。

[0585] 2) Bar Test

[0586] Wistar大鼠,分别灌胃给不同浓度化合物40苯磺酸盐和伊曲茶碱,给药体积10mL/kg;30min后,Haloperidol腹腔给药(1mg/kg),给药体积为5mL/kg;Haloperidol给药后1h后Rearing测试站立次数,Rearing检测完成后大鼠休息30min再进行Bar Test检测。

[0587] Bar test时间:测试大鼠的僵直程度,用Bar test检测,即用直径8mm的木棒,固定于2个铁架台之间,离桌面高度为10cm,然后手抓大鼠尾巴,使其前爪搭在木棒上,后爪或屁股着地,一般大鼠第一次检测时,需要适应几次,测试前肢落棒时间或是后肢离开台面时间,一只大鼠测试3次。

[0588] 3) Rearing

[0589] 站立次数:用Rearing检测大鼠站立次数,即大鼠放入27*52cm笼子,适应5min,记录大鼠10min内的自发活动行为-站立次数。当大鼠后肢直立并将两个前肢举过肩膀并着地时,即为站立一次,一个前肢提举不计算在内。通常,大鼠会抬起前肢去触摸笼壁。如果大鼠连续几次将前肢举过肩而不落地,则只计一次。

[0590] 以Bar test的时间为衡量指标,包括平均时间及最大时间。时间长说明僵直严重,时间短说明僵直轻微,药物处理后,Bar test时间越短,说明药物缓解僵直的作用越好。

[0591] Rearing统计站立次数,站立次数越多,说明大鼠自发探索活动越频繁,僵直程度越低。

[0592] 4) 统计分析

[0593] 应用Prism GraphPad 7.0独立样本T检验对数据进行组间统计学分析, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

[0594] 5. 结果与结论

[0595] 表23本申请化合物对大鼠僵直时间的影响

组别	最大在棒时间(sec)	平均在棒时间(sec)	站立次数
Vehicle溶剂对照	463.75 $\pm$ 53.97	302.44 $\pm$ 36.24	0.00 $\pm$ 0.00
化合物40苯磺酸盐 3mg/kg	266.63 $\pm$ 50.73	212.67 $\pm$ 51.43	1.75 $\pm$ 0.60*
[0596] 化合物40苯磺酸盐 10mg/kg	69.67 $\pm$ 28.71****	41.67 $\pm$ 16.50****	7.89 $\pm$ 0.98****
化合物40苯磺酸盐 30mg/kg	18.00 $\pm$ 2.21****	12.29 $\pm$ 1.41****	13.00 $\pm$ 0.96****
伊曲茶碱 10mg/kg	15.38 $\pm$ 2.75****	10.33 $\pm$ 1.58****	23.25 $\pm$ 2.86****

[0597] 注:与Vehicle组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$

[0598] 表23的结果显示,化合物40苯磺酸盐剂量为10mg/kg、30mg/kg治疗组、伊曲茶碱10mg/kg与Vehicle组相比,大鼠僵直平均时间和最大时间显著缩短,站立次数也明显增加,均具有显著性差异(治疗后僵直平均时间P值分别为 < 0.0001 , < 0.0001 , < 0.0001 ,最大时

间P值分别为 <0.0001 , <0.0001 , <0.0001 , 站立次数P值分别为 <0.0001 , <0.0001 , <0.0001), 而化合物40苯磺酸盐剂量为3mg/kg治疗组与Vehicle组相比, 大鼠僵直平均时间和最大时间没有明显的统计学差异, 而站立次数具有显著性差异 (治疗后僵直平均时间, $P=0.2741$; 治疗后僵直最大时间, $P=0.0521$; 治疗后站立次数, $P=0.0351$)。氟哌啶醇诱导的大鼠帕金森病僵直模型试验支持化合物40苯磺酸盐应用于帕金森疾病的治疗。

[0599] 实施例8本申请化合物在MPTP (1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶) 诱导的小鼠帕金森模型中的药效学评价

[0600] 1. 实验原理

[0601] 通过注射黑质选择性毒物MPTP, 通过干预线粒体, 引起脂质过氧化, 使得膜结构紊乱, 影响细胞功能, 最终导致选择性破坏黑质DA能神经元, 导致黑质DA能神经元大量死亡, 纹状体酪氨酸羟化酶阳性纤维大量丧失, 纹状体DA及其代谢产物3,4-二羟基苯乙酸、高香草酸水平明显降低, 也有黑质纹状体小胶质细胞和星形细胞的增生和蓝斑、下丘脑等区的损伤, 与帕金森病患者的改变基本相同。评价受试物对MPTP诱导小鼠引起的帕金森病僵直症状的改善作用。

[0602] 2. 实验设计与方法

组别	动物数	给药	剂量	给药方式	给药频率
第1组	6	Vehicle	N/A	p.o.	一次
第2组	7	化合物22	10mpk	p.o.	一次
第3组	7	化合物22	30mpk	p.o.	一次

[0603] 3. 实验步骤

[0604] 选取C57BL/6雄性小鼠, 8周龄, 8周大的C57小鼠每天腹腔内 (i.p.) 注射溶于盐水中的媒介物 (生理盐水) 或MPTP (30mg/kg体重), 持续5天, 以诱发帕金森病。

[0605] 在最后一次MPTP注射后0.5小时, 通过胃内给药以两种剂量 (10mpk和30mpk) 给药。

[0606] 上次MPTP注射后1.5个小时, 进行10分钟的旷场测试 (总行进距离和站立次数)。

[0607] 4. 实验结果与结论

[0608] 表24本申请化合物对帕金森小鼠运动能力的影响

组别	运动路程 (cm)	站立次数
模型组 (n=6)	139.5	0.83
化合物22 (10mg/kg) (n=6)	647.0	18.3
化合物22 (30mg/kg) (n=6)	1107.3	31.0

[0609] 结果显示, 在MPTP诱导的小鼠帕金森模型中, 化合物22在10mg/kg和30mg/kg剂量条件下, 显著减轻小鼠的帕金森运动症状, 在运动路程和站立次数方面均得到明显的提升, 呈现出剂量-药效关系, 表现了很好的药效。MPTP诱导的小鼠帕金森模型试验支持受试化合物22应用于帕金森疾病的治疗。

[0610] 实施例9本申请化合物在6-OHDA诱导的大鼠旋转实验中的药效及对L-DOPA耐药性的克服作用评价

[0611] 1. 实验原理

[0612] 帕金森病患者在长期使用左旋多巴以后很容易出现耐药现象 (剂末现象), 即其药效持续时间往往会逐渐变短 (开期缩短), 功效也会越来越弱, 患者的病症也越来越不受控

制,通过与受试化合物联用,能够恢复左旋多巴对已经出现剂末现象的关闭期帕金森病患者的功效。采用6-羟基多巴胺(6-OHDA)定点注射毁损黑质纹状体的方法构建帕金森大鼠模型,然后给予动物长时间(计划3-4周)的左旋多巴(L-DOPA)/苄丝肼(Benserazide)(BID),在看到动物出现对左旋多巴的耐药现象以后,即当左旋多巴引起的旋转时间有明显减少以后(3-4周后),同时给予动物受试化合物和左旋多巴/苄丝肼,并测量动物的旋转时间,考察受试化合物对大鼠旋转症状的恢复情况。

[0613] 2. 实验设计

[0614] 第一阶段:将同一批成模大鼠(共15只)分别给予不同剂量(0,1,3,10,30和100mg/kg)的化合物22乙酸盐进行旋转试验,用旋转计数仪计数60min后,腹腔注射给予L-DOPA(5mg/kg)/Benserazide(1.25mg/kg),然后再次使用旋转计数仪进行旋转计数60min。每个剂量的旋转测试之间至少间隔1天。第一阶段总计测试6次。

[0615] 第一阶段动物分组和药物处理:

分组	动物数量	化合物22乙酸盐 (mg/kg)	给药次数	给药途径	给药体积 (mL/kg)	旋转诱导
[0616]	15	0	单次	口服	5	L-DOPA (5 mg/kg)/Benserazide (1.25 mg/kg), 腹腔注射, 单次给药
		1	单次	口服	5	
		3	单次	口服	5	
		10	单次	口服	5	
		30	单次	口服	5	
		100	单次	口服	5	

[0617] 第二阶段:第2、3、4、5和6组的试验动物均每天腹腔注射给予两次高剂量的L-DOPA(25mg/kg)/Benserazide(6.25mg/kg),目的是为了诱发出出现耐药现象,其中在第0(第0天为开始给予高剂量L-DOPA/Benserazide的前一天)、7、14、21和22天分别进行5次旋转测试,测试当天所有试验动物均只腹腔注射给予一次的L-DOPA(20mg/kg)/Benserazide(5mg/kg)诱导旋转。在第22天,在腹腔注射给予L-DOPA(20mg/kg)/Benserazide(5mg/kg)之前60min,各试验组先分别口服给予溶媒,受试药或阳性药。为了评估化合物22乙酸盐是否能够预防动物对L-DOPA/Benserazide出现耐药现象,除了每天腹腔注射给予两次L-DOPA(25mg/kg)/Benserazide(6.25mg/kg)以外,第7组和第8组的试验动物还在每天分别口服给予两次的受试药化合物22乙酸盐和对照药Istradefylline,其中在第0、7、14和21天分别进行4次旋转测试。在测试当天,受试药和对照药均只口服给予1次;这一天所有试验动物也均只腹腔注射给予一次的L-DOPA(20mg/kg)/Benserazide(5mg/kg)诱导旋转。在第二阶段,用旋转计数仪进行旋转计数的时间均为180min。

[0618]

分 组	动 物 数量	治疗药物	给药剂量 (mg/kg)	给药次数	给药体积 (mL/kg)	给 药 途 径	耐药模
2	10	溶媒	-	BID*21 单次(Day22)	5	口服	L-DOPA (25 mg/kg)/ Benserazide (6.25 mg/kg), 腹腔注射， BID*21)
3	10	化合物22乙酸 盐	7.5	单次(Day22)	5	口服	
4	10	化合物22乙酸 盐	15	单次(Day22)	5	口服	
6	10	化合物22乙酸	30	单次(Day22)	5	口服	

[0619]

		盐					
5	10	Istradefylline	10	单次(Day22)	5	口服	
7	10	化合物22乙酸 盐	5 or 10	BID*21	5	口服	
8	10	Istradefylline	10	BID*21	5	口服	

[0620] 3.实验试剂和动物:

[0621] 第一阶段:Wistar大鼠,6-8周,雄性,178-213克,试验动物提供商:北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0006,质量合格证号:1100112011004974;

[0622] 第二阶段:Wistar大鼠,6-8周,雄性,166-225克,试验动物提供商:北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0006,质量合格证号:1100112011011824、1100112011011826;

试剂耗材名称	货号/批号	供应商
甲基纤维素	079K0054V	Sigma-Aldrich
冰醋酸	/	天津市光复科技发展有限公司
三水乙酸钠	WXBC8551V	Sigma-Aldrich
6-羟基多巴胺	MKCH0942	Sigma-Aldrich
L-抗坏血酸	SLBS0713V	Sigma-Aldrich
盐酸阿扑吗啡	/	中检所
左旋多巴	SLCB0627	Sigma-Aldrich
盐酸苳丝肼	BCBZ1809	Sigma-Aldrich

[0623] 4.实验步骤与方法

[0624] 帕金森大鼠造模:

[0625] L-DOPA注射量:每只大鼠左侧内侧前脑束(MFB)注射6-OHDA溶液(2.5 μ g/ μ l)4 μ l。

[0626] L-DOPA注射坐标:以前囟为标准参考点,参照大鼠脑立体定位图谱,注射左侧的内侧前脑束:anterior(A),-2.5mm;lateral(L),+2.0mm;ventral(V),-8.5mm。

[0627] L-DOPA注射速度:注射速度1 μ l/min,注射后原位留针5min,再以1mm/min的速度缓慢退针,缝合伤口。

[0628] 按照实验设计的方法分组和给药。

[0629] 第一阶段只测试动物的旋转圈数,仅在第二阶段测试旋转反应时间。

[0630] 在第二阶段,试验动物腹腔注射给予L-DOPA/Benserazide后,每5min记录一次总

旋转圈数, 依此计算出每5min的旋转圈数, 并从中找出旋转圈数最多的5min, 定义该5min内的旋转圈数为峰值旋转圈数。旋转圈数增至峰值旋转圈数20%的第一个5min为旋转反应时间的起始点, 旋转圈数降至峰值旋转圈数20%的第一个5min为旋转反应时间的终止点, 从起始点到终止点之间的时间算作旋转反应时间。

[0631] 试验结果以“均值±标准差”表示。数据采用SPSS16.0软件包进行数据统计分析, 采用单因素方差分析法 (One-way ANOVA), 配对样本T检验以及独立样本T检验进行比较, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

[0632] 6. 结果与结论

[0633] 第一阶段的结果如表25和26所示。

[0634] 表25化合物22乙酸盐单独给药后的总旋转圈数

[0635]	受试药	受试药剂量 (mg/kg)	总旋转圈数 (60 min)
	化合物22乙酸盐	0	10.4±7.8
		1	7.7±5.6
		3	17.1±18.7
		10	11.6±13.9
		30	30.7±22.5*
		100	35.2±18.8

[0636] 注: 与溶媒组 (化合物22乙酸盐, 0mg/kg) 相比, $*P < 0.05$ 。

[0637] 表26化合物22乙酸盐与L-DOPA联用的总旋转圈数 (平均值±标准差)

[0638]	受试药	受试药剂量 (mg/kg)	旋转诱导药物及剂量	总旋转圈数 (60 min)
	化合物22乙酸盐	0	L-DOPA (5 mg/kg)/ Benserazide (1.25 mg/kg)	21.2±16.2
		1		41.4±80.8
		3		36.6±46.3
		10		109.4±205.2
		30		285.2±283.8*
		100		379.3±326.4*

[0639] 注: 化合物22乙酸盐口服1小时后腹腔注射给予L-DOPA (5mg/kg) /Benserazide (1.25mg/kg)。与溶媒组 (化合物22乙酸盐, 0mg/kg) 相比, $*P < 0.05$ 。

[0640] 第一阶段试验旨在评价不同剂量 (0, 1, 3, 10, 30和100mg/kg) 的受试药化合物22乙酸盐对6-OHDA诱导的大鼠对侧旋转作用的药效。

[0641] 结果显示, 与给予溶媒 (化合物22乙酸盐, 0mg/kg) 相比, 单独给予不同剂量的受试药化合物22乙酸盐后, 动物的旋转圈数在高剂量时有所增加, 其中受试药在30mg/kg剂量下可显著增加对侧旋转圈数。

[0642] 虽然单独用药时化合物22乙酸盐在所有剂量下引起动物旋转的程度都不高, 而且L-DOPA/Benserazide在低剂量下单独起作用的药效也不明显, 但在保持L-DOPA/Benserazide为同等低剂量的情况下, 化合物22乙酸盐与L-DOPA联用的药效明显, 受试药化合物22乙酸盐在5个剂量下均可增加L-DOPA/Benserazide所引起的对侧旋转圈数, 并呈剂量依赖关系, 其中在30mg/kg和100mg/kg的剂量下, 化合物22乙酸盐能够显著增加动物的对侧旋转圈数。

[0643] 第二阶段的结果如表27所示。

[0644] 表27各试验组动物的旋转反应时间 (平均值±标准差, min)

[0645]

组别	旋转反应时间-第0天	旋转反应时间-第7天	旋转反应时间-第14天	旋转反应时间-第21天	旋转反应时间-第22天
第2组: 溶媒 + L-DOPA (20-25 mg/kg)/Benserazide (5-6.25 mg/kg)	139.4±17.6	121.1±9.9#	109.3±18.1#	113.6±11.8#	119.3±17.4#
第3组: 化合物22乙酸盐 (7.5 mg/kg, 第22天) + L-DOPA (20-25 mg/kg)/Benserazide (5-6.25 mg/kg)	129.0±9.1	110.0±27.1	109.5±11.7	111.5±14.0	133.5±30.0
第4组: 化合物22乙酸盐 (15 mg/kg, 第22天) + L-DOPA (20-25 mg/kg)/Benserazide (5-6.25 mg/kg)	128.9±11.7	113.3±13.0	111.1±17.8	97.5±42.7	146.3±37.0&
第5组: Istradefylline (10 mg/kg, 第22天) + L-DOPA (20-25 mg/kg)/Benserazide (5-6.25 mg/kg)	116.1±34.4	126.7±10.6	116.3±13.8	114.4±15.9	150.6±37.8&
第6组: 化合物22乙酸盐 (30 mg/kg, 第22天) + L-DOPA (20-25 mg/kg)/Benserazide (5-6.25 mg/kg)	135.0±13.1	121.0±13.3	110.6±21.9	104.4±23.0	153.9±22.7&
第7组: 化合物22乙酸盐 (5 or 10 mg/kg) + L-DOPA (20-25 mg/kg)/Benserazide (5-6.25 mg/kg)	150.5±11.9	145.6±3.0*	133.9±8.9*#	128.3±13.5*#	-
第8组: Istradefylline (10 mg/kg) + L-DOPA (20-25 mg/kg)/Benserazide (5-6.25 mg/kg)	161.5±14.2	125.0±23.5	-	-	-

[0646]

[0647] 结果显示, 给予6-OHDA帕金森模型大鼠高剂量的L-DOPA (25mg/kg, BID) / Benserazide (6.25mg/kg, BID) 后, 大鼠在第7天即出现对L-DOPA的耐药性, 表现为L-DOPA诱导的旋转反应时间明显缩短, 并一直维持到试验结束的第22天。

[0648] 在第22天, 单次给予已出现耐药性的6-OHDA帕金森模型大鼠不同剂量的化合物22乙酸盐后 (7.5、15和30mg/kg), 与第0天和21天相比, 受试药能在不同程度上恢复或增加动物的旋转反应时间, 其中受试药在15和30mg/k剂量下能够显著增加旋转反应时间 (与第21

天相比),并存在剂量依赖关系。这说明,在动物对L-DOPA/Benserazide出现耐药性以后,化合物22乙酸盐能够有效地恢复或提高L-DOPA在耐药动物中的原有药效。

[0649] 试验结果也显示,化合物22乙酸盐还可能有效地预防或减缓6-OHDA帕金森模型大鼠对L-DOPA/Benserazide的耐药性。

[0650] 另外,与模型对照组相比,试验期间各试验组大鼠体重无明显变化,表明受试药物化合物22乙酸盐对试验动物的体重无明显影响。

[0651] 该模型试验显示,当帕金森病患者由于长期使用左旋多巴而出现耐药现象以后,通过与化合物22乙酸盐联用,左旋多巴有可能恢复对这些关闭期帕金森病患者的治疗功效。支持权利要求书中对于帕金森疾病治疗的应用。

[0652] 实施例10本申请化合物在鼠源结肠癌MC38细胞株皮下同种移植C57BL/6雌性小鼠模型中的药效学评价

[0653] 1. 试验原理

[0654] MC38小鼠结肠癌细胞模型为结肠癌药效验证常用模型,多用作结直肠癌发生及转移方向研究,并成为肿瘤药效验证的常用途径。评价测试药物在鼠源结肠癌MC38细胞株皮下同种移植雌性C57BL/6小鼠动物模型中的抗肿瘤作用。

[0655] 2. 试验设计

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	计划给药周期	实际给药周期
1	10	溶媒对照	0	p.o.	QD×14 or 28天	QD×25天
2	10	Anti-PD-1	100μg/mouse	i.p.	Days 7, 9, 11, and 13	Days 7, 9, 11, and 13
3	10	化合物22	30	p.o.	QD×14 or 28天	QD×25天
4	10	化合物22	30	p.o.	QD×14 or 28天	QD×25天
		Anti-PD-1	100μg/mouse	i.p.	Days 7, 9, 11, and 13	Days 7, 9, 11, and 13
5	10	化合物22	100	p.o.	QD×14 or 28天	QD×25天

[0657] 3. 试验材料和试剂

[0658] 实验动物:C57BL/6小鼠,雌性,7-9周(肿瘤细胞接种时的小鼠周龄),体重16.4-20.1g,购自上海灵畅生物科技有限公司(LC),生产许可证号:SCXK(沪)2013-0018,动物合格证编号:2013001837385。饲养环境:SPF级。

[0659] Anti-PD-1抗体:批号:695318A1B,包装规格:18mg,由BioXcell提供,无色溶液,4℃保存。

[0660] 溶媒配制:称取16.8g羟丙基-beta-环糊精(淄博千汇生物科技有限公司,批号:160101),加入42ml灭菌水,完全溶解后待用。

[0661] 4. 实验方法

[0662] MC38细胞培养在含10%胎牛血清的DMEM培养液中。收集指数生长期的MC38细胞,PBS重悬至适合浓度用于小鼠皮下肿瘤接种。

[0663] 雌性小鼠右侧皮下接种 1×10^6 MC38细胞。接种当天定义为第0天。MC38细胞接种第二天(Day1),根据体重随机分组给药。分别配制3mg/mL和10mg/mL的化合物22溶液备用。

[0664] 肿瘤体积计算公式:肿瘤体积(mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中a表示长径,b表示短径);

[0665] 肿瘤增殖率, T/C%, 即在某一时间点, 治疗组和对照组肿瘤体积或瘤重的百分比值。

[0666] 计算公式如下:

[0667] $T/C\% = T_{TV}/C_{TV} \times 100\%$ (T_{TV} : 治疗组在某一特定时间点的平均TV; C_{TV} : 溶媒对照组在某一特定时间点的平均TV);

[0668] 或 $T/C\% = T_{TW}/C_{TW} \times 100\%$ (T_{TW} : 治疗组实验终结时平均瘤重; C_{TW} : 溶媒对照组实验终结时平均瘤重)。

[0669] 肿瘤抑制率, TGI(%), 计算公式如下: $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(TV)或瘤重(TW))。

[0670] 所有实验结果以平均瘤体积 $\pm$ SEM(平均标准误差)表示。不同组间的统计分析选择最佳药物治疗点(通常是在最后一次给药后)。用独立样本T检验方法比较治疗组肿瘤体积与对照组相比有无显著性差异。所有的数据均用SPSS18.0进行分析。 $p < 0.05$ 为具有显著性差异。

[0671] 5. 实验结果与讨论

[0672] 表28本申请化合物对结肠癌小鼠模型的药效

实验组		第22天			
		肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P Value (相较于对照组)
[0673]	第1组 溶媒对照组	1839.95 $\pm$ 166.98	/	/	/
	第2组 Anti-PD-1(100 μ g/animal)	440.32 $\pm$ 137.06	76	24	<0.001
	第3组 化合物22 (30 mg/kg)	1205.60 $\pm$ 259.65	34	66	0.055
	第4组 Anti-PD-1 (100 μ g/animal)	268.89 $\pm$ 57.10	85	15	<0.001
	化合物22 (30 mg/kg)				
	第5组 化合物22 (100 mg/kg)	951.28 $\pm$ 116.30	48	52	<0.001

[0674] 试验结果显示, 在MC38小鼠结肠癌细胞模型中, 测试化合物22在30mg/kg, 100mg/kg的剂量条件下, 第22天显示出良好的肿瘤抑制活性, 肿瘤抑制率(TGI)分别为34%和48%。测试化合物22与Anti-PD-1抗体联用, 同样展现出优异的抗肿瘤体内活性, 肿瘤抑制率(TGI)分为85%, 均未见动物死亡和体重显著变化。以上实验支持化合物22作为单药或联合Anti-PD-1抗体在相应肿瘤适应症中的应用。

[0675] 实施例11本申请化合物在B16F10鼠源黑色素瘤模型中的药效学评价

[0676] 1. 试验原理

[0677] B16F10鼠源黑色素瘤模型是经典的黑色素瘤药效评估模型, 采用同种B16F10肿瘤细胞接种于雌性C57BL/6小鼠皮下造模而成。给与受试物, 评估对模型中肿瘤生长的抑制效果。

[0678] 2. 实验设计

[0679]

组别	例数	治疗	剂量 (mg/kg)*	给药体积 (ml/kg)	给药途径	给药频率	疗程
1	12	溶剂对照	-	10	p.o.	QD	22天
2	12	Anti PD-1	10 mg/kg	5	i.p.	2/WK	5次
3	12	化合物22	50 mg/kg	10	p.o.	QD	25天
4	12	化合物22	50 mg/kg	10	p.o.	QD	25天
		Anti PD-1	10 mg/kg	5	i.p.	2/WK	7次

[0680] 3. 试验材料和试剂

[0681] 实验动物:种属:Rodent;品系:C57BL/6mice;等级:SPF级;周龄:6-8周;性别:

[0682] 雌性;体重:18-22g;实验动物提供商:北京维通利华生物技术有限公司;生产许可证号:SCXK(京)2016-0006;质量合格证号:1100111911039475;

[0683] Anti PD-1抗体:提供单位:康龙化成(北京)新药技术股份有限公司;批次:717919M1:

[0684] 溶媒:40%羟丙基-β-环糊精(SIGMA,批次:Z08D9Y76902;称取120g HP-beta-CD用蒸馏水溶解,最后用烧杯定容至300ml,配置成40%羟丙基-β-环糊精溶液)。

[0685] 4. 实验方法

[0686] 用含有灭活的10%的胎牛血清,100U/ml的青霉素和100μg/ml的链霉素以及2mM谷氨酰胺的DMEM培养基在37℃、5%CO₂的培养箱中培养B16F10肿瘤细胞,每隔3至4天待细胞长满后分瓶传代。将处于对数生长期的肿瘤细胞用于体内肿瘤的接种。

[0687] 将无血清的DMEM培养液重悬的B16F10肿瘤细胞以 1×10^5 /100μl接种于实验动物的右侧肋部皮下。第二组当肿瘤长至75mm³时选出12只肿瘤体积较均一的动物按照实验设计给药。

[0688] 称取31.99mg(纯度93.79%)化合物22加入6ml 40%HP-beta-CD溶液,涡旋超声混匀,配制5mg/ml浓度药物待用。

[0689] 移液枪吸取7.18mg/ml Anti PD-1 0.418ml加入1.082ml PH7.0 PBS溶液,轻轻倒置混匀,配制2mg/ml浓度溶液待用。

[0690] 肿瘤接种的第一天为D0天,第一、三、四组从肿瘤接种的第二天开始给药,第二组当肿瘤体积达到75mm³时开始给药。

[0691] 肿瘤体积:每周使用游标卡尺对肿瘤体积进行3次的测量,测量肿瘤的长径和短径,其体积计算公式为:体积=0.5×长径×短径²。

[0692] 肿瘤生长抑制率(TGI, %):

[0693] 肿瘤生长抑制率(TGI, %) = $(1 - T/C) \times 100$ 。

[0694] $TGI = 100 - T/C \times 100$,

[0695] $T/C(\%) = (\text{治疗组当日肿瘤体积的均值} - \text{治疗组初始D0天肿瘤体积的均值}) / (\text{对照组当日肿瘤体积的均值} - \text{对照组初始D0天肿瘤体积的均值}) \times 100$ 。

[0696] 应用Graphpad Prism 8.0进行生存数据分析。

[0697] 5. 实验结果与讨论

[0698] 表29本申请化合物对黑色素瘤小鼠模型的肿瘤抑制药效

组别	治疗	肿瘤体积 (mm ³ , 第18天) ^a	% 肿瘤体积增殖 (mm ³ , 第18天) ^a	肿瘤抑制率 (%) ^c	P 值 ^b
[0699]	1 溶剂对照	2,265 ± 288	3,032 ± 404	-	-
	2 Anti PD-1 10 mg/kg	2,071 ± 199	2,822 ± 253	8.6	0.586
	3 化合物22 50 mg/kg	1,764 ± 314	2,425 ± 415	22.1	0.173
	4 化合物22 50 mg/kg + Anti PD-1 10 mg/kg	1,176 ± 199	1,750 ± 277	48.1	0.004

[0700] ^a均值±标准误; ^bvs. 溶剂对照组;

[0701] 试验结果显示,在B16F10鼠源黑色素瘤模型中,肿瘤接种后第18天的治疗结果显示,化合物22与Anti PD-1联合治疗组(平均肿瘤体积为1176mm³)具有显著性抗肿瘤作用(TGI=48.1%, P=0.004, vs. 溶剂对照组);化合物22单独治疗组体现出较大的抗肿瘤趋势(平均肿瘤体积为1764mm³, TGI=22.1%, P=0.173, vs. 溶剂对照组);Anti PD-1单独治疗组(平均肿瘤体积分别为2071mm³, TGI=8.6%, P=0.586, vs. 溶剂对照组)没有抗肿瘤作用,这与模型本身为Anti PD-1耐药模型有关。实验中均未见动物死亡和体重显著变化。以上实验支持化合物22作为单药或联合Anti-PD-1抗体在相应肿瘤适应症中的应用。

[0702] 实施例12本申请化合物在A20鼠源淋巴瘤(B淋巴细胞)同种移植模型中的药效学评价

[0703] 1. 实验原理

[0704] A20鼠源淋巴瘤(B淋巴细胞)同种移植模型是经典的B淋巴细胞瘤的药效评估模型,采用同种将A20肿瘤细胞接种于雌性BALB/c小鼠右侧肋部皮下造模而成。给与受试物,评估对模型中肿瘤生长的抑制效果。

[0705] 2. 实验设计

组别	例数	治疗	剂量 (mg/kg)	给药体积 (ml/kg)	给药途径	给药频率	疗程
[0706]	1	12 溶剂对照	-	10	p.o.	QD	24天
	2	12 化合物22	50 mg/kg	10	p.o.	QD	24天

[0707] 3. 试验材料和试剂

[0708] 实验动物:种属:Rodent;品系:BALB/c mice;等级:SPF级;周龄:6-8周;性别:

[0709] 雌性;体重:18-21g;实验动物提供商:北京维通利华生物技术有限公司;生产许可证号:SCXK(京)2016-0006;质量合格证号:1100111911036383;

[0710] 溶媒:40%羟丙基-β-环糊精(SIGMA,批次:Z08D9Y76902;称取120g HP-beta-CD用蒸馏水溶解,最后用烧杯定容至300ml,配置成40%羟丙基-β-环糊精溶液)。

[0711] 4. 实验方法

[0712] 用含有灭活的10%的胎牛血清,100U/ml的青霉素和100μg/ml的链霉素以及0.05mM2-巯基乙醇的RPMI 1640培养基在37℃、5%CO₂的培养箱中培养A20肿瘤细胞,每隔3至4天待细胞长满后分瓶传代。将处于对数生长期的肿瘤细胞用于体内肿瘤的接种。

[0713] 将无血清的RPMI 1640培养液重悬的A20肿瘤细胞以3×10⁵/100μl接种于实验动物的右侧肋部皮下,共接种30只动物。肿瘤细胞接种后的第一天根据体重选出24只体重较均一的动物分组给药,每组各12只,具体给药方案按照实验设计进行。

[0714] 称取15.99mg (纯度93.79%) 化合物22加入3ml 40%HP-beta-CD溶液, 涡旋超声混匀, 配制5mg/mL的化合物22溶液使用。

[0715] 肿瘤体积: 每周使用游标卡尺对肿瘤体积进行3次的测量, 测量肿瘤的长径和短径, 其体积计算公式为: 体积 = $0.5 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ 。

[0716] 肿瘤生长抑制率 (TGI, %):

[0717] 肿瘤生长抑制率 (TGI, %) = $(1 - T/C) \times 100$,

[0718] $TGI = 100 - T/C \times 100$;

[0719] $T/C (\%) = (\text{治疗组当日肿瘤体积的均值} - \text{治疗组初始D0天肿瘤体积的均值}) / (\text{对照组当日肿瘤体积的均值} - \text{对照组初始D0天肿瘤体积的均值}) \times 100$ 。

[0720] 应用SPSS T-test检验对肿瘤体积进行组间统计学分析。

[0721] 5. 实验结果与结论

[0722] 表30本申请化合物的淋巴癌小鼠模型的肿瘤抑制药效

组别	肿瘤接种后天数	6	8	10	13	15	17	20	22	24
1		-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	TGI (%)	11.9	8.4	7.0	16.5	29.4	32.6	28.5	36.4	35.6
	P	0.021*	0.329	0.314	0.121	0.026*	0.038*	0.142	0.083	0.115

[0724] 试验结果显示, 化合物22 (50mg/kg) 治疗组体现出明显的抗肿瘤趋势, 并于肿瘤接种后第15、17天体现出显著的抗肿瘤作用 ($P < 0.05$), 其TGI分别为29.4%、32.6%。另外, 给药期间, 各组实验动物活动、进食等一般状态良好, 并没有发现明显的临床异常, 治疗前后动物整体体重均增加。以上实验支持化合物22作为单药在相应肿瘤适应症中的应用。

[0725] 实施例13本申请化合物在CT26鼠源结肠癌模型中同种移植模型中的药效学评价

[0726] 1. 实验原理

[0727] CT26鼠源结肠癌同种移植模型是经典的结肠癌的药效评估模型, 采用BALB/c小鼠皮下接种CT26造模而成。给与受试物, 评估对模型中肿瘤生长的抑制效果。

[0728] 2. 实验设计

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方	计划给药周期	实际给药周期
				式		
1	10	溶媒对照	0	p.o.	QD×14 or 28天	QD×25天
6	10	化合物22	100	p.o.	QD×14 or 28天	QD×25天

[0731] 3. 试验材料和试剂

[0732] 实验动物: BALB/c小鼠, 雌性, 7-8周 (肿瘤细胞接种时的小鼠周龄), 体重17.4-23.5g, 160只 (100只加60只富余小鼠)。购自上海灵畅生物科技有限公司 (LC), 生产许可证号: SCXK (沪) 2013-0018, 动物合格证编号: 2013001837385。饲养环境: SPF级。;

[0733] 溶媒: 40%羟丙基-β-环糊精 (淄博千汇生物科技有限公司; 批号: 160101; 称取16.8g羟丙基-β-环糊精, 加入42ml灭菌水, 完全溶解后待用。)

[0734] 4. 实验方法

[0735] CT26细胞培养在含10%胎牛血清的RPMI1640培养液中。收集指数生长期的CT26细

胞,PBS重悬至适合浓度用于小鼠皮下肿瘤接种。

[0736] 雌性小鼠右侧皮下接种 5×10^5 CT26细胞。接种当天定义为第0天。MC38细胞接种第二天 (Day1), 根据体重随机分组给药。

[0737] 称取64.35mg化合物22 (60mg free base), 加入6.0ml溶媒, 涡旋超声得到6.0ml悬浊液, 配制10mg/mL的化合物22溶液使用。

[0738] 肿瘤增殖率, T/C%, 即在某一时间点, 治疗组和对照组肿瘤体积或瘤重的百分比值。

[0739] 计算公式如下:

[0740] $T/C\% = T_{TV}/C_{TV} \times 100\%$ (T_{TV} : 治疗组在某一特定时间点的平均TV; C_{TV} : 溶媒对照组在某一特定时间点的平均TV);

[0741] 或 $T/C\% = T_{TW}/C_{TW} \times 100\%$ (T_{TW} : 治疗组实验终结时平均瘤重; C_{TW} : 溶媒对照组实验终结时平均瘤重)。

[0742] 肿瘤抑制率, TGI (%), 计算公式如下: $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积 (TV) 或瘤重 (TW))。

[0743] 所有的数据均用SPSS 18.0进行分析。

[0744] 5. 实验结果与结论

[0745] 表31本申请化合物的结肠癌小鼠模型的肿瘤抑制药效

实验组	第26天				
	肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P Value (相较于对照组)	
[0746] 第1组 溶媒对照组	2441.88 $\pm$ 334.10	--	--	--	
第2组 化合物22 (100 mg/kg)	1988.56 $\pm$ 325.70	19	81	0.344	

[0747] 试验结果显示, 化合物22 (50mg/kg) 治疗组在第26天体现出抗肿瘤效果, 其TGI为19%。另外, 给药期间, 各组实验动物活动、进食等一般状态良好, 并没有发现明显的临床异常。以上实验支持化合物22作为单药在相应肿瘤适应症中的应用。

[0748] 实施例14本申请化合物在ICR小鼠中的药代动力学

[0749] 14.1化合物27、化合物40、化合物22和化合物41在不同给药方式中的药代动力学

[0750] 1. 实验信息与设计

[0751]

受试物	给药途径	溶媒	给药剂量/体积/浓度	采血点
化合物27	IV(静脉注射)	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	1 mg/kg 5 mL/kg 0.2 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
	PO(口服)	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	5 mg/kg 10 mL/kg 0.5 mg/mL	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
化合物40	IV	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	1 mg/kg 5 mL/kg 0.2 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	5 mg/kg 10 mL/kg 0.5 mg/mL	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
化合物22	IV	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS (pH=7.4)	1 mg/kg 5 mL/kg 0.2 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS (pH=7.4)	5 mg/kg 10 mL/kg 0.5 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
化合物41	IV	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS (pH=7.4)	1 mg/kg 5 mL/kg 0.2 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS (pH=7.4)	5 mg/kg 10 mL/kg 0.5 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
化合物27	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	30 mg/kg 10 mL/kg 3 mg/mL	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24h
化合物22	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	30 mg/kg 10 mL/kg 3 mg/mL	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24h
化合物40	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	30 mg/kg 10 mL/kg 3 mg/mL	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24h

[0752] 2. 计算软件

[0753] 采用WinNonlin®6.4作为PK参数计算软件。

[0754] 3. 结果与结论

[0755] 表32本申请化合物在ICR小鼠中的药代动力学结果

[0756]

			T _{1/2}	C _{max}	AUC _{last}	Cl _{pred}	Cl-	F
--	--	--	------------------	------------------	---------------------	--------------------	-----	---

受试物	给药方式	给 药 剂 量 (mg/kg)					--F_{pred}	(%)
			h	ng/mL	hr*ng/mL	L/h/kg	L/h/kg	
化合物 27	IV	1	0.67	993.2	494.7	2.03	/	/
	PO	5	1.19	1551.7	3098.8	/	1.65	125.29
化合物 40	IV	1	2.49	1878.6	1537.9	0.65	/	/
	PO	5	2.36	2134.7	5535.7	/	0.90	71.99
化合物 22	IV	1	0.94	1689.9	924.6	1.09	/	/
	PO	5	2.74	3511.4	3962.8	/	1.26	85.72
化合物 41	IV	1	0.28	2232.2	1108.5	0.91	/	/
	PO	5	1.85	1300.1	1801.8	/	2.92	32.51
化合物 27	PO (单次)	30	1.12	14530.5	33609.5	/	0.92	/
	PO (连续给药7 天后)	30	1.86	17341.0	41741.7	/	0.72	/
化合物 22	PO (单次)	30	2.22	9654.7	17955.8	/	1.67	/
	PO (连续给药7 天后)	30	3.04	4801.5	15383.9	/	1.95	/
化合物 40	PO (单次)	30	1.65	14361.0	24414.1	/	1.23	/
	PO (连续给药7 天后)	30	2.79	2326.2	10621.5	/	2.82	/

[0757] 实验结果表明,列表中的化合物在ICR小鼠中均有优异的药代动力学表现。化合物27,化合物40,化合物22,化合物41展现出较高的口服体内暴露量和较高的口服生物利用度。化合物27,化合物22,化合物40和展现出较高的口服体内暴露量,其中化合物27,化合物22和化合物40在30mg/kg的剂量下,连续口服给药均未出现明显的药物蓄积。

[0759] 14.2化合物40及其苯磺酸盐在ICR小鼠中的药代动力学

[0760] 1.实验信息

[0761]	种属:	ICR 小鼠
	测试化合物:	化合物40苯磺酸盐
	给药途径:	PO (口服)
	溶媒空白对照:	40%Hp- β -CD
	溶剂性质:	白色混悬
	给药剂量:	100 mg/kg
	给药体积:	100 mL/kg
	给药浓度:	10 mg/mL
	LLOQ:	1 ng/mL
[0762]	PK 参数计算软件:	WinNonlin® 7.0

[0762] 2.实验设计

[0763]	组别	受试物	给药剂量	采血点
	第1组	化合物40	100 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
[0764]	第2组	化合物40苯磺酸盐	100 mg/kg (按照游离碱计)	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h

[0765] 3.实验结果与结论

[0766] 表33本申请化合物在在ICR小鼠中的药代动力学结果

[0767]

组别	T _{1/2} , h	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{INF_pred} (h*ng/mL)	Cl _{F_pred} (L/h/kg)
第1组	4.27	0.50	2897.3	11936.0	12129.3	0.82
第2组	2.29	0.50	36006.0	138326.1	138424.0	0.07

[0768] 表33的数据显示,受试化合物在ICR小鼠体内具有优异的药代动力学参数。化合物40及其苯磺酸盐的体内暴露量均较高。

[0769] 实施例15本申请化合物在SD大鼠中的药代动力学

[0770] 15.1化合物27、化合物16、化合物14和化合物22在SD大鼠中的药代动力学

[0771] 1.实验信息与设计

[0772]

受试物	给药途径	溶媒	给药剂量/体积/浓度	采血点
化合物27	IV	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	1 mg/kg 5 mL/kg 0.2 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	5 mg/kg 10 mL/kg 0.5 mg/mL	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
化合物16	IV	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	1 mg/kg 5 mL/kg 0.2 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	10 mg/kg 10 mL/kg 1 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
化合物14	IV	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	1 mg/kg 5 mL/kg 0.2 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS	10 mg/kg 10 mL/kg 1 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
化合物22	IV	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS(pH=7.4)	1 mg/kg 5 mL/kg 0.2 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h
	PO	10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS(pH=7.4)	3 mg/kg 10 mL/kg 0.3 mg/mL	0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24h

[0773] 2.计算软件

[0774] 采用WinNonlin®6.4作为PK参数计算软件。

[0775] 3.结果与结论

[0776] 表34本申请化合物在SD大鼠中的药代动力学结果

[0777]

受试物	给药方式	给药剂量	T _{1/2}	C _{max}	AUC _{last}	Cl _{pred}	Cl _{F_pred}	F
			h	ng/mL	hr*ng/mL	L/h/kg	L/h/kg	(%)
化合物27	IV	1	0.51	1341.0	476.6	2.16	/	/
	PO	5	4.36	318.1	484.0	/	8.82	33.85
化合物16	IV	1	0.61	986.3	535.6	1.89	/	/
	PO	10	4.78	258.1	758.3	/	13.98	/
化合物14	IV	1	0.44	1680.6	678.0	1.48	/	/
	PO	10	3.05	573.7	1213.6	/	8.66	17.90
化合物22	IV	1	1.00	2347.5	1768.5	0.57	/	/
	PO	3	3.30	580.2	2095.1	/	1.52	39.49

[0778] 实验结果表明,列表中的化合物在SD大鼠中均有较为优异的药代动力学表现,静脉注射的T_{1/2}约在0.5至1h,口服给药的T_{1/2}约在3-5h,展现出较高的口服体内暴露量和较高的口服生物利用度。

[0779] 15.2受试物在SD大鼠中的药代动力学

[0780] 1. 试验设计

[0781] 给药剂量:

[0782]

化合物名称	化合物40, 化合物27, 化合物47
溶媒	口服溶媒: 40% PEG400/60%PBS
给药剂量	化合物40: IV, 1mg/kg; PO, 10 mg/kg 化合物27: IV, 1mg/mL; PO, 10 mg/kg 化合物40:IV, 1.64 mg/kg; PO, 2.36 mg/kg 化合物47: PO, 3 mg/kg

[0783] 给药剂量:本组化合物均采用混合给药的方式进行,每6个化合物为1组混合PO给药。

[0784]

受试物	给药途径	溶媒	给药剂量	采血点
化合物17	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物18	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物21	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物23	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物25	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物28	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8

[0785]

化合物29	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物35	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物37	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物48	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物44	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物40	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物41	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物42	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物43	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物44	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物45	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物46	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物47	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物48	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物49	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物50	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物51	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8
化合物52	PO	40% PEG400/60%PBS 的水溶液	2 mg/kg	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8

[0786] 检测模型及检测方法

[0787]

种属/品系	大鼠/Sprague Dawley
-------	-------------------

[0788]

每组动物数量及性别	3只, 雄性	
内标	维拉帕米	
分析方法	蛋白沉淀、采用LC-MS/MS方法	
药代动力学时间点	IV: 0.08, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 24.00h PO: 0.08, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 24.00h	PO: 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00h

[0789] 2. 试验材料与设备

[0790] 1) 主要试剂:

试剂名称	来源	批号
甲酸	阿拉丁	F1627037
乙腈	Merck KGaA Co.	JA050830
PEG400	麦考林化学试剂有限公司	C10083707
维拉帕米	阿拉丁	K1629079

[0791] 2) 主要仪器

[0792]

仪器名称	型号	生产厂家	仪器编号
多功能漩涡混合仪	Vortex4	德国IKA	FX03025
超声波清洗机	S22H	厦门致微	FX03020
液质联用仪(化合物40, 化合物27, 化合物40和化合物47)	Qtrap 5500	AB Sciex	FX03001
液质联用仪(化合物44和化合物48)	TQS	Waters	-

[0793] 3. 分析方法

[0794] 1) 液相条件

[0795] 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1mm×50mm, 1.7μm)

[0796] 流速: 化合物40, 化合物27, 化合物40和化合物47: 0.4mL/min 柱温: 40℃ 进样量: 5μL; 化合物44和化合物48: 0.3mL/min 柱温: 35℃ 进样量: 1μL。

[0797] 化合物40, 化合物27, 化合物40和化合物47: 流动相A: 水 (0.1% 甲酸), 流动相B: 乙腈 (0.075% 甲酸);

[0798] 化合物44和化合物48: 流动相A: 水 (0.1% 甲酸), 流动相B: 乙腈 (0.1% 甲酸)。

[0799] 梯度洗脱, 洗脱程序见下表。

[0800]

时间 (min)		A相 (%)	B相 (%)
0.00	0.00	90	10
0.50	0.50	90	10
1.50	1.50	10	90

[0801]

3.00	2.5	10	90
3.10	2.51	90	10
4.00	3.5	90	10

[0802] 2) 质谱条件

[0803] 电喷雾离子源(Turbo spray),正离子检测模式,选择多反应监测扫描(MRM)模式进行质谱分析。质谱离子源参数及化合物检测参数见下表。

[0804]	CUR/kPa	GAS1/kPa	GAS2/kPa	TEM/°C	IS/V	CAD/V
	气帘气	雾化气	辅助气	离子源温度	电喷电压	碰撞气
	25	50	55	450	5500	8
[0804]	毛细管电压(kV)	锥体电压(V)	脱溶剂温度(°C)	脱溶剂(L/Hr)	锥体(L/hr)	碰撞气体流量(mL/Min)
	3.50	11	500	550	150	0.15

[0805] 4. 试验方法

[0806] 按照试验方案中的取血点取血。取血浆样品50μL,加入3倍体积的乙腈(含内维拉帕米定5ng/mL),涡旋振荡30s后,15000rpm,4°C离心15min,取上清液10μL进行LC-MS/MS分析。

[0807] 按照试验方案中的溶媒进行化合物配制。

[0808] SD大鼠3只/化合物,雄性,体重200-220g,给药前禁食一晚但可以饮水。

[0809] 口服灌胃给药:于灌胃给药前、给药后0.083h、0.25h、0.5h、1h、2h、4h、8h和24h(化合物40,化合物27,化合物40和化合物47),或给药后0.25h、0.5h、1h、4h、6h和8h(化合物44和化合物48)眼眶取血于肝素钠处理的试管中,离心后取上清液血浆用于LC-MS/MS分析。

[0810] 将血浆样本按“样品处理”项方法处理后用LC-MS/MS法进行分析,随行标准曲线和质控样本。超过定量上限的时间点稀释10或100倍进行分析。

[0811] 所有的测定数据由Analyst 1.6.3软件采集并处理,用Microsoft Excel计算和处理数据。用DAS 3.2.8软件,采用统计矩法进行药代动力学参数计算。主要包括动力学参数 T_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 $AUC_{(0-t)}$ 等。

[0812] 5. 试验结果与结论

[0813] 表35本申请化合物在SD大鼠中的药代动力学结果

受试物	给药方式	给药剂量(mg/kg)	T1/2	Cmax	AUClast	Cl_pred	Cl-F_pred	F (%)
			h	ng/mL	hr*ng/mL	mL/h/kg	mL/h/kg	
化合物40	IV	1	0.78	1281.99	1406.02	710.04	/	/
	PO	10	2.44	2439.21	6604.17	/	1375.37	46.97
化合物27	IV	1	0.47	139.17	83.82	11331.4	/	/
	PO	10	2.42	325.40	1068.7	/	8344.15	127.5
化合物40	IV	1.64	0.53	1314.36	1006.5	1622.87	/	/
	PO	2.36	0.23	303.44	1685.73	/	1395.24	116.3
化合物47	PO	3	2.25	537.58	1496.3	/	1389.74	/

[0815] 表36本申请化合物在SD大鼠中的药代动力学结果

[0816]

受试物	给药方式	给药剂量 (mg/kg)	AUC _{last}
			hr*ng/mL
化合物17	PO	2	730
化合物18	PO	2	441
化合物21	PO	2	603
化合物23	PO	2	325
化合物25	PO	2	142
化合物28	PO	2	757
化合物29	PO	2	160
化合物35	PO	2	1604
化合物37	PO	2	1833
化合物48	PO	2	596.99
化合物44	PO	2	340.61
化合物40	PO	2	2363.07
化合物41	PO	2	1891.16
化合物42	PO	2	817.59
化合物43	PO	2	314.98
化合物45	PO	2	717.52
化合物46	PO	2	739.16
化合物47	PO	2	779.45
化合物51	PO	2	420.09
化合物52	PO	2	387.63

[0817] 表35和表36的实验结果表明,列表中的化合物在SD大鼠中均有较为优异的药代动力学表现,AUC_{last}数值较高,展现出较高的口服体内暴露量和较高的口服生物利用度。列表中的化合物优异的大鼠药代动力学特性可以支持进一步的临床人体实验。

[0818] 15.3化合物22乙酸盐在SD大鼠中单次和重复给药的药代动力学

[0819] 1.实验设计

[0820]

化合物名称	化合物22乙酸盐
批号	A05753-043A7
含量	97.8%
溶媒	静脉注射溶媒: 10% DMAC/15% Solutol HS 15/75% PBS (pH=7.4) 口服溶媒: 含0.5% MC的乙酸-乙酸钠 (pH=4.0) 缓冲液
给药剂量	单次给药: 静脉注射2.0 mg/kg; 口服21、63和189 mg/kg 重复给药(7天): 口服63 mg/kg
种属/品系	大鼠/Sprague Dawley

[0821]	每组动物数量及性别	3雄/3雌
	分析基质（抗凝剂）	血浆 [Potassium (K ₂) EDTA]
	内标	Verapamil
	分析方法	蛋白沉淀、采用验证的LC-MS/MS方法
	定量下限	2.00 ng/mL
	标曲范围	2.00 - 1000 ng/mL
	药代动力学时间点	单次给药，静脉注射组2.0 mg/kg（第1组）：给药前、给药后5、15、30分钟、1、2、4、8小时和24小时 单次给药，口服组21~189 mg/kg（第2-4组）：给药前、给药后15、30分钟、1、2、4、6、8小时和24小时 重复给药，口服组63 mg/kg（第5组）：第1天：给药前、给药后15、30分钟、1、2、4、6、8小时和24小时 第4天和第5天：给药后24小时 第7天：给药前、给药后15、30分钟、1、2、4、6、8小时和24小时
	药代动力学分析	非房室模型
	GLP/Non-GLP	Non-GLP

[0822] 给药信息如下所示：

组别	受试物	给药剂量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	浓度 (mg/mL)	给药途径	动物数 (雄性/雌性)
1	化合物22乙酸盐 ^A	2.0	5.0	0.4	静脉注射	3/3
2	化合物22乙酸盐 ^B	21	10	2.1	口服	3/3
3	化合物22乙酸盐 ^B	63	10	6.3	口服	3/3
4	化合物22乙酸盐 ^b	189	10	18.9	口服	3/3
5	化合物22乙酸盐 ^b	63	10	6.3	口服	3/3

[0824] a: 溶媒为10%DMAC/15%Solutol HS 15/75%PBS (pH=7.4)。

[0825] b: 溶媒为含0.5%MC的乙酸-乙酸钠 (pH=4.0) 缓冲液。

[0826] 2. 实验材料

[0827] 动物信息：

[0828]	种属/品系/等级	Sprague-Dawley (SD) 大鼠[CrI: CD (SD)] (SPF/VAF)
	来源	北京维通利华实验动物技术有限公司
	首次给药时年龄	7-9周
	动物数量	15雌15雄加5雌5雄备用
	动物转入课题时间	2019年08月13日
	动物质量合格证号	1100111911037824 (雄) 1100111911037825 (雌)
	试验动物生产许可证	SCXK (京) 2016-0006
	首次给药体重	雄性273.3 ~ 330.2克, 雌性210.7 ~ 250.4克

[0829] 实验试剂：

名称	来源	批号
DMAC	SIGMA	BCBT8964

Solutol HS15	BASF SE	69889088Q0
PBS	GIBCO	1948177
冰醋酸	HOheywell	SZBF2670V
三水乙酸钠	SIGMA	BC13W4910
甲基纤维素	SIGMA	SLCB1319
去离子水	康龙化成试验室	08142019

[0830] 3. 实验方法

[0831] 1) 制剂配制

[0832] 静脉注射制剂配制:精密称取7.13mg化合物22乙酸盐至容器中,加入1.5mL的DMAC,涡旋混匀使其完全溶解;加入2.25mL的Solutol HS 15并涡旋,再加入11.25mL的PBS定容至终体积(15mL),涡旋1分钟,得到终浓度为0.4mg/mL的澄清溶液(pH=3.96)。

[0833] 口服组制剂配制(第2-5组):第二组精密称取69.91mg化合物22乙酸盐至容器中,加入20mL含0.5%MC的乙酸-乙酸钠(pH=4.0)缓冲液,搅拌66分钟,超声30分钟定容至终体积(28mL),得到终浓度为2.1mg/mL的澄清溶液(PH=3.99)。第三组精密称取209.7mg化合物22乙酸盐至容器中,加入20mL含0.5%MC的乙酸-乙酸钠(pH=4.0)缓冲液,搅拌66分钟,超声30分钟定容至终体积(28mL),得到终浓度为6.3mg/mL的澄清溶液(pH=4.15)。第四组精密称取629.2mg化合物22乙酸盐至容器中,加入20mL含0.5%MC的乙酸-乙酸钠(pH=4.0)缓冲液,搅拌66分钟,超声30分钟定容至终体积(28mL),得到终浓度为18.9mg/mL的澄清溶液(pH=4.35)。第五组精密称取1348.3mg化合物22乙酸盐至容器中,加入150mL含0.5%MC的乙酸-乙酸钠(pH=4.0)缓冲液,搅拌66分钟,超声30分钟定容至终体积(180mL),得到终浓度为6.3mg/mL的澄清溶液(pH=4.15)。给药制剂在每天给药前于黄光灯下新鲜配制。其中,第5组的制剂在第1天给药前配制,并分装每天的给药量,在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 保存。给药当天制剂取出后,给药前在室温下至少放置30分钟。

[0834] 2) 给药

[0835] 按照实验设计方案进行给药。

[0836] 3) 样本处理

[0837] 采血后将含抗凝剂的采血管反复颠倒数次以充分混匀,离心前放在湿冰上。采血后60分钟内,在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下2000g,离心10分钟,分离红细胞,得到血浆样品。血浆样品转移至冻存管,并保存在 $-75\pm 15^{\circ}\text{C}$ 条件下直至分析。

[0838] 室温下采集SD大鼠给药前和给药后24小时内的血液样本。收集到的所有样本离心前放在湿冰上并在 $-75\pm 15^{\circ}\text{C}$ 条件下保存直到分析。

[0839] 样品处理方法:

样品	空白血浆(μL)	血浆样品(μL)	标准曲线样品和质控样品(μL)	内标工作液(μL)	含0.1%甲酸的乙腈(μL)
双空白样品	25	NA	NA	NA	400
零样品	25	NA	NA	400	NA
标准曲线样品和质控样品	NA	NA	25	400	NA
药代样品	NA	25	NA	400	NA

[0841] NA:不适用

- [0842] ①.按照上表取所需体积转移到1.1mL塑料管中。
- [0843] ②.使用涡旋仪混匀样品,震荡10分钟,在4000rpm和4℃条件下离心10分钟。
- [0844] ③.离心后转移20μL上清到含有140μL稀释液的1.1mL塑料管中涡旋混匀,转移60μL混合样品至含有100μL稀释液的1.1mL塑料管中涡旋混匀。
- [0845] ④.160μL样品转移至96孔板内。
- [0846] ⑤.进5.0μL样品到LC-MS/MS。
- [0847] 4) 分析方法与条件

[0848]

液相条件:				
仪器	SHMADZU LC; Racker Changer II Autosampler			
色谱柱	YMC-Triart C18-(2.1 mm x 50 mm, 5 μm)			
柱温	4 °C			
分析时间	4.50 min			
流动相	A: 含0.1%乙酸的去离子水中			
	B: 含0.1%乙酸的乙腈			
进样体积	5.0 μL			
保留时间	化合物22乙酸盐		0.9 min	
	Verapamil		1.3 min	
洗脱梯度	时间 (minute)	A (%)	B (%)	流速(mL/min)
	0	70.0	30.0	0.600
	0.10	70.0	30.0	0.600
	0.50	70.0	30.0	0.600
	1.20	50.0	50.0	0.600
	1.60	10.0	90.0	0.600
	2.00	10.0	90.0	0.600
	2.50	70.0	30.0	0.600
	3.00	10.0	90.0	0.600
	3.50	10.0	90.0	0.600
	4.00	70.0	30.0	0.600
	4.50	70.0	30.0	0.600
自动进样器温度	4 °C			
质谱条件:				

[0849]	仪器	Applied biosystems/AB Sciex Triple Quad 4500		
	离子源	ESI		
	离子模式	Positive		
	检测模式	MRM		
	电压	5000V		
	温度	550 °C		

[0850] 质谱参数

[0851]	化合物	Transition (m/z)	Dwell Time (ms)	DP (volts)	CE (volts)	EP (volts)	CXP (volts)
	化合物22乙酸盐	393.2→146.0	100	100	43	12	8
	Verapamil	455.2→165.1	100	100	42	12	15
	峰积分方式:	峰面积					

[0852] 用液相质谱联用技术,以Verapamil作为内标化合物,对SD大鼠血浆中化合物22乙酸盐的浓度进行测定。质谱仪为Applied Biosystems/AB Sciex Triple Quad 4500,采用电喷雾离子源正离子模式扫描下,监测化合物22乙酸盐和Verapamil的母离子和子离子质荷比分别为393.2→146.0和455.2→165.0。

[0853] 化合物22乙酸盐的药代动力学参数由软件PhoenixTMWinNonlin[®](8.1版)采用非房室模型计算。采用线性对数梯形法计算药代动力学数据,权重为1/(Y*Y)。样本浓度低于定量下限的样品不参与药代动力学参数的计算。使用Microsoft Excel 2010版计算各项参数的平均值,其平均值由每只动物的药代动力学参数确定。其中达峰时间(T_{max})的平均值由中位数表示。

[0854] 4. 实验结果与结论

[0855] 表37 SD大鼠给予化合物22乙酸盐后体内的主要药代动力学参数(平均值±标准偏差)

组别	给药剂量 (mg/kg)	性别	C_0	$T_{1/2}$	T_{max} _a	C_{max}	AUC_{0-t}	CL	V_{ss}	F
			(ng/mL)	(hr)	(hr)	(ng/mL)	(hr*ng/mL)	(mL/min/kg)	(L/kg)	(%)
1 (IV)	2.0	雄性	7055±699	1.43 (-)	NA	NA	4873±601	6.56*	0.445*	NA
		雌性	8142±820	4.70±3.22	NA	NA	5853±149	5.66±0.166	0.465±0.122	NA
		总体	7598±905	3.39±2.90	NA	NA	5363±664	6.02±0.668	0.457±0.088	NA
2 (PO)	21	雄性	NA	3.21±0.304	0.5	16633±4100	42043±10546	NA	NA	82.2±20.6
		雌性	NA	3.73±0.771	0.5	20100±3859	43486±4146	NA	NA	70.8±6.75

[0857]

组别	给药剂量	性别	C ₀	T _{1/2}	T _{max} _a	C _{max}	AUC _{0-t}	CL	V _{ss}	F
	(mg/kg)		(ng/mL)	(hr)	(hr)	(ng/mL)	(hr*ng/mL)	(mL/min/kg)	(L/kg)	(%)
		总体	NA	3.47±0.596	0.5	18367±4036	42765±7210	NA	NA	76.5±15.1
3 (PO)	63	雄性	NA	3.10±0.251	1.0	24200±2339	87302±3045	NA	NA	56.9±1.98
		雌性	NA	2.91±0.949	1.0	30533±9708	136518±40447	NA	NA	74.1±21.9
		总体	NA	3.01±0.630	1.0	27367±7205	111910±37212	NA	NA	65.5±16.8
4 (PO)	189	雄性	NA	3.68±1.22	4.0	44133±4706	234576±24311	NA	NA	50.9±5.28
		雌性	NA	7.63 (-)	1.0	59567±12116	248087±55584	NA	NA	44.9±10.1
		总体	NA	5.26±3.05	2.0	51850±11791	241332±39077	NA	NA	47.9±7.91
5 (PO) 第 1 天	63	雄性	NA	4.26±2.04	1.0	19857±9080	79661±31526	NA	NA	51.9±20.5
		雌性	NA	2.40±0.523	2.0	37667±2376	141976±23059	NA	NA	77.0±12.5
		总体	NA	3.33±1.68	2.0	28762±11419	110818±42133	NA	NA	64.5±20.5
5 (PO) 第 7 天	63	雄性	NA	3.69±0.342	1.0	30967±5754	98141±14699	NA	NA	NA
		雌性	NA	2.73±0.359	1.0	45567±1553	156575±36913	NA	NA	NA
		总体	NA	3.21±0.615	1.0	38267±8841	127358±40692	NA	NA	NA

[0858] NA:不适用。

[0859] a:T_{max} 均值为中位数。

[0860] *:个体数小于3不进行标准偏差计算。

[0861] 结果如表36所示,静脉注射给予2.0mg/kg的化合物22乙酸盐后,化合物22乙酸盐在SD大鼠体内的药物暴露量AUC_{0-t}为5363hr*ng/mL,半衰期T_{1/2}为3.39hr,清除率(CL)为6.02mL/min/kg,远小于肝血流量(55.2mL/min/kg),属于低清除药物。稳态表观分布容积(V_{ss})为0.457L/kg,接近于总体液量(0.668L/kg),表明药物在SD大鼠体内分布较广。

[0862] SD大鼠口服给予3个剂量水平的化合物22乙酸盐(21mg/kg、63mg/kg和189mg/kg)后,SD大鼠的药物暴露量(AUC_{0-t})分别是42765hr*ng/mL、111910hr*ng/mL和241332hr*ng/mL,最大血药浓度(C_{max})分别为18367ng/mL、27367ng/mL和51850ng/mL。剂量由21mg/kg增加到189mg/kg时,AUC_{0-t}和C_{max}的增加比例低于剂量比。

[0863] SD大鼠口服给予21、63、189mg/kg的化合物22乙酸盐后,化合物22乙酸盐的平均生

物利用度分别为76.5%、65.5%和47.9%。

[0864] 连续7天每天给予63mg/kg的化合物22乙酸盐后,第1天和第7天的AUC_{0-t}值分别为110818hr*ng/mL和127358hr*ng/mL,第7天与第1天暴露量比值小于2倍,提示在7天连续重复给予63mg/kg化合物22乙酸盐后,化合物22乙酸盐在SD大鼠体内无明显蓄积。

[0865] 实验结果表明,化合物22乙酸盐在大鼠体内具有优良的药代动力学特性:低清除,分布广,体内暴露量和最大血药浓度随剂量增加而增加,具有较高的口服生物利用度,7天给药体内无明显蓄积。

[0866] 15.4化合物22化合物27和化合物40在SD大鼠连续7天口服的药代动力学

[0867] 1.实验设计

[0868] 12只雄性SD大鼠(给药当天约7~9周龄,283.0~298.1克)购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,随机分为3组,每组4只,连续7天每天1次口服给药,其中第1组给予30mg/kg的化合物27,第2组给予30mg/kg的化合物22,第3组给予30mg/kg的化合物40。所有动物给药过程中自由饮水饮食。

组别	受试物	给药剂 (mg/kg)	给药体 (mL/kg)	浓度 (mg/mL)	给药方式	动物数 (雄性)
[0869] 1	化合物27	30.0	10.0	3.0	口服	4只
2	化合物22	30.0	10.0	3.0	口服	4只
3	化合物40	30.0	10.0	3.0	口服	4只

[0870] 2.实验材料

[0871] 1) 动物信息

种属/品系/等级:	Sprague-Dawley (SD) 大鼠 [Cr1:CD (SD)] (SPF/VAF)
来源:	斯贝福(北京)生物技术有限公司
试验动物生产许可证:	SCXK(京)2016-0002
动物质量合格证号:	11401500037777
首次给药时年龄:	大约7~9周
首次给药时体重:	雄性283.0~298.1克

[0872] 2) 溶媒信息

名称	来源	批号
PEG400	Sigma	BCBV8368
PBS	Gibco	1951153

[0873] 3) 受试物信息

名称:	化合物27	化合物22	化合物40
纯度:	98.43%	99.00%	97.76%
失效日期:	未测	未测	未测
储存条件:	室温避光	室温避光	室温避光
性状:	白色粉末	白色粉末	白色粉末
校正因子:	1.02	1.01	1.02

[0874] 校正因子=FW/MW*1/纯度

[0875] 3. 实验方法

[0876] 1) 制剂配制步骤:

[0877] 分别称取0.3366g的化合物27、0.3333g的化合物22和0.3366g的化合物40溶解于44mL的PEG400中搅拌超声溶解,加入50mL的PBS搅拌超声至完全溶解后,加PBS定容到终体积110mL,得到终浓度为3.0mg/mL的目标制剂溶液。将配制好的制剂溶液,分装为7份,每份15mL,于4℃冰箱储存,给药前将制剂放置于室温,至制剂温度恢复室温并在室温下搅拌至少10分钟,且在给药过程中持续搅拌。整个制剂配制过程在黄光下操作,配制好的制剂转移时用锡箔纸包裹避光。

[0878] 2) 药代动力学样品采集:

[0879]

采样方法:	尾静脉、眼眶静脉穿刺
采样时间点:	第1天: 给药后15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时和24小时 第7天: 给药前, 给药后15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时和24小时
采样体积:	每只大鼠每个时间点~0.2 mL
样品处理和储存:	1) 采血后将含抗凝剂的采血管反复颠倒数次以充分混匀,并放在湿冰上。 2) 采血后60分钟内,在2至8℃下2000 g,离心10分钟,分离红细胞,得到血浆样品。 3) 血浆样品转移至冻存管,并保存在-75±15℃条件下直至分析。

[0880] 3) 样品分析

[0881] 采用液相质谱联用技术,以Verapamil作为内标化合物,对SD大鼠血浆中化合物27,化合物22和化合物40的浓度进行测定。质谱仪采用电喷雾离子源正离子模式扫描下,监测化合物27,化合物40、化合物22和Tolbutamide的母离子和子离子质荷比分别为395.2→178.2,404.2→158.9,393.4→146.2和455.2→165.0。

[0882] 化合物27,化合物40和化合物22的药代动力学参数由软件PhoenixTM WinNonlin 6.1版采用非房室模型计算。采用线性对数梯形法计算药代动力学数据,权重为1/Y*Y。样本浓度低于定量下限的样品不参与药代动力学参数的计算。使用Microsoft Excel 2010版计算各项参数的平均值,其平均值由每只动物的药代动力学参数确定。其中达峰时间(T_{max})的平均值由中位数表示。

[0883] 4. 分析方法

[0884] 1) 化合物27的液质联用生物分析方法

[0885] 标准曲线和质控样品信息:

[0886]

储备液:	化合物27: 1.00 mg/mL溶于 DMSO
内标储备液:	Verapamil: 1.00 mg/mL溶于DMSO
内标浓度:	25 ng/mL 的Tolbutamide 溶于乙腈中
血浆体积:	25 μ L
内标工作液体积:	200 μ L
标曲范围:	2-200 ng/mL
标曲溶液:	双空白, 0, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0, 50.0, 80.0, 100 和 200 ng/mL
回归模式:	线性 (1/浓度 ²)
血浆中质控样品浓度:	6.00 ng/mL (LQC) 40.0 ng/mL (MQC) 160 ng/mL (HQC)

[0887] 液相条件:

[0888]

仪器:	SHIMADZU (LC-20AD, 序列号: L20104923601AE; LC-20AD, 序列号: L20104923599AE); CTC Analytics HTC PAL自动进样器 (MXY013-02A, 序列号 260299)			
色谱柱:	Phenomenex Gemini NX-C18 (50 $\times$ 2.0 mm, 3.0 μ m)			
柱温:	Ambient			
分析时间	4.00 min			
流动相	A: 0.1% 甲酸的去离子水			
	B: 0.1% 甲酸的乙腈			
进样体积	10 μ L			
保留时间	化合物27 1.83 min			
	Verapamil 1.90 min			
洗脱梯度	时间 (分钟)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
	0	95.0	5.00	0.600
	0.50	95.0	5.00	0.600
	1.50	5.00	95.0	0.600
	2.80	5.00	95.0	0.600
	3.00	95.0	5.00	0.600
	4.00	95.0	5.00	0.600
自动进样器温度	5 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C			

[0889] 质谱条件:

[0890]

仪器	Applied Biosystems MDS SCIEX API4000 LC / MS / MS仪器 (序列号25540110831)
离子源	ESI
离子模式	正离子

[0891]

检测模式	MRM	
ESI电压	5500	
温度	550 $^{\circ}$ C	
质谱参数	化合物	Transition (<i>m/z</i>)
	化合物27	395.2 $\rightarrow$ 178.2
	Verapamil	455.2 $\rightarrow$ 165.0
峰积分方式	峰面积	

[0892] 2) 化合物40的液质联用生物分析方法

[0893] 标准曲线和质控样品信息：

储备液：	化合物40: 1.00 mg/mL溶于 DMSO
内标储备液：	Verapamil: 1.00 mg/mL溶于DMSO
内标浓度：	25 ng/mL 的Tolbutamide 溶于乙腈中
血浆体积：	25 μ L
内标工作液体积：	200 μ L
[0894] 标曲范围：	2-200 ng/mL
标曲溶液：	双空白, 0, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0, 50.0, 80.0, 100 和 200 ng/mL
回归模式：	线性 (1/浓度 ²)
血浆中质控样品浓度：	6.00 ng/mL (LQC)
	40.0 ng/mL (MQC)
	160 ng/mL (HQC)

[0895] 液相条件：

仪器：	SHIMADZU (LC-20AD, 序列号: L20104923601AE; LC-20AD, 序列号: L20104923599AE); CTC Analytics HTC PAL自动进样器 (MXY013-02A, 序列号 260299)			
色谱柱：	Phenomenex Gemini NX-C18 (50 $\times$ 2.0 mm, 3.0 μ m)			
柱温：	Ambient			
分析时间	4.00 min			
流动相	A: 0.1% 甲酸的去离子水			
	B: 0.1% 甲酸的乙腈			
进样体积	10 μ L			
保留时间	化合物40 2.07 min			
	Verapamil 1.94 min			
洗脱梯度	时间 (分钟)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
	0	95.0	5.00	0.600
	0.50	95.0	5.00	0.600
	1.50	5.00	95.0	0.600
	2.80	5.00	95.0	0.600
	3.00	95.0	5.00	0.600
	4.00	95.0	5.00	0.600

[0897] 自动进样器温度 5 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C

[0898] 质谱条件

[0899]

仪器	Applied Biosystems MDS SCIEX API4000 LC / MS / MS仪器 (序列号25540110831)						
离子源	ESI						
离子模式	正离子						
检测模式	MRM						
ESI电压:	5500						
温度	550 °C						
质谱参数	化合物	Transition (m/z)	Dwell Time (ms)	DP (volts)	CE (volts)	EP (volts)	CXP (volts)
	化合物 40	404.2→158.9	150	70	35	10	8
	Verapamil	455.2→165.0	150	70	25	10	8
峰积分方式:	峰面积						

[0900] 3) 化合物22的液质联用生物分析方法

[0901] 标准曲线和质控样品信息:

储备液:	化合物22: 1.00 mg/mL溶于 DMSO
内标储备液:	Verapamil: 1.00 mg/mL溶于DMSO
内标浓度:	25 ng/mL 的Tolbutamide 溶于乙腈中
血浆体积:	25 µL
内标工作液体积:	200 µL
标曲范围:	2-200 ng/mL
标曲溶液:	双空白, 0, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0, 50.0, 80.0, 100 和 200 ng/mL
回归模式:	线性 (1/浓度 ²)
血浆中质控样品浓度:	6.00 ng/mL (LQC)
	40.0 ng/mL (MQC)
	160 ng/mL (HQC)

[0903] 液相条件:

[0904]

仪器:	SHIMADZU (LC-20AD, 序列号: L20104923601AE; LC-20AD, 序列号: L20104923599AE); CTC Analytics HTC PAL自动进样器 (MXY013-02A, 序列号 260299)
色谱柱:	Phenomenex Gemini NX-C18 (50×2.0 mm, 3.0 µm)
柱温:	Ambient
分析时间	4.00 min
流动相	A: 0.1% 甲酸的去离子水
	B: 0.1% 甲酸的乙腈

[0905]

进样体积	10 μ L			
保留时间	化合物22	2.02 min		
	Verapamil	1.90 min		
洗脱梯度	时间 (分钟)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
	0	95.0	5.00	0.600
	0.50	95.0	5.00	0.600
	1.50	5.00	95.0	0.600
	2.80	5.00	95.0	0.600
	3.00	95.0	5.00	0.600
	4.00	95.0	5.00	0.600
自动进样器温度	5 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C			

[0906] 质谱条件:

[0907]

仪器	Applied Biosystems MDS SCIEX API4000 LC / MS / MS仪器 (序列号25540110831)						
离子源	ESI						
离子模式	正离子						
检测模式	MRM						
ESI电压:	5500						
温度	550 $^{\circ}$ C						
质谱参数	化合物	Transition (m/z)	Dwell Time (ms)	DP (volts)	CE (volts)	EP (volts)	CXP (volts)
	化合物22	393.4 $\rightarrow$ 146.2	150	70	36	10	8
	Verapamil	455.2 $\rightarrow$ 165.0	150	70	25	10	8
峰积分方式:	峰面积						

[0908] 5. 实验结果与结论

[0909] 表38连续7天口服化合物27, 化合物22, 化合物40的主要PK参数 (平均值)

[0910]

组别	受试物	给药剂量 (mg/kg)	T _{max} ^a	C _{max}	AUC _{0-t}	C _{min}	C _{avg}	AUC _{tau}
			(hr)	(ng/mL)	(hr*ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(hr*ng/mL)
1 (第1天)	化合物27	30.0	2	7103	29550	-	-	-
1 (第7天)			1.5	4615	22194	9.23	925	22194
2 (第1天)	化合物22	30.0	4	1022	6630	-	-	-
2 (第7天)			1.5	947	6953	11.4	290	6953
3 (第1天)	化合物40	30.0	3	503	5154	-	-	-

[0911]

天)								
3 (第7天)			4	581	6584	52.3	274	6584

[0912] a: T_{max} 值为中位数值。

[0913] “-”:不适用。

[0914] SD雄性大鼠连续7天每天一次口服给予30mg/kg的化合物27,化合物22,化合物40后,检测其给药后第1天和第7天的血浆药物浓度。

[0915] SD雄性大鼠连续7天每天一次口服给予30mg/kg的化合物27,化合物22,化合物40后,第1天的药物暴露量 AUC_{0-t} 分别为29550hr*ng/mL,6630hr*ng/mL和5154hr*ng/mL;最大血药浓度 C_{max} 分别为7103ng/mL,1022ng/mL和503ng/mL。连续给药第7天,化合物27,化合物22和化合物40在SD大鼠血浆中的药物暴露量 AUC_{0-t} 分别为22194hr*ng/mL,6953hr*ng/mL和6584hr*ng/mL;最大血药浓度 C_{max} 分别为4615ng/mL,947ng/mL和581ng/mL。结果表明,连续7天每天一次口服给予30mg/kg的化合物27,化合物22,化合物40后,化合物27,化合物22,化合物40在SD大鼠体内没有明显的蓄积(表38)。

[0916] 数据显示,受试化合物在SD大鼠体内具有优异的药代动力学参数,体内暴露量高,连续给药没有明显的蓄积。受试化合物优异的大鼠药代动力学特性可以支持进一步的临床人体实验。

[0917] 实施例16本申请化合物在雌性BALB/c小鼠体内的药代动力学评价

[0918] 1.实验设计

组别	动物数	给药组	剂量 (mg/kg)	给药方式	计划给药周期	实际给药周期
1	12	化合物22	100	p.o.	QDx1次	QDx1次
2	12	化合物22	100	p.o.	QDx1次	QDx1次

[0919] 2.实验材料

[0920] 1) 试验动物

[0921] BALB/c小鼠,雌性,7-9周(实验开始时的小鼠周龄),体重19.2-22.1g,51只(34只加10只富余小鼠)。购自上海灵畅生物科技有限公司(LC),动物合格证编号:2013001835211。饲养环境:SPF级。

[0922] 2) 供试品

[0923] 供试品:化合物22:批号:F,包装规格:38.0mg/vial+5045.1mg/vial,纯度98.96%,水分5.38%,由浙江春禾医药科技有限公司提供,粉末,RT密封保存。

[0924] 3.实验方法

[0925] 1) 随机分组

[0926] 在给药开始前,称量所有动物的体重,根据鼠的体重使用StudyDirector™(版本号3.1.399.19,供应商Studylog System, Inc., S.San Francisco, CA, USA)进行随机分组。

[0927] 2) 供试品和溶媒的配制

[0928]	供试品 /对照品	剂量 (mg/kg)	配制	浓度 (mg/ml)	配制 频率	配置后 储存
	溶媒1 (40% PEG400/60%Water), 用于G1药物配置	--	取1.92ml PEG400, 加入2.88ml灭 菌水, 混匀待用。	--	现用 现配	使用后 丢弃
	溶媒2 (40% (2-羟丙 基)- β -环糊精), 用于 G2药物配置	--	称取2.0g (2-羟丙基)- β -环糊精, 加入5.0ml灭菌水, 完全溶解后待 用。	--	现用 现配	使用后 丢弃
	化合物22 G1	100	称取38.45mg 化合物22 (36mg free base), 加入3.6ml溶媒1, 涡旋超 声得到3.6ml悬浊液	10	现用 现配	使用后 丢弃
	化合物22 G2	100	称取38.45mg 化合物22 (36mg free base), 加入3.6ml溶媒2, 涡旋超 声得到3.6ml悬浊液	10	现用 现配	使用后 丢弃

[0929] 4) 实验观察和数据收集

[0930] 本实验过程中动物实验的实验方案均通过CrownBio IACUC委员会审核并批准通过。实验过程中,动物实验操作均根据AAALAC的要求。分组后,常规监测包括了治疗对动物正常行为的影响,具体内容有实验动物的活动性,摄食和饮水情况,眼睛、被毛及其它异常情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。实验中使用StudyDirector™ (版本号3.1.399.19, 供应商Studylog System, Inc.) 软件收集动物体重数据,原始数据由天平测量后直接导入软件,数据的任何变动都将被记录在此软件中。给药及体重称量等全部过程都在生物安全柜或超净工作台中进行。

[0931] 5) 实验终点

[0932] 单次给药后,每组分别于0.25h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h和24h采集血浆,每个时间点3只小鼠,24h后终止实验。10只分剩小鼠用于采集空白血浆。

[0933] 5. 实验结果与讨论

[0934] 表39不同溶媒中的化合物22的药代动力学数据

[0935]	组 别	给药剂量 (mg/kg)	T1/2 (hr)	Tmax (hr)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (hr*ng/mL)	AUC0- ∞ (ng*hr/mL)	AUClas的最后 时间点(hr)
	1	100	3.04	1.0	2078	15945	16072	24
	2	100	2.66	0.5	5577	28353	28487	24

[0936] G1和G2小鼠在单次给药后,每组分别于0.25h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h和24h采集血浆检测化合物22在小鼠体内的PK反应。结果显示,不同时间点G2组小鼠血浆中化合物22浓度均明显高于G1组小鼠血浆中化合物22浓度。40% (2-羟丙基)- β -环糊精作为化合物22的溶媒效果好。同时100mg/kg的剂量条件下,小鼠体内有较高的药物暴露量,药代动力学表现优异。

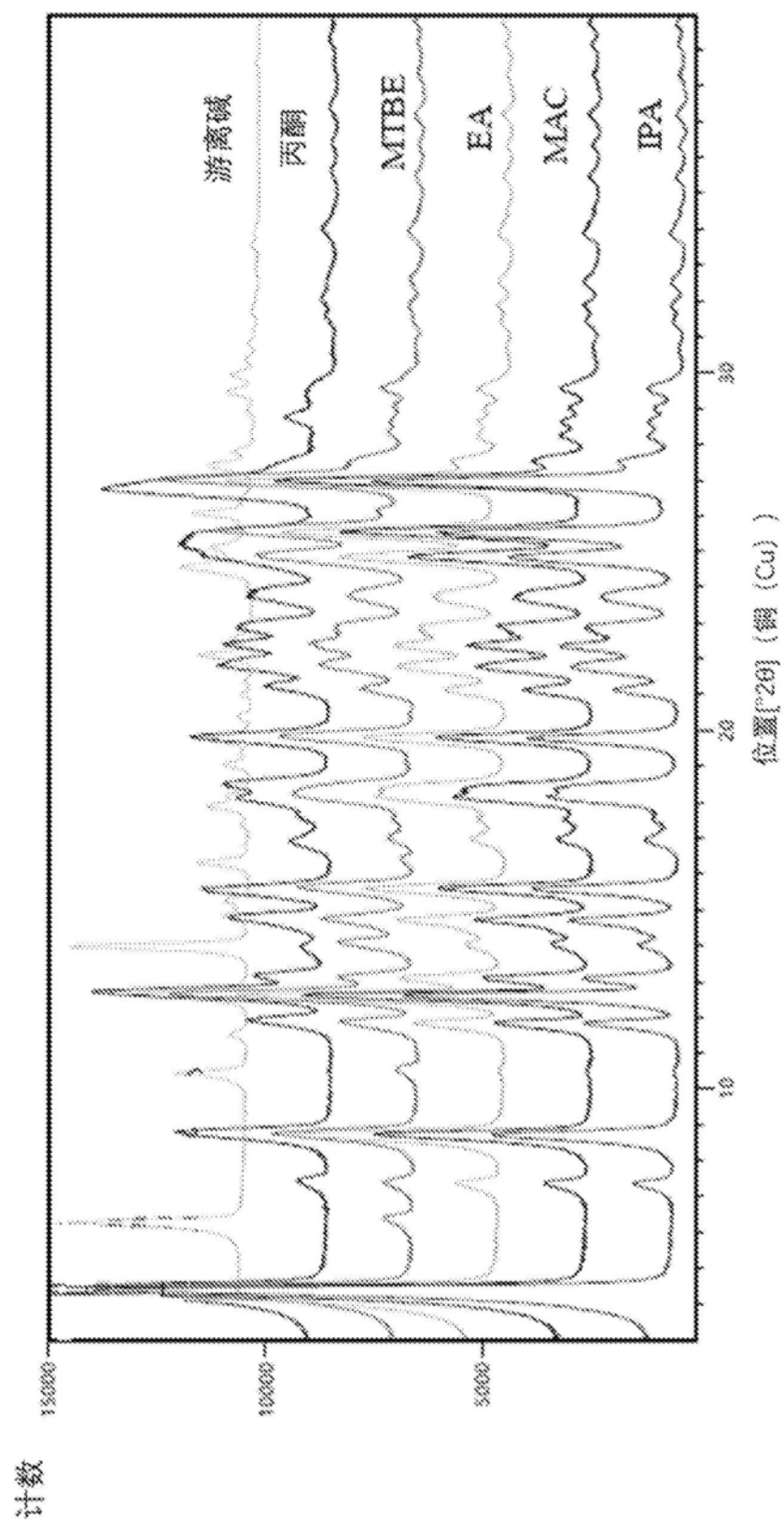


图1

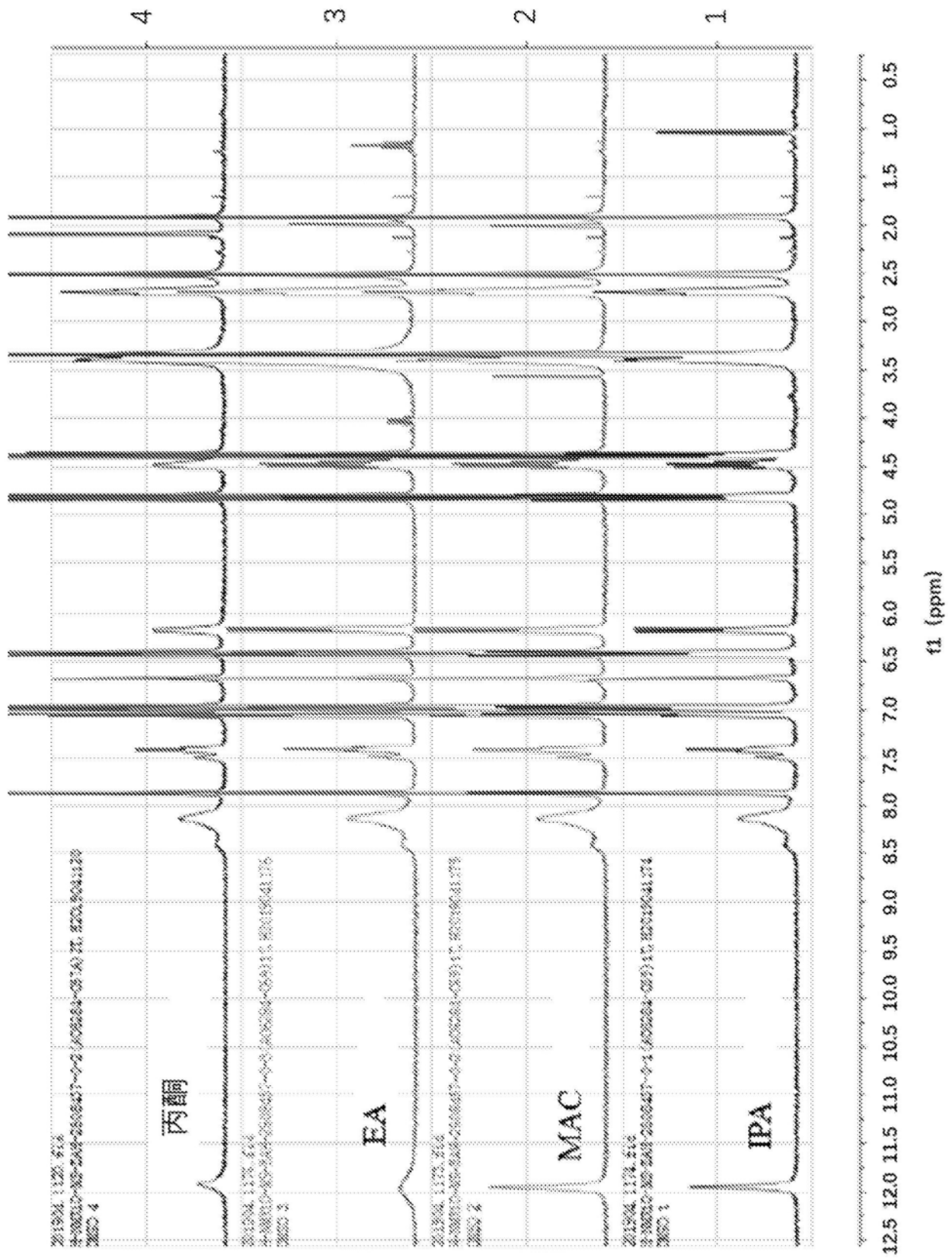


图2

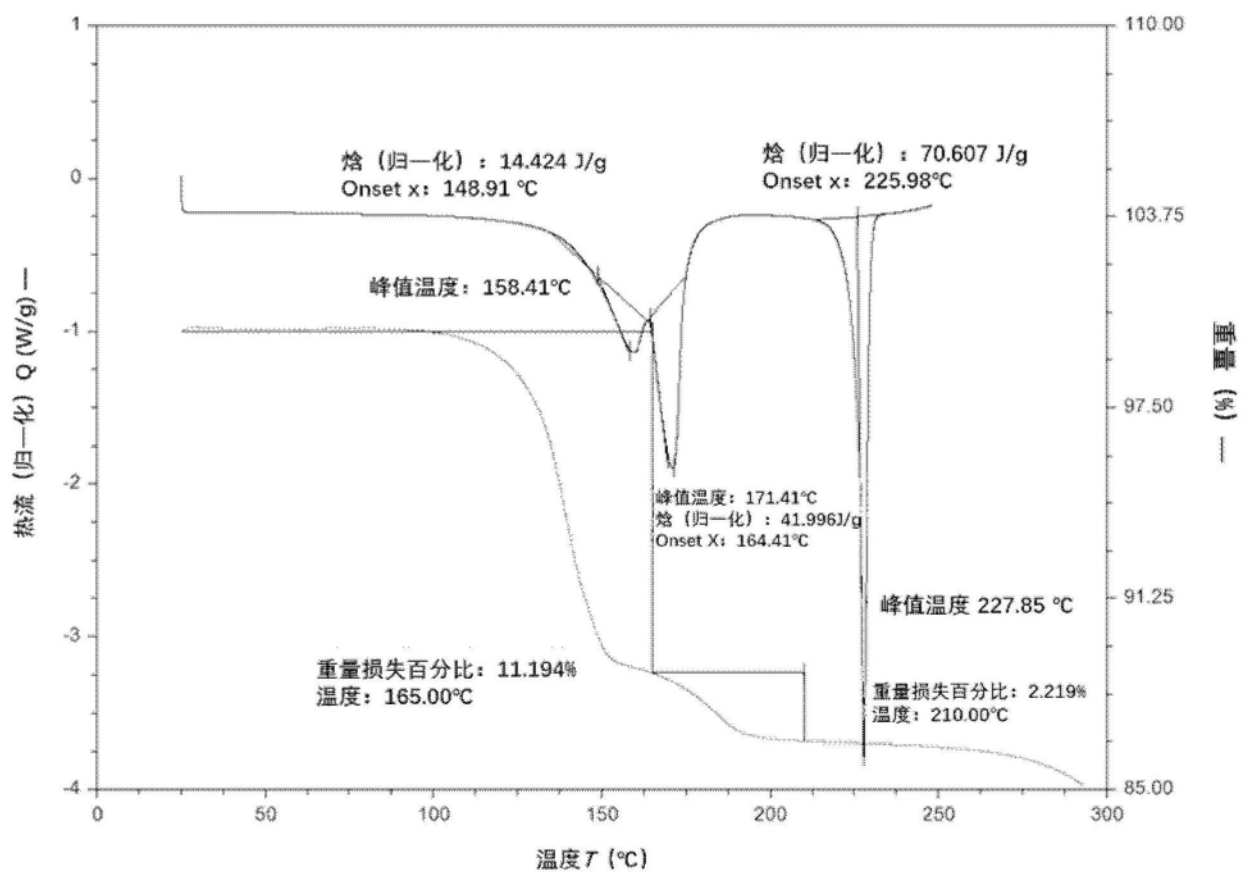


图3