



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818472.0

[43] 公开日 2003 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 1424911A

[22] 申请日 2000.10.18 [21] 申请号 00818472.0
[30] 优先权
 [32] 2000. 1. 18 [33] US [31] 09/484,161
 [32] 2000. 6. 6 [33] US [31] 09/588,221
[86] 国际申请 PCT/US00/28800 2000.10.18
[87] 国际公布 WO01/52853 英 2001.7.26
[85] 进入国家阶段日期 2002.7.17
[71] 申请人 布里斯托尔－迈尔斯斯奎布公司
 地址 美国新泽西州
[72] 发明人 R·F·梅奥

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 代理人 王景朝 杨九昌

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 5 页

[54] 发明名称 焦虑方法

[57] 摘要

6—羟基—8—[4—[4—(2—嘧啶基)—哌嗪基]—丁基]—8—氮杂螺环[4.5]—7,9—二酮及其可药用盐和水合物能够用于减轻焦虑症。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 减轻哺乳动物不希望的焦虑症的方法，包括：对所述哺乳动物全身给药有效量但非毒性量的 6-羟基-8-[4-[4-(2-嘧啶基)-哌嗪基]-丁基]-8-氮杂螺环[4.5]-7,9-二酮或其可药用酸加成盐或其水合物。
- 5

焦虑方法

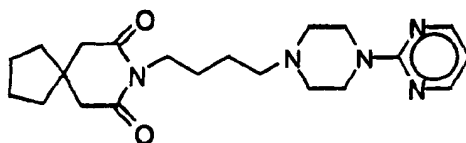
有关申请的交叉参考

- 5 本申请是2000年1月18日提交的09/484,161号申请的部分继续申请。其为1999年8月5日提交的09/368,842号申请的分案申请。

发明背景

- 本发明涉及减轻焦虑的改进方法，该方法通过给药抗焦虑有效量的6-羟基-8-[4-[4-(2-嘧啶基)-哌嗪基]-丁基]-8-氮杂螺环[4.5]-7,9-二酮进行。该化合物首次被Jajoo等在Drug Metab. and Disposition, 17/6, pp. 634-640, 1989中公开，其属于临床上有用的抗焦虑药物 丁螺旋酮的若干代谢物中的一种代谢物。通过与合成制备得到的可信化合物样品比较确定了该代谢物的结构。该代谢物化合物被指定为BMY 28674，也被称为BMY 28674。

- 15 母体药物，丁螺旋酮，具有下列化学结构：



丁螺旋酮

- 20 丁螺旋酮的化学名为 8-[4-[4-(2-嘧啶基)1-哌嗪基]丁基]-8-氮杂螺环(4,5)-癸烷-7,9-二酮，它是一种药物活性化合物，已经发现其能够有效地治疗焦虑症和抑郁症。已经被认可的理论认为：丁螺旋酮通过血清素 1A (5-HT_{1A}) 受体发挥作用。然而，丁螺旋酮具有非常高的首过效应，通常来说，经口服后，仅仅有4%治疗剂量的丁螺旋酮以非代谢形式到达全身循环(Mayol等, Clin. Pharmacol. Ther., 37, p. 210, 1985)。还观察到丁螺旋酮的吸收存在巨大的个体差异。业已证明：该药物的最大血浆浓度的个体差异高达10倍(Gammans等, American J. Med., 80, 增刊3B, pp. 41-51, 1986)。

Wu等在US 3,717,634中公开了丁螺旋酮和相关类似物的合成，

并公开了它们的治疗精神病特性。Casten 等在 US 4,182,763 中公开了用了丁螺旋酮盐酸盐作为新的抗焦虑试剂用于治疗神经官能症患者。

以前通过实验室方法测试了 BMY 28674 的抗焦虑活性，所述实验室方法是专门针对于测定氮杂螺旋酮 (azaspirone) 例如丁螺旋酮、
5 吉吡隆及其结构类似物的抗焦虑活性而开发的。在这种测试中，测试出 BMY 28674 没有显著的抗焦虑活性，并且没有任何文献公开该化合物具有任何类型的显著生物学活性。诚然，除 1-嘧啶基哌嗪 (1-PP) 外，尚没有文献公开了任何已知的丁螺旋酮代谢物具有任何的显著抗焦虑活性。参见：Gammans 等，*JAMA*，(1986 年 3 月)，第 80 卷，增
10 刊 3B，pp. 43-44。因此，当以代谢物的形式通过最大化不变药物的浓度的方式应用时，口服丁螺旋酮用于治疗焦虑症被认为是最佳的。

U. S. 5,431,922 记载了丁螺旋酮的延期释放剂型，从而对该药物的口服进行了改进，因为未发生变化的丁螺旋酮血浆含量增加，而代谢物含量降低，这是通过测定丁螺旋酮与 1-PP 代谢物的血浆浓度比
15 例而得出的结论。然而并没有公开这些制剂的效果数据，并且它们没有被商业化。

U. S. 5,633,009 公开并要求保护一种释放丁螺旋酮的经皮贴剂。正如所料，该经皮释放剂型可靠地得到较高的丁螺旋酮血浆含量 (AUC)，并且通过测定 1-PP 得知代谢物含量大大降低。通常把贴剂
20 设计成每 24 小时释放 60mg 丁螺旋酮。令人惊奇地，用该贴剂进行临床研究显示其抗焦虑作用与安慰剂没有明显差异。

最近，U. S. 6,008,222 要求保护口服给药丁螺旋酮的改进方法，其中，未变化的丁螺旋酮的生物利用度增加，并且降低了代谢物的生成。所公开的方法涉及丁螺旋酮与药物奈法唑酮 (细胞色素 P 4503
25 A4 (CYP3A4) 的抑制剂) 联合给药。根据测定的初步临床数据，不再打算开发该药物的联合给药制剂。

总之，业已发现：人口服抗焦虑药丁螺旋酮得到若干代谢物，BMY 28674 是这几种代谢物中的一种，在本发明之前，该化合物本身并没有被发现有用的生物学活性。具体地说，在以前的测试中没有检测出其
30 抗焦虑活性。据预测丁螺旋酮的代谢抑制将引起更强的抗焦虑反应，基于此预测推荐了丁螺旋酮的剂量。临床观察认为：某些比例的焦虑症患者口服丁螺旋酮后没有减轻症状，该临床观察被认为是在这些未

反应者中未达到足够含量的母体药物所引起的。另一种临床观察的结果是：抗焦虑效果观察前有 7-10 天的滞后期，这一点被归因于慢性给药丁螺旋酮引起受体部位动力学的变化。BMY 28674 具有抗焦虑活性的这种出人意料的发现揭示出这些观察的其它解释。

5

附图的简要说明

图 1. 在幼大鼠中，BMY 28674 对于分离诱导的超声发音和运动活性的作用。

图 2. 在幼大鼠中，丁螺旋酮对于分离诱导的超声发音和运动活性的作用。

10

图 3. 在人体中，口服丁螺旋酮后丁螺旋酮的人血浆浓度。

图 4. 在人体中，口服丁螺旋酮后 1-PP 的人血浆浓度。

图 5. 在人体中，口服丁螺旋酮后 BMY 28674 的人血浆浓度。

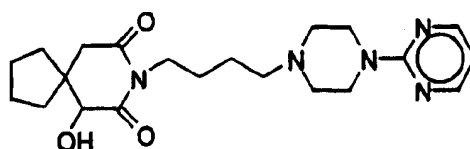
图 6. 在体外代谢研究中，丁螺旋酮产生 BMY 28674 的人肝脏微粒体 (HLM) 代谢。

15

发明概述和详述

我们已经发现：6-羟基-8-[4-[4-(2-嘧啶基)-哌嗪基]-丁基]-8-氮杂螺环[4.5]-7,9-二酮(I)能够用作治疗焦虑症的试剂，该化合物在此被称为 BMY 28674，其结构式如下：

20



BMY 28674

I

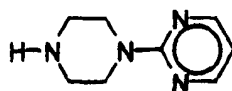
该化合物被认为是丁螺旋酮的活性代谢物。

25

关于临床用抗焦虑试剂丁螺旋酮及其推定或实际代谢物的室内 (in-house) 测试结果表明：抗焦虑活性主要由丁螺旋酮本身决定的，丁螺旋酮的代谢物几乎不具有抗焦虑活性。例如，将某些推定的代谢物全身给药（静脉注射和胃内给药）于大鼠几乎不或者完全不抑制背缝神经元兴奋 (dorsal raphe neuronal firing)。相反，丁螺旋酮本身对背缝神经元兴奋产生高度抑制。参见：VanderMaelen 等，Eur.

30

J. Pharmacol., 129, pp. 123-30, 1986。然而一种代谢物，结构片段 1-(2-嘧啶基)哌嗪，也被称为 1-PP，



5

1 - PP

对于背缝兴奋显示弱的抑制作用，并且在某些其它临床前试验中显示某些抗焦虑活性(参见: U.S. 4, 409, 223)，在某些行为测试范
例中，其还显示焦虑活性。参见: Cervo 等, Life Sciences, 43, pp.
10 2095-2102, 1988 ; Martin, Psychopharmacology, 104, pp.
275-278, 1991。还可能的情况是: 1-PP 的生物学活性是通过 α 2 肾
上腺素机理介导的，因为 1-PP 不显示结合 5-HT_{1A} 受体。目前，1-PP
的临床效果仍然不清楚。

通常认为: 抗焦虑活性是由于丁螺旋酮本身的原因，剂量指导说
15 明目前是根据焦虑患者中未变丁螺旋酮的最大血浆浓度来提供的。在
丁螺旋酮代谢被抑制的患者中，或者是由于患者肝酶活性的原因，或
者是由于摄取了对肝代谢有抑制作用的物质，特别 CYP3A4，对于这些
患者，必须劝告其降低丁螺旋酮的用药量。有趣的现象是: 丁螺旋酮
的高血浆含量与副作用之间并没有具体相关性。通过发现目前的活性
20 代谢物，这些剂量指导说明的方向应该改变成有利于生成 BMY 28674
的酶生成条件。结果，对于丁螺旋酮代谢被抑制的患者，应该增加丁
螺旋酮的剂量，而不是降低其剂量。

另一个被广泛接收的假设认为: 对于某些比例的患者，给药丁螺
旋酮并不能减轻焦虑症状。这种无效因素被归因于: 没有变化的丁螺
25 旋酮在非反应者中的血浆含量不足，尽管丁螺旋酮在所有患者中的血
浆含量非常低。治疗失败的这种解释尚缺乏科学证实。另一种解释是
基于发现活性代谢物 BMY 28674 及其抗焦虑作用。对某些患者治疗失
败的更可能解释是关于抗焦虑活性与 BMY 28674 血浆含量的关系。未
反应者被看作是这样的患者: 从丁螺旋酮至 BMY 28674 的代谢转变不
30 足以达到 BMY 28674 的生效含量。这种解释在于: 在同一患者或者口
服后的患者之间，丁螺旋酮血浆含量变化非常大。这种变化可能是已

知在每日生活中人肝代谢的活性水平发生变化的结果。然而,由于丁螺旋酮本身的血浆含量非常低,与更高含量的代谢物的血浆含量变化相比,丁螺旋酮血浆含量的变化通常较小些。

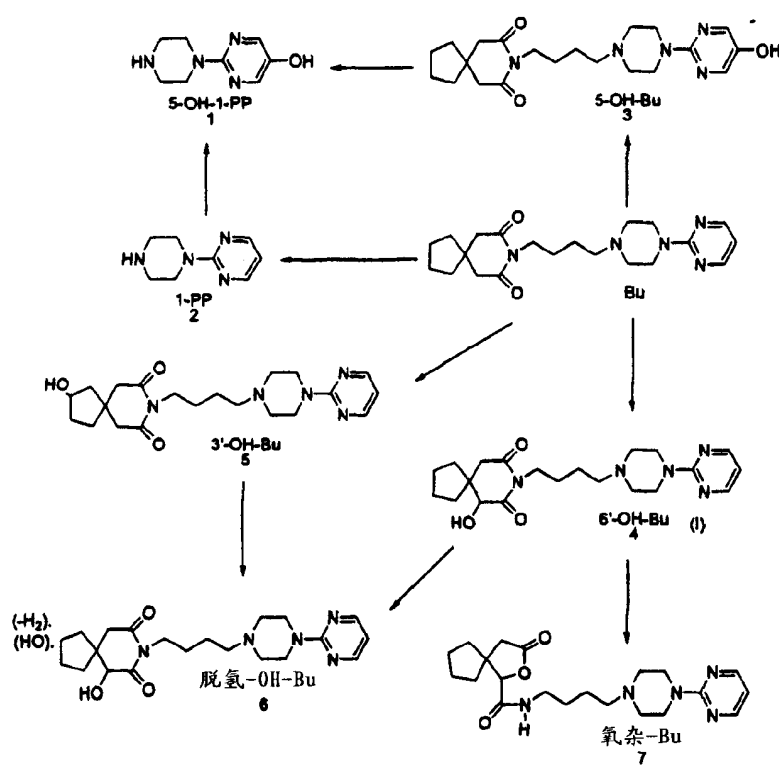
5 类似地,丁螺旋酮治疗开始后,抗焦虑作用发生滞后效应,这是因为代谢积累需要时间,并且受体部位动力学再调节需要时间。通常来说,抗焦虑活性对于代谢物 BMY 28674 表观的依赖性非常良好地与临床观察相关,其中所述临床观察是关于将丁螺旋酮口服给药于焦虑患者的临床观察。

10 基于已经接收的基本理论:未发生变化的丁螺旋酮在临床上提供有用的抗焦虑活性,并开发出丁螺旋酮的透皮贴剂给药系统(参见:U. S. 5,633,009)。并且认为丁螺旋酮透皮贴剂能够非常有效地治疗焦虑症的原因在于:透皮药物剂型使丁螺旋酮代谢降低,从而得到非常大量的母体药物,并且大大地降低了代谢物的含量。令人惊奇的事实是:应用丁螺旋酮透皮贴剂在临床上没有观察到或者基本上没有观察到抗
15 焦虑活性。这种出人意外的结果导致需要对丁螺旋酮代谢物进行重新评价,并导致了 BMY 28674 高效抗焦虑活性的发现。

丁螺旋酮的下列代谢方案(方案1)摘自 Jajoo 等, *Xenobiotica*, 1990, Vol. 20, No. 8, pp. 779-786, "抗焦虑药丁螺旋酮的体外代谢作为体内代谢的预测"。

方案 1

大鼠肝微粒体和肝细胞对丁螺旋酮的代谢方案



5

通过评价丁螺旋酮代谢物相关受体的结合开始该新工作。因此，对丁螺旋酮 (Bu ; MJ 9022) 及其代谢物 1-PP (BMJ 13653)、 3'-OH-丁螺旋酮 (BMJ 14295)、 5-OH-丁螺旋酮 (BMJ 14131) 和 6'-OH-丁螺旋酮 (BMJ 28674) 的体外人 5-HT 1A 受体活性进行评价。这些实验的结果如表 1 所示。

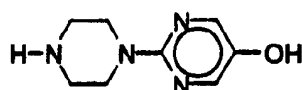
10

表 1

化合物	IC ₅₀ [nM]	STDEV	K _i 值	N
8-OH-DPAT (参照物)	2.5	0.9	1	8
丁螺旋酮 (MJ 9022)	30	18	15	8
6-OH-丁螺旋酮 (BMY 28674)	114	85	57	7
5-OH-丁螺旋酮 (BMY 14131)	928	176	464	7
3-OH-丁螺旋酮 (BMY 14295)	652	402	326	7
1-PP (BMY 13653)	> 1000	-	-	3

可以看出, 表 1 中列出了 MJ 9022 (丁螺旋酮) 及其代谢物 BMY 13653 (1-PP)、 BMY 14131 (5-OH 丁螺旋酮)、 BMY 14295 (3-OH-
5 丁螺旋酮) 和 BMY 28674 (6-OH 丁螺旋酮) 对人血清素 1A (5-HT_{1A}) 受体的新体外活性。丁螺旋酮显示对人 5-HT_{1A} 受体有高的亲和力 (K_i=15 nM)。BMY 28674 具有与丁螺旋酮接近的结合亲和力 (K_i=57 nM)。与丁螺旋酮相比, 其它代谢物测试时显示对人 5-HT_{1A} 受体具有相对弱的亲和力。

10 BMY 28674 显示为丁螺旋酮的活性代谢物。不仅仅是因为在人尿研究中该代谢物为含量第二高的代谢物 (5-羟基-1 PP



5-羟基-1-PP

15

为含量最高的代谢物); 但更重要的是, BMY 28674 在人血中的含量比丁螺旋酮的含量高出约 40 倍, 并且比 1-PP 的含量高出数倍。同时还有一种重要的事实: 在 BMY 28674 中, 丁螺旋酮的骨架保持完整无缺。另外, 在 5-HT_{1A} 受体的结合数据表明: BMY 28674 的结合亲和力与丁
20 螺旋酮接近, 但其它代谢物在 5-HT_{1A} 位点仅仅显示弱的相互作用。目前, 该 5-HT_{1A} 受体被认为是密切参与调节焦虑的血清素受体。目前的研究焦点已经聚集至保持丁螺旋酮骨架并且分子中引入不超过一个亲水性羟基的丁螺旋酮代谢物。如果存在多于一个的亲水性羟基, 则其

可能使那些多羟基化代谢物产物进入到体内 CNS 区域的分布和转运降低, 因此使必需的受体相互作用不太可能在靶区域发生。

以前, BMY 28674 的室内功能测试应用了基于改良的 Vogel Conflict 测试的体内测试方法, 即用于测试抗焦虑试剂的简单可靠的冲突方法(参见: Vogel 等, *Psychopharmacologia*, (Berl.) 21, pp. 1-7, 1971)。然而, BMY 28674 在 Vogel 测试中没有显示抗焦虑反应。以前, 没有任何有用的抗焦虑活性归因于 BMY 28674。

把大鼠幼鼠与其母亲和其同窝幼鼠分离, 并接受环境刺激(例如冷温), 其发出的超声波声音被证明是评价可能的抗焦虑和致焦虑化合物的灵敏方法(Winslow 和 Insel, 1991, *Psychopharmacology*, 105 : 513-520)。以抗焦虑为目的的心理活性化合物抑制超声波呼叫的频率, 而具有致焦虑活性的药物增加了呼叫的频率。更重要的是, 分离诱导的超声发声范例显示对于检测广谱药物的抗焦虑活性最敏感, 所述的广谱药物的例子为: 苯并二氮杂革类、5-HT 重摄取抑制剂、5-HT_{1A} 激动剂以及 NMDA 拮抗剂。在本发明的研究中, 把 9-11 天龄的大鼠幼鼠与其母亲和同窝幼鼠分离, 并将其置于冷环境(18-20°C)盘中, 使其发出因哀伤而引起的超声波发声, 测定丁螺旋酮的 6-羟基化代谢物——BMY 28674[其对 5-HT_{1A} 受体具有亲和力($K_i=57$ nM)]的抗焦虑活性。参见图 1。图 2 显示在该测试方法中获得的丁螺旋酮结果。

在测试前 30 分钟给药 BMY 28674 (0.03-1 mg/kg, sc ; 图 1), 大鼠幼鼠在冷盘中发出的超声波发声显示剂量-依赖性抑制 [$F(4, 45)=19.27$, $p=0.0001$]。预计 BMY 28674 降低呼叫数目 50% 时的剂量 (ID_{50}) 为 0.13 mg/kg。在给药 BMY 28674 后, 运动活性也显著降低 [$F(4, 45)=5.85$, $p=0.007$]。然而, BMY 28674 降低运动活性的 ID_{50} 剂量 (0.41 mg/kg) 约为其抑制超声波呼叫的 D_{50} 剂量 (0.13 mg/kg) 的 3 倍, 从而表明与丁螺旋酮类似, BMY 28674 的抗焦虑活性剂量更低。

在测试前 30 分钟给药丁螺旋酮 (0.03-1 mg/kg, sc ; 图 2), 大鼠幼鼠在冷盘中的发出的超声波发声显示剂量-依赖性抑制 [$F(4, 42)=15.44$, $p=0.0001$]。预计丁螺旋酮的剂量降低呼叫数目 50% 时的剂量 (ID_{50}) 为 0.10 mg/kg。运动活性也发生降低 [$F(4, 42)=4.343$, $p=0.005$], 比那些抑制超声波呼叫的剂量大约高 5 倍。

这些结果表明: 在大鼠幼鼠分离诱导的超声波发声焦虑模型中,

与丁螺旋酮类似，代谢物 BMY 28674 显示抗焦虑活性。与抑制运动活性相比，BMY 28674 (和丁螺旋酮) 在低得多的剂量下发生抗焦虑活性。总之，上述体外和体内测试表明：丁螺旋酮和 BMY 28674 均显示阳性的抗焦虑测试结果；然而，把丁螺旋酮口服给药至人体后，其血浆含
5 量非常低。在本发明工作之前，没有关于 BMY 28674 临床血浆浓度的信息。

已经进行了人药代动力学研究，并且得到了出人意外的结果，从而支持了 BMY 28674 作为活性抗焦虑代谢物的结论。

将丁螺旋酮口服给药至人 (n=13) 25 天，总每日剂量为 10-60mg。
10 将给药方案分成 5 个 5-天给药间隔，在每个间隔增加 BID 剂量。在每个给药间隔的第 5 天进行药代动力学测定，将这些数据用于评价丁螺旋酮、1-PP 和 BMY 28674 的药代动力学。下面显示人的给药方案。

	给药间隔	丁螺旋酮 BID 剂量 (mg)	PK 测定 (研究天数)
15	1	5	5
	2	7.5	10
	3	15	15
	4	20	20
	5	30	25

20

对于参加 25 天研究的健康成人来说，在这 5 个给药水平中，发现口服这些多剂量的丁螺旋酮是安全的，并且通常能够良好地耐受。

图 3、4 和 5 显示各个给药间隔最后 1 天以 12 小时的给药期间分别口服丁螺旋酮、1-PP 和 BMY 28674 的平均血浆含量。丁螺旋酮含量
25 (图 3) 通常非常低 (在较高的剂量下约 1-2 ng/mL)，给药两小时后含量低于 1ng/mL。相反，1-PP 含量 (图 4) 和 BMY 28674 含量 (图 5) 要高得多。但时间比丁螺旋酮要迟一些。BMY 28674 的浓度比 1-PP 的含量要高数倍，但比丁螺旋酮的含量要高 30-40 倍。

迄今为止，研究表明：口服给药丁螺旋酮后，与丁螺旋酮的可忽略血浆含量相比，代谢物 BMY 28674 的血浆含量显然要有意义得多。
30 尽管丁螺旋酮本身在测试模型例如大鼠 pub USV 模型中已经显示出具有抗焦虑活性，但人体中看到的低血浆含量导致的结论是：正是丰富

的代谢物 BMY 28674 介导了临床上的抗焦虑效果。在本发明评价丁螺旋酮代谢物之前，本领域技术人员并不知道在人口服丁螺旋酮后出现相对丰富的 BMY 28674。

有证据表明：给药 BMY 28674 本身能够达到抗焦虑效果，与把 BMY 28674 全身引入到焦虑患者相比，口服其前体丁螺旋酮在合适条件下也能够获得改进的方法。为了更好地定义这些条件，进行体外代谢实验以研究丁螺旋酮的人肝微粒体 (HLM) 代谢物。基于 CYP3A4 酶活性选择 HLM 多供体制剂。HLM 制剂购自：Gentest Corporation (Woburn, MA: Catalog #'s, H023、H056、H070、H093 和 H112)，其特征为应用标准方法的 HLM 制剂。除了测定孵化中母体化合物的减少外，还测定了代谢物 BMY 28674 的含量。

从图 6 可以看出：第一套实验中 HLM 制剂的 CYP3A4 的特效活性和丁螺旋酮代谢物以及代谢物的生成之间有相关性。应用从 5 个供体肝的 5 个 HLM 制剂培育单一浓度的 ^{14}C -丁螺旋酮 ($10\ \mu\text{M}$)。通过 NADPH 生成系统应用 0.5mg/ml 微粒体蛋白培育 15 分钟，通过反相 HPLC、应用联机放射活性检测测定培育样品中 ^{14}C -丁螺旋酮和 BMY 28674 的含量，并将其与标准样品进行比较。得到 ^{14}C 的定量回收。图 6 中显示：从 5 个供体肝 HLM 制剂中，BMY 28674 与丁螺旋酮的浓度比与测定的 CYP3A4 特异活性之间的关系（两次单独测定的平均）。所得结果显示：随着 HLM 中 CYP3A4 特异活性的增加，BMY 28674 与丁螺旋酮的比也增加。因为 CYP3A4 活性增加，BMY 28674 含量增加以及丁螺旋酮浓度降低从而使比例变化显著（结果未显示）。

进行另一套培育以确定在 HLM 培育中 CYP3A4 抑制剂改变 BMY 28674 与丁螺旋酮的比例的能力。在合并的 HLM（通过把上述 5 个供体肝中得到的等量物质混合）中培育单一浓度的 ^{14}C -丁螺旋酮 ($10\ \mu\text{M}$)。把公知的 CYP3A4 抑制剂酮康唑以各种浓度加入到上述培育液中。所有其它培育条件以及样品分析如上所述。当不含有酮康唑时，用合并的 HLM 培育丁螺旋酮 15 分钟后，BMY 28674 与丁螺旋酮的比为 0.42（表 2）。当酮康唑的浓度升至 $0.125\ \mu\text{M}$ 时，丁螺旋酮的代谢并不受影响。当酮康唑的浓度为 $0.25\ \mu\text{M}$ 时，6'-羟基-丁螺旋酮与丁螺旋酮的比降低至 0.32。在 $1.25\ \mu\text{M}$ 和 $2.5\ \mu\text{M}$ 的高酮康唑浓度下，BMY 28674 与丁螺旋酮的浓度比分别进一步降低至 0.06 和 0.01。这些结果表明：当在

合并的 HLM 中同时培育酮康唑与丁螺旋酮时，随 CYP3A4 抑制剂酮康唑的浓度升高，BMY 28674 与丁螺旋酮的比例降低。由酮康唑浓度升高引起的比例变化由 BMY 28674 浓度降低和未变化的丁螺旋酮浓度升高两者显示。

5

表 2
酮康唑对丁螺旋酮代谢的抑制

[酮康唑]	[丁螺旋酮]	[BMY 28674]	[BMY 28674/丁螺旋酮]
(uM)	(相对 CPM)		(比例)
0	20054	8400	0.42
0.025	18645	7884	0.42
0.125	19648	8201	0.42
0.25	21957	7052	0.32
1.25	36117	2111	0.06
2.5	43712	576	0.01

总之，这些体外试验表明：在人肝中，丁螺旋酮的代谢以及代谢物 BMY 28674 的表现均依赖于 CYP3A4 活性。

10

本发明的目的是提供一种引起焦虑症患者抗焦虑反应的方法。通过对焦虑症患者提供抗焦虑有效血含量的 BMY 28674 可以达到该目的。达到该目的最明显的方式就是把 BMY 28674 本身对患者全身给药。因此，本发明一方面涉及对需要进行减轻焦虑的哺乳动物减轻焦虑状态的方法，该方法通过全身给药抗焦虑有效量 BMY 28674 来进行。

15

通常来说，有效量应该提供至少 1-2ng/mL BMY 28674 的最低血浆含量。通常来说，测定 CMIN 含量的时间点是给药 12 小时后，即刚好在下一 BID 给药之前测定。BMY 28674 可以通过许多给药途径，这些途径包括但不限于：口服、舌下、
、鼻内或胃肠外例如肌肉内、静脉内和皮下等。

20

在治疗上，可以通过上述给药途径之一把 BMY 28674 以制剂形式给药，所述制剂含有存在于可药用载体中的抗焦虑有效量的 BMY 28674 或其可药用酸加成盐之一或其水合物。优选提供约 5-50mg 活性成分/单位剂量、并且能够制备成水溶液和水或油悬浮液的药物组合物。当制备成口服制剂例如片剂、锭剂、胶囊、糖浆剂、酏剂、水溶液或混

悬液剂型时，还可以把 BMY 28674 口服给药。

也可以考虑把 BMY 28674 的可药用酸加成盐用作抗焦虑试剂。按照定义，它们是这样的一些盐：其中的阴离子对 BMY 28674 碱形式的毒性或药理学活性没有显著影响。

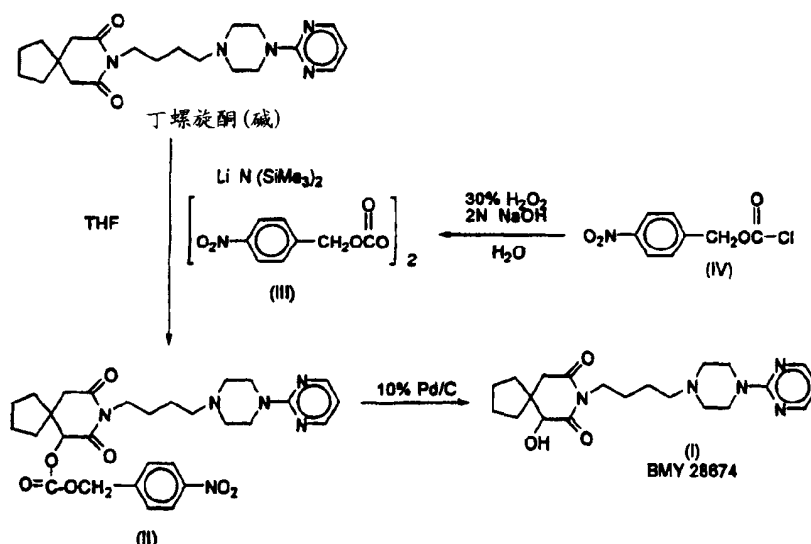
- 5 获得酸加成盐有两种方式：一种方式是将 BMY 28674 与有机酸或无机酸反应，优选在溶液中进行反应；另一种方式是通过现有技术记载以及本领域技术人员可获得的任何方法。可用的有机酸例子为：羧酸例如马来酸、乙酸、酒石酸、丙酸、富马酸、羧乙磺酸、琥珀酸和扑酸等；可用的无机酸例子为：氢卤酸例如 HCl、HBr 或 HI 以及硫酸和磷酸等。

- 10 优选的口服组合物为片剂或胶囊，其除了含有 BMY 28674 外，还可含有常规赋形剂例如粘合剂（例如糖浆、阿拉伯胶、白明胶、山梨醇、黄耆胶或聚乙烯吡咯烷酮）、填充剂（例如乳糖、蔗糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨醇或甘氨酸）、润滑剂（例如硬脂酸镁、滑石、聚乙二醇或二氧化硅）、崩解剂（例如淀粉）和湿润剂（例如十二烷基硫酸钠）。含有常规药用载体的 BMY 28674 溶液或混悬液被用来制备胃肠外组合物例如静脉注射用水溶液或肌肉内注射用油混悬液。这样的具有所需澄清度、稳定性和适应性的胃肠外给药组合物制备如下：把 0.1-10 重量% 15 的活性成分(BMY 28674 或其可药用酸加成盐或其水合物)溶解于水或由多羟基脂肪醇（例如甘油、乙二醇和聚乙二醇或其混合物）组成的载体中。其中聚乙二醇由下列混合物组成：能溶于水和有机液体、分子量约 200-1500 的通常为液体的非挥发性聚乙二醇。

- 20 可以按照化学文献中记载的方法容易地合成得到 BMY 28674，这些方法对有机合成化学技术人员来说是已知的。有一种制备方法是应用丁螺旋酮作为起始原料，该方法如方案 2 所示。

方案 2

BMY 28674 的制备



5

该制备方法是一个有用的实施例，其举例说明了 BMY 28674 的合成。

应该理解：BMY 28674 可以通过体外丁螺旋酮的酶(人或大鼠肝微粒体)转变得得到。(参见：Jajoo 等, *Xenobiotica*, 1990, Vol. 20, No. 8, pp. 779-786.)

还可以通过另一种方法全身给药从而达到抗焦虑有效血含量的 BMY 28674，这种方法是口服给药 BMY 28674 的前体形式。这种前体药物形式的给药量产生有效的抗焦虑作用但没有毒副作用。也就是说：可以通过对哺乳动物给药 BMY 28674 的前体或前体药物形式例如丁螺旋酮来完成 BMY 28674 的全身给药。

然而，这种全身给药 BMY 28674 的方法不同于已知的口服给药丁螺旋酮的方法，而是对后者作了进一步的改进。在本发明改进的抗焦虑作用方法中应用了前体药物丁螺旋酮。因此，本发明另一方面涉及减轻哺乳动物焦虑的方法，该方法通过一种改进的方法口服丁螺旋酮。所述改进之处在于：丁螺旋酮的口服方式更有助于 BMY 28674 的代谢生成，从而在患者中提供抗焦虑有效量的 BMY 28674。这与目前的给药方法是不同的，因为目前的方法的目的在于使未变化的丁螺旋酮血含量最大化。例如，以前的用药指导已经教导：如果在有利于抑

制代谢的条件下给药，也就是说产生高浓度的未变化的丁螺旋酮和低浓度的代谢物，则应该降低丁螺旋酮的剂量。本发明改进的方法与过去的口服给药丁螺旋酮方法相反，当抑制丁螺旋酮的代谢时，不是降低丁螺旋酮的剂量，而是应该增加丁螺旋酮的剂量，其目的是达到合适含量的 BMY 28674。在严重的毒副作用与增加的丁螺旋酮消化量之间并没有特别的相关性。

总之，本发明另一方面涉及减轻哺乳动物不希望的焦虑状态的改进方法，通过有利于哺乳动物代谢生成 BMY 28674 的方式对哺乳动物口服给药丁螺旋酮或其可药用酸加成盐。通常来说，丁螺旋酮的给药量是导致 BMY 28674 最少血浓度(CMIN)为 1-2ng/mL 的给药量。通常在给药 12 小时后并刚好在下一次给药前测定患者中的 CMIN。

影响 BMY 28674 代谢生成的因素之一的例子为口服丁螺旋酮的食物效应。根据 BUSPAR[®](盐酸丁螺旋酮口服片)的包装说明附件，已经含蓄地表明：丁螺旋酮应该与食物同时服用以增加未变化的丁螺旋酮血浆含量。

在 BUSPAR[®]包装说明附件中教导的另一个给药改进例子为：当与 CYP3A4 抑制剂同时给药时，建议降低丁螺旋酮的剂量。

为了通过口服给药丁螺旋酮减轻不希望的焦虑症状的改进方法，前面的例子的教导精神与本发明的改进方法相背离。在本发明的改进方法中，不是在进餐的同时给药丁螺旋酮，相反，应该在进餐前或后两小时或更长时间给药。类似地，如果细胞色素 P450 3A4 (CYP3A4) 的功能被削弱，应该增加丁螺旋酮的剂量，而不是如 BUSPAR[®]包装说明附件所述降低丁螺旋酮的剂量。

关于改进经口服丁螺旋酮全身引入 BMY 28674 的改进抗焦虑方法所想象的其它给药方案包括下列：

- 在哺乳动物 CYP3A4 活性最高的白天期间口服给药丁螺旋酮。
- 中断同时服用抑制 CYP3A4 活性的药物或食物。
- 当中断同时服用抑制细胞色素活性的药物在医学上不可行时，增加丁螺旋酮的剂量以调节降低的 CYP3A4 活性。

总之，按照良好的药物实践，从方式和程度上改进了焦虑症患者口服丁螺旋酮的方法，因此有利于 BMY 28674 的代谢生成。为了保持良好的临床实践，优选给药 BMY 28674 或其前体形式，给药的浓度将

产生有效的抗焦虑作用而不引起毒副作用。

具体实施方案描述

对于应用构成本发明的化合物及其制备方法将通过下列实施例变得更明显，这些实施例仅仅用于举例说明本发明，但在范围和领域方面不对本发明构成限制。

实施例 1：BMV 28674 (I) 的制备

A. 过氧化二碳酸双-4-硝基苄基酯 (III)

通过对文献记载的方法 (1 F. Strain 等, J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1254) 进行改进来制备过氧化二碳酸双-4-硝基苄基酯。因此，以 30 分钟的时间把 30 % H_2O_2 (2.7mL, 24mmol) 和 2.35N NaOH (20mL, 47mmol) 的冰冷混合物滴入到氯甲酸 4-硝基苄基酯 (10.11g, 4.7mmol) 在丙酮 (20mL) 中的冰冷溶液中。将混合物剧烈搅拌 15 分钟，然后过滤，用水洗涤滤饼，然后用己烷洗涤。将得到的潮湿固体溶解于二氯甲烷中，将溶液进行干燥 (Na_2SO_4)，然后用等体积己烷稀释。用旋转蒸发仪在 20°C 浓缩该溶液得到晶体沉淀，将其过滤，用己烷洗涤，真空干燥得到浅黄色微晶化合物 III (6.82g, 74%)，熔点：104°C (分解)。

过氧化二碳酸双-4-硝基苄基酯被发现为相对稳定的物质，其在熔点下分解，缓缓放出气体。相反，过氧化二碳酸二苄基酯 (2 参见: M. P. Gore, J. C. Vederas, J. Org. Chem., 1986, 51, 3700) 的分解是从熔点毛细管中突然剧烈地排出物质。

B. 6-(过氧化二碳酸 4-硝基苄酯基)-8-[4-[4-(2-嘧啶基)-哌嗪基]-丁基]-8-氮杂螺环 [4.5]-7,9-二酮 (II)

在 -78°C 下，把 $\text{LiN}(\text{Me}_3\text{Si})_2$ (28.5mL 1M THF 溶液) 加入到 8-[4-[4-(2-嘧啶基)-哌嗪基]-8-氮杂螺环 [4.5]-7,9-二酮 (丁螺旋酮: 10 g, 26 mmol) 的干燥 THF (250 mL) 溶液中，搅拌 3 小时，然后以 1 小时的时间滴加过氧化二碳酸双-4-硝基苄酯 (11.2g) 的干燥 THF (150mL) 溶液。在 -78°C 下持续搅拌 1 小时。

移开冷却浴，将反应溶液倾入到水和乙酸乙酯的混合物中。分离有机相，用水洗涤，然后用盐水洗涤。干燥有机相，再蒸发成粘性油状物。将该油状物进行闪极色谱，用 MeCN-EtOAc (1:2) 洗涤硅胶柱，得到粗产物，用丙酮洗涤除去未反应的丁螺旋酮，得到 6.23 g 白色固体 (46%) 产物 (II)。

C. 6-羟基-8-[4-[4-(2-嘧啶基)-哌嗪基]-丁基]-8-氮杂螺环[4.5]7,9-二酮(I; BMY 28674)

在 Parr 摇动器中, 在 40-45 磅压力下, 将 II (4.0 g; 6.9 mmol) 和 10% Pd/C (约 1g) 在甲醇 (100mL) 中的混合物进行氢化反应 1 小时。
5 经 Celite 垫过滤该氢化混合物, 然后用乙酸乙酯洗涤。将滤液进行蒸发得到胶状物, 将其用闪极色谱纯化: 在硅胶柱上用 EtOAc 洗脱得到 0.41 g 淡白色固体 (I)。

$C_{21}H_{31}N_5O_3$ 的分析计算: C, 62.82; H, 7.78; N, 17.44。

测定: C, 62.84; H, 7.81; N, 17.33。

10 实施例 2: 5-HT1A 受体结合测定

应用在 HEK293 细胞中表达的人 5-HT1A 受体制备膜用于结合。应用杜恩斯均化器收集和断裂细胞。以 $18000 \times g$ 的速度旋转细胞 10 分钟, 将颗粒物重新悬浮于测试缓冲液中, 在液氮中冷冻, 在 -80°C 下储存直至到测定那天。

- 15 在每个孔中应用总量为 $30\mu\text{g}$ 的蛋白。在 96 深孔培养皿中进行测定。测定缓冲液为含有 2.5mM MgCl_2 和 2mM EGTA 的 50mM HEPES。应用 0.1nM-1000nM 的测试化合物和 1nM 的 3H-8-OH-DPAT 在 25°C 下培育膜制剂 60 分钟。用 10 mM 血清素作为阻断剂用于测定非特异性结合。加入 1ml 冰冷的 50mM HEPES 缓冲液中止反应, 应用 Whatman GF/B
20 过滤器通过 Brandel 细胞收集器快速过滤。在 LKB Trilux 液体闪烁计数器中对滤饼进行计数。通过 Excel-fit 非线性回归测定 IC_{50} 值。

实施例 3: 幼大鼠分离-诱导的超声波发声测试

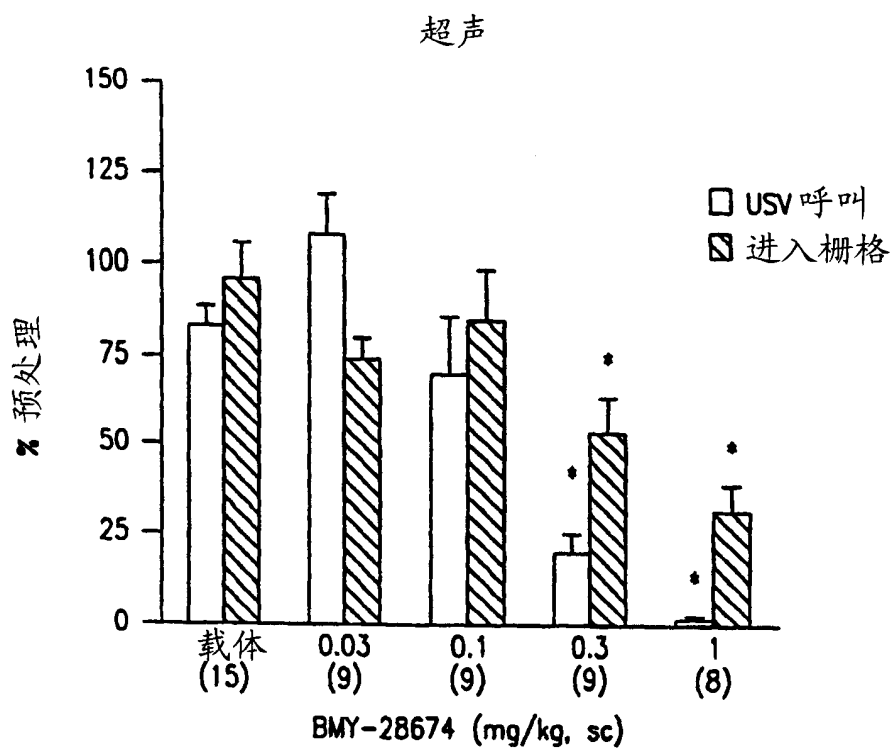
- 在聚碳酸酯笼中用橡皮堤围住 Harlan Sprague-Dawley 幼大鼠 (雄性和雌性), 直至其达到 9-11 天龄。测试前 30 分钟, 从堤中放出
25 幼鼠, 应用少量家用被褥将其置于新笼中, 带入到实验室中, 置于光下以维持体温为 37°C 。将幼鼠称重, 区别性别, 标记后送回至同窝幼鼠直至进行行为评价。在 Plexiglas 记录室中进行测试, 该记录室中包括具有 $5 \times 5\text{cm}$ 栅格的温度保持在 $18-20^\circ\text{C}$ 的金属板。在所述板上方 10cm 处悬挂一麦克风, 用来记录超声波发声。应用提供呼叫频率和持续
30 时间联机分析的 Noldus UltraVox 系统记录超声呼叫。同时通过观察记录幼大鼠进入的栅格室的数目。如果在 5 分钟预测期间, 幼鼠不能发出至少 60 次呼叫, 则在药理学测试中不应用这些幼鼠。在基线测

定收集后，立即在大鼠幼鼠的颈背部经皮下把载体或药物注射至大鼠幼鼠，然后将其重新放回到其同窝幼鼠中。30 分钟后，在各个依赖性测定(发声和栅格室穿越)上重复测试幼鼠。除非另有说明，各个幼鼠仅仅使用一次。对于超声发声的频率和栅格室穿越，应用单向 ANOVA 5 分析基线差异和从基线的百分比变化。进行 Bonferroni/Dunn post hoc 比较以评价含载体的急性药物效应。应用 Log-几率单位分析评价被预测能够抑制分离-诱导的超声波发声的 50% (ID₅₀) 的各个拮抗剂的剂量(毫克/千克)。把实验 I 型错误率(α)设定为 0.05, 进行所有比较。

以跨过数个幼鼠的不规则顺序给药各种药物。将 BMY 28674 和丁 10 螺旋酮溶解于生理盐水(0.9% NaCl; 赋形剂)中。以 10ml/kg 的体积皮下注射所有药物。其中药物剂量是指盐的重量。

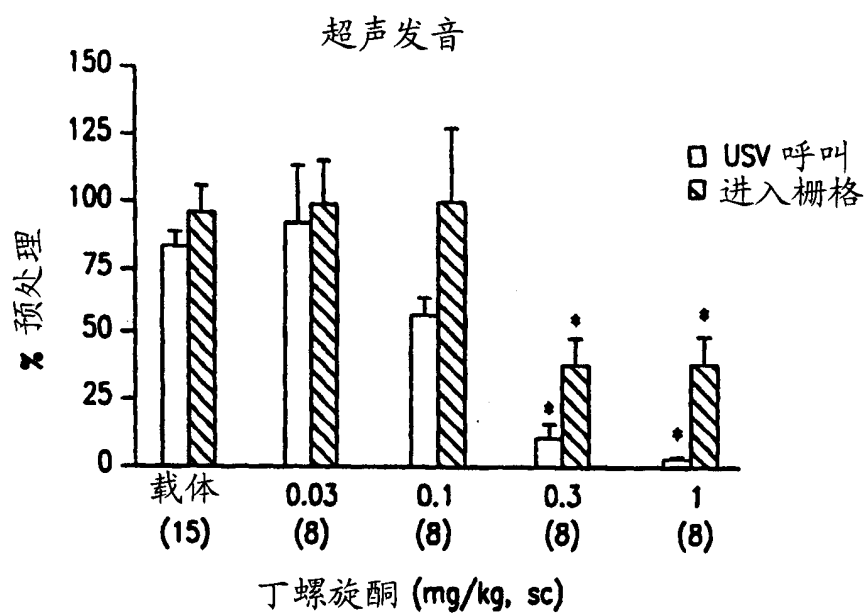
实施例 4: 体外代谢研究: 丁螺旋酮转变为 BMY 28674

- 基于 CYP3A4 细胞色素 P450 酶活性选择 5 个 HLM 的供体制剂。
- 应用从 5 个供体肝中得到的 5 个 HLM 制剂培育 ¹⁴C-丁螺旋酮 15 (10 μ M) (应用 0.5mg/ml 微粒体蛋白进行 15 分钟)。
 - 应用联机放射性检测和与标准样品进行比较通过反相 HLPC 测定培育样品中的 ¹⁴C-丁螺旋酮和 BMY 28674 含量。
 - 进行第二组培育以测定酮康唑(一种 CYP3A4 抑制剂)改变 HLM 培养液中 BMY 28674 与 BUSPAR[®] 的比的能力。
- 20 · 用合并的 HLM 培育 ¹⁴C-丁螺旋酮(10 μ M) (用 0.5mg/ml 微粒蛋白培育 15 分钟)。



* $p < 0.05$ 对载体
(每组动物数)

图 1



* $p < 0.05$ 对载体
(每组动物数)

图 2

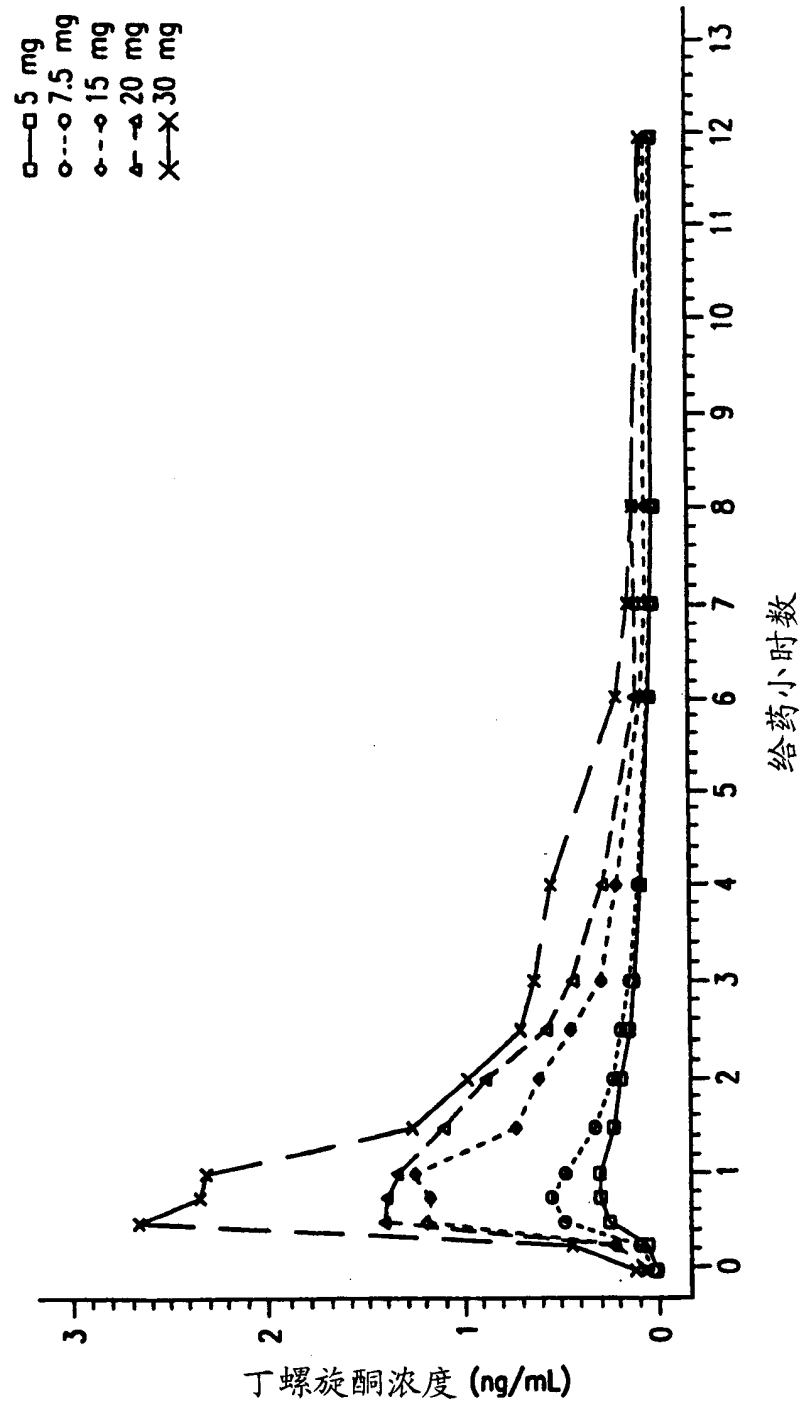


图 3

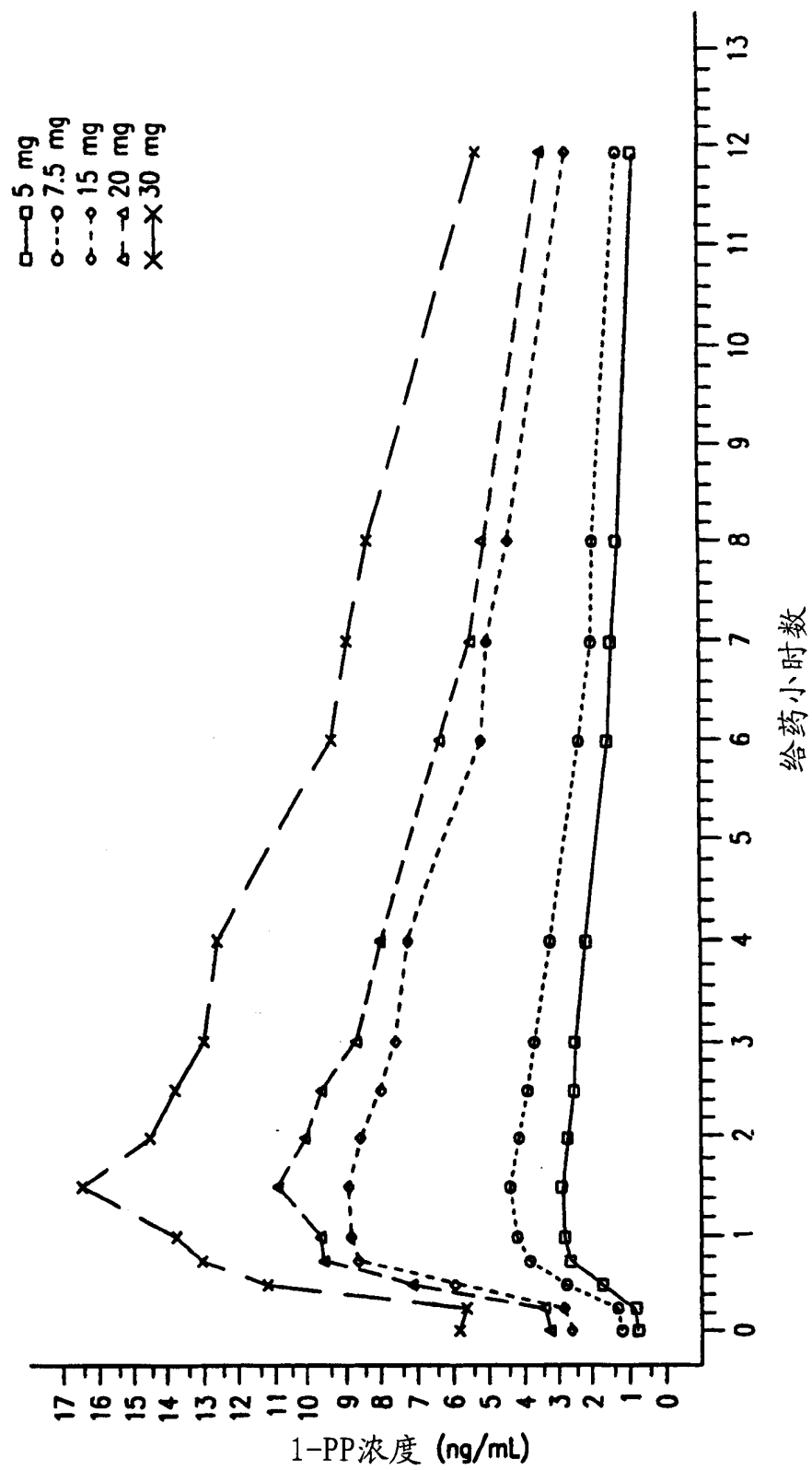


图 4

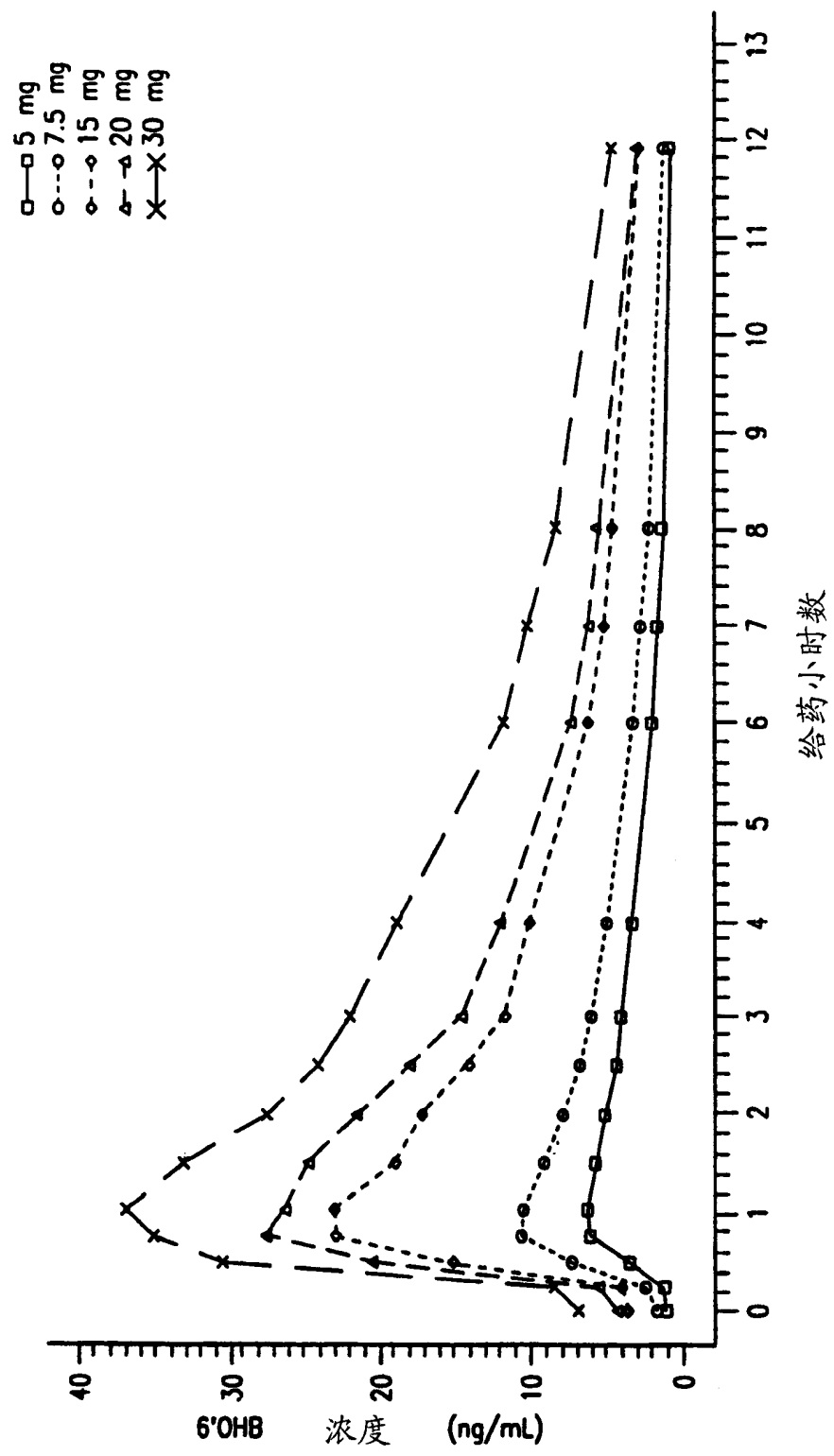


图 5

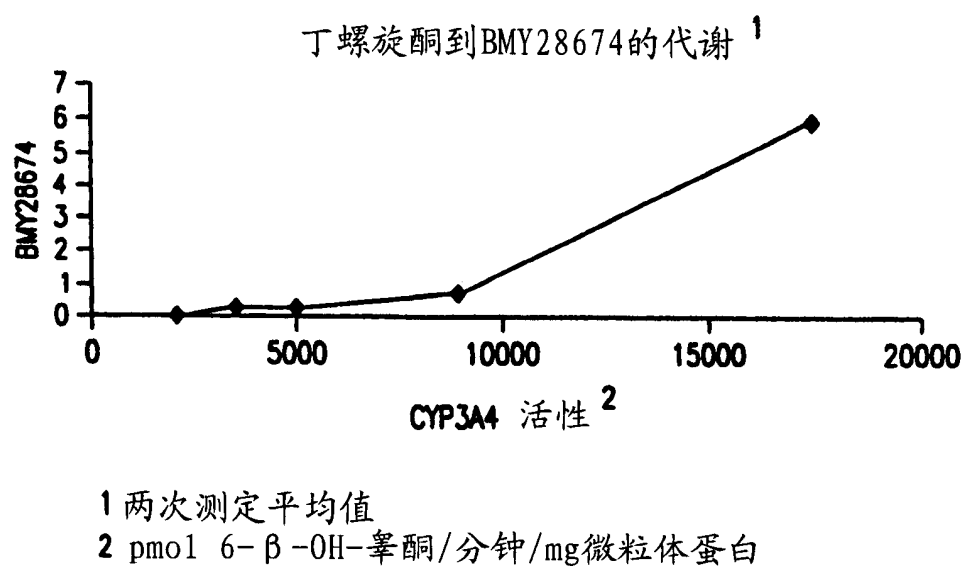


图 6