[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07D403/04
A61K 31/415
A61P 29/00

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00819103.4

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1230433C

[22] 申请日 2000.12.15 [21] 申请号 00819103.4
[30] 优先权
[32] 1999.12.23 [33] US [31] 60/173,019
[86] 国际申请 PCT/US2000/034160 2000.12.15
[87] 国际公布 WO2001/047915 英 2001.7.5
[85] 进入国家阶段日期 2002.8.20
[71] 专利权人 艾科斯有限公司
地址 美国华盛顿州
[72] 发明人 J·J·高蒂诺
审查员 康 蕾

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 钟守期

权利要求书 5 页 说明书 44 页

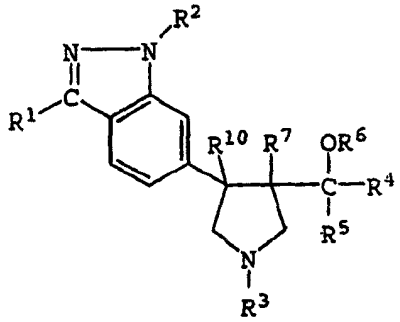
[54] 发明名称 环腺苷酸 - 特异性磷酸二酯酶抑制剂

[57] 摘要

本发明公开为 PDE4 的有效和选择性抑制剂的新的化合物以及制备它们的方法。 也同时公开所述化合物在治疗炎性疾病和其它涉及细胞因子水平升高的疾病以及中枢神经系统(CNS)疾病中的用途。

ISSN1008-4274

1. 一种具有下式的化合物:



其中，R^1为氢、C_1-C_6烷基、C_3-C_7环烷基或苯基;

R^2为氢、C_1-C_6烷基、C_3-C_7环烷基或苯基;

R^3为 C(=O)OR^7、C_1-C_6烷基或苯基 C_1-C_6烷基;

R^4为氢或 C_1-C_6烷基;

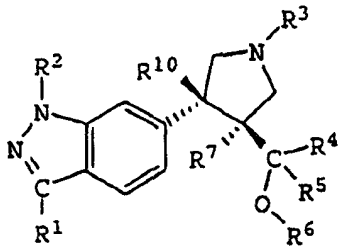
R^5为 C_1-C_6烷基;

R^6为氢或 C_1-C_6烷基;

R^7为 C_1-C_6烷基; 和

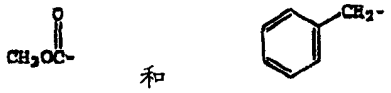
R^{10}为氢或 C_1-C_6烷基。

2. 权利要求 1 的化合物，它具有以下结构式:



其中 R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7和 R^{10}与权利要求 1 中定义一致。

3. 权利要求 1 或 2 的化合物，其中 R^3选自:



和

.

4. 权利要求 1 或 2 的化合物，其中 R^5 为甲基。

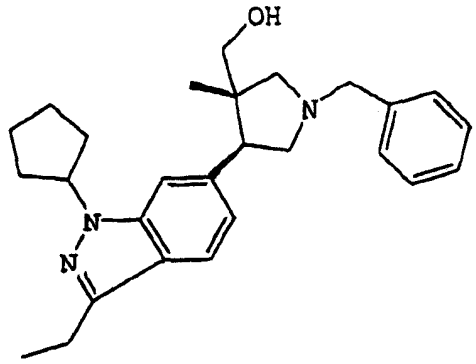
5. 权利要求 1 或 2 的化合物，其中 R^7 为甲基。

6. 权利要求 1 的化合物，它为:

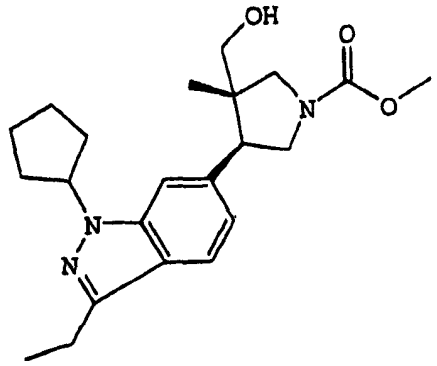
(1S)-1-[(3S,4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙-1-醇；或

(1R)-1-[(3S,4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙-1-醇;

或具有以下结构式

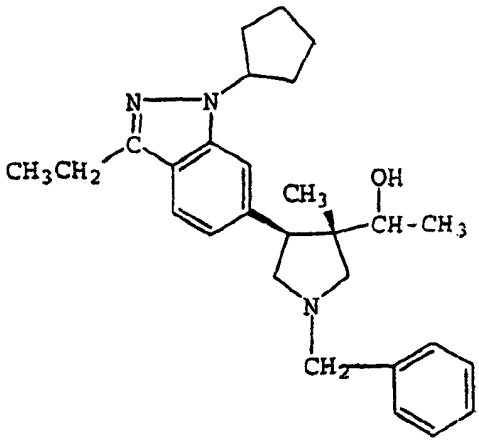


，或



。

7. 权利要求 1 的化合物，它具有以下结构式:



。

8. 一种用于治疗患有其中抑制环腺苷酸特异性磷酸二酯酶具有治疗益处的疾病的药用组合物，其含有权利要求 1 的化合物和药学上可接受的载体。

9. 权利要求1的化合物在制备用于治疗患有其中抑制环腺苷酸特异性磷酸二酯酶具有治疗益处的疾病的哺乳动物的药物的用途。

10. 权利要求 9 的用途，其为在制备用于调节哺乳动物体内环腺苷酸水平的药物的用途。

11. 权利要求 8 的药用组合物在制备用于治疗患有其中抑制环腺苷酸特异性磷酸二酯酶具有治疗益处的疾病的哺乳动物的药物的用途。

12. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为变应性疾病、自身免疫性疾病或炎性疾病。

13. 权利要求 12 的用途，其中所述炎性疾病为关节炎性疾病或皮炎。

14. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为类风湿性关节炎、骨关节炎、痛风性关节炎或脊椎炎。

15. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为与甲状腺有关的眼病、贝赫切特病、脓毒病、败血症性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒病、革兰氏阳性脓毒病、中毒性休克综合症、过敏性结膜炎、春季结膜炎或朗格斯细胞肉芽肿病。

16. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为哮喘、慢性支气管炎、变应性鼻炎、成人呼吸窘迫综合症、慢性肺炎、硅肺或肺结节病。

17. 权利要求 16 的用途，其中所述慢性肺炎为慢性阻塞性肺炎。

18. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为脑或脊髓的创伤性损伤或心肌、脑或肢端再灌注损伤。

19. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为纤维变性、瘢痕疙瘩形成或疤痕形成。

20. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为系统性红斑狼疮或移植排斥反应。

21. 权利要求 20 的用途，其中所述移植排斥反应为移植物抗宿主反应或同种移植排斥反应。

22. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为慢性肾小球性肾炎或炎性肠疾病。

23. 权利要求 22 的用途，其中所述炎性肠疾病为局限性回肠炎或溃疡性结肠炎。

24. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为增生性淋巴细胞疾病。

25. 权利要求 24 的用途，其中所述增生性淋巴细胞疾病为白血病。

26. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为炎性皮肤病。

27. 权利要求 26 的用途，其中所述炎性皮肤病为特应性皮炎或牛皮癣或荨麻疹。

28. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病为心肌病、动脉粥样硬化、发热、恶病质、感染或恶性肿瘤继发的恶病质、获得性免疫缺陷综合症继发的恶病质、获得性免疫缺陷综合症相关复症、脑型疟、骨质疏松、骨吸收疾病、由于感染引起的发烧和肌痛、尿崩症、中枢神经系统疾病、脑局部缺血、迟发性运动障碍、帕金森氏病和经前期综合症。

29. 权利要求 28 的用途，其中所述心肌病为充血性心力衰竭。

30. 权利要求 28 的用途，其中所述中枢神经系统疾病为抑郁症、

多梗死性痴呆、焦虑症或应激反应。

31. 权利要求 11 的用途，其中所述哺乳动物显示最低的催吐反应。

32. 权利要求 11 的用途，其中所述哺乳动物没有催吐反应。

33. 权利要求 11 的用途，其中所述哺乳动物没有不利的中枢神经系统副作用。

34. 权利要求 9 的用途，其为在制备用于降低哺乳动物体内肿瘤坏死因子α水平的药物的用途。

35. 权利要求 9 的用途，其为在制备用于抑制哺乳动物体内炎性细胞激活的药物的用途。

36. 权利要求 9 的用途，其为在制备用于抑制哺乳动物体内磷酸二酯酶-4 功能的药物的用途。

环腺苷酸-特异性磷酸二酯酶抑制剂

相关申请的相互参考

本申请要求 1999 年 12 月 23 日递交的美国临时申请顺序号 60/173,019 的优先权益。

本发明的领域

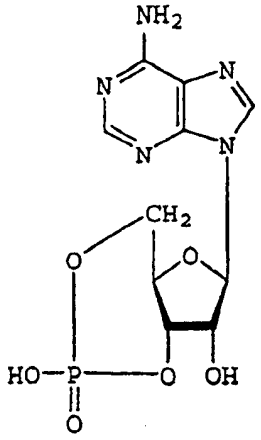
本发明涉及一系列为有效和选择性的环腺苷酸特异性磷酸二酯酶(cAMP 特异性 PDE)抑制剂的化合物。本发明尤其涉及一系列用于抑制 cAMP 特异性 PDE 功能，尤其是 PDE4 功能的新的吲唑化合物以及制备它们的方法、含有它们的药用组合物和它们作为例如治疗炎性疾病和其它涉及细胞因子和促炎介质水平升高的疾病的治疗药的用途。

本发明背景

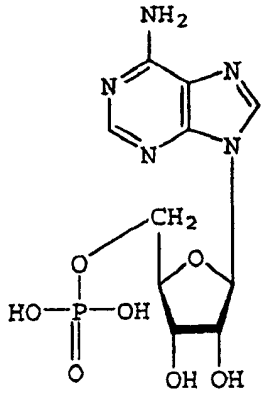
慢性炎症为一种多因素并发症，其特征为激活多种类型的炎性细胞，尤其是淋巴系细胞(包括 T 淋巴细胞)和骨髓系细胞(包括有粒白细胞、巨噬细胞和单核细胞)。包括细胞因子例如肿瘤坏死因子(TNF)和白介素-1 (IL-1)的促炎介质由这些激活的细胞产生。因此，抑制这些细胞的激活或抑制它们产生促炎细胞因子的药物将用于治疗性治疗炎性疾病和其它涉及细胞因子水平升高的疾病。

环腺苷酸(cAMP)为一种介导细胞对于广泛的胞外刺激的生物应答的第二信使。当合适的激动剂与特异性细胞表面受体结合时，激活腺苷酸环化酶，使腺苷三磷酸(ATP)转化为 cAMP。理论上在细胞内诱导 cAMP 作用的所述激动剂主要由 cAMP-依赖性蛋白激酶的作用介导。cAMP 的细胞内作用因为 cAMP 转运到细胞外或由环核苷

酸磷酸二酯酶(PDEs)的酶促裂解作用而中止，PDEs 水解 3'-磷酸二酯键以形成 5'-腺苷酸(5'-AMP)。5'-AMP 为一种失活的代谢物。以下图示说明 cAMP 和 5'-AMP 的结构。



cAMP



5'-AMP

在人骨髓系细胞和淋巴系细胞中 cAMP 水平的升高与抑制细胞激活有关。因此，细胞内 PDEs 酶家族调节细胞内 cAMP 的水平。PDE4 为这些细胞中的主要的 PDE 同种型并且主要影响 cAMP 降解。因此，抑制 PDE 的功能将防止 cAMP 转化为失活的代谢物 5'-AMP，从而维持较高的 cAMP 水平，因而抑制细胞激活(参见 Beavo 等，"Cyclic

Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action”，Wiley and Sons, Chichester，第 3-14 页(1990))；Torphy 等，Drug News and Perspectives, 6，第 203-214 页(1993)；Giembycz 等，Clin. Exp. Allergy, 22，第 337-344 页(1992))。

具体地说，已证明 PDE4 抑制剂例如咯利普兰抑制 TNFα的产生并且部分抑制单核细胞释放 IL-1β (参见 Semmler 等，Int. J. Immunopharmacol., 15，第 409-413 页(1993)；Molnar-Kimber 等，Mediators of Inflammation, 1，第 411-417 页(1992))。还证明了 PDE4 抑制剂抑制由人多形核白细胞产生超氧化物自由基(参见 Verghese 等，J. Mol. Cell. Cardiol., 21 (增补 2), S61 (1989); Nielson 等，J. Allergy Immunol., 86，第 801-808 页(1990))；抑制血管活性胺和前列腺素类由人嗜碱性粒细胞的释放(参见 Peachell 等，J. Immunol., 148，第 2503-2510 页(1992))；抑制嗜酸性白细胞的呼吸爆发(参见 Dent 等，J. Pharmacol., 103，第 1339-1346 页(1991))；以及抑制人 T-淋巴细胞的激活(参见 Robicsek 等，Biochem. Pharmacol., 42，第 869-877 页(1991))。

炎性细胞的激活和过量的或非调节性细胞因子(例如 TNFα和 IL-1β)的产生与以下变应性、自身免疫和炎性疾病有关：如类风湿性关节炎、骨关节炎、痛风性关节炎、脊椎炎、与甲状腺有关的眼病、贝赫切特病、脓毒病、败血症性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒病、革兰氏阳性脓毒病、中毒性休克综合征、哮喘、慢性支气管炎、成人呼吸窘迫综合征、慢性肺炎例如慢性阻塞性肺炎、硅肺、肺结节病、心肌、脑和肢端再灌注损伤、纤维变性、胰囊性纤维变性、瘢痕疙瘩形成、疤痕形成、动脉粥样硬化、移植排斥反应例如移植物抗宿主的反应和同种移植排斥反应、慢性肾小球性肾炎、红斑狼疮、炎性肠疾病例如局限性回肠炎和溃疡性结肠炎、增生性淋巴细胞疾病例如白血病以及炎性皮肤疾病例如特应性皮炎、牛皮癣和荨麻疹。

特征在于细胞因子水平升高的其它疾病包括由于中度的外伤引起的脑损伤(参见 Dhillon 等，J. Neurotrauma, 12, 第 1035-1043 页(1995)；Suttorp 等，J. Clin. Invest., 91, 第 1421-1428 页(1993))、心肌病例如充血性心力衰竭(参见 Bristow 等，Circulation, 97,第 1340-1341 页(1998))、恶病质、感染或恶性肿瘤继发的恶病质、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)继发恶病质、ARC (AIDS 相关复症)继发的恶病质、由于感染引起的发烧和肌痛、脑型疟、骨质疏松和骨吸收疾病、瘢痕疙瘩形成、疤痕组织形成和发热。

尤其是，已经证实 TNFα对于人获得性免疫缺陷综合征(AIDS)具有作用。AIDS 是由于 T-淋巴细胞感染人免疫缺陷病毒(HIV)引起的。尽管 HIV 也感染并存在于骨髓系细胞中，已经证实 TNF 上调 T-淋巴细胞和单核细胞中的 HIV 感染(参见 Poli 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 第 782-785 页(1990))。

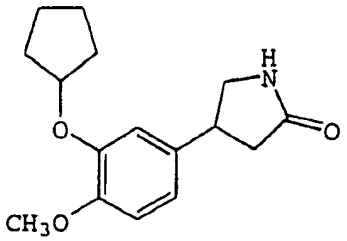
TNFα的几种性质例如刺激胶原酶、刺激体内血管生成、刺激骨吸收和能够增加肿瘤细胞与内皮的附着的性质与 TNF 对肿瘤在宿主体内形成和转移扩散的作用是一致的。最近，已显示 TNFα直接参与促进肿瘤细胞的生长和转移(参见 Orosz 等，J. Exp. Med., 177, 第 1391-1398 (1993))。

PDE4 具有广泛的组织分布。对于 PDE4 具有至少 4 种基因，来自任一给定基因的 PDE4 的多种转录物能够产生共有相同催化位点的几种不同的蛋白。在 4 种可能的催化位点之间氨基酸的同一性大于 85%。它们对抑制剂的同样敏感性和它们的动力学相似性反映了这个水平的氨基酸的同一性的功能方面作用。推测这些可变表达的 PDE4 蛋白的作用在于细胞通过这种作用可以区别性细胞内定位这些酶和/或通过翻译后修饰调节催化效率。表达 PDE4 酶的任一给定的细胞类型通常表达编码这些蛋白的 4 种可能的基因中的至少一种。

研究者已经表现出对使用 PDE4 抑制剂作为抗炎药物的极大兴趣。早期的证据显示，抑制 PDE4 对于各种炎性细胞例如单核细胞、

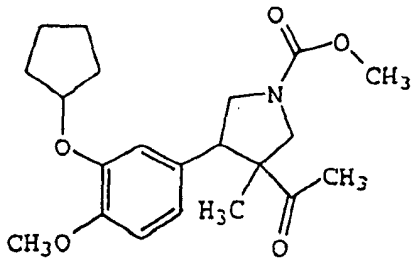
巨噬细胞、所述 Th-1 系的 T-细胞和有粒白细胞具有有益的作用。许多促炎介质例如细胞因子、脂质介质、超氧化物和生物胺例如组胺的合成和/或释放通过 PDE4 抑制剂的作用在这些细胞中已经减弱。PDE4 抑制剂也影响其它细胞功能包括 T-细胞增殖、有粒白细胞化学毒性物质作用下的移行和微管结构内内皮细胞连接的完整性。

已经报告了各种 PDE4 抑制剂的设计、合成和筛选。甲基黄嘌呤例如咖啡因、茶碱是最初被发现的 PDE 抑制剂，但是，这些化合物对于被抑制的 PDE 是非特异性的。药物咯利普兰(抗抑郁药)是最初报道的特异性 PDE4 抑制剂之一。已经报道，具有以下结构式的咯利普兰抑制重组人 PDE4 的 50%抑制浓度(IC_{50})约 200 nM (纳摩尔)。



咯利普兰

研究者一直在继续寻找 PDE4 抑制剂，它们对于抑制 PDE4 更有效，它们具有比咯利普兰更低的 IC_{50} 值，它们避免了与给予咯利普兰有关的不需要中枢神经系统(CNS)的副作用例如干呕、呕吐和镇静作用。在 Feldman 等的美国专利号 5,665,754 中公开了一类化合物。其中所公开的化合物为具有与咯利普兰结构类似的取代的吡咯烷。一种具有结构式(I)的具体的化合物具有对于人重组 PDE4 的 IC_{50} 为约 2nM。由于观察到可有利地将催吐副作用与效果分开，这些化合物没有显示降低不需要的中枢神经系统作用。



(I)

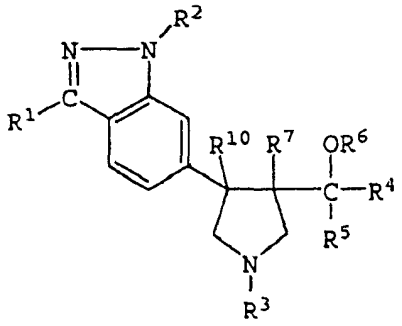
此外，有几家公司正在进行其它 PDE4 抑制剂的临床试验。然而，涉及效果和不利的副作用例如呕吐和中枢神经系统紊乱的问题仍未解决。

因此，选择性抑制 PDE4 并降低或消除与在先的 PDE4 抑制剂有关的不利的中枢神经系统副作用的化合物将用于治疗变应性和炎性疾病以及其它与细胞因子例如 TNF 过度或非调节性产生有关的疾病。此外，选择性 PDE4 抑制剂将用于治疗与在具体靶组织中 cAMP 水平升高或 PDE4 功能增强有关的疾病。

本发明概述

本发明涉及用于治疗其中抑制 PDE4 活性是非常有益的疾病和病症的有效和选择性的 PDE4 抑制剂。本发明的 PDE4 抑制剂出人意料地降低或消除与在先的 PDE4 抑制剂有关的不利的中枢神经系统副作用。

本发明尤其涉及具有结构式(II)的化合物：



(II)

其中，R^1为氢、低级烷基、桥连的烷基(例如降冰片基)、芳基(例如苯基)、杂芳基、环烷基、5-或6-元饱和杂环基(例如3-四氢呋喃基)、C_{1-3}亚烷基环烷基(例如环戊基甲基)、芳基-或杂芳基-取代的炔丙基(例如-$CH_2C\equiv C-C_6H_5$)、芳基-或杂芳基-取代的烯丙基(例如-$CH_2CH=CH-C_6H_5$)或卤代环烷基(例如氟代环戊基);

R^2为氢、低级烷基、桥连的烷基、环烷基、卤代烷基、卤代环烷基、C_{13}亚烷基环烷基、5-或6-元饱和杂环基、芳基、杂芳基、芳基烷基、烷基芳基、杂芳基烷基或杂烷基芳基;

R^3为C(=O)OR^7、C(=O)R^7、C(=NH)NR^8R^9、C(=O)-NR^8R^9、低级烷基、桥连的烷基、环烷基、卤代烷基、卤代环烷基、C_{1-3}亚烷基环烷基、5-或6-元饱和杂环基、芳基、杂芳基、杂芳基SO_2、芳基烷基、烷基芳基、杂芳基烷基、杂烷基芳基、C_{1-3}亚烷基C(=O)OR^7、C(=O)C_{1-3}亚烷基-C(=O)OR^7、C_{1-3}亚烷基杂芳基、C(=O)C(=O)OR^7、C(=O)C_{1-3}亚烷基C(=O)OR^7、C(=O)C_{1-3}亚烷基NH(C=O)OR^7、C(=O)C_{1-3}亚烷基NH_2或NHC(=O)OR^7;

R^4为氢、低级烷基、卤代烷基、环烷基或芳基;

R^5为氢、低级烷基、炔基、卤代烷基、环烷基或芳基;

R^6为氢、低级烷基或C(=O)R^7;

R^7为支链或直链的低级烷基或芳基，其中任何一个任选被一个或更多个OR^8、NR^8R^9或SR^8取代;

R^8和R^9相同或不同，选自氢、低级烷基、环烷基、芳基、杂芳基、烷芳基、杂芳烷基、杂烷芳基和芳烷基，或者R^8和R^9一起形成4-元-7-元环;

R^{10}为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、芳基、C(=O)烷基、C(=O)环烷基、C(=O)芳基、C(=O)O烷基、C(=O)O环烷基、C(=O)芳基、CH_2OH、CH_2O烷基、CHO、CN、NO_2或SO_2R^{11}; 和

R^{11}为烷基、环烷基、三氟甲基、芳基、芳烷基或NR^8R^9。

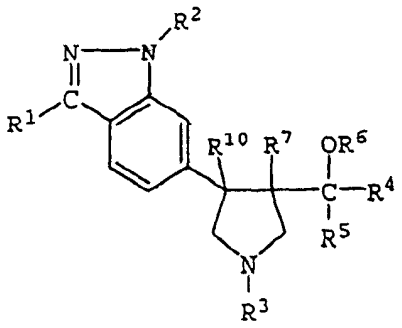
本发明也涉及含有一种或更多种结构式(II)的化合物的药用组合

物，涉及所述化合物和含有所述化合物的组合物在治疗疾病中的用途以及涉及制备化合物和在参与合成结构式(II)的化合物的中间体的方法。

本发明也涉及通过给予哺乳动物治疗有效量的结构式(II)的化合物或含有结构式(II)的化合物的组合物，治疗所述哺乳动物的疾病的方法，其中所述哺乳动物患有的疾病如果抑制 PDE4，可有益地调节哺乳动物体内 cAMP 水平、降低哺乳动物体内的 TNFα水平、抑制哺乳动物体内炎性细胞的激活和抑制哺乳动物体内的 PDE4 功能。

优选实施方案的详述

本发明涉及具有结构式(II)的化合物：



(II)

其中，R^1 为氢、低级烷基、桥连的烷基(例如降冰片基)、芳基(例如苯基)、环烷基、5-或 6-元饱和杂环基(例如 3-四氢呋喃基)、C_{1-3} 亚烷基环烷基(例如环戊基甲基)、芳基-或杂芳基-取代的炔丙基(例如-$CH_2C{\equiv}C\text{-}C_6H_5$)、芳基-或杂芳基-取代的烯丙基(例如-$CH_2CH{=}CH\text{-}C_6H_5$)或卤代环烷基(例如氟代环戊基)；

R^2 为氢、低级烷基、桥连的烷基、环烷基、卤代烷基、卤代环烷基、C_{1-3} 亚烷基环烷基、5-或 6-元饱和杂环基、芳基、杂芳基、芳基烷基、烷基芳基、杂芳基烷基或杂烷基芳基；

R^3 为 $C(=O)OR^7$、$C(=O)R^7$、$C(=NH)NR^8R^9$、$C(=O)\text{-}NR^8R^9$、低

级烷基、桥连的烷基、环烷基、卤代烷基、卤代环烷基、C_{1-3}亚烷基环烷基、5-或6-元饱和杂环基、芳基、杂芳基、杂芳基SO_2、芳基烷基、烷基芳基、杂芳基烷基、杂烷基芳基、C_{1-3}亚烷基$C(=O)OR^7$、$C(=O)C_{1-3}$亚烷基-$C(=O)OR^7$、C_{1-3}亚烷基杂芳基、$C(=O)C(=O)OR^7$、$C(=O)C_{1-3}$亚烷基$C(=O)OR^7$、$C(=O)C_{1-3}$亚烷基$NH(C=O)OR^7$、$C(=O)C_{1-3}$亚烷基NH_2或$NHC(=O)OR^7$;

R^4为氢、低级烷基、卤代烷基、环烷基或芳基;

R^5为氢、低级烷基、炔基、卤代烷基、环烷基或芳基;

R^6为氢、低级烷基或$C(=O)R^7$;

R^7为支链或直链的低级烷基或芳基，其中任何一个任选被一个或更多个OR^8、NR^8R^9或SR^8取代; 和

R^8和R^9相同或不同，选自氢、低级烷基、环烷基、芳基、杂芳基、烷芳基、杂芳烷基、杂烷芳基和芳烷基，或者R^8和R^9一起形成4-元-7-元环;

R^{10}为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、芳基、C(=O)烷基、C(=O)环烷基、C(=O)芳基、C(=O)O烷基、C(=O)O环烷基、C(=O)芳基、CH_2OH、CH_2O烷基、CHO、CN、NO_2或SO_2R^{11}; 和

R^{11}为烷基、环烷基、三氟甲基、芳基、芳烷基或NR^8R^9。

如在此所使用的，术语“烷基”，单独或者结合，定义为包括直链和支链、以及桥连的、含1-16个碳原子的饱和烃基。术语“低级烷基”此处定义为具有1-6个碳原子的烷基(C_1-C_6)。低级烷基的实例包括，但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、异丁基、正丁基、新戊基、正己基等。术语“炔基”指含有碳-碳三键的不饱和烷基。

术语“桥连的烷基”此处定义为C_6-C_{16}的双环或多环烃基，例如降冰片基、金刚烷基、双环[2.2.2]辛基、双环[2.2.1]庚基、双环[3.2.1]辛基或十氢萘基。

术语“环烷基”此处定义为包括环C_3-C_7烃基。环烷基的实例包括，但不限于环丙基、环丁基、环己基和环戊基。

术语“亚烷基”指具有取代基的烷基。例如术语“C_{1-3}亚烷基环烷基”指含有 1-3 个碳原子并被环烷基取代的烷基。

术语“卤代烷基”此处定义为被一个或更多个卤代取代基例如氟代基、氯代基、溴代基、碘代基或者其组合取代的烷基。类似地，“卤代环烷基”定义为具有一个或更多个卤代取代基的环烷基。

术语“芳基”，单独或结合，此处定义为单环或多环的芳族基团，优选单环或双环的芳族基团，例如苯基或萘基，所述芳基可以为未取代的或者例如被一个或更多个，尤其一个或三个选自以下的取代基取代：卤代基、烷基、羟基、羟基烷基、烷氧基、烷氧基烷基、卤代烷基、硝基、氨基、烷基氨基、酰基氨基、烷硫基、烷基亚磺酰基和烷基磺酰基。实例性的芳基包括苯基、萘基、四氢萘基、2-氯代苯基、3-氯代苯基、4-氯代苯基、2-甲基苯基、4-甲氧基苯基、3-三氟甲基苯基、4-硝基苯基等。

术语“杂芳基”此处定义为含有一个或者两个芳族环并且在芳环上含有至少一个氮、氧或硫原子的单环或双环系，该环系可以为未取代的或者例如被一个或更多个，尤其 1-3 个如下的取代基取代：卤代基、烷基、羟基、羟基烷基、烷氧基、烷氧基烷基、卤代烷基、硝基、氨基、烷基氨基、酰基氨基、烷硫基、烷基亚磺酰基和烷基磺酰基。杂芳基的实例包括噻吩基、呋喃基、吡啶基、噁唑基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、三唑基、异噻唑基、异噁唑基、咪唑基、苯并噻唑基、吡嗪基、嘧啶基、噻唑基和噻二唑基。

术语“芳基烷基”此处定义为在先定义的烷基，其中所述烷基的氢原子之一被如此处定义的芳基取代，所述芳基例如为任选具有一个或更多个取代基例如卤代基、烷基、烷氧基等的苯基。芳基烷基的实例是苄基。

术语“烷基芳基”此处定义为在先定义的芳基，其中所述芳基的氢原子之一被烷基、环烷基、卤代烷基或卤代环烷基置换。

术语“杂芳基烷基”和“杂烷基芳基”类似如术语“芳基烷基”

和“烷基芳基”所定义，然而，所述芳基被如在先定义的杂芳基置换。

术语“杂环基”定义为具有一个或更多个存在于环中的选自氧、氮和硫原子的杂原子的5-或6-元非芳族环。非限制性的实例包括四氢呋喃、哌啶、哌嗪、环丁砜、吗啉、四氢吡喃、二氧六环等。

术语“卤素”或“卤代基”此处定义为包括氟、氯、溴和碘。

术语“烷氧基”、“芳基氧基”和“芳基烷氧基”分别定义为-OR，其中R为烷基、芳基和芳基烷基。

术语“烷氧基烷基”定义为连接烷基的烷氧基。术语“芳基氧基烷基”和“芳基烷氧基烷基”类似地定义为连接烷基的芳基氧基或芳基烷氧基。

术语“羟基”定义为-OH。

术语“羟基烷基”定义为连接烷基的羟基。

术语“氨基”定义为$-NH_2$。

术语“烷基氨基”定义为$-NR_2$，其中至少一个R为烷基，第二个R为烷基或氢。

术语“酰基氨基”定义为RC(=O)N，其中R为烷基或芳基。

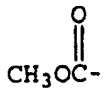
术语“硝基”定义为$-NO_2$。

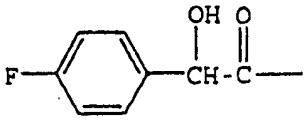
术语“烷硫基”定义为-SR，其中R为烷基。

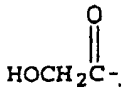
术语“烷基亚磺酰基”定义为$R-SO_2$，其中R为烷基。

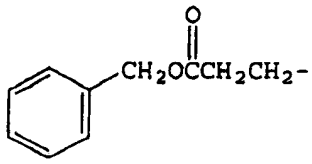
术语“烷基磺酰基”定义为$R-SO_3$，其中R为烷基。

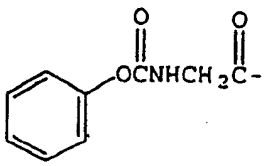
在优选的实施方案中，R^5为氢或甲基；R^7为甲基；R^2为烷基、环烷基、芳基或杂芳基；R^4选自氢、甲基、三氟甲基和环丙基；R^6选自氢、乙酰基和苯甲酰基；R^1选自氢、烷基、环烷基、C_{1-3}亚烷基环烷基、卤代环烷基、芳基和杂芳基；R^3选自$C(=O)OR^7$、芳基烷基、烷基芳基、杂芳基烷基、杂烷基芳基、低级烷基、环烷基、杂环基和芳基，尤其选自：

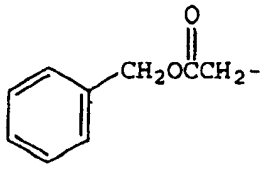


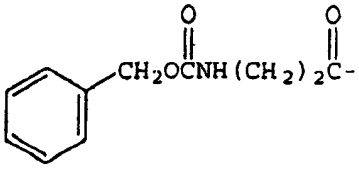


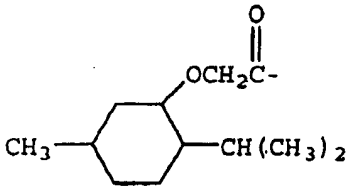


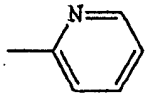


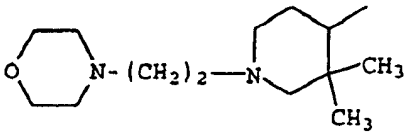


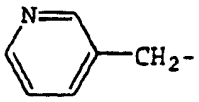


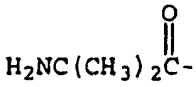


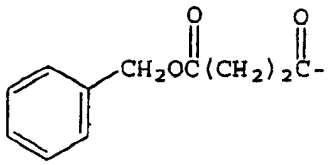


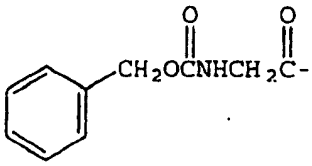


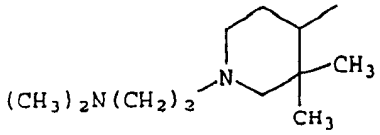


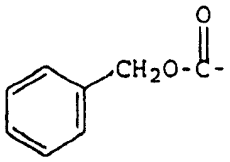


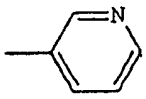


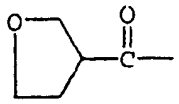


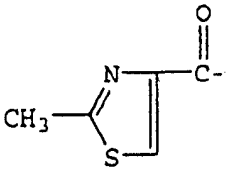


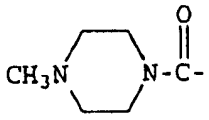


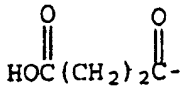


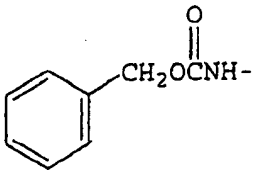


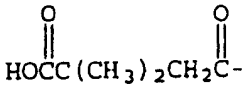




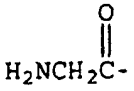


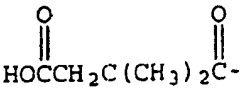


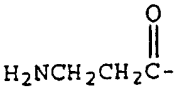




或



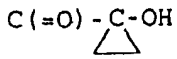




。

在最优选的实施方案中，R^1选自环戊基、四氢呋喃基、茚满基、降冰片基、苯乙基和苯基丁基；R^2选自氢、乙基、甲基和二氟甲基；R^3选自苄基、CO_2CH_3、$C(=O)CH_2OH$、$C(=O)CH(CH_3)OH$、

$C(=O)C(CH_3)_2OH$ 和



；

R^4 为氢；R^5 为氢或甲基；R^6 为氢；R^7 为甲基；和 R^{10} 为氢。

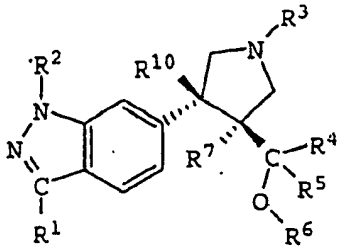
本发明包括结构式(II)化合物的所有可能的立体异构体和几何异构体，并且不仅包括外消旋化合物而且也包括光学活性异构体。当需要结构式(II)化合物的单一的对映体时，通过拆分终产物或者通过由异构体纯的原料或者使用手性辅助剂(例如参见 Z. Ma 等，Tetrahedron: Asymmetry, 8(6), 第 883-888 页(1997))立体有择合成可以得到该单一的对映体。终产物、中间体或者原料的拆分可以通过本领域已知的任何合适的方法完成。此外，在其中结构式(II)化合物的互变异构体可能存在的情况下，本发明意欲包括所述化合物的所有互变异构形式。如此后所证明的，特定的立体异构体显示抑制 PDE4 的优越的能力，并且不显示通常与 PDE4 抑制剂有关的不利的中枢神经系统副作用。

尤其是，普遍接受生物系统可以显示对于化合物的绝对立体化学性质非常敏感的活性的观点(参见 E. J. Ariens, Medicinal Research Reviews, 6:451-466 (1986); E. J. Ariens, Medicinal Research Reviews, 7:367-387 (1987); K.W. Fowler, Handbook of Stereoisomers: Therapeutic Drugs, CRC Press, Donald P. Smith 编辑，第 35-63 页(1989); 和 S. C. Stinson, Chemical and Engineering News, 75:38-70 (1997))。

例如，咯利普兰为含有一个手性中心的立体特异性 PDE4 抑制剂。咯利普兰的(-)-对映体比其(+)-对映体在涉及其潜在的抗抑郁作用方面具有更高的药理学效能(Schultz 等，Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 333:23-30 (1986))。此外，咯利普兰的代谢作用似乎是立体特异性的，(+)-对映体显示比(-)-对映体更快的清除率(Krause 等，

Xenobiotica, 18:561-571 (1988))。最后，最新的观察显示咯利普兰的(-)-对映体(R-咯利普兰)比其(+)-对映体(S-咯利普兰)的催吐作用强大约十倍(A. Robichaud 等，Neuropharmacology, 38:289-297 (1999))。这个观察结果不容易与试验动物对咯利普兰异构体的反应和咯利普兰抑制 PDE4 酶的能力方面的差异一致。本发明化合物可以具有三个手性中心。特定立体化学取向的化合物能够显示类似的 PDE4 抑制活性和药理学活性，但是改变中枢神经系统毒性和催吐的潜能。

因此，本发明的优选的化合物具有结构式(III):



(III)

结构式(III)的化合物为有效和选择性的 PDE4 抑制剂并且不显示由结构式(III)的化合物的立体异构体所显示的不利的中枢神经系统作用和催吐潜能。

含有酸性基团的结构式(II)化合物可以与合适的阳离子形成药学上可接受的盐。合适的药学上可接受的阳离子包括碱金属(例如钠或钾)和碱土金属(例如钙或镁)阳离子。含有碱性中心的结构式(II)化合物的药学上可接受的盐为与药学上可接受的酸形成的酸加成盐。实例为盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐或硫酸氢盐、磷酸盐或磷酸氢盐、乙酸盐、苯甲酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、马来酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、葡糖酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐。根据前文所述，任何本文中提到的本发明化合物意欲包括结构式(II)化合物以及其药学上可接受的盐和溶剂合物。

本发明的化合物可以作为纯的化学品在治疗上给药，但是优选

作为药用组合物或制剂给予结构式(II)化合物。因此，本发明还提供含有结构式(II)化合物或其药学上可接受的盐以及一种或更多种药学上可接受的载体并任选其它治疗和/或预防成分的药用制剂。所述载体在与所述制剂中的其它成分相容并且不损害其接受者的意义上为“可接受的”。

尤其是，本发明的选择性 PDE4 抑制剂单独或与第二种抗炎治疗药联合使用，例如所述第二种抗炎治疗药为治疗类风湿性关节炎的靶向 TNFα的治疗药如 ENBREL®或 REMICADE®。同样，IL-1 的拮抗作用的治疗用途在类风湿性关节炎的动物模型中也已经得到证明。因此，想象 IL-1 的拮抗作用与减弱 TNFα的 PDE4 抑制作用结合将是有效的。

本发明的 PDE4 抑制剂用于治疗各种变应性、自身免疫和炎性疾病。

术语“治疗”包括预防、降低、阻止或逆转所治疗疾病或症状严重的进程。如此，术语“治疗”包括适当地医学治疗和/或预防给药。

炎症尤其是一种局部、保护性反应，它是由组织的损伤或破坏引起的，它可以破坏、稀释或隔绝(即隔离)损伤因子和受损的组织。如此处所用的术语“炎性疾病”，指任何其中过量或非调节性炎性反应导致过量的炎性症状、宿主组织损伤或丧失组织功能的疾病。此外，如此处所用的术语“自身免疫疾病”指任何种类的其中组织损伤与对于身体自身成分的体液或细胞调节反应有关的疾病。如此处所用的术语“变应性疾病”指由变态反应产生的任何症状、组织损伤或组织功能丧失。如此处所用的术语“关节疾病”指特征在于各种病因引起的关节炎性损伤的一大类疾病。如此处所用的术语“皮炎”指特征在于各种病因引起的皮肤炎症的一大类皮肤疾病。如此处所用的术语“移植排斥”指特征在于移植的组织和周围的组织功能丧失、疼痛、肿胀、白细胞增多和血小板减少的直接针对移植组

织(包括器官和细胞(例如骨髓))的任何免疫反应。

本发明也提供调节哺乳动物体内 cAMP 水平的方法以及治疗特征为细胞因子水平升高的疾病的方法。

如此处所用的术语“细胞因子”指任何分泌的多肽，该多肽影响其它细胞的功能并调节所述免疫或炎性反应中细胞之间的相互作用。细胞因子包括，但不限于单核因子、淋巴因子和趋化因子而不管是那些细胞产生它们。例如，单核因子通常指由单核细胞产生和分泌的，然而，许多其它细胞产生单核因子例如天然杀伤细胞、成纤维细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、内皮细胞、脑星形胶质细胞、骨髓基质细胞、表皮角质细胞和 B-淋巴细胞。淋巴因子通常指由淋巴细胞产生的因子。细胞因子的实例包括，但不限于白介素-1 (IL-1)、白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子α (TNFα)和肿瘤坏死因子β (TNFβ)。

本发明还提供降低哺乳动物体内 TNF 水平的方法，该方法包括给予所述哺乳动物有效量的结构式(II)的化合物。如此处所用的术语“降低 TNF 水平”指以下情况之一:

a) 通过抑制所有细胞包括，但不限于单核细胞或巨噬细胞体内释放 TNF，降低哺乳动物体内过量的 TNF 水平到正常水平或者低于正常水平；或

b) 在翻译或转录水平诱导哺乳动物体内过量 TNF 水平下调到正常水平或者低于正常水平；或

c) 通过抑制作为翻译后事件的直接合成 TNF 诱导下调。

此外，本发明化合物用于抑制炎性细胞激活。如此处所用的术语“炎性细胞激活”指由刺激(包括，但不限于细胞因子、抗原或自身抗体)诱导的增殖性细胞反应，产生可溶性的介质(包括，但不限于细胞因子、氧自由基、酶、前列腺素类或血管活性胺)或者在炎性细胞(包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、有粒白细胞、多形核白细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒

细胞、树突细胞和内皮细胞)中，新的或增加数量的介质(包括，但不限于主要组织相容性抗原或细胞粘着分子)的细胞表面表达。本领域技术人员可以理解这些细胞的这类表型中的一种或其组合的激活可引起炎症的发生、延长或恶化。

本发明化合物也用于引起气道平滑肌松弛、支气管扩张和防止支气管收缩。

因此，本发明化合物用于治疗以下疾病例如关节疾病(类风湿性关节炎)、骨关节炎、痛风性关节炎、脊椎炎、与甲状腺有关的眼病、贝赫切特病、脓毒病、败血症性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒病、革兰氏阳性脓毒病、中毒性休克综合征、哮喘、慢性支气管炎、变应性鼻炎、过敏性结膜炎、春季结膜炎、朗格斯细胞肉芽肿病、成人(急性)呼吸窘迫综合征(ARDS)、慢性肺炎(例如慢性阻塞性肺炎)、硅肺、肺结节病、心肌、脑或肢端再灌注损伤、由于轻度外伤引起的脑或脊柱损伤、包括胰囊性纤维变性的纤维变性、瘢痕疙瘩形成、疤痕组织形成、动脉粥样硬化、自身免疫疾病例如系统性红斑狼疮(SLE)和移植排斥反应(例如移植物抗宿主(GvH)的反应和同种移植排斥反应)、慢性肾小球性肾炎、炎性肠疾病例如局限性回肠炎和溃疡性结肠炎、增生性淋巴细胞疾病如白血病(例如慢性淋巴细胞白血病；CLL)(参见 Mentz 等，Blood 88，第 2172-2182 (1996))以及炎性皮肤疾病例如特应性皮炎、牛皮癣或荨麻疹。

这类疾病或有关症状的其它实例包括心肌病例如充血性心力衰竭、发热、恶病质、感染或恶性肿瘤继发的恶病质、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)继发恶病质、ARC (AIDS 相关复症)、脑型疟、骨质疏松和骨吸收疾病以及由于感染引起的发烧和肌痛。此外本发明化合物用于治疗尿崩症和中枢神经系统疾病例如抑郁症和多梗死性痴呆。

本发明化合物也具有通常称作治疗药以外的用途。例如，本发明化合物也可以用作器官移植的保存剂(参见 Pinsky 等，J. Clin. Invest.,

92, 第 2994-3002 页 (1993))。

选择性的PDE4抑制剂也可以用于治疗尿崩症(Kidney Int., 37, 第 362 页, (1990); Kidney Int., 35, 第 494 页, (1989))和中枢神经系统疾病例如多梗死性痴呆(Nicholson, Psychopharmacology, 101, 第 147 页(1990))、抑郁症(Eckman 等, Curr. Ther. Res., 43, 第 291 页(1988))、焦虑症和应激反应(Neuropharmacology, 38, 第 1831 页(1991))、脑局部缺血(Eur. J. Pharmacol., 272, 第 107 页(1995))、迟发性运动障碍(J. Clin. Pharmocol., 16, 第 304 页(1976))、帕金森氏病(参见 Neurology, 25, 第 722 页(1975); Clin. Exp. Pharmal. Physiol., 26, 第 421 页(1999))和经前综合征。对于抑郁症而言, PDE4 选择性抑制剂在各种抑郁症的动物模型例如“行为绝望”或 Porsolt 试验(Eur. J. Pharmacol., 47, 第 379 页(1978); Eur. J. Pharmacol., 57, 第 431 页(1979); Antidepressants: neurochemical, behavioral and clinical prospectives, Enna, Malick, and Richelson, eds., Raven Press, 第 121 页(1981))和“尾悬浮试验”(Psychopharmacology, 85, 第 367 页(1985))中显示有效。最新的研究成果显示通过各种抗抑郁药长期体内治疗增加 PDE4 的脑性表达(J. Neuroscience, 19, 第 610 页(1999))。因此, 选择性的 PDE4 抑制剂可以单独使用或者与第二种治疗结合使用, 四种主要的抗抑郁治疗为电惊厥方法、单胺氧化酶抑制剂和 5-羟色胺或去甲肾上腺素的选择性重摄取抑制剂。选择性的 PDE4 抑制剂也可以用于借助直接作用于支气管平滑肌细胞来调节支气管扩张活性用于治疗哮喘。

本发明的化合物和药用组合物引起哺乳动物最低的催吐反应或不引起催吐反应。

适用于本发明中的化合物和药用组合物包括其中以有效量给予哺乳动物所述活性成分以便达到其预定治疗目的的化合物和药用组合物。更准确地说, “治疗有效量”指有效防止所治疗患者已有症状发展或者缓解该症状的量。该有效量的确定完全在本领域技术人员的知识范围内(特别是参照本发明所公开的细节)。

如此处所用的术语“哺乳动物”包括雄性和雌性, 并且包括人、家养动物(例如猫、狗)、家畜(例如牛、马、猪)和野生生物(例如灵长

类、大型猫科动物、动物园动物)。

“治疗有效剂量”指达到所需的作用的所述化合物的量。这类化合物的毒性和治疗效果可以在细胞培养中或者实验动物中通过标准药学方法确定，例如确定 LD_{50} (群体的 50%致死的剂量)和 ED_{50} (群体的 50%治疗有效剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比例为治疗指数，它表示为 LD_{50} 和 ED_{50} 间的比值。优选显示高的治疗指数的化合物。由这类数据得出的资料可以用于计算用于人的剂量范围。这类化合物的剂量优选在包括几乎没有或者没有毒性的 ED_{50} 的循环浓度范围内。根据所使用的剂型和所用的给药途径，所述剂量可以在该范围内变化。

精确的处方、给药途径和剂量可以由每个医生根据患者的病情来选择。可以个别调整剂量和间隔时间以便提供足以维持治疗效果的活性部分的血药浓度。

如本领域技术人员可以理解的，此处所述的治疗可以延伸到预防以及治疗已确诊的疾病或者症状。还可以理解，所需用于治疗的本发明的化合物的量根据所治疗疾病的性质、患者的年龄和状况而变化，并且最终由主治医生或兽医决定。然而，一般来说用于成人治疗的常用剂量在每日 0.001 mg/kg 至约 100 mg/kg。所需剂量可以方便地以单一剂量给予或以合适的间隔时间，以多剂量给予，例如每日两个、三个、四个或更多个亚剂量给予。在实践当中，医生决定最适合于每个患者的实际给药方案，所述剂量根据具体患者的年龄、体重和反应而改变。以上剂量为平均情况下的实例，但可能有个别情况，其中需要较高或较低的剂量，这也在本发明的范围内。

本发明的制剂可以以用于治疗所指定疾病的标准方式给予，例如口服、非肠道、经粘膜(例如舌下或者口含给药)、局部、经皮、直肠、经吸入(例如鼻或者肺深部吸入)。非肠道给药包括，但不限于静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌内、鞘内和关节内。胃肠外给药也可以使用高压技术象 POWDERJECT™完成。

对于口含给药而言，所述组合物可以是以常规方式配制的片剂或者锭剂形式。例如，用于口服给予的片剂和胶囊可以含有常规的赋形剂例如粘合剂(例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、黄蓍胶、淀粉浆或者聚乙烯吡咯烷酮)、填充剂(例如乳糖、蔗糖、微晶纤维素、纤维素、玉米淀粉、磷酸钙或者山梨糖醇)、润滑剂(例如硬脂酸镁、硬脂酸、滑石、聚乙二醇或者二氧化硅)、崩解剂(例如马铃薯淀粉或者羟基乙酸淀粉钠)或者润湿剂(例如月桂基硫酸钠)。可以根据本领域熟知的方法将所述片剂包衣。

或者，本发明的化合物可以掺入口服液体制剂例如水性或者油性悬浮液、溶液、乳剂、糖浆或者酏剂中。而且，含有这些化合物的制剂可以作为用水或者其它合适的溶媒在使用前构成的干燥产品提供。这类液体制剂可以含有常规的添加剂例如悬浮剂，如山梨糖醇糖浆、甲基纤维素、葡萄糖/蔗糖糖浆、明胶、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶和氢化食用脂肪；乳化剂，例如卵磷脂、脱水山梨糖醇单油酸酯或者阿拉伯胶；非水性溶媒(它们可以包括食用油)，例如杏仁油、分级分离的椰子油、油性酯、丙二醇和乙醇；和防腐剂，例如对羟基苯甲酸甲酯或者丙酯和山梨酸。

这类制剂也可以配制为栓剂，例如含有常规的栓剂基质如可可脂或者其它甘油酯。用于吸入的组合物一般可以以溶液、悬浮液或者乳液的形式提供，它们可以以干粉或者以使用常规抛射剂(例如二氯二氟甲烷或者三氯氟甲烷)的气溶胶的形式给予。典型的局部和经皮制剂含有常规含水或者非水介质，例如为滴眼剂、霜剂、软膏、洗剂和糊剂或者为加药的膏药、贴剂或者膜剂的形式。

此外，本发明的组合物可以配制用于经注射或者连续输注非肠道给予。注射剂可以是在油性或者水性溶媒中的悬浮剂、溶液剂或者乳剂形式并且可以含有组方剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者，所述活性成分可以是在使用前用合适的溶媒(例如无菌、无热

源水)构成的粉末形式。

本发明的组合物也可以配制为储库型制剂。这类长效制剂可以植入给予(例如皮下或者经粘膜)或者通过肌内注射给予。因此，本发明的化合物可以与合适的聚合物或者疏水性物质(例如在可接受的油中的乳剂)、离子交换树脂一起或者作为微溶的衍生物(例如微溶的盐)配制。

对于兽医使用而言，式(II)化合物或其非毒性盐作为根据常规兽医实践的可合适接受的制剂给予。兽医可以容易地确定最适合具体动物的给药方案和给药途径。

因此，本发明另一方面提供含有式(II)化合物以及药学上可接受的稀释剂或者载体的药用组合物。本发明进一步提供制备含有式(II)化合物的药用组合物的方法，该方法包括将式(II)化合物与药学上可接受的稀释剂或者载体混合。

以下提供结构式(II)化合物的具体的、非限制性实施例，其合成根据以下给出的方法进行。

一般而言，结构式(II)的化合物可以根据以下合成方案制备。在下述方案中，本领域内可以理解，当需要时，根据合成化学的一般原理可以使用保护基团。这些保护基团在合成的最终步骤中可以在碱性、酸性或者本领域技术人员显而易见的氢解条件下除去。通过使用合适地处理和保护任何化学官能团，未在本文中专门提到的结构式(II)的化合物的合成可以通过与以下提出的方案类似的方法完成。

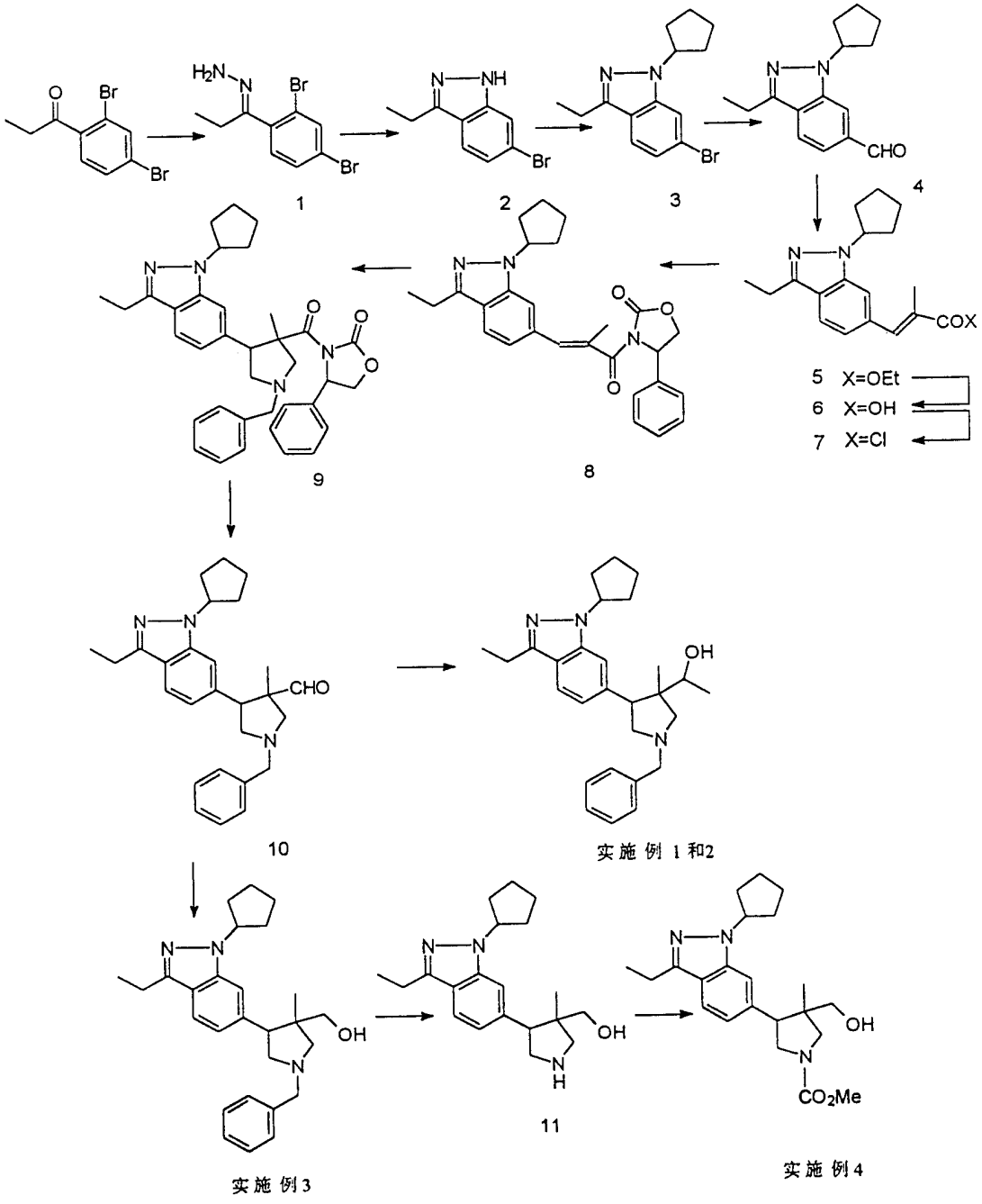
除非另外指出，所有的原料均从供应商处获得并且未经进一步纯化而使用。所有反应物和层析流分通过薄层层析，在250mm硅胶板上分析，用UV(紫外)光或者I_2(碘)染色目测观察。产物和中间体经快速层析或者反相HPLC纯化。

如以下所提出的合成方案可以制备通用结构式(II)的化合物。其它的合成途径对于本领域技术人员也是已知的。以下反应方案提供

结构式(II)化合物，其中 R^1 和 R^2 即乙基和环戊基由原料所决定。合适的选择其它原料或者进行中间体和实施例的转化反应提供具有其它所述 R^1-R^{11} 取代基的通用结构式(II)的化合物。

以下说明结构式(II)的不同中间体和化合物的合成方法。提供下列说明性的实施例，不应该视为对本发明的限制。

吲唑化合物的通用合成方法



中间体 1

1-(2,4-二溴苯基)丙-1-腙的制备

于室温、氮气氛下，将肼(18.4 ml, 58.9 mmol)加入到 1-(2,4-二溴苯基)丙-1-酮(17.2 g, 58.9 mmol) (得自 Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI)的无水乙醇(400 ml)的搅拌的溶液中。于 80℃下将生成的溶液加热过夜。将所述反应物冷却到室温，然后减压浓缩。将所得的油状物溶于二氯甲烷(400ml)中，经硫酸钠干燥，过滤，然后真空浓缩得到所述腙(16.5 g, 92%)。该化合物未经进一步纯化或鉴定而使用。

中间体 2

6-溴-3-乙基-1H-吲唑的制备

氢化钠方法:

于室温、氮气氛下，将氢化钠(60%油中的分散体; 5.72g; 108mmol)加入到中间体 1 (16.5g; 54mmol)的干燥二甲基甲酰胺(350ml)的搅拌溶液中。于 79℃，将所形成的混合物加热 2.5 小时，然后冷却到室温。通过减压浓缩除去大约一半的溶剂，然后用水(800ml)稀释该反应混合物。搅拌 1 小时后，用乙酸乙酯(3x300 ml)萃取所形成的混合物，用盐水(2x200 ml)洗涤和合并的有机层，经硫酸钠干燥，过滤并且真空浓缩。将残留的油状物通过硅胶垫(plug)，用己烷/乙酸乙酯(1:1)洗脱，得到所述吲唑(12.26g, 99%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 9.98 (br s, 1H), 7.60 (d, 1H), 7.57 (d, 1H), 7.24 (dd, 1H), 2.99 (q, 2H), 1.40 (t, 3H)。

中间体 3

6-溴代-1-环戊基-3-乙基-1H-吲唑的制备

于 0℃、氮气氛下，向中间体 2 (130mg, 0.58mmol)的干燥二甲基甲酰胺(5.8ml)的搅拌溶液中加入氢化钠(60%的油分散体; 26mg;

0.64 mmol)。将该反应混合物温热至室温 30 分钟，然后用环戊基溴(68μl; 0.63mmol)处理。搅拌过夜后，将该反应混合物分配在乙酸乙酯(50ml)和水(50ml)之间，然后分离有机层，用水(4x50ml)洗涤。经硫酸镁干燥反应物，过滤，真空浓缩。薄层层析(5/95 乙酸乙酯/己烷)显示形成区域异构体的 5:1 的混合物，其中所需的、较高 R_f 的 N-1 烷基化产物为主产物。快速层析(5/95 乙酸乙酯/己烷)得到为黄色油状物的中间体 3 (133mg, 78%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 7.56 (d, 1H), 7.52 (d, 1H), 7.17 (dd, 1H), 4.83 (c, 1H), 2.95 (q, 2H), 2.28-2.07 (m, 4H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.76-1.66 (m, 2H), 1.36 (t, 3H)。

中间体 4

1-环戊基-3-乙基-1H-吲唑-6-甲醛的制备

在氮气氛下，借助于注射器中间体 3 (4.34g, 14.9mmol)的干燥四氢呋喃(80ml)的冷却(-78℃)的搅拌溶液中加入正丁基锂(7.51ml 的 1.98M 在己烷中的溶液; 14.9 mmol)。于-78℃下，将得到的深色溶液搅拌 0.5 小时，然后，借助于注射器加入二甲基甲酰胺(4.61ml, 59.6 mmol)。用 1 小时温热至 0℃后，通过加入水猝灭该反应化合物，用盐水稀释，用乙酸乙酯(3x100ml)萃取。经硫酸钠干燥，过滤并且浓缩合并的有机层，得到粗品中间体 4。经硅胶快速层析(5%乙酸乙酯的己烷溶液)纯化得到所述醛(2.55g, 71%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 10.13 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.61 (d, 1H), 5.01 (c, 1H), 3.01 (q, 2H), 2.21-2.13 (m, 4H), 2.01-1.93 (m, 2H), 1.81-1.70 (m, 2H), 1.39 (t, 3H)。

中间体 5

(2E)-3-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-2-甲基丙-2-烯酸乙酯

通过 Horner Emmons 烯化方法制备。

在氮气氛下，借助于注射器向膦酸丙酸三乙酯(364μl, 1.70mmol;

1.2 当量)的干燥四氢呋喃(14ml)的冷却(0℃)的搅拌溶液中加入六甲基二甲硅烷基氨化锂的四氢呋喃溶液(1.56ml 的 1.0M 溶液; 1.1 当量)。于 0℃下，将得到的黄色溶液搅拌 0.5 小时，然后，用 5 分钟，借助于加料漏斗滴加入中间体 4 (344mg, 1.42mmol)的干燥四氢呋喃(1.0ml)溶液。于 0℃，将所得溶液搅拌 2 小时，然后温热至室温并且搅拌过夜。然后，通过加入水(30ml)猝灭反应，用乙酸乙酯(2x20ml)萃取。经硫酸镁干燥合并的有机层，过滤并且真空浓缩。经硅胶快速层析(6:1 己烷:乙酸乙酯)纯化粗品产物得到为澄清无色液体的所述酯(418.6mg, 90%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 7.83 (s, 1H), 7.67 (d, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.13 (d, 1H), 4.91 (c, 1H), 4.29 (q, 2H), 2.99 (q, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.17-2.10 (m, 4H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.78-1.70 (m, 2H), 1.42-1.33 (m, 6H)。

中间体 6

(2E)-3-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-2-甲基丙-2-烯酸的制备

通过氢氧化锂水解方法制备。

于室温、氮气氛下，向中间体 5 (1.05g, 3.22mmol)的四氢呋喃(10ml)的搅拌的溶液中加入氢氧化锂一水合物(676mg, 16.1mmol; 5.0 当量)的水(10ml)溶液。发生稍微放热。于 65℃(油浴)加热所得到的浑浊的黄色溶液过夜。加热半小时后，该反应物变为澄清，但是如薄层层析所证明需要 1.5 小时完成反应。将所得的溶液冷却至室温，用二氯甲烷(30ml)稀释，用 1.0M 盐酸水溶液洗涤。用盐水(30ml)洗涤合并的有机层，经硫酸钠干燥，过滤，真空浓缩得到为固体的所述羧酸(890mg, 93%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 8.20 (s, 1H), 7.72 (d, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.18 (dd, 1H), 4.94 (p, 1H), 3.00 (q, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.25-2.13 (m, 4H), 2.03-1.93 (m, 2H), 1.80-1.72 (m, 2H), 1.40 (t, 3H)。

中间体 7

(2E)-3-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-2-甲基丙-2-烯酰氯的制备

通过酰氯方法的制备。

向中间体 6 (240mg, 0.804mmol)的无水二氯甲烷(6ml)的冷却(0℃)的搅拌淤浆中，用 10 分钟，在经氯化钙干燥的气氛中，借助于注射器加入草酰氯的二氯甲烷溶液(0.484ml 的 2.0M 溶液； 0.964mmol; 1.2 当量)。剧烈产生泡沫。于 0℃，将所得深色溶液搅拌 15 分钟，然后借助于注射器加入催化量的二甲基甲酰胺(17μl)。于 0℃，将该得到的溶液搅拌半小时直到发泡停止，然后，使其温热至室温，并且搅拌过夜(17 小时)。用二氯甲烷(15ml)稀释该反应物，小心地以用水(20ml)猝灭。剧烈搅拌所得到的混合物 1 小时后，分离各层，用水(20ml)和盐水(20ml)洗涤有机层，经硫酸镁干燥，过滤并且真空浓缩得到为棕色固体的酰氯(258mg, 100%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 8.22 (s, 1H), 7.80 (d, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.22 (dd, 1H), 4.99 (p, 1H), 3.00 (q, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.26-2.19 (m, 4H), 2.06-1.94 (m, 2H), 1.82-1.75 (m, 2H), 1.41 (t, 3H)。

中间体 8

3-[(2E)-3-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-2-甲基丙-2-烯酰基] (4R)-4-苯基-1,3-噁唑烷-2-酮的制备

通过噁唑烷酮酰化方法制备。

在氮气氛下，借助于注射器，将正丁基锂的己烷溶液(0.429ml 的 1.98M 溶液； 1.1 当量)加入 R-苯基噁唑烷酮(138.5mg, 0.850mmol)的无水四氢呋喃(7.7ml)的冷却(-78℃)的搅拌的溶液中。于-78℃，将所得的溶液搅拌 0.8 小时，然后，借助于导管，将中间体 7(269mg, 0.85mmol; 1.1 当量)的四氢呋喃(1.5ml)溶液加入到该溶液中。于-78℃搅拌 15 分钟后，用 40 分钟，使所得的反应混合物缓慢温热至 0℃，在此期间，反应物变为粘稠的淤浆。于 0℃搅拌 2.5 小时后，用乙酸

乙酯(30ml)稀释该反应混合物，并且用盐水(2x30ml)洗涤。经硫酸钠干燥有机层，真空浓缩得到为白色固体的中间体 8 (426mg, 100%)。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 7.65 (d, 1H), 7.43-7.30 (m, 7H), 7.11 (d, 1H), 5.56 (dd, 1H), 4.90 (p, 1H), 4.77 (t, 1H), 4.31 (dd, 1H), 2.98 (q, 2H), 2.20 (d, 3H), 2.18-2.13 (m, 4H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.76-1.69 (m, 2H), 1.38 (t, 3H)。

中间体 9

(4R)-3-{[(3S,4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]羰基}-4-苯基-1,3-噁唑烷-2-酮的制备

通过环加成方法制备

在氮气氛下，通过注射器将三氟乙酸的氯仿溶液(0.16ml 的 1.0M 溶液; 0.17mmol; 0.2 当量)加入到中间体 8 (375mg, 0.85mmol)和 N-(甲氧基甲基)-N-(三甲基甲硅烷基甲基)苄胺(334mg, 1.70mmol; 2 当量)的氯仿(2.5ml)的搅拌淤浆中。于大约 0℃将所得的淤浆搅拌 4 小时，然后于大约 15℃(水浴)搅拌过夜。然后，将所得的浑浊溶液冷却到-4℃，借助于注射器加入 N-(甲氧基甲基)-N-(三甲基甲硅烷基甲基)苄胺(330mg, 1.70mmol; 2 当量)处理并且搅拌 5 小时，在此期间所述反应混合物变为均匀的溶液。薄层层析(4:1 己烷:乙酸乙酯)显示反应完成。减压除去大部分的氯仿，用二氯甲烷(30ml)稀释残余物。用盐水(20ml)洗涤所得的混合物。经硫酸钠干燥有机层，过滤，真空浓缩得到半固体。经硅胶快速层析(4:1 己烷:乙酸乙酯)纯化该半固体得到无色泡沫状物的主要的非对映体(275mg, 56%)。

主要非对映体:

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 7.53 (d, 1H), 7.45-7.24 (m, 11H), 7.17 (d, 1H), 5.55 (dd, 1H), 4.87 (p, 1H), 4.70 (t, 1H), 4.31 (t, 1H), 4.22 (dd, 1H), 3.78 (d, 1H), 3.65 (d, 1H), 3.53 (d, 1H), 2.98-2.86 (m, 5H), 2.20-2.09 (m, 4H), 2.02-1.92 (m, 2H), 1.78-1.68 (m, 2H), 1.35 (t, 3H), 1.11 (s, 3H)。

中间体 10

(3S,4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-甲醛的制备

通过还原/氧化方法制备。

在氮气氛下，借助于注射器，将氢化锂铝的四氢呋喃溶液(0.229ml的1.0M溶液; 0.229mmol; 0.6 当量)加入到中间体9 (220mg, 0.382mmol)的甲苯(4.2ml)的冷却(-78℃)的搅拌的溶液中。于-78℃下，将所得到的溶液搅拌 2 小时，通过连续加入甲醇(50μl)、15%氢氧化钠水溶液(50μl)和附加量的水(200μl)猝灭该反应。使所得的混合物温热至室温，然后搅拌 30 分钟，再用乙醚(8ml)稀释，经硫酸钠干燥。过滤并且真空浓缩滤液得到为半固体的醇(存在少量醛)(242mg)。该物质未经进一步纯化直接使用。

在氮气氛下，借助于注射器，向草酰氯的二氯甲烷溶液(95μl 的2.0M 溶液; 0.19mmol; 0.5 当量)在附加量的二氯甲烷(0.40ml)中的冷却(-78℃)的搅拌溶液中加入二甲基亚砜(160μl; 0.38mmol; 1.0 当量)。观察到剧烈发泡。于-78℃下，搅拌 20 分钟后，通过导管加入所述粗品醇的二氯甲烷溶液(0.6ml)。于-78℃下，将所得到的黄色溶液搅拌 20 分钟，然后，通过注射器加入三乙胺(119μl; 0.85mmol; 2.2 当量)。于-78℃下，将所得到的反应混合物搅拌 20 分钟，然后温热至室温并且再搅拌 1 小时。再通过加入盐水(10ml)猝灭该反应混合物，用二氯甲烷(2x10ml)萃取。经硫酸钠干燥合并的有机层，过滤，真空浓缩得到所述粗品醛。经硅胶快速层析(20%乙酸乙酯的己烷溶液洗脱)纯化得到为澄清、无色油状物的所述醛(101mg, 两步共 63%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 9.68 (s, 1H), 7.57 (d, 1H), 7.41-7.21 (m, 6H), 6.94 (dd, 1H), 4.87 (p, 1H), 3.89 (t, 1H), 3.81 (d, 1H), 3.68 (d, 1H), 3.26-3.20 (m, 2H), 3.01-2.92 (m, 3H), 2.48 (d, 1H), 2.22-2.08 (m, 4H), 2.01-1.92 (m, 2H), 1.78-1.71 (m, 2H), 1.37 (t, 3H), 0.76 (s, 3H)。

实施例 1 和 2 的制备

通过 Grignard 加成方法制备

在氮气氛下，借助于注射器，将碘化甲基镁的乙醚溶液(184μl 的 3.0M 溶液; 0.55mmol; 3 当量)加入到中间体 10 (76.8mg; 0.185mmol) 的无水乙醚(2.8ml)的搅拌的溶液中。于 0℃下，搅拌 15 分钟后，使所述反应混合物温热至室温并且搅拌 2 小时。然后，用饱和氯化铵水溶液(10ml)小心地猝灭该反应混合物，用乙酸乙酯(3x10ml)萃取。用盐水洗涤合并的有机部分，经硫酸钠干燥，过滤并且真空浓缩得到油状物。经快速硅胶层析(1.5:2.5:0.6 乙酸乙酯:己烷:甲醇)纯化得到为无色油状物的较低极性的非对映体(22mg; 27%)和较高极性的非对映体(30mg; 38%)。

实施例 1

(1S)-1-[(3S,4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙-1-醇

较低极性的非对映体。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 7.58 (d, 1H), 7.40-7.17 (m, 6H), 6.99 (dd, 1H), 4.88 (c, 1H), 3.80-3.65 (m, 4H), 3.47 (t, 1H), 3.05 (d, 1H), 2.96 (q, 2H), 2.66 (t, 1H), 2.48 (d, 1H),2.23-2.05 (m, 4H), 2.01-1.91 (m, 2H), 1.79-1.70 (m, 2H), 1.37 (t, 3H), 1.15 (d, 3H), 0.56 (s, 3H)。

LRMS (电喷雾，阳离子): Da/e 432.4 (m+1)。

实施例 2

(1R)-1-[(3S,4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙-1-醇

较高极性的非对映体。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 7.57 (d, 1H), 7.38-7.21 (m, 6H), 6.99 (dd, 1H), 4.88 (c, 1H), 3.83-3.65 (m, 5H), 3.36 (t, 1H), 3.17 (d, 1H), 2.97 (q, 2H), 2.74 (t, 1H), 2.23-2.02 (m, 4H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.79-1.69 (m, 2H),

1.37 (t, 3H), 1.16 (d, 3H), 0.52 (s, 3H)。

LRMS (电喷雾，阳离子): Da/e 432.4 (m+1)。

实施例 3 的制备

[(3S,4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]甲-1-醇

通过氢化物还原方法制备。

向溶于无水四氢呋喃(0.8ml)中的中间体 10 (38.8mg, 0.0844mmol)的冷却(0℃)的搅拌的溶液中加入氢化锂铝(84.4μl; 1.0M 的四氢呋喃溶液; 0.084mmol; 1.0 当量)。在早期放热后，将该反应混合物温热至室温 1 小时。将 1N 盐酸水溶液(1ml)加入到该反应混合物中并且继续搅拌另外 5 分钟。用 1M 的氢氧化钠将该反应混合物碱化至 pH 为 8。用乙酸乙酯(2x10ml)萃取含水层，用盐水(10ml)洗涤合并的有机层，然后经硫酸钠干燥，真空浓缩得到所述醇(31mg; 88%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 7.59 (d, 1H), 7.39-7.28 (m, 6H), 6.98 (d, 1H), 3.58-2.80 (m, 8H), 4.04-3.92 (m, 3H), 2.76 (t, 1H), 2.45 (d, 1H), 2.25-1.66 (m, 8H), 1.37 (s, 3H)。

LRMS (电喷雾，阳离子): Da/e 418.3 (m+1)。

中间体 11

[(3S,4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基吡咯烷-3-基]甲-1-醇(游离吡咯烷)的制备

通过披钯碳调节的氢化方法制备。

向在 190 规定乙醇(2.0ml)中的实施例 3 化合物(25.5mg; 0.0611mmol)的搅拌的溶液中加入 10%的披钯碳(5mg; 20%重量的催化剂)。使氢气剧烈冒泡通过所述溶液 5 分钟。将该反应物于室温下搅拌 2 小时，然后，通过硅藻土过滤除去催化剂。真空除去溶剂得到所述吡咯烷(14mg; 71%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 7.59 (d, 1H), 7.20 (d, 1H), 6.92 (d, 1H),

4.92 (c, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.14-2.95 (m, 3H), 3.42 (d, 0.5H), 3.36 (d, 0.5H), 3.01 (q, 2H), 2.20-2.08 (m, 4H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.79-1.62 (m, 2H), 1.40 (t, 3H), 0.78 (s, 3H)。

LRMS (电喷雾，阳离子): Da/e 428.4 (m+1)。

实施例 4

(3S,4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-(羟基甲基)-3-甲基吡咯烷甲酸甲酯的制备

通过 Hunig's 碱调节的酰化方法制备。

向在干燥二氯甲烷(1.0ml)中的中间体 11 (14.2mg; 0.043mmol)的冷却(0℃)、搅拌的溶液中加入二异丙基乙胺(5.6mg; 0.043mmol; 1.0 当量)。滴加氯代甲酸甲酯(4.1mg; 0.043mmol; 1.0 当量)并且将该反应物温热至室温过夜(14 小时)。真空浓缩该反应物并且用乙酸乙酯(1.5ml)稀释。用盐水(2x10ml)洗涤有机相，经硫酸钠干燥，真空浓缩。经硅胶快速层析(15%乙酸乙酯的己烷溶液洗脱)纯化粗品油状物得到实施例 4 化合物(8.9mg; 53%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz; 旋转异构体的混合物) : δ 7.61 (d, 1H), 7.18 (d, 1H), 6.92 (d, 1H), 4.88 (c, 1H), 3.96-3.71 (m, 4H), 3.65-3.49 (m, 3H), 3.40 (d, 0.5H), 3.32 (d, 0.5H), 2.97 (q, 2H), 2.20-2.08 (m, 4H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.78-1.63 (m, 2H), 1.38 (t, 3H), 0.78 (s, 3H)。

LRMS (电喷雾，阳离子): Da/e 386.4 (m+1)。

测试了结构式(II)化合物抑制 PDE4 的能力。一种化合物抑制 PDE4 活性的能力与该化合物的 IC_{50} 值即抑制 50%的酶活性所需抑制剂的浓度有关。使用重组人 PDE4 测定结构式(II)化合物的 IC_{50} 值。

本发明化合物一般显示抑制重组人 PDE4 的 IC_{50} 值为低于约 100μM，优选低于约 50μM，更优选低于约约 25μM。本发明化合物一般显示抑制重组人 PDE4 的 IC_{50} 值为低于约 1μM，优选低于约 0.10μM。为充分体现本发明的优点，本发明的 PDE4 抑制剂具有的 IC_{50} 值为约 0.001μM-约 0.3μM。

由一般使用在 0.1pM-500μM 范围内的浓度的浓度-反应曲线，确定所述化合物的 IC_{50} 值。使用如 Loughney 等，J. Biol. Chem., 271，第 796-806 页(1996)中所述的标准方法的针对其它 PDE 酶的试验也表明本发明的化合物对于 cAMP 特异性 PDE4 酶具有高度选择性。

通过本领域众所周知的方法可以完成重组人 PDEs 的产生和 IC_{50} 值的测定。以下介绍典型的方法:

人 PDEs 的表达

在杆状病毒感染的草地贪夜蛾(Spodoptera fugiperda) (Sf9)细胞中的表达

使用 pBlueBacIII (Invitrogen)或者 pFastBac (BRL-Gibco)构建杆状病毒转移质粒。通过跨越所述载体接点进行测序并且通过对由 PCR 产生的所有区进行完全测序，证实所有质粒的结构。质粒 pBB-PDE1A3/6 在 pBlueBacIII 中含有 PDE1A3 的完整的可读框(Loughney 等，J. Biol. Chem., 271，第 796-806 页(1996))。质粒 Hcam3aBB 在 pBlueBacIII 中含有 PDE1C3 的完整的可读框(Loughney 等(1996))。质粒 pBB-PDE3A 在 pBlueBacIII 中含有 PDE3A 的完整的可读框(Meacci 等，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89,第 3721-3725 页(1992))。

根据制造商的方案，使用 MaxBac 系统(Invitrogen)或者 FastBac 系统(Gibco-BRL)产生重组病毒原液。在这两种情况下，在所得到的病毒中重组人 PDEs 的表达由病毒多角体启动子驱动。当使用 MaxBac®系统时，为了确保在制剂中不污染有野生型(occ+)病毒，将病毒噬斑纯化两次。如下进行蛋白表达。使 Sf 9 细胞于 27℃下在补充如下成分的 Grace's 昆虫培养基(Gibco-BRL)中生长：10%胎牛血清、0.33%TC yeastolate、0.33%水解乳白蛋白、4.2mM 的碳酸氢钠、10μg/ml 庆大霉素、100 单位/ml 的青霉素和 100μg/ml 链霉素。以每个细胞大约 2-3 病毒颗粒的感染复数感染指数生长的细胞并且孵育 48 小时。通过离心收集所述细胞，用未经补充的 Grace's 培养基洗涤并

且快速冷冻保存。

在酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae) (酵母)中的表达

人 PDE1B、PDE2、PDE4A、PDE4B、PDE4C、PDE4D、PDE5 和 PDE7 的重组产生类似于美国专利第 5,702,936 号(在此结合到本发明中作为参考)的实施例 7 中所述进行，除了使用酵母转化载体，该酵母转化载体衍生自 Price 等 Methods in Enzymology, 185, 第 308-318 页(1990)介绍的基本 ADH2 质粒，该质粒中加入酵母 ADH2 启动子和终止子序列，所述酿酒酵母宿主为蛋白酶缺陷性菌株 BJ2-54，BJ2-54 于 1998 年 8 月 31 日保藏在美国典型培养物中心(Manassas, Virginia)，保藏号为 ATCC 74465。使转化宿主细胞在 2x SC-leu 培养基(pH 6.2，含有微量金属和维生素)中生长。24 小时后，加入含有甘油的 YEP 培养基到终浓度为 2x YET/3%甘油。大约 24 小时后，收获细胞，洗涤并且于-70℃下保存。

人磷酸二酯酶制剂

磷酸二酯酶活性的测定

如下测定所述制剂的磷酸二酯酶活性。利用活性炭分离技术的 PDE 测试基本如 Loughney 等(1996)所述进行。在该测试中，按照存在的 PDE 活性的量的比例，PDE 活性将[32P] cAMP 或者[32P] cGMP 转化为相应的[32P] 5'-AMP 或者[32P] 5'-GMP。然后，[32P] 5'-AMP 或者[32P] 5'-GMP 通过蛇毒 5'-核苷酸酶的作用被定量地转化为游离的[32P]磷酸和未标记的腺苷或者鸟苷。因此，释放的[32P]磷酸的量与酶活性成正比。该测试于 30℃下，在含有(终浓度) 40mM Tris HCl (pH 8.0)、1μM 硫酸锌、5mM 氯化镁和 0.1 mg/ml 牛血清白蛋白(BSA)的 100μl 反应混合物中进行。或者，在评估 PDE1-比活性的测试中，孵育混合物还包括使用 0.1mM 氯化钙和 10μg/ml 钙调蛋白。PDE 酶以产生<30%总的底物水解的量存在(线性测试条件)。通过加入底物

(1mM [32P] cAMP 或者 cGMP)引发所述测试，将该混合物孵育 12 分钟。然后，加入 75μg 大响尾蛇(Crotalus atrox)毒素，继续孵育 3 分钟(总共 15 分钟)。通过加入 200μl 活性炭(在每毫升 0.1 M 磷酸二氢钠的悬浮液(pH4)中 25 毫克)终止反应。离心(750 X g 3 分钟)沉淀所述活性炭后，取出上清液样品用于在闪烁计数器中的放射活性的测定并且计算 PDE 活性。

类似于 Loughney 等，J. Biol. Chem., 271,第 796-806 页(1996)所述的方法进行抑制剂的分析，只是同时使用 cGMP 和 cAMP，底物浓度保持在低于 32nM，该值远低于所测试 PDEs 的 Km。

人 PDE4A、4B、4C、4D 制剂

由酿酒酵母制备 PDE4A

通过与 50ml 的裂解缓冲液(50mM MOPS pH 7.5, 10μM 硫酸锌，2 mM 氯化镁，14.2 mM 2-巯基乙醇，各 5μg/ml 的抑胃酶肽、亮抑蛋白酶肽、抑蛋白酶肽，各 20 μg/ml 的钙蛋白酶抑制剂 I 和 II，以及 2 mM 苄脒盐酸盐)混合，于室温下，解冻酵母细胞(50g 带有 HDUN1.46 的酵母菌株 YI26)。于 10℃，将细胞在 French®压碎器(SLM-Aminco®, Spectronic Instruments)中溶解。于 4℃，在 Beckman JA-10 转子中，以 9000 rpm 将所述提取物离心 22 分钟。转移上清液并且在 Beckman TI45 转子中，以 36000 rpm，于 4℃，离心 45 分钟。

通过加入固体硫酸铵(0.26 g/ml 上清液)，同时在冰浴中搅拌并且维持 pH 在 7.0-7.5 之间，由高速上清液沉淀 PDE4A。经在 Beckman JA-10 转子中，以 9000 rpm 离心 22 分钟，收集沉淀的含有 PDE4A 的蛋白。将所述沉淀再次悬浮在 50ml 缓冲液 G (50mM MOPS pH 7.5, 10μM 硫酸锌，5 mM 氯化镁，100 mM 氯化钠，14.2 mM 2-巯基乙醇，2 mM 苄脒盐酸盐，各 5μg/ml 的亮抑蛋白酶肽、抑胃酶肽、抑蛋白酶肽，以及各 20 μg/ml 的钙蛋白酶抑制剂 I 和 II)中并且通过 0.45μm 滤膜。

将所述悬浮样品(50-100ml)上样到在缓冲液G中平衡后的5 x 100 cm的Pharmacia SEPHACRYL® S-300柱中。以2ml/min的流速洗脱酶活性并且收集以供以后分离。

将经凝胶过滤层析分离的PDE4A上样到在缓冲液A(50mM MOPS pH 7.5, 10μM硫酸锌，5 mM氯化镁，14.2 mM 2-巯基乙醇以及100 mM苄脒盐酸盐)中平衡后的1.6 x 20 cm的Sigma Cibacron Blue Agarose-300型 (10ml)柱中。连续用50-100ml缓冲液A、20-30ml含有20mM 5'-AMP的缓冲液A、50-100ml含有1.5M氯化钠的缓冲液A和10-20ml缓冲液C (50mM Tris HCl pH 8, 10μM硫酸锌, 14.2 mM 2-巯基乙醇以及2 mM苄脒盐酸盐)洗涤柱。用20-30ml含有20mM cAMP的缓冲液C洗脱所述酶。

收集PDE活性峰并且用硫酸铵沉淀(0.33g/ml酶收集液)以便除去过量的环核苷酸。将沉淀的蛋白再悬浮在缓冲液X (25mM MOPS pH 7.5, 5μM硫酸锌，50 mM氯化钠，1 mM DTT以及1 mM苄脒盐酸盐)中，并且按照制造商的指示，经在Pharmacia PD-10®柱上凝胶过滤脱盐。将所述酶在干冰/乙醇浴中快速冷冻并且于-70℃保存。

所得的制剂为约> 80%纯度(经SDS-PAGE)。这些制剂具有每分钟每毫克蛋白水解的约10-40 μmol cAMP的比活性。

由酿酒酵母制备PDE4B

于室温下，通过与100ml玻璃珠(0.5mM, 酸洗)和150ml的裂解缓冲液(50mM MOPS pH 7.2, 2 mM EDTA，2mM EGTA，1 mM DTT, 2 mM苄脒盐酸盐，以及各5μg/ml的抑胃酶肽、亮抑蛋白酶肽、抑蛋白酶肽、钙蛋白酶抑制剂I和II)混合，解冻酵母细胞(150g带有HDUN2.32的酵母菌株YI23)。将所述混合物冷却到4℃，转移至Bead-Beater®中并且快速混合6个周期(每个周期30秒)溶解所述细胞。于4℃，在Beckman J2-21M离心机中，使用JA-10转子，以9000 rpm将所述匀浆离心22分钟。回收上清液并且于4℃，在Beckman

XL-80 超速离心机中，使用 TI45 转子，以 36000 rpm 离心 45 分钟。回收上清液并且通过加入固体硫酸铵(0.26g/ml 上清液)，同时在冰浴中搅拌并且维持 pH 在 7.0-7.5 的范围内，沉淀 PDE4B。然后，在 Beckman J2 离心机中，使用 JA-10 转子，以 9000 rpm (12000 X g)将该混合物离心 22 分钟。弃去上清液，将沉淀溶于 200ml 缓冲液 A (50mM MOPS pH 7.5, 5 mM 氯化镁，1 mM DTT，1 mM 苄脒盐酸盐，以及各 5μg/ml 的亮抑蛋白酶肽、抑胃酶肽和抑蛋白酶肽)中。将其 pH 和电导率分别校正为 7.5 和 15-20 mS。

将所述再悬浮的样品上样到在缓冲液 A 中平衡后的 1.6 x 200 cm Sigma Cibacron Blue Agarose-300 型(25ml)柱中。将所述样品在 12 个小时内，循环通过所述柱 4-6 次。将所述柱连续用 125-250ml 缓冲液 A、125-250ml 含有 1.5M 氯化钠的缓冲液 A 和 25-50ml 缓冲液 A 洗涤。用 50-75ml 缓冲液 E (50mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA，2mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM 苄脒盐酸盐，以及 20 mM cAMP)和 50-75ml 含有 1M 氯化钠的缓冲液 E 洗脱所述酶。收集 PDE 活性峰并且用硫酸铵(0.4g/ml 酶收集液)沉淀以便除去过量的环核苷酸。将沉淀的蛋白再悬浮在缓冲液 X (25mM MOPS pH 7.5, 5μM 硫酸锌，50 mM 氯化钠，1 mM DTT 以及 1 mM 苄脒盐酸盐)中，并且按照制造商的指示，经在 Pharmacia PD-10®柱上凝胶过滤脱盐。将该酶收集液对含有 50%甘油的缓冲液 X 透析过夜。将所述酶在干冰/乙醇浴中快速冷冻并且于-70℃保存。

所得的制剂为约> 90%纯度(经 SDS-PAGE)。这些制剂具有每分钟每毫克蛋白水解的约 10-50 μmol cAMP 的比活性。

由酿酒酵母制备 PDE4C

于室温下，通过与 100ml 玻璃珠(0.5mM, 酸洗)和 150ml 的裂解缓冲液(50mM MOPS pH 7.2, 2 mM EDTA，2mM EGTA，1 mM DTT, 2 mM 苄脒盐酸盐，以及各 5μg/ml 的抑胃酶肽、亮抑蛋白酶肽、抑

蛋白酶肽、钙蛋白酶抑制剂 I 和 II)混合，解冻酵母细胞(150g 带有 HDUN3.48 的酵母菌株 YI30)。将所述混合物冷却到 4℃，转移至 BEAD-BEATER®中并且快速混合 6 个周期(每个周期 30 秒)溶解所述细胞。于 4℃，在 Beckman J2-21M 离心机中，使用 JA-10 转子，以 9000 rpm 将所述匀浆离心 22 分钟。回收上清液并且于 4℃，在 Beckman XL-80 超速离心机中，使用 TI45 转子，以 36000 rpm 离心 45 分钟。

回收上清液并且通过加入固体硫酸铵(0.26g/ml 上清液)，同时在冰浴中搅拌并且维持 pH 在 7.0-7.5 的范围内，沉淀 PDE4C。30 分钟后，在 Beckman J2 离心机中，使用 JA-10 转子，以 9000 rpm (12000 X g)将该混合物离心 22 分钟。弃去上清液，将沉淀溶于 200ml 缓冲液 A (50mM MOPS pH 7.5, 5 mM 氯化镁，1 mM DTT，2 mM 苄脒盐酸盐，以及各 5μg/ml 的亮抑蛋白酶肽、抑胃酶肽和抑蛋白酶肽)中。将其 pH 和电导率分别校正为 7.5 和 15-20 mS。

将所述再悬浮的样品上样到在缓冲液 A 中平衡后的 1.6 x 20 cm Sigma Cibacron Blue Agarose-300 型(25ml)柱中。将所述样品在 12 个小时内，循环通过所述柱 4-6 次。将所述柱连续用 125-250ml 缓冲液 A、125-250ml 含有 1.5M 氯化钠的缓冲液 A 和 25-50ml 缓冲液 A 洗涤。用 50-75ml 缓冲液 E (50mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA，2mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM 苄脒盐酸盐，以及 20 mM cAMP)和 50-75ml 含有 1M 氯化钠的缓冲液 E 洗脱所述酶。收集 PDE4C 活性峰并且用硫酸铵(0.4g/ml 酶收集液)沉淀以便除去过量的环核苷酸。将沉淀的蛋白再悬浮在缓冲液 X (25mM MOPS pH 7.2, 5μM 硫酸锌，50 mM 氯化钠，1 mM DTT 以及 1 mM 苄脒盐酸盐)中，并且按照制造商的指示，经在 Pharmacia PD-10®柱上凝胶过滤脱盐。将该酶收集液对含有 50%甘油的缓冲液 X 透析过夜。将所述酶在干冰/乙醇浴中快速冷冻并且于-70℃保存。

所得的制剂为约> 80%纯度(经 SDS-PAGE)。这些制剂具有每分钟每毫克蛋白水解的约 10-20 μmol cAMP 的比活性。

由酿酒酵母制备 PDE4D

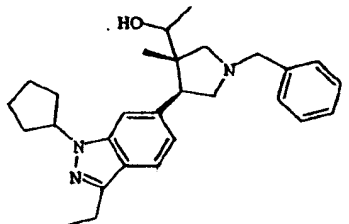
于室温下，通过与 150ml 玻璃珠(0.5mM, 酸洗)和 150ml 的裂解缓冲液(50mM MOPS pH 7.2, 10μM 硫酸锌，2 mM 氯化镁，14.2 mM 2-巯基乙醇，2 mM 苄脒盐酸盐，各 5μg/ml 的抑胃酶肽、亮抑蛋白酶肽、抑蛋白酶肽、钙蛋白酶抑制剂 I 和 II)混合，解冻酵母细胞(100g 带有 HDUN4.11 的酵母菌株 YI29)。将所述混合物冷却到 4℃，转移至 Bead-Beater®中并且快速混合 6 个周期(每个周期 30 秒)溶解所述细胞。于 4℃，在 Beckman J2-21M 离心机中，使用 JA-10 转子，以 9000 rpm 将所述匀浆离心 22 分钟。回收上清液并且于 4℃，在 Beckman XL-80 超速离心机中，使用 TI45 转子，以 36000 rpm 离心 45 分钟。回收上清液并且通过加入固体硫酸铵(0.33g/ml 上清液)，同时在冰浴中搅拌并且维持 pH 在 7.0-7.5 的范围内，沉淀 PDE4D。30 分钟后，在 Beckman J2 离心机中，使用 JA-10 转子，以 9000 rpm (12000 X g)将该混合物离心 22 分钟。弃去上清液，将沉淀溶于 100ml 缓冲液 A (50mM MOPS pH 7.5, 10μM 硫酸锌，5 mM 氯化镁，14.2 mM 2-巯基乙醇，100 mM 苄脒盐酸盐，以及各 5μg/ml 的亮抑蛋白酶肽、抑胃酶肽和抑蛋白酶肽、钙蛋白酶抑制剂 I 和 II)中。将其 pH 和电导率分别校正为 7.5 和 15-20 mS。

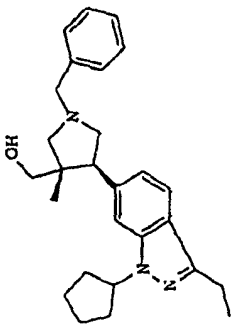
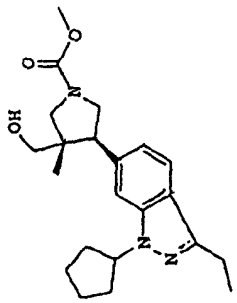
以 0.67 ml/min 的流速，将所述再悬浮的样品上样到在缓冲液 A 中平衡后的 1.6 x 20 cm Sigma Cibacron Blue Agarose-300 型(10ml)柱中。将所述柱连续用 50-100ml 缓冲液 A、20-30ml 含有 20mM 5'-AMP 的缓冲液 A、50-100ml 含有 1.5M 氯化钠的缓冲液 A 和 10-20ml 缓冲液 C (50mM Tris HCl pH 8, 10μM 硫酸锌，14.2 mM 2-巯基乙醇，2 mM 苄脒盐酸盐)洗涤。用 20-30ml 含有 20mM cAMP 的缓冲液 C 洗脱所述酶。

收集 PDE4D 活性峰并且用硫酸铵(0.4g/ml 酶收集液)沉淀以便除去过量的环核苷酸。将沉淀的蛋白再悬浮在缓冲液 X (25mM MOPS pH 7.2, 5μM 硫酸锌，50 mM 氯化钠，1 mM DTT 以及 1 mM 苄脒盐

酸盐)中，并且按照制造商的指示，经在 Pharmacia PD-10®柱上凝胶过滤脱盐。将该酶收集液对含有 50%甘油的缓冲液 X 透析过夜。将所述酶的制剂在干冰/乙醇浴中快速冷冻并且于-70℃保存。

所得的制剂为约> 80%纯度(经 SDS-PAGE)。这些制剂具有每分钟每毫克蛋白水解的约 20-50 μmol cAMP 的比活性。

实施例编号	结构式	分子量	PDE4 IC_{50} (nM)
1	 (1S)-1-[(3S, 4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙-1-醇	431.62	315.9
2	(1R)-1-[(3S, 4S)-4-(1-环戊基-3-乙基(1H-吲唑-6-基))-3-甲基-1-苄基吡咯烷-3-基]乙-1-醇	431.62	87.6

实施例编号	结构式	分子量	PDE4 IC_{50} (nM)
3		417.60	6.1
4		385.51	79.1

以上提供的数据显示本发明的化合物为有效的 PDE4 抑制剂，例如所述化合物具有对于人重组 PDE4 的 IC_{50} 为约 0.001 μM-0.3 μM。优选的化合物具有的 IC_{50} 为约 100nM 或以下，特别优选的化合物具有的 IC_{50} 为约 50nM 或以下。

本发明的化合物用于选择性地抑制哺乳动物体内 PDE4 的活性，而不显示与在先 PDE4 抑制剂有关的不利的中枢神经系统作用和催吐作用。

显而易见，在不背离本发明的精神和范围的条件下，可以对此前提出的本发明内容作各种修饰和改进，因此，只有所附带的权利要求书才是对本发明的唯一的限定。