



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109790170 B

(45) 授权公告日 2022.08.02

(21) 申请号 201780063337.9

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22) 申请日 2017.08.16

72001

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 张宇腾 黄希贵

申请公布号 CN 109790170 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2019.05.21

C07D 487/04 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07D 487/14 (2006.01)

62/375694 2016.08.16 US

A61K 31/5517 (2006.01)

62/427771 2016.11.29 US

A61P 11/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2019.04.12

WO 2014047413 A1, 2014.03.27

(86) PCT国际申请的申请数据

US 4226768 A, 1980.10.07

PCT/US2017/047185 2017.08.16

US 2006003995 A1, 2006.01.05

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2012295892 A1, 2012.11.22

W02018/035246 EN 2018.02.22

A. Walser, 等. Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. XCV. Synthesis of 1,4-benzodiazepines by ring expansion of 2-chloromethylquinazolines with carbanions. 《J. Heterocyclic Chem.》. 1986, 第23卷

(73) 专利权人 UWM研究基金会有限公司

Frank Watjen, 等. Novel benzodiazepine receptor partial agonists:

地址 美国威斯康星州

oxadiazolylimidazobenzodiazepines. 《J. Med. Chem.》. 1989, 第32卷(第10期),

专利权人 纽约市哥伦比亚大学信托人

审查员 孙静

(72) 发明人 A.E.阿诺 D.C.斯塔福德

权利要求书1页 说明书35页 附图13页

J.M.库克 C.W.埃马拉 G.福尔扩

R.贾罕 R.科达利 李官官

M.R.斯蒂芬

(54) 发明名称

GABA (A) 受体调节剂和控制哮喘中气道高反应性和炎症的方法

(57) 摘要

吡咯并苯并二氮杂草靶向 α -4 和 α -5 GABA_A受体, 用于治疗哮喘中的气道高反应性和炎症。化合物选择性地分配到外周隔室并且具有降低的CNS作用。

1. 化合物, 其选自

(R)-8-溴-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸; 和

(R)-8-环丙基-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸;

或其药学上可接受的盐。

2. 权利要求1的化合物, 其中所述化合物是(R)-8-溴-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸或其药学上可接受的盐。

3. 权利要求1的化合物, 其中所述化合物是(R)-8-环丙基-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸或其药学上可接受的盐。

4. 一种药物组合物, 其包含权利要求2的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

5. 一种药物组合物, 其包含权利要求3的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

6. 权利要求2的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于减轻气道收缩的药物中的用途。

7. 权利要求2的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于减轻肺部炎症的药物中的用途。

8. 权利要求2的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于减轻具有与肺部炎症相关的风险因素的对象的疾病发展的药物中的用途。

9. 权利要求2的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗肺病的药物中的用途。

10. 权利要求3的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于减轻气道收缩的药物中的用途。

11. 权利要求3的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于减轻肺部炎症的药物中的用途。

12. 权利要求3的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于减轻具有与肺部炎症相关的风险因素的对象的疾病发展的药物中的用途。

13. 权利要求3的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗肺病的药物中的用途。

GABA (A) 受体调节剂和控制哮喘中气道高反应性和炎症的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年8月16日提交的美国临时申请序列号62/375,694和2016年11月29日提交的美国临时申请序列号62/427,771的权益，所述美国临时申请的整体内容特此通过引入并入。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在美国政府支持下以NIH授权号R01HL118561、R01MH096463、R01GM065281和R01HL122340完成。美国政府对本发明具有某些权利。

[0005] 背景

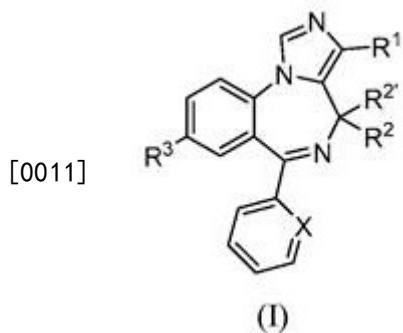
[0006] 支气管收缩性疾病是全世界主要的健康问题。这些包括哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)和支气管肺发育不良(BPD)，并且尽管存在诸如 β -肾上腺素能激动剂、吸入的皮质类固醇和吸入的抗胆碱能药物的现有治疗，但支气管收缩性疾病仍然非常普遍。哮喘本身影响全球3亿人。由于哮喘使患者易患严重急性气道收缩，因此能够促进气道平滑肌松弛的新型治疗机制将具有临床价值。

[0007] 因此，持续需要有效对抗支气管收缩性疾病的治疗和预防剂。治疗这些疾病的新药理学方法是有限的。治疗局限性在促进急性气道平滑肌松弛的药物中尤为明显，因为 β -肾上腺素受体激动剂和抗胆碱能药物仍然是目前用于治疗急性气道收缩的唯一药物类别。

[0008] GABA_A受体(GABA_AR)是配体门控的氯离子通道，因其在中枢神经系统(CNS)中的抑制作用而众所周知。GABA_AR为从19个不同的亚基(α_{1-6} 、 β_{1-3} 、 γ_{1-3} 、 δ 、 ε 、 π 、 θ 、 ρ_{1-3})组装的杂五聚体(heteropentamer)。经典的GABA_AR由两个 α 、两个 β 和一个 γ 、 δ 、 ε 、 θ 或 π 亚基组成。改变GABA_AR的功能的功效的化合物已广泛用作中枢神经系统病症的药物。除神经元外，还已在气道平滑肌、气道上皮和免疫/炎性细胞中鉴定出GABA_AR亚基。选择性地与气道平滑肌细胞、上皮细胞和免疫细胞上的离散GABA_AR亚型反应的化合物是重要的，是迄今为止用于治疗支气管收缩性疾病的新方法。对于 $\alpha_4\beta_3\gamma_2$ GABA_AR或 $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ GABA_AR偏好的化合物已被确定为在哮喘的描述模型中具有药理学活性。

[0009] 概述

[0010] 一方面，本发明提供式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，



[0012] 其中：

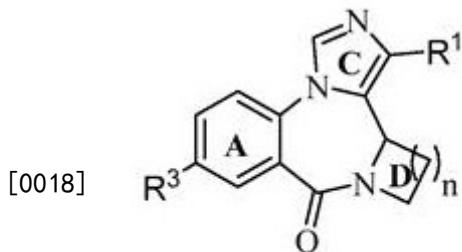
[0013] R¹为COOH、羧酸酯、羧酸电子等排体或羧酸酯电子等排体；

[0014] X为C-H、C-F、C-Cl、C-Br、C-I、C-CF₃或N;

[0015] R²和R^{2'}各自独立地为H、D、C₁₋₄烷基、CD₃、F、Cl、CF₃、CCl₃或环丙基;或R²和R^{2'}一起形成任选取代的环;和

[0016] R³为H、F、Cl、Br、CF₃、CHF₂、-OCF₃、-OCHF₂、CN、OH、-OC₁₋₄烷基、-C≡CH或环丙基。

[0017] 本发明的另一方面提供式(II)的化合物或其药学上可接受的盐,



(II)

[0019] 其中:

[0020] R¹为COOH、羧酸酯、羧酸电子等排体或羧酸酯电子等排体;

[0021] n为1或2;和

[0022] R³为H、F、Cl、Br、CF₃、CHF₂、-OCF₃、-OCHF₂、CN、OH、-OC₁₋₄烷基、-C≡CH或环丙基。

[0023] 另一方面,本发明的提供含有式(I)或(II)的化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,组合物可以是口服或气雾剂制剂。

[0024] 另一方面,本发明提供减少气道收缩的方法,包括将有效量的式(I)或(II)的化合物或组合物或其药学上可接受的盐给予有需要的对象。在一些实施方案中,与治疗剂量的地西洋相比,式(I)或(II)化合物在对象中具有降低的苯并二氮杂草型CNS作用。

[0025] 另一方面,本发明提供减轻肺部炎症的方法,包括将有效量的式(I)或(II)的化合物或组合物或其药学上可接受的盐给予有需要的对象。在一些实施方案中,与治疗剂量的地西洋相比,式(I)或(II)化合物在对象中具有降低的苯并二氮杂草型CNS作用。

[0026] 另一方面,本发明提供减轻具有与肺部炎症相关的风险因素的对象的疾病发展的方法,包括将有效量的式(I)或(II)的化合物或组合物或其药学上可接受的盐给予有需要的对象。在一些实施方案中,与治疗剂量的地西洋相比,式(I)或(II)化合物在对象中具有降低的苯并二氮杂草型CNS作用。

[0027] 另一方面,本发明提供治疗肺病的方法,包括将有效量的式(I)或(II)的化合物或组合物或其药学上可接受的盐给予有需要的对象。在一些实施方案中,与治疗剂量的地西洋相比,式(I)或(II)化合物在对象中具有降低的苯并二氮杂草型CNS作用。

[0028] 在一些方面中,本发明的化合物选择性地靶向GABA_AR的α₄和α₅亚基。在一些方面,本发明的化合物是GABA_AR的别构调节剂,其对于GABA_AR上的α₄和α₅苯并二氮杂草别构调节位点是选择性的。在一些方面,本发明的化合物可能具有有限的穿过血脑屏障的无能力(inability)。

[0029] 附图的简要说明

[0030] 图1A示出通过表达GABA_A受体亚型α1β3γ2、α2β3γ2、α3β3γ2、α4β3γ2和α5β3γ2的非洲爪蟾卵母细胞上的SH-053-2'F-R-CH₃-酸对GABA引发电流的剂量依赖性调节。

[0031] 图1B示出使用表达 $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ 或 $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ GABA_A受体的HEK293T细胞的具有RJ-02-50的自动膜片钳。

[0032] 图2示出在旋转杆试验中化合物对感觉运动协调的作用。

[0033] 图3A示出RJ-02-50和RJ-03-30对豚鼠气管环中气道平滑肌收缩力的作用。

[0034] 图3B示出RJ-03-57对豚鼠气管环中气道平滑肌收缩力的作用。

[0035] 图3C示出SH-053-2' F-R-CH3酸和GL-II-93对豚鼠气管环中气道平滑肌收缩力的作用。

[0036] 图4示出SH-053-2' F-R-CH3酸对人气道平滑肌收缩力的作用。

[0037] 图5A-5F示出化合物对气道高反应性的作用。

[0038] 图6A-6D示出化合物在小鼠血液、肺和脑中的药代动力学特征。

[0039] 图7A-7C示出化合物对炎性细胞的作用。

[0040] 图8示出使用从ova s/c BALB/c 小鼠脾脏分离的CD4+ T-细胞在600nM GABA和一起施加3秒的渐增浓度的化合物存在下的电流记录。

[0041] 图9示出化合物在细胞因子产生方面的抗炎特性。

[0042] 图10A-10B示出化合物对粘蛋白产生的作用。

[0043] 图11示出未经处理或用GL-II-93处理的肺细胞的增殖。

[0044] 详述

[0045] 最近的研究表明,在哮喘肺病理生理学中涉及的细胞类型表面上存在功能性 γ -氨基丁酸A型受体(GABA_AR)。重要的是,GABA_AR信号传导可以影响气道平滑肌(ASM)的收缩状态、炎症过程和气道上皮细胞(AEC)的增殖。尽管GABA_AR信号传导在肺部局部起作用越来越得到理解,但尚未开发或开拓出治疗性地用于哮喘治疗的联合和靶向GABA_AR反应的策略。因此,本发明人考虑通过系统地探测人肺细胞类型以鉴定对ASM和免疫/炎性细胞具有抑制作用而不刺激AEC肥大的配体,来鉴定新型哮喘疗法。

[0046] 内源性气道平滑肌GABA_A受体的激活使气道平滑肌的胆碱能收缩松弛,且气道平滑肌的分子分析显示这些GABA_A受体的 α -亚基成分限于 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 。

[0047] 本发明提供了新化合物,其可以结合至免疫/炎性细胞和气道平滑肌中表达的特异性离子移变的(配体门控的)离子通道,且因而松弛收缩。该新发现详述了用于松弛气道平滑肌收缩的新信号传导途径和蛋白质靶标,并且可以潜在地发展成对抗气道收缩、肺部炎症和与过敏性和自身免疫疾病相关的炎症的新型治疗剂。因此,本发明尤其提供了新型化合物(其提供了对抗气道收缩、肺部炎症和与过敏性和自身免疫疾病相关的炎症的新型治疗选择),以及使用这些化合物治疗各种疾病的方法。

[0048] 定义

[0049] 以下更详细地描述特定官能团和化学术语的定义。就本发明的目的而言,化学元素按照元素周期表(CAS版本,化学和物理手册,第75版,内封面)鉴定,且具体官能团如其中所述一般性地定义。另外,有机化学的一般原理以及特定的功能基团和反应性描述于Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith and March March's Advanced Organic Chemistry, 第5版, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989; Carruthers, Some Modern Methods of Organic

Synthesis, 第3版, Cambridge University Press, Cambridge, 1987; 每个的全部内容通过引用并入本文。

[0050] 术语“酰基”是指烷基羰基、环烷基羰基、杂环基羰基、芳基羰基或杂芳基羰基取代基。在一些实施方案中, 酰基可以进一步被(例如, 一个或多个取代基)取代。除非另有说明, 否则酰基是未取代的。

[0051] 术语“烷基”是指含有指定碳原子数目的直链或支链烃链。例如, C_1-C_{12} 烷基表示可具有1至12个(包括端点)碳原子的烷基, C_1-C_4 烷基表示可具有1至4个(包括端点)碳原子的烷基。在一些实施方案中, 该烷基可以是任选取代的。 C_{1-4} 烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基和叔丁基。除非另有说明, 烷基是未被取代的。

[0052] 术语“烯基”是指具有一个或多个双键的直链或支链烃链。烯基的实例包括但不限于烯丙基、丙烯基、2-丁烯基、3-己烯基和3-辛烯基。双键碳之一可任选地是烯基取代基的连接点。在一些实施方案中, 烯基可任选被取代。除非另有说明, 否则烯基是未取代的。

[0053] 术语“炔基”是指具有一个或多个三键的直链或支链烃链。炔基基团的实例包括但不限于乙炔基、炔丙基和3-己炔基。三键碳之一可任选地是炔基取代基的连接点。在一些实施方案中, 炔基可任选被取代。除非另有说明, 否则炔基是未取代的。

[0054] 术语“芳基”是指芳族碳环单环、双环或三环烃环系统, 其中任何能够取代的环原子可以被(例如, 一个或多个取代基)取代。芳基的实例包括但不限于苯基、萘基和蒽基。除非另有说明, 否则芳基是未取代的。

[0055] 术语“芳基烷基”是指其中烷基氢原子被芳基代替的烷基。芳基烷基包括其中多于一个氢原子已被芳基代替的基团。芳基烷基的实例包括苄基、2-苯基乙基、3-苯基丙基、9-芴基、二苯甲基和三苯甲基。

[0056] 如本文所用的术语“环烷基”是指具有3至12个碳(例如, 3、4、5、6或7个碳原子)的饱和环、双环、三环或多环烃基。任何环原子可以被(例如, 一个或多个取代基)取代。环烷基可含有稠环。稠环是共有一个或多个共同碳原子的环。单环环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基和环己基。桥连环烷基的实例包括金刚烷基和降冰片基(norbornyl)。

[0057] 本文所用的术语“卤代”和“卤素”指的是氟、氯、溴或碘的任何基团。

[0058] 本文所用的术语“卤代烷基”是指其中一个或多个氢原子被卤素代替的烷基, 并且包括其中所有氢已经被卤素代替的烷基(例如, 全氟烷基, 例如 CF_3)。

[0059] 如本文所用的术语“杂芳基”是指芳族5-8元单环、8-12元双环或11-14元三环环系, 如果是单环, 则具有1-3个杂原子, 如果是双环, 则具有1-6个杂原子, 或如果是三环, 则具有1-9个杂原子, 所述杂原子独立地选自O、N、S、P和Si(例如, 碳原子和如果是单环、双环或三环, 则分别1-3、1-6或1-9个独立地选自O、N、S、P和Si的杂原子)。任何环原子可以被(例如, 一个或多个取代基)取代。杂芳基可含有稠环, 其为共有一个或多个共同原子的环。杂芳基的实例包括但不限于吡啶、嘧啶、吡嗪、哒嗪、吡咯、咪唑、吡唑、噁唑、异噁唑、呋喃、噻唑、异噻唑、噻吩、喹啉、异喹啉、喹喔啉、喹唑啉、噌啉、吲哚、异吲哚、吲嗪、吲唑、苯并咪唑、酞嗪、蝶啶、咔唑、咔啉、菲啶、吖啶、菲咯啉、吩嗪、萘啶和嘌呤的基团。

[0060] 如本文所用的术语“杂环”是指非芳族的、饱和的或部分不饱和的3-10元单环、8-12元双环或11-14元三环环系, 如果是单环, 则具有1-3个杂原子, 如果是双环, 则具有1-6个杂原子或如果是三环, 则具有1-9个杂原子, 所述杂原子选自O、N、S、Si和P(例如, 碳原子和

如果是单环、双环或三环，则分别1-3、1-6或1-9个O、N、S、Si和P的杂原子)。任何环原子可以被(例如，一个或多个取代基)取代。杂环基可含有稠环，其为共有一个或多个共同原子的环。杂环基的实例包括但不限于四氢呋喃、四氢噻吩、四氢吡喃、哌啶、哌嗪、吗啉、吡咯啉、嘧啶、吡咯烷、二氢吲哚、四氢吡啶、二氢吡喃、噻吩、吡喃、苯并吡喃、咕吨、氧硫杂蒽、吩噻嗪、呋咱、内酯、内酰胺如氮杂环丁酮和吡咯烷酮类、磺内酰胺、磺内酯等的基团。

[0061] 术语“羟基”是指-OH基团。术语“烷氧基”是指-O-烷基。术语“芳氧基”是指-O-芳基。术语“卤代烷氧基”是指-O-卤代烷基。

[0062] 术语“取代基”是指在烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基、芳烷基或杂芳基上的该基团的任何原子处“取代的”基团。合适的取代基包括但不限于：酰基、酰基酰氨基(acylamido)、酰氧基、烷氧基、烷基、烯基、炔基、酰氨基、氨基、羧基、氰基、酯、卤素、羟基、亚氨基、硝基、氧化(例如，C=O)、膦酸酯、亚磺酰基、磺酰基、磺酸酯、磺氨基(sulfonamino)、磺酰氨基(sulfonamido)、硫代酰氨基、巯基、硫代(例如，C=S)和脲基。在实施方案中，基团上的取代基独立地是任何一个单独的上述取代基或其任何组合。在实施方案中，取代基本身可以被任何一个上述取代基取代。

[0063] 上述取代基可在本文中缩写，例如，缩写Me、Et和Ph分别代表甲基、乙基和苯基。有机化学家使用的缩写词的更全面的列表出现在Journal of Organic Chemistry的每卷的第一期中；该列表通常在标题为缩写的标准列表的表格中呈现。在所述列表中所含的缩写和具有本领域普通技术的有机化学家使用的所有缩写特此通过引用并入。

[0064] 对于化合物，其基团和取代基可以根据原子和取代基的允许化合价选择，从而所述选择和取代会产生稳定的化合物，例如其不会例如通过重排、环化、消除等而自发地发生转化。

[0065] 当取代基由它们的从左到右书写的常规化学式指定时，它们任选地包括从右到左书写结构得到的取代基，例如-CH₂O-任选地也书写成-OCH₂-。

[0066] 根据本领域中使用的惯例，基团：

[0067]

[0068] 在本文中的结构式中用于描绘作为基团或取代基与核心或骨架结构的连接点的键。

[0069] 在治疗病症的背景下，本文所用的术语“有效量”是指化合物或包含该化合物的组合物的量，其在对对象单或多剂量给药时在处理细胞、或治愈、减轻、缓解或改善对象的病症的症状中有效。有效量的化合物或组合物可根据应用而变化。在治疗病症的背景下，有效量可取决于因素诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及化合物在个体内诱发期望反应的能力。在一个实例中，化合物的有效量是与对照(例如在未用该化合物处理的细胞(例如，细胞培养物)或对象中)相比在给定参数中产生药理学上有用的变化的量。

[0070] 苯并二氮杂草型CNS作用的治疗窗口是指在剂量或剂量范围内对靶标器官(例如，肺)具有期望的治疗效果，其中苯并二氮杂草型CNS作用(例如，镇静)在特定治疗的背景下处于可接受的水平。例如，在哮喘治疗的背景下，可接受的CNS作用水平包括无CNS作用或轻度CNS作用。例如，在一些实施方案中，治疗指数为10或更高。在一些实施方案中，治疗指数为20或更高。在一些实施方案中，治疗指数为24或更高。与治疗剂量的地西洋相比，降低的

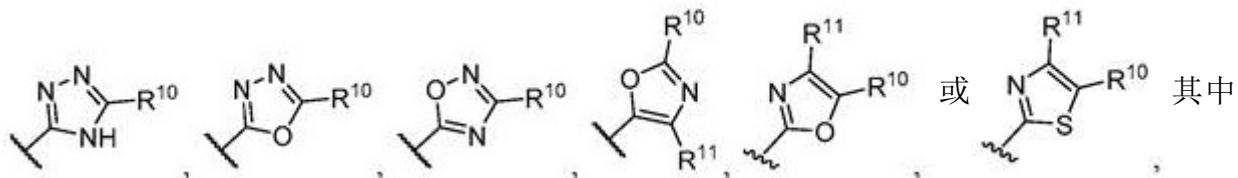
苯并二氮杂草型CNS作用包括对象中苯并二氮杂草型CNS作用降低。例如,在一些实施方案中,与治疗剂量的地西泮相比,苯并二氮杂草型CNS作用降低至1/10或更低。在一些实施方案中,与治疗剂量的地西泮相比,苯并二氮杂草型CNS作用降低至1/20或更低。在一些实施方案中,与治疗剂量的地西泮相比,苯并二氮杂草型CNS作用降低至1/24或更低。

[0071] 特别理解的是,本文所述的任何数值(例如,范围)包括从较低值到较高值的所有值,即,所列举的最低值和最高值之间的数值的所有可能组合被认为是在本申请中明确说明的。例如,如果浓度范围表示为1%至50%,则意图在本说明书中明确列举诸如2%至40%、10%至30%或1%至3%等的值。这些仅是所具体预期的示例。

[0072] 化合物

[0073] 在第一方面,提供了式(I)化合物或其药学上可接受的盐。式(I)的实施方案包括X、R¹、R²、R²'和R³及其任何组合的以下描述。

[0074] 在式(I)的一些实施方案中,当R¹为羧酸酯或羧酸酯电子等排体时,R³为OH;和/或当R³为H、F、Cl、Br、-OC₁₋₄烷基、-C≡CH或环丙基时,R¹不是羧酸酯或羧酸酯电子等排体;和/或当R³为-C≡CH时,R¹不是羧酸酰胺、羧酸硫酯、



R¹⁰和R¹¹独立地为H或C₁₋₆烷基;和/或当R³为-C≡CH时,R¹不是COOH;和/或当R²和R²'均为H时,R¹不是COOH、羧酸酯、羧酸酰胺或羧酸硫酯;X是C-H、C-F、C-Cl或C-I;和R³为H、F、Cl或Br。在一些实施方案中,式(I)化合物不是(R)-8-乙炔基-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸。在一些实施方案中,当R³是-C≡CH且R²或R²'独立地是H或C₁₋₄烷基时,R¹不是COOH。

[0075] 在如本文所述的式(I)的实施方案中,X是C-H、C-F、C-Cl、C-Br、C-I、C-CF₃或N。在进一步的实施方案中,X是C-H、C-F、C-Cl、C-Br、C-I或N。在进一步的实施方案中,X是C-H、C-F、C-Cl、C-Br或N。

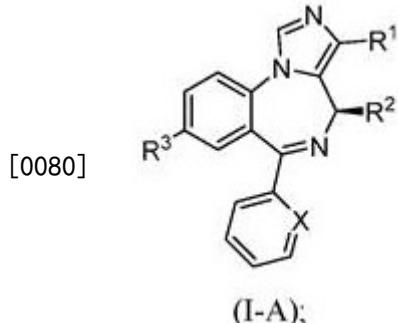
[0076] 在如本文所述的式(I)的实施方案中,R²和R²'各自独立地为H、D、C₁₋₄烷基、CD₃、F、Cl、CF₃、CCl₃或环丙基;或R²和R²'一起形成任选取代的环。在进一步的实施方案中,R²和R²'各自独立地为H、C₁₋₄烷基、F、Cl、CF₃、CCl₃或环丙基;或R²和R²'一起形成环。在进一步的实施方案中,R²和R²'各自独立地为H、C₁₋₄烷基、F、Cl、CF₃或CCl₃;或R²和R²'一起形成环。在更进一步的实施方案中,R²和R²'各自独立地为H、D、CH₃、CD₃、CF₃或环丙基;或R²和R²'一起形成C₃₋₆环烷基(例如环丙基)。在更进一步的实施方案中,R²和R²'一起形成任选被1-4个取代基取代的C₃₋₆环烷基,所述取代基独立地选自CH₃、F、OH、OCH₃、氧代和CF₃。

[0077] 在如本文所述的式(I)的实施方案中,R³是H、F、Cl、Br、CF₃、CHF₂、-OCF₃、-OCHF₂、CN、OH、-OC₁₋₄烷基、-C≡CH或环丙基。在进一步的实施方案中,R³是H、F、Cl、Br、OH、OCH₃、-C≡CH或环丙基。在进一步的实施方案中,R³是H、F、Cl、OCH₃或-C≡CH。在更进一步的实施方案中,R³是OH,其中X、R¹、R²和R²'及其组合如本文所述。在某些实施方案中,R³是OH。

[0078] 在进一步的实施方案中,R³是OH;X是C-H、C-F、C-Cl、C-Br、C-I或N;且R²和R²'各自独立地选自C₁₋₄烷基、F、Cl、CF₃、CCl₃或环丙基,或者一起形成环;和R¹如本文所定义。在更进

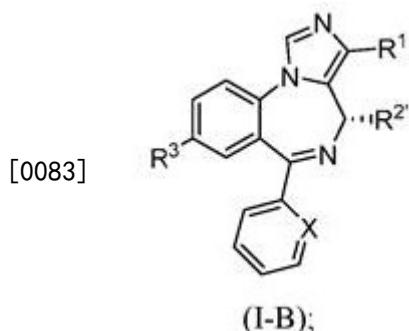
一步的实施方案中, R^2 和 $R^{2'}$ 一起形成任选被 1-4 个取代基取代的 C_{3-6} 环烷基, 所述取代基独立地选自 CH_3 、F、OH、 OCH_3 、氧化和 CF_3 。在一些实施方案中, 一个或多个氢可以用氘代替。合适地, 该化合物可以是 S- 异构体。或者, 该化合物可以是 R- 异构体。

[0079] 式(I)的实施方案包括式(I-A)的化合物



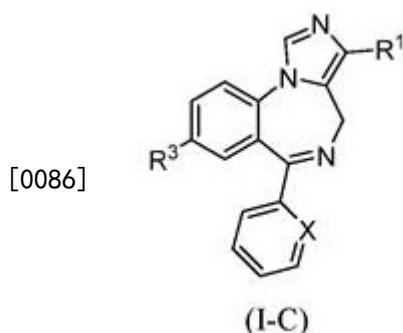
[0081] 其中 R^2 是 D、 C_{1-4} 烷基、 CD_3 、F、Cl、 CF_3 、 CCl_3 或环丙基, 并且与 X、 R^1 和 R^3 的组合如本文所述。在式(I-A)的一些实施方案中, R^2 是 D、 CH_3 、 CD_3 、 CF_3 或环丙基。在根据前述的式(I-A)的一些实施方案中, R^3 是 OH。

[0082] 式(I)的实施方案包括式(I-B)的化合物



[0084] 其中 $R^{2'}$ 是 D、 C_{1-4} 烷基、 CD_3 、F、Cl、 CF_3 、 CCl_3 或环丙基, 并且与 X、 R^1 和 R^3 的组合如本文所述。在式(I-B)的一些实施方案中, $R^{2'}$ 是 D、 CH_3 、 CD_3 、 CF_3 或环丙基。在根据前述的式(I-B)的一些实施方案中, R^3 是 OH。

[0085] 式(I)的实施方案包括式(I-C)的化合物



[0087] 其中 X、 R^1 和 R^3 及其组合如本文所述。在根据前述的式(I-C)的一些实施方案中, R^3 是 OH。

[0088] 在 X、 R^2 、 $R^{2'}$ 和 R^3 的一些组合中, X 是 C-H、C-F、C-Cl、C-Br、C-I 或 N; R^2 为 C_{1-4} 烷基、 CD_3 、F、Cl、 CF_3 、 CCl_3 或环丙基; $R^{2'}$ 为 H 或 D; 且 R^3 为 H、F、Cl、Br、OH、 OCH_3 、 $-C\equiv CH$ 或环丙基。在一些实

施方案中, R^2 是 C_{1-4} 烷基(例如, CH_3)。在进一步的实施方案中, R^3 是 H、F、Cl、Br、OH、 OCH_3 或环丙基, 并且 R^2 是 C_{1-4} 烷基。在与前述的进一步组合中, R^1 是 COOH。

[0089] 在一些实施方案中, 本发明提供根据式(I)的化合物, 其中 R^1 是羧酸电子等排体; X是C-H、C-F、C-Cl、C-Br、C-I或N; R^2 和 $R^{2'}$ 独立地选自H、 C_{1-4} 烷基、F、Cl、 CF_3 、 CCl_3 或环丙基, 或者一起形成环; 且 R^3 选自H、F、Cl、Br、OMe、-C≡CH或环丙基。在更进一步的实施方案中, R^2 和 $R^{2'}$ 一起形成任选被1-4个取代基取代的 C_{3-6} 环烷基, 所述取代基独立地选自 CH_3 、F、OH、 OCH_3 、氧代和 CF_3 。在实施方案中, R^2 和 $R^{2'}$ 是H和(R)-Me, 或H和(S)-Me, 或 R^2 和 $R^{2'}$ 都是H。在一些实施方案中, 一个或多个氢可以被氘代替。合适地, 该化合物可以是S-异构体。或者, 该化合物可以是R-异构体。

[0090] 在式(I)的另一个实施方案中, R^1 是 COOH; X是C-H、C-F、C-Cl、C-Br、C-I或N; R^2 和 $R^{2'}$ 独立地选自 C_{1-4} 烷基、F、Cl、 CF_3 、 CCl_3 或环丙基, 或者一起形成环; 且 R^3 选自H、F、Cl、Br、OMe、-C≡CH、Br或环丙基。在更进一步的实施方案中, R^2 和 $R^{2'}$ 一起形成任选被1-4个取代基取代的 C_{3-6} 环烷基, 所述取代基独立地选自 CH_3 、F、OH、 OCH_3 、氧代和 CF_3 。在一些实施方案中, 一个或多个氢可以被氘代替。合适地, 该化合物可以是S-异构体。或者, 该化合物可以是R-异构体。

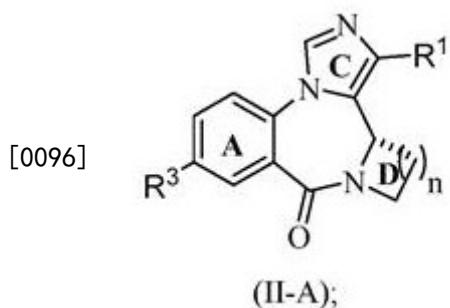
[0091] 另一方面, 提供了式(II)化合物或其药学上可接受的盐。式(II)的实施方案包括X、 R^1 和 R^3 及其组合的以下描述。

[0092] 在式(II)的一些实施方案中, 当 R^1 为 COOH、羧酸酯、羧酸酰胺或羧酸硫酯时, R^3 为 OH。在其它实施方案中, 当 R^1 为 COOH 时, R^3 为 OH。在其它实施方案中, R^1 不是羧酸酯、羧酸酰胺或羧酸硫酯。在其它实施方案中, 当 R^3 为 - OC_{1-4} 烷基或 OH 时, R^1 不是羧酸酯、羧酸酰胺或羧酸硫酯。在一些实施方案中, 式(II)化合物不是 (S)-7-羟基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酸乙酯。

[0093] 在如本文所述的式(II)的实施方案中, R^3 是 H、F、Cl、Br、 CF_3 、 CHF_2 、-OCF₃、-OCHF₂、CN、OH、-OC₁₋₄ 烷基、-C≡CH或环丙基。在进一步的实施方案中, R^3 是 H、F、Cl、Br、OH、-OCH₃、-C≡CH或环丙基。在进一步的实施方案中, R^3 是 H、F、Cl、Br、-OCH₃或-C≡CH。在进一步的实施方案中, R^3 是 H、F、Cl、-OCH₃或-C≡CH。在更进一步的实施方案中, R^3 是 OH。在进一步的实施方案中, R^3 是 OH, 其中 X 和 R^1 及其组合如本文所述。

[0094] 在某些组合中, R^1 是羧酸电子等排体且 R^3 是 H、F、Cl、Br、 CF_3 、 CHF_2 、-OCF₃、-OCHF₂、CN、-OC₁₋₄ 烷基、-C≡CH或环丙基。在其它组合中, R^1 为 COOH、羧酸酯、羧酸电子等排体或羧酸酯电子等排体; 且 R^3 为 OH。

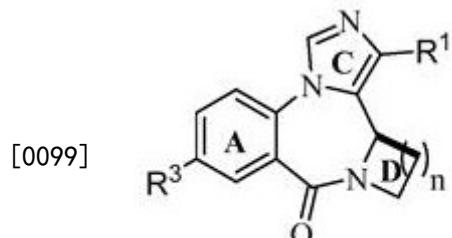
[0095] 式(II)的实施方案包括式(II-A)的化合物



[0097] 其中 X、 R^1 和 R^3 如本文中所述。在根据前述的式(II-A)的一些实施方案中, R^3 是 OH。在某些组合中, R^1 是羧酸电子等排体且 R^3 是 H、F、Cl、Br、 CF_3 、 CHF_2 、-OCF₃、-OCHF₂、CN、-OC₁₋₄ 烷基。

基、 $-C\equiv CH$ 或环丙基。在某些组合中, R^1 是羧酸电子等排体且 R^3 是 H、F、Cl、Br、OH、 $-OCH_3$ 、 $-C\equiv CH$ 或环丙基。在其它组合中, R^1 为 COOH、羧酸酯、羧酸电子等排体或羧酸酯电子等排体; 且 R^3 为 OH。

[0098] 式 (II) 的实施方案包括式 (II-B) 的化合物

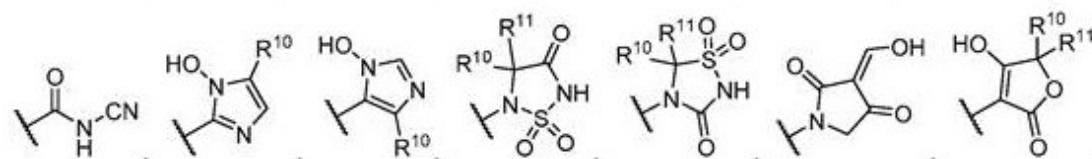
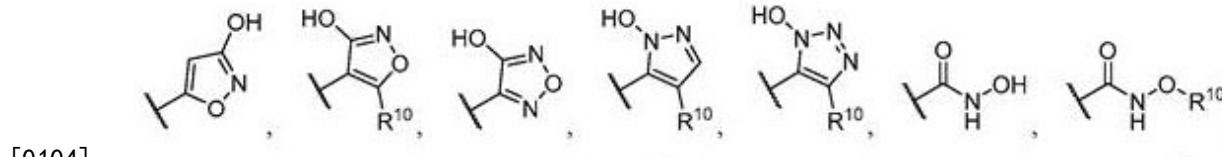
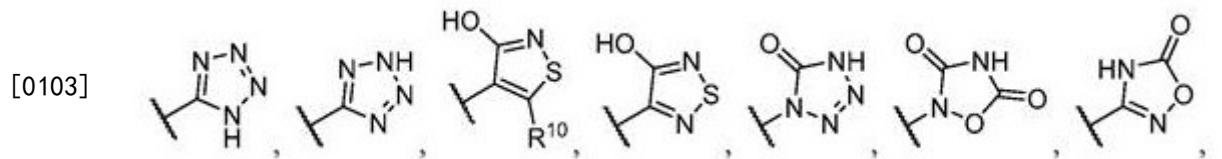


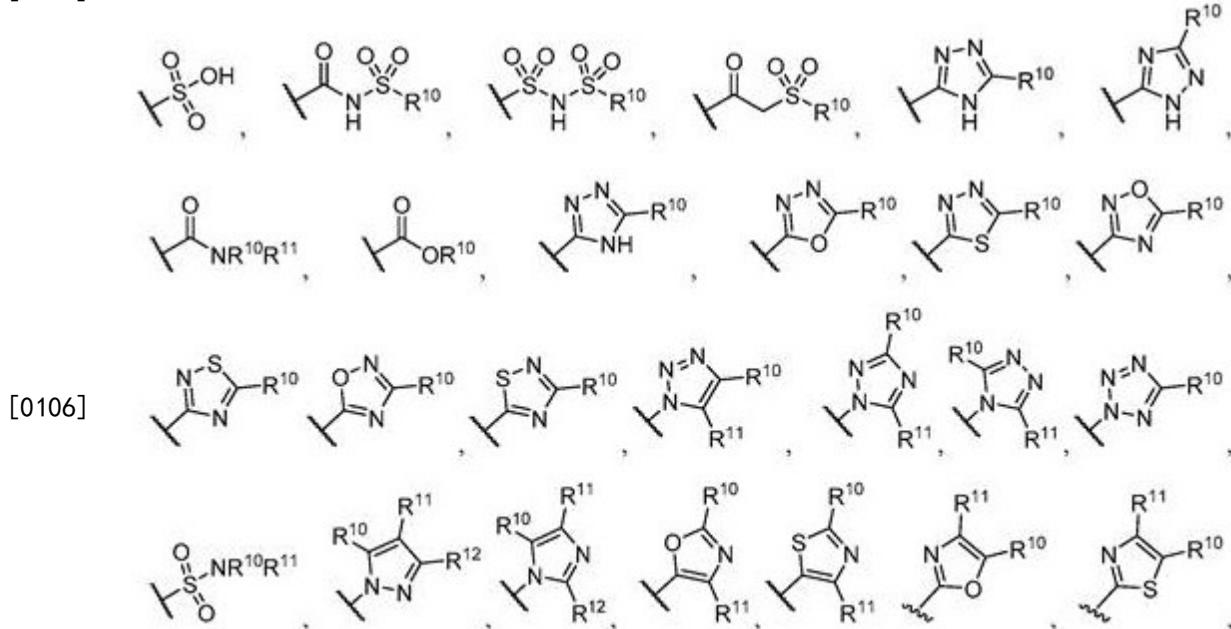
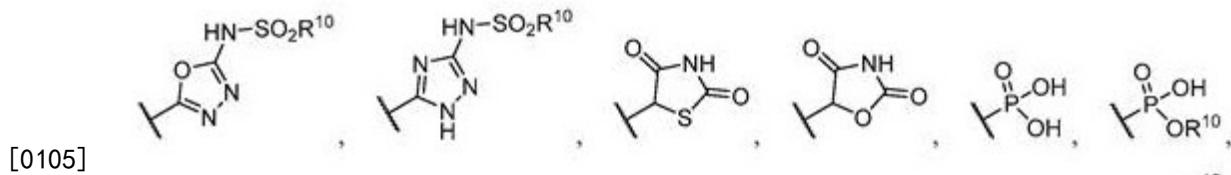
(II-B);

[0100] 其中 X、 R^1 和 R^3 如本文中所述。在根据前述的式 (II-B) 的一些实施方案中, R^3 是 OH。在某些组合中, R^1 是羧酸电子等排体且 R^3 是 H、F、Cl、Br、 CF_3 、 CHF_2 、 $-OCF_3$ 、 $-OCHF_2$ 、CN、 $-OC_{1-4}$ 烷基、 $-C\equiv CH$ 或环丙基。在某些组合中, R^1 是羧酸电子等排体且 R^3 是 H、F、Cl、Br、OH、 $-OCH_3$ 、 $-C\equiv CH$ 或环丙基。在其它组合中, R^1 为 COOH、羧酸酯、羧酸电子等排体或羧酸酯电子等排体; 且 R^3 为 OH。

[0101] 除非另有说明, 否则本文所述的实施方案包括其中 R^1 为 COOH 的其它实施方案。除非另有说明, 否则本文所述的实施方案包括其中 R^1 为 羧酸酯 的其它实施方案。在一些实施方案中, 羧酸酯是 $-C(O)OC_{1-6}$ 烷基或 $-C(O)OC_{3-6}$ 环烷基。除非另有说明, 否则本文所述的实施方案包括其中 R^1 为 羧酸电子等排体 的其它实施方案。除非另有说明, 否则本文所述的实施方案包括其中 R^1 为 羧酸酯电子等排体 的其它实施方案。

[0102] 包括在本文描述的实施方案中的是其中 R^1 为

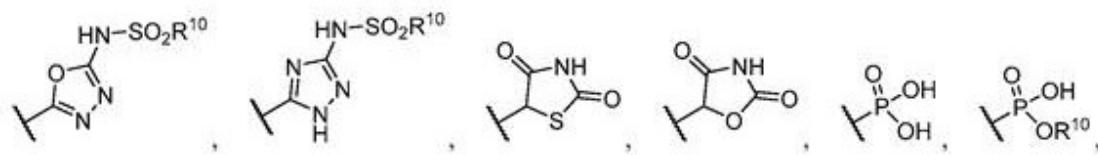
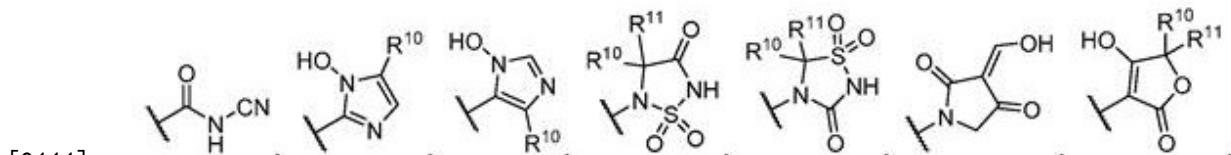
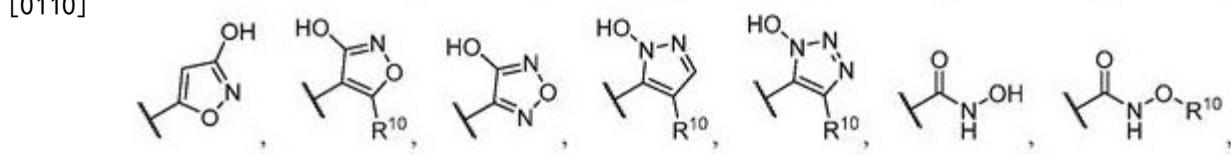
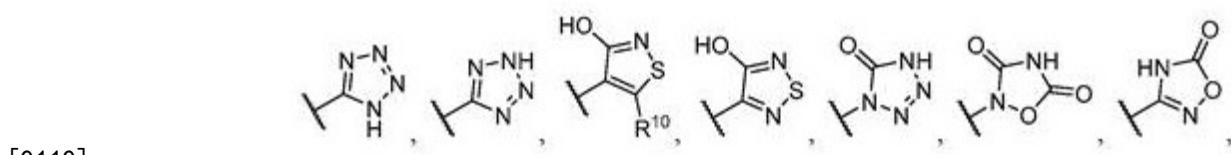


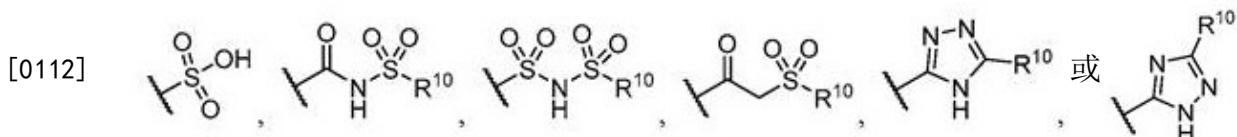


[0107] 或

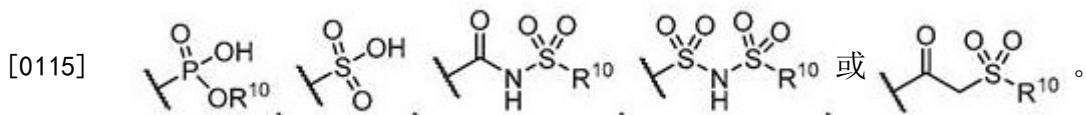
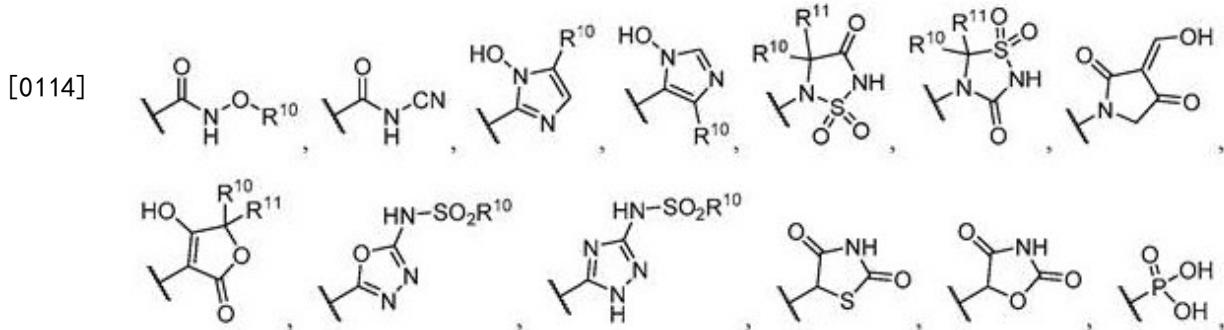
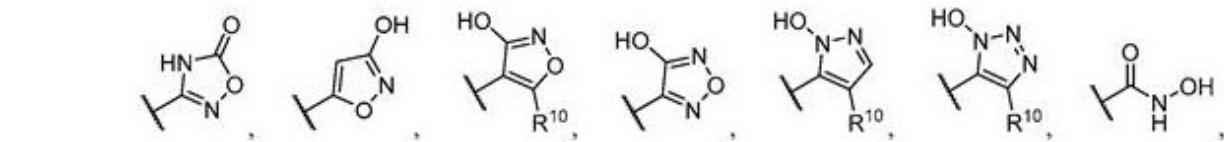
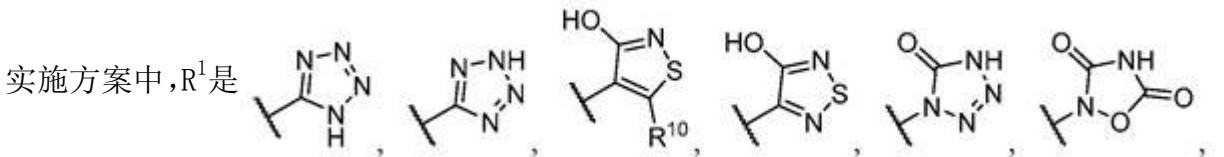
[0108] 其中R¹⁰、R¹¹和R¹²独立地选自H、D或C₁₋₆直链或环状饱和的或取代的烷基。

[0109] 包括在本文描述的实施方案中的是其中R¹为

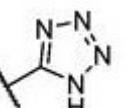


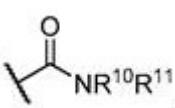


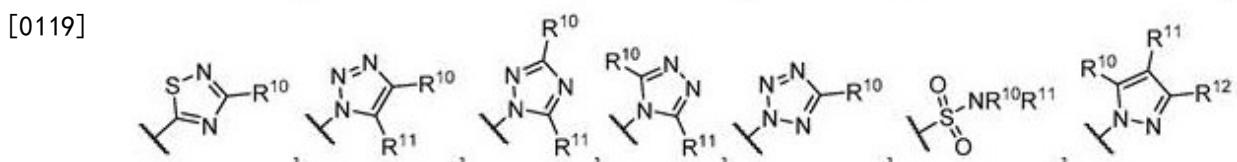
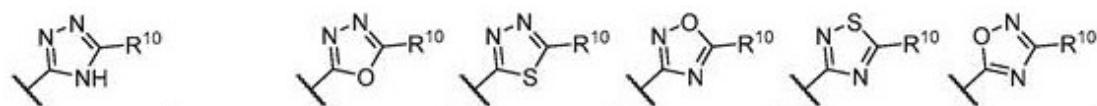
[0113] 的其它实施方案。前述R¹基团成员包括在术语“羧酸电子等排体”中。在进一步的

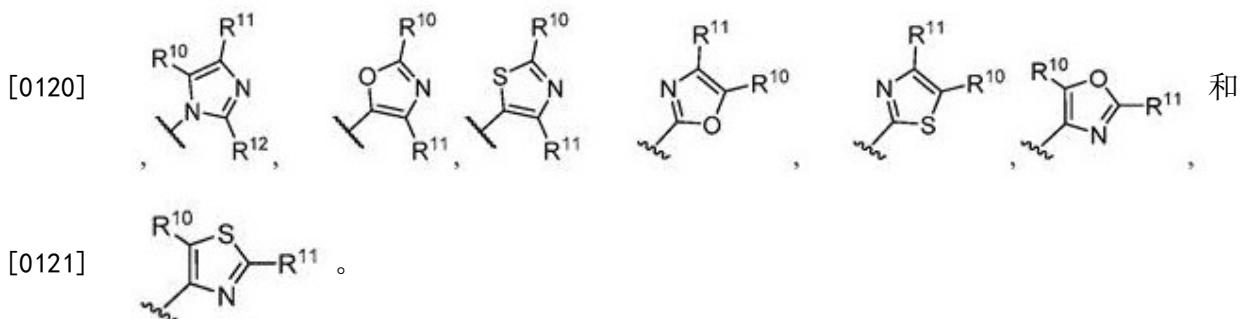


[0116] 在更进一步的实施方案和组合中,R¹⁰、R¹¹和R¹²独立地是H、D、C₁₋₆烷基或C₃₋₆环烷基。

[0117] 在更进一步的实施方案中,R¹是四唑(例如,)。

[0118] 根据前述,羧酸酯电子等排体包括





[0122] 在另一个方面,本发明提供了选自以下的化合物:

[0123] (R)-8-乙炔基-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸 (SH-053-2' F-R-CH₃酸);

[0124] (R)-8-溴-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸 (GL-II-93);

[0125] (R)-8-环丙基-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸 (GL-III-43);

[0126] (R)-8-氯-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸 (GL-III-54);

[0127] (R)-8-溴-4-甲基-6-(吡啶-2-基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸 (GL-II-51);

[0128] (R)-8-乙炔基-4-甲基-6-(吡啶-2-基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸 (GL-II-30);

[0129] (S)-7-甲氨基-1-(1H-四唑-5-基)-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-9-酮 (RJ-03-57);

[0130] (S)-N,7-二甲氨基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酰胺 (MRS-III-87);

[0131] (S)-N-氰基-7-甲氨基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酰胺 (MRS-III-90);

[0132] (S)-7-羟基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酸乙酯 (RJ-02-50);

[0133] (S)-7-羟基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酸 (RJ-03-90);

[0134] (S)-7-羟基-1-(噁唑-5-基)-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-9-酮 (RJ-03-30);和

[0135] (S)-7-羟基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酸叔丁酯 (RJ-02-67);

[0136] 或其药学上可接受的盐。

[0137] 在另一个方面,本发明提供了选自以下的化合物:

[0138] 5-(8-乙炔基-6-(吡啶-2-基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-基)噁唑 (KRM-II-81);

[0139] 5-(8-乙炔基-6-苯基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-基)噁唑

(KRM-II-82)；

[0140] 5-(8-乙炔基-6-(2-氟苯基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-基)噁唑 (KRM-II-18B)；

[0141] (R)-8-乙炔基-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸甲酯 (MP-III-004)；

[0142] (R)-8-乙炔基-6-(2-氟苯基)-N,4-二甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酰胺 (MP-III-022)；

[0143] 8-乙炔基-6-(吡啶-2-基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸(乙基-1,1-d₂)酯 (MP-III-068)；

[0144] 5-(8-乙炔基-6-(吡啶-2-基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-基)-3-甲基-1,2,4-噁二唑 (MP-III-085)；

[0145] 3-乙基-5-(8-乙炔基-6-(吡啶-2-基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-基)-1,2,4-噁二唑 (MP-III-080)；

[0146] 8-乙炔基-6-苯基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸乙酯 (XHe-II-053)；

[0147] 8-乙炔基-6-(吡啶-2-基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸乙酯 (HZ-166)；和

[0148] 8-乙炔基-6-(2-氟苯基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸乙酯 (JY-XHe-053)；

[0149] 或其药学上可接受的盐。

[0150] 对于根据本发明的化合物，其基团和取代基可以根据原子和取代基允许的化合价选择，从而所述选择和取代产生稳定的化合物，例如其不会例如通过重排、环化、消除等而自发地发生转化。

[0151] 当取代基由它们的从左到右书写的常规化学式指定时，它们任选地包括从右到左书写结构得到的取代基，例如-CH₂O-任选地也书写成-OCH₂-。

[0152] 根据本发明的化合物包括仅在一个或多个富含同位素的原子存在下不同的化合物。例如，化合物可以具有本发明结构，除了用氘或氚代替氢或者用富含¹³C-或¹⁴C-的碳代替碳之外。

[0153] 根据本发明的化合物可以呈盐的形式，例如药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”包括活性化合物的盐，其用相对无毒的酸或碱制备，这取决于化合物上存在的具体取代基。本发明的化合物的合适的药学上可接受的盐包括酸加成盐，其可以例如通过混合根据本发明的化合物的溶液与诸如以下药学上可接受的酸的溶液形成：盐酸、硫酸、甲磺酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、乙酸、苯甲酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、碳酸或磷酸。此外，当本发明化合物带有酸性基团时，其合适的药学上可接受的盐可包括碱金属盐，例如钠盐或钾盐，碱土金属盐，例如钙盐或镁盐；和与合适的有机配体形成的盐，例如季铵盐。

[0154] 化合物的中性形式可以通过将盐与碱或酸接触并以常规方式分离母体化合物来再生。该化合物的母体形式在某些物理性质(例如在极性溶剂中的溶解度)上不同于各种盐形式，但是对于本公开的目的而言，在其它方面盐与化合物的母体形式等同。

[0155] 除了盐形式外，本发明可以还提供前药形式的根据本发明的化合物。化合物的前

药为在生理条件下容易经历化学改变以提供活性化合物的那些化合物。前药可以通过化学或生化方法在离体环境中转变为本发明的化合物。例如,当将前药置于具有合适的酶或化学试剂的透皮贴剂储库中时,前药可以缓慢转化为本发明的化合物。

[0156] 本文描述的化合物可以以立体异构体存在,其中存在不对称(或手性)中心。取决于手性碳原子周围的取代基的构型,这些立体异构体是“R”或“S”。本文使用的术语“R”和“S”是IUPAC 1974 Recommendations for Section E, Fundamental Stereochemistry, Pure Appl. Chem., 1976, 45: 13-30中定义的构型。

[0157] 根据本发明的化合物可以是,例如,本文所述的立体异构体的对映异构体富集的异构体。如本文所用,对映异构体是指一对化学化合物中的任一种,其分子结构彼此具有镜像关系。例如,化合物可具有至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的对映异构体过量。

[0158] 根据本发明的化合物的制品(preparation)可以富集具有选择的立体化学(例如R或S,对应于选择的立体中心)的化合物的异构体。例如,该化合物可具有对应于具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的选择的立体中心的选择的立体化学的化合物的纯度。例如,化合物可包括本文公开的化合物的制品,其在选择的立体中心富集具有选择的立体化学(例如R或S)的一个或多个结构。

[0159] 在一些实施方案中,根据本发明的化合物的制品可以富集为化合物的非对映异构体的异构体(主题异构体)。如本文所用,非对映异构体是指具有两个或更多个手性中心的化合物的立体异构体,其不是相同化合物的另一种立体异构体的镜像。例如,该化合物可具有对应于具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的选择的非对映异构体的化合物的纯度。

[0160] 当没有对化合物中给定立体中心处的构型作出具体指示时,意图是任何一种构型或构型的混合物。本说明书中的式可以仅代表可能的互变异形式之一。应当理解,本文包括任何互变异构形式以及其混合物并且不仅限于化合物或式的命名中使用的任何一种互变异构形式。

[0161] 化合物可以通过立体有择合成或通过拆分以外消旋形式或作为单独的对映异构体或非对映异构体制备。所述化合物可以,例如,通过标准技术,诸如通过与光学活性碱形成盐而形成立体异构体对,随后分步结晶和再生游离酸,拆分成其组分对映异构体或非对映异构体。所述化合物也可以通过形成立体异构性酯或酰胺、随后色谱分离和除去手性助剂而拆分。或者,所述化合物可以使用手性HPLC柱进行拆分。对映异构体也可以使用脂肪酶从相应酯的外消旋体的动力学拆分中获得。

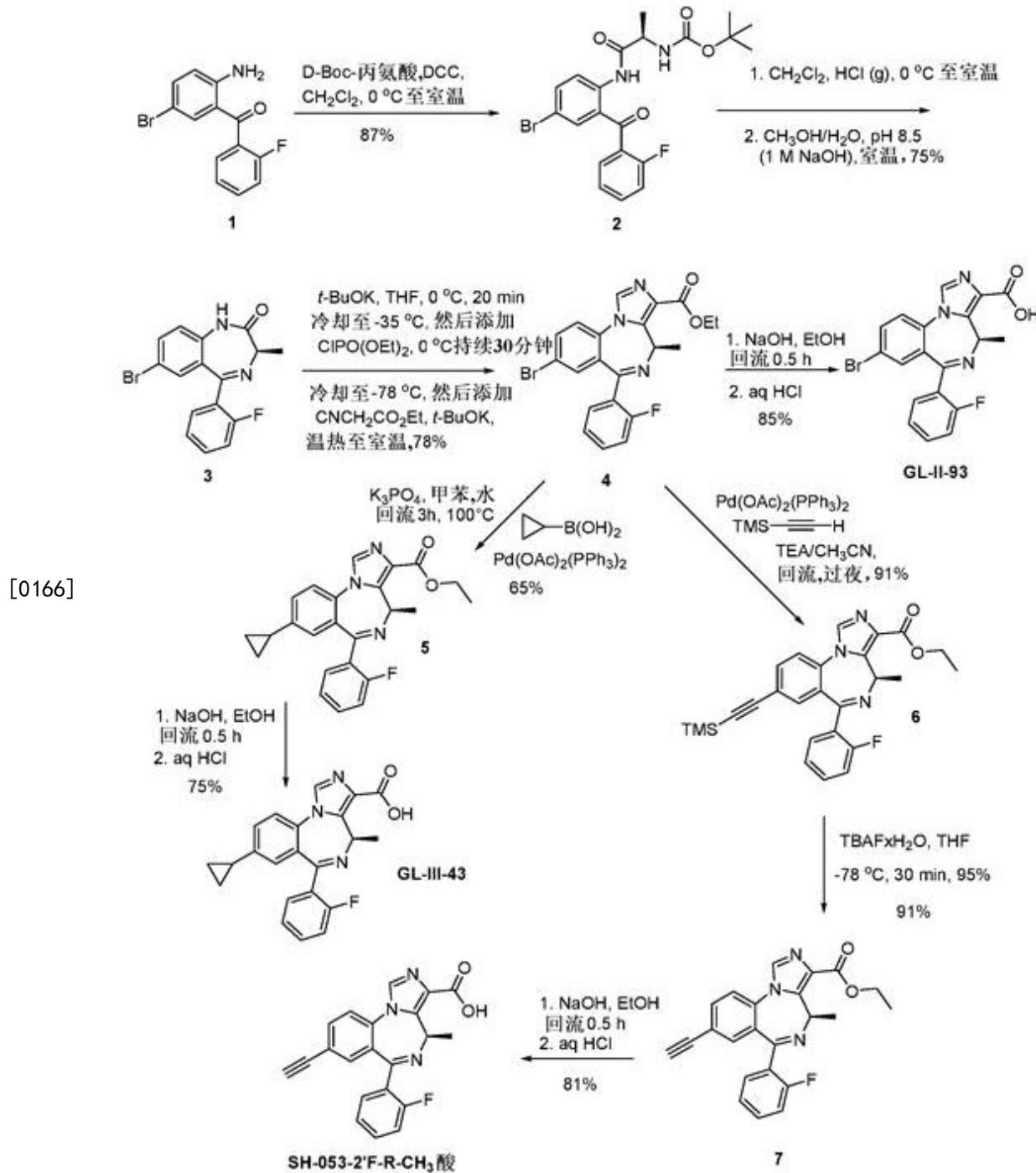
[0162] 根据本发明的化合物还可以通过添加适当的官能团来改性以增强选择性生物学性质。这种改性是本领域已知的,并且包括增加向给定的生物系统(例如,血液、淋巴系统、中枢神经系统)中的生物渗透、增加口服利用度、增加溶解度以允许通过注射施用、改变代谢和改变排泄率的那些。这些改性的实例包括但不限于用聚乙二醇酯化、用特戊酸酯(pivolate)或脂肪酸取代基衍生化、转化成氨基甲酸酯、芳环的羟基化和芳环中的杂原子取代。

[0163] 本发明的化合物也可以改造成“软药”。软药可以定义为生物活性化合物,其在达到其所需的治疗效果后具有可预测和可控的向惰性物质的体内代谢。也就是说,本发明化合物可含有允许化合物在肺或其它靶组织中快速代谢的基团。在肺中,发现了几种细胞色

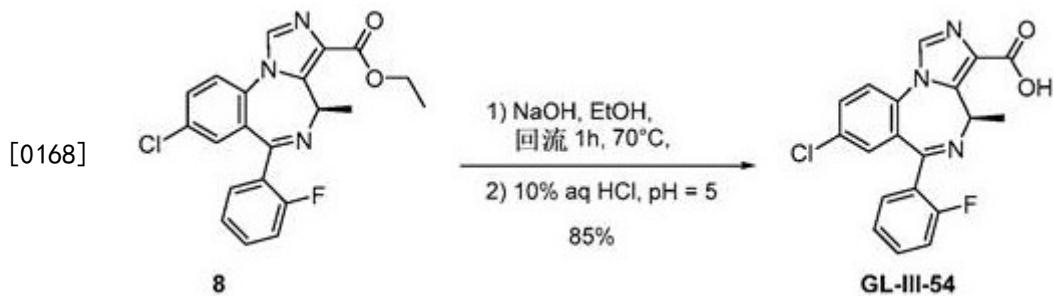
素同种型,以及其它生物转化酶,例如碘基转移酶、UDP葡萄糖醛酸基转移酶、谷胱甘肽S-转移酶、酯酶、肽酶、环加氧酶和黄素单加氧酶。广泛的生物转化酶能够代谢广谱的化学上不同的底物,例如具有不稳定酯功能的化合物。与没有该基团的化合物相比,软药具有更短的全身半衰期,并且可以限制不期望的全身作用(诸如分布到CNS组织)。

[0164] 化合物的合成

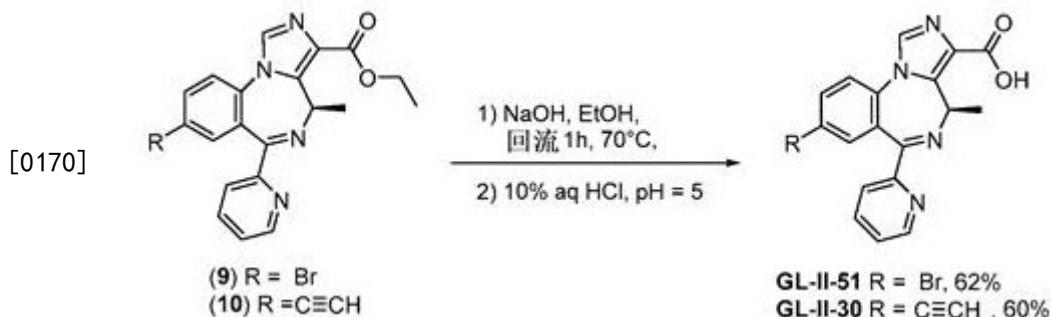
[0165] 式(I)和(II)化合物可使用市售原料合成。示例性的合成概述于方案1-5和(Cook, J.M., Zhou, H., Huang S., Sarma, P.V.V.S., Zhang, C., 2009. *Stereospecific anxiolytic and anticonvulsant agents with reduced muscle-relaxant, sedative hypnotic and ataxic effects, PCTW02006/004945A1, US专利7,618,958*)中。



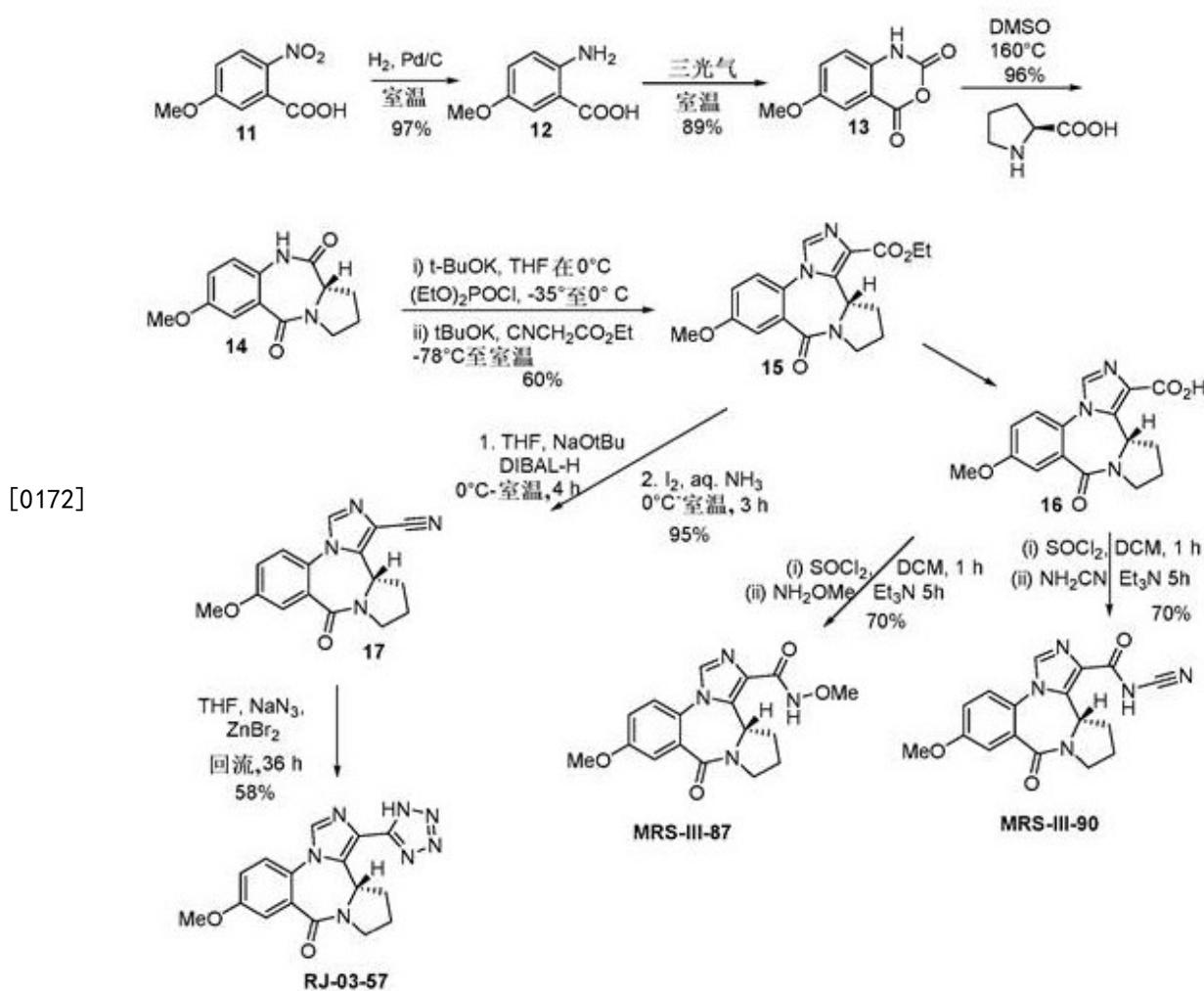
[0167] 方案1. 式(I)的化合物的合成部分I。



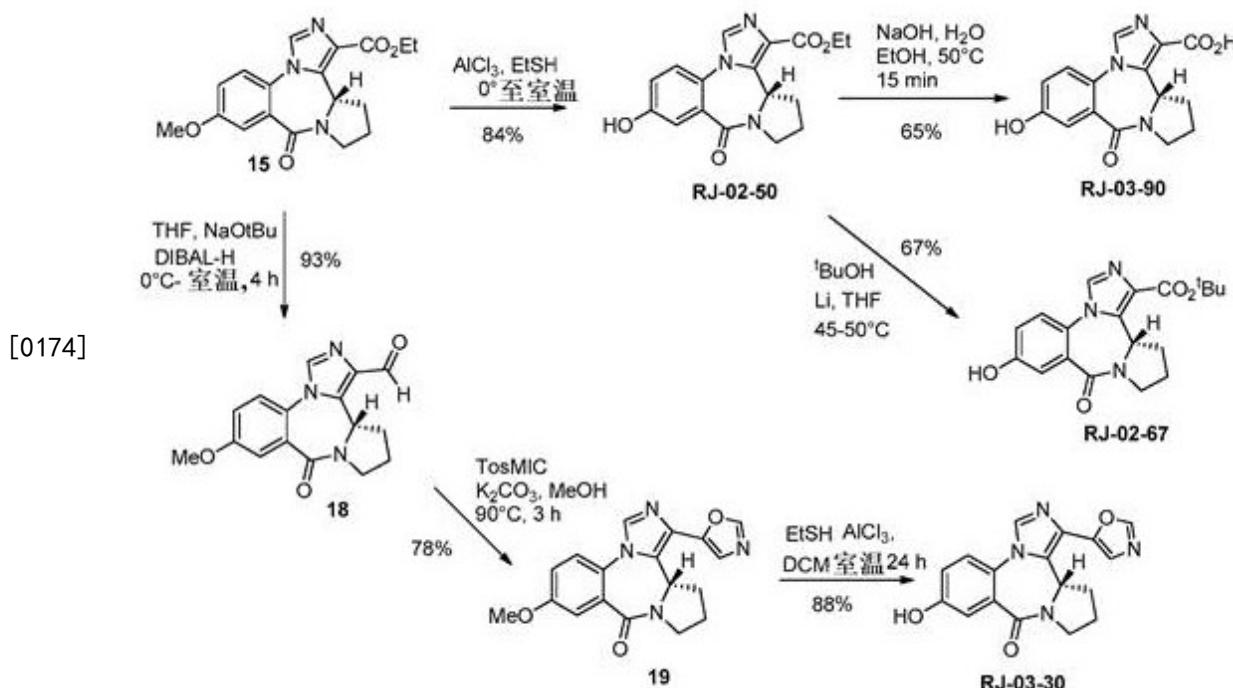
[0169] 方案2. 式(I)化合物的合成部分II。



[0171] 方案3. 式(I)化合物的合成部分III。



[0173] 方案4. 式(II)化合物的合成。



[0174] 方案5. 式(II)化合物的合成。

[0176] 式(II)化合物可使用市售原料合成。示例性合成示于此处的展示和 (Jahan et al. European J. Med Chem. 2017, 126, 550-560) 中。

[0177] 合成本文中式的化合物的其它方法是本领域普通技术人员显而易见的。用于合成化合物的合成化学转化和保护基团方法(保护和去保护)是本领域已知的并且包括例如如 R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene 和 P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第2版, John Wiley and Sons (1991); L. Fieser 和 M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); 和 L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995) 及其后续版本中所述的那些。

[0178] 评估化合物

[0179] 可以使用许多方法,包括受体结合研究和体内方法分析化合物。

[0180] 例如,可以例如使用竞争性结合测定来评估化合物的GABA_A亚基选择性。已经描述了这样的测定 (Choudhary等人. Mol Pharmacol. 1992, 42, 627-33; Savić等人. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 2010, 34, 376-386)。该测定涉及使用已知与GABA_A受体结合的放射性标记化合物,例如^{[3]H}氟硝西泮。可以收获膜蛋白并与放射性标记的化合物一起温育,并且可以通过比较放射性标记的化合物与另一种未标记的化合物(例如地西泮)的结合来评估非特异性结合。结合的放射活性可以通过液体闪烁计数来定量。膜蛋白浓度可使用市售的测定试剂盒(例如来自Bio-Rad, Hercules, CA)确定。

[0181] 还可以在非洲爪蟾卵母细胞或HEK293T细胞(过表达特定GABA_AR亚型)的电生理学测定中评估化合物。可以在加入GABA之前将化合物预先施加到细胞上,然后可以与化合物

共同施用直至观察到峰值响应。在施加之间,可以洗涤细胞以确保从脱敏中完全恢复。对于电流测量,可以用微电极刺穿细胞,并使用电压钳进行记录。

[0182] 本文所述的化合物可以是GABA_A受体配体,其与内源性气道平滑肌GABA_A受体结合并增强胆碱能气道平滑肌收缩的松弛。这是由于对 α_4 和 α_5 亚基处的苯并二氮杂草别构调节位点的靶向性增加。相对于那些GABA_A/ α_1 、GABA_A/ α_2 和GABA_A/ α_3 ,化合物可具有至少2倍,适当地至少5倍,且有利地至少10倍的对GABA_A/ α_4 和/或GABA_A/ α_5 别构调节位点的选择性功效。然而,对GABA_A/ α_4 和/或GABA_A/ α_5 受体上的苯并二氮杂草别构调节结合位点没有选择性的化合物也包括在本发明的范围内。通过证明在其它GABA_A受体的苯并二氮杂草别构调节位点处的功效降低,这些化合物将理想地显示出功能选择性。

[0183] 相比于GABA_A/ α_4 或GABA_A/ α_5 亚基上的苯并二氮杂草别构调节位点,选择性或优先治疗剂具有较低的对GABA_A受体上的其它苯并二氮杂草别构调节位点的结合亲和力或效力。或者,所述试剂以可比的亲和力靶向所有GABA_A受体上的苯并二氮杂草别构调节位点,但与其它GABA_A受体上的那些相比,对GABA_A/ α_4 和GABA_A/ α_5 受体上的苯并二氮杂草别构调节结合位点展现出优先效力。相对于GABA_A/ α_2 和GABA_A/ α_3 受体,本发明的选择剂还可具有更大或更小的结合其它GABA_A受体上的苯并二氮杂草别构调节位点的能力。

[0184] 评估化合物的其它方法对于本领域技术人员是已知的。为了评估化合物的不良副作用(毒性),可以监测动物的神经学或肌肉功能受损的明显迹象。在小鼠中,旋转杆程序(Dunham, M. S. 等人*J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.* 1957, 46, 208-209)用于公开最小的肌肉或神经损伤。当将小鼠放置在以6转/分钟(rpm)的速度旋转的杆上时,动物可以长时间保持其平衡。如果它在1分钟时间内从该旋转杆上掉落三次,则认为该化合物是有毒的。在大鼠中,共济失调表明最小的运动缺陷,其表现为异常的、共济失调的步态。在施用测试药物之前检查用于评估毒性的大鼠,因为个体动物可能具有步态、平衡、放置反应等的特性,这可能错误地归因于测试物质。动物可能表现出圆形或锯齿形的步态、异常的体位和腿部的伸展、震颤、活动过度、缺乏探索行为、嗜睡、昏迷、僵住、失去放置反应和肌肉张力的变化。

[0185] 本文所述的化合物可降低哮喘动物模型中的气道高反应性。因此,在第0、7和14天,在100 μ L的总体积中,腹膜内(i.p.)注射以2mg乳化的2mg/kg/天的卵清蛋白(Ova),可以使小鼠致敏3次。此外,从第23-27天开始,可以用1mg/kg/天的Ova鼻内(i.n.)攻击小鼠5天。对照小鼠可以用Ova致敏并用盐水攻击。气道高反应性测量可以使用DSI的Buxco® FinePointe Non-Invasive Airway Mechanics (NAM) 仪器进行,该仪器由鼻室和胸室组成,允许计算比气道阻力(sRaw)。经过治疗的有意识的、自发呼吸的Ova S/C小鼠可以暴露于雾化磷酸盐缓冲盐水(PBS)(用于基线测量)或乙酰甲胆碱(1.5625-12.5 mg/mL) 1分钟,并且可以在每次雾化之后取得读数(sRaw)并平均3分钟。

[0186] 可以在Ova S/C小鼠的支气管肺泡灌洗液(BALF)中研究由化合物引起的特异性免疫细胞数量的变化。因此,可以进行支气管肺泡灌洗,然后裂解红细胞。用BALF温育细胞类型特异性抗体可允许使用流式细胞术定量白血球,例如嗜酸性粒细胞和CD4⁺ T淋巴细胞。

[0187] 可以通过电生理学研究化合物和CD4⁺ T细胞之间的直接相互作用。因此,可以从哮喘小鼠的脾中分离CD4⁺ T细胞,并在自动膜片钳实验期间用化合物处理。

[0188] 可以在Ova S/C小鼠的肺中研究由化合物引起的细胞因子表达的变化。因此,可以

收获经处理和未经处理的哮喘小鼠的肺，均质化并通过离心澄清。可以用特异性抗体和流式细胞术鉴定和定量细胞因子。

[0189] 可以在动物中研究化合物的药代动力学特性。因此，动物可以以不同的时间间隔暴露于化合物。使用特定的制备方案，然后使用质谱法定量，可以对血液、肺和脑进行化合物浓度的定量。

[0190] 化合物的细胞毒性可以通过用递增浓度的化合物处理HEK293人胚肾细胞24-48小时，然后使用Cell-Titer Glo (Promega) 定量活细胞来评估。

[0191] 组合物和给药途径

[0192] 另一方面，本发明提供药物组合物，其包含一种或多种本发明化合物和药学上可接受的载体。此类组合物可以是单位剂型，例如片剂、丸剂、胶囊、粉末、颗粒、无菌肠胃外溶液或悬浮液、计量气雾剂或液体喷雾剂、滴剂、安瓿、自动注射器装置或栓剂；用于口服、肠胃外、鼻内、舌下或直肠给药，或通过吸入或吹入给药。还设想可将化合物掺入透皮贴剂中，所述透皮贴剂设计成以连续方式递送适量的药物。为了制备固体组合物诸如片剂，将主要活性成分与药物载体，例如常规的制片成分诸如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶；和其它药物稀释剂，例如水混合，以形成含有本发明的化合物或其药学上可接受的盐的均质混合物的固体制剂组合物。当提及这些制剂组合物为均质时，意指该活性组分均匀分散于该组合物内，使得该组合物可被容易地细分成同样有效的单位剂型诸如片剂、丸剂和胶囊。此固体制剂组合物接着被细分成上述类型的单位剂型，其含有0.1至约500 mg的本发明的活性组分。典型的单位剂型含有1-100mg活性成分，例如1、2、5、10、25、50或100mg活性成分。新颖组合物的片剂或丸剂可被包衣或以其它方式配混以提供具有长效优点的剂型。例如，该片剂或丸剂可包含内部剂量和外部剂量组分，后者呈前者的包膜的形式。该两种组分可通过肠溶层分开，该肠溶层用来抵抗胃中的崩解，且允许内部组分完整通过到达十二指肠或被延迟释放。各种材料可用于此类肠溶层或包衣，此类材料包括许多聚合酸和聚合酸与材料诸如虫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素的混合物。

[0193] 用于口服或注射施用的、可以在其中掺入本发明的组合物的液体形式包括水溶液、适当矫味的糖浆剂、水性或油性混悬液和含有食用油(诸如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油)的矫味乳剂，以及酏剂和类似的药物媒介物。用于水性混悬液的合适的分散剂或悬浮剂包括合成的和天然的树胶诸如黄蓍胶、阿拉伯胶、海藻酸盐、葡聚糖、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮或明胶。

[0194] 适合的剂量水平是约0.01至250 mg/kg/天、约0.05至100 mg/kg/天或约0.05至5 mg/kg/天。化合物可以每天1至4次的方案给药，或者通过例如使用透皮贴剂连续给药。

[0195] 用于肠内给药，例如鼻腔、含服、直肠、舌下或特别是口服给药，以及用于肠胃外给药，例如静脉内、肌肉内、皮下、硬膜外(peridural)、硬膜上(epidural)或鞘内给药的药物组合物是合适的。药物组合物包含约1%至约95%的活性成分，或约20%至约90%的活性成分。

[0196] 对于包括冠状动脉内、脑血管内或外周血管注射/输注的肠胃外给药，优选使用亚基选择性GABAA受体激动剂的溶液，以及悬浮液或分散液，尤其是等渗水溶液、分散液或悬浮液，其例如可以在使用前不久制作。药物组合物可以是灭菌的和/或可以包含赋形剂，例如防腐剂、稳定剂、润湿剂和/或乳化剂、增溶剂、增粘剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲

剂，并且以本身已知的方式制备，例如，通过常规的溶解和冻干方法。

[0197] 对于口服药物制剂，合适的载体尤其是填充剂，例如糖，例如乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨醇，纤维素制剂和/或磷酸钙，以及粘合剂，例如淀粉、纤维素衍生物和/或聚乙烯吡咯烷酮，和/或如果需要，崩解剂、流动调节剂和润滑剂，例如硬脂酸或其盐和/或聚乙二醇。片剂核心可以提供有合适的任选肠溶包衣。可以向片剂或片剂包衣中加入染料或颜料，例如用于鉴别目的或为了指示活性成分的不同剂量。用于口服给药的药物组合物还包括由明胶组成的硬胶囊以及由明胶和增塑剂，如甘油或山梨醇组成的软密封胶囊。胶囊可以含有颗粒形式，或溶解或悬浮在合适的液体赋形剂中，例如油中的活性成分。

[0198] 还考虑透皮应用，例如使用透皮贴剂，其允许在延长的时间段内给药，例如1至20天。

[0199] 使用方法

[0200] 本发明提供减轻气道收缩的方法，包括给予有效量的式(I)或(II)的化合物或组合物或其盐。在一些实施方案中，与治疗剂量的地西洋相比，式(I)或(II)化合物在对象中具有降低的苯并二氮杂草型CNS作用。在一些实施方案中，在麻醉期间发生气道收缩。

[0201] 本发明进一步提供减轻肺部炎症的方法，包括将有效量的式(I)或(II)的化合物或组合物或其药学上可接受的盐给予有需要的对象。在一些实施方案中，与治疗剂量的地西洋相比，式(I)或(II)化合物在对象中具有降低的苯并二氮杂草型CNS作用。在一些实施方案中，肺部炎症与哮喘、慢性阻塞性肺病、肺气肿、囊性纤维化、肺纤维化、支气管扩张、纤维化肺泡炎、韦格纳肉芽肿病、内源性肺泡炎或感染有关。感染适当地由病毒、细菌和/或真菌剂引起。

[0202] 肺部炎症可以通过肺功能受损、呼吸短促(特别是伴随费力或运动)、咳嗽或呼吸困难而在患者中得到证实。各种诊断工具，包括胸部X光、CT扫描和肺功能试验，用于诊断炎性肺病。肺功能和运动试验可用于确定炎症损害的肺活量。可以获得来自肺部的组织样品以更明确地诊断炎症。这可以通过支气管镜检查(经支气管活组织检查)或支气管肺泡灌洗或外科肺活检获得。在组织学上，炎症可以表现为痰和支气管肺泡灌洗液或肺实质或气道中巨噬细胞、淋巴细胞或多种核细胞的数量增加。免疫/炎性细胞向肺的迁移和活化受多种不同介质，包括由各种炎性和驻留细胞分泌的蛋白酶、细胞因子和趋化因子的调节。

[0203] 另一方面，本发明提供一种减少患有与肺部炎症相关的风险因素的对象的疾病发展的方法，包括将有效量的式(I)或(II)的化合物或组合物或其药学上可接受的盐给予有需要的对象。在一些实施方案中，与治疗剂量的地西洋相比，式(I)或(II)的化合物在对象中具有降低的苯并二氮杂草型CNS作用。

[0204] 许多因素可能会增加发展炎性肺病的可能性：低出生体重、具有患有例如哮喘等病症的血亲亲戚(因此具有遗传倾向)、特定基因突变的存在(如在囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)基因中)、肥胖、吸烟或暴露于烟雾(包括子宫内暴露)、暴露于废气或其它类型的环境污染、或暴露于工业或农业化学品。

[0205] 在一些实施方案中，肺部炎症与哮喘、慢性阻塞性肺病、肺气肿、囊性纤维化、肺纤维化、支气管扩张、纤维化肺泡炎、韦格纳肉芽肿病、内源性肺泡炎或感染有关。感染适当地由病毒、细菌和/或真菌剂引起。

[0206] 本发明进一步提供减轻患有自身免疫疾病的对象的炎症的方法，包括将有效量的

式(I)或(II)的化合物或组合物或其药学上可接受的盐给予有需要的对象。在一些实施方案中,与治疗剂量的地西泮相比,式(I)或(II)的化合物在对象中具有降低的苯并二氮杂草型CNS作用。在一些实施方案中,自身免疫疾病选自关节炎、糖尿病、狼疮和克罗恩病。

[0207] 下述非限制性实施例预期是纯粹示例一些方面和实施方案,并且显示依照公开内容进行的具体实验。

实施例

[0208] 实施例1. (R)-8-乙炔基-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸(SH-053-2'F-R-CH₃-酸)的合成

[0209] 将化合物7 (2.0 g, 5.16 mmol) 在乙醇(100 mL) 中搅拌并加入3M氢氧化钠(20 mL, 60 mmol), 将溶液加热并回流1小时。然后, 将反应溶液冷却至室温并用水(100 mL)稀释。将该溶液置于减压下直至剩余一半溶剂。将剩余的反应混合物在室温下搅拌并在室温下逐滴加入盐酸(1M) 直至产物沉淀出来。过滤产物, 用水冲洗并干燥, 得到纯酸SH-053-2'F-R-CH₃-酸, 为白色固体(81%收率): ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.42 (s, 1H), 7.94 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.82 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.56 (dt, 2H, J = 7.8, 6.5 Hz), 7.33 (t, 1H, J = 7.4 Hz), 7.22 (t, 2H, J = 9.3 Hz), 6.53 (d, 1H, J = 7.1 Hz), 2.51 (s, 1H), 1.16 (d, 3H, J = 6.8 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d6) δ 164.76, 162.81, 158.19, 140.57, 136.57, 135.54, 134.74, 133.18, 132.65, 131.88, 129.88, 129.35, 125.17, 123.98, 121.09, 116.53, 116.25, 83.42, 82.01, 49.79, 15.08; HRMS (LCMS-IT-TOF) C₂₁H₁₄FN₃O₂ (M + H)⁺计算值: 360.1143, 实测值: 360.1140。

[0210] 实施例2. (R)-8-溴-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸(GL-II-93)的合成

[0211] 将化合物4 (5.1 g, 11.5 mmol) 溶解在EtOH (150 mL) 中, 然后将固体NaOH (0.9 g, 23 mmol) 加入到该溶液中。将该反应混合物加热至70℃保持1小时, 减压除去EtOH。将剩余的水溶液在0℃下搅拌10分钟, 然后向溶液中滴加10%HCl水溶液直至pH为5(pH试纸)。将形成的浅白色沉淀物在溶液中放置10分钟, 然后通过过滤收集。用冷水洗涤固体, 水层也在室温下静置10小时, 得到另外的酸。将合并的固体在真空干燥箱中在80℃下干燥7小时, 得到纯的GL-II-93, 为白色粉末(4 g, 9.7 mmol, 85.2%): ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.12 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.55 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.50 - 7.37 (m, 2H), 7.25 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.07 - 6.99 (m, 1H), 6.78 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 1.27 (d, J = 6.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 164.94, 162.87, 161.09, 159.09, 141.28, 135.04, 134.91, 133.59, 133.08, 132.51, 132.12, 131.34, 131.11, 129.38, 128.16, 124.57, 123.91, 120.40, 116.30, 116.13, 49.83, 49.81, 49.83, 49.81; HRMS (LCMS-IT-TOF) C₁₉H₁₃N₃O₂FBr (M + H)⁺计算值: 414.0248, 实测值: 414.0235。

[0212] 实施例3. (R)-8-环丙基-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸(GL-III-43)的合成。

[0213] 将化合物4 (2.1 g, 4.8 mmol) 溶于甲苯(20 mL) 中。将环丙基硼酸(1.0 g, 12.0

mmol) 和水 (1.5 mL) 加入混合物中。连接回流冷凝器, 混合物在氩气下真空脱气; 这个过程重复四次。将双(三苯基膦)-乙酸钯(II) (0.72 g, 0.96 mmol) 和 K₃PO₄ 加入到反应混合物中, 将反应混合物用氩气/真空脱气另外四次。然后在氩气下将反应混合物加热至回流并搅拌3小时。通过添加冷水将反应混合物淬灭, 并用乙酸乙酯萃取。合并有机层, 用盐水 (2 x 150 mL) 洗涤, 用 Na₂SO₄ 干燥, 减压除去溶剂, 得到棕色固体。粗固体通过柱色谱法(硅胶, 乙酸乙酯/己烷 5:5) 纯化以提供纯化合物5, 为灰白色固体 (1.2 g, 3.0 mmol, 65%): ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (s, 1H), 7.55 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 13.3, 5.8 Hz, 1H), 7.19 (dd, J = 12.9, 6.1 Hz, 2H), 6.98 (dd, J = 18.9, 9.9 Hz, 2H), 6.64 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.45 - 4.25 (m, 2H), 1.91 - 1.78 (m, 1H), 1.38 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.24 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.04 - 0.88 (m, 2H), 0.59 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 164.17, 163.12, 161.12, 159.12, 143.88, 141.58, 134.85, 132.09, 131.65, 131.21, 129.16, 129.04, 128.47, 127.87, 124.33, 121.95, 116.08, 115.91, 60.59, 50.05, 15.04, 14.64, 14.44, 9.91, 9.89; HRMS (LCMS-IT-TOF) C₂₄H₂₂N₃O₂F (M + H)⁺ 计算值: 404.1769, 实测值: 404.1763。

[0214] 按照前述程序中针对GL-II-93概述的一般程序, 从化合物5制备GL-III-43, 得到 GL-III-43, 为白色固体 (0.62 g, 1.7 mmol, 75%): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 8.34 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.58 - 7.49 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.21 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.50 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 1.93 (m, J = 4.1 Hz, 1H), 1.13 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 0.61 (m, 2H); HRMS (LCMS-IT-TOF) C₂₂H₁₈N₃O₂F (M + H)⁺ 计算值: 376.1456, 实测值: 376.1453。

[0215] 实施例4. (R)-8-氯-6-(2-氟苯基)-4-甲基-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸(GL-III-54)的合成

[0216] 按照上面报道的一般程序, 从化合物8制备GL-III-54, 得到白色固体 (0.93 g, 2.5 mmol, 85%): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 8.41 (s, 1H), 7.97 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.84 (t, J = 10.0 Hz, 1H), 7.65 - 7.52 (m, 2H), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.27 - 7.14 (m, 2H), 6.56 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 1.17 (d, J = 6.9 Hz, 3H); HRMS (LCMS-IT-TOF) C₁₉H₁₃N₃O₂FC1 (M + H)⁺ 计算值: 370.0753, 实测值: 370.0752。

[0217] 实施例5. (R)-8-溴-4-甲基-6-(吡啶-2-基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸(GL-II-51)的合成

[0218] 按照上面报道的一般程序, 从化合物9制备GL-II-51, 得到白色固体 (0.87 g, 2.2 mmol, 62%): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 8.51 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.01 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.98 - 7.89 (m, 2H), 7.84 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.47 (m, 2H), 6.54 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 1.17 (d, J = 6.4 Hz, 3H); HRMS (LCMS-IT-TOF) C₁₈H₁₃N₄O₂Br (M + H)⁺ 计算值: 397.0295, 实测值: 397.0299。

[0219] 实施例6. (R)-8-乙炔基-4-甲基-6-(吡啶-2-基)-4H-苯并[f]咪唑并[1,5-a][1,4]二氮杂草-3-甲酸(GL-II-30)的合成

[0220] 按照上面报道的一般程序, 从化合物10制备GL-II-30, 得到白色固体 (1.06 g, 3.1 mmol, 60%): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 8.57 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 8.02

(dd, $J = 27.8, 13.9$ Hz, 2H), 7.84 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.40 - 7.31 (m, 1H), 6.72 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.15 (s, 1H), 1.25 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H); HRMS (LCMS-IT-TOF) $C_{20}H_{14}N_4O_2$ ($M + H$)⁺ 计算值: 343.1190, 实测值: 343.1188。

[0221] 实施例7. (S)-7-甲氧基-1-(1H-四唑-5-基)-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-9-酮(RJ-03-57)的合成

[0222] 在0°C下将DIBAL-H (1.2 M, 6.2 mL, 7.4 mmol) 加入到叔丁醇钠 (0.76 g, 7.9 mmol) 在20mL干燥的四氢呋喃中的溶液中。将所得混合物在室温下在氩气气氛下搅拌1小时。然后在0°C下将化合物15 (1.5 g, 4.4 mmol) 加入到上述溶液中并在室温下在氩气气氛下搅拌3小时(或直至完全消耗15)。之后, 在0°C下加入浓NH₃ (28%, 20 mL) 和I₂ (4.57 g, 18.0 mmol), 并将得到的混合物在室温下搅拌3小时。在醛中间体完全消失后, 将反应混合物用饱和硫代硫酸钠溶液 (~10 mL) 处理, 并用乙酸乙酯 (3x 30 mL) 萃取。合并的有机层用盐水洗涤, 经Na₂SO₄ 干燥并在减压下蒸发掉溶剂。用硅胶快速柱色谱法 (70%乙酸乙酯的己烷溶液) 纯化残余物, 得到腈17, 为白色固体, 1.225g, 95%。此时, 向腈17 (0.295 g, 1.0 mmol) 在30mL四氢呋喃中的溶液中加入ZnBr₂ (0.34 g, 1.50 mmol) 和NaN₃ (78 mg, 1.20 mmol), 加热混合物至回流持续36小时(或直到完全消耗17)。将溶液用1M HCl处理以溶解固体物质并使溶液的pH达到1。将该溶液用乙酸乙酯 (4x 40 mL) 萃取。减压蒸发溶剂, 用7%甲醇在二氯甲烷中的溶液使残余物通过短二氧化硅垫, 得到196 mg的RJ-03-57, 58 %。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.96-2.14 (m, 2H), 2.23-2.40 (m, 1H), 3.40-3.50 (m, 1H), 3.5-3.66 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.96-4.10 (m, 1H), 4.95 (d, 1H, $J = 8.34$ Hz), 7.31-7.38 (m, 1H), 7.43 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz), 7.69 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 8.60 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 24.7, 27.9, 46.6, 52.3, 56.3, 115.1, 119.2, 123.5, 126.0, 126.5, 130.9, 137.7, 155.4, 159.3, 163.3; HRMS (ESI) ($M - H$), $C_{16}H_{16}N_7O_2$ 计算值: 336.1360; 实测值: 336.1357。

[0223] 实施例8. (S)-N,7-二甲氧基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酰胺(MRS-III-87)的合成

[0224] 在氩气下, 将化合物16 (0.15 g)、亚硫酰氯 (1 mL) 和干燥的CH₂Cl₂ (8 mL) 的混合物加入到烘箱干燥的圆底烧瓶中。在氩气下, 使该悬浮液在52°C (外部油浴温度为60°C) 下回流1小时。溶液变成透明的黄色。通过薄层色谱 (TLC) (硅胶) 检查溶液确认不存在起始原料。在减压下除去有机溶剂和过量的亚硫酰氯。用干燥的二氯甲烷 (5 mL) 将其闪蒸, 重复两次, 以除去过量的亚硫酰氯和任何HCl。将得到的黄色残余物溶于干燥的CH₂Cl₂ (10 mL) 中并在氩气下冷却至0°C持续10分钟。然后在0°C下将甲基羟胺盐酸盐 (2.5当量) 和随后的三乙胺 (5当量) 加入到反应混合物中, 然后将混合物温热至室温并搅拌4小时。反应完成 (TLC, 硅胶) 后, 减压除去溶剂, 并向残余物中加入丙酮 (4mL)。过滤除去盐并减压除去溶剂, 得到MRS-III-87, 产率70%: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.14-2.22 (m, 2H), 2.30-2.39 (m, 1H), 3.08-3.10 (m, 1H), 3.51-3.57 (m, 1H), 3.75-3.80 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.72 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.14 (dd, 1H, $J = 8.8$ Hz, 2.7 Hz), 7.28 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.58 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 7.69 (s, 1H), 9.84 (bs, 1H); LCMS (ESI, m/z, 相对强度 (ESI)), $C_{17}H_{17}N_4O_4$ ($M - H$)⁺ 计算值: 341.35; 实测

值:341.00。

[0225] 实施例9. (S)-N-氰基-7-甲氧基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酰胺(MRS-III-90)的合成

[0226] 在氩气下,将化合物16 (0.15 g)、亚硫酰氯(1 mL)和干燥的CH₂Cl₂ (8 mL)的混合物加入到烘箱干燥的圆底烧瓶中。在氩气氛下,使该悬浮液在52°C (外部油浴温度为60°C) 下回流1小时。溶液变成透明的黄色。通过TLC (硅胶) 检查溶液证实不存在起始原料。在减压下除去有机溶剂和过量的亚硫酰氯。用干燥的CH₂Cl₂ (5 mL) 重复该蒸发几次,以除去过量的亚硫酰氯和任何HCl。将得到的黄色残余物溶于干燥的CH₂Cl₂ (10 mL) 中并在氩气下冷却至0°C持续10分钟。在0°C下将甲基氰胺(2.5当量),然后三乙胺(5当量)加入到反应混合物中,然后将混合物温热至室温并搅拌5小时。反应完成(TLC, 硅胶)后,减压除去溶剂,向残余物中加入丙酮(4mL)。滤掉盐,减压除去溶剂,得到MRS-III-90,收率70%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 2.10-2.13 (m, 2H), 3.34-3.58 (m, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.73 (d, 1H, J = 7.5 Hz, 主要旋转异构体83%), 4.84 (d, J = 7.5 Hz, 次要旋转异构体, 17%), 7.27-7.29 (m, 1H, 主要旋转异构体), 7.31-7.33 (m, 次要旋转异构体), 7.38 (d, 1H, J = 2.0 Hz, 主要旋转异构体), 7.41 (d, J = 2.5 Hz, 次要旋转异构体), 7.57 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 主要旋转异构体), 7.64 (d, J = 9.0 Hz, 次要旋转异构体), 8.00 (s, 1H, 主要旋转异构体), 8.21 (s, 次要旋转异构体), 9.49-10.11 (bs, 1H); LCMS (ESI, m/z, 相对强度(ESI), C₁₇H₁₄N₅O₃ (M-H)⁺ 计算值: 336.33; 实测值: 336.00。

[0227] 实施例10. (S)-7-羟基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酸乙酯(RJ-02-50)的合成:

[0228] 在烘箱干燥的圆底烧瓶中,加入干燥的CH₂Cl₂ (50 mL)并冷却至0°C。然后在0°C下将AlCl₃ (3 g, 22.8 mmol)和乙硫醇(4.5 mL, 60.8 mmol)缓慢加入上述烧瓶中。移去冰浴,使反应温热至室温。在AlCl₃完全溶解后,在室温下将酯15 (2.6 g, 7.62 mmol)加入混合物中并在Ar下搅拌24-36小时。在反应完成(TLC, 硅胶)后,将溶液倒在冰上并使用2N HCl水溶液酸化。将溶液分别用CH₂Cl₂萃取5-7次并用乙酸乙酯萃取3-4次。合并的有机层用盐水洗涤并干燥(Na₂SO₄)。减压除去溶剂,残留物通过快速柱色谱法在[硅胶, 4%甲醇在CH₂Cl₂中的溶液]上纯化,得到固体的RJ-02-50 (2.1 g), 产率84%: M.p => 260°C (分解); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 2.19-2.42 (m, 3H), 3.55-3.64 (m, 2H), 3.81-3.89 (m, 1H), 4.42 (q, 2H, J = 7.1 Hz), 4.82 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 7.13 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, 2.6 Hz), 7.27-7.31 (m, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.91 (d, 1H, J = 2.6 Hz), 9.22 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 14.3, 24.4, 28.4, 46.9, 53.8, 61.2, 117.5, 120.8, 124.9, 125.2, 127.7, 129.5, 136.0, 137.2, 157.6, 162.8, 164.6; HRMS (ESI) (M+H)⁺, C₁₇H₁₈N₃O₄计算值: 328.1292; 实测值: 328.1293。

[0229] 实施例11. (S)-7-羟基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酸(RJ-03-90)的合成

[0230] 将RJ-02-50 (1.52 g, 4.6 mmol)溶于乙醇(4 mL)和H₂O (3 mL)的混合物中,然后向溶液中加入固体NaOH (1.0 g, 25.0 mmol)。将该反应混合物加热至50°C持续15分钟,

在减压下除去乙醇。将剩余的水溶液在0℃下搅拌10分钟,然后向溶液中逐滴加入浓HCl直至pH为3-4 (pH试纸)。将形成的浅黄色沉淀物留在溶液中,并将混合物在室温下搅拌2小时。过滤收集沉淀物,用冷水(2-5mL)洗涤,水层也在室温下静置10小时,得到另外的RJ-03-90。将合并的固体在真空干燥箱中在80℃下干燥7小时,得到纯的RJ-03-90,收率65%,¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 2.14-2.29 (m, 3H), 3.50-3.63 (m, 2H), 3.70-3.78 (m, 1H), 4.95 (d, 1H, 与溶剂峰合并), 7.15 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 3.0 Hz), 7.38-7.43 (m, 1H), 7.53 (d, 1H, J = 8.76 Hz), 8.48 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 24.0, 27.7, 46.2, 53.4, 116.2, 119.8, 124.5, 125.4, 128.4, 130.2, 136.2, 137.5, 158.2, 162.5, 164.4; HRMS (ESI) (M+H)⁺, C₁₅H₁₄N₃O₄计算值:300.0979; 实测值:300.0990。

[0231] 实施例12. (S)-7-羟基-9-氧代-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-1-甲酸叔丁酯(RJ-02-67)的合成

[0232] 向火焰干燥的圆底烧瓶中加入干燥的四氢呋喃(30 mL),并加入锂棒(过量,切成小块)。在室温下将干燥的叔丁醇(2.6 mL, 27.1 mmol)加入到上述烧瓶中,并将所得混合物在Ar下加热至45-50℃直至叔丁醇完全反应。将新制备的叔丁醇锂溶液用套管小心地转移到另一个装有RJ-02-50 (1.0 g, 2.71 mmol)的火焰干燥的圆底烧瓶中,并在50℃下在Ar下搅拌30分钟。反应完成(TLC, 硅胶)后,将烧瓶冷却至室温,减压除去四氢呋喃。向残余物中加入冰水(10 mL),然后用乙酸乙酯萃取。有机层用水(2 x 10 mL)和盐水(15 mL)洗涤。减压除去溶剂,并通过快速柱色谱法[硅胶, 乙酸乙酯/己烷 (7:3)]纯化残余物,得到固体的RJ-02-67 (0.72 g),产率65%。M.p = 174-175℃;¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.63 (s, 9H), 2.09-2.34 (m, 3H), 3.50-3.62 (m, 2H), 3.77-3.85 (m, 1H), 4.79 (d, 1H, J = 7.1 Hz), 7.10 (dd, 1H, J = 8.6 Hz, 2.2 Hz), 7.23-7.28 (m, 1H), 7.77 (bs, 1H), 7.85 (s, 1H), 9.75 (bs, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 24.4, 28.2, 28.3, 46.9, 53.7, 82.0, 117.4, 120.7, 124.9, 125.1, 129.1, 129.6, 135.8, 136.2, 157.7, 162.3, 164.6; HRMS (ESI) (M+H)⁺, C₁₉H₂₂N₃O₄计算值:356.1605; 实测值:356.1615。

[0233] 实施例13. (S)-7-羟基-1-(噁唑-5-基)-11,12,13,13a-四氢-9H-苯并[e]咪唑并[5,1-c]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂草-9-酮(RJ-03-30)的合成:

[0234] 在0℃下将DIBAL-H (1M, 20.4 mL, 20.4 mmol)加入到叔丁醇钠(2.02 g, 21.02 mmol)在30mL干燥的四氢呋喃中的溶液中。将所得混合物在室温下在氩气气氛下搅拌1小时。然后在0℃下将化合物15 (4 g, 11.72 mmol)加入到上述溶液中并在室温下在氩气气氛下搅拌3小时(或直至完全消耗15)。反应完成后,通过小心地加入甲醇(~ 15 mL),然后加入5%HCl水溶液(20-30 mL)(在0 ℃)淬灭过量的DIBAL-H。然后将所得混合物温热至室温。将水层用CH₂Cl₂ (2x 50 mL)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤并干燥(Na₂SO₄)。减压除去溶剂,得到粗醛。通过快速色谱法(2:1乙酸乙酯/己烷)纯化该残余物,得到纯的二氮杂草醛18,为白色固体(3.325 g, 93%)。

[0235] 将甲苯磺酰基甲基异氰化物TosMIC (3.28 g, 16.8 mmol)置于干燥的双颈圆底烧瓶中并在氩气气氛下溶解在干燥的甲醇(40 mL)中。在室温下,向反应混合物中加入K₂CO₃ (4.64 g, 33.57 mmol)和醛18 (3.325 g, 11.18 mmol),将反应混合物加热回流持续3小

时。在通过TLC(硅胶乙酸乙酯)指示反应完成后,将反应混合物用冷水淬灭。此后,在减压下除去1/3的溶剂并用乙酸乙酯(3x 20 mL)萃取。将合并的有机层依次用水和盐水洗涤并干燥(Na_2SO_4)。然后减压除去溶剂,残余物通过硅胶快速色谱法纯化,得到纯的噁唑19,为白色固体(2.83 g, 75 %)。

[0236] 在烘箱干燥的圆底烧瓶中,取干燥的 CH_2Cl_2 (50 mL)并冷却至0 °C。然后在0 °C下将 AlCl_3 (3.33 g, 24.97 mmol)和乙硫醇(5.0 mL, 67.52 mmol)缓慢加入上述烧瓶中。移去冰浴,使反应温热至室温。在 AlCl_3 完全溶解后,在室温下向混合物中加入19 (2.8 g, 8.32 mmol)并在Ar下搅拌24-36小时。反应完成(TLC, 硅胶)后,将溶液倒入冰中,用2N HCl溶液酸化。将溶液分别用 CH_2Cl_2 萃取5-7次并用乙酸乙酯萃取3-4次。合并的有机层用盐水洗涤,经 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂,残余物通过快速柱色谱法在[硅胶, 4%甲醇在 CH_2Cl_2 中的溶液]上纯化,得到固体的RJ-03-30 (2.36 g), 产率88%。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.97-2.08 (m, 2H), 2.25-2.35 (m, 1H), 2.65-2.73 (m, 1H), 3.63-3.71 (m, 1H), 3.76-3.84 (m, 1H), 4.84-4.88 (m, 1H), 7.10 (dd, 1H, J = 8.6, 2.2 Hz), 7.30 (d, 1H, J = 5.3 Hz), 7.40 (s, 1H), 7.75 (d, 1H, J = 1.9 Hz), 7.95 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 9.85 (s, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 23.9, 27.8, 47.2, 52.8, 117.6, 120.8, 123.5, 124.7, 125.3, 126.2, 129.3, 131.9, 136.5, 145.4, 150.9, 157.5, 164.8; HRMS (ESI) ($M+\text{H}$) +, $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3$ 计算值: 323.1139; 实测值: 323.1130。

[0237] 实施例14. 测定 GABA_AR 亚型选择性

[0238] 可以识别对 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5-\text{GABA}_A\text{R}$ 具有选择性活性偏好的化合物。膜片钳测定法用于定量由含有单一 α -亚基的 GABA_AR 的激动作用引起的氯化物通量诱导的内向电流。这些结果可以证明精细区分 GABA_AR 受体 - 配体相互作用的功能活性的能力。对于非洲爪蟾卵母细胞的电生理学实验(Ramerstorfer等人. *European journal of pharmacology* 2010, 636, 8-27), 将成熟雌性非洲爪蟾(Nasco, Fort Atkinson, WI, USA)在冰冷的0.17%Tricain(间氨基苯甲酸乙酯)浴中麻醉,然后断头并转移青蛙的卵巢到ND96培养基(96 mM NaCl, 2 mM KC1, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES; pH 7.5)中。在1mg/mL胶原酶(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)中温育30分钟后,将第5至6阶段的卵母细胞从卵巢中挑出并使用铂丝环进行去滤泡膜。将卵母细胞储存并在18°C下在NDE培养基(96 mM NaCl, 2 mM KC1, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 1.8 mM CaCl₂; pH 7.5)中温育,所述培养基中补充有100U • mL⁻¹青霉素、100μg • mL⁻¹链霉素和2.5 mM丙酮酸盐。向卵母细胞注射mRNA水溶液。每个卵母细胞总共注射2.5ng mRNA。对于 $\alpha x\beta 3\gamma 2$ ($x = 1, 2, 3, 5$), 亚基比率为1:1:5, 对于 $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ 受体, 亚基比率为3:1:5。在电生理学记录之前,将注射的卵母细胞温育至少36小时。将卵母细胞置于NDE培养基浴中的尼龙载网上。对于电流测量,用两个微电极(2-3MΩ)刺穿卵母细胞,所述微电极用2M KC1填充。卵母细胞不断被6 mL • min⁻¹ NDE流清洗,所述NDE可转换为含有GABA和/或药物的NDE。将药物从二甲亚砜(DMSO)溶液稀释进NDE中,得到0.1%DMSO的终浓度。在mRNA注射的卵母细胞中测量的最大电流在所有受体亚型的微安范围内。为了测试化合物对GABA诱导的电流的调节,将逐步增加以引发个体卵母细胞(EC3-5)各自的最大GABA诱导电流的3-5%的GABA浓度与各种浓度的测试化合物一起施加给细胞。使用Warner OC-725C TEV (Warner Instrument, Hamden, CT, USA)或Dagan CA-1B卵母细胞钳或

Dagan TEV-200A TEV (Dagan Corporation, Minneapolis, MN, USA) 在室温下以-60mV的保持电位进行所有记录。数据使用Digidata 1322A或1550数据采集系统 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) 数字化, 使用Clampex 10.5软件 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 记录, 并使用Clampfit 10.5和GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA) 软件分析。使用Hill方程拟合浓度 - 响应数据。数据以来自两个批次的至少三个卵母细胞的平均值±SEM给出。或者, 化合物对 α 4和 α 5-GABA_AR的选择性可通过自动膜片钳测定法鉴定。因此, 膜片钳测定: 稳定表达 α 1 β 3 γ 2 GABAAR或 α 4 β 3 γ 2的HEK293T维持在具有L-谷氨酰胺的RPMI 1640培养基中, 其中补充有10% (v/v) 胎牛血清和1% 青霉素/链霉素 (Forkuo等人, *Molecular Pharmaceutics* 2016, 13, 2026-38)。简言之, IonFlux 板布局由12个孔的单元构成: 两个孔含有细胞内溶液(含有140mM的CsCl、1mM的CaCl₂、1mM的MgCl₂、11mM的EGTA、10mM的HEPES、用CsOH实现pH 7.2的ICS), 一个包含在细胞外溶液(含有140 mM NaCl、5.4 mM KCl、1 mM CaCl₂、10 mM D-葡萄糖一水合物和10 mM HEPES并用NaOH实现pH 7.4的ECS) 中稀释的细胞, 八个包含在GABA存在下的不同浓度的1 (EC₂₀浓度) (0.1% DMSO)。孔1用于收集废物。通过在整体记录阵列中对微观通道施加抽吸, 从悬浮液中捕获细胞。一旦阵列被完全占据, 所施加的抽吸就会破坏捕获细胞的膜, 其建立全细胞电压钳。对于化合物施用, 将压力施加到合适的化合物孔, 其将化合物引入快速流过细胞的细胞外溶液中。为了记录GABA_AR诱导的电流, 将细胞阵列电压钳制在-80mV的超极化保持电位。在自动膜片钳上使用之前, 将细胞以380g离心5分钟并轻轻重悬于ECS中。在将细胞分配到板中之前, 将其再重复两次。所有化合物施用进行3秒, 然后进行5秒冲洗。

[0239] 图1A和1B示出GABA_A受体亚型选择性。在图1A中, 示出SH-053-2' F-R-CH₃-酸对表达GABA_A受体亚型 α 1 β 3 γ 2、 α 2 β 3 γ 2、 α 3 β 3 γ 2、 α 4 β 3 γ 2和 α 5 β 3 γ 2的非洲爪蟾卵母细胞的GABA (EC3-5浓度) 引发的电流的剂量依赖性调节。数据点代表来自2批的2-8个卵母细胞的平均值±SEM, 其被标准化为在没有化合物的情况下对照电流 (100%)。SH-053-2' F-R-CH₃-酸是阳性 α 5 β 3 γ 2-选择性GABA_A受体调节剂。图1B示出采用RJ-02-50的自动膜片钳。使用表达 α 1 β 3 γ 2或 α 4 β 3 γ 2 GABAAR的HEK293T细胞在EC₂₀浓度的GABA和一起施加3秒的渐增浓度的化合物1存在下浓度依赖性负电流响应。将负电流读数标准化为设定为100%的EC₂₀浓度的GABA反应 (n = 16)。RJ-02-50是阳性 α 4 β 3 γ 2-选择性GABA_A受体调节剂。

[0240] 实施例15 . 测定化合物的细胞毒性。

[0241] 可以使用体外细胞毒性测定法鉴定具有增加的细胞毒性的化合物。因此, 购买人胚肾293T (HEK293T) 细胞系 (ATCC) 并在75cm²烧瓶 (CellStar) 中培养。细胞在DMEM/High Glucose (Hyclone, #SH3024301) 培养基中生长, 向该培养基添加了非必需氨基酸 (Hyclone, #SH30238.01)、10 mM HEPES (Hyclone, #SH302237.01)、5 x 10⁶单位的青霉素和链霉素 (Hyclone, #SV30010) 和10%热灭活的胎牛血清 (Gibco, #10082147)。使用0.05%胰蛋白酶 (Hyclone, #SH3023601) 收获细胞。使用CellTiter-Glo™ 发光细胞活力测定试剂盒 (Promega, Madison, WI) 评估细胞活力测定, 该试剂盒包含荧光素酶及除ATP之外的所有底物。使用的细胞毒性测定的对照是(E)-4-(4-(叔丁基)苯基)-4-氧代丁-2-烯酸10-(溴三苯基正膦基)癸酯 (400μM, 在DMSO中, 阳性对照) 和DMSO (阴性对照)。所有发光读数均在Tecan Infinite M1000读板器上进行。使用100 nL针式工具转移 (V & P Scientific) 在Tecan Freedom EVO液体处理系统上进行小体积转移。在96孔聚丙烯板

(Corning, #3365) 中进行系列稀释，并在384孔白色光学底板中进行测定。在三次独立运行中一式四份地 (quadruplet) 进行测定。将数据标准化至对照，并且如果可能，通过非线性回归(GraphPad Prism) 进行分析。

[0242] 表1. 在人肾和肝细胞存在下测定的化合物的细胞毒性。在最高达100 μ M浓度下所研究的化合物中没有一种诱发细胞毒性。对于大多数化合物，在400 μ M的浓度下未观察到毒性。

[0243]

化合物	LD ₅₀ HEK293 (μ M) (肾)	LD ₅₀ HEPG2 (μ M) (肝)
RJ-03-57	>200	>200
SH-053-2' F-R-CH ₃ -酸	>400	>400
GL-II-93	>400	>400
RJ-02-50	>400	>400
RJ-02-67	>400	>400
RJ-03-30	>400	>400

[0244] 实施例16. 旋转杆测定,以确定化合物诱导的CNS作用

[0245] 可以用旋转杆鉴定具有跨越血脑屏障和诱导CNS作用的能力的调节小鼠的感觉运动技能的化合物。训练雌性Swiss Webster小鼠以在旋转杆装置 (Omnitech Electronics Inc., Nova Scotia, Canada) 上以15rpm的恒定速度保持平衡,直到小鼠可以在三个连续的时间点进行三分钟。各组小鼠接受腹膜内 (i.p.) 注射媒介物 (10% DMSO, 40% 丙二醇和 50% PBS) 中的化合物或口服管饲 (p.o.) 媒介物 (2% 羟丙基甲基纤维素和2.5% 聚乙二醇) 中的化合物 (体积大约100 μ l)。每次注射后10分钟、30分钟和60分钟,将小鼠置于旋转杆上3分钟。如果小鼠在3分钟之前从旋转杆上掉落,则记录时间并对该组小鼠取平均值。非配对t检验(GraphPad Prism) 用于确定*p < 0.05、**p < 0.01 和***p < 0.001 的显著性。图2示出化合物对感觉运动协调的作用。Swiss Webster小鼠在化合物暴露后10、30和60分钟在旋转杆上以15rpm测试3分钟。小鼠 (N = 10) 接受单次注射 (i.p. 或 p.o.) 的测试化合物。如果在3分钟之前发生,则记录掉落时间。数据以平均值±SEM (N = 10) 表示。使用Student t-检验来计算显著性:与媒介物处理的小鼠相比,* (p < 0.05)、** (p < 0.01) 或*** (p < 0.001) 显著性。所研究的化合物中没有一种在所测试的浓度下诱导任何感觉运动损伤。

[0246] 实施例17. 化合物的微粒体稳定性

[0247] 化合物在体内的代谢稳定性可以通过化合物在肝微粒体存在下的稳定性来估计。因此,将4 μ L终浓度为10 μ M的测试化合物的1mM DMSO溶液在数字加热振荡干浴 (Fischer scientific, Pittsburgh, PA) 上在37°C下在总体积为391.2 μ L的包含282 μ L水、80 μ L磷酸盐缓冲液 (0.5 M, pH 7.4)、20 μ L NADPH再生系统溶液A (BD Bioscience, San Jose, CA) 和4 μ L NADPH再生系统溶液B (BD Bioscience, San Jose, CA) 的混合物中预温育5分钟。预温育后,通过加入蛋白质浓度为0.5mg/mL的8.8 μ L人肝微粒体 (BD Gentest, San Jose, CA) 或小鼠肝微粒体 (Life technologies, Rockford, IL) 引发反应。以0 (无微粒体)、10、20、30、40、50和60分钟的时间间隔取50 μ L的等分试样。将每个等分试样加入到100 μ L含有1 μ M维拉帕米HCL作为内标的冷乙腈溶液中。然后将其超声处理10秒,并以10,000rpm离心5分钟。将100 μ L上清液转移到Spin-X HPLC过滤管 (Corning Incorporated, NY) 中,并以13,000 rpm离心5分钟。将滤液进行100倍稀释,随后用Shimadzu LCMS 8040 (Shimadzu

Scientific Instruments, Columbia, MD)通过LC-MS/MS分析。计算每个时间点的内标和测试化合物的峰面积的比率，并将该比率的自然对数对时间作图，以确定线性斜率(k)。计算代谢率($k \times C_0/C$)、半衰期($0.693/k$)和内部清除率($V \times k$)，其中k为斜率， C_0 为测试化合物的初始浓度，C为微粒体浓度，且V是以 μL 计的温育体积/以mg计的微粒体蛋白质。所有实验重复两次，一式三份。

[0248] 表2. 用人和小鼠肝微粒体测试化合物的微粒体稳定性。除化合物RJ-02-67外，大多数化合物在人和小鼠肝微粒体存在下表现出相似的稳定性。当与人和小鼠肝微粒体一起温育时，在60分钟后，观察到超过90%的所有其它化合物。

[0249]

化合物	60分钟后保留的HLM%	60分钟后保留的MLM%
RJ-03-57	94.3 ± 0.1	98.3 ± 0.2
SH-053-2' F-R-CH ₃ -酸	92.0 ± 0.2	89.0 ± 0.3
RJ-02-50	91.7 ± 0.2	91.1 ± 0.1
RJ-02-67	90.6 ± 0.2	46.6 ± 0.3
RJ-03-30	91.8 ± 0.2	80.0 ± 0.3

[0250] 实施例18. 通过化合物松弛豚鼠气道平滑肌。

[0251] 所有研究均在哥伦比亚大学IACUC批准后进行。通过腹膜内戊巴比妥(100mg/kg)使成年雄性Hartley豚鼠安乐死。通过手术切除气管并横切成含有两个软骨环的横截面。用至少五次缓冲液交换将环洗涤一小时以除去任何戊巴比妥。在用棉签除去上皮后，将环在4mL夹套器官浴(Radnoti Glass Technology)中自两根丝线悬挂，将一根线连接到通过Biopac硬件和Acknowledge 7.3.3软件(Biopac Systems)与计算机偶联的Grass FT03力传感器(Grass-Telefactor)上用于肌肉张力的连续数字记录。将环浸浴在含10 μM吲哚美辛(0.01%的DMSO媒介物最终浓度)的4ml KH缓冲溶液(以mM计的组成:118 NaCl、5.6 KCl、0.5 CaCl₂、0.2 MgSO₄、25 NaHCO₃、1.3 NaH₂PO₄、5.6 D-葡萄糖)中，将所述缓冲溶液在pH 7.4，37°C下用95% O₂和5% CO₂连续地鼓泡。将环以1g等渗张力平衡1小时，每15分钟加入新的KH缓冲液。所有环均用10μM的N-香草基壬酰胺(辣椒碱类似物)预收缩，然后进行累积增加浓度的乙酰胆碱(0.1–100 μM)的两个循环，在这两个循环之间和之后进行大量缓冲液洗涤，将静息张力重置为1.0g。将河豚毒素(1μM)和吡拉明(10μM)加入浴中的缓冲液中以消除气道神经和组胺受体的混杂作用。在建立1.0g静息张力的稳定基线后，将气管环用1μM物质P收缩。达到峰值收缩后，将指定浓度的化合物或媒介物(0.1%DMSO)加入浴中。在化合物暴露后在指定时间点保留的初始收缩百分比表示为媒介物处理的组织中的剩余收缩力的百分比，并在组间比较。图3A-3C示出豚鼠气管环中的气道平滑肌收缩力。气管环用1mM物质P收缩，然后用50mM化合物或媒介物对照(0.1%DMSO)处理。在不同时间点测量保留收缩力的百分比，并表示为初始物质P诱导的收缩力的百分比。(N> 6) 双因素方差分析(2way ANOVA)用于计算*(p < 0.05)、** (p < 0.01)或*** (p < 0.001)的显著性。对每个条件给出p值。除了RJ-03-57之外，所有研究的化合物在15分钟后减少气道平滑肌的收缩至少60分钟的时间。

[0252] 实施例19. 通过化合物松弛人气道平滑肌。

[0253] 从人气管解剖人气道平滑肌条，所述气管从肺移植附带的健康供体肺获得。研究由哥伦比亚大学机构审查委员会(IRB)审核，并认为不是人类主题研究。如上所述将这些条

在充氧的KH缓冲液中的器官浴中于37°C以1.5g静息张力悬挂。在平衡1小时后(每15分钟进行缓冲液交换),用渐增浓度的乙酰胆碱(100nM-1mM)的3个循环收缩这些条,在这些预收缩挑战之间和之后进行大量缓冲液交换。将MK571(10μM)、吡拉明(10μM)和河豚毒素(1μM)加入到缓冲液中,然后将每个条收缩至其单独计算的乙酰胆碱的EC₅₀浓度。当达到收缩力增加的平稳期(通常15分钟)时,将100μM化合物或其媒介物(0.2%乙醇)加入到缓冲液中,并在1小时内连续测量收缩力的维持。在15、30、45和60分钟时保留的收缩力表示为初始乙酰胆碱诱导的收缩力的百分比。图4示出人气道平滑肌中的气道平滑肌收缩力。用EC₅₀浓度的乙酰胆碱(Ach)收缩人气管气道平滑肌条,然后用100 μM的SH-053-2F' F-R-CH3-酸或媒介物0.2%乙醇处理。在加入化合物后15、30、45和60分钟测量肌肉力。数据表示为初始Ach诱导的收缩力的百分比。使用来自至少七个人的个体肌肉条。使用双因素方差分析(2way ANOVA)计算*(p < 0.05)、** (p < 0.01)或*** (p < 0.001)的显著性。对于每个条件给出p值。SH-053-2F' F-R-CH3-酸在15分钟后减少人呼吸道平滑肌的收缩至少60分钟的时间。

[0254] 实施例20. 化合物对过敏原诱导的小鼠哮喘模型的作用。

[0255] 药物治疗方案:在2%羟丙基甲基纤维素溶液(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)和2.5%聚乙二醇(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)中制备化合物的无菌溶液,用于在生物安全柜中口服给药。通过用研钵和研杵研磨混合物获得细悬浮液。在ova攻击期间,通过口服管饲法(200μl)用20mg管饲针(Kent Scientific Corporation, Torrington CT)将药物以100mg/kg单独施用至ova s/c BALB/c组,每天两次,持续5天。刚好在气道参数测量之前,小鼠接受单p.o.剂量的化合物。用于i.p.注射的化合物在10%DMSO、40%丙二醇和50%PBS中制备,并以100μl注射给药。在给药后每天监测小鼠。评估气道高反应性:通过DSI的Buxco® FinePointe Non-Invasive Airway Mechanics (NAM)仪器测量有意识的自发呼吸的动物中的对乙酰甲胆碱的气道高反应性。在进行测量之前,使小鼠每天适应隔室15分钟,持续5天。此外,卵清蛋白致敏和攻击方案由随机化的雄性BALB/c小鼠组成,所述小鼠通过腹膜内(i.p.)注射2 mg/kg/d卵清蛋白(Ova) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)致敏3次,所述卵清蛋白在第0、7和14天,在100μL的总体积中,在2mg Alum (Imject Alum; Thermo Scientific, Pierce, Rockford, IL)中乳化。然后从第23-27天用1mg/kg/天的Ova鼻内(i.n.)攻击小鼠5天。对照小鼠用Ova致敏并用盐水攻击。在数据收集之前,每次也对腔室进行校准。简言之,鼻腔与胸腔组合允许计算比气道阻力(sRaw)。FinePointe软件计算比气道阻力(sRaw)且所有其它通气参数由NAM分析仪得出。将小鼠暴露于雾化的PBS(用于基线测量)或乙酰甲胆碱(1.5625-12.5 mg/mL)1分钟,并且在每次雾化后取出读数并平均3分钟。获得的数据表示为sRaw对比用于产生气溶胶的乙酰甲胆碱浓度(mg/mL)。图5A-5F示出化合物对气道高反应性的作用。通过DSI的Buxco FinePointe Non-Invasive Airway Mechanics仪器测量渐增剂量的乙酰甲胆碱的比气道阻力(sRaw)。通过口服管饲法给予Ova s/c BALB/c小鼠所有化合物,100mg/kg每天两次,持续5天。数据代表每组10只小鼠的平均值±SEM.*、**和***分别表示与媒介物处理的ova s/c BALB/c小鼠相比的p < 0.05、p < 0.01、p < 0.001的显著性。化合物RJ-03-57、RJ-03-30和GL-III-43不能减轻气道高反应性。然而,化合物SH-053-2F' F-R-CH3-酸、GL-II-93和RJ-02-50降低一种或多种乙酰甲胆碱浓度下的气道高反应性。

[0256] 实施例21. 化合物的药代动力学分析。

[0257] 测定小鼠的药代动力学参数。雌性Swiss Webster小鼠接受胃内管饲媒介物或化合物,所述化合物以25mg/kg的剂量配制在2%羟丙基甲基纤维素溶液和2.5%聚乙二醇中。在10、20、40、60、120、240、480和1440分钟时,收集血液(收集到肝素化的管中)、肺和脑,并将样品储存在液氮中直至分析。样品制备和LC/MS:将血液样品在冰上解冻,涡旋10秒,取出100μL等分试样并加入到400μL含有[100 nM 4,5-二苯基咪唑、100 nM HZ-166、RJ-02-50或SH-053-2' RCH₃-酸]内标(I.S.)冷乙腈中。将样品涡旋30秒并以10,000RPM离心10分钟。然后将上清液层转移到干净的管中并使用Speedvac浓缩器蒸发。将残余物用400μL流动相重构并通过0.22μm尼龙离心过滤器单元(Costar)旋转过滤。重构后,将样品适当稀释,加入维拉帕米或4,5-二苯基咪唑,并将5μL样品注入LC-MS/MS。将脑和肺组织样品解冻、称重并使用Cole Palmer LabGen 7B匀浆器直接匀浆化到含有I.S.的400μL乙腈中。将样品以10,000 RPM离心10分钟。然后回收上清液,并以与血液样品相同的方式制备用于LC-MS/MS分析。用Shimadzu Nexera X2 LC30AD系列泵(Shimadzu, Kyoto, Japan)进行高效液相色谱(HPLC)。分析物通过Restek Pinnacle II C18柱(2.1 mm × 100 mm, 5 μm粒度, Restek, California, US)在梯度洗脱下以0.5 mL/min (SH-053-2' R-CH₃-酸)、0.4 mL/min (RJ-02-50) 和0.6 mL/min (RJ-03-57和GL-II-93) 的流速分离。流动相为乙腈或甲醇和水(均含有0.1%甲酸)。时间程序:在40°C的柱温下20% B → 70% B (3分钟) → 99% B (5分钟),保持在99% B (8分钟),返回到10% B (9分钟),保持(9.5分钟) (SH-053-2' R-酸),70% B → 70% B (6分钟)(对于SH-053-2' F-R-CH₃-酸等度),20% B → 70% B (2分钟) → 99% B (4分钟),保持在99% B (4.5分钟),返回到20% B (4.75分钟),保持(5分钟) (RJ-03-57) 和20% B → 70% B (2分钟) → 99% B (5分钟),保持在99% B (5.5分钟),返回到20% B (5.75分钟),保持(6分钟) (GL-II-93)。通过Shimadzu 8040三元四极杆质量分析仪(Shimadzu, Kyoto, Japan)电喷雾和大气压电离(以双(DUIS)模式运行)在正模式下监测分析物。在多反应监测(MRM)模式中监测以下转换。RJ-02-50的离子对为m/z 327.85 > 281.95、m/z 327.85 > 264.05、m/z 327.85 > 254.10、m/z 327.85 > 236.80和m/z 327.85 > 212.75。SH-053-2' F-R-CH₃-酸的转换离子对为m/z 360.0 > 342.10、m/z 360.0 > 316.00、m/z 360.0 > 301.10、m/z 360.0 > 249.05和m/z 360.0 > 219.90。HZ-166的转换对为m/z 356.90 > 311.15、m/z 356.90 > 283.15和m/z 356.90 > 282.15。4,5-二苯基咪唑的转换对为m/z 220.80 > 193、m/z 220.80 > 167、m/z 220.80 > 151.95和m/z 220.80 > 115。维拉帕米(内标)的转换对为m/z 454.70 > 165.05、m/z 454.70 > 150和m/z 454.70 > 303.0。RJ-03-57的转换对为m/z 337.85 > 265.95、m/z 337.85 > 252.05、m/z 337.85 > 238.0、m/z 337.83 > 224.95和m/z 337.85 > 209.85。GL-II-93的转换对为m/z 413.90 > 396、m/z 413.90 > 368、m/z 413.90 > 355.05、m/z 413.90 > 302.95、m/z 413.90 > 326.80、m/z 413.90 > 276.05和m/z 413.90 > 248.20。针对每次转换优化碰撞能量以获得最佳灵敏度。质谱仪在加热块温度为400°C、干燥气流为15L/分钟、去溶剂化线温度为250°C、雾化气流为1.5L/分钟、针和界面电压都为4.5kV下运行。使用LabSolutions软件执行响应获取。通过线性回归拟合标准曲线,并通过当天的校准曲线反算验证样品。相应地计算平均值和变异系数(CV)。通过比较计算的浓度与相应的标称值来计算准确度。用PK方案软件2.0计算药代动力学参数,并拟合到下列方程:c = A·e^{-at} + B·e^{-bt} + C·e^{-ct}。图6A-6D示出化合物在小鼠血液、肺和脑中的药代动力学特征。通过口服管饲法以25mg/kg施

用的化合物的时间依赖性系统分布。RJ-02-50、SH-053-2F' F-R-CH3-酸和GL-II-93在小鼠中表现出优异的生物利用度,而RJ-03-57具有适度的吸收和快速清除率。

[0258] 实施例22. 化合物导致的小鼠BALF中炎性细胞数量的变化。

[0259] 在过敏原诱导的哮喘小鼠模型中研究化合物的抗炎特性的测定。在分析当天,用1mL不含Ca²⁺和Mg²⁺的PBS进行支气管肺泡灌洗(BAL)。使用BD红细胞裂解缓冲液(BD Pharmingen, San Jose, CA)裂解红细胞(RBC)。将BALF分成四个不同的管,并使用6 μg/mL的2.4G2小鼠BD Fc BlockTM (BD Pharmingen, San Jose, CA)将与Fc受体的非特异性结合阻断5分钟。将BALF细胞在4°C下在黑暗中用100μL BSA染色缓冲液(BD Pharmingen, San Jose, CA)染色30分钟,所述缓冲液含有以下抗体的最终浓度:抗小鼠CD45 APC (1:1000, 30-F11, Affymetrix eBiosciences, San Diego, CA)、FITC大鼠抗小鼠CD4 (1:500, RM4-5, BD Pharmingen, San Jose, CA)、PE大鼠抗小鼠Siglec F (1:500, E50-2440, BD Pharmingen, San Jose, CA)和小鼠CCR3 PE-缀合抗体(1:40, 83101, R&D systems Inc, Minneapolis, MN)。使用BD FACS Calibur (BD Pharmingen, San Jose, CA)进行流式细胞计数研究,随后使用Cell Quest专业软件(BD Pharmingen, San Jose, CA)分析数据。遵循免疫细胞的一般门控。通过以高(60μL/min)运行所有样品180秒获得总炎性细胞计数。第四通道(FL4)中的门控抗小鼠CD45阳性事件用于将总炎性细胞计数计算为细胞/mL。CCR3+/Siglec F的频率用于嗜酸性粒细胞的定量,并且在其各自门中的CD4⁺ T细胞群的CD4⁺乘以总炎性细胞计数(细胞/mL)以获得差异细胞群。统计分析:使用GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA)分析数据并表示为平均值±SEM。对于多组的统计学差异,进行使用Dunnet事后检验的单因素方差分析(ANOVA)或使用Bonferroni事后检验的双因素ANOVA。图7A-7C示出化合物对炎性细胞的作用。10只ova s/c BALB/c小鼠的组以100 mg/kg每天两次施用化合物,持续5天。从每只动物收获BALF并用于(A)定量总炎性细胞;(B)嗜酸性粒细胞;(C) CD4⁺ T细胞。用小鼠CD45⁺ APC抗体染色细胞,并用BD FACS Calibur以高流速(60μl/分钟)分析样品180秒。第四通道(FL4)中的门控阳性事件用于将总炎性细胞计数计算为细胞/ml。特定白细胞群(B)嗜酸性粒细胞(C) CD4⁺ T细胞群的定量用特异性抗体染色并通过流式细胞术检测。数据代表每组10只小鼠的平均值±SEM。*、**和***分别表示与媒介物处理的ova s/c BALB/c小鼠相比的p < 0.05、p < 0.01和p < 0.001显著性。化合物GL-II-43、RJ-03-30、RJ-03-90不调节炎性细胞的数量。然而,RJ-02-50和GL-II-93确实减少了哮喘小鼠肺中嗜酸性粒细胞和CD4⁺ T细胞的数量。SH-053-2F' F-R-CH3-酸减少了嗜酸性粒细胞的数量,但没有减少CD4⁺ T细胞的数量。

[0260] 实施例23. 在化合物存在下对CD4⁺ T淋巴细胞的电生理学测量

[0261] 为了确定化合物对淋巴细胞的作用,分离来自Ova S/C小鼠的CD4⁺ T细胞,并通过自动膜片钳测量它们与化合物的相互作用。来自ova s/c BALB/c小鼠的脾细胞按照用于制备鼠脾细胞的BD Biosciences说明书制备,并使用BD Pharm LyseTM裂解溶液(BD Biosciences, San Jose, CA)裂解红细胞。在存在或不存在100 μg/mL卵清蛋白的情况下,将细胞保持在悬浮于含有L-谷氨酰胺的RPMI 1640培养基(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL)中,所述培养基补充有10% (v/v) 胎牛血清、10μM 2-巯基乙醇和1% 青霉素/链霉素。将细胞在37°C下维持在5% CO₂,95%的湿润空气中48小时。所述IonFlux板布局由12个孔的单元构成:两个孔含有细胞内溶液(含有346 mM CsCl、1 mM CaCl₂、1 mM

MgCl₂、11 mM EGTA、10 mM HEPES、用CsOH实现pH 7.2的ICS),一个含有在细胞外溶液(含有140 mM NaCl、5 mM 349 KCl、2 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、5 mM D-葡萄糖一水合物和10 mM HEPES、用NaOH实现pH 7.4的ECS)中稀释的细胞,八个包含在ECS中稀释的感兴趣的化合物,并且一个孔用于收集废物。通过在整体记录阵列中对微观通道施加抽吸,从悬浮液中捕获细胞。一旦阵列被完全占据,所施加的抽吸就会破坏捕获细胞的膜,其建立全细胞电压钳。对于化合物施用,将压力施加到合适的化合物孔,其将化合物引入快速流过细胞的细胞外溶液中。为了记录GABA_AR诱导的电流,将细胞阵列电压钳制在-50mV的超极化保持电位。在自动膜片钳上使用之前,将细胞以380g离心5分钟并轻轻重悬于ECS中。在将细胞分配到板中之前,将其再重复两次。在施用前将GABA和蝇蕈醇在ECS中稀释至适当浓度并记录数据。图8示出使用从ova s/c BALB/c小鼠脾中分离的CD4+ T细胞在600nM GABA和一起施加3秒的渐增浓度的化合物存在下的电流记录。采用n为16在600nM GABA和渐增浓度的化合物存在下进行CD4+ T细胞的浓度依赖性电流响应,并标准化至600nM GABA的电流响应。化合物RJ-02-50增强GABA诱导的膜电流的程度超过SH-053-2F' F-R-CH3-酸。重要的是,GL-II-93和RJ-03-30引起非常显著的GABA诱导的跨膜电流。

[0262] 实施例24. 通过化合物体获得的肺细胞因子表达的体内调节

[0263] 在AHR测量后通过收获经处理和未经处理的Ova S/C小鼠的肺(N = 10)来研究化合物在细胞因子产生方面的抗炎特性。使用手持式组织匀浆器将全肺在含有1X蛋白酶抑制剂混合物的200μL的T-PER®组织蛋白提取试剂(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL)中匀浆化。将匀浆化的肺样品以10,000 RPM离心5分钟,以将细胞/组织碎片沉淀。根据制造商的说明,使用BD细胞计数珠阵列小鼠Th1/Th2/Th17细胞因子试剂盒(BD Biosciences, San Jose, CA)收集组织上清液用于细胞因子分析。使用GraphPad Prism 4(GraphPad Software, San Diego, CA)分析数据并表示为平均值±SEM。对于多组的统计学差异,进行单因素方差分析(ANOVA)和Dunnet事后检验。图9示出小鼠肺中细胞因子水平的定量。在测试的细胞因子中,与正常BALB/c小鼠相比,在ova s/c小鼠的肺中IL-10、IL-17A、TNF-α和IL-4的表达显著更高。数据代表每组10只小鼠的平均值±SEM。*、**和***表示p < 0.05、p < 0.01和p < 0.001显著性。ova s/c小鼠表达较高水平的IFN-γ、IL-6和IL-2,但与正常小鼠相比,变化不显著。用GL-II-93处理的Ova s/c小鼠表现出小鼠肺中IL-17、TNFα和IL-4的水平降低。

[0264] 实施例25. 化合物没有粘液分泌过多调节

[0265] 在AHR测量后,通过收获经处理和未经处理的Ova S/C小鼠的肺,然后进行福尔马林固定和石蜡包埋,研究化合物对粘液产生的药效学作用。从一个叶(包括大气道和小气道)制备切片并加工用于标准H&E(用于一般组织病理学和炎症)和PAS(用于粘液细胞;作为细胞/mm基底膜)染色。图10A-10B示出化合物对粘蛋白产生的作用:(A)粘蛋白体积密度的形态学定量和(B)采用高碘酸荧光席夫氏染色的气道上皮(绿色)中粘蛋白(红色)的代表性图像。向Balb/c小鼠施用100mg/kg的化合物两次,持续5天。数据代表每组5-7只小鼠的平均值±SEM。比例尺表示100 μm。GL-II-93、RJ-02-50和SH-053-2'F-R-CH3酸没有改变粘蛋白的产生。

[0266] 实施例26. 化合物抑制肺细胞增殖

[0267] 通过EdU在新形成细胞的DNA中的不顺从性来确定ASM增生。本文中,在卵清蛋白致

敏和攻击方案结束时,小鼠以100 mg/kg的剂量接受单次i.p.注射EdU (Invitrogen, Carlsbad, CA)。注射后4小时对小鼠实施安乐死,并将肺福尔马林固定,收获并石蜡包埋。将福尔马林固定和石蜡包埋的肺切片的6μm切片封固在Fisher Superfrost Plus载玻片上。使用Click-iT™ EdU成像试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA)根据制造商的说明书进行EdU染色。简言之,将肺在 histoclear中脱石蜡并在分级乙醇中再水合。将组织切片用PBS中的3%牛血清白蛋白(BSA)洗涤两次,并用PBS中的0.5% Triton X-100透化20分钟。将切片再次用PBS中的3% BSA洗涤两次,然后与含有Click-iT™ 反应缓冲液、CuSO₄、Alexa Fluor® 488叠氮化物和反应缓冲添加剂的Click-iT™ 反应混合物在黑暗中温育30分钟。用PBS中的3% BSA再洗涤切片一次。对于DNA染色,将切片用PBS洗涤一次,然后与5 μg/mL Hoechst 33342一起温育30分钟。然后用PBS洗涤载玻片两次并用Permount封固剂盖上盖玻片。在室温下进行全部步骤。图11示出肺细胞的增殖。分析未处理和GL-II-93处理的Ova S/c小鼠的肺切片的EdU的不顺从性,EdU是胸苷类似物,其可在用荧光叠氮化物点击化学后显现。对于阴性对照,未注射EdU,导致没有可见的荧光。与GL-II-93处理的动物相比,未处理的Ova S/C小鼠示出高增殖率。细胞核特异性Hoechst 33342染色确保在图11中比较的两个切片之间的细胞密度相似。

[0268] 实施例27. 病毒诱发的哮喘模型。

[0269] GABA_AR化合物在慢性肺病中的功效将在病毒诱导的哮喘模型中进行研究。在第0天,用2x105 pfu SeV (Strain 52; ATCC) 或UV-灭活的SeV (UV-SeV) (69) 鼻内接种C57BL/6小鼠(6-20周龄;10只组)。每天监测小鼠的体重和活动;在接种(P-I)后第49天慢性疾病被确立。安排四个实验组,在P-I 49-56天期间腹膜内施用测试化合物(或媒介物)。对于预防性研究,治疗将在第13-21天期间施用,然后在第49-56天进行疾病测量;以模拟与RSV暴露后的儿童期治疗相对应的给药方案(因此,研究病毒感染后早期或急性感染后阶段期间的免疫调节是否可以影响后期炎性肺病的发展)。在PI第13天、第49天和第56天,在所有组中测量响应于乙酰甲胆碱的连续非侵入性AHR测量(sRAW)。在第56天进行AHR测量后,将动物实施安乐死并获得BALF、血液和组织样品。将BALF收集在1ml PBS中,离心,并如上所述收集细胞上清液用于细胞因子分析。将细胞沉淀重悬浮于RPMI中,并取样用于差异细胞计数(Diff-Quik) 和流式细胞术。对于流式细胞术,细胞制品将用荧光团标记的针对小鼠CD1d的单克隆抗体(Invitrogen) 和针对M2巨噬细胞的Mac-3(BD) 或针对NKT细胞的CD3和NK1.1(均为Invitrogen) 染色。用FACS Calibur仪器(BD Biosciences) 检查抗体标记的细胞,并用FlowJo软件(Tree Star, Ashland, OR) 分析数据(69,70,84)。进行所有其它肺组织和生化测试,并如OVA模型中那样分析数据。

[0270] 实施例28. 慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型。

[0271] GABA_AR化合物的功效通过小鼠中的脂多糖(LPS)肺攻击作为人COPD的模型进行研究。LPS是一种促炎性兴奋剂,作为香烟烟雾、空气污染和有机粉尘中的污染物存在。在人类中,长期暴露于载满LPS的粉尘会导致肺功能下降。在急性模型中,LPS诱导混合性炎症反应,其中中性粒细胞增加且肿瘤坏死因子(TNF)、IL-1和在支气管肺泡液中的其它介质增加。在给药之前,将每种测试化合物在缓冲溶液媒介物(磷酸盐缓冲盐水,pH7.4)中稀释并过滤灭菌。在每个指定的天数腹膜内施用测试化合物,总体积为100μl(因此3个剂量)。在最终i.p.化合物给药后约1小时,小鼠使用非手术程序气管内接受LPS。首先通过皮下(s.c.)

注射氯胺酮盐酸盐和盐酸甲苯噻嗪溶液 (Cat. no. K113; Sigma; 50 mg/kg氯胺酮盐酸盐) 麻醉小鼠。通过套管和注射器气管内滴注 (i.t.) (20 μ g LPS/小鼠) 溶解于50 μ L无菌0.9%NaCl中的LPS (Cat. no. L2880; Sigma, 055:B5型) (2×25 μ l), 然后是100 μ l空气。将假处理的小鼠用50 μ L无菌0.9%NaCl i.t.滴注。滴注处理后, 将小鼠保持直立位置10分钟, 以允许液体扩散到整个肺部。允许小鼠从麻醉中恢复, 并在使用颈部CO₂窒息后24小时处死。通过心脏穿刺在含EDTA的管中收集血液, 立即离心 (2000×g, 10分钟, 4°C) 并将血浆储存在-80°C。移除肺组织并快速冷冻用于RNA分离和MPO分析。对于免疫组织化学分析, 将肺组织置于10%磷酸盐缓冲的福尔马林 (pH 7.4) 中。

[0272] 实施例29. 免疫关节炎模型。

[0273] 将8-10周龄的8-10只雄性DBA/1j小鼠的组 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) 用在50%完全弗氏佐剂中的200mg牛胶原蛋白II (bCII, Chondrex, Redmond, WA, USA) 在尾巴基部皮内地免疫。21天后, 用在不完全弗氏佐剂中的100mg bCII类似地加强小鼠。用无bCII的假免疫处理对照小鼠的组。在整个处理过程中测量食物和水的消耗、体重以及临幊上可观察到的关节炎症。在初次免疫后开始, 给小鼠每周3次施用本发明的GABA_A受体试剂, 持续8周。化合物剂量将如实施例22中所述确定。通过微量滴定板ELISA表征最终免疫后8周的各对照和实验小鼠中的血清胶原特异性IgG、IgG1和IgG2a抗体。在ELISA中, bCII用作包被板孔的抗原, 并且同种型特异性的荧光团缀合的兔抗小鼠抗体用于定量初级抗体结合。使用标准荧光板读数器读取ELISA板中的孔。通过与对照小鼠相比, 处理的小鼠中临床关节炎症减少和/或对bCII的IgG抗体效价降低来证明化合物功效。

[0274] 实施例30. 自身免疫性糖尿病模型

[0275] 非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠已经在糖尿病研究中使用了30年。NOD小鼠的特征在于胰岛炎—一种胰岛的白细胞浸润。胰腺胰岛素含量的减少在大约12周龄的雌性中自发发生, 并且在几周后在雄性中发生。糖尿病小鼠是低胰岛素血症和高胰高血糖素血症的, 表明胰岛β细胞的选择性破坏。通过给药途径 (PO、IP、IM、SC) 之一QD或BID给予本发明化合物 28天; 对照动物类似地给予媒介物剂量。剂量如实施例22中所述确定。每组分配8-10只小鼠。每周监测动物两次, 测量体重、食物消耗、水摄入量和血液或尿液葡萄糖。可以使用常规获得的测试条 (Bayer Diastix) 测定尿液葡萄糖。化合物的功效通过处理组与对照组相比一种或多种这些临幊标志物的减少来证明。

[0276] 本文引用的所有专利、出版物和参考文献特此通过引用完全并入。在本公开与所并入的专利、出版物和参考文献之间存在冲突的情况下, 应当适用本公开。

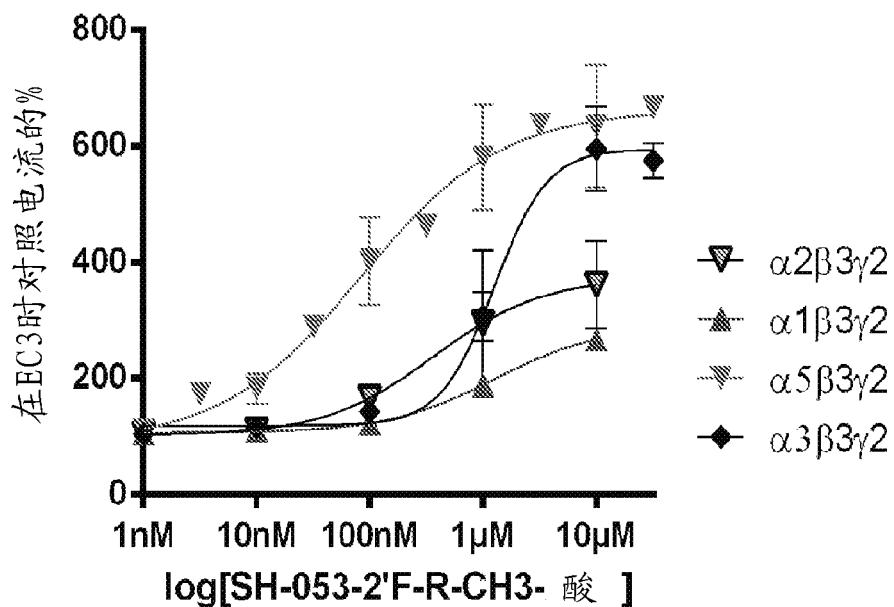


图 1A

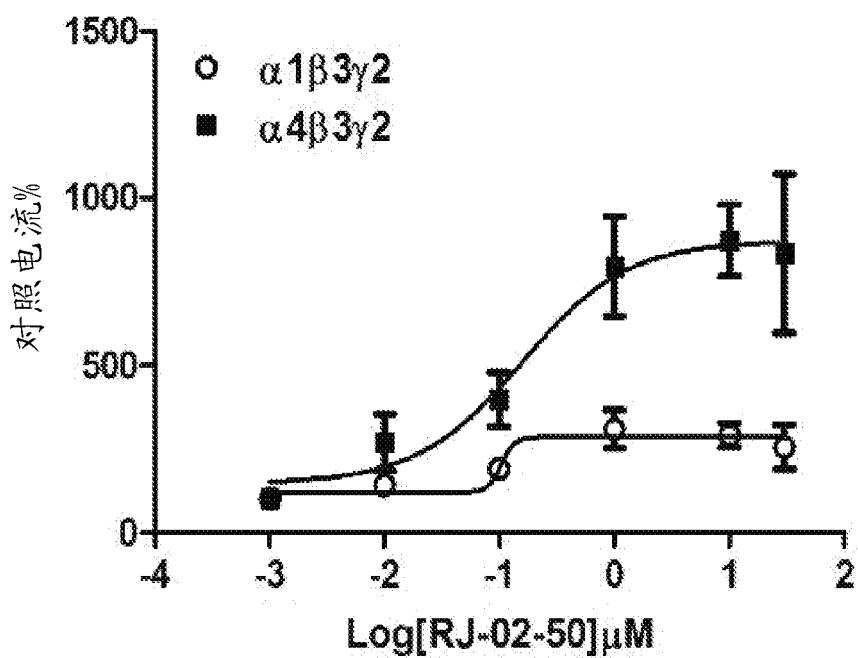


图 1B

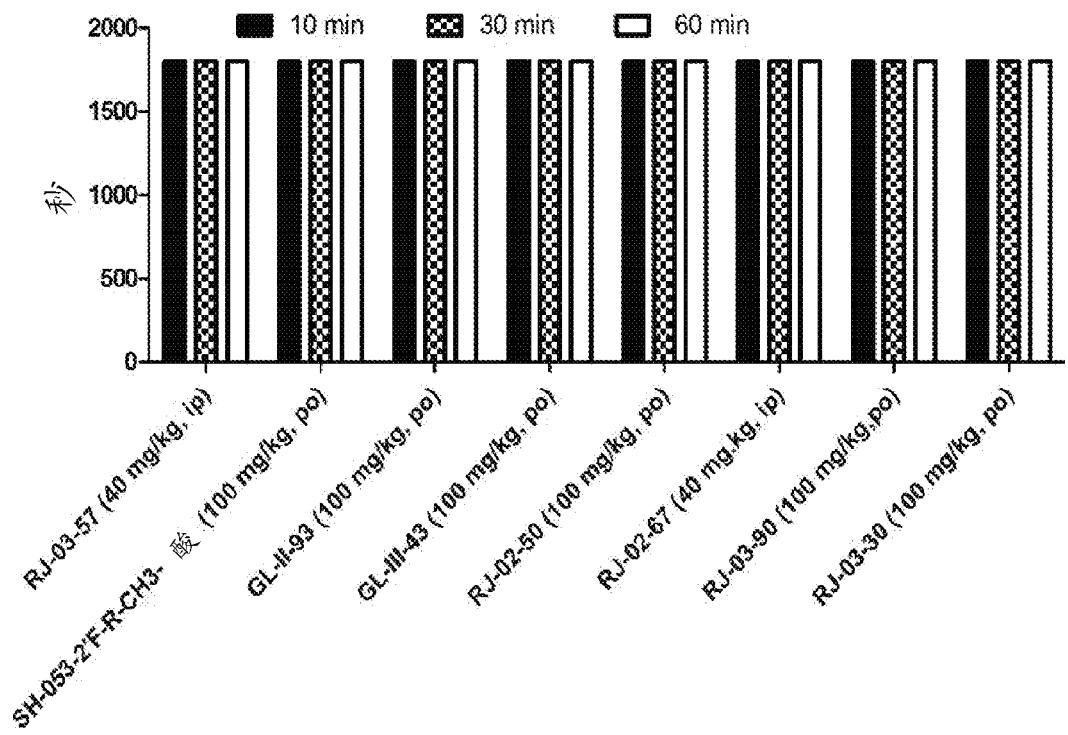


图 2

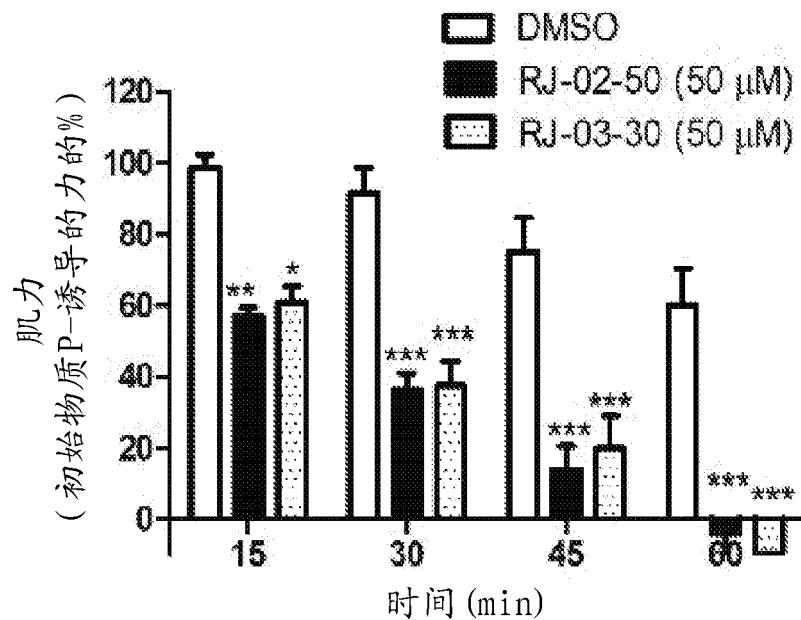


图 3A

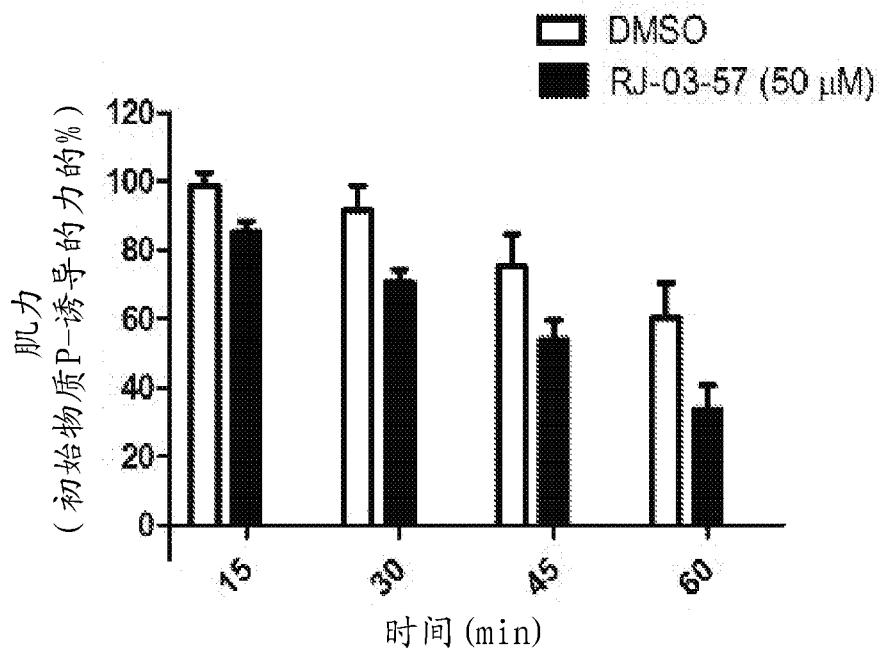


图 3B

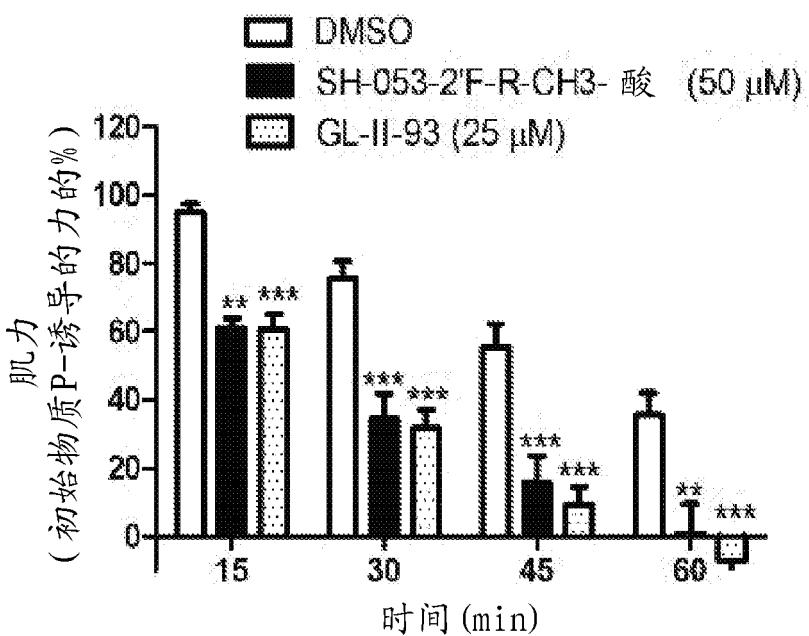


图 3C

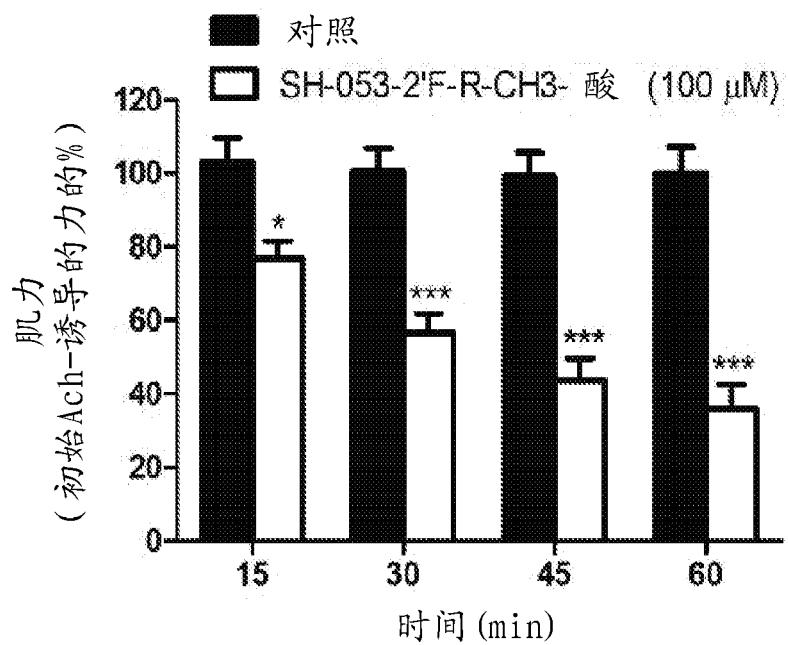


图 4

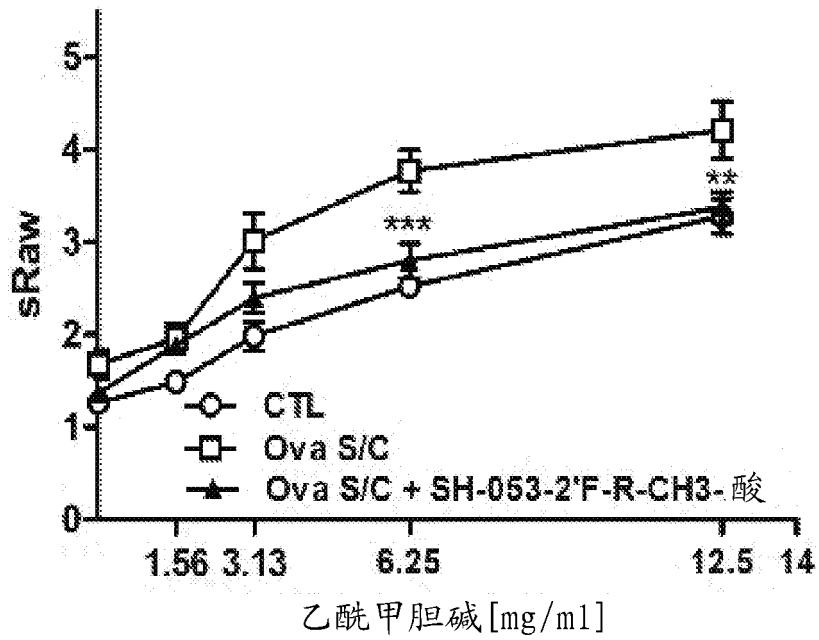


图 5A

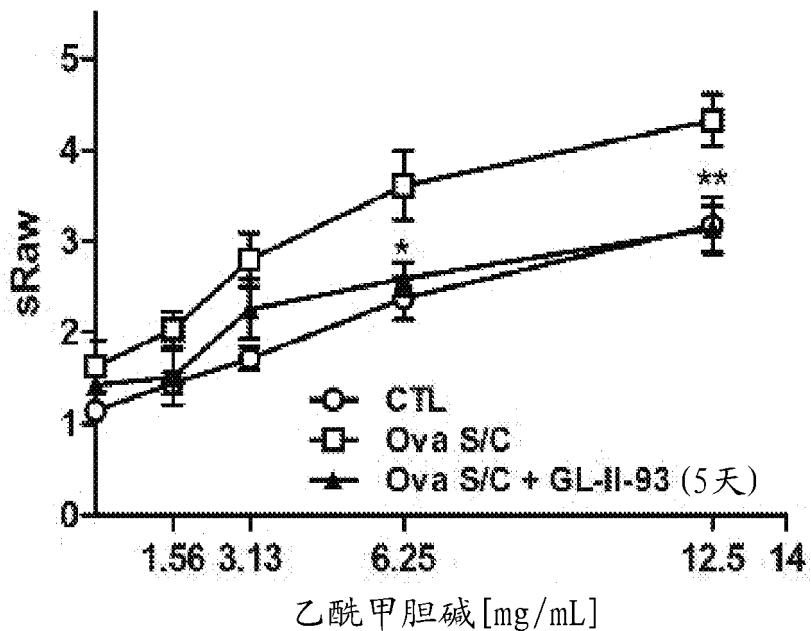


图 5B

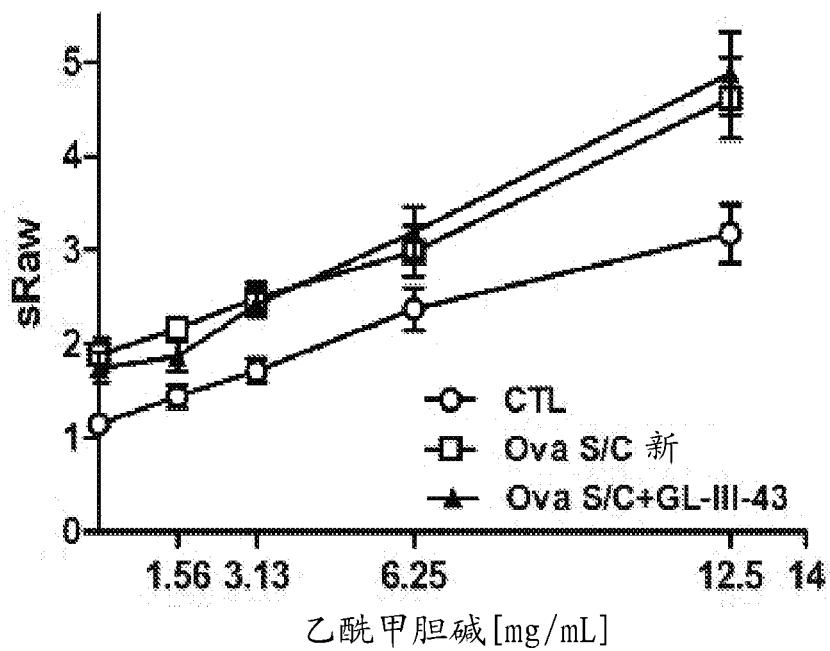


图 5C

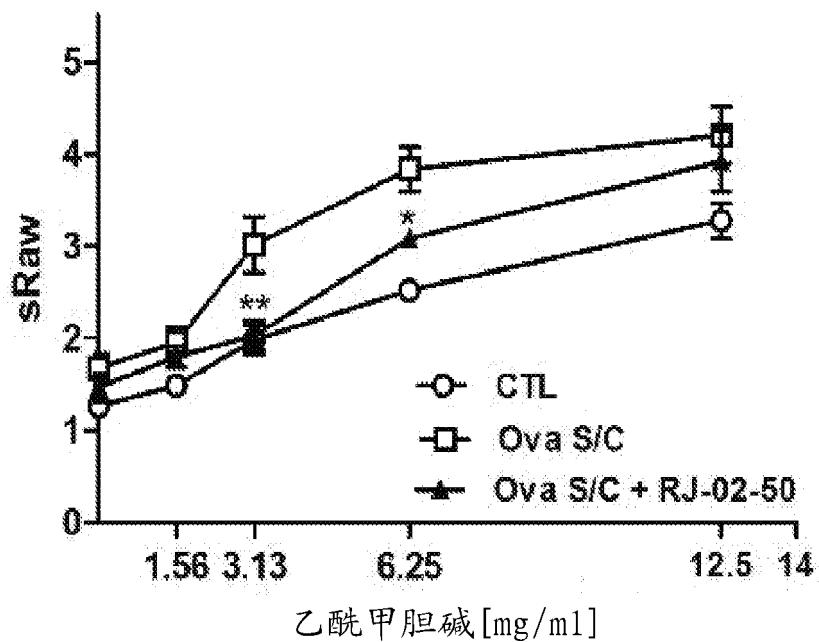


图 5D

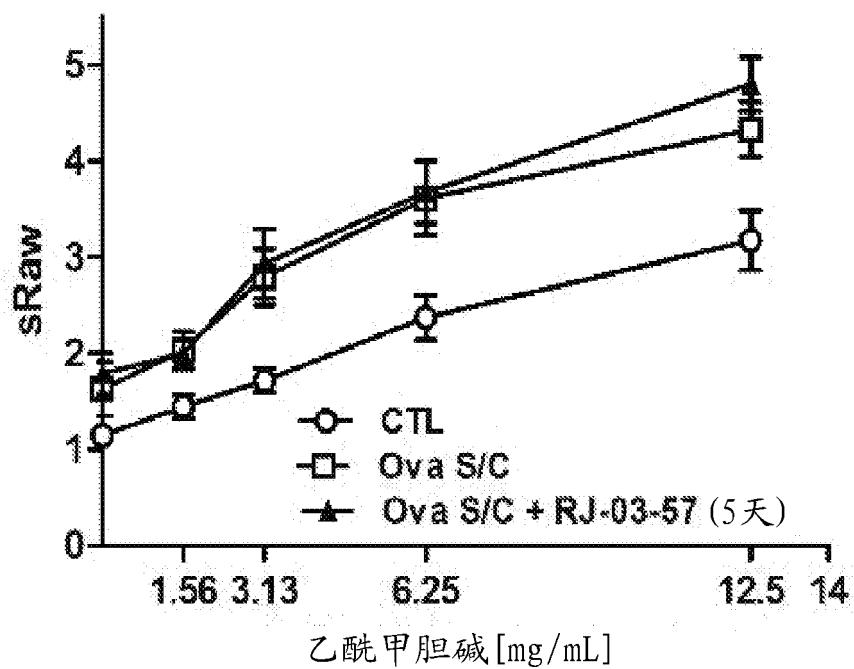


图 5E

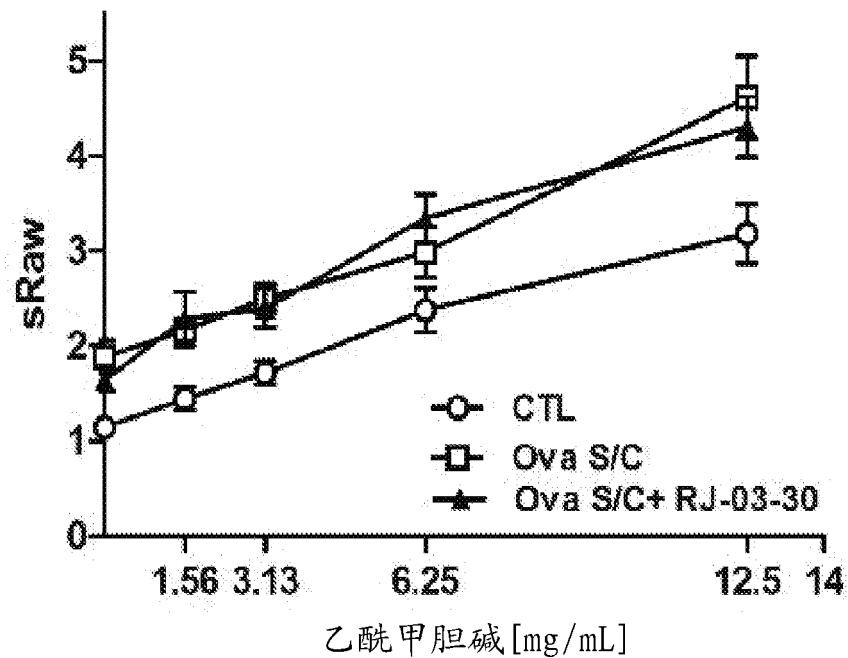


图 5F

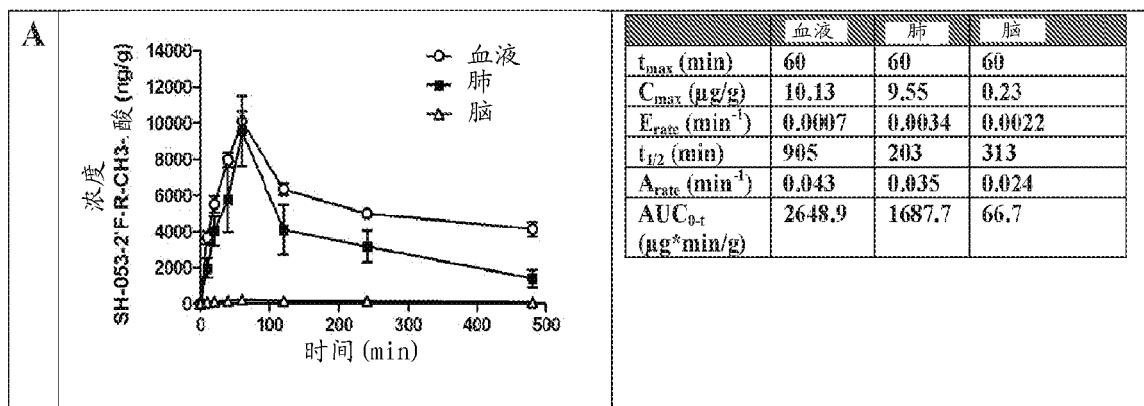


图 6A

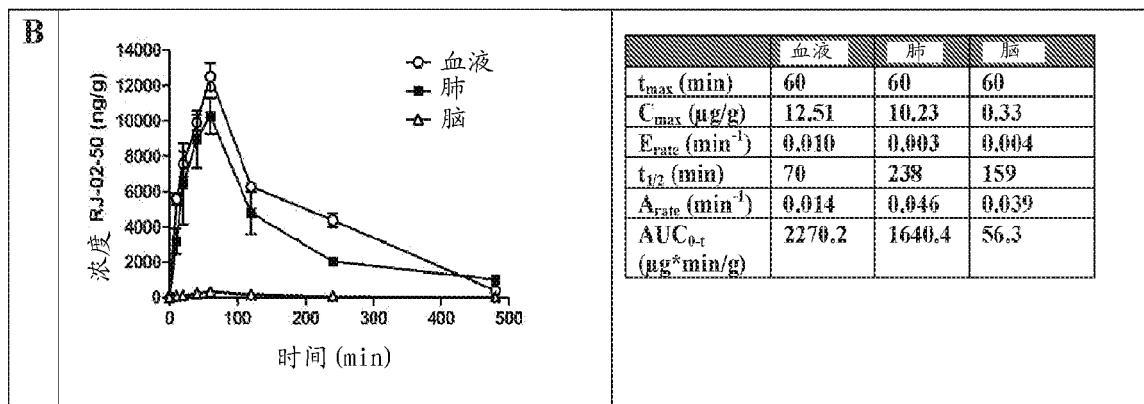


图 6B

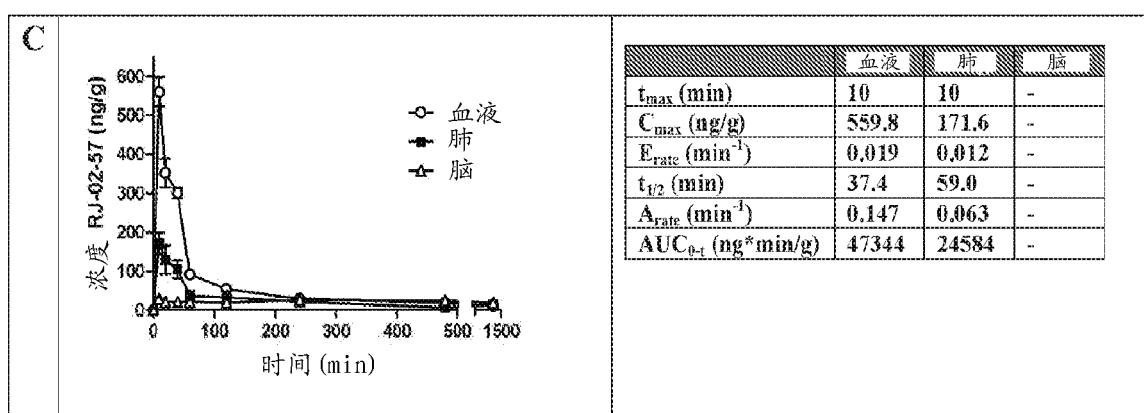


图 6C

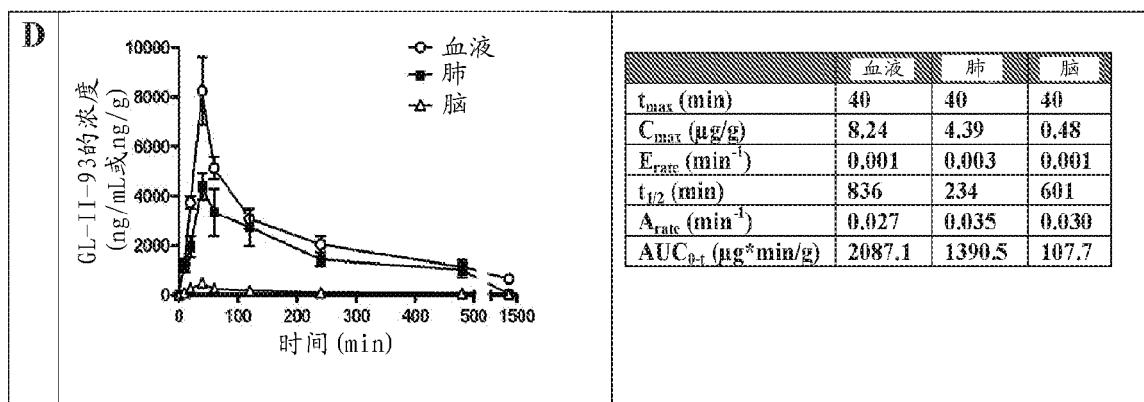


图 6D

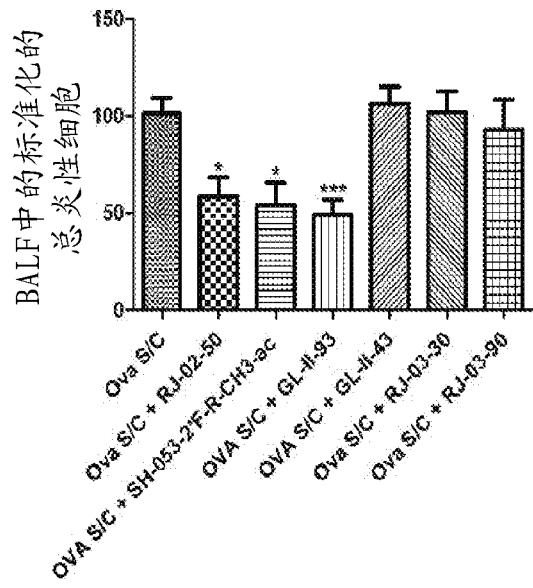


图 7A

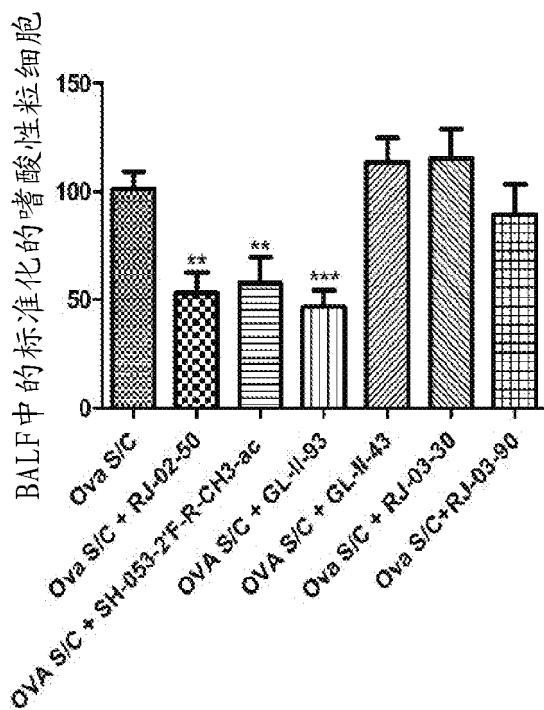


图 7B

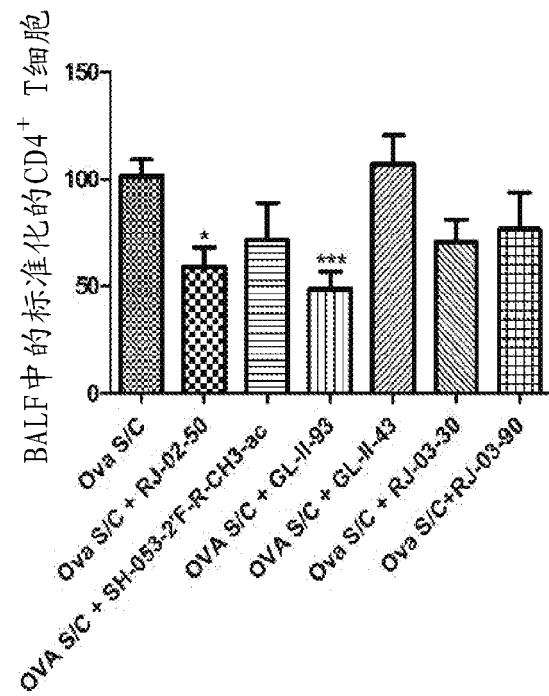


图 7C

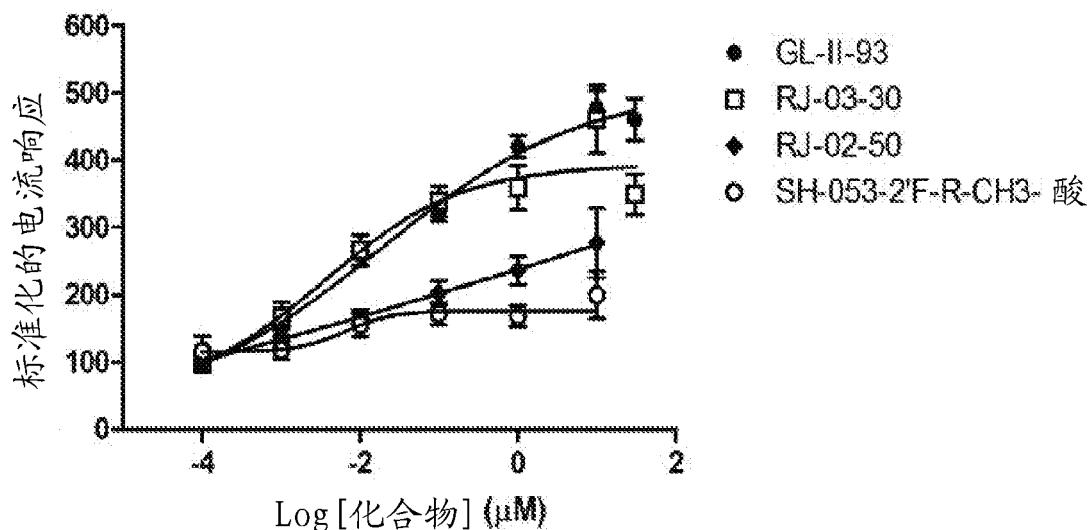


图 8

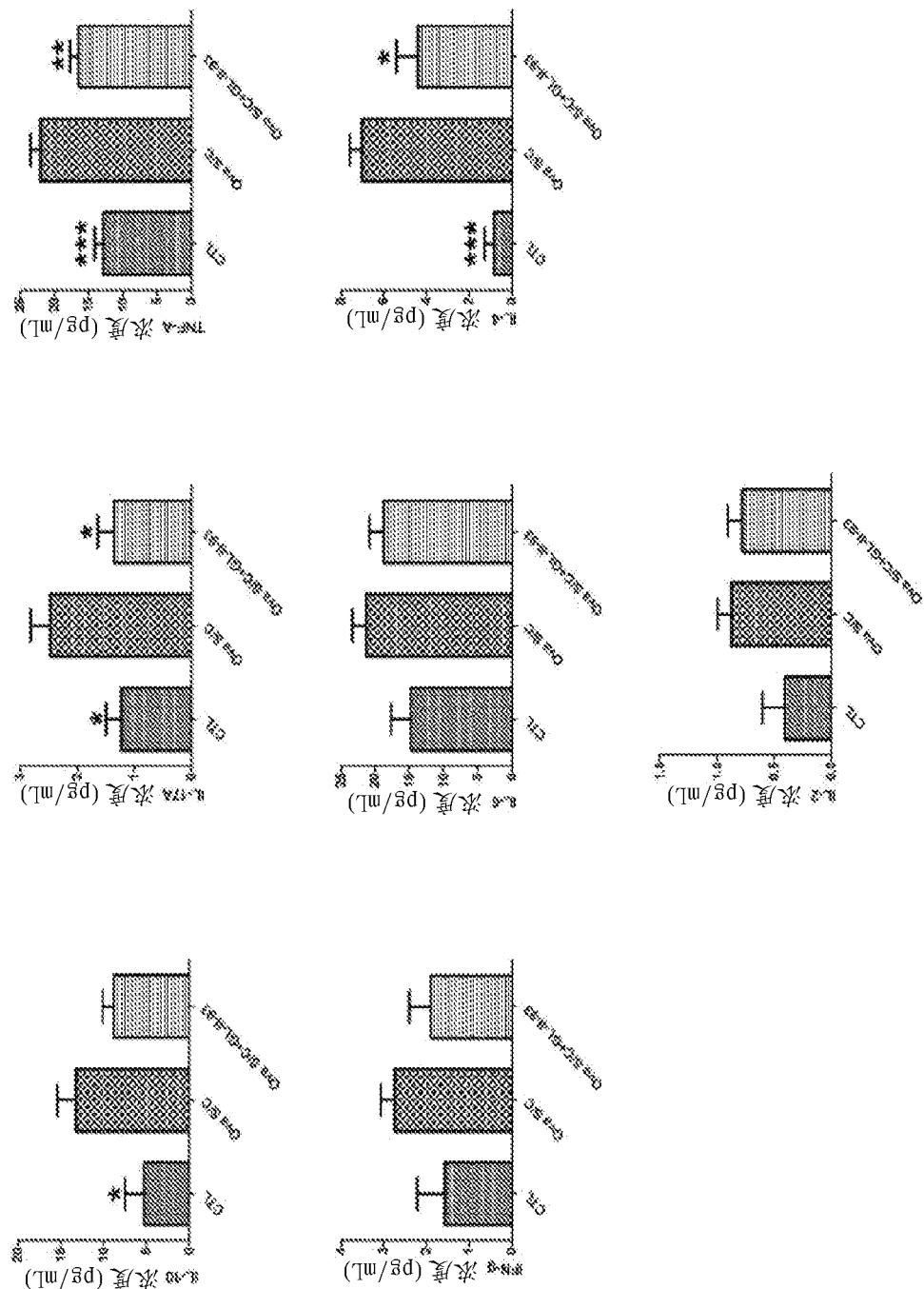


图 9

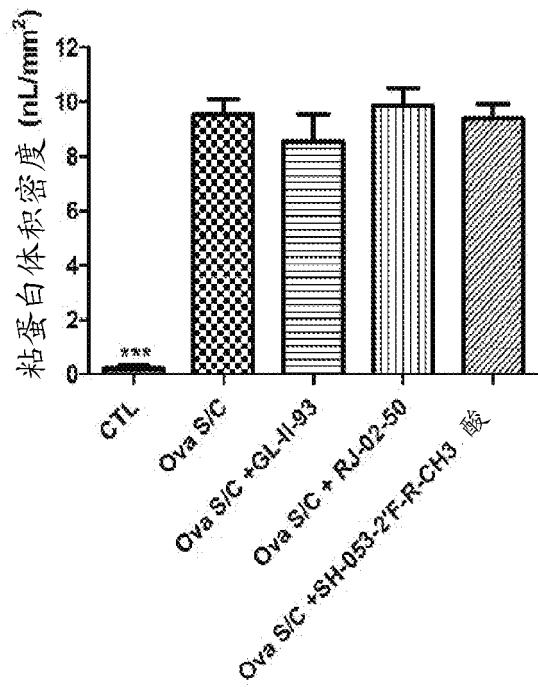


图 10A

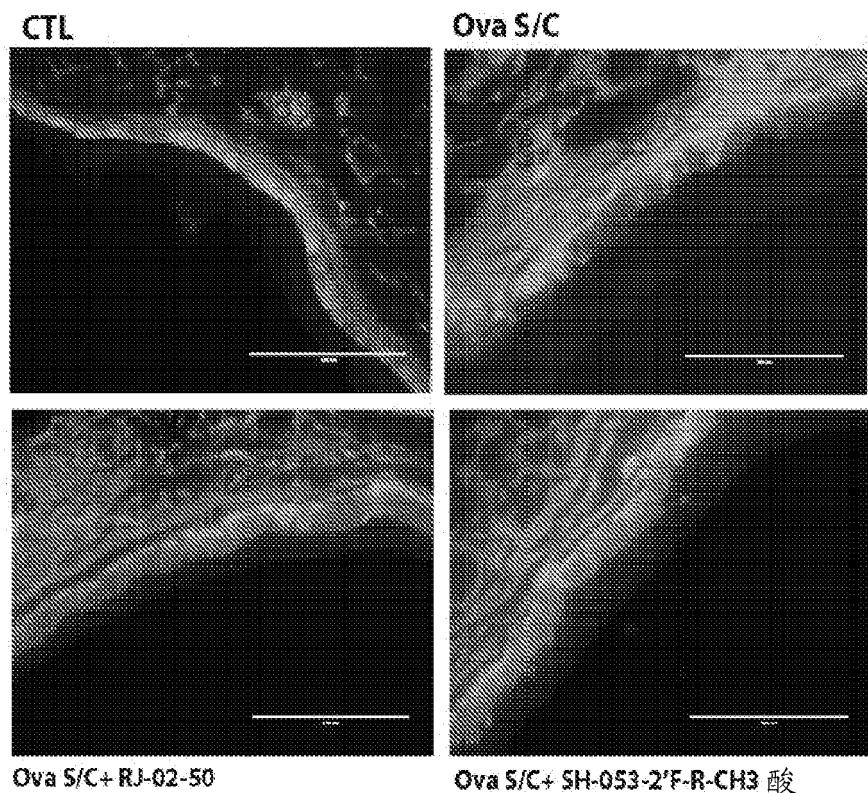


图 10B

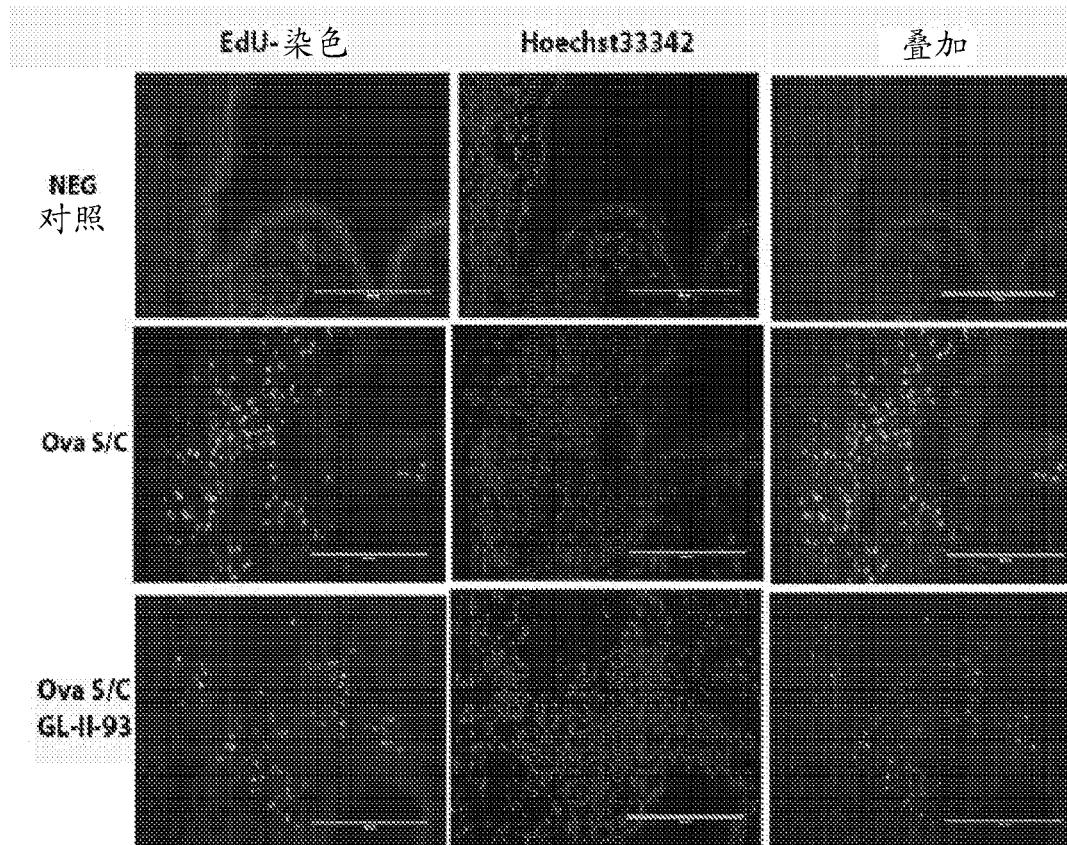


图 11