



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109937202 B

(45) 授权公告日 2022.12.30

(21) 申请号 201780067815.3

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22) 申请日 2017.10.31

72001

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 李进 李志强

申请公布号 CN 109937202 A

(51) Int.CI.

C07D 487/04 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.06.25

C07D 451/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/519 (2006.01)

16196943.1 2016.11.02 EP

A61P 25/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2019.04.30

WO 2015/164508 A1, 2015.10.29

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 101103035 A, 2008.01.09

PCT/EP2017/077920 2017.10.31

CN 101801949 A, 2010.08.11

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 103183675 A, 2013.07.03

W02018/083103 EN 2018.05.11

CN 101560212 A, 2009.10.21

(73) 专利权人 詹森药业有限公司

US 2015/0105365 A1, 2015.04.16

地址 比利时.比尔斯.特恩豪特斯路30号

US 2014/0364413 A1, 2014.12.11

(72) 发明人 Y.E.M.万罗斯布洛克

US 4036840 A, 1977.07.19

P.J.J.A.布伊斯特尔斯

WO 2015/164508 A1, 2015.10.29

G.特瑞萨德尔 E.雅各比

审查员 王婷婷

D.厄里奇 H.J.M.吉森

权利要求书2页 说明书42页 附图1页

(54) 发明名称

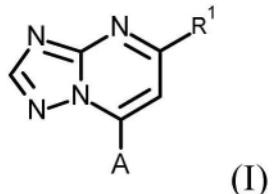
作为PDE2抑制剂的[1,2,4]三唑并[1,5-A]

嘧啶化合物

(57) 摘要

本发明涉及作为磷酸二酯酶2(PDE2)的抑制剂的新颖的[1,2,4]三唑并[1,5-a]嘧啶-基衍生物。本发明还涉及包含这些化合物的药物组合物,涉及用于制备此类化合物和组合物的方法,并且涉及此类化合物和组合物用于预防和治疗其中涉及PDE2的障碍,如神经和精神障碍的用途。

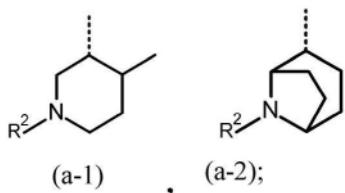
1. 一种具有式(I)的化合物



或其立体异构形式,其中

R¹是CHF₂或CH₃;

A是选自(a-1)和(a-2)的基团



其中

R²选自2-吡啶基、1-异喹啉基、4-喹唑啉基、1H-吡咯并[3,2-c]-吡啶-4-基、和呋喃并[3,2-c]吡啶-4-基;其各自任选地被各自独立地选自下组的1个或2个取代基取代,该组由以下各项组成:卤基、OH、-CN;任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的C₁₋₄烷基;任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的C₁₋₄烷氧基;和1-吗啉基;

或其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中R²选自2-吡啶基和1-异喹啉基;其各自任选地被各自独立地选自下组的1个或2个取代基取代,该组由以下各项组成:卤基、OH、-CN;任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的C₁₋₄烷基;以及

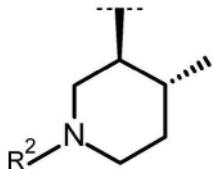
任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的C₁₋₄烷氧基。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中R²是任选地被1个或2个各自独立地选自下组的取代基取代的1-异喹啉基,该组由以下各项组成:卤基、OH、-CN;任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的C₁₋₄烷基;和任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的C₁₋₄烷氧基。

4. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中R²是任选地被1个或2个独立选择的卤基取代基取代的1-异喹啉基。

5. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中A是(a-1)。

6. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中A是具有式(a-1a)的基团(a-1)



(a-1a)。

7. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中R¹是CHF₂。

8. 一种药物组合物,该药物组合物包含药学上可接受的载体和治疗有效量的根据权利要求1至7中任一项所述的化合物。

9. 根据权利要求1至7中任一项所述的化合物或根据权利要求8所述的药物组合物在制备药剂中的用途,所述药剂用于抑制PDE2酶。

10. 根据权利要求1至7中任一项所述的化合物或根据权利要求8所述的药物组合物在制备药剂中的用途,所述药剂用于治疗或预防由PDE2酶介导的且选自下组的中枢神经系统障碍:精神性障碍和病症;焦虑障碍;运动障碍;物质相关障碍;心境障碍;神经退行性障碍;包含注意力和/或认知缺陷症状的障碍或病症;与记忆获得和巩固相关的障碍;中风;和自闭性障碍。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中

所述精神性障碍选自下组:精神分裂症;精神分裂症样障碍;情感性分裂障碍;妄想性障碍;物质诱发的精神性障碍;偏执型人格障碍;以及分裂样人格障碍;

所述焦虑障碍选自下组:惊恐性障碍;广场恐怖症;特殊恐惧症;社交恐惧症;强迫性障碍;创伤后应激障碍;急性应激障碍;以及广泛性焦虑障碍;

所述运动障碍选自下组:亨廷顿氏病和异动症;帕金森氏病;下肢不宁综合征和特发性震颤;妥瑞氏综合征和其他抽动障碍;

所述物质相关障碍选自下组:酒精滥用;酒精依赖;酒精戒断;酒精戒断性谵妄;酒精诱发的精神性障碍;安非他明依赖;安非他明戒断;可卡因依赖;可卡因戒断;尼古丁依赖;尼古丁戒断;阿片类药物依赖和阿片类药物戒断;

所述心境障碍选自:抑郁症;躁狂症;双相性I型障碍、双相性II型障碍;循环性心境障碍;心境恶劣障碍;重度抑郁障碍;难治性抑郁症;和物质诱发的心境障碍;

所述神经退行性障碍选自下组:帕金森氏病;亨廷顿氏病;痴呆;阿尔茨海默氏病;多发梗塞性痴呆;艾滋病相关痴呆或额颞痴呆;

所述包含注意力和/或认知缺陷症状的障碍或病症选自下组:与阿尔茨海默氏病相关的痴呆;多发梗塞性痴呆;由路易体病引起的痴呆;酒精性痴呆或物质诱发的持续性痴呆;与颅内肿瘤或颅脑创伤相关的痴呆;与亨廷顿氏病相关的痴呆;与帕金森氏病相关的痴呆;艾滋病相关痴呆;由皮克氏病引起的痴呆;由克罗伊茨费尔特-雅各布病引起的痴呆;谵妄;遗忘障碍;创伤后应激障碍;中风;进行性核上性麻痹;精神发育迟滞;学习障碍;注意力缺陷/多动障碍(ADHD);轻度认知损害;阿斯伯格氏综合征;年龄相关的认知损害;与感知、专注、学习或记忆相关的认知损害;

与记忆获得和巩固相关的障碍选自记忆障碍。

12. 一种用于制备如权利要求8所定义的药物组合物的方法,其特征在于将药学上可接受的载体与治疗有效量的如权利要求1至7中任一项所定义的化合物紧密混合。

作为PDE2抑制剂的[1,2,4]三唑并[1,5-a]嘧啶化合物

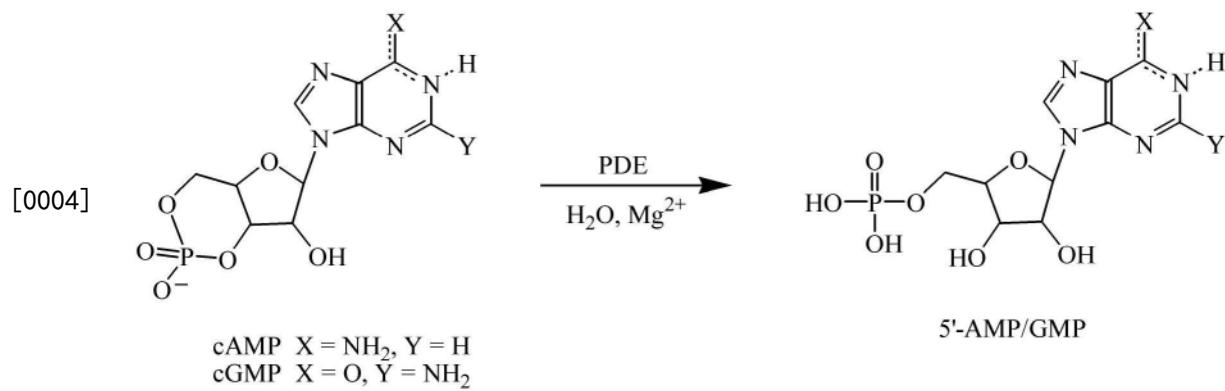
技术领域

[0001] 本发明涉及作为磷酸二酯酶2 (PDE2) 的抑制剂的新颖的[1,2,4]三唑并 [1,5-a] 嘧啶-基衍生物。本发明还涉及包含这些化合物的药物组合物,涉及用于制备此类化合物和组合物的方法,并且涉及此类化合物和组合物用于预防和治疗其中涉及PDE2的障碍,如神经和精神障碍的用途。

背景技术

[0002] 磷酸二酯酶 (PDE) 是由21个基因编码的酶家族并且根据结构和功能特性细分为11个不同的家族。这些酶经代谢使广泛出现的细胞内第二信使3',5'-环腺苷酸 (cAMP) 和3',5'-环鸟苷酸 (cGMP) 失活。这两种信使调节多种多样的生物过程,包括促炎症介质产生和作用、离子通道功能、肌肉收缩、学习、分化、细胞凋亡、脂肪生成、糖原分解、和葡萄糖异生。它们通过活化蛋白激酶A (PKA) 和蛋白激酶G (PKG) 来完成这些,进而使多种多样的物质磷酸化,这些物质包括调节无数生理反应的转录因子和离子通道。在神经元中,这包括 cAMP 和 cGMP-依赖性激酶的活化以及随后参与急性突触传递调节以及神经元分化和存活的蛋白质的磷酸化。cAMP和cGMP的细胞内浓度受到环化酶生物合成速率和PDE降解速率的严格调节。PDE是水解酶,其通过催化水解3' - 酯键,形成失活的5' - 单磷酸而使cAMP及cGMP失活(方案A)。

[0003] 方案A



[0005] 在底物特异性的基础上,PDE家族可以被分为三组:i) cAMP-特异性PDE,其包括PDE4、7和8;ii) cGMP-选择性酶PDE5、6和9;和iii) 双底物PDE, PDE1、2和3,以及PDE10和11。

[0006] 此外,在整个生物体(包括中枢神经系统)中,PDE是差异表达的。因此不同的PDE同工酶可以具有不同的生理学功能。选择性地抑制PDE家族或同工酶的化合物可以显示具体的治疗活性,更小的副作用,或者两者兼有。

[0007] 磷酸二酯酶2A (PDE2A) 通过降解cAMP和cGMP(通过将生物相关的第二信使cAMP和cGMP分别水解成不发出信号的AMP和GMP)使赖于其介导的环核苷酸信号转导的细胞内信号传导机制失活。已知这种信号传导途径在参与诱导突触可塑性的基因的调节中发挥作用。

[0008] 因此,PDE2的药理学抑制引起突触可塑性水平的增加(与学习和记忆潜在相关),表明PDE2A调节可以是用于减轻遭受以下障碍的人类中可见的认知缺陷的靶标,像例如:精

神分裂症、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和其他与认知功能障碍相关的CNS障碍。

[0009] 相对于外周组织,磷酸二酯酶2A (PDE2A) 在脑中更丰富地表达。PDE2 在边缘系统(同形皮质、海马体、扁桃体、松果体、基底核)中的高表达表明PDE2可以调节情绪、感知、专注、学习和记忆中涉及的神经元信号传导。此外,PDE2在伏隔核、嗅球、嗅结节和扁桃体中表达,支持了PDE2也可能参与焦虑和抑郁症的说法。(参见例如,Lakics,V.等人,(2010), Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues.[人脑和外周组织中磷酸二酯酶mRNA分布的定量比较], Neuropharmacol.[神经药理学],59,367-374)。

[0010] 此外,已经显示出PDE2抑制剂在减少氧化应激诱发的焦虑方面是有益的,支持了它们在涉及氧化应激的神经精神障碍和神经退行性障碍的焦虑治疗中的用途,如阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和多发性硬化症。

[0011] 已经显示出PDE2抑制剂在大鼠的目标识别和社会认可测试中增强了突触传递的长时程增强并且改进了记忆获得和巩固。此外,PDE2抑制剂在小鼠T 迷宫中已经显示出逆转了MK-801诱导的工作记忆缺陷。PDE2抑制剂还显示出在强迫游泳测试和光/暗盒子模型中展示活性;以及在高架十字迷宫实验、洞板实验和空场测试中显示抗焦虑样作用并且预防在细胞凋亡和行为中的应激诱发的变化。

[0012] 因此,PDE2抑制剂可用于治疗记忆缺陷、认知障碍、焦虑、双相性障碍和抑郁症。

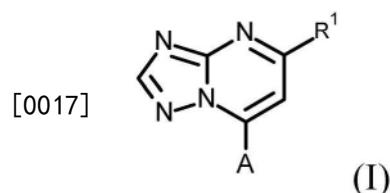
[0013] WO 2015/164508(达特神经科学有限责任公司(Dart Neuroscience,LLC)) 披露了作为PDE2抑制剂的经取代的[1,2,4]三唑并[1,5-a]嘧啶-基化合物。

[0014] 对具有多种特性的有利平衡的PDE2抑制剂化合物仍然存在需求。

发明内容

[0015] 本发明的目的是提供PDE2的新颖的抑制剂,其在与PDE2酶活性有关的疾病的治疗中可能是潜在有用的。

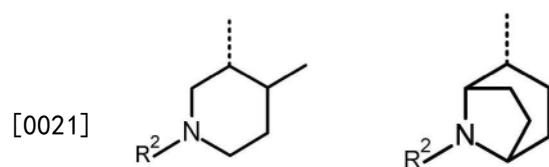
[0016] 因此,本发明涉及具有式(I)的化合物



[0018] 及其立体异构形式,其中

[0019] R¹是CHF₂或CH₃;

[0020] A是选自(a-1)和(a-2)的基团



(a-1), (a-2); 其中

[0022] R²选自2-吡啶基、1-异喹啉基、4-喹唑啉基、1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-4-基、和呋喃并[3,2-c]吡啶-4-基;各自任选地被1个或2个各自独立地选自由以下各项组成的组的取代

基取代：卤基、OH、-CN；任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的C₁₋₄烷基；任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的C₁₋₄烷氧基；和1-吗啉基；

[0023] 及其药学上可接受的盐和溶剂化物。

[0024] 本发明的示例是包含药学上可接受的载体和如本文所述的具有式(I)的化合物、或其药学上可接受的盐或溶剂化物的药物组合物。本发明的示例是通过将如本文所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物和药学上可接受的载体混合来制备的药物组合物。本发明示例了用于制备药物组合物的方法，该方法包括将如本文所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物和药学上可接受的载体混合。

[0025] 本发明另外的示例是增强神经元可塑性的方法，该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的如本文所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或在此所述的药物组合物。

[0026] 本发明示例了治疗由PDE2酶介导的障碍的方法，该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的如本文所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或在此所述的药物组合物。

[0027] 本发明进一步示例了抑制PDE2酶的方法，该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的如本文所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或在此所述的药物组合物。

[0028] 本发明的实例是治疗选自下组的障碍的方法，该组由以下各项组成：神经和精神障碍，该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的如本文所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或在此所述的药物组合物。

[0029] 本发明的实例是治疗选自神经和精神障碍的组的障碍的方法，所述神经和精神障碍选自精神性障碍和病症；焦虑障碍；运动障碍；药物滥用；心境障碍；神经退行性障碍；包含注意力和/或认知缺陷症状的障碍或病症；与记忆获得和巩固相关的障碍；中风；以及自闭性障碍，该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的如本文所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或在此所述的药物组合物。

[0030] 本发明的实例是治疗选自下组的障碍的方法，该组由以下各项组成：神经和精神障碍，该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的如本文所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或在此所述的药物组合物。

[0031] 本发明的实例是治疗选自神经和精神障碍的组的障碍的方法，所述神经和精神障碍选自精神性障碍和病症；焦虑障碍；运动障碍；药物滥用；心境障碍；神经退行性障碍；包含注意力和/或认知缺陷症状的障碍或病症；与记忆获得和巩固相关的障碍；中风；以及自闭性障碍，该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的如本文所述的具有式(I)的化合物或其盐或溶剂化物、或药物组合物。

[0032] 本发明还示例了用作药剂的本文所述的具有式(I)的化合物或其盐或溶剂化物、或药物组合物。

[0033] 本发明进一步示例了根据本发明的具有式(I)的化合物或其盐或溶剂化物，或药物组合物，用于治疗、预防、改善、控制多种神经和精神障碍或降低其风险，这些障碍与哺乳动物(包括人类)中的磷酸二酯酶2功能紊乱相关，其治疗或预防受磷酸二酯酶2的抑制的影响或促进。

[0034] 本发明的实例是根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,或根据本发明的药用组合物,用于治疗、预防、缓解、控制选自以下各项的多种障碍或降低其风险:精神性障碍和病症;焦虑障碍;运动障碍;药物滥用;心境障碍;神经退行性障碍;包含注意力和/或认知缺陷症状的障碍或病症;与记忆获得和巩固相关的障碍;中风;和自闭性障碍。

[0035] 本发明的实例是治疗选自下组的障碍的方法,该组由以下各项组成:阿尔茨海默氏病、轻度认知损害、衰老、痴呆、路易体痴呆、唐氏综合征、与中风相关的痴呆、与帕金森氏病相关的痴呆以及与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆,优选地是阿尔茨海默氏病,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的本文所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或药物组合物。

[0036] 本发明的另一个实例是本文描述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,用于治疗有需要的受试者的以下疾病:(a)阿尔茨海默氏病、(b)轻度认知损害、(c)衰老、(d)痴呆、(e)路易体痴呆、(f)唐氏综合征、(g)与中风相关的痴呆、(h)与帕金森氏病相关的痴呆、(i)与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆、(j)抑郁障碍和(k)焦虑障碍。

附图说明

[0037] 图1的a、b₁和b₂示出了化合物1对在苔藓纤维突触处长时程增强(LTP)的弱HFS诱导的作用。据报道该化合物具有差的溶解性,并且对组织的渗透不利于LTP的诱导。

具体实施方式

[0038] 定义

[0039] 如在此单独使用或作为另一个基团的部分而使用的“C₁₋₄烷基”定义了具有1个、2个、3个或4个碳原子的饱和的直链或支链烃基,如甲基、乙基、1-丙基、1-甲基、丁基、1-甲基-丙基、2-甲基-1-丙基、1,1-二甲基乙基等。“C₁₋₄烷氧基”应当表示醚基,其中C₁₋₄烷基是如在此所定义的。“卤基”应当表示氟基、氯基以及溴基。“C₃₋₇环烷基”应当表示环丙基、环丁基、环戊基、环己基以及环庚基。

[0040] 每当术语“取代的”用于本发明时,除非另有说明或上下文中是明确的,它意为指明在使用“取代”的表述中指示的原子或基团上的一个或多个氢(优选从1至3个氢、或从1至2个氢、或1个氢)被来自所指示组的选择项替代,其条件是未超过正常的化合价,并且该取代产生化学稳定的化合物(即一种足够强健以承受从反应混合物分离至有用程度的纯度,并且足够强健以承受被配制到治疗剂中的化合物)。

[0041] 如在此使用的术语“受试者”是指动物,优选地是哺乳动物,最优选地是人类,该受试者是或已经成为治疗、观察或实验的对象。

[0042] 如在此使用的术语“治疗有效量”意指由研究员、兽医、医师或其他临床医生寻找的,在组织系统、动物或人类中引起生物学或医学反应的活性化合物或药物试剂的量,该反应包括正在被治疗的疾病或障碍的症状的减轻。

[0043] 如在此使用的,术语“组合物”旨在涵盖包含处于特定量的特定成分的产品,连同直接或间接地源于特定量的特定成分的组合的任何产品。

[0044] 在上下文中,术语“具有式(I)的化合物”意指包括其加成盐、溶剂化物以及立体异

构体。

[0045] 在上下文中,术语“立体异构体”或“立体化学异构形式”可互换地使用。

[0046] 本发明包括呈纯立体异构体或呈两种或更多种立体异构体的混合物的具有式(I)的化合物的所有立体异构体。

[0047] 对映体是彼此不可重叠镜像的立体异构体。一对对映体的1:1混合物是外消旋体或外消旋混合物。非对映体(或非对映异构体)是不为对映体的立体异构体,即它们不以镜像形式相关。因此,本发明包括对映异构体、非对映体、外消旋体。

[0048] 在根据本发明的化合物中,用平行线楔形(····)示出的键表示被投影到化学式平面的下方的键,同时用黑体楔形(—►)示出键表示被投影到化学式平面的上方的键。

[0049] 绝对构型是根据卡恩-英戈尔德-普雷洛格(Cahn-Ingold-Prelog)系统指定的。不对称原子处的构型由R或S指定。绝对构型未知的已拆分的化合物可以根据它们旋转平面偏振光的方向而由(+)或(-)指定。

[0050] 当鉴定一种特定立体异构体时,这意指所述立体异构体基本上不含其他异构体,即与其他异构体的关联小于50%,优选地小于20%,更优选地小于10%,甚至更优选地小于5%,特别是小于2%并且最优选地小于1%。因此,当具有式(I)的化合物例如被指定为(R)时,这意指该化合物基本上不含(S)异构体。

[0051] 此外,本发明化合物的一些晶型可以作为多晶型物存在并且同样旨在被包括在本发明之内。另外,本发明的一些化合物可以与水(即,水合物)或常用有机溶剂形成溶剂化物,并且此类溶剂化物也旨在被涵盖在本发明的范围之内。

[0052] 为了在医学中使用,本发明的化合物的盐是指无毒的“药学上可接受的盐”。然而,其他盐可以适用于制备根据本发明的化合物或其药学上可接受的盐。化合物的适合的药学上可接受的盐包括可以例如通过将化合物的溶液与药学上可接受的酸的溶液混合而形成的酸加成盐,该药学上可接受的酸是如盐酸、硫酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、乙酸、苯甲酸、柠檬酸、酒石酸、碳酸或磷酸。此外,在本发明的化合物携带酸性部分时,其适合的药学上可接受的盐可以包括碱金属盐,例如,钠盐或钾盐;碱土金属盐,例如钙盐或镁盐;以及与适合的有机配体形成的盐,例如季铵盐。

[0053] 可以用于制备药学上可接受的盐的代表性酸包括但不限于以下各项:乙酸、2,2-二氯-乙酸、酰化氨基酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰胺基苯甲酸、(+)-樟脑酸、樟脑磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环己酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基-乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡萄糖酸、D-葡萄糖醛酸、L-谷氨酸、β-氧代-戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸、乳糖酸、马来酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、(±)-DL-扁桃酸、甲磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、磷酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、单宁酸、(+)-L-酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟甲基磺酸以及十一碳烯酸。可以用于制备药学上可接受的盐的代表性碱包括但不限于以下各项:氨、L-精氨酸、苯乙基胺、苯丙氨酸、氢氧化钙、胆碱、二甲基乙醇胺、二乙醇胺、二乙胺、2-(二乙氨基)-乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基-葡萄糖胺、哈胺(hydrazamine)、1H-咪唑、L-赖氨酸、氢氧化镁、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、氢氧化钾、1-(2-羟乙基)吡咯烷、仲胺、氢氧化钠、三乙醇胺、氨丁三醇以及氢氧化锌。

[0054] 本发明的化合物的名称根据由化学文摘社 (Chemical Abstracts Service) (CAS) 商定的命名规则使用高等化学发展有限公司 (Advanced Chemical Development, Inc.) 的软件 (ACD/命名产品版本10.01;Build 15494,2006年 12月1日或ACD/ChemSketch 产品版本12.5;Build 47877,2011年4月20日) 或者根据由国际纯粹与应用化学联合会 (International Union of Pure and Applied Chemistry) (IUPAC) 商定的命名规则使用高等化学发展有限公司的软件 (ACD/ 命名产品版本10.01.0.14105,2006年10月) 来生成。在互变异构形式的情况下,产生该结构的描绘的互变异构形式的名称。其他未描绘的互变异构形式也被包括在本发明的范围内。

[0055] 本发明涉及如在上文所定义的具有式 (I) 的化合物以及其药学上可接受的盐和溶剂化物。

[0056] 在具体的实施例中,本发明涉及如本文所述的根据式 (I) 的化合物,其中 R^2 选自 2-吡啶基和1-异喹啉基;其各自任选地被各自独立地选自下组的1个或 2个取代基取代,该组由以下各项组成:卤基、OH、-CN;任选地被1个、2 个或3个独立选择的卤基取代基取代的 C_{1-4} 烷基;以及任选地被1个、2个或3 个独立选择的卤基取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基。

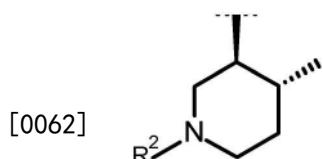
[0057] 在具体的实施例中,本发明涉及如本文所述的根据式 (I) 的化合物,其中 R^2 是任选地被各自独立地选自下组的1个或2个取代基取代的1-异喹啉基,该组由以下各项组成:卤基、OH、-CN;任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的 C_{1-4} 烷基;和任选地被1个、2个或3个独立选择的卤基取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基。

[0058] 在具体的实施例中,本发明涉及如本文所述的根据式 (I) 的化合物,其中 R^2 是任选地被1个或2个独立选择的卤基取代基取代的1-异喹啉基。

[0059] 在具体的实施例中,本发明涉及如本文所述的根据式 (I) 的化合物,其中 R^2 是未取代的1-异喹啉基或被氯或溴取代的1-异喹啉基。

[0060] 在具体的实施例中,本发明涉及如本文所述的根据式 (I) 的化合物,其中 A是如本文所述的基团 (a-1)。

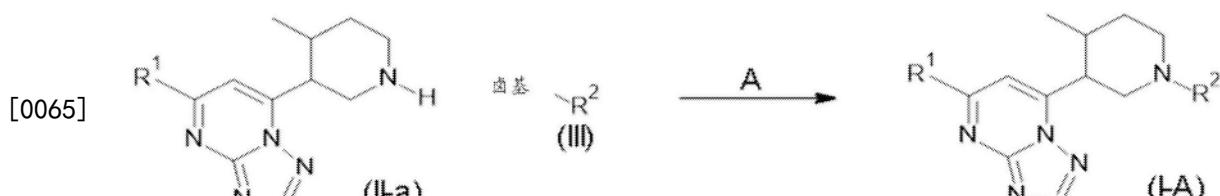
[0061] 在具体的实施例中,本发明涉及如本文所述的根据式 (I) 的化合物,其中 A是具有式 (a-1a) 的基团 (a-1)



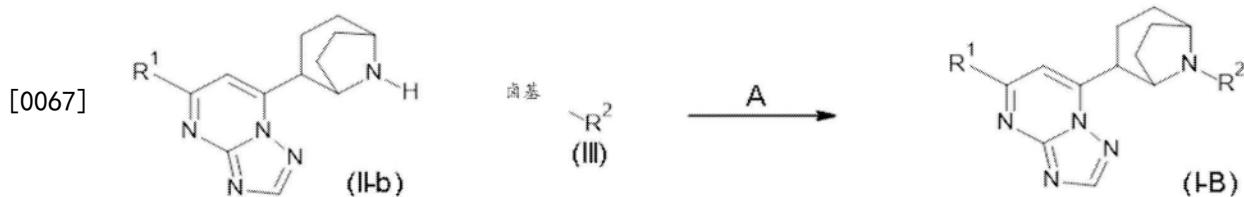
(a-1a)。

[0063] 化合物的制备

[0064] 实验方法1



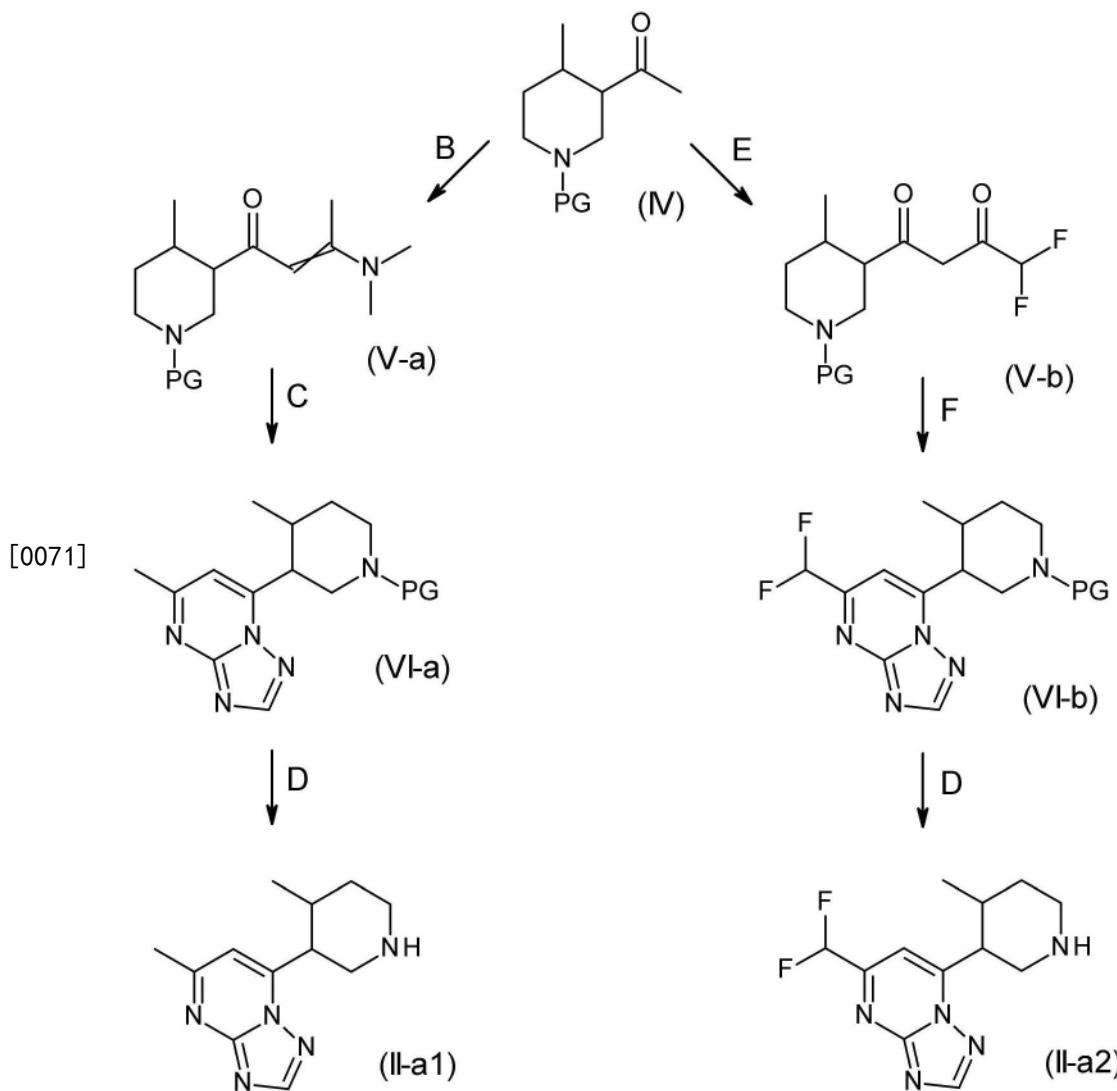
[0066] 反应方案1a



[0068] 反应方案1b

[0069] 其中 R^B 是式(a)或(b)的基团的最终化合物(在本文中分别称为具有式(I-A)和式(I-B)的化合物)可以按照本领域已知的方法(反应步骤A),通过与卤化物(III)反应来方便地制备。所述转化可在合适的碱(例如DIPEA或 K_2CO_3)存在下,在合适的溶剂(如DCM或DMSO)存在下,在热条件下(如加热至100°C-160°C),通过用具有式(III)的中间体处理具有式(II-a)或(II-b)的中间体中的哌啶类官能度来方便地进行。具有式(III)的试剂可商购获得或可通过本领域已知的方法制备。

[0070] 实验方法2



[0072] 反应方案2

[0073] B:与N,N-二甲基乙酰胺二甲缩醛反应

[0074] C,F:与1H-1,2,4-三唑-3-胺盐酸盐反应

[0075] D: 保护基团裂解

[0076] E: 与2,2,-二氟-乙酸乙酯反应

[0077] 具有式 (II-a) 中间体 (其中R¹是甲基或CHF₂, 在本文中分别称为具有式 (II-a1) 和 (II-a2) 的中间体) 可以由具有式 (IV-a) 的中间体 (其中PG是合适的氨基保护基, 如叔丁氧基羰基 (Boc)) 制备形成。

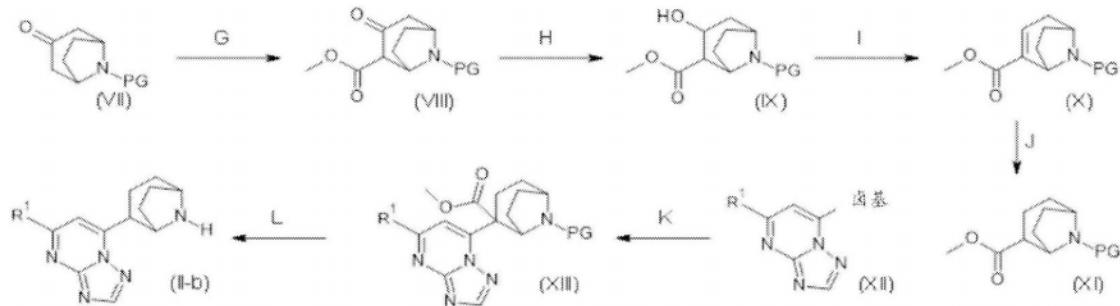
[0078] 与N,N-二甲基乙酰胺二甲基缩醛的反应可以在热条件 (如例如在100°C 加热) 下净 (neat) 进行。

[0079] 与2,2-二氟乙酸乙酯的反应可在碱 (如KO^tBu) 存在下, 在反应惰性溶剂 (如甲苯) 中, 在适当的温度 (如0-5°C), 然后在室温进行。

[0080] 双环核可以通过中间体 (V-a) 或 (V-b) 与1H-1,2,4-三唑-3-胺盐酸盐在反应惰性溶剂 (如例如DMF) 中在热条件下 (如例如在80°C 加热) 反应形成。

[0081] 中间体 (VI-a) 或 (VI-b) 中保护基团的裂解可以根据本领域已知的方法进行, 例如, 当保护基团是Boc时, 裂解可以在酸性条件 (如例如在室温在 MeOH中的HCl, 或DCM中的TFA) 下进行。

[0082] 实验方法3



[0083] 反应方案3

[0085] G: 与氰基甲酸甲酯反应

[0086] H: 还原

[0087] I: 脱水

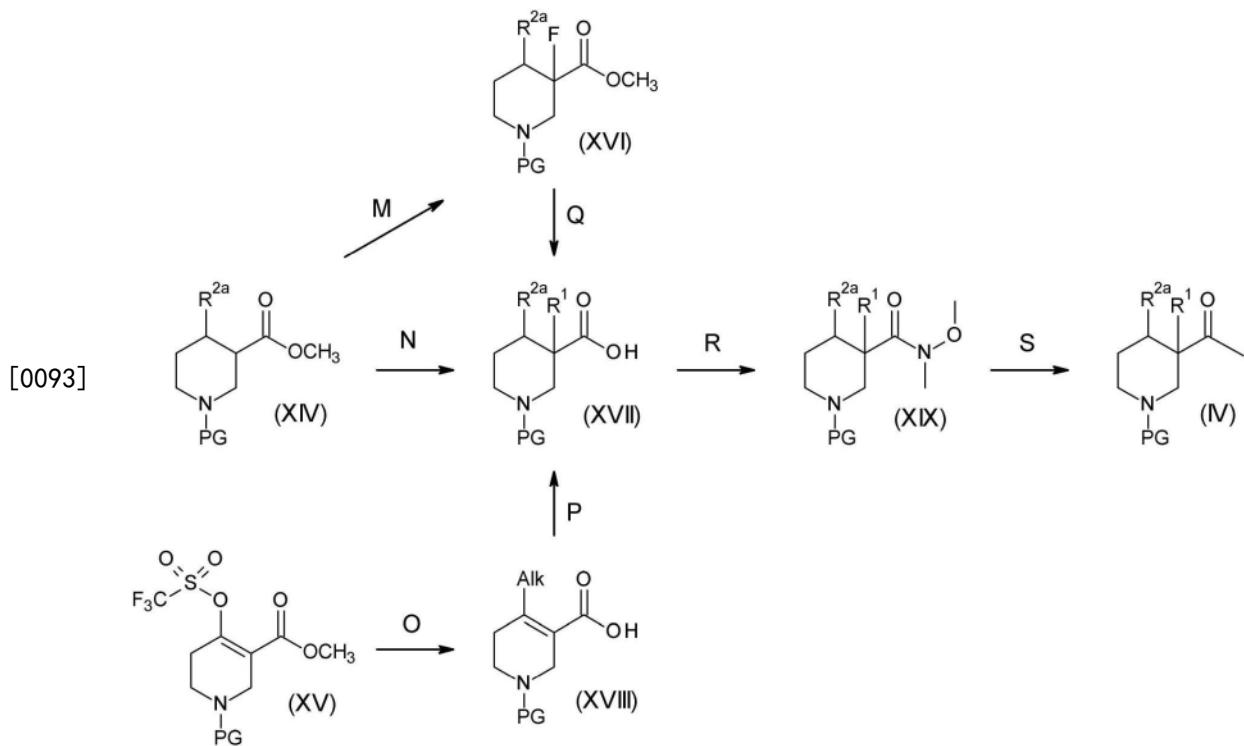
[0088] J: 氢化

[0089] K: 偶联

[0090] L: 脱羧和保护基团裂解

[0091] 具有式 (II-b) 的中间体的形成可如本文所述制备, 或可替代地, 通过一系列合成步骤, 从市售的具有式 (VII) 的起始原料 (如N-Boc-去甲吡酮 [185099-67-6]) 开始制备。在碱 (如nBuLi 和 NH^tPr₂) 存在下, 在反应惰性溶剂 (如THF) 中, 在适当的温度 (如-78°C) 与氰基甲酸甲酯反应, 得到酮-酯 (VIII), 随后可将其用NaBH₄在本领域已知条件 (例如在约0°C 在 MeOH中) 下还原, 然后在碱 (如三乙胺和DMAP) 存在下, 在反应惰性溶剂 (如DCM) 中, 保持温度低于60°C, 用例如三氟乙酸酐脱水。在本领域已知条件下 (如例如在MeOH中的钯/碳催化剂存在下) 的氢化提供中间体 (XI), 然后可将其在碱 (如例如LDA) 存在下, 在反应惰性溶剂 (如THF) 中, 在-78°C至-60°C的温度下与市售或根据本领域已知方法制备的具有式 (XII) 的中间体反应。在热条件下 (如例如在150°C 加热) 与浓HCl反应使得当酸不稳定时, 中间体 (II-b) 伴随保护基团 (如例如Boc) 的裂解。

[0092] 实验方法4



[0094] 反应方案4

[0095] M:氟化

[0096] N:甲基化和/或皂化

[0097] O:铃木(Suzuki) (烷基化) 和皂化

[0098] P:氢化

[0099] Q:皂化

[0100] R:魏因雷布(Weinreb) 酰胺形成

[0101] S:酰胺至酮的转化(例如:格氏反应(Grignard))

[0102] 中间体(IV)的形成可以通过一系列官能团互变,从中间体(XIV)、(XV)或(XVI)开始来进行,所述中间体可以商购获得,或可以例如根据本文所述的那些方法制备。

[0103] 具有式(XIV)的化合物(其中R^{2a}是氢或甲基,且PG是Boc)可以商购或根据一系列已知方法(如本文所述的那些)制备。可以根据本领域已知的方法对它们进行氟化或烷基化,如在碱(如LDA)存在下,在反应惰性溶剂(如THF)中与N-氟苯磺酰亚胺反应,或用碱(如LiHMDS)处理后用烷基碘化物烷基化;任选地,随后在本领域已知的条件下皂化,得到(XI)。

[0104] 具有式(XV)的化合物也是本领域已知的,可以通过铃木型方法,使用本领域技术人员已知的条件(如使用硼酸/酯),在催化剂(如Pd(PPh₃)₄)存在下,在反应惰性溶剂(如1,4-二噁烷)中,在如加热等热条件下进行烷基化。随后在类似于本文所述的那些条件下皂化和氢化,得到具有式(XVII)的中间体。

[0105] 如本文所述,随后的魏因雷布酰胺形成和用格氏反应进行的酰胺至酮的转化提供所需的中间体(IV)。

[0106] 药理学

[0107] 根据本发明的化合物抑制PDE2酶活性,特别是PDE2A,并且因此提高表达PDE2的细

胞内的cAMP或cGMP水平。相应地, PDE2酶活性的抑制可用于治疗由细胞中cAMP或cGMP的量缺乏所引起的疾病。PDE2抑制剂也可以有益于如下情况, 其中提高cAMP或cGMP的量超过正常水平产生治疗效果。PDE2抑制剂可用于治疗神经和精神障碍。

[0108] 因此, 本发明涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 用于作为药物使用, 连同涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或根据本发明的药物组合物用于制造药剂的用途。本发明还涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或根据本发明的药物组合物, 用于治疗或预防, 特别是治疗哺乳动物(包括人类)中的病症, 该病症的治疗或预防是受磷酸二酯酶2的抑制的影响或促进。本发明还涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或根据本发明的药物组合物用于制造用于治疗或预防, 特别是治疗哺乳动物(包括人类)中的病症的药剂的用途, 该病症的治疗或预防是受磷酸二酯酶2的抑制的影响或促进。

[0109] 本发明还涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或根据本发明的药物组合物, 用于治疗、预防、改善、控制多种神经和精神障碍或降低其风险, 这些障碍与哺乳动物(包括人类)中的磷酸二酯酶2功能紊乱相关, 其治疗或预防受磷酸二酯酶2的抑制的影响或促进。

[0110] 同样, 本发明涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或根据本发明的药物组合物用于制造用于治疗、预防、改善、控制多种神经和精神障碍或降低其风险的药剂的用途, 这些障碍与哺乳动物(包括人类)中的磷酸二酯酶2功能紊乱相关, 其治疗或预防受磷酸二酯酶2的抑制的影响或促进。

[0111] 在提交本发明涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或组合物用于制造用于例如治疗受试者(例如哺乳动物)的药剂的用途的情况下, 应当理解的是此类用途在某些司法管辖权内被解释为例如治疗受试者的方法, 该方法包括向对此类(例如治疗)有需要的受试者给予有效量的根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或组合物。

[0112] 特别地, 这些适应症可以用PDE2抑制剂单独地或与其他药物组合地进行治疗, 这些适应症包括但不限于: 被认为部分由基底核、前额皮质和海马体介导的那些疾病。

[0113] 这些适应症包括选自精神性障碍和病症的神经和精神障碍; 焦虑障碍; 运动障碍; 药物滥用; 心境障碍; 神经退行性障碍; 包含注意力和/或认知缺陷症状的障碍或病症; 与记忆获得和巩固相关的障碍; 中风; 和自闭性障碍或孤独症。

[0114] 具体地, 与PDE2功能障碍相关的精神性障碍和病症包括以下一种或多种病症或疾病: 精神分裂症, 例如妄想型、紊乱型、紧张型、未分型或残余型精神分裂症; 精神分裂症样障碍; 情感性分裂障碍, 如妄想型或抑郁型; 妄想性障碍; 物质诱发的精神性障碍, 如酒精、安非他明、大麻、可卡因、致幻剂、吸入剂、阿片类药物或苯环利定诱发的精神病; 偏执型人格障碍; 以及分裂样人格障碍。

[0115] 特别地, 焦虑障碍包括: 惊恐性障碍; 广场恐怖症; 特殊恐惧症; 社交恐惧症; 强迫性障碍; 创伤后应激障碍; 急性应激障碍; 以及广泛性焦虑障碍。

[0116] 特别地, 运动障碍包括: 亨廷顿氏病和异动症; 帕金森氏病; 下肢不宁综合征和特发性震颤。另外地, 可以包括妥瑞氏综合征(Tourette's syndrome)和其他抽动障碍。

[0117] 特别地,中枢神经系统障碍是选自下组的物质相关障碍:酒精滥用;酒精依赖;酒精戒断;酒精戒断性谵妄;酒精诱发的精神性障碍;安非他明依赖;安非他明戒断;可卡因依赖;可卡因戒断;尼古丁依赖;尼古丁戒断;阿片类药物依赖和阿片类药物戒断。

[0118] 具体地,心境障碍和心境发作包括抑郁症、躁狂症和双相性障碍。优选地,心境障碍选自下组:双相性障碍(I型和II型);循环性心境障碍;抑郁症;心境恶劣障碍;重度抑郁障碍;难治性抑郁症;和物质诱发的心境障碍。

[0119] 具体地,神经退行性障碍包括:帕金森氏病;亨廷顿氏病;痴呆例如像阿尔茨海默氏病;多发梗塞性痴呆;艾滋病相关痴呆或额颞痴呆。所述神经退行性障碍或病症包含纹状体中棘神经元反应的机能障碍。

[0120] 具体地,包含注意力和/或认知缺陷症状的障碍或病症包括痴呆,如阿尔茨海默氏病;多发梗塞性痴呆;由路易体病引起的痴呆;酒精性痴呆或物质诱发的持续性痴呆;与颅内肿瘤或颅脑创伤相关的痴呆;与亨廷顿氏病相关的痴呆;与帕金森氏病相关的痴呆;艾滋病相关痴呆;由皮克氏(Pick's)病引起的痴呆;由克罗伊茨费尔特-雅各布(Creutzfeldt-Jakob)病引起的痴呆;其他疾病,包括谵妄;遗忘障碍;创伤后应激障碍;中风;进行性核上性麻痹;精神发育迟滞;学习障碍;注意力缺陷/多动障碍(ADHD);轻度认知障碍;阿斯伯格氏综合征;年龄相关的认知损害;与感知、专注、学习或记忆相关的认知损害。

[0121] 具体地,与记忆获得和巩固相关的障碍包括:记忆障碍,如与年龄相关的记忆丧失、记忆缺陷。

[0122] 优选地,精神性障碍选自下组:精神分裂症、妄想性障碍、情感性分裂障碍、精神分裂症样障碍和物质-诱发的精神性障碍。

[0123] 优选地,中枢神经系统障碍是选自下组的人格障碍:强-迫型人格障碍和分裂样障碍、分裂型障碍。

[0124] 优选地,中枢神经系统障碍是选自下组的心境障碍:双相性障碍(I型和II型)、循环性心境障碍、抑郁症、心境恶劣障碍、重度抑郁障碍、难治性抑郁症、和物质诱发的心境障碍。

[0125] 优选地,该中枢神经系统障碍是注意力缺陷/多动障碍。

[0126] 优选地,中枢神经系统障碍是选自下组的认知障碍:谵妄、物质-诱发的持续性谵妄、痴呆、由HIV疾病引起的痴呆、由亨廷顿氏病引起的痴呆、由帕金森氏病引起的痴呆、阿尔茨海默氏型痴呆、物质-诱发的持续性痴呆和轻度认知损害。

[0127] 优选地,由本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物治疗的障碍选自精神分裂症;强迫症;广泛性焦虑障碍;亨廷顿氏病;异动症;帕金森氏病;抑郁症;双相性障碍;痴呆(如阿尔茨海默氏病);注意力缺陷/多动障碍;药物滥用;中风;和孤独症。

[0128] 优选地,由本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物治疗的障碍是精神分裂症,包括其阳性和阴性症状,和认知缺陷,如注意力或记忆力受损。

[0129] 以上提到的障碍中,焦虑、强迫性障碍、创伤后应激障碍、广泛性焦虑障碍、精神分裂症、抑郁症、注意力缺陷/多动障碍、阿尔茨海默氏病、由亨廷顿氏病引起的痴呆、由帕金森氏病引起的痴呆、阿尔茨海默氏型痴呆、物质诱发的持续性痴呆以及轻度认知损害的治疗是尤其重要的。

[0130] 以上提到的障碍中,焦虑、强迫性障碍、精神分裂症、抑郁症、注意力缺陷/多动障碍以及阿尔茨海默氏病的治疗是尤其重要的。

[0131] 其他的中枢神经系统障碍包括精神分裂焦虑障碍,以及抑郁症和焦虑共病,特别地重度抑郁障碍与广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、或惊恐性障碍共病;应当理解的是抑郁症和焦虑共病也可以是指术语焦虑抑郁症、混合焦虑抑郁症、混合焦虑抑郁障碍、或具有焦虑症状的重度抑郁障碍,它们在此无区别使用。

[0132] 目前,第四版的美国精神病学协会的精神障碍的诊断与统计学手册(Diagnostic&Statistical Manual of Mental Disorders) (DSM-IV) 为在此所述的障碍的鉴别提供了诊断工具。本领域技术人员将意识到存在关于在此所述的神经障碍和精神障碍的可替代的术语表、疾病分类学、以及分类系统,并且其随着医学和科学的进步而发展。例如,“American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders [美国精神病学协会:精神障碍的诊断与统计学手册],第五版,阿灵顿,弗吉尼亚州,美国精神病学协会 (American Psychiatric Association),2013” (DSM-5TM) 利用以下术语,如抑郁障碍,特别是重度抑郁障碍、持续性抑郁障碍(心境恶劣)、物质药物诱发的抑郁障碍;神经认知障碍(NCD)(重度和中度两者),特别是由阿尔茨海默氏病引起的神经认知障碍、血管性NCD(如表现为多发性梗死的血管性 NCD)、由HIV感染引起的NCD、由创伤性脑损伤(TBI)引起的NCD、由帕金森氏病引起的NCD、由亨廷顿氏病引起的NCD、额颞性NCD、由朊病毒病引起的NCD、以及物质/药物诱发的NCD;神经发育障碍,特别是智力残疾、特殊学习障碍、神经发育性运动障碍、沟通障碍、以及注意力缺陷/多动障碍 (ADHD);物质相关性障碍和成瘾性障碍,特别是酒精使用障碍、安非他明使用障碍、大麻使用障碍、可卡因使用障碍、其他致幻剂使用障碍、烟草使用障碍、阿片类药物使用障碍、以及苯环利定使用障碍;精神分裂症谱系以及其他精神性障碍,特别是精神分裂症、精神分裂症样障碍、情感性分裂障碍、妄想性障碍、短时精神性障碍、物质/药物诱发的精神性障碍、以及循环性心境障碍(其在DSM-5TM下归类在双相和相关障碍分类下)。技术人员可以使用此类术语作为用于一些在此提及的疾病或病症的替代性命名。另外的神经发育障碍包括孤独症谱系障碍(ASD),根据DSM-5TM这种障碍涵盖先前通过术语早期幼儿孤独症、儿童期孤独症、卡纳氏孤独症(Kanner's autism)、高功能孤独症、非典型孤独症、未以另外的方式指明的广泛性发育障碍、儿童期崩解症、以及亚斯伯格症(Asperger's disorder)而已知的障碍。

[0133] 因此,本发明还涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,用于治疗任何一种上文提及的疾病。

[0134] 本发明还涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,用于治疗任何一种上文提及的疾病。

[0135] 本发明还涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,用于治疗或预防,特别地治疗任何一种上文提及的疾病。

[0136] 本发明还涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物用于制造用于治疗或预防上文提及的任何一种疾病状况的药剂的用途。

[0137] 本发明还涉及根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物用于制造用于治疗上文提及的任何一种疾病状况的药剂的用途。

[0138] 可以将本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物给予至哺

乳动物,优选人类,用于治疗或预防上文提及的任何一种疾病。

[0139] 鉴于根据本发明的具有式(I)的化合物及其药学上可接受的盐和溶剂化物的效用,提供了一种治疗上文提及的障碍或疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的在此所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或药物组合物。

[0140] 所述方法包括向温血动物(包括人类)给予,即,全身给予或局部给予,优选口服给予治疗有效量的根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0141] 因此,本发明还涉及用于预防和/或治疗任何一种上文提及的疾病的方法,该方法包括向有需要的患者给予治疗有效量的根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0142] 在此所述的PDE2抑制剂可以单独使用,组合使用或与其他药物试剂组合使用,这些其他药物试剂如在治疗精神病中使用的其他试剂,该精神病如精神分裂症和双相性障碍、强迫性障碍、帕金森氏病、认知损害和/或记忆丧失,这些试剂例如,烟碱 α -7激动剂、PDE4抑制剂(咯利普兰、GEBR-7b、GSK356278、GSK256066、阿普斯特、MK-0952、罗氟司特、AN2898、AN2728、西洛司特(Ariflo Cilomilast)、屈他维林、Ronomilast Elbimilast、Revamilast、替托司特、E6005、GDP-1116、HT0712、MK-0873)、PDE5抑制剂(西地那非、伐地那非、他达拉非、乌地那非、阿伐那非、米罗那非、罗地那非、达生他非、PF-00489791)、PDE9(PF-04447943)、其他PDE2抑制剂(Bay 60-7550、PF-999、ND-7001)、PDE10抑制剂(PF-02545920、AMG579)、PDE2和PDE10抑制剂、钙通道阻断剂、毒蕈碱m1和m2调节剂、腺苷酸受体调节剂、安帕金、NMDA-R调节剂、mGluR调节剂、多巴胺调节剂、血清素调节剂、大麻素调节剂、HDAC抑制剂(伏立诺他SAHA、帕比司他、奎辛司他、丙戊酸)、和胆碱酯酶抑制剂(例如多奈哌齐、卡巴拉汀、和加兰他敏)。在此类组合中,本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物可以与一种或多种其他药物组合使用,用于治疗、预防、控制、改善疾病或病症或降低其风险,对于所述疾病或病症具有式(I)的化合物或其他药物可以具有效用,其中药物组合在一起比任何一种单独的药物更安全或更有效。

[0143] 本领域普通技术人员将认识到,本发明的PDE2抑制剂的治疗有效量是足以抑制PDE2酶的量,并且这个量尤其取决于疾病类型、治疗性配制品中化合物的浓度以及患者的病状而不同。通常,有待作为用于治疗在其中PDE2酶的抑制是有益的疾病(如在此所述的这些障碍)的治疗剂而给予的PDE2抑制剂的量将根据具体情形由主治医师决定。

[0144] 通常,适合的剂量是导致在治疗部位处的PDE2抑制剂的浓度处于0.5nM至200 μ M并且更常见在5nM至50 μ M的范围内的剂量。为了获得这些治疗浓度,需要治疗的患者可能将在0.001mg/kg至15mg/kg体重之间给药,特别是从0.01mg/kg至2.50mg/kg体重,特别是从0.01至1.5mg/kg体重,特别是从0.1mg/kg至0.50mg/kg体重。实现治疗作用所需要的根据本发明的化合物(在此还被称为活性成分)的量将(当然在-根据具体情形-的基础上变化)随着具体化合物、给予途径、接受者的年龄和病症、以及正被治疗的具体障碍或疾病而变化。治疗方法还可以包括按照每天一次与四次之间的摄取的方案来给予活性成分。在这些治疗方法中,优选在入院之前配制根据本发明的化合物。如在本文下文中所述的,合适的药物配制品通过已知程序使用熟知并且容易可得的成分来制备。

[0145] 药物组合物

[0146] 本发明还提供了组合物,用于预防或治疗其中PDE2的抑制是有益的疾病(如神经和精神障碍)。所述组合物包括治疗有效量的具有式(I)的化合物以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0147] 虽然可以单独给予活性成分,但优选的是以药物组合物形式呈递。因此,本发明进一步提供了药物组合物,该药物组合物包含根据本发明的化合物连同药学上可接受的载体或稀释剂。该载体或稀释剂在与该组合物的其他成分相容的意义上必须是“可接受的”而对于其接受者是无害的。

[0148] 可以通过制药领域所熟知的任何方法来制备本发明的药物组合物。治疗有效量的呈碱形式或加成盐形式的作为活性成分的具体化合物与药学上可接受的载体组合成紧密混合物,该载体可以取决于给予所希望的制剂形式而采用多种多样的形式。这些药物组合物合意地呈整体剂型,优选地适用于全身给予,如口服、经皮或肠胃外给予;或局部给予如通过吸入、鼻喷雾、滴眼剂或通过霜剂、凝胶剂、洗发剂等给予。例如,在制备呈口服剂型的组合物中,可使用任何常见药物介质,在口服液体制剂(如悬浮液、糖浆剂、酏剂、以及溶液)的情况下,使用例如像水、二醇类、油类、醇类等;或在粉剂、丸剂、胶囊和片剂的情况下,使用固体载体如淀粉、糖、高岭土、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。因为其容易给予,片剂和胶囊剂代表最有利的口服单位剂型,在该情形下显然采用固体药物载体。对于肠胃外组合物而言,载体通常将包含至少大部分的无菌水,但也可以包括其他成分例如以辅助溶解性。可以制备例如可注射溶液,其中载体包含盐水溶液、葡萄糖溶液或盐水与葡萄糖溶液的混合物。也可以制备可注射悬浮液,在这种情况下可以采用适当的液体载体、悬浮剂以及类似物。在适合于经皮给予的组合物中,载体任选地包含渗透增强剂和/或适合的可湿润剂,任选地与小比例的具有任何性质的适合添加剂组合,这些添加剂不会对皮肤造成任何显著有害作用。所述添加剂可促进向皮肤给药和/或可有助于制备期望的组合物。这些组合物能够以不同方式,例如作为透皮贴剂、作为滴-剂或作为软膏给予。

[0149] 尤其有利的是将以上提及的药物组合物配制成单位剂型以实现给予简易性和剂量均一性。如本说明书和权利要求书中所用的单位剂型在此是指适合作为单位剂量的物理离散单位,每一单位含有经计算以与所需的药物载体结合而产生所希望的治疗作用的预定量的活性成分。此类单位剂型的实例是片剂(包括刻痕或包衣片剂)、胶囊剂、丸剂、散剂包、糯米纸囊剂、可注射溶液或悬浮液、茶匙剂、汤匙剂等,及其分开的多个。

[0150] 取决于给予模式,该药物组合物将包含按重量计从0.05%至99%,优选地按重量计从0.1%至70%,更优选地按重量计从0.1%至50%的活性成分,以及按重量计从1%至99.95%,优选地按重量计从30%至99.9%,更优选地按重量计从50%至99.9%的一种药学上可接受的载体,所有的百分数都基于该组合物的总重量。

[0151] 本发明化合物可以用于全身给予,如口服、经皮或肠胃外给予;或局部给予如通过吸入、鼻喷雾、滴眼剂或通过霜剂、凝胶剂、洗发剂等给予。该化合物优选地口服给予。

[0152] 如本领域的普通技术人员所熟知的,给予的精确剂量以及频率取决于化合物、进行治疗的具体病症、进行治疗的病症的严重性、具体患者的年龄、体重、性别、障碍程度以及总体身体健康状况,连同个体可以服用的其他药物。此外,显而易见的是,所述有效日用量可以降低或提高,这取决于所治疗的受试者的反应和/或取决于给出本发明化合物处方的医生的评估。

[0153] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的具有式(I)的化合物的量将取决于治疗的疾病、哺乳动物种类以及具体给予模式而变化。然而,作为一般指导,本发明的这些化合物的适合单位剂量可以例如优选地含有0.1mg至约1000mg之间的活性化合物。优选的单位剂量是在1mg至大约500mg之间。更优选的单位剂量是在1mg至大约300mg之间。甚至更优选的单位剂量是在1mg至大约100mg之间。这样的单位剂量可以每天超过一次地被给予,例如一天2、3、4、5或6次,但是优选每天1次或2次,这样使得对于一个70kg的成人每次给予的总剂量是每kg受试者重量在0.001至大约15mg的范围内。优选的剂量是每次给予每kg受试者重量0.01至约1.5mg,并且此类疗法可以持续多个星期或月,并且在一些情况下,持续多年。然而,应当理解,任何特定患者的具体剂量水平取决于各种因素,包括采用的特定化合物的活性;被治疗个体的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;给予时间和途径;排泄速率;先前给予的其他药物;及进行医疗的特定疾病的严重性,如本领域技术人员所熟知的。

[0154] 典型剂量可以是一天服用一次或一天多次的一片1mg至约100mg片剂或1mg至约300mg,或者一天服用一次的、并且含有在比例上含量较高的活性成分的一粒延时释放(time-release)的胶囊或片剂。延时释放效应可以通过在不同的pH值下溶解的胶囊材料、通过经渗透压造成的缓慢释放的胶囊、或者通过控制释放的任何其他已知手段来获得。

[0155] 如本领域技术人员将理解的,在一些情况下有必要使用这些范围外的剂量。此外,应当注意临床医生或治疗医师结合个体患者反应将知道如何以及何时开始、中断、调节或终止治疗。

[0156] 对于以上提供的组合物、方法以及试剂盒,本领域技术人员将理解,在每个中使用的优选化合物是在此注明的化合物

[0157] 实验部分

[0158] 如在此所使用,术语“ACN”意指乙腈,“AcOH”意指乙酸,“DMAP”意指4-二甲基氨基吡啶,“DSC”意指差示扫描量热法,“LCMS”意指液相色谱法/质谱法,“HPLC”意指高效液相色谱法,“RP HPLC”意指反相高效液相色谱法,“aq.”意指水性的,“DCM”意指二氯甲烷,“DIPE”意指二异丙醚,“DIPEA”意指二异丙基乙胺,“DMF”意指N,N-二甲基甲酰胺,“EtOH”意指乙醇,“Et₂O”意指二乙醚,“EtOAc”意指乙酸乙酯,“Et₃N”意指三乙胺,“HBTU”意指0-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯,“THF”意指四氢呋喃,“min”意指分钟,“h”意指小时,“MeOH”意指甲醇,“MTBE”意指甲基叔丁基醚,“iPrOH”意指2-丙醇,“RM”意指反应混合物,“RT”意指室温,“OL”意指有机层,“R_t”意指保留时间(以分钟计),“quant.”意指定量的,“sat.”意指饱和的,“sol.”意指溶液,“m.p.”意指熔点,“q.s.”意指足量。

[0159] 使用试剂级溶剂,在硅胶60F254板(默克公司(Merck))上进行薄层层析法(TLC)。在标准技术下,在硅胶(网目230-400粒度以及60 Å孔径大小(默克公司))上进行开口柱色谱。使用来自默克公司的易连接柱,在来自阿尔钦仪器公司(Armen Instrument)的SPOT或LAFLASH系统上,在不规则凝胶上进行自动快速柱色谱法,粒度15-40μm(正向一次性使用的快速柱)。

[0160] 当立体中心用‘RS’表示时,这意指在指定中心获得了外消旋混合物,除非另外指明。当将这些混合物分离时,可以将在一些化合物中心的立体化学构型指定为“R”或“S”;对于一些化合物,尽管该化合物本身已经作为单一的立体异构体被分离并且是对映异构体纯的/非对映构体纯的,但是当绝对立体化学未确定时,已经将在指定中心的立体化学构型指

定为^{*}R或^{*}S。

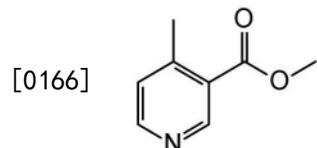
[0161] 使用振动圆二色光谱 (VCD) 确定这些化合物中的一些的绝对立体化学的构型。在配备有PMA 37的Bruker Equinox 55上,在KBr液体池中使用CD₂Cl₂作为溶剂 (PEM:1350cm⁻¹, LIA:1mV, 分辨率:4cm⁻¹), 对它们进行测量。关于VCD用于绝对构型测定用法的说明可以发现于Dyatkin A.B. 等人, Chirality[手征], 14:215-219 (2002) 中。从头计算: 使用宏模型在分子力学水平上进行彻底的构象检索, 从而以OPLS-2005力场进行混合扭转/低模取样。用模拟二氯甲烷溶剂的泊松-波尔兹曼 (Poisson-Boltzmann) 连续溶剂化模型使用捷豹 (Jaguar) 在B3LYP/6-31G**水平上优化定位的最小值。使用10kJ/mol区间内的所有构象模拟VCD和IR光谱。使用捷豹 (Jaguar) 在相同的B3LYP/6-31G** 水平下计算偶极和旋转强度。在以0.97的因子缩放频率, 转换为洛伦兹谱带形, 并将每个构象异构体的贡献相加(假设波尔兹曼系综 (Boltzmann ensemble)) 后生成的计算的VCD光谱与实验光谱进行视觉比较以用于分配正确的立体化学。

[0162] 如本领域技术人员所理解的, 使用所示方案合成的化合物可以作为溶剂化物例如水合物存在和/或含有残留溶剂或微量杂质。以盐形式分离的化合物可以是整数化学计量的, 即单盐或二盐, 或以中间化学计量。

[0163] 以下实例旨在说明但并非限制本发明的范围。除非另外指出, 否则所有起始材料都从商业供应商获得并且不经进一步纯化即使用。

[0164] A. 中间体的合成

[0165] 中间体1

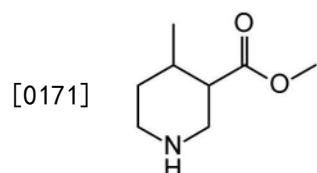


[0167] 程序a: 将4-甲基-3-吡啶甲酸盐酸盐 (1:1) (40g, 230.4mmol) 添加到硫酸 (20mL) 和 MeOH (400mL) 的回流混合物中。将该混合物回流过夜, 然后将其蒸发, 并将所得浆液添加到 NaHCO₃ (64g) 在水 (360mL) 中的冷却的溶液中。将产物用DCM萃取, 并将0L经MgSO₄ 干燥, 过滤并蒸发, 产生中间体1 (28.70g, 83%)。

[0168] 程序b: 将金属反应器用3-溴-4-甲基-吡啶 (200g, 0.116mol) 和DMF/MeOH (1L/1L) 的混合物填充。向其中添加Et₃N (400g, 0.395mol)、乙酸钯 (II) (8g, 0.036mol) 和1,1'-双(二苯基膦基)-二茂铁 (16g, 0.029mol)。

[0169] 将反应器关闭并用CO气体加压 (3MPa), 并且搅拌反应混合物并在140℃下加热过夜。将该RM冷却, 过滤并且在真空中浓缩。将残余物通过快速柱色谱法在硅胶上 (梯度洗脱: EtOAc/石油醚, 从1/1至1/0) 进行纯化。收集产物级分并将溶剂蒸发以提供所希望的中间体1 (90g, 51%)。

[0170] 中间体2

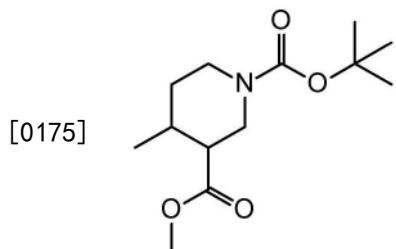


[0172] 程序a: 将氢化烧瓶用AcOH (500mL) 填充, 并且然后添加PtO₂ (15.02 g, 66.2mmol)。

添加中间体1(50g,330.8mmol),并将混合物在50℃下氢化7天。将该RM经dicalite®过滤,并将滤液蒸发以产生中间体2(52g),将其不进一步纯化而用于下一步骤中。

[0173] 程序b:向中间体1(90g,0.595mol)和AcOH(1L)的溶液中添加氧化铂(5g,0.022mol)。搅拌反应混合物,并在50℃下在3.5kPa的压力下氢化5天。将冷却的RM在真空中浓缩,以给出呈乙酸盐的中间体2(140g,97%,90%纯度,通过¹H-NMR确定)。

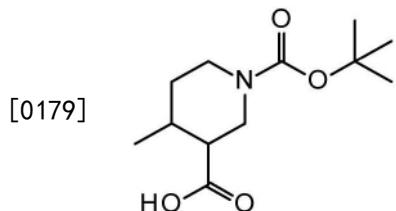
[0174] 中间体3



[0176] 程序a:向中间体2(52g,330.8mmol)在DCM(869mL)中的溶液中添加DIPEA(85.5g,661.5mmol)和DMAP(4.04g,33.08mmol)。然后将二碳酸二叔丁酯(72.19g,330.8mmol)以小部分添加到该溶液中,并将反应物在RT搅拌1h。将该RM用水和盐水洗涤,并将该有机层经MgSO₄干燥,过滤并蒸发。将产物通过柱色谱(硅胶,洗脱液:DCM,在DCM中的1%MeOH,2%,4%)进行纯化。将所希望的级分蒸发,产生中间体3(64.1mg,75%)。

[0177] 程序b:向中间体2(140g,0.595mol)在DCM(1.5L)中的搅拌且冷却(0℃)溶液中顺序添加二碳酸二叔丁酯(130g,0.596mol)、Et₃N(225g,1.74mol)和DMAP(10g,0.082mol),并在RT继续搅拌2h。将该反应混合物倒入H₂O(500mL)中,并用DCM(2x100mL)萃取。将该有机层分离,干燥(Na₂SO₄),并蒸发溶剂以给出粗中间体3(150g,90%,90%纯度,通过¹H-NMR确定),将其照原样用于下一步骤。

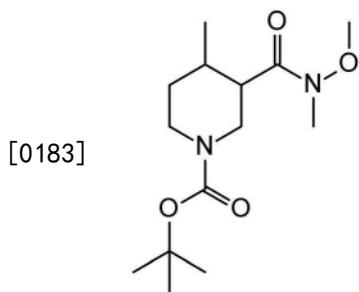
[0178] 中间体4



[0180] 程序a:将中间体3(64.1g,249.1mmol)在MeOH(500mL)中在RT搅拌。添加NaOH(2M,747.3mL),并将混合物在RT下搅拌2h。将该RM用1N HCl酸化,并将产物用Et₂O萃取。将OL用盐水洗涤并经MgSO₄干燥,过滤并蒸发,产生呈白色固体的中间体4(59.70g)。

[0181] 程序b:向中间体3(150g,90%纯度,0.524mol)在MeOH(0.9L)中的搅拌溶液中添加2M NaOH溶液(1.8mol)。在RT下14h后,用MTBE(2 x0.8L)萃取RM。将水层用10%柠檬酸酸化,并且然后用EtOAc(4x1L)萃取。将合并的有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并在真空中浓缩,以给出粗中间体4(142g,90%纯度,通过¹H-NMR确定,100%),将其照原样用于下一步骤。

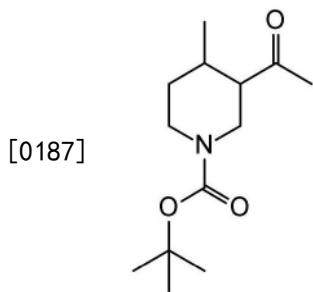
[0182] 中间体5



[0184] 程序a:向中间体4(59.7g,0.25mol)在THF(800mL)中的溶液中添加二-1H-咪唑-1-基-甲酮(54g,0.33mol),并将混合物在RT搅拌1h。在另一烧瓶中,向N-甲氧基-甲胺盐酸盐(1:1)(32.93g,0.34mol)在ACN(500mL)中的悬浮液中添加三甲胺(35.75g,0.35mol)。将两种混合物合并并且在50℃下搅拌,同时进行监测。将中间产物从RM中结晶,并且不与N-甲氧基-甲胺反应以形成所希望的产物。添加DCM直到中间体溶解。将该反应在80℃下搅拌1周。蒸发溶剂。将残余物溶解于DCM中,并且用水、20%AcOH溶液洗涤,并且最后用饱和NaHCO₃溶液洗涤。将OL经MgSO₄干燥,过滤并蒸发。将产物通过柱色谱法(硅胶,洗脱液:在DCM中的2%MeOH,4%)进行纯化。蒸发纯级分,产生中间体5(70g,定量的)。

[0185] 程序b:向中间体4(140g,0.518mol)在DCM(2L)中的搅拌且冰冷溶液中添加N,O-二甲基羟胺(113g,1.16mol)和Et₃N(113g,1.79mol)。然后添加HATU(235g,0.618mol),并且持续搅拌14h。蒸发溶剂,并且添加NaHCO₃溶液(0.5L),并且然后用DCM(3x1L)萃取。将合并的有机层分离、经Na₂SO₄干燥,过滤并且在真空中进行浓缩。将残余物通过用在石油醚中的1%-10%EtOAc洗脱的硅胶快速色谱纯化,以提供中间体5(152g,100%)。

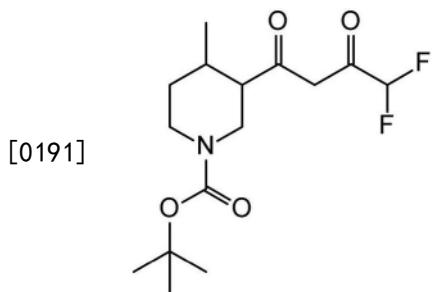
[0186] 中间体6



[0188] 程序a:将在THF(250mL)中的中间体5(70g,244.4mmol)在N₂下充入烧瓶中并冷却至-15℃。滴加溴化甲镁(1.4M在甲苯/THF 75/25中,206mL),同时温度不超过0℃。添加后,将RM在室温搅拌1小时。然后将RM倒入含有20mL AcOH的冰上。将产物用Et₂O萃取,并将OL用5%NaHCO₃溶液洗涤。将OL经MgSO₄干燥,过滤并蒸发,以给出中间体6(53.35g,90%)。

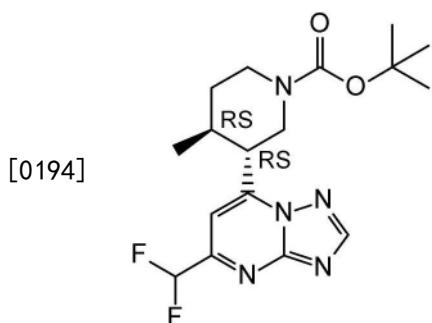
[0189] 程序b:向中间体5(150g,0.524mol)在THF(2L)中的搅拌且冷却溶液(0℃)中滴加在THF(0.75L,2.25mol)中的3M溴化甲镁溶液,并在RT持续搅拌2h。将该反应混合物倒入水性NH₄Cl溶液中,并且用DCM萃取。将合并的有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并且在真空中进行浓缩。将残余物通过用在石油醚中的1%-5%EtOAc洗脱的硅胶色谱纯化,以提供中间体6(120g,95%)。

[0190] 中间体7



[0192] 在0℃,在N₂气下,将中间体6(53.35g,0.22mol)在甲苯(1500mL)中搅拌。在0-5℃下添加叔丁醇钾(34.14g),并在0-5℃下滴加2,2-二氟乙酸乙酯(33.01g,0.27mol)。将该RM在RT搅拌2h,然后用在水中的10%H₂SO₄洗涤,并且将OL经MgSO₄干燥,过滤并蒸发,产生中间体7(70.50g,定量的)。

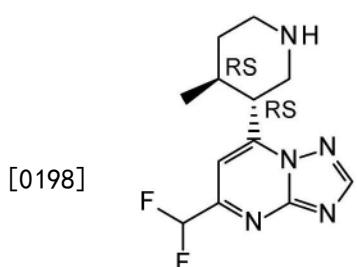
[0193] 中间体8



[0195] 将中间体7(70.5g,220.8mmol)、1H-1,2,4-三唑-5-胺盐酸盐(1:1)(53.22 g,441.52mmol)和DMF(1500mL)在80℃搅拌24h。添加Et₃N(20g)和二碳酸二叔丁酯(20g)。将该混合物搅拌30min,蒸发并且然后溶解于EtOAc中,用水和盐水洗涤。将OL经MgSO₄干燥,过滤并蒸发。观察到四种异构体。将第一级分从Et₂O中结晶。将晶体过滤出并干燥,产生中间体8(24.60g,30%)。该母液产生化合物的第二级分。将晶体过滤出并干燥,产生中间体8(2.53g, 3%)。

[0196] N.B. “RS”意指中间体是反式相对构型的两种对映异构体的外消旋混合物。

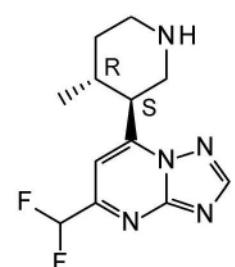
[0197] 中间体9、9A和9B



中间体 9



中间体 9a



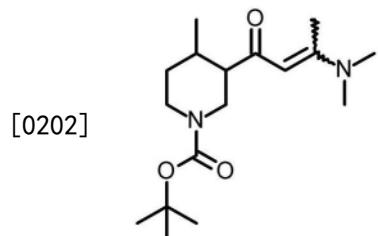
中间体 9b

[0199] 向中间体8(24.6g,67mmol)在MeOH(350mL)中的溶液中添加HCl-iPrOH(350mL),并将RM在RT下搅拌2h。蒸发RM,并将产物从EtOH中结晶。将晶体过滤出并干燥,产生20.33g粗品,向其中添加水、Na₂CO₃和DCM。将OL经MgSO₄干燥,过滤并蒸发,产生12.80g中间体9。通过经制备型SFC(固定相:Chiralpak Diacel AD 30x250mm;流动相:CO₂, (MeOH-iPrOH 50/50)与0.4% iPrNH₂)的纯化将该游离碱分离成对映异构体 9a和9b,产生中间体9a(5g,

19%, $R_t = 7.57\text{min}$) 和中间体9b (5.13g, 19%, $R_t = 9.36\text{min}$)。

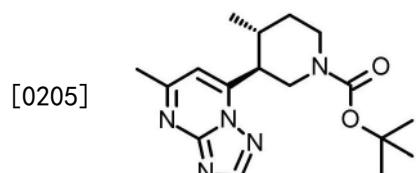
[0200] 将中间体9a和9b分离为游离碱, 或可替代地, 将它们溶解于MeOH中, 随后添加HCl/i-PrOH并将混合物蒸发。将盐酸盐 (在每种情况中, .HCl) 从 ACN中结晶, 过滤出并干燥。

[0201] 中间体10



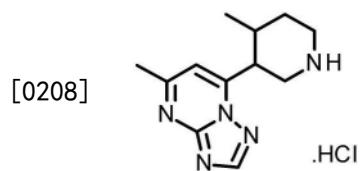
[0203] 将I-6 (7.3g, 0.03mol) 在N,N-二甲基乙酰胺二甲缩醛 (20mL, 0.91g/mL, 0.14mol) 中的搅拌混合物在100°C加热4h。将该RM在真空中浓缩、与甲苯 (2x20mL) 共蒸发, 以产生呈棕色残余物 (9.4g, 产率100.1%) 的I-7, 将其照原样用于下一步骤。

[0204] 中间体11 (I-11)



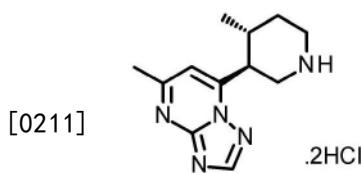
[0206] 向I-10 (9.4g, 0.03mol) 在AcOH (50mL, 1.05g/mL, 1.75mol) 中的混合物中添加3-氨基-1,2,4-三唑 (2.68g, 0.03mol) 在HOAc (50mL, 1.05g/mL, 1.75mol) 中的混合物, 并将随后的RM在130°C的Drysyn®金属加热块上加热15min。将该RM冷却、在真空中浓缩、用DCM (0.2L) 稀释并用1NaOH 处理直到pH约8。分离各层, 并将水层用DCM (2x50mL) 萃取。将合并的有机层干燥 (MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩, 以给出深棕色油, 将其通过硅胶色谱使用 Redisep® 120g快速柱, 以在DCM中的0-3% 7N NH_3 /MeOH的梯度洗脱来纯化, 以提供呈棕褐色油的中间体11 (约1:4=顺式:反式混合物 (2.15g, 产率21.42%))。

[0207] 中间体12

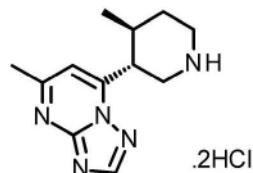


[0209] 将I-11 (2.15g, 0.0065mol) 在MeOH (50mL, 0.79g/mL, 1.23mol) 中的搅拌混合物用HCl (6M在iPrOH中) (50mL, 6M, 0.3mol) 处理, 并且在RT下16h后将该RM在真空中浓缩以给出灰白色固体。将其用Et₂O (200mL) 和ACN (30mL) 的混合物研磨16h。将该固体通过过滤收集并干燥, 以提供作为顺式/反式混合物 (18%/82%) 的呈灰白色固体的中间体12 (1.7g, 产率97.87%)。

[0210] 中间体12A和中间体12B



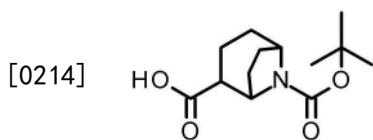
I-12a



I-12b

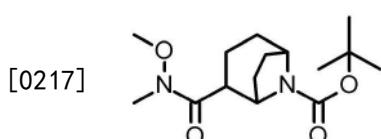
[0212] 将I-11 (23g, 0.0694mol) 在MeOH (165mL) 中的搅拌混合物用HCl (6 M在iPrOH中) (165mL, 6M, 0.986mol) 处理, 并且在RT下16h后将该RM在真空中浓缩以给出灰白色固体。将其用水和DCM稀释并用Na₂CO₃处理。将OL用MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩以提供残余物, 使用SCF (固定相: Chiralpak® Diacel AD 20x250mm, 流动相: CO₂, MeOH-iPrOH (50-50) + 0.4% iPrNH₂) 将该残余物纯化以提供中间体12a和12b。将其溶解于MeOH (100mL) 中, 并在0°C用HCl (6M, 在iPrOH中) (100mL) 处理2h。将挥发物在减压下蒸发, 并将所得残余物在0°C在Et₂O中搅拌, 以产生中间体12a (9.25g, 43%) 和中间体12b (8.8g, 42%)。将其溶解于MeOH (100mL) 中, 并在0°C用HCl (6M, 在iPrOH中) (100mL) 处理2h。将挥发物在减压下蒸发, 并将所得残余物在0°C在Et₂O中搅拌, 以产生中间体12a (9.25g, 43%, R_t = 3.54 min, [α]²⁰_D = -17.47° (c0.54, DMF)) 和中间体12b (8.8g, 42%, R_t = 3.24 min, [α]²⁰_D = +16.5° (c0.52, DMF))。

[0213] 中间体13



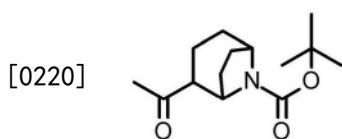
[0215] 将8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-2,8-二甲酸、8-(1,1-二甲基乙基)-2-甲酯 [1033820-28-8] (4.77g, 17.71mmol) 在MeOH (41.608mL) 中在RT下搅拌。添加NaOH (106mL, 1M, 106mmol), 并将混合物在rt下搅拌过夜。将MeOH 蒸发。将RM用HCl 1N酸化, 并将产物用氯仿萃取。将OL经MgSO₄干燥, 过滤并蒸发以给出中间体13 (4.52g, 100%)。

[0216] 中间体14



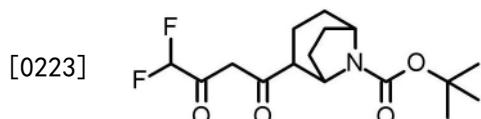
[0218] 将中间体13 (4.52g, 17.704mmol) 溶解于DCM (200mL) 中。然后添加N,N-二甲基羟胺盐酸盐 (3.454g, 35.407mmol) 和Et₃N (5.37g, 53.1mmol)。将反应混合物冷却至0°C。然后添加HATU (7.41g, 19.5mmol)。将该反应混合物在RT搅拌2h。将该反应混合物倒入水性NaHCO₃ (100mL) 中。将 OL分离、经MgSO₄干燥, 并将溶剂蒸发。将残余物通过快速柱色谱法经硅胶 (洗脱液: DCM->1% MeOH, 在DCM中) 进行纯化。收集产物级分并蒸发溶剂以给出中间体14 (3.03g, 57%)。

[0219] 中间体15



[0221] 将在THF (50mL) 中的中间体14 (3.03g, 10.2mmol) 在N₂下引入烧瓶中并冷却至-15℃。滴加溴化甲镁 (12.7mL, 1.4M, 17.8mmol) , 温度不超过 0℃。添加后, 将RM在RT下搅拌1h。然后将该RM与AcOH (20mL) 一起倒在冰上。将产物用Et₂O萃取, 并将OL用5% NaHCO₃溶液洗涤。将OL经 MgSO₄干燥, 过滤和蒸发, 并在硅胶 (洗脱液: DCM) 上纯化。将纯级分蒸发以给出中间体15 (2.57g, 100%)。

[0222] 中间体16



[0224] 在0℃下在N₂下, 将中间体15 (2.57g, 0.0101mol) 在甲苯 (150mL) 中搅拌。在0-5℃下添加叔丁醇钾 (1.59g, 14.2mmol) , 在0-5℃下滴加二氟乙酸乙酯 (1.52g, 0.0122mol) 。将RM在RT搅拌2h。将RM用在水中的 10% H₂SO₄洗涤, 并且将OL经MgSO₄干燥, 过滤并蒸发, 以产生中间体16 (3.34g, 99%)。

[0225] 中间体17



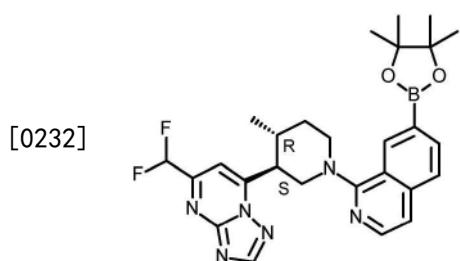
[0227] 在80℃搅拌中间体16 (3.34g, 10.1mmol) 和1H-1,2,4-三唑-5-胺盐酸盐 (2.43g, 20.2mmol) 在DMF中的溶液 (30mL) 16h。将RM蒸发, 添加DCM, 并且添加2g (Boc)₂O和Et₃N (2mL)。将该混合物搅拌30min、用水洗涤, 将OL经MgSO₄干燥, 过滤并蒸发。将产物 (4种异构体) 经硅胶 (洗脱液: DCM->2% MeOH, 在DCM中) 纯化。将级分蒸发, 产生3.07g粗品, 将该粗品经由制备型HPLC (固定相: Uptisphere® C18 ODB-10μm, 200g, 5cm I.D., 流动相: 在水中的0.25% NH₄HCO₃溶液, MeOH) 进行纯化, 以给出中间体17 (1.07g, 28%)。

[0228] 中间体18



[0230] 向在MeOH (30mL) 中的中间体17 (1.07g, 2.82mmol) 中添加HCl (6 M在iPrOH中30mL, 6M, 179mmol) 中, 并将该反应混合物在RT下搅拌过夜。蒸发溶剂, 并将产物从乙醚中结晶。将晶体过滤出并干燥, 以产生呈盐酸盐的中间体18 (1.12g, 112%)。

[0231] 中间体19



[0233] 在氮气气氛下,将化合物1 (213mg, 0.45mmol)、双(频哪醇并)二硼烷 [73183-34-3] (120mg, 0.47mmol)、K0Ac [127-08-2] (132.5mg, 1.35mmol) 和1,1'-双(二苯基-膦)二茂铁-钯(II)二氯甲烷复合物[95464-05-4] (18mg, 0.023 mmol) 溶解于无水1,4-二噁烷[123-91-1] (4mL, 1.033g/mL, 46.898mmol) 中并且在100℃加热6h。将该反应混合物冷却,用Et0Ac稀释并且用10%水性KHSO₄洗涤。将水层用乙酸乙酯萃取两次。然后合并有机层,用盐水洗涤,经MgSO₄干燥,过滤并且在真空中浓缩以提供中间体19 (138g),使其照原样用于下一步骤。

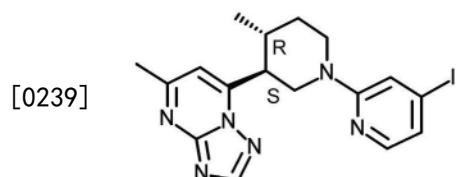
[0234] 最终化合物的B-合成

[0235] 化合物1



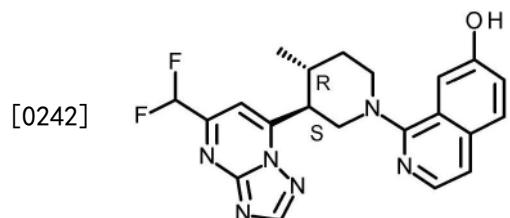
[0237] 将DIPEA [7087-68-5] (4.26mL, 24.7mmol) 和7-溴-1-氟异喹啉 [215453-51-3] (2.4g, 9.88mmol) 在r.t.添加到中间体9b (1.5g, 4.94mmol) 在正丁醇 [71-36-3] (8mL) 中的溶液中。然后将所得混合物在微波辐射下在160℃搅拌4h。在真空中除去挥发物,并且将所得残余物溶解于DCM中,并用饱和NaHCO₃水溶液洗涤。将有机层分离,经MgSO₄干燥,过滤且在减压下蒸发。将所得残余物在硅胶上使用洗脱液(梯度:DCM-MeOH (9:1, v/v) / DCM, 0/100至5/95)进行纯化。收集产物级分,并且在真空中浓缩。将所得残余物从庚烷中重结晶,得到化合物1 (1.02g, 43.6%)。

[0238] 化合物16x



[0240] 在r.t.将K₂CO₃ [584-08-7] (546mg, 3.95mmol) 添加到中间体12a (1.00g, 3.29mmol) 和2-氟-4-碘吡啶 [22282-70-8] (734mg, 3.29mmol) 在DMSO [67-68-5] (100mL) 中的溶液中。然后将所得混合物在100℃搅拌14h,然后将其冷却至r.t.并用水处理。将水层用Et0Ac (3X) 进行萃取并将合并的有机层用盐水 (1X) 进行洗涤、然后分离、经MgSO₄干燥、过滤并在减压下蒸发。将所得残余物经硅胶使用洗脱液(梯度:DCM-MeOH (9:1, v/v) / DCM, 0/100至 1/99)进行纯化,以给出化合物16x (0.7g, 45.2%)。

[0241] 化合物18



[0243] 经2min时间向中间体19 (138mg, 0.26mmol) 在丙酮 [67-64-1] (6.3mL, 0.786g/mL, 84.93mmol) 中的溶液中逐滴添加过一硫酸氢钾 [10058-23-8] (318 mg, 2.09mmol) 在水

(1.255mL, 0.998g/mL, 69.53mmol) 中的溶液。将反应混合物搅拌 10min, 用硫酸氢钠水溶液稀释并再搅拌 20min, 并且然后在减压下除去挥发物。过滤所得水性残留物, 并将滤液的 pH 调整到 5。将水相用 DCM 萃取三次。将合并的 0.1L 经 MgSO_4 干燥, 过滤并在真空中蒸发。将所得残余物经硅胶使用洗脱液 (梯度: DCM -> 1.5% MeOH, 在 DCM 中) 进行纯化, 以给出化合物 18 (24mg, 22% 产率)。

[0244] 通过使用与制备化合物编号1类似的方法(化合物16和18除外),从哌啶(中间体)9a、9b、12a或18,以及相应的制备的、已知的或市售的吡啶或喹啉开始,获得以下实例。

[0245] 表1

化合物 编号	结构	制备自	产率 (%)
2		7-溴-1-氯异喹啉 [215453-51-3]	56
3		1,7-二氯异喹啉 [70810-24-1]	31
4		1,7-二氯异喹啉 [70810-24-1]	26
5		7-溴-1-氯异喹啉 [215453-51-3]	0.7
6		1,4-二氯异喹啉 [15298-58-5]	33
7		1-氯异喹啉 [19493-44-8]	36
8		1-氯-4-甲氧基异喹啉 [3336-60-5]	

化合物 编号	结构	制备自	产率 (%)
9		4-氯-1H-吡咯并[3,2-C]吡啶 [152170-30-4]	10
10		1-溴-5-甲氧基异喹啉 [1207448-19-8]	51
11		4-丁氧基-2-氯吡啶 [1098093-35-6]	4
[0247]		4-氯喹唑啉 [5190-68-1]	48
		4-溴呋喃并[3,2-c]吡啶 [76312-04-4]	37
14		1-氯-7-氟异喹啉 [630422-89-8]	7
15		1-氯异喹啉 [19493-44-8]	26
16		参见上述方法	45

化合物 编号	结构	制备自	产率 (%)
24		6-氯吡啶-2-甲腈 [33252-29-8]	31
25		2-氟-5-氯吡啶 [1480-65-5]	52
26 [0249]		2-氯-6-(三氟甲基)吡啶 [39890-95-4]	32
27		2-氯-4-吗啉代吡啶 [937202-67-0]	14
28		2,3-二氯吡啶 [22245-83-6]	29
29		7-溴-1-碘异喹啉 [1203578-97-5]	25

化合物 编号	结构	制备自	产率 (%)
30		4-溴呋喃并[3,2-C]吡啶 [76312-04-4]	42
31		2-溴-3-(丙-2-基氧基)吡啶 [113503-65-4]	10
32		2-氟吡啶 [372-48-5]	35
33		2-溴-3,4-二甲氧基吡啶 [104819-52-5]	3
34		2-溴-3-(丙-2-基氧基)吡啶 [113503-65-4]	9

化合物 编号	结构	制备自	产率 (%)
35		2-氯-5-氟吡啶 [33252-28-7]	39
36		2-溴-5-氟吡啶 [41404-58-4]	13
37		2,6-二氟喹啉-4-甲腈 [50504-14-8]	19

化合物 编号	结构	制备自	产率 (%)
38		2-氯-5-(三氟甲基)吡啶 [52334-81-3]	46
39		2-氯-6-甲基吡啶 [18368-63-3]	9
[0252]		4-叔丁基-2-氯吡啶 [81167-60-4]	18
41		1-氯-8-甲基异喹啉 [174873-81-5]	41
42		4-氯喹啉 [611-35-8]	28

[0253] 分析部分

[0254] 熔点

[0255] 值是峰值或熔融范围，并且所获得的值具有通常与这种分析方法相关的实验不确定性。

[0256] 用DSC823e (Mettler-Toledo) 确定熔点。用10°C/min的温度梯度来测量熔点。最高温度是300°C。

[0257] 表2

化合物 编号	MP (°C)	化合物 编号	MP
1	129.91	[0258]	23
4	135.42		29
13	182.59		30
20	179.73		37
21	124.81		

[0259] LC/MS方法

[0260] 如相应方法中所指定的, 使用LC泵、二极管阵列(DAD)或UV检测器和柱进行高效液相色谱(HPLC)测量。如果必要的话, 包括其他检测器(参见下文的方法表)。

[0261] 将来自柱的流带至配置有大气压离子源的质谱仪(MS)。设置调谐参数(例如扫描范围、驻留时间)以便获得允许鉴别化合物的标称单一同位素分子量(MW)的离子是在技术人员的知识内。利用适宜软件进行数据获取。

[0262] 通过其实验保留时间(R_t)和离子描述化合物。如果未在数据表中不同地指定, 那么所报告的分子离子对应于 $[M+H]^+$ (质子化的分子)和/或 $[M-H]^-$ (去质子的分子)。在化合物不是直接可电离的情况下, 指定加合物类型(即 $[M+NH_4]^+$ 、 $[M+HC0O]^-$ 等)。对于具有多种同位素模式的分子(Br、Cl)来说, 报告的值是针对最低同位素质量获得的值。所获得的所有结果均具有实验不确定性, 这通常与所使用方法相关联。

[0263] 下文中, “SQD”意指单四极检测器、“MSD”意指质量选择性检测器、“RT”意指室温、“BEH”意指桥连乙基硅氧烷/二氧化硅杂化体、“DAD”意指二极管阵列检测器、“HSS”意指高强度二氧化硅。

[0264] 表3A.LCMS方法代码(以mL/min表示流量; 以°C表示柱温(T); 以分钟表示运行时间)

方法代码	仪器	柱	流动相	梯度	流量 ----- 柱温	运行时间 (min)
[0265] 方法 A	沃特斯： Acquity [®] UPLC [®] -DAD - SQD	沃特斯： BEH C18 (1.7 μ m, 2.1*50 mm)	A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ 于 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 中 B: CH ₃ CN	在 1.3 min 内从 95% A 至 5% A, 保 持 0.7 min。	0.8 ----- 55	2
方法 C	沃特斯： Acquity [®] UPLC [®] - DAD 和 SQD	沃特斯： HSS T3 (1.8 μ m, 2.1*100 mm)	A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ 在 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 中 B: CH ₃ CN	2.10 min 内 从 100% A 至 5% A, 0.90 min 内 至 0% A, 0.5 min 内 至 5% A	0.7 ----- 55	3.5

[0266] 表3B. 分析型LCMS数据-R_t意指保留时间(以分钟计), [M+H]⁺意指化合物的质子化质量, 方法是指用于(LC) MS分析的方法。

化合物 编号	R _t (min)	[M+H] ⁺	[M+H] ⁻	方法
1	1.23	473	471	A
2	2.2	437	495 [M+CH ₃ COO] ⁻	C
3	2.18	393	391	C
4	1.21	429	427	A
5	1.32	487	485	A

化合物 编号	R _t (min)	[M+H] ⁺	[M+H] ⁻	方法
6	1.27	429	427	A
7	1.14	395	393	A
8	1.19	425	483	A
9	1.56	384	382	C
10	1.14	425	423	A
11	1.19	417	415	A
12	0.89	396	394	A
13	1	385	383	A
14	2.16	413	411	C
15	1.96	359		C
16	1.15	471	469	A
17	2.03	384	382	C
18	1.78	411	409	C

[0268]

化合物 编号	R _t (min)	[M+H] ⁺	[M+H] ⁻	方法
19	2.34	491	489	C
20	2.15	413	411	C
21	2.3	427	425	C
22	1.92	370	368	C
23	1.95	396	394	C
24	0.99	370	368	A
[0269]	25	2.11	379	C
	26	2.16	413	C
	27	1.7	430	C
	28	2.08	379	C
	29	1.27	473	-
	30	1.04	385	-
	31	1.13	403	A

化合物 编号	R _t (min)	[M+H] ⁺	[M+H] ⁻	方法
[0270]	32	0.99	345	343
	33	0.97	405	403
	34	1.1	403 461 [M+CH ₃ COO] ⁻	A
	35	1.83	370	368
	36	1.96	363	361
	37	2.35	454	452
	38	2.14	413	411
	39	2.06	359	357
	40	2.24	401	399
	41	1.26	409	407
	42	0.95	395	393

[0271] 核磁共振(NMR)

[0272] 在Bruker DPX-400光谱仪上用标准脉冲序列(在400MHz下操作)或在Bruker DPX-360(在360MHz下操作)上使用DMSO-d₆(氘化DMSO,二甲基-d₆亚砜)作为溶剂记录¹H NMR光谱。化学位移(δ)被报告为相对于四甲基硅烷(TMS)(用作内部标准)的百万分率(ppm)。

[0273] 化合物编号¹H NMR(360MHz,DMSO-d₆) δppm 0.91 (d, J=6.59Hz, 3H) 1.72-1.90 (m,

1H) 2.03 (br d, $J=10.25\text{Hz}$, 1H) 2.34-2.48 (m, 1H) 3.01-3.26 (m, 2H) 3.83 (br d, $J=12.81\text{Hz}$, 1H) 3.88-4.05 (m, 1H) 7.12 (t, $J=53.80\text{Hz}$, 1H) 7.43 (d, $J=5.85\text{Hz}$, 1H) 7.70 (s, 1H) 7.83-7.89 (m, 2H) 8.14 (d, $J=5.85\text{Hz}$, 1H) 8.36 (s, 1H) 8.90 (s, 1H)。

[0274] 化合物编号3¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0.92 (d, $J=6.60\text{Hz}$, 3H) 1.78 (qd, $J=12.43, 4.07\text{Hz}$, 1H) 2.02 (br dd, $J=13.20, 3.52\text{Hz}$, 1H) 2.26-2.46 (m, 1H) 2.63 (s, 3H) 3.08-3.13 (m, 1H) 3.76-3.89 (m, 2H) 3.94 (br dd, $J=12.43, 2.31\text{Hz}$, 1H) 7.29 (s, 1H) 7.40 (d, $J=5.72\text{Hz}$, 1H) 7.70 (dd, $J=8.69, 2.09\text{Hz}$, 1H) 7.91 (d, $J=8.80\text{Hz}$, 1H) 8.11 (d, $J=5.72\text{Hz}$, 1H) 8.17-8.23 (m, 1H) 8.55 (s, 1H)。

[0275] 化合物编号4¹H NMR (360MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0.91 (d, $J=6.22\text{Hz}$, 3H) 1.73-1.86 (m, 1H) 1.99-2.07 (m, 1H) 2.30-2.46 (m, 1H) 3.00-3.25 (m, 2H) 3.79-3.88 (m, 1H) 3.88-4.02 (m, 2H) 7.12 (t, $J=52.30\text{Hz}$, 1H) 7.44 (d, $J=5.49\text{Hz}$, 1H) 7.71 (s, 1H) 7.74 (d, $J=8.65\text{Hz}$, 1H) 7.95 (d, $J=8.78\text{Hz}$, 1H) 8.12 (d, $J=5.85\text{Hz}$, 1H) 8.20 (s, 1H) 8.87 (s, 1H)。

[0276] 化合物编号7¹H NMR (360MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0.88 (d, $J=6.59\text{Hz}$, 3H) 1.75-1.87 (m, 1H) 1.97-2.04 (m, 1H) 2.31-2.48 (m, 1H) 3.07-3.19 (m, 1H) 3.20-3.29 (m, 1H) 3.85-4.01 (m, 3H) 7.12 (t, $J=54.20\text{Hz}$, 1H) 7.39 (d, $J=5.85\text{Hz}$, 1H) 7.61-7.73 (m, 2H) 7.74-7.76 (m, 1H) 7.88 (d, $J=7.68\text{Hz}$, 1H) 8.08 (d, $J=5.85\text{Hz}$, 1H) 8.19 (d, $J=8.42\text{Hz}$, 1H) 8.86 (s, 1H)。

[0277] 药理学实例

[0278] 本发明提供的化合物是PDE2的抑制剂,特别是PDE2A的抑制剂。在若干种药理学测定中测试化合物的结果如下所示。

[0279] 体外测定PDE2A

[0280] 人类重组PDE2A (hPDE2A) 在Sf9细胞中使用重组rPDE10A杆状病毒构建体表达。感染48h后收集细胞并通过在Ni-琼脂糖6FF上的金属螯合色谱纯化hPDE2A蛋白。将检测化合物溶解并在100%DMSO中稀释至测定中终浓度的100倍的浓度。在384孔板中向20 μ l的孵育缓冲液(50mM Tris pH 7.8, 8.3 mM MgCl₂, 1.7mM EGTA)中添加化合物稀释液(0.4 μ l)。在孵育缓冲液中添加10 μ l的hPDE2A酶并且通过添加10 μ l底物至终浓度为10 μ M cGMP和 0.01 μ Ci³H-cGMP来起始该反应。将该反应在室温下孵育45分钟。孵育后,用20 μ l的终止液终止该反应,该终止液由17.8mg/ml PDE SPA(闪烁迫近测定法) 微珠组成,该终止液补充有200mM ZnCl₂。在30分钟期间这些微珠沉淀后,在铂金埃尔默公司(Perkin Elmer) Topcount闪烁计数器中测量放射活性并且结果表示为cpm。对于空白值,将该酶从该反应省略掉并且由孵育缓冲液取代。对照值通过添加终浓度为1%的DMSO代替化合物获得。通过对减去空白值的%对照值与化合物浓度的曲线的最小平方和法拟合获得最佳拟合曲线并且半最大抑制浓度(IC₅₀)值衍生自此曲线。

[0281] 体外测定PDE3A

[0282] 人类重组PDE3A (hPDE3A) 作为部分纯化的昆虫细胞裂解物由苏格兰生物医学公司(Scottish Biomedical) 提供,其克隆自人脑并在Sf9细胞中表达。将检测化合物溶解并在100%DMSO中稀释至测定中终浓度的100倍的浓度。在384孔板中向20 μ l的孵育缓冲液(50mM Tris pH7.8, 8.3mM MgCl₂, 1.7mM EGTA)中添加化合物稀释液(0.4 μ l)。在孵育缓冲液中添加10 μ l的hPDE3A 酶并且通过添加10 μ l底物至终浓度为0.4 μ M cAMP和2.4 μ Ci/ml [³H]-cAMP来起始该反应。将该反应在室温下孵育60min。孵育后,用20 μ l的终止液终止该反应,该终止

液由17.8mg/ml PDE SPA(闪烁亲近测定法)微珠组成,该终止液补充有200mM ZnCl₂。在30min期间这些微珠沉淀后,在铂金埃尔默公司(Perkin Elmer)Topcount闪烁计数器中测量放射活性并且结果表示为cpm。对于空白值,将该酶从该反应省略掉并且由孵育缓冲液取代。对照值通过添加终浓度为1%的DMSO代替化合物获得。通过对减去空白值的%对照值与化合物浓度的曲线的最小平方和法拟合获得最佳拟合曲线并且半最大抑制浓度 (IC₅₀) 值衍生自此曲线。

[0283] 体外测定PDE10A

[0284] 大鼠重组PDE10A(rPDE10A2)在Sf9细胞中使用重组rPDE10A杆状病毒构建体表达。感染48h后收集细胞并通过在Ni-琼脂糖6FF上的金属螯合色谱纯化rPDE10A蛋白。将检测化合物溶解并在100%DMSO中稀释至测定中终浓度的100倍的浓度。人类重组PDE10A(hPDE2A)在Sf9细胞中使用重组 hPDE10A杆状病毒进行表达,该重组hPDE10A杆状病毒在内部制备和扩增。感染72h后收集细胞并通过在Ni-琼脂糖上的金属螯合色谱法纯化hPDE10A蛋白。在384孔板中向20μl的孵育缓冲液(50mM Tris pH7.8, 8.3mM MgCl₂, 1.7mM EGTA)中添加化合物稀释液(0.4μl)。添加10μl在培养缓冲液中的 rPDE10A或hPDE10A酶,并且通过添加10μl底物至终浓度为60nM的cAMP 和0.008μCi³H-cAMP来起始反应。将该反应在室温下孵育60分钟。孵育后,用20μl的终止液终止该反应,该终止液由17.8mg/ml PDE SPA(闪烁亲近测定法)微珠组成。在30分钟期间这些微珠沉淀后,在铂金埃尔默公司(Perkin Elmer)Topcount闪烁计数器中测量放射活性并且结果表示为cpm。对于空白值,将该酶从该反应省略掉并且由孵育缓冲液取代。对照值通过添加终浓度为1%的DMSO代替化合物获得。通过对减去空白值的%对照值与化合物浓度的曲线的最小平方和法拟合获得最佳拟合曲线并且半最大抑制浓度 (IC₅₀) 值衍生自此曲线。

[0285] 表4

化合物 编号	hPDE2A pIC ₅₀	hPDE2A E _{max}	hPDE3B pIC ₅₀	hPDE3B E _{max}	hPDE10A2 pIC ₅₀	hPDE10A2 E _{max}
[0286]	1	8.65	96	5.25	73	6.26
	2	8.97	100	5.45	89	7.13
	3	8.52	100	5.49	88	7.08
	4	8.47	100	5.39	82	6.46
	5	8.17	100	5.27	76	6.37
	6	8.05	99	5.21	67	6.38
	7	7.97	101	5.22	69	6.21
	8	7.97	101	5.22	73	5.99
	9	7.9	101	5.13	60	6.15
	10	7.89	99	5.53	84	6.31
	11	7.86	99	6.02	99	6.45
	12	7.84	100	5.25	67	6.19
	13	7.8	98	5.07	54	6.34
	14	7.77	101	5.29	62	6.41
	15	7.76	100	5.21	69	6.79
	16	7.74	100	6.19	95	6.65
	17	7.71	100	5.15	66	6.99
	18	7.6	101	5.14	65	6.48
	19	7.52	100	< 5	38	6.38
	20	7.43	100	5.41	81	6.57
	21	7.21	101	5.83	93	6.57
	22	7.17	100	5.5	82	5.94
	23	7.13	95	< 5	54	6.18
	24	7.1	100	5.17	68	6.24
	25	7.08	101	< 5	45	6.16
化合物 编号	hPDE2A pIC ₅₀	hPDE2A E _{max}	hPDE3B pIC ₅₀	hPDE3B E _{max}	hPDE10A2 pIC ₅₀	hPDE10A2 E _{max}
[0287]	26	7.04	99	5.43	80	6.34
	27	6.97	100	5.07	48	5.58
	28	6.96	99	4.96	50	6.16
	29	5.53	8	5.85	99	5.6
	30	5.07	9	5.02	53	< 5
	31	6.59	81	< 5	27	5.89
	32	6.77	86	< 5	38	5.78
	33	6.78	89	< 5	40	5.77
	34	5.62	30	< 5	2	< 5
	35	6.79	99	< 5	31	5.86
	36	6.61	100	5.01	56	5.82
	37	6.89	102	5.17	70	6.44
	38	6.77	99	< 5	49	6.12
	39	6.84	99	5.13	58	5.89
	40	6.81	100	5.78	87	6.32
	41	6.51	99	5.14	65	5.33
	42	7.69	99	5.27	70	5.91

[0288] 测试化合物的PDE2占用

[0289] 方法

[0290] 使用 [^3H]B-17a (描述于 WO 2013/000924) 作为放射性配体 (化合物 12, 于 Buijnster 等人, (2014), Structure-Based Design of a Potent, Selective, and Brain Penetrating PDE2 Inhibitor with Demonstrated Target Engagement [以结构为基础设计有效、具有选择性和脑部穿透性的 PDE2 抑制剂, 其具有明确的靶向作用], ACS Med Chem Lett [美国化学学会药物化学快报] 5 (9) :1049-53.) , 通过离体放射自显影评估 PDE2A 的占用。

[0291] 通过口服给予运载体或递增剂量的 [^3H]B-17a 处理雄性韦斯特 (Wistar) 大鼠 (200-250g) , 并在 1h 后处死。将脑迅速从颅骨中取出并在干冰冷却的 2- 甲基丁烷 (-40°C) 中快速冷冻。使用 Leica CM 3050 恒冷箱切片机 (van Hoplynus 公司, 比利时) 切割二十 μm 厚的纹状体切片, 将其解冻安装在显微镜载玻片 (SuperFrost Plus Slides, 拉博诺德 (LaboNord) , 法国) 上, 并在 -20°C 下储存直到使用。

[0292] 解冻后, 将切片在冷空气流下干燥, 并用在含有 0.3% BSA 的 Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) 中的 30nM [^3H]B-17a 孵育 1 分钟。将来自药物处理和运载体处理的动物的脑切片进行平行地孵育。在小脑切片 (不含 PDE2A 酶的脑区域) 上测量非特异性结合。孵育后, 将过量的 [^3H]B-17a 在冰冷的缓冲液中洗涤 2 次 10 分钟, 随后快速浸入蒸馏水中。然后将这些切片在冷空气流下干燥。

[0293] 将脑切片装载在 β 成像仪 (拜斯倍斯 (Biospace) , 巴黎) 中持续 4h, 并使用 β 视觉程序 (拜斯倍斯, 巴黎) 定量出现自描绘的脑区域的放射活性。按照纹状体中的总结合与小脑中的非特异性结合之间的差异确定特异性结合。给予动物的药物的受体占用百分比对应于 100% 减去经处理的动物中标记的受体百分比。对于 ED_{50} 值的确定, 将受体占用的百分比针对剂量作图, 并且使用 GraphPad Prism 程序通过非线性回归分析计算最佳拟合的 S 形对数剂量-效应曲线。从剂量-反应曲线计算具有 95% 置信区间的 ED_{s0} (产生 50% 受体占用的药物剂量)。

[0294] 表 5. P0 = 口服; SC = 皮下的;

化合物编号	在 10 mg/kg 下的 PDE2 占用	在 10 mg/kg 下的 PDE2 路线 (Route) 占用	PDE 占用 ED ₅₀	路线 (Route) 占用 ED ₅₀
1	94	PO	5.9 2.6 6.7	PO PO SC
2	96	PO	2.6	PO
3	90	PO		
	89	PO	2.12	PO
4	93	PO	8.1	PO
6	3	PO		PO
7	81	SC	29	PO
9	36	SC		
10	53	SC	20	PO
12	1	PO		
13	41	SC		
	67	SC		
16	-14	SC		
17	-18	PO		
18	-6	SC		
20	18	PO		
21	9	PO		
22	0	PO		
23	5	SC		
27	0	SC		
32	18	PO		

化合物编号	在 10 mg/kg 下的 PDE2 占用	在 10 mg/kg 下的 PDE2 路线 (Route) 占用	PDE 占用 ED ₅₀	路线 (Route) 占用 ED ₅₀
35	0	PO		
41	-8	SC		
42	-8	PO		

[0297] 测试化合物对突触传递的作用

[0298] 关键性试剂

[0299] 蔗糖分离缓冲液含有以下各项(以 mM 计): 蔗糖(150)、NaCl(40)、KCl(4)、NaH₂PO₄·H₂O(0.3)、MgCl₂·6H₂O(7)、NaHCO₃(26)、CaCl₂·2H₂O(0.5)、D-葡萄糖(10), 用 95% O₂ 和 5% CO₂ 气体混合物平衡。在平衡和记录期间使用的人工脑脊液(ACSF)含有以下各项(以 mM 计): NaCl(124)、KCl(2.7)、NaH₂PO₄·H₂O(1.25)、MgSO₄·7H₂O(1.3)、NaHCO₃(26)、CaCl₂·2H₂O(2), D-葡萄糖(10)、抗坏血酸(2), 用 95% O₂ 和 5% CO₂ 气体混合物平衡。在 ACSF 中分别以 50 μM 和 1 mM 浓度制备 CNQX 和 犬尿酸。从 ACSF 中的储备溶液(具有 DMSO) 新鲜制备测试化合物, 并且最终 DMSO 浓度不超过 0.1%。除非另有说明, 否则所有试剂均来自西格玛-奥

德里奇 (Sigma-Aldrich)。

[0300] 动物(物种、体重和性别)

[0301] 使用的动物是由查尔斯河德国 (Charles River Germany) 提供的重量范围在145和200g之间的雄性斯普拉格道利 (Sprague-Dawley) 大鼠。

[0302] 海马切片的制备

[0303] 根据标准方案,从用异氟烷麻醉的雄性斯普拉格道利大鼠的腹中-腹侧海马体获得水平脑切片 (300 μ m)。在冷 (4°C) 蔗糖分离缓冲液中以0.1mm/s的速度使用振动组织切片机 (Leica VT1200S) 切割切片。切割后,将切片置于 35°C下平衡20min,并且然后允许在RT下在人工脑脊液 (ACSF) 中回收至少一小时。从一个脑制备三到四个切片。

[0304] 测试系统

[0305] 用商购自多通道系统MCS股份有限公司 (MultiChannel Systems MCS GmbH) (罗伊特林根 (Reutlingen), 德国) 的MEA装置 (由4通道刺激发生器和连接到60通道A/D卡的60通道放大器探头 (head-stage) 构成) 记录所有数据。用于刺激、记录和分析的软件是分别商购自多通道系统公司 (MultiChannel Systems) 的软件:MC Stim (II 2.0.0发布) 和MC Rack (3.8.1.0 发布)。用由间隔100 μ m的60个尖形 (tip-shaped) 且60 μ m高电极组成的三维MEA (阿扬达生物科技公司 (Ayanda Biosystems, S.A.), CH-1015洛桑市 (Lausanne), 瑞士 (Switzerland)) 进行所有的实验。这些MEA电极由600k Ω <阻抗<900k Ω 的铂制成。

[0306] 实验设计

[0307] 通过记录海马切片中的细胞外场电位来研究测试化合物对突触传递的作用。已经确定的是,突触传递可以产生细胞外场电位的偏转,这反映了在记录电极周围的神经元群体中的同步突触活性。

[0308] 细胞外场电位记录。恢复后,将脑切片安装在显微镜下的MEA芯片上,并将60个记录电极定位在海马体的苔藓纤维突触 (齿状回-CA3) 区域上。ACSF 溶液以2mL/min的速率连续灌注。将MEA腔的温度保持在32±0.1°C,并且珀耳帖 (Peltier) 元件位于MEA放大器探头中。用商购自多通道系统MCS股份有限公司 (罗伊特林根, 德国) 的MEA装置记录所有数据。选择芯片的两个相邻电极以刺激齿状回的门区中的苔藓纤维,并且将fEPSP记录在海马体 CA3区的末端区域。通过用间隔30ms并且每60s重复一次的两个连续的电脉冲 (脉冲宽度100 μ s, 并且电流刺激强度 (μ A) 相对于最大振幅为40%) 刺激苔藓纤维输入诱发细胞外突触后场电位 (fEPSP)。同时用随机分配为用运载体 (DMSO) 处理的切片进行对照实验。N代表切片数,并且每只动物通常使用3-4个切片。如果满足某些质量标准 (包括:正确的位置,稳定的基线 (连续10分钟内波动在+/-10%内,振幅>100 μ V),则记录突触后神经元水平 (fEPSP) 的诱发反应。将来自所选电极的fEPSP以5kHz采样并记录在PC的硬盘上用于离线分析。平行地,将所选电极的fEPSP振幅在线编译 (用MC Rack 程序) 以监测和跟踪实验的质量。将数据绘制在电子表格文件中以进行离线分析。

[0309] 通过单次高频刺激 (HFS) 诱发弱的长时程增强 (LTP),以产生小于fEPSP 的最大增强。

[0310] 对于化合物1的作用,该测试的结果如图1的a、b₁和b₂所示。据报道该化合物具有差的溶解性,并且对组织的渗透不利于LTP的诱导。

[0311] 合理的变化不应被认为偏离本发明的范围。将显而易见的是在此所述的发明可以

由本领域普通技术人员以许多方式改变。

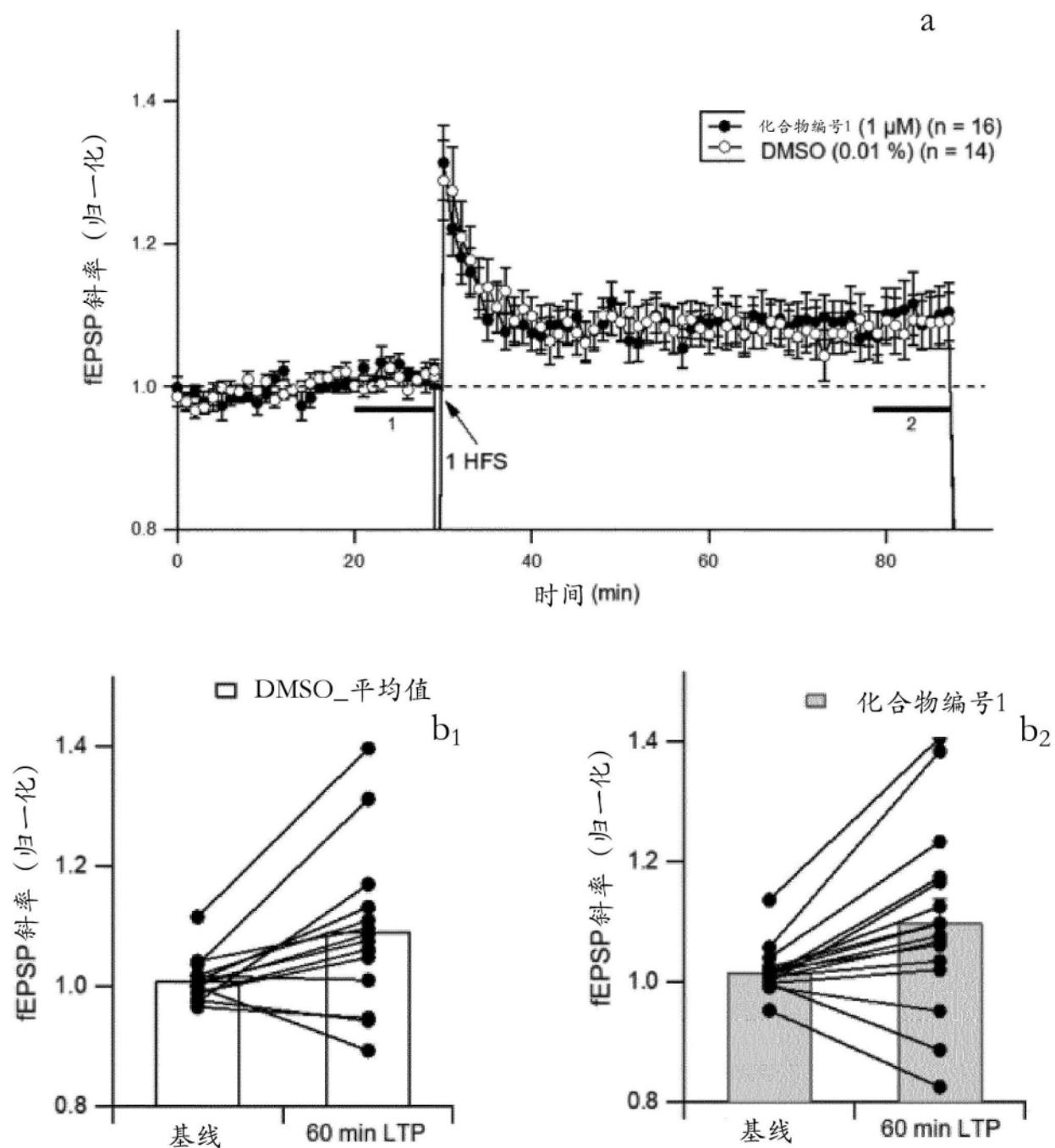


图1