



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102307836 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 19

(21) 申请号 200980156008. 4

(22) 申请日 2009. 12. 09

(30) 优先权数据

0822486. 7 2008. 12. 10 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 08. 03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2009/002850 2009. 12. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/067069 EN 2010. 06. 17

(73) 专利权人 邓迪大学

地址 英国邓迪

(72) 发明人 M·洛伊韦尔 P·奥尼尔 N·贝里

G·黑泽勒

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07C 39/15 (2006. 01)

C07C 39/367 (2006. 01)

A61P 25/04 (2006. 01)

A61K 31/05 (2006. 01)

A61K 31/055 (2006. 01)

C07C 233/25 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 9958521 A1, 1999. 11. 18, 实施例 16.

US 6121271 A, 2000. 09. 19, 实施例 4 STEP

2.

WO 2007071967 A2, 2007. 06. 28, 全文.

WO 9961435 A1, 1999. 12. 02, 实施例 50 STEP 2、实施例 53 STEP 3.

JP 3498853 B2, 2004. 02. 23, 实施例 2 (L).

CN 1907954 A, 2007. 02. 07, 全文.

Giuseppe Trapani 等. Propofol

Analogues. Synthesis, Relationships between Structure and Affinity at GABAA Receptor in Rat Brain, and Differential Electrophysiological Profile at Recombinant Human GABAA Receptors. 《J. Med. Chem. 》. 1998, 第 41 卷 (第 11 期), 第 1846-1854 页.

审查员 陈东旭

权利要求书4页 说明书35页 附图3页

(54) 发明名称

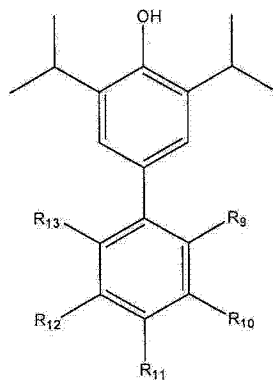
用于治疗疼痛的化合物

(57) 摘要

本发明涉及衍生自麻醉药丙泊酚的化合物。

这些化合物可以用于治疗疼痛,特别是、但不限于慢性痛和中枢性痛致敏。

1. 式 (III) 的化合物或其盐



(III)

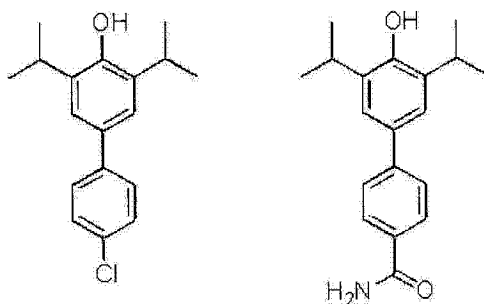
其中

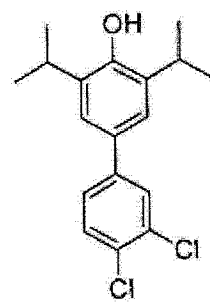
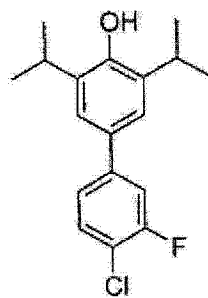
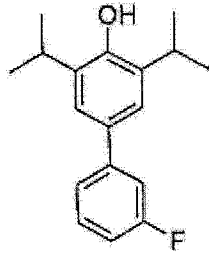
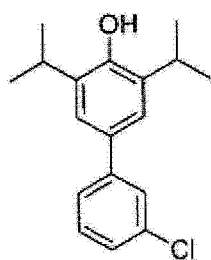
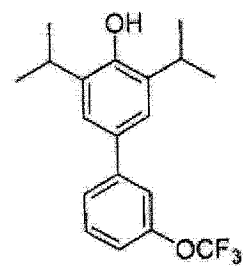
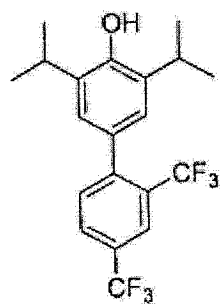
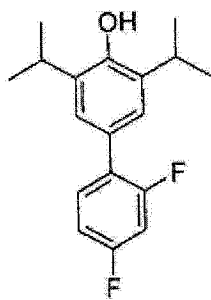
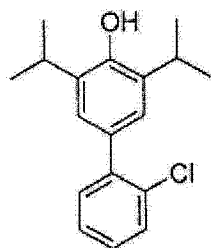
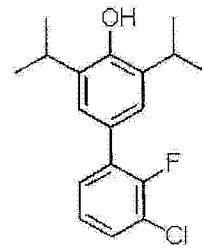
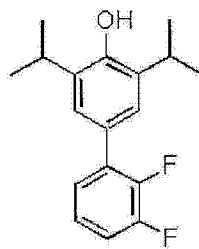
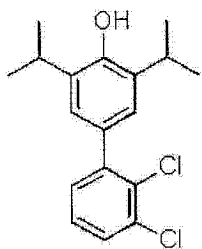
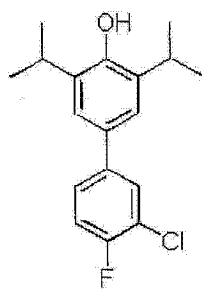
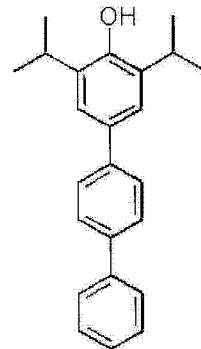
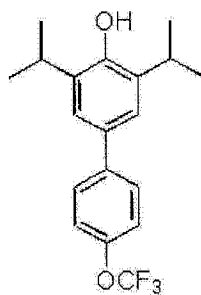
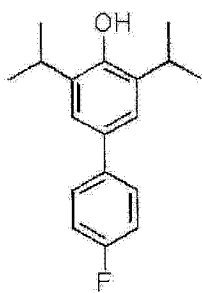
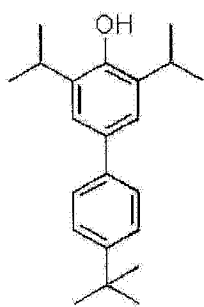
R₉ 选自氢、氟、氯和三氟甲基, 且 R₁₃ 是氢;

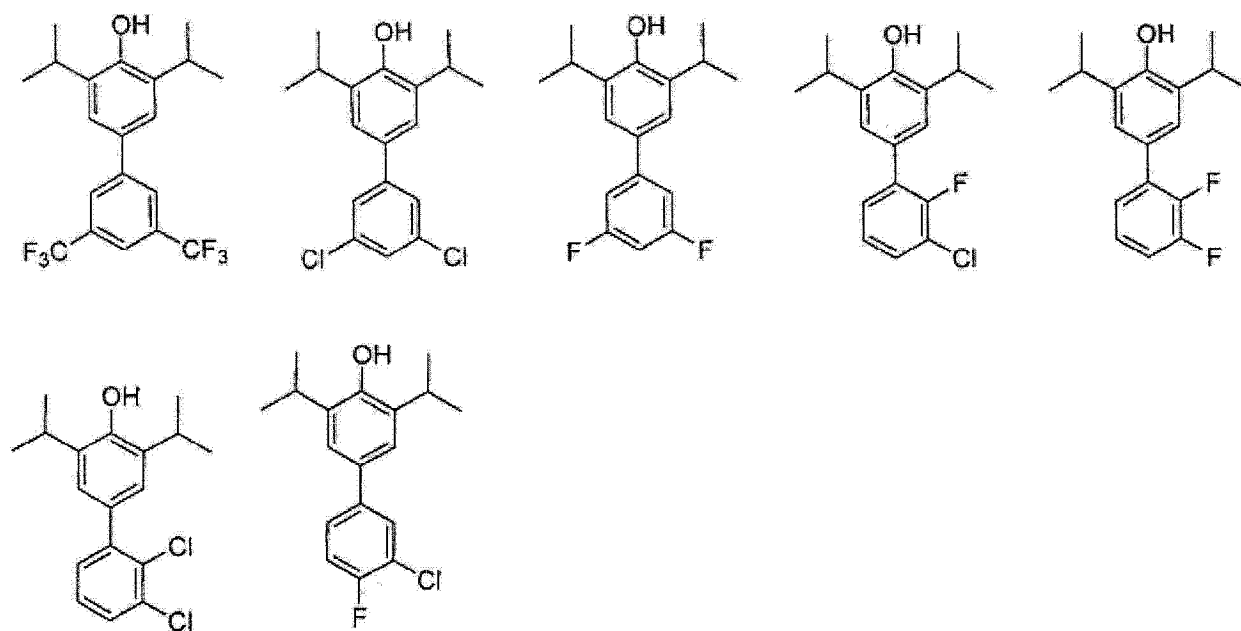
R₁₀ 选自氟、氯、三氟甲基和三氟甲氧基, 且 R₁₂ 选自氢、氟、氯和三氟甲基; 且;

R₁₁ 选自氢、氟、氯、CONH₂、未取代的烷基、卤素取代的 C₁₋₄ 烷基、未取代的烷氧基、卤素取代的 C₁₋₄ 烷氧基和未取代的苯基。

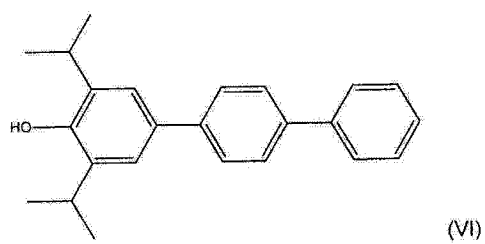
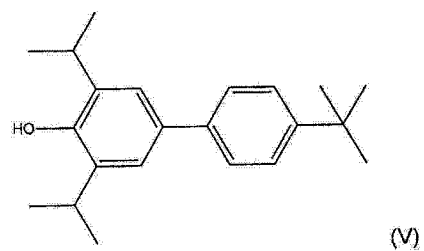
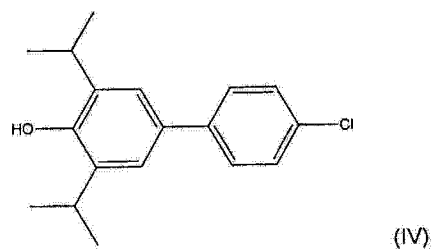
2. 下式化合物或其盐:



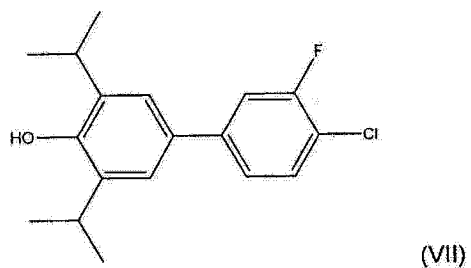




3. 根据权利要求 2 的具有下式的化合物或其盐：



或



4. 药物组合物,其包含治疗有效量的根据权利要求 1 至 3 的任意一项的化合物或其盐和药学可接受的媒介物。

5. 根据权利要求 1 至 3 的任意一项的化合物或其盐或根据权利要求 4 的药物组合物用于制备治疗疼痛的药物的用途。

用于治疗疼痛的化合物

[0001] 本发明涉及衍生自麻醉药丙泊酚的化合物。这些化合物可以用于治疗疼痛,特别是、但不限于慢性痛和中枢性痛致敏。

[0002] 有效安全的疼痛控制在全世界被视为高优先级临床需求。然而,在该领域中的大部分研发都难以在递送高效产品时不带有不期望的副作用和安全问题。阿片类可能仍然作为最有效的可得到的治疗手段且最终目的在于递送具有阿片类功效的疼痛控制剂而没有镇静、依赖、胃损伤和一般耐受性问题。

[0003] 已经推定苯酚衍生物可以具有大量神经调节效果。然而,在广泛临床应用中唯一的苯酚衍生物是麻醉药丙泊酚(2,6-二-异丙基苯酚)。

[0004] 麻醉的关键特征在于在痛性刺激的存在下和没有回忆下的意识、不动性丧失。麻醉药例如丙泊酚被理解为通过活化中枢神经系统(CNS)中的 γ -氨基丁酸($GABA_A$)受体介导其麻醉效果。

[0005] 相反,镇痛被定义为不存在疼痛。在外周和/或中枢神经系统机制中,镇痛可以作为脊柱背侧角内的突触传递抑制增强的结果。应理解抑制脊髓内的突出后传递主要涉及甘氨酸受体。因此,甘氨酸受体家族代表了目的在于抑制疼痛的治疗剂的靶点。

[0006] $GABA_A$ 和甘氨酸受体都属于配体门控型离子通道超家族。它们具有共同的结构,其中5个亚单位形成离子通道, α 和 β 亚单位装配成具有提出的 $3\alpha:2\beta$ 体内化学计量的五聚化受体。甘氨酸受体如 $GABA_A$ 受体通过激动剂结合后开放氯化物通道抑制神经元放电。甘氨酸受体主要在中枢神经系统的下部区域中发现并且涉及控制运动节律发生、协调脊髓伤害反射响应和感觉信号加工。对研发新的和改进的止痛药存在需求。尽管甘氨酸受体代表了鉴定这种止痛药的良好靶标这一事实,但是不存在靶向这些受体的止痛药。因此,发明人决定解决这一问题并且利用其基于麻醉和止痛的病理生理机制的知识以鉴定新的和改进的控制疼痛的药物。

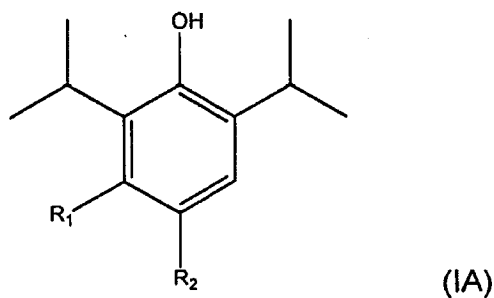
[0007] 慢性痛非常不同于急性痛。急性痛可以被视为给我们提供伤害性刺激且由此帮助我们避开和预防伤害的有用早期警报系统。相反,慢性痛恰是其自身的疾病。专家将其视为平衡失调综合征,其中在正常情况下抑制疼痛加工的神经元活性抑制得到显著降低。治疗慢性炎性或神经性疼痛仍然是困难的,且目前无对所有病症起作用的单一治疗手段。

[0008] 在慢性痛中观察到的神经元兴奋性增加涉及脊髓浅表背侧角中GABA和/或甘氨酸能神经元介导的抑制缺失,所述脊髓浅表背侧角中GABA和/或甘氨酸能神经元控制从中枢神经系统周围到高级区域的感受伤害信号延缓。在成年人背侧角中,促成甘氨酸快速抑制突触后传递占优。甘氨酸受体主要在中枢神经系统低级区域中发现且涉及控制运动节律发生、协调脊柱伤害反射响应和感觉信号加工。其调节上升感受伤害途径和疼痛中的作用使得它们成为止痛药和解痉剂的潜在有意义的靶点。甘氨酸受体激动剂牛磺酸微注射入在先扣带回皮质-与疼痛的情感成分相关-缓解神经性疼痛,即可以由选择性甘氨酸受体拮抗剂土的宁拮抗的效应。对于土的宁-敏感性甘氨酸受体有4个 α -亚单位和1个 β -亚单位, $\alpha 1$ -亚单位不但广泛地在成年人脊髓和脑中表达,而且在涉及感觉加工中涉及的脑高级中心中表达。甘氨酸受体 $\alpha 3$ -亚单位已经被鉴定为基于因PGE2-诱导的受体磷酸

化导致的中枢炎性疼痛致敏的靶点。 $\alpha 3$ -亚单位敲除小鼠不发生炎性痛,而对急性痛具有正常响应。这种现象可以被解释为如下事实:包含 $\alpha 1$ 的能够补偿 $\alpha 3$ 中缺乏的甘氨酸受体亚单位不具有涉及PGE2信号转导的蛋白激酶A(PKA)磷酸化位点。此外, $\alpha 3$ 亚单位磷酸化不一定涉及神经性疼痛。基于这种理解,发明人确定了对研发靶向包含 $\alpha 1$ 亚单位的主要成年人甘氨酸受体同种型的药物的需求。由于甘氨酸受体的生理学作用及其相对有限的表达(主要在脊髓和下部脑区域中),所以选择性甘氨酸调节剂应在增加脊髓背侧角水平上的抑制方面具有巨大意义。

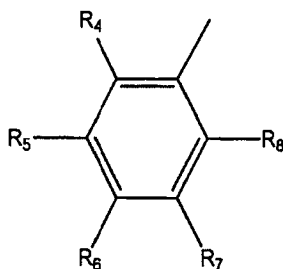
[0009] 本发明的第一个方面提供了通式(IA)的化合物

[0010]



[0011] 其中 R_1 是

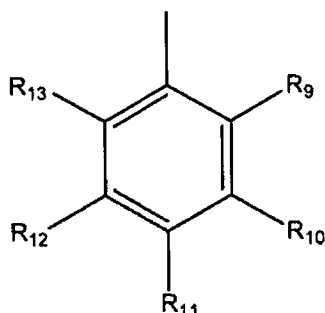
[0012]



[0013] 其中 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自氢、卤素、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烷氧基、取代或未取代的胺、取代或未取代的酰胺、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基;和/或

[0014] 其中 R_2 是

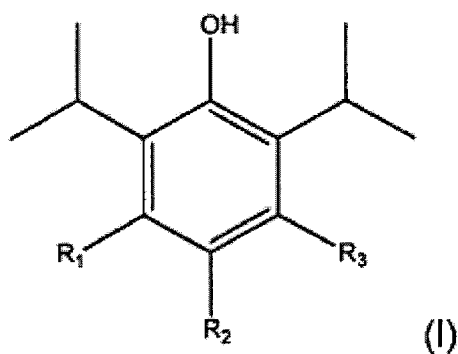
[0015]



[0016] 其中 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地选自氢、卤素、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烷氧基、取代或未取代的胺、取代或未取代的酰胺、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。

[0017] 本发明还提供了用于治疗疼痛的通式(I)的化合物

[0018]

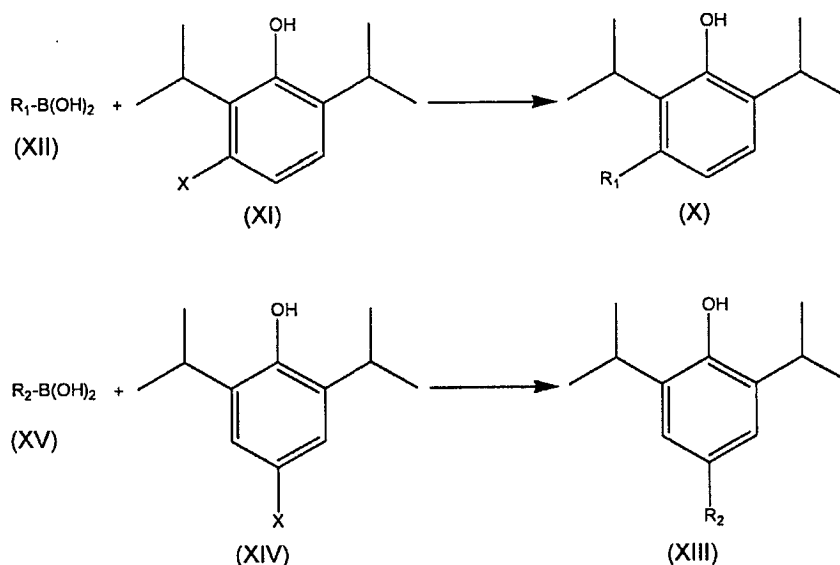


[0019] 其中至少一个 R_1 、 R_2 和 R_3 是或包含取代或未取代的芳基或杂芳基。

[0020] 最近以来,已经公布了通过靶向脊髓 $GABA_A$ 受体增加脊髓中的抑制的可替代的方法。由于其遍在中枢神经系统中的表达,所以 $GABA_A$ 受体是结构不同的镇静-麻醉和抗焦虑药的治疗靶标。因此,在脊髓注射时存在的 $GABA$ -调节剂如苯二氮杂~~草~~类的止痛效果因其在全身给药时的中枢神经系统效应而被消除。已经预先显示包含 $\alpha 2$ 和 / 或 $\alpha 3GABA_A$ 受体亚单位的 $GABA_A$ 受体受体涉及苯二氮杂~~草~~类在脊髓水平上的镇痛作用,从而启示研发亚型-选择性 γ 氨基丁酸能药物治疗慢性痛。与这种最新的工作相反,发明人的方法在于选择性靶向甘氨酸受体而非 $GABA_A$ 受体,以研发通式 I 和 IA 的化合物,以通过增强 / 恢复脊髓水平的抑制治疗慢性痛,同时避免与刺激高级脑区域中 $GABA_A$ 受体刺激相关的镇静和依赖。发明人的方法靶向甘氨酸受体 $\alpha 1$ -亚单位,已知它被麻醉药、酒精和大麻酚类确定地调节,但本发明的化合物首次以高亲和力靶向指定受体家族,而非与以较高亲和力靶向其他受体家族(例如就麻醉药而言是 $GABA_A$ 受体)的全部已知化合物一样是相对非特异性的。本发明还提供了用于治疗疼痛的式 II、IA 的化合物及其优选的实施方案。

[0021] 本发明的其他相关方面提供了通式 (X) 和 (XIII) 化合物的生产方法,通过使通式 (XI) 或 (XIV) 的化合物分别与通式 (XII) 或 (XV) 的化合物如下展示的反应来进行:

[0022]



[0023] 其中每个 R_1 和 R_2 是或包含取代或未取代的芳基或杂芳基, X 是选自氟、氯和溴的卤原子。

[0024] 本发明的另一个方面提供了药物组合物,其包含治疗有效量的本发明第一个方面

的化合物或通式 I 或 IA 的化合物和药学可接受的媒介物。

[0025] 本发明的另一个方面提供了用于治疗疼痛的药物组合物,其包含有效量的本发明第一个方面的化合物或通式 I 或 IA 的化合物和药学可接受的赋形剂。

[0026] 本发明的另一个方面提供了治疗或减轻有这种治疗需要的个体疼痛的方法,包括对该个体施用治疗有效量的如本发明第一个方面所定义的化合物或通式 I 或 IA 的化合物。

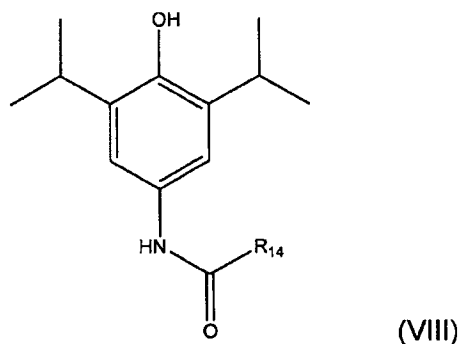
[0027] 其他方面还提供了包含本发明第一个方面所定义的化合物或通式 I 或 IA 的化合物的药物;和作为用于治疗疼痛的药物的本发明第一个方面的化合物或通式 I 或 IA 的化合物。

[0028] 本发明的另一个方面提供了本发明第一个方面的化合物或通式 I 或 IA 的化合物,其用于制备治疗疼痛的药物。

[0029] 本发明的另一个方面提供了本发明第一个方面的化合物或通式 I 或 IA 的化合物在治疗疼痛中的用途。

[0030] 本发明的第二个方面提供了用于治疗疼痛的药物组合物,其包含有效量的式 (VIII) 化合物

[0031]



[0032] 其中 R_{14} 是卤代-烷基;和药学可接受的赋形剂。

[0033] 本发明还提供了治疗疼痛的具有式 (VIII) 结构的化合物。

[0034] 本发明的另一个方面提供了用于治疗疼痛的药物组合物,其包含有效量的本发明第二个方面的化合物或通式 VIII 或 IX 的化合物和药学可接受的赋形剂。

[0035] 本发明的另一个方面提供了治疗或减轻有这种治疗需要的个体疼痛的方法,包含对该个体施用治疗有效量的本发明第二个方面所定义的化合物或通式 VIII 或 IX 的化合物。

[0036] 本发明的另一个方面提供了用于治疗疼痛的药物,其包含本发明第二个方面所定义的化合物或通式 VIII 或 IX 的化合物。

[0037] 本发明的另一个方面提供了本发明第二个方面的化合物或通式 VIII 或 IX 的化合物,其用于制备治疗疼痛的药物。

[0038] 本发明的另一个方面提供了本发明第二个方面的化合物或通式 VIII 或 IX 的化合物在治疗疼痛中的用途。

[0039] 发明人认为脊髓背侧角内的突触传递抑制缺失在炎症或神经损伤后发生慢性痛中起关键作用。此外,他们认为脊髓背侧角内的突触传递抑制主要涉及甘氨酸。这使得他们认识到土的宁-敏感性甘氨酸受体家族代表了目的在于抑制疼痛敏感性的治疗剂的靶点。这种认识基于 Ahmadi 等人的工作 (Nature Neuroscience (2001) Vol. 5No. 1 p34-40)。

[0040] 发明人通过研究羟基对位上带有卤素且邻位或间位上带有一个或两个甲基的苯酚衍生物继续测试其假说。其结果由 Haeseler 等人公布 (British Journal of Pharmacology (2005) 145, p916-925) 并且确立卤化改善了甘氨酸受体的共活化或活化。然而, 这些最初的结果显然证实苯酚环上的甲基数量或位置不会明显影响甘氨酸受体共活化的 EC_{50} 。

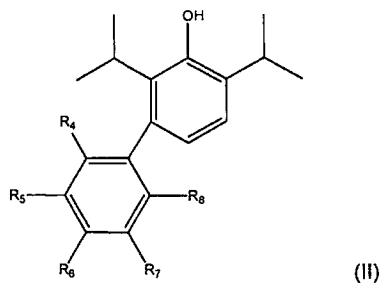
[0041] 发明人由此研发了改进的止痛药, 其特异性靶向甘氨酸受体, 且对他们而言令人意外的是, 他们发现掺入邻位或间位烷基的包含两个或多个碳原子和对 - 卤素、氨基或酰氨基的丙泊酚类似物显示令人意外的作为甘氨酸受体共活化剂的功效。这项工作是申请人的国际专利申请 W02007/071967 的主题。

[0042] 实施例中所所述的化合物在低纳摩尔范围显示半数最大增强效果。这表示低于丙泊酚浓度的数量级。此外, 本发明的化合物在功效上明显高于早期公布工作中所述的对 - 甲基和对 - 卤素衍生物。这是一个巨大的优势, 因为它意味着本发明的化合物将是理想的止痛药且对意识不具有或具有可忽略不计的效应 (即麻醉效应)。

[0043] 就通式 I 和 IA 的化合物而言, 优选所述芳基或杂芳基是单环芳族环或多环芳族环。所述芳基或杂芳基可以未被取代或可以被一个或多个基团取代, 该基团选自卤素、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烷氧基、取代或未取代的胺、取代或未取代的酰胺、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。所述一个或多个取代基之一可以位于邻位、间位和 / 或对位上。

[0044] 在第一个优选的实施方案中, R_1 是取代或未取代的芳基或杂芳基且至少一个 R_2 和 R_3 是氢原子。优选的化合物具有式 (II) 的结构

[0045]



[0046] 其中 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自氢、卤素、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烷氧基、取代或未取代的胺、取代或未取代的酰胺、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。

[0047] 至少一个 R_4 和 R_8 可以是卤素或取代或未取代的 C_{1-4} 烷基。卤素优选是氟或氯且烷基优选是甲基、乙基、丙基或丁基。优选 R_8 选自氟、氯和三氟甲基且 R_4 是氢。

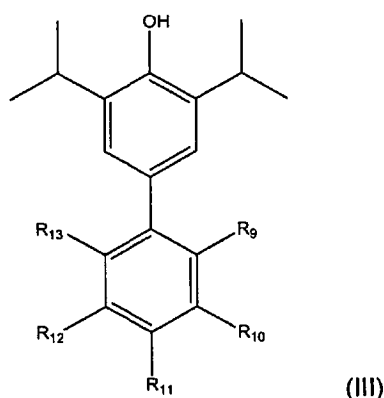
[0048] 优选至少一个 R_5 和 R_7 选自氢、卤素和取代或未取代的烷基。卤素可以是氟或氯且烷基可以是卤代 C_{1-4} 烷基。优选 R_7 选自氟、氯、三氟甲基和三氟甲氧基, 且 R_5 选自氢、氟、氯和三氟甲基。

[0049] R_6 优选自氢、卤素、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烷氧基和取代或未取代的苯基。所述卤素可以是氟或氯, 所述烷基可以是卤代 C_{1-4} 烷基且所述烷氧基可以是卤代 C_{1-4} 烷氧基。优选 R_6 选自 $-C(O)NH_2$ 、氟、氯和三氟甲基、三氟甲氧基。

[0050] 在第二个优选的实施方案中, R_2 是取代或未取代的芳基或杂芳基且至少一个 R_1 和

R₃ 是氢原子。优选的化合物具有式 (III) 的结构

[0051]



[0052] 其中 R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂ 和 R₁₃ 各自独立地选自氢、卤素、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烷氧基、取代或未取代的胺、取代或未取代的酰胺、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。

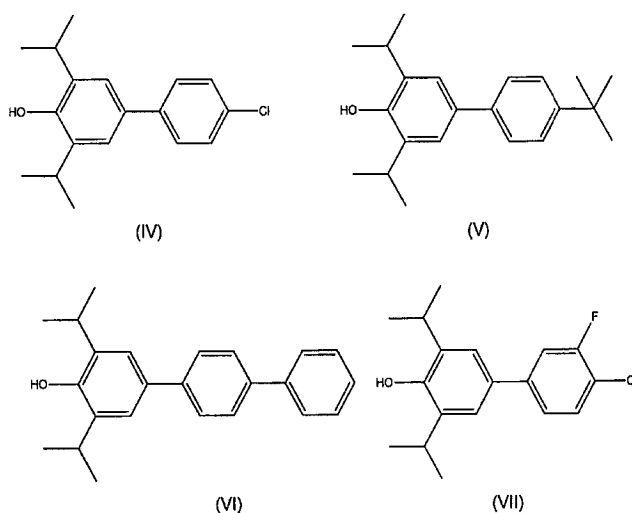
[0053] 至少一个 R₉ 和 R₁₃ 优选是卤素，例如氟或氯，或取代或未取代的 C₁₋₄ 烷基，例如甲基、乙基、丙基或丁基。优选 R₉ 选自氟、氯和三氟甲基，且 R₁₃ 是氢。

[0054] 优选至少一个 R₁₀ 和 R₁₂ 选自氢、卤素和取代或未取代的烷基。所述卤素可以是氟或氯且所述烷基可以是卤代 C₁₋₄ 烷基。优选 R₁₀ 选自氟、氯、三氟甲基和三氟甲氧基且 R₁₂ 选自氢、氟、氯和三氟甲基。

[0055] R₁₁ 可以选自氢、卤素、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烷氧基和取代或未取代的苯基。卤素优选是氟或氯，烷基优选是卤代 C₁₋₄ 烷基且烷氧基优选是卤代 C₁₋₄ 烷氧基。优选 R₆ 选自 -C(O)NH₂、氟、氯和三氟甲基、三氟甲氧基。

[0056] 本发明提供了如下优选的化合物：

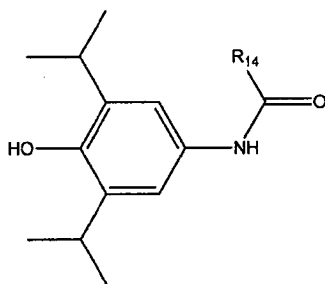
[0057]



[0058] 本发明还提供了用于治疗疼痛的上述优选的化合物。

[0059] 本发明的第二个方面提供了用于治疗疼痛的药物组合物，其包含有效量的具有式 (VIII) 结构的化合物

[0060]



(VIII)

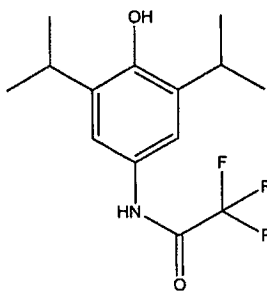
[0061] 其中 R_{14} 是卤代-烷基 ;和药学可接受的赋形剂。

[0062] 本发明还提供了用于治疗疼痛的具有式 (VIII) 结构的化合物。

[0063] 优选所述烷基是 C_{1-4} 烷基。 R_{14} 可以包含两个或多个、优选三个卤素取代基。可以选择任意适合的卤素取代基,但优选它或至少一个所述卤素取代基是氟。

[0064] 本发明还提供了用于治疗疼痛的药物组合物,其包含有效量的具有式 (IX) 结构的化合物

[0065]

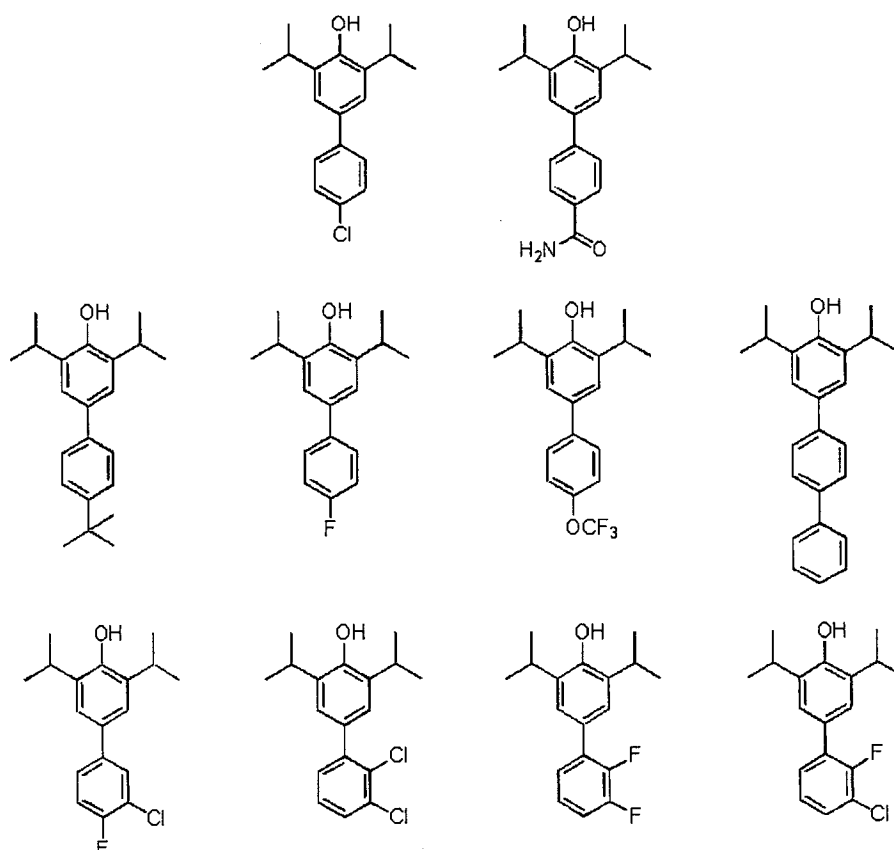


(XI)

[0066] 本发明还提供了用于治疗疼痛的具有式 (XI) 结构的化合物。

[0067] 本发明第一个方面的另一种优选的化合物可以选自下组 :

[0068]



[0069] 优选这些化合物对土的宁敏感性甘氨酸受体具有的选择性超过 GABA_A 受体。这些化合物可以具有用于在低于其对 GABA_A 受体的 EC_{50} 的浓度下共活化甘氨酸受体的 EC_{50} 。优选这些化合物具有用于在低于其对 GABA_A 受体的 EC_{50} 10 倍的共活化甘氨酸受体的 EC_{50} 。更优选这些化合物具有用于在低于其对 GABA_A 受体的 EC_{50} 至少 100 倍的共活化甘氨酸受体的 EC_{50} 。

[0070] 优选这些化合物还应具有用于在低于丙泊酚的共活化甘氨酸受体的 EC_{50} 。例如，这些化合物具有用于在低于丙泊酚至少 10 倍或 100 倍的共活化甘氨酸受体的 EC_{50} 。最优选这些化合物具有用于在低于丙泊酚 1000 倍的共活化甘氨酸受体的 EC_{50} （在 HEK293 细胞中异源表达的甘氨酸受体中测定）。

[0071] 测定用于共活化甘氨酸受体的 EC_{50} 值的适合的方法在下文实施例中公开。

[0072] 这些化合物的功效在考虑到 CNS 中调节麻醉和在 PNS 中调节镇痛的神经理理学时都更令人意外。发明人认为通式 I 和 IA 的化合物作为对土的宁 - 敏感性甘氨酸受体的正变构调节剂起作用。这些受体是通过超极化稳定跨膜电位的氯化物通道并且构成脊髓水平上的主要抑制成分。相反，紧密相关的 GABA_A 受体构成 CNS 中的主要抑制成分。 GABA_A 拮抗药由此导致意识改变或缺失，而本发明的化合物理想地在不影响意识的浓度外周水平下阻断了疼痛。发明人认为本发明的化合物具有功效，因为它们作为对土的宁 - 敏感性甘氨酸受体的正变构调节剂起作用且由此在背根神经节水平上阻断了传入神经信号，但对中枢 GABA_A 受体具有最低效应或无效应。因此，接下来本领域技术人员选择是甘氨酸受体激动剂且完全没有 GABA_A 拮抗效应的止痛药。因此，为已知最强效的 GABA_A 激动剂的丙泊酚被本领域技术人员视为适合性最低的用作研发止痛药的平台的化合物。此外，本领域技术人员还综述了 Haeseler 等人公布的数据（文献同上）并且取得了如下观点：烷基化（Haeseler

论文中的甲基)的性质在研发对甘氨酸受体的选择性超过 GABA 受体的化合物时并不关键。发明人由此认为对研究丙泊酚衍生物的止痛特性存在技术偏见。因此,发明人使用本发明化合物发现的甘氨酸受体共活化中意外的增加不仅令人意外,而且被本领域技术人员视为不可能的。在理论上,根据本领域的状态,在 GABA_A 受体水平上具有较低功效的任意其他苯酚衍生物应被视为更有前景的候选物。

[0073] 在代表上述举出的本发明其他方面的通式 (X) 和 (XIII) 的化合物的生产方法中, R₁ 和 / 或 R₂ 可以采用掺入本发明第一个方面的化合物的取代基 R₁ 和 R₂ 的优选特征。因此,可以理解本发明的方法代表了生产本发明第一个方面的化合物的优选实施方案的优选合成途径。

[0074] 本发明优选使用 Suzuki- 型反应途径,其中使芳基-硼酸与芳基-卤反应,生成本发明第一个方面的化合物。可以使用任意适合的反应条件,但优选使用适合的催化剂例如钯催化剂催化反应,正如一般 Suzuki 反应方法中众所周知的。因此,该反应优选在钯催化剂例如 Pd(PPh₃)₄ 的存在下进行。可以使用任意适合的反应温度,但优选高于室温,更优选高于约 40-50°C,更优选在约 60-100°C 的温度,且最优选在约 80°C 的温度。该反应可以进行任意理想的时间期限。优选该反应在约 6 小时以上、更优选约 12 小时以上且优选低于约 36-48 小时的时间期限内进行。优选的时间期限约为 12-48 小时,更优选约 24 小时。

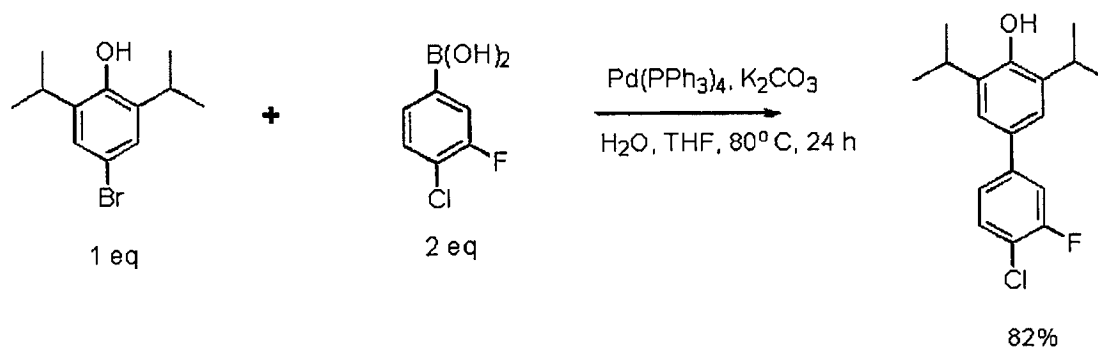
[0075] 可以根据如下典型反应路线或其如本领域技术人员显而意见的衍生物生产芳基-卤原料:

[0076]

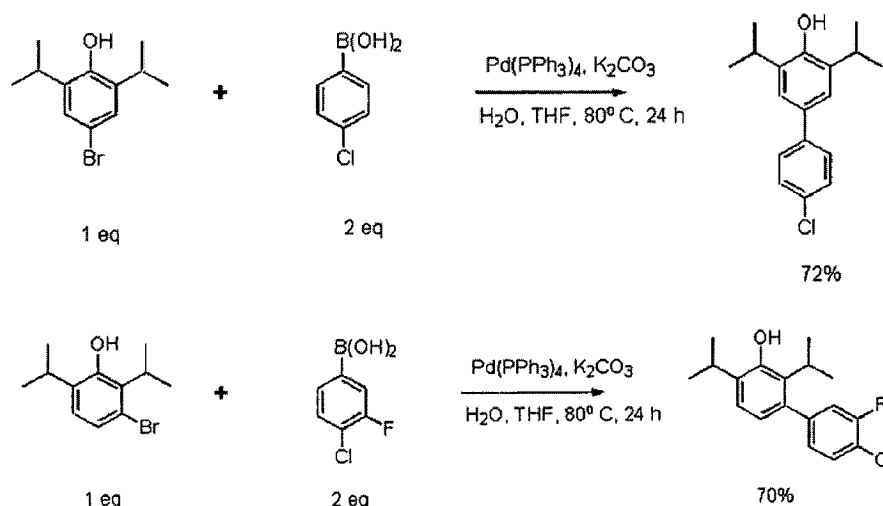


[0077] 然后与适合的芳基-或杂芳基-硼酸反应,生成如下所列举的所需的丙泊酚类似物:

[0078]



[0079]



[0080] 本发明的化合物和包含这种化合物的药物组合物和药物可以用作许多情况下的止痛药。

[0081] 这些化合物特别用于靶向迄今为止众所周知难以治疗的慢性痛状态（例如神经性和/或炎症后的慢性痛）。这些化合物特别用于治疗难以使用常规药物例如 NSAID、阿片衍生物等治疗的慢性神经性疼痛。

[0082] 这些化合物还用于治疗急性痛（例如损伤后）。

[0083] 本发明的化合物也是有益性的，因为它们避免了如果同时作为单一疗法使用的局部麻醉药和止痛药和 NSAID 和阿片类的全部常见副作用，从而允许使用大量目的在于叠加或超-叠加效果的联合治疗策略。

[0084] 可以调节疼痛的具体病症实例包括慢性腰背痛、关节炎、癌痛、三叉神经痛、中风和神经性疼痛。

[0085] 这些化合物可以用于治疗存在的疼痛，而在预防性治疗被视为在医学上必不可少时例如预先的选择性外科手术也可以使用。

[0086] 这些化合物可以用作单一疗法形式的止痛药（即单独使用该化合物）或可以与其他也减轻疼痛的疗法联用该化合物。优选的联合疗法包括将该化合物与通过疼痛加工途径调节疼痛的止痛药联用，所述的疼痛加工途径不同于通式化合物所调节的途径。这种止痛药包括吗啡、对乙酰氨基酚和 NSAIDs。这些化合物还可以与仅间接与甘氨酸受体发生相互作用的局麻药（例如利多卡因）联用。

[0087] 本发明的药物可以包含通式 I 或 IA 的化合物和药学可接受的媒介物。应理解所述媒介物应是被所给予的个体充分耐受并且能够将化合物递送至受侵害区域的媒介物。

[0088] 本发明的药物可以采用许多不同形式，这特别依赖于所述化合物的使用方式。因此，例如，该药物可以包含苯酚衍生物的盐形式的化合物（例如钠盐）。可以制备粉末形式的这种盐并且将其掺入片剂、胶囊、液体、软膏剂、霜剂、凝胶、水凝胶、喷雾剂、胶束、透皮贴剂、脂质体或任意其他可以对人或动物施用的适合形式。

[0089] 或者，可以将本发明的苯酚衍生物溶于适合的溶剂以形成液体药物。溶剂可以是水性的（例如 PBS 或蒸馏水）。或者，溶剂可以是醇，例如乙醇或这种溶剂与水性溶剂的混合物。

[0090] 优选药物用于局部治疗。可以将这种药物配制成应用于起效部位的液体。或者，

可以将该液体配制成通过注射施用的形式或配制成气雾剂。

[0091] 还可以将化合物掺入缓释或延迟释放装置。例如,可以将这种装置插在皮肤上或之下并且该化合物可以在数周乃至数月内释放。这种装置可以特别用于具有长期慢性痛的患者(例如具有关节炎的患者)。装置在使用通常需要频繁施用的化合物时可能特别有利。

[0092] 应理解的是,根据生物活性和生物利用度确定所需的化合物量,由此它取决于施用方式、所用化合物的物化特性和该化合物是作为单一疗法使用还是以联合疗法使用。施用频率还将受到上述举出的因素和化合物在所治疗个体体内的半衰期的影响。

[0093] 所施用的最佳剂量可以由本领域技术人员确定且随所用的具体化合物、制剂的规格、施用方式和需要缓解的疼痛的程度的不同而改变。依赖于所治疗具体个体的其他因素导致需要调整剂量,包括个体年龄、体重、性别、膳食和施用时间。

[0094] 已知方法例如制药工业所常用的那些方法(例如体内实验、临床试验等)可以用于建立组合物的具体制剂和精确的治疗方案(例如化合物的每日剂量和施用频率)。

[0095] 一般而言,应给出将化合物有效递送至靶点、使得组织周围的浓度约为所用化合物的 EC_{50} 的剂量。每日剂量可以作为单一施用给出(例如作为单一每日注射)。或者,所用化合物可以需要在一天过程中两次或两次以上。作为实例,可以将用于治疗慢性腰背痛的优选化合物作为可注射溶液或软膏剂两次(或根据疼痛的严重性两次以上)每日剂量施用。接受治疗的患者可以在清醒状态时服用第一次剂量,然后在晚上服用第二次剂量(如果使用两次剂量方案)或在此后每间隔 3 或 4 小时施用一次。或者,缓释装置可以用于给患者提供最佳剂量而无需施用重复的剂量。

[0096] 本发明还提供了药物组合物,其包含治疗有效量的本发明化合物和药学可接受的媒介物。在一个实施方案中,本发明苯酚衍生物的盐的量就肠(口服、直肠)施用而言是每剂量单位中约 10 μ g/kg 体重-10mg/kg 体重的量。在另一个实施方案中,该量就胃肠外(静脉内/鞘内或硬膜外)施用而言是每剂量单位中约 1 μ g/kg 体重-1mg/kg 体重。

[0097] 在另一个实施方案中,媒介物是液体且组合物是溶液。用于胃肠外施用的有用的液体溶液可以包含 0.001-1% 重量的式 I 或 IA 的苯酚类。在另一个实施方案中,媒介物是固体且组合物是片剂。在另一个实施方案中,媒介物是凝胶且组合物用于局部施用。

[0098] 在本发明中,"治疗有效量"是对患有痛性病症的个体施用时化合物有效、导致疼痛减轻、缓解或消退的化合物、药物或组合物的任意用量。

[0099] "个体"是脊椎动物、哺乳动物、家畜或人。

[0100] 在本发明实施过程中,"药学可接受的媒介物"是用于配制药物组合物的本领域技术人员所公知的任意生理学媒介物。在一个实施方案中,药用媒介物可以是液体且药物组合物可以是溶液形式。在另一个实施方案中,药学可接受的媒介物是固体且组合物是粉末或片剂形式。在另一个实施方案中,药用媒介物是凝胶且组合物是栓剂或霜剂形式。在另一个实施方案中,可以将化合物或组合物配制药学可接受的透皮贴剂的部分。

[0101] 固体媒介物可以包括一种或多种还可以作为润滑剂、增溶剂、助悬剂、填充剂、助流剂、压制助剂、粘合剂或片剂崩解剂起作用的物质;它还可以是包囊材料。在粉末中,媒介物是与活性成分细粉混合的固体细粉。在片剂中,将活性成分与具有必需压制特性的媒介物以适合比例混合并且压制成所需的形状和大小。粉末和片剂优选包含至多 99% 活性成分。适合的固体媒介物包括,例如磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、糖类、乳糖、糊精、淀粉、明胶、

纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、低熔点蜡和离子交换树脂。

[0102] 液体媒介物用于制备溶液、混悬液、乳剂等。可以将苯酚衍生物溶于或混悬于药学可接受的液体媒介物中,例如水、乙醇、有机溶剂或其混合物或药学可接受的油或脂肪。

[0103] 例如,可以通过肌内、鞘内、硬膜外、腹膜内或皮下注射使用无菌溶液或混悬液的液体药物组合物。也可以通过静脉内施用无菌溶液。可以将化合物制备成无菌固体组合物,可以使用无菌水、盐水或其他适合的无菌可注射介质在施用时间将其溶解或混悬。

[0104] 现在将通过下列实施例并且参照附图进一步示例本发明,其中:

[0105] 图 1:对使用对数标度的 4-(对-叔丁基苯基)-丙泊酚浓度绘制的 $\alpha 1$ 同聚甘氨酸受体 (平均值 $\pm$ SD;每次 $n = 3$) 在无甘氨酸的存在下活化的归一化的 Cl^- 电流。将电流归一化至用高浓度化合物达到的最大值。实线是使用所示参数的对数数据的希尔拟合;

[0106] 图 2:对使用对数标度的 4-(对-氯苯基)-丙泊酚浓度绘制的 $\alpha 1$ 同聚甘氨酸受体 (平均值 $\pm$ SD;每次 $n = 3$) 在无甘氨酸的存在下活化的归一化的 Cl^- 电流。将电流归一化至用高浓度化合物达到的最大值。实线是使用所示参数的对数数据的希尔拟合;

[0107] 图 3:对使用对数标度的 4-(对-联苯)-丙泊酚浓度绘制的 $\alpha 1$ 同聚甘氨酸受体 (平均值 $\pm$ SD;每次 $n = 3$) 在无甘氨酸的存在下活化的归一化的 Cl^- 电流。将电流归一化至用高浓度化合物达到的最大值。实线是使用所示参数的对数数据的希尔拟合;

[0108] 图 4:分别口服 (折线) 和静脉内 (实线) 施用 8mg/kg 和 1mg/kg 后 CK-I-I 的单个动物的血浆浓度。插图描绘了使用半对数标度的相同数据;

[0109] 图 5:分别静脉内施用 20mg/kg 和 2mg/kg 后 CK-2-3 的单个动物的血浆浓度。插图描绘了使用半对数标度的相同数据。在口服施用后在血浆中未检测到化合物;和

[0110] 图 6:分别口服 (折线) 和静脉内 (实线) 施用 20mg/kg 和 2mg/kg 后 CK-2-9 的单个动物的血浆浓度。插图描绘了使用半对数标度的相同数据。

实施例

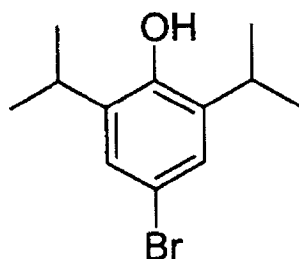
[0111] 如下所述以卤代丙泊酚化合物为原料合成了本发明大量芳基-取代的丙泊酚类似物。然后测试所生产的芳基-取代的类似物在乙醇中的溶解度,然后测试有代表性的选择以测定其 EC_{50} 值和希尔系数。

[0112] 化合物合成

[0113] 4-取代的丙泊酚类似物的合成

[0114] 4-溴丙泊酚:

[0115]

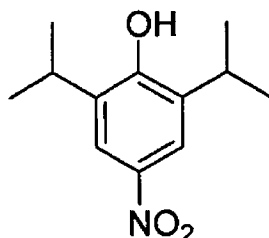


[0116] 将丙泊酚 (1g, 5.6mmol) 溶于冰醋酸 (25ml.)。在搅拌下滴加溴 (水溶液),直到溶液停止变色为止。将该混合物保持在室温搅拌 1 小时。然后将该反应混合物缓慢倾入水 (50ml)。用乙酸乙酯萃取得到的红色油状物,用水和盐水洗涤。用硫酸镁干燥粗产物,

除去溶剂,得到棕色油状物,其通过快速色谱法纯化,使用 2% DCM 的己烷溶液作为洗脱剂。回收 1.35g 淡黄色油状物,为纯的 4-溴-丙泊酚(93%.)。¹H NMR 400MHz d 7.1(s,1H), 4.75(s,1H),3.15(m,2H),1.3(d,12H)。¹³C NMR d149.4,136.48,126.89,113.74,27.69,22.95。HRMS(EI) C₁₂H₁₇OBr[M+H]⁺ 理论值 258.1679,实测值 258.1703。分析 C₁₂H₁₇OBr 理论值 C:56.04%,H:6.66%,实测值 C:55.99%,H:6.63%。

[0117] 4-硝基-丙泊酚:

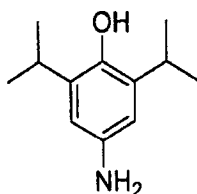
[0118]



[0119] 将丙泊酚(1.78g,10mmol.)溶于AcOH:DCM 15:10mL的混合物中。在0℃在滴加硝酸(1mL溶于10mL DCM)。在添加时观察到黄色至橙色至红色的颜色改变。加入水(20mL),用DCM(3x20mL)萃取该反应混合物。用硫酸钠干燥得到的红色溶液,除去溶剂,得到深红色粗固体。通过从乙醚和己烷中重结晶纯化粗产物,得到两批淡黄色结晶。1.803g(84%)。¹H NMR δ 7.71(s,2H),4.77(s,1H),3.1(m,2H),1.3(d,12H)。¹³C NMR δ 155.21,140.44,138.41,120.20,27.68,23.01。HRMS(EI)C₁₂H₂₀N₂O₃[M+NH₄]⁺ 理论值 240.2735,实测值 240.2731。分析 C₁₂H₁₆NO₃ 理论值 C:64.55%,H:7.67%,N:6.27%,实测值 C:64.53%,H:7.66%,N:6.25%。

[0120] 4-氨基-丙泊酚:

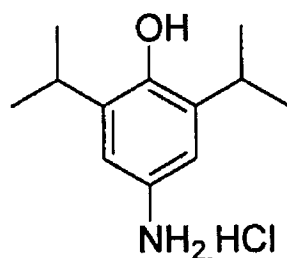
[0121]



[0122] 将4-硝基丙泊酚(0.368g,1.6mmol)溶于EtOH(2.8mL)和浓HCl(7.5mL.)。加入过量锡颗粒(1.4g),将该反应混合物加热至回流。观察到从淡黄色至无色的颜色改变。1小时后,通过硅藻土垫过滤该反应混合物。减压除去溶剂,将得到的残余物再溶于水(50ml)。滴加氢氧化钠水溶液,直到通过通用指示剂试纸证实该溶液呈碱性为止(pH 12-15)。然后用DCM(3x25ml)萃取该溶液。合并有机萃取物,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,除去溶剂,得到320mg分析纯的紫色油状物98%。¹H NMR δ 6.45(s,2H),4.75(s,1H)3.4(br s,2H)3.1(m,2H)1.3(d,12H)。¹³C NMR δ 140.45,138.72,136.48,112.02,27.70,23.01。HRMS(CI)C₁₂H₂₂N₂O[M+NH₄]⁺ 理论值 210.3093,实测值 210.3097。分析 C₁₂H₁₈NO 理论值 C:74.56%,H:9.91%,N:7.24%,实测值 C:74.36%,H:9.95%,N:7.23%。

[0123] 4-氨基丙泊酚-盐酸盐:

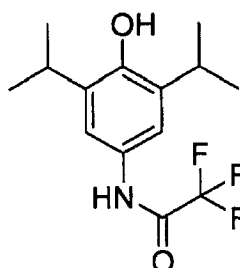
[0124]



[0125] 将 4-氨基丙泊酚 (310mg, 1.6mmol) 溶于 Et₂O (100ml)。在搅拌下滴加溶于 1,4-二噁烷 (25ml) 的浓 HCl (5ml)。1Hr 后, 该混合物沉降为两层, 回收下层, 减压除去溶剂, 得到粉红色结晶固体 (250mg, 67%), 其不经进一步分析使用。

[0126] 4-三氟乙酰胺-丙泊酚:

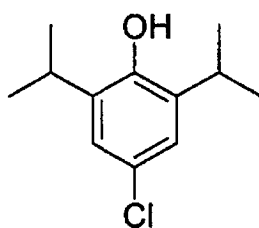
[0127]



[0128] 将 4-氨基丙泊酚 (200mg, 1.04mmol) 溶于 EtOAc (40ml)。加入吡啶 (0.25ml, 3mmol), 然后加入三氟乙酐 (0.2ml, 1mmol)。将该反应混合物加热至 60°C 30mins。冷却时, 减压除去溶剂, 将残余物再溶于 DCM (50ml), 依次用水和盐水洗涤, 用硫酸钠干燥。除去溶剂后, 回收 4-三氟乙酰氨基丙泊酚, 其为淡粉红色结晶固体 (205mg, 75%)。¹H NMR δ 7.16 (s, 2H), 6.3 (br s, 1H), 5.0 (1H, s), 3.2 (m, 2H), 1.3 (d, J = 6.9Hz, 12H)。¹³C NMR δ 155.18, 144.28, 138.05, 130.51, 117.03, 115.85, 27.78, 23.12。HRMS (E1): C₁₄H₁₈F₃NO₂ [M+H]⁺ 理论值 306.2751, 实测值 306.2747。分析 C₁₄H₁₈F₃NO₂ 理论值 C: 58.12, H: 6.27, N: 4.84, 实测值 C: 58.11, H: 6.25, N: 4.83。

[0129] 4-氯丙泊酚:

[0130]

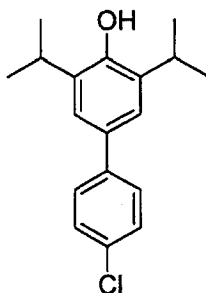


[0131] 将丙泊酚 (710mg, 4.0mmol) 溶于 DCM。滴加磺酰氯 (0.675g, 5mmol), 然后将该反应混合物回流 4hrs。减压除去溶剂, 得到粗产物, 为棕色油状物, 通过蒸馏纯化, 得到 4-氯丙泊酚, 为淡橙色油状物 (750mg, 89%), 在 1mm Hg 的 b. p. 为 94-97°C。¹H NMR δ 7.0 (s, 2H), 5.0 (s, 1H), 3.1 (m, 2H), 1.2 (d, J = 6.9Hz, 2H)。¹³C NMR δ 148.92, 139.12, 126.12, 124.01, 27.37, 22.68。HRMS (E1) C₁₂H₁₇Cl [M+H]⁺ 理论值 166.9545, 实测值 166.9572。分析 C₁₂H₁₇Cl 理论值 C: 67.76, H: 8.06, 实测值 C: 67.70, H: 8.04。

[0132] 芳基-取代的丙泊酚类似物的合成

[0133] 4-(对-氯苯基)-丙泊酚:

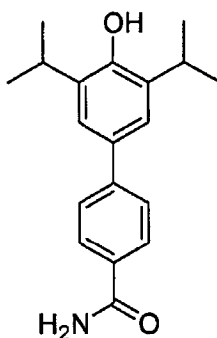
[0134]



[0135] 将 4-溴-丙泊酚 (200mg, 0.77mmol)、对-氯苯基硼酸 (156mg, 1mmol, 1.3eq)、四(三苯膦)钯 (0) (26mg, 3mol%)、碳酸钠 (3.5ml 的 2N 水溶液) 和二甲氧基乙烷 (10mL) 的混悬液在 95°C 搅拌 24hrs。冷却该混悬液, 通过硅藻土过滤, 溶于 EtOAc, 依次用水和盐水洗涤, 用硫酸钠干燥, 真空除去溶剂。通过柱色谱法纯化得到的残余物, 用 10% EtOAc 的己烷溶液洗脱, 得到纯产物, 为白色固体 (72%)。¹H NMR δ 7.5-7.2 (m, 6H), 4.8 (s, 1H), 3.2 (m, 2H), 1.3 (d, J = 6.85Hz, 12H)。¹³C NMR δ 147.59, 138.23, 134.54, 132.89, 129.11, 128.50, 122.71, 27.71, 23.144。HRMS: (EI) ⁻C₁₈H₂₀OCl [M+H]⁻ 理论值 287.1203, 实测值 287.1206。分析 C₁₈H₂₀OCl 理论值 C: 74.86, H: 7.33, 实测值 C: 74.88, H: 7.32。

[0136] 4-(对-氨基甲酰基苯基)-丙泊酚:

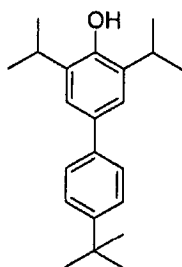
[0137]



[0138] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (200mg, 0.77mmol)、对-氨基甲酰基苯基硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为淡黄色固体 (212mg, 93%)。¹H NMR δ 8.00-7.7 (m, 4H), 7.2 (s, 2H), 6.3 (s, 2H), 5.1 (s, 1H), 3.2 (m, 2H), 1.2 (d, J = 6.85, 12H)。¹³C NMR δ 168.13, 147.55, 139.90, 138.18, 133.07, 128.05, 127.94, 126.53, 26.71, 23.68。HRMS (EI) ⁻C₁₉H₂₃NO₂ [M+H]⁻ 理论值 298.4567, 实测值 298.4570。分析 C₁₉H₂₃NO₂ 理论值 C: 76.73, H: 7.80, N: 4.71, 实测值 C: 76.70, H: 7.76, N: 4.68。

[0139] 4-(对-叔丁基苯基)-丙泊酚:

[0140]

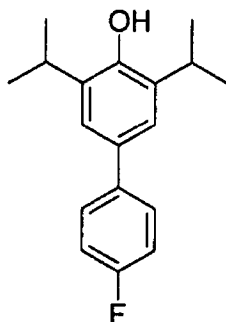


[0141] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (300mg, 1.12mmol)、对-叔丁基苯基硼酸和四

(三苯膦) 钯 (0) 反应, 得到产物, 为黄色油状物 (300mg, 83%)。 ^1H NMR δ 7.4–7.2 (m, 6H), 4.9 (s, 1H), 3.15 (m, 2H), 1.4 (s, 9H), 1.2 ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 149.00, 147.63, 138.21, 133.38, 128.49, 127.58, 126.45, 125.30, 40.67, 31.39, 26.70, 23.65。 HRMS (E1) $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 310.4690, 实测值 310.4692。 分析 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}$ 理论值 C :85.11, H :9.74, 实测值 C :85.10, H :9.72。

[0142] 4-(对-氟苯基)-丙泊酚:

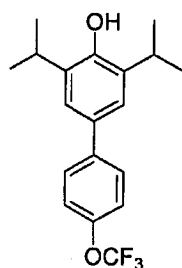
[0143]



[0144] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (300mg, 1.12mmol)、对-氟苯基硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为浅黄色油状物 (210mg, 69%)。 ^1H NMR δ 7.6 (m, 2H), 7.2 (m, 4H), 4.85 (s, 1H), 3.2 (m, 2H), 1.25 ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 150.39, 141.13, 134.55, 132.79, 128.52, 122.85, 121.50, 100.00, 27.77, 23.14。 HRMS : (E1) $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FO}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 273.3598, 实测值 273.3593。 分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FO}$ 理论值 C :79.38, H :7.77, 实测值 C :79.30, H :7.76。

[0145] 4-(对-三氟甲氧基苯基)-丙泊酚:

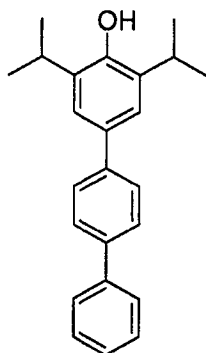
[0146]



[0147] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (200mg, 0.77mmol)、对-三氟甲氧基苯基硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为淡黄色固体 (205mg, 79%)。 ^1H NMR δ 7.6–7.5 (m, 2H), 7.3–7.0 (m, 4H), 4.8 (s, 1H), 3.2 (m, 2H), 1.3 ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 159.62, 150.05, 134.46, 128.79, 128.71, 122.74, 115.88, 115.67, 99.99, 27.77, 23.16。 HRMS (E1) $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_2[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 339.3568, 实测值 339.3564。 分析 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_2$ 理论值 C :67.44, H :6.26, 实测值 C :67.40, H :6.23。

[0148] 4-(对-联苯)-丙泊酚:

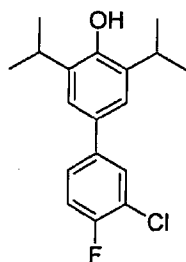
[0149]



[0150] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (200mg, 0.77mmol)、对-联苯硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为黄白色固体 (100mg, 39%)。 ^1H NMR δ 7.6 (s, 4H), 7.5 (m, 2H), 7.2-7.3 (m, 3H), 7.0 (s, 2H), 4.9 (s, 1H), 3.1 (m, 2H), 1.2ppm (d, $J = 6.85$, 12H)。 ^{13}C NMR δ 147.53, 138.18, 136.5, 135.40, 135.31, 129.41, 128.43, 128.0, 127.3, 126.3, 26.73, 23.73。 HRMS: (EI) $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 331.4673, 实测值 331.4663。 分析 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}$ 理论值 C: 87.23, H: 7.93, O: 4.84, 实测值 C: 87.18, H: 7.76, O: 4.79。

[0151] 对-(4-氟, 3-氯苯基)-丙泊酚:

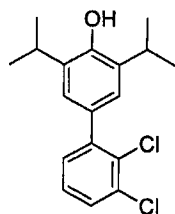
[0152]



[0153] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (200mg, 0.77mmol)、4-氟, 3-氯苯基硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为淡黄色固体 (82%)。 ^1H NMR δ 7.35-7.25 (m, 3H), 7.0-6.9 (m, 3H), 4.85 (s, 1H), 3.2 (m, 2H), 1.25ppm (d, $J = 6.85$, 12H)。 ^{13}C NMR δ 161.81, 147.58, 138.31, 133.47, 129.56, 128.59, 127.39, 126.50, 121.28, 117.30, 25.95, 22.89。 HRMS: (EI) $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClFO}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 307.8139, 实测值 307.8090。 分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClFO}$ 理论值 C: 70.47, H: 6.57, 实测值 C: 70.50, H: 6.63。

[0154] 对-(2,3-二氯苯基)-丙泊酚:

[0155]

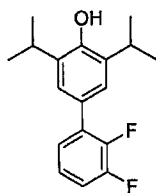


[0156] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (200mg, 0.77mmol)、2,3-二氯苯基硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为白色固体 (170mg, 68%)。 ^1H NMR δ 7.25-7.15 (m, 3H), 7.0 (s, 2H), 4.85 (s, 1H), 3.20 (m, 2H), 1.3ppm (d, $J = 6.85$, 12H)。 ^{13}C NMR δ 147.58, 138.78, 138.17, 134.01, 131.63, 129.25, 128.45, 127.43, 126.49, 26.68, 23.72。 HRMS: (EI) $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 324.2679, 实测值 324.2674。 分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}$ 理论值 C: 66.88, H: 6.24, 实测值 C:

66.93, H:6.30。

[0157] 对-(2,3-二氟苯基)-丙泊酚:

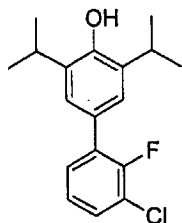
[0158]



[0159] 根据一般方法A使4-溴丙泊酚(300mg, 1.12mmol)、2,3-二氟苯基硼酸和四(三苯膦)钯(0)反应,得到产物,为白色固体(290mg, 89%)。 ^1H NMR δ 7.15–6.9(m, 5H), 4.85(s, 1H), 3.15(m, 2H), 1.3ppm(d, J = 6.85, 12H)。 ^{13}C NMR δ 151.01, 147.78, 145.58, 138.19, 133.07, 128.53, 126.48, 125.10, 116.03, 26.60, 23.74。 HRMS: (EI) $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 291.3589, 实测值 291.3591。 分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{O}$ 理论值 C:74.46, H:6.94, 实测值 C:74.51, H:6.99。

[0160] 对-(2-氟,3-氯苯基)-丙泊酚:

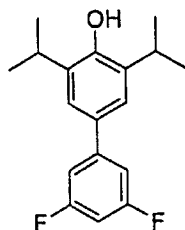
[0161]



[0162] 根据一般方法A使4-溴丙泊酚(520mg, 1.94mmol)、2-氟,3-氯苯基硼酸和四(三苯膦)钯(0)反应,得到产物,为黄色油状物(520mg, 95%)。 ^1H NMR δ 7.3–7.2(m, 2H), 7.1–7.0(m, 3H), 4.8(s, 1H), 3.1(m, 2H), 1.25ppm(d, J = 6.85, 12H)。 ^{13}C NMR δ 161.42, 147.59, 138.24, 132.66, 129.43, 128.46, 127.58, 126.54, 126.28, 121.30, 26.74, 23.68。 HRMS: (EI) $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClF}_2\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 307.8139, 实测值 307.8126。 分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClF}_2\text{O}$ 理论值 C:70.47, H:6.57, 实测值 C:70.43, H:6.54。

[0163] 对-(3,5-二氟苯基)-丙泊酚:

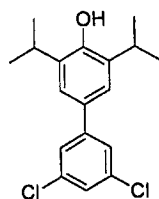
[0164]



[0165] 根据一般方法A使4-溴丙泊酚(520mg, 1.94mmol)、3,5-二氟苯基硼酸和四(三苯膦)钯(0)反应,得到产物,为深红色油状物(500mg, 89%)。 ^1H NMR δ 7.3–7.2(m, 2H), 7.0–6.9(m, 4H), 6.6(m, 1H), 4.9(s, 1H), 3.15(m, 2H), 1.3ppm(d, J = 6.85, 12H)。 ^{13}C NMR δ 165.00, 147.58, 139.80, 138.16, 128.54, 126.48, 120.01, 103.63, 26.59, 23.64。 HRMS: (EI) $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 291.3589, 实测值 291.3580。 分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{O}$ 理论值 C:74.46, H:6.94, 实测值 C:74.40, H:6.88。

[0166] 对-(3,5-二氯苯基)-丙泊酚:

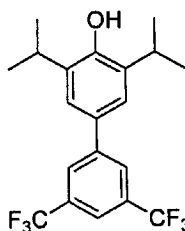
[0167]



[0168] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (200mg, 0.77mmol)、3,5-二氯苯基硼酸和四(三苯膦)钯(0)反应,得到产物,为黄色半固体 (200mg, 80%)。 ^1H NMR δ 7.4(s, 2H), 7.2(s, 1H) 7.0(s, 1H), 4.8(s, 1H), 3.1(m, 2H), 1.2ppm(d, $J = 6.85$, 12H)。 ^{13}C NMR δ 147.62, 139.34, 138.15, 136.21, 129.30, 126.48, 125.87, 26.63, 23.74。 HRMS : (EI) $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 324.2679, 实测值 324.2649。 分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}$ 理论值 C :66.88, H :6.24, 实测值 C :66.80, H :6.28。

[0169] 对-(3,5-二-三氟甲基苯基)-丙泊酚:

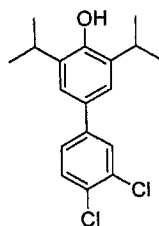
[0170]



[0171] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (300mg, 1.12mmol)、3,5-二-三氟甲基苯基硼酸和四(三苯膦)钯(0)反应,得到产物,为黄色半固体 (350mg, 80%)。 ^1H NMR δ 7.7-7.6(m, 3H) 7.0(s, 1H), 4.8(s, 1H), 3.15(m, 2H), 1.25ppm(d, $J = 6.85$, 12H)。 ^{13}C NMR δ 148.00, 138.75, 137.21, 131.92, 130.33, 128.83, 126.72, 125.03, 122.09, 27.10, 23.85。 HRMS : (EI) $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 391.3729, 实测值 391.3721。 分析 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{O}$ 理论值 C :61.54, H :5.16, 实测值 C :61.60, H :5.19。

[0172] 对-(3,4-二氯苯基)-丙泊酚:

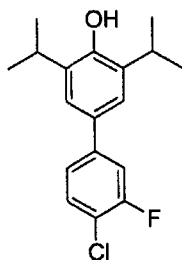
[0173]



[0174] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (200mg, 0.77mmol)、3,4-二氯苯基硼酸和四(三苯膦)钯(0)反应,得到产物,为黄色半固体 (120mg, 48%)。 ^1H NMR δ 7.4-7.3(m, 3H), 7.15(m, 1H), 4.9(s, 1H), 3.25(m, 2H), 1.3ppm(d, $J = 6.85$, 12H)。 ^{13}C NMR δ 148.01, 139.05, 136.31, 133.95, 130.78, 129.15, 128.56, 127.38, 126.41, 26.79, 23.69。 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 324.2679, 实测值 324.2656。 分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}$ 理论值 C :66.88, H :6.24, 实测值 C :66.79, H :6.23。

[0175] 对-(3-氟,4-氯苯基)-丙泊酚:

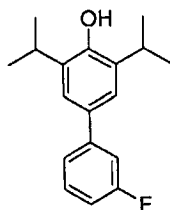
[0176]



[0177] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (520mg, 1.94mmol)、3-氟, 4-氯苯基硼酸和四(三苯膦) 钯 (0) 反应, 得到产物, 为黄色固体 (380mg, 63%)。 ^1H NMR δ 7.3–7.1 (m, 5H), 5.0 (s, 1H), 3.2 (m, 2H), 1.3ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 163.28, 148.00, 138.24, 136.19, 131.02, 128.55, 125.99, 124.47, 119.73, 117.66, 26.80, 23.67。 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClFO}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 307.8079, 实测值 307.8099。分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClFO}$ 理论值 C : 70.47, H : 6.57, 实测值 C : 70.43, H : 6.51。

[0178] 对-(3-氟苯基)-丙泊酚:

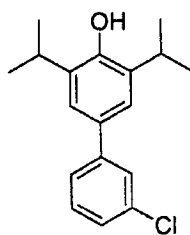
[0179]



[0180] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (200mg, 0.77mmol)、3-氟苯基硼酸和四(三苯膦) 钯 (0) 反应, 得到产物, 为淡粉红色固体 (160mg, 76%)。 ^1H NMR δ 7.25–6.9 (m, 6H), 5.1 (s, 1H), 3.25 (m, 2H), 1.2ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 163.44, 147.66, 138.17, 131.05, 128.47, 126.73, 123.44, 116.23, 114.01, 27.15, 22.99。 $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FO}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 273.3688, 实测值 273.3680。分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FO}$ 理论值 C : 79.38, H : 7.77, 实测值 C : 79.43, H : 7.81。

[0181] 对-(3-氯苯基)-丙泊酚:

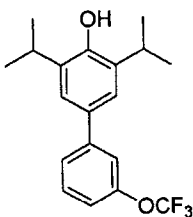
[0182]



[0183] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (520mg, 1.94mmol)、3-氯苯基硼酸和四(三苯膦) 钯 (0) 反应, 得到产物, 为淡黄色 (350mg, 62%)。 ^1H NMR δ 7.5 (s, 1H), 7.35–7.25 (m, 3H), 7.15 (s, 2H), 4.8 (s, 1H), 3.2 (m, 2H), 1.3ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 148.11, 138.34, 137.82, 134.91, 131.03, 129.03, 127.73, 125.99, 125.41, 27.09, 23.01。 $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClO}[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 289.8238, 实测值 289.8245。分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClO}$ 理论值 C : 74.86, H : 7.33, 实测值 C : 74.72, H : 7.30。

[0184] 对-(3-三氟甲氧基苯基)-丙泊酚:

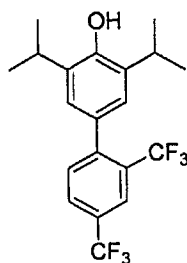
[0185]



[0186] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (300mg, 1.12mmol)、3-氯苯基硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为淡黄色油状物 (230mg, 56%)。 ^1H NMR δ 7.2 (m, 1H), 7.0 (m, 4H), 6.7 (m, 1H), 4.85 (s, 1H), 3.25 (m, 2H), 1.2ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 162.33, 148.41, 139.09, 137.71, 130.52, 129.12, 127.11, 121.79, 113.33, 26.68, 23.74。 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 339.3748, 实测值 339.3753。分析 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_2$ 理论值 C :67.44, H :6.26, 实测值 C :67.51, H :6.27。

[0187] 对-(2,4-三氟甲基苯基)-丙泊酚:

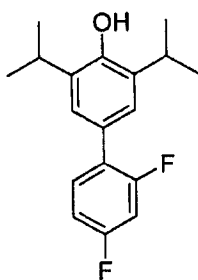
[0188]



[0189] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (300mg, 1.12mmol)、2,4-三氟甲基苯基硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为淡黄色固体 (250mg, 57%)。 ^1H NMR δ 7.2 (m, 1H), 7.65-7.5 (m, 2H), 7.34-7.15 (m, 3H), 4.85 (s, 1H), 3.25 (m, 2H), 1.2ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 148.41, 139.52, 132.78, 130.35, 129.03, 128.39, 127.21, 124.63, 123.29, 118.14, 25.99, 23.83。 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 391.3729, 实测值 391.3761。分析 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{O}$ 理论值 C :61.54, H :5.16, 实测值 C :61.22, H :5.10。

[0190] 对-(2,4-二氟苯基)-丙泊酚:

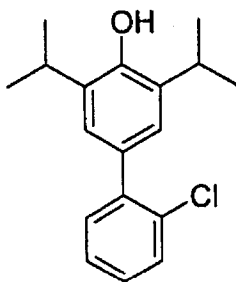
[0191]



[0192] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (520mg, 1.94mmol)、2,4-二氟苯基硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为淡黄色固体 (350mg, 56%)。 ^1H NMR δ 7.5 (m, 1H), 7.1 (s, 2H), 6.8-6.7 (m, 2H), 4.85 (s, 1H), 3.25 (m, 2H), 1.2ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 164.11, 160.35, 147.93, 139.11, 131.15, 129.37, 127.33, 112.06, 105.34, 26.77, 24.11。 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 291.3589, 实测值 291.3565。分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{O}$ 理论值 C :74.46, H :6.94, 实测值 C :74.51, H :6.99。

[0193] 对-(2-氯苯基)-丙泊酚:

[0194]



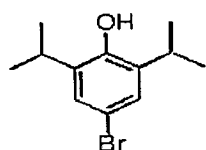
[0195] 根据一般方法 A 使 4-溴丙泊酚 (300mg, 1.12mmol)、2-氯苯基硼酸和四(三苯膦)钯 (0) 反应, 得到产物, 为淡黄色油状物 (195mg, 60%)。 ^1H NMR δ 7.4-7.1 (m, 6H), 4.85 (s, 1H), 3.25 (m, 2H), 1.2ppm (d, $J = 6.85, 12\text{H}$)。 ^{13}C NMR δ 146.93, 139.31, 137.43, 133.10, 129.29, 125.93, 26.74, 23.71。 HRMS: (EI) $^-\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{OCl}[\text{M}+\text{H}]^-$ 理论值 287.1203, 实测值 287.1216。分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{OCl}$ 理论值 C: 74.86, H: 7.33, 实测值 C: 74.90, H: 7.33。

[0196] 化合物测试

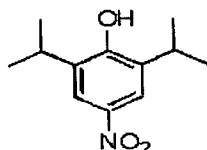
[0197] 乙醇溶解度对比试验

[0198] 使用 5mg 化合物 / 1ml 乙醇目视测定一系列对-取代的丙泊酚类似物在乙醇中的溶解度。测试的少量类似物并非是本发明的, 但为对比目的包括如下根据本发明测试的大量类似物。全部测试化合物均是可溶性的, 除外如下所述的那些。

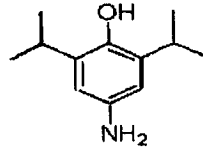
[0199]



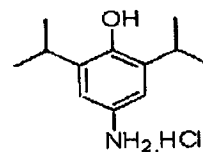
分子量: 257.17
MJ-2-01 575 mg



分子量: 223.27
MJ-2-02 100 mg

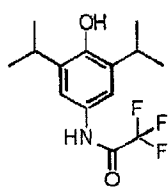


分子量: 193.29
MJ-2-04 100 mg

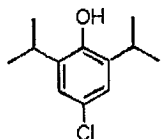


分子量: 229.75
MJ-2-05 100 mg

[0200]

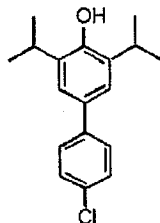


分子量: 289.29

MJ-2-28 205 mg
不溶性

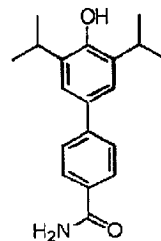
分子量: 212.72

MJ-2-29 300 mg



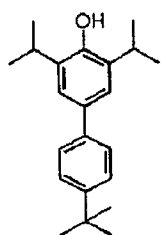
分子量: 288.81

MJ-2-11 120 mg

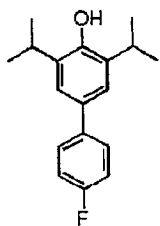


分子量: 297.39

MJ-2-09 212 mg

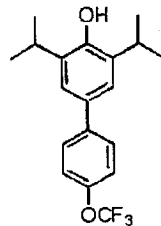


分子量: 310.47

MJ-2-08 400 mg
不溶性

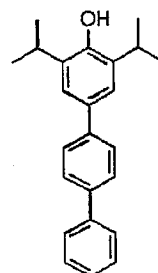
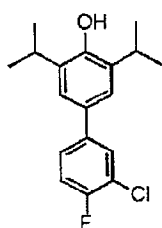
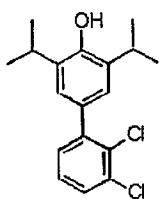
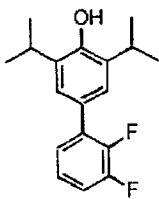
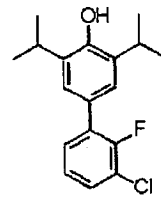
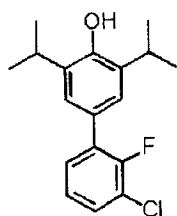
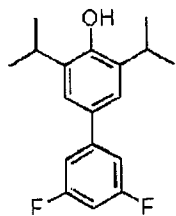
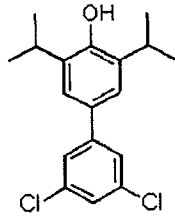
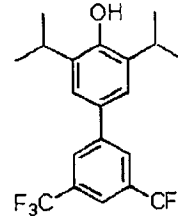
分子量: 272.36

MJ-2-21 210 mg

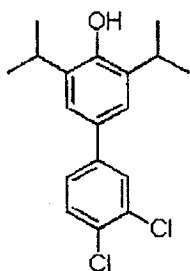


分子量: 338.36

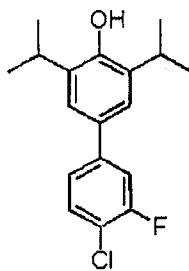
MJ-2-20 205 mg

MJ-2-37 100 mg
不溶性分子量: 306.80
MJ-2-43 160 mg分子量: 323.26
MJ-2-39 170 mg分子量: 290.35
MJ-2-40 290 mg分子量: 306.80
MJ-2-33 570 mg
不溶性MJ-2-33 570 mg
不溶性
分子量: 306.80MJ-2-25 500 mg
分子量: 290.35MJ-2-24 200 mg
分子量: 323.26MJ-2-32 350 mg
分子量: 390.36

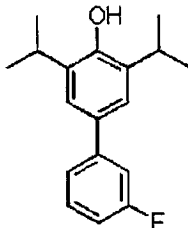
[0201]



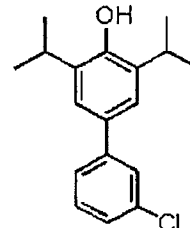
MJ-2-35 120 mg
分子量: 323.26



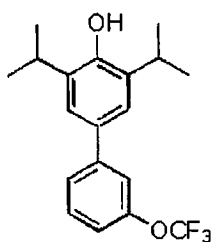
MJ-2-30 380 mg
分子量: 306.80



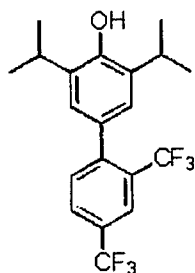
MJ-2-31-160 mg
分子量: 272.36



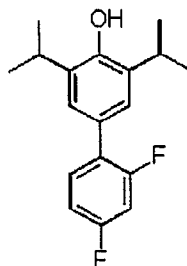
MJ-2-36 350 mg
分子量: 288.81



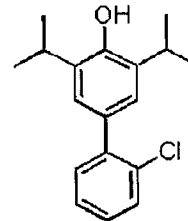
MJ-2-44 230 mg
分子量: 338.36



MJ-2-38 250 mg
分子量: 390.36



MJ-2-34 350 mg
不溶性
分子量: 290.35



MJ-2-23 195 mg
分子量: 288.81

[0202] 化合物功效的测定

[0203] 如下所述进行预实验,以研究本发明丙泊酚类似物有代表性的样品对甘氨酸受体活化和氯离子电流的效果。本领域技术人员可以理解这些数据启示所述类似物适合于用作止痛药。

[0204] 方法

[0205] 细胞培育、转染

[0206] 将大鼠 $\alpha 1$ 甘氨酸受体亚单位短暂转染入转化的人胚肾细胞 (HEK293)。 $\alpha 1$ 甘氨酸受体亚单位有效形成异源表达系统中的同聚受体。在 37°C 在 $5\% \text{CO}_2$ /空气温育箱中在补充了 10% 胎牛血清 (FCS, Biochrom, Berlin, Germany)、 100U ml^{-1} 青霉素和 $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ 链霉素的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (DMEM, Biochrom, Berlin, Germany) 中培养细胞。为了转染,将细胞混悬于包含 $50 \text{mM K}_2\text{HPO}_4$ 和 20mM 乙酸 K、 $\text{pH } 7.35$ 的缓冲液中。为了共转染大鼠 $\alpha 1$ 甘氨酸受体亚单位,将各自亚克隆入 pCIS2 表达载体 (Invitrogen, San Diego, USA) 的相应 cDNA 加入到所述混悬液中。为了显影转染的细胞,将它们于绿色荧光蛋白 cDNA (GFP $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) 一起共转染。为了转染,我们使用 EquiBio (Kent, UK) 的电穿孔装置。将转染的细胞重新在玻璃盖玻片上铺板并且在记录前温育 $15\text{--}24$ 小时。

[0207] 化学品和溶液

[0208] 除非另有记录,否则全部化学品均来自 Sigma Chemicals (Deisenhofen, 德国)。

[0209] 将研究中的本发明的化合物制备成在乙醇中的 1M 储备溶液,避光,贮存在 -20°C 的玻璃容器内。根据注入玻璃小瓶的量计算浓度。将包含药物的小瓶剧烈涡旋 60min 。将甘氨酸和印防己毒素直接溶于浴溶液。

[0210] 膜片电极包含 [mM]KCl 140、MgCl₂ 2、EGTA 11、HEPES 10、葡萄糖 10；浴溶液包含 [mM]NaCl 162、KCl 5.3、NaHPO₄ 0.6、KH₂PO₄ 0.22、HEPES 15、葡萄糖 5.6。

[0211] 实验设置

[0212] 在 -30mV 膜电位进行标准全细胞实验 (Hamill 等人, (1981)PflügersArch., 391, 85-100.)。细胞膜与膜片钳电极之间形成的几 GΩ 的紧密电密封物提供因激动剂 - 诱导的通道活化产生的内向电流以决定 pA 范围。移液管电阻约为 5MΩ, 相当于约 10MΩ 的全细胞结构总通道电阻。将在研究中的本发明的化合物通过连接压电晶体的使用单一流出得到的平滑液丝施加于细胞 (玻璃管 0.15mm 内径)。将细胞置于该丝与恒流本底溶液之间的界面。当将电压脉冲施加于压力器时, 在研究中使管上升和下降或远离细胞。确保细胞相对于液丝的正确定位, 从而在每次测试实验前后施加饱和 (1000uM) 甘氨酸脉冲。谨慎确保甘氨酸活化的电流振幅和形状稳定, 然后继续进行实验。通过相同玻璃 - 聚四氟乙烯灌流系统、但来自单独贮器施加测试溶液和甘氨酸 (1000 μM)。将这些贮器的内含物在连接处混合, 然后即刻进入表面灌流室。

[0213] 施加单独的测试中的化合物, 以测定其直接的拮抗效应。新细胞用于每一化合物和每一方案, 对每一设置而言进行至少三次不同实验。相当于所用最高化合物浓度的稀释剂乙醇的量为 34000 μM。我们预先已经证实乙醇自身在这种浓度下对直接活化没有影响。

[0214] 电流记录和分析

[0215] 为了进行数据采集和进一步分析, 发明人使用 Axopatch 200B 放大器与 pClamp6 软件的组合 (Axon Instruments, Union City, CA, USA)。在 2kHz 过滤电流。使用非线性最小二乘法 Marquardt-Levenberg 算法进行拟合程序。适合的图例或结果部分中提供了详细内容。

[0216] 将活化的电流对其自身最大响应归一化。根据 ($I_{\text{norm}} = [1 + (EC_{50}/[C])^{\text{nH}}]^{-1}$) 拟合剂量 - 响应 - 曲线, 其中 I_{norm} 是相应化合物浓度 [C] 直接诱导的电流, 相对于最大内向电流归一化。EC₅₀ 是引起总计其自身最大响应 50% 响应所需的浓度, nH 是希尔系数。

[0217] 结果

[0218] 来源于希尔方程与 α1 受体中归一化响应的拟合的起始 EC₅₀ 值和希尔系数 (±SD) 如图 1、2 和 3 中所示且举出在下表 1 中。

[0219] 表 1 来源于希尔方程在 α1 受体中归一化的共活化响应 (相对于最高测试浓度的效应而言) 的拟合的 EC₅₀ 值和希尔系数 (+SD)。

[0220]

α_1 同聚体

	EC_{50} (nM)	n_H
4-(对-叔丁基苯基)-丙泊酚(图 1)	0.05 ± 0.03	2.0 ± 0.4
4-(对-氯苯基)-丙泊酚(图 2)	0.2 ± 0.3	1.1 ± 0.5
4-三氟乙酰胺-丙泊酚	0.3	-
4-(间-氟-对-氯苯基)-丙泊酚	0.8	-
4-(对-联苯)-丙泊酚(图 3)	0.8 ± 0.2	2.6 ± 1.2

[0221] 正如表 1 中可以观察到的,全部测试的类似物在纳摩尔范围显示显著的功效。

[0222] 测定上表 1 中所示的 5 种化合物的 EC_{50} 值的另一系列试验显示 2 种化合物显示甚至低于在起始试验中观察到的效力。在后面的试验中,4-三氟乙酰胺-丙泊酚显示 0.11nM 的 EC_{50} 且 4-(间-氟-对-氯苯基)-丙泊酚显示的 0.07nM 的 EC_{50} 。

[0223] 结论

[0224] 在上述实施例中,在一步 Suzuki 反应中由 4-溴-丙泊酚制备高收率的芳基-取代的丙泊酚类似物库。这证实 4-卤代丙泊酚上的 4-卤原子易于被芳香环替代。从最初的筛选数据中显示这种性质的类似物具有纳摩尔、乃至在一些情况中亚纳摩尔的活性。另一个有意义的观察结果在于 4-联苯基团也是可耐受的。尽管发明人不希望受到任何特定理论约束,但是这一观察结果与迄今为止得到的构效关系 (SAR) 数据一起显然可以支持在可以结合亲脂性 / 联苯残基内疏水性通道的存在。

[0225] 三种丙泊酚衍生物在大鼠体内的血浆动力学

[0226] 1. 概述

[0227] 静脉内和口服给药入大鼠后测定 4-氯丙泊酚、4-(对-氯苯基)-丙泊酚和对-(3-氟,4-氯苯基)-丙泊酚的体内血浆动力学。

[0228] 这些化合物一般显示高清除值,但因大体积的分布而延长半衰期。在口服施用后的血浆中观察到 4-氯丙泊酚和对-(3-氟,4-氯苯基)-丙泊酚。快速达到峰值血浆浓度,但终末半衰期比静脉内给药显著增加。因此,在生物利用度评估值中存在一定量的不确定性。

[0229] 2. 材料和方法

[0230] 2.1 化学品、生物材料和温育

[0231] 2.1.1 化学品

[0232] HPLC 级甲醇和乙腈获自 Merck (Darmstadt, Germany)。乙酸铵、甲酸铵、乙酸和甲酸获自 BDH Laboratory Supplies (Poole, UK)。其他化学品主要获自 Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA) 和 Boehringer (Ingelheim, Germany) 并且具有可得到的最高纯度。使用 Milli-Q (Millipore, Espoo, Finland) 纯化系统和 UP 级 (超纯, 18.2MQ) 在室内新鲜制备水。

[0233] 2.1.2 动物实验和样品

[0234] 以 20mg/kg 口服和 2mg/kg 静脉内将测试物质 4-氯丙泊酚、CK-2-3 和 CK-2-9 给药入大鼠。在口服给药后 0min、30min、1h、2h 和 4h 和静脉内给药后 0min、15min、30min、1h 和 2h 的时间点从侧尾静脉采集全血样品以便血浆分离,同时通过心脏穿刺在给药(口服和 Lv.) 后 6h 的时间点采集末端样品。取来自单一大鼠中全部时间点并且一式三份进行全部实验。

[0235] 2.1.3 样品制备

[0236] 在室温融化样品并且通过以 1 : 2 的血浆和乙腈的比例进行蛋白质沉淀制备,以 16100xg 离心 10 分钟 (Eppendorf 5415D, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), 然后注入 UPLC/MS/MS 系统。在空白血浆样品中加入 0.5、2、5、10、20、50、200、500、1000 和 2000ng/ml 分析化合物后,类似地制备标准样品。

[0237] 2.1.4 计算

[0238] 通过 WinNonlin Pro (Pharsight Corp, CA)、使用标准非隔室法计算研究化合物的药代动力学参数。分布容量 (V_d) 基于末期。根据 log 浓度 - 时间曲线的末端线性部分的最小二乘法回归分析计算消除期半衰期 ($t_{1/2}$)。通过使用至多最终可测定的浓度的线性梯形法则、然后通过外推末端消除期至无穷大测定血浆浓度 - 时间曲线 (AUC) 下的面积。将未进行末端外推的血浆浓度 - 时间曲线下的面积报道为 AUC 0-6h。计算代表化合物保持在室内或系统内的平均时间量的平均停留时间 (MRT), 从而将药物浓度外推至无穷。最大血浆浓度 (C_{max}) 和达到 C_{max} 的时间 (t_{max}) 直接来源于血浆浓度数据。通过用口服施用后的 AUC 除以考虑到剂量差异的静脉内施用后的 AUC 计算试验性的口服生物利用度 (F), 即 $F = AUC(\text{口服}) / \text{剂量}(\text{口服}) / AUC(\text{静脉内}) / \text{剂量}(\text{口服})$ 且报道为 (%)。

[0239] 2.2 分析方法

[0240] 2.2.1 液相色谱法 - 质谱法

[0241] 使用带有自动采样器、真空脱气器和柱加热炉的 Waters Acquity 色谱系统 (Waters Corp., Milford, MA, USA)。用于全部化合物的分析柱是 Waters BEH ShieldRP18 (2.1x50mm, 1.7 μ m, Waters Corp, Milford, MA, USA) 与联机操作过滤器。洗脱剂是 0.1% 乙酸 (A, pH 3.2) 和乙腈 (B)。0-2 分钟内使用 5% B-35% B 的梯度洗脱, 2.0-3.0min 内使用 35% B-85% B 的梯度洗脱, 然后使用 80% B 进行 1min 等度洗脱和柱平衡。流速是 0.5ml/min, 柱加热炉温度为 35°C。使用安装 LockSpray 电喷雾电离源的 Micromass Quattro Premier 三元四极质谱仪获取 LC/MS/MS 数据。使用负离子模式电离。使用多重反应监测 (MRM) 模式。在 Micromass MassLynx 4.1 软件下操作质谱仪和 UPLC 系统。完全的 LC/MS/MS 参数如附录 I 中所示。

[0242] 3. 结果和结论

[0243] 3.1 定量分析

[0244] 分析方法的性能 (" 联机验证 ") 如附录 I 中所示。LC/MS/MS 色谱图的实例如附录 II 中所示。

[0245] 对每一化合物获得血浆中 2ng/ml-10ng/ml 的检测 / 定量限。通过拟合作为浓度函数的外标峰面积之比 (不包括起点) 并使用 $1/x$ 加权和线性或二次拟合生成用于定量的校准曲线。校准曲线拟合至多 2000ng/ml 的范围。在定量限和较高浓度处的定量范围内的反算 (backcalculated) 精确度 ($n = 2$) 在 82-119% 之间。根据标准样品 (两次注射 / 浓

度)、使用 Snedecor 方程 $S = (\sum d^2/2n)^{0.5}$ 计算总精确度 12.0-17.0%, 其中 S = 精确度, d 是表示为平均值%的一式两份之差, N 是标准浓度的数量。样品中的每一研究化合物的浓度如附录 IV-VI 中所示。

[0246] 3.2 药代动力学

[0247] 将研究化合物的药代动力学参数概括在下表 2 中且单个动物的参数如下表 3-5 中所示。研究化合物血浆浓度与时间的曲线如图 4-6 中所示。

[0248] 全部化合物显示具有起始分布和最终消除期证据的血浆动力学特性。

[0249] 4-氯丙泊酚与大鼠肝血流相比具有极高的清除值 (55.2ml/min, Davies, B 和 Morris, T, (1993)。Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res 10:1093-5)。尽管清除率高, 但是半衰期因高分布容积而处于中间值。口服生物利用度良好 ($F = 72.4\%$) 且吸收快速 ($T_{max} = 30\text{min}$)。由于药物清除快速, 所以表面上有限的首过提取可以来源于肝代谢饱和, 这是因快速吸收后的门静脉内的高药物浓度所致。清除率与静脉内给药类似, 但半衰期显著增加。药代动力学分析提示分布容积增加是该情况的原因, 但其背后的机制尚不清楚。ADC 计算在一定程度上可能倾向于可以是吸收速率受限的长终末半衰期 (通过口服施用后的 ADC 和 ADC 0-6h 值差异来示例)。因此, 试验性生物利用度应被视为最大值。

[0250] 仅在静脉内施用后检测 4-(对-氯苯基)-丙泊酚。清除在肝血流范围内且半衰期约为 1.5 小时。分布容量十分大 (> 6 升/kg)。低生物利用度的原因可能是吸收差或广泛的首过代谢。

[0251] 对-(3-氟, 4-氯苯基)-丙泊酚在静脉内给药后显示中等程度的清除率和半衰期。试验性口服生物利用度约为 18%。清除率与静脉内清除率类似, 但分布容量远高于静脉内给药后的分布容量。这种行为就 4-氯丙泊酚而言产生类似的结论。ADC 计算在一定程度上可能倾向于可以是吸收速率受限的长终末半衰期 (通过口服施用后的 ADC 和 ADC 0-6h 值差异来示例)。因此, 试验性生物利用度应被视为最大值。

[0252] 表 2. 口服和静脉内施用后研究化合物的药代动力学参数 ($n = 3$)。SE = 标准误差。

[0253]

化合物	参数	i.v		p.o.		F(%)	
		平均值	SE	平均值	SE		
		1 mg/kg*		8 mg/kg*			
4-Cl-丙泊酚	ADC	min*µg/mL	7.39	1.68	42.8	8.78	72.4
	ADC 0-6h	min*µg/mL	6.29	3.18	18.7	5.8	
	c _{max}	µg/mL	0.11	0.03	0.1	0.02	
	t _{max}	min	15	0	30	0	
	t _{1/2}	min	48.8	18.9	398	96.4	

[0254]

	CL/F	mL/min/kg	148	27.8	201	34.3	
	CL	mL/min/kg	148	27.8	146	24.8	
	Vd/F	L/kg	11.8	5.64	110	27.4	
	Vd	L/kg	11.8	5.64	79.6	19.8	
	MRT	min	48.7	16	609	152	
			2 mg/kg		20 mg/kg		
4-(对-Cl-Ph)-	ADC	min*µg/mL	48.6	10.2	N.D.	N.D.	0.0
丙泊酚	ADC 0-6h	min*µg/mL	46.6	17.6	N.D.	N.D.	
	c _{max}	µg/mL	0.55	0.12	N.D.	N.D.	
	t _{max}	min	15	0	N.D.	N.D.	
	t _{1/2}	min	96.8	5.01	N.D.	N.D.	
	CL/F	mL/min/kg	44.4	7.87	N.D.	N.D.	
	CL	mL/min/kg	44.4	7.87	N.D.	N.D.	
	Vd/F	L/kg	6.09	0.83	N.D.	N.D.	
	Vd	L/kg	6.09	0.83	N.D.	N.D.	
	MRT	min	76.3	14.7	N.D.	N.D.	
			2 mg/kg		20 mg/kg		
对-(3-F,4-	ADC	min*µg/mL	69.2	5.72	123	42	17.8
Cl-Ph)-丙泊	ADC 0-6h	min*µg/mL	64.1	6.88	34.6	12.6	
酚							
	c _{max}	µg/mL	0.77	0.17	0.15	0.04	
	t _{max}	min	15	0	30	0	
	t _{1/2}	min	91	5.01	789	185	
	CL/F	mL/min/kg	29.3	2.28	231	103	
	CL	mL/min/kg	29.3	2.28	41.1	18.3	
	Vd/F	L/kg	3.87	0.5	306	195	
	Vd	L/kg	3.87	0.5	54.4	34.7	
	MRT	min	104	19.1	1160	256	

[0255] * 因制备中存在问题分析给药溶液。结果显示实际剂量约为预计剂量的 40% (口服) 和 50% (Lv.)。

[0256] N. D. 口服施用后在血浆中未检测到化合物。

[0257] 表 3. 来自单个动物的 4-Cl- 丙泊酚的 PK- 参数

[0258]

参数		1 mg/kg i.v.*			8 mg/kg p.o. *		
		A4	A5	A6	A1	A2	A3
ADC	min*µg/mL	10.7	5.43	6.01	33.2	34.9	60.4
c _{max}	µg/mL	0.17	0.07	0.09	0.12	0.05	0.12
t _{max}	min	15	15	15	30	30	30
t _{1/2}	min	16.3	81.8	48.2	205	493	496
CL/F	mL/min/kg	93.2	184	166	241	229	133
Vd/F	L/kg	2.19	21.7	11.6	71.3	163	94.7
MRT	min	31.8	80.8	33.6	305	760	764

[0259] * 因制备中存在问题分析给药溶液。结果显示实际剂量约为预计剂量的 40% (口服) 和 50% (Lv.)。

[0260] 表 4. 来自单个动物的 4-(对-Cl-Ph)- 丙泊酚的 PK- 参数

[0261]

参数		2 mg/kg i.v.			20 mg/kg p.o.		
		A7	A8	A9	A10	A11	A12
ADC	min* $\mu\text{g/mL}$	36.3	40.8	68.8	N.D.	N.D.	N.D.
$C_{\max}$	$\mu\text{g/mL}$	0.4	0.46	0.78	N.D.	N.D.	N.D.
$t_{\max}$	min	15	15	15	N.D.	N.D.	N.D.
$t_{1/2}$	min	91.2	92.4	107	N.D.	N.D.	N.D.
CL/F	mL/min/kg	55.1	49.1	29.1	N.D.	N.D.	N.D.
Vd/F	L/kg	7.26	6.54	4.48	N.D.	N.D.	N.D.
MRT	min	91.4	90.5	46.9	N.D.	N.D.	N.D.

[0262] N. D. 口服施用后在血浆中未检测到化合物。

[0263] 表 5 来自单个动物的对-(3F,4-Cl-Ph)-丙泊酚的 PK- 参数

[0264]

参数		2 mg/kg i.v.			20 mg/kg p.o.		
		A16	A17	A18	A13	A14	A15
ADC	min* $\mu\text{g/mL}$	80.4	65.7	61.6	131	46.1	191.0
$C_{\max}$	$\mu\text{g/mL}$	1.1	0.69	0.54	0.21	0.06	0.17
$t_{\max}$	min	15	15	15	30	30	30
$t_{1/2}$	min	81.8	92	99.1	468	1110	788
CL/F	mL/min/kg	24.9	30.4	32.5	153	434	105
Vd/F	L/kg	2.94	4.04	4.64	103	695	119
MRT	min	67.5	114	131	710	1590	1180

[0265] 附录

[0266] 附录 I :分析中的 LC/MS-MS 参数

[0267] Waters Acquity UPLC+Waters QuattFo Premier 三元四极质谱仪

[0268] Waters Acquity BEH ShieldRP18(2.1x50mm,1.8 μm) 柱,具有 quard 滤器

[0269]

去溶剂化气流(L/h) 800

毛细管(V) 2500

去溶剂化温度($^{\circ}\text{C}$) 350

源温度($^{\circ}\text{C}$) 150

CID 压力(mbar) 3.8×10^{-3}

[0270] 每种化合物的 MRM 过渡反应:

[0271]

化合物	MRM 反应	碰撞能 (Ev)	圆锥电压 (V)	保留时间 (min)	极性
CK-1-1	$m/z211>196$	18	48	3.35	ESI-
CK-2-3	$m/z287>236$	28	48	3.56	ESI-
CK-2-9	$m/z305>254$	28	48	3.59	ESI-

[0272] 梯度

[0273] 洗脱剂 A = 0.1% 乙酸 (pH 3.2), B = 乙腈

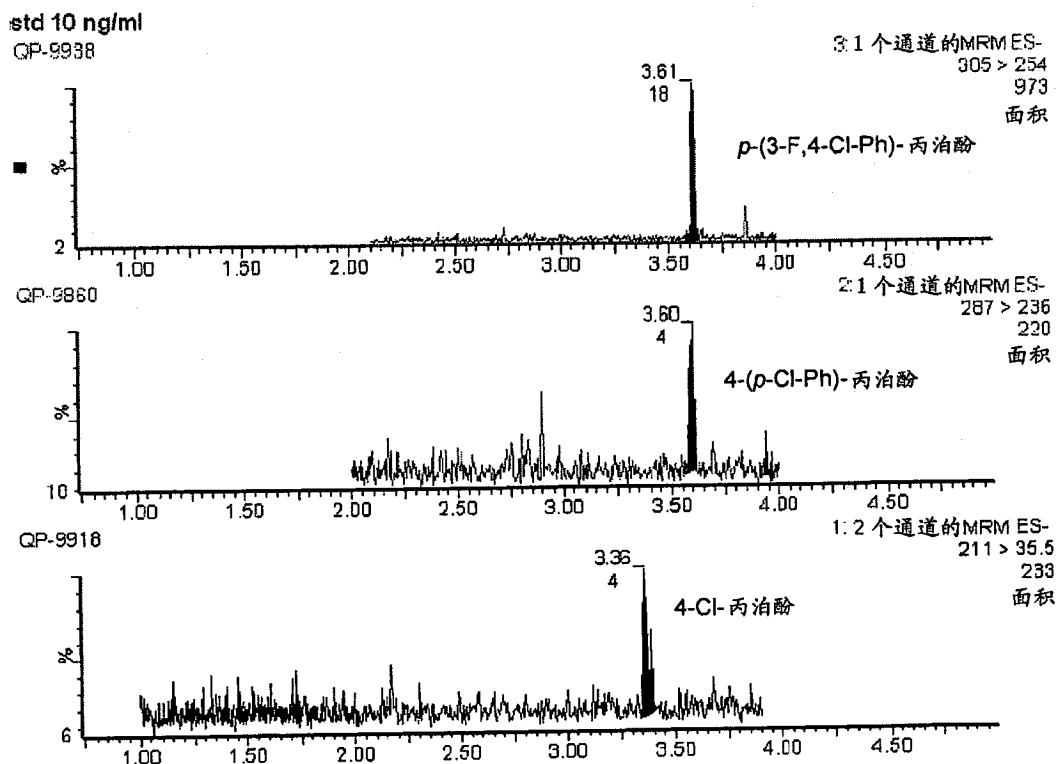
[0274]

时间	流速	A%	B%	曲线
0.00	0.500	95.0	5.0	6
2.00	0.500	65.0	35.0	6
3.00	0.500	15.0	85.0	6
4.00	0.500	15.0	85.0	6
4.10	0.500	95.0	5.0	6
6.00	0.500	95.0	5.0	6

[0275] 附录 II 用于研究化合物的 LC/MS/MS 离子色谱图

[0276] 从加至 10ng/ml 血浆浓度的标准样品获取数据。

[0277]



[0278] 附录 III 分析方法的性能

		精确度, %, n = 2		
		4-Cl-丙泊酚	4-(p-Cl-Ph)-丙泊酚	p-(3-F,4-Cl-Ph)-丙泊酚
[0279]	std 0.5 ng/ml	-	-	-
	std 1 ng/ml	-	-	-
	std 2 ng/ml	-	-	82.3 (LoD/LoQ)
	std 5 ng/ml	44.9 (LoD)	-	100.3
	std 10 ng/ml	102.7 (LoQ)	93.1 (LoD/LoQ)	94.3
	std 20 ng/ml	119.2	116.2	100.4
	std 50 ng/ml	115.1	121.1	114.2
	std 100 ng/ml	114.7	125.0	108.4
	std 200 ng/ml	106.0	89.8	90.4
	std 500 ng/ml	99.1	95.3	-
	std 1000 ng/ml	95.7	100.7	93.9
	std 2000 ng/ml	93.2	99.6	93.1
	Snedecor-精密度	14.4%	17.0%	12.0%
	校准曲线的 R2	0.991	0.962	0.991

[0280] LoD = 检测限

[0281] LoQ = 定量限

[0282] 附录 IV 样品中 4-Cl- 丙泊酚的浓度

[0283] G = 组, A = 动物

[0284]

样品	血浆中的 ng/ml
G1 A1 CK1-1 po 0 min	-
G1 A2 CK1-1 po 0 min	-
G1 A3 CK1-1 po 0 min	-
G1 A1 CK1-1 po 30 min	116
G1 A2 CK1-1 po 30 min	51.0
G1 A3 CK1-1 po 30 min	121
G1 A1 CK1-1 po 1h	99.8
G1 A2 CK1-1 po 1h	47.3
G1 A3 CK1-1 po 1h	57.2
G1 A1 CK1-1 po 2h	64.3
G1 A2 CK1-1 po 2h	25.3
G1 A3 CK1-1 po 2h	52.3
G1 A1 CK1-1 po 4h	61.8
G1 A2 CK1-1 po 4h	36.1
G1 A3 CK1-1 po 4h	55.1
G1 A1 CK1-1 po 6h	33.8
G1 A2 CK1-1 po 6h	32.0
G1 A3 CK1-1 po 6h	55.3
G2 A4 CK1-1 iv 0 min	-
G2 A5 CK1-1 iv 0 min	-
G2 A6 CK1-1 iv 0 min	-
G2 A4 CK1-1 iv 15 min	172
G2 A5 CK1-1 iv 15 min	70.0
G2 A6 CK1-1 iv 15 min	94.3
G2 A4 CK1-1 iv 30 min	47.3
G2 A5 CK1-1 iv 30 min	26.1
G2 A6 CK1-1 iv 30 min	25.4
G2 A4 CK1-1 iv 1h	13.2
G2 A5 CK1-1 iv 1h	15.2
G2 A6 CK1-1 iv 1h	16.5
G2 A4 CK1-1 iv 2h	33.7
G2 A5 CK1-1 iv 2h	11.5
G2 A6 CK1-1 iv 2h	-
G2 A4 CK1-1 iv 6h	-
G2 A5 CK1-1 iv 6h	-
G2 A6 CK1-1 iv 6h	-

[0285] 附录 V 样品中 4-(对-C1-Ph)-丙泊酚的浓度

[0286] G = 组, A = 动物

[0287]

样品	血浆中的 ng/ml
G3 A7 CK2-3 po 0 min	-
G3 A8 CK2-3 po 0 min	-
G3 A9 CK2-3 po 0 min	-
G3 A7 CK2-3 po 30 min	-
G3 A8 CK2-3 po 30 min	-
G3 A9 CK2-3 po 30 min	-
G3 A7 CK2-3 po 1h	-
G3 A8 CK2-3 po 1h	-
G3 A9 CK2-3 po 1h	-
G3 A7 CK2-3 po 2h	-
G3 A8 CK2-3 po 2h	-
G3 A9 CK2-3 po 2h	-
G3 A7 CK2-3 po 4h	-
G3 A8 CK2-3 po 4h	-
G3 A9 CK2-3 po 4h	-
G3 A7 CK2-3 po 6h	-
G3 A8 CK2-3 po 6h	-
G3 A9 CK2-3 po 6h	-
G4 A110 CK2-3 iv 0 min	-
G4 A11 CK2-3 iv 0 min	-
G4 A12 CK2-3 iv 0 min	-
G4 A110 CK2-3 iv 15 min	784
G4 A11 CK2-3 iv 15 min	398
G4 A12 CK2-3 iv 15 min	456
G4 A110 CK2-3 iv 30 min	123
G4 A11 CK2-3 iv 30 min	187
G4 A12 CK2-3 iv 30 min	307
G4 A110 CK2-3 iv 1h	79.7
G4 A11 CK2-3 iv 1h	149
G4 A12 CK2-3 iv 1h	156
G4 A110 CK2-3 iv 2h	63.9
G4 A11 CK2-3 iv 2h	62.4
G4 A12 CK2-3 iv 2h	74.2
G4 A110 CK2-3 iv 6h	13.1
G4 A11 CK2-3 iv 6h	14.6
G4 A12 CK2-3 iv 6h	14.9

[0288] 附录 VI 样品中对 $-(3F, 4-Cl-Ph)-$ 丙泊酚的浓度

[0289] G = 组, A = 动物, * 制备中丢失的样品

样品	血浆中的 ng/ml
G5 A13 CK2-9 po 0 min	-
G5 A14 CK2-9 po 0 min	-
G5 A15 CK2-9 po 0 min	-
G5 A13 CK2-9 po 30 min	213
G5 A14 CK2-9 po 30 min	63.0
G5 A15 CK2-9 po 30 min	172
G5 A13 CK2-9 po 1h	182
G5 A14 CK2-9 po 1h	26.6
G5 A15 CK2-9 po 1h	121
G5 A13 CK2-9 po 2h	134
G5 A14 CK2-9 po 2h	26.2
G5 A15 CK2-9 po 2h	168
G5 A13 CK2-9 po 4h	*
G5 A14 CK2-9 po 4h	21.5
G5 A15 CK2-9 po 4h	97.6
G5 A13 CK2-9 po 6h	121
G5 A14 CK2-9 po 6h	22.9
[0290] G5 A15 CK2-9 po 6h	128
G6 A16 CK2-9 iv 0 min	-
G6 A17 CK2-9 iv 0 min	-
G6 A18 CK2-9 iv 0 min	-
G6 A16 CK2-9 iv 15 min	1100
G6 A17 CK2-9 iv 15 min	689
G6 A18 CK2-9 iv 15 min	535
G6 A16 CK2-9 iv 30 min	444
G6 A17 CK2-9 iv 30 min	499
G6 A18 CK2-9 iv 30 min	513
G6 A16 CK2-9 iv 1h	316
G6 A17 CK2-9 iv 1h	329
G6 A18 CK2-9 iv 1h	297
G6 A16 CK2-9 iv 2h	90.3
G6 A17 CK2-9 iv 2h	74.0
G6 A18 CK2-9 iv 2h	81.3
G6 A16 CK2-9 iv 6h	24.1
G6 A17 CK2-9 iv 6h	44.0
G6 A18 CK2-9 iv 6h	46.6

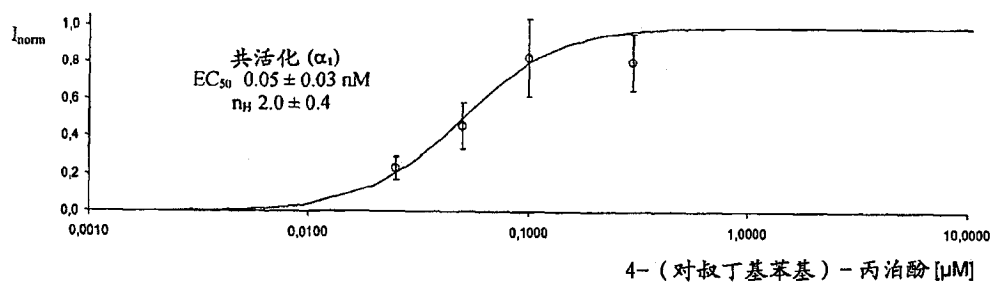


图 1

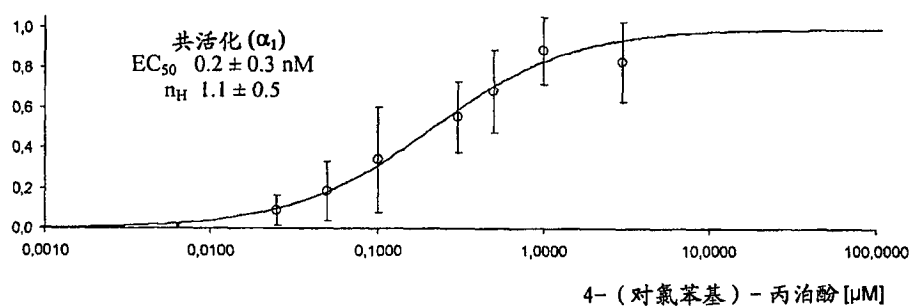


图 2

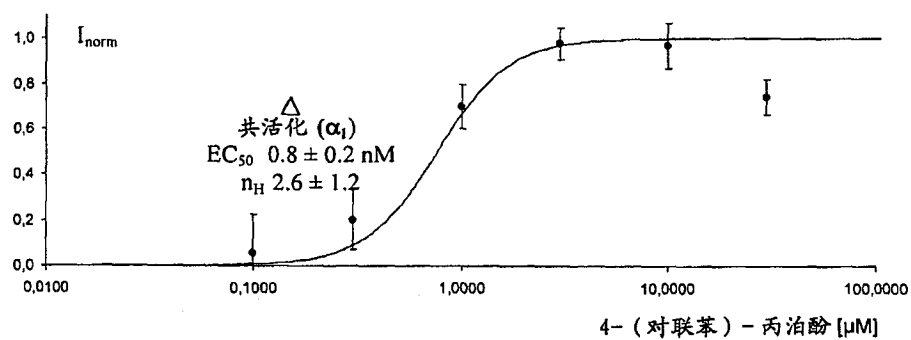


图 3

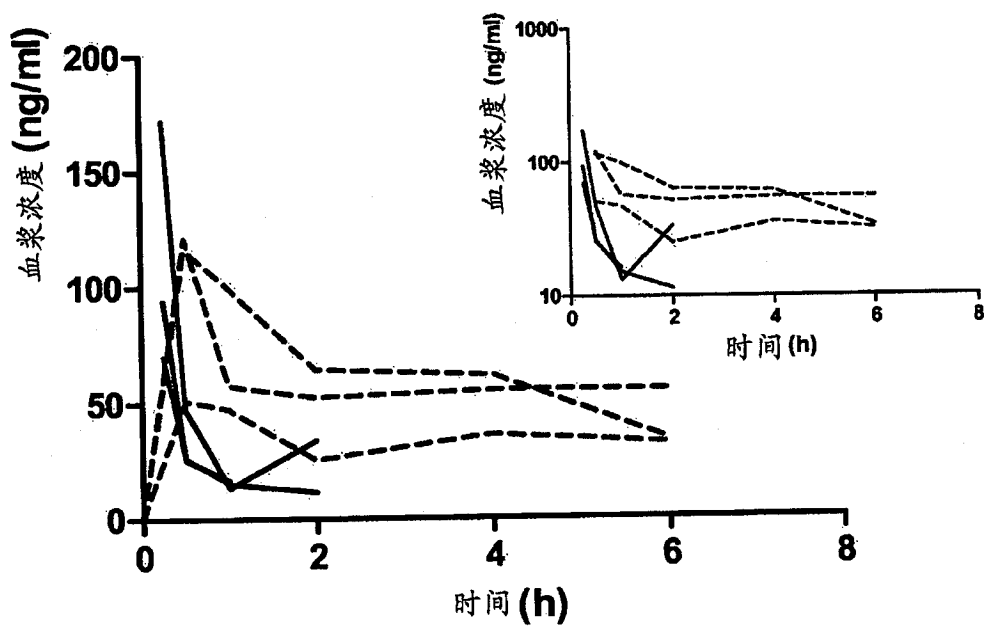


图 4

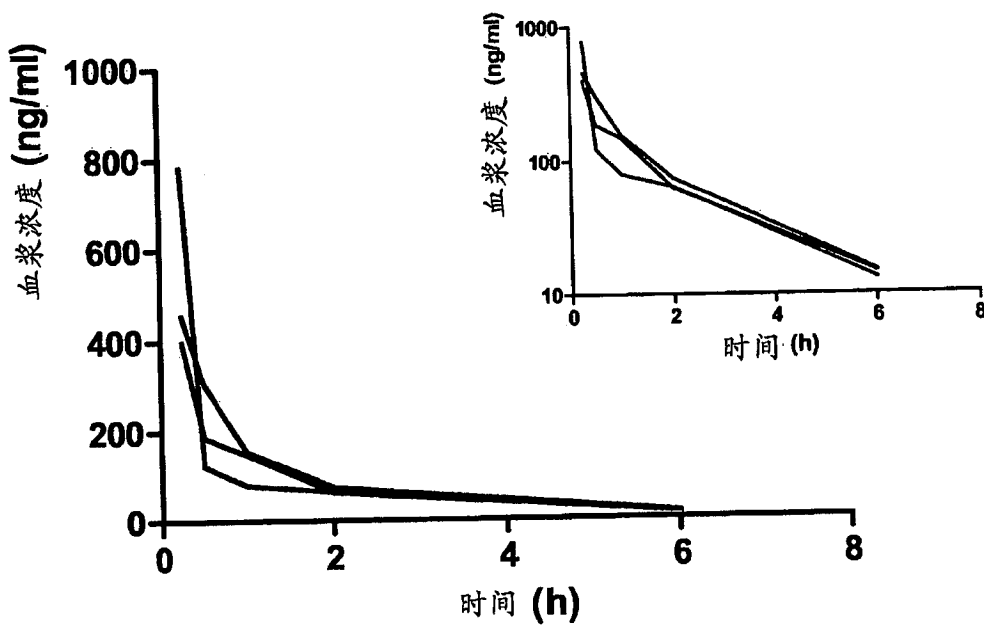


图 5

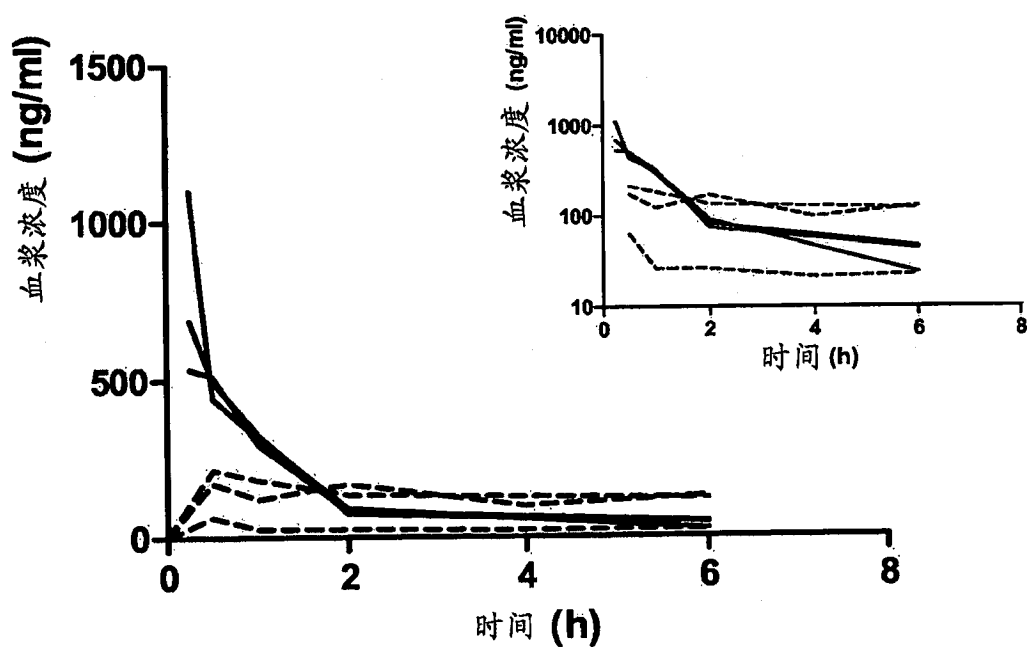


图 6