



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112673014 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 17

(21) 申请号 201980049499.6

(22) 申请日 2019.07.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112673014 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(30) 优先权数据
18185753.3 2018.07.26 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.25

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/069283 2019.07.17

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/020728 EN 2020.01.30

(73) 专利权人 中生医药股份有限公司

地址 中国台湾台北市

(72) 发明人 阿尔贝托·塞里 朱塞佩·比安基
帕特里齐亚·费拉里
玛拉·佛兰迪 保罗·巴拉西

(续)

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 刘慧 金海霞

(51) Int.Cl.

C07J 43/00 (2006.01) (续)

(56) 对比文件

EP 0576915 A2, 1994.01.05 (续)

审查员 曾雪怡

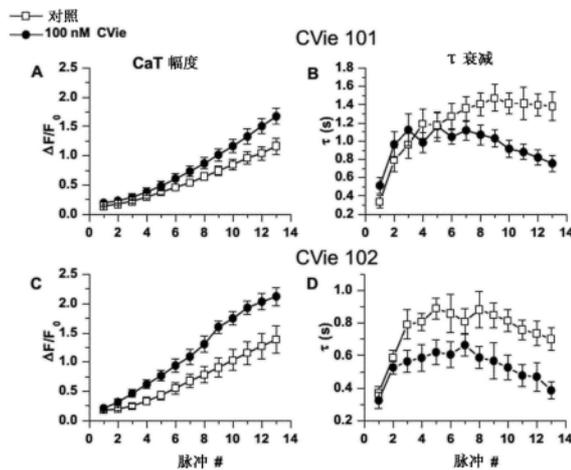
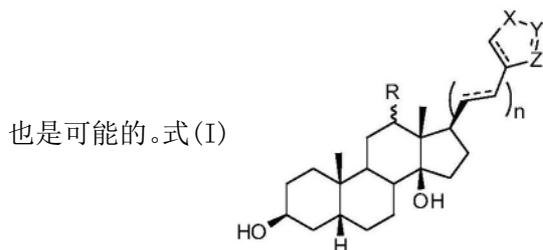
权利要求书3页 说明书50页 附图4页

(54) 发明名称

用于治疗心力衰竭的17β-杂环基-洋地黄类化合物

(57) 摘要

本发明公开了式(I)的化合物,其中X、Y、Z是包含在五元碳环或杂环中的环原子,选自由CH、NH、N、O、S组成的组;所述碳环或杂环任选地被氨基(C₁-C₄)直链或支链烷基或胍或胍基(C₁-C₄)直链或支链烷基取代;条件是所述杂环不是呋喃基;n为0或1;R为H或OH;虚线表示任意的双键C=C;粗线表示β构型的键;波浪线表示α和β构型的键;其对映异构体和/或非对映异构体混合物,其药学上可接受的盐,其溶剂化物、水合物;其代谢物和代谢前体。所述式(I)的化合物用作药物,特别是用于治疗急性或慢性心力衰竭。口服施用



CN 112673014 B

[接上页]

(72) 发明人 安东尼奥·扎扎 马切拉·罗切蒂
卡洛塔·隆奇 徐士哲

(51) Int. Cl.

A61K 31/58 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

C07J 3/00 (2006.01)

C07J 5/00 (2006.01)

C07J 9/00 (2006.01)

C07J 19/00 (2006.01)

C07J 31/00 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

(56) 对比文件

Angel Guzman et al..Replacement of the butenolide moiety of digitoxigenin by cyclic Michael acceptor systems.《Canadian Journal of Chemistry》.1981,59第3241-3247页.

Uttam K. Pati et al..Synthesis of 17 β -(3'-thiophenyl)-5 β -androstane-3 β ,14 β -diol 3-D-glucopyranoside, an anti-inotropic cardiac glucoside.《Steroids》.1990,55第65-68页.

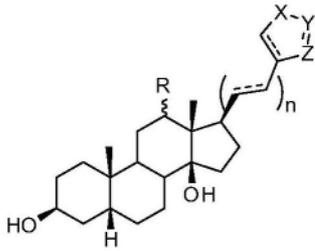
F. Warren Villaescusa et al..Steroids and related natural products. 69. Synthesis of 20(22)-dihydro-23-deoxodigitoxigenin.《J. Org. Chem.》.1972, 37第569-572页.

KLAUCS OURAULCT et al..Partialsynthesenvon Cardenoliden und Cardenolid-Anaogen.XIII.Synthese substituierter14,21-Epoxy-5beta,14beta-card-20(22)-enolide.《Journal f. prakt. Chemie.》.1988,第445-452页.

Alberto Cerri et al..Synthesis, Cardiotoxic Activity, and Structure-Activity Relationships of 17 β -Guanylhydrazone Derivatives of 5 β -Androstane-3 β ,14 β -diol Acting on the Na⁺,K⁺-ATPase Receptor.《J. Med. Chem.》.1997,40第3484-3488页.

Manfred E. Wolff et al..Modified cardenolides. V. Replacement of the C-17 lactone substituent by alkylating groups.《J. Med. Chem.》.1970,13第657-663页.

1. 一种式(I)的化合物



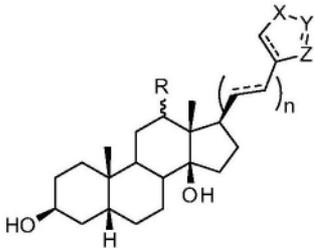
其中X、Y、Z是包含在五元杂环中的环原子,选自由CH、NH、N、O、S组成的组;所述杂环选自咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噁唑基;所述杂环任选地被氨基(C₁-C₄)直链或支链烷基或胍或胍基(C₁-C₄)直链或支链烷基取代;

n为0或1;

R为H或OH;

虚线表示任选的双键C=C;粗线表示β构型的键;波浪线表示α和β构型的键;或者其药学上可接受的盐。

2. 一种式(I)的化合物



其中X、Y、Z是包含在五元杂环中的环原子,选自由CH、NH、N、O、S组成的组;所述杂环任选地被氨基(C₁-C₄)直链或支链烷基或胍或胍基(C₁-C₄)直链或支链烷基取代;

条件是所述杂环不是呋喃基;

n为1,并且在雄甾烷骨架与17β-杂环基环之间存在单键或双键;

R为H或OH;

虚线表示任选的双键C=C;粗线表示β构型的键;波浪线表示α和β构型的键;或者其药学上可接受的盐。

3. 根据权利要求2所述的化合物,其中17β位的杂环基团选自由以下组成的组:咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噁唑基,任选地被氨基(C₁-C₄)直链或支链烷基或胍或胍基(C₁-C₄)直链或支链烷基取代。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的化合物,其中R为BOH。

5. 根据权利要求1所述的化合物,其中符号n为0。

6. 根据权利要求1所述的化合物,所述符号n为1,并且在雄甾烷骨架与17β-杂环基环之间存在单键或双键。

7. 根据权利要求1或2所述的化合物,所述化合物选自由以下组成的组:

3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(咪唑-4-基)雄甾烷;

3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(2-胍基-噻唑-4-基)雄甾烷;

3β-羟基-5β-10β-甲基-12β-羟基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(咪唑-4-基)雄甾烷;

3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-12 β -羟基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -(2-胍基-噻唑-4-基)雄甾烷;

3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -(N-(3-氨基丙基)-咪唑-4-基)雄甾烷;

3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -(吡唑-3-基)雄甾烷;

3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -((5-(3-氨基丙基)-异噁唑-3-基))雄甾烷;

3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -((5-(3-氨基丙基)-异噁唑-3-基)-乙基)雄甾烷;

3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -((5-(2-氨基乙基)-异噁唑-3-基)-乙基)雄甾烷;

3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -((5-(2-氨基甲基)-异噁唑-3-基)-乙烯基)雄甾烷。

8. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中所述药学上可接受的盐选自:氯化物、溴化物、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、草酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐。

9. 一种药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种如权利要求1-8中任一项所述的化合物以及至少一种药学上可接受的媒介物和/或赋形剂。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物,其被配制用于肠内或肠胃外施用或吸入。

11. 根据权利要求10所述的药物组合物,其被配制用于口服施用。

12. 根据权利要求10所述的药物组合物,其被配制用于静脉内或肌内注射。

13. 根据权利要求9-12中任一项所述的药物组合物,其还包含一种或多种其他治疗活性成分。

14. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述其他治疗活性成分选自用于治疗心力衰竭的治疗剂。

15. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述其他治疗活性成分选自:ACE抑制剂、血管紧张素II受体阻滞剂、利尿剂、Ca通道阻滞剂、 β 受体阻滞剂、洋地黄、NO供体、血管扩张剂、SERCA2a刺激剂、中性内肽酶(NEP)抑制剂、肌球蛋白丝激活剂、重组松弛素2介体、重组NP蛋白、可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)激活剂、血管紧张素II受体的 β -抑制蛋白配体。

16. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述其他治疗活性成分选自:呋塞米,布美他尼,托拉塞米,美托拉宗,醛固酮拮抗剂,噻嗪利尿剂,缬沙坦,坎地沙坦,奥美沙坦,替米沙坦,氯沙坦,利诺普利,雷米普利,沙比特利,卡维地洛,美托洛尔,胍屈嗪,胍屈嗪与二硝酸异山梨酯组合,硝酸酯,氨氯地平,非洛地平和非二氢吡啶类血管扩张剂。

17. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述其他治疗活性成分选自:螺内酯,依普利酮,氢氯噻嗪,美托拉宗,氯噻酮,硝酸甘油,硝酸异山梨酯,地尔硫卓和维拉帕米。

18. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述用于治疗心力衰竭的治疗剂选自:地高辛、诺欣妥、奥美替氟、塞拉克辛、乌拉立肽、左西孟旦。

19. 根据权利要求1-8中任一项所述的化合物在制备用于治疗心力衰竭的药物中的用途。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述化合物与一种或多种治疗活性剂组合,所述治疗活性剂选自:ACE抑制剂、血管紧张素II受体阻滞剂、利尿剂、Ca通道阻滞剂、 β 受体阻滞剂、洋地黄、NO供体、血管扩张剂、SERCA2a刺激剂、中性内肽酶(NEP)抑制剂、肌球蛋白丝激活剂、重组松弛素2介体、重组NP蛋白、可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)激活剂、血管紧张素II受体的 β -抑制蛋白配体。

21. 根据权利要求19所述的用途,其中所述化合物与一种或多种治疗活性剂组合,所述治疗活性剂选自:呋塞米,布美他尼,托拉塞米,美托拉宗,醛固酮拮抗剂,噻嗪利尿剂,缬沙坦,坎地沙坦,奥美沙坦,替米沙坦,氯沙坦,利诺普利,雷米普利,沙比特利,卡维地洛,美托洛尔,胍屈嗪,胍屈嗪与二硝酸异山梨酯组合,硝酸酯,氨氯地平,非洛地平和非二氢吡啶类血管扩张剂。

22. 根据权利要求19所述的用途,其中所述化合物与一种或多种治疗活性剂组合,所述治疗活性剂选自:螺内酯,依普利酮,氢氯噻嗪,美托拉宗,氯噻酮,硝酸甘油,硝酸异山梨酯,地尔硫卓和维拉帕米。

23. 根据权利要求19所述的用途,其中所述化合物与一种或多种治疗活性剂组合,所述治疗活性剂选自:地高辛、诺欣妥、奥美替氟、塞拉克辛、乌拉立肽、左西孟旦。

用于治疗心力衰竭的17β-杂环基-洋地黄类化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及药物领域,特别是涉及17β-杂环基-洋地黄类化合物及其用于治疗心力衰竭的用途。

背景技术

[0002] 心力衰竭(HF)的发病率与年龄有关,范围从60岁以下人群中不到2%到75岁以上人群中超过10%(Metra M,Teerlink JR Lancet 2017;390:1981-1995)。大多数HF患者都有高血压、冠状动脉疾病、心肌病、或瓣膜病、或这些病症组合的病史(Metra M,Teerlink JR Lancet 2017;390:1981-1995)。预计所计算出的患上HF的终生风险会增加,而患有高血压的人则处于较高风险中(Lloyd-Jones DM等,Circulation 2002;106:3068-3072)。HF患者的预后差,住院率和死亡率高。

[0003] HF的临床症状是由心脏双重病理特征引起的,所述特征包括肌力异常,导致收缩期排空减弱(收缩功能障碍)和顺应性异常,其中心室从静脉系统吸血的能力受损(舒张功能障碍),从而减少可用于收缩期收缩的血液量(即左心室(LV)充盈受损)。收缩性和松弛性受损是细胞内Ca²⁺分布异常的结果,这是由细胞内Ca²⁺存储的肌浆网(SR)摄取的Ca²⁺减少引起的(Bers D等,Ann N.Y. Acad Sci 2006,1080:165-177)。后者是通过SR膜的Ca²⁺-ATP酶(SERCA2a)进行操作的,一种主动的膜转运。SERCA2a活性在生理上受到其与受磷蛋白(phospholamban,PLN)相互作用的限制(Bers DM.Annu Rev Physiol 2008,70:23-49; MacLennan DH,Kranias EG.Nat Rev Mol Cell Biol 2003,4(7):566-577);这种限制通常通过蛋白激酶A(PKA)的PLN磷酸化来减轻,该信号通路由于HF重塑而被严重抑制(Lohse M等,Circ Res 2003,93:896-906)。因此,SERCA2a功能在衰竭的心肌中受损(Bers D等,Ann N.Y. Acad Sci 2006,1080:165-177),并且这主要造成SR的Ca²⁺摄取减少。除了对心肌细胞的收缩性和松弛性产生影响外,异常的Ca²⁺分布也促进心律失常(Zaza和Rocchetti,Curr Pharm Des 2015,21:1053-1061),并且从长远来看,它加速由细胞凋亡导致的心肌细胞损失(Nakayama H等,J Clin Invest 2007,117:2431-44)。降低的SERCA2a功能还增加了收缩的能量成本,因为它需要通过Na-Ca交换体(NCX)补偿性增加Ca²⁺压出,其能量效率较差(Lipskaya L等,2010Expert Opin Biol Ther 2010;10:29-41)。大量证据表明SERCA2a功能的正常化可恢复细胞内Ca²⁺稳态,并改善心肌细胞和心脏原位的收缩性和松弛性(Byrne MJ等,Gene Therapy 2008,15:1550-1557;Sato等,JBC 2001,276:9392-99)。总之,在HF中SERCA2a功能的恢复可以改善心脏松弛性和收缩性,同时使心律失常、心肌耗氧量和心肌细胞死亡最小化(Lipskaia L等,Expert Opin Biol Ther.2010;10:29-41)。如果Na,K泵抑制与SERCA2a激活同时进行,则可以进一步增加细胞内Ca²⁺含量,而不会引起过多的胞质Ca²⁺积累。因此,Na,K-ATP酶抑制和SERCA2a刺激的组合可以提供进一步的正性肌力,降低心律失常性Ca²⁺释放事件的风险。能够将SR SERCA2a的增强与Na,K泵的抑制相结合的新型分子可能能够改善收缩和舒张功能,并改善HF中的舒张-肌力(luso-inotropic)性能。这为寻找新的舒张-肌力药提供了强大的动力,这些药剂使促心律失常作用降至最低,并且比能够抑

制Na,K泵但缺乏SERCA2a刺激活性的地高辛(Digoxin)具有更高的安全性。

[0004] 当前的HF长期治疗的重点是预防“心肌重塑”(β受体阻滞剂、ACE抑制剂、醛固酮拮抗剂),这是对收缩性降低的慢性适应不良反应,这会放大初始损伤并成为疾病发展的基础(Heineke J和Molkentin D Nat Rev 2006,7:589-600)。尽管这种方法具有无可争议的优点,但它并没有针对受损的“收缩性”和“松弛性”,而这些才是限定HF并导致其症状的功能紊乱。实际上,特别是在疾病晚期,增加心肌收缩性/松弛性的药物(“肌力/舒张药”)仍被广泛使用,并且对患者的管理至关重要(Metra M,Teerlink JR Lancet 2017,390:1981-1995)。这些包括拟交感神经胺(多巴酚丁胺)和左西孟旦(levosimendan)(一种具有强血管扩张作用的Ca²⁺敏化剂)。不幸的是,这些药剂通过具有潜在有害成分的机制起作用,例如促进危及生命的心律失常,心肌耗氧量增加以及由于血管扩张引起的血压下降导致已经不足的冠状动脉血流受损(Ashkar H,Makaryus AN StatPearls.Treasure Island(FL):StatPearls Publishing,2018年1月-2017年12月19日(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470431/>);Gong B.等,JCardiothorac Vasc Anesth 2015,29:1415-25;EDITORIAL)。这将肌力药的使用限制在疾病晚期,从而失去了在疾病过程早期增加收缩性的潜在益处。此外,这些药剂并不改善患者的预后和存活率,并且必须仔细监测其治疗使用(Ashkar H,Makaryus AN StatPearls.Treasure Island(FL):StatPearls Publishing,2018年1月-.2017年12月19日;Gong B.等,J Cardiothorac Vasc Anesth 2015,29:1415-25;EDITORIAL)。

[0005] 在正性肌力药中,心脏用糖苷地高辛是一种Na,K-ATP酶的酶活性的抑制剂,它在过去一直是最常用的处方药之一。但是,由于难以维持地高辛的血清浓度范围(0.5-0.7ng/ml)(在该浓度下地高辛显示其有益作用)而不达到阈值水平0.9ng/ml(高于该水平则观察到主要由心律失常导致的死亡风险增加),在过去几十年中,地高辛的使用一直在减少(Packer M Journal of Cardiac Failure 2016,22:726-730;Packer M Eur J Heart Failure 2018;20:851-852)。

[0006] 用于开发具有不同于正性肌力的作用机理的HF药物的深入研究也正在进行中。这其中,研究最多并且正在临床开发中的药剂包括:塞拉克辛(SERELAXIN),重组松弛素2介体;ULARITIDE,重组利钠肽;奥美替氟(OMECANTIV)MECARBIL,心肌肌球蛋白激活剂;BMS986231,NO供体;ADRECIZUMAB,肾上腺髓质素抑制剂;ANX-042,NP的剪接变体;TD1439,中性内肽酶(NEP)抑制剂。然而,当在2-3期临床试验中进行评估时,这些新药均未达到主要终点。

[0007] 慢性心力衰竭(CHF)患者在一次急性心力衰竭(AHFS)发作后的临床病程和预后要差得多(Solomon SD等,Circulation 2007;116:1482-87)。AHFS可以定义为心力衰竭的症状和体征的新发作或复发,需要紧急评估和治疗,并导致计划外的护理或住院。一半的AHFS患者的收缩功能(HFrEF)降低,这代表着潜在的未来治疗目标(Braunwald E.Lancet2015,385:812-24)。对于射血分数降低的患者,AHFS的治疗重点在于用血管扩张剂、利尿剂或超滤缓解充血,或用正性肌力药增加心输出量。尽管这种治疗策略降低了心脏猝死的风险,但因AHFS住院的患者的出院后事件发生率仍然高得令人无法接受。可用的疗法可能引起许多不良的心血管副作用,例如:因肌力药疗法而导致的心肌缺血、心脏损伤和心律失常,特别是在冠心病(CAD)患者中(Abraham WT等,J Am Coll Cardiol 2005,46:57-64;Flaherty

JD等, *J Am Coll Cardiol*.2009,53(3):254-63);由血管扩张剂引起的低血压和外周器官(肾脏)低灌注,特别是在具有低血压的HF患者中。因此,住院期间的主要目标是在不引起心脏和/或肾脏损伤的情况下改善心输出量。此外,在其余50%的具有HF但射血分数(EF)保持不变的患者中,几乎没有重点检查或治疗受损的左心室(LV)舒张松弛,这是造成HF症状的原因。此外,在EF降低的AHFS患者中,心室舒张功能障碍也导致整体心脏功能衰竭。已开发出多种超声心动图指标来测量动物模型和HF患者中的心脏舒张能力(例如,二尖瓣早期环形组织速度[e']降低和二尖瓣早期流入[E]减速时间[DT]降低),以及增加的LV充盈压的超声心动图参数(例如E/e'比值)。即使在一些动物模型和患者中单指标变化的对应关系不能完全重叠,但它们在心室舒张功能障碍动物模型中的整体变化无疑可以推移到人类疾患,并用于研究AHFS中的药物作用(Shah SA等, *Am Heart J* 2009,157:1035-41)。

[0008] 最近已经研究了增加SERCA2a功能的各种治疗方法。这些包括通过基因转移引起的SERCA2a过表达(Byrne等, *Gene Therapy* 2008,15:1550-1557),或通过表达具有负优势的突变体使PLN失活(Hoshijima M等, *Nat. Med.*2002;8:864-871;Iwanaga Y等, *J Clin Investig* 2004;113,727-736),AdV-shRNA(Suckau L等, *Circulation* 2009,119:1241-1252),microRNA(Gröbbl等, *PLoS One* 2014,9:e92188)或抗体(Kaye DM等, *J. Am. Coll. Cardiol.*2007,50:253-260)。正如在HF中应用SERCA2a基因递送的最大2b期临床试验的阴性结果(CUPID 2)所强调的那样,这些方法在构建体递送(病毒载体等)和剂量调整方面存在重大问题,这些问题远未解决(Hulot JS *Eur Heart J* 2016;19:1534-1541)。最近已经描述了在结构上不同于伊司他肱(istaroxime)的抑制PLN的小分子(吡啶酮衍生物)(Kaneko M.等, *Eur J Pharmacol* 2017;814:1-7)。

[0009] 因此,开发小分子SERCA2a激活剂将有利于治疗HF,并且仍然代表着非常有前途的策略。

[0010] 伊司他肱(Istaroxime)是一种正在临床开发的用于治疗AHFS的新的的小分子药物,该药物具有在激活SERCA2a(Rocchetti M等, *J Pharmacol Exp Ther* 2005,313:207-15)的同时抑制Na⁺/K⁺泵(Micheletti等, *J Pharmacol Exp Ther* 2002,303:592-600)的双重作用机制。在相同的肌力水平下,伊司他肱的促心律失常作用显著低于纯粹的Na⁺/K⁺泵抑制剂地高辛(Rocchetti M等, *J Pharmacol Exp Ther.*2005;313:207-15)。这表明,通过改善从细胞溶质中清除Ca²⁺(Alemanni *J Mol Cell Cardiol*2011;50:910-8),SERCA2a刺激还可以使Na⁺/K⁺泵阻滞的促心律失常作用降至最低(Rocchetti M等, *J Pharmacol Exp Ther* 2005,313:207-15;Zaza和Rocchetti, *Curr Parm Des* 2015:21:1053-1061),同时保持其肌力作用。在临床研究中已经证实了伊司他肱降低促心律失常作用(Georghiad M等, *J Am Coll Cardiol* 2008,51:2276-85)。

[0011] 在HF患者中,伊司他肱输注可改善收缩功能和舒张功能。随着收缩组织速度(S')和收缩末期弹性斜率(ESPVR斜率)的增加,检测到收缩功能的改善;通过舒张期组织速度(E')的增加和舒张末期弹性(EDPVR斜率)的降低揭示了舒张期顺应性的增加(Shah SA等, *Am Heart J* 2009;157:1035-41)。尽管具有优异的药效学概况,但伊司他肱由于其胃肠道吸收不良,清除率高并且含有潜在的遗传毒性部分(肱),因此不适合长期施用;因此,已经开发出该药剂仅用于住院的AHFS患者的静脉内输注(Dec GW *J Am Coll Cardiol* 2008,51:2286-88;Shah SA等, *Am Heart J* 2009,157:1035-41)。

[0012] 伊司他肱公开于EP0825197和S.De Munari等, J. Med. Chem. 2003, 64, 3644-3654中, 并且是化合物(3Z, 5 α)-3-[(2-氨基乙氧基)亚氨基]雄甾烷-6, 17-二酮。

[0013] 伊司他肱尽管在治疗心力衰竭中具有良好的作用, 但仍然没有完全消除缺点。

[0014] 所述分子的氨基乙氧基亚氨基部分经历代谢转化, 这可以导致可能的遗传毒性。

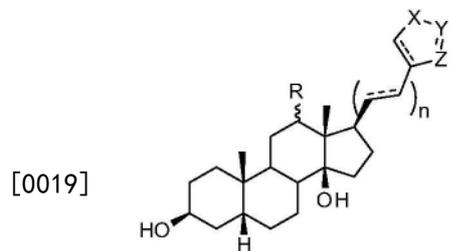
[0015] 此外, 伊司他肱仅通过静脉内施用才具有活性, 因此, 它只能在医院和相关环境中施用。伊司他肱施用需要训练有素的医务人员并且不适合长期治疗。

[0016] 因此, 迫切需要一种具有正性肌力作用和正性舒张作用的治疗心力衰竭的化合物, 其没有遗传毒性, 并且可以优选通过口服途径施用。

[0017] 本发明满足了上述需求并克服了现有技术的问题。

发明内容

[0018] 现已发现式(I)的17 β -杂环基-洋地黄类化合物



(I)

[0020] 其中X、Y、Z是包含在五元碳环或杂环中的环原子, 选自由CH、NH、N、O、S组成的组; 所述碳环或杂环任选地被氨基(C₁-C₄)直链或支链烷基或胍或胍基(C₁-C₄)直链或支链烷基取代;

[0021] 条件是所述杂环不是咪唑基;

[0022] n为0或1;

[0023] R为H或OH;

[0024] 虚线表示任意的双键C=C; 粗线表示 β 构型的键; 波浪线表示 α 和 β 构型的键;

[0025] 其对映异构体和/或非对映异构体混合物, 其药学上可接受的盐, 其溶剂化物、水合物; 其代谢物和代谢前体。

[0026] 在本发明的上下文中, 代谢物和代谢前体是指活性代谢物和代谢前体, 即已经通过代谢反应转化但基本上保持或增加了药理活性的式(I)化合物。

[0027] 代谢物或代谢前体的实例是式(I)化合物的羟基化、羧基化、磺化、糖基化、糖醛酸化、甲基化或脱甲基化的氧化或还原衍生物。

[0028] 一些式(I)化合物也可以是活性形式的前药。

[0029] 当式(I)化合物可以显示互变异构时, 所述式意在涵盖所有互变异构体; 本发明在其范围内包括所有可能的立体异构体、Z和E异构体、旋光异构体、对映异构体及其混合物。

[0030] 药学上可接受的盐也包括在本发明的范围内。药学上可接受的盐是保留碱性化合物的生物活性的盐, 并且衍生自此类已知的药学上可接受的酸, 例如, 盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸、富马酸、琥珀酸、草酸、苹果酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸、甲磺酸或苯甲酸和本领

域中常用的其他酸,参见例如Pharmaceutical Salts and Co-crystals,编辑:Johan Wouters,Luc Quéré,RSC Publishing。

[0031] C_1 - C_4 烷基可以是支链或直链或环状基团,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、甲基环丙基或环丁基。

[0032] 一些式(I)化合物也可以是活性形式的前药。

[0033] 本发明的另一个目的是所述通式(I)的化合物用作药物,特别是用于治疗心力衰竭。

[0034] 本发明的另一个目的是药物组合物,其包含一种或多种式(I)化合物,任选地与其他治疗活性成分组合。

[0035] 现在还将通过实施例和附图详细公开本发明的上述和其他目的。

附图说明

[0036] 图1显示了CVie 101和CVie 102对SR Ca^{2+} 摄取的影响。数据点为平均值 \pm SE。CVie 101(A-B)和CVie 102(C-D)对CaT衰减的 Ca^{2+} 瞬态(CaT)幅度和时间常数(τ)的影响。根据双因素ANOVA, CVie 101或CVie 102与CTRL曲线之间的差异是统计学显著的($p < 0.05$)。在所有方案中,对于CVie 101, $N \geq 13$,并且对于CVie 102, $N \geq 11$ 。

[0037] 图2显示了CVie 101在各种刺激速率(Hz)下对动作电位(AP)特征的影响。A)舒张膜电位($E_{舒张}$);B)最大动作电位上升速度(dV/dt_{max});C)在90%、50%和20%复极化下的动作电位持续时间(APD);D)在刺激速率逐步增加后,APD适应的时间常数(τ)。CTRL=对照。CTRL $N=12$;CVie 101 $N=14$ 。对于所有参数,CTRL与CVie之间的差异在统计学上并不显著。

[0038] 图3显示了CVie 101对APD短期变异性(STV)对于平均APD的依赖性的影响。A-D)在稳态刺激期间在4种速率(Hz)下绘制的STV作为平均 APD_{90} 的函数;实线是数据点的线性拟合;E)将所有刺激速率下的STV值合并。CTRL=对照。CTRL $N=10$,CVie 101 $N=11$ 。

[0039] 图4显示了CVie 101在大鼠中的生物利用度。

具体实施方式

[0040] 在本发明的含义内,式(I)的位置17 β 中的五元碳环残基选自环戊二烯基、环戊烯基、环戊基。

[0041] 在本发明的含义内,式(I)中的五元杂环残基选自吡咯基、噁吩基、吡唑基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、二氧戊环基、二硫杂环戊烷基、三唑基、噁二唑基、噻二唑基、二噁唑基、二噻唑基、四唑基、二硫杂环戊烷基、二氧戊环基、二氧杂环戊烯基、噻唑基、异噻唑基及其所有氢化或部分氢化的衍生物。杂环基团可以具有芳族或非芳族特性,并且可以通过环上的任何可用位置结合至17位。

[0042] 在本发明的含义内,式(I)中的 C_1 - C_4 烷基是指支链或直链或环状基团,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、甲基环丙基或环丁基。

[0043] 在本发明的含义内,药学上可接受的盐是保留或改善式(I)化合物的生物学活性或药代动力学的盐,并且其衍生自己知的药学上可接受的酸。

[0044] 根据本发明的第一优选实施方式,式(I)的化合物是其中符号n为0的那些。

[0045] 根据本发明的第二优选实施方式,式(I)的化合物是其中17 β 位的杂环基团选自自由

咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噁唑基、相应的二氢和四氢衍生物组成的组的那些化合物。

[0046] 根据本发明的第三优选实施方式,式(I)的化合物是其中杂环基团选自咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噁唑基组成的组并被氨基(C₁-C₄)直链或支链的烷基或胍取代的那些化合物。

[0047] 根据本发明的第四优选实施方式,式(I)的化合物是其中R为βOH的那些化合物。

[0048] 根据本发明的第五优选实施方式,式(I)的化合物是其中符号n为1并且存在双键的那些化合物。

[0049] 根据本发明的第六优选实施方式,式(I)的化合物是其中符号n为1并且存在单键的那些化合物。

[0050] 根据本发明的一个优选实施方式,式(I)的化合物选自以下组成的组:

[0051] 3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(咪唑-4-基)雄甾烷;

[0052] 3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(2-胍基-噻唑-4-基)雄甾烷;

[0053] 3β-羟基-5β-10β-甲基-12β-羟基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(咪唑-4-基)雄甾烷;

[0054] 3β-羟基-5β-10β-甲基-12β-羟基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(2-胍基-噻唑-4-基)雄甾烷;

[0055] 3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(N-(3-氨基丙基)-咪唑-4-基)雄甾烷;

[0056] 3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(吡唑-3-基)雄甾烷;

[0057] 3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-((5-(3-氨基丙基)-异噁唑-3-基))雄甾烷;

[0058] 3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-((5-(3-氨基丙基)-异噁唑-3-基)-乙基)雄甾烷;

[0059] 3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(5-(2-氨基乙基)-异噁唑-3-基)-乙基)雄甾烷;

[0060] 3β-羟基-5β-10β-甲基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(5-(2-氨基甲基)-异噁唑-3-基)-乙烯基)雄甾烷;

[0061] 本发明还提供了制备通式(I)的化合物的方法。

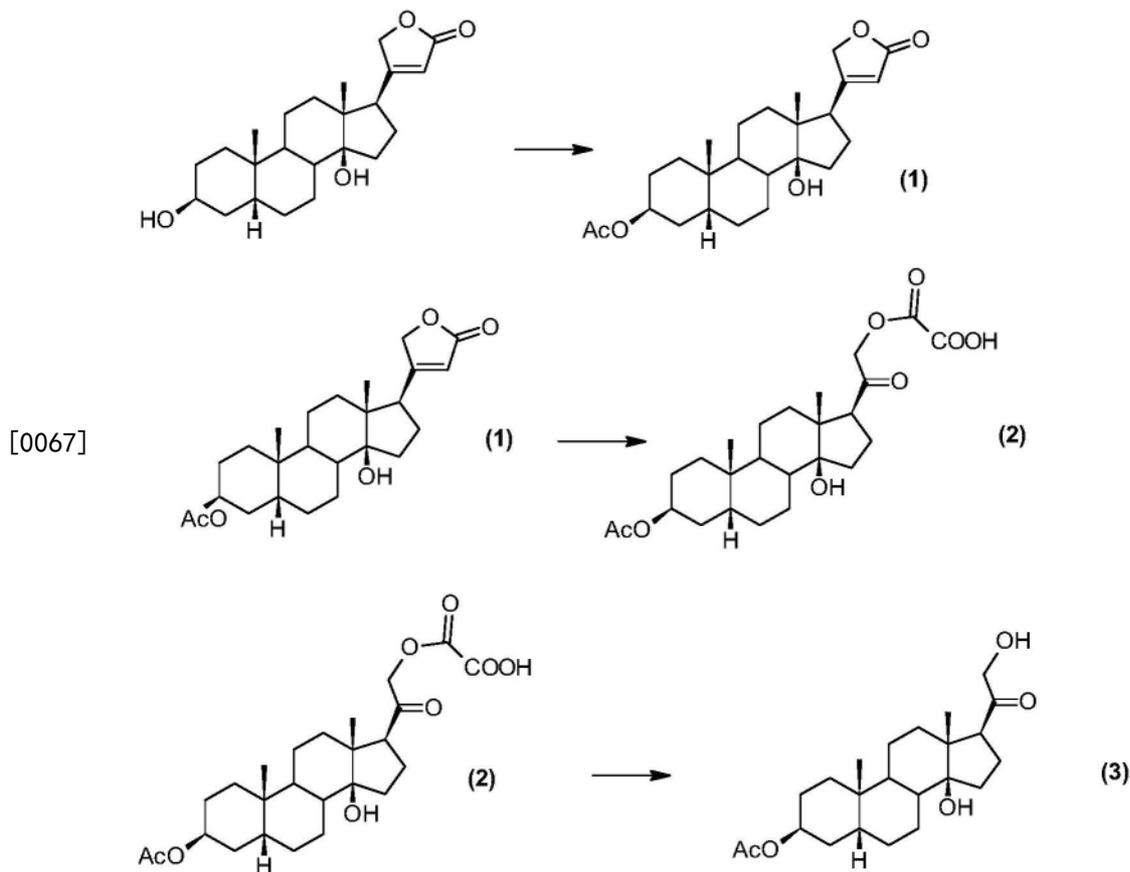
[0062] 本发明的另一个目的涉及药物组合剂和制剂及其在治疗、改善、逆转、或消除或减轻急性或慢性心力衰竭的症状或预防急性或慢性心力衰竭中的用途。由于有缺陷的细胞内Ca²⁺分布在心肌重塑过程中起作用,因此通过SERCA2a刺激对其进行纠正可能会抵消所述作用。因此,可以防止收缩性的初始和补偿性失调向明显心力衰竭的发展。

[0063] 制备式(I)化合物

[0064] 通常,从洋地黄毒苷(digitoxigenin)起始制备其中R为H的式(I)化合物,而从异羟基洋地黄毒苷(digoxigenin)起始制备其中R为β-OH的式(I)化合物。

[0065] 洋地黄毒苷和异羟基洋地黄毒苷都是商业产品,或者可以根据众所周知的方法制备。例如,异羟基洋地黄毒苷可以从地高辛起始制备。

[0066] 其中R为H的式(I)化合物可以从洋地黄毒苷起始制备,得到中间体(3)。



[0068] 用合适的反应物处理洋地黄毒苷以保护3位的羟基。合适的保护基是本领域众所周知的,例如,3-OH可以通过酰化例如乙酰化来保护,这是常规反应。例如,可以优选在惰性气氛中,例如在氩气气氛下,在有机溶剂中,优选在含氮溶剂例如吡啶中,使洋地黄毒苷与乙酸酐反应。优选地,使用酯化催化剂,例如4-二甲基氨基吡啶(DMAP)或其他常规催化剂。控制反应温度,并且反应优选在室温下进行足以使反应完成的时间。此后,优选通过在减压下蒸发(可以与其他溶剂共蒸发)除去溶剂。根据众所周知的方法进行反应的后处理,例如将残余物用水处理并在室温下放置适宜时间。可以例如通过过滤收集所得固体,用水洗涤并干燥,优选真空干燥。所得产物(1)无需进一步纯化即可用于后续步骤。

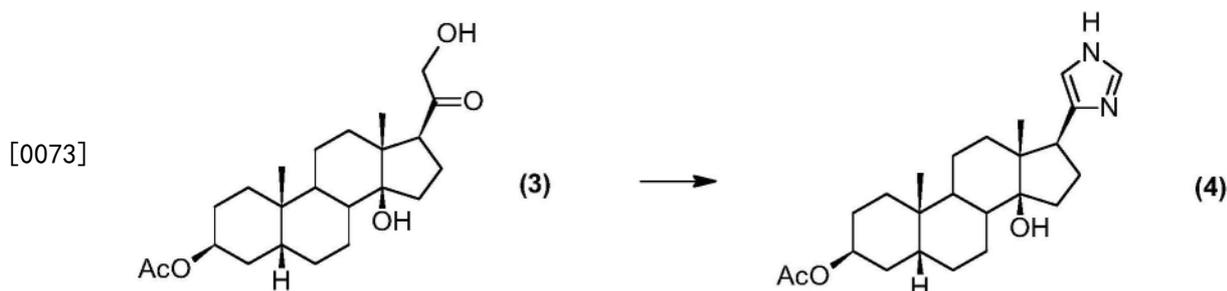
[0069] 然后使中间体(1)进行氧化反应以在17位打开内酯环,得到中间体(2)。这种反应对于技术人员是众所周知的,并且可以在技术文献中找到。举例来说,将中间体(2)溶解在有机溶剂例如丙酮中,并加入氧化剂。例如,纵使也可以使用其他已知的试剂,但 NaIO_4 和 RuO_2 水合物在水中的溶液是适宜的。如果需要,可以进一步添加氧化剂。反应温度没有限制并且可以根据氧化剂的性质确定。一旦氧化反应完成,则根据众所周知的方法将任何过量的氧化剂淬灭。例如,当使用 NaIO_4 和 RuO_2 水合物体系时,异丙醇可以用作淬灭剂。从反应混合物中分离出任何固体,例如通过过滤,优选通过蒸发,适宜地在减压下蒸发来缩减反应体积,并用合适的溶剂例如乙酸乙酯(AcOEt)萃取残余物。然后将有机相洗涤,优选用盐水洗涤,然后以常规方式干燥,例如用 MgSO_4 干燥,必要时过滤并除去溶剂,例如在真空下除去溶剂。中间体(2)无需任何进一步纯化即可用于后续步骤。

[0070] 中间体(3)是通过在温和条件下将溶解在合适溶剂中(例如溶解在醇如甲醇中)的化合物(2)用例如 KHC_3O_3 水溶液水解足以在17位恢复伯醇的时间而获得的。然后优选在减压

下除去有机溶剂,并将残余物用溶剂例如二氯甲烷萃取。有机相例如用盐水洗涤,然后以常规方式干燥,必要时过滤并除去溶剂,优选在减压下除去溶剂。根据众所周知的方法,例如用适当的洗脱剂(例如7:3环己烷/AcOEt)洗脱的快速色谱法(SiO_2)纯化残余物。

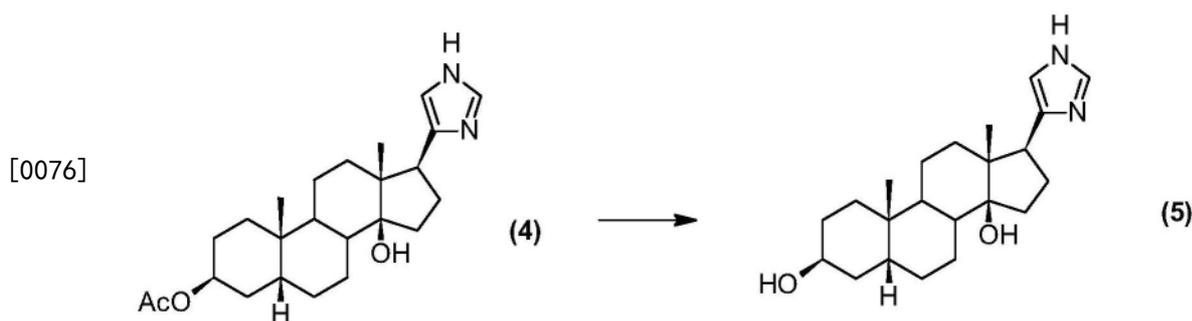
[0071] 化合物(3)是用于制备大多数式(I)的17 β -杂环基和碳环基化合物的中间体。取决于最终产物,即在式(I)的最终化合物中要获得的杂环或碳环的类型,技术人员可以借助普通常识来找到合适的合成途径,例如Advanced Organic Chemistry Pt.B:Reactions and Synthesis,Francis A.Carey和Richard J.Sundberg;以及The Chemistry of Heterocycles:Structures,Reactions,Synthesis,and Applications,第3版,Theophil Eicher,Siegfried Hauptmann,Andreas Speicher。

[0072] 举例来说,对于其中X为NH,Y为CH并且Z为N,即杂环为咪唑基的式(I)化合物,根据以下方案将化合物(3)转化为中间体(4)。



[0074] 通常,将化合物(3)溶解在有机溶剂,例如溶解在醇如乙醇中,并用甲醛处理。适宜地,添加 $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 于水和铵中的溶液。加热反应混合物,优选回流持续足以完成反应的时间。然后优选在减压下除去溶剂,并将残余物溶解在有机溶剂如AcOEt中,并用盐水重复洗涤。收集有机相,并用相同溶剂萃取水相。将合并的有机相干燥,例如经 MgSO_4 干燥,过滤,优选在硅藻土垫上过滤,并且优选在减压下除去溶剂,得到13.34g(96%)的呈固体形式的(4),其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

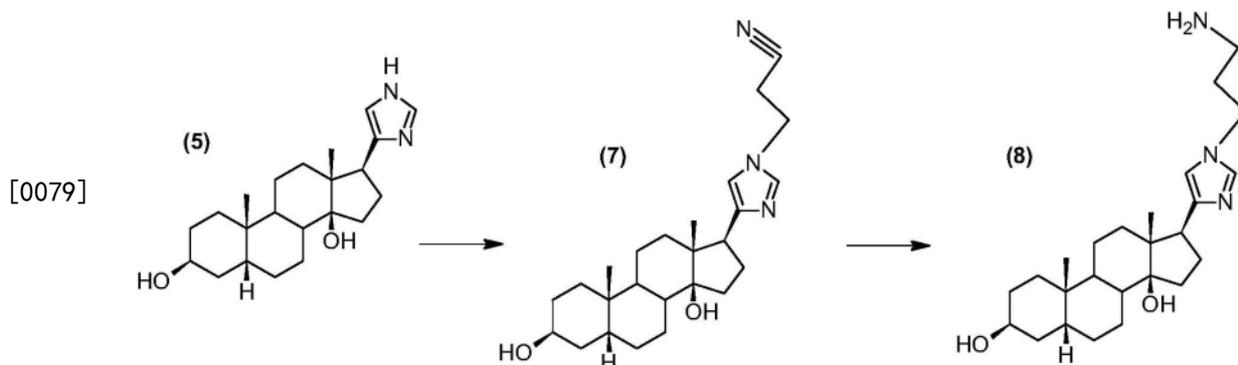
[0075] 最后,根据以下方案,利用常规方法通过恢复3-羟基将中间体(4)转化为最终产物。



[0077] 通常,将化合物(4)溶解在有机溶剂如醇例如甲醇中,并加入水解剂例如NaOH。使反应完成。反应时间和温度由技术人员确定,例如室温是适宜的。除去溶剂,优选在减压下除去溶剂,并将残余物用水稀释并用有机溶剂如二氯甲烷萃取。将有机相干燥,例如经 MgSO_4 干燥,过滤并除去溶剂,优选在真空下除去溶剂,得到最终产物(5)。如果需要,可以用常规方法将最终化合物转化成药学上可接受的盐。

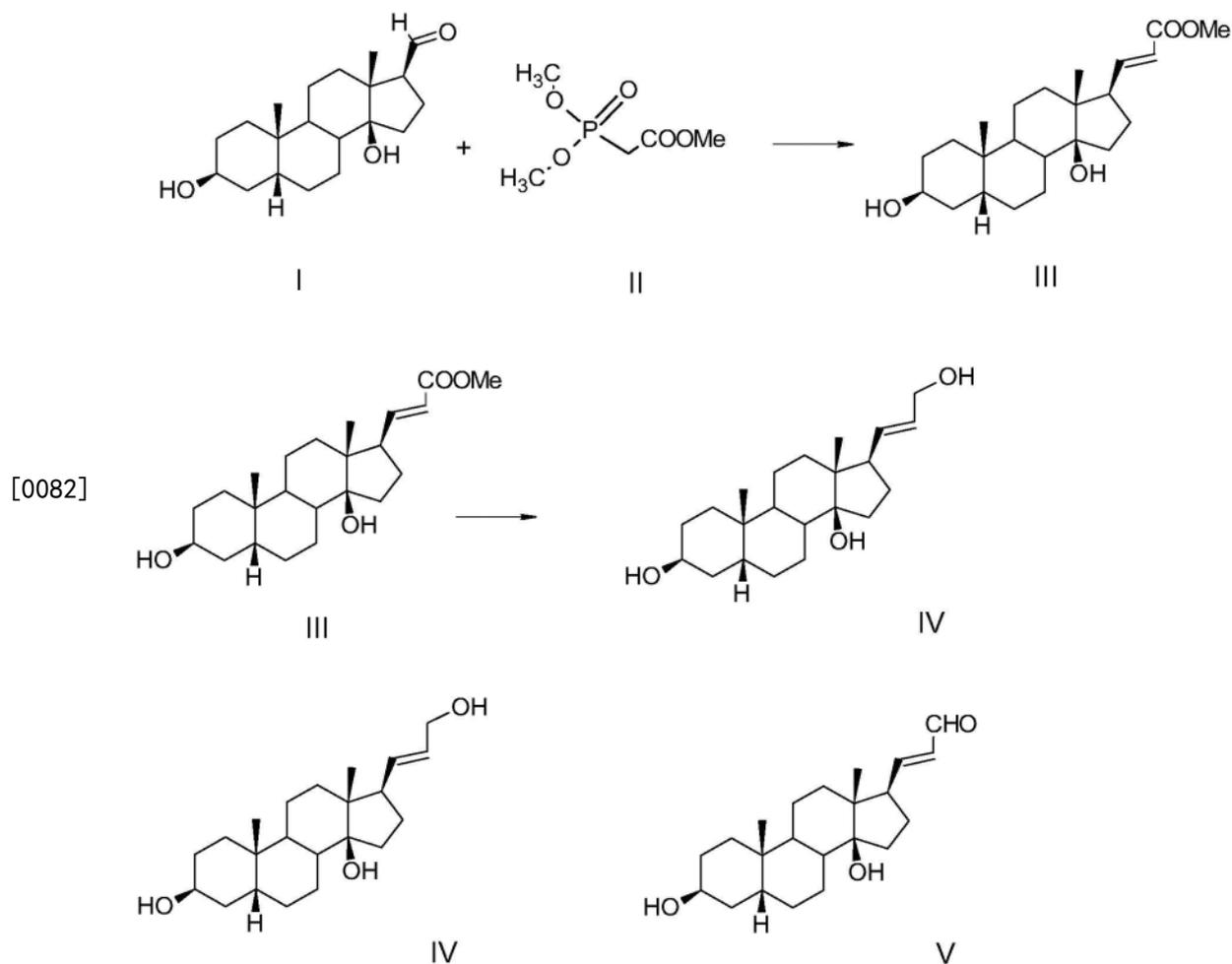
[0078] 举例来说,对于其中X为NH,Y为CH并且Z为N,即杂环为被氨基(C_1 - C_4)烷基取代的咪

唑基的式(I)化合物,根据上述方案将化合物(3)转化为相关中间体(4),但是选择合适的反应物代替甲酰胺并相应地改变反应条件,这是本领域技术人员众所周知的。如果式(I)的最终化合物在咪唑基残基的1-N氮上带有氨基(C₁-C₄)烷基,则根据以下方案处理化合物(5),在此显示为N-(3-氨基丙基)衍生物的示例性情况:



[0080] 在强碱例如K₂CO₃的存在下,将化合物(5)溶解在合适的有机溶剂例如二甲亚砜(DMSO)中。加入丙烯腈,并且反应在合适的温度例如室温下进行足以完成反应的时间。技术人员可以根据烷基链的长度容易地选择适当的 ϵ -不饱和腈。反应完成时,加入水,并用合适的有机溶剂例如乙酸乙酯萃取混合物,有机相如常干燥,例如经Na₂SO₄干燥,过滤并除去溶剂,优选在减压下除去溶剂,得到中间体(7),其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。最后,根据众所周知的方法将腈基还原为氨基。例如,将产物(7)溶解在有机溶剂,例如四氢呋喃(THF)中,优选地所述溶剂是无水的。加入还原剂如LiAlH₄,并将混合物加热,优选回流持续足以完成反应的时间。随后,将冷却的溶液用相同的反应溶剂或其他适宜的溶剂和水稀释,并加入碱如NaOH的溶液以沉淀固体。例如通过过滤分离固体并用溶剂洗涤,并且分离的固体产物根据常规方法纯化,例如通过用合适的洗脱剂体系例如CHCl₃/MeOH/NH₃ 9/1/0.1洗脱的快速色谱法(SiO₂),得到产物(8)。

[0081] 举例来说,对于其中X为CH,Y为NH并且Z为N,即杂环为吡唑基的式(I)化合物,根据以下方案将化合物(I)转化为中间体(V)。



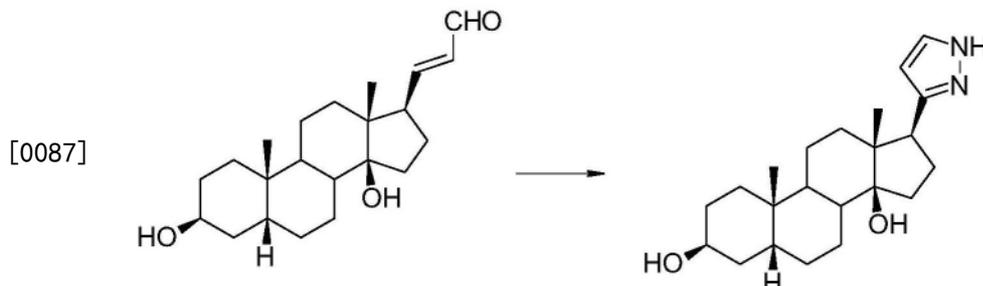
[0083] 醛(I)是众所周知的,并且其制备已公开于Gobbini等,Synth Comm,27(6),1115-1122(1997)中。

[0084] 根据众所周知的方法,将醛(I)转化为衍生物(III)。例如,在惰性气氛下于0℃向NaH(通常55%,分散在矿物油中)于无水溶剂如THF中的悬浮液中滴加膦酰基乙酸三甲酯(II)。将悬浮液在室温下放置适宜的时间,例如30分钟,然后在0℃下冷却。加入溶解在干燥有机溶剂中的醛(I),优选与先前混合物相同的溶剂,并使混合物例如在室温下反应完全。随后加入有机溶剂,例如EtOAc,将混合物转移至NaH₂PO₄溶液(通常为5%的水溶液)中,并用相同的溶剂萃取。合并的有机相优选在减压下浓缩至干。将固体残余物悬浮在水中并在搅拌下保持一段时间,过滤并溶解在有机溶剂例如AcOEt和二氯甲烷中,然后如常干燥,过滤并除去溶剂,优选在减压下除去溶剂,得到中间体(III),其无需任何进一步纯化即用于将酯还原成醇的下一步骤中。酯还原为醇是众所周知的,并且技术人员可以使用许多方法。例如,在惰性气氛下,在-78℃下,向化合物(III)在干燥有机溶剂例如THF中的溶液中,加入纯净的二异丁基氢化铝(DIBAL),并使反应完成。在-78℃冷却后,加入温和的酸性溶液(通常为柠檬酸的13%水溶液)并反应足够的时间,然后加入另外的中性无机盐以促进相分离,例如NaCl,并用有机溶剂如EtOAc洗涤水相。合并的有机相用温和的碱性水溶液,例如NaHCO₃溶液(例如5%)洗涤,如常干燥,过滤并除去溶剂,优选在减压下除去溶剂,得到中间体(IV),其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。下一步骤是将醇常规氧化为醛。例如,向化合物(IV)于合适的有机溶剂例如二氯甲烷中的溶液中,加入MnO₂并将悬浮液搅拌足够的时

间,通常在室温下。过滤混合物以除去金属,例如在硅藻土垫上,所述硅藻土垫用有机溶剂如AcOEt洗涤。优选在减压下除去溶剂,并且残余物可以用合适的结晶介质例如二乙醚结晶,得到化合物(V)。

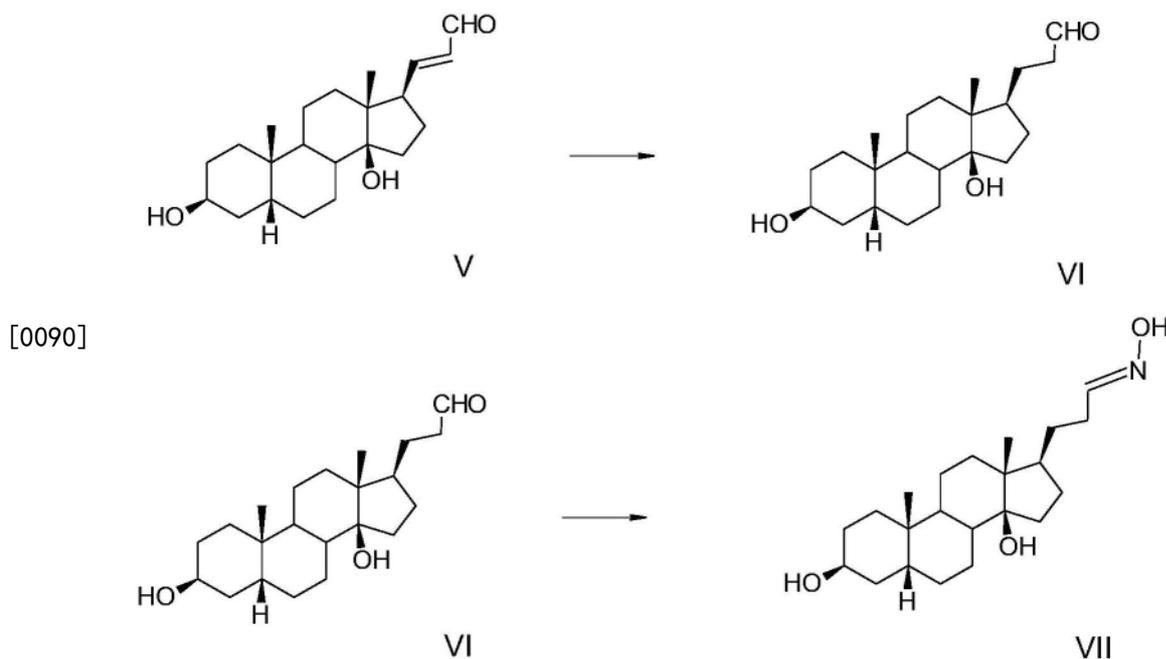
[0085] 如随后所公开的,中间体(V)可以用作起始化合物,以制备具有各种杂环残基的式(I)化合物。

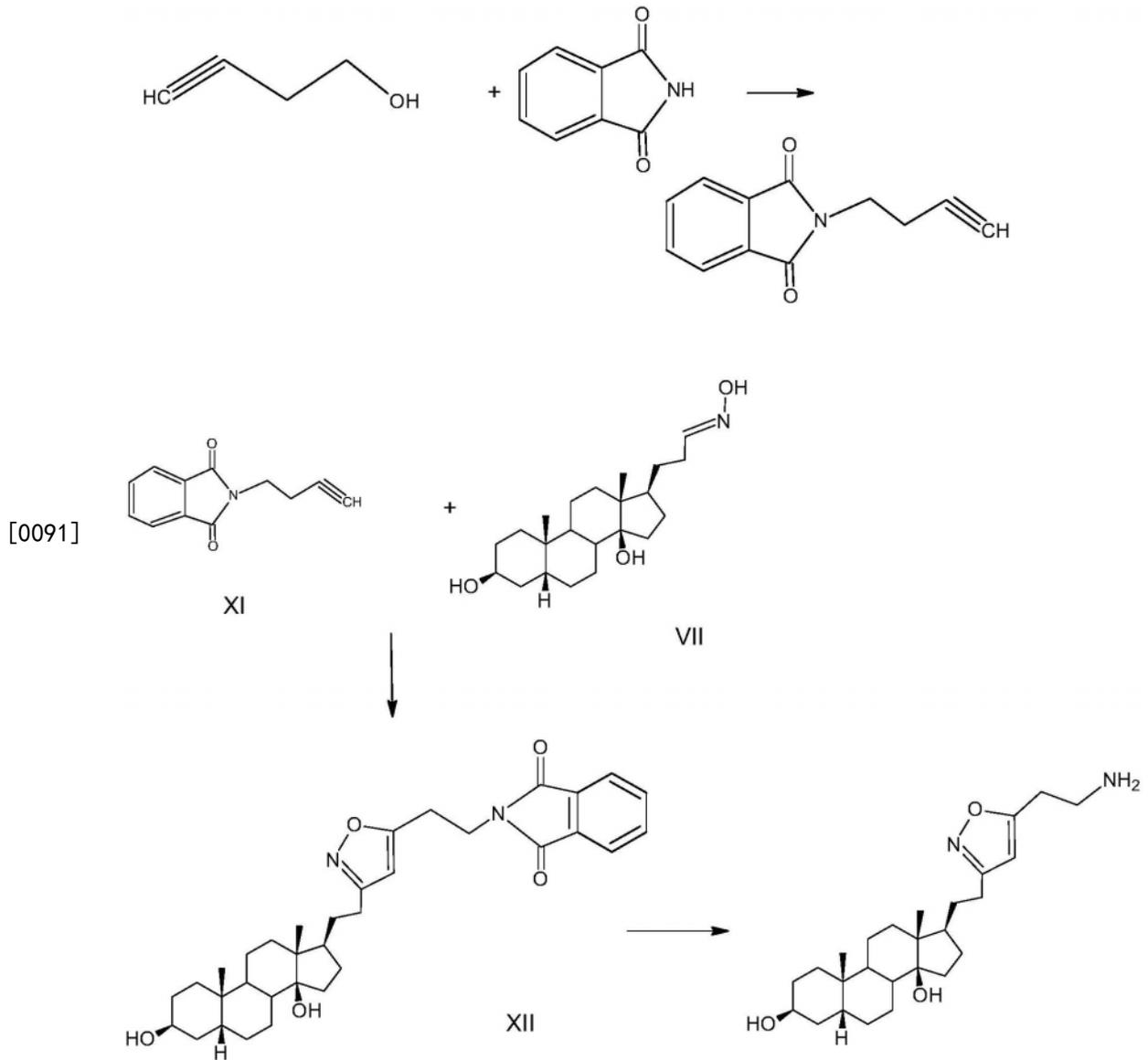
[0086] 为了制备其中吡唑为杂环的式(I)化合物,可以遵循以下反应方案。



[0088] 向化合物(V)于合适的反应介质例如乙酸中的溶液中,加入对甲苯磺酰肼。将反应混合物在合适的温度例如室温下放置足够的时间,然后将其用 Na_2HPO_4 溶液(通常为5%的水溶液)稀释。将悬浮液过滤,将固体干燥,优选在减压下干燥,并溶解在溶剂例如二甲基甲酰胺(DMF)中,加入空间受阻的强碱如叔丁醇钾。使反应完成,例如从室温开始,然后加热,例如加热至 80°C ,然后倒入水中,并用合适的溶剂例如二乙醚进行萃取。合并的有机相如常干燥,过滤并除去溶剂,优选在减压下除去溶剂。残余物通过常规方法纯化,例如使用合适的洗脱剂体系(例如 CH_2Cl_2 /丙酮7/3/作为洗脱剂)的快速色谱法(SiO_2)纯化,得到最终产物。

[0089] 相同的化合物(V)可用于获得其他杂环体系,例如,其中杂环为异噁唑,即其中X为CH,特别是被氨基(C_1 - C_4)烷基取代的CH,Y为O并且Z为N的式(I)化合物。本文根据以下方案提供示例性方法:



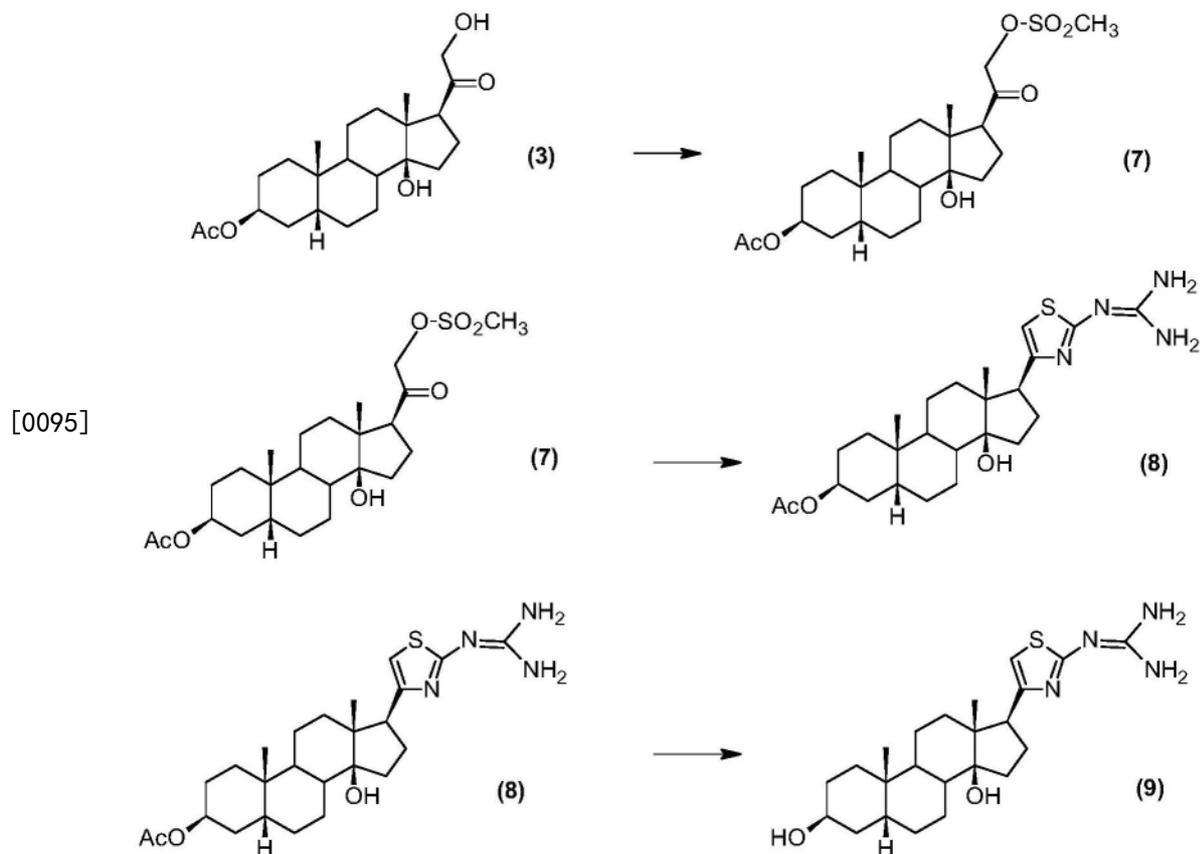


[0092] 根据常规方法,对化合物(V)进行双键氢化。例如,向产物(V)于合适的反应介质例如EtOAc中的溶液中,加入氢化催化剂例如Pd/C(5%),并将混合物在氢气中,通常在大气压和室温下,保持足够的时间。反应完成后,例如在硅藻土垫上滤出催化剂,并优选在减压下将滤液浓缩至干,得到产物(VI)。然后根据常规方法将醛(VI)转化为肟(VII)。例如,向化合物(VI)于反应介质例如二噁烷中的溶液中,加入盐酸羟胺和NaOH。使反应完成,可以在室温下进行,优选在减压下除去溶剂,并用溶剂例如CHCl₃萃取。将有机相浓缩至干,优选在减压下浓缩,得到产物(VII)。

[0093] 根据如式(I)中所提供的烷基链的所需长度来制备炔烃(XI)。在上述方案中所示的示例性实施方式中,其中炔烃具有两个亚甲基基团,在0℃下向3-丁炔-1-醇于无水溶剂如THF中的溶液中加入PPh₃和邻苯二甲酰亚胺。将1,2-乙氧基羰基二氮烯溶液(DEAD)加入到先前的溶液中,并将混合物静置至反应完成,然后优选在减压下除去溶剂,并通过常规方法,例如通过在合适的洗脱剂(例如庚烷/二乙醚9/1)中进行快速色谱法(SiO₂),来纯化残余物,得到产物(XI)。炔烃(XI)与肟(VII)反应。向(VII)于有机溶剂例如含有0.5%吡啶的氯仿中的悬浮液中,加入N-氯代琥珀酰亚胺,并且反应在惰性(N₂)气氛中进行。加入炔烃

(XI) 于有机溶剂例如含三甲基胺(TEA)的氯仿中的溶液,并使反应结束,例如在室温下,用有机溶剂,优选相同的溶剂稀释,并用水洗。优选在减压下除去溶剂至干,并通过常规方法,例如在合适的洗脱剂体系(例如环己烷/丙酮/氯仿7/2/2)中进行快速色谱法(SiO_2),来纯化残余物,得到产物(XII)。最后,获得最终的期望产物,在溶剂例如乙醇中用盐酸胍处理化合物(XII),优选在回流下直至反应完成。用水稀释混合物,优选在减压下除去溶剂,并用有机溶剂例如 CH_2Cl_2 萃取残留的含水部分。将有机相干燥,优选在减压下干燥,并将残余物通过常规方法,例如快速色谱法(SiO_2) (示例性稀释剂 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 95/5/0.5)纯化,得到最终产物。

[0094] 在其中存在胍基的式(I)化合物的示例性实施方式中,可以从中间体(3)起始遵循以下方案。



[0096] 向产物(3)于无水溶剂例如二氯甲烷中的溶液中,加入三乙胺或等效剂。将溶液例如在5°C下冷却,并加入甲磺酰氯或另一种已知的离去基团,并将溶液在相同的冷却温度下保持足够的时间,然后在室温下保持另外的时间以完成反应。将所述溶液用溶剂稀释并用 NaHCO_3 或等效物洗涤。用有机溶剂例如二氯甲烷萃取水相,并用水洗涤合并的有机相。再次用萃取溶剂萃取水相,并如常干燥合并的有机相,优选在减压下除去溶剂,得到中间体(7),其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。向中间体(7)在例如丙酮的有机溶液中加入2-氨基-4-硫代缩二脲。所述反应优选在回流下进行直至反应完成,通过常规方法例如薄层色谱法(TLC)检查。在室温下冷却后,使反应静置额外的时间,检查反应是否完成。滤出固体并优选在减压下除去溶剂。固体残余物用有机溶剂例如二氯甲烷和水溶解。萃取水相,如常干燥溶剂和合并的有机相,过滤并除去溶剂,优选在真空下除去溶剂,得到中间体(8),其可

通过常规方法,例如快速色谱法(SiO_2) (示例性洗脱剂环己烷/乙酸乙酯1/1+1%TEA-乙酸乙酯99%+1%TEA)纯化,得到产物(8)。将NaOH或等效剂加入到(8)于溶剂例如MeOH中的溶液中。所述反应优选在室温下进行,然后除去溶剂。残余物用水洗涤并过滤。过滤器上的固体进一步用另外的水洗涤,然后通过用合适的结晶介质例如EtOH/水结晶来纯化。固体通常在室温下溶解在有机溶剂例如EtOH中,并加入水,使混合物重结晶。通过过滤回收固体,得到产物(9)。

[0097] 对于其中R为 β -OH的式(I)化合物,上述合成方案是从异羟基洋地黄毒苷代替洋地黄毒苷起始进行的。在这种情况下,在3位和12位上进行OH的羟基保护的初始反应。

[0098] 可以根据有机合成技术人员的常识来制备式(I)的化合物。所有的起始产物、反应物、反应介质、催化剂和任何其他材料都是可商购的,或者可以根据文献中描述的方法制备。知识来源是众所周知的,并且包括科学文献、教科书、手册、数据库和服务提供商,参见例如www.cas.org。

[0099] 替代合成可以用于制备式(I)的化合物。本文公开的反应可以改变,修改其反应物、材料和条件,以及分离和纯化最终产物的方法。反应时间和温度可以由技术人员根据其经验和常识来选择。如果需要,可以根据所希望的纯度要求采用良好实验室规范(Good Laboratory Practice, GLP)和良好生产规范(Good Manufacturing Practice, GMP)。材料优选是纯度、高纯度或药物级的。分析方法是有机化学中常规使用的那些方法,例如色谱法、光谱法和任何其他合适的技术。

[0100] 药物组合物

[0101] 药物组合物和制剂包含一种或多种本文公开的式(I)化合物与至少一种常规药学上可接受的载体和/或媒介物和/或赋形剂的混合物。

[0102] 药物组合物可以肠胃外、局部、皮下、肌内、口服施用,或通过局部施用,例如通过气雾剂或透皮施用。优选肠内药物组合物、特别是可口服施用的药物组合物。

[0103] 药物组合物可以任何方式配制,并且可以根据疾患或疾病和疾病程度、每个患者的一般医疗状况、所得优选施用方法等以多种单位剂型施用。关于制剂和施用技术的细节充分描述于科学和专利文献中,参见例如最新版的Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co, Easton PA ("Remington's")。

[0104] 作为治疗剂的式(I)化合物可以单独施用或作为药物制剂(组合物)的组分施用。可以将所述化合物配制成以任何适宜的方式施用以用于人类或兽用药物。组合物中也可以存在润湿剂、乳化剂和润滑剂例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和增香剂、缓冲剂、防腐剂 and 抗氧化剂。

[0105] 根据本发明的组合物的制剂包括适用于口服/经鼻、舌下、局部、肠胃外(例如通过肌内或静脉内注射)、直肠和/或阴道内施用的那些制剂。所述制剂可以适宜地以单位剂型存在并且可以通过药学领域中众所周知的任何方法来制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的受试者、特定的施用模式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常将是产生治疗作用的化合物的量。

[0106] 如本文所提供的药物制剂可以根据本领域已知的用于制造药物的任何方法来制备。这样的制剂可以含有甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂。可以将制剂与适合制造的无毒药学上可接受的赋形剂混合。制剂可以包含一种或多种稀释剂、乳化剂、防腐剂、缓冲剂、赋

形剂等,并且可以以如下形式提供:液体、散剂、乳液、冻干粉末、喷雾剂、乳膏、洗剂、控释制剂、片剂、丸剂、凝胶剂、贴片上、植入物中等。

[0107] 可以使用本领域众所周知的药学上可接受的载体以适当且合适的剂量来配制用于口服施用的药物制剂。这样的载体使药物能够以适合于患者摄入的单位剂型配制为片剂、凝胶片、丸剂、散剂、糖衣丸、胶囊剂、液体、锭剂、凝胶剂、糖浆剂、浆剂、混悬剂等。可以将用于口服使用的药物制剂配制成固体赋形剂,任选地将所得混合物研磨,并在需要时加入合适的其他化合物后加工颗粒的混合物,以获得片剂或糖衣丸芯。合适的固体赋形剂是碳水化合物或蛋白质填充剂,包括例如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇;来自玉米、小麦、大米、马铃薯或其他植物的淀粉;纤维素,例如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠;和胶类,包括阿拉伯胶和黄蓍胶;和蛋白质,例如明胶和胶原蛋白。可以加入崩解剂或增溶剂,例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、藻酸或其盐如藻酸钠。

[0108] 糖衣丸芯具有合适的包衣,例如浓缩糖溶液,其也可以含有阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液以及合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或颜料添加到片剂或糖衣丸包衣中以用于产品标识或表征活性化合物的量(即剂量)。用于实践本文提供的用途和方法的药物制剂也可以经口使用,其使用例如由明胶制成的推入配合式胶囊,以及由明胶制成的软密封胶囊和包衣如甘油或山梨糖醇。推入配合式胶囊可含有与填充剂或粘合剂如乳糖或淀粉、润滑剂如滑石粉或硬脂酸镁以及任选地稳定剂混合的活性剂。在软胶囊中,可以将活性剂溶解或悬浮在合适的液体例如脂肪油、液体石蜡或带有或不带有稳定剂的液态聚乙二醇中。

[0109] 水性悬浮液可含有与适于制备水性悬浮液的赋形剂混合的活性剂(例如,用于实践本文提供的用途和方法的组合物)。这样的赋形剂包括悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基-甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶,以及分散或润湿剂,例如天然存在的磷脂(例如卵磷脂)、环氧烷与脂肪酸的缩合产物(例如聚环氧乙烷硬脂酸酯)、环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物(例如十七烯氧基鲸蜡醇),环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烷山梨糖醇单油酸酯),或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烷脱水山梨糖醇单油酸酯)。水性悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯;一种或多种着色剂;一种或多种调味剂;以及一种或多种甜味剂,例如蔗糖、阿斯巴甜或糖精、或赤藓糖醇或甜菊双糖苷A。可以调节制剂的渗透压。

[0110] 油基药物特别适用于施用疏水性活性剂,用于实践如本文所提供的用途和方法。油基悬浮液可以通过将活性剂悬浮在植物油如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油中或矿物油如液体石蜡或这些油的混合物中来配制。参见例如美国专利第5,716,928号,其描述了使用精油或精油组分来提高经口施用的疏水性药物化合物的生物利用度并降低个体间和个体内的变异性(也参见美国专利第5,858,401号)。油悬浮液可以含有增稠剂,例如蜂蜡、硬质石蜡或鲸蜡醇。可以添加甜味剂以提供可口的口服制剂,例如甘油、山梨糖醇或蔗糖、或赤藓糖醇或甜菊双糖苷A。这些制剂可以通过添加抗氧化剂如抗坏血酸来保存。作为可注射油载体的实例,参见Minto(1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:93-102。如本文所提供的药物制剂也可以是水包油乳液的形式。油相可以是如上所述的植物油或矿物油,或这些油的混合物。合适的乳化剂包括天然存在的胶,例如阿拉伯胶和黄蓍胶;天然存在的磷脂,例如

大豆卵磷脂;衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯,例如脱水山梨糖醇单油酸酯;以及这些偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。乳液也可以含有甜味剂和调味剂,如在糖浆和酞剂的配方中。这样的制剂还可以含有缓和剂、防腐剂或着色剂。

[0111] 根据本发明,药物化合物还可以通过鼻内、眼内和阴道内途径施用,包括栓剂、吹入剂、散剂和气雾剂制剂(例如类固醇吸入剂,参见Rohatagi (1995) *J. Clin. Pharmacol.* 35: 1187-1193; Tjwa (1995) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 75: 107-111)。栓剂制剂可以通过将药物与合适的无刺激性的赋形剂混合来制备,所述赋形剂在常温下为固态,但在体温下为液态,因此会在体内熔融以释放出药物。这样的材料是可可脂和聚乙二醇。

[0112] 根据本发明,药物化合物可以通过局部途径透皮递送,配制成涂药棒、溶液、悬浮液、乳液、凝胶、乳膏、软膏、糊剂、胶冻、涂料、散剂和气雾剂。

[0113] 根据本发明,式(I)的药物化合物可以通过吸入来递送;例如,在替代实施方式中,用于吸入的式(I)化合物被制备用于干分散,例如,通过喷雾干燥含有活性成分(即,式(I)化合物)的溶液,例如使用如美国专利6,509,006;6,592,904;7,097,827;和6,358,530中所述的方法。示例性的干粉赋形剂包括低分子量的碳水化合物或多肽,其与式(I)的化合物混合以帮助分散。在替代实施方式中,可用作干粉分散载体的药物赋形剂的类型包括稳定剂,例如人血清白蛋白(HSA),其也是有用的分散剂;增量剂,例如碳水化合物、氨基酸和多肽;pH调节剂或缓冲剂;盐,例如氯化钠;等等。这些载体可以是结晶形式或无定形形式,或者可以是两者的混合物。可以用于递送粉末或气雾剂制剂的装置包括例如在美国专利5,605,674;7,097,827中所述的那些装置。

[0114] 根据本发明,药物化合物也可以以纳米颗粒或微球的形式递送以在体内缓慢释放。例如,纳米颗粒或微球可以通过以下施用:皮内或皮下注射缓慢皮下释放的药物;参见Rao (1995) *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7: 623-645;作为可生物降解和可注射的凝胶制剂,参见例如Gao (1995) *Pharm. Res.* 12: 857-863 (1995);或作为用于口服施用的微球,参见例如Eyles (1997) *J. Pharm. Pharmacol.* 49: 669-674。

[0115] 根据本发明,式(I)的药物化合物可以肠胃外施用,例如通过肌内(IM)或静脉内(IV)施用或施用到体腔或器官内腔中。这些制剂可以包含溶解在药学上可接受的载体中的活性剂溶液。可以使用的可接受的媒介物和溶剂是水,水中的右旋糖和林格氏溶液(一种等渗的氯化钠)。另外,无菌不挥发性油可以用作溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,脂肪酸如油酸同样可以用于注射剂的制备中。这些溶液是无菌的,并且通常不含不希望的物质。这些制剂可以通过常规的众所周知的灭菌技术进行灭菌。所述制剂可以含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,例如pH调节和缓冲剂,毒性调节剂,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中活性剂的浓度可以在很大范围内变化,并且将根据所选的特定施用模式和患者的需要,主要基于流体量、粘度、体重等进行选择。对于IV施用,制剂可以是无菌可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性悬浮液。该悬浮液可以使用那些合适的分散或润湿剂和悬浮剂来配制。无菌注射制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂(例如1,3-丁二醇溶液)中的悬浮液。可以通过推注或连续输注(例如,在指定的时间段内基本上不间断地引入血管)进行施用。

[0116] 如本文所提供的药物化合物和制剂可以冻干。提供了包含如本文所提供的组合物

的稳定的冻干制剂,其可以通过冻干包含如本文所提供的药物和增量剂例如甘露糖醇、海藻糖、棉子糖和蔗糖或其混合物的溶液来制备。存在许多其他常规的冻干剂。在所述糖中,乳糖是最常见的。还使用柠檬酸、碳酸钠、EDTA、苄醇、甘氨酸、氯化钠等(参见例如Journal of Excipients and Food Chemistry第1卷,第1期(2010)第41-54页;美国专利申请第20040028670号)。

[0117] 根据本发明,如本文所提供的式(I)的化合物可以被施用用于预防性和/或治疗性治疗。在治疗性应用中,组合物以足以治愈、减轻或部分阻止疾患或疾病及其并发症的临床表现的量(“治疗有效量”)施用于已经患有所述疾患或疾病的受试者。例如,在替代实施方式中,如本文所提供的药物组合物以足以治疗、预防或改善有需要的个体的量施用。足以完成此举的药物组合物的量被定义为“治疗有效剂量”。对于该用途有效的给药方案和量,即“给药方案”,将取决于多种因素,包括疾病或疾患的阶段、疾病或疾患的严重程度、患者的总体健康状况、患者的身体状况、年龄等。在计算患者的给药方案时,还应考虑施用模式。

[0118] 给药方案还考虑了本领域众所周知的药代动力学参数,即活性剂的吸收速率、生物利用度、代谢、清除等(参见例如Hidalgo-Aragones(1996) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617; Groning(1996) Pharmazie 51:337-341; Fotherby(1996) Contraception 54:59-69; Johnson(1995) J. Pharm. Sci. 84:1144-1146; Rohatagi(1995) Pharmazie 50:610-613; Brophy(1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24:103-108; 最新的Remington's,同上)。现有技术状态允许临床医生确定每个个体患者、活性剂和所治疗的疾病或疾患的给药方案。为用作药物的类似组合物提供的指南可以用作确定给药方案的指南,即,剂量方案和剂量水平,采用如本文所提供的方法进行施用是正确和适当的。

[0119] 可以根据患者所要求和耐受的剂量和频率给予一次或多次制剂施用。所述制剂应提供足够量的活性剂,以有效治疗、预防或改善如本文所述的疾患、疾病或症状。例如,用于口服施用用于实践如本文所提供的方法和用途的组合物的示例性药物制剂的每日量可为每天每千克体重约1至约20、50、100或1000或更多微克或等效的其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0120] 在替代实施方式中,向有需要的个体施用的有效量的式(I)化合物或等效的其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物包括使用各种剂量方案,例如:A)在AHFS的情况下,为挽救住院患者,可在24/48小时内通过静脉内输注式(I)化合物,剂量范围为每分钟每千克体重0.1至0.5至约10、50或100或更多微克。B)在从AHFS挽救并出院的患者中,维持治疗效果的剂量方案可以是每日量为每公斤体重1、10、50或100或1000或更多微克。口服施用是优选的实施方式。

[0121] 在替代实施方式中,基于对肺毛细血管楔压(PCWP)、呼吸困难、外周和肺静脉充血、尿量、运动能力、血清生物标志物如NT-proBNP和高敏感性心肌肌钙蛋白(hs-cTnT)的监测,施用于有需要的个体的式(I)化合物或等效的其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的有效量被个体化。

[0122] 在替代实施方式中,施用于有需要的个体的式(I)化合物或等效的其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物是足以维持正常的运动耐力而没有气喘的量。

[0123] 在替代实施方式中,有效量通过以下证实:PCWP降低,端坐呼吸,阵发性夜间呼吸困难,运动耐力增加,外周和肺静脉充血(例如肺捻发音或罗音)减少,踝部肿胀减少,生物

标志物泌尿量如NT-proBNP和高敏感性心肌肌钙蛋白 (hs-cTnT) 减少。

[0124] 在替代实施方式中,当在血流或IV或IM中施用(与例如经口,通过吸入或皮下施用形成对比)时,例如作为IV或IM施用,或施用于体腔或器官内腔中,使用较低剂量的式(I)化合物或等效的其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。基本上更高的剂量可以用于局部、喷雾、吸入或口服施用或通过散剂、喷雾或吸入施用。用于制备肠胃外或非肠胃外可施用制剂的实际方法对于本领域技术人员而言将是已知的或显而易见的,并且在例如Remington's, 同上的出版物中有更详细的描述。

[0125] 在替代的有利实施方式中,长期给予式(I)化合物或等效的其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,例如从诊断当天直至患者生命的最后一天或直至疾病减轻为止。在替代实施方式中,需要通过定期监测疾病的特定的、传统上已知的生物标志物或临床征象,从治疗阶段到维持期进行剂量调整。

[0126] 在替代实施方式中,在评估治疗、治疗方案或特定剂量的功效,或确定是否应给予治疗与维持剂量时,对个体,例如受急性或慢性心力衰竭影响的患者,进行器官和组织受累或受损的存在和程度的定期周期性筛查,例如心脏(心室扩张、三心音心脏肥大),疲劳,疲倦,运动耐力降低,运动后恢复时间增加,肾脏(肾功能不全、少尿),肺部(端坐呼吸、阵发性夜间呼吸困难、呼吸急促),踝关节肿胀,颈静脉压升高。应在那些专家选择的治疗心血管疾病(特别是急性或慢性心力衰竭)的时间间隔内进行彻底的身体检查,所述检查应集中在心脏、肺和外周循环功能上。因此,在替代实施方式中,尽可能早地,优选在紧急情况下,实行用式(I)化合物或等效的其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物进行治疗,以防止症状迅速发展,并在患者出院后继续治疗多年,优选在患者的整个生命期间或至少与在心力衰竭中使用其他药物的方式一致的时期内。

[0127] 根据本发明,如本文所提供的用途和方法可以进一步包括与其他药物或药品共同施用。实际上,本发明选择性地纠正了降低的心脏生化功能(即SERCA2a活性)。这无疑有助于缓解现有的HF临床症状,其不良副作用要比现有疗法少(仅因为上述选择性)。然而,由于CHF和AHF是复杂的临床综合征,因此本发明可能与现有和未来的药物类别和/或特定药物相关,例如:a) 药物类别,例如ACE抑制剂、AIBB、利尿剂、Ca通道阻滞剂、 β 受体阻滞剂、洋地黄、NO供体、血管扩张剂、SERCA2a刺激剂、中性内肽酶(NEP)抑制剂、肌球蛋白丝激活剂、重组松弛素2介体、重组NP蛋白、可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)激活剂、血管紧张素II受体的 β -抑制蛋白配体;b) 特定药物:氢氯噻嗪(hydrochlorothiazide)、呋塞米(furosemide)、维拉帕米(verapamil)、地尔硫卓(diltiazem)、卡维地洛(carvedilol)、美托洛尔(metoprolol)、肼苯哒嗪(hydralazine)、依普利酮(eplerenone)、螺内酯(spironolactone)、赖诺普利(lisinopril)、雷米普利(ramipril)、硝酸甘油、硝酸酯、地高辛、缬沙坦(valsartan)、奥美沙坦(olmesartan)、替米沙坦(telmisartan)、坎地沙坦(candesartan)、氯沙坦(losartan)、诺欣妥(entresto)、奥美替氟(omecantiv)、沙库比曲(sacubitril)、塞拉克辛(serelaxin)、乌拉立肽(ularitide)、左西孟旦、cinaciguat。

[0128] 本发明的化合物,特别是作为用于治疗心力衰竭的治疗剂,可以与用于治疗相同疾病的其他治疗剂组合。示例性的其他治疗剂是利尿剂,例如呋塞米、布美他尼(bumetanide)和托拉塞米(torasemide);美托拉宗(Metolazone),一种醛固酮拮抗剂,例如螺内酯或依普利酮;噻嗪利尿剂,例如氢氯噻嗪(Hydrochlorothiazide)、美托拉宗和氯噻

酮(chlorthalidone)。其他药剂是ACE抑制剂,例如赖诺普利和雷米普利。还可以考虑血管紧张素II受体阻滞剂(ARB),例如缬沙坦、坎地沙坦和氯沙坦。包括血管紧张素受体/中性内肽酶抑制剂(ARNI),例如沙比特利(sacubitril)。其他药剂可以选自β受体阻滞剂,例如卡维地洛(carvedilol)和美托洛尔(metoprolol),或血管扩张剂,例如肼屈嗪(Hydralazine),任选地与二硝酸异山梨酯组合,硝酸酯如硝酸甘油,氨氯地平(amlodipine)和非洛地平(felodipine);非二氢吡啶类,例如地尔硫卓(diltiazem)或维拉帕米(verapamil)。如果需要,本发明的化合物也可以与地高辛混合。可以考虑使用其他药物,如伊伐布雷定(Ivabradine)和其他抗凝剂。

[0129] 本发明的化合物可以与其他治疗剂,特别是可用于治疗心血管疾病的药剂组合,更特别是在心力衰竭的联合疗法中。组合的活性成分可以根据医生决定的不同方案进行施用。根据本发明的一个实施方式,可以通过同时或在不同时间施用式(I)化合物与另外的一种或多种治疗活性成分来进行联合治疗。在同时施用的情况下,本发明的化合物和另外的一种或多种活性成分可以各自配制成相应的药物组合物或配制成同一单位剂型。在前一种情况下,本发明提供了一种试剂盒,特别是用于治疗心力衰竭的试剂盒,其包含分别含有本发明的化合物和另外的一种或多种活性成分的单独的药物组合物。在另一个实施方式中,本发明提供了一种特别是用于治疗心力衰竭的药物单位剂型试剂盒,其包含同一单位剂型中的本发明的化合物和另外的一种或多种活性成分。根据本发明的联合疗法除了本文公开的另外的活性剂的众所周知的治疗作用之外或与其协同组合,由于本文公开的式(I)化合物的肌力-舒张作用而提供了有利的心力衰竭治疗。

[0130] 还提供了纳米颗粒、纳米脂质颗粒、囊泡和脂质体膜,其包含用于实践如本文所提供的用途和方法的化合物,例如,以向有需要的受试者递送如本文所提供的药物活性化合物和组合物(式(I)化合物或等效的其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,任选与如上文所公开的其他治疗活性剂组合)。在替代实施方式中,这些组合物被设计成靶向特定分子,包括生物分子,例如多肽,包括细胞表面多肽,例如用于靶向所需细胞类型,例如肌细胞或心脏细胞、内皮细胞等。

[0131] 提供了多层脂质体,其包含用于实践如本文所提供的方法的化合物,例如,如Park等,美国申请第20070082042号中所述。多层脂质体可以使用包含角鲨烷、固醇、神经酰胺、中性脂质或油、脂肪酸和卵磷脂的油相组分的混合物来制备,粒度为约200至5000nm,以捕获用于实践如本文所提供的用途和方法的组合物。

[0132] 脂质体可以使用任何方法制备,例如,如美国专利第4,534,899号;或Park等,美国申请第20070042031号中所述,包括通过包封根据本发明的活性剂(或活性剂的组合)生产脂质体的方法,所述方法包括在第一储器中提供水溶液;在第二储器中提供有机脂质溶液,然后在第一混合区域中将所述水溶液与所述有机脂质溶液混合以产生脂质体溶液,其中所述有机脂质溶液与所述水溶液混合以基本上瞬时产生包封活性剂的脂质体;然后立即将所述脂质体溶液与缓冲溶液混合以产生稀释的脂质体溶液。

[0133] 在一个实施方式中,用于实践如本文所提供的用途和方法的脂质体组合物包含被取代的铵和/或聚阴离子,例如用于向所需细胞类型靶向递送用于实践如本文所提供的方法的式(I)化合物或等效的其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,如例如美国申请第20070110798号中所述。

[0134] 提供了包含用于实践如本文所提供的用途和方法的根据本发明的化合物的纳米颗粒,呈含活性剂的纳米颗粒(例如次级纳米颗粒)的形式,如例如美国申请第20070077286号中所述。在一个实施方式中,提供了包含用于实践如本文所提供的用途和方法的脂溶性活性剂或与二价或三价金属盐作用的脂溶的水溶性活性剂的纳米颗粒。

[0135] 在一个实施方式中,固体脂质悬浮液可以用于配制和递送用于实践如本文所提供的用途和方法的组合物到体内、体外或离体的哺乳动物细胞,如例如美国申请第20050361321号中所述。

[0136] 可以通过使用脂质体或纳米脂质体来递送用于实践如本文所提供的用途和方法的组合物和制剂。通过使用脂质体,特别是在脂质体表面带有对靶细胞具有特异性的配体,或者优先针对特定器官的情况下,可以专注于将活性剂递送到体内靶细胞中。参见例如美国专利第6,063,400号;第6,007,839号;Al-Muhammed(1996)J.Microencapsul.13:293-306;Chonn(1995)Curr.Opin.Biotechnol.6:698-708;Ostro(1989)Am.J.Hosp.Pharm.46:1576-1587。

[0137] 递送媒介物

[0138] 在替代实施方式中,任何递送媒介物都可以用于实践如本文所提供的用途和方法,例如,将本文提供的化合物递送到有需要的受试者。例如,可以使用包含聚阳离子、阳离子聚合物和/或阳离子肽的递送媒介物,例如聚乙烯亚胺衍生物,例如,如例如在美国申请第20060083737号中所述。

[0139] 在一个实施方式中,干燥的多肽-表面活性剂复合物用于配制组合物,该组合物用于实践如本文所提供的用途和方法,例如,如例如美国申请第20040151766号中所述。

[0140] 在一个实施方式中,可以使用具有细胞膜渗透肽缀合物的媒介物将用于实践如本文所提供的用途和方法的组合物施用于细胞,例如,如美国专利第7,306,783号;第6,589,503号中所述。在一个方面,将待递送的组合物缀合至细胞膜渗透肽。在一个实施方式中,将待递送的组合物和/或递送媒介物与介导转运的肽缀合,例如,如美国专利第5,846,743号中所述,所述专利描述了高度碱性并结合于多磷脂酰肌醇的介导转运的肽。

[0141] 在一个实施方式中,电通透化被用作主要或辅助手段,以例如通过使用任何电穿孔系统将组合物递送至细胞,如例如美国专利第7,109,034号;第6,261,815号;第5,874,268号中所述。

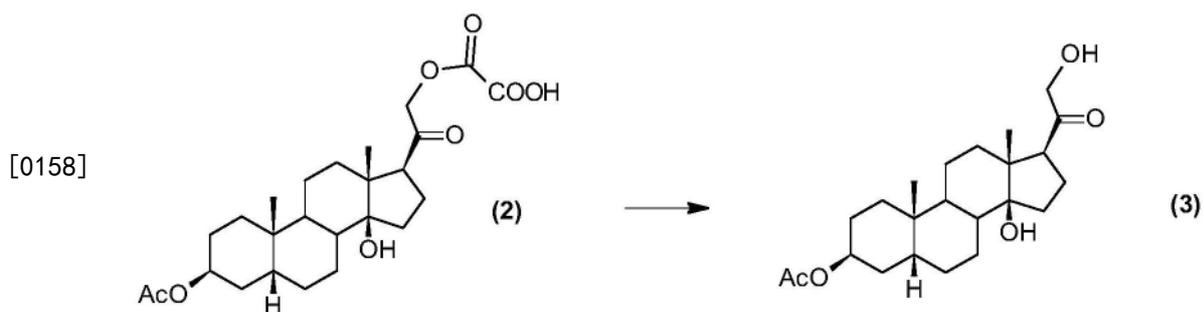
[0142] 下列实施例进一步说明本发明。

[0143] 制备式(I)化合物

[0144] 在以下实施例中,除非另有说明,否则化合物、溶剂、反应物和任何其他材料均来自商业来源。

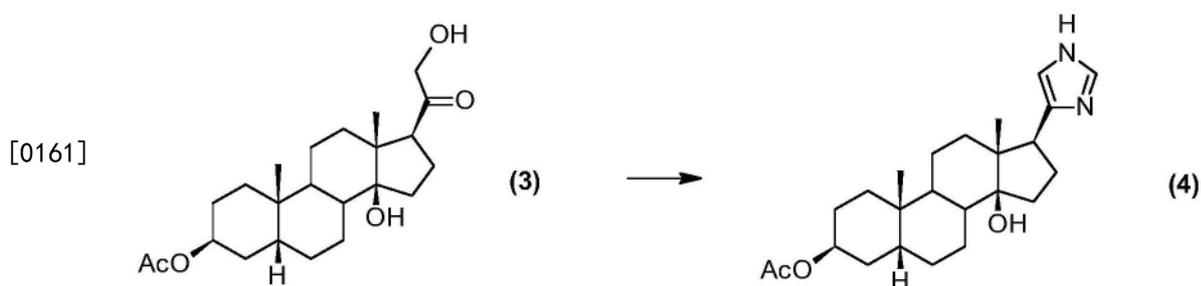
[0145] 实施例1

[0146] 3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β - (咪唑-4-基)雄甾烷 (CVie101)



[0159] 将21.47g KHC_3 于685ml水中的溶液加入到28.18g中间体2于1080ml MeOH中的溶液中。将所述溶液在室温搅拌下保持16小时，然后加入10.74g的 KHC_3 。在室温下5小时后，在减压下除去MeOH，残余物用500ml二氯甲烷萃取两次，并且有机相用250ml盐水洗涤，然后经 MgSO_4 干燥，过滤并在减压下除去溶剂。残余物通过用7:3环己烷/AcOEt洗脱的快速色谱法(SiO₂)纯化，得到14.78g (63%)的白色固体形式的中间体3。

[0160] -构建咪唑环

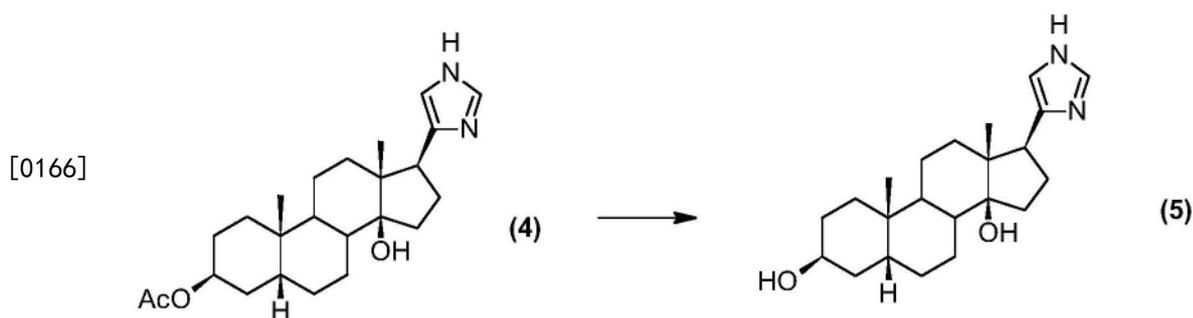


[0162] 向13.66g产物3于955ml乙醇中的搅拌溶液中加入68.3ml的37%甲醛， $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (13.27g于34ml水中)和205ml 28%氢氧化铵的溶液。将混合物加热至回流持续3小时。在减压下除去溶剂，并将固体残余物溶解在AcOEt中并用盐水洗涤。

[0163] 收集有机相，并用AcOEt萃取水相。

[0164] 合并的有机相经 MgSO_4 干燥，经硅藻土垫过滤，并在减压下除去溶剂，得到13.34g (96%)的浅绿色固体形式的4，其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

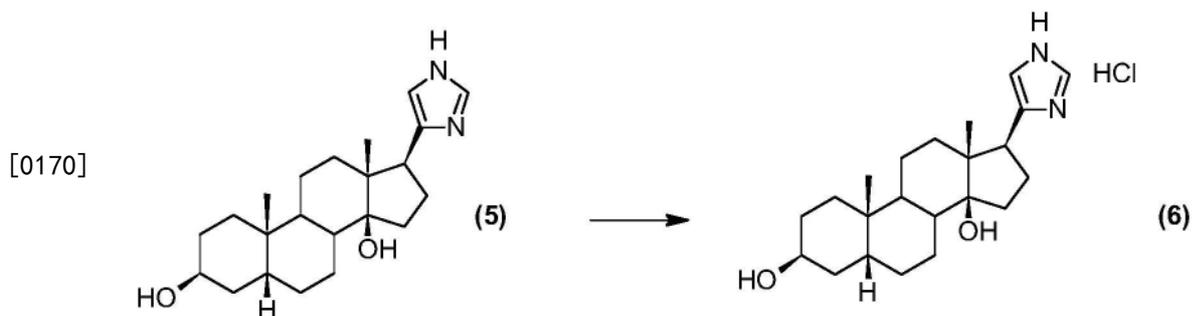
[0165] -3-乙酰基的水解



[0167] 向13.34g中间体4于555ml MeOH中的搅拌溶液中，加入166.5ml的1M NaOH，并将所述溶液在室温下搅拌16小时。在减压下除去MeOH，并将残余物用水稀释并用二氯甲烷萃取。

[0168] 有机相经 MgSO_4 干燥，过滤并真空除去溶剂，得到8.23g (69%)的灰白色固体形式的中间体5，其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0169] -制备药学上可接受的盐



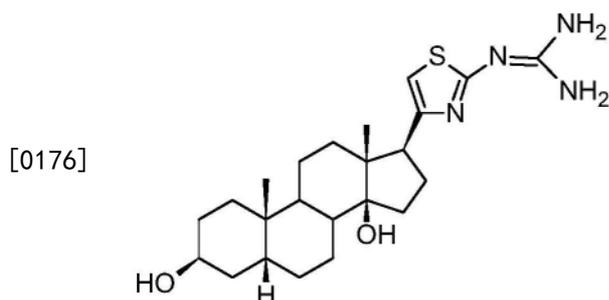
[0171] 将18.1ml的1.25M HCl的EtOH溶液加入到8.11g产物5于400ml MeOH中的溶液中。将混合物在室温搅拌5分钟,然后除去溶剂。将残余物溶解在丙酮中并加热至回流,冷却,然后通过过滤收集固体,得到6.03g白色固体,将其通过色谱纯化。

[0172] 固体通过多次用7:3水/ACN洗脱的半制备型C18柱色谱操作(装载有3.0g粗物质)纯化。总产率:3.95g(44%)。

[0173] $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO): 0.59 (s, 3H); 0.87 (s, 3H); 1.05-1.24 (m, 4H); 1.32-1.53 (m, 8H); 1.59-1.88 (m, 7H); 2.03-2.11 (m, 1H); 2.21-2.29 (m, 1H); 2.92 (dd, 1H); 3.89 (s, 1H); 4.25 (brs, 1H); 7.29 (d, 1H); 8.86 (d, 1H); 13.72 (s, 1H); 14.22 (s, 1H)。

[0174] 实施例2

[0175] 3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -(2-胍基-噻唑-4-基)雄甾烷
(Cvie 102)



[0177] -洋地黄毒苷至3-乙酰基-洋地黄毒苷

[0178] 在氩气气氛下向25克洋地黄毒苷于118ml吡啶中的溶液中,加入41mg DMAP和33.1ml乙酸酐,保持温度低于30 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0179] 在室温下搅拌20小时后,在减压下除去溶剂(与甲苯共蒸发)。将残余物用480ml水收集,并在室温下搅拌1小时。通过过滤收集所得固体,用240ml水洗涤并真空干燥,得到28.04g(定量产率)的浅黄色固体形式的产物1,其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0180] -3-乙酰基-洋地黄毒苷至打开17 β -内酯环

[0181] 向26.33g中间体1于740mL丙酮中的搅拌溶液中,加入33.8g NaIO_4 和105mg RuO_2 水合物于222ml水中的溶液。在室温下搅拌30分钟后,加入33.8g NaIO_4 和105mg RuO_2 水合物于222ml水中的溶液。将混合物在室温下再搅拌15分钟,然后加入33.8g NaIO_4 和105mg RuO_2 水合物于222ml水中的溶液。

[0182] 加入32ml异丙醇,并在室温下搅拌15分钟后,将固体滤出,在减压下缩减体积,并用AcOEt萃取残余物。

[0183] 有机相用盐水洗涤,然后经 MgSO_4 干燥,过滤并在真空下除去溶剂,得到29.8g浅棕

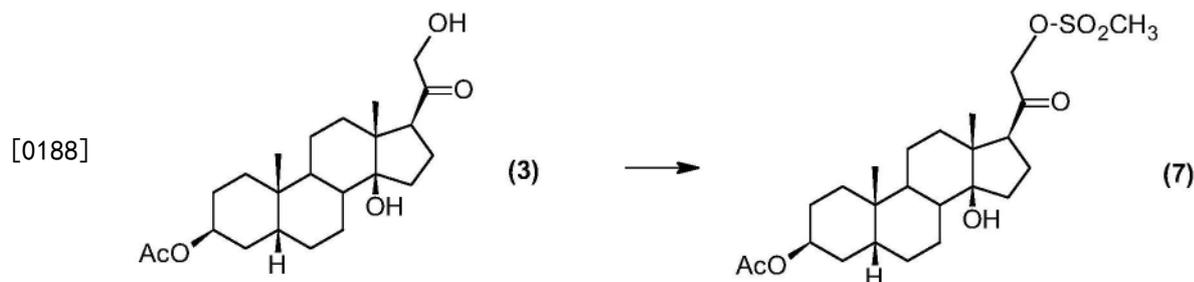
色固体,将其溶解在790ml丙酮中。

[0184] 加入33.8g NaIO_4 和105mg RuO_2 水合物于222ml水中的溶液。在室温下搅拌30分钟后,加入33.8g NaIO_4 和105mg RuO_2 水合物于222ml水中的溶液,并将混合物在室温下搅拌30分钟,然后加入异丙醇(32ml)。加入 NaIO_4 (33.8g, 158.0mmol, 2.5eq)和 RuO_2 水合物(105mg, 0.79mmol, 2eq)于水(222ml)中的溶液,并将混合物在室温下搅拌30分钟,然后加入32ml异丙醇。在室温下搅拌15分钟后,将固体滤出,在减压下缩减体积,并用AcOEt萃取残余物。有机相用盐水洗涤,然后经 MgSO_4 干燥,过滤并在减压下除去溶剂,得到28.25g(97%)的中间体2,其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0185] -还原为醇

[0186] 将21.47g KHC_3 于685ml水中的溶液加入到28.18g中间体2于1080ml MeOH中的溶液中。将所述溶液在室温搅拌下保持16小时,并加入10.74g KHC_3 。在室温下5小时后,在减压下除去MeOH,残余物用500ml二氯甲烷萃取两次,并且有机相用250ml盐水洗涤,然后经 MgSO_4 干燥,过滤并在减压下除去溶剂。残余物通过用7:3环己烷/AcOEt洗脱的快速色谱法(SiO_2)纯化,得到14.78g(63%)的白色固体形式的中间体3。

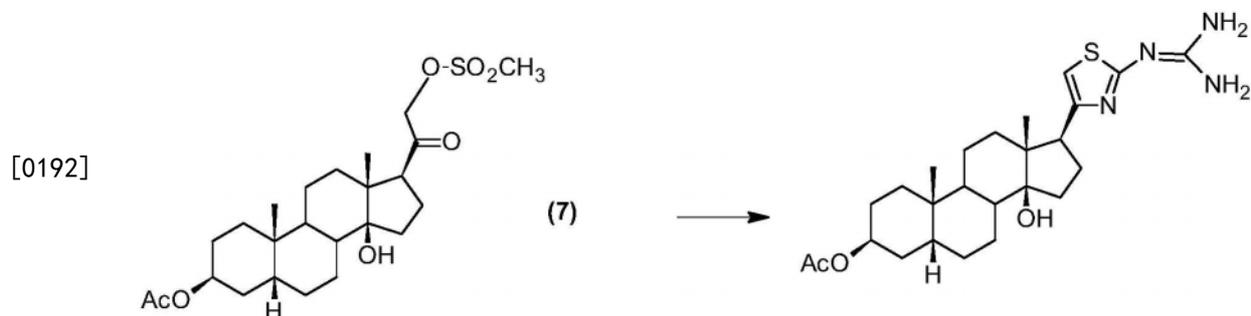
[0187] -从醇至甲磺酸酯



[0189] 向10.2克产物3于205ml无水二氯甲烷中的搅拌溶液中,加入5.1ml三乙胺。将溶液在5°C下冷却,并滴加2.5ml的甲磺酰氯,并将溶液在5°C下保持10分钟,并在室温下再保持2小时。所述溶液用200ml二氯甲烷稀释并用200ml NaHCO_3 溶液洗涤。

[0190] 用50ml二氯甲烷萃取水相,并用200ml水洗涤合并的有机相。再次用50ml二氯甲烷萃取水相,并且合并的有机相经 MgSO_4 干燥,并在减压下除去溶剂,得到12.4g(99%)的白色固体形式的7,其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0191] -构建胍取代的噻唑

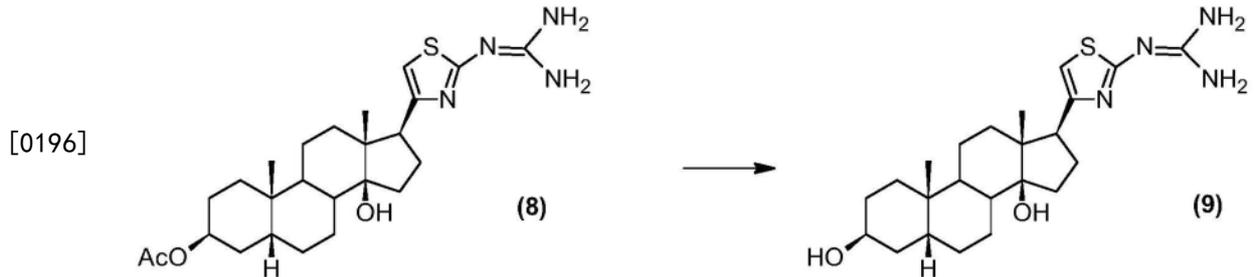


[0193] 向12.4g中间体7于1120ml丙酮中的搅拌溶液中,加入52.3克2-亚氨基-4-硫代缩二脲。将所述溶液回流5小时并且使其在室温下冷却,并再搅拌16小时。将悬浮液过滤,弃去固体,并在减压下除去丙酮。

[0194] 固体残余物用500ml二氯甲烷和500ml水收集。水相用250ml二氯甲烷萃取两次,并

且合并的有机相经MgSO₄干燥,过滤,并在真空下除去溶剂,得到15.3g浅黄色固体形式的中间体8,其通过快速色谱法(SiO₂) (环己烷/乙酸乙酯1/1+1%TEA-乙酸乙酯99%+1%TEA作为洗脱剂)纯化,得到8.95克纯产物8(73%)。

[0195] -恢复3β-羟基



[0197] 将93.3ml NaOH 1M加入到8.86g中间体8于900ml MeOH中的溶液中。将混合物在室温下搅拌48小时,然后除去溶剂。残余物用250ml水洗涤并过滤。过滤器上的固体进一步用另外的100ml水洗涤,得到7.7克灰白色固体,其通过用EtOH/水结晶而纯化。在室温下将固体溶解于770ml EtOH中,并在搅拌下加入385ml水,将混合物在4℃下放置16小时。通过过滤回收固体,得到6.24克灰白色粉末形式的产物9。

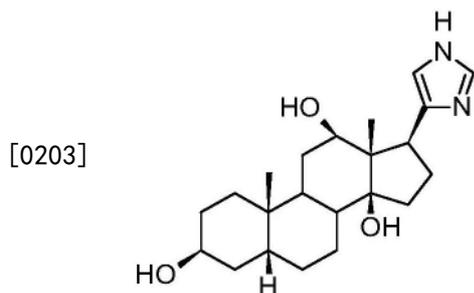
[0198] ¹H-NMR (d₆-DMSO, 400MHz): 0.59 (s, 3H); 0.89 (s, 3H); 1.05-1.24 (m, 4H); 1.32-1.53 (m, 8H); 1.59-1.88 (m, 7H); 2.04-2.09 (m, 2H); 2.72 (t, 1H); 3.90 (s, 1H); 4.20 (s, 1H); 4.89 (s, 1H); 6.59 (bs, 4H)。

[0199] -制备药学上可接受的盐

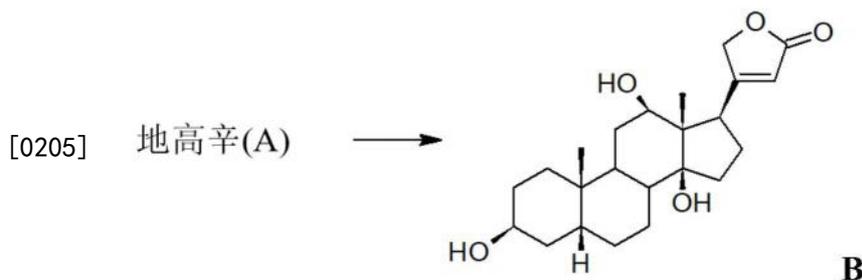
[0200] 将5.72克产物9溶解在230ml的MeOH中,过滤,并将4.4ml的3M HCl的MeOH溶液加入到过滤的溶液中。在减压下除去溶剂,残余物与130ml丙酮成浆并在室温下搅拌3小时。在4℃下另外16小时后,通过过滤回收固体,得到4.40克白色固体。

[0201] 实施例3

[0202] 3β-羟基-5β-10β-甲基-12β-羟基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(咪唑-4-基)雄甾烷 (Cvie 104)

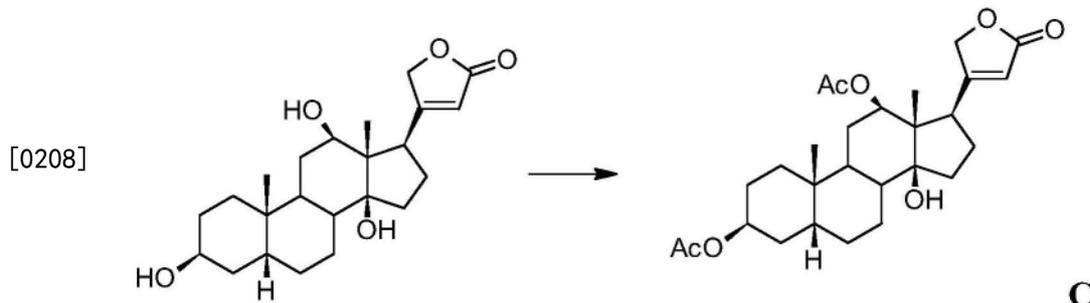


[0204] -从地高辛(A)至异羟基洋地黄毒苷



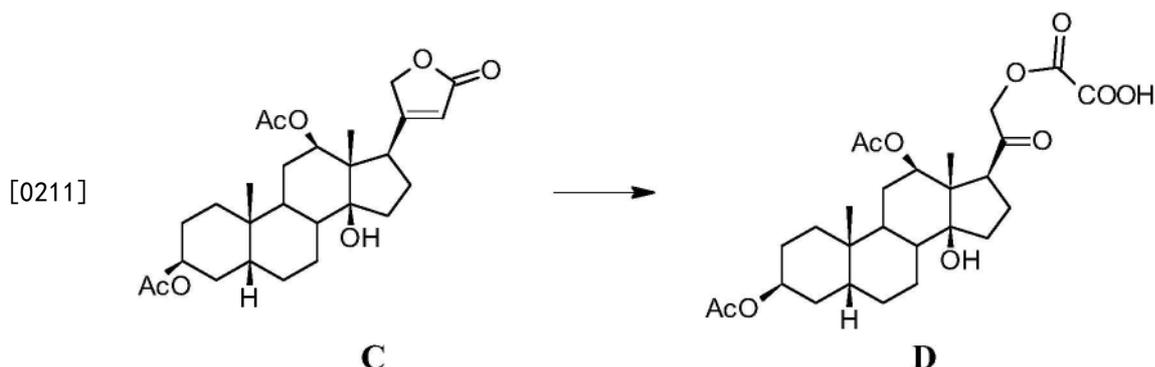
[0206] 向4.33克地高辛于43ml MeOH中的悬浮液中,加入12.3ml的0.2M H_2SO_4 ,并将混合物加热回流1小时并冷却至室温。在减压下除去溶剂,并且将25ml冰和水的混合物加入到残余物中,并搅拌30分钟。将收集的固体在25ml冷水中搅拌1小时后洗涤,将悬浮液过滤,并将固体在过滤器上用水洗涤,得到2.238克白色固体B(99%)。

[0207] -3 β ,12 β -羟基的乙酰化



[0209] 在氩气气氛下,向2.14克异羟基洋地黄毒苷于10ml吡啶中的溶液中加入3mg DMAP和2.5ml乙酸酐,保持温度低于30 $^{\circ}C$ 。在室温下搅拌20小时后,在减压下除去溶剂(与甲苯共蒸发)。将残余物用25ml水处理并在室温下搅拌1小时。通过过滤收集所得固体并在真空下干燥,得到1.92克(79%)的白色固体形式的产物C,其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0210] -打开内酯环

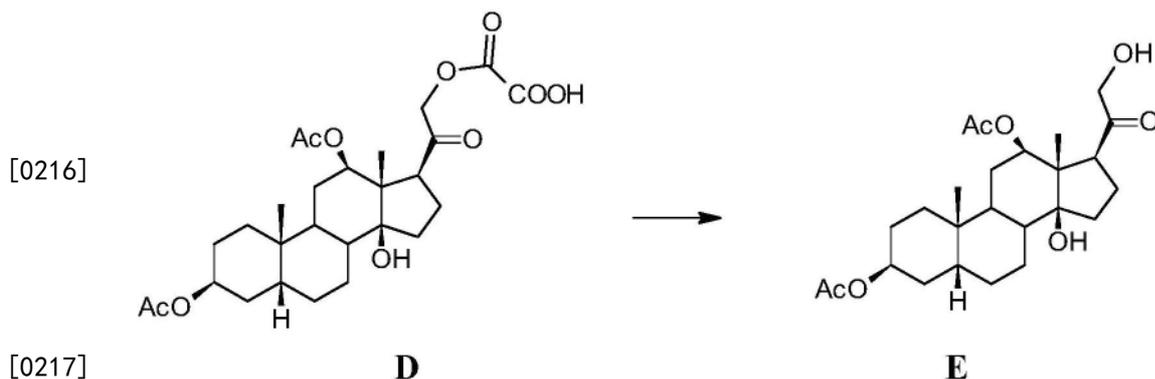


[0212] 向1.91克中间体C于47mL丙酮中的搅拌溶液中,加入2.15g $NaIO_4$ 和7mg RuO_2 水合物于14ml水中的溶液。在室温下搅拌30分钟后,加入2.15g $NaIO_4$ 和7mg RuO_2 水合物于14ml水中的溶液。

[0213] 加入2.4ml异丙醇,并且在室温下搅拌15分钟后,在硅藻土垫上滤出固体,并在过滤器上用150ml丙酮洗涤,在减压下除去溶剂,并用AcOEt和水萃取残余物。

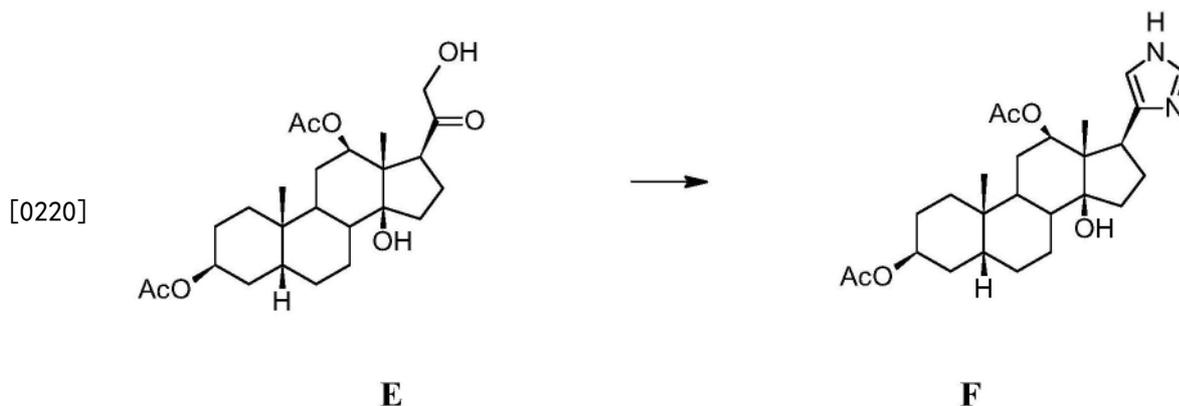
[0214] 有机相用盐水洗涤,然后经 $MgSO_4$ 干燥,过滤并在真空下除去溶剂,得到2.25g(99%)的白色固体形式的产物D,其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0215] -酯的水解



[0218] 将1.42g KHC_3 于47ml水中的溶液加入到2.25g中间体D于71ml MeOH中的溶液中。将所述溶液在室温搅拌72小时,然后在减压下除去MeOH。剩余的水溶液用EtOAc萃取,并且有机相经 MgSO_4 干燥,过滤并在减压下除去溶剂。粗残余物通过用环己烷/AcOEt 6/4洗脱的 SiO_2 凝胶柱色谱法纯化,得到1.03克(57%)的白色固体形式的中间体E。

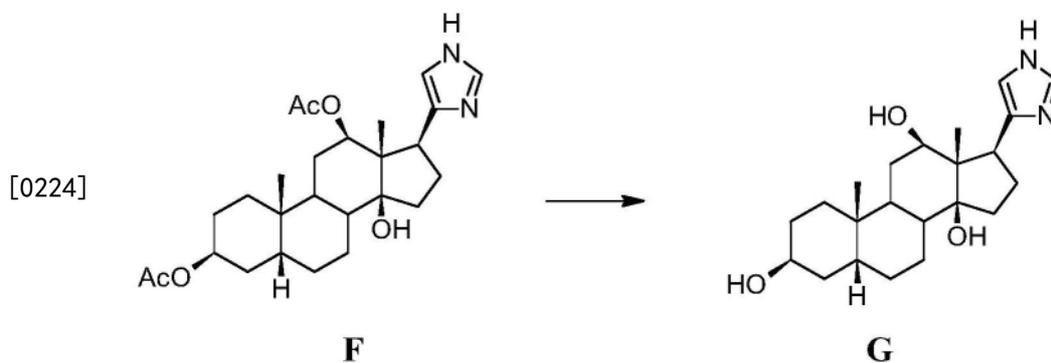
[0219] -构建咪唑环



[0221] 向500mg产物E于30ml乙醇中的搅拌溶液中,加入2.2ml的37%甲醛、 $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (423g于2.6ml水中)和6.5ml 28%氢氧化铵的溶液。将混合物加热至回流持续3小时。缩减体积并且残余物用盐水和AcOEt收集。

[0222] 收集有机相并用AcOEt萃取水相。合并的有机相经 MgSO_4 干燥,过滤,并在减压下除去溶剂,得到474mg(93%)的浅绿色固体形式的F,其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0223] -乙酰基的水解



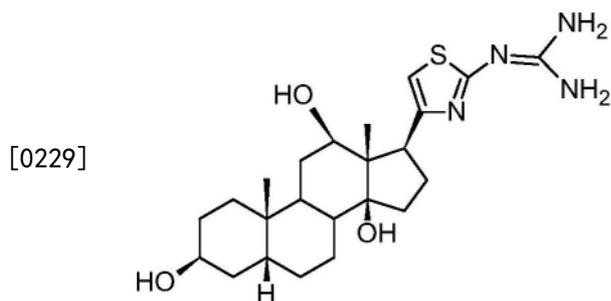
[0225] 向470mg中间体F于17ml MeOH中的搅拌溶液中,加入5.1ml的1M NaOH,并将所述溶液在室温下搅拌24小时。在减压下除去MeOH,并将残余物用水稀释并用二氯甲烷萃取。有机

相经MgSO₄干燥,过滤并真空除去溶剂,得到383mg (73%)的灰色/绿色固体形式的粗残余物,其通过用DCM/MeOH 8/2洗脱的SiO₂凝胶柱色谱法纯化,得到152mg白色固体形式的纯产物G(Cvie 104)。

[0226] ¹H-NMR (d₆-DMSO, 600MHz): 0.40 (s, 3H); 0.83 (s, 3H); 1.08-1.24 (m, 4H); 1.30-1.58 (m, 6H); 1.58-1.82 (m, 6H); 1.82-2.18 (m, 1H); 2.02-2.18 (m, 1H); 3.20 (m, 1H); 3.90 (s, 1H); 4.18 (s, 1H); 4.40 (s, 1H); 6.68 (s, 1H); 7.60 (s, 1H); 11.78 (s, 1H)。

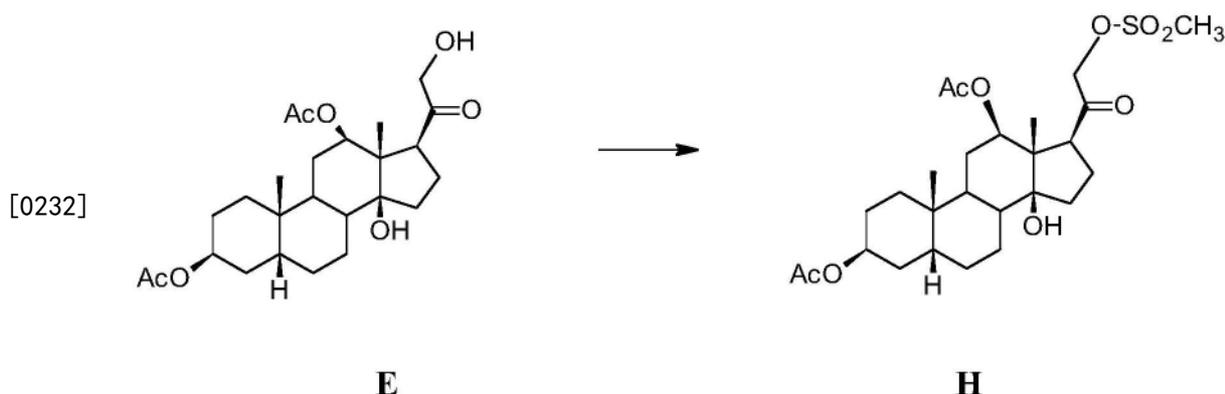
[0227] 实施例4

[0228] 3β-羟基-5β-10β-甲基-12β-羟基-13β-甲基-14β-羟基-17β-(2-胍基-噻唑-4-基)雄甾烷(Cvie 105)



[0230] 重复实施例3直至中间体E。

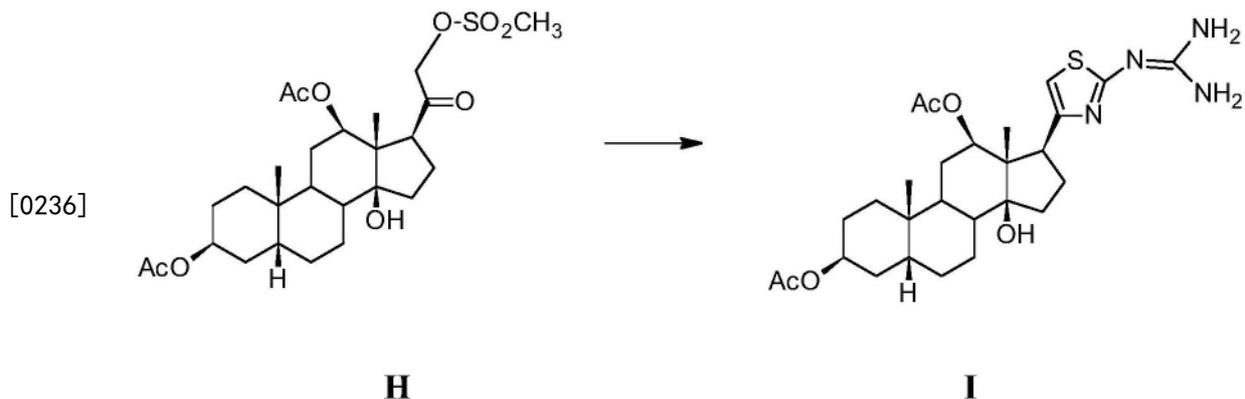
[0231] -从醇至甲磺酸酯



[0233] 向0.55克产物E于10ml无水二氯甲烷中的搅拌溶液中,加入0.24ml三乙胺。将所述溶液在5℃下冷却,并滴加0.12ml的甲磺酰氯,并将溶液在5℃下搅拌10分钟,然后在室温下再搅拌2小时。所述溶液用10ml二氯甲烷稀释并用10l的5%NaHCO₃溶液洗涤。

[0234] 用50ml二氯甲烷萃取水相,并用10ml水洗涤合并的有机相。有机相经MgSO₄干燥,并在减压下除去溶剂,得到0.64g (99%)的白色固体形式的H,其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

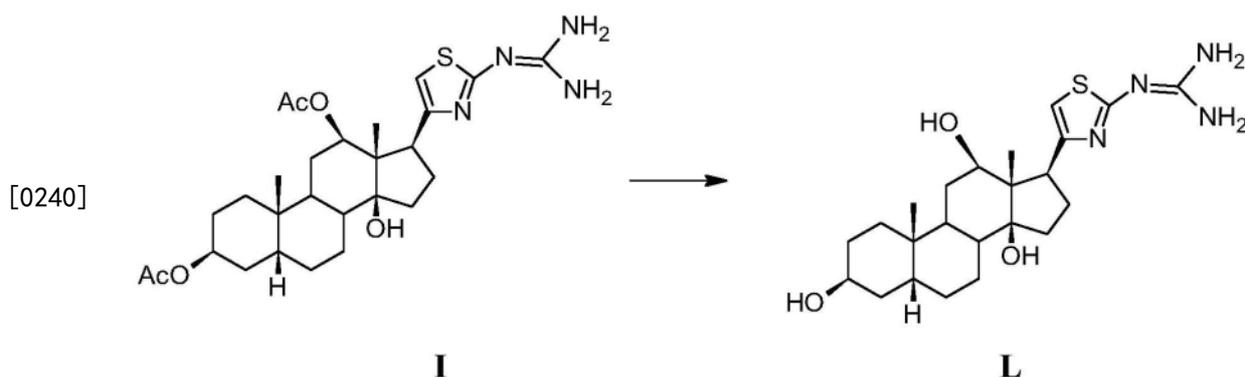
[0235] -构建胍取代的咪唑环



[0237] 向0.64g中间体H于52ml丙酮中的搅拌溶液中,加入2.39克2-亚氨基-4-硫代缩二脲(Amidinothiourea,商品)。将所述溶液回流5小时,在室温下冷却并再搅拌16小时。过滤悬浮液,弃去固体,并在减压下除去丙酮。

[0238] 固体残余物用20ml二氯甲烷溶解并用水洗涤。有机相经 $MgSO_4$ 干燥,过滤并在真空下除去溶剂,得到0.59克黄色固体形式的粗产物,其通过快速色谱法(SiO_2) (乙酸乙酯/环己烷8/2+1%TEA-乙酸乙酯99%+1%TEA作为洗脱剂)纯化,获得0.40克纯产物I(62%)。

[0239] -乙酰基的水解



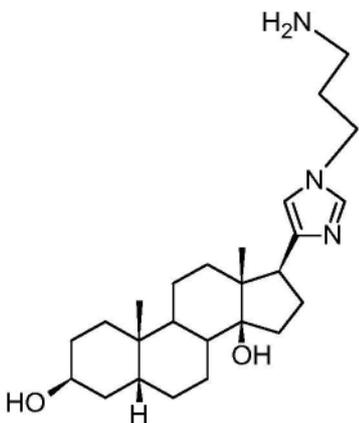
[0241] 将1.9ml的1M NaOH加入到200mg中间体I于6ml MeOH中的溶液中。将混合物在室温下搅拌24小时,然后除去溶剂。残余物用5ml水洗涤并过滤,得到131mg(78%)的白色固体形式的化合物L(CVie 105)。

[0242] 1H -NMR(d_6 -DMSO,600MHz):0.50(s,3H);0.87(s,3H);1.01-1.26(m,4H);1.26-1.58(m,6H);1.58-1.62(m,2H);1.62-1.98(m,6H);1.98-2.06(m,1H);3.20(s,1H);3.30-3.38(m,1H);3.90(s,1H);6.19(s,1H)。

[0243] 实施例6

[0244] 3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -(N-(3-氨基丙基)-咪唑-4-基)雄甾烷(CVie 106)

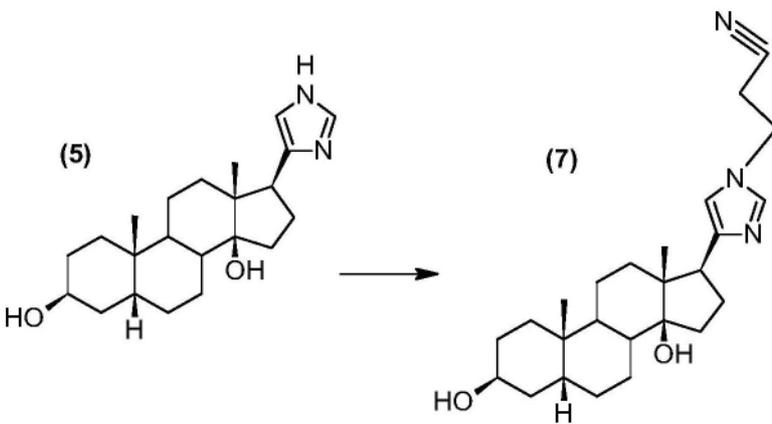
[0245]



[0246] 重复实施例1直至呈游离碱形式的最终产物5。

[0247] -制备N-(氨基烷基)衍生物

[0248]

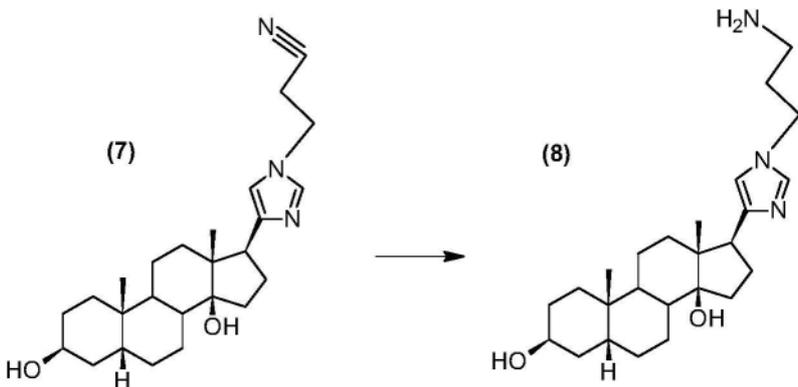


[0249] a) 腈衍生物

[0250] 向1.42克产物5于50ml DMSO中的搅拌溶液中,加入55mg K_2CO_3 和1.31ml丙烯腈,并将混合物在室温下搅拌24小时。加入150ml水,并用乙酸乙酯萃取混合物,有机相经 Na_2SO_4 干燥,过滤,并在减压下除去溶剂,得到1.71g (99%)的中间体7,其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0251] b) 腈基团的还原

[0252]

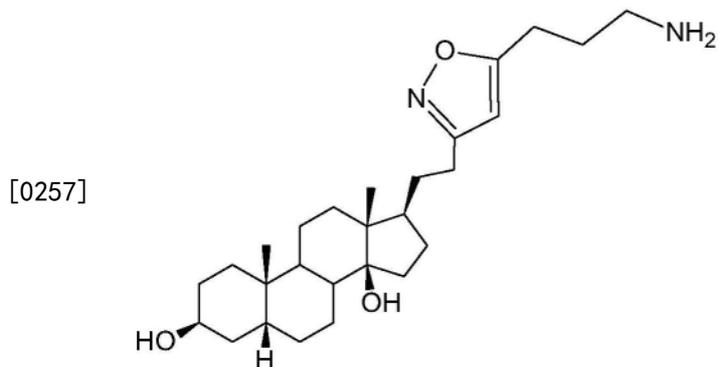


[0253] 向286mg产物7于20ml无水THF中的搅拌溶液中,逐份加入340mg $LiAlH_4$,并将混合物在80℃加热并回流16小时,然后将冷却的溶液用THF和水稀释,并加入NaOH 4N溶液直至形成白色固体。将悬浮液过滤,将固体用乙酸乙酯洗涤并通过用 $CHCl_3/MeOH/NH_3$ 9/1/0.1洗脱的快速色谱法(SiO_2)纯化,得到204mg (69%)的白色固体形式的产物8(Cvie 106)。

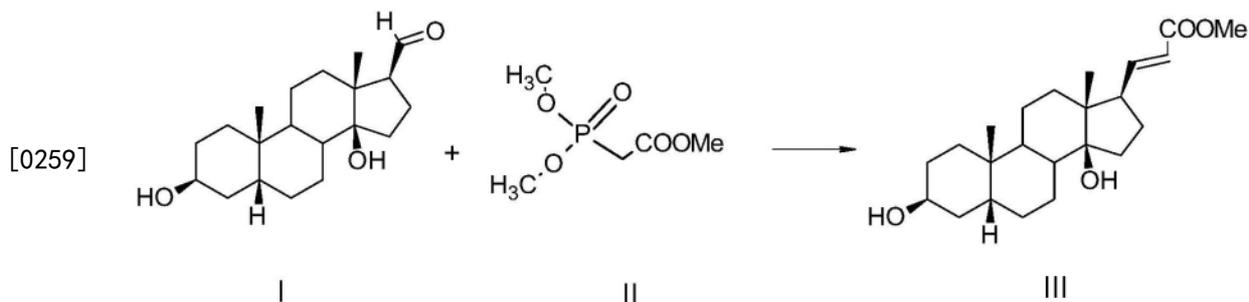
[0254] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) : 0.59 (s, 3H) ; 0.98 (s, 3H) ; 1.25-1.35 (m, 4H) ; 1.35-1.75 (m, 11H) ; 1.85-2.02 (m, 7H) ; 2.19-2.24 (m, 2H) ; 2.69-2.74 (m, 3H) ; 3.98 (t, 2H) ; 4.15 (s, 1H) ; 6.58 (s, 1H) ; 7.37 (s, 1H) 。

[0255] 实施例6

[0256] 3β -羟基- 5β - 10β -甲基- 13β -甲基- 14β -羟基- 17β -(5-(3-氨基丙基)-异噁唑-3-基)-乙基雄甾烷(Cvie108)



[0258] -从醛I至 α -不饱和酯



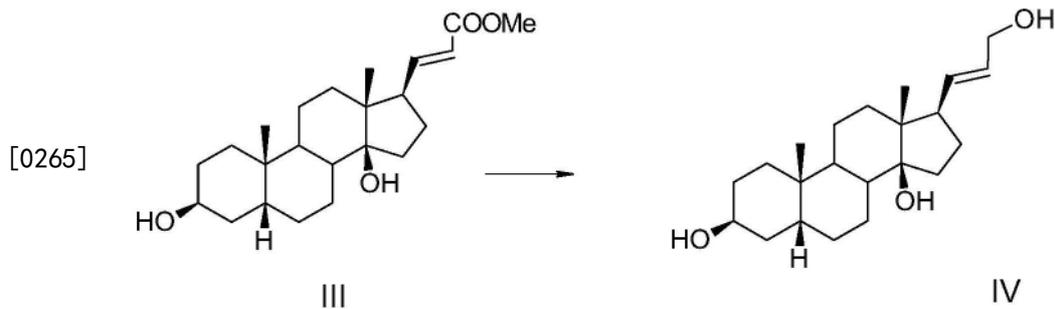
[0260] 醛I是根据Gobbini等, Synth Comm, 27(6), 1115-1122(1997) 制备的。

[0261] 在氮气气氛下, 于 0°C 下, 向2.43g NaH(55%分散在矿物油中)于73ml无水THF中的悬浮液中, 滴加8.57ml的磷酰基乙酸三甲酯II(液体, 商品)。

[0262] 将所述悬浮液在室温下放置30分钟, 然后在 0°C 下冷却。逐滴加入溶解在146ml无水THF中的10克化合物I, 并将混合物在室温下搅拌2小时。

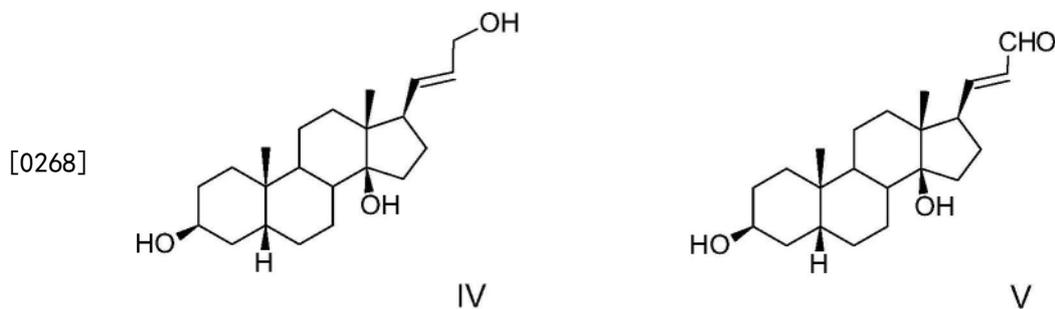
[0263] 加入100ml EtOAc, 将混合物转移至200ml的 NaH_2PO_4 溶液(5%于水中)中, 并用150ml EtOAc萃取三次。将合并的有机相在减压下浓缩至干。将固体残余物悬浮于130ml水中, 并在搅拌下保持16小时, 过滤并溶解于AcOEt和二氯甲烷中, 然后经 Na_2SO_4 干燥, 过滤并在减压下除去溶剂, 得到11g(95%)的中间体III, 其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0264] -酯还原为醇



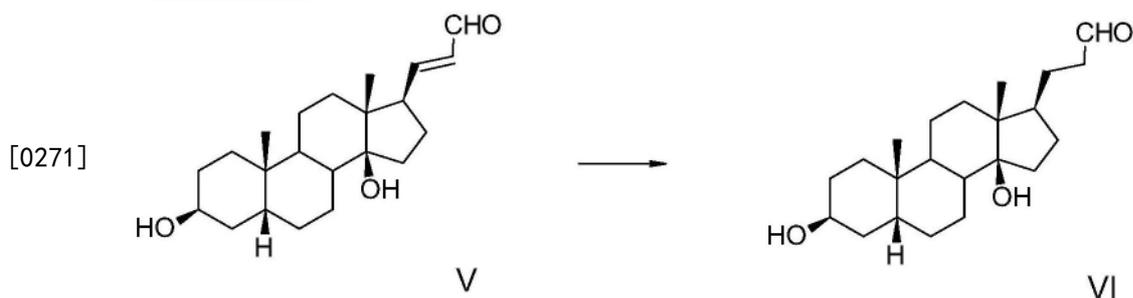
[0266] 在 N_2 气氛下,在 $-78^\circ C$ 下,向11克化合物III于450ml无水THF中的溶液中,滴加35ml纯DIBAH(内部温度升至 $65^\circ C$),并将混合物搅拌一小时。在 $-78^\circ C$ 冷却后,在30分钟内滴加500ml柠檬酸溶液(13%于水中)并在室温下搅拌1小时,然后加入50克NaCl,并用150ml EtOAc洗涤水相三次。合并的有机相用5% $NaHCO_3$ 溶液洗涤,经 Na_2SO_4 干燥,过滤并在减压下除去溶剂,得到11.9g(98%)的中间体IV,其无需任何进一步纯化即可用于下一步骤。

[0267] -醇氧化为醛



[0269] 向11.9克化合物IV于140ml二噁烷中的搅拌溶液中,加入75克 MnO_2 并将悬浮液在室温下搅拌4小时。将混合物在硅藻土垫上过滤,所述硅藻土垫用另外的150ml AcOEt洗涤。在减压下除去溶剂,并将残余物用150ml二乙醚结晶,获得8.4克化合物V(83%)。

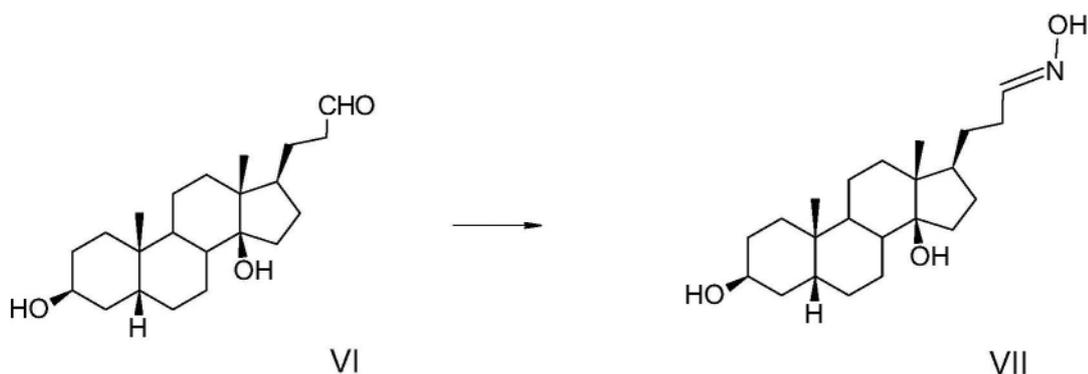
[0270] -双键的氢化



[0272] 向2.95克产物V于600ml EtOAc中的溶液中,加入55mg催化剂Pd/C(5%),并将混合物在氢气中在大气压和室温下保持一小时。将混合物在硅藻土垫上过滤,并将滤液在减压下浓缩至干,获得2.95克(99%)的产物VI。

[0273] -从醛至醇

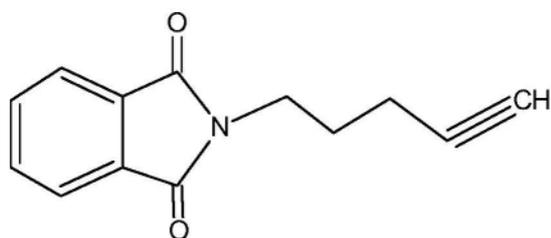
[0274]



[0275] 向2.7g化合物VI于90ml二噁烷中的搅拌溶液中,加入670mg盐酸羟胺和22.5ml的1M NaOH。将混合物在室温下搅拌90分钟,在减压下除去溶剂并用CHCl₃萃取。将有机相在减压下浓缩至干,获得3.1g(99%)的产物VII。

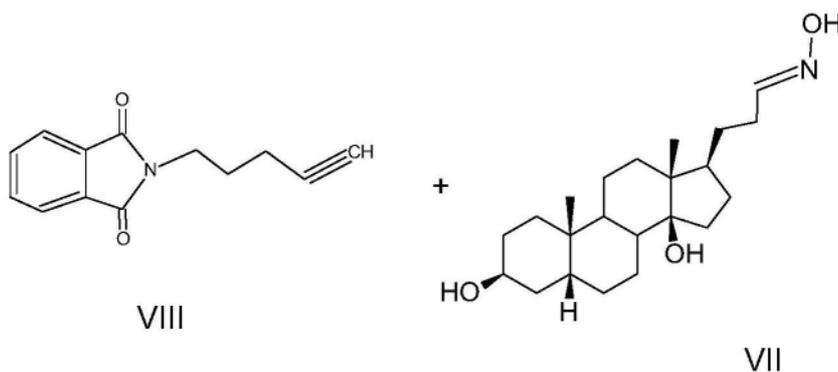
[0276] 炔炔的合成

[0277]

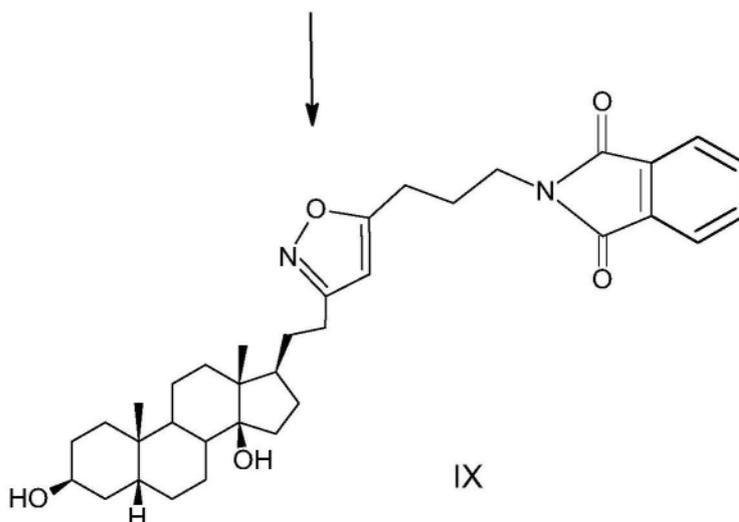


[0278] 在0℃下,向1ml 4-丙炔-1-醇于40ml无水THF中的搅拌溶液中,加入5.63克PPh₃和3.16克邻苯二甲酰亚胺。将3.35ml的1,2-乙氧基羰基二氮烯溶液(DEAD)滴加到先前的溶液中,并将混合物搅拌16小时,然后在减压下除去THF,并将残余物通过快速色谱法(SiO₂) (庚烷/二乙醚9/1作为洗脱剂)纯化,得到1.92克纯产物VIII(84%)。

[0279] 炔炔与脲偶联



[0280]

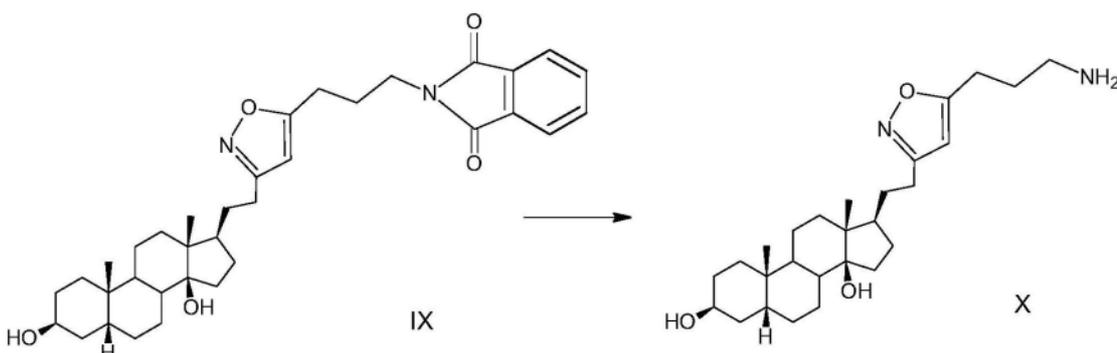


[0281] 向600mg产物VII于8ml含0.5%吡啶的氯仿中的悬浮液中,加入220mg N-氯代琥珀酰亚胺,并将混合物在 N_2 气氛下搅拌10分钟。

[0282] 滴加240mg炔烃VIII于4ml含0.24ml TEA的氯仿中的溶液,并将混合物在室温下搅拌6小时,用 $CHCl_3$ 稀释并用水洗涤。在减压下除去溶剂至干,并将残余物通过快速色谱法(SiO_2) (庚烷/丙酮/乙酸乙酯7/2/2作为洗脱剂)纯化,得到260mg纯产物IX(35%)。

[0283] 胺的恢复

[0284]

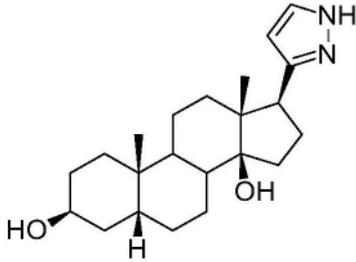


[0285] 将350mg化合物IX和0.70ml盐酸胍于22ml乙醇中的混合物回流一小时。将混合物用水稀释,在减压下除去乙醇,并将残余的含水部分用 CH_2Cl_2 萃取。在减压下除去有机相至干,并将残余物通过快速色谱法(SiO_2) ($CH_2Cl_2/MeOH/NH_3$ 9/1/0.1作为洗脱剂)纯化,得到125mg(44%)纯产物X(CVie 108)。

[0286] 实施例7

[0287] 3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β - (吡唑-3-基)雄甾烷 (Cvie 103)

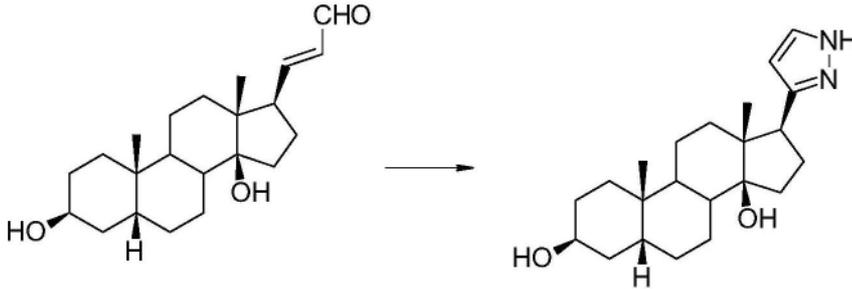
[0288]



[0289] 重复实施例6直至中间体V。

[0290] -构建吡唑环

[0291]

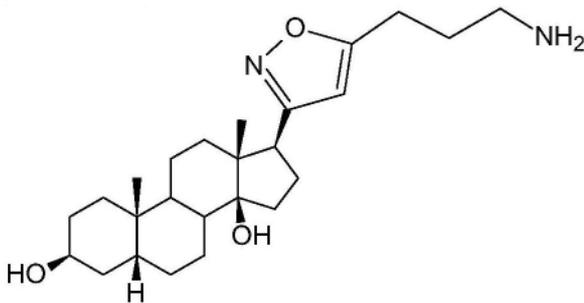


[0292] 向1克产物V于6ml乙酸中的搅拌溶液中,加入0.58克对甲苯磺酰肼。将混合物在室温下搅拌1小时,并用Na₂HPO₄溶液(5%于水中)稀释。过滤悬浮液,将固体在减压下干燥,并溶解在30ml DMF中,加入400mg叔丁醇钾。将混合物在室温下搅拌1小时,加热至80℃持续1.5小时,然后倒入水中并用二乙醚萃取三次。合并的有机相经Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下除去溶剂。残余物通过快速色谱法(SiO₂)(CH₂Cl₂/丙酮7/3/作为洗脱剂)纯化,得到296mg(29%)纯产物(Cvie 103)。

[0293] 实施例8

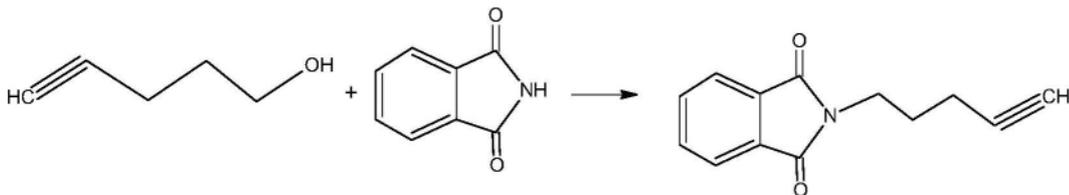
[0294] 3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -((5-(3-氨基丙基)-异噁唑-3-基))雄甾烷(Cvie 107)

[0295]



[0296] -制备炔烃

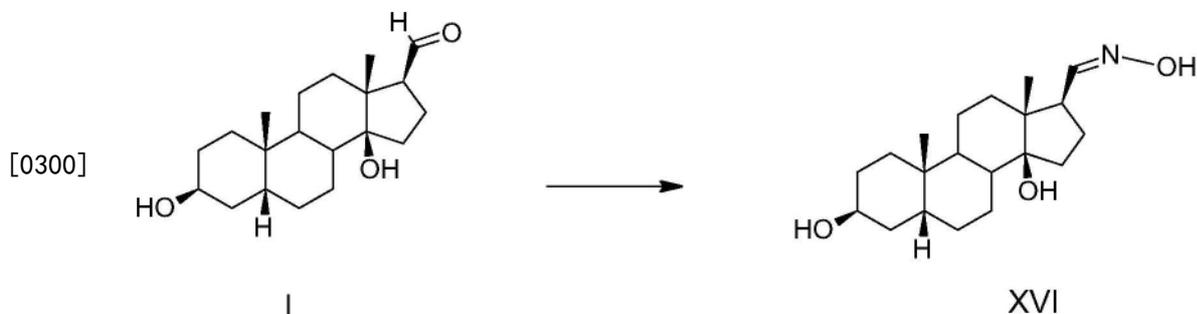
[0297]



VIII

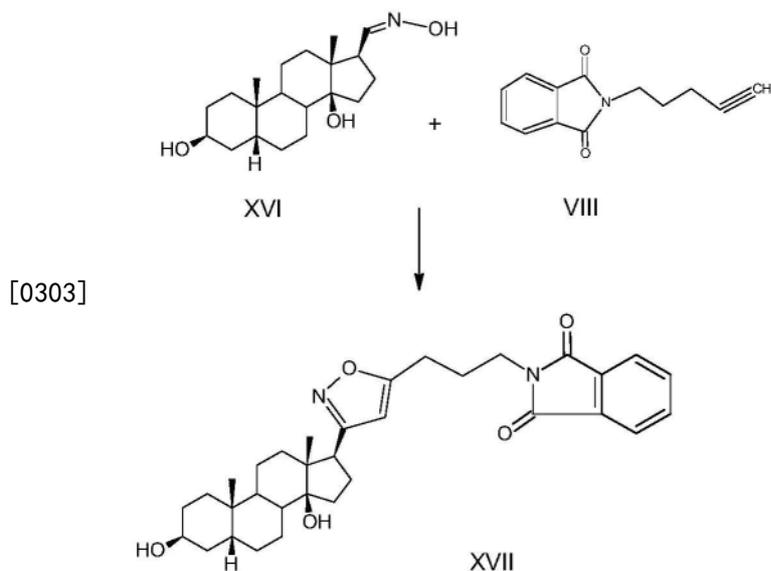
[0298] 在0℃下,向11的4-丙炔-1-醇于40ml无水THF中的搅拌溶液中加入5.63克PPh₃和3.16克邻苯二甲酰亚胺。将3.35ml的1,2-乙氧基羰基二氮烯溶液(DEAD)滴加至先前的溶液中,并将混合物搅拌16小时,然后在减压下除去THF,并将残余物通过快速色谱法(SiO₂) (庚烷/二乙醚9/1作为洗脱剂)纯化,得到1.92克纯产物VIII(84%)。

[0299] -醛至肟



[0301] 如以上实施例6中所公开来制备醛I。向24ml乙酸盐缓冲液(pH 4.7)和24ml二噁烷的搅拌溶液中,加入1.3g盐酸羟胺,并用1N HCl(5.75至4.8)校正pH。用15ml二噁烷稀释所述溶液,并滴加5克醛I于二噁烷和水(分别为40ml和16ml)中的溶液。30分钟后,加入固体NaHCO₃直至溶液达到pH 7,用EtOAc萃取溶液,将有机相用水洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下除去溶剂,得到5.4g(99%)的中间体XVI。

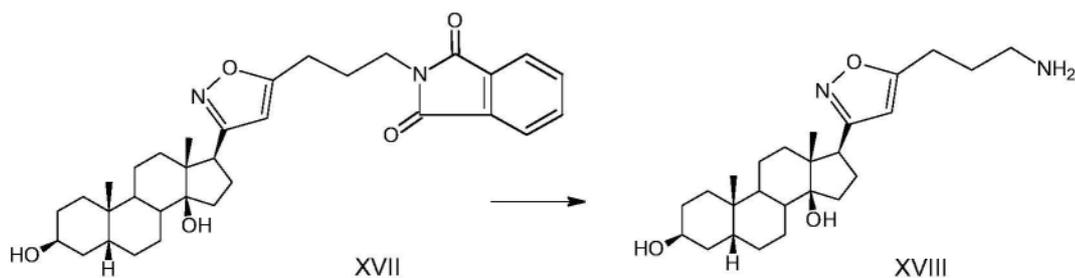
[0302] -炔烃与肟偶联



[0304] 向480mg N-氯代琥珀酰亚胺于15ml含0.5%吡啶的氯仿中的搅拌溶液中,逐份加入1.2克固体产物XVI。在氮气气氛下,滴加炔烃780mg VIII于12ml含0.5%吡啶和0.53ml TEA的氯仿中的溶液,并在45℃加热。将混合物搅拌18小时,用CHCl₃稀释并用水洗涤。在减压下除去溶剂至干,并将残余物通过快速色谱法(SiO₂) (CHCl₃/Et₂O 8/2作为洗脱剂)纯化,得到900mg纯产物XVII(45%)。

[0305] -用肟脱保护

[0306]

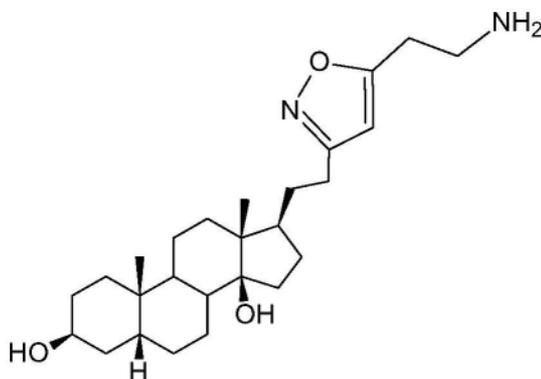


[0307] 将350mg化合物XVII和1.90ml盐酸胍于60ml乙醇中的混合物回流7小时。将混合物用水稀释,在减压下除去乙醇,并将残余的含水部分用 CH_2Cl_2 萃取。在减压下除去有机相至干,并将残余物通过快速色谱法(SiO_2) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 9/1/0.1作为洗脱剂)纯化,得到400g(60%)的纯产物XVIII(Cvie 107)。

[0308] 实施例9

[0309] 3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -(5-(2-氨基乙基)-异噁唑-3-基)-乙基)雄甾烷(Cvie 109)

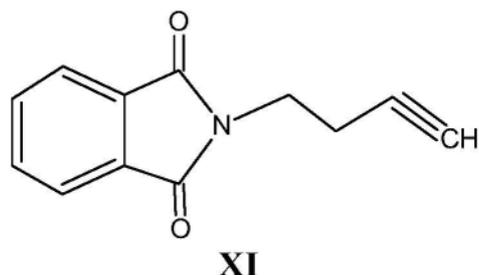
[0310]



[0311] 重复实施例6直至中间体VII。

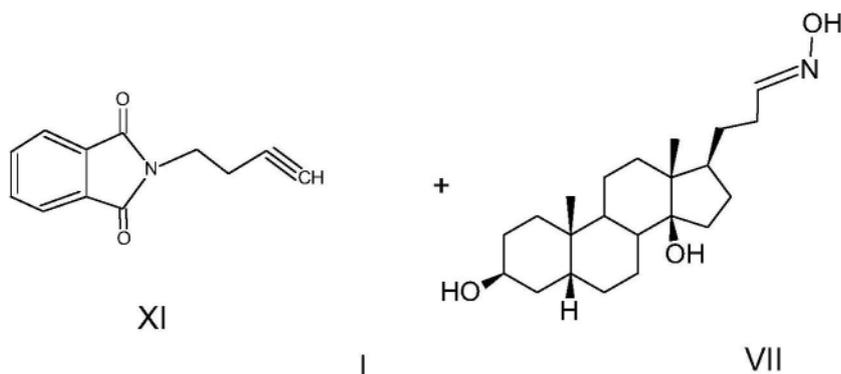
[0312] -炔烃的合成

[0313]

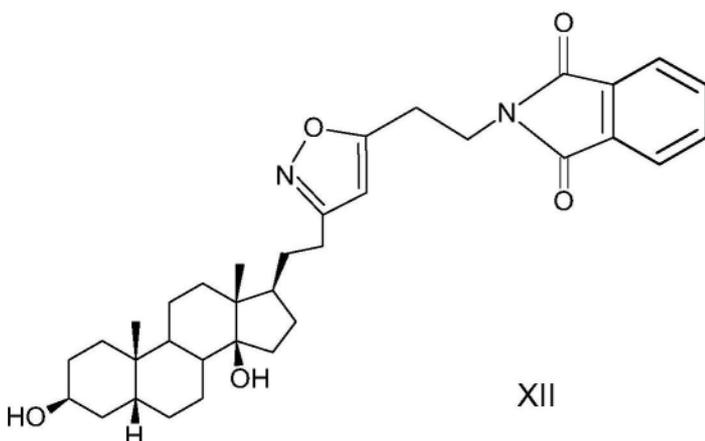


[0314] 在0℃下,向0.70ml 3-丁炔-1-醇于34ml无水THF中的搅拌溶液中,加入4.85克 PPh_3 和2.72克邻苯二甲酰亚胺。将2.89ml的1,2-乙氧基羰基二氮烯溶液(DEAD)滴加到先前的溶液中,并将混合物搅拌18小时,然后在减压下除去THF,并将残余物通过快速色谱法(SiO_2) (庚烷/二乙醚9/1作为洗脱剂)纯化,得到400mg的纯产物XI(21%)。

[0315] -炔烃与脲偶联

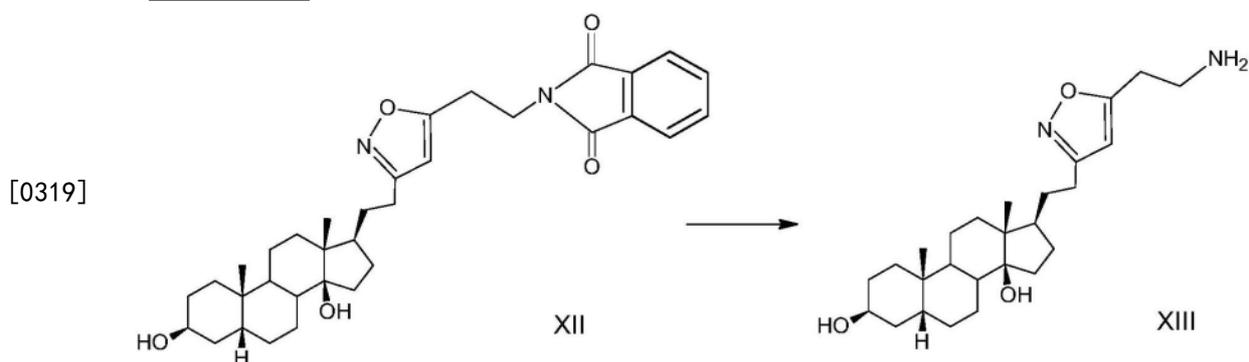


[0316]



[0317] 向950mg产物VII于12ml含0.5%吡啶的氯仿中的悬浮液中,加入348mg N-氯代琥珀酰亚胺,并将混合物在 N_2 气氛下搅拌10分钟。滴加600mg炔烃XI于6ml含0.38ml TEA的氯仿中的溶液,并将混合物在室温下搅拌6小时,用 $CHCl_3$ 稀释并用水洗涤。在减压下除去溶剂至干,并将残余物通过快速色谱法(SiO_2) (环己烷/丙酮/氯仿7/2/2作为洗脱剂)纯化,得到330mg纯产物XII(35%)。

[0318] -用肼脱保护



[0319]

[0320] 将480mg化合物XII和0.90ml盐酸肼于27ml乙醇中的混合物回流一小时。将混合物用水稀释,在减压下除去乙醇,并将残余的含水部分用 CH_2Cl_2 萃取。在减压下除去有机相至干,并将残余物通过快速色谱法(SiO_2) ($CHCl_3/MeOH/NH_3$ 95/5/0.5作为洗脱剂)纯化,得到130mg(36%)的纯产物XIII(CVie 109)。

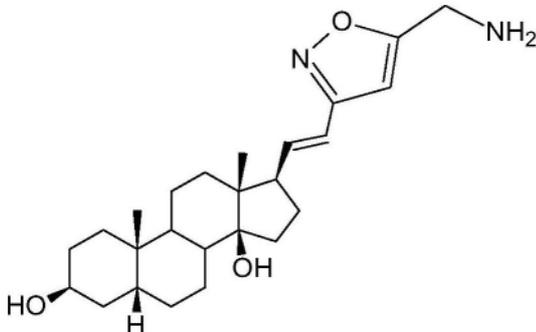
[0321] -制备药学上可接受的盐

[0322] 向36mg产物XIII于1ml EtOH中的搅拌溶液中,加入4.7mg富马酸于0.2ml EtOH中的溶液。在3ml的二乙醚中进行结晶,并将获得的固体过滤,获得25mg的富马酸盐。

[0323] 实施例10

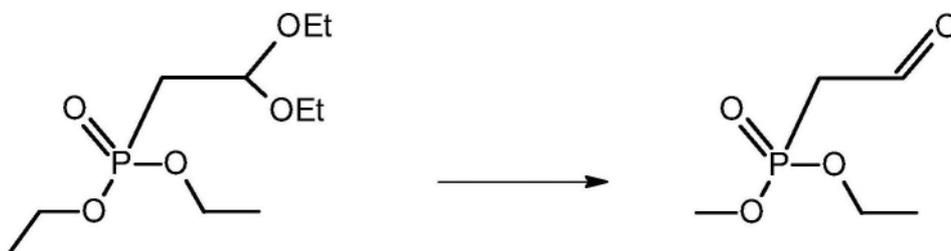
[0324] 3 β -羟基-5 β -10 β -甲基-13 β -甲基-14 β -羟基-17 β -(5-(2-氨基甲基)-异噁唑-3-基)-乙烯基)雄甾烷(Cvie 110)

[0325]



[0326] -制备磷酸酯

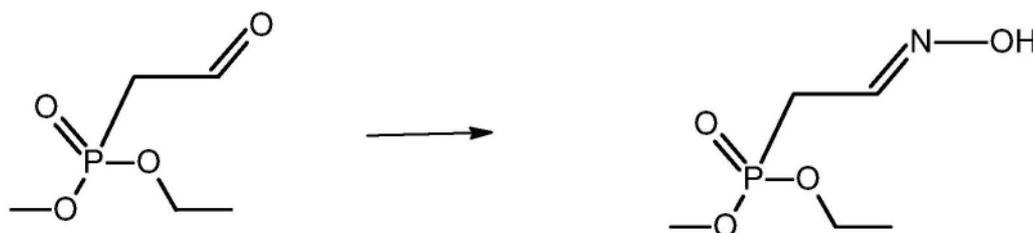
[0327]



[0328] I步骤:将磷酸酯(Acetal)于45ml HCl(2%于水中)中的溶液回流10分钟,并在室温下冷却。加入17克NaCl,并用CH₂Cl₂萃取混合物,有机相用NaHCO₃(5%于水中)和盐水洗涤,然后经Na₂SO₄干燥,过滤,并在减压下除去溶剂,获得10.6克醛。

[0329] II步骤:

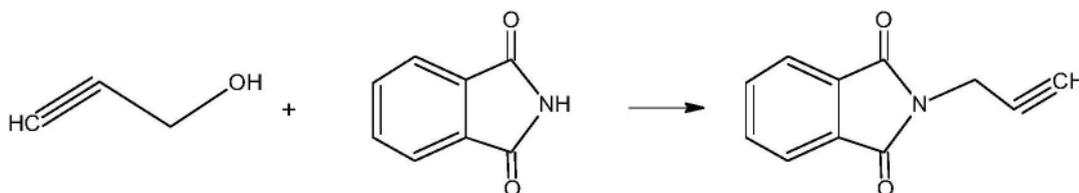
[0330]



[0331] 在0℃下搅拌5克盐酸羟胺和5.8克Na₂CO₃十水合物于45ml水中的溶液,并滴加10克醛于30ml水中的溶液。将混合物在室温搅拌24小时,然后用NaCl饱和并用CH₂Cl₂萃取。有机相用10ml水洗涤,并在减压下除去溶剂,获得10克肟。

[0332] -制备炔烃

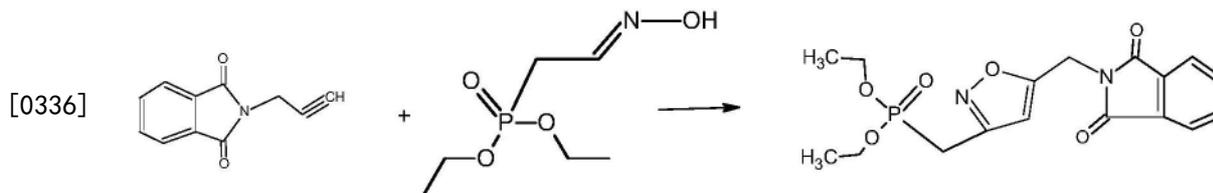
[0333]



[0334] 在氮气气氛下于0℃下向4ml的2-丙炔-1-醇于250ml无水THF中的搅拌溶液中,加入36.5克PPh₃和20.5克邻苯二甲酰亚胺,然后滴加22ml DEAD,并将混合物搅拌16小时。将

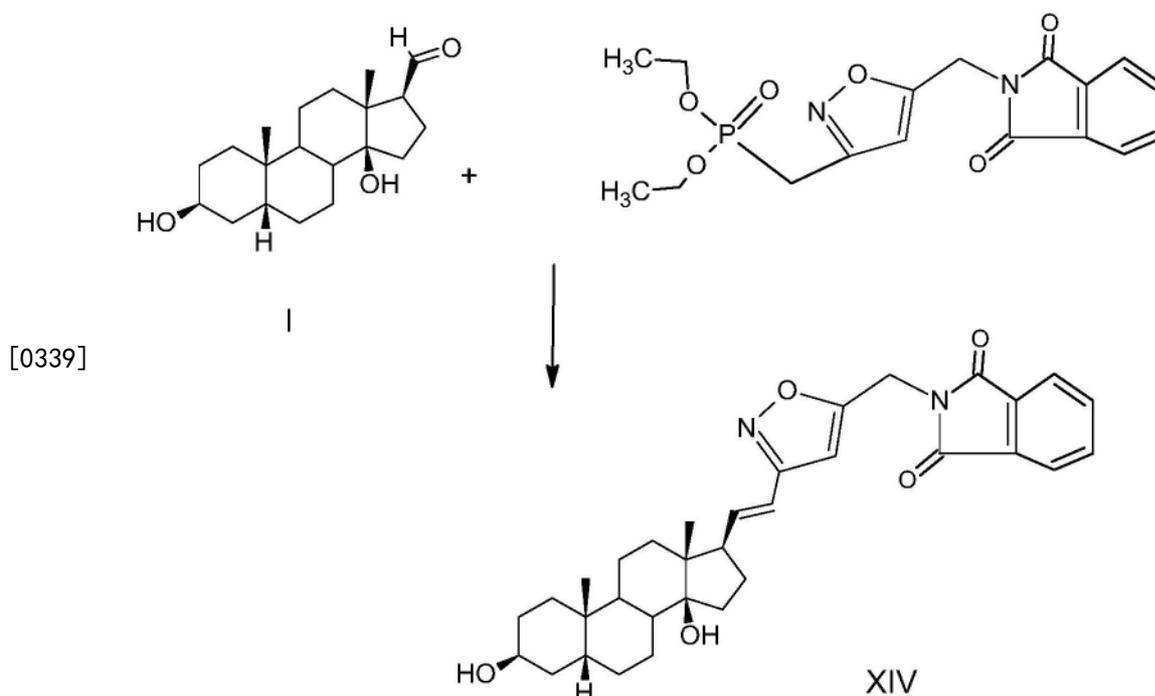
所得固体过滤并通过快速色谱法 (SiO_2) (环己烷/AcOEt 95/5作为洗脱剂) 纯化, 并进一步用MeOH结晶, 得到3.8克 (30%) 的炔烃。

[0335] - 肟与炔烃偶联



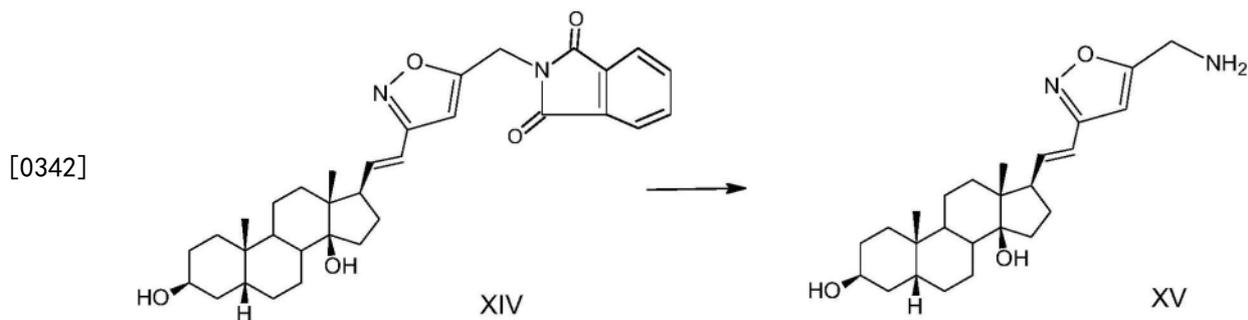
[0337] 向1.26克N-氯代琥珀酰亚胺于15ml CHCl_3 中的悬浮液中, 加入6微升吡啶和肟于15ml CHCl_3 中的溶液, 并在5分钟后逐份加入2克先前制备的固体炔烃。将混合物加热至50 $^\circ\text{C}$, 并在一小时内滴加含1.4ml TEA的5ml CHCl_3 。搅拌8小时后, 用水淬灭反应并分离有机相, 在减压下除去溶剂, 并将粗残余物通过快速色谱法 (SiO_2) (CH_2Cl_2 /二乙醚1/1作为洗脱剂) 纯化, 得到1克 (20%) 的纯产物磷酸酯。

[0338] - 醛I与磷酸酯偶联



[0340] 在氮气气氛下, 于0 $^\circ\text{C}$ 下, 向290mg NaH (55%分散在矿物油中) 于14ml无水THF中的悬浮液中, 滴加2.5克磷酸酯于30ml无水THF中的溶液。将所述悬浮液在室温下放置30分钟, 然后在0 $^\circ\text{C}$ 下冷却。以小份加入1.0克按照实施例6制备的化合物I, 并将混合物在室温下搅拌6小时。将所述溶液用 NaH_2PO_4 (5%水溶液) 处理, 并用 CHCl_3 萃取。在减压下除去有机相至干, 并通过快速色谱法 (SiO_2) (庚烷/二乙醚/丙酮6/3/1作为洗脱剂) 纯化2.6克粗残余物, 得到370mg (10%) 纯产物XIV。

[0341] - 用肼脱保护



[0343] 将370mg化合物XIV和0.70ml盐酸胍于22ml乙醇中的混合物回流90分钟。将混合物用水稀释,在减压下除去乙醇,并将残余的含水部分用 CH_2Cl_2 萃取。在减压下除去有机相至干,并将残余物通过快速色谱法(SiO_2) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 95/5/0.5作为洗脱剂)纯化,得到150mg(54%)的纯产物XV(Cvie 110)。

[0344] -制备药学上可接受的盐

[0345] 向153mg产物XV于6ml EtOH中的搅拌溶液中,加入21.5mg富马酸于1.5ml EtOH中的溶液。加入10ml己烷,然后除去溶剂,以定量产率获得玻璃状固体。

[0346] 生物活性

[0347] 实施例11

[0348] -程序

[0349] 动物护理

[0350] 所述研究符合美国国立卫生研究院(National Institute of Health)出版的《实验动物的护理和使用指南》(NIH出版物编号85-23,1996年修订)以及参与机构认可的动物护理指南。

[0351] 无细胞制剂中的生物化学测量

[0352] 狗肾Na,K-ATP酶的纯化和Na,K-ATP酶活性测定

[0353] 肾Na,K-ATP酶的纯化是根据Jørgensen的方法(Methods Enzymol.1988;156:29-43)进行的。在戊巴比妥麻醉(意大利卫生部进口授权0009171-09/04/2015-DGSAF-COD_UO-P,2015)下从1-3岁的雄性比格犬(无锡AppTec,苏州有限公司,中国苏州市吴中区吴中大街1318号,215104)中切除肾脏。将肾脏切片,并将外延髓切开,汇集并悬浮(1g/10ml)于蔗糖-组氨酸溶液中,所述溶液含有250mM蔗糖、30mM组氨酸和5mM EDTA pH 7.2,并匀浆化。将匀浆以6,000g离心15分钟,倒出上清液,并以48,000g离心30分钟。将团粒悬浮在蔗糖-组氨酸缓冲液中,并与十二烷基硫酸钠(SDS)溶液一起温育20分钟,所述溶液溶解在含有25mM咪唑和1mM EDTA pH 7.5的梯度缓冲液中。样品在蔗糖不连续梯度(10%、15%和29.4%)的顶部分层,并以60,000g离心115分钟。将团粒悬浮在梯度缓冲液中。

[0354] 如所述(Ferrandi M.等,Hypertension 1996;28(6):1018-25),通过测量 ^{32}P -ATP的释放,“体外”测定Na,K-ATP酶活性。将浓度递增的标准哇巴因(ouabain)或被测化合物与0.3 μg 纯化的狗肾酶在120 μl 最终体积的培养基中在37 $^\circ\text{C}$ 下温育10分钟,所述培养基含有140mM NaCl、3mM MgCl_2 、50mM HEPES-Tris、3mM ATP,pH 7.5。然后,加入10 μl 含有10mM KCl和20nCi的 ^{32}P -ATP(3-10Ci/mmol,Perkin Elmer)的温育溶液,在37 $^\circ\text{C}$ 下继续反应15分钟,并通过用20%v/v冰冷的高氯酸进行酸化来终止反应。通过与活性炭(Norit A,Serva)离心分离出 ^{32}P ,并测量放射性。抑制活性表示为在不存在哇巴因或被测化合物的情况下进行的对

照样品的百分比。通过使用多参数非线性回归最佳拟合程序 (Kaleidagraph™, Synergy Software) 计算引起Na, K-ATP酶活性的50%抑制的化合物浓度 (IC_{50})。

[0355] 心脏肌浆网 (SR) 微粒体中SERCA2a活性的测量

[0356] 解剖左心室组织, 在4体积的10mM $NaHCO_3$ pH 7、1mM PMSF、10 μ g/ml抑肽酶和亮抑肽酶中匀浆化, 并以12,000g离心15分钟, 如所公布 (Nediani C. 等, J Biol Chem. 1996; 271:19066-73)。将上清液过滤并以100,000g离心30分钟。通过将团粒用0.6M KCl、30mM组氨酸pH 7悬浮并以100,000g进一步离心30分钟来提取收缩蛋白。最终的团粒用0.3M蔗糖、30mM组氨酸pH 7重构。

[0357] 如所述 (Micheletti R. 等, Am J Card 2007; 99:24A-32A), 在不存在和存在被测化合物的情况下, 在不同 Ca^{2+} 浓度 (100-4000nM) 下以 ^{32}P -ATP水解的形式体外测量SERCA2a活性。将递增浓度的每种化合物 (从1至100nM) 与2 μ g微粒体在4 $^{\circ}C$ 下在80 μ l含100mM KCl、5mM $MgCl_2$ 、1 μ M A23187、20mM Tris pH 7.5的溶液中预温育5分钟。然后, 加入20 μ l含50nCi的 ^{32}P -ATP (3-10Ci/mmol, Perkin Elmer) 的5mM Tris-ATP。在37 $^{\circ}C$ 下继续ATP水解15分钟, 并通过用100 μ l的20% v/v冰冷的高氯酸进行酸化来终止反应。通过与活性炭 (Norit A, SERVA) 离心分离出 ^{32}P , 并测量放射性。SERCA2a依赖性活性被鉴定为被10 μ M环匹阿尼酸抑制的总水解活性的一部分 (Seidler NW. 等, J Biol Chem. 1989; 264:17816-23)。

[0358] 通过使用S形曲线拟合软件拟合剂量-反应曲线, 并计算最大速度 (V_{max}) 活性和 K_d Ca^{2+} (Synergy软件KaleidaGraph 3.6)。

[0359] 离体心室心肌细胞的测量

[0360] 表征化合物对以下的影响: (i) SR Ca^{2+} 摄取功能, (ii) 通过逆向冠状动脉灌注酶溶液从豚鼠心室新鲜解离的心肌细胞中的动作电位 (AP) (Rocchetti M等, J Pharmacol Exper Therap 2005; 313(1):207-215)。

[0361] SR Ca^{2+} 摄取功能 (“装载方案”)

[0362] 药物对SR Ca^{2+} 摄取速率的影响是通过SR“装载方案”评估的, 所述方案专门设计用于排除Na/Ca交换体 (NCX) 的贡献并评估从低水平SR Ca^{2+} 装载量开始的摄取速率。在电压钳制条件下, 通过落射荧光 (Fluo4-AM) 动态测量细胞内 Ca^{2+} 浓度。同时记录膜电流, 该膜电流的时间依赖性成分主要反映了ICaL。SR装载方案包括清空SR (通过短暂的咖啡因脉冲), 然后通过激活通过肌膜 Ca^{2+} 通道 (ICaL) 的 Ca^{2+} 流入的电压阶跃渐进性地重新填充它。NCX被细胞内和细胞外溶液中的 Na^+ 遗漏所阻断。所述程序与已公布的方法相符, 但稍有修改 (Rocchetti M等, J Pharmacol Exper Therap 2005; 313(1):207-215)。

[0363] 通过考虑多个参数来分析药物对SR Ca^{2+} 摄取的影响: 1) 装载方案期间 Ca^{2+} 瞬态 (CaT) 幅度增加的速率, 这反映了SR重新填充的速率; 和2) 每个脉冲内的胞质 Ca^{2+} 衰减 ($\tau_{\text{衰减}}$) 的时间常数, 反映了穿过SR膜的净 Ca^{2+} 传输速率 (通过SERCA2a) ($\tau_{\text{衰减}}$ 的减少对应于SR Ca^{2+} 摄取的增强)。

[0364] “装载方案”在检测SERCA2a激活中的特异性得到了以下观察结果的支持: 它没有检测到地高辛 (一种阻断 Na^+/K^+ 泵的肌力药, 但缺乏SERCA2a刺激作用) 的任何作用 (Rocchetti M等, J Pharmacol Exp Ther 2005; 313:207-215; Alemanni M等, JMCC 2011; 50:910-918)。

[0365] 动作电位测量

[0366] 动作电位(AP)轮廓提供了对膜离子通道整合功能的第一线估计,并且其变化可能揭示了辅助动作,可能导致化合物的不良作用。为了增加AP轮廓作为报告者的敏感性,还测试了对AP参数的速率依赖性的影响,从而提供了一种多参数(更严格)的方法。

[0367] 在36.5℃的标准Tyrode溶液中记录了AP。在4种刺激速率(0.5-1-2-4Hz)下测量以下参数:舒张膜电位($E_{舒张}$),最大去极化速度(dV/dt_{max}),动作电位持续时间(在90%、50%和20%复极化下的APD),在刺激速率发生阶跃变化后APD适应的时间常数(τ)。稳态起搏期间的短期APD变异性(STV)是复极化稳定性的指标,是从 APD_n - $fAPD_{n+1}$ 曲线(Poincaré曲线)中与身份线的绝对正交偏差之和测量的(Altomare C等,Circulation A&E 2015;8:1265-1275)。

[0368] 大鼠中的药物生物利用度研究

[0369] 中国Sundia MediTech Service已测量了大鼠中的生物利用度。将被测化合物CVie 101以1mg/kg静脉内输注并以10mg/kg经口施用。从时间0至时间24小时以时间间隔测量被测化合物的血浆浓度,并通过LC-MS方法检测。计算出F(%)。

[0370] 小鼠中的药物毒性研究

[0371] 194.已在小鼠(Albino Swiss CD-1,体重30g)中确定了急性毒性。用单次施用递增剂量的测试物质对小鼠进行经口治疗或静脉内注射,以鉴定引起50%死亡率的剂量。死亡发生在施用后30分钟内,并存活在24小时后。然后评估急性毒性(LD₅₀)。

[0372] 用于豚鼠中的肌力和致死剂量测定的血流动力学研究

[0373] 用尿烷(1.5g/kg ip)麻醉豚鼠(400-450g)。将微尖端压力传感器通过右颈动脉引入左心室,以测量心室压力(LVP);将传感器与传感器放大器耦合。将记录送入多项记录器并进行分析。将聚乙烯套管插入颈静脉以输注药物。在稳定期之后,将测试物质以0.16ml/min的速率注射90分钟(Micheletti R等,J Pharmacol Exp Ther 2002;303:592-600)。

[0374] 获得以下参数:心率(HR)、左心室压力(LVP)、压力上升(+dP/dtmax)和衰减(-dP/dtmax)的最大速度、ECG。对于肌力,鉴定直到+dP/dtmax增加80%为止所经过的时间,以确定ED80(使基础+dP/dtmax增加80%的剂量)。还鉴定了达到+dP/dtmax最大增加的时间,以确定最大有效剂量EDmax。舒张(lusitropy)通过引起-dP/dtmax的最大降低(EDmax)的剂量来表征。作为毒性的指标,计算直到心律失常发作为止的施用剂量和诱导死亡的剂量(LD)。被测化合物的安全性比值也计算为LD与ED80的比值。

[0375] 与以0.016mg/kg/min施用90分钟的参考化合物地高辛相比,CVie 101以0.2和0.4mg/kg/min静脉内输注。

[0376] 链脲佐菌素糖尿病大鼠中的血流动力学研究(超声心动图2M-多普勒-组织多普勒)

[0377] 通过在0.1M柠檬酸钠缓冲液pH 4.5中新鲜制备的链脲佐菌素溶液(STZ,50mg/kg, Sigma-Aldrich)的尾静脉单次注射,使Sprague Dawley雄性大鼠(150-175g)患上糖尿病。对照大鼠接受柠檬酸盐缓冲液。1周后测量空腹血糖,并将值>400mg/dl的大鼠视为糖尿病的。

[0378] STZ注射后八-九周,使大鼠接受在戊巴比妥麻醉下进行的经胸廓超声心动图和多普勒评估。二维引导的M型记录用于获得左心室舒张末期直径(LVEDD)、左心室舒张末期直径(LVESD)、后壁(PW)和隔膜(SW)舒张期壁厚的短轴测量结果,根据美国超声心动图学会指

南(Lang RM等,Eur J Echocardiography 2006;7:79-108)。缩短分数计算为 $FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD$ 。相对壁厚计算为 $PWTd + IVSTd / LVEDD$ 。

[0379] 通过脉冲多普勒在来自心尖四腔视图的二尖瓣小叶尖端测量二尖瓣流入,以获得早期和晚期充盈速度(E,A)以及早期充盈速度的减速时间(DT)。将减速斜率计算为E/DT比值。二尖瓣减速指标计算为DT/E比值。

[0380] 从心尖四腔视图评估组织多普勒成像(TDI),以记录隔膜二尖瓣环运动,即峰值心肌收缩(s')以及舒张早期和晚期速度(e'和a')。

[0381] 将化合物CVie 101经口施用于STZ注射的大鼠,剂量为20mg/kg,并在1小时后测量超声心动图参数。地高辛(20mg/kg os)用作参考药物。

[0382] 统计分析

[0383] 整个动物实验:数据报告为平均值±SD。通过Student t检验(配对t检验)进行统计分析。

[0384] 离体心肌细胞实验:数据报告为平均值±SE。对于重复测量,通过双因素ANOVA比较包括多个平均值的曲线;根据“X因子组”相互作用的重要性定义药物引起的总体曲线陡度变化。由于 Ca^{2+} 衰减的单指数拟合不充分,因此在报告了CaT数据的少许细胞中未估计 $\tau_{\text{衰减}}$;图1中报告的样本大小(N)(对于CVie 101为 $N \geq 13$ 并且对于CVie 102为 $N \geq 11$)是指所有参数均可用的细胞。STV对平均APD的依赖性通过线性回归进行量化。

[0385] 在所有比较中, $P < 0.05$ 被认为是统计学显著的。

[0386] 生物学结果

[0387] -体外筛选

[0388] 抑制犬肾Na,K-ATP酶活性

[0389] 被测化合物抑制了纯化的Na,K-ATP酶的酶活性, IC_{50} 以 μM 表示,如表1所示。已将化合物与参考药物地高辛和异羟基洋地黄毒苷进行比较(表1)。

[0390] 表1对犬肾Na,K-ATP酶的抑制作用

[0391]

化合物	IC_{50} (μM)
地高辛	0.3
异羟基洋地黄毒苷	0.23
CVie 101	0.71
CVie 102	1.7
CVie 103	4.0
CVie 104	1.61
CVie 105	0.53
CVie 106	10.0
CVie 107	0.15
CVie 108	3.3
CVie 109	1.0
CVie 110	0.33

[0392] 正常犬的心脏来源的SR微粒体中的SERCA2a ATP酶活性

[0393] 在1-100nM的浓度范围内针对SERCA2a活性对化合物进行测试。对于正常犬制剂中

的测量,化合物的作用已表示为在不存在化合物的情况下操作的对照样品的SERCA2a Vmax活性增加%(表2)。数据为平均值±SD,n=实验次数,*至少p<0.05。

[0394] 在纳摩尔浓度下,被测化合物刺激了正常犬心脏制剂的SERCA2aVmax活性(表2)。这些结果表明被测化合物的舒张作用。与这些不同的是,地高辛不能刺激SERCA2a活性(Rocchetti M等,J Pharmacol Exp Ther 2005;313:207-215;Ferrandi M等,Br J Pharmacol 2013;169:1849-61)。

[0395] 表2正常犬的心脏来源的SR微粒体中的SERCA2a ATP酶活性

化合物	浓度 nM	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质) 平均值±SD	相对于对照的增加% *p<0.05
CVie 101	0	2.373 ± 0.079 (n=7)	0
	10 nM	2.737 ± 0.336 (n=7)	15%*
	100 nM	2.832 ± 0.198 (n=7)	19%*
CVie 102	0	2.359 ± 0.192 (n=11)	0
	1 nM	2.949 ± 0.321 (n=6)	25%*
	10 nM	2.660 ± 0.232 (n=12)	13%*
CVie 103	0	2.320 ± 0.149 (n=7)	0
	10 nM	2.569 ± 0.278 (n=7)	11%*
	100 nM	2.688 ± 0.285 (n=7)	16%*
CVie 104	0	1.290 ± 0.138 (n=4)	0
	1 nM	1.437 ± 0.158 (n=4)	11%*
	10 nM	1.551 ± 0.275 (n=4)	20%*
CVie 106	0	2.553 ± 0.216 (n=6)	0
	1 nM	3.113 ± 0.157 (n=3)	22%*
	10 nM	2.935 ± 0.403 (n=3)	15%
CVie 107	0	2.346 ± 0.109 (n=3)	0
	10 nM	2.508 ± 0.339 (n=3)	7%
	100 nM	2.751 ± 0.171 (n=3)	17%*
CVie 108	0	2.562 ± 0.214 (n=8)	0
	1 nM	2.94 ± 0.306 (n=3)	15%
	10 nM	2.980 ± 0.441 (n=4)	16%*
CVie 109	0	2.518 ± 0.244 (n=4)	0
	10 nM	2.859 ± 0.504 (n=4)	14%
	100 nM	2.889 ± 0.305 (n=4)	15%*
CVie 110	0	2.457 ± 0.198 (n=5)	0
	1 nM	2.924 ± 0.549 (n=3)	19%
	10 nM	2.903 ± 0.188 (n=3)	18%*

[0397] -完整心肌细胞中的研究

[0398] 豚鼠离体心肌细胞中的功能评估

[0399] SR Ca^{2+} 摄取功能(“装载方案”)

[0400] CVie 101(100nM)增加了SR重载期间的 Ca^{2+} 瞬态(CaT)的增加速率(图1A),并且一旦CaT幅度达到阈值(在第5次脉冲时),降低每个脉冲内胞质 Ca^{2+} 衰减的时间常数($\tau_{\text{衰减}}$,图1B)。

[0401] 类似地, CVie 102 (100nM) 在方案期间增加了CaT的增加速率 (图1C), 并降低了每个脉冲内的 $\tau_{\text{衰减}}$ (图1D)。

[0402] 这些结果趋于表明CVie 101和CVie 102显著增加了SR对Ca²⁺的摄取。在所应用的实验条件下, SERCA2a完全支持SR Ca²⁺摄取; 因此, 结果是两种试剂一致地激活SERCA2a。

[0403] 动作电位测量

[0404] 动作电位 (AP) 轮廓提供了对膜离子通道整合功能的估计, 并且其变化可能揭示了辅助动作, 可能会导致化合物的不良作用。为此, 评估了药物对AP参数的影响。在对SERCA2a产生显著影响的相同浓度下 (100nM), CVie 101不会影响舒张膜电位 ($E_{\text{舒张}}$, 图2A)、最大去极化速度 (dV/dt_{max} , 图2B)、动作电位持续时间 (在90%、50%和20%的复极化下的APD) 及其在稳态下的周期长度依赖性 (图2C)。周期长度逐步变化后, APD适应的时间常数 (τ) 并未因药物而缩短 (图2D)。短期APD变异性 (STV), 分别在4种不同的频率 (0.5-1-2-4Hz) 下测量 (图3A-B-C-D), 或合并在一起 (图3E), 也不受CVie 101的影响。这些结果表明CVie 101不会影响肌细胞电活动。

[0405] CVie 102是与CVie 101在结构上相关的化合物, 因此CVie 102尚未针对AP参数进行测试, 因为预期它是非活性的。

[0406] 总的来说, 用于AP分析的多参数方法清楚地表明了CVie 101不存在对心脏电活动的不良药物作用。这同样适用于CVie 102。因此, 这两种分子是用于SERCA2a调节的选择性化合物 (正性舒张药物)。

[0407] -体内研究

[0408] 大鼠中的生物利用度

[0409] 中国Sundia MediTech Service已在静脉内注射 (i.v.) 1mg/kg和口服施用 (os) 10mg/kg的大鼠中测量了CVie 101的生物利用度。从时间0至时间24小时以时间间隔测量了被测化合物CVie 101的血浆浓度, 并通过LC-MS方法检测 (图4)。已计算出F值 (%), 并且结果为66.3% (表3)。

[0410] 表3大鼠中CVie 101的生物利用度参数

生物利用度参数		
	平均值	SD
HL_λ_z (T1/2.h)	2.21	0.72
Tmax (h)	0.50	0.00
Cmax (ng/mL)	1020.9	340.4
AUC _{最后} (h*ng/mL)	2428.5	1540.3
AUCINF_pred (h*ng/mL)	2493.7	1494.0
MRT _{最后} (h)	2.03	0.56
Vz_F_pred (L/kg)	14.29	5.03
Cl_F_pred (L/h/kg)	4.88	2.19
λz 计算时间范围(h)	NA	NA
F (%)	66.3	42.07

[0411]

[0412] 小鼠中的急性毒性

[0413] 已在小鼠 (Albino Swiss CD-1, 体重30g) 中确定了被测化合物CVie 101的急性毒性。已经以递增剂量经口施用或静脉内注射CVie 101, 以鉴定引起50%死亡率的剂量。死亡发生在施用后30分钟内, 并存活在24小时后。

[0414] CVie 101急性毒性的结果报告于表4中。作为比较, 根据文献数据, 参考化合物地高辛的急性毒性也包括在内 (www.lookchem.com, 关于静脉内地高辛, 参考: Afifi AM, Ammar EM. Pharmacological Research Communications. 第6卷, 第417页, 1974; 关于口服地高辛, 参考: Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie. 第153卷, 第436页, 1965) (表4)。

[0415] 表4地高辛和CVie 101在小鼠中的急性毒性 (LD₅₀)

[0416]	化合物	LD ₅₀ mg/kg
	静脉内 CVie 101	20
	口服 CVie 101	350
[0417]	静脉内地高辛 来自文献的数据	7.7
	口服地高辛 来自文献的数据	17.8

[0418] 豚鼠中的肌力和致死剂量

[0419] 在0.016mg/kg/min的地高辛、0.2和0.5mg/kg/min的CVie 101以及0.3mg/kg/min的CVie 102缓慢静脉内输注90分钟后, 在豚鼠中测量血流动力学参数。表5总结了所述参数。CVie 101在1.6和2.34mg/kg的累积剂量下产生dP/dtmax增加达到80% (ED80), 并且在3.73和7.49mg/kg的剂量 (EDmax) 下, 峰值相比于基值分别为163.6%和278.7%。CVie 102在3.8mg/kg的累积剂量下以ED80产生dP/dtmax增加, 并且在8.6mg/kg的剂量 (EDmax) 下, 峰值相比于基值为138.3%。地高辛在0.96mg/kg的累积剂量 (EDmax) 和0.69mg/kg的ED80下提供128%增加。就致死剂量 (LD)、死亡/治疗动物数目和LD/ED80比值而言, CVie 101和CVie 102的安全性概况似乎始终优于地高辛 (表5)。

[0420] 表5地高辛、CVie 101和CVie 102在豚鼠中的血流动力学

[0421]	化合物	剂量 mg/kg/min	dP/dtmax 的 Emax % 增加	EDmax mg/kg	ED ₈₀ mg/kg	致死剂 量 mg/kg	死亡/治 疗数目	LD/ED ₈₀
	地高辛	0.016	128.04	0.96	0.69	1.20	5/7	2.41
	CVie 101	0.2	163.6	3.73	1.60	> 18	1/8	n.d.
		0.5	216.8	5.08	2.74	28.2	8/8	11.32
	CVie 102	0.3	138.3	8.6	3.8	12.57	11/11	5.42

[0422] 链脲佐菌素糖尿病大鼠中的血流动力学 (超声心动图2M-多普勒-组织多普勒)

[0423] 表6显示了在口服治疗1小时之前和之后, 媒介物 (盐水)、CVie 101和地高辛 (均为20mg/kg) 在STZ糖尿病大鼠中的血流动力学参数之间的比较。数据是平均值±SD; 带星号的

值具有统计学显著性,至少 $p < 0.05$ 。

[0424] 数据表明,在以舒张功能障碍为特征的动物模型(例如链脲佐菌素糖尿病大鼠)中,CVie 101改善了舒张功能,同时E/e'比值显著降低,e'的增加与SV的增加相关,而心率没有任何变化(表6)。相反,地高辛诱导相反的作用:E/e'比值增加,心率增加并且不影响每搏输出量。CVie101和地高辛对STZ大鼠的受损心脏功能的不同影响与CVie 101的SERCA2a刺激活性一致,即通过纠正受抑制的心脏松弛,增加了可用于收缩的血液量,从而导致CVie 101产生的SV增加,但地高辛并未如此。

[0425] 表6地高辛和CVie 101口服治疗STZ糖尿病大鼠后的血流动力学参数

功能	回波参数	盐水之前	盐水之后	Cvie101之前	Cvie101 20 mg/kg之后	地高辛之前	地高辛 20 mg/kg之后
		(n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=12)
收缩	FS	41.7±5.18	40.8±4.28	39.6±4.9	45.1±3.4*	42.6±3.32	47.2±3.24*
	S'	24.0±2.16	23.5±2.71	23.3±2.5	23.8±3.6	24.2±2.53	26.7±2.77*
舒张	E	0.98±0.1	0.96±0.1	0.90±0.1	0.96±0.14*	0.92±0.1	1.02±0.13*
	A	0.89±0.16	0.80±0.11*	0.75±0.13	0.76±0.17	0.79±0.18	0.92±0.1*
	E/A	1.11±0.13	1.22±0.16*	1.22±0.15	1.29±0.22	1.19±0.19	1.11±0.16
	DT	46±12.4	50.9±5.99	53.2±4.6	47.7±4.8*	50.2±9.08	39.2±9.34*
	DT/E	47.8±15.1	53.5±8.0	60.2±13.2	51.0±10.2*	55.6±12.2	39.2±11.2*
	E/DT	23.2±8.5	19.0±2.8*	17.1±2.6	20.3±4.1*	19.2±6.5	27.9±9.8*
	E/e'	42.2±6.2	40.9±5.7	40.36 ± 4.5	38.0±4.9*	39.4±5.27	43.1±4.9*
	E'	23.3±1.4	23.5±2.0	22.4±1.29	25.2±1.9*	23.4±1.79	23.7±1.35
	A'	30.8±4.0	29.7±4.1	27.3±6.2	28.7±6.6	29.0±6	35.8±5*
总体	CO	246.1±45.3	238.7±41.6	195.8±61.1	219.0±76.7	215±51.3	246.8±72*
	HR	293±35	298±33	275± 34.6	262±48.1	273.1±29	308±39*
	SV	0.84±0.13	0.80±0.11	0.70±0.16	0.82±0.21*	0.78±0.14	0.80±0.19

[0427] 图例:FS%:缩短分数,收缩功能;E m/s:二尖瓣流入的早期充盈速度;A m/s:二尖瓣流入的晚期充盈速度;E/A:LV功能指标;DTms:E波的减速时间;DT/E s²/m:二尖瓣减速指标;E/DT m/s²:减速斜率;s' cm/s TDI:收缩速度;e' cm/s TDI:早期松弛速度;a' cm/s TDI:后期松弛速度;e'/a'舒张功能障碍患病率指标;E/e':LV充盈压力指标;CO ml/min:心输出量;HR搏动/min:心率;SV ml/搏动:每搏输出量。

[0428] 受体结合测定

[0429] 根据公布的程序并通过使用适当的参考标准,由Eurofins对原始膜制剂进行了放射性配体与一组受体的结合(Eurofins,CVie 101化合物代码PT#1207859,研究#AB76416,引用#68407-1,对于Cvie Therapeutics Limited,Taiwan,China,于2017年3月05日)。以10

μM 的浓度测试了CVie 101。除了大鼠(目录#279510)的部位2的钠通道以外,没有记录到明显的相互作用,其中注意到显著反应($\geq 50\%$) (表7)。

[0430] 表7 CVie 101的受体结合测定

目录#	测定名称	批次	物种	受体	浓度	抑制%
107480	ATP 酶, Ca^{++} , 骨骼肌, 猪	401881	猪	2	10 μM	14
118040	CYP450, 19	401501	hum	2	10 μM	36
124010	HMG-CoA 还原酶	401548	hum	2	10 μM	7
140010	单胺氧化酶 MAO-A	401605	hum	2	10 μM	4
140120	单胺氧化酶 MAO-B	401606	hum	2	10 μM	4
107300	肽酶, 血管紧张素转化酶	401611	兔	2	10 μM	5
164610	肽酶, 肾素	401717	hum	2	10 μM	3
152000	磷酸二酯酶 PDE3	401702	hum	2	10 μM	-16
200510	腺苷 A1	401527	hum	2	10 μM	-4
200610	腺苷 A2A	401527	hum	2	10 μM	0
203100	肾上腺素能 $\alpha 1\text{A}$	401626	大鼠	2	10 μM	1
203200	肾上腺素能 $\alpha 1\text{B}$	401528	大鼠	2	10 μM	0
203630	肾上腺素能 $\alpha 2\text{A}$	401629	hum	2	10 μM	-7
204010	肾上腺素能 $\beta 1$	401529	hum	2	10 μM	-4
204110	肾上腺素能 $\beta 2$	401638	hum	2	10 μM	1
204600	醛固酮	401887	大鼠	2	10 μM	6
206000	雄激素(睾酮)	401738	hum	2	10 μM	1
210030	血管紧张素 AT1	401493	hum	2	10 μM	12
[0431] 210120	血管紧张素 AT2	401493	hum	2	10 μM	-1
214600	钙通道 L 型, 二氢吡啶类	401530	大鼠	2	10 μM	-8
219500	多巴胺 D1	401581	hum	2	10 μM	-5
219700	多巴胺 D2s	401582	hum	2	10 μM	4
219800	多巴胺 D3	401573	hum	2	10 μM	7
226010	雌激素 ER	401648	hum	2	10 μM	14
226050	雌激素 ER	401535	hum	2	10 μM	17
226600	GABA _A , 氟硝西洋, 中枢	401654	大鼠	2	10 μM	6
226500	GABA _A , 蝇蕈醇, 中枢	401653	大鼠	2	10 μM	-9
232030	糖皮质激素	401564	hum	2	10 μM	10
233000	谷氨酸酯, NMDA, 苯环利定	401525	大鼠	2	10 μM	7
239610	组胺 H1	401531	hum	2	10 μM	13
241000	咪唑啉 I2, 中枢	401657	大鼠	2	10 μM	25
243000	胰岛素	401578	大鼠	2	10 μM	-7
252710	毒蕈碱 M2	401658	hum	2	10 μM	7
252810	毒蕈碱 M3	401659	hum	2	10 μM	15
253010	毒蕈碱 M5	401562	hum	2	10 μM	21
258590	烟碱乙酰胆碱	401636	hum	2	10 μM	2
260410	阿片类物质 μ (OP3, MOP)	401532	hum	2	10 μM	19
264500	佛波酯	401662	小鼠	2	10 μM	-4

目录#	测定名称	批次	物种	受体	浓度	抑制%
265600	钾通道(K _{ATP})	401663	ham	2	10 μM	-6
265900	钾通道 hERG	401868	hum	2	10 μM	4
299005	孕酮 PR-B	401590	hum	2	10 μM	10
270300	雷诺定 RyR3	401776	大鼠	2	10 μM	8
[0432] 271010	血清素(5-羟色胺) 5-HT1, 非选择性	401498	大鼠	2	10 μM	7
299007	Sigma σ ₂	401500	hum	2	10 μM	30
278110	Sigma σ ₁	401499	hum	2	10 μM	23
279510	钠通道, 部位 2	401686	大鼠	2	10 μM	50
204410	转运蛋白, 去甲肾上腺素 (NET)	401639	hum	2	10 μM	2

[0433] 注意:批次代表在同一测定中同时测试的化合物;bov=牛;ham=仓鼠;hum=人。

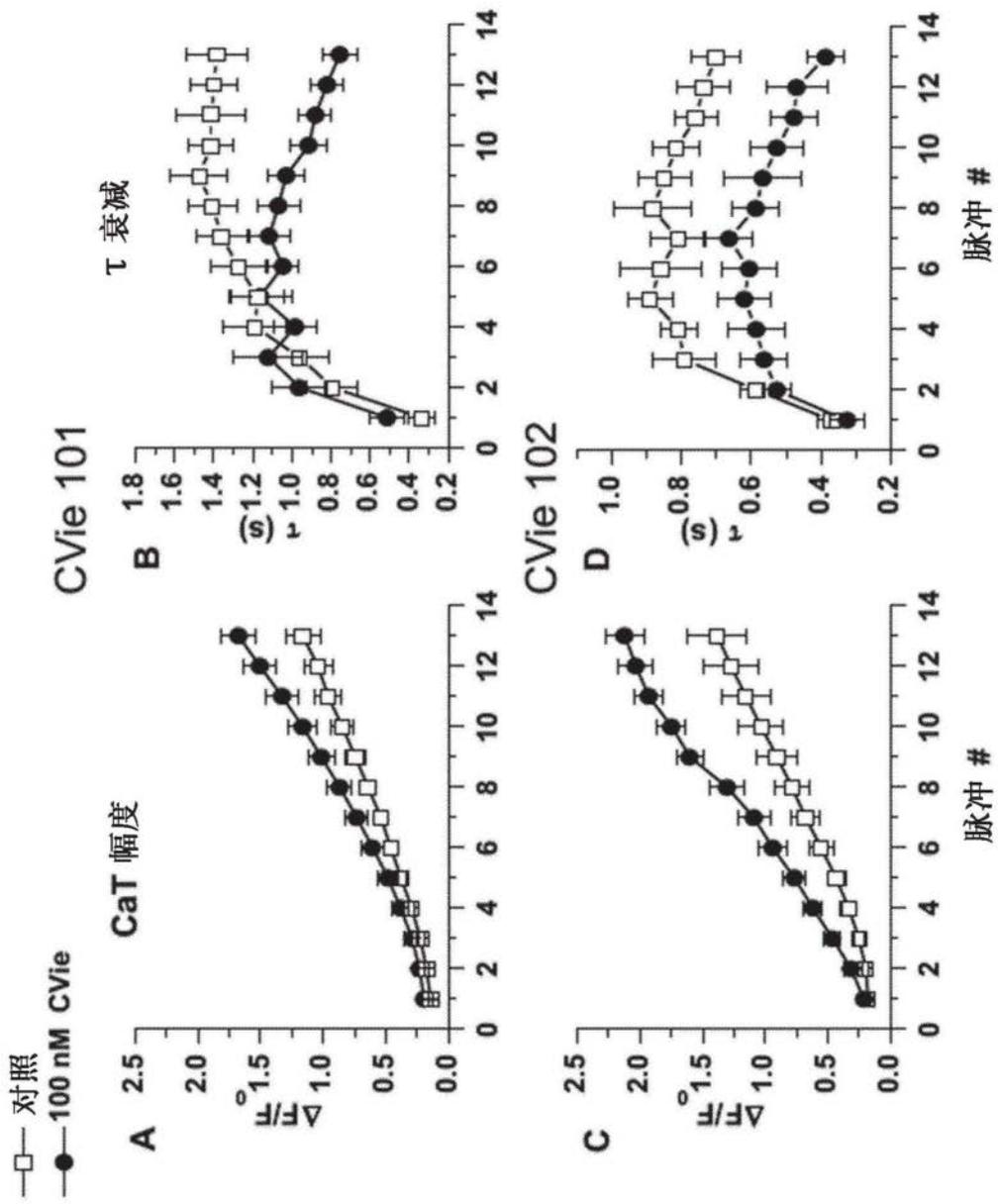


图1

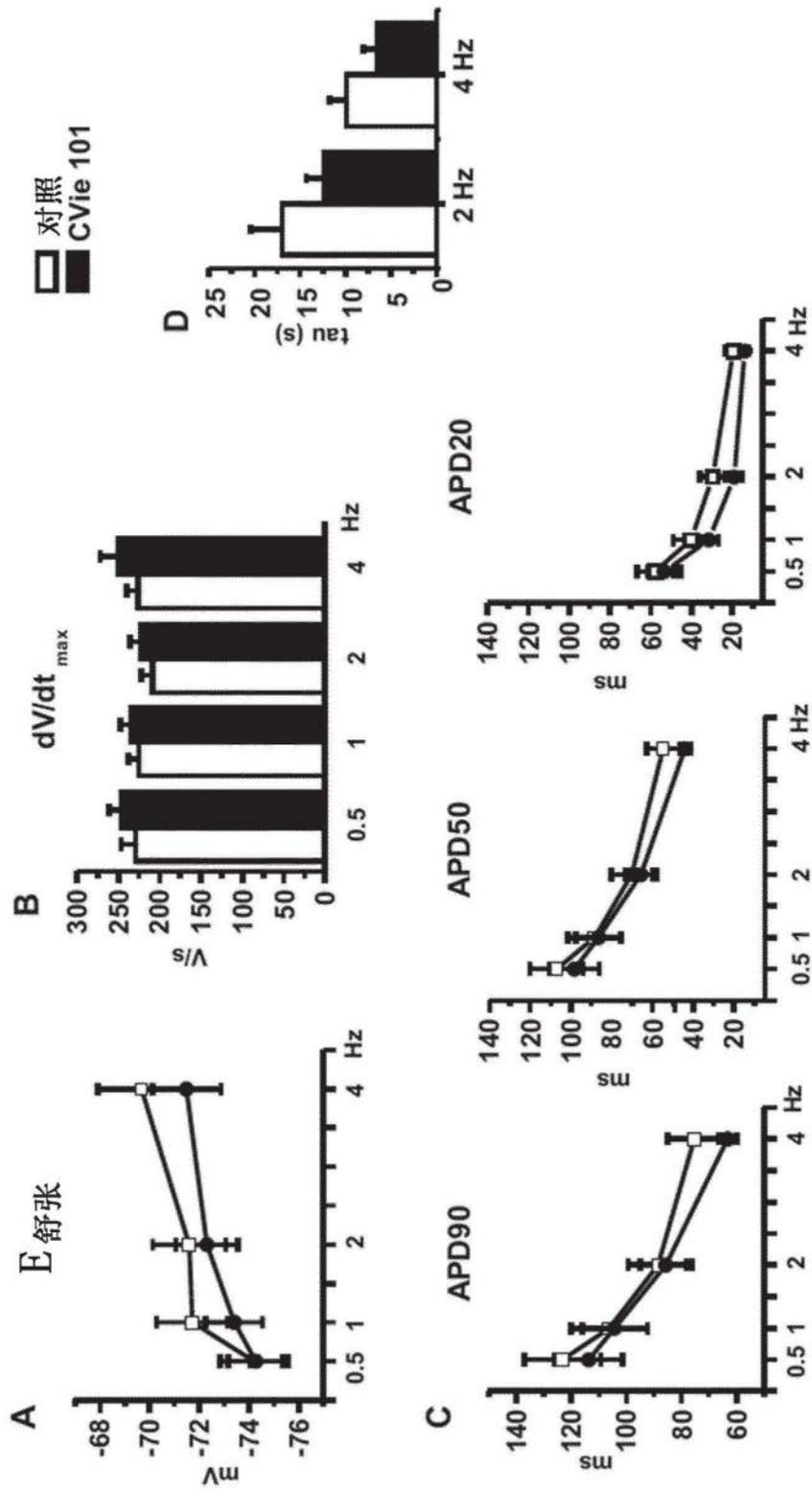


图2

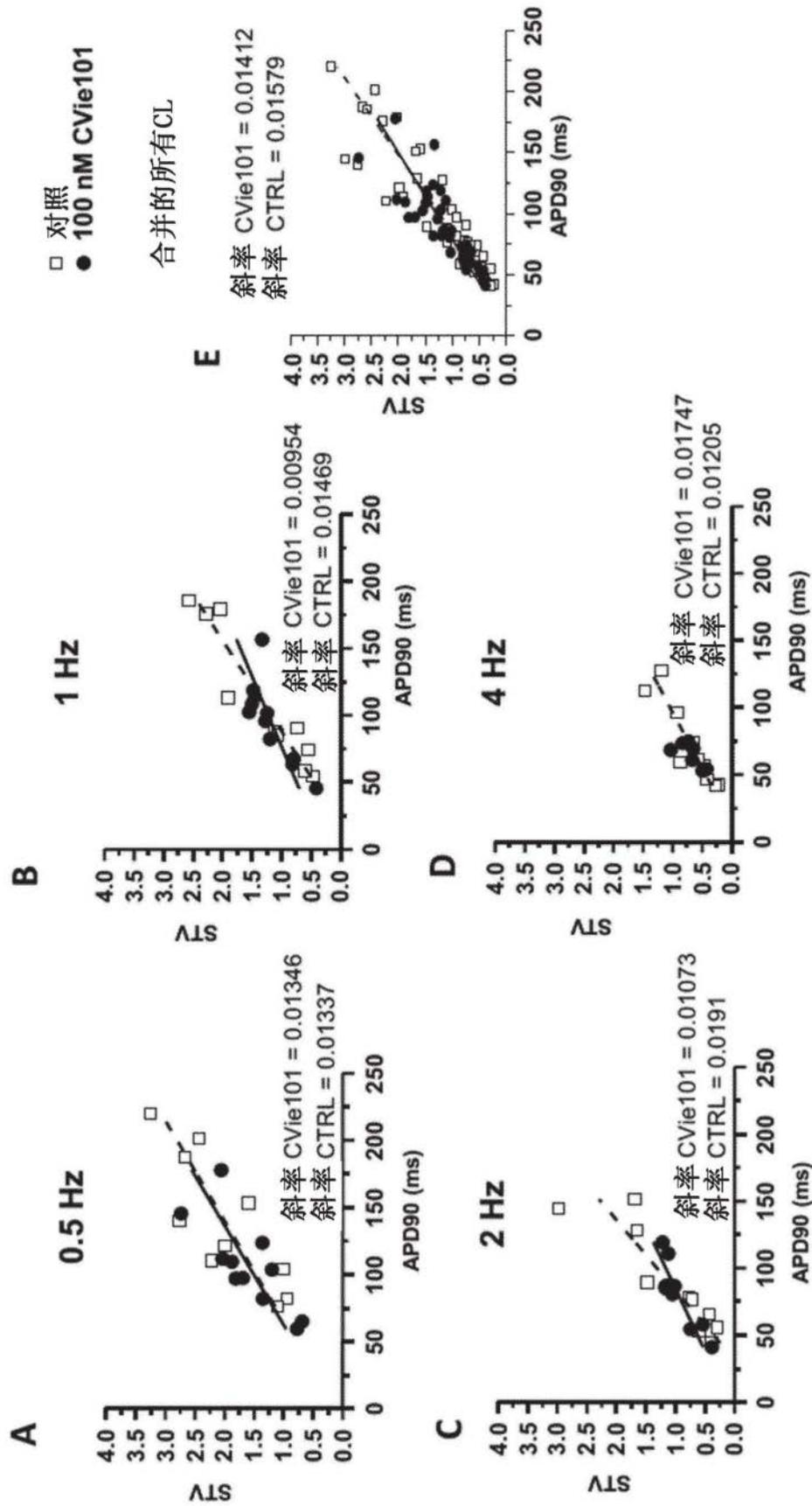


图3

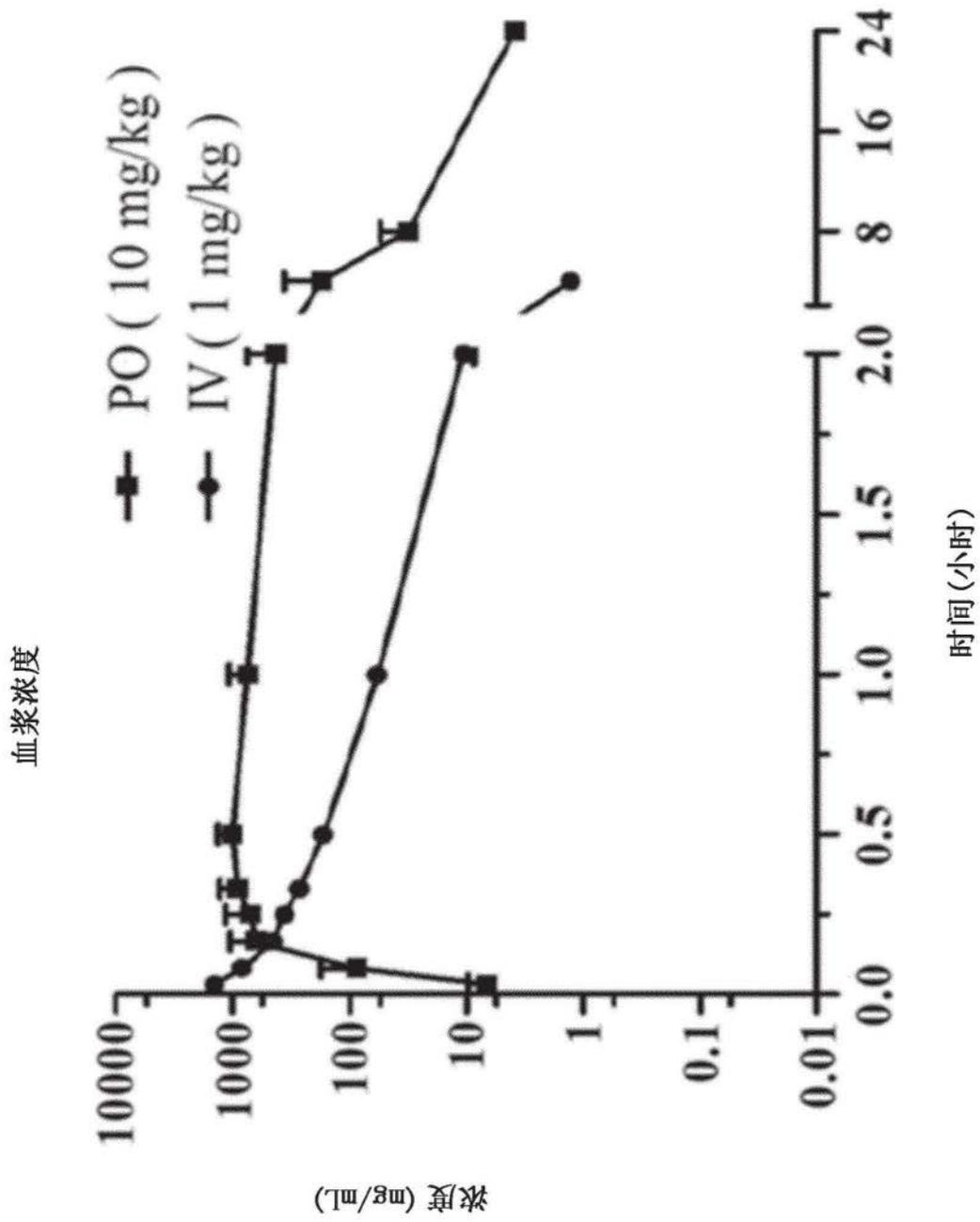


图4