

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C07D 213/643 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780028662.8

[43] 公开日 2009年7月29日

[11] 公开号 CN 101495454A

[22] 申请日 2007.5.29

[21] 申请号 200780028662.8

[30] 优先权

[32] 2006.5.31 [33] US [31] 60/809,751

[86] 国际申请 PCT/US2007/012668 2007.5.29

[87] 国际公布 WO2007/142929 英 2007.12.13

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.1

[71] 申请人 查珀尔希尔北卡罗来纳大学

地址 美国北卡罗来纳州

共同申请人 佐治亚州立大学研究基金会公司

[72] 发明人 K·衡明 G·考尔 王炳和

S·郑

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所  
代理人 罗菊华

权利要求书4页 说明书50页 附图3页

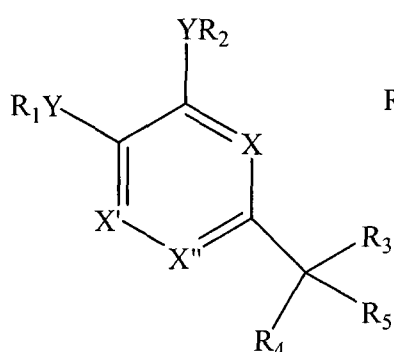
[54] 发明名称

新型 PDE4 抑制剂

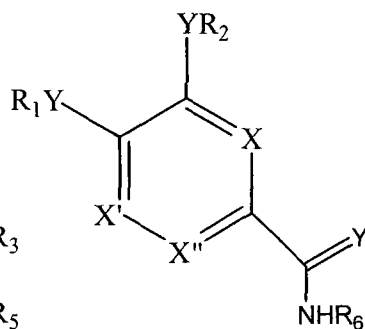
[57] 摘要

本发明公开了 PDE4 抑制剂、包含所述抑制剂的药物组合物以及使用所述抑制剂的治疗方法。通过说明书中的式 1-9 举例说明了所述化合物。所述化合物可用于治疗由磷酸二酯酶和 TNF- $\alpha$  介导的各种病症,包括哮喘、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病、关节炎、呼吸窘迫综合征、过敏性鼻炎、神经原性炎症、疼痛、类风湿性关节炎、中枢神经系统病症、心血管病症和进行性肿瘤。

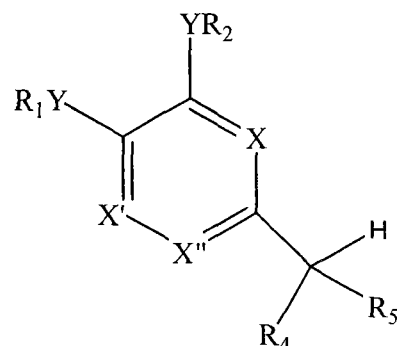
## 1. 下式的化合物:



式 1



式 2



式 3

其中,

$R_1$  是卤代烷基,

$R_2$  是  $C_{3-6}$  环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基部分, 特别地包括环戊基、四氢吡喃基和氧杂环己基部分,

$R_3$  选自  $C_{2-10}$  烷基或卤代烷基, 例如  $C_{2-5}$  烷基, 更特别地  $C_4$  烷基, 包括正丁基、异丁基和叔丁基,

$R_4$  和  $R_5$  独立地选自  $C_{2-6}$  烷基、 $C_{3-6}$  环烷基、卤代烷基, 或者两者组合形成羰基、亚胺 (即, =NH) 或硫代羰基部分,

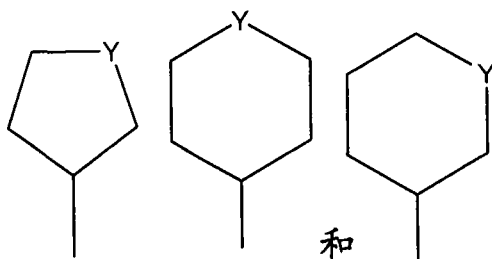
$X$ 、 $X'$  和  $X''$  独立地选自 N、C-H、C-F、C-Cl、C-Br、C-I、C- $R_6$ 、C-- $NR_6R_7$ 、C- $CF_3$ 、C-CN、C- $NO_2$ 、C- $C_2R_6$ 、C-S $CH_3$ 、C-- $N_3$ 、C-SO $_2CH_3$ 、C-OR $_6$ 、C-SR $_6$ 、C-C(=O)NR $_6R_7$ 、C-NR $_6C$ (=O)R $_6$ 、C-C(=O)R $_6$ 、C-C(=O)OR $_6$ 、C(CH $_2$ ) $_n$ OR $_6$ 、C-OC(=O)R $_6$ 、COC(=O)NR $_6R_7$  和 C-NR $_6C$ (=O)OR $_6$ , 条件是 X、 $X'$  和  $X''$  中不超过两个为 N,

Y 是 O、S 或 NH,

其中,  $R_6$  和  $R_7$  各自为氢、 $C_{2-6}$  烷基、 $C_{6-10}$  芳基、- $C_{1-10}$  烷基- $C_{6-10}$  芳基、- $C_{6-10}$  芳基- $C_{1-10}$  烷基、杂芳基, 和

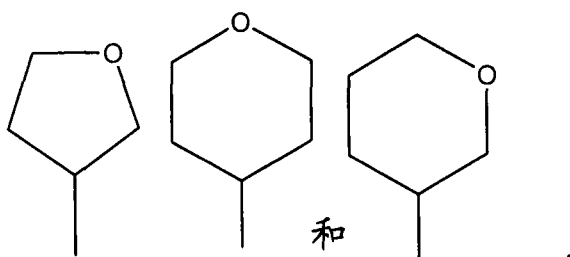
n 是 1 至 10 的整数。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中  $R_2$  选自

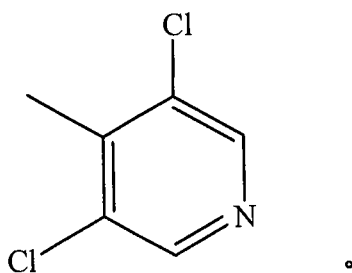


其中 Y 如上所定义。

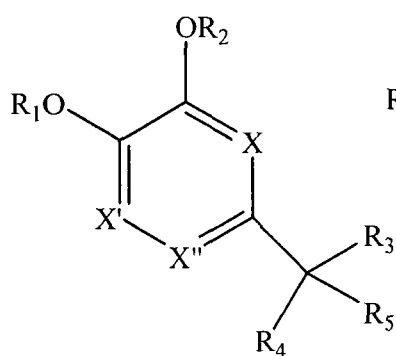
3. 权利要求 1 的化合物, 其中  $R_2$  选自



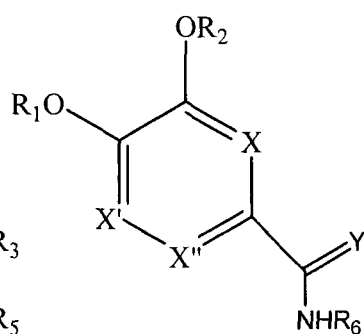
4. 权利要求 1 的化合物, 其中  $R_6$  是



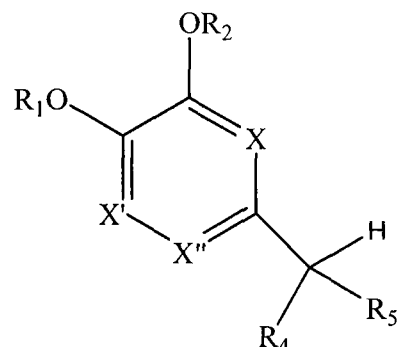
5. 权利要求 1 的化合物, 其由下式定义:



式 4



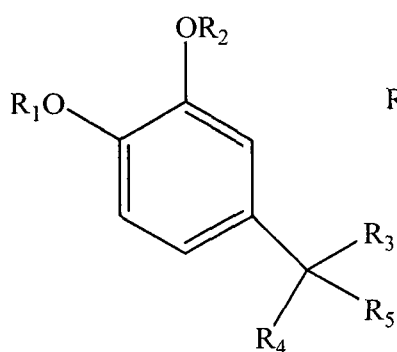
式 5



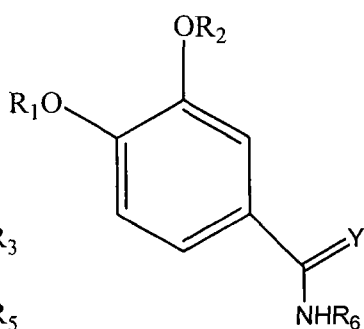
式 6

其中， $R_{1-6}$ 、 $X$ 、 $X'$ 、 $X''$ 和 $Y$ 如上文在权利要求 1 中所定义。

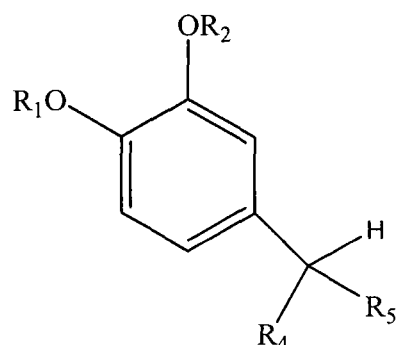
6. 权利要求 1 的化合物，其由下式定义：



式 7



式 8



式 9

其中， $R_{1-6}$ 和 $Y$ 如上文在权利要求 1 中所定义。

7. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐，其中  $R_1$  是  $\text{CHF}_2$ 。

8. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐，其中  $R_2$  是四氢呋喃基或吡咯烷基。

9. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐，其中  $R_2$  是四氢吡喃基（氧杂环己烷）。

10. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐，其中  $R_2$  是环戊基。

11. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐，其中  $R_4$  和  $R_5$  一起形成羰基、硫代羰基或亚胺部分。

12. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐，其中  $R_3$  是正丁基、

异丁基、仲丁基或叔丁基。

13. 药物组合物，其包含权利要求 1-12 中任一项的化合物和药学上可接受的载体。

14. 在哺乳动物中抑制 PDE-4 的方法，其包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的权利要求 1-12 中任一项的化合物。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述哺乳动物具有选自下列的病状：哮喘、慢性支气管炎或慢性阻塞性肺疾病。

16. 权利要求 14 的方法，其中所述哺乳动物具有选自下列的病状：内毒素性休克、败血症性休克、溃疡性结肠炎、细菌或真菌诱导的脓毒症、病毒诱导的脓毒症、细菌或真菌诱导的败血症性休克或病毒诱导的败血症性休克。

17. 权利要求 14 的方法，其中所述哺乳动物具有选自下列的病状：克罗恩病、心肌和脑的再灌注损伤、炎性关节炎、慢性肾小球肾炎、荨麻疹、类风湿性关节炎、移植排斥、移植物抗宿主病、炎症介导的慢性组织变性、细胞因子介导的慢性组织变性、骨关节炎或肌肉萎缩。

18. 权利要求 14 的方法，其中所述哺乳动物具有选自下列的病状：成人呼吸窘迫综合征、动物中的慢性阻塞性肺疾病、尿崩症、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、春季结膜炎、动脉再狭窄、ortherosclerosis、动脉粥样硬化、神经原性炎症、疼痛、咳嗽、强直性脊柱炎、胃酸分泌过多、癌症、恶病质、抑郁症、记忆障碍、肿瘤生长或正常组织的癌侵袭。

19. 权利要求 14 的方法，其中所述哺乳动物具有选自下列的病状：单相抑郁症、具有炎性组分的急性和慢性神经变性病症、帕金森病、轻度认知缺损、记忆丧失、阿尔茨海默病、脊髓创伤、颅脑损伤或多发性硬化症。

20. 权利要求 14 的方法，其中所述哺乳动物具有选自下列的病状：心血管疾病或癌症。

## 新型 PDE4 抑制剂

### 发明领域

本发明旨在磷酸二酯酶-4 抑制剂，其可以是对于各种磷酸二酯酶-4 亚家族特异性的或非特异的。

### 发明背景

几种基于环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 的酶抑制剂已被研究用于治疗各种人类疾病。在它们之中，PDE4 抑制剂显示了在治疗哮喘和慢性阻塞性肺疾病的潜力，虽然它们经常伴有副作用。所述副作用被认为是由于抑制了其他 PDE 家族或 PDE4 亚家族而产生的。

环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 控制“第二信使”环腺苷酸和环鸟苷酸 (cAMP 和 cGMP) 的浓度。PDEs 将 cAMP 和 cGMP 水解成 5'-AMP 和 5'-GMP。由 PDE 催化的 cAMP 向 AMP 的水解显示在图 1 中。PDE 以相同的方式水解 cGMP。这些第二信使介导一系列的激素和神经递质的生物应答，以及代谢过程例如平滑肌收缩、糖原分解、凋亡和成长控制。存在有 11 个 PDE 家族，它们被再细分为超过六十种同种型。每个家族具有不同的底物特异性和具有选择性抑制剂。PDE 4、7 和 8 优先水解 cAMP，而 PDE 5、6 和 9 是 cGMP 特异性的。PDE 1、2、3、10 和 11 这些酶显示出对于这两种核苷酸的活性。PDEs 的同源性被归类为三个区域：N-末端剪接区域、调控结构域和接近 C-末端区域的催化结构域。N-末端区域的功能是未知的；而调控结构域包含各种结构部分并且被假定在调控 PDEs 的催化活性方面发挥作用。所有 11 个 PDE 家族的催化结构域共享大约 30 至 50% 的氨基酸同一性。在这些家族中催化结构域的保守性预示了，这些家族也会分享相同的抑制剂。事实上，已报

道了，一种选择性 PDE5 抑制剂，万艾可，具有 3.5 nM 的  $IC_{50}$ ，并且它还显示出对于 PDE4 的抑制，具有 8  $\mu$ M 的  $IC_{50}$ 。还已鉴定了几种非选择性 PDE 抑制剂。

与所述酶的活性位点结合的 PDE4 抑制剂已被研究用于治疗哮喘和慢性阻塞性肺疾病。由于不利的副作用，例如呕吐，最近的关注集中于只抑制亚家族 PDE4A、B、C 或 D 之一的 PDE4 抑制剂。PDE4D 存在于中枢神经系统中，而 PDE4B 存在于嗜中性粒细胞和单核细胞中 (Wang 等人, *Mol. Pharmacol.* 56, 170-174 (1999))。最近的发现表明，PDE4D 是缺血性中风基因 (Gretarsdottir 等人, *Nature Genet.* 35: 131-138 (2003))。这暗示 PDE4D 可能与呕吐有关。当前的研究集中于开发选择性地以所述 4 种 PDE4 亚家族之一为靶标的 PDE4 抑制剂。

当前仍需要治疗性地抑制 PDE4 (理想地以使副作用减到最小的方式) 的新型化合物和组合物。本发明提供了这样的化合物和组合物。

## 发明概述

本发明旨在特异性的和非特异性的 PDE4 抑制剂、包含所述抑制剂的药物组合物、合成所述抑制剂的方法和使用所述抑制剂的治疗方法。

所述抑制剂是取代的苯或取代的六元杂芳环，其中所述杂芳环包含一个或两个环氮原子。所述环用醚、硫醚或胺基团取代，其中在所述醚、硫醚或胺上的烷基是卤代烷基，例如氟甲基、二氟甲基或三氟甲基。所述醚、硫醚或胺基团对于 5 或 6 元环烷基或杂环基部分而言处于邻位，和对于烷基、酮基或酰氨基 ( $-C(=O)-NHR$ ) 部分而言处于对位。

在一个实施方案中，所述卤代烷基是二氟甲基。在另一个实施方案中，所述环烷基是环戊基，或者所述杂环基团是四氢呋喃基或吡咯烷基。在第三个实施方案中，对于所述烷基而言处于对位的所述酮基部分为  $C_{3-5}$  烷基部分，例如  $C_4$  烷基部分，包括正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基部分。所述化合物可以被包括在药物组合物中，所述药物

组合物包含有效量的所述化合物和药学上可接受的载体。

所述化合物可以用于治疗患各种病症的哺乳动物例如人，所述病症包括例如哮喘，慢性支气管炎，慢性阻塞性肺疾病（COPD），嗜酸细胞肉芽肿，和其他良性或恶性增生性皮肤病，内毒素性休克（以及相关的病状，例如在马中的蹄叶炎和绞痛），败血症性休克，溃疡性结肠炎，克罗恩病，心肌和脑的再灌注损伤，炎性关节炎（inflammatory arthritis），骨质疏松症，慢性肾小球肾炎，特应性皮炎，荨麻疹，成人呼吸窘迫综合征，婴儿呼吸窘迫综合征，动物中的慢性阻塞性肺疾病，尿崩症，过敏性鼻炎，过敏性结膜炎，春季结膜炎，动脉再狭窄，动脉粥样硬化，神经原性炎症，疼痛，咳嗽，类风湿性关节炎，强直性脊柱炎，移植排斥和移植物抗宿主病，胃酸分泌过多，细菌、真菌或病毒诱导的脓毒症或者败血症性休克，炎症和细胞因子介导的慢性组织变性，骨关节炎，癌症，恶病质，肌肉萎缩（muscle wasting），抑郁症，记忆障碍，单相抑郁症（monopolar depression），具有炎症组分的急性和慢性神经变性病症（neurodegenerative disorders with inflammatory components），帕金森病，阿尔茨海默病，脊髓创伤，颅脑损伤，多发性硬化症，肿瘤生长和正常组织的癌侵袭（cancerous invasion of normal tissues）。通过施用有效量的本文所述的化合物或者在体内形成所述化合物的前体化合物，可以治疗这些病症，和在某些情况下预防这些病症。

### 附图简述

图 1 为这样的图，其显示了由 PDE 催化的 cAMP 和 cGMP 的水解。

图 2 为这样的图，其显示了 11 个 PDE 家族的结构域结构。

图 3 为这样的图表，其显示了化合物 1 和 9 以及咯利普兰在 TNF- $\alpha$  抑制中的相对活性，显示为 %LPS 对  $\mu\text{M}$  浓度，其中用正方形显示的数据代表化合物 1，用三角形显示的数据代表化合物 9，和用圆形显示的数据代表咯利普兰。



## 发明详述

通过参考下文的详细描述以及参考以下定义，将更好地理解本发明。

如本文中所使用的，“烷基”，以及带有前缀“烷(alk)”的其他基团，例如烷氧基(alkoxy)、烷酰基(alkanoyl)、链烯基(alkenyl)、炔基(alkynyl)等，是指可以为线性的或分支的或其组合的碳链。烷基的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲和叔丁基、戊基、己基等等。烷基可以用促进与PDE4受体的氢键键合的基团取代，例如OH、SH和NH<sub>2</sub>基团。“链烯基”、“炔基”和其他相似的术语包括含有至少一个不饱和C-C键的碳链。

术语“芳基”是指芳香族取代基，其是单环或者稠合在一起的多个环。当由多个环形成时，所述组成环中的至少一个环是芳香族的。优选的芳基取代基是苯基。

如本文中所使用的，术语“共施用”意欲包括同时施用本文所描述的化合物以及至少第二种形式的治疗，它们可以一起配制入单个剂型中；基本上同时施用，顺次施用，或相互间以一定的显著时间间隔连续施用。

术语“化合物”意欲包括本文所描述的化合物以及它们药学上可接受的盐。

术语“环烷基”是指不含有杂原子的碳环，包括单、双和三环的饱和碳环，以及稠合环体系。这样的稠合环体系可以包含一个部分或完全不饱和的环例如苯环从而形成稠合环体系，例如苯并稠合碳环(benzofused carbocycles)。环烷基还包括诸如螺稠合环(spirofused ring)体系的稠合环体系。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、十氢化萘、金刚烷、茛满基、茛基、茛基、1,2,3,4-四氢化萘，等等。类似地，“环烯基”是指不含有杂原子但含有至少一个非芳香族C=C双键的碳环，包括单、双和三环的部分饱

和碳环，以及苯并稠合环烯烃。环烯基的实例包括环己烯基、茛基，等等。

除非另外特别说明，术语“杂”包括一个或多个 O、S 或 N 原子。例如，杂环烷基和杂芳基包括这样的环系统，所述环系统在环中含有至少一个且不超过两个 O、S 和/或 N 原子，包括此类原子的混合。所述杂原子替代环碳原子。因此，例如，杂环 C<sub>5</sub> 烷基是含有 2 至 4 个碳原子的五元环。杂芳基的实例包括具有一个或两个环氮原子的六元环，例如吡啶基、哒嗪基、嘧啶基和吡嗪基，以及五元环杂环（包括与苯环稠合的那些），例如咪喃基、苯并咪喃基、二苯并咪喃基、噻吩基、苯并噻吩基、吡咯基、吲哚基、吡唑基、吲唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、咪唑基、苯并咪唑基、噁二唑基和噻二唑基。

杂环烷基的实例包括氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、四氢咪喃基、咪唑啉基、吡咯烷-2-酮、哌啶-2-酮和硫代吗啉基，其中四氢咪喃基和吡咯烷基是特别优选的。

除非另外特别说明，术语“胺”包括伯、仲和叔胺，尽管伯胺可以是优选的，因为它们将帮助促进与相关受体的结合。

术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘原子。

术语“哺乳动物”包括人以及其他动物，例如狗、猫、马、猪和牛。使用本文中所描述的化合物，可以就与人类病患相关的病症来治疗除了人类以外的其他动物。术语“动物”仅用于相对于动物界的其他成员而言指出人类。所述化合物具有治疗可应用性，以用于治疗哺乳动物（一般而言），特别是人类。

术语“可选地取代的”，包括取代的和未取代的部分。因此，例如，可选地取代的芳基可以表示五氟苯基或苯基环。此外，可选地取代的多个部分，例如烷芳基，是指烷基和芳基被可选地取代。如果多个部分中仅一个部分被可选地取代，则将作特别说明，例如“烷芳基，其中芳基用卤素或羟基可选地取代”。

术语“取代的”是指，“取代的”部分包括 1 至 3 个选自下列的取代基：卤、烷基、卤代烷基、胺、腈、硝基、链烯基、炔基、硫代

烷基和叠氮化物。

术语“治疗”意欲包括预防性的 (prophylactic) 和针对症状的 (symptomatic) 模式的疗法。

本文中所描述的化合物可以包含一个或多个不对称中心，并因而可以产生非对映异构体和旋光异构体。本发明包括所有此类可能的非对映异构体以及它们的外消旋混合物，它们的基本上纯的经拆分的对映异构体，所有可能的几何异构体，及其药学上可接受的盐。上述式没有显示在某些位置处的确定的立体化学。本发明包括所述化合物及其药学上可接受的盐的所有立体异构体。另外，还包括立体异构体的混合物以及分离的特定立体异构体。在用于制备此类化合物的合成工序过程中，或者在使用本领域技术人员已知的外消旋化或差向异构化工序中，此类工序的产物可以是立体异构体的混合物。

术语“药学上可接受的盐”是指从药学上可接受的无毒性的碱或酸制备的盐。当所述化合物包含酸性官能团时，其相应的盐可方便地从药学上可接受的无毒性的碱制备，包括无机碱和有机碱。源自此类无机碱的盐包括铝盐、铵盐、钙盐、铜（二价铜和一价铜）盐、三价铁盐、二价铁盐、锂盐、镁盐、锰（三价锰和二价锰）盐、钾盐、钠盐、锌盐等。特别优选的是铵盐、钙盐、镁盐、钾盐和钠盐。

源自药学上可接受的无毒性的有机碱的盐包括伯、仲、叔胺，以及环胺和经取代的胺（例如，天然存在和合成的经取代的胺）的盐。其他药学上可接受的无毒性的有机碱（从中可形成盐）包括离子交换树脂，例如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙基氨基乙醇、2-二甲基氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、还原葡糖胺、葡糖胺、组氨酸、哈胺 (hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、葡甲胺 (methylglucamine)、吗啉、哌嗪、哌啶、聚胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇，等等。

当所述化合物包含碱性基团例如胺基团时，其相应的盐可方便地从药学上可接受的无毒性的酸制备，包括无机酸和有机酸。此类酸包

括, 例如乙酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、富马酸、葡糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、羟乙基磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、双羟萘酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸, 等等。

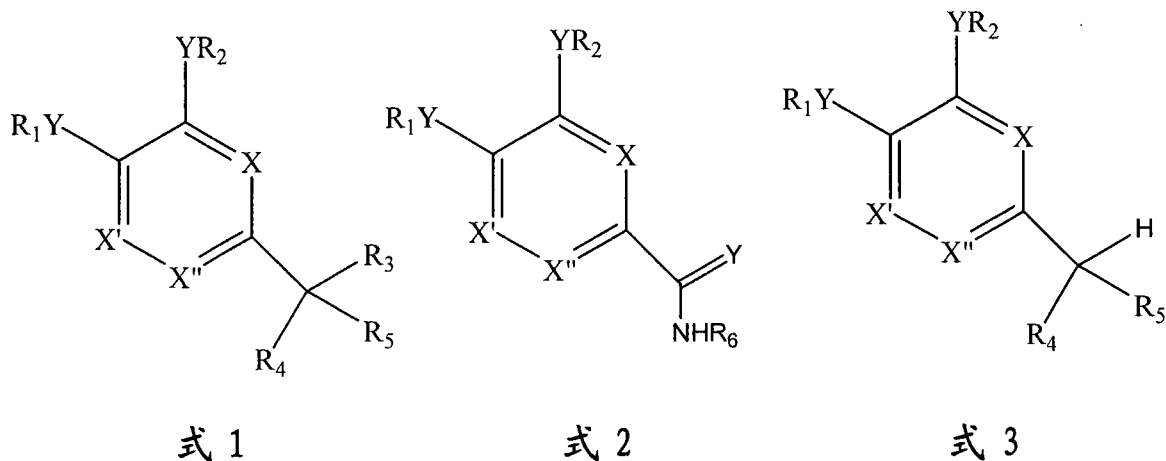
## I. PDE4 抑制剂

3', 5'-环核苷酸磷酸二酯酶 (PDEs) 是一大类酶, 包括至少 11 个不同的家族, 它们在结构、生物化学和药理学上彼此不同。每个家族内的酶通常被称为同工酶。本文中所描述的化合物特异性地结合 PDEs 的第四个家族的四种基因产物中的一种或多种, 即 PDE4A、PDE4B、PDE4C 和 PDE4D。

在一些实施方案中, 所述化合物对于这四种受体亚型是非选择性的, 和在其他实施方案中, 所述化合物选择性地结合这些亚型之一。在其中所述化合物结合 PDE4D 的工作实施例中所显示的数据并非想要表明所述化合物特异性地结合 PDE4D 受体亚型, 而是表明所述化合物与 PDE4 受体的结合超过与其他 PDE 受体类型的结合。所述化合物与其他 PDE4 受体亚型的结合的比较研究显示, 在所述化合物与 PDE4D 受体亚型结合以及与其他 PDE4 亚型结合方面存在微小的差异。例如, 本文中所描述的化合物 1 抑制 PDE4A、4B、4C 和 4D 的  $IC_{50}$  值分别为  $99 \pm 15$ 、 $35 \pm 5$ 、 $127 \pm 17$  和  $18 \pm 1$  nM。

这些酶共同被称为是 PDE4 同工酶家族的同种型或亚型。PDE4s 的特征在于选择性地、高亲和力地水解降解第二信使环核苷酸, 环腺苷酸 (cAMP); 以及对于通过咯利普兰的抑制敏感。

一般地, 所述化合物落入下列式中:



其中，

$R_1$  是卤代烷基，例如氟甲基、二氟甲基和三氟甲基，

$R_2$  是  $C_{3-6}$  环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基部分，特别地包括环戊基、四氢呋喃基和氧杂环己基部分，

$R_3$  选自  $C_{2-10}$  烷基或卤代烷基，例如  $C_{2-5}$  烷基，更特别地  $C_4$  烷基，包括正丁基、异丁基和叔丁基，

$R_4$  和  $R_5$  独立地选自  $C_{2-6}$  烷基、 $C_{3-6}$  环烷基、卤代烷基，或者两者组合形成羰基、亚胺（即， $=NH$ ）或硫代羰基部分，

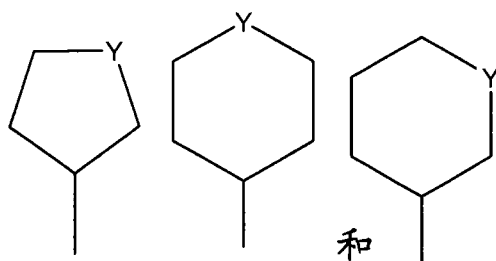
$X$ 、 $X'$  和  $X''$  独立地选自  $N$ 、 $C-H$ 、 $C-F$ 、 $C-Cl$ 、 $C-Br$ 、 $C-I$  和  $C-R_6$ ，

$Y$  是  $O$ 、 $S$  或  $NH$ ，

其中， $R_6$  和  $R_7$  各自为氢、 $C_{2-6}$  烷基、 $C_{6-10}$  芳基、 $-C_{1-10}$  烷基- $C_{6-10}$  芳基、 $-C_{6-10}$  芳基- $C_{1-10}$  烷基、杂芳基，和

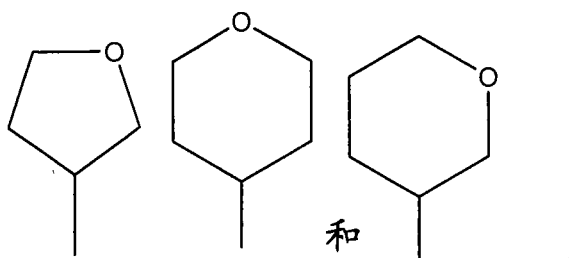
$n$  是 1 至 10 的整数。

合适的  $R_2$  部分的实例包括：

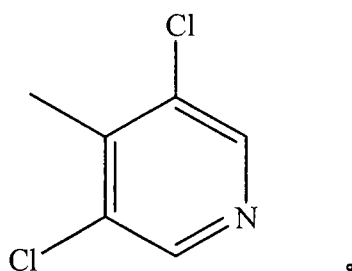


其中 Y 如上所定义。

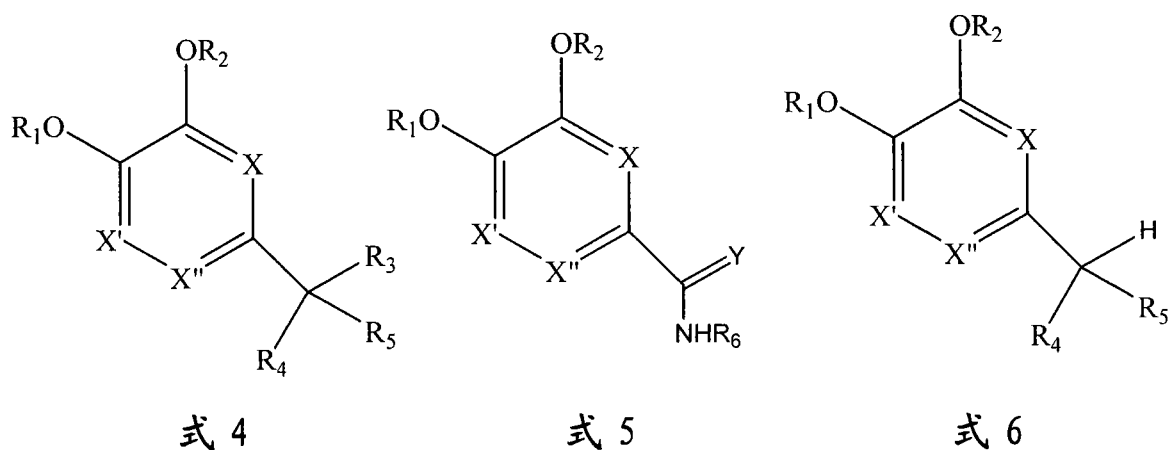
更特别地,  $R_2$  选自:



在一个实施方案中,  $R_6$  是

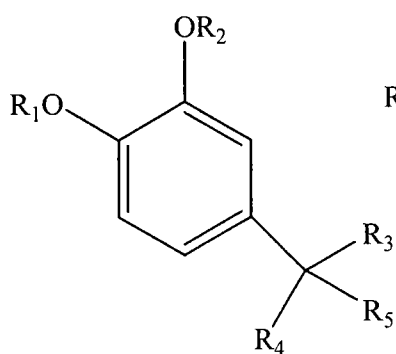


在一个实施方案中, 所述化合物由下式定义:

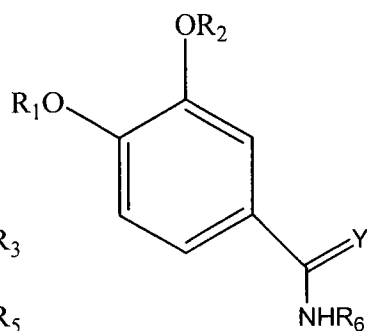


其中,  $R_{1-6}$ 、X、X'、X''和 Y 如上定义。

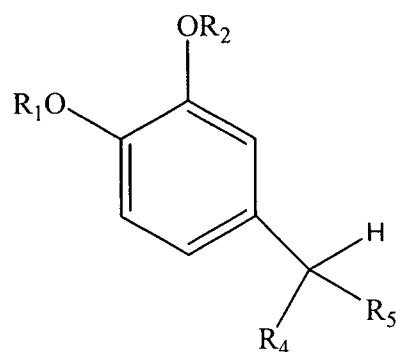
在另一个实施方案中, 所述化合物由下式定义:



式 7



式 8



式 9

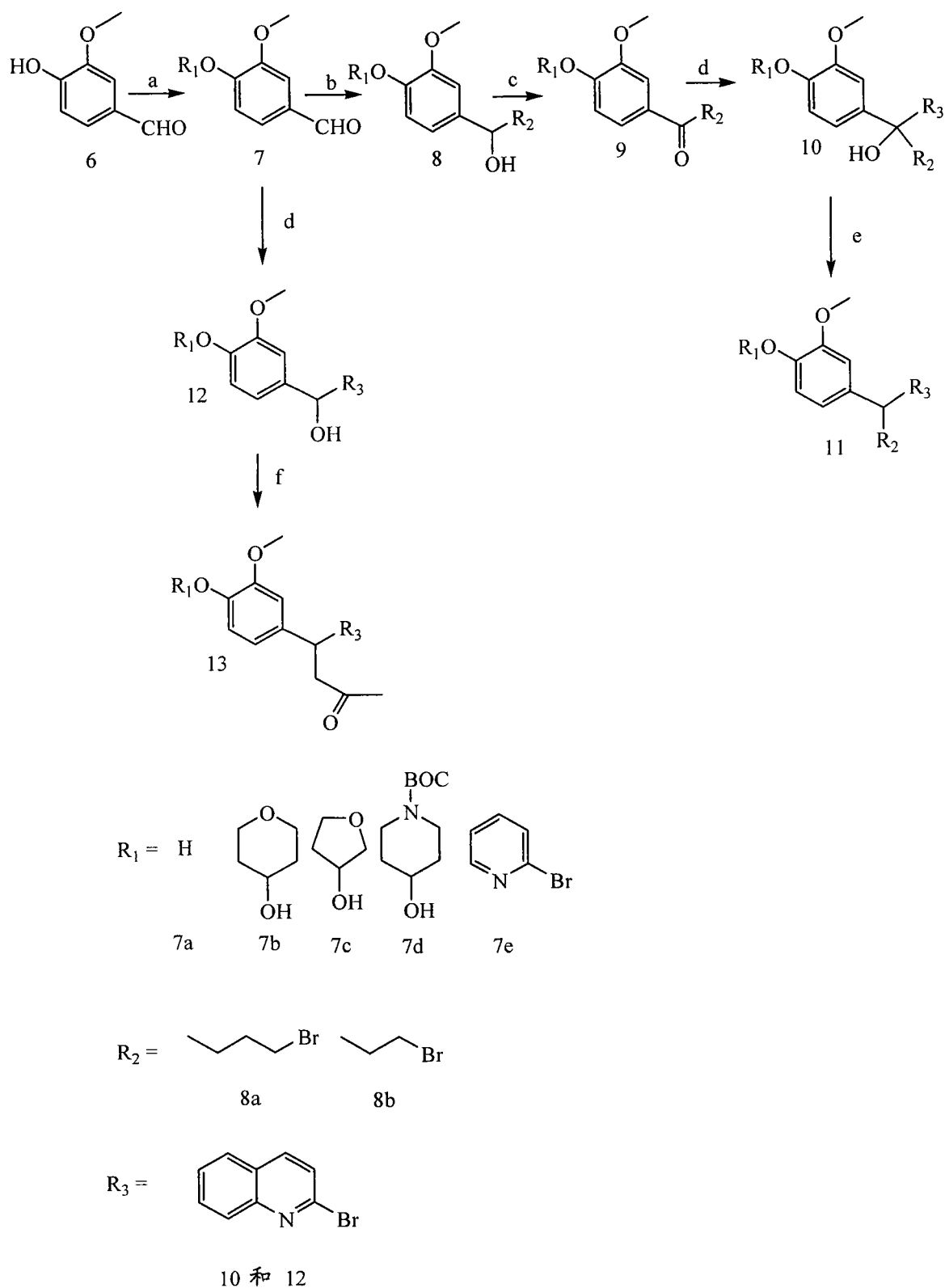
其中， $\text{R}_{1-6}$  和  $\text{Y}$  如上定义。

## II. 合成方法

所述化合物可以例如根据下文在流程 1 和 2 中所概述的下列一般方法来制备。







流程 2 a) (i)  $R_2OH$  (7a-d),  $PPh_3$ ,  $t-BuO_2CN=NCO_2t-Bu$ , THF; (ii)  $R_2Br$  (7e),  $CsCO_3$ , DMF; b)  $R_3Li$  或  $R_3MgBr$ , THF,  $-78^\circ C$ ; c) PCC, DCM; d)  $R_3Br$ ,  $n-BuLi$ , THF,  $-78^\circ C$ ; e) AcOH,  $H_2SO_4$ ,  $80^\circ C$ ;  $H_2Pd/C$ ; f)  $SOCl_2$ , DCM; 乙酰乙酸乙酯,  $CH_3ONa$ , THF; LiOH, THF/MeOH/ $H_2O$

由于  $R_1$ - $R_4$  基团的大量的可能组合, 流程 1 中的描述提供了这些类似物的一般合成。下文是该合成方法的一般性讨论。在下文中, 虽然在所列的参考文献中没有描述确切的中间体, 但是在这些参考文献中描述了化学反应和条件, 并且所述化学可适用于提供下文所描述的化合物。

从 3, 4-二羟基苯甲醛开始, 根据关于与氯二氟乙酸甲酯反应的确切文献工序 (Guay 等人, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 12, 1457-1461 (2002)) 可以制备单-二氟甲基醚 (2a)。单-甲基醚 (2b) 是商购可得的。可以根据类似的文献工序, 采用在四氢呋喃 (THF) 中与  $R_2OH$  的 Mitsunobu 反应来进行  $R_2$  基团的连接, 从而得到化合物 3。存在有采用 Mitsunobu 反应来制备苯酚醚的成熟先例 (例如, *J. Chem. Soc. Perkin T.* 1(5), 857-865; Wang 等人, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 11(7), 891-894 (2001), Picard 等人, *J. Med. Chem.* 45(16), 3406-3417 (2002), Hirayama 等人, *Bioorg. & Med. Chem.* 11(3), 361-381 (2003), Sagi 等人, *J. Med. Chem.* 46(10), 1845-1857 (2003), 和 Stelmach 等人, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 13(2), 277-280 (2003); 和 *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 13(12), 1997-2001 (2003) )。

当  $R_2$  是芳基环时, 其可以通过 2 与  $ArBr$  的烷基化来进行连接。也存在有大量的关于此类反应的文献先例 (例如, h Cherng, Y.-J. *Tetrahedron* 58(24), 4931-4935 (2002), i Cherng, Y.-J. *Tetrahedron* 58(24), 4931-4935 (2002), 和 Phillips 等人, *J. Med. Chem.* 45, 2484-2493 (2002), j LaMattina 和 Taylor, *J. Org. Chem.* 46, 4179-4182 (1981), 和 Reinhard 等人, *J. Med. Chem.* 46(11), 2151-2168 (2003) )。在烷基化过程中,  $R_2OH$  (b、c、f) 上的氨基需要被保护。这可以通过使用 Boc 保护来完成, 所述 Boc 可以在合成结束时通过三氟乙酸 (TFA) 进行处理来切割。在两个酚羟基均烷基化后, 可以通过下列方式来引入  $R_3$  基团: 使用烷基锂试剂 (通过用叔丁基锂处理芳基卤而制备的), 或使用格氏试剂 (通过与镁进行反应而制备的) 对醛羰基进行亲核加成。此外, 在所述芳基卤中的带有活泼质子

的官能团需要被保护。所述羟基可以用叔丁基二甲基甲硅烷基基团或四氢吡喃 (THP) 基团来保护。所述氨基可以用 Boc 基团来保护。4a 中的羟基可以用 PCC (氯铬酸吡啶鎓) 进行氧化, 从而得到 4b, 其是潜在的 PDE4 抑制剂 (表 2)。可以通过首先将 4a 的苄羟基转化成卤化物离去基团, 随后用烯醇化物进行取代来引入最后一个基团 ( $R_4$ ), 从而得到化合物 6a ( $R_4 = \text{CH}_3\text{CO}-$ ) (Côté 等人, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 13, 741-744 (2002); 和 Guay 等人, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 12, 1457-1461 (2002))。皂化以及随后的酸化在脱羧后形成 7a (*Id.*)。7a 的酮基团可以通过 Wolf-Kishner 还原而转化成亚甲基 (7b), 或者通过  $\text{NaBH}_4$  还原而转化成醇 (7c)。醇 (7c) 可以在甲磺酰化以及随后的 MeLi 取代之后被甲基置换, 从而得到 7d。然后, 可以进行在  $R_2$  和  $R_3$  上的各自基团的去保护, 从而得到最终产物。获得化合物 7 的备选方法是从 4b 开始, 通过使用有机锂或格氏试剂进行亲核加成。这两种技术都成功地进行了使用。

应当注意, 在流程 1 或 2 中的合成中没有立体化学控制。然而, 通过首先合成和筛选外消旋形式的抑制剂, 并鉴定高亲和力抑制剂, 可以使用手性 HPLC 来纯化和分离每种对映异构体以鉴定更有效的对映异构体, 然后开始此类对映异构体抑制剂的不对称合成。例如, 在下面的工作实施例中所讨论的化合物 1 是优异的先导化合物, 其具有 18 nM 的  $\text{IC}_{50}$  (表 2), 但它是外消旋混合物。通过使用商购可得的对映异构体纯的醇, 可以引入  $R_2$ , 并使用手性 HPLC 来分离和评价各个对映异构体。

下列原料/烷基化试剂不是商购可得的, 它们的制备描述于流程 2 中。化合物 9 可以通过 8 的硼氢化-氧化来制备 (Brown 等人, *J. Org. Chem.* 50(10), 1582-1589 (1985))。14 的合成可以从 1,4-二溴-2-氟苯 (10) 开始, 通过用叔丁醇钾和乙二醇进行处理, 从而得到化合物 11。可以将 11 的羟基转化成溴化物。接着, 在环上进行邻位溴化物的锂交换, 随后进行取代, 从而得到 13 (Song 等人, *Org. Lett.* 3, 3357-3360 (2001))。进一步的氧化提供了苯并咪唑化合物 14 (Filler,

R. *Chem. Rev.* 63, 21-43 (1963) )。化合物 16-19 的合成都可以从 15 开始。3-溴苯氧基乙醛缩醛与多磷酸 (PPA) 在回流的苯中的环化提供了化合物 16 和 17 (Barker 等人, *Synth. Commun.* 19, 257-265 (1989) )。催化氢化应当导致形成化合物 18 和 19 (Kuwano 等人, *Chem. Lett.* 4, 428-429 (2000) )。已合成了中间体 16-17。22 和 23 的制备可以从使用合适的二溴烷烃进行 2,6-二溴苯酚的烷基化开始,从而得到芳氧基烷基溴 21。接着,用正丁基锂进行锂交换,随后进行环化,从而提供了 22 (Kerrigan 等人 *Tetrahedron Lett.* 39, 2219-2222 (1998) )。22 的脱氢提供了化合物 23 (Filler, R. *Chem. Rev.* 63, 21-43 (1963) )。

### III. 药物组合物

所述化合物可被包含在药物组合物中。所述药物组合物包含本文所描述的化合物或者其药学上可接受的盐作为活性成分,和药学上可接受的载体;并且还可以可选地包含其他治疗成分或助剂 (adjuvant)。可选的另外的治疗成分包括,例如 i) 白三烯受体拮抗剂, ii) 白三烯生物合成抑制剂, iii) 皮质类固醇, iv) H1 受体拮抗剂, v)  $\beta$ 2 肾上腺素受体激动剂, vi) COX-2 选择性抑制剂, vii) 抑制素, viii) 非类固醇抗炎药 (“NSAID”), 和 ix) M2/M3 拮抗剂。

所述组合物包括适合于口服、直肠、局部和肠胃外 (包括皮下、肌肉和静脉内) 施用的组合物,尽管在给定的情况下,最合适的途径取决于具体的宿主,以及为了其而施用所述活性成分的病状的性质和严重程度。所述药物组合物可以方便地以单位剂量形式存在,并通过使用制药领域中所熟知的任何方法来制备。

包含所述化合物的乳膏剂、软膏剂、胶冻剂、溶液或悬浮液可用于局部使用。为了本发明的目的,在局部使用的范围内包括口腔洗剂和漱口剂。

大约 0.01 至大约 140 mg/kg 体重/天的剂量水平可用于治疗下列病状: 例如哮喘,慢性支气管炎,慢性阻塞性肺疾病 (COPD), 嗜酸

细胞肉芽肿，和其他良性或恶性增生性皮肤病，内毒素性休克（以及相关的病状，例如在马中的蹄叶炎和绞痛），败血症性休克，溃疡性结肠炎，克罗恩病，心肌和脑的再灌注损伤，炎性关节炎，慢性肾小球肾炎，特应性皮炎，荨麻疹，成人呼吸窘迫综合征，动物中的慢性阻塞性肺疾病，尿崩症，过敏性鼻炎，过敏性结膜炎，春季结膜炎，动脉再狭窄，*orthrosclerosis*，动脉粥样硬化，神经原性炎症，疼痛，咳嗽，类风湿性关节炎，强直性脊柱炎，移植排斥和移植物抗宿主病，胃酸分泌过多，细菌、真菌或病毒诱导的脓毒症或者败血症性休克，炎症和细胞因子介导的慢性组织变性，骨关节炎，癌症，恶病质，肌肉萎缩，抑郁症，记忆障碍，肿瘤生长和正常组织的癌侵袭，它们对 PDE4 抑制作出响应；或者备选地采用大约 0.5 mg 至大约 7 g/患者/天的剂量水平。可以以预防有效剂量水平来施用所述化合物以预防上述病状。

可与载体材料相组合从而产生单剂量形式的活性成分的量将取决于被治疗的宿主和特定的施用方式而变化。例如，意欲口服施用给人的制剂可以方便地含有大约 0.5 mg 至大约 5 g 的活性剂，其与合适且方便的量的载体材料（可占总组合物的大约 5% 至大约 95%）相复合。单位剂量形式一般将包含大约 1 mg 至大约 1000 mg 的活性成分，通常为 25 mg、50 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、800 mg 或 1000 mg。

对于任何特定的患者，具体的剂量水平将取决于一系列因素，包括年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、施用时机、施用途径、排泄速率、药物联合和经历治疗的特定疾病的严重程度。

实际上，按照常规的制药学复合技术，本发明的化合物或其药学上可接受的盐可以作为活性成分以密切混合的方式与制药学载体相组合。载体可以具有各种各样的形式，这取决于希望进行施用的制剂的形式，例如口服或肠胃外（包括静脉内）。因此，所述药物组合物可以作为适合于口服施用的分开的单元存在，例如胶囊、扁囊剂或片剂，其中每个都含有预定量的活性成分。此外，所述组合物可以以下列形

式存在：粉末、颗粒剂、溶液、在水性液体中的悬浮液、非水性液体、水包油乳剂或油包水液体乳剂。除了上面展示的常用剂型外，所述化合物或其药学上可接受的盐，也可以通过控释手段和/或递送装置来施用。所述组合物可以通过制药业中的任何方法来制备。一般地，此类方法包括将活性成分与载体（其构成一种或多种必需成分）相组合的步骤。一般地，所述组合物通过将活性成分与液体载体或细分的固体载体或两者均匀且密切地混合来制备。然后，所述产品可以方便地被制成所希望的形式。

因此，本发明的药物组合物可以包含药学上可接受的载体以及化合物或其药学上可接受的盐。所述化合物或其药学上可接受的盐还可以与一种或多种其他治疗活性化合物相组合地被包含在药物组合物中。

所采用的制药学载体可以是例如固体、液体或气体。固体载体的实例包括乳糖、石膏粉、蔗糖、滑石、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁和硬脂酸。液体载体的实例为糖浆、花生油、橄榄油和水。气体载体的实例包括二氧化碳和氮气。

在制备用于口服剂型的组合物中，可以使用任何方便的制药学介质。例如，水、二醇、油、醇、矫味剂、防腐剂、着色剂等可用于形成口服液体制剂，例如悬浮液、酏剂和溶液；而诸如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、粒化剂（granulating agents）、润滑剂、粘合剂、崩解剂等载体可用于形成口服固体制剂，例如粉末、胶囊和片剂。由于它们施用方便，因而片剂和胶囊是优选的口服剂量单元，由此采用固体制药学载体。可选地，片剂可通过标准的水性或非水性技术来进行包衣。

含有本文所描述的化合物的片剂可以通过压制或模制来制备，可选地使用一种或多种辅助成分或助剂。压制片剂可通过在合适的机器中压制以自由流动形式（例如粉末或颗粒）的活性成分来制备，可选地与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、表面活性剂或分散剂相混合。模制片剂可通过在合适的机器中模压用惰性液体稀释剂润湿的粉末状化

合物的混合物来制备。每个片剂优选地含有大约 0.1 mg 至大约 500 mg 的活性成分；和每个扁囊剂或胶囊优选地含有大约 0.1 mg 至大约 500 mg 的活性成分。因此，在服用一个或两个片剂、扁囊剂或胶囊（每天一次、两次或三次）的情况下，片剂、扁囊剂或胶囊方便地含有 0.1 mg、1 mg、5 mg、25 mg、50 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg 或 500 mg 的活性成分。

适合于肠胃外施用的药物组合物可以被制成活性成分在水中的溶液或悬浮液。可以包括合适的表面活性剂，例如羟丙基纤维素。还可以在甘油、液态聚乙二醇、以及它们的混合物（在油中）中制备分散体。此外，可包含防腐剂以防止微生物的有害生长。

适合于注射使用的那些药物组合物包括无菌水溶液或分散体。所述组合物可以是无菌粉末的形式，用于即时制备此类无菌可注射溶液或分散体。在所有情况下，最终的可注射形式必须是无菌的，而且必须是有效流动的以便能够容易地注射。

所述药物组合物在生产和贮存条件下必须是稳定的；因此，优选地应当针对微生物（例如细菌和真菌）的污染作用进行防护。所述载体可以是溶剂或分散介质，包括例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇）、植物油及其合适的混合物。

所述药物组合物可以为适合于局部使用的形式，例如气雾剂、乳膏剂、软膏剂、洗液、扑粉等。此外，所述组合物可以为适合于在透皮装置中使用的形式。可以通过常规的加工方法，使用化合物或其药学上可接受的盐来制备这些制剂。作为实例，乳膏剂和软膏剂通过下列方式来制备：混合亲水性材料和水以及大约 5 wt% 至大约 10 wt% 的化合物，从而产生具有所需稠度的乳膏剂或软膏剂。

特别是当用于治疗易激惹肠病症，所述药物组合物可以为适合于直肠施用的形式，其中所述载体是固体。优选地，所述混合物形成单位剂量栓剂。合适的载体包括可可脂和其他本领域中常用的材料。栓剂可以方便地通过下列方式来形成：首先将该组合物与软化的或熔化的载体相混合，随后在模具中冷却和成形。

所述药物制剂还可以可选性地在适当时候包含一种或多种另外的载体成分，例如稀释剂、缓冲剂、矫味剂、粘合剂、表面活性剂、增稠剂、润滑剂、防腐剂（包括抗氧化剂）等等。此外，可以包含其他助剂以使得所述制剂与目标受者的血液等渗。

#### IV. 治疗方法

已显示，选择性 PDE4s 抑制剂在各种疾病模型中是有效的。参见，例如 Torphy 等人，*Environ. Health Perspect.* 102 Suppl. 10: 79-84, 1994; Duplantier 等人，*J. Med. Chem.* 39: 120-125, 1996; Schneider 等人，*Pharmacol. Biochem. Behav.* 50: 211-217, 1995; Banner 和 Page, *Br. J. Pharmacol.* 114: 93-98, 1995; Barnette 等人，*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273: 674-679, 1995; Wright 等人，*Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 1001-1008, 1997; Manabe 等人，*Eur. J. Pharmacol.* 332: 97-107, 1997; 和 Ukita 等人，*J. Med. Chem.* 42: 1088-1099, 1999, 这些文献中每一篇文献的内容通过提及而合并入本文。

因为所述化合物是 PDE4 抑制剂，所以本领域中已知用 PDE4 抑制剂来治疗的那些病症可以使用本文所描述的化合物来治疗。例如，所述化合物可以用于通过施用有效量的本发明化合物来治疗下列病症：例如哮喘，慢性支气管炎，慢性阻塞性肺疾病（COPD），嗜酸细胞肉芽肿，和其他良性或恶性增生性皮肤病，内毒素性休克（以及相关的病状，例如在马中的蹄叶炎和绞痛），败血症性休克，溃疡性结肠炎，克罗恩病，心肌和脑的再灌注损伤，炎性关节炎，慢性肾小球肾炎，特应性皮炎，荨麻疹，成人呼吸窘迫综合征，动物中的慢性阻塞性肺疾病，尿崩症，过敏性鼻炎，过敏性结膜炎，春季结膜炎，动脉再狭窄，arteriosclerosis，动脉粥样硬化，神经原性炎症，疼痛，咳嗽，类风湿性关节炎，强直性脊柱炎，移植排斥和移植物抗宿主病，胃酸分泌过多，细菌、真菌或病毒诱导的脓毒症或者败血症性休克，炎症和细胞因子介导的慢性组织变性，骨关节炎，癌症，恶病质，肌肉萎



缩，抑郁症，记忆障碍，肿瘤生长和正常组织的癌侵袭，它们是可通过抑制 PDE4 同工酶以及从而导致的升高的 cAMP 水平而得到改善的疾病。

此外，如上所述，本发明的化合物可以与其他治疗化合物联合使用。特别地，本发明的 PDE4 抑制性化合物的组合可以有利地与下列物质联合使用：i) 白三烯受体拮抗剂，ii) 白三烯生物合成抑制剂，或 iii) M2/M3 拮抗剂。

选择性 PDE4 抑制剂可以用于治疗许多炎性、呼吸系统和过敏性疾病和病状，例如哮喘；慢性阻塞性肺疾病 (COPD)，包括慢性支气管炎、肺气肿和支气管扩张；慢性鼻炎；和慢性鼻窦炎。在患有哮喘和其他阻塞性气道疾病的患者的气道内，作为用于药物发现的靶标，PDE4 在 PDE 同工酶中是最重要的，因为其分布在气道平滑肌和炎性细胞中。

气流阻塞和气道炎症是哮喘以及 COPD 的特征。选择性 PDE4 抑制剂可用于治疗这些病症，因为它们减少了嗜酸性粒细胞流入受过敏原攻击的动物的肺中，并且减少了在过敏原攻击后出现的支气管收缩和增加的支气管应答性。PDE4 抑制剂还抑制免疫细胞的活性，包括 CD4<sup>+</sup> T-淋巴细胞、单核细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞；减少肺水肿；抑制兴奋性非肾上腺素能非胆碱能神经传递 (eNANC)；增强抑制性非肾上腺素能非胆碱能神经传递 (iNANC)；减少气道平滑肌有丝分裂发生；和诱导支气管扩张。PDE4 抑制剂还抑制与 COPD 的病理生理学相关的许多炎性细胞的活性，包括单核细胞/巨噬细胞、CD8<sup>+</sup> T-淋巴细胞和嗜中性粒细胞。PDE4 抑制剂还减少血管平滑肌有丝分裂发生，并有效地干扰气道上皮细胞产生促炎介体的能力。通过从它们的颗粒中释放出中性蛋白酶和酸性水解酶，以及产生活性氧类别，嗜中性粒细胞有助于与慢性炎症相关的组织破坏，并且进一步牵涉诸如肺气肿的病状的病理学。

PDE4 抑制剂可以用于通过提高 cAMP，以及抑制超氧化物产生、脱粒、趋化性和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) 释放 (在嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和单核细胞中) 来治疗阻塞性肺疾病，包括 COPD。

呕吐,即恶心和反胃,是与某些 PDE4 抑制剂相关的不利的副作用,并且已在这样的情况下被观察到,即其中首先就 CNS 适应症例如抑郁症对 PDE4 抑制剂进行了研究。因此,在一个实施方案中,就不能有效地穿过血脑屏障来选择这些化合物。产生过多胃酸可以是 PDE4 抑制剂的另一个不利的副作用。

通过选择不渗透入中枢神经系统的化合物,或者通过经吸入而不是口服来施用所述化合物,可以最小化或避免上述有时与 PDE4 抑制剂相关的不利事件。

关于 PDE4 亚型, A、B、C 和 D, 已发现 PDE4C 通常对于所有抑制剂都较不敏感; 而关于亚型 A、B 和 D, 迄今还没有抑制剂特异性(被定义为在  $IC_{50}$  值方面的 10 倍差异)的确切证据。本领域中已暗示, 在  $S_r$  位点具有高亲和力的 PDE4 抑制剂可能与呕吐和增加的胃酸分泌相关联。

可以在动物模型中评价 PDE4 抑制剂, 所述动物模型证明 PDE4 抑制剂的 PDE4 抑制活性, 例如, 抑制抗原诱导的支气管收缩, 如在 Cavalla 等人, *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155:A660 (1997) 中所公开的, 该文献的内容通过提及而合并入本文。

还研究了将 PDE4 抑制剂用于治疗克罗恩病, 一种病因未知的通常涉及回肠末端的慢性肉芽肿性炎症性疾病, 其中出现肠壁的瘢痕形成和增厚, 这常常导致肠梗阻以及瘘和脓肿的形成。

在本领域中还已经作了很多努力来改善 PDE4 抑制剂关于 A 至 D 亚型的选择性(上文进一步描述的)。目前存在四种已知同种型(亚型)的 PDE4 同工酶, 包括七种剪接变体(还如上文进一步描述的)。PDE4D(PDE4B)同种型 mRNA 在炎性细胞例如嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞中表达, 并且本领域中已暗示, PDE4 的 B-选择性抑制剂能提供好的临床功效, 同时具有减少的副作用。

关于选择性 PDE4 同工酶的进一步背景知识可以在本领域中可得出版物中找到, 例如 Norman, "PDE4 inhibitors 1999," *Exp. Opin. Ther. Patents* 9(8): 1101-1118, 1999 (Ashley Publications Ltd.);

以及 Dyke 和 Montana, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 8(9) 1301-1325, 1999 (Ashley Publications Ltd.)。

### 治疗应用和临床终点 (Clinical Endpoints)

下面提供了本文所描述的化合物可用于的治疗应用, 以及与此类治疗应用相关的临床终点的解释, 和各种体外测定法和动物模型实验 (其能够提供足以定义和证明所述化合物的治疗效用的数据)。

所述化合物的治疗效用可应用于患者或受试者, 所述患者或受试者患有本文所示的疾病或病状并因此需要这样的治疗。有益的结果是无论施用给动物还是施用给人都是治疗性的。

所述化合物抑制 PDE4 同工酶并因此具有宽范围的治疗应用(如下文中进一步描述的), 因为 PDE4 家族的同工酶在所有哺乳动物的生理学中起着重要作用。由 PDE4 同工酶来执行的酶促作用是在促炎白细胞之中环腺苷酸 (cAMP) 的细胞内水解。而 cAMP 负责介导许多激素在体内的作用, 并因而 PDE4 抑制在各种生理学过程中起着重要作用。在现有技术中存在有大量的文献, 它们描述了 PDE 抑制剂对于各种炎性细胞应答的作用, 其除了 cAMP 升高之外还包括抑制超氧化物产生、脱粒、趋化性和肿瘤坏死因子 (TNF) 释放 (在嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和单核细胞中)。

PDE4 家族的同工酶是在牵涉慢性炎症性疾病的细胞类型中发现的磷酸二酯酶的主要形式, 并且在骨髓衍生细胞类型中, 只有血小板不表达 PDE。PDE4 是在免疫和炎性细胞中主要的代谢 cAMP 的酶, 并且是在气道平滑肌中两种主要的代谢 cAMP 的酶之一。PDE4 专有地存在于嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞中。以前使用体外实验已证明了 PDE 抑制剂的有益的抗炎作用, 所述体外实验确定, 此类化合物抑制人单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞中的过氧化物产生; 嗜碱性粒细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞中的介体释放; 和单核细胞和巨噬细胞中的 TNF  $\alpha$  释放。PDE 抑制剂还抑制炎性细胞如单核细胞和单核细胞衍生巨噬细胞、肺肥大细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、肺泡巨噬细胞和嗜酸性粒细胞的介体释放。

所述化合物提供了有益的抗炎作用, 因为 PDE4 抑制剂有力地抑制从单核吞噬细胞的 TNF  $\alpha$  释放。

### 哮喘

PDE4 抑制剂, 特别是 PDE4B 抑制剂, 可以用于治疗哮喘, 包括特应性和非特应性哮喘。如本文中所使用的, 术语“特应性哮喘”意欲与“过敏性哮喘”同义, 即作为在致敏的人中的过敏表现的支气管哮喘; 如本文中所使用的, “非特应性哮喘”意欲指所有其他哮喘, 尤其是特发性或“真”哮喘, 其由各种因素引发, 包括剧烈运动、刺激性颗粒、精神紧张等。

这些化合物在治疗特应性或非特应性哮喘方面的有效性可以使用下列本领域公认的模型来证明: PDE 抑制, 嗜酸性粒细胞活化的抑制, 和细胞浸润模型。一个基于使用灵长类的代表性测定法描述于 Turner 等人, *Inflammation Research* 45: 239-245, 1996, 该文献的内容通过提及而合并入本文。所述化合物的抗炎活性还可以通过嗜酸性粒细胞活化的抑制来证明, 如通过在人全血中由 SEPHADEX 小珠刺激的 LTE4 产生而测量的。

鉴于它们的抗炎活性, 它们对于气道高反应性的影响, 和它们与 PDE 同工酶抑制相关的特性, 特别是作为选择性 PDE4 抑制剂, 所述化合物可用于治疗和预防阻塞性和炎性气道疾病。因此, 通过在延长的时期内连续且定期施用所述化合物, 可以提供先期保护以针对因阻塞性或炎性气道疾病而引起的支气管收缩或其他症状性发作的复发。所述化合物可用作支气管扩张剂以用于治疗慢性或急性支气管收缩, 和用于针对症状地治疗阻塞性和炎性气道疾病。

本发明可应用于的阻塞性和炎性气道疾病包括: 哮喘; 尘肺; 慢性嗜酸细胞性肺炎; 慢性阻塞性气道或肺疾病 (COAD 或 COPD); 和成人呼吸窘迫综合征 (ARDS), 以及由其他药物疗法 (例如, 阿司匹林或  $\beta$ -激动剂疗法) 所引起的气道高反应性的加剧。

所述化合物还可用于治疗任何类型、病因或发病机制的尘肺, 包括例如矽土肺 (铁矽土矿工病); 炭肺 (矿工哮喘); 石棉肺 (汽管

装配工哮喘)；石末肺(石末沉着病)；由于吸入来自鸵鸟羽毛的粉尘而造成的鸵鸟毛尘肺；由于吸入铁颗粒而造成的铁尘肺；矽肺(磨工病)；棉尘肺(棉屑性哮喘)；和滑石尘肺。

### 慢性阻塞性肺疾病(COPD)

所述化合物可以用于治疗 COPD 或慢性阻塞性气道疾病(COAD)，包括慢性支气管炎、肺气肿或与之相关的呼吸困难。COPD 的特征在于不可逆的进行性的气道阻塞。慢性支气管炎与大的软骨性气道中粘膜下层的粘液分泌性腺体的增生和肥大有关。肺气肿的特征在于肺泡壁的破坏和肺弹性的丧失。

与哮喘一样，COPD 以炎症为特征，但在患者的支气管肺泡灌洗液和痰中发现的炎性细胞是嗜中性粒细胞而不是嗜酸性粒细胞。在 COPD 患者中还发现升高的炎性介体水平，包括 IL-8、LTB<sub>4</sub> 和 TNF- $\alpha$ ，并且此类患者的支气管的表面上皮和上皮下层(sub-epithelium)被发现被 T-淋巴细胞和巨噬细胞浸润。

### 支气管炎和支气管扩张

所述化合物可以用于治疗任何类型、病因或发病机制的支气管炎，包括急性支气管炎、急性喉气管支气管炎、花生仁吸入性支气管炎、卡他性支气管炎、慢性支气管炎、格鲁布性支气管炎、干性支气管炎、感染性哮喘性支气管炎、增生性支气管炎和肺泡状支气管炎。

所述化合物作为支气管扩张剂或支气管解痉剂来治疗支气管哮喘、慢性支气管炎以及相关疾病和病症的有效性，可以使用本领域已知的许多不同的体内动物模型来证明。

可以例如通过抑制了在人全血中由脂多糖(LPS)刺激的 TNF $\alpha$  产生来证明所述化合物的抗炎活性。

### 过敏性和其他类型的鼻炎；鼻窦炎

过敏性鼻炎以鼻塞、瘙痒、水样鼻漏、喷嚏和偶尔的嗅觉缺失为特征。过敏性鼻炎分成两种疾病类别，即季节性的和长期的，其中前者归因于花粉或室外霉菌孢子，而后者归因于常见的过敏原，例如房尘螨、动物皮屑和霉菌孢子。过敏性鼻炎一般展现出早期应答和晚期

应答。早期应答与肥大细胞脱粒相关，而晚期应答以嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和 T-淋巴细胞的浸润为特征。这些细胞还释放各种炎性介体，所有这些介体可促成在晚期应答中所展现出的炎症。

根据解剖学上的接近以及在某些情况下共享的病因和发病机制，鼻窦炎与鼻炎有关。鼻窦炎是窦的炎症，并且该病状可以是化脓性或非化脓性的，以及可以是急性或慢性的。

由于 PDE4 抑制剂在治疗炎症方面是有效的，所以本文所描述的化合物可以用于治疗鼻炎和鼻窦炎。

### 类风湿性关节炎，骨关节炎，疼痛、发热和痛风

关节炎被定义为关节的炎症，和类风湿性关节炎是主要为关节的慢性全身性疾病，其特点是滑膜和关节结构的炎性变化以及肌萎缩和骨质疏松。类风湿性关节炎的晚期阶段的特点是关节强硬和变形。如本文中所使用的，术语“类风湿性关节炎”意欲包括本领域众所周知的相关和相联系的关节炎形式，例如急性关节炎、慢性炎症性关节炎、变性关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎、增生性关节炎和椎骨关节炎。

负责进行性关节破坏的类风湿性关节炎的三个主要病理学特征是炎症、异常的细胞和体液应答和滑膜增生。促炎细胞因子，例如 IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13 和 TNF- $\alpha$ ，是造成关节组织损伤、炎症、增生、关节畸形和骨吸收的主要贡献因素。参见 Firestein 和 Zvaifner, *Arth. Rheum.* 33: 768-773, 1990。

本文所描述的 PDE4 抑制剂可用于治疗类风湿性关节炎，因为它们能够抑制各种炎性细胞（包括嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞）的活性。所述化合物可用于治疗类风湿性关节炎，还因为它们在抑制经由许多不同因素（包括抗原）介导的 T-细胞增殖方面的有效性。所述化合物能够促进单核细胞释放细胞因子 IL-10，而其能够减少滑液单核细胞产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13 和 GM-CSF，这进一步增强了 PDE4 抑制剂的总抗炎特性。此外，可以将所述化合物抑制从经刺激的单核细胞释放 TNF- $\alpha$  的能力与炎症动物模

型相关联，在所述模型中抗炎作用可以显示为相应于 TNF- $\alpha$  积累的抑制。

本领域中已知的类风湿性关节炎动物模型证明了，PDE4 抑制剂对于 TNF- $\alpha$  的体内调节与它们用于治疗类风湿性关节炎的效用之间的相关性，可以用于评估本文所描述的化合物的有效性。一种此类动物模型是小鼠佐剂关节炎 (adjuvant arthritis) 模型，如 Sekut 等人, *Olin. Exp. Immunol.* 100(1): 126-132 (1995) 中所描述的。

### 痛风

痛风是指一组嘌呤代谢病症，并且完全发展的痛风表现为下列现象的各种组合：高尿酸血症，由尿酸一钠一水合物的晶体引起的复发性、特征性急性炎性关节炎，所述晶体在四肢关节中或周围的痛风石性沉积 (tophaceous deposits) (这可导致关节破坏和严重致残)，和尿酸尿石病。

由于所述化合物抑制炎症，所以它们还可以用于治疗痛风以及与炎症相关的发热和疼痛。

### 与嗜酸性粒细胞相关的病症

作为其总体抗炎活性的一部分，PDE4 抑制剂可以抑制嗜酸性粒细胞活化。因此，所述化合物可用于与嗜酸性粒细胞相关的病症的治疗性治疗。此类病症包括嗜酸性粒细胞增多，其为在血液中形成和积累异常大量的嗜酸性粒细胞。可以使用本文所描述的化合物来治疗嗜酸性粒细胞增多性肺浸润，慢性嗜酸性细胞性肺炎，以及热带肺嗜酸性粒细胞增多和支气管肺曲霉病的症状 (使用抗微生物疗法最佳地治疗了这些病症的根本原因)。

术语“肉芽肿的 (肉芽肿性)”表示“含有肉芽肿”，和术语“肉芽肿”是指任何小的结节状的定界的单核炎性细胞聚集，或类似于上皮细胞的经修饰的巨噬细胞的此类集合，其周围常常围绕着一圈淋巴细胞，带有在损害周围常见的纤维化。有些肉芽肿包含嗜酸性粒细胞。肉芽肿形成代表了由各种感染性和非感染性因子起始的慢性炎症反应。许多此类肉芽肿性病状，例如变应性肉芽肿性血管炎 (也称为丘-

斯综合征)、结节性多动脉炎(PAN)和其他与嗜酸性粒细胞相关的病症可以使用本文所描述的化合物来治疗。

### 特应性皮炎、荨麻疹、结膜炎和葡萄膜炎

特应性皮炎是一种慢性炎性皮肤病，其见于具有倾向于对于瘙痒症的皮肤域值降低的遗传素质的个体中，常伴有过敏性鼻炎、枯草热和哮喘，并且主要以极度瘙痒为特征。特应性皮炎也称为过敏性皮炎，和过敏性或特应性湿疹。特应性皮炎常常与哮喘和过敏反应联系在一起，因此可以用 PDE4 抑制剂来治疗。

PDE4 抑制剂可以用于治疗由嗜酸性粒细胞驱动的皮肤病，通常通过局部施用。PDE4 抑制剂可以用于治疗特应性皮炎、血管神经性水肿和荨麻疹（包括胆碱能性荨麻疹、寒冷性荨麻疹、接触性荨麻疹和丘疹性荨麻疹），以及各种眼病症，例如结膜炎和葡萄膜炎。

### 多发性硬化症和其他炎性自身免疫疾病

多发性硬化症是一种自身免疫病症，除了慢性炎症和脱髓鞘之外，这种病症也导致在中枢神经系统内的神经胶质增生。在多发性硬化症中，炎性损害局限于中枢神经系统的白质中，但是却遍及中枢神经系统的白质，虽然特征在于脱髓鞘的硬化斑为该疾病的标志。而脱髓鞘的发展是由少突胶质细胞坏死引起的，并且脱髓鞘与主要由 T-细胞和巨噬细胞组成的浸润物相关，所述 T-细胞和巨噬细胞与当地细胞（例如星形胶质细胞、小胶质细胞和微血管脑内皮细胞）一起表达 II 类主要组织相容性复合体(MHC)。因此，这些细胞牵涉抗原呈递和炎症反应，并且在多发性硬化症患者的脑组织中已鉴定了许多促炎细胞因子，包括 TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IL-1、IL-6 和 IFN- $\gamma$  在被发现，并且它们的存在一般与活跃的损害有关。

抑制 TNF- $\alpha$  产生的化合物已经成为了关注焦点，因为 TNF- $\alpha$  在体外介导髓鞘和少突胶质细胞损伤，诱导星形胶质细胞表达表面黏附分子，和与血脑屏障的瓦解相关。已将动物模型用于证明 TNF- $\alpha$  在多发性硬化症中的作用，例如在实验性变应性脑脊髓炎(EAE)中，施用抗-TNF 抗体或可溶性 TNF 受体显示出提供了保护性效应。已经报道了



TNF- $\alpha$  mRNA 水平和 EAE 的进展之间的直接相关性。参见 Reeno 等人, *J. Immunol.* 154: 944-953, 1995。

由于 PDE4 抑制剂减少 TNF- $\alpha$ , 因此它们可以用于治疗多发性硬化症。除了抑制 PDE4 活性和 TNF- $\alpha$  产生之外, 所述化合物还充当免疫抑制剂, 并且可以用于治疗与炎症相关的自身免疫疾病。

可以被治疗的其他自身免疫疾病/炎症性疾病包括, 但不限于, 自身免疫性血液学病症, 例如溶血性贫血、再生障碍性贫血、纯红细胞贫血和特发性血小板减少性紫癜; 全身性红斑狼疮; 多发性软骨炎; 硬皮病; 韦格纳肉芽肿病; 皮炎; 慢性活动性肝炎; 重症肌无力; 斯-约综合征; 特发性口炎性腹泻; 自身免疫性炎症肠病, 例如溃疡性结肠炎和克罗恩病; 内分泌性眼病; 格雷夫斯病; 结节病; 肺泡炎; 慢性超敏性肺炎; 原发性胆汁性肝硬化; 幼年型糖尿病 (I 型糖尿病); 前葡萄膜炎和肉芽肿性 (后) 葡萄膜炎; 干性角膜结膜炎和流行性角膜结膜炎; 弥漫性肺间质纤维化 (间质肺纤维化); 特发性肺纤维化; 囊性纤维化; 银屑病关节炎; 有和没有肾病综合征的肾小球肾炎, 包括急性肾小球肾炎、特发性肾病综合征和微小病变肾病; 炎性/过度增生性皮肤病, 包括银屑病和特应性皮炎 (如上文进一步详细讨论的)、接触性皮炎、过敏性接触性皮炎、良性家族性天疱疮、红斑性天疱疮、落叶性天疱疮和寻常性天疱疮。

此外, 所述化合物还可作为免疫抑制剂以用于预防器官移植后的同种异体移植物排斥反应, 其中此类器官通常包括来自骨髓、肠、心脏、肾、肝、肺、胰腺、皮肤和角膜的组织。

### 炎性肠病

溃疡性结肠炎 (UC) 是一种在结肠中的慢性复发性溃疡, 主要发生在粘膜和粘膜下层, 其原因不明, 并且其临床表现为痉挛性腹部疼痛, 直肠出血, 以及带有极少粪便微粒的血、脓和粘液的松散排出物。肠的相关疾病包括胶原性结肠炎、息肉状结肠炎和透壁性结肠炎。克罗恩病 (CD) 是病因不明的慢性肉芽肿性炎症性疾病, 其涉及胃肠道的任何部分, 但通常涉及具有肠壁的瘢痕形成和增厚的回肠末端, 这常

常导致肠梗阻以及瘘和脓肿的形成，并且具有在治疗后的高复发率。溃疡性结肠炎、克罗恩病和上文所讨论的相关疾病一起被称为炎症肠病（IBD）。

目前用于炎症肠病的疗法包括 5-氨基水杨酸、皮质类固醇和免疫调节剂，例如硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤和氨甲蝶呤，它们被使用是因为它们抑制 TNF- $\alpha$  产生的能力。选择性 PDE4 抑制剂，例如本文所描述的化合物，抑制从外周血单核细胞释放 TNF- $\alpha$ ，因此可以用于治疗炎症肠病。

#### 败血症性休克、肾衰竭、恶病质和感染

败血症性休克是与极重度感染，最通常地革兰氏阴性细菌感染相关的休克，尽管它可以由其他细菌、病毒、真菌和原生动物产生。败血症性休克被认为起因于内毒素或感染因子的其他产物对于血管系统的作用，其造成大量血液被隔离在毛细血管和静脉中。还涉及补体和激肽系统的活化，以及组胺、细胞因子、前列腺素和其他介体的释放。

肾衰竭是肾脏不能在正常负荷条件下排泄正常血浆水平的代谢物，或者不能在正常摄入条件下保留电解质。在内毒素诱导的急性肾衰竭的大鼠模型中，选择性 PDE4 抑制剂显示出显著增加尿 cAMP 排泄，明显减弱内毒素诱导的肾血管阻力的增加，并且减少肾血流量和肾小球滤过率。参见 Carcillo 等人，*Pharmacol. Exp. Ther.* 279:1197 (1996)。因此，本文所描述的化合物，作为选择性 PDE4 抑制剂，可以用于治疗肾衰竭，例如急性肾衰竭。恶病质是以总体不健康和营养不良为特征的体质病。恶病质可以由下列因素引起：疟疾、体液或其他器官功能的丧失或衰退、晚期肾衰竭、心脏病、低血压、体重下降、食欲缺乏、肾上腺皮质激素缺乏、结核病、癌症、人免疫缺陷病毒（HIV）和获得性免疫缺陷综合征（AIDS）。所述化合物可用于治疗恶病质，因为它们可以下调或抑制 TNF- $\alpha$  释放。

所述化合物还可以用于治疗感染的症状，其中所述感染增加患者中 TNF- $\alpha$  的产成。这样的感染的实例包括病毒感染，例如 HIV-1、HIV-2 和 HIV-3；巨细胞病毒（CMV）；流感；腺病毒；和疱疹病毒，特别是

带状疱疹和单纯疱疹。

所述化合物还可以用于治疗酵母和真菌感染的症状，其中所述酵母和真菌对于通过 TNF- $\alpha$  的上调敏感或者引起患者中的 TNF- $\alpha$  产生。

当用于治疗感染的症状时，所述化合物可以并且应当与抗微生物剂一起施用，例如，多粘菌素类，例如多粘菌素 B；咪唑类，例如克霉唑、益康唑、咪康唑和酮康唑；三唑类，例如氟康唑和伊曲康唑；和两性霉素类，例如两性霉素 B 和两性霉素 B 脂质体。

### 肺动脉高压

磷酸二酯酶水解血管舒张第二信使 cAMP 和 cGMP，并且通过由缺氧诱导的肺动脉高压 (HPH) 而增加。缺氧是组织氧气供应降低至低于生理水平，尽管血液对组织的灌注足够。结果导致的肺动脉高压的特征在于在肺动脉循环之内的压力升高，即，高于 30 mm Hg 的收缩压和高于 12 mm Hg 的舒张压。

在使用来自正常大鼠和来自具有由缺氧诱导的肺动脉高压的大鼠的分离的肺动脉环的大鼠模型中，选择性 PDE4 抑制剂显示出增强了异丙肾上腺素和弗司扣林的弛缓活性。因此，PDE4 抑制剂可以在由缺氧诱导的肺动脉高压中显著提高肺动脉弛缓。因此，所述化合物可用于治疗肺动脉高压，特别是由缺氧诱导的肺动脉高压。

### CNS 病症

已知选择性 PDE4 抑制剂在抑郁症和其他中枢神经系统病症中提供了有益的效果，包括帕金森病 (Hulley 等人, *Eur. J. Neurosci.* 7: 2431-2440, 1995)；以及学习和记忆障碍 (Egawa 等人, *Jpn. J. Pharmacol.* 75: 275-281, 1997)。PDE4 抑制剂还已用于治疗迟发性运动障碍和药物依赖 (WO 95/28177 和 JP 92221423 (1997))。还已发现 PDE4 同工酶在控制中脑神经元中多巴胺生物合成方面起着主要作用。因此，PDE4 抑制剂，例如本文所描述的化合物，可以用于治疗与中脑神经元之内和周围的多巴胺相关或由其介导的病症和疾病。

所述化合物还可以用于治疗动脉硬化性痴呆和皮质下痴呆。动脉硬化性痴呆，也称血管性痴呆和多发性脑梗塞痴呆，是这样的一种痴

呆，其具有以一系列小中风形式的逐步恶化的过程，和由脑血管疾病引起的神经缺损的不规则分布。皮质下痴呆由影响皮质下脑结构的损害引起，并且其特征在于记忆丧失，伴随着在处理信息或作出智力响应方面缓慢。包括伴随着亨廷顿舞蹈病、威尔逊病、震颤麻痹和丘脑萎缩的痴呆。

使用本文所描述的化合物和组合物还可以治疗另外的病症，包括但不限于，单相抑郁症、具有炎性组分的急性和慢性神经变性病症、帕金森病、轻度认知缺损、记忆丧失、阿尔茨海默病、脊髓创伤、颅脑损伤或多发性硬化症。

#### 其他治疗应用

已知 PDE4 抑制剂可用于治疗缺血-再灌注损伤 (Block 等人, *NeuroReport* 8: 3829-3832, 1997); 自身免疫性糖尿病 (Liang 等人, *Diabetes* 47: 570-575, 1998); 视网膜自身免疫性 (Xu 等人, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 40: 942-950, 1999); 慢性淋巴细胞性白血病 (Kim 和 Lerner, *Blood* 92: 2484-2494, 1998); HIV 感染 (Angel 等人, *AIDS* 9: 1137-1144, 1995); 红斑狼疮 (JP 10067682 (1998)); 肾脏和输尿管疾病 (DE 4230755 (1994)); 泌尿生殖系统和胃肠道病症 (转让给 Schering AG 的 WO 94/06423); 和前列腺疾病 (WO 99/02161)。

因此，本文所公开的化合物可以用于治疗任何一种上述病症。

#### V. 证明生物学活性的测定法

各种测定法可以用于证明所述化合物的功效 (例如，结合亲和力，选择性，和/或活性)。下面提供了代表性的实例。

##### 在人全血中由 LPS 和 FMLP 诱导的 TNF $\alpha$ 和 LTB $_4$ 测定法

全血提供了富含蛋白质和细胞的环境，其适合于研究抗炎化合物 (例如 PDE4 选择性抑制剂) 的生物化学功效。

正常的未刺激的人血不包含可检测水平的 TNF- $\alpha$  和 LTB $_4$ 。在用 LPS 刺激后，激活的单核细胞表达并分泌 TNF- $\alpha$  直至 8 小时，并且血

浆水平保持稳定 24 小时。经公开的研究已显示，在转录水平上出现了通过经 PDE4 抑制和/或增强的腺苷酸环化酶活性来增加细胞内 cAMP 而导致的 TNF- $\alpha$  的抑制。

可以就它们在人外周血单核细胞 (PBMCs) 中抑制由 LPS 诱导的 TNF $\alpha$  产生方面的活性来分析 PDE4 抑制剂。LPS(脂多糖)可以从 Sigma 购得。PBMCs 可以从 ATCC 购得 (THP-1, ATCC 编号 TIB-202), 并且可以使用标准方案进行培养, 和通过 1-STEP POLYMORPHS 培养基 (Accurate Chemical, Westbury NY) 来分离。

可以将经纯化的人 PBMCs 以浓度为  $2 \times 10^6$  个细胞/ml 的浓度悬浮在补充有 10% 热失活的 FBS (胎牛血清) 和 1% 抗生素 (青霉素-链霉素) 的 RPMI 1640 培养基中。将 100  $\mu$ l 的等分试样 ( $2 \times 10^5$  个细胞) 添加至 96 孔微量滴定板中。在脂多糖 (10 ng/ml) 刺激之前, 可以向所述细胞以 0.1 nM - 10  $\mu$ M 的剂量范围添加 PDE4 抑制剂和对照 (培养基中 DMSO 的终浓度为 0.1%), 并保持 60 分钟。于 37 $^{\circ}$ C 在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中温育 18-20 小时后, 可以通过于 800 g 进行离心来收集无细胞的上清液, 并贮存于 -80 $^{\circ}$ C。然后, 可以就 TNF $\alpha$  的量来对所述上清液进行分析, 例如使用由 R&D Systems (Minneapolis, MN) 开发的 QUANTIKINE 免疫测定法试剂盒。IC<sub>50</sub> 值可以使用 GRAPHPAD Prism 软件来计算。

#### 体内抗过敏活性

可以就对于 IgE 介导的过敏性肺部炎症 (其是通过由致敏的豚鼠吸入抗原而诱导的) 的影响来测试所述化合物。最初, 可以通过腹膜内注射与氢氧化铝和百日咳疫苗相组合的抗原, 来使豚鼠在轻度的环磷酰胺诱导的免疫抑制下对于卵清蛋白致敏。2 和 4 个星期后可以给予抗原的加强剂量。在 6 个星期时, 可以用气雾化的卵清蛋白来攻击动物, 而同时腹膜内施用抗组胺剂例如美吡拉敏。在进一步的 48 小时后, 可以进行支气管肺泡灌洗 (BAL), 并且可以计数在 BAL 液中的嗜酸性粒细胞和其他白细胞的数目。可以取出肺以用于炎性损伤的组织学检查。在施用所述化合物后, 可以评估, 相对于对照, 在经治疗的动物的肺中嗜酸性粒细胞以及其他炎性白细胞的积累是否显著减少,

和/或是否有较少的炎性损伤。

### 基于 SPA 的 PDE 活性测定法方案

可以如下以 96 孔平板形式来筛选抑制 IV 型 cAMP 特异性磷酸二酯酶将 cAMP 水解成 AMP 的化合物：

于 30℃ 向 96 孔平板中添加受试化合物（溶解在 2 μL DMSO 中），188 μL 底物缓冲液，其包含 [2, 8-<sup>3</sup>H] 环腺苷酸（cAMP, 100 nM 至 50 μM），10 mM MgCl<sub>2</sub>，1 mM EDTA，50 mM Tris, pH 7.5。通过添加 10 μL 人重组 PDE4（控制所述量，从而使得在 10 分钟内形成大约 10% 的产物）来起始反应。在 10 分钟后，通过添加 1 mg PDE-SPA 珠（Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N. J.）来终止反应。在 Wallac Microbeta<sup>®</sup> 96 孔平板计数器（EG&G Wallac Co., Gaithersburg, Md.）上定量所产生的产物 AMP。在不存在酶时的信号被定义为背景。100% 活性被定义为在存在酶和 DMSO 时检测出的信号，并减去背景。因而，计算出抑制百分。IC<sub>50</sub> 值可以用非线性回归拟合（使用标准的 4-参数/多结合点方程式）从 10-点滴定中来估计。

下列实施例意欲举例说明本发明的某些实施方案，但并不意味着限制了本发明。除非另外具体说明，实验程序在下列条件下进行。所有操作在室温或环境温度下，即在 18-25℃ 的温度下进行。在减压（600-4000 帕斯卡：4.5-30 mm Hg）下，以直至 60℃ 的浴温度，使用旋转蒸发仪来进行溶剂的蒸发。通过薄层色谱法（TLC）来追踪反应过程，并且给出反应时间仅为了举例说明。熔点是未修正的，并且 ‘d’ 表示分解。所给出的熔点是对于如所述进行制备的材料而获得的熔点。多晶型现象可导致在一些制备中分离出具有不同熔点的样品。所有最终产品的结构和纯度通过至少一种下列技术来确保：TLC、质谱法、核磁共振（NMR）波谱法或微量分析数据。给出产率仅为了举例说明。当给出时，NMR 数据以主要诊断性质子（major diagnostic protons）的 delta (δ) 值的形式，表示为相对于作为内标的四甲基硅烷（TMS）的百万分之几（ppm），其通过使用所示的溶剂在 300 MHz、400 MHz 或 500 MHz 下测定。用于信号形状的常规缩写为：s.，单峰；d.，双

重峰; t., 三重峰; m., 多重峰; br., 宽; 等等。另外, “Ar” 表示芳族信号。化学符号具有它们的通常含义; 还使用了下列缩写: v (体积), w (重量), b. p. (沸点), m. p. (熔点), L (升), ml (毫升), g (克), mg (毫克), mol (摩尔), mmol (毫摩尔), eq (当量)。

参考下列非限制性的实施例将更好地理解本发明。

### 实施例 1: PDE4 抑制剂的合成和评估

使用在上述流程 I 和 II 中所概括的化学来合成一系列假定的 PDE4 抑制剂, 并且评估它们对于各种 PDEs 的抑制活性。这些 PDEs 包括 PDE4A10、PDE4B2B、PE4C2、PDE4D2、PDE2A3、PDE3A、PDE5A1、PDE7A1、PDE9A2 和 PDE10A2。

将 PDE2A、PDE3A、PDE4A-D、PDE5A、PDE7A、PDE9A 和 PDE10A 的催化结构域亚克隆入大肠杆菌中并在其中过表达。亚克隆、过表达和蛋白质纯化是标准技术, 并且用于纯化 PDE4D、PDE5A、PDE7A 和 PDE9A 的方案已被公开 (Huai, Q., Wang H, Sun, Y., Kim, H.Y., Liu, Y. 和 Ke, H., *Structure* 11, 865-873 (2003); Huai, Q., Colicelli, J. 和 Ke, H. *Biochemistry* 42, 13220-13226 (2003); Huai, Q., Liu, Y., Francis, S. H., Corbin, J. D. 和 Ke, H., *J. Biol. Chem.*, 279, 13095-13101 (2004); 和 Wang, H., Liu, Y., Chen, Y., Robinson, H. 和 Ke, H. *J. Biol. Chem.* 280, 30949-30955 (2005); Huai 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 9624-9629 (2004) )。因此, 下文仅简单概述关键步骤和结果。

PDE4A10 (BF528806)、PDE4B2B (BC036108) 和 PDE4D2 (BF059733) 的 EST (表达序列标签) cDNA 克隆购自 ATCC (美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection))。人 PDE4C2 的 cDNA 克隆由 University of Glasgow, UK 的 Miles Houslay 教授提供。将 PDE4A10 (残基 298-622)、PDE4B2B (残基 152-528)、PDE4C2 (残

基 200-558) 和 PDE4D2 (残基 79-438) 的催化结构域亚克隆入表达载体 pET15b 中。将所得到的质粒 pET-PDE4A、pET-PDE4B、pET-PDE4C 和 pET-PDE4D 转化入大肠杆菌菌株 BL21 (CODONPLUS) 中。使带有所述表达质粒的大肠杆菌细胞在 LB 培养基中于 37℃ 生长至光吸收  $A_{600} = 0.7$ , 然后添加 0.1 mM 异丙基  $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷以于 11℃-15℃ 诱导过表达 20-40 小时。PDE4A10、PDE4B、PDE4C2 和 PDE4D2 这些重组蛋白质在 Ni-NTA 亲和力柱 (Qiagen) 上进行纯化, 随后为凝血酶切割以及在 Q-SEPHAROSE (Amersham) 和 SUPERDEX 200 (Amersham) 柱上的进一步纯化。典型的纯化从 2 升细胞培养物中产生大约 10 mg PDE4A10、20 mg PDE4B2B、15 mg PDE4C2 和 100 mg PDE4D2。这些经纯化的 PDE4 蛋白质在 SDS-PAGE 中显示出单条条带, 据估计具有 >95% 的纯度。关于 PDE4D2 的蛋白质表达和纯化的方案已被公开 (Huai 等人, 2003a)。

人 PDE2A3 的 cDNA 克隆 (U67733) 购自 ATCC。将 PDE2A3 的催化结构域 (残基 580-941) 亚克隆入载体 pET15b 中, 并且于 15℃ 在不含 NaCl 的 2xYT 培养基中在大肠杆菌菌株 BL21 (CODONPLUS) 中过表达 20 小时。通过 Ni-NTA 亲和力、Q-SEPHAROSE 和 SEPHACRYL S300 柱来纯化重组的 PDE2A3。典型批次的纯化从 2 升细胞培养物中产生大约 5 mg PDE2A3。所述 PDE2A3 蛋白具有 >95% 的纯度和 180 nmol/分钟/mg 的比活性。

人 PDE3A 的 cDNA 克隆由 Temple University 的 Robert Colman 博士提供。将 PDE3A 的氨基酸 679-1141 的编码区亚克隆入 pET15b 中。质粒 pET-PDE3A 于 15℃ 在不含盐的经修饰的 LB 培养基中在大肠杆菌菌株 BL21 (CODONPLUS) 中过表达 24 小时。通过 Ni-NTA 亲和力和 SEPHACRYL S300 柱来纯化重组的 PDE3A。典型的纯化从 4 升细胞培养物中产生大约 10 mg PDE3A, 纯度为 >95%, 其具有 120 nmol/分钟/mg 的比活性。

通过对由 Vanderbilt University 的 Jackie Corbin 博士提供的牛 PDE5A 的 cDNA 进行定点诱变来亚克隆人 PDE5A1。将载体 pET15b 和



大肠杆菌菌株 BL21 (CODONPLUS) 用于于 15℃ 过表达人 PDE5A1 的催化结构域 (残基 535-860) 过夜 (Huai 等人, 2004a)。通过 Ni-NTA 亲和力、Q-SEPHAROSE 和 SEPHACRYL S300 柱来纯化重组的 PDE5A1。典型批次的纯化产生超过 10 mg PDE5A1/2 升细胞培养物。PDE5A1 蛋白具有 >95% 的纯度, 和具有 2  $\mu$ M/分钟/mg 的比活性, 这与在杆状病毒系统中表达的全长 PDE5A1 相当 (Fink 等人, 1999)。

PDE7A1 的 cDNA 购自 ATCC (BE782968)。将催化结构域 (残基 130-482) 亚克隆入载体 pET32a 中。将质粒 pET32-PDE7A1 转化入大肠杆菌菌株 BL21 (CODONPLUS) 中, 并且于 15℃ 在 2xYT 培养基中过表达 12-16 小时。使用 Ni-NTA 亲和力柱、随后的凝血酶切割以及 Q-SEPHAROSE 和 SEPHACRYL S300 柱来纯化 PDE7A1 的催化结构域。典型的纯化从 4 升细胞培养物中产生大约 5 mg PDE7A1, 其据估计具有好于 95% 的纯度 (Wang 等人, 2005)。

人 PDE9A2 的 cDNA 克隆 (BC009047) 购自 ATCC。将 PDE9A2 的催化结构域 (残基 181-506) 亚克隆入载体 pET15b 中, 并且于 15℃ 在 LB 培养基中在大肠杆菌菌株 BL21 (CODONPLUS) 中过表达过夜。使用 Ni-NTA 亲和力、Q-SEPHAROSE 和 SEPHACRYL S300 柱来纯化重组的 PDE9A2。该 PDE9A2 蛋白具有大于 95% 的纯度, 如通过 SDS-PAGE 所显示的。典型的纯化从 2 升细胞培养物中产生超过 100 mg PDE9A2 (Huai 等人, 2004b)。

人 PDE10A2 的 cDNA 克隆 (BQ435652) 购自 ATCC。将 PDE10A2 的催化结构域 (残基 442-789) 亚克隆入载体 pET15b 中, 并且于 18℃ 在不含 NaCl 的 2xYT 培养基中在大肠杆菌菌株 BL21 (CODONPLUS) 中过表达 15-20 小时。通过 Ni-NTA 亲和力、Q-SEPHAROSE 和 SEPHACRYL S300 柱来纯化重组的 PDE10A2。典型的纯化从 2 升细胞培养物中产生大约 10 mg PDE10A2。该 PDE10A2 蛋白具有 >95% 的纯度, 如通过 SDS-PAGE 所显示的。

使用上文所讨论的 PDE 酶, 就它们结合上述 PDE 家族的能力来评估所述合成的化合物。基于对于抑制活性的评估, 在核心结构中某些

官能度的存在和对于某些 PDE4 亚家族的高结合亲和力以及选择性之间发现具有强的相关性。

特别地，四种化合物（显示在图 2 以及表 1 和 2 中）具有低于微摩尔浓度（sub-micromolar）的  $IC_{50}$  值。更重要地，大多数这些抑制剂显示出偏爱 PDE4，这表明具有优异的选择性。例如，化合物 1 具有 18 nM 的  $IC_{50}$ ，其选择性分别为对于 PDE7A1 和 PDE9A2 的 5000 和 27000 倍。

在另一个实验中，就其结合其他 PDE4 受体亚型的能力来评估化合物 1。化合物 1 抑制 PDE4A、4B、4C 和 4D 的  $IC_{50}$  值分别为  $99\pm 15$ 、 $35\pm 5$ 、 $127\pm 17$  和  $18\pm 1$  nM。

因此，所述化合物显示出是选择性 PDE4 抑制剂。

表 1. 式 7 的代表性化合物


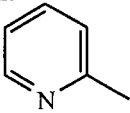
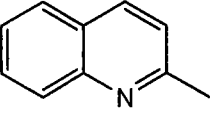
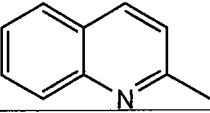
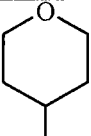
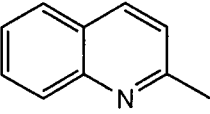
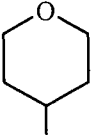
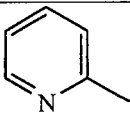
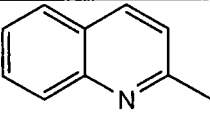
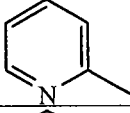
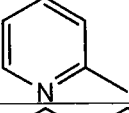
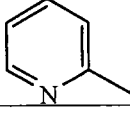
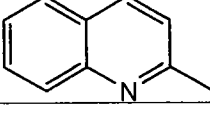
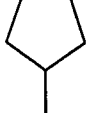
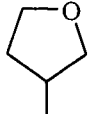
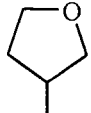
化合物编号	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
1	CH <sub>2</sub> F		-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	R <sub>4</sub> 和 R <sub>5</sub> 形成 羰基	
2		Me		R <sub>4</sub> 和 R <sub>5</sub> 形成 CHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
3	H	Me		H	CH <sub>2</sub> C(O)CH <sub>3</sub>
4	Me			R <sub>4</sub> 和 R <sub>5</sub> 形成 羰基	
5	Me		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> 和 R <sub>5</sub> 形成 羰基	
6		Me		R <sub>4</sub> 和 R <sub>5</sub> 形成 羰基	
7		Me		H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
8		Me			
9	CH <sub>2</sub> F		-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	R <sub>4</sub> 和 R <sub>5</sub> 形成 羰基	
10	CH <sub>2</sub> F		-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> 和 R <sub>5</sub> 形成 羰基	
11	CH <sub>2</sub> F		-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> 和 R <sub>5</sub> 形成 羰基	

表 2. 所选择出的先导抑制剂对于各种 PDEs 的 IC<sub>50</sub> 值 (μM)

化合物编号	PDE4 D2 (79-438)	PDE7 A1 (130-482)	PDE9 A2 (181-506)	His- PDE2 A3 (580-941)	PDE5 A1 (535-860)
1	0.018	100	500	100	500
2	35	360	150	1000	1000
3	6	200	500	100	80
4	45	500	1000	1000	1000
5	3.5	1000	1000	500	150
6	80	360	1000	1000	300
7	10	36	50	100	20
8	6	17	60	300	40
9	0.028	ND	ND	ND	ND
10	0.41	ND	ND	ND	ND
11	0.061	ND	ND	ND	ND

ND = 未测定

### 实施例 2: 基于细胞的 PDE4 抑制剂测定法

将下列关于基于细胞的 PDE4 抑制剂测定法的程序用于测量所述化合物对于肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) 产生方面的影响。TNF  $\alpha$  是激活嗜中性粒细胞和单核细胞的炎性细胞因子, 因而在慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 和哮喘中起着重要作用。脂多糖 (LPS) 是关键炎症刺激物, 其诱导 TNF  $\alpha$  产生并且造成肺损伤。抑制由 LPS 诱导的 TNF  $\alpha$  产生是用于评估 PDE4 抑制剂在抗炎以及治疗 COPD 和哮喘中的效力的基本测定法 (Muisse 等人, *Biochem Pharmacol.* 63, 1527-1535 (2002); Ouqued 等人, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 18: 49-54 (2005))。

测量了在人外周血单核细胞 (PBMC) 系统中化合物 1 和化合物 9 在抑制由 LPS 诱导的 TNF  $\alpha$  释放方面的活性。化合物 1、化合物 9 和咯

利普兰的  $IC_{50}$  值分别为 0.04、0.11 和 0.06  $\mu\text{M}$  (图 3 中所显示的数据)。由于测定法系统的变化,文献中的关于  $\text{TNF}\alpha$  释放的  $IC_{50}$  值可能不是可直接比较的。然而,如果将咯利普兰作为相对参照,我们的化合物 1 的效力比西洛司特好得多(咯利普兰的  $IC_{50} = 1.3 \mu\text{M}$ , 西洛司特的  $IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ , Oaqued 等人, *Pulm Pharmacol Ther.* 18, 49-54 (2005)), 西洛司特是已在临床试验中用于治疗 COPD 的药物前导物。

上述内容是本发明的举例说明,而不被解释为限制了本发明。本发明由下面的权利要求来定义,所述权利要求的等价形式包括在其中。

下列在整个说明书中所引用的参考文献,就其在本文中被指明为相关的内容,通过提及而合并入本文。

Abdel-Hamid IA. Phosphodiesterase 5 inhibitors in rapid ejaculation: potential use and possible mechanisms of action. *Drugs* 64:13-26 (2004).

Altmann, E., Green, J., and Tintelnot-Blomley, M. Arylaminoethyl amides as inhibitors of the cysteine protease cathepsin K-investigating P1 substituents. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 13(12): 1997-2001 (2003)

Antoni, F. Molecular diversity of cyclic AMP signaling, *Front. Neuroendocrin.* 21: 103-132 (2000).

Barker, P., Finke, P., and Thompson, K. Preparation and cyclization of aryloxyacetaldehyde acetals-A general synthesis of 2,3-unsubstituted benzofurans. *Synth. Commun.* 19: 257-265 (1989).

Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl. J. Med.* 343: 269-280 (2000).

Barnes, S., Boersma, B., Patel, R., Kirk, P. M., Darley-USmar, V. M., Kim, H., and Xu, J. Isoflavonoids and chronic disease: mechanisms of action. *BioFactors* 12, 209-215 (2000).

Barnette, MS. Phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Fortschritte der Arzneimittelforschung - Progress in Drug Research*, 53: 193-229 (1999)

Barnette, M. S., Underwood, D. C. New phosphodiesterase inhibitors as therapeutics for the treatment of chronic lung disease, *Curr. Opin. Pulmonary Med.* 6, 164-169 (2000).

Bax, A. Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics.

*Protein Science* 12:1-16 (2003).

Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterase: functional implication of multiple isoforms, *Physiol. Rev.* **75**: 725-748 (1995).

Bowers, M. M., Carroll, P., and Joullie, M. M. Model studies directed toward the total synthesis of 14-membered cyclopeptide alkaloids. Synthesis of prolyl peptides via a four-component condensation. *J. Chem. Soc. Perkin T.* **1**(5): 857-865 (1989).

Brown, H. C., Prasad, J. V., and Zee, S. H. Hydroboration. 71. hydroboration of representative heterocyclic olefins with borane-methyl sulfide, 9-borabicyclo[3.3.1]nonane, dicyclohexylborane, and disiamylborane. synthesis of heterocyclic alcohols. *J. Org. Chem.* **50**(10): 1582-1589 (1985).

Brünger, A.T. et al. Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst.* **D54**: 905-921 (1998).

Card GL, England BP, Suzuki Y, Fong D, Powell B, Lee B, Luu C, Tabrizizad M, Gillette S, Ibrahim PN, Artis DR, Bollag G, Milburn MV, Kim SH, Schlessinger J, Zhang KY. Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases. *Structure* **12**: 2233-2247 (2004).

Card GL, Blasdel L, England BP, Zhang C, Suzuki Y, Gillette S, Fong D, Ibrahim PN, Artis DR, Bollag G, Milburn MV, Kim SH, Schlessinger J, Zhang KY. A family of phosphodiesterase inhibitors discovered by cocrystallography and scaffold-based drug design. *Nat Biotechnol.* 2005 Feb; **23**(2):201-7 (2005).

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* **184**, 409-420.

Castro A, Jerez MJ, Gil C, Martinez A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in immunomodulatory responses: advances in the development of specific phosphodiesterase inhibitors. *Med Res Rev.* **25**, 229-244 (2005)

Cherng, Y.-J. Synthesis of substituted pyridines by the reactions of halopyridines with sulfur, oxygen and carbon nucleophiles under focused microwave irradiation. *Tetrahedron* **58**(24): 4931-4935 (2002).

Chin KV, Yang WL, Ravatn R, Kita T, Reitman E, Vettori D, Cvijic ME, Shin M, Iacono L. Reinventing the wheel of cyclic AMP: novel mechanisms of cAMP signaling. *Ann N Y Acad Sci.* **968**: 49-64 (2002).

Claussen H, Buning C, Rarey M, Lengauer T. (2001) FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. *J Mol Biol.* **308**: 377-395.

Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". *Acta Cryst.* **D50**: 760--763.

- Comish-Bowden, A. (1979) Fundamentals of enzyme kinetics. Butterworths, London.
- Conti, M., Richter, W., Mehats, C., Livera, G., Park, J.Y., and Jin, C. (2003) Cyclic AMP-specific PDE4 Phosphodiesterases as Critical Components of Cyclic AMP Signaling, *J. Biol. Chem.* **278**: 5493 - 5496.
- Corbin, J. D. & Francis, S. H. (1999) Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil, *J. Biol. Chem.*, **274**: 13729-13732.
- Corbin, J. D. & Francis, S. H. (2002) Pharmacology of phosphodiesterase-5inhibitors, *Int. J. Clin. Pract.* **56**: 453-459.
- Côté, B., R. Frenette, S. Frescott, M. Blouin, C. Brideau, Y. Ducharme, R. W. Friesen, F. Laliberté, P. Masson, A. Styhler and Y. Girard (2002) Sustituted aminopyridines as potent and selective phosphodiesterase-4-inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **13**: 741-744.
- Crowe SM, Streetman DS.(2004) Vardenafil treatment for erectile dysfunction. *Ann. Pharmacother.* **38**: 77-85.
- Degerman, E., Belfragem P., & Manganiello, V. C. (1996) cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3 gene family). *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 1010-1013.
- Dousa, T. P. (1999) Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney, *Kidney Internat.* **55**: 29-62.
- Dym, O., Xenarios, I., Ke, H., and Colicelli, J. (2002) Molecular docking of competitive phosphodiesterase inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **61**: 20-25.
- Filler, R. (1963) *Chem. Rev.* **63**: 21-43.
- Fink, T. L., Francis, H., Beasley, A., Grimes, K. A., and Corbin, J. D. (1999) Expression of an active, monomeric catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *J. Biol. Chem.* **274**: 24613-24620.
- Fitzpatrick, L. A. (2004) Soy isoflavones: hope or hype? *Maturias* **44**: S21-S29.
- Francis SH, Corbin JD. (1999) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **36**: 275-328.
- Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, Omori K. (1999) Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem.* **274**: 18438-18445.
- Gane, P.J. and Dean, P.M. (2000) Recent advances in structure-based rational drug design. *Curr.*

*Opin. Struct. Biol.* **10**, 401-404.

Giembycz, M. A. (2002) Development status of second generation PDE 4 inhibitors for asthma and COPD: the story so far. *Monaldi Arch. Chest Dis.* **57**: 48-64.

Goodsell, D. S., Morris, G. M., and Olson, A. J. (1996) Automated Docking of Flexible Ligands: Applications of AutoDock. *J. Mol. Recognition* **9**: 1-5.

Goraya TA, and Cooper DM. (2005) Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives. *Cell Signal.* **17**: 789-797.

Guay, D., P. Hamel, M. Blouin, C. Brideau, C. C. Chan, N. Chauret, Y. Ducharme, Z. Huang, M. Girard, T. R. Jones, F. Laliberté, P. Masson, M. McAuliffe, H. Piechuta, J. Silva, R. N. Young and Y. Girard (2002). Discovery of L-791,943: a potent, selective, non emetic and orally active phosphodiesterase-4 inhibitor. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **12**: 1457-1461.

Hansen, G., Jin, S.-L. C., Umetsu, D. T., and Conti, M. (2000) Absence of muscarinic cholinergic airway responses in mice deficient in the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **97**: 6751-6756.

Hatzelmann, A. and Schudt, C. (2001) Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**: 267-279.

Hersperger, R., Bray-French, K., Mazzoni, L., Muller, T. (2000) Palladium-catalyzed cross-coupling reactions for the synthesis of 6,8-Disubstituted 1,7-Naphthyridines: A novel class of potent and selective phosphodiesterase type 4D inhibitors. *J. Med. Chem.* **43**: 675-682.

Hersperger, R., Dawson, J., Mueller, T. (2002) Synthesis of 4-(8-benzo[1,2,5]oxadiazol-5-yl-[1,7]naphthyridine-6-yl)-benzoic acid: a potent and selective phosphodiesterase type 4D inhibitor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**: 233-235.

Hirayama, F., H. Koshio, N. Katayama, T. Ishihara, H. Kaizawa, Y. Taniuchi, K. Sato, Y. Sakai-Moritani, S. Kaku, H. Kurihara, T. Kawasaki, Y. Matsumoto, S. Sakamoto and S. Tsukamoto (2003) Design, synthesis and biological activity of YM-60828 derivatives. Part 2: potent and orally-bioavailable factor Xa inhibitors based on benzothiadiazine-4-one template. *Bioorg. & Med. Chem.* **11**(3): 361-381.

Houslay, M. D. (1998) Adaptation in cyclic AMP signaling processes: a central role for cyclic AMP phosphodiesterases, *Cell & Develop. Biol.*, **9**: 161-167.

Houslay, M. D. & Milligan, G. (1997) Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity, *TIBS*, **22**: 217-224.

Houslay, M. D., Sullivan, M., & Bolger, G. B. (1998) The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and



selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions, *Adv. Pharmacol.*, **44**: 225-343.

Houslay, MD, and Adams DR. (2003) PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization, *Biochem J.* **370**: 1-18.

Huai, Q., Wang H, Sun, Y., Kim, H.Y., Liu, Y., and Ke, H. (2003a) Three dimensional structures of PDE4D in complex with roliprams and implication on inhibitor selectivity. *Structure* **11**: 865-873.

Huai, Q., Colicelli, J., and Ke, H. (2003b) The crystal structure of AMP-bound PDE4 suggests a mechanism for phosphodiesterase catalysis, *Biochemistry* **42**: 13220-13226.

Huai, Q., Liu, Y., Francis, S. H., Corbin, J. D., and Ke, H. (2004a) Crystal structures of phosphodiesterases 4 and 5 in complex with inhibitor IBMX suggest a conformation determinant of inhibitor selectivity, *J. Biol. Chem.*, **279**: 13095-13101.

Huai, Q., Wang, H., Zhang, W., Colman, R. W., Robinson, H., and Ke, H. (2004b) Crystal structure of phosphodiesterases 9 shows orientation variation of inhibitor IBMX binding. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **101**: 9624-9629.

Huang, Z., Ducharme, Y., MacDonald, D., and Robinchaud, A. (2001) The next generation of PDE4 inhibitors, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**: 432-438.

Iffland A, Kohls D, Low S, Luan J, Zhang Y, Kothe M, Cao Q, Kamath AV, Ding YH, Ellenberger T. (2005) Structural Determinants for Inhibitor Specificity and Selectivity in PDE2A Using the Wheat Germ *in Vitro* Translation System. *Biochemistry* **44**: 8312-8325.

Ikegami, T., Verdier, L., Sakhaii, P., Grimme, S., Pescatore, B., Saxena, K., Fiebig, K.M., and Griesinger, C. (2004). Novel techniques for weak alignment of proteins in solution using chemical tags coordinating lanthanide ions. *Journal of Biomolecular NMR* **29**: 339-349.

Jayalakshmi, V., Biet, T., Peters, T., and Krishna, N.R. (2004). Refinement of the conformation of UDP-galactose bound to galactosyltransferase using the STD NMR intensity-restrained CORCEMA optimization. *Journal of the American Chemical Society* **126**: 8610-8611

Jones, TA, Zou, J-Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* **A47**: 110-119.

Juilfs, D. M., Soderling, S., Burns, F., & Beavo, J. A. (1999) Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **135**: 67-104.

Kerrigan, F., Martin, C., and Thomas, G. (1998) Synthesis of arylpiperazines via palladium-catalysed aromatic amination reactions of bromoarenes with N-tert-butoxycarbonylpiperazine. *Tetrahedron Lett.* **39**: 2219-2222.

Klein C. (2002) Nitric oxide and the other cyclic nucleotide. *Cell. Signalling.* **14**: 493-498.

Ko, W., Shih, C., Lai, Y., Chen, J., and Huang, H. (2004) Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* **68**: 2087-2094.

Kontaxis, G., Clore, G.M., and Bax, A. (2000). Evaluation of cross-correlation effects and measurement of one-bond couplings in proteins with short transverse relaxation times. *Journal of Magnetic Resonance* **143**: 184-196.

Kroemer RT, Vulpetti A, McDonald JJ, Rohrer DC, Trosset JY, Giordanetto F, Cotesta S, McMartin C, Kihlen M, Stouten PF. (2004) Assessment of Docking Poses: Interactions-Based Accuracy Classification (IBAC) versus Crystal Structure Deviations. *J Chem Inf Comput Sci.* **44**: 871-881.

Kuhn, P., Wilson, K., Patch, M. G., and Stevens, R. C. (2002) The genesis of high-throughput structure-based drug discovery using protein crystallography. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 704-710.

Kuwano, R., K. Sato and Y. Ito (2000) Hydrogenation of five-membered heteroaromatic compounds catalyzed by a rhodium-phosphine complex. *Chem. Lett.* **4**: 428-429.

Kuzmic, P. (1996) Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase. *Anal. Biochem.* **237**: 260-273.

LaMattina, J. L. and R. L. Taylor (1981) Chemoselective reactions of 3-chloroisonicotinitrile. *J. Org. Chem.* **46**: 4179-4182.

Lamontagne, S., Meadows, E., Luk, P., Normandin, D., Muise, E., Boulet, L., Pon, D. J., Robichaud, A., Robertson, G. S., Metters K. M., and Nantel F. (2001) Localization of phosphodiesterase-4 isoforms in the medulla and nodose ganglion of the squirrel monkey. *Brain Res.* **920**: 84-96

Lee, M.E., Markowitz, J., Lee, J.O., and Lee, H. (2002). Crystal structure of phosphodiesterase 4D and inhibitor complex. *FEBS Lett.* **530**: 53-58.

Limer, J. and Speirs, V. (2003) Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res.* **6**: 119-127.

Lin, J.H, Perryman, A. L., Schames, J. R., & McCammon, J. A. (2002) Computational drug design accommodating receptor flexibility: the relaxed complex scheme. *J. Am. Chem. Soc.* **124**:

5632-5633.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. (2001) Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol.* **91**: 1421-1430.

Lipworth BJ. (2005) Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* **365**: 167-75.

Liu, Y., Shakur, Y., Yoshitake, M., and Kambayashi, J. J. (2001) Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovascular Drug Rev.* **19**: 369-86.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* **52**: 375-414.

Manallack, D. T. H., R. A.; Thompson, P. E. (2005). "The next generation of phosphodiesterase inhibitors: structural clues to ligand and substrate selectivity of phosphodiesterases." *J. Med. Chem.* **48**(10): 3449-3462

Manganiello, V. C., Murata, T., Taira, M., Belfrage, P. & Degerman, F. (1995a) Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch. Biochem. Biophys.* **322**: 1-13.

Manganiello, V. C., Taira, M., Degerman, F. & Belfrage, P. (1995b) Type III cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3 gene family). *Cell Signal.* **7**: 445-455.

Manning CD., Burman M., Christensen SB., Cieslinski LB., Essayan DM., Grous M., Torphy TJ., Barnette MS. (1999) Suppression of human inflammatory cell function by subtype-selective PDE4 inhibitors correlates with inhibition of PDE4A and PDE4B. *Brit. J. Pharmacol.* **128**: 1393-1398.

Mayer, M., and Meyer, B. (2001). Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society* **123**: 6108-6117.

Mehats C., Andersen CB., Filopanti M., Jin SL., Conti M. (2002) Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends in Endocrinol. & Metabolism.* **13**: 29-35.

Meyer, B., and Peters, T. (2003). NMR Spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewandte Chemie-International Edition* **42**: 864-890.

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., and Olson, A. J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **19**: 1639-1662.

Morris LC, Valafar H, Prestegard JH Assignment of protein backbone resonances using connectivity, torsion angles and  $^{13}\text{C}$  alpha chemical shifts. *J Biomol NMR*. **29**: 1-9 (2004).

Movsesian MA. (2000) Therapeutic potential of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors in heart failure. *Expert Opin. Investigational Drugs*. **9**: 963-73.

Muise ES, Chute IC, Claveau D, Masson P, Boulet L, Tkalec L, Pon DJ, Girard Y, Frenette R, Mancini JA. (2002) Comparison of inhibition of ovalbumin-induced bronchoconstriction in guinea pigs and *in vitro* inhibition of tumor necrosis factor-alpha formation with phosphodiesterase 4 (PDE4) selective inhibitors. *Biochem Pharmacol*. **63**: 1527-1535.

Müller, T., Engels, P., & Fozard, J. R. (1996) Subtypes of type 4 cAMP phosphodiesterase: structure, regulation and selective inhibition. *TIPS*. **17**: 294-298.

Navaza, J. & Saludjian, P. (1997) AMoRe: an automated molecular replacement program package, *Methods Enzymol*. **276**: 581-594.

Nichols, M. R. and Morimoto, B. H. (2000) Differential inhibition of multiple cAMP phosphodiesterase isozymes by isoflavones and tyrphostins. *Mol. Pharmacol*. **57**: 738-754.

Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol*. **276**: 307-326.

Ouagued M, Martin-Chouly CA, Brinchault G, Leportier-Comoy C, Depince A, Bertrand C, Lagente V, Belleguic C, Pruniaux MP. (2005) The novel phosphodiesterase 4 inhibitor, CI-1044, inhibits LPS-induced TNF-alpha production in whole blood from COPD patients. *Pulm. Pharmacol Ther*. **18**: 49-54.

Palmer AG 3rd. (2004) NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chem Rev*. **104**: 3623-3640.

Pelligrino DA, Wang Q. (1998) Cyclic nucleotide crosstalk and the regulation of cerebral vasodilation. *Prog. Neurobiol*. **56**: 1-18.

Phillips, G., W. J. Guilford, B. O. Buckman, D. D. Davey, K. A. Eagen, S. Koovakkat, A. Liang, M. McCarrick, R. Mohan, H. P. Ng, M. Pinkerton, B. Subramanyam, E. Ho, L. Trinh, M. Whitlow, S. Wu, W. Xu and M. M. Morrissey (2002) Design, synthesis, and activity of a novel series of factor Xa inhibitors: optimization of arylamidine groups. *J. Med. Chem*. **45**: 2484-2493.

Piaz, V. D. & Giovannoni, P. (2000) Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. *Eur. J. Med. Chem.*, **35**: 463-480.

- Picard, F., S. Barassin, A. Mokhtarian and R. W. Hartmann (2002) Synthesis and evaluation of 2'-substituted 4-(4'-carboxy- or 4'-carboxymethylbenzylidene)-N-acylpiperidines: highly potent and *in vivo* active steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 inhibitors. *J. Med. Chem.* **45**(16): 3406-3417
- Pintacuda G, Keniry MA, Huber T, Park AY, Dixon NE, Otting G. (2004) Fast structure-based assignment of  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of selectively  $^{15}\text{N}$ -labeled paramagnetic proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 2963-2970.
- Prestegard, J.H., Bougault, C.M., and Kishore, A.I. (2004). Residual dipolar couplings in structure determination of biomolecules. *Chemical Reviews* **104**: 3519-3540.
- Reinhard, E. J., J. L. Wang, R. C. Durley, Y. M. Fobian, M. L. Grapperhaus, B. S. Hickory, M. A. Massa, M. B. Norton, M. A. Promo, M. B. Tollefson, W. F. Vernier, D. T. Connolly, B. J. Witherbee, M. A. Melton, K. J. Regina, M. E. Smith and J. A. Sikorski (2003) Discovery of a simple picomolar inhibitor of cholesteryl ester transfer protein. *J. Med. Chem.* **46**(11): 2151-2168.
- Rotella, D. P. (2002) Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. *Nature Rev. Drug Discovery* **1**: 674 – 682.
- Sagi, K., T. Nakagawa, M. Yamanashi, S. Makino, M. Takahashi, M. Takayanagi, K. e. a. Takenaka, N. Suzuki, S. Oono, N. Kataoka, K. Ishikawa, S. Shima, Y. Fukuda, T. Kayahara, S. Takenaka, Y. Shima, K. Tashiro, H. Yamamoto, R. Yoshimoto, S. Iwata, T. Tsuji, K. Sakurai and M. Shoji (2003) Rational design, synthesis, and structure-activity relationships of novel Factor Xa inhibitors: (2-substituted-4-amidinophenyl)pyruvic and -propionic acids. *J. Med. Chem* **46**(10): 1845-1857.
- Scapin G, Patel SB, Chung C, Varnerin JP, Edmondson SD, Mastracchio A, Parmee ER, Singh SB, Becker JW, Van der Ploeg LH, Tota MR. (2004) Crystal structure of human phosphodiesterase 3B: atomic basis for substrate and inhibitor specificity. *Biochemistry* **43**: 6091-6100.
- Schrör K. (2002) The pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab.* **4** Suppl 2: S14-9.
- Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. (1999) Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 7071-7076.
- Soderling, S. H., & Beavo, J. A. (2000) Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions, *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 174-179.
- Song, Z. J., M. Zhao, L. Frey, J. Li, L. Tan, C. Y. Chen, D. M. Tschaen, R. Tillyer, E. J. J. Grabowski, R. Volante and P. J. Reider (2001) Practical asymmetric synthesis of a selective endothelin A receptor (ETA) antagonist. *Org. Lett.* **3**: 3357-3360.
- Soto FJ, Hanania NA. (2005) Selective phosphodiesterase-4 inhibitors in chronic obstructive

lung disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **11**: 129-134.

Souness, J. E., Aldous, D., & Sargent C. (2000) Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology*, **47**: 127-162.

Spina D. (2003) Theophylline and PDE4 inhibitors in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **9**: 57-64.

Stelmach, J. E., L. Liu, S. B. Patel, J. V. Pivnichny, G. Scapin, S. Singh, C. E. Hop, Z. Wang, J. R. Strauss, P. M. Cameron, E. A. Nichols, S. J. O'Keefe, E. A. O'Neill, D. M. Schmatz, C. D. Schwartz, C. M. Thompson, D. M. Zaller and J. B. Doherty (2003). "Design and synthesis of potent, orally bioavailable dihydroquinazolinone inhibitors of p38 MAP kinase. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **13**(2): 277-280.

Sturton, G. & Fitzgerald, M. (2002) Phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of COPD. *Chest* **121**: 192s-196s.

Sung, B. J., Hwang, K. Y., Jeon Y. H., Lee, J. I., Heo, Y. S., Kim, J. H., Moon, J., Yoon, J. M., Hyun, Y. L., Kim, E., Eum, S. J., Park, S.Y., Lee, J. O., Lee, T. G., Ro, S., and Cho, J. M. (2003) Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. *Nature* **425**: 98-102.

Taylor, R. D., Jewsbury, P. J., and Essex, J. W. (2002) A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **16**: 151-166.

Tolman, J.R. (2001). Dipolar couplings as a probe of molecular dynamics and structure in solution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**: 532-539.

Torphy, T. J. (1998) Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 351-370.

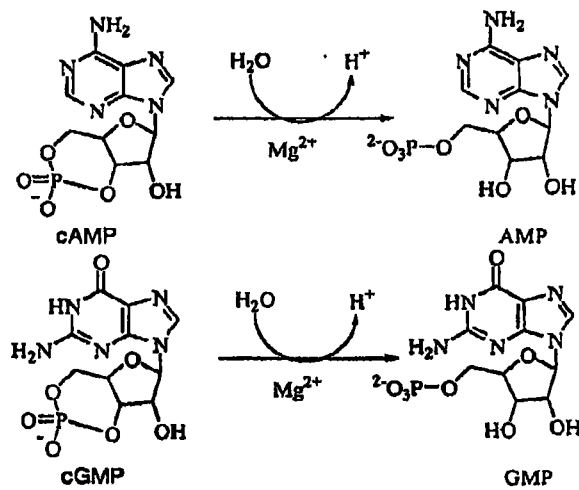
Truss, M. C., Stief, C. G., Uckert, S., Becker, A. J., Wafer, J., Schultheiss, D., and Jonas, U. (2001) Phosphodiesterase 1 inhibition in the treatment of lower urinary tract dysfunction: from bench to bedside. *World J. Urol.* **19**: 344-350.

Tugarinov, V., Hwang, P.M., and Kay, L.E. (2004). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of high-molecular-weight proteins. *Annual Review of Biochemistry* **73**: 107-146.

Turko, I. V., Francis, S. H., and Corbin, J. D. (1998) Hydropathic analysis and mutagenesis of the catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). cGMP versus cAMP substrate selectivity. *Biochemistry* **37**: 4200-4205.

Valafar, H., and Prestegard, J.H. (2004). REDCAT: a residual dipolar coupling analysis tool. *J. Magn. Reson.* **167**: 228-241.

- Vassali, P. (1992) The pathophysiology of TNF. *Ann. Rev. Immunol.*, **10**: 411-452.
- Vignola AM. (2004) PDE4 inhibitors in COPD--a more selective approach to treatment. *Respir Med.* **98**: 495-503.
- Wang, H., Liu, Y., Chen, Y., Robinson, H., and Ke, H. (2005) Multiple elements jointly determine inhibitor selectivity of cyclic nucleotide phosphodiesterases 4 and 7. *J. Biol. Chem.* **280**: 30949-30955.
- Wang, P., Wu, P., Ohleth, K. M., Egan, R. W., and Billah, M. M. (1999) Phosphodiesterase 4B2 is the predominant phosphodiesterase species and undergoes differential regulation of gene expression in human monocytes and neutrophils. *Mol. Pharmacol.* **5**: 170-174.
- Wang, Y., S. Chackalamannil, W. Chang, W. Greenlee, V. Ruperto, R. A. Duffy, R. McQuade and J. E. Lachowicz (2001) Design and synthesis of ether analogues as potent and selective M2 muscarinic receptor antagonists. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **11**(7): 891-894.
- Wohnert, J., Franz, K.J., Nitz, M., Imperiali, B., and Schwalbe, H. (2003). Protein alignment by a coexpressed lanthanide-binding tag for the measurement of residual dipolar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 13338-13339.
- Wong, C. F. and McCammon, J. A. (2003) *Protein flexibility and computer sided drug design. Annual Review of Pharmacol. Toxicol.*, **43**: 31-45.
- Xu, R.X., et al. (2000) Atomic structure of PDE4: Insight into phosphodiesterase mechanism and specificity. *Science* **288**: 1822-1825.
- Xu, R.X., Rocque, W. J., Lambert, M. H., Vanderwall, D. E., Luther, M. A., and Nolte, R. T. (2004) Crystal structure of the catalytic domain of phosphodiesterase 4B complexed with AMP, 8-Br-AMP, and rolipram. *J. Mol. Biol.* **337**: 355-365.
- Zhang, W., Ke, H., and Colman, R. W. (2002) Identification of interaction sites of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3A with milrinone and cilostazol using molecular modeling and site-directed mutagenesis. *Mol. Pharmacol.* **62**: 514-520.
- Zhang KY, Card GL, Suzuki Y, Artis DR, Fong D, Gillette S, Hsieh D, Neiman J, West BL, Zhang C, Milburn MV, Kim SH, Schlessinger J, Bollag G. (2004) A Glutamine Switch Mechanism for Nucleotide Selectivity by Phosphodiesterases. *Mol. Cell.* **15**: 279-286.



由PDE催化的cAMP和cGMP的水解

图1



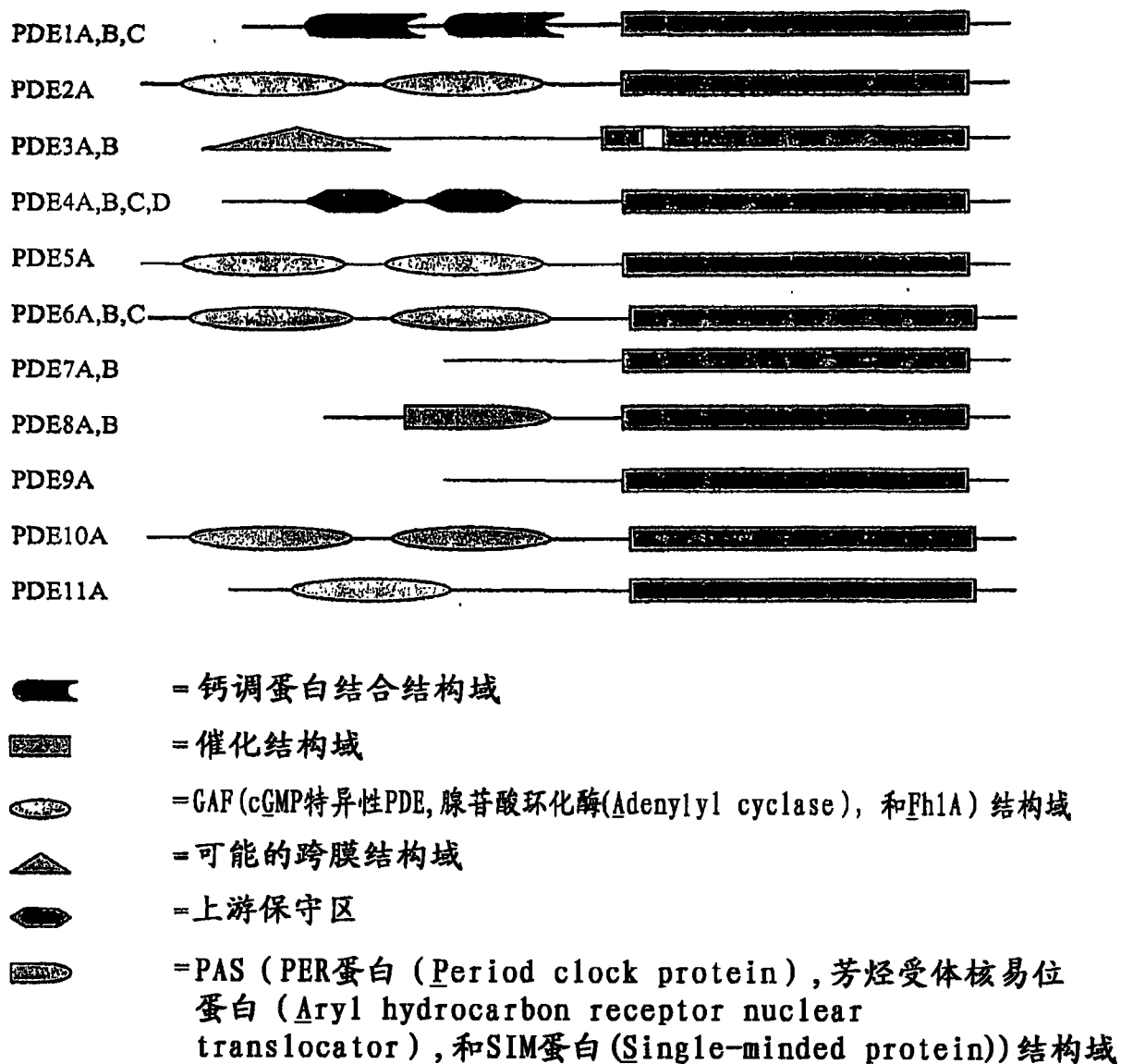


图2

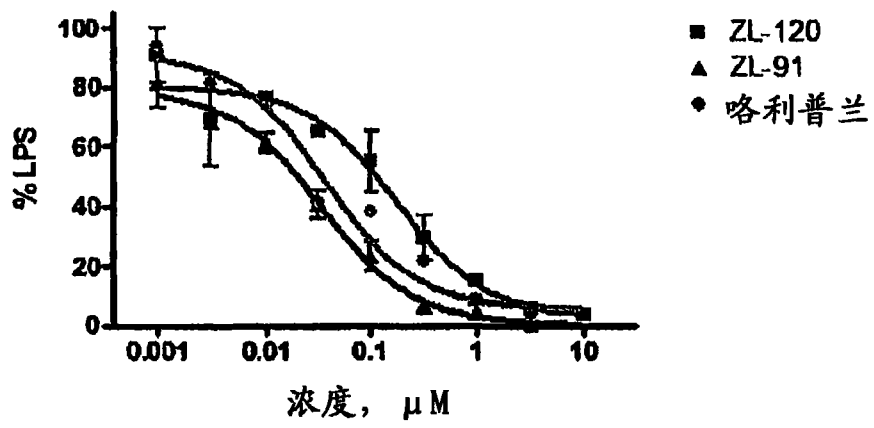


图 3