

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 231/38 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480040623.6

[43] 公开日 2007年1月31日

[11] 公开号 CN 1906198A

[22] 申请日 2004.11.19

[21] 申请号 200480040623.6

[30] 优先权

[32] 2003.11.25 [33] US [31] 60/525,050

[32] 2004.11.10 [33] US [31] 10/985,236

[86] 国际申请 PCT/US2004/039046 2004.11.19

[87] 国际公布 WO2005/051954 英 2005.6.9

[85] 进入国家阶段日期 2006.7.18

[71] 申请人 布里斯托尔 - 迈尔斯斯奎布药品公司
地址 美国新泽西州

[72] 发明人 J·P·舍尔拜恩 S·K·帕克
J·A·佩斯蒂 R·E·于尔
K·C·麦努尔蒂

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜 李连涛

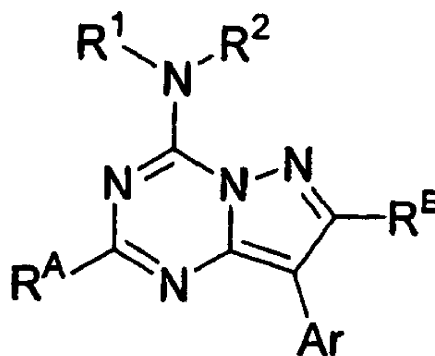
权利要求书 20 页 说明书 41 页

[54] 发明名称

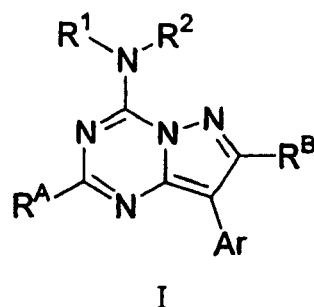
吡啶并 [1,5- α] -1,3,5-三嗪和其中间物的制备方法

[57] 摘要

本发明提供了用于制备具有下述结构的、可用于治疗与 CRF 相关的病症,比如焦虑和抑郁,的促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)的新方法和中间物。



1、制备式 I 的化合物的方法:



其中:

Ar 是用 0-5 个 R^3 取代的苯基或者吡啶基;

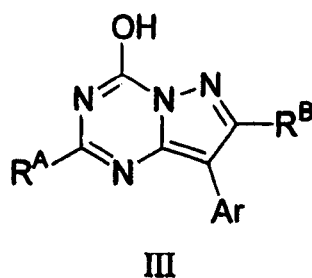
每个 R^1 和 R^2 独立是 H、 (C_1-C_8) 烷基或者 (C_1-C_6) 烷氧基烷基;

每个 R^3 独立是氢、卤素、CN、硝基、 (C_1-C_4) 烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 (C_1-C_4) 卤烷基、或者 (C_1-C_4) 卤烷氧基; 和

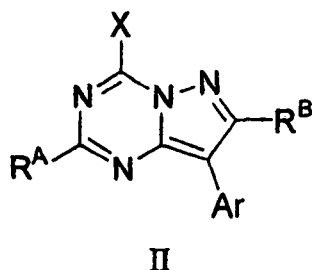
每个 R^A 和 R^B 独立是 (C_1-C_4) 烷基;

包括:

(a) 在胺存在时, 使式 III 的化合物



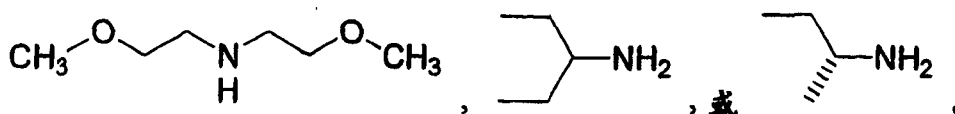
与 POX_3 接触一定时间, 其中 X 是卤素, 并且接触条件足以获得式 II 的化合物:



其中所述胺选自二异丙基乙胺、二乙基苯基胺、二异丙基苯胺、二乙基苯胺、二异丙基异丁胺、三苄基胺、三苯基胺、三环己基胺、或者二乙基异丙胺，和：

(b)在足以获得式I的化合物的条件下使所述式II的化合物和 NHR^1R^2 接触一定时间。

- 2、权利要求1的方法，其中X是Cl。
- 3、权利要求1的方法，其中所述胺是二异丙基乙胺。
- 4、权利要求1的方法，其中所述 NHR^1R^2 是



- 5、权利要求1的方法，其中 R^A 是甲基。
- 6、权利要求1的方法，其中 R^B 是甲基。
- 7、权利要求1的方法，其中步骤(b)的所述接触在铵盐存在下进行。
- 8、权利要求7的方法，其中所述铵盐是苄基三乙基氯化铵、苄基三丁基氯化铵或者甲基三烷基($\text{C}_8 - \text{C}_{10}$)氯化铵。
- 9、权利要求7的方法，其中所述铵盐是苄基三丁基氯化铵。
- 10、权利要求1的方法，其中所述步骤(b)的接触在有机溶剂存在下进行。
- 11、权利要求10的方法，其中所述有机溶剂包括甲基叔丁基醚、乙腈、乙酸异丙酯、甲苯或者1-氯丁烷的一种或多种。
- 12、权利要求10的方法，其中所述有机溶剂是乙腈和甲基叔丁基醚的混合物。
- 13、权利要求1的方法，其中所述步骤(a)的接触在约50 - 约70

℃的温度进行。

14、权利要求1的方法，其中所述式II的化合物在所述步骤(b)的接触之前并不分离。

15、权利要求1的方法，其中：

Ar是2-甲基-4-甲氧基苯基；

R¹是甲氧基乙基；

R²是甲氧基乙基；

R^A是甲基；和

R^B是甲基。

16、权利要求1的方法，其中：

Ar是2-氟-5-氟-4-甲氧基苯基；

R¹是H；

R²是戊-3-基；

R^A是甲基；和

R^B是甲基。

17、权利要求1的方法，其中：

Ar是2-甲基-6-甲氧基吡啶-3-基；

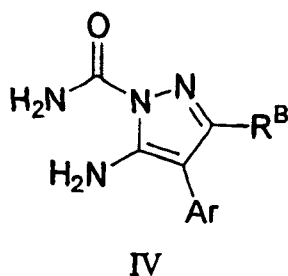
R¹是H；

R²是丁-2-基；

R^A是甲基；和

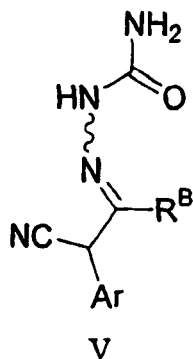
R^B是甲基。

18、权利要求1的方法，其中所述式III的化合物通过(c)在足以获得所述式III的化合物条件下使式IV的化合物与(R^A)C(OR⁴)接触一定时间制备：



其中R⁴是(C₁-C₄)烷基。

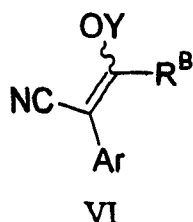
- 19、权利要求 18 的方法，其中 R^A 是甲基。
- 20、权利要求 18 的方法，其中 R^A 是甲基。
- 21、权利要求 18 的方法，其中 R^B 是甲基。
- 22、权利要求 18 的方法，其中所述步骤 (c) 的接触在酸或碱存在下进行。
- 23、权利要求 22 的方法，其中所述步骤 (c) 的接触在酸存在下进行。
- 24、权利要求 23 的方法，其中所述酸是对甲苯磺酸。
- 25、权利要求 18 的方法，其中所述步骤 (c) 的接触在有机溶剂存在下进行。
- 26、权利要求 25 的方法，其中所述有机溶剂包含 1-甲基-2-吡咯烷酮。
- 27、权利要求 18 的方法，其中所述步骤 (c) 的接触在约 40 - 约 100℃ 的温度进行。
- 28、权利要求 18 的方法，其中通过 (d) 在足以获得式 IV 的化合物的条件下使式 V 的化合物与碱接触一定时间制备式 IV 的化合物：



- 29、权利要求 28 的方法，其中所述碱是 1, 8-二氮二环[5.4.0]十一碳-7-烯 (DBU)。
- 30、权利要求 28 的方法，其中所述步骤 (d) 的接触在有机溶剂存在下进行。
- 31、权利要求 30 的方法，其中所述有机溶剂包含 1-甲基-2-吡咯烷酮。
- 32、权利要求 28 的方法，其中所述步骤 (d) 的接触在约 0 - 约 30

℃的温度进行。

33、权利要求 28 的方法，其中所述式 V 的化合物通过 (e) 在足以获得式 VI 的化合物的条件下，使式 VI 的化合物和缩氨基脲、或者其酸加成盐反应一定时间制备：



其中，Y 是碱金属或者 Z^1Z^2 ，其中 Z^1 是卤素和 Z^2 是碱土金属。

34、权利要求 33 的方法，其中 Y 是 K。

35、权利要求 33 的方法，其中所述步骤 (e) 的接触在约 3 - 约 5 的 pH 进行。

36、权利要求 4 的方法，其中所述步骤 (e) 的接触在酸存在下进行。

37、权利要求 36 的方法，其中所述酸是乙酸。

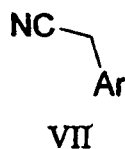
38、权利要求 33 的方法，其中所述步骤 (e) 的接触在含水溶剂中进行。

39、权利要求 38 的方法，其中所述含水溶剂包含乙醇。

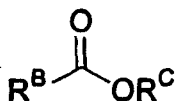
40、权利要求 39 的方法，其中所述醇是异丙醇。

41、权利要求 33 的方法，所述步骤 (e) 的接触在约 20 - 约 40℃ 的温度进行。

42、权利要求 33 的方法，其中所述式 VI 的化合物通过 (f) 在 (t - BuO) Y 存在下在足以获得式 VI 的化合物的条件下使式 VII 的化合物：



和具有下式的加成试剂接触一定时间制备：



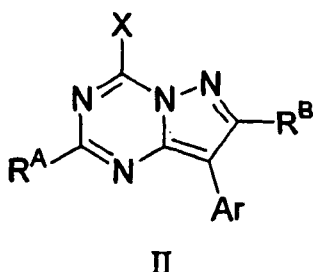
其中:

每个 R^{B} 和 R^{C} 独立是 $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基。

43、权利要求 42 的方法，其中 Y 是 K。

44、权利要求 42 的方法，所述步骤 (f) 的接触在约 $30 - 50^\circ\text{C}$ 的温度进行。

45、制备式 II 的化合物的方法:



其中:

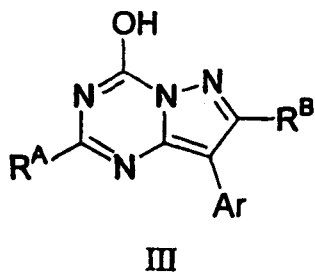
Ar 是用 0-5 个 R^3 取代的苯基或者吡啶基;

X 是卤素;

每个 R^3 独立是 H、卤素、CN、硝基、 $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基、 $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷氧基、 $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 卤烷基、或者 $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 卤烷氧基; 和

每个 R^{A} 和 R^{B} 独立是 $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基;

包括在胺存在下在足以获得所述式 II 的化合物的条件下使式 III 的化合物与 POX_3 接触一定时间:



其中所述胺选自二异丙基乙胺、二乙基苯基胺、二异丙基苯胺、二乙

基苯胺、二异丙基异丁胺、三苄基胺、三苯基胺、三环己基胺、或者二乙基异丙胺。

46、权利要求 45 的方法，其中 X 是 Cl。

47、权利要求 45 的方法，其中所述胺是二异丙基乙胺。

48、权利要求 45 的方法，其中所述接触在铵盐存在下进行。

49、权利要求 48 的方法，其中所述铵盐是苄基三乙基氯化铵、苄基三丁基氯化铵或者甲基三烷基 ($C_8 - C_{10}$) 氯化铵。

50、权利要求 48 的方法，其中所述铵盐是苄基三丁基氯化铵。

51、权利要求 45 的方法，其中所述接触在有机溶剂存在下进行。

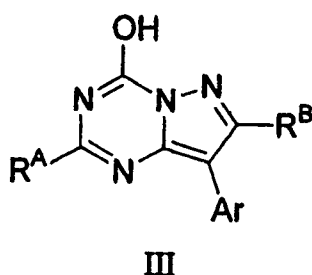
52、权利要求 51 的方法，其中所述有机溶剂包括甲基叔丁基醚、乙腈、乙酸异丙酯、甲苯或者 1-氯丁烷的一种或多种。

53、权利要求 51 的方法，其中所述有机溶剂是乙腈和甲基叔丁基醚的混合物。

54、权利要求 45 的方法，其中所述接触在约 50 - 约 70°C 的温度进行。

55、权利要求 45 的方法，其中所述 Ar 是 2-甲基-4-甲氧基苯基、2-氯-5-氟-4-甲氧基苯基或者 2-甲基-6-甲氧基吡啶-3-基。

56、制备式 III 的化合物的方法：



其中：

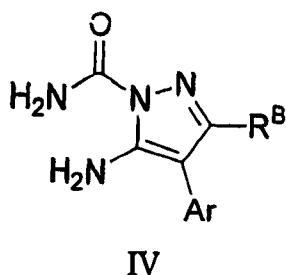
Ar 是用 0 - 5 个 R^3 取代的苯基或者吡啶基；

每个 R^3 独立是 H、卤素、CN、硝基、($C_1 - C_4$) 烷基、($C_1 - C_4$) 烷氧基、($C_1 - C_4$) 卤烷基、或者 ($C_1 - C_4$) 卤烷氧基；和

每个 R^A 和 R^B 独立是 ($C_1 - C_4$) 烷基；

包括在胺存在下在足以获得所述式 III 的化合物的条件下使式 IV

的化合物与 $(R^A)C(OR^4)$ 接触一定时间:



其中 R^4 是 $(C_1 - C_4)$ 烷基。

57、权利要求 56 的方法，其中 R^4 是甲基。

58、权利要求 56 的方法，其中 R^A 是甲基。

59、权利要求 56 的方法，其中 R^B 是甲基。

60、权利要求 56 的方法，其中所述接触在酸或碱存在下进行。

61、权利要求 60 的方法，其中所述接触在酸存在下进行。

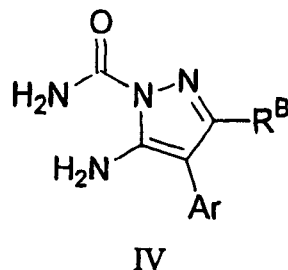
62、权利要求 61 的方法，其中所述酸是对甲苯磺酸。

63、权利要求 56 的方法，其中所述接触在有机溶剂存在下进行。

64、权利要求 63 的方法，其中所述有机溶剂包含 1-甲基-2-吡咯烷酮。

65、权利要求 56 的方法，其中所述接触在约 40 - 约 100℃ 的温度进行。

66、制备式 IV 的化合物的方法:



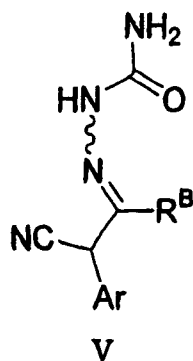
其中:

Ar 是用 0 - 5 个 R^3 取代的苯基或者吡啶基;

每个 R^3 独立是 H、卤素、CN、硝基、 $(C_1 - C_4)$ 烷基、 $(C_1 - C_4)$ 烷氧基、 $(C_1 - C_4)$ 卤烷基、或者 $(C_1 - C_4)$ 卤烷氧基; 和

R^B 是 (C₁ - C₄) 烷基;

包括在足以获得所述式 IV 的化合物的条件下使式 V 的化合物与 1, 8 - 二氮二环[5.4.0]十一碳 - 7 - 烯 (DBU) 接触一定时间:



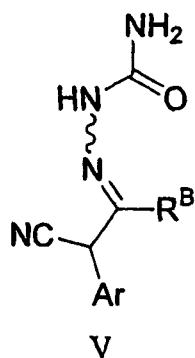
其中 R^B 是 (C₁ - C₄) 烷基。

67、权利要求 66 的方法，其中所述接触在有机溶剂存在下进行。

68、权利要求 67 的方法，其中所述有机溶剂包含 1 - 甲基 - 2 - 吡咯烷酮。

69、权利要求 66 的方法，其中所述接触在约 0 - 约 30℃ 的温度进行。

70、制备式 V 的化合物的方法:



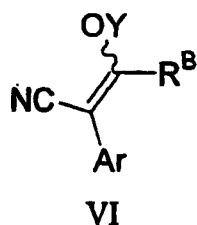
其中:

Ar 是用 0 - 5 个 R^3 取代的苯基或者吡啶基;

每个 R^3 独立是 H、卤素、CN、硝基、(C₁ - C₄) 烷基、(C₁ - C₄) 烷氧基、(C₁ - C₄) 卤烷基、或者 (C₁ - C₄) 卤烷氧基; 和

R^B 是 $(C_1 - C_4)$ 烷基;

包括在足以获得所述式 VI 的化合物的条件下使式 VI 的化合物与缩氨基脲或其加成盐接触一定时间:



其中 Y 是碱金属或者 Z^1Z^2 , 其中 Z^1 是卤素和 Z^2 是碱土金属。

71、权利要求 70 的方法, 其中 Y 是 K。

72、权利要求 70 的方法, 其总 R^B 是甲基。

73、权利要求 70 的方法, 其中所述接触在约 3 - 约 5 的 pH 进行。

74、权利要求 70 的方法, 其中所述接触在酸存在下进行。

75、权利要求 74 的方法, 其中所述酸是乙酸。

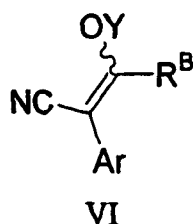
76、权利要求 70 的方法, 其中所述接触在含水溶剂中进行。

77、权利要求 76 的方法, 其中所述含水溶剂包含乙醇。

78、权利要求 77 的方法, 其中所述醇是异丙醇。

79、权利要求 70 的方法, 所述接触在约 20 - 约 40°C 的温度进行。

80、制备式 VI 的化合物的方法:



其中:

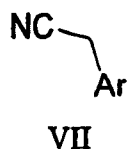
Y 是 K;

Ar 是用 0 - 5 个 R^3 取代的苯基或者吡啶基;

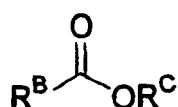
每个 R^3 独立是 H、卤素、CN、硝基、 $(C_1 - C_4)$ 烷基、 $(C_1 - C_4)$ 烷氧基、 $(C_1 - C_4)$ 卤烷基、或者 $(C_1 - C_4)$ 卤烷氧基; 和

R^B 是 $(C_1 - C_4)$ 烷基;

包括在 (t-BuO)Y 存在下在足以获得所述式 VI 的化合物的条件下使式 VII 的化合物:



和具有下式的加成试剂接触一定时间:



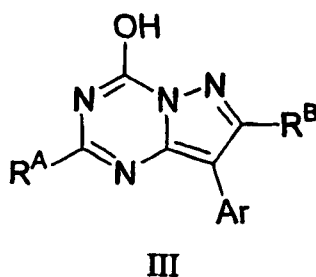
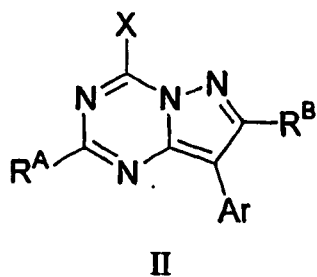
其中:

每个 R^{B} 和 R^{C} 独立是 ($\text{C}_1 - \text{C}_4$) 烷基。

81、权利要求 80 的方法, 其中所述加成试剂是乙酸乙酯。

82、权利要求 80 的方法, 所述接触在约 30 - 约 50°C 的温度进行。

83、式 II 或 III 的化合物:



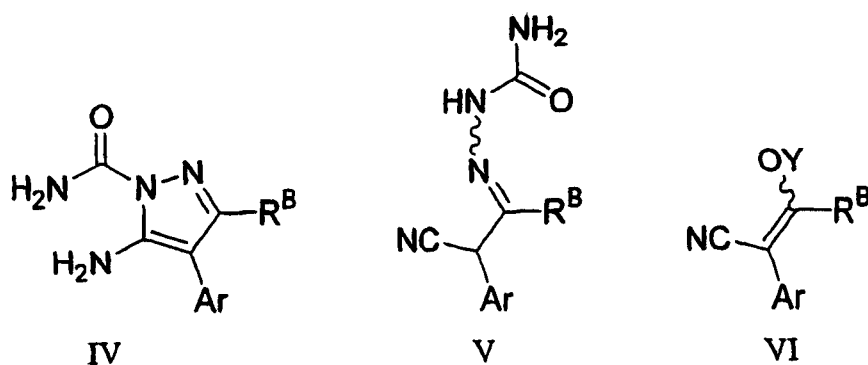
其中:

Ar 是 2-甲基-4-甲氧基苯基、2-氟-5-氟-4-甲氧基苯基或者 2-甲基-6-甲氧基吡啶-3-基;

X 是 Cl; 和

R^{A} 和 R^{B} 每个是甲基。

84、式 IV、V 或 VI 的化合物:



其中:

Y 是碱金属或 Z^1Z^2 , 其中:

Z^1 是卤素; 和

Z^2 是碱土金属;

Ar 是用 0-5 个 R^3 取代的苯基或者吡啶基;

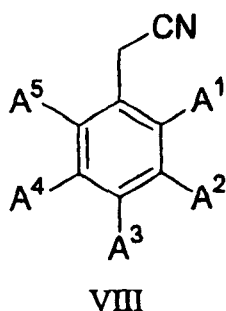
每个 R^3 独立是 H、卤素、CN、硝基、(C₁-C₄) 烷基、(C₁-C₄) 烷氧基、(C₁-C₄) 卤烷基、或者 (C₁-C₄) 卤烷氧基; 和

R^A 和 R^B 每个是甲基。

85、权利要求 84 的化合物, 其中 Ar 是 2-甲基-4-甲氧基苯基、2-氟-5-氟-4-甲氧基苯基或者 2-甲基-6-甲氧基吡啶-3-基。

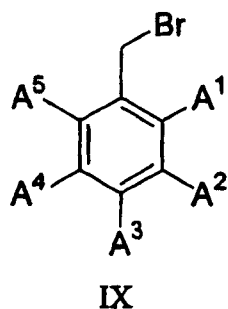
86、式 VI 的权利要求 84 的化合物, 其中 Y 是 K。

87、制备式 VIII 的化合物的方法:



其中 A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 和 A^5 每个独立是 F、Cl、Br、(C₁-C₄) 烷基、(C₁-C₄) 卤烷基、(C₁-C₄) 烷氧基或者 (C₁-C₄) 卤烷氧基;

包括: (a) 在足以获得式 VIII 的化合物的条件下、在酸存在下使式 IX 的化合物:



和氟化物接触一定时间。

88、权利要求 87 的方法，其中所述接触在铵盐存在下进行。

89、权利要求 88 的方法，其中所述铵盐是苄基三烷基铵盐。

90、权利要求 88 的方法，其中所述铵盐是苄基三丁基氯化铵。

91、权利要求 87 的方法，其中所述氟化物以氟化钠形式提供。

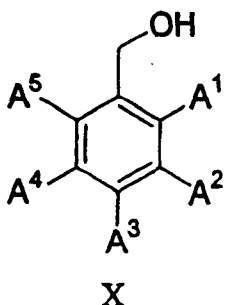
92、权利要求 87 的方法，其中在所述接触之前，将所述式 IX 的化合物溶于有机溶剂中并且将所述氟化物和铵盐溶于含水溶剂中。

93、权利要求 92 的方法，其中所述接触在两相系统中进行。

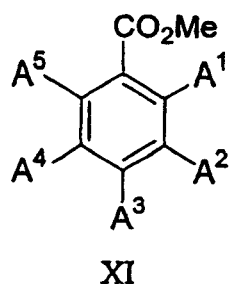
94、权利要求 92 的方法，其中 A¹ 是 Cl、A² 是 H、A³ 是甲氧基、A⁴ 是 F 和 A⁵ 是 H。

95、权利要求 87 的方法，其中所述酸是乙酸。

96、权利要求 87 的方法，其中所述式 IX 的化合物通过 (b) 在足以获得所述式 IX 的化合物的条件下使式 X 的化合物与 HBr 接触一定时间制备：



97、权利要求 96 的方法，其中所述式 X 的化合物通过 (c) 在足以获得所述式 X 的化合物的条件下使式 XI 的化合物与还原剂接触一定时间制备：



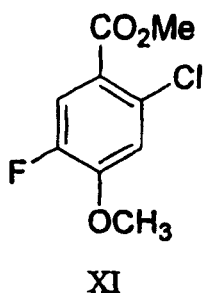
98、权利要求 97 的方法，其中所述还原剂是二（2-甲氧基乙氧基）铝氢化钠（Red-Al）。

99、权利要求 97 的方法，其中所述步骤（c）的接触在有机溶剂中进行。

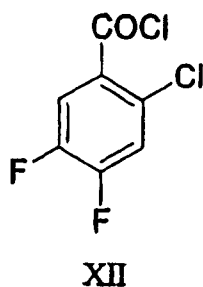
100、权利要求 99 的方法，其中所述有机溶剂是甲苯。

101、权利要求 97 的方法，其中所述步骤（c）的接触在约 10 - 约 20℃ 的温度进行。

102、制备式 XI 的化合物的方法：

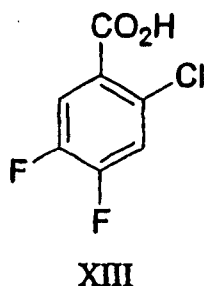


包括（a）在足以获得所述式 XI 的化合物的条件下使式 XII 的化合物和甲氧化物接触一定时间：



103、权利要求 102 的方法，其中所述甲氧化物溶于甲醇中。

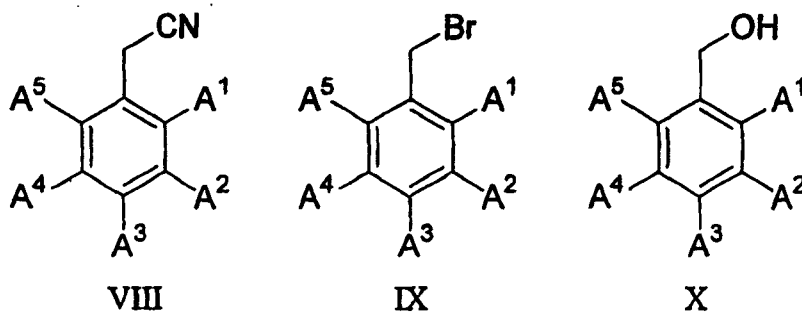
104、权利要求 102 的方法，其中所述式 XII 的化合物通过 (b) 在足以获得所述式 XII 的化合物的条件下使式 XIII 的化合物和草酰氯接触一定时间：



105、权利要求 104 的方法，其中所述步骤 (b) 的接触在二甲基甲酰胺 (DMF) 存在下进行。

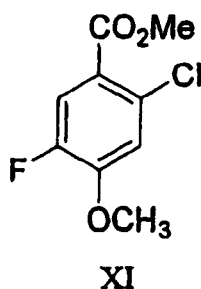
106、权利要求 104 的方法，其中所述步骤 (b) 的接触在甲苯存在下进行。

107、式 VIII、IX 或 X 的化合物：

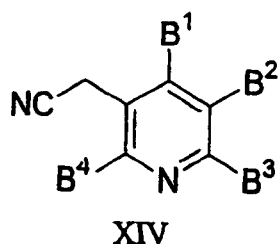


其中 A¹是 Cl、A²是 H、A³是甲氧基、A⁴是 F 和 A⁵是 H。

108、式 XI 的化合物：

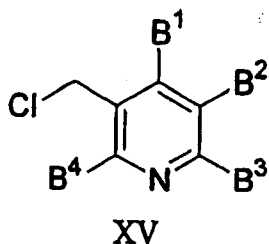


109、制备式 XIV 的化合物的方法:



其中 B¹、B²、B³ 和 B⁴ 每个独立是 F、Cl、Br、(C₁-C₄) 烷基、(C₁-C₄) 卤烷基、(C₁-C₄) 烷氧基或者 (C₁-C₄) 卤烷氧基;

包括 (a) 在足以获得式 XIV 的化合物的条件下使式 XV 的化合物和氰化物接触一定时间:

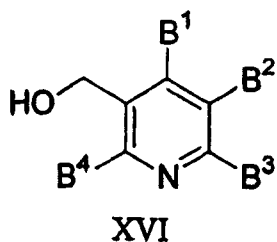


110、权利要求 109 的方法, 其中所述氰化物以氰化钠形式提供。

111、权利要求 109 的方法, 其中所述接触在碘盐存在下进行。

112、权利要求 109 的方法, 其中 B¹ 是 H, B² 是 H, B³ 是甲氧基, B⁴ 是甲基。

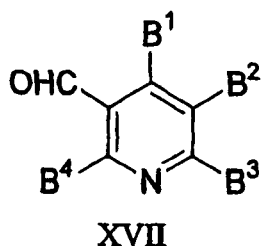
113、权利要求 109 的方法, 其中所述式 XV 的化合物通过 (b) 在足以获得式 XV 的化合物的条件下使式 XVI 的化合物和氯化剂接触一定施加来制备:



114、权利要求 113 的方法, 其中所述氯化剂是甲磺酰氯 (MsCl)。

115、权利要求 113 的方法，其中 B^1 是 H， B^2 是 H， B^3 是甲氧基， B^4 是甲基。

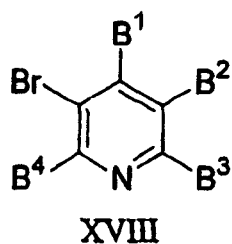
116、权利要求 113 的方法，其中所述式 XVI 的化合物通过 (c) 在足以获得式 XVI 的化合物的条件下使式 XVII 的化合物接触还原剂一定时间来制备：



117、权利要求 116 的方法，其中所述还原剂是 NaBH_4 。

118、权利要求 116 的方法，其中 B^1 是 H， B^2 是 H， B^3 是甲氧基， B^4 是甲基。

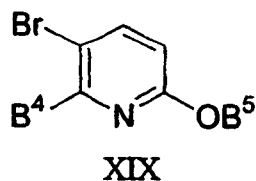
119、权利要求 116 的方法，其中所述式 XVII 的化合物通过 (d) 在足以获得所述式 XVII 的化合物的条件下使式 XVIII 的化合物和 $n\text{-BuLi}$ 接触并随后和甲酰化剂接触一定时间制备：



120、权利要求 116 的方法，其中所述甲酰化剂是二甲基甲酰胺 (DMF)。

121、权利要求 119 的方法，其中 B^1 是 H， B^2 是 H， B^3 是甲氧基， B^4 是甲基。

122、制备式 XIX 的化合物的方法：



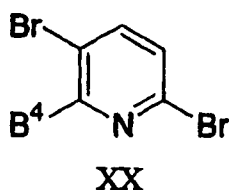
其中：

B^4 是 F、Cl、Br、 $(C_1 - C_4)$ 烷基、 $(C_1 - C_4)$ 卤烷基、 $(C_1 - C_4)$ 烷氧基、或者 $(C_1 - C_4)$ 卤烷氧基；和

B^5 是 $(C_1 - C_4)$ 烷基；

包括：

(a) 在足以提供式 XIX 的化合物的条件下使式 XX 的化合物：

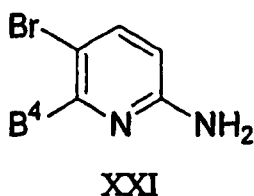


和 B^5O^- 接触一定时间。

123、权利要求 122 的方法，其中 B^5 是甲基

124、权利要求 122 的方法，其中 B^4 是甲基。

125、权利要求 122 的方法，其中所述式 XX 的化合物通过 (b) 在足以获得所述式 XX 的化合物的条件下使式 XXI 的化合物或其酸加成盐在酸存在下与亚硝酸盐和 Br_2 接触一定时间：



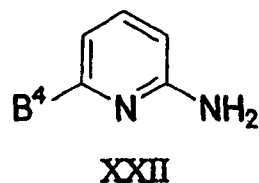
126、权利要求 125 的方法，其中 B^4 是甲基。

127、权利要求 125 的方法，其中所述亚硝酸盐以 $NaNO_2$ 形式提供。

128、权利要求 125 的方法，其中所述酸是 HBr 。

129、权利要求 125 的方法，其中所述式 XXI 的化合物通过 (c)

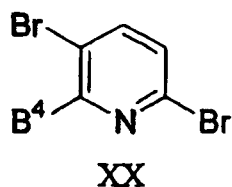
在足以获得所述式 XXI 的化合物的条件下使式 XXII 的化合物在酸存在下和 Br₂ 接触一定时间:



130、权利要求 129 的方法, 其中 B⁴ 是甲基。

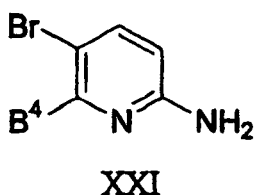
131、权利要求 129 的方法, 其中所述酸是乙酸。

132、制备式 XX 的化合物的方法:



其中 B⁴ 是 F、Cl、Br、(C₁-C₄) 烷基、(C₁-C₄) 卤烷基、(C₁-C₄) 烷氧基、或者 (C₁-C₄) 卤烷氧基;

包括在足以获得所述式 XX 的化合物的条件下使式 XXI 的化合物或其酸加成盐在酸存在下与亚硝酸盐和 Br₂ 接触一定时间:

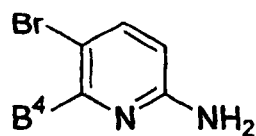


133、权利要求 132 的方法, 其中 B⁴ 是甲基。

134、权利要求 132 的方法, 其中所述亚硝酸盐以 NaNO₂ 形式提供。

135、权利要求 132 的方法, 其中所述酸是 HBr。

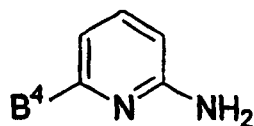
136、制备式 XXI 的化合物的方法:



XXI

其中 B^4 是 F、Cl、Br、 $(C_1 - C_4)$ 烷基、 $(C_1 - C_4)$ 卤烷基、 $(C_1 - C_4)$ 烷氧基、或者 $(C_1 - C_4)$ 卤烷氧基；

包括在足以获得所述式 XXI 的化合物的条件下使式 XXII 的化合物在酸存在下与 Br_2 接触一定时间：

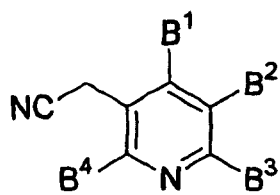


XXII

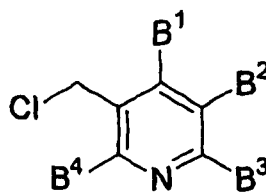
137、权利要求 136 的方法，其中 B^4 是甲基。

138、权利要求 136 的方法，其中所述酸是乙酸。

139、式 XIV 或 XV 的化合物：



XIV



XV

其中 B^1 是 H， B^2 是 H， B^3 是甲氧基， B^4 是甲基。

吡唑并[1, 5- α]-1, 3, 5-三嗪和其中间物的制备方法

相关申请的交叉引用

本申请要求 2004 年 11 月 10 日提交的美国专利申请 No._____ 的优选权, 所述美国专利申请 No._____ 要求于 2003 年 11 月 25 日提交的美国临时专利申请 No.60/525050 的优先权, 这两份专利申请的公开在此全文引入作为参考。

技术领域

本发明涉及能够大规模制备吡唑并[1, 5- α]-1, 3, 5-三嗪的新方法。

背景技术

促肾上腺皮质激素释放因子 (CRF) 是促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 的同义词, 是调节身体对压力的整体反应的 41 氨基酸肽。作为 CRF 受体 (CRF₁ 和 CRF₂) 的促效剂, 已知 CRF 是主要的生理促分泌素, 控制着下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴的活动, 所述 HPA 轴活动调节内分泌压力反应。CRF 还在对压力的自主反应和行为反应上起着重要作用。CRF 生理水平的变化和各种病症包括抑郁和焦虑相关。

CRF 受体的拮抗剂在动物模型中已经表现出可以有效改进行为压力反应。CRF₁ 受体拮抗剂的全身性给药在啮齿动物中的抗焦虑效果和抗抑郁效果也已经得到充分证实。动物模型结果还表明 CRF₁ 拮抗剂能够有助于缓解停药、压力诱导癫痫发作和某些炎症的症状。人们也已经设想到了 CRF 在 Alzheimer 病、帕金森病、亨廷顿病、进行性核上麻痹、和肌萎缩外侧硬化的病原学和病理生理学中所具有的作用, 因为这些病症都和中枢神经系统中 CRF 神经元的功能障碍有关。进食紊乱, 比如神经性食欲缺乏, 也和 CRF 的升高水平有关。

虽然 CRF 受体广泛分散在整个中枢神经系统中, 但也存在于周围系统包括腺、脉管、肠胃和免疫系统组织中。相应的, 人们相信 CRF 拮抗剂有潜力治疗中枢神经系统以外的许多其它病症。周围系统的一些和 CRF 相关的病症包括例如高血压、心动过速、充血性心力衰竭、中风、过敏性肠综合症、术后肠梗阻和结肠超敏反应。研究表明 CRF₁

拮抗剂也可以用作头发生长刺激剂。

已经确定吡唑并[1, 5- α]-1, 3, 5-三嗪衍生物是有效的 CRF₁ 拮抗剂, 目前正在研究作为各种和 CRF 相关的病症 (包括许多上述的病症) 的治疗剂。例如在美国专利 No.6124289、6191131、6313124、6060478、6136809 和 6358950 以及 WO 02/72202 和 WO 98/08847 中, 报导了许多吡唑并三嗪 CRF₁ 拮抗剂。

吡唑并[1, 5- α]-1, 3, 5-三嗪化合物的制备通常包括多步骤程序, 包括两个成环反应制备二环芯。在上述参考文献以及下列文献中报导了各种吡唑并[1, 5- α]-1, 3, 5-三嗪化合物的合成: WO 01/23388; 美国专利 No. 4824834、3910907、5137887、4892576 和 5484760; EP 594149; He 等, J. Med. Chem., 2000, 43, 449; Senga 等, J.Chern., 1982, 25, 243; Bruni 等, J. Heterocycl. Chem., 1995, 32, 291; Kobe 等, J. Het. Chem., 1974, 991; Kobe 等, J. Het. Chem. 1974, 199; Novinson 等, J. Het. Chern., 1974, 691; 和 Albert 等, J. Het. Chem. 1973, 885. 在 Beyer 等, Ber., 1960, 93, 2209 和 Cusniano 等, Gazz. Chim. Ita/., 1952, 82, 373 中包括成环和其它反应。

多种活性吡唑并[1, 5- α]-1, 3, 5-三嗪化合物包含连接到所述二环芯的 8-位置的多取代芳基或杂芳基基团。引入 8-取代基一般涉及采用芳基或杂芳基乙腈衍生物。在 JP 2001302658、CN1088574 和 Nishida 等, Technol. Rep. Yamaguchi Univ., 1988, 4 (2), 145 中报导了由相应的卤甲基化合物和氰化物制备芳基或杂芳基乙腈衍生物的方法。报导了可用于制备芳基或杂芳基乙腈衍生物的反应的其它参考文献包括例如 Nagel 等, J.Org.Chem., 1977, 42, 3626 和 Stogryn, J.Org.Chem., 1972, 37, 673 (芳基氯化物的 n-Buli 金属取代以及和 DMF 缩聚形成醛); Li 等, Tetrahedron Lett. 2001, 1175 (苄基醛被氢溴化钠还原成苄基醇); J.Org.Chem., 1970, 35, 3195, J.Org.Chem., 1971, 36, 3044, Tetradron 1971, 27, 5979 (用甲磺酰氯和碱使苄基醇氯化); J.Am.Chem.Soc., 1951, 73, 2239, J.Am.Chem.Soc., 1953, 75, 2053(苄基氯转化成氰化物衍生物); 和 Repic, Principles of Process Research and Chemical Development in the Pharmaceutical Industry, Wiley, 1998, 第 38 页。

考虑到吡唑并[1,5- α]-1,3,5-三嗪衍生物在治疗和 CRF 相关的病症,比如焦虑和抑郁中的重要性,需要其合成的改进方法。这种改进可以包括例如在各个反应步骤中提高对映体和/或对映体选择性,提高化学纯度、提供产率、采用更低成本的原材料、采用毒性更小的原材料、降低能耗(例如,避免在极高或极低温度或压力下进行反应)、减少合成步骤以及改进按比例放大的条件。本文讨论的方法和中间物有助于满足这些和其它需求。

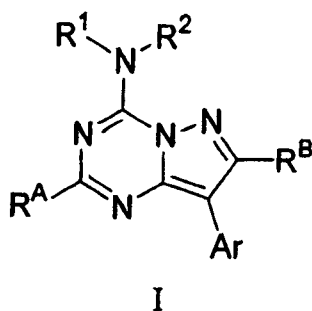
发明内容

本发明提供了用于制备下述式 I 的吡唑并[1,5- α]-1,3,5-三嗪的方法和中间物,以及其它,其中所述吡唑并[1,5- α]-1,3,5-三嗪是可用于治疗与 CRF 相关的病症包括焦虑和抑郁的 CRF 受体拮抗剂。

本发明进一步提供了用于制备芳基和杂芳基乙腈化合物的方法和中间物,所述芳基和杂芳基乙腈化合物在式 I 的吡唑并[1,5- α]-1,3,5-三嗪制备中可用作中间物。

具体实施方式

本发明提供制备式 I 的吡唑并[1,5- α]-1,3,5-三嗪的方法和和其它:



其中:

Ar 是用 0-5 个 R^3 取代的苯基或者吡啶基;

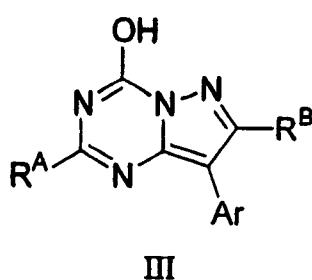
每个 R^1 和 R^2 独立是 H、 (C_1-C_8) 烷基或者 (C_1-C_6) 烷氧基烷基;

每个 R^3 独立是氢、卤素、CN、硝基、 (C_1-C_4) 烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 (C_1-C_4) 卤烷基、或者 (C_1-C_4) 卤烷氧基; 和

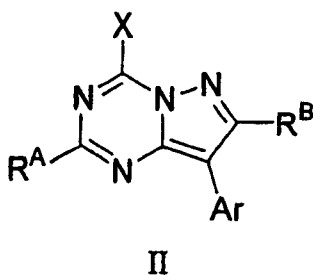
每个 R^A 和 R^B 独立是 $(C_1 - C_4)$ 烷基。在一些实施方案中, R^A 和 R^B 全部或者任一是甲基。在其它实施方案中, Ar 可以是 2-甲基-4-甲氧基苯基、2-氟-5-氟-4-甲氧基苯基或者 2-甲基-6-甲氧基吡啶-3-基。在其它实施方案中, R^A 和 R^B 都可以是甲氧基乙基, 或者 R^1 是 H 以及 R^2 是戊-3-基, 或者 R^1 是 H 以及 R^2 是丁-2-基。

根据本发明, 制备式 I 的化合物的方法可以包括下列步骤:

(a) 在胺存在时, 使式 III 的化合物



与 POX_3 (其中 X 是卤素) 接触一定时间, 所述接触条件足以获得式 II 的化合物:



其中所述胺优选是位阻胺, 选自二异丙基乙胺、二乙基苯基胺、二异丙基苯胺、二乙基苯胺、二异丙基异丁胺、三苄基胺、三苯基胺、三环己基胺、二乙基异丙胺, 和:

(b) 在足以获得式 I 的化合物的条件下使式 II 的化合物和 NHR^1R^2 接触一定时间。

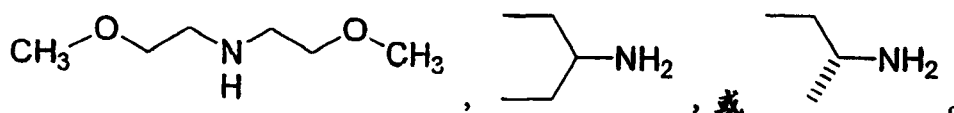
步骤 (a) 的反应包括用来自试剂 POX_3 的卤素部分替代式 III 的中间物的羟基部分。 POX_3 试剂的例子包括 POF_3 、 $POCl_3$ 、和 $POBr_3$ 等。在有些实施方案中, X 是 Cl。步骤 (a) 的胺可以充当卤化的催化

剂。合适的胺通常是蓬松的 (bulky) 叔胺, 选自例如二异丙基乙胺、二乙基苯基胺、二异丙基苯胺、二乙基苯胺、二异丙基异丁胺、三苄基胺、三苯基胺、三环己基胺、二乙基异丙胺。在有些实施方案中, 二异丙基乙胺用作胺催化剂。胺催化剂和 POX_3 的摩尔比可以是大约 1: 1。

在有些实施方案中, 步骤 (a) 的接触在铵盐存在下进行, 所述铵盐可以充当相转移试剂。任何铵盐都是合适的。一些铵盐的例子包括苄基三乙基氯化铵、苄基三丁基氯化铵、Adogens[®] (甲基三烷基 (C_8 - C_{10}) 氯化铵)。在一些实施方案中, 铵盐是苄基三乙基氯化铵。铵盐可以以催化量提供。铵盐量的例子是小于 1 当量 (相对于式 III 的化合物)。

步骤 (a) 的接触可以在任何在所述反应条件下不反应的溶剂中进行。对这种转变而言, 优选的溶剂是甲基叔丁基醚、乙腈、乙酸异丙酯、甲苯和 1-氯丁烷。合适的反应条件可以包括大气压力和约 50 - 约 110 $^{\circ}\text{C}$, 优选约 50 - 约 70 $^{\circ}\text{C}$ 的温度。

步骤 (b) 的反应包括用胺部分替换式 II 的中间物的卤部分。任何伯胺或仲胺都是合适的, 比如具有式 NHR^1R^2 的胺。胺可以相对于式 II (或者式 III) 的化合物过量提供。式 NHR^1R^2 的一些胺可以包括例如,

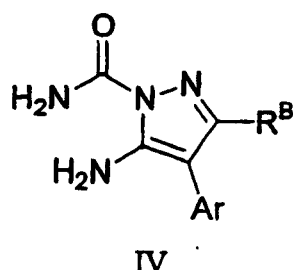


可以采用任何合适的溶剂执行步骤 (b) 的反应。根据一些实施方案, 步骤 (b) 的反应在有机溶剂中进行。有机溶剂的一些例子包括甲基叔丁基醚、乙腈、乙酸异丙酯、甲苯和 1-氯丁烷。在一些实施方案中, 有机溶剂包括乙腈和甲基叔丁基醚的一种或全部, 比如乙腈和甲基叔丁基醚的混合物。示例性的乙腈: 甲基叔丁基醚的体积比可以是大约 1: 4。步骤 (b) 的反应可以在环境压力和温度下进行。示例性的温度是约 0 - 约 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

在一些实施方案中, 式 II 的中间物可以原位反应, 在进行步骤 (b) 的反应之前不用分离。

本发明进一步提供用于闭合第一环的方法, 其中通过 (c) 在足以

获得式 III 的化合物条件下使式 IV 的化合物与 $(R^A)C(OR^4)$ 接触一定时间制备式 III 的化合物:



其中 R^4 是 $(C_1 - C_4)$ 烷基。 $(R^A)C(OR^4)$ 的合适量可以是大约 1 当量或以上 (相对于式 IV 的化合物)。

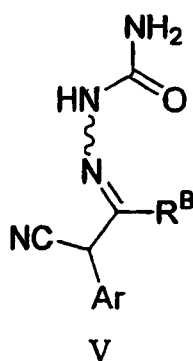
第一环闭合方法可以在催化性酸或碱的存在下进行。该反应通常在有机溶剂中进行。合适的一些溶剂包括乙腈、1-甲基-2-吡咯烷酮 (pyrrolidinone) 或者四氢呋喃。在没有酸或碱存在时, 执行第一环闭合反应的温度通常升高 (例如, 大约室温, 比如大于约 25°C)。升高温度的例子可以是约 $30 - 100^{\circ}\text{C}$, 或者 $50 - 100^{\circ}\text{C}$, 或者约 $75 - 100^{\circ}\text{C}$ 。

酸可适用于催化第一环闭合反应。酸的例子包括对甲苯磺酸 (pTSA)、甲烷磺酸、硫酸和乙酸。在一些实施方案中, pTSA 用作酸催化剂。执行酸催化反应的合适温度可以是约 $40 - 100$, 约 $40 - 70$, 或者约 $40 - 60^{\circ}\text{C}$ 。

根据一些实施方案, 第一环闭合反应在 1-甲基-2-吡咯烷酮和 pTSA 的混合物中进行。在其它实施方案中, 反应可以在乙腈中进行。

在其它实施方案中, 试剂 $(R^A)C(OR^4)$ 可以是原乙酸三甲酯 (其中 R^A 和 R^B 都是甲基) 或者原乙酸三乙酯。

本发明进一步通过第二环闭合的方法, 其中通过 (d) 在足以获得式 IV 的化合物的条件下使式 V 的化合物与碱接触一定时间制备式 IV 的化合物:



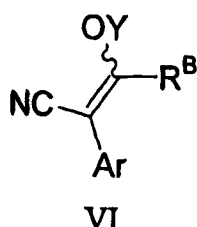
碱可以任何合适量提供，比如一当量或更小（相对于式 V 的化合物）。

任何碱可以适用于实施上述第二环闭合反应的方法。碱的优选例子包括氢氧化物、胺、1,5-二氮二环[4.3.0]-壬-5-烯和咪唑。优选性较差的例子包括醇盐。在一些实施方案中，碱是 1,8-二氮二环[5.4.0]十一碳-7-烯（DBU）。

上述第二环闭合反应可以在有机溶剂中进行。合适的有机溶剂包括乙腈、1-甲基-2-吡咯烷酮、四氢呋喃、异丙醇水溶液或其混合物。在一些实施方案中，溶剂包括 1-甲基-2-吡咯烷酮或乙腈。

执行第二环闭合反应的合适温度可以包括更低的温度，比如低于室温（例如，低于 25℃）以及从约 0-约 30℃ 的温度。温度例子可以是约 -20-约 20、约 -10-约 10、约 0-约 10、约 10-约 20、约 20-约 30、或者约 30-约 35℃。周围压力也是合适的。

本发明还提供了缩氨基脲的形成方法，其中通过 (e) 在足以获得式 VI 的化合物的条件下，使式 VI 的化合物和缩氨基脲、或者其酸加成盐反应一定时间制备式 V 的化合物：



其中，Y 是碱金属或者 Z^1Z^2 ，其中 Z^1 是卤素和 Z^2 是碱土金属。在一些实施方案中，氨基脲以氨基脲化氢形式提供。氨基脲可以以大于约 1 当量的量提供（相对于式 VI 或 VII 的化合物）。

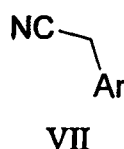
根据上述缩氨基脲形成方法的一些实施方案，Y 是碱金属，比如 K。在其它实施方案中，Y 是 Z^1Z^2 ，比如例如 MgBr。

在其它实施方案中，上述缩氨基脲形成方法在约 1 - 约 6，更优选约 3 - 约 5 的 pH 下进行。相应地，步骤 (e) 的接触可以在酸比如乙酸、氢氟酸、硫酸、丙酸或丁酸存在下进行。在一些实施方案中，酸是乙酸。

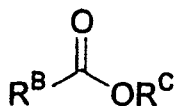
在其它实施方案中，上述缩氨基脲形成方法可以在含水溶剂中进行。另外，所述含水溶剂可以包括醇，比如例如异丙醇、甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、异丁醇、叔丁醇、乙二醇或丙二醇。在一些实施方案中，含水溶剂包含异丙醇。

适合于上述缩氨基脲形成方法的反应条件进一步包括环境压力和温度。温度例子可以是约 20 - 约 40°C。

本发明进一步提供芳基加成方法，其中式 VI 的化合物通过 (f) 在 $(t\text{-BuO})Y$ 存在下在足以获得式 VI 的化合物的条件下使式 VII 的化合物：



和具有下式的加成试剂接触一定时间制备：



其中：

每个 R^{B} 和 R^{C} 独立是 $(C_1 - C_4)$ 烷基。在一些实施方案中，Y 是碱金属，比如 K。在其它实施方案中，Y 是 Z^1Z^2 ，比如例如 MgBr。

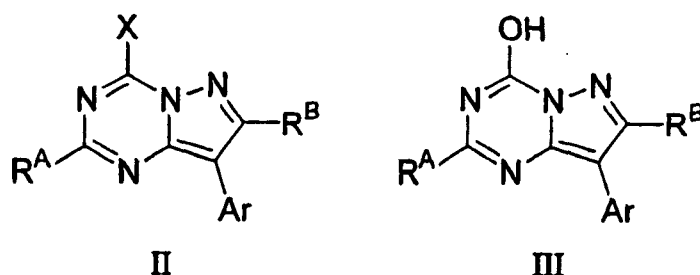
在一些实施方案中，试剂 $(t\text{-BuO})Y$ 可以多于加成试剂。例如，相对于式 VII 的化合物的量，合适的 $(t\text{-BuO})Y$ 量可以是约 1 - 约 2 当量。

根据一些实施方案，加成试剂可以是乙酸乙酯（例如， R^{B} 是甲基

和 R^C 是乙基)。

上述芳基加成方法可以在环境温度或升高温度, 比如高于 25°C 下进行。升高温度的例子可以是约 $25 - 约 60$ 或者约 $30 - 约 50^\circ\text{C}$ 。环境压力是合适的。

本发明进一步提供式 II 或 III 的化合物:



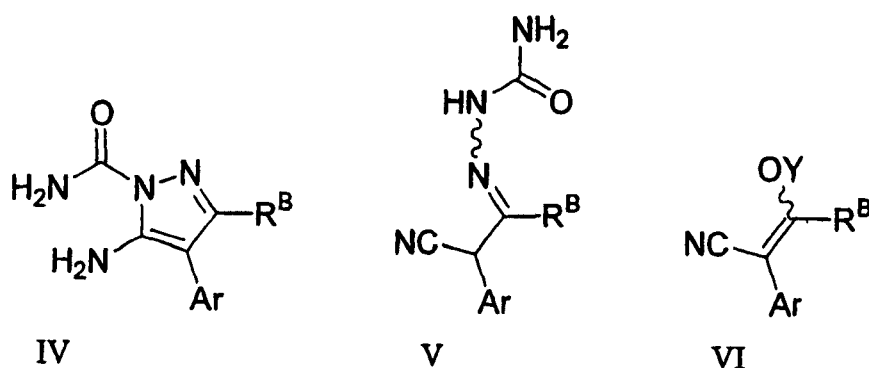
其中:

Ar 是 2-甲基-4-甲氧基苯基、2-氟-5-氟-4-甲氧基苯基或者 2-甲基-6-甲氧基吡啶-3-基;

X 是 Cl; 和

R^A 和 R^B 每个是甲基。

本发明进一步提供了式 IV、V 或 VI 的化合物:



其中:

Y 是碱金属或者 Z^1Z^2 , 其中:

Z^1 是卤素; 和

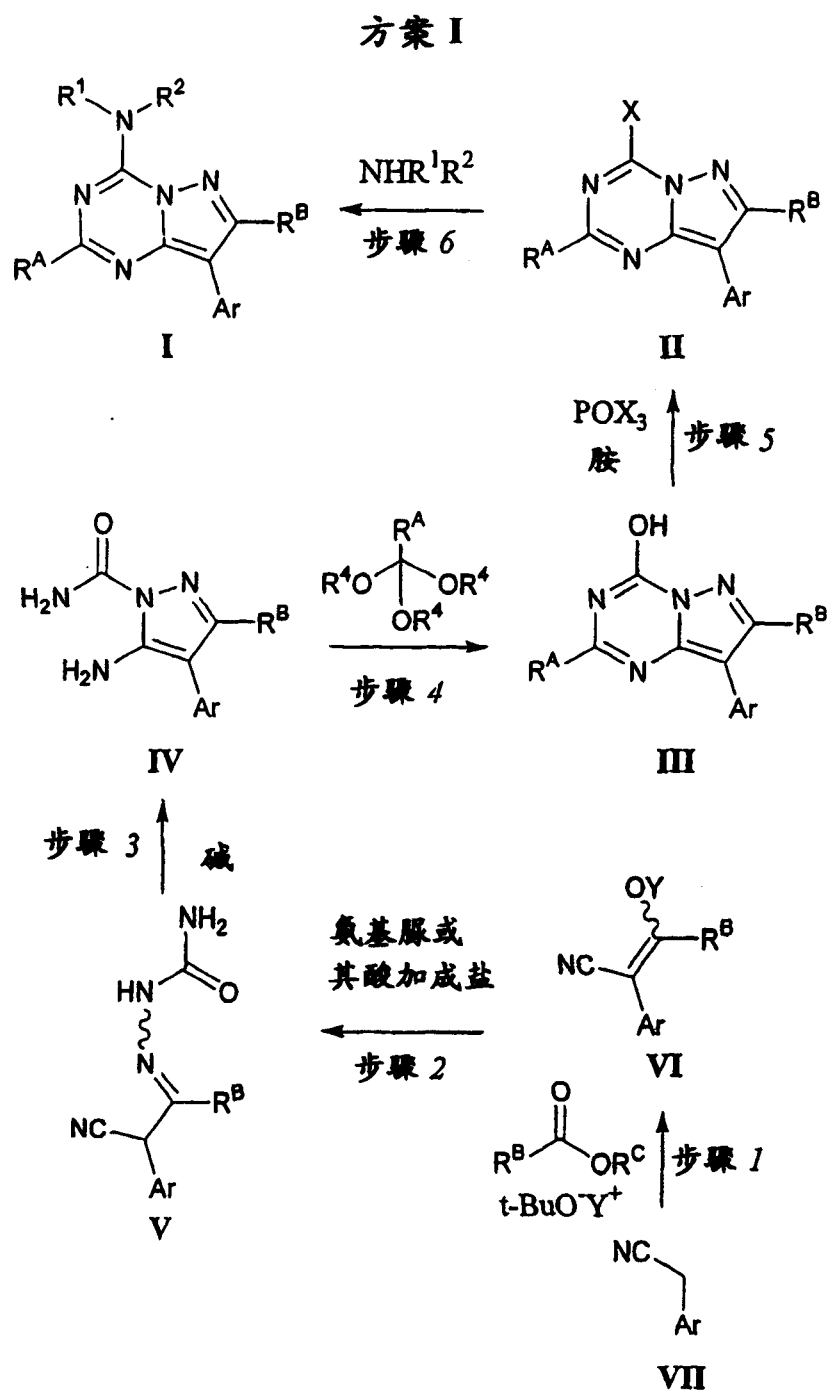
Z^2 是碱土金属;

Ar 是被 0-5 个 R^3 取代的苯基或吡啶基;

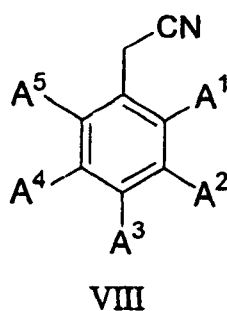
每个 R^3 独立是 H、卤素、CN、硝基、 (C_1-C_4) 烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 (C_1-C_4) 卤烷基或者 (C_1-C_4) 卤烷氧基；和

R^A 和 R^B 每个都是甲基。在一些实施方案中，式 IV、V 和 VI 的化合物被取代，其中 Ar 是 2-甲基-4-甲氧基苯基、2-氟-5-氟-4-甲氧基苯基或者 2-甲基-6-甲氧基吡啶-3-基。在其它实施方案中，提供了其中 Y 是 K 的式 VI 的化合物。

方案 I 提供了本发明的吡唑并[1,5- α]-1,3,5-三嗪的制备方法的例子。

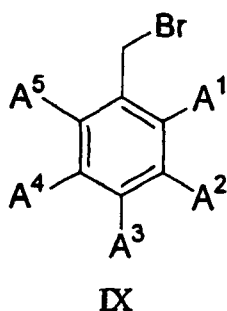


本发明进一步提供了制备芳基或杂芳基乙腈衍生物（例如式 VII 的化合物）的方法，所述衍生物是式 I 的 CRF 拮抗剂化合物的制备方法中的中间物。相应地，本发明包括制备式 VIII 的化合物的方法：



其中 A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 和 A^5 每个独立是 F、Cl、Br、 $(C_1 - C_4)$ 烷基、 $(C_1 - C_4)$ 卤烷基、 $(C_1 - C_4)$ 烷氧基或者 $(C_1 - C_4)$ 卤烷氧基；

包括：(a) 在足以获得式 VIII 的化合物的条件下使式 IX 的化合物：



和氰化物接触一定时间。在一些实施方案中， A^1 是 Cl、 A^2 是 H、 A^3 是甲氧基、 A^4 是 F 和 A^5 是 H。

根据制备式 VIII 的化合物的方法的一些实施方案，步骤 (a) 的接触可以在铵盐存在下进行。铵盐的例子包括苄基三烷基铵盐，比如苄基三丁基氯化铵、苄基三烷基铵或者四烷基铵盐。铵盐可以以大约小于 1 当量，或者小于 0.1 当量（相对于式 IX 的化合物）的量提供。

在制备式 VIII 的化合物的方法的其它实施方案中，步骤 (a) 接触中的氰化物可以以氰化物盐比如氰化钠或者氰化钾的形式提供。也可以采用丙酮氰醇。氰化物可以以大约 1 当量或以上的量提供（相对于式 IX 的化合物）。在一些实施方案中，提供大约 3-4 当量的氰化物。

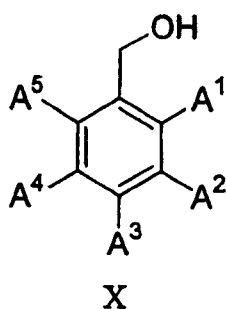
在制备式 VIII 的化合物的方法的其它实施方案中，在所述步骤 (a) 的接触之前，可以将式 IX 的化合物溶于有机溶剂中，可以将氰化物和铵盐溶于含水溶剂中。相应的，可以进行接触以使各个试剂溶于不混溶（或者弱混溶的）溶剂中，形成两相反应系统。不混溶溶剂

的任何组合都可以是合适的，只要试剂充分溶解。可以形成两相系统的不混溶溶剂组合的例子是有机溶剂和水的组合。和水不混溶的有机溶剂例子包括戊烷、己烷、苯、甲苯、二乙醚或者其混合物。所述不混溶溶剂的组合在铵盐催化剂的存在下，构成了相转移催化（PTC）的基础。PTC是本领域技术人员公知的，能显著提高化合物比如式 VIII 的化合物的形成速率。在一些实施方案中，两相系统包括甲苯和水。例如，式 IX 的化合物可以溶解在甲苯中，氰化物和铵盐可以溶解在水中。

在制备式 VIII 的化合物的方法的其它实施方案中，在步骤 (a) 的接触中的酸可以是弱羧酸，比如丙酸、丁酸或异丁酸。酸的优选例子是乙酸。酸可以以大约小于 1 当量的量提供（相对于式 IX 的化合物）。所述量例如约 0.3 - 约 0.4eq。

上述制备式 VIII 的化合物的方法可以在环境温度或升高温度，比如高于 25℃ 的温度下进行。升高温度的例子可以是约 25 - 约 40 或者约 30 - 约 40℃。环境压力是合适的。

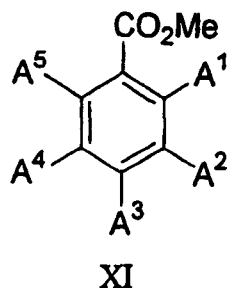
根据一些实施方案，式 IX 的化合物可以通过 (b) 在足以获得式 IX 的化合物的条件下使式 X 的化合物和 HBr 接触一定时间：



HBr 的合适量可以大于 1 当量（相对于式 X 的化合物），大于 10 当量，或者为约 10 - 20 当量。

涉及式 X 的化合物和 HBr 的步骤 (b) 的接触可以在合适温度和压力下进行。初始接触可以在低温，比如约 0 - 约 20℃ 或者约 0 - 约 15℃ 进行，随后升到加高温度，比如约 25 - 约 60℃ 或者约 30 - 约 55℃。环境压力是合适的。式 X 的化合物可以溶解在任何合适的溶剂体系中。溶剂的例子包括有机溶剂，比如那些在水中不混溶的溶剂。

在其它实施方案中，式 X 的化合物可以通过 (c) 在足以提供式 X 的化合物的条件下使式 XI 的化合物和还原剂接触一定时间：

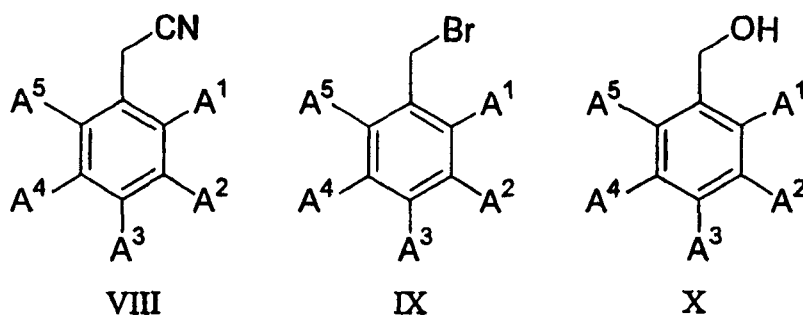


可以采用任何合适的还原剂。还原剂的量可以是大约 1 或以上的还原当量。还原剂的例子包括二(2-甲氧基乙氧基)铝氢化物 (Red-Al)、氯化铝锂、氢溴化锂、氢溴化铝、硼烷、氯化铝、三乙基氢溴化锂、氢溴化钠和适当的活性配体和某些酶。在一些实施方案中，还原剂是二(2-甲氧基乙氧基)铝氢化钠 (Red-Al)。

对于制备式 X 化合物的步骤 (c) 的接触适用于的溶剂系统可以是例如对强还原剂成惰性的有机溶剂。溶剂的例子包括苯、甲苯、二乙醚、四氢呋喃、戊烷、己烷、和其混合物等。在一些实施方案中，合适的溶剂是甲苯。

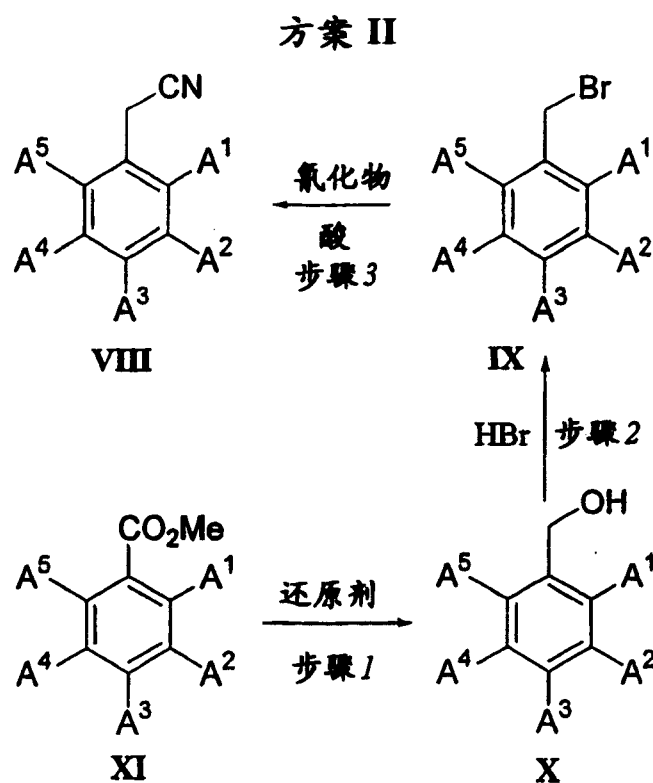
涉及式 XI 的化合物的步骤 (c) 的接触可以在任何合适温度下进行。一些合适的温度低于 25°C，包括约 0-约 20，约 10-约 20、或者约 14-约 17°C 的温度。环境压力是合适的。

本发明还提供了式 VIII、IX 或 X 的化合物：

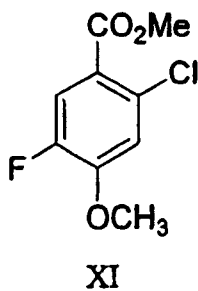


其中 A¹ 是 Cl, A² 是 H, A³ 是甲氧基, A⁴ 是 F 和 A⁵ 是 H。

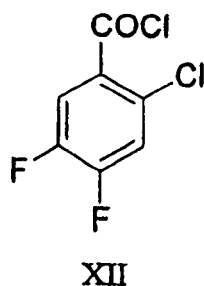
在下面的方案 II 中提供了制备式 VIII 的化合物的方法的例子。



本发明还提供了制备式 XI 的化合物的方法的例子：

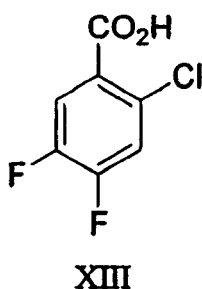


包括 (a) 在足以获得式 XI 的化合物的条件下使式 XII 的化合物和甲氧化物接触一定时间：



甲氧化物可以以大约约 2 当量（相对于式 XII 的化合物）的量提供。甲氧化物的量的例子是大约 3eq。合适的溶剂系统包括甲醇。环境温度和压力也是合适的。

在一些实施方案中，式 XII 的化合物可以通过 (b) 在足以获得式 XII 化合物的条件下使式 XIII 的化合物：



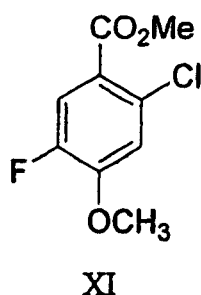
和草酰氯或者亚硫酰氯接触一定时间。草酰氯或亚硫酰氯可以以至少约 1 当量的量（相对于式 XIII 的化合物）提供。草酰氯或亚硫酰氯的量的例子是大约 2eq。

在一些实施方案中，在制备式 XII 的化合物中步骤 (b) 的接触在 DMF 存在下进行。DMF 可以以小于 1 当量 (eq)（相对于式 XIII 的化合物）的量提供。DMF 的量的例子包括约 0.3 - 约 0.6eq。

另外，在式 XII 的化合物的制备中步骤 (b) 的接触可以在有机溶剂存在下进行，所述有机溶剂比如二甲基甲酰胺 (DMF)、甲苯、或其混合物、或者任何和试剂不反应的其它溶剂。

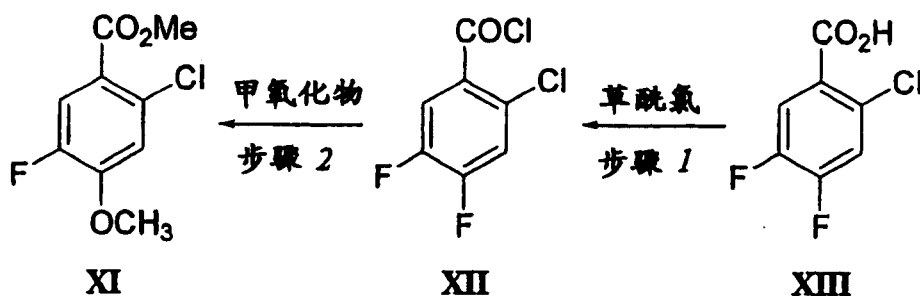
制备式 XII 的化合物的合适温度可以小于约 25℃。在有些实施方案中，执行步骤 (b) 的接触的初始温度低于 25℃，然后在后一时间点上升到高于 25℃，比如上升到约 40 - 约 60℃ 的温度。过量的草酰氯可以通过已知程序的蒸馏去除。

本发明还提供式 XI 的化合物:

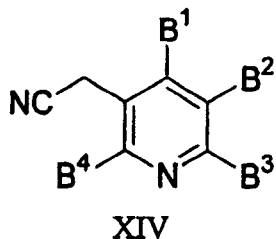


在方案 III 中举例说明了制备式 XI 的化合物的方法。

方案 III



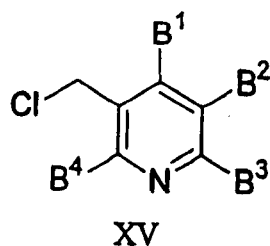
本发明进一步提供制备式 XIV 的化合物的方法:



其中 B^1 、 B^2 、 B^3 和 B^4 每个独立是 F、Cl、Br、 $(C_1 - C_4)$ 烷基、 $(C_1 - C_4)$ 卤烷基、 $(C_1 - C_4)$ 烷氧基或者 $(C_1 - C_4)$ 卤烷氧基。在一些实施方案中， B^1 是 H， B^2 是 H， B^3 是甲氧基， B^4 是甲基。

制备式 XIV 的化合物的方法包括在足以获得式 XIV 的化合物的条

件下使式 XV 的化合物和氰化物接触一定时间:

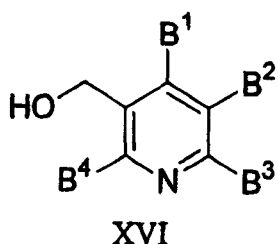


任何氰化物源都是合适的。在一些实施方案中，氰化物以氰化钠形式提供。氰化物试剂也可以以相对于式 XV 的化合物约 1 当量或以上的量提供。在一些实施方案中，提供了大约 3-约 4 当量的氰化物。

制备式 XIV 的化合物的步骤 (a) 的接触可以任选地在碘化物盐存在下进行。任何碘化物盐都是合适地，包括例如钠盐或钾盐。碘化物可以以催化量提供，比如相对于式 XV 的化合物以小于 1 当量提供。在一些实施方案中，提供约 0.1eq 的碘化物。

在式 XIV 的化合物的制备中，步骤 (a) 的接触可以在任何合适的温度或压力下进行。在一些实施方案中，在环境温度和压力下进行接触。

在一些实施方案中，可以通过 (b) 在足以获得式 XV 的化合物的条件下使式 XVI 的化合物和氯化剂接触一定施加来制备式 XV:

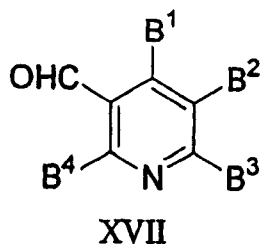


任何氯化剂都是合适的。在一些实施方案中，氯化剂是甲磺酰氯或亚磺酰氯。甲磺酰氯可以以相对于式 XVI 的化合物至少约 1 当量的量提供。亚磺酰氯可以以相对于式 XVI 的化合物至少约 0.5 当量的量提供。

在式 XV 的化合物的制备中，步骤 (b) 的接触可以在任何合适的溶剂中进行。在一些实施方案中，溶剂包括乙腈。任何温度或压力都

是合适的。在一些实施方案中，接触在约 0 - 约 10℃，或者约 0 - 约 5℃ 的温度进行。

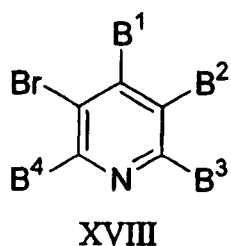
根据一些实施方案，式 XVI 的化合物通过 (c) 在足以获得式 XVI 的化合物的条件下使式 XVII 的化合物接触还原剂一定时间来制备：



任何具有足够强度的还原剂都是合适的，可以以相对于式 XVII 的化合物至少约 1 当量的量提供。在一些实施方案中，还原剂是 NaBH₄。NaBH₄ 可以在氢氧化物水溶液（例如，约 10 - 约 20M NaOH）中提供。

在用于制备式 XVI 的化合物的步骤 (c) 的接触中，合适的溶剂包括对还原剂成惰性的那些。在一些实施方案中，溶剂包括醇，比如甲醇、乙醇、异丙醇等，和其混合物。

根据一些实施方案，式 XVII 的化合物可以通过 (d) 在足以获得所述式 XVII 的化合物的条件下使式 XVIII 的化合物和 n-BuLi 接触并随后和甲酰化剂接触一定时间制备：



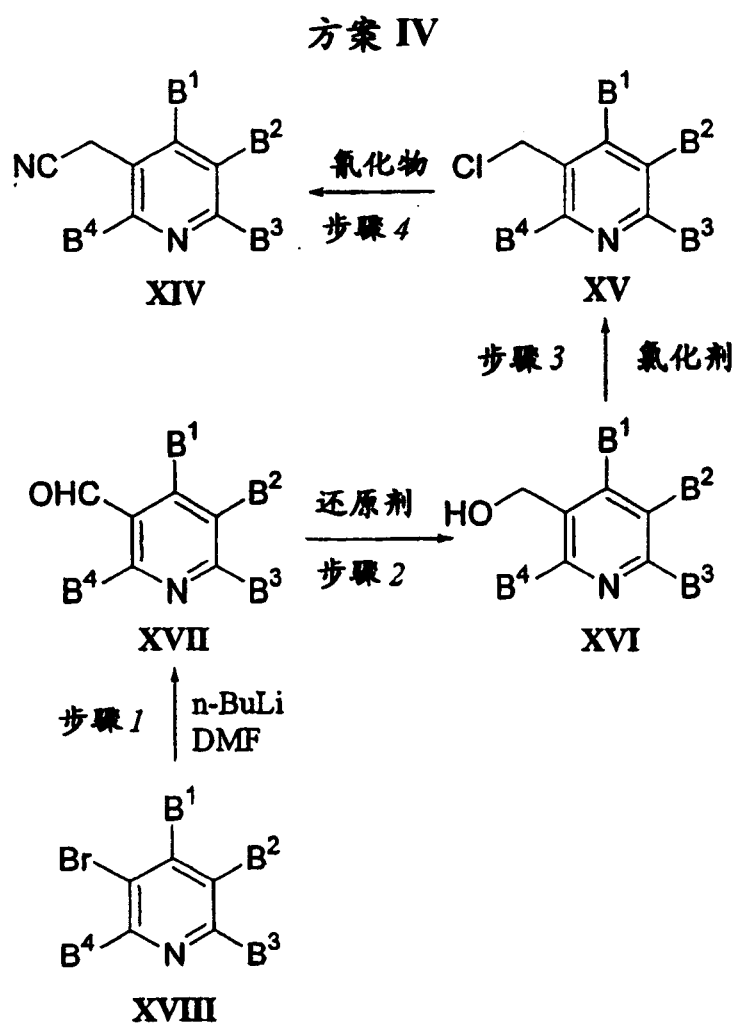
n-BuLi 可以以相对于式 XVII 的化合物约 1eq 的量提供。式 XVII 的化合物也可以通过使式 XVIII 的化合物和能够进行金属 - 卤素交换的试剂，比如镁、锂或者烷基锂，相接触来制备。

合适的甲酰化试剂包括二甲基甲酰胺 (DMF)、甲酸乙酯、N-甲酰基吡啶、N-甲氧基-N-甲基甲酰胺。根据一些实施方案，甲酰化试剂是 DMF。甲酰化试剂可以以至少约 1 当量的量（相对于式 XVIII

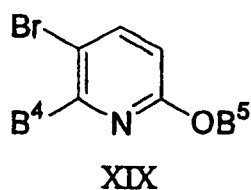
的化合物) 提供。在一些实施方案中, 甲酰化试剂以约 2eq 的量提供。

对式 XVII 的化合物的制备中步骤(d)的接触合适的溶剂对 n-BuLi 显示出惰性, 比如例如苯、甲苯、己烷、和戊烷等。四氢呋喃也可以合适。对于初始接触而言合适的温度可以为 -80 - 约 0℃, 比如约 -60℃。在初始接触后环境温度 and 压力是合适的。

在方案 IV 中提供了制备式 XIV 的化合物的方法的例子。



本发明进一步提供了用于制备式 XIX 的化合物的方法:



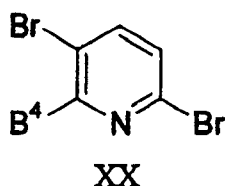
其中:

B^4 是 F、Cl、Br、 $(C_1 - C_4)$ 烷基、 $(C_1 - C_4)$ 卤烷基、 $(C_1 - C_4)$ 烷氧基、或者 $(C_1 - C_4)$ 卤烷氧基; 和

B^5 是 $(C_1 - C_4)$ 烷基;

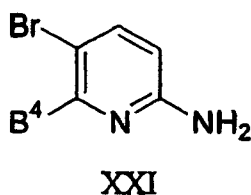
包括:

(a) 在足以提供式 XIX 的化合物的条件下使式 XX 的化合物:



和 B^5O^- 接触一定时间。根据一些实施方案, B^5 可以是甲基或者 B^4 可以是甲基。在其它实施方案中, B^5O^- 以碱盐比如钠盐或钾盐形式提供。试剂 B^5O^- 可以过量提供, 比如例如相对于式 XX 的化合物的量以大于 1eq 的量提供。步骤 (a) 的接触可以在任何合适的溶剂中进行。一些合适的溶剂包括甲醇、苯、和甲苯等。在该温度可以进行步骤 (a) 的接触的合适温度包括约 0 - 约 120°C。例如, 该温度可以是约 60 - 约 80°C 或者约 65 - 约 75°C。环境压力是合适的。

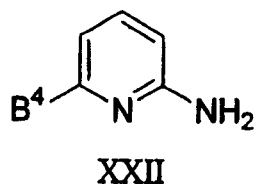
在其它实施方案中, 可以通过在足以获得式 XX 的化合物的条件下, 在酸存在时使式 XXI 的化合物:



或其酸加成盐接触亚硝酸盐和 Br_2 , 来制备式 XX 的化合物。在一些实施方案中, 亚硝酸盐可以以 $NaNO_2$ 或者 HONO 提供。在其它实施方案中, 酸可以是 HBr。亚硝酸盐、 Br_2 和酸的每一个可以过量提供, 例如, 相对于式 XXI 的化合物的量以大于 1eq 提供。步骤 (b) 的接触可以在任何合适温度下进行。温度例如可以是约 -10 - 约 20、约 -5 - 约 10, 或者约 0 - 约 5°C。

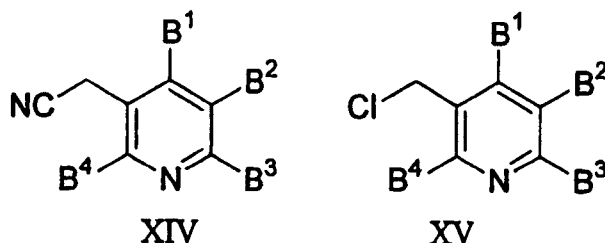
步骤(b)的接触所获得的反应混合物可以进一步和碱接触以将 pH 调到大于约 7。例如,可以加入氢氧化物(比如 NaOH、或者 KOH 等),使溶液 pH 为约 8 - 约 4、约 10 - 约 14 或者约 13。

在一些实施方案中,式 XXI 的化合物可以通过(c)在足以获得式 XXI 的化合物的条件下使式 XXII 的化合物:



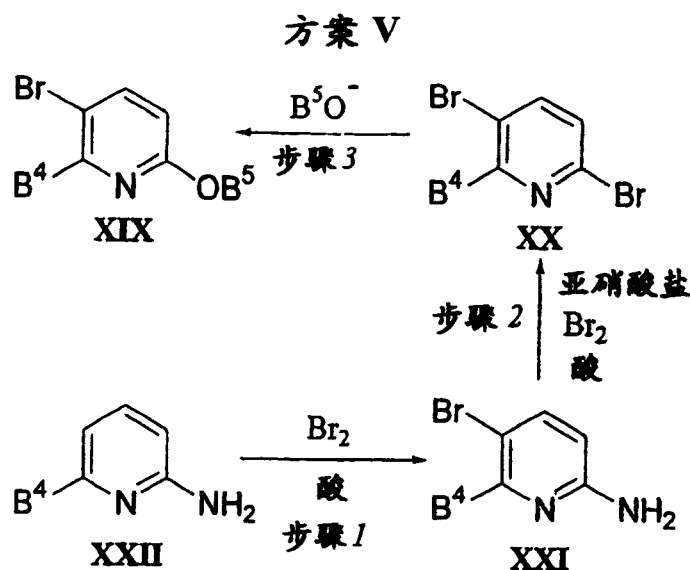
和 Br₂ 在酸存在下接触来制备。在一些实施方案中,酸是乙酸。步骤(c)的接触可以在任何合适温度和压力下进行。一些合适的温度可以为约 10 - 约 25、约 15 - 约 20 或者约 18°C。酸可以相对于式 XXII 的化合物过量提供,可以充当溶剂。溴(Br₂)可以相对于式 XXII 的化合物以约 0.5 - 约 1.5、约 0.9 - 约 1.1 或者约 1.0eq 的量提供。

本发明进一步提供式 XIV 或 XV 的化合物:



其中 B¹ 是 H, B² 是 H, B³ 是甲氧基, B⁴ 是甲基。

方案 V 提供了制备式 XIX 的化合物的方法例子。



本文描述的方法可以通过本领域公知的任何合适方法监控。例如，可以通过光谱装置，比如核磁共振光谱仪（例如， ^1H 或 ^{13}C ）、红外光谱仪、分光光度仪（例如，UV-可见）、或者质谱仪、或者色谱仪，比如高性能液相色谱仪（HPLC）或者薄层色谱仪，监控产物形成。

本文所用术语“接触”是指将试剂一起置于足以实现分子转变比如键断裂和形成的距离之内。提供用以接触的试剂可以处于任何形式，比如气体、液体、固体或溶液形式。

本文所述方法的反应可以在合适溶剂中进行，所述溶剂比如有机溶剂或含水溶剂，有机合成领域的技术人员可以很容易选择。合适的溶剂能够在反应进行的温度，即可以从溶剂凝固温度到溶剂沸腾温度的温度，和原材料（反应剂）、中间物、或者产物基本不反应。给定的反应可以在一种溶剂中或者多于一种溶剂的混合物中进行。可以选择对具体反应步骤而言合适的溶剂，具体取决于所述具体反应步骤。

合适的有机溶剂可以包括卤化溶剂，比如四氯化碳、溴二氯甲烷、二溴二氯甲烷、溴仿、氯仿、溴氯甲烷、二溴甲烷、丁基氯、二氯甲烷、四氯乙烯、三氯乙烯、1, 1, 1-三氯乙烷、1, 1, 2-三氯乙烷、1, 1-二氯乙烷、2-氯丙烷、六氯苯、1, 2, 4-三氯苯、邻二氯苯、氯苯、氟苯、氟三氯甲烷、氯三氯甲烷、溴三氯甲烷、四氯化碳、二氯氟甲烷、氯二氯甲烷、三氯甲烷、1, 2-二氯四氯乙烷、六氯乙烷、1-氯丁烷和 1, 2-二氯乙烷。

合适的有机溶剂包括醚，比如二甲氧基甲烷、四氢呋喃、1, 3-二噁烷、1, 4-二噁烷、呋喃、二乙醚、乙二醇二甲醚、乙二醇二乙醚、二乙二醇二甲醚、二乙二醇二乙醚、三乙二醇二甲醚、苯甲醚、叔丁基甲醚、二正丁醚、2-甲基四氢呋喃或者1, 3-二氧戊环。

合适的质子溶剂可以包括（举例而非限制）水或者有机溶剂，比如甲醇、乙醇、2-硝基乙醇、2-氟乙醇、2, 2, 2-三氟乙醇、乙二醇、1-丙醇、2-丙醇、2-甲氧基乙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、2-乙氧基乙醇、二乙二醇、1-、2-或3-戊醇、新戊醇、叔戊醇、二乙二醇单甲醚、二乙二醇单乙醚、环己醇、苜醇、苯酚、甘油或者1-甲氧基-2-丙醇。

合适的非质子溶剂可以包括（举例而非限制）有机溶剂四氢呋喃（THF）、二甲基甲酰胺（DMF）、二甲基乙酰胺（DMAC）、1, 3-二甲基-3, 4, 5, 6-四氢-2(1H)-嘧啶酮（pyrimidinone）（DMPU）、1, 3-二甲基-2-咪唑啉酮（DMI）、N-甲基吡咯烷酮（NMP）、甲酰胺、N-甲基乙酰胺、N-甲基甲酰胺、乙腈、二甲基亚砷、丙腈、甲酸乙酯、乙酸甲酯、六氯丙酮、丙酮、乙基甲基酮、乙酸乙酯、环丁砜、N, N-二甲基丙酰胺、四甲基脲、硝基甲烷、硝基苯、六甲基磷酰胺、乙酸正丙酯、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、丙酸乙酯、2-戊酮或者甲基异丁酮。

合适的有机溶剂包括烃，比如苯、环己烷、戊烷、己烷、甲苯、环庚烷、甲基环己烷、庚烷、乙基苯、间二甲苯、邻二甲苯、对二甲苯、辛烷、1, 2-二氯化茚、壬烷或者萘。

本文所用的合适酸包括但不限于氢氟酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸、和有机酸。

合适的有机酸包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、甲烷磺酸、对甲苯磺酸、苯磺酸、三氟乙酸、丙炔酸、丁酸、2-丁炔酸、乙烯基乙酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸和癸酸。

本文使用的合适碱包括但不限于氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾、氢氧化镁、氢氧化钙、碳酸钙、碳酸氢钠和碳酸氢钾。

本文所用的合适强碱包括但不限于醇盐、氨基化金属（metal amide）、金属氢化物、金属二烷基酰胺和芳胺（metal dialkylamide and

arylamine)，其中：醇盐包括甲醚、乙醚和叔丁醚的锂盐、；钠盐和钾盐；氨基化金属包括氨基化钠、氨基化钾和氨基化锂；金属氢化物包括氢化钠、氢化钾和氢化锂；金属二烷基酰胺包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、三甲基甲硅烷基和环己基取代的酰胺的钠盐和钾盐。

本文描述的化合物可以具有不对称中心。除非另有说明，本发明包括了所有手性形式、非对映体形式和外消旋形式。烯烃和 C=N 双键等的许多几何异构体也可以出现在此处所述的化合物中，本发明考虑了所有这种稳定的异构体。应该认识到含有非对称取代碳原子的本发明化合物可以以光活性形式或外消旋形式分离。由光活性原材料制备光活性形式的方法是本领域公知的，比如通过外消旋形式的溶解或通过合成。结构的所有手性、非对映体和外消旋形式以及所有几何异构体形式都是预期的。

本发明包括在中间物或最终化合物中出现的原子的所有同位素。同位素包括那些具有同样原子数不同质子数的原子。例如，氢的同位素包括氘和氚。

当在任何成分或任何式子中任何变量出现不止一次时，它在每次出现时的定义和它在所有其它次出现时的定义无关。因此，例如，如果表明某基团用 0-3 个 R^Z 取代，则该基团可以任选地用多达 3 个不同的 R^Z 取代。

本文所用术语“取代”意思是指定原子上的任一或多个氢被选择的指定基团替代，前提是不超过指定原子的正常价态以及取代基导致化合物稳定。

本文所用术语“烷基”是指饱和的直链、支链或环化（“环烷基”）烃基团。烷基基团可以是未取代的，或取代的以使其一个或多个氢被另一化学基团代替。烷基的例子包括甲基（Me）、乙基（Et）、丙基（例如，正丙基和异丙基）、丁基（例如，正丁基、异丁基、叔丁基）、戊基（例如，正戊基、异戊基、新戊基）、环戊基、环己基、和降冰片基等。“烯基”是指具有一个或多个碳碳双键的烷基。烯基的例子包括乙烯基、丙烯基、和环己烯基等。“炔基”是指具有一个或多个碳碳三键的烷基。炔基的例子包括乙炔基和丙炔基等。“卤烷基”是指具有一个或多个卤素取代基的支链、支链或环烷基。卤烷基的例子

包括 CF_3 、 C_2F_5 、 CHF_2 、 CCl_3 、 CHCl_2 和 C_2Cl_5 等。术语“烷氧基”是指 $-\text{O}-$ 烷基。烷氧基的例子包括甲氧基、乙氧基、丙氧基（例如，正丙氧基和异丙氧基）、叔丁氧基等。“卤烷氧基”是指被一个或多个卤素取代的烷氧基。术语“环烷基”是指环化的烷基，包括单环、双环或多环系统。环烷基的例子包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。“卤”或“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

“芳基”是指单环或多环芳烃，包括例如苯基、萘基、蒽基、菲基、1,2-二氧化萘基、茛基等。芳基部分是已知的，在例如 Hawley's Condensed Chemical Dictionary (13 版)，R.J.Lewis 编辑，J.Wiley & Sons, Inc., New York (1997) 中进行描述，在此全文引入作为参考。芳基可以是取代的或未取代的。

“杂芳基”是含有至少一个杂原子环成员比如硫、氧或氮的单环和多环芳烃。杂芳基包括但不限于吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、三嗪基、呋喃基、噻吩基、异噻吩基、噁噁基、咪唑基、噻唑基、吡咯基、吡咯基、苯并呋喃基、苯并噁噁基、苯并噻唑基、异噻唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、1,2,4-噁二唑基、异噻唑基、苯并噁噁基、嘌呤基、呋唑基、苯并咪唑基、2,3-二氢苯并呋喃基、2,3-二氢苯并噁噁基、2,3-二氢苯并噁噁基-S-氧化物、2,3-二氢苯并噁噁基-S-二氧化物、苯并咪唑啉-2-酮基、二氢咪唑基、苯并二氧戊环基、和苯并二噁烷等。杂芳基可以是取代的或未取代的。

“杂环基”可以是饱和（即，不含双键或三键）或未饱和的（即，含有一个或多个双键或三键）碳环基，其中该碳环基的一个或多个成环碳原子被杂原子比如 O、S 或 N 代替。杂环基可以是取代的或者未取代的。杂环基的例子包括吗啉代、硫代吗啉代、哌嗪基、四氢呋喃基、四氢噁噁基、哌啶基、吡咯烷基、异噻唑烷基、异噻唑烷基、吡唑烷基、噻唑烷基、噻唑烷基、和咪唑烷基等。杂环取代基的一些例子可以包括 C1-C6 烷基、C3-C6 环烷基、C2-C6 烯基、C2-C6 炔基、卤素、C1-C4 卤烷基、CN、OR₇、SH、N₀₂、OCF₃、S(O)_nR₇、COR₇、C₀₂R₇、OC(O)R₇、NR₇COR₈、N(COR₇)₂、NR₇CONR₇R₈、NR₇CO₂R₈、NR₇R₈、或 CONR₇R₈，其中 R₇ 和 R₈ 根据本发明第一方面定义。杂环基可以由多个取代基比如例如 0-

7、0-6、0-5、0-4、0-3、0-2 或者 0-1 个取代基取代。

由本发明所述方法制备的化合物可用于治疗哺乳动物中特征在于促肾上腺皮质激素释放因子 (CRF) 水平反常的病症。

特征在于促肾上腺皮质激素释放因子水平反常的一些病症包括心情紊乱，比如抑郁，包括重性抑郁、单次发作抑郁、继发性抑郁、童年虐待引发的抑郁、季节影响性紊乱、产后抑郁、心境恶劣、两极性异常和躁郁循环性精神病；焦虑紊乱，包括恐慌、恐怖症、强迫性神经失调、外伤后压力紊乱；和压力引发的睡眠紊乱；炎症；疼痛；慢性疲劳综合症；压力引发头疼；癌症；人体免疫缺乏病毒 (HIV) 感染；神经变性疾病，比如 Alzheimer 疾病、帕金森病和亨廷顿病；肠胃病比如溃疡、过敏性肠综合症、Crohn 病、结肠痉挛、腹泻和手术后肠梗阻，和与精神病理学干扰或压力相关的结肠超敏性；进食障碍，比如厌食症和贪食症；核上麻痹；肌萎缩外侧硬化；免疫抑制；出血压力；压力引发的精神病发作；甲状腺机能病变综合症；不当抗腹泻激素 (ADH) 综合症；肥胖；不育；头部外伤；脊髓外伤；缺血性神经损伤 (例如，脑缺血，比如脑海马状突起缺血)；兴奋性中毒神经损伤；癫痫症；心血管病症，包括高血压、心动过速和充血性心衰竭；中风；免疫功能紊乱，包括压力引发的免疫功能紊乱 (例如，压力引发的发烧、猪压迫症候群、牛运输性发烧、马突发性纤维性颤动、和由圈闭小鸡、羊剪毛压力 (sheering stress) 或者狗的与人-动物互动引发的功能紊乱)；肌肉痉挛；尿失禁；Alzheimer 型老年型痴呆；多梗塞型痴呆；肌萎缩性(脊髓)侧索硬化；化学依赖性和上瘾 (例如，依赖酒精、可卡因、海洛因、苯并二氮草类或其它药物)；药物和酒精停用综合症；骨质疏松症；社会心理侏儒症；低血糖症；掉发；昼夜节律异常；和与昼夜节律异常相关的紊乱，比如时区变换综合症、季节性紊乱、睡-醒模式不正常、延缓睡眠阶段综合症、超前睡眠阶段综合症、非 24 小时睡醒紊乱、光引发生物钟重置、REM 睡眠紊乱、睡眠过度、深眠状态、发作性睡眠症、夜遗尿、多动腿综合症、睡眠呼吸暂停、精神抑郁、和与抗抑郁剂的长期给药及停药相关的昼夜节律反常。因此，本文提供的化合物由于对 CRF 受体的拮抗性，预计可用于治疗这些和其它病症。

本发明方法制备的化合物可以通过任何使得该化合物可以和其在

哺乳动物体内的作用部位比如 CRF 受体接触的合适方法，进行给药以治疗上述病症。该化合物可以通过任何可用于和药物结合使用的常规装置给药，或者作为单独的治疗剂或者和其它治疗剂结合使用。化合物可以单独给药，或者和药物载体结合给药，所述药物载体根据所选给药途径和标准药物实践选择。

化合物的给药剂量根据几个因数变化，所述因素比如具体化合物的药效性质、和给药模式和途径；接受者年龄、重量和健康程度‘症状的本质和程度；并发治疗种类；治疗频率和所需效果。为了用于治疗上述疾病或状况，本发明的化合物可以以约 0.002 - 约 200mg/kg 体重的活性成分（例如，式 I 的化合物）剂量每日经口给药。例如，可以将约 0.01 - 约 10mg/kg 的剂量分成更小剂量，每天给药 1 - 4 次。可替换地，缓释制剂可以有效地获得所需的药理学效果。

适于给药的剂型（组合物）可以每剂量单位含有约 1mg - 约 100mg 的活性成分。在这些药物组合物中，基于组合物的总重量，活性成分（例如，式 I 的化合物）可以以约 0.5 - 95% 的量存在。

活性成分（例如，式 I 的化合物）可以以固体剂型，比如胶囊、片和粉末，或者以固体形式，比如酏剂、糖浆和/或悬浮液，经口给药。化合物也可以以无菌液体剂量制剂形式不经肠给药。

明胶胶囊可用于包含所述活性成分和合适的载体，比如但不限于乳糖、淀粉、硬脂酸镁、硬脂酸（steric acid）或纤维素衍生物。可以采用类似的稀释剂制备压制的片。片和胶囊都可以以缓释制品的形式生产，以在一定时间内提供药物的连续释放。压制的片可以具有糖衣或者包膜，以遮掩任何不舒服的味道，或者用于保护活性成分免受大气影响，或者使得该片在胃肠管道里选择性分解。

用于经口给药的液体剂型也可以含有着色剂或香味剂来增加患者的接受度。

通常，对于不经肠给药的溶液而言，水、药物可接受的油、盐水、含水右旋糖、和相关的糖溶液和二醇类，比如丙二醇或聚乙二醇，都是合适的载体。用于不经肠给药的溶液可以含有例如活性成分的水溶性盐和合适稳定剂。抗氧化剂，比如酸性亚硫酸钠、亚硫酸钠或者抗坏血酸，可以单独或组合充当合适的稳定剂。柠檬酸和其盐，和 EDTA 也是合适的稳定剂。另外，不经肠溶液可以含有防腐剂，比如例如洁

尔灭、甲基或者丙基尼泊金酯、和氯丁醇。

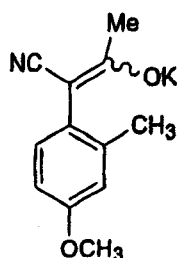
通过本发明所述方法制备的化合物也可以在神经功能、功能紊乱和疾病的研究中用作试剂或标准。

如同本领域技术人员会认识的那样，可以对本发明的优选实施方案进行许多改变和修改，而不会偏离本发明的精神。旨在所有这些改变都落在本发明的范围内。在整个发明书中，采用了各种分组来方便地描述化合物的组成变化以及各种相关部分的分组。具体而言，整个说明书中所述组的每次出现旨在包括该组成员的每种可能的子组合，包括其单独的成员。

在本专利文献中提到的专利、申请和打印文献的每一个旨在通过全文引入作为参考。

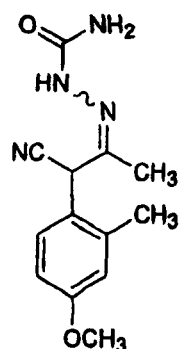
实施例

实施例 1: 制备 2-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-3-氧代丁腈钾盐。



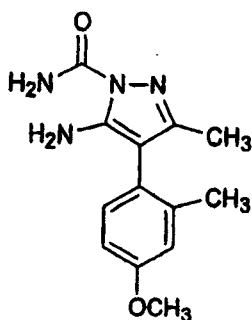
在无水条件下，混合 (4-甲氧基-2-甲基苯基) 乙腈 (25.0kg, 155mol, 有市售) 和 68.3kg 的乙酸乙酯，得到溶液。所得溶液加热到 35℃，在 30-60 分钟内添加在 THF (100kg, 20wt%, 178mol) 中的叔丁氧化钾，同时温度控制在 35℃。加入后，将反应物加热到 45℃ 并保持 60 分钟。在保温末期，用 HPLC 分析试样。然后，将反应混合物冷却到 25℃，和其它三批组合，总共得到 843kg 溶液。

实施例 2: 制备 2-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-3-氧代丁腈缩氨基脲。



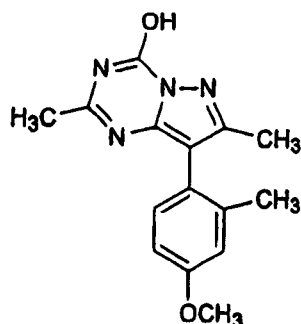
将根据实施例1制备的四批溶液和水(150kg)结合。在145mm Hg和35℃下,从混合物中蒸馏溶剂(557kg)。接下来,加入水(1200kg)、乙酸(47.0kg)、氨基脲化氢氟(89.0kg, 798mol)和IPA(475kg)。将所得混合物加热到25-35℃并保温21小时。通过HPLC监控反应。通过过滤分离形成的2-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-3-氧代丁腈缩氨基脲,用水(2×250kg)清洗滤饼。总共分离143kg。纯度为99.3wt%。产率为理论值的93.1%。

实施例3: 制备5-氨基-4-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-3-甲基吡唑-1-羧酸酰胺



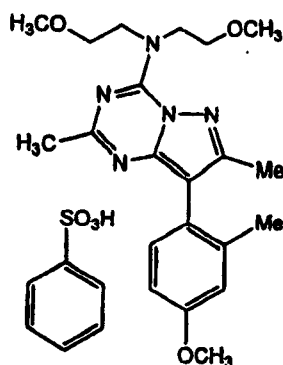
将实施例2的2-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-3-氧代丁腈缩氨基脲(160g, 615mmol)和N-甲基吡咯烷酮(NMP, 480mL)装料,所得浆料冷却到<5℃。加入1,8-二氮二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU, 18.0mL, 120mmol)。将反应物在<5℃保温1.0-1.5小时。由HPLC监控5-氨基-4-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-3-甲基吡唑-1-羧酸酰胺的转化(通常大于95%)。

实施例4: 制备8-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-2,7-二甲基吡唑合[1,5-a][1,3,5]三嗪-4-酚。



在含有 5-氨基-4-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-3-甲基吡唑-1-羧酸酐的实施 3 所述反应混合物中，加入在乙腈 (100mL) 中的对甲苯磺酸 (29.2g, 154mmol)。将所得混合物升温到 85-90℃，在加热过程在 5 分钟内加入原乙酸三甲酯 (160mL, 1.26mol)。反应保持在所需范围内大约 45 分钟，从加热循环开始的总加热时间是 1.5 小时。通过 HPLC 监控反应进程。在 5 分钟内加入水 (1.50L)，温度降到约 60℃。将所得混合物在 1 小时内冷却到约 20℃，通过过滤分离产物。产量为 136g (产率为 78.0%，纯度为 99.5A%)。

实施例 5: 制备 N,N-二(2-甲氧基乙基)-8-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-2,7-二甲基吡唑合[1,5-a][1,3,5]三嗪-4-胺苯磺酸酯。

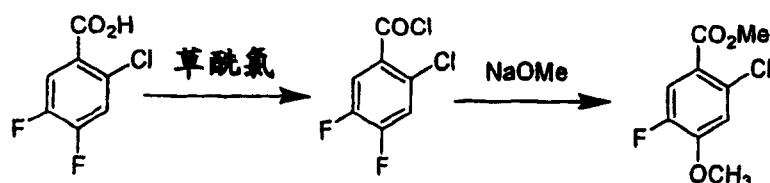


将实施例 4 的 8-(4-甲氧基-2-甲基苯基)-2,7-二甲基吡唑合[1,5-a][1,3,5]三嗪-4-酚 (6.50kg, 22.5mol)、苄基三丁基氯化铵 (4.70kg, 15.0mol)、乙腈 (6.50L) 合甲基叔丁基醚 (26.0L) 装料，所得浆料用磷酸氯 (3.30L, 34.9mol) 合 N,N-二异丙基乙胺

(6.00L, 34.3mol) 处理。所得混合物加热到 50 - 55℃, 保温大约 1.5 小时, 此时反应完成。将所得溶液冷却到大约 0℃, 用二(2-甲氧基乙基)胺(8.50L, 57.5mol) 处理同时保持批料温度 < 25℃。将批料保持大约 1.0 小时, 然后用氢氧化钾(11.4kg, 203mol) 的水溶液(78.0L) 处理并保持 3 - 4 小时。出现分相, 用水(32.5L) 清洗有机部分。加入另外的甲基叔丁基醚(163L), 过滤批料以去除颗粒物。批料在减压下蒸馏, 以去除水和甲基叔丁基醚, 直到最终为约 47.0L。溶液冷却到大约 0℃, 过滤去除颗粒物。

通过在批料中首先加入乙腈(6.11L), 随后一部分一部分地加入苯磺酸(3.58kg, 22.6mol) 在甲基叔丁基醚(6.50L) 中的溶液并同时加入晶种, 以制备盐。该浆料在冷却到大约 0℃ 之前, 在大约 2 小时内形成, 由此该批料保持大约 30 分钟然后通过过滤分离。干燥后得到 10.7kg (理论值的 83.8%)。

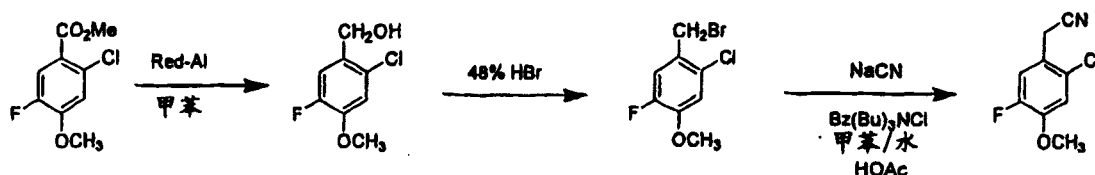
实施例 6: 制备 2-氯-5-氟-4-甲氧基-苯甲酸甲酯。



用草酰氯(19.8kg, 156.0mol, 2.02eq) 处理 2-氯-4, 5-二氟-苯甲酸(15.0kg, 99wgt% 纯度, 77.1mol, 1.00eq) 和二甲基甲酰胺在甲苯(75.9kg) 中的溶液, 同时在 2 小时内温度保持在 < 25℃。将混合物加热到 50℃, 并保温 1 小时。此时, HPLC 表明反应完成。通过蒸馏去除剩下的草酰氯, 容器温度从 85 升到 110℃, 表明在去除沸点较低的草酰氯, 直到蒸馏的仅仅是甲苯为止。将冷却的反应物 (< 25℃) 转移到另一容器中, 该容器含有在甲醇(90.0kg) 中的在甲醇(50.5kg, 233.7mol, 3.03eq) 中的 25 重量% 甲氧化钠。混合物在 25℃ 搅拌过夜, 通过 HPLC 监控。在 50℃/150mmHg 真空在通过蒸馏去除甲醇, 同时通过加入甲苯(总共加入 184.6kg) 维持体积。连续蒸馏直到通过 GC 测定的甲醇含量为 1.16 体积/体积%。所得溶液用水(150.0kg)、1.6 重量% 的盐酸(37.0kg)、碳酸氢钠水溶液(1.85kg 的碳酸氢钠在 33.15kg

水中的溶液)和水(35.0kg)顺序清洗(每次首先搅拌15分钟)。洗后的溶液通过0.2微米盒式过滤器过滤,通过在50℃/150mm Hg真空下蒸馏使体积减半。将混合物加热到80℃,以使已经出现的固体重新溶解,加入庚烷(68.0kg)同时维持温度为70℃。将浆料冷却到5℃,保持过夜。通过过滤收集晶体,用庚烷(34.0kg)清洗,在50℃/50mmHg下干燥,得到14.4kg(85%产率)的醇2-氯-5-氟-4-甲氧基-苯甲酸甲酯制品。

实施例7: 2-氯-5-氟-4-甲氧基-苯甲酸甲酯转变成(2-氯-5-氟-4-甲氧基-苯基)-乙腈。



用 Red-Al (二(2-甲氧基乙氧基)铝氢化钠, 2.95L, 9.83mol, 1.08eq) 的 65wt% 溶液在 1 小时内处理冷却到 13-15℃ 的 2-氯-5-氟-4-甲氧基苯甲酸甲酯 (2.00kg 的 99.04wt% 材料, 9.06mol, 实施例6) 在甲苯 (17.0L) 中的溶液, 同时保持温度为 13-17℃。在此时用 HPLC 采样, 表明所有的原材料已经反应。

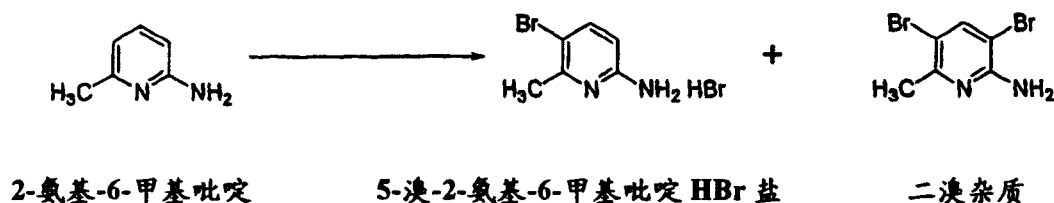
通过加入丙酮 (40mL) 使剩下的 Red-Al 冷却。将反应物转移到预先冷却到 8℃ 的 48% 氢溴酸 (19.0L, 168mol, 18.5eq) 溶液中。加料在 <50℃ 下耗费 40 分钟。将反应混合物加热到 50℃, 保温 30 分钟, 此时 HPLC 表明 1-溴甲基-2-氯-5-氟-4-甲氧基苯和 (2-氯-5-氟-4-甲氧基苯基)-甲醇的比是 999: 1。

分离相, 随后用水清洗有机相 5 次 (2.0L), 直到水洗液的 pH 达到 5。溶液通过盒式过滤器过滤, 得到 18.1kg 溶液, 经分析知道有 13.17 重量% 的 1-溴甲基-2-氯-5-氟-4-甲氧基苯。将该中间物和乙酸混合 (195mL, 3.4mol, 0.36eq)。在 1 分钟内加入氰化钠 (1780g, 36.3mol, 3.84eq) 和苄基三丁基氯化铵 (195g, 0.63mol, 0.07eq) 在水 (2.0L) 中的溶液, 同时剧烈搅拌。用另外的水 (2.0L) 清洗混合物, 温度调整到 35℃。搅拌持续 2.5 小时, HPLC 采样结果表明 (2-氯-5-氟-4-甲氧基-苯基)-乙腈和 1-溴甲基-2-氯-5-氟-4-甲

氧基苯的比是 1999: 1。

分离相，用水（18.5L）清洗有机相。将该批料和同样规模制备的另一批料结合。通过在<50℃的旋转蒸发使溶液浓缩直到~12L的水平，此时继续浓缩但是通过加入异丙醇保持水平不变。持续浓缩程序直到 GC 显示甲苯含量为 2.09% 体积/体积为止。总共需要 18L 的异丙醇。将体积用 IPA 稀释到 16.5L，通过加热使固体溶解。溶液冷却到 45℃，压力下降到 120mmHg，从而蒸馏出异丙醇，同时加入水来维持体积。温度保持在 45-50℃。在 GC 分析结果表明异丙醇水平已经下降到 5.7% 之前，在 5 小时内加入总共~15L 的水。浆料冷却到室温过夜，通过过滤收集晶体。用水（5L）多次清洗滤饼，晶体在 50℃ 经过 4 天的真空干燥（25"真空），得到纯度为 99.17 重量% 的 3.533kg（校正后的产率 97%）的（2-氯-5-氟-4-甲氧基-苯基）-乙腈。

实施例 8: 制备 5-溴-2-氨基-6-甲基吡啶 HBr 盐。



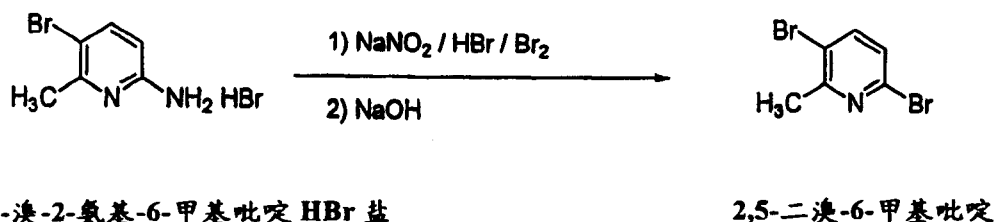
变体 1

将 2-氨基-6-甲基吡啶（39.8kg，99.6 重量% 纯度，367mol，1.00eq）加入到乙酸（65.0kg）中，同时温度升到 60℃。加入另外的乙酸（17kg）以洗掉甲基吡啶的最后部分，将化合物加热到 35℃ 直到发生溶解。在冷却到 18℃ 后，于 18±3℃ 在 2 小时内加入溴（56.2kg，352mol，0.96eq）。再加入乙酸（2.0kg）以洗掉溴的最后部分。将化合物保持在这个温度范围 1 小时，然后冷却到 11-15℃。在此范围保持 0.5 小时。通过在聚丙烯过滤回收固体，用异丙醇（63.0kg）清洗得到 69.6kg 的湿 5-溴-2-氨基-6-甲基吡啶氢溴化物（76wgt% 的产物是氢溴化物）。这对应于 54% 的产率。干燥部分产物以便记录 ¹³CNMR 谱：¹³CNMR（400MHz，DMSO-d₆）δ 154.1、146.9、112.4、105.2、20.1。

变体 2

将 2-氨基-6-甲基吡啶 (16.0kg, 99.6wgt% 纯度, 147mol, 1.00eq) 加入乙酸 (35.0kg) 中, 同时保持温度 50°C。加入另外的乙酸 (2kg) 以洗掉所述甲基吡啶的最后部分, 将混合物加热到 35°C 直到发生溶解为止。在冷却到 18°C 后, 于 $18 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 在 2 小时内加入溴 (23.0kg, 144mol, 0.98eq)。再加入乙酸 (2.0kg) 以洗掉溴的最后部分。将化合物保持在这个温度范围 1 小时, 加入水 (41L)。用 30% 的氢氧化钠 (35kg) 将 pH 调节到 4.0, 在离心分离机上将固体收集到聚丙烯袋 (从这些固体中另外回收产物将在下面描述) 中。用水 (50L) 清洗固体。重新过滤所有的滤液和洗液其去除剩下的固体 (从这些固体中另外回收产物将在下面描述), 用 30% 的氢氧化钠水溶液 (75kg) 调节 pH 到 13.3。在离心分离机上将固体收集到聚丙烯袋中, 用水 (30L) 清洗固体。将这些固体和预先分离的 5-溴-2-氨基-6-甲基吡啶 HBr 盐结合在一起以便干燥。同时, 将第一次过滤收集的二溴杂质滤饼在水 (100L) 中制成浆料, 在离心分离机上的聚丙烯袋中过滤, 用水 (30L) 清洗固体。将滤液/洗液重新装入反应器, 用 50% 的氢氧化钠 (12.5L) 和另外的水 (150L) 将 pH 调至 12.5。在离心分离机上将固体过滤到聚丙烯袋中, 用水 (60L) 清洗固体。将这些固体和预先分离的 5-溴-2-氨基-6-甲基吡啶 HBr 盐固体结合在一起, 在 40°C 一起干燥 3 天, 得到 16.2kg 固体 (95.6wgt%), 或者 56% 的产率。

实施例 9: 5-溴-2-氨基-6-甲基吡啶 HBr 盐转变成 2,5-二溴-6-甲基吡啶



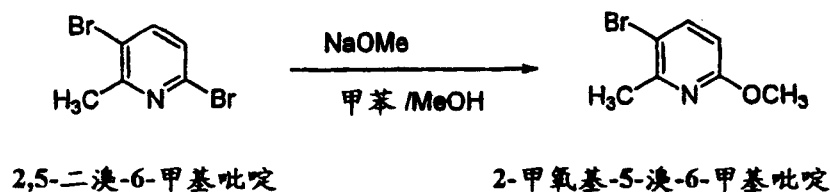
变体 1

将 5-溴-2-氨基-6-甲基吡啶氢溴化物 (29.4kg, 76.5wgt% 纯度, 84mol, 1.00eq) 溶入温度 35°C 的 48% 的氢溴酸 (162.0kg, 961mol,

11.44eq) 中。溶液冷却到 2℃, 在 40 分钟内加进溴 (43.0kg, 269mol, 3.20eq)。在 50 分钟内于 -1 - 5℃ 加入 40wt% 的亚硝酸钠 (28.9kg, 419mol, 4.99eq) 溶液。将所得物保持 1 小时, 采用 50% 的氢氧化钠水溶液 (120.0kg) 将 pH 调至 13.1。将所得物在 1 小时内加热到 20℃, 加入甲苯 (78.0kg)。混合物搅拌 30 分钟, 静置过夜。通过过滤澄清有机相, 用饱和氯化钠水溶液 (51.1kg) 清洗两次。获得 96.0kg 的 2, 5-二溴-6-甲基吡啶溶液 (17.3wgt%) 或者 79% 的产率。

变体 2

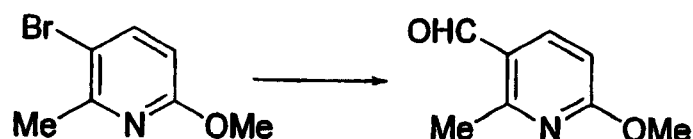
将 5-溴-2-氨基-6-甲基吡啶 (7.0kg) 和 5-溴-2-氨基-6-甲基吡啶氢溴化物 (7.0kg) (基于对原材料的分析, 等于 11kg 或者 41mol 的原材料) 溶入温度 < 35℃ 的 48% 的氢溴酸 (107.0kg, 635mol, 15.49eq) 中。溶液冷却到 2℃, 在 45 分钟内于 0 - 5℃ 加进溴 (27.3kg, 171mol, 4.17eq)。在 1.5 小时内于 -1 - 5℃ 加入亚硝酸钠 (8.1kg, 117mol, 2.86eq) 在 20L 水中的溶液。将所得物保持 1 小时, 采用氢氧化钠的 50% 水溶液 (70.0kg) 将 pH 调至 12.5。将所得物在 1 小时内加热到 20℃, 将固体收集到离心分离机上的聚丙烯袋中。用水 (75L) 清洗固体, 得到 12.0kg 的湿 2, 5-二溴-6-甲基吡啶, 确定有 83wgt% 的产物 (产率为 68%)。干燥部分产物, 以便记录 ¹³C NMR 谱: ¹³C NMR (400MHZ, CDCl₃) δ 158.8, 141.9, 139.4, 126.7, 120.6, 24.7。
 实施例 10: 2, 5-二溴-6-甲基吡啶转变成 2-甲氧基-5-溴-6-甲基吡啶在转变成 2-甲氧基-5-溴-6-甲基吡啶。



通过在 40℃/75mm Hg 下的真空蒸馏, 干燥 2, 5-二溴-6-甲基吡啶 (30.6kg, 122mol, 1.00eq) 在甲苯 (154.2kg) 中的溶液, 以去除 105.7kg 的蒸馏物, 从而得到含有 40ppm 水的溶液。将所得溶液和在甲醇 (124.1kg, 574mol, 4.71eq) 中的 25wt% 甲氧化钠混合, 将混合物

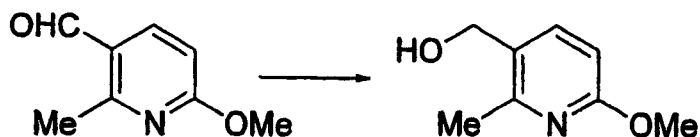
于 65 - 75℃ 加热 6 小时，直到反应完成，（HPLC 分析表明剩下 1.6 面积% 的原材料）。将混合物冷却至 5℃，加入水（98L）并随后加入叔丁基甲醚（97kg）。层发生分离，用 5% 盐水（139kg）清洗两次有机相，并用 20% 盐水（165kg）清洗有机相一次。有机相通过过滤澄清，通过在 40℃ 的真空蒸馏去除 51kg，得到纯度为 40.6wt% 的 2-甲氧基-5-溴-6-甲基吡啶溶液（58.4kg）。将所述溶液部分通过蒸馏纯化，以便记录 ^{13}C NMR 谱： ^{13}C NMR（400MHz, CDCl_3 ） δ 162.4, 154.4, 142.0, 111.8, 109.5, 53.6, 24.6。

实施例 11: 2-甲氧基-5-溴-6-甲基吡啶转变成苄基醛衍生物。



将在 THF（18.3L）中的 2-甲氧基-5-溴-6-甲基吡啶溶液（在甲苯中 73wt% 溶液，3.17kg, 11.45mol）冷却至 -60℃，用在己烷（4.87L, 12.2mol, 1.06eq）中的 2.5N 正丁基锂处理。在 0.5 小时后，于 < -50℃ 装入二甲基甲酰胺（1.76L, 22.8mol, 2.0eq）。在加热到环境温度后，加入氯化铵的水溶液（1.6kg/16.2L 水），层发生分离。用甲基叔丁基醚（3.3L）重新萃取含水相，用饱和的盐水（2.5L）清洗组合的有机萃取物。总共获得 22.4kg 的有机溶液（7.08wt%），相应产率为 92% 溶液。

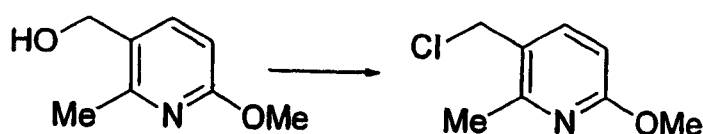
实施例 12: 醛衍生物转变成醇衍生物



将上述实施例 11 制备的苄基醛溶液在真空下于 25 - 35℃ 和甲醇发生溶剂交换。重复进行直到水分析 < 0.1%。最终溶液表明苄基醛的损失为 7.7%。将溶液冷却至 0℃，于 0 - 5℃ 添加氢溴化钠的 12wt% 溶液

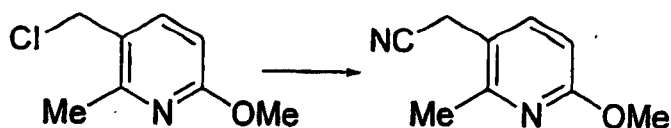
(在 14M 的氢氧化钠水溶液中的 12wt%，660ml，2.9mol，1.10eq)。在 <35℃ 蒸发挥发性组分，加入甲基叔丁基醚 (3L)，继续蒸发。用甲基叔丁基醚 (4.8L) 和水 (3.9L) 清洗残余物，发生分层。用甲基叔丁基醚 (0.8L) 进一步萃取含水相。组合的有机层由 6.238kg (25.16wt% AJ2153) 或者 97.6% 溶液产率构成，所述结果基于溶剂交换后的分析。

实施例 13: 醇衍生物转变成氯化物衍生物



将上述实施例 12 制备的溶液和乙腈发生溶剂交换，直到水含量 < 400ppm。用乙腈 (8.6L) 稀释所述溶液并冷却至 0-2℃。于 0-5℃ 添加亚硫酸氯 (0.78kg，6.6mol，0.64eq)。大多数挥发性组分在 25-35℃ 蒸发，将残余物溶于甲基叔丁基醚 (4.7L) 和饱和碳酸氢钠溶液 (4.7L) 中。添加固体碳酸氢钠 (1.41kg)，以完成中和反应。发生相分离，在含水相中添加更多水 (12L)，用甲基叔丁基醚 (2.4L) 进一步萃取。用饱和盐水 (0.5L) 清洗组合的有机层。有机溶液重量为 7.8kg (16.42wt%)，相应于 72.9% 的溶液产率。

实施例 14: 氯化物衍生物转变成腈衍生物



蒸馏出上述实施例 13 制备的溶液的大约一半体积，剩余物用异丙醇 (7.4L) 稀释。添加氯化钠 (1.79kg，36.6mol，4.9eq) 和碘化钠 (0.11kg，0.73mol，0.1eq) 在水 (4.6L) 中的溶液。搅拌反应物直到 LC 表明苄基氯/苄基氰的比为 1/100 @ 200nm。使层沉降，用乙酸乙酯 (4.2L) 重新萃取含水层。组合的有机溶液在 35-40℃ 下浓缩得到棕色固体。将

所述固体溶入水 (1.5L) 和乙酸乙酯 (8.2L), 发生分层。用乙酸乙酯 (2.6L) 重新萃取含水层, 用饱和盐水和水 (1.3L) 的 1: 1 化合物清洗该组合的有机层。有机溶液用硫酸镁 (0.26kg) 干燥、过滤并于 25 - 35℃ 浓缩。蒸馏出的体积用乙酸乙酯替换, 直到含水量 < 400ppm。有机溶液的重量是 2.68kg (41.3wt%)。这相应于 91.4% 的溶液产率。

实施例 15: 生物学试验

本发明方法制备的化合物可以具有 CRF 受体拮抗剂活性。化合物如果其 K_i 值小于约 10000nM, 则可以认为它对于抑制 CRF 具有活性。 K_i 值可以通过任何合适的生物学试验比如例如下面描述的试验确定。

此处提供了可用于评价本发明化合物生物活性的 CRF₁ 受体结合试验的实施例。本实施例还包括分离含有克隆人体 CRF₁ 受体的细胞膜, 以在结合试验中使用。

通过标准技术将从人体海马状突起分离信使 RNA。mRNA 采用 oligo (dt) 12 - 18 进行逆转录, 通过 PCR 对信号区从起始密码子到终止密码子进行扩增。将所得的 PCR 片段克隆到 pGEMV 的 EcoRV 部位中, 由此该插入片段通过 XhoI+XbaI 回收并克隆到向量 pm3ar (它含有 CMV 促进剂、SV40 't' 剪接和早期多 A 信号、Epstein-Barr 复制病毒源、和潮霉素可选标记物) 的 XhoI+XbaI 部位。所得表达向量称作 phchCRFR, 转移到 293EBNA 细胞中, 在存在 400 μM 的潮霉素时, 选择保留该游离体的细胞。在潮霉素选择中存活 4 周的细胞被集中起来, 适用于在悬浮液中生长, 并用于形成用于下述结合试验的膜。然后, 将各个含有大约 1×10^8 的悬浮细胞的等份进行离心处理以形成丸粒并冷冻。

为了进行结合试验, 将含有感染了 hCRFR1 受体的 293EBNA 细胞的冷冻丸粒在 10mL 的冰冷组织缓冲液 (50mM HEPES 缓冲液, pH 为 7.0, 含有 10mM MgCl₂、2mM EGTA、1 μg/l 抑肽酶、1 μg/ml 亮肽素和 1 μg/ml 抑胃肽) 中均质化。均质化物以 40000 × g 离心 12 分钟, 所得的丸粒在 10mL 的组织缓冲液中重新均质化。在以 40000 × g 再次离心 12 分钟后, 将丸粒重新悬浮得到 360 μg/ml 的蛋白质浓度, 在试验中备用。

在 96 孔板上进行结合试验; 每个孔具有 300 μl 的容量。在每个孔中加入 50 μl 的测试药物稀释液 (药物最终浓度为 10^{-10} - 10^{-5} M)、100

μl 的 ^{125}I -羊-CRF (^{125}I -o-CRF) (最终浓度为 150pM) 和 150 μl 的上述细胞均质物。然后, 将板在室温下培养 2 小时, 然后在 GF/F 过滤器 (预先采用 0.3% 的聚乙烯亚胺浸泡) 上采用合适的细胞收集器过滤培养物。过滤器用冰冷的试验缓冲液冲洗 2 次, 然后移开单个过滤器, 在 γ 计数器上评价其放射性。

采用迭代曲线拟合程序 LIGAND 分析在试验药物的各种稀释水平下对 ^{125}I -o-CRF 与细胞膜的结合的抑制曲线, (参见 Munson 等, *Anal.Biochem.*, 1980, 107, 220, 该文献在此全文引入作为参考), 它提供了用于抑制的 K_i 值, 该值随后用来评价生物学活性。

在例如 *Endocrinology*, 1985, 115, 1653 和 *Peptides*, 1985, 10, 1979 中描述了用于确定本发明化合物的 CRF_1 受体拮抗剂活性的其它体外试验, 所述文献都在此全文引入作为参考。根据 Grigoriadis 等, *Biochemical, Pharmacological, and Autoradiographic Methods to Study Corticotropin-Releasing Factor Receptors*, *Methods in Neurosciences*, Vol.5, 1991 描述的方法, 也可以评价化合物的受体结合活性, 其在此全文引入作为参考。

实施例 16: 抑制 CRF - 刺激的腺苷酸环化酶活性

本发明化合物的活性可以通过抑制 CRF - 刺激的腺苷酸环化酶活性来进行研究, 所述抑制可以通过 Battaglia 等, *Synapse*, 1987, 1, 572 的描述进行研究, 其在此全文引入作为参考。在 200mL 的缓冲液中于 37°C 试验 10 分钟, 所述缓冲液含有 100mM Tris-HCl (37°C 时 pH 为 7.4)、10mM MgCl_2 、0.4mM EGTA、0.1% BSA、1mM 异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX)、250 单位/ml 的磷酸肌酸激酶、5mM 磷酸肌酸、100mM 鸟苷 5' - 三磷酸盐、100nM oCRF、拮抗剂肽 (浓度范围为 10^{-9} - 10^{-6}M) 和 0.8mg 原始湿重组织 (大约 40 - 60mg 蛋白质)。通过加入 1mM $\text{ATP}/^{32}\text{P}\text{ATP}$ (大约 2 - 4mCi/管) 引发反应, 通过加入 100mL 的 50mM Tris-HCl、45mM ATP 和 2% 十二烷基硫酸钠使反应终止。为了监控 cAMP 的回收, 在分离前在每个管子中加入 1 μl 的 $^3\text{H}\text{cAMP}$ (大约 40000dpm)。通过在 Dowex 和氧化铝柱上顺序洗脱, 实现 $^{32}\text{P}\text{cAMP}$ 和 $^{32}\text{P}\text{ATP}$ 的分离。

实施例 17: 体内生物学试验

本发明化合物的体内活性可以采用本领域可得并且认可的任一生物

生物学试验进行评价。用于测试化合物 anxiolytic 活性的体内生物学试验的例子包括“punished drinking test”（Vogel 等, *Psychopharmacologia*, 1971, 21, 1, 在此全文引入作为参考）、“elevated plus-maze test”（Pellow 等, *J. Neurosci. Methods*, 1985, 14, 149, 在此全文引入作为参考）、“压力诱导皮层去甲肾上腺素释放”（Funk 等, *Brain Res.*, 1996, 741, 220, 在此全文引入作为参考）、“亮-暗试验”（Misslin 等, *Behav. Process*, 1989, 8, 119, 在此全文引入作为参考）、“四板试验”（Boissier 等, *Eur. J Pharmacol.*, 1968, 4, 145, 在此全文引入作为参考）、和“小鼠防御试验电池组”（Griebel 等, *Aggress. Behav.*, 1997, 23, 19, 在此全文引入作为参考）。化合物可以在任何种类的啮齿动物或小型哺乳动物中试验。

用于测试化合物的抗抑郁类活性的体内生物学试验的例子包括“强迫游泳试验”（Porsolt 等, *Nature*, 1977, 266, 730, 在此全文引入作为参考）和“CMS 试验”（Willner 等, *Clin. Neuropharmacol.*, 1992, 15（附录 1）, 500A, 在此全文引入作为参考）。

在 Berridge 等, *Brain Research Reviews*, 1990, 15, 71 中描述了测试化合物的 anxiolytic 或抗抑郁活性的其它可用方法, 在此全文引入作为参考。用于测试化合物有关其它指示的活性的模型是本领域公知的。