

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2013年8月22日 (22.08.2013)



(10) 国际公布号  
WO 2013/120438 A1

- (51) 国际专利分类号:  
A61K 31/50 (2006.01) A61P 25/02 (2006.01)  
A61K 31/5025 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/071515
- (22) 国际申请日: 2013年2月7日 (07.02.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201210032922.1 2012年2月14日 (14.02.2012) CN  
201210506153.4 2012年11月30日 (30.11.2012) CN
- (71) 申请人: 中国科学院上海生命科学研究院 (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路319号, Shanghai 200031 (CN)。 中国科学院上海药物研究所 (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。
- (72) 发明人: 张旭 (ZHANG, Xu); 中国上海市岳阳路319号, Shanghai 200031 (CN)。 李帅 (LI, Shuai); 中国上海市岳阳路319号, Shanghai 200031 (CN)。 鲍岚 (BAO, Lan); 中国上海市岳阳路319号, Shanghai 200031 (CN)。 叶阳 (YE, Yang); 中国上海市祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 姚胜 (YAO, Sheng); 中国上海市祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

### 本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: SUBSTANCE FOR TREATMENT OR RELIEF OF PAIN

(54) 发明名称: 治疗或缓解疼痛的物质

(57) Abstract: Disclosed is the use of an inverse agonist for  $\alpha$ -subunit-containing  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor in the preparation of a medicine for the prevention, alleviation, or treatment of pain.

(57) 摘要: 一种含  $\alpha$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的反向激动剂用于制备预防、改善或治疗疼痛的药物中的用途。



WO 2013/120438 A1

## 治疗或缓解疼痛的物质

### 技术领域

本发明属于生物技术领域；更具体地，本发明涉及治疗或缓解疼痛的物质。

5

### 背景技术

疼痛是一种不同于触、压、热或冷的感觉表达。患者经常用如锐痛、钝痛、酸痛、刺痛、切割性疼痛或灼烧痛的此类术语描述疼痛。一般将由伤害神经引起、表现为痛觉过敏的疼痛称为“神经源性”痛；而将通过刺激伤害感受体引起的疼痛称为“伤害性”痛。

10

从临床上来讲，疼痛又可分为两类：急性痛和慢性痛。急性痛由皮肤、身体结构或内脏的损伤和/或疾病产生的有害刺激引起，或由不产生实际组织损害的肌肉或内脏的异常功能引起；而慢性痛可以定义为持续超出急性疾病通常的病程或损伤治愈的合理时间，或与引起持续疼痛的慢性病理过程有关，或疼痛以一定间隔复发数月或数年，如果在应该已经达到治愈后仍存在疼痛，则认为是慢性痛。对于本发明的目的，慢性痛可以是慢性非缓解的或是复发的，急性痛和慢性痛之间定义的差异不仅仅是语义上的差异，而是具有重要的临床相关性，例如急性痛不能得到很好的控制，就会发展成为慢性痛。

15

急性和慢性痛在病因学机制、病理学和诊断治疗方面不同。与急性痛的暂时性相对比，慢性痛由身体结构或内脏中的慢性病理过程引起，或由外周或中枢神经系统或这两者延长的、有时是永久性的技能障碍引起。此外，慢性痛有时可以归因于心理学机制或/和环境因素。

20

急性痛一般是指非神经病性疼痛，包括常见病症，如关节炎疼痛、肌肉骨骼疼痛、手术后疼痛和纤维肌痛。这些疼痛中的大多数被认为是由软组织和骨损伤引起的，如关节炎疼痛、肌肉骨骼疼痛和手术后疼痛，是在正常发挥功能的神经系统中导致炎症反应，而疼痛仅仅是炎症过程的结果。

25

慢性痛包括神经源性痛、炎性痛和癌症痛。这些疼痛可以与痛觉过敏和/或异常痛觉有关，其中痛觉过敏是指对典型有害刺激的敏感性增高而异常痛觉是指对典型非有害刺激的敏感性增高。

躯体源性的疼痛是由外周感觉神经损伤或感染引起，它包括但不限于由外周神经损伤、疱疹病毒感染、糖尿病、灼痛、血管或神经丛撕脱、神经痛、截肢和结节性脉管炎引起的疼痛，神经源性痛还由慢性环境中毒、人免疫缺陷病毒感染、甲状腺功能减退、尿毒症或维生素缺乏造成的神经损伤引起，其临床表现包括但不限于炎症疼痛、骨关节疼痛、三叉神经痛、癌症疼痛、糖尿病神经病、腿多动综合症、疱疹后神经痛、灼痛、臂血管神经丛撕脱、枕部神经痛、痛风、幻肢、烧伤及其它形式的神经痛、神经性和自发性疼痛综合征。

35

神经源性痛一般被认为是由外周或中枢神经系统被损害或病变引起的慢性痛。与神经源性痛有关的病变包括长期外周或中枢神经元致敏、与神经系统抑制和/或兴奋功能受到损害有关的中枢敏化以及副交感神经和交感神经神经系统之间的异常相互作用。许多临床症状与神经源性痛有关或构成神经源性痛的基础，例如糖尿病、切断术的术后疼痛、  
5 背下部疼痛、癌症、化学损伤或毒素、其他严重手术、由创伤性损害压迫引起的外周神经损害、营养缺乏、感染(如带状疱疹、HIV)等。

使疼痛受到注意的刺激水平称为“疼痛阈值”。镇痛剂为通过使患者提高痛阈而不丧失意识来缓解疼痛的药物。在患痛觉过敏的个体中，镇痛药可具有抗痛觉敏感的作用。目前，美国食品和药品管理局(FDA)所批准的处方镇痛药仅分为两类药物：阿片类和抗炎药。  
10 麻醉药属于不同的分类。阿片类镇痛药通过模拟机体的内源性阿片类物质即内啡肽和脑啡肽(其由机体产生以有助于减轻疼痛)而起作用，通过作用于整个中枢和外周神经系统的阿片类受体来阻断疼痛。抗炎药包括非选择性非甾类抗炎镇痛药和特异的COX-2 抑制剂，试图降低由机体损伤引起的前列腺素等化学递质所产生的炎症。

在所有的阿片类镇痛剂中，吗啡仍然是最广泛使用的镇痛剂。但是除了它的治疗特  
15 性外，它有一些缺点，包括呼吸抑制、胃肠运动降低(引起便秘)、恶心和呕吐。耐受性和物理依赖性也限制了阿片类化合物的临床使用。抗炎类镇痛剂包括阿司匹林和其他水杨酸化合物，能够阻止炎症过程的扩大，并暂时性地减轻疼痛，然而上述药物对于神经源性痛效果并不显著。并且很多抗炎药物，特别是非甾类抗炎药会引起胃肠道副作用，尤其在口服时，这种副作用包括引起胃肠道溃疡和糜烂，这些通常无症状的副作用会变得严重到需要住院，甚至可以致命。加巴喷丁(Gabapentin)是当前治疗神经源性痛的一  
20 线临床药物，得到广泛的应用。加巴喷丁具有明显的副作用，包括嗜睡、眩晕、行走不稳或和疲劳感，这些副作用常见于用药早期。儿童偶尔会急躁易怒，停药以后会消失。

根据这些现实，需要更有效的镇痛剂，它具有很好的安全性和耐药性，并且无成瘾性。理想的镇痛剂将减轻或消除患者对疼痛的感觉，在各类疼痛发生时产生痛觉缺失，  
25 无论口服还是其他给药方式其作用均令人满意，产生最小副作用或不产生副作用，并且不产生药物耐受和药物依赖的倾向。

$\gamma$ -氨基丁酸(GABA)是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质，有两类GABA 受体存在于自然界中，一类是GABA<sub>A</sub>受体，该类受体为配体门控离子通道超家族的成员，另一类是GABA<sub>B</sub>受体，该类受体是为G蛋白偶连受体超家族的成员。哺乳  
30 动物中的GABA<sub>A</sub>受体亚基被发现的有 $\alpha$ 1-6、 $\beta$ 1-4、 $\gamma$ 1-3、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\theta$ 和 $\rho$ 1-2等亚基，其中 $\alpha$ 亚基、 $\beta$ 亚基和 $\gamma$ 亚基对形成一个完整的功能型GABA<sub>A</sub>受体是必不可少的，而 $\alpha$ 亚基对苯二氮卓与GABA<sub>A</sub>受体的结合是至关重要的。主要能够与苯二氮卓结合的是含有 $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、 $\alpha$ 3或 $\alpha$ 5亚基的GABA<sub>A</sub>受体，已有文献已经报道过包含 $\alpha$ 1亚基的GABA<sub>A</sub>受体主要介导镇定和肌肉松弛的作用，而包含 $\alpha$ 2和 $\alpha$ 3的受体主要介导抗惊厥的作用。  
35 关于GABA<sub>A</sub>受体在疼痛中的作用研究比较广泛，特别是GABA<sub>A</sub>受体的激动剂可以在

中枢神经系统抑制疼痛,在 2008 年报道包含  $\alpha 2$  和  $\alpha 3$  亚基的  $GABA_A$  受体的激动剂在脊髓水平明显抑制神经源性痛和炎性痛。 $GABA_A$  受体的抑制剂或者反向激动剂是否能够抑制疼痛尚不清楚。已有文献报道, $GABA$  在大鼠或人体外周神经系统可以引起一个兴奋性的电流,而  $GABA_A$  受体的激动剂 Muscimol 在低剂量可以抑制福尔马林诱导的疼痛,而高剂量促进福尔马林诱导的疼痛。 $GABA_A$  受体在疼痛中的作用尚不清楚,而  $GABA_A$  受体在中枢神经系统表达的广泛性限制了一应配体在治疗疼痛方面的应用。

含  $\alpha 5$  的  $GABA_A$  受体 ( $\alpha 5-GABA_A$  受体) 在哺乳动物大脑的  $GABA_A$  受体中所占的比例小于 5%,在大脑皮层中表达水平非常低,但在大脑海马组织中的  $GABA_A$  受体中所占比例大于 20%,其他大脑区域几乎不表达。以前的工作已经提示  $\alpha 5-GABA_A$  受体很可能与认知有关(Collinson N et al., Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the  $GABA_A$  receptor J Neurosci. 2002 Jul. 1;22(13):5572-80.)

考虑到  $\alpha 5-GABA_A$  受体的在大脑海马组织中特异性分布和功能研究,包括默沙东在内的许多制药公司从事于  $\alpha 5-GABA_A$  受体配体的研究,陆续有大量的化合物合成出来,特别是针对  $\alpha 5-GABA_A$  受体的化合物,期望能够治疗与认知有关的疾病。A5I 和 MRK016 是默沙东开发出来用于治疗认知相关疾病的化合物,A5I 在临床 II 期实验中发现由于化合物的溶解度太低造成肾毒性;而 MRK016 在安全性上存在问题,在 I 期临床实验中,发现该药物可以导致头重脚轻、头痛和恶心呕吐等副作用。

关于  $\alpha 5-GABA_A$  受体在外周神经系统的作用,尚未有相关报道。外周神经系统由躯体神经系统和自主神经系统组成。躯体神经系统分感觉神经系统(传入神经)和运动神经系统(传出神经)两大类,分布到身体的各部分。把神经冲动从外周传到神经中枢的神经元叫初级感觉神经元,在感觉神经系统中,只有胸神经是一根根地在肋骨下缘行走,形成肋间神经,支配胸壁和腹壁的皮肤和肌肉。其余感觉神经都是相邻的几根神经结合起来,形成神经丛,如颈丛、臂丛、腰丛和骶丛等,从各个神经丛再分出许多神经,分别分布到颈部、上胸、上肢、下肢和会阴部的皮肤和肌肉等处。背根神经节的初级感觉神经元按照细胞直径的大小分为不同的功能群,通常分为小细胞、中等细胞和大细胞。通常认为中小细胞是传递伤害性感受(疼痛)的细胞,某些中小细胞的游离神经末梢对伤害性或持续性刺激敏感,称之为伤害性感受器。已发现包含  $\alpha 5-GABA_A$  受体主要表达在小神经元,并且在神经切断模型中表达升高(Xiao HS et al., Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain." Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 11;99(12):8360-5.),但其是否与伤害或疼痛密切相关本领域还没有深入的研究。

## 发明内容

本发明的目的在于提供治疗或缓解疼痛的物质和方法,同时也提出一种新的疼镇痛

药物筛选方法。

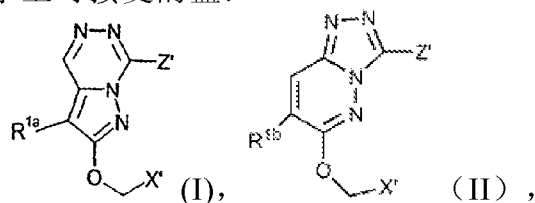
在本发明的第一方面，提供  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂或其药学上可接受的盐的用途，用于制备预防、改善(缓解)或治疗疼痛的药物。

5 在一个优选例中，所述的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂是选择性结合于该受体的苯二氮卓结合位点的配体。

在另一优选例中，所述的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的配体结合于  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的能力大于结合于包含  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的能力。

在另一优选例中，所述的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的配体反向激动  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的效率大于反向激动包含  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的效率。

10 在另一优选例中，所述的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂是具有式(I) 和 (II) 结构所示的结构的化合物或其药学上可接受的盐：



15 其中，R<sup>1a</sup> 表示卤素；或 C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>3-7</sub> 环烷基、C<sub>4-7</sub> 环烯基、C<sub>6-8</sub> 二环烷基、C<sub>6-10</sub> 芳基、C<sub>3-7</sub> 杂环烷基、定义为或者含有 6 个原子，其中 1, 2 或 3 个为氮，或者含有 5 个原子；其中 1、2 或 3 个独立选自氧、氮或硫而且其中氧或硫不超过一个的芳环的杂芳基，或二(C<sub>1-6</sub>) 烷基氨基，这些基团中的任意一个可以用一个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、R<sup>3</sup>、OR<sup>3</sup>、OC(O)R<sup>3</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>(C<sub>1-6</sub>)烷基、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>C(O)、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>C(O)(C<sub>1-6</sub>)烷基、CN、氰基(C<sub>1-6</sub>)烷基或 R<sup>6</sup>。

20 R<sup>1b</sup> 表示 C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>3-7</sub> 环烷基、C<sub>4-7</sub> 环烯基、芳基、C<sub>3-7</sub> 杂环烷基、杂环芳基、二(C<sub>1-6</sub>) 烷基氨基。

R<sup>3</sup> 表示 C<sub>2-6</sub> 烷基、C<sub>2-6</sub> 链烯基、C<sub>2-6</sub> 炔基、C<sub>3-6</sub> 环烷基、C<sub>3-6</sub> 环烷基 (C<sub>1-6</sub>)烷基、氰基(C<sub>1-6</sub>)烷基、羟基 (C<sub>1-6</sub>)烷基且 R<sup>3</sup> 任选为 1、2 或 3 氟代的。

25 R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 每个独立为氢、C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>2-6</sub> 链烯基、C<sub>2-6</sub> 炔基、C<sub>3-6</sub> 环烷基或 CF<sub>3</sub>，或 R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 与它们共同连接的氮原子一起形成 4-7 元杂脂肪环，该脂肪环含有所述氮原子和一个任选自 O、N 和 S 的其它杂原子，所述环可以被一个或多个 R<sup>3</sup> 基团任选取代。

R<sup>6</sup> 为 C<sub>6-10</sub> 芳基、C<sub>6-10</sub> 芳基(C<sub>1-6</sub>)烷基、杂芳基或杂芳基(C<sub>1-6</sub>)烷基。其中杂芳基如上定义，而且 R<sup>6</sup> 任选被一个、两个或三个独立选自以下的取代基取代：卤原子和 C<sub>1-4</sub> 烷基、C<sub>2-4</sub> 链烯基、C<sub>2-4</sub> 炔基、C<sub>1-4</sub> 烷氧基、C<sub>2-4</sub> 链烯氧基和 C<sub>2-4</sub> 炔氧基基团，其中每个基团是未取代的或被一个、两个或三个卤原子取代。

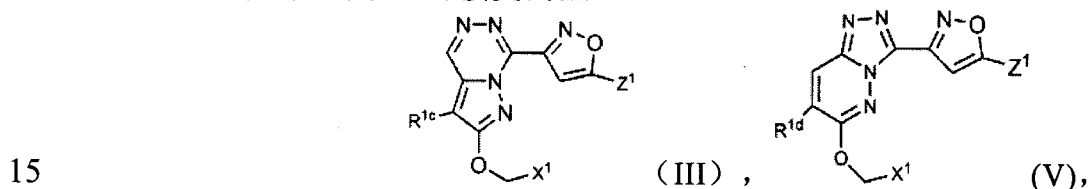
30 X' 为 NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>；或 X' 为含有 1、2、3 或 4 个独立选自氧、氮和硫的杂原子的 5 元杂芳环，杂原子中最多有一个为氧或硫，或为含有 1、2 或 3 个氮原子的 6 元杂芳环，所述 5 或 6 元杂芳环任选稠合于苯环或吡啶环上并且该杂芳环任选被 R<sup>w</sup> 和/或 R<sup>y</sup> 和/或 R<sup>z</sup> 取代，其中 R<sup>w</sup> 为卤素、R<sup>3</sup>、OR<sup>3</sup>、OC(O)R<sup>3</sup>、C(O)OR<sup>3</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、NR<sup>4</sup>C(O)R<sup>5</sup>、OH、三(C<sub>1-6</sub> 烷

基)甲硅烷基 C<sub>1-6</sub> 烷氧基 C<sub>1-4</sub> 烷基、CN 或 R<sup>6</sup>, R<sup>y</sup> 为卤素、R<sup>3</sup>、OR<sup>3</sup>、OC(O)R<sup>3</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、NR<sup>4</sup>C(O)R<sup>5</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>(C<sub>1-6</sub>)烷基或 CN 而 R<sup>z</sup> 为 R<sup>3</sup>、OR<sup>3</sup>、OC(O)R<sup>3</sup>, 前提是当 X' 为吡啶衍生物时, 该吡啶环任选为 N-氧化物形式, 并且前提是 X' 为四唑衍生物时, 它被 C<sub>1-4</sub> 烷基基团保护; 或 X' 为由一个、两个或三个独立选自以下的基团任选取代的苯基: 卤素、

5 氰基、C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>2-6</sub> 链烯基、C<sub>2-6</sub> 炔基和 C<sub>3-6</sub> 环烷基。  
Z' 表示含有 1、2 或 3 个独立选自氧、氮和硫的杂原子的 5 元杂芳环, 最多有 1 个杂原子为氧或硫, 并且前提是当 1 个原子为氧或硫时至少也存在 1 个氮原子, 或为含有 2 或 3 个氮原子的除吡嗪之外的 6 元杂芳环, 所述环中的任何 1 个可以由 1 个或多个选自以下的取代基任选取代: 卤素、R<sup>3</sup>、OR<sup>3</sup>、OC(O)R<sup>3</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>(C<sub>1-6</sub>)烷基、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>C(O)、

10 NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>C(O)(C<sub>1-6</sub>)烷基、CN、氰基(C<sub>1-6</sub>)烷基或 R<sup>6</sup>。  
在另一优选例中, 所述的 α5-GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂还包括: 具有式(I 和 II)所示结构的化合物的异构体、前体。

在另一优选例中, 所述的 α5-GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂是具有式(III 或 V)所示结构的化合物或其药学上可接受的盐:

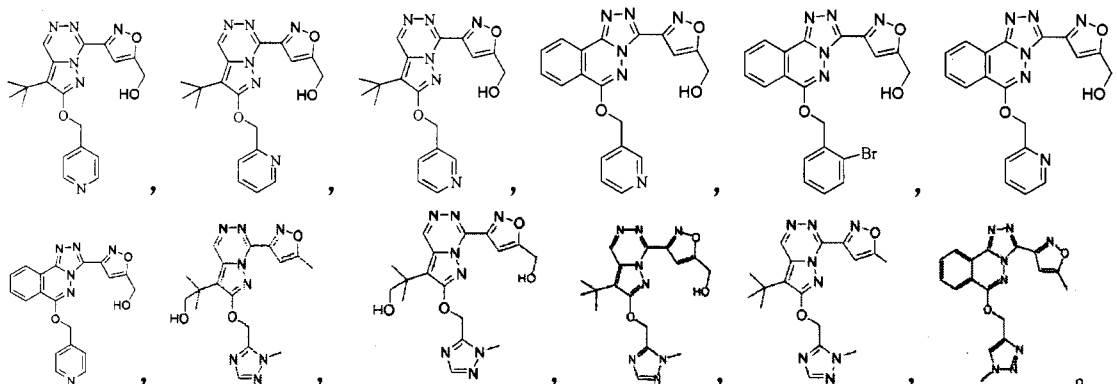


其中, R<sup>1c</sup> 表示溴、噻吩基、叔丁基、苯基或呋喃基; R<sup>1d</sup> 表示芳基, C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>3-7</sub> 环烷基; X<sup>1</sup> 为含有 1、2 或 3 氮原子的 5 元杂环, 杂原子中最多有一个为氧或硫, 或为含有 1、2 或 3 个氮原子的 6 元杂芳环, 所述 5 或 6 元杂芳环所述环中的任何 1 个可以由 1 个或多个选自以下的取代基任选取代: C<sub>1-6</sub> 烷基、氨基、吡啶基、CF<sub>3</sub>、芳基(C<sub>1-6</sub>)烷基、

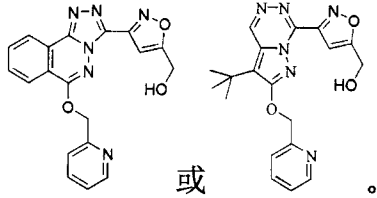
20 吡啶基(C<sub>1-6</sub>)烷基、卤素、氰基、氰基(C<sub>1-6</sub>)烷基、羟甲基、羟基或其酮基互变异构体。Z<sup>1</sup> 表示羟基、卤素、羟基或氨基取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 链烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 链炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷氧基。

在另一优选例中, 所述的 α5-GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂还包括: 具有式 (III 或 V) 所示结构的化合物的异构体、前体。

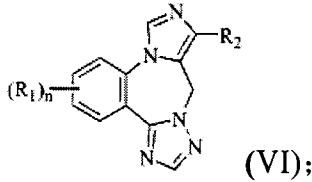
25 在另一优选例中, 所述的 α5-GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂为下列化合物或其药学上可接受的盐, 该化合物为:



在另一优选例中，所述的  $\alpha 5\text{-GABA}_A$  受体的反向激动剂，更优选为下列化合物或其药学上可接受的盐，该化合物为：

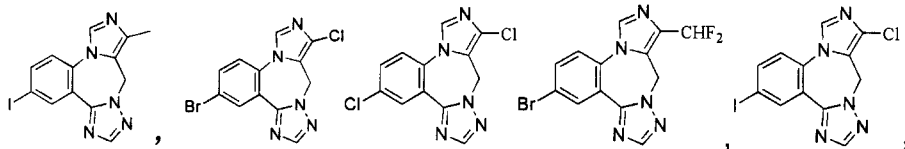


在另一优选例中，所述的  $\alpha 5\text{-GABA}_A$  受体的反向激动剂是具有式(VI)所示的结构 5 的化合物或其药学上可接受的盐：

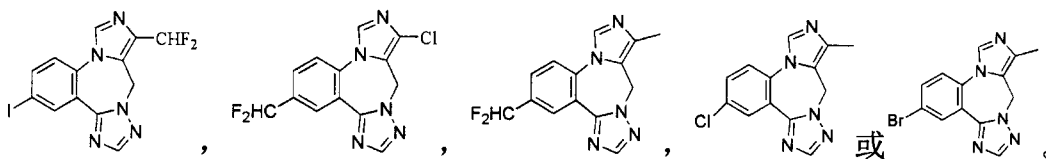


其中， $R_1$  是卤素、 $C_{1-7}$  烷基、 $C_{2-7}$  链炔基、环烷基、 $C_{1-7}$  烷氧基、 $OCF_3$ 、 $-NHR$ 、 $-NHC(O)R$  或  $-NHSO_2R$ ； $R$  是氢、 $C_{1-7}$  烷基、被卤素取代的  $C_{1-7}$  烷基、杂芳基、 $-(CH_2)_nO-C_{1-7}$  烷基、 $-NH-C_{1-7}$  烷基； $R_2$  是卤素、氢、 $-C(O)O(C_{1-4})$  烷基、 $C(O)NHCH_2CCH$ 、 $C(O)NHCH_2CH_2$ 、 $SO_2CH_2CH_3$ 、 $C_{1-7}$  烷基、被卤素取代的  $C_{1-7}$  烷基、氰基、 $C_{3-6}$  环烷基； $n$  是 0、1、2 或 3。

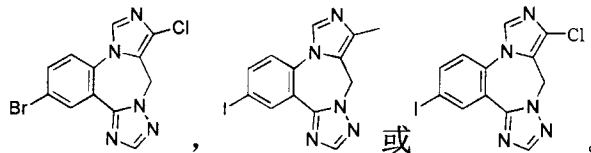
在另一优选例中，所述的  $\alpha 5\text{-GABA}_A$  受体的反向激动剂为下列化合物或其药学上可接受的盐，该化合物为：



15



另一优选例中，所述的  $\alpha 5\text{-GABA}_A$  受体的反向激动剂更优选为下列化合物或其药学上可接受的盐，该化合物为：



20 在另一优选例中，所述的  $\alpha 5\text{-GABA}_A$  受体受体的反向激动剂是结合外周神经表达的  $\alpha 5\text{-GABA}_A$  受体但不能有效与中枢表达的  $\alpha 5\text{-GABA}_A$  受体受体相结合。

在另一优选例中，所述的疼痛是外周神经相关的慢性痛。

在另一优选例中，所述的慢性痛是神经源性痛、炎性痛和癌症痛。

25 在另一优选例中，所述的疼痛病包括(但不限于)：头痛、面部痛、颈痛、肩痛、背痛、胸痛、腹痛、背部痛、腰痛、下肢痛、肌肉与骨骼疼痛、躯体疼痛、血管疼痛、

痛风、关节炎疼痛、与躯体病样精神障碍有关的疼痛、内脏疼痛、感染性疾病(如 AIDS 和带状疱疹后神经痛)导致的疼痛、多骨疼痛、镰刀细胞贫血、自身免疫性疾病、多发性硬化或炎症有关的疼痛、急慢性炎症疼痛、癌性疼痛、神经源性痛、损伤或手术引起的疼痛、癌性痛、伤害感受性疼痛、糖尿病、外周神经病、疱疹后神经痛, 三叉神经痛、腰部或子宫颈神经根病、舌咽神经痛、自主神经反射性疼痛、反射性交感神经营养不良、神经根撕脱、癌症、化学损伤、毒素、营养缺乏、病毒或细菌感染、退行性骨关节病, 或它们的联合形式。

在本发明的另一方面, 提供一种筛选预防、改善或治疗疼痛的药物的方法, 所述方法包括:

10 (1) 提供一包含  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的体系, 所述的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体具有完整的 GABA<sub>A</sub> 受体功能;

(2) 将候选物质给予步骤(1)的体系, 观察候选物质与  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的结合情况; 若候选物质能够与  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 结合, 则该候选物质是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。

15 在一个优选例中, 所述的与  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体结合为: 选择性结合于苯二氮卓结合位点。

在另一优选例中, 所述的候选物质不能有效与中枢表达的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体相结合。

在另一优选例中, 所述的候选物质是少量穿过或不穿过动物体血脑屏障的物质, 在动物体内组织分布中, 候选化合物在大脑组织分布低于在血浆组织分布的 50%。

20 在另一优选例中, 所述的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 由 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基、 $\beta$  亚基(如  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ )、 $\gamma$  亚基(如  $\gamma 1$ 、 $\gamma 3$ )组成。

在另一优选例中, 所述的步骤(2)中, 包括观察候选物质抑制(如抑制 20%以上, 更佳地抑制 40%以上, 更佳地抑制 50%以上) GABA 通过 GABA<sub>A</sub> 受体诱导的电流的情况; 若候选物质能够抑制 GABA 通过 GABA<sub>A</sub> 受体诱导的电流, 则该候选物质是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。

25 在另一优选例中, 步骤(1)中, 还包括设置对照组的步骤, 所述的对照组选自: 包含(如表达)含  $\alpha 1$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的体系、包含(如表达)含  $\alpha 2$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的体系和/或包含(如表达)含  $\alpha 3$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的体系, 对照组 GABA<sub>A</sub> 受体具有完整的 GABA<sub>A</sub> 受体功能; 且, 步骤(2)中, 所述方法包括: 在包含(如表达)  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的体系中, 检测候选物质与  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的结合情况, 并与对照组比较, 若候选物质与  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的结合抑制常数  $K_i$  (nM) (为表征拮抗剂与受体结合能力的物理常数, 越小表明结合能力越强) 在统计学上小于(如小 20%以上, 更佳地小 40%以上, 更佳地小 60%以上, 更佳地小 80%以上) 其与含  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的结合抑制常数  $K_i$ , 就表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。

35 在另一优选例中, 所述的候选物质不能有效抑制  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的配体在中枢的结合(如可通过同位素标记方法鉴定这种结合)。在给予实验动物一定剂量的候选物质和已



知的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的特异配体, 该特异配体可以被标记(如同位素标记), 然后检测该候选物质是否抑制已知的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体特异配体在中枢的分布, 如果候选物质抑制已知的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的特异配体在中枢的分布小于 60%, 就表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。

5 在另一优选例中, 所述的候选物质不能有效穿过血脑屏障, 候选物质在大脑和血浆中的分布比例小于 50%, 就表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。

在另一优选例中, 步骤(1)中, 还包括设置对照组的步骤, 所述的对照组选自: 包含 (如表达) 含  $\alpha 1$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的体系、包含 (如表达) 含  $\alpha 2$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的体系和/或包含 (如表达) 含  $\alpha 3$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的体系, 对照组 GABA<sub>A</sub> 受体具有完整的 GABA<sub>A</sub> 受体功能; 且, 步骤(2)中, 所述方法包括: 通过电生理方法检测候选物质对 GABA 通过 GABA<sub>A</sub> 受体诱导电流的抑制, 如果待测物质能够显著抑制 (如抑制 20%以上, 更佳地抑制 40%以上, 更佳地抑制 50%以上)  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体介导的电流, 但同时不能显著抑制含  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  的 GABA<sub>A</sub> 受体诱导的电流, 就表明该候选物质是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。

15 在另一优选例中, 所述的候选物质包括 (但不限于): 小分子化合物(如  $\gamma$ -氨基丁酸 A 的反向激动剂)、多肽、配体。

在另一优选例中, 所述的体系选自: 细胞体系 (或细胞培养物体系) (如背根神经节细胞)、亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系。

作为本发明的优选方式, 所述的方法还包括: 对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验, 以进一步选择和确定对于预防、改善或治疗疼痛真正有用的物质。

在本发明的另一方面, 提供一种预防、改善或治疗疼痛的方法, 包括给予需要的患者安全有效量的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂或其药学上可接受的盐。

在一个优选例中, 所述的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂或其药学上可接受的盐可以口服、皮下注射、透皮贴剂、鼻内给药或用自动注射装置。

25 本发明的其它方面由于本文的公开内容, 对本领域的技术人员而言是显而易见的。

### 附图说明

图 1、在部分神经损伤 (Spared Nerve Injury, SNI) 条件下, GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基蛋白在背根神经节中表达升高。

30 A、通过免疫组织化学实验测定 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基蛋白的表达情况。

B、通过免疫印迹实验测定 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基的蛋白水平。

图 2、在完全福氏佐剂诱导(CFA)的炎性痛模型条件下, GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基蛋白在背根神经节中表达升高。

35 A、通过免疫组织化学实验测定 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基蛋白的表达情况。

B、通过免疫印迹实验测定 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基的蛋白水平。

图 3、背根神经节中的 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基蛋白可以转运到坐骨神经。

A、通过免疫组织化学实验测定 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基蛋白的表达情况。

5 B、通过免疫印迹实验测定 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基蛋白在坐骨神经、背根神经节胞体、背根神经和脊髓背角中的蛋白水平。

图 4、SNI 诱导的疼痛模型中，给予 MRK016 或者 MRK016-M3 有效地抑制神经源性痛。

10 A、SNI 模型 7 天后，皮下注射 MRK016 后不同时间的机械疼痛阈值。

B、剂量依赖试验测定 MRK016-M3 抑制神经源性痛的效果。

C、加巴喷丁治疗神经源性痛的有效性以及有效剂量分析。

D、将 SNI 建立 10 天的大鼠作为实验动物，给大鼠脚掌注射 MRK016-M3，抑制神经源性痛的有效性分析。

15 E、鞘内注射针对 GABA<sub>A</sub>  $\alpha 5$  亚基 mRNA 的 siRNA，检测敲除实施后  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体在背根神经节中的表达情况。

F、鞘内注射特异针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基 mRNA 的 siRNA 可以明显提高疼痛的阈值，对照 siRNA 没有显著地镇痛效果。

20 G、鞘内注射特异针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基 mRNA 的 siRNA 的条件下，MRK016-M3 不能明显提高疼痛的阈值；而注射对照 siRNA 的情况下，MRK016-M3 能明显提高疼痛的阈值。

图 5、CFA 诱导的炎性痛模型中，给予 MRK016 或者 MRK016-M3 可以抑制大鼠的疼痛反应。

25 A、首先检测大鼠的热痛阈值和机械疼痛阈值，然后当天注射针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基 mRNA 的 siRNA 或对照 siRNA，第 2 天给大鼠右脚掌注射 100 微升的 CFA，然后每天检测大鼠的热痛阈值。

30 B、首先检测大鼠的热痛阈值和机械疼痛阈值，然后当天注射针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基 mRNA 的 siRNA，第 2 天给大鼠右脚掌注射 100 微升的 CFA，然后每天检测大鼠的机械痛阈值。

C、在炎性痛模型 7 天的时候，腹腔注射 MRK016(2 mg/kg 体重)，发现该化合物能有效地抑制机械疼痛。

D、在炎性痛模型 3 天的时候，腹腔注射 MRK016 (2 mg/kg 体重)，发现该化合物能有效地抑制热痛。

35 E、在炎性痛模型建立 3 天检测检测热痛，结果显示 MRK016-M3 打药后 1 小时明

显抑制疼痛。

F、在炎性痛模型建立 7 天检测机械痛，结果显示 MRK016-M3 打药后 1 小时明显抑制疼痛。

5 图 6、 $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的配体 A5I 治疗神经源性痛和炎性痛。

A、检测  $\alpha 5$ IA 在 SNI 模型中的镇痛作用。 $\alpha 5$ IA (3 mg/kg 体重) 可以显著抑制神经源性痛，吗啡 (10 mg/kg 体重) 作为阳性对照。

B、连续注射  $\alpha 5$ IA 不会产生耐受反应。在 SNI 模型建立 14 天，连续给药 6 天，分别在给药 1-3 小时后检测疼痛阈值。

10 C、在炎性痛模型建立 3 天后，腹腔注射 A5I (3 mg/kg 体重) 也可以有效地治疗热痛。

D、在炎性痛模型建立 7 天后，腹腔注射 A5I (3 mg/kg 体重) 也可以有效地治疗机械痛。

图 7、 $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的不同配体 (C2、C3 和 C4) 治疗神经源性痛和炎性痛。

15 A、不同配体 (C2、C3 和 C4) 的化学结构式。

B、建立 SNI 模型 14 天后，皮下分别注射 C2、C3 或 C4，在 1 小时后分别检测该系列药物的镇痛效果，该系列药物都可以有效治疗疼痛。

C、在炎性痛模型建立 7 天后，皮下分别注射 C2、C3 或 C4，在 1 小时后分别检测该系列药物的对机械痛的镇痛效果，该系列药物都可以有效治疗疼痛。

20 D、在炎性痛模型建立后 3 天，皮下分别注射 C2、C3 或 C4，在 1 小时后检测该系列药物对热痛的镇痛效果，该系列药物都可以有效治疗疼痛。

图 8、 $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的不同配体 (C5、C6、C7 或 C8) 治疗神经源性痛和炎性痛。

A、不同配体 (C5、C6、C7 和 C8) 的化学结构式。

25 B、建立 SNI 模型 14 天后，皮下分别注射 C5、C6、C7 或 C8，在 1 小时后检测该系列药物的镇痛效果，该系列药物都可以有效治疗神经源性痛。

C、在炎性痛模型建立 7 天后，皮下注射 C5、C6、C7 或 C8，在 1 小时后检测该系列药物的对机械痛的镇痛效果，该系列药物都可以有效治疗疼痛。

30 D、在炎性痛模型建立后 3 天后，皮下注射化合物 C5、C6、C7 或 C8，在 1 小时后检测该系列药物对热痛的镇痛效果，该系列药物都可以有效治疗疼痛。

E、建立 SNI 模型 14 天后，以 1 mg/kg 或 3 mg/kg 剂量分别皮下注射 C5 后，在不同时间点检测化合物 C5 的镇痛效果，都可以有效治疗疼痛。吗啡作为阳性对照，以 10 mg/kg 体重的剂量皮下注射。

35 F、化合物 C5 对戊四氮诱导的癫痫并没有作用。在该试验中，首先皮下注射不同剂量的化合物 C5，剂量分别为 1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 和 15 mg/kg。在 0.5 小时后，

分别注射戊四氮 100 mg/kg, 试验结果证明不同剂量的化合物 C5 对戊四氮诱导的惊厥发作反应级数和潜伏时间上没有影响。

### 具体实施方式

5 本发明人经过深入的研究, 首次揭示了一种新的治疗疼痛的方法, 用针对外周神经  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂治疗疼痛。

本发明披露 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基蛋白主要转运到外周的神经丛或坐骨神经, 而在 SNI 模型和 CFA 诱导的炎性痛模型条件下该基因蛋白表达升高。本发明人假设: 那些少量穿过或不穿过血脑屏障的 GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂, 就可以结合外周神经的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体, 抑制神经源性痛和炎性痛。考虑到 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基的主要在神经系统表达, 此类化合物在理论上就是没有副作用或者副作用较小的镇痛药物。

### 术语

15 如本文所用, “(包)含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体”、“ $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体”、“(包)含  $\alpha 5$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体”可互换使用。

如本文所用, “ $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体”与“GABA<sub>A</sub> 受体”可互换使用。

如本文所用, “(针对)包含  $\alpha 5$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的配体”定义为能够结合于包  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的化合物, 该化合物可以调节疼痛反应。

20 如本文所用, “(针对)包含  $\alpha 5$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂”是指能够结合于  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的化合物, 并且该化合物能够抑制 GABA 对  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的作用。

如本文所用, “治疗”也包括预防性给药, 一旦所述病症建立后缓解或消除所述病症。

如本文所用, “患者”定义为任何温血动物, 例如不限于小鼠、豚鼠、狗、马或人, 所述患者最好是人。

25 如本文所用, “急性痛”定义为由皮肤、身体结构或内脏的损伤和/或疾病发生的有害刺激而引起的疼痛, 或由不产生实际组织损害的肌肉或内脏的异常功能而引起的疼痛。

30 如本文所用, “慢性痛”定义为持续超出急性疾病通常的病程或损伤治愈的合理时间, 或与引起持续疼痛的慢性病理过程有关, 或疼痛以一定间隔复发数月或数年, 如果在应该已经达到治愈后或超过通常的治疗过程后仍存在疼痛, 则认为是慢性痛。在疼痛需要经过的时间长度取决于疼痛的性质和与疼痛有关的治疗过程, 如果疼痛超过通常的治疗过程, 则疼痛是慢性的。慢性痛包括但不限于头痛、面部痛、颈痛、肩痛、胸痛、腹痛、背部痛、腰痛、下肢痛、肌与骨骼疼痛、与躯体病样精神障碍有关的疼痛、内脏痛、疼痛性糖尿病性神经病、血管疼痛、痛风、关节炎性痛、癌症疼痛、自主神经反射性疼痛、感染性疾病(如艾滋病和带状疱疹)导致的疼痛、自身免疫性疾病(风湿)导致的疼

痛、急慢性炎症导致的疼痛、手术后疼痛和烧伤后疼痛。

本发明揭示的药物能有效地治疗如上定义的慢性痛，而且本发明揭示的药物可用于治疗伴随其他病症的痛敏，包括痛觉过敏、异常性疼痛、痛觉增强和疼痛记忆增强，该发明将改善对其疼痛的治疗。

5 如本文所用，“头痛”可分为原发性头痛和继发性头痛，原发性头痛包括紧张性头痛、偏头痛和丛集性头痛，而继发性头痛是由于其他疾病引起的。头面部的痛敏感组织发生病变或受到刺激时，可引起各种头痛，这些痛敏感组织包括分布于头皮、面部、口腔及咽喉等，由于它们主要是头部的肌肉或血管，含有丰富的神经纤维，对疼痛比较敏感，所以当这些组织受到伤害时可引起头痛。

10 如本文所用，“面部痛”包括但不限于三叉神经痛、非典型面痛、面神经麻痹和面肌痉挛。

如本文所用，“三叉神经痛”是一种独特的慢性痛性疾病，又称痛性抽搐，是指在三叉神经分布区域出现短暂的、阵发性的和反复发作的电击样剧烈性疼痛，或伴有同侧面肌痉挛。三叉神经痛分为原发性和继发性两种类型，原发性三叉神经痛是指临床上未发现神经系统体征，检查未发现器质性病变；继发性三叉神经痛是指在临床上有神经系统体征，检查发现有器质性病变，如肿瘤和炎症等。

15 如本文所用，“非典型面痛”是指由多种病因引起的疼痛。表现为持续性烧灼样疼痛、无间歇性、与特殊的动作或触发刺激无关，疼痛多为双侧、疼痛常常超出三叉神经的分布范围甚至累及颈部皮肤。病因可由鼻窦炎、恶性肿瘤、颌及颅底感染等原因刺激或损伤三叉神经而引起疼痛。

20 如本文所用，“颈痛、背痛、肩痛”是指由于急慢性肌肉劳损及骨关节的退行性变和外伤等导致的疼痛。引起颈、肩及上肢疼痛的常见疾病有颈肩肌筋膜炎、项韧带炎、颈椎病、肩周炎、胸廓出口综合症、肱骨外上髁炎等，或由自身免疫性疾病引起的疼痛常见于类风湿性关节炎、强直性脊柱炎和风湿性关节炎等疾病，其他可能引起颈痛、背痛、肩痛的疾病还有颈、肩部的肿瘤、神经炎、动静脉疾病和各种感染以及胸、腹腔脏器病变引起的牵涉痛等。

如本文所用，“胸、腹及背部痛”指由于胸腹部内脏、胸腹壁组织的疾病导致的疼痛，包括但不限于肋间神经痛、肋间软骨炎、心绞痛、腹痛(急性腹部内脏痛)和腰背部肌筋膜综合征。

30 如本文所用，“腰、下肢痛”是指下腰、腰骶、骶髂、髌、臀及下肢痛。腰和下肢痛往往并不是独立的疾病，而是多种疾病的共有特征，临床表现多样，病因十分复杂，以退行性和损伤为多，包括但不限于腰椎间盘突出、急性腰扭伤、坐骨神经痛、骨质疏松症、第三腰椎横突综合症、梨状肌综合症、膝关节骨性关节炎、尾痛症和足根痛等涉及的疼痛。

35 如本文所用，“肌与骨骼疼痛”包括但不限于肌筋膜疼痛、创伤引发的疼痛和慢性

区域性疼痛综合症。

如本文所用，“疼痛性糖尿病”是指糖尿病并发的神经损伤而引起的疼痛，糖尿病中的神经损伤至少部分是由于血流减少和高血糖引起的。某些糖尿病患者不发生神经病变，而其他患者早期就发生该疾病，糖尿病性神经病痛可以分为涉及一个或者多个病灶部位的单神经病和全身性多神经病，所述多神经病可以是扩散和对称的，通常主要涉及感觉方式(Merrit's Textbook of Neurology, 第9版)。糖尿病性神经病的表现可以包括植物神经功能障碍，导致包括心脏、平滑肌和腺体在内的调节障碍，引起低血压、腹泻、便秘和性无能。糖尿病神经病往往分阶段发展，早期在神经末梢区，植物神经病或感觉神经病的时发生在足部，脑神经病时发生在面部和眼周围，出现间歇性疼痛和麻刺感，在随后的阶段中，疼痛更强和经常发生，最后当某一区域痛觉丧失时，发生为无痛性神经病，由于没有疼痛作为损伤的指示，大大增加了发生严重组织损伤的风险。

如本文所用，“内脏疼痛”包括但不限于刺激性肠综合征(IRS)，伴有或不伴有慢性疲劳综合征(CFS)、炎性肠病(IRD)和间质性膀胱炎的疼痛。

如本文所用，“血管疼痛”是由以下一种或多种因素产生的疼痛。第一，组织的灌注不当。引起暂时或连续的局部缺血，诸如在运动期间发生肢体肌肉中的局部缺血。第二，迟发性变化。例如在皮肤或腹部内脏中的溃疡或坏疽。第三，大血管口径的突然或加速变化。例如动脉瘤发生的变化。第四，主动脉破裂。结果是血液溢出，刺激腹膜或胸膜壁层中的伤害感受纤维。第五，由于动脉内注射严重刺激动脉内皮而引起的强痉挛。第六，静脉血回流的损害，结果是迅速扩张筋膜隔室的大量水肿(Bonica's Management of Pain, 第一卷(第二版))。实例包括但不限于闭塞性动脉硬化、闭塞性血栓脉管炎、急性动脉闭合、栓塞、先天性动静脉瘤、血管痉挛性疾病、Rayaud病、手足发绀、急性静脉闭合、血栓静脉炎、静脉曲张和淋巴水肿。

如本文所用，“癌性痛”是指恶性肿瘤在其发展过程中出现的疼痛，癌性痛发生目前认为有三种机制，即：癌症发展直接造成的疼痛、癌症治疗后造成的疼痛和癌症患者并发疼痛性疾病。

如本文所用，“自主神经反射性疼痛”是指由“反射性交感神经萎缩征”导致的疼痛。反射性交感神经萎缩征是指机体遭受急慢性损伤后，有剧烈的自发疼痛，对触觉和痛觉过敏，可伴有浮肿和血行障碍，随后可出现皮肤及肌肉骨骼的营养障碍和萎缩等状况。

如本文所用，“术后疼痛”是指机体对疾病本身和手术造成的组织损伤的一种复杂的生理反应，它表现为心理和行为上的一种不愉快的经历。

如本文所用，“关节炎性痛”包括但不限于骨关节炎、类风湿性关节炎、关节强直性脊椎炎、牛皮癣性关节炎、痛风、假痛风、传染性关节炎、腱炎、粘液囊炎、骨损害和关节软组织炎症等疾病导致的疼痛。

如本文所用，“带状疱疹后的神经痛”是指带状疱疹的皮疹愈合后，在原来皮疹区

的皮下长期存在的剧烈疼痛。

如本文所用，“伤害性痛”是由刺激伤害性感受器传入的组织损害过程引起的疼痛，或是由伤害性感受器延长的兴奋引起的疼痛。由伤害感受器延长的兴奋引起的疼痛可以是由于伤害感受器的持久有害刺激或其敏化或这两者共同引起，或它们可以由这些因素引起，并由其持久性、各种反射机制和其他因素而延长。

如本文所用，“痛觉”是指探测有害刺激的神经机制。痛觉涉及两个步骤：外周神经末梢传导伤害刺激和将这些信号传递至中枢神经系统。

本文所用的术语“烷基”指饱和的、直链或支链的脂族烃类基团。例如，烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基。所述的“烷基”较佳地为 C<sub>1-8</sub> 烷基；更佳地为 C<sub>1-6</sub> 烷基；更佳地为 C<sub>1-4</sub> 烷基。

本文所用的术语“烯基”指含有至少一个碳碳双键和至少 2 个碳原子(较佳地 2-6 个碳原子)的直链或支链烃基。所述的“烯基”较佳地为 C<sub>2-8</sub> 烯基；更佳地为 C<sub>2-6</sub> 烯基；更佳地为 C<sub>2-4</sub> 烯基。

本文所用的术语“炔基”指含有至少一个碳碳三键和至少 2 个碳原子(较佳地 2-8 个碳原子；更佳地为 2-6 个碳原子；更佳地为 2-4 个碳原子)的直链和支链烃基。

本文所用的术语“卤素”指 F、Cl、Br 或 I，特别是 F、Cl 或 Br。

本文所用的术语“烷氧基”指的是含氧的烷基，例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基等。较佳地其含有 2-8 个碳原子；更佳地为 2-6 个碳原子；更佳地为 2-4 个碳原子。

本文所用的术语“环烷基”指的是指具有 3 至 7 个碳原子的环烷基团，如环丙基、环戊基、环己基和环庚基等。

本文所用的术语“环烯基”的定义如“环烷基”，且含有至少一个不饱和的碳碳双键。

本文所用的术语“芳基”指芳族体系，可以是单环或原本稠合的或连接在一起的多芳环，从而使至少一部分稠合或连接的环形成共轭的芳系。芳基基团包括(但不限制于)：苯基、萘基。

本文所用的术语“杂环”指稳定的 4-7 元单环或稳定的多环杂环，该杂环可以是饱和的、部分不饱和的或不饱和的，且由碳原子和选自以下的 1-4 个杂原子构成：N、O 和 S 原子。N 和 S 原子可以被氧化。杂环还可包括任何多环，其中任一上述杂环可稠合于芳环。

本文所用的术语“杂芳基”是指杂环的芳基。

本文所用的术语“异构体”包括：构象异构体，光学异构体(如对映异构体和非对映异构体)，几何异构体(如顺反异构体)。

含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的反向激动剂及其用途

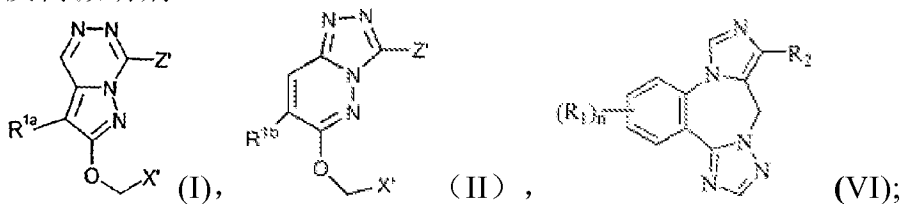
对  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂的研究已有十几年了, 陆续有新的化合物合成出来, 以往研究认为其可能治疗学习记忆 (认知) 相关的疾病。

5 本发明人深入研究后发现,  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂可以有效抑制疼痛。针对  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂是能够结合于  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的化合物, 该化合物可结合于  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的苯二氮卓结合位点, 该化合物可以为  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂。优选地是一些不能有效进入血脑屏障与中枢神经系统中的与  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体结合的化合物。

10 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基蛋白在背根神经节中表达, 并且主要转运到外周; 而 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基蛋白在 CFA 诱导的炎性痛模型和 SNI 模型中表达升高。通过基因敲除 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基蛋白在背根神经节中的表达, 可以明显抑制炎性痛和神经源性痛。并且, 给  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂可以明显抑制炎性痛和神经源性痛。

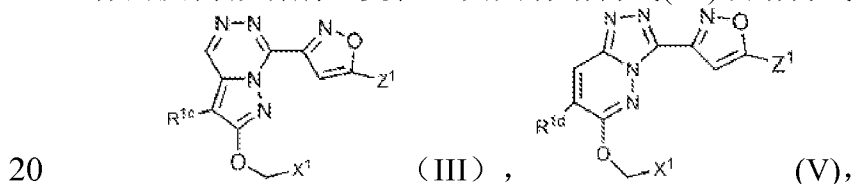
所述的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 的反向激动剂结合于  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的能力大于结合于仅包含  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的能力。

15 作为本发明的优选方式, 本发明提供了一种如结构式(I 和 II)所示的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂:



其中, 各基团的定义同前。

作为本发明的另一优选方式, 本发明提供了一种如结构式(II)所示的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂。更佳地其具有结构式(III)或结构式(IV)所示的结构。



其中, 各基团的定义同前。

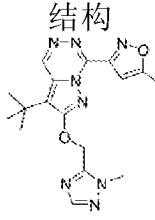
25  $\alpha 5$ -GABAA 受体的反向激动剂还包括在以下专利中提到的那些: WO 2011/107812 A2, WO 2010/112475 A1, WO 2010/104843 A2, WO 2010/002451 A1, WO 2010/127978 A1, WO 2010/127968 A1, WO 2010/097368 A1, WO 2010/125042 A1, WO 2010/028769 A1, WO 2010/094669 A1, WO 2010/127976 A1, WO 2010/127975 A1, WO 2009/000662 A1, WO 2009/071464 A1, WO 2009/071476 A1, WO 2009/071477 A1, WO 2008/154438 A1, WO 2008/154442 A1, WO 2008/154447 A1, WO 2007074089 A1, WO 2007/071598 A1, WO 2007/074078 A2, WO 2010/127974 A1, WO 2007/137954 A1, WO 2007/042420 A1, WO 2007/054444 A2, WO 2007/042421 A1, WO 2007/039389 A1, WO 2007/082806 A1, WO 2006/078891 A2, WO 2006/045430 A1, WO 2006/045429 A1, WO



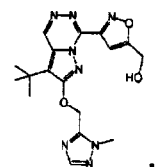
2006/040038-A1, WO 2006/063708 A1, WO 2005/080355 A1, WO 2005/084439 A1, WO  
 2005/108401 A1, WO 2004/041808 A1, WO 2004/014865 A1, WO 2004/014891 A1, WO  
 2004/074259 A1, WO 2004/039802, WO 2004/014865 A1, WO 2004/043930 A1, WO  
 2004/087137 A1, WO2004076452-A1, WO 2004/031174 A1, WO 2004031174 A1, WO  
 5 2004/107863 A1, WO2004065388-A1, WO 2003/093263 A1, WO 2003/086406 A1, WO  
 2003/093273 A1, WO 2003/087099 A1, WO 2003/048132 A1, WO 2003/066634 A1, WO  
 2003/008418 A1, WO 2003/097643 A1, WO 2003/044018 A1, WO 2003/006471, WO  
 2003/004018 A1, WO 2003/093272 A1, WO 2003/099816 A1, WO 2003/099817 A1, WO  
 2002/081474 A1, WO 2002/020480 A1, WO 2002/076987 A1, WO 2002/076983 A1, WO  
 10 2002/000623 A2, WO 2002/006285 A1, WO 2002/016363 A1, WO 2002/020492 A1, WO  
 2002/094834 A1, WO 2002/042305 A1, WO 2002/074773 A1, WO 2002/094834 A1, WO  
 2002/002557 A2, WO 2001/038331 A2, WO 2001/092257 A1, WO 2001/018001 A1, WO  
 2001/016103 A1, WO 2001/044250 A1, WO 2001/092258 A1, WO 2001/090108 A1, WO  
 2001/051492 A1, WO 2000/027849 A2, WO 2000/029412 A1, WO 2000/012505 A2, WO  
 15 2000/077008 A2, WO 2000/059905 A1, WO 1999/006400 A1, WO 1999/006399 A1, WO  
 1999/006401 A1, WO 1998/004560 A1, WO 1998/024435 A1, WO 1998/018792 A1, WO  
 1996/025948 A1, WO 1996/008494 A1, US 6511987, US 6297256, US 2004/0058970 A1,  
 US 7176203, US 2010/0216752 A1, US 2008/0064748 A1, US 2002/0103371 A1, US  
 2008/0064748 A1, US 6395905, US 2004/0235844 A1, US 2004/0006226 A1, EP 1451161  
 20 B1, US 2006/0040940 A1, US 2006/0058303 A1, AU 2003/276424, AU 2003/282222,  
 US 2006/0041125 A1, US 7148222, US 6395766, AU 2002/343110, US 6642229, US  
 2003/0176449 A1, US 2004/0110778 A1, US 2003/0220348 A1, US 2008/0167324 A1,  
 EP 1368342 B1, US 2010/652435 A, US2004006226-A1 US2010130481-A1,  
 25 US2008033061-A1 在本发明中“含  $\alpha 5$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂”包括但不限于以上  
 上专利所述的化合物。

其中在科学文献中明确报道, 具有显著反向激动剂效果的化合物如表 1。

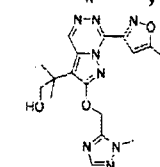
表 1

名称	合成方法文献或专利	结构
MRK-016	文献 (Chambers MS et al., An orally bioavailable, functionally selective inverse agonist at the benzodiazepine site of GABA <sub>A</sub> alpha5 receptors with cognition enhancing properties. J Med Chem. 2004 Nov 18; 47(24):5829-32.) 和专利 US 6355638 (Pyrazolo[1,5-d][1,2,4] triazines for enhancing cognition)。	

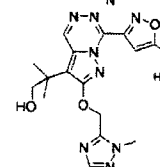
MRK-016-M3 Jones et al., Pharmacokinetics and metabolism studies on (3-*tert*-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1*H*-,2,4-triazol-5-ylmethoxy)



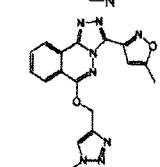
MRK-016-M2 pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazine, a functionally selective GABA<sub>A</sub> α5 inverse agonist for cognitive dysfunction. Bioorg Med Chem Lett. 2006 Feb 15;16(4):872-5.



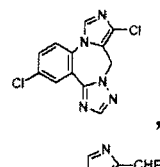
MRK-016-M4



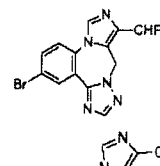
α 5IA 文献(Sternfeld F et al., Selective, orally active gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> alpha5 receptor inverse agonists as cognition enhancers. J Med Chem. 2004 Apr 22; 47(9):2176-9.)和专利 WO 9850385 A1.



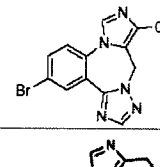
RO4938581 文献(Knust H et al., The discovery and unique pharmacological profile of RO4938581 and



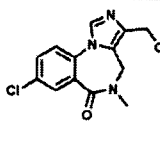
RO4882224 as potent and selective GABA<sub>A</sub> alpha5 inverse agonists for the treatment of cognitive dysfunction. Bioorg Med Chem letter. 2009 Oct



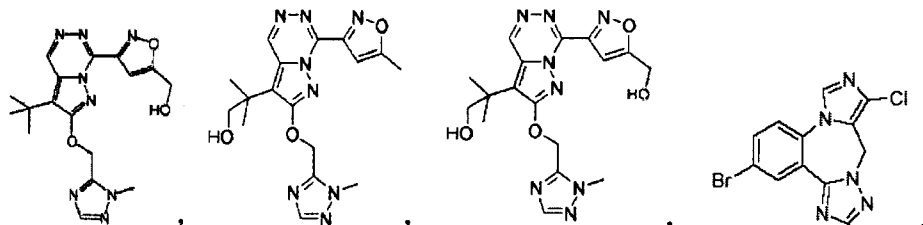
RO 15;19(20):5940-4)和美国专利(US 2006/0084642 A1, US 2007/0082890 A1 等)。



PWZ-029 Savić MM et al., PWZ-029, a compound with moderate inverse agonist functional selectivity at GABA<sub>A</sub> receptors containing alpha5 subunits, improves passive, but not active, avoidance learning in rats. Brain Res. 2008 May 7;1208:150-9.

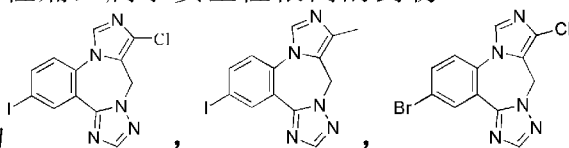


具有明显的反向激动效果，但不能有效穿过血脑屏障的药物有：



有文献报道 (Jones et al., Pharmacokinetics and metabolism studies on (3-*tert*-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1*H*-,2,4-triazol-5-ylmethoxy) pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazine, a functionally selective GABA<sub>A</sub> alpha5 inverse agonist for cognitive dysfunction. Bioorg Med Chem Lett. 2006 Feb 15;16(4):872-5.), MRK016 在体内可以代谢为 MRK016-M1、MRK016-M2、MRK016-M3 等多种结构。而 MRK016-M3 和

MRK016-M2 具有明显的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动效果，但却不能有效地结合大脑中的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体。这说明，不能有效进入血脑屏障的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂可以有效地治疗炎性痛和神经源性痛，属于安全性很高的药物。



5 本发明人还发现，化合物 Cc1nc(Cl)c2c(c1)nc3c2ncn3I，Cc1nc2c(c1)nc3c2ncn3I，Cc1nc(Cl)c2c(c1)nc3c2ncn3Br，可以有效地抑制炎性痛和神经源性痛，它们几乎不能穿过血脑屏障，不会直接影响中枢功能，属于中枢副作用小且可以有效治疗疼痛的药物。这些化合物作为本发明中优选的化合物。

本发明还包括上述所列举的各种化合物的异构体、外消旋体、药学上可接受的盐、水合物或前体。

10 所述的“药学上可接受的盐”是指上述化合物与无机酸、有机酸、碱金属或碱土金属等反应生成的盐。这些盐包括(但不限于)：(1)与如下无机酸形成的盐：如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、磷酸；(2)与如下有机酸形成的盐，如乙酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸、葡萄糖酸、安息香酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、草酸、丁二酸、酒石酸、马来酸、或精氨酸。其它的盐包括与碱金属或碱土金属(如钠、钾、钙或镁)形成的盐，铵盐或水溶性的胺盐(如 N-甲基葡萄糖胺盐)、低级的烷醇铵盐以及  
15 其它药学上可接受的胺盐(比如甲胺盐、乙胺盐、丙胺盐、二甲基胺盐、三甲基胺盐、二乙基胺盐、三乙基胺盐、叔丁基胺盐、乙二胺盐、羟乙胺盐、二羟乙胺盐、三羟乙胺盐，以及分别由吗啉、哌嗪、赖氨酸形成的胺盐)，或其它常规的“前体药物”的形式。化合物具有一个或多个不对称中心。所以，这些化合物可以作为外消旋的混合物、单独的对映异构体、单独的非对映异构体、非对映异构体混合物、顺式或反式异构体存在。

20 所述的“化合物的前体”指当用适当的方法服用后，该化合物的前体在病人体内进行代谢或化学反应而转变成结构式 I 的一种化合物，或化学结构式 I 的一个化合物所组成的盐或溶液。化合物的前体包括但不限于所述化合物的羧酸酯、碳酸酯、磷酸酯、硝酸酯、硫酸酯、砷酯、亚砷酯、氨基化合物、氨基甲酸盐、偶氮化合物、磷酰胺、葡萄糖苷、醚、乙缩醛等形式。

25 本发明的化合物的制备方法时本领域技术人员已知的。例如，文献 (Chambers MS et al., An orally bioavailable, functionally selective inverse agonist at the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> alpha5 receptors with cognition enhancing properties. J Med Chem. 2004 Nov 18; 47(24):5829-32.) 和专利 US 6355638 (Pyrazolo[1,5-d][1,2,4] triazines for enhancing cognition) 公开了 MRK-016 的化学合成方法。文献 (Jones P et al., Pharmacokinetics and  
30 metabolism studies on (3-tert-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-ylmethoxy) pyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazine, a functionally selective GABA<sub>A</sub> alpha5 inverse agonist for cognitive dysfunction. Bioorg Med Chem Lett. 2006 Feb 15;16(4):872-5.) 公开了 MRK016-M3 的化学合成方法。文献 (Sternfeld F et al., Selective, orally active gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> alpha5 receptor inverse agonists as

cognition enhancers. J Med Chem. 2004 Apr 22; 47(9):2176-9.)和专利 WO 9850385 A1 公开了  $\alpha$  5IA 的合成鉴定。文献(Atack JR et al., In vitro and in vivo properties of 3-tert-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-ylmethoxy)-pyrazolo[1,5-d]-[1,2,4]triazine (MRK-016), a GABA<sub>A</sub> receptor alpha5 subtype-selective inverse agonist. J Pharmacol Exp Ther. 2009 Nov;331(2):470-84.)公开了 MRK016、MRK016-M3、 $\alpha$ 5IA 均是结合于苯二氮卓结合位点选择性  $\alpha$ 5 的反向激动剂, MRK016 (MRK-016)及其主要代谢物(M1、M2、M3)与 GABA<sub>A</sub> 受体各亚型的结合亲和力(Affinity)和效力(Efficacy)如表 1 所示。

## 10 筛选方法

在得知了  $\alpha$ 5-GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂通过选择性地结合于  $\alpha$ 5-GABA<sub>A</sub> 受体, 发挥抑制疼痛的作用后, 可以基于该特征来筛选结合于  $\alpha$ 5-GABA<sub>A</sub> 受体的物质。之后, 可从所述的物质中找到对于抑制疼痛真正有用的药物。

因此, 本发明提供筛选预防、改善或治疗疼痛的药物的方法, 所述方法包括: (1) 提供  $\alpha$ 5-GABA<sub>A</sub> 受体的体系, 所述的  $\alpha$ 5-GABA<sub>A</sub> 受体具有完整的 GABA<sub>A</sub> 受体功能; (2) 将候选物质给予步骤(1)的体系, 观察候选物质与  $\alpha$ 5-GABA<sub>A</sub> 受体的结合情况; 若候选物质能够与  $\alpha$ 5-GABA<sub>A</sub> 受体受体结合, 则该候选物质是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。所述的包含 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha$ 5 亚基的体系例如可以是细胞 (如背根神经节细胞) 体系, 所述的细胞可以是内源性表达 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha$ 5 亚基的细胞; 或可以是重组表达 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha$ 5 亚基的细胞。所述的 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha$ 5 亚基的体系还可以是亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系 (如动物模型, 优选非人哺乳动物的动物模型, 如鼠、兔、羊、猴等) 等。

在本发明的优选方式中, 在进行筛选时, 为了更易于观察到包含 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha$ 5 亚基与候选物质结合情况的差异, 还可设置对照组, 所述的对照组可以是不添加所述候选物质的  $\alpha$ 5-GABA<sub>A</sub> 受体的体系。

所述的候选物质可以包括 (但不限于): 小分子化合物(GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂), 多肽, 配体。较佳地, 所述的候选物质是不穿过动物体血脑屏障的物质。

作为本发明的优选方式, 所述的方法还包括: 对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验, 以进一步选择和确定对于预防、改善或治疗疼痛真正有用的物质。

另一方面, 本发明还包括采用所述筛选方法获得的抑制疼痛的物质。

检测一个化合物是否与受体或受体的部分亚基结合是本领域已知的技术。检测一个化合物是否是针对  $\alpha$ 5-GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂或者拮抗剂, 这方面的研究工作已经做了很多, 例如在国际申请专利 WO 92/22652 和 WO 94/13799 中, 用 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha$ 5、 $\beta$ 3 和  $\gamma$ 2 组合来检测某一个化合物是否与该受体相结合; 在进行药物筛选的过程中, 通常用 Goeders 等(Goeders NE and Kuhar MJ, Benzodiazepine binding in vivo with [<sup>3</sup>H]Ro

15-1788. Life Sci, 1985 Jul, 37(4):345-355)所述的方法。检测一个能与  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体结合的配体是拮抗剂、激动剂还是反向激动剂,在这一方面的研究也很多,可以参照文献(Wafford K A, Whiting P J and Kemp J A, Differences in affinity and efficacy of benzodiazepine receptor ligands on recombinant GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. 1993 Feb, Mol. Pharmacol 43(2)40-244)所述的方法。而筛选药物是否进入血脑屏障的办法比较广泛,在文献 (Jones et al., Pharmacokinetics and metabolism studies on (3-tert-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-ylmethoxy)pyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazine, a functionally selective GABA<sub>A</sub> alpha5 inverse agonist for cognitive dysfunction. Bioorg Med Chem Lett. 2006 Feb 15;16(4):872-5)中报道可以检测候选化合物抑制(<sup>3</sup>H)Ro -15-1788 ( $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体标记的特异性反向激动剂)在大脑中的结合, MRK016 可以有效地抑制(<sup>3</sup>H)Ro-15-1788 在中枢的结合,而 MRK016-M3 却不能显著的抑制(<sup>3</sup>H)RO-15-1788 在中枢的结合。也可以通过检测药物在不同组织的方法检测,例如检测药物在大脑和血浆中的分布比例来确定药物是否可以有效进入血脑屏障。

## 15 治疗方法

本发明通过提供治疗疼痛的方法,满足安全和有效地治疗急性疼痛和慢性痛。按照本发明提供的治疗疼痛的方法,包括给予需要这种治疗的患者有效量的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂。

本发明特别适用于患有疼痛的老年患者、肝功能和肾功能不好的人群。对大多数老年人来说,慢性痛是常见的病症,而疼痛往往被认为是中老年人器官老化及病变的伴随症状。老年人疼痛主要包括来自骨关节系统的四肢关节、背部、颈部疼痛、头痛以及其他慢性病引起的疼痛,最常见的表现就是关节疼痛、僵硬及活动受限,医学上称之为退行性骨关节病。退行性骨关节病包括关节软骨退行性变和骨质增生(骨刺或骨赘),在 50 岁以上的人群中,发病率仅次于心脏病,在 65 岁以上的人群中发病率可达 60%~90%。骨关节炎是最常见的疼痛原因。60 岁以上的老年人中 80%以上有骨关节炎表现,如关节疼痛、活动时响、行走障碍和晨僵,严重时可有有关节红肿等。然而老年病人往往伴有其他慢性疾病,如高血压、糖尿病和心脏病等,为治疗相应的疾病,需要同时服用多种不同的药物,且老年人对药物耐受性低,易发生不良反应。

本发明提供了一种治疗疼痛的方法,更具体的说是治疗急性疼痛和慢性痛的方法。该方法是针对  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的配体作为药物治疗疼痛,这些药物可以口服、皮下注射、透皮贴剂、鼻内给药或用自动注射装置给药。在该方法中,用于治疗疼痛的配体是针对  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂,是特异性地针对  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体,不能有效穿过血脑屏障,但同时也可包括  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  的 GABA<sub>A</sub> 受体的拮抗剂或反向激动剂。在实施中,该配体也可为 GABA<sub>A</sub> 受体的拮抗剂。

35 在本发明中治疗疼痛的方法可以以口服和非肠道等多种给药剂型制备并给药。因

此，本发明所涉及的化合物可以通过注射给药，即静脉内、肌肉内、皮内、皮下、十二指肠内或腹腔内给药；本发明涉及的化合物还可以通过吸入给药，例如鼻内吸入；此外，本发明的化合物可以透皮给药。

## 5 组合物

本发明的化合物可以制备药物组合物，药用载体可以是固体或液体，固体制剂包括散剂、片剂、丸剂、胶囊、扁囊剂、栓剂和可分散颗粒剂，固体载体可以是一种或多种物质，它们可以作为稀释剂、矫味剂、黏合剂、防腐剂、片剂崩解剂或包囊材料。在散剂中，载体是微细分的固体，本发明的化合物与微细分的活性组份存在于混合物中。在片剂中，此化合物与所需的粘合载体以适当比例混合，并压制成所需的形状和大小。散剂和片剂中优先含有 5 至 70% 活性化合物，适宜的载体是碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡和可可脂等。同样，扁囊剂或锭剂、片剂、散剂、胶囊、丸剂、扁囊剂和锭剂可以是适合于口服给药的固体制剂型。

15 为了制备栓剂，现将低熔点蜡乳脂肪酸甘油酯或可可脂的混合物熔化，并通过搅拌将此活性化合物组份均匀地分散在其中，然后，将熔化的均匀混合物倒入大小合适的模中，让其冷却，并由此固化。溶液形式的制剂包括溶液、悬浮剂和乳剂，例如水或含水丙二醇溶液。对于非肠道注射液体制剂，可以在含水聚乙二醇溶液中制备。适于口服的含水溶液可以通过将活性组份溶解于水中，并按照需要加入适宜的着色剂、矫味剂、乳  
20 化剂和增稠剂制备。

适于口服的含水混悬剂可以通过将微细分的活性组份分散于含水粘性物质中制备，如天然或合成胶、树脂、甲基纤维素、羟甲基纤维素钠及其他熟知的混悬剂。

还包括在使用前短不久转变味口服给药的液体制剂的固体形式的制剂。这些液体形式包括溶液、混悬剂和乳剂，除活性组份外，这些制剂可含有着色剂、矫味剂、稳定剂、  
25 缓冲剂、合成或天然甜味剂、分散剂、增稠剂和助溶剂等。此药物制剂优先是单位剂型，在此剂型中，此制剂被再分为含适量活性组份的单位剂量，此单位剂量可以是包装的制剂，该包装含有一定量的制剂，如包装的片剂、胶囊和在小瓶或胶囊中的散剂。此单位剂型还可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身，或其可以存在包装形式中的适当数量的任何这些散剂。

30 单位剂量制剂中活性组份的量可根据具体的应用和活性组份的效力而变化，可调节自 0.01 mg 至约 0.1 g。例如，在医药用途中，该药物可以 0.1 至约 3 mg 的胶囊每天给药三次，必要时该组合物还可以含其他相容的治疗剂。

在治疗用途中，用于本发明的化合物以起始剂量每天 0.001 mg 至 10 mg/kg 体重。但是，这些剂量可以根据患者的需要、被治疗病症的严重性以及使用的化合物而变化，  
35 一般来说，开始以小于该化合物最佳剂量的较小剂量治疗，此后，小量增加此剂量达到

最佳效果，方便起见，如果需要可将总日剂量再细分为一天内分次给药。

本发明的药物组合物还可同时与其它治疗剂或辅剂联合使用，包括但不限于吗啡、加巴喷丁)等。

因此，本发明提供了一种用于治疼痛的药物，该药物不仅有效，而且没有明显的副作用，本发明的另一个目的是提供一种对于特殊病人群体，如老人、患有肝或肾功能衰退、或心脏血管性疾病的病人，具有高度安全性的药物。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 J.萨姆布鲁克等编著的《分子克隆实验指南》(科学出版社，2002 年)所述的条

件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

15

## I. 实验方法

### (1) 动物

雄性 SD 大鼠(200-250 g)，每 6 只一组放在笼子中，将所有动物放在 12 小时亮/循环(即每天包括 12 小时照明和 12 小时黑暗)，任意食用食物和水。所有试验均在观察者

20

对药物治疗不知情的情况下进行。

### (2) 动物模型

部分神经损伤模型 (SNI): 腹腔注射 10%水合氯醛，导致大鼠麻醉，于大鼠后肢上缘切开皮肤，纵行分离肌肉，暴露坐骨神经主干及其下的分支—胫神经、腓总神经和腓肠神经，结扎并剪断胫神经和腓总神经，保留细小的腓肠神经，同时避免任何损伤。将肌肉、皮肤逐层缝合，然后腹腔注射抗生素作抗菌预防，具体方法可以参考 (Decosterd I and Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. 2000 Aug; Pain 87(2):149-58.)。

25

完全福式佐剂 (CFA) 诱导的炎性痛模型: 用 10%的水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 ml/100 g 体重)后，双后足足趾和足掌皮下注射 CFA 200  $\mu$ l。CFA 液配制方法: 用美国 Sigma 公司售的 CFA 液(结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)的生理盐水: 油悬浮液)。

30

坐骨神经和背根神经结扎模型: 正常大鼠，注射 10%水合氯醛，导致大鼠麻醉，于大鼠后肢上缘切开皮肤，纵行分离肌肉，暴露坐骨神经主干用羊肠线结扎; 背根神经结扎，在臀背部剃毛后常规酒精消毒，在腰 3 和腰 4 椎骨处做纵向 2 cm 的切口，钝性分

35

离脊骨两侧肌肉组织，撑开器撑开肌肉和皮肤，使手术视野暴露足够大，用手术钳破坏腰3椎骨，暴露出腰5和腰6的背跟神经，用羊肠线结扎。24小时后，大鼠灌注，然后取材，分别取背根神经节、背根神经、脊髓背角和坐骨神经。

5 戊四氮诱导的癫痫试验：首先给大鼠注射 C5 或 70%PGE400，半小时后再向大鼠皮下注射 100 mg/kg 的戊四氮，戊四氮溶解在盐水中，然后观察大鼠的惊厥反应。惊厥评分采用 Fatholahi 分级法。0 级，无反应；1 级，节律性嘴和面部抽动；2 级，躯体波动样游走性痉挛；3 级，全身肌阵挛、臀部上翘；4 级，躯体向一侧翻转；5 级，仰翻位，全身强直痉挛发作。每次给药后观察 30 分钟。统计大鼠发作最大级数以及戊四氮注射到诱导最大反应级数潜伏时间。

10 大鼠胫骨癌疼痛模型，反映临床病人转移性癌痛模型。正常大鼠，注射 10%水合氯醛，导致大鼠麻醉，于大鼠后肢上缘切开皮肤，纵行分离肌肉，暴露出胫骨，在胫骨髓腔内注射同源大鼠的  $3 \times 10^3$  MRMT-1 乳腺癌细胞，在手术 14 天后，大鼠表现出明显痛敏反应。

### 15 (3) 免疫组织化学和免疫印迹实验

在免疫组化实验中，不同时间点手术模型大鼠用固定液灌注，后固定 1.5 小时，10%蔗糖浸泡 24 小时以上的组织在恒冷箱一切片机切 14  $\mu\text{m}$  的切片，置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存。切片与抗体(抗  $\alpha 5\text{-GABA}_A$  受体(Santa Cruz)山羊源性，有效稀释比 1: 100~200) 孵育过夜，然后用 0.01 M PBS 洗三遍，然后上二抗，孵育 40 分钟，然后用 0.01 M PBS 洗三遍，避光。最后，在显微镜下观察，拍片。免疫荧光强度用 Image-pro 定量分析免疫荧光强度。

20 在免疫印迹实验中，将取材的背根神经节用 RIPA(50 mM Tris(pH7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1%去氧胆酸钠(sodium deoxycholate), 0.1% SDS, 以及正钒酸钠(sodium orthovanadate), 氟化钠(sodium fluoride), EDTA, 亮抑酶肽(leupeptin)等多种抑制剂) 裂解， $100^\circ\text{C}$  煮 5 分钟使蛋白变性，待蛋白样品冷却后吸取 10-20  $\mu\text{l}$  样品加入到配制后的胶孔中。然后，先恒电压 60 伏电泳 30 分钟，待样品越过上下层胶边界时将电压调至 90 伏电压继续电泳直到溴酚蓝至下层胶的下边缘。电泳完毕后，割下含有目的条带的 SDS 胶，进行转膜操作，即通过电转，将带有负电荷的蛋白转移到带正电极的 PVDF 膜，在含 5%的脱脂奶粉的封闭液中封闭 1 小时以降低抗体的非特异结合。封闭结束后，将 PVDF 膜浸润在含一抗的封闭液中在  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜或在室温孵育 1-2 小时，结束后，将 PVDF 膜用 TBST 洗脱液清洗三次总共 1 小时，然后和带有辣根过氧化物酶的二抗在室温孵育 1 小时。二抗孵育结束后，又用 TBST 洗脱液清洗 1 小时，最后在避光条件下，将 PVDF 膜和辣根过氧化物酶底物 ECL-PLUS 反应 5 分钟，产生荧光信号，然后用 X 光胶片获取 PVDF 膜上的荧光信号。胶片经显影液和定影液定影。



#### (4) 疼痛检测方法

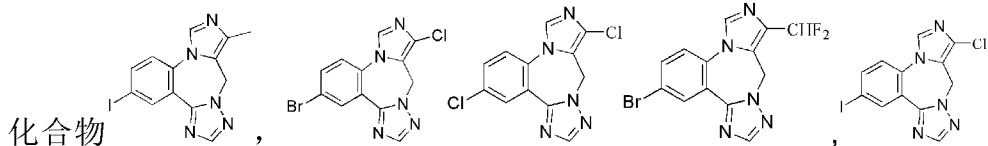
大鼠热痛敏定量检测法：在大鼠足底注射 CFA 液 24 小时开始，用热痛敏定量检测法测定大鼠对热辐射刺激的缩足反应。为了检测大鼠的热痛阈值，将大鼠置于具有透明玻璃板的有机玻璃盒中，用热辐射仪(BME-410C; CAMS) 刺激大鼠脚掌。热痛阈值为光源照到大鼠脚掌，到大鼠反射抬足反应的时间长度。

大鼠机械痛敏定量检测法：在大鼠足底注射 CFA 液 24 小时开始，用机械痛敏定量检测法测定大鼠对正常、无害机械刺激的缩足反应。可以参考文献 (Chaplan SR et al., Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods. 1994 Jul;53(1):55-63.) 所述的方法进行评估，在该方法中，用不同弯曲力(相当于 1-50 g 力的范围)的 von Frey 纤维施加无害机械刺激，将大鼠置于具有金属网底板的有机玻璃盒中，将 von Frey 纤维施加在所述后肢足底表面，与足底表面垂直用 von Frey 纤维施加足以引起略微抵抗所述后肢的力，在每只后肢足底保持 2-3 秒，如果所述后肢突然退缩，则记录阳性反应。可见常规给 10 次刺激，取引起 50%(5-6 次缩足/10 次刺激)缩足反射的重量均值作为阈值。CFA 炎症 5-7 天后再测机械痛敏的阈值，以确定这些动物是否表现了痛觉过敏。

#### (5) 药物溶解

MRK 016、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8 等化合物或  $\alpha 5IA$  (A5I) 溶解在 70%(PGE400:水=70: 30 的体积比例)的 PGE400 中，剂量为 MRK 016 2 mg/kg 或 A5I 3 mg/kg, C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8 化合物剂量 3 mg/kg 体重作为注射剂。

MRK016-M3 溶解在 10% (PGE400:水=10: 90 的体积比例) 的 PGE400 中，剂量分别为 10 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg 和 0.3 mg/kg，作为一种口服溶液。



25

溶解在 30% (PGE400:水=30: 70 的体积比例) 的 PGE400 中，剂量为 3 mg/kg，作为注射剂。

#### (6) $\alpha 5-GABA_A$ 基因敲除实验

按照 EX 500 所述的方法学，将 siRNA 配置成可注射溶液。然后将大鼠麻醉，然后将 siRNA 溶液从腰 5 或腰 6 的位置注射进入脊髓。siRNA 注射 3 天后，取腰 5 或腰 6 背根神经节，检测  $GABA_A$  受体的  $\alpha 5$  亚基的蛋白表达强度。

针对  $\alpha 5-GABA_A$  受体 mRNA 的 siRNA 序列为：5'GGUGCGAACAGACAUCUAUTT

3'。对照 siRNA 序列为：5'UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 3'。

(7) 数据统计

行为学数据统计方法为 unpaired t-test, \*, p<0.05, 代表显著性差异。

5 **II. 实施例**

**实施例 1、GABA<sub>A</sub>受体的 α5 亚基在 SNI 模型条件下表达升高**

在 SNI 模型中, 通过免疫组织化学实验和免疫印迹实验测定 GABA<sub>A</sub> 受体的 α5 亚基蛋白的表达情况, 结果如图 1 所示。

免疫组织化学实验显示, SNI 模型可以诱导 GABA<sub>A</sub> 受体的 α5 亚基蛋白表达升高。  
10 在免疫组织化学实验中, SNI 模型制备 14 天后 GABA<sub>A</sub> 受体的 α5 亚基蛋白表达升高, 对照为正常大鼠的背根神经节切片(正常), 如图 1A 所示。结果显示: GABA<sub>A</sub> 受体的 α5 亚基在背根神经节中细胞表达升高, 更有趣的是, 在小细胞中, GABA<sub>A</sub> 受体的 α5 亚基蛋白荧光信号强度升高尤为明显。

免疫印迹实验显示, 在 SNI 模型中, 随着时间的增加, GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基的蛋白  
15 总量明显升高, 如图 1B 所示。

**实施例 2、GABA<sub>A</sub>受体的 α5 亚基蛋白在炎性痛模型下表达升高**

在 CFA 诱导的炎性痛模型中, 通过免疫组织化学实验和免疫印迹实验测定 GABA<sub>A</sub> 受体的 α5 亚基蛋白的表达情况, 结果如图 2 所示。

20 免疫组织化学实验显示, 在注射 CFA 2 天后, 在背根神经节中, CFA 诱导的炎性痛模型可以促进 GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基蛋白表达升高, 如图 2A 所示。

免疫组织化学实验中, 发现 GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基蛋白在背根神经节中小细胞表达升高。统计显示 GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基在背根神经节中细胞表达比例升高。而免疫印记实验显示, GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基的蛋白量在炎性痛模型中明显增加(图 2B), 甘油醛-3-磷酸  
25 脱氢酶(GAPDH)作为阳性对照。

**实施例 3、GABA<sub>A</sub>受体的 α5 亚基蛋白在背根神经节中表达, 并且转运到坐骨神经**

在坐骨神经和背根神经结扎模型中, 观察 GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基蛋白量的情况, 结果如图 3 所示。

30 图 3A 显示, GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基蛋白可以转运到坐骨神经, 而几乎不转运到背根神经。CGRP(降钙素基因相关肽)作为一种可以沿坐骨神经和背根神经传输的多肽, 作为实验的阳性对照。免疫印迹结果表明坐骨神经、背根神经节胞体、背根神经束和脊髓背角中 GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基的蛋白量明显增加。

图 3B 显示, 坐骨神经中的 GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基蛋白量明显高于背根神经, 而在脊  
35 髓中 GABA<sub>A</sub> 受体 α5 亚基的蛋白量更少, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)作为阳性对照。

#### 实施例 4、 $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的特异反向激动剂可以有效地抑制神经源性痛

SNI 模型模拟了与神经损伤相关的神经源性痛，该损伤可以由外伤和压伤直接导致，或可以由一系列疾病而间接导致，其中所说的疾病如感染、癌症、代谢疾病、毒素、营养缺乏、免疫功能障碍以及肌骨骼改变 (musculoskeletal changes)。神经源性痛在当前临床是最难治疗的疼痛之一，严重影响了病人的生活质量。加巴喷丁是当前治疗神经源性痛的一线药物，然而加巴喷丁可以导致病人嗜睡、眩晕、行走不稳和疲劳感等副作用。

本发明人发现，化合物 MRK016 和它的代谢物 MRK016-M3 可以有效地抑制疼痛。在建立 SNI 模型 7 天后，皮下注射 MRK016 可以有效地抑制神经源性痛，结果显示在打药 1 小时后可以明显抑制疼痛，如图 4A 所示所示。

本发明人检测了 MRK016-M3 是否可以抑制神经源性痛。通过剂量依赖试验，发现 MRK016-M3 也可以有效地抑制神经源性痛，如图 4B 所示。在该实验中，本发明人用建立 SNI 模型 10 天到 20 天的大鼠作为实验动物，发现用 10 mg/kg、3 mg/kg 和 1 mg/kg 的剂量，在口服给药 1 小时后都能显著抑制机械疼痛阈值。

本发明人同时检测了加巴喷丁在治疗神经源性痛的效果，SNI 模型 11 天的大鼠作为实验动物，发现加巴喷丁可以有效地治疗神经源性痛，如图 4C 所示；但是 MRK016-M3 的用药剂量远远小于加巴喷丁的用药剂量，治疗疼痛的效果相似。

为了进一步确认 MRK016-M3 是通过外周神经起作用，本发明人将 SNI 模型建立 10 天的大鼠作为实验动物，局部给药，给大鼠脚掌注射 MRK016-M3(1 mg/ml)100 微升，结果发现同样可以明显抑制神经源性痛，如图 4D 所示。

为了证明该药物是通过  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体起作用，通过基因敲除实验检测了  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体在 SNI 模型中的作用。本发明人通过鞘内注射针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基 mRNA 的 siRNA，统计发现该方法可以明显地敲除 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基蛋白在背根神经节中的表达，如图 4E 所示。

通过免疫印迹实验，发现在注射特异 siRNA 后可以明显降低 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基蛋白在背根神经节中的表达，对照 siRNA 对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基蛋白无明显改变。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为阳性对照。在 SNI 模型中，发现鞘内注射特异针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基的 siRNA 可以明显提高疼痛的阈值，非特异 siRNA 对疼痛没有显著影响，如图 4F 所示。在该实验中，本发明人在 SNI 模型建立 7 天后，向大鼠脊髓注射针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基的 siRNA，然后在 SNI 模型 9 天、11 天、13 天、15 天和 17 天分别检测大鼠的疼痛阈值。为了检测进一步检测 MRK016-M3 是通过受体  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体抑制慢性痛，在建立 SNI 模型 4 天后，检测大鼠的疼痛阈值，然后注射对照 siRNA 和针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基的 siRNA，在 4 天后检测 MRK016-M3 对大鼠疼痛阈值的影响，本发明人的结果显示在注射对照 siRNA 的大鼠中，MRK016-M3(口服，3 mg/kg)可

以明显地抑制神经源性痛；而在注射针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基的特异 siRNA 的大鼠中，MRK016-M3(口服，3 mg/kg)则没有显著效果，如图 4G 所示。

根据上述机制，所属技术领域的人员可以理解：只要能够阻止 GABA 通过  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体发挥生物学功能的物质均为预防和治疗疼痛的潜在物质。

5 文献 ( Jones P et al., Pharmacokinetics and metabolism studies on (3-tert-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)- 2-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-ylmethoxy) pyrazolo [1,5-d] [1,2,4]triazine, a functionally selective GABA<sub>A</sub>  $\alpha 5$  inverse agonist for cognitive dysfunction. Bioorg Med Chem Lett. 2006 Feb 15;16(4):872-5.)报道，MRK016 和它的代谢物 MRK016-M3 具有类似的针对  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动效果，然而 MRK016 在大脑中富集，而 MRK016-M3 却很难进入大脑与  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体相结合。这提示 MRK016-M3 10 不能有效与中枢表达的  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体相结合，不会导致中枢系统的副作用，而可以有效地抑制疼痛反应，是一个潜在的临床镇痛药物。

同时该实验也同样证明：作用于外周神经  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂也可以治疗神经源性痛。上述结论说明：可以结合  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体但是不穿过血脑屏障的特异反向 15 激动剂可以有效地抑制神经源性痛，为筛选潜在镇痛临床药物提供了新的筛选方法。

#### 实施例 5、 $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂治疗炎性痛

炎性痛一般是由于组织或器官因病变发生炎症而导致的疼痛，存在有急性疼痛和慢性痛。在动物试验中，组织损伤性病理痛模型是与临床炎性痛相似的模型，其中 CFA 20 诱导的炎性痛模型反映了临床上慢性炎性痛的各项指标。在此模型中，注射 CFA 后 2-3 小时注射部位皮肤开始出现炎症反应，6-24 小时达到高峰，痛敏和水肿可以持续 1-2 周 (Ladarola et al., Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization.” Brain Res. 1988, vol.455, No.2, pp:205-12)，该模型炎性痛特点显著，持续时间长。本发明人发现，化合物 MRK016 和 25 它的代谢物 MRK016-M3 可以有效地抑制炎性痛。

脊髓注射针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基的 siRNA，抑制 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基在背根神经节表达，也可以有效地抑制炎性痛的发生，如图 5A 和 B 所示。在该实验中，本发明人首先检测大鼠的热痛阈值和机械疼痛阈值，然后当天注射针对 GABA<sub>A</sub> 受体  $\alpha 5$  亚基的 siRNA，第 2 天给大鼠右脚掌注射 100 微升的 CFA，然后每天检测大鼠的热痛和机械痛 30 阈值。结果显示，抑制 GABA<sub>A</sub> 受体的  $\alpha 5$  亚基在背根神经节表达可以明显抑制炎性痛。

根据上述结果，所属技术领域的人员可以理解，只要能够阻止 GABA 通过  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体发挥生物学功能的物质均为预防和治疗疼痛的潜在物质。

腹腔注射 MRK016(2 mg/kg 体重)能有效地抑制炎性痛。该实验中，在炎性痛模型 7 天的时候，是机械痛比较敏感的时期，本发明人腹腔注射 MRK016(2 mg/kg 体重)，发现 35 该化合物能有效地抑制机械疼痛(图 5C)；在炎性痛模型 3 天的时候，是热疼比较敏感的

时期，腹腔注射 MRK016(2 mg/kg 体重)，发现该化合物能有效地抑制热痛(图 5D)；实验结果发现 MRK016 可以在打药后 1 小时明显抑制炎性痛。

口服给药 MRK016-M3 也可以有效地抑制炎性痛，本发明人分别在炎性痛模型建立 3 天检测热痛和炎性痛模型 7 天检测机械痛，结果显示 MRK016-M3 打药后 1 小时明显抑制炎性痛，如图 5E 和 F 所示。

同时，该实验也同样证明：作用于外周神经  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂也可以治疗炎性痛。该实验说明：可以结合  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体但是不穿过血脑屏障的特异反向激动剂可以有效地抑制炎性痛，为筛选潜在镇痛临床药物提供了新的筛选方法。

## 10 实施例 6、 $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂 A5I 治疗神经源性痛和炎性痛

$\alpha 5$ IA (A5I) 是默沙东 (Merck) 公司开发的一个特异针对  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂。在临床 II 期实验中，发现该药物由于水溶性的问题，造成了一定的毒性问题。

在文献(Munro G et al., A question of blance-positive versus negative allosteric modulation of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes as drive of analgesi efficacy in rat model of inflammatory and neuropathic pain. Neuropharmacology. 2011 Jul-Aug;61(1-2):121-32.) 报道该化合物治疗疼痛没有效果。在这里本发明人检测了 A5I 在 SNI 和炎性痛模型中的镇痛作用。数据显示：腹腔注射 A5I (3 mg/kg 体重)可以有效地治疗神经源性痛，见图 6A 所示。在该实验中，SNI 模型建立 14 天后，皮下注射 A5I (3 mg/kg)，打药后 0.5 小时、1 小时、2 小时、3 小时和 24 小时，检测大鼠的疼痛阈值，结果证明该化合物可以有效抑制神经源性痛。

A5I 连续给药不会产生耐受。在该实验中，SNI 模型建立 14 天后，连续给药 6 天，分别在给药 1-3 小时后检测疼痛阈值，发现在连续给药 6 天后，仍然可以有效地治疗疼痛，见图 6B 所示。

在 CFA 诱导的炎性痛模型中，本发明人发现腹腔注射 A5I (3 mg/kg 体重)也可以有效地治疗炎性痛，如图 6C 和 D 所示。该实验中，在炎性痛模型建立 3 天，检测 A5I 对热痛的影响，打药后 0.5、1.0、2.0 和 3.0 小时检测疼痛阈值，而在炎性痛模型建立后 7 天，检测 A5I 对机械痛疼痛阈值的影响，打药后 0.5、1.0、2.0 和 24 小时检测机械疼痛阈值。

## 30 实施例 7、筛选药物

### (1) 细胞水平筛选

将 GABA<sub>A</sub> 受体的不同亚基表达在细胞系中，包括人肾上皮细胞系 293 细胞系或 L(tk-)细胞系中。将所述细胞培养于培养基中，将该种细胞作为用于筛选抑制疼痛的药物的细胞模型。一个  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基和  $\gamma$  亚基对形成一个完整的功能型 GABA<sub>A</sub> 受体是 35 必不可少的。

在该实施例中，本发明人建立了以下细胞模型：

(a) 用  $\alpha 5$  亚基(蛋白序列见 GenBank 登录号 NM\_001165037.1)、 $\beta 3$  亚基(蛋白序列见 GenBank 登录号 NM\_021912.4)和  $\gamma 2$  亚基(蛋白序列见 GenBank 登录号：NM\_198904.2)同时表达在 293 细胞系中，组成含  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体；

5 (b) 用  $\alpha 1$  亚基(GenBank 登录号：NM\_001127648.1)、 $\beta 3$  亚基和  $\gamma 2$  亚基同时表达在 293 细胞系中，组成含  $\alpha 1$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体；

(c) 用  $\alpha 2$  亚基(蛋白序列见 GenBank 登录号 NM\_000813.2)、 $\beta 3$  亚基和  $\gamma 2$  亚基同时表达在 293 细胞系中，组成包含  $\alpha 2$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体；

10 (d) 用  $\alpha 3$  亚基(蛋白序列见 GenBank 登录号 NM\_000808.3)、 $\beta 3$  亚基和  $\gamma 2$  亚基同时表达在 293 细胞系中，组成含  $\alpha 3$  亚基的 GABA<sub>A</sub> 受体。

上述(a)-(d)均能形成具有完整功能的 GABA<sub>A</sub> 受体。

然后提取细胞膜和检测蛋白浓度，分别检测待测物质与放射性标记化合物(例如 1 nM [<sup>3</sup>H]Ro-0151788) 的竞争结合，计算待测物质的 Ki 值。上述方法可参照文献 (Ballard TM et al., RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABA<sub>A</sub> alpha5 subunit-containing receptors. Psychopharmacology (Berl). 2009 Jan; 202(1-3): 207-23) 报道的方法。如果测试组中候选物质与  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的结合抑制常数 Ki (nM) 小于含其他  $\alpha$  亚基( $\alpha 1$  亚基、 $\alpha 2$  亚基或  $\alpha 3$  亚基) 受体的 Ki，就表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。所述技术领域人员了解许多方法可以用于评价含  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的配体结合于  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的能力，包括但不限于上述的方法。

20 本发明人通过电生理的方法检测待测物质的反向激动效率。该方法可参照文献 (Ballard TM et al., RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABA<sub>A</sub> alpha5 subunit-containing receptors. Psychopharmacology (Berl). 2009 Jan; 202 (1-3): 207-23)报道的方法。如果待测物质能够显著抑制 GABA 通过  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体诱导电流，但同时不能明显抑制 GABA 引起的含  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  的 GABA<sub>A</sub> 受体诱导的电流，就表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的在药物。所述技术领域人员了解许多方法可以用于评价  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的配体反向激动  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的效率,包括但不限于上述的方法。

30 通过对体外血脑屏障模型(blood-brain barrier model, BBBM)检测待测物质是否有效通过血脑屏障。在该实验中，将脑微血管内皮细胞 (Brain microvessel endothelial cell)和星形胶质细胞共同培养，然后检测待测物质是否可以有效穿过细胞膜，具体方法参考相关文献 (Culot M et al., An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. Toxicol In Vitro. 2008 Apr; 22(3):799-811.)。

35 采用 MRK016、MRK016-M3、 $\alpha 5$ IA 作为候选物质进行了测试，结果显示在表 2 中，MRK016、MRK016-M3 和  $\alpha 5$ IA 对各亚型 GABA<sub>A</sub> 受体的亲和力相似，但对  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动效率(Efficacy)远高于对含  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  的 GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动效率，从而它们对于抑制哺乳动物疼痛有用的物质。优选的，MRK016-M3 不能显著穿

过血脑屏障，理论上是一个无副作用的有效镇痛药物。

因此，如果测试组中候选物质与  $\gamma$ -氨基丁酸 A 的  $\alpha 5$  亚基的结合系数  $K_i$  (nM) 小于其他亚基( $\alpha 1$  亚基、 $\alpha 2$  亚基或  $\alpha 3$  亚基)，就表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。或者，如果待测物质能够显著抑制 GABA 引起的含  $\alpha 5$  亚基 GABA<sub>A</sub> 受体诱导的电流，但同时不能明显抑制 GABA 引起的含  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  的 GABA<sub>A</sub> 受体诱导的电流，就表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的在药物，或者兼而有之。以上均表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的在药物。

表 2

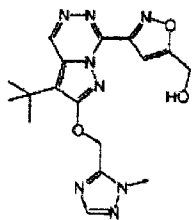
名称	指标	人重组 GABA A 亚型(包含的 $\alpha$ 亚基的类型)			
		$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 5$
MRK016	亲和力, nM	0.83	0.85	0.77	1.36
	反向激动效率, %	-16	6	-9	-55
MRK016-M2	亲和力, nM	26	N.D.	9.8	9.4
	反向激动效率, %	-41	-23	-32	-40
MRK016-M3	亲和力, nM	1.5	N.D.	0.69	1.1
	反向激动效率, %	-11	-1	-15	-52
$\alpha 5IA$	亲和力, nM	0.88	0.58	0.61	0.66
	反向激动效率, %	-4	12	4	-29

反向激动效率为候选物质对 GABA 通过  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体诱导的电流的抑制效率 = (候选物质对 GABA 通过  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的电流强度-缺少候选物质存在时 GABA 通过  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体诱导的电流强度)/缺少候选物质存在时 GABA 通过  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体诱导的电流强度。

## (2) 动物水平筛选

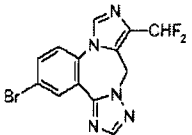
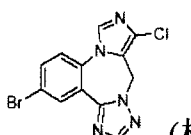
用候选物质皮下注射给予腹腔注射 (或通过口服) 动物，在处理适当时间，测定候选物质在动物体内的分布。可通过以下两种方法检测待测化合物与中枢  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的结合效率。

第一种方法，检测待测物质在动物体内的药物分布。在该方法中，通过检测待测物质是否可竞争或抑制同位素标记物质例如(<sup>3</sup>H)Ro-15-1788 在大脑海马组织中的结合，抑制效率不能超过 60%。实验动物在给予实验动物一定剂量的候选物质和(<sup>3</sup>H)Ro-15-1788，然后检测该候选物质是否抑制已知  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的特异配体在中枢的分布，如果候选物质抑制(<sup>3</sup>H)Ro-15-1788 在中枢的分布小于 60%，就表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。就表明该候选物是副作用较小治疗疼痛的潜在药物。结果发现，



(MRK016-M3), 不能有效抑制(<sup>3</sup>H)Ro-15-1788 在中枢的结合, 抑制效率为 12% 左右 (Jones P et al., Pharmacokinetics and metabolism studies on (3-tert-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-ylmethoxy) pyrazolo [1,5-d][1,2,4]triazine, a functionally selective GABA<sub>A</sub> alpha5 inverse agonist for cognitive dysfunction. Bioorg Med Chem Lett. 2006 Feb 15;16(4):872-5).

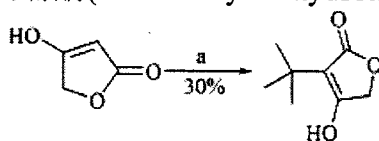
第二种方法, 检测待测化合物在动物内的组织分布。首先, 将待测物质注射(或口服)到动物体内, 然后在注射 0.25-2.0 小时后提取大脑组织和血浆组织, 用色谱-质谱联用(L-MS) 的方法检测药物的浓度, 如果化合物在大脑组织和血浆组织的比例 (brain/plasma ratio) 小于 0.5, 就表明该候选物是副作用较小且可以治疗疼痛的潜在药

10 物。结果发现,  (少量地跨血脑屏障),  (极少跨血脑屏障)这两个化合物在大脑组织和血浆组织的比例小于 0.5, 就表明该候选物是副作用较小且可以治疗疼痛的潜在药物。

15 实施例 8、制备(3-(3-叔丁基-2-((2-甲基-2-氢-1,2,4-三唑-3-基)甲基)吡唑并 [1,5-d][1,2,4] 三嗪-7-基) 异恶唑-5-基) 甲醇及其类似物

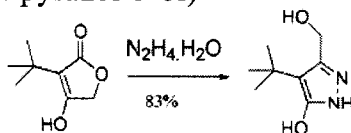
中间体 1: 4-叔丁基-3-甲酰-1 氢-吡唑-4-甲苯磺酸

(a) 3-叔丁基-4-羟基-2(5H)-呋喃酮(3-tert-butyl-4-hydroxyfuran-2(5H)-one)



20 将4-羟基-2(5H)-呋喃酮 (4.0 g, 40 mmol) 和2-甲基-2-丙醇 (3.0 g, 40 mmol) 在45℃ 搅拌15分钟, 然后将该混合液用浓硫酸在45℃快速处理一下, 然后将该溶液在45℃继续 搅拌48小时。然后将混合液用水(10 mL)稀释, 用乙醚萃取 (10 mL x 3), 有机层用硫酸 镁(MgSO<sub>4</sub>)干燥。蒸发溶剂并将该残余物在硅胶上进行层析, 用己烷: 乙酸乙酯= 20: 1 to 10: 1, 得到产物3-叔丁基-4-羟基-2(5H)-呋喃酮1.85克, 为一种白色固体。

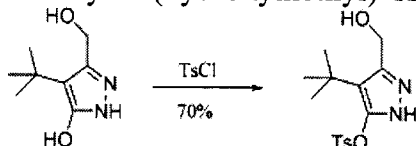
25 (b) 4-叔丁基-3-(羟基甲基)-1H-吡唑-5-醇 (4-tert-butyl-3-(hydroxymethyl)-1H-pyrazol-5-ol)





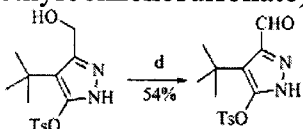
将 3-叔丁基-4-羟基-2(5H)-咪唑酮 (2.2 克, 14 mmol) 在常温下溶解于乙醇(22 mL) 中, 然后加入水合肼(4.1 g, 70 mmol), 在 78°C 的条件下搅拌 72 小时。将反应溶液蒸发, 然后用水(20 mL)冲洗, 然后用乙酸乙酯提取(20 mL x 3), 有机层用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 低压蒸发得到 2 克产物 (4-叔丁基-3-(羟甲基)-1 氢-吡唑-5-醇), 为一种白色固体。

- 5 (c) 4-叔丁基-3-(羟甲基)-1 氢-吡唑-4-甲苯磺酸  
(4-tert-butyl-3-(hydroxymethyl)-1H-pyrazol-5-yl 4-methylbenzenesulfonate)



- 10 将 4-叔丁基-3-(羟甲基)-1 氢-吡唑-5-醇 (2.0 克, 12 mmol) 在 DCM (40 mL) 在常温下搅拌, 然后加入对甲苯磺酰氯 (TsCl) (2.7 g, 14 mmol)。将三乙胺 Et<sub>3</sub>N (1.55 g, 2.12 mL) 逐滴加入。然后在常温下搅拌 20 小时。然后将混合液用卤水(20 mL)冲洗, 用 DCM 提取 (10 mL x 3), 有机层用硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>)干燥。将该残余物在硅胶上进行层析, 用 DCM : MeOH = 30:1, 得到产物 4-叔丁基-3-(羟甲基)-1 氢-吡唑-4-甲苯磺酸 2.7 克, 为黄色固体。

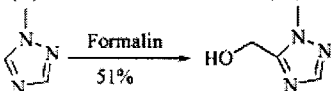
- 15 4-叔丁基-3-甲酰-1 氢-吡唑-4-甲苯磺酸 (4-tert-butyl-3-formyl-1H-pyrazol-5-yl 4-methylbenzenesulfonate)



- 20 将 4-叔丁基-3-(羟甲基)-1 氢-吡唑-4-甲苯磺酸(100 mg, 0.31 mmol) 在常温下溶解在 CHCl<sub>3</sub> (2 mL), 然后加入 MnO<sub>2</sub> (70 mg, 0.8 mmol)。将该溶液在 70°C 搅拌 48 小时。再加 MnO<sub>2</sub> (34 mg, 0.4 mmol)。然后在 70°C 搅拌 6 小时。冷却到室温, 将所述混合物过滤并蒸发滤液, 将该残余物在硅胶上进行层析, 用 DCM : MeOH = 50:1 洗脱, 得到产物 4-叔丁基-3-甲酰-1 氢-吡唑-4-甲苯磺酸 30 mg, 为黄色固体。

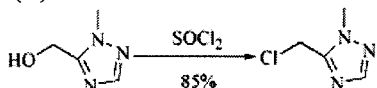
中间体 2: 5-氯甲基-1-甲基-1 氢-1,2,4-三唑

- (a) (2-甲基-2 氢-1,2,4-三唑-3-基) 甲醇[(2-methyl-2H-1,2,4-triazol-3-yl)methanol]



- 25 1-甲基-1 氢-1,2,4-三唑 (200 mg, 1.8 mmol) 和福尔马林(1 mL) 在 135°C 条件下在封闭容器中混匀过夜。冷却到室温, 负压蒸发滤液, 将该残余物在硅胶上进行层析, 用 DCM : MeOH = 20:1 洗脱, 得到产物 (2-甲基-2 氢-1,2,4-三唑-3-基) 甲醇 140 mg, 为白色固体。

- (b) 5-氯甲基-1-甲基-1 氢-1,2,4-三唑[5-(chloromethyl)-1-methyl-1H-1,2,4- triazole]

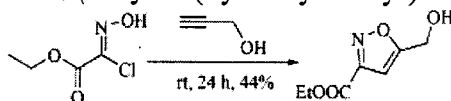


- 30 将 (2-甲基-2 氢-1,2,4-三唑-3-基) 甲醇(300 mg, 2.7 mmol) 加入到冰上放置的惰性气

体氩气条件下的亚硫酰氯  $\text{SOCl}_2$  (5 mL)。混合液在  $80^\circ\text{C}$  加热 1 小时。负压蒸发, 然后将残留物用叔丁基甲基醚 (TBME) 研磨并且过滤, 得到产物 5-氯甲基-1-甲基-1-氢-1,2,4-三唑 380 mg, 为白色固体。

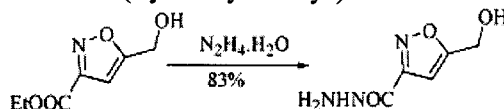
### 5 中间体3

(a) 5-羟甲基-异恶唑-3-羧酸乙酯 (ethyl 5-(hydroxymethyl) wasoxazole-3-carboxylate)



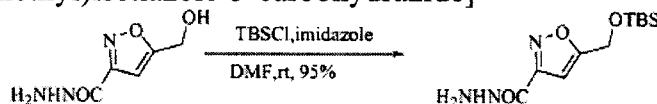
将氯代肟基乙酸乙酯 (8.0 g, 53 mmol) 溶于氯仿 (80 mL) 中, 然后在常温下加入丙炔醇 (9.0 g, 158 mmol)。15 分钟后, 加入三乙胺 (10.7 g, 105.6 mmol), 在  $45^\circ\text{C}$  条件下搅拌 48 小时。蒸发反应溶液, 将该残余物在硅胶上进行层析, 用 (Hexane : EtOAc = 3:1) 洗脱, 得到产物 5-羟甲基-异恶唑-3-羧酸乙酯 4g, 为白色油状物。

(b) 5-(羟甲基)异恶唑-3-碳酰肼 5-(hydroxymethyl)wasoxazole-3-carbohydrazide



将 5-羟甲基-异恶唑-3-羧酸乙酯 (4.3 g, 25 mmol) 溶于乙醇 (43 mL) 中, 然后在常温下加入水合肼 (3.7 g, 63 mmol)。在室温下搅拌 3 h。反应溶液过滤, 用乙醇 (10 mL) 清洗, 通过模式泵干燥, 得到产物 5-(羟甲基)异恶唑-3-碳酰肼 3.4 克, 产物为白色固体。

(c) 5-((叔丁基二甲基硅氧烷基)甲基)异恶唑-3-碳酰肼 [5-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)methyl]isoxazole-3-carbohydrazide]

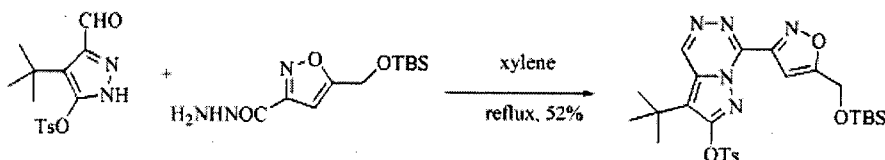


将 5-(羟甲基)异恶唑-3-碳酰肼 (550 mg, 3.5 mmol) 溶解在干燥 DMF (15 mL) 中, 然后加入咪唑 (380 mg, 5.6 mmol)。把 t-BuMe<sub>2</sub>SiCl (630 mg, 4.2 mmol) 溶解在 DMF 中, 在  $-10^\circ\text{C}$  条件下滴加到上述溶液。在室温条件下将反应溶液混匀过夜。反应分别用冷水和乙酸乙酯终止。水层用乙酸乙酯 (50 mL x 2) 萃取。这有机层用卤水清洗 (20 mL x 2), 然后用硫酸钠干燥, 过滤并蒸发得到 0.9 g 淡黄色固体, 5-((叔丁基二甲基硅氧烷基)甲基)异恶唑-3-碳酰肼。

### 合成步骤 1

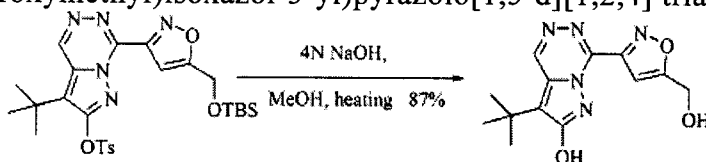
(a) 3-叔丁基-7-(5-((叔丁基二甲基硅氧烷基)甲基)异恶唑-3-基)吡唑并 [1,5-d][1,2,4] 三嗪-2-基-4-对甲苯磺酸 3-tert-butyl-7-(5-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)methyl)isoxazol-3-yl]pyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazin-2-yl 4-methylbenzenesulfonate

34



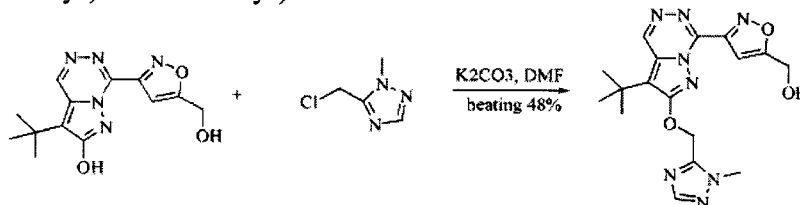
5- ( (叔丁基二甲基硅氧烷基) 甲基) 异恶唑-3-碳酰肼(850 mg, 3.1 mmol)和 4-叔丁基-3-甲酰-1 氢-吡唑-4-甲苯磺酸 (1.1 g, 2.8 mmol) 在二甲苯(20 mL)加热在氩气条件下回流 72 小时。蒸发得到残余物, 用热甲醇研磨残余物, 然后得到沉淀物, 固体过滤收集, 真空干燥得到 750 mg 目标中间体, 一种棕色固体。母液浓缩, 残留物用硅胶上进行层析, 用 DCM : MeOH = 200:1 洗脱, 得到较纯的中间产物, 为棕色泡沫状物质, 200 mg。 .

10 (b) 3-叔丁基-7- (5- (羟甲基) 异恶唑-3-基) 吡唑并[1,5-d][1,2,4] 三嗪-2-基  
3-tert-butyl-7-(5-(hydroxymethyl)isoxazol-3-yl)pyrazolo[1,5-d][1,2,4] triazin-2-ol



15 3-叔丁基-7- (5- ( (叔丁基二甲基硅氧烷基) 甲基) 异恶唑-3-基) 吡唑并[1,5-d][1,2,4] 三嗪-2-基-4-对甲苯磺酸化合物 (800 mg, 1.4 mmol) 溶解于甲醇(20 mL)中, 然后加入 4 N aq. NaOH (1 mL)。混合反应溶液氩气条件下在 60°C 条件下反应 2 小时, 冷却到室温。加入 2 N aq. HCl (2.5 mL)。将所述混合物过滤并蒸发滤液, 将该残余物在硅胶上进行层析, 用 DCM : MeOH = 20:1 洗脱, 得到产物。混合有机物用卤水洗 2 次, 用硫酸钠干燥, 过滤然后得到 360 mg 产物, 直接用于下一步反应。

20 (c) (3-(3-叔丁基-2-((2-甲基-2 氢-1,2,4-三唑-3-基)甲基) 吡唑并[1,5-d][1,2,4] 三嗪-7-基) 异恶唑-5-基) 甲醇 (3-(3-tert-butyl -2-((2-methyl-2H-1,2,4-triazol-3-yl)methoxy)pyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazin-7-yl)isoxazol-5-yl)methanol

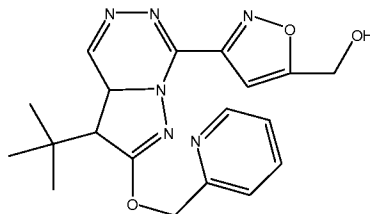


25 3-叔丁基-7- (5- (羟甲基) 异恶唑-3-基) 吡唑并[1,5-d][1,2,4] 三嗪-2-基(360 mg, 1.2 mmol)溶解于 DMF (10 mL)中, 加入 5-氯甲基- 1-甲基-1 氢-1,2,4-三唑盐酸盐(250 mg, 1.5 mmol), 再加入碳酸钾(1 g, 7.5 mmol)。反应溶液在氩气条件下 70°C 加热 5 小时。蒸干溶剂与甲苯共沸, 并将该残余物在乙酸已脂 (EtOAc) 和水之间分配, 分离出有机相。水层用乙酸已脂(30 mL x 2)萃取。混合有机物用卤水洗, 用硫酸钠干燥, 蒸发得到固体物质。将该残余物在硅胶上进行层析, 用 DCM : MeOH = 50:1 洗脱, 得到产物 260 mg, 为黄色粉末固体。1H NMR (400 MHz, DMSO-d6)  $\delta$ : 9.60 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.22 (s, 1H),

5.85 (m, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.74 (s, 2H), 3.91(s, 3H), 1.45 (s, 9H), -0.02 (s, 6H); ESI-MS: m/z 385 [M+H]<sup>+</sup>.

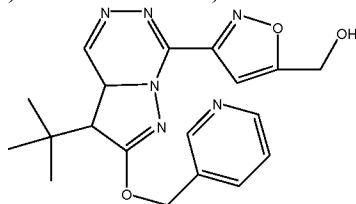
用上述的方法可以合成下列化合物:

- 5 用 3-叔丁基-7-(5-(羟甲基)异恶唑-3-基)吡唑并[1,5-d][1,2,4]三嗪-2-基与 2-氯甲基吡啶盐酸盐用上述类似的方法可以合成下列化合物 (C2)(3-(3-叔丁基-2-(2-吡啶基甲氧基)-3,3a-2 氢-吡唑并[1,5-d][1,2,4]三嗪-7-基)异恶唑-5-基)甲醇,如下图所示: m/z 381 [M+H]<sup>+</sup>.

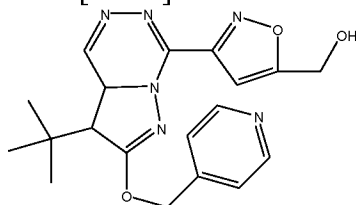


10

同例也可以合成下列化合物, 化合物3 (C3) (3-(3-叔丁基-2-(3-吡啶基甲氧基)-3,3a-2 氢-吡唑并[1,5-d][1,2,4]三嗪-7-基)异恶唑-5-基)甲醇: m/z 381 [M+H]<sup>+</sup>.



- 15 化合物 4 (C4) (3-(3-叔丁基-2-(4-吡啶基甲氧基)-3,3a-2 氢-吡唑并[1,5-d][1,2,4]三嗪-7-基)异恶唑-5-基)甲醇: m/z 381 [M+H]<sup>+</sup>.



### 实施例 9、C2、C3、C4 化合物可以抑制神经源性痛和炎性痛

20 将 C2、C3、C4 化合物分别溶解在 70%(PGE400:水=70:30 的体积比例)的 PGE400 中, 剂量分别为 3 mg/kg, 作为注射剂。

在这里本发明人检测了 C2、C3、C4(图 7A)化合物在 SNI 模型中和炎性痛模型中的治疗镇痛作用。

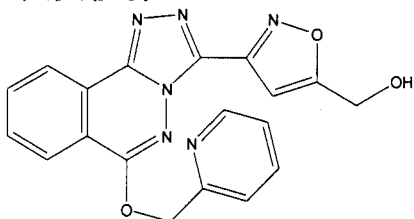
图 7A 显示了化合物 C2、C3、C4 的化学结构式。

25 图 7B 显示: 腹腔注射 C2、C3、C4 化合物可以有效地治疗神经源性痛。在该实验中, SNI 模型建立 14 天后, 皮下分别注射 C2、C3、C4 化合物(3 mg/kg 体重), 打药后 1 小时, 检测大鼠的疼痛阈值, 结果证明该化合物可以有效抑制神经源性痛。

在 CFA 诱导的炎性痛模型中, 本发明人在建模 3 或 7 天后, 腹腔注射 C2、C3 或

C4 化合物(3 mg/kg 体重), 然后在 1 小时后检测注射药物对热痛或机械痛的影响, 如图 7C 和 D, 该系列化合物均可以有效抑制热痛或机械痛反应。

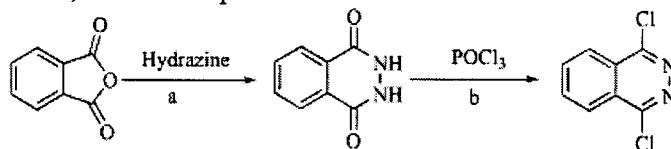
5 实施例 10、制备{3-[6-(吡啶-2-甲基)-[1, 2, 4]三唑[3, 4-a] 酞嗪-3-基]- 异恶唑-5-基)甲醇及其类似物



1、制备中间体 4: 1-(1-氯酞嗪-4-基)

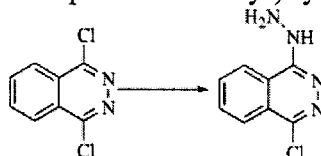
中间体 1: 1-(1-氯酞嗪-4-基)

(a) 1,4-酞嗪二氯 (1,4-dichlorophthalazine)



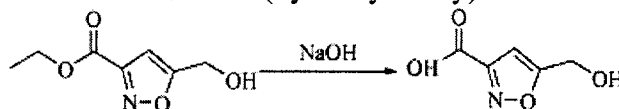
10 将异苯并呋喃 (5.92 g, 0.04 mol) 溶解于醋酸(22 mL) 中, 将肼 (2.8 mL, 0.044 mol) 滴加, 回流 4 小时.冷却到室温,过滤,乙醇清洗, 然后在负压下蒸发, 得到产物 2,3-二氢-1,4-酞嗪二酮(2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione, 6.13 g, 产率为 94.6%), 为白色固体。将该产物溶解在 POCl3 (50 mL), 在 110°C 搅拌混匀 3 小时,冷却到室温, 然后慢慢倾倒入  
15 冷水中。过滤, 并用水清洗, THF 条件下重新结晶得到 1,4-酞嗪二氯, 为白色固体。

(b) 1-(1-氯酞嗪-4-基)肼 1-(1-chlorophthalazin-4-yl)hydrazine



20 肼一水(5.6 mL, 0.17 mol)在乙醇(150 mL)中煮沸, 然后加入 1,4-酞嗪二氯(3.0 g, 0.015 mol), 加热回流 0.5 小时。混合液冷却到室温, 过滤收集固体物, 用乙醚清洗。石油醚/乙酸乙酯条件下重新结晶, 得到产物 1-(1-氯酞嗪-4-基)肼, 为淡黄色固体。

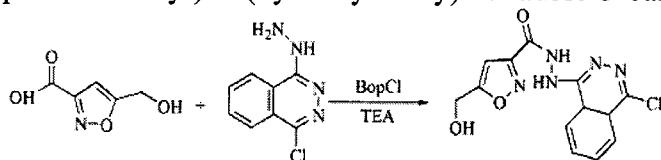
中间体 2: 5-羟甲基-异恶唑-3-羧酸 5-(hydroxymethyl)isoxazole-3-carboxylic acid



25 (a) 5-羟甲基-异恶唑-3-羧酸乙酯的获得方法可以参考实施例 8。将 5-羟甲基-异恶唑-3-羧酸乙酯 (参考实施例 8, 1.5 g; 8.76 mmol) 和 1 M 氢氧化钠 (18 mL, 18 mmol) 在常温下搅拌 1.5 小时。卤水 (40 mL) 加入, 用 6N 盐酸将 pH 值调到 2。用醋酸乙酯 (6X 60 mL) 萃取。然后用硫酸镁干燥, 蒸发得到产物 5-羟甲基-异恶唑-3-羧酸 (1.2 g, 产率 95%), 为白色固体。

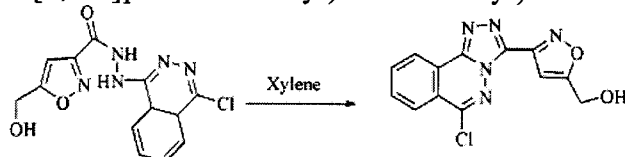
步骤 1:

(a) N'-(1-氯苯酞-4-基)-5-(羟甲基)异恶唑-3-碳酰肼  
N'-(1-chlorophthalazin-4-yl)-5-(hydroxymethyl)isoxazole-3-carbohydrazide



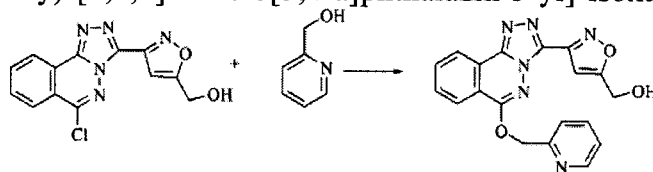
5 向干燥二氯甲烷中溶解 5-羟甲基-异恶唑-3-羧酸(770 mg, 5.4 mmol)和三乙基胺(1.1 g, 10.8 mmol, 2 eq.) 在干燥 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL), 在 0°C 温度条件下, 加入双(2-氧代-3-恶唑烷基)次磷酰氯 (BOP-Cl, 1.47 g, 5.4 mmol, 1 eq.). 在 0°C 温度条件下搅拌 0.5 小时。再加入 1-(1-氯酞嗪-4-基)肼(943 mg, 4.86 mmol, 0.9 eq.)。混合液在 0°C 搅拌 2 小时, 再在室温下搅拌过夜。蒸发, 固体残余物用水和乙醚清洗, 得到产物 N'-(1-氯苯酞-4-基)-5-(羟甲基)异恶唑-3-羧酸乙酯(900 mg, 产率:60%), 为黄色固体。

10 (b) (3-(6-氯-[1,2,4]三唑[3,4-a]酞嗪-3-基)异恶唑-5-基)甲醇  
(3-(6-chloro-[1,2,4]triazolo[3,4-a]phthalazin-3-yl)isoxazol-5-yl)methanol



15 N'-(1-氯苯酞-4-基)-5-(羟甲基)异恶唑-3-羧酸乙酯 (900 mg, 2.82 mmol) 和乙基胺喹啉定 (154 mg, 0.13 mmol, 0.4 eq.) 在二甲苯(60 mL)回流 3 小时。DCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)加入到悬浮液, 得到均匀混合液。有机相用水清洗, 硫酸镁干燥, 过滤, 然后蒸发得到产物(3-(6-氯-[1,2,4]三唑[3,4-a]酞嗪-3-基)异恶唑-5-基)甲醇(300 mg, 产率为 35%), 为黄色固体。

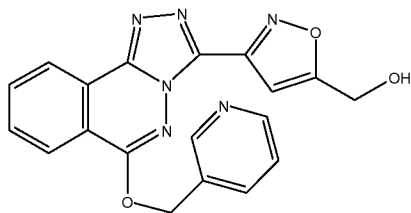
(c){3-[6-(吡啶-2-基)-[1,2,4]三唑[3,4-a]酞嗪-3-基]-异恶唑-5-基)甲醇  
{3-[6-(Pyridin-2-ylmethoxy)-[1,2,4]triazolo[3,4-a]phthalazin-3-yl]-isoxazol-5-yl}-methanol



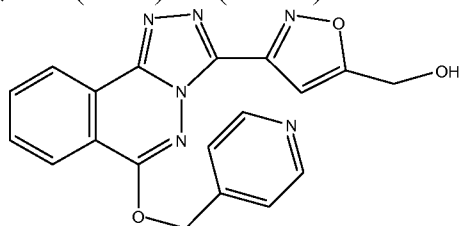
20 吡啶-2-基-甲醇 (300 mg, 1 mmol) 在 DMF (30 mL) 中, 在室温下加入 NaH (80 mg, 2 mmol, 2 eq.)。混合液在室温下搅拌 15 分钟。(3-(6-氯-[1,2,4]三唑[3,4-a]酞嗪-3-基)异恶唑-5-基)甲醇 (164 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq.) 加入, 室温搅拌 1 小时。冷水终止反应, 并且浓缩。残留物用硅胶上进行层析, 得到产物 C5(50 mg, yield: 13.4%)。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ:8.64(d,1H),8.63-8.60(d,1H), 8.53-8.33(d,1H), 8.13(t,1H) 7.99 (t, 1H),7.87 (t,1H),7.76(d,1H), 7.41-7.39(t,1H), 7.15(s,1H) ,5.87(t,1H),5.71 (s,2H),4.74-4.73(d,2H).  
25 m/z(ESI+)375(M+H<sup>+</sup>).

用上述类似的方法, 合成下列化合物:

化合物 6(C6): {3-[6-(吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑[3,4-a]酞嗪-3-基]-异恶唑-5-基)甲醇 m/z(ESI+)375(M+H<sup>+</sup>).



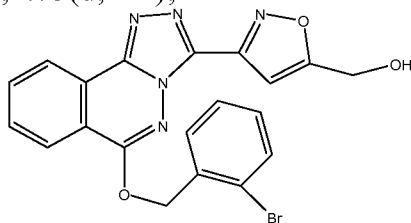
化合物 7(C7): {3-[6-(吡啶-4-甲基)-[1, 2, 4]三唑[3, 4-a] 酞嗪-3-基]- 异恶唑-5-基) 甲醇  $m/z(\text{ESI}^+)$ 375( $\text{M}+\text{H}^+$ ).



5

化合物 8(C8): {3-[6-(2-溴-苯)-[1, 2, 4]三唑[3, 4-a] 酞嗪-3-基]- 异恶唑-5-基)甲醇  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 8.60(d,1H),8.27(d, 1H), 8.13(t, 1H),7.99(d, 1H), 7.85(d, 1H), 7.50(t, 1H), 7.47(t, 1H), 7.41(t, 1H), 7.21(s, 1H),5.85(t, 1H),5.71(s, 2H),4.75(d, 2H);4.75(d, 2H);

10



### 实施例 11、C5、C6、C7、C8 化合物可以抑制神经源性痛和炎性痛

将上述实施例合成的化合物 C5、C6、C7 和 C8 化合物分别溶解在 70% PGE400 中，剂量分别为 3 mg/kg 体重，作为注射剂。

15

本发明人检测了 C5、C6、C7 和 C8 化合物在 SNI 模型中和炎性痛模型中的镇痛作用。

图 8A 显示了化合物 C5、C6、C7 和 C8 的化学结构式。

图 8B 显示：腹腔注射 C5、C6、C7 和 C8 化合物可以有效地治疗神经源性痛。在该实验中，SNI 模型建立 14 天后，皮下分别注射 C5、C6、C7 和 C8 化合物(3 mg/kg 体重)，打药后 1 小时，检测大鼠的疼痛阈值，结果证明该化合物可以有效抑制神经源性痛。

20

在 CFA 诱导的炎性痛模型中，本发明人在建模 3 或 7 天后，腹腔注射 C5、C6、C7 和 C8 化合物(3 mg/kg 体重)，然后在 1 小时后检测药物对热痛或机械痛的影响，如图 8C 和 D 所示，该系列化合物均可以有效抑制热痛和机械痛反应。

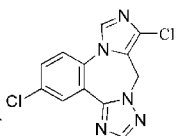
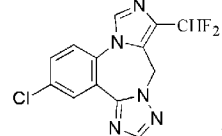
25

C5 在行为学检测中，镇痛效果最为理想。图 8E 中，皮下注射 C5 分别以 1 mg/kg 体重和 3 mg/kg 体重的剂量，然后打药后 0.5 小时、1 小时、2 小时、3 小时、6 小时和 12

小时, 检测大鼠的疼痛阈值, 结果证明该化合物可以有效抑制神经源性痛。在该试验中, 吗啡作为阳性对照, 皮下注射, 剂量为 10 mg/kg。同时, 本发明人也检测了 C5 是否影响大脑中枢反应, 我们检测了 C5 是否潜在诱导癫痫反应, 在图 8F 中, 发现 C5 在 1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 和 15 mg/kg 的剂量对戊四氮诱导的癫痫并没有作用。这提示 C5 可以有效地治疗疼痛, 并且没有潜在的中枢副作用。

### 实施例 12、一类 $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂的镇痛效果验证

$\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> 受体的反向激动剂广泛应用于治疗学习记忆相关的疾病, 弗·哈夫曼-拉罗

切有限公司申请了一系列相关化合物, 并且文献报道 、 作为潜在药物, 进行临床 I 期试验。在这里本发明人按照文献(Knust H et al., The discovery and unique pharmacological profile of RO4938581 and RO4882224 as potent and selective GABA<sub>A</sub> alpha5 inverse agonists for the treatment of cognitive dysfunction. Bioorg Med Chem letter. 2009 Oct 15;19(20):5940-4) 和美国专利 (US 2006/0084642 A1, US 2007/0082890 A1 等) 合成了下表中所示的化合物。在大鼠慢性痛模型中, 检测了这一类化合物在疼痛中的作用。如下图所示, 将下列化合物分别溶解在 PGE400:水=(30: 70 的体积比例)的 PGE400 中, 剂量为 3 mg/kg 体重, 作为注射剂。

在 SNI 模型中和炎性痛模型中的治疗镇痛作用。行为数据显示: 腹腔注射下列化合物(3 mg/kg 体重)可以有效地治疗神经源性痛。在该实验中, SNI 建立 14 天后, 皮下注射下列化合物(3 mg/kg 体重), 打药后 1 小时, 检测大鼠的疼痛阈值, 结果证明该系列化合物可以有效抑制神经源性痛。在 CFA 诱导的炎性痛模型中, 我们在建模 3 或 7 天后, 腹腔注射下列化合物(3 mg/kg 体重), 然后在 1 小时后检测药物对热痛或机械痛的影响, 结果如下所示, 该系列化合物均可以有效抑制热痛或机械痛反应。

同时, 本发明人检测了该类型化合物在大鼠组织中的分布。首先将待测物质皮下注射到动物体内, 然后在注射 1 小时后提取大脑组织和血浆组织, 用色谱-质谱联用 (L-MS) 的方法检测药物的浓度, 如果化合物在大脑组织和血浆组织的比例 (brain/plasma ratio) 小于 0.1, 就表明该候选物是副作用较小且可以治疗疼痛的潜在药

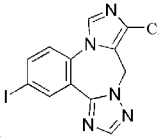
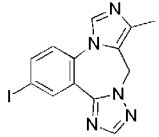
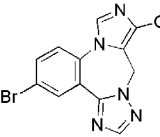
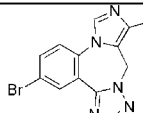
物。本发明人的试验发现 , ,  等几乎不穿过血脑屏障。

表 3

化合物	大脑/血液含量比例	CFA 诱导的炎性痛模型(热痛)	CFA 诱导的炎性痛模型(机械痛)	神经源性痛 (SNI 模型)
	<0.2	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著



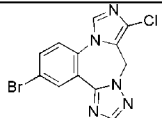
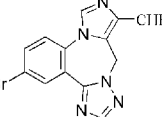
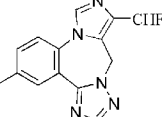
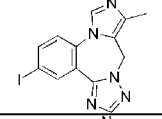
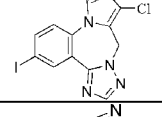
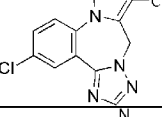
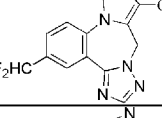
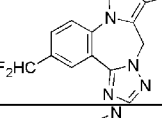
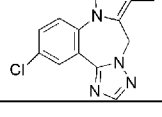
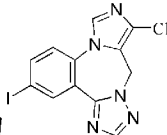
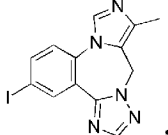
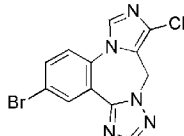
	<0.1	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著
	>0.2	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著
	NA	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著
	<0.1	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著
	<0.1	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著
	>0.2	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著
	NA	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著
	NA	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著
	=0.2	镇痛效果显著	镇痛效果显著	镇痛效果显著

表 3 中各化合物均具有显著的镇痛效果。其中，化合物 ，，，可以有效地抑制 CFA 诱导的炎性痛，并且也可以抑制 SNI 诱导的神经源性痛。这三个化合物几乎不能穿过血脑屏障，不会直接影响中枢功能，属于中枢副作用小，且可以有效治疗疼痛的药物。

5

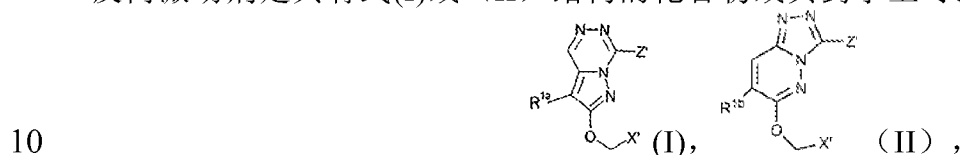
在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

## 权 利 要 求

1. 含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的反向激动剂或其药学上可接受的盐的用途，用于制备预防、改善或治疗疼痛的药物。

5           2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的反向激动剂是选择性结合于该受体的苯二氮卓结合位点的配体。

3. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的反向激动剂是具有式(I)或(II)结构的化合物或其药学上可接受的盐：



15           其中， $R^{1a}$  表示卤素；或  $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-7}$  环烷基、 $C_{4-7}$  环烯基、 $C_{6-8}$  二环烷基、 $C_{6-10}$  芳基、 $C_{3-7}$  杂环烷基、定义为或者含有 6 个原子，其中 1, 2 或 3 个为氮，或者含有 5 个原子；其中 1、2 或 3 个独立选自氧、氮或硫而且其中氧或硫不超过一个的芳环的杂芳基，或二( $C_{1-6}$ ) 烷基氨基，这些基团中的任意一个可以用一个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、 $R^3$ 、 $OR^3$ 、 $OC(O)R^3$ 、 $NR^4R^5$ 、 $NR^4R^5(C_{1-6})$  烷基、 $NR^4R^5C(O)$ 、 $NR^4R^5C(O)(C_{1-6})$  烷基、 $CN$ 、氰基( $C_{1-6}$ ) 烷基或  $R^6$ 。

$R^{1b}$  表示  $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-7}$  环烷基、 $C_{4-7}$  环烯基、芳基、 $C_{3-7}$  杂环烷基、杂环芳基、二( $C_{1-6}$ ) 烷基氨基。

20            $R^3$  表示  $C_{2-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  链烯基、 $C_{2-6}$  炔基、 $C_{3-6}$  环烷基、 $C_{3-6}$  环烷基 ( $C_{1-6}$ ) 烷基、氰基( $C_{1-6}$ ) 烷基、羟基 ( $C_{1-6}$ ) 烷基且  $R^3$  任选为 1、2 或 3 氟代的。

$R^4$  和  $R^5$  每个独立为氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  链烯基、 $C_{2-6}$  炔基、 $C_{3-6}$  环烷基或  $CF_3$ ，或  $R^4$  和  $R^5$  与它们共同连接的氮原子一起形成 4-7 元杂脂肪环，该脂肪环含有所述氮原子和一个任选自 O、N 和 S 的其它杂原子，所述环可以被一个或多个  $R^3$  基团任选取代。

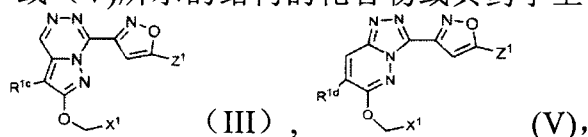
25            $R^6$  为  $C_{6-10}$  芳基、 $C_{6-10}$  芳基( $C_{1-6}$ ) 烷基、杂芳基或杂芳基( $C_{1-6}$ ) 烷基。其中杂芳基如上定义，而且  $R^6$  任选被一个、两个或三个独立选自以下的取代基取代：卤原子和  $C_{1-4}$  烷基、 $C_{2-4}$  链烯基、 $C_{2-4}$  炔基、 $C_{1-4}$  烷氧基、 $C_{2-4}$  链烯氧基和  $C_{2-4}$  炔氧基基团，其中每个基团是未取代的或被一个、两个或三个卤原子取代。

30            $X'$  为  $NR^4R^5$ ；或  $X'$  为含有 1、2、3 或 4 个独立选自氧、氮和硫的杂原子的 5 元杂芳环，杂原子中最多有一个为氧或硫，或为含有 1、2 或 3 个氮原子的 6 元杂芳环，所述 5 或 6 元杂芳环任选稠合于苯环或吡啶环上并且该杂芳环任选被  $R^w$  和/或  $R^y$  和/或  $R^z$  取代，其中  $R^w$  为卤素、 $R^3$ 、 $OR^3$ 、 $OC(O)R^3$ 、 $C(O)OR^3$ 、 $NR^4R^5$ 、 $NR^4C(O)R^5$ 、 $OH$ 、三( $C_{1-6}$  烷基)甲硅烷基  $C_{1-6}$  烷氧基  $C_{1-4}$  烷基、 $CN$  或  $R^6$ ， $R^y$  为卤素、 $R^3$ 、 $OR^3$ 、 $OC(O)R^3$ 、 $NR^4R^5$ 、 $NR^4C(O)R^5$ 、 $NR^4R^5(C_{1-6})$  烷基或  $CN$  而  $R^z$  为  $R^3$ 、 $OR^3$ 、 $OC(O)R^3$ ，前提是当  $X'$  为吡啶衍生物时，该吡啶环任选为 N-氧化物形式，并且前提是  $X'$  为四唑衍生物时，它被  $C_{1-4}$

烷基基团保护；或 X' 为由一个、两个或三个独立选自以下的基团任选取代的苯基：卤素、氰基、C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>2-6</sub> 链烯基、C<sub>2-6</sub> 炔基和 C<sub>3-6</sub> 环烷基。

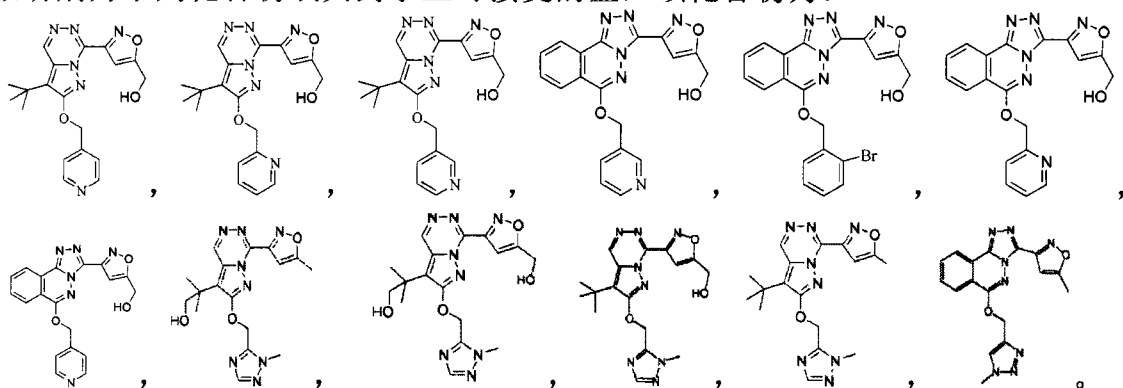
Z' 表示含有 1、2 或 3 个独立选自氧、氮和硫的杂原子的 5 元杂芳环，最多有 1 个杂原子为氧或硫，并且前提是当 1 个原子为氧或硫时至少也存在 1 个氮原子，或为含有 2 或 3 个氮原子的除吡嗪之外的 6 元杂芳环，所述环中的任何 1 个可以由 1 个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、R<sup>3</sup>、OR<sup>3</sup>、OC(O)R<sup>3</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>(C<sub>1-6</sub>)烷基、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>C(O)、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>C(O)(C<sub>1-6</sub>)烷基、CN、氰基(C<sub>1-6</sub>)烷基或 R<sup>6</sup>。

4. 如权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述的 α5 亚基的 γ-氨基丁酸 A 受体的反向激动剂是具有式(III) 或 (V)所示的结构化合物或其药学上可接受的盐：

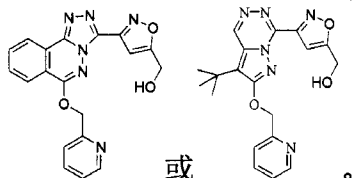


其中，R<sup>1c</sup> 表示溴、噻吩基、叔丁基、苯基或呋喃基；R<sup>1d</sup> 表示芳基，C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>3-7</sub> 环烷基；X<sup>1</sup> 为含有 1、2 或 3 氮原子的 5 元杂环，杂原子中最多有一个为氧或硫，或为含有 1、2 或 3 个氮原子的 6 元杂芳环，所述 5 或 6 元杂芳环所述环中的任何 1 个可以由 1 个或多个选自以下的取代基任选取代：C<sub>1-6</sub> 烷基、氨基、吡啶基、CF<sub>3</sub>、芳基(C<sub>1-6</sub>)烷基、吡啶基(C<sub>1-6</sub>)烷基、卤素、氰基、氰基(C<sub>1-6</sub>)烷基、羟甲基、羟基或其酮基互变异构体。Z<sup>1</sup> 表示羟基、卤素、羟基或氨基取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 链烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 链炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷氧基。

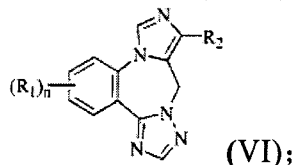
5. 如权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述的含 α5 亚基的 γ-氨基丁酸 A 的反向激动剂为下列化合物或其药学上可接受的盐，该化合物为：



6. 如权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述的含 α5 亚基的 γ-氨基丁酸 A 的反向激动剂为下列化合物或其药学上可接受的盐，该化合物为：

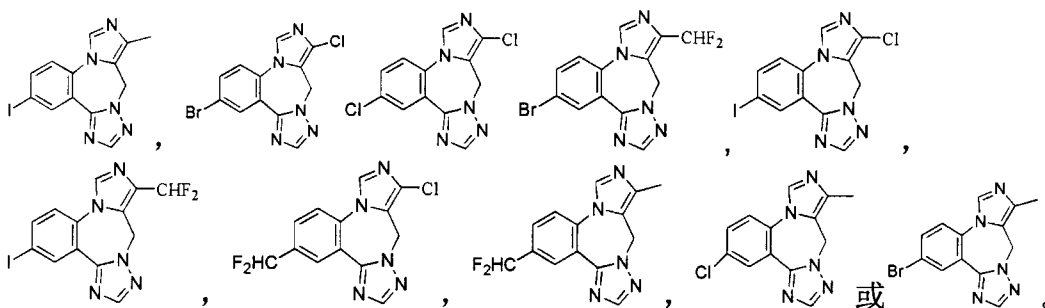


7. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述的  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的反向激动剂是具有式(VI)结构的化合物或其药学上可接受的盐:

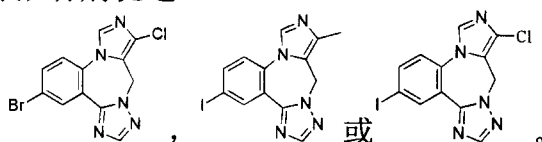


$R_1$  是卤素、 $C_{1-7}$  烷基、 $C_{2-7}$  链炔基、环烷基、 $C_{1-7}$  烷氧基、 $OCF_3$ 、 $-NHR$ 、 $-NHC(O)R$  或  $-NHOSO_2R$ ;  $R$  是氢、 $C_{1-7}$  烷基、被卤素取代的  $C_{1-7}$  烷基、杂芳基、 $-(CH_2)_nO-C_{1-7}$  烷基、 $-NH-C_{1-7}$  烷基;  $R_2$  是卤素、氢、 $-C(O)O(C_{1-4})$  烷基、 $C(O)NHCH_2CCH$ 、 $C(O)NHCH_2CH_2$ 、 $SO_2CH_2CH_3$ 、 $C_{1-7}$  烷基、被卤素取代的  $C_{1-7}$  烷基、氰基、 $C_{3-6}$  环烷基;  $n$  是 0、1、2 或 3。

8. 如权利要求 7 所述的用途, 其特征在于, 所述的含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 的反向激动剂选自:



9. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述的含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 的反向激动剂优选:



10. 如权利要求 1 所述的反向激动剂, 其特征在于, 所述的含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的反向激动剂是结合外周神经表达的含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体, 但不能有效与中枢表达的含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体相结合。

11. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述的疼痛是外周神经相关的慢性痛。

12. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述的慢性痛是神经源性痛、炎性痛和癌性痛。

13. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述的疼痛病包括: 头痛、面部痛、颈痛、肩痛、背痛、胸痛、腹痛、背部痛、腰痛、下肢痛、肌肉与骨骼疼痛、躯体疼痛、血管疼痛、痛风、关节炎疼痛、与躯体病样精神障碍有关的疼痛、内脏疼痛、感染性疾

病导致的疼痛、多骨疼痛、镰刀细胞贫血、自身免疫性疾病、多发性硬化或炎症有关的疼痛、急慢性炎症疼痛、癌性疼痛、神经源性痛、损伤或手术引起的疼痛、癌性痛、伤害感受性疼痛、糖尿病、外周神经病、疱疹后神经痛、三叉神经痛、腰部或子宫颈神经根病、舌咽神经痛，自主神经反射性疼痛、反射性交感神经营养不良、神经根撕脱、癌症、化学损伤、毒素、营养缺乏、病毒或细菌感染、退行性骨关节病或它们的联合形式。

14. 一种筛选预防、改善或治疗疼痛的药物的方法，所述方法包括：

(1) 提供一包含含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的体系，所述的含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体具有完整的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体功能；

10 (2) 将候选物质给予步骤(1)的体系，观察候选物质与含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的结合情况；若候选物质能够与含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体结合，则该候选物质是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，步骤(1)中，还包括设置对照组的步骤，所述的对照组选自：包含含  $\alpha 1$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的体系、包含含  $\alpha 2$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的体系和/或包含含  $\alpha 3$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的体系，对照组  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体具有完整的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体功能。

20 在步骤(2)中，所述方法包括：在包含含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的体系中，检测候选物质与含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的结合情况，并与对照组比较，若候选物质与含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的结合抑制常数  $K_i$  在统计学上小于其与含  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的结合抑制常数  $K_i$ ，就表明该候选物是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。

25 16. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，步骤(1)中，还包括设置对照组的步骤，所述的对照组选自：包含含  $\alpha 1$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的体系、包含含  $\alpha 2$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的体系和/或包含含  $\alpha 3$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的体系，对照组  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体具有完整的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体功能。

30 步骤(2)中，所述方法包括：通过电生理方法检测候选物质对  $\gamma$ -氨基丁酸通过  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体诱导的电流的抑制，如果待测物质能够显著抑制含  $\alpha 5$  亚基  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体介导的电流，但同时不能显著抑制含  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  或  $\alpha 3$  的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体介导的电流，就表明该候选物质是预防、改善或治疗疼痛的潜在药物。

17. 一种预防、改善或治疗疼痛的方法，包括给予需要的患者安全有效量的含  $\alpha 5$  亚基的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体的反向激动剂或其药学上可接受的盐。

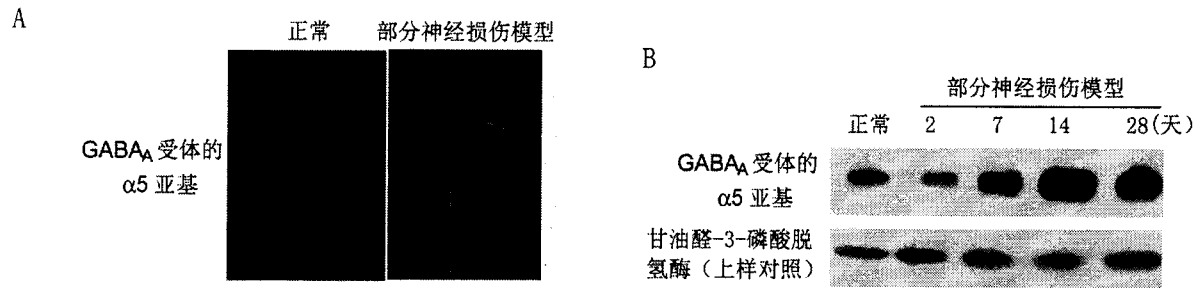


图1

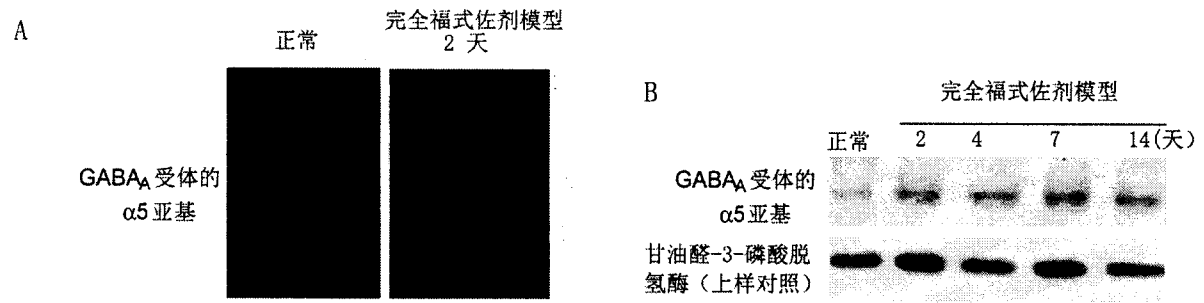


图2

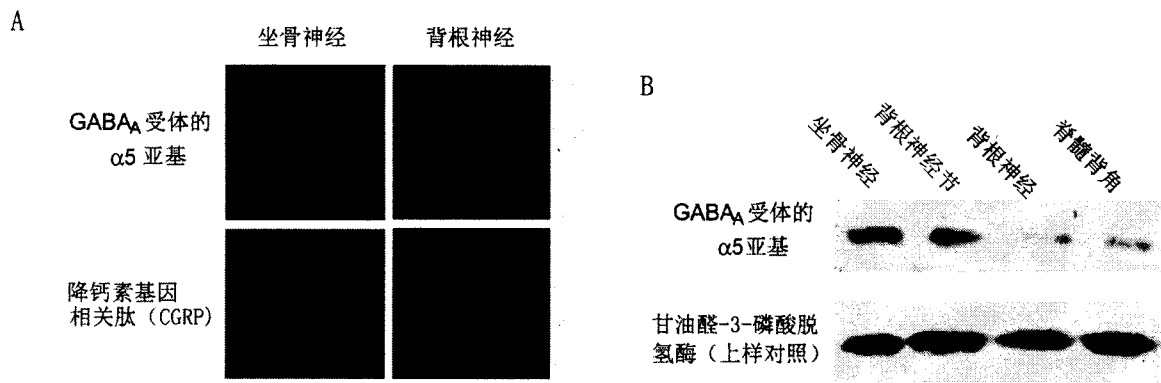
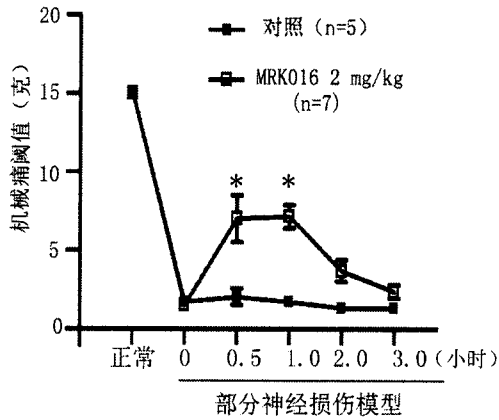
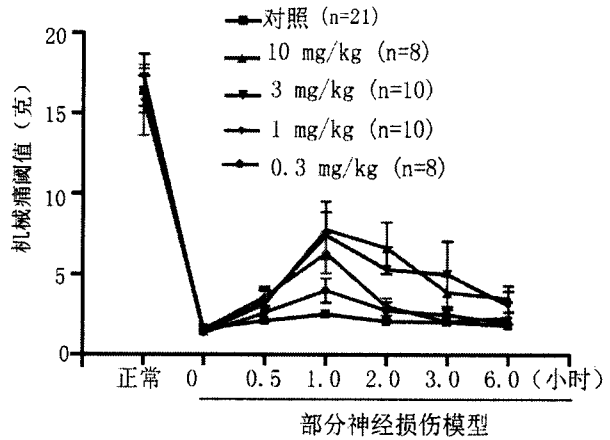


图3

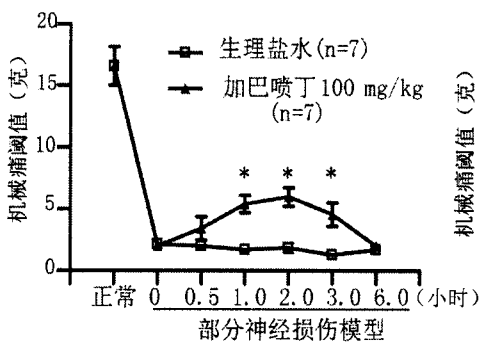
A



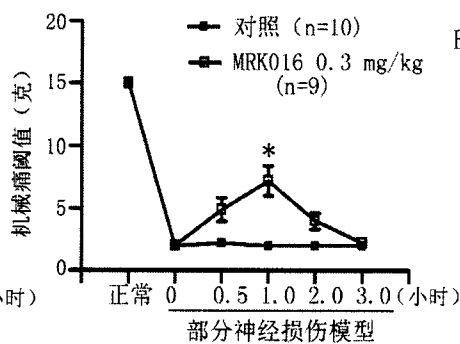
B



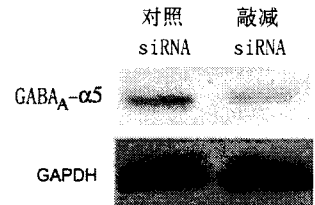
C



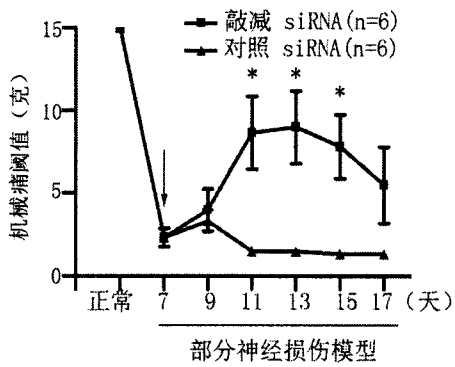
D



E



F



G

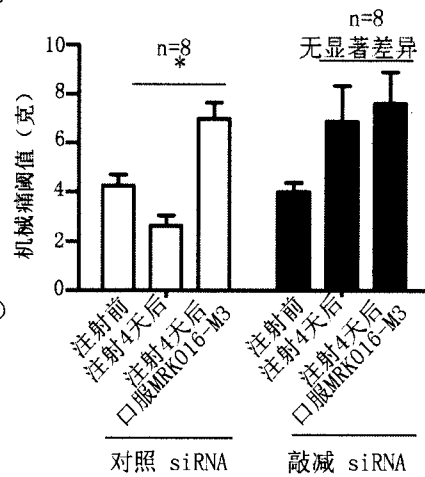


图 4

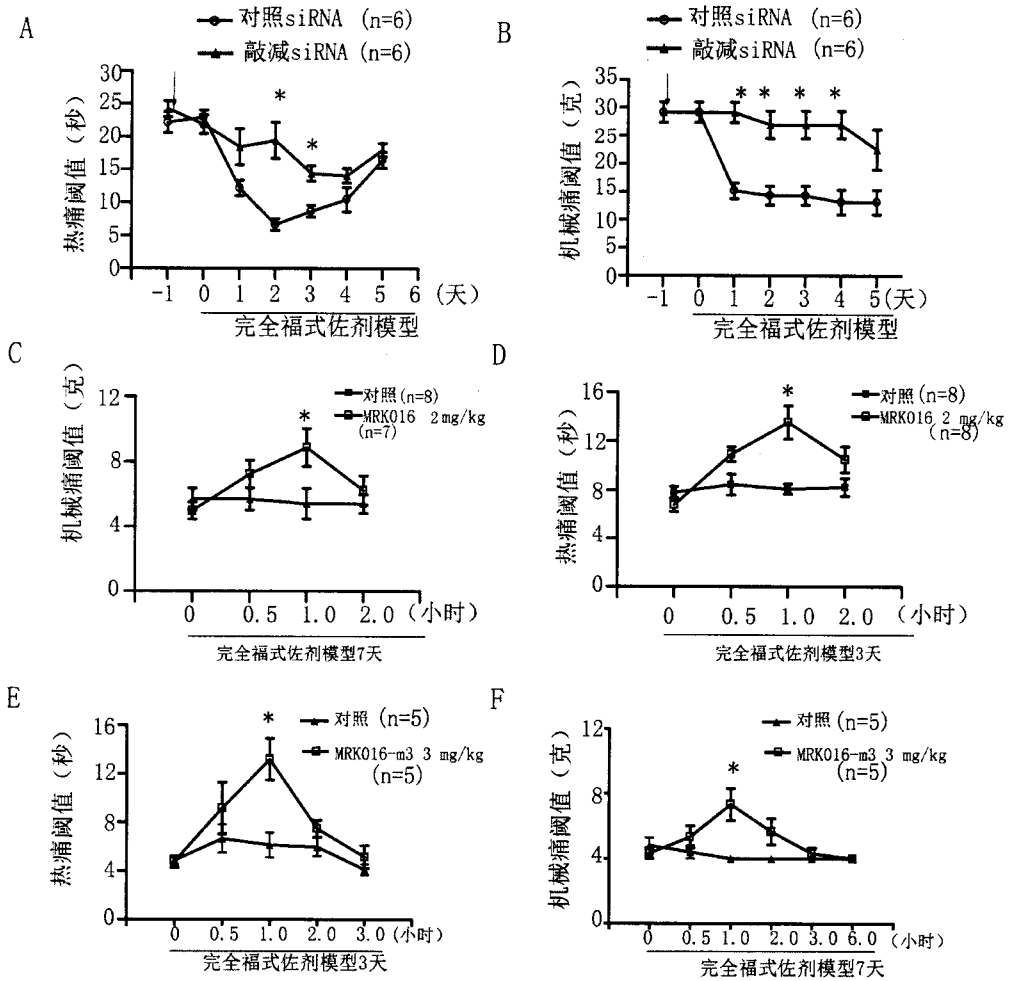


图 5

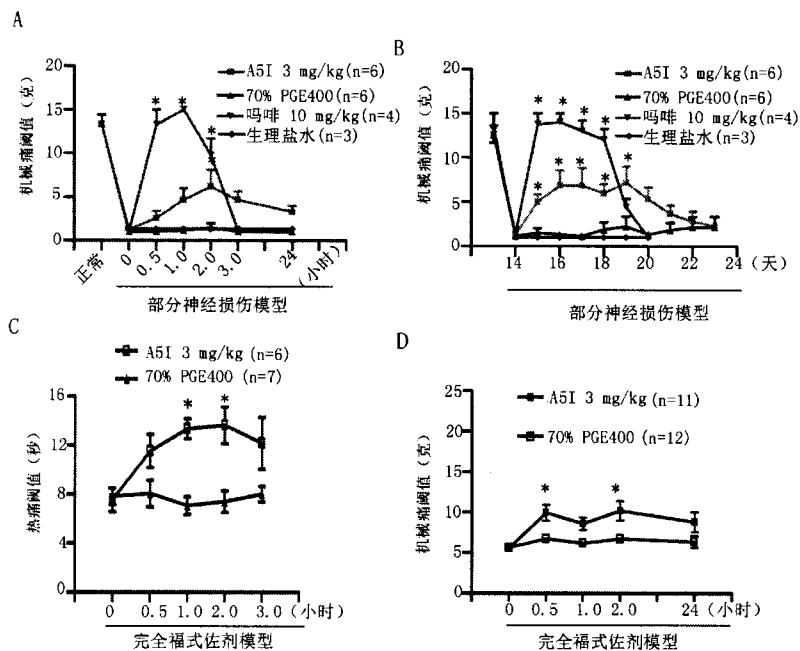


图 6



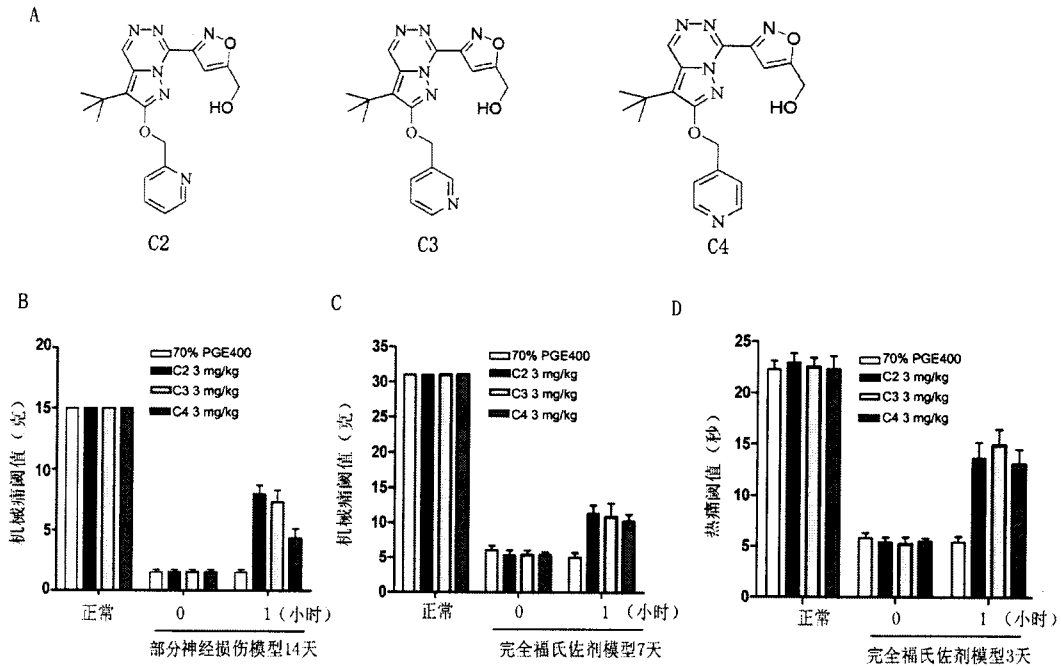


图 7

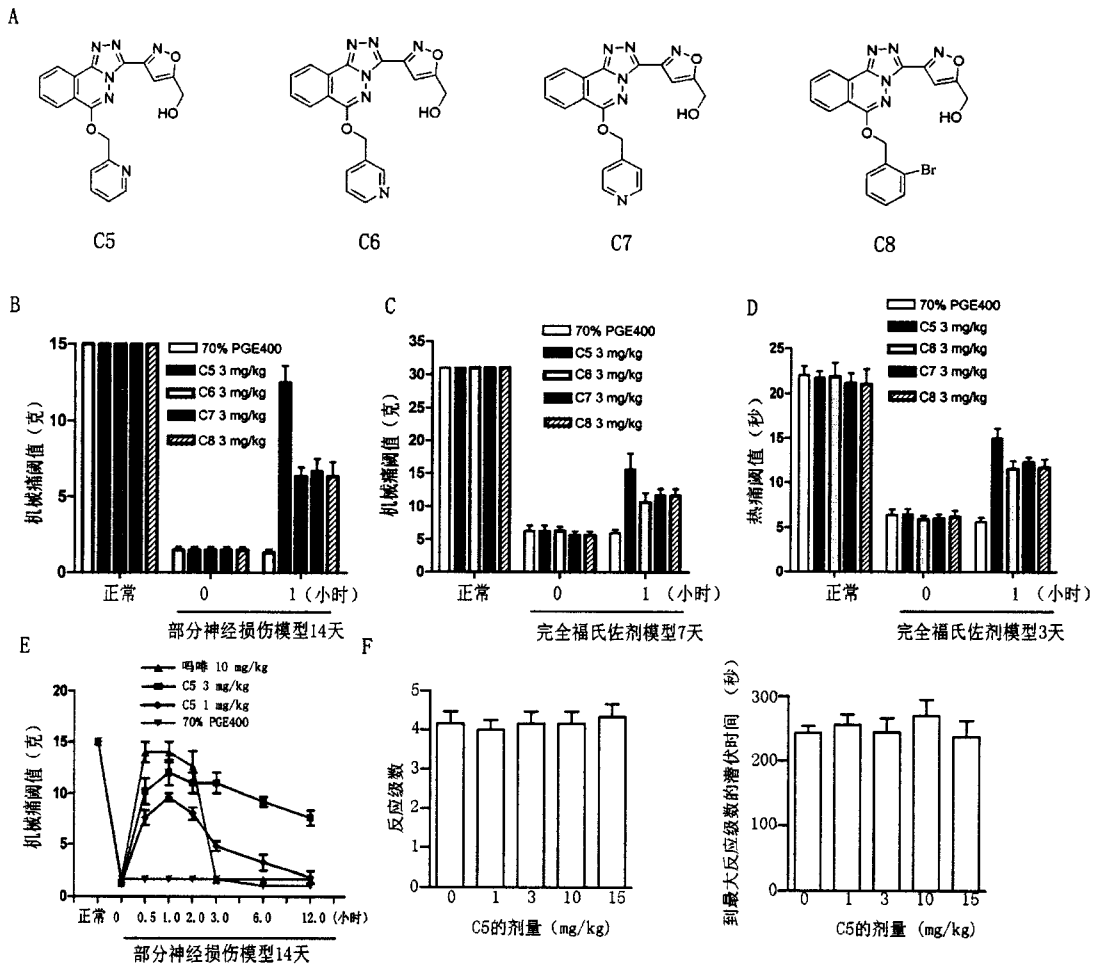


图 8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2013/071515

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DATABASE: WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CA, EMBASE

KEY WORDS:  $\alpha 5$ , alpha5, GABA, inverse agonist, negative allosteric modulator, ache, pain, benzodiazepine

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03099816 A1 (MERCK SHARP & DOHME LIMITED) 4 December 2003 (04.12.2003) see the abstract and page 4, line5, page 5, lines 17-18, page 41, lines 3-6	1-16
A	Alessandra Di Lio et. HZ166, a Novel GABAA Receptor Subtype-selective Benzodiazepine Site Ligand, is Antihyperalgesic in Mouse Models of Inflammatory And Neuropathic Pain. Neuropharmacology. 2011, no. 60, pages 626-632	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 21 June 2013 (21.06.2013)	Date of mailing of the international search report 24 June 2013 (24.06.2013)
--	---

<p>Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer  ZHANG, Zhicong  Telephone No. (86-10) 62411129</p>
--	---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2013/071515

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:17  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
claim 17 is directed to methods of preservation, amendment or treatment of pain ( Article 17 (2) (a) (i) and Rule 39.1(iv) PCT).
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/071515

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 03099816 A1	20031204	AU 2003234022 A1	20031212
		EP 1511747 A1	20050309
		US 2005165048 A1	20050728
		JP 2005531582 A	20051020
		EP 1511747 B1	20060412
		DE 60304572 EE	20060524
		ES 2260623 TT3	20061101
		DE 60304572 TT2	20061214
		US 7279580 B2	20071009
		AU 2003234022 B2	20090625

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/071515

Continuation of classification of subject matter:

A61K 31/50 (2006.01) i

A61K 31/5025 (2006.01) i

A61P 25/02 (2006.01) i

<b>A. 主题的分类</b>		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
<b>B. 检索领域</b>		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))		
数据库: WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CA, EMBASE		
检索词: $\gamma$ 氨基丁酸, 疼, 痛, 受体, 反向, 激动剂, $\alpha 5$ , alpha5, GABA, inverse agonist, negative allosteric modulator, ache, pain, benzodiazepine		
<b>C. 相关文件</b>		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 03099816A1(MERCK SHARP & DOHME LIMITED), 4.12 月 2003(04.12.2003), 参见说明书摘要和说明书第 4 页第 5 行, 第 5 页第 17-18 行, 第 41 页第 3-6 行	1-16
A	Alessandra Di Lio et. HZ166, a Novel GABAA Receptor Subtype-selective Benzodiazepine Site Ligand, is Antihyperalgesic in Mouse Models of Inflammatory And Neuropathic Pain. Neuropharmacology. 2011 年, 第 60 期, 第 626-632 页	1-16
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 25.4 月 2013 (25.04.2013)		国际检索报告邮寄日期 16.5 月 2013 (16.05.2013)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员  张志聪  电话号码: (86-10) 62411129

**第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)**

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1.  权利要求:

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:

权利要求17 请求保护一种预防、改善或治疗疼痛的方法, 其属于PCT 细则第39.1(iv)条规定的不要检索的主题。

2.  权利要求:

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,  
具体地说:

3.  权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

**第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)**

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1.  由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2.  由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何附加费。

3.  由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。  
具体地说, 是权利要求:

4.  申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明:  申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2013/071515**

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO 03099816A1	20031204	AU 2003234022A1	20031212
		EP 1511747A1	20050309
		US 2005165048A1	20050728
		JP 2005531582A	20051020
		EP 1511747B1	20060412
		DE 60304572EE	20060524
		ES 2260623TT3	20061101
		DE 60304572TT2	20061214
		US 7279580B2	20071009
		AU 2003234022B2	20090625



续主题的分类:

A61K 31/50(2006.01)i

A61K 31/5025(2006.01)i

A61P 25/02(2006.01)i