

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580024634. X

[51] Int. Cl.

C07D 403/06 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 15/06 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月27日

[11] 公开号 CN 1989130A

[22] 申请日 2005.6.21

[21] 申请号 200580024634. X

[30] 优先权

[32] 2004.6.23 [33] GB [31] 0414092.7

[86] 国际申请 PCT/EP2005/006761 2005.6.21

[87] 国际公布 WO2006/000400 英 2006.1.5

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.22

[71] 申请人 葛兰素集团有限公司

地址 英国米德尔塞克斯

[72] 发明人 阿兰·D·博思威克

史蒂文·L·索利斯

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

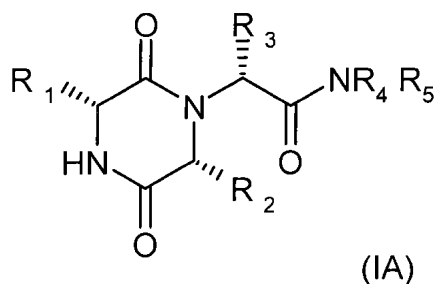
权利要求书 3 页 说明书 20 页

[54] 发明名称

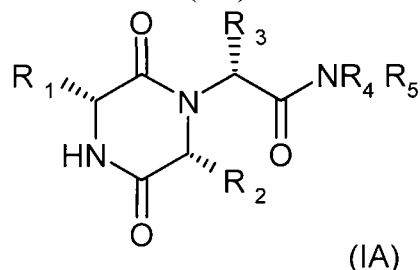
作为催产素拮抗剂的取代的二酮哌嗪

[57] 摘要

本发明公开了式 (IA) 化合物及其药学上可接受的衍生物, 其中, R_1 为 2-茚满基, R_2 为 1-甲基丙基, R_3 为 1-甲基-吡啶-5-基, R_4 代表甲基和 R_5 代表氢或甲基, 也公开了它们的制备方法和包含它们的药物组合物, 以及它们的医学用途, 特别是它们作为催产素拮抗剂的用途。

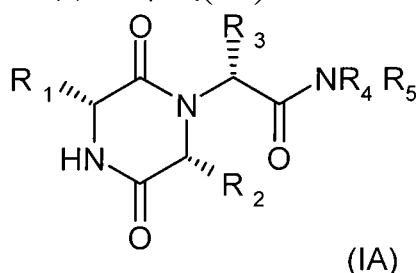


1. 至少一个化学实体,其选自式(IA)化合物及其药学上可接受的衍生物:



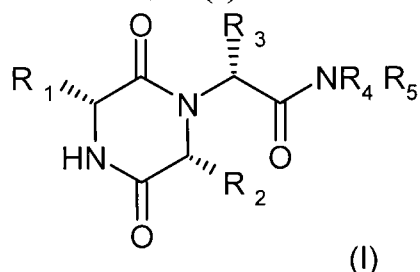
其中, R_1 为 2-茛满基, R_2 为 1-甲基丙基, R_3 为 1-甲基-吡唑-5-基, R_4 代表甲基和 R_5 代表氢或甲基。

2. 至少一个化学实体,其选自式(IA)化合物的盐和溶剂化物:



其中, R_1 为 2-茛满基, R_2 为 1-甲基丙基, R_3 为 1-甲基-吡唑-5-基, R_4 代表甲基和 R_5 代表氢或甲基。

3. 至少一个化学实体,其选自式(I)化合物及其药学上可接受的衍生物:



其中, R_1 为 2-茛满基, R_2 为 1-甲基丙基, R_3 为 1-甲基-吡唑-5-基, R_4 代表甲基和 R_5 代表氢。

4. 根据权利要求 1 或权利要求 3 的至少一个化学实体,其中 R_2 为 (1S)-1-甲基丙基。

5. 根据权利要求 1、3 和 4 中任一项的至少一个化学实体,其选自:

(2R)-2-[(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基]-N-甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)乙酰胺,及其药学上可接受的衍生物。

6. 根据权利要求1或权利要求4的至少一个化学实体, 其选自:

(2R)-2-[(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基]-N-甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)乙酰胺, 和

(2R)-2-[(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基]-N,N-二甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)乙酰胺,

及其药学上可接受的衍生物。

7. 包含根据权利要求1和3-6中任一项的至少一个化学实体和一种或多种药学上可接受的载体的药物组合物。

8. 用于治疗根据权利要求1和3-6中任一项的至少一个化学实体。

9. 根据权利要求1和3-6中任一项的至少一个化学实体在制备用于拮抗催产素对催产素受体作用的药物中的用途。

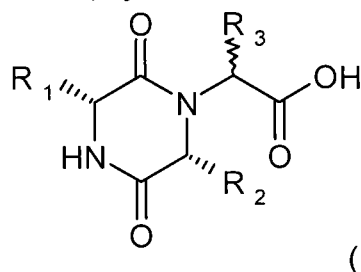
10. 根据权利要求1和3-6中任一项的至少一个化学实体在制备用于治疗一种或多种选自下述疾病或病症的药物中的用途: 预产期前分娩、痛经、子宫内膜异位和良性前列腺增生症。

11. 治疗或预防通过催产素作用介导的疾病或病症的方法, 所述方法包括给药于需要它的哺乳动物有效量的根据权利要求1和3-6中任一项的至少一个化学实体。

12. 根据权利要求11的方法, 其中所述疾病或病症选自预产期前分娩、痛经、子宫内膜异位和良性前列腺增生症。

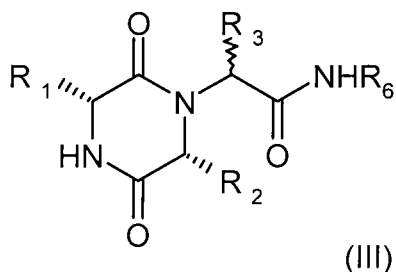
13. 制备权利要求1或权利要求3中分别要求保护的式(I)化合物或式(IA)化合物的方法, 所述方法包括:

(a) 在由羧酸或其活性衍生物和胺制备酰胺的标准条件下, 使式(II)化合物或其活性衍生物与胺 HNR_4R_5 反应



在式(II)中, R_1 、 R_2 和 R_3 具有权利要求1或权利要求3中所定义的含义, 且 R_3 处的手性为 *R* 或 *S* 或其混合物, 在胺 HNR_4R_5 中, R_4 和 R_5 具有权利要求1或权利要求3中所定义的含义, 或

(b) 在适宜的溶剂中，使其中 R_1 、 R_2 和 R_3 具有权利要求 1 或权利要求 3 中所定义的含义，且 R_6 为 2-羟基苯基的式(III)化合物与 1,1'-羰基二咪唑或 1,1'-硫代羰基二咪唑反应，然后使如此形成的产物与其中 R_4 和 R_5 具有权利要求 1 或权利要求 3 中所定义的含义的胺 HNR_4R_5 反应



作为催产素拮抗剂的取代的二酮哌嗪

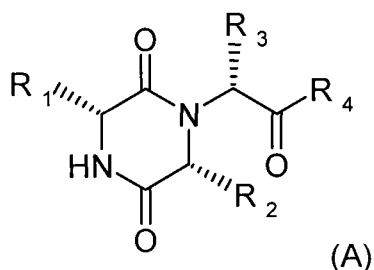
本发明涉及对催产素受体具有有效的和选择性的拮抗作用的新的二酮哌嗪衍生物、它们的制备方法、含有它们的药物组合物及其在药物中的应用。

激素催产素是有效的子宫收缩剂并用于诱导或增强分娩。子宫催产素受体的密度在妊娠期间也显著增加>100 倍并且在分娩时(预产期前和期间)达到高峰。

预产期前生产/分娩(在 24 至 37 周之间)导致大约 60%的婴儿死亡率/发病率,因此抑制催产素的子宫作用的化合物例如催产素拮抗剂应该对预产期前分娩的预防或控制有用。

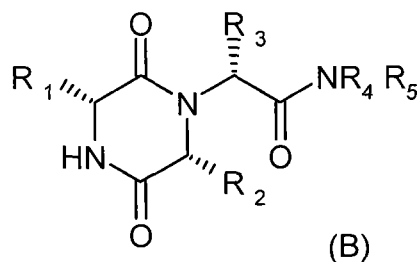
国际专利申请 WO 99/47549 公开了作为果糖 1,6-二磷酸酯(FBPase)抑制剂的包括 3-苄基-2,5-二酮哌嗪衍生物的二酮哌嗪衍生物。

国际专利申请 WO 03/053443 公开了一类二酮哌嗪衍生物,其显示出作为催产素受体选择性拮抗剂的特别有用的活性水平。式(A)代表本文描述的一类优选的化合物:



这样的化合物包括下述那些: 其中 R_1 为 2-萜满基, R_2 为 C_{3-4} 烷基, R_3 为任选取代的 6,5 稠合的二环, 例如 1H-吡唑-5-基, 其通过环上的碳原子连接到分子的其它部分, R_4 代表基团 NR_5R_6 , 其中 R_5 和 R_6 每个代表烷基, 例如甲基, 或者 R_5 和 R_6 与它们相连的氮原子一起形成 3 至 7 员饱和杂环, 其中该杂环可包含选自氧的另外的杂原子。

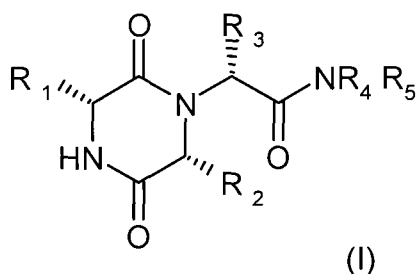
国际专利申请 WO 2005/000840 公开了式(B)二酮哌嗪衍生物。



其中, R_1 为 2-茛菪基, R_2 为 1-甲基丙基, R_3 为 2-甲基-1,3-噁唑-4-基以及 R_4 和 R_5 与它们连接的氮原子一起代表吗啉代(morpholino)。

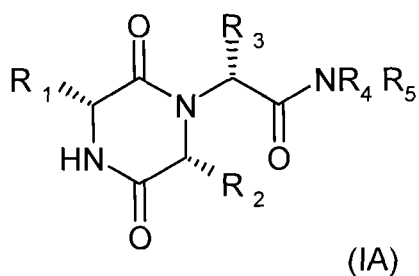
目前我们已经发现一类新的显示出特别有益的药物代谢动力学特征的选择性催产素受体拮抗剂。

因此, 本发明提供至少一个选自式(I)化合物的化学实体(entity)及其药学上可接受的衍生物:



其中, R_1 为 2-茛菪基, R_2 为 1-甲基丙基, R_3 为 1-甲基-吡唑-5-基, R_4 代表甲基和 R_5 代表氢。

或者, 本发明提供至少一个选自式(IA)化合物的化学实体及其药学上可接受的衍生物:



其中, R_1 为 2-茛菪基, R_2 为 1-甲基丙基, R_3 为 1-甲基-吡唑-5-基, R_4 代表甲基和 R_5 代表氢或甲基。

应当理解式(I)和式(IA)化合物在连接有基团 R_1 、 R_2 和 R_3 的不对称碳原子上具有所描述的绝对立体化学, 即在这些位置上的立体化学总是为(R)。然而, 也应当理解尽管这样的化合物基本上没有在各 R_1 、 R_2 和 R_3 位置上的(S)-差向异构体, 但是每个差向异构体可以以少量存在, 例如可存在 1%或更少的(S)-差向异构体。

也应当理解, 基团 R_2 包含不对称碳原子, 本发明包括其(R)-和(S)-差向

异构体。

在本发明的一个实施方案中，R₂为(1S)-1-甲基丙基。在本发明的另一个实施方案中，R₂为(1R)-1-甲基丙基。

在本发明的一个实施方案中，R₅代表氢。在本发明的另一个实施方案中，R₅代表甲基。

本发明的一个实施方案为在实施例1中特别描述其制备的化合物。本发明的另一个实施方案为在实施例1和2中特别描述其制备的化合物。

在一个方面，在本发明中有用的化学实体可以是选自下述的至少一个化学实体：

(2R)-2-{(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)乙酰胺，和

(2R)-2-{(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N,N-二甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)乙酰胺，

及其药学上可接受的衍生物。

如本文使用的术语“药学上可接受的”指适于药学应用的化合物。适于在药学中使用的本发明化合物的盐和溶剂化物是其中抗衡离子或相关溶剂为药学上可接受的那些。然而，具有非药学上可接受的抗衡离子或相关溶剂的盐和溶剂化物也包括在本发明范围内，例如，在本发明其它化合物和它们的药学上可接受的盐和溶剂化物制备中使用的中间体。

如本文使用的术语“药学上可接受的衍生物”指本发明化合物的任何药学上可接受的盐、溶剂化物或前药，例如酯，当将其给予受体时，能(直接或间接地)提供本发明的化合物或其活性代谢物或残基。本领域熟练技术人员能够识别这些衍生物，而不需要过度的实验。然而，参考Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5th Edition, Vol 1: Principles and Practice的教导，其在此引入作为参考，教导了这些衍生物。在一方面，药学上可接受的衍生物为盐、溶剂化物、酯、氨基甲酸酯和磷酸酯。在另一方面，药学上可接受的衍生物为盐、溶剂化物和酯。在一方面，药学上可接受的衍生物为药学上可接受的盐。在进一步的方面，药学上可接受的衍生物为溶剂化物和酯。在另一方面，药学上可接受的衍生物为溶剂化物。

本发明化合物的适宜生理学可接受的盐包括与生理学可接受的无机酸或有机酸形成的酸加成盐。这样的酸的实例包括盐酸、氢溴酸、硝酸、磷酸、

硫酸、磺酸例如甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸和对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、富马酸和马来酸。

本发明还涉及式(I)或式(IA)化合物的溶剂化物,例如水合物或与药学上可接受的溶剂的溶剂化物,所述溶剂包括,但不限于醇类例如乙醇、异丙醇,丙酮,醚,酯,例如乙酸乙酯。

本发明的化合物也可与其它治疗剂组合(combination)使用。因此,在另一个方面,本发明提供包含本发明的化合物或其药学上可接受的衍生物与其他治疗剂的组合。

当本发明的化合物或其药学上可接受的衍生物与第二种有效地抗相同疾病状态的治疗剂组合使用时,每种化合物的剂量可以不同于化合物单独使用时的剂量。本领域熟练技术人员可以很容易地知道适宜的剂量。应当理解,在治疗中需要使用的本发明化合物的数量将随所治疗疾病的性质和患者的年龄和病症而变,并且将最终由主治医师或兽医确定。本发明的化合物可与抗分娩剂或预防性药物组合使用。这些包括,但不限于 β -激动剂,例如特布他林或利托君,钙通道阻滞剂例如硝苯地平(nifedepine),非甾体抗炎药例如吲哚美辛,镁盐例如硫酸镁,其它催产素拮抗剂例如阿托西班,和黄体酮激动剂及制剂。此外,本发明的化合物可与下述物质组合使用: antenatal steroids, 包括倍他米松和地塞米松,前体维生素(prenatal vitamins),特别是叶酸补充剂(folate supplement),抗生素,包括但不限于氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸盐、甲硝唑、克林霉素和抗焦虑剂。

在一方面,上述组合可以药物制剂的形式存在,因而,包括上述定义的组合与药学上可接受的载体或赋形剂的药物制剂构成本发明的另一个方面。这样的组合的各个成分可以按任何常规途径顺序或同时以分开的或组合的药物制剂给药。

当顺序给药时,本发明的化合物或第二种治疗剂可首先给药。当同时给药时,该组合可以以相同或不同的药物组合物给药。

当在相同制剂中组合时,应当理解这两种化合物必须是稳定的,且彼此以及和制剂的其它组分之间是可相容的。当分开配制时,它们可以以任意方便的制剂提供,方便地以如本领域对这种化合物已知的方式提供。

式(I)和式(IA)化合物对大鼠和人子宫上的催产素受体有高亲和力,这可使用常规方法确定。例如,对大鼠子宫上催产素受体的亲和力可通过Pettibone

等人在Drug Development Research 30. 129-142 (1993)中的方法确定。本发明化合物也显示出对CHO细胞的人重组体催产素受体的高亲和力，这可使用Wyatt等人在Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2001 (11) p1301-1305中描述的方法方便地证实。

本发明的化合物显示出有利的药物代谢动力学特征，包括良好的生物利用度和低固有清除率。在一个方面，本发明的化合物显示出良好的效能和低固有清除率。在另一方面，本发明的化合物显示出低固有清除率。

因此，本发明的化合物在治疗或预防通过催产素作用介导的疾病和/或病症中是有用的。这种疾病和/或病症的实例包括预产期前分娩、痛经、子宫内膜异位和良性前列腺增生症(prostatic hyperplasia)。

所述化合物也可用于推迟在择期的剖腹产术或转移患者至三级护理中心之前的分娩、治疗性功能障碍(男性和女性)特别是早泄，肥胖症，进食障碍疾患，充血性心力衰竭，动脉压过高，肝硬化，肾炎或高眼压，强迫观念与行为疾病和神经精神病(neuropsychiatric disorders)。本发明的化合物也可用于提高动物例如农场牲畜的生育率。

因此，本发明提供了至少一个选自式(I)或式(IA)化合物及其药学上可接受的衍生物的化学实体，其用于治疗尤其是用于人或兽医的治疗，并特别地作为拮抗催产素受体上催产素作用的药物使用。

本发明也提供了至少一个选自式(I)或式(IA)化合物及其药学上可接受的衍生物的化学实体在制备用于拮抗催产素受体上催产素作用的药物中的用途。

根据另一个方面，本发明也提供了拮抗催产素受体上催产素作用的方法，包括给药需要它的患者拮抗量的至少一种选自式(I)或式(IA)化合物及其药学上可接受的衍生物的化学实体。

本领域技术人员应当理解，本文中涉及的治疗延伸到对确诊疾病或症状的预防及治疗。

应当进一步理解的是，本发明化合物用于治疗的需要量可根据接受治疗病症的性质、给药途径和患者的年龄和状态而改变，并最终由主治医师慎重考虑。然而，一般而言，用于成人治疗的剂量将一般在每天2至1000mg范围内，这取决于给药途径。

因此，对于肠胃外给药而言，每日剂量将典型地为每天2至50mg，在

一方面为每天 5 至 25mg。对于口服给药而言，每日剂量将典型地为每天 10 至 1000mg，例如每天 50 至 500mg。

所需剂量可存在于单剂量中或以每隔适当间隔给药的分份剂量中，例如每天 2、3、4 或更多个分剂量。

虽然本发明的化合物在治疗用途中可能以原料化学药而被使用，但是优选使活性成分作为药物制剂存在。

因此，本发明进一步提供了一种药物制剂，其包含至少一个选自式(I)或式(IA)化合物及其药学上可接受的衍生物的化学实体，与一种或多种其药学上可接受的载体一起，以及任选地其它治疗和/或预防成分。该载体在与制剂的其它成分相容及对其接受者无害这一意义上必须是“可接受的”。

本发明的组合物包括那些尤其配制成口服、含服、肠胃外、吸入或吹入、植入、阴道或直肠给药形式的组合物。

用于口服给药的片剂和胶囊可含有常规赋形剂例如，粘合剂，如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨醇、西黄蓍胶、淀粉的粘胶或聚乙烯吡咯烷酮；填充剂，如乳糖、蔗糖、微晶纤维素，玉米淀粉、磷酸钙或山梨醇；润滑剂，如硬脂酸镁、硬脂酸、滑石、聚乙二醇或二氧化硅；崩解剂，如马铃薯淀粉或淀粉羟乙酸钠，或湿润剂例如十二烷基硫酸钠。片剂可根据本领域众所周知的方法包衣。口服液体制剂可为例如水性或油性混悬剂、溶液乳剂、糖浆剂或酞剂的形式，或作为干燥产品而存在，其在使用前与水或其它适宜载体配制(constitution)。这种液体制剂可包含常规添加剂例如助悬剂，如山梨醇糖浆、甲基纤维素、葡萄糖/蔗糖糖浆、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶或氢化食用脂；乳化剂，如卵磷脂、去水山梨糖醇单油酸酯或阿拉伯胶；非水载体(可包括食用油)，如杏仁油、分馏(fractionated)椰子油、油脂、丙二醇或乙醇；增溶剂例如表面活性剂如聚山梨醇酯或其它试剂例如环糊精；及防腐剂，例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或抗坏血酸。也可将该组合物制成栓剂，例如包含常规栓剂基质例如可可脂或其它甘油酯。

用于含服(buccal)给药的组合物可为用常规方法制备的片剂或锭剂的形式。

根据本发明的组合物可被制成用于肠胃外的注射或连续输注给药形式。注射制剂可以在安瓿中以单位剂量形式存在，或与添加的防腐剂在多剂量容器中存在。该组合物可为例如在油或水性载体中的悬浮液、溶液、或乳剂的

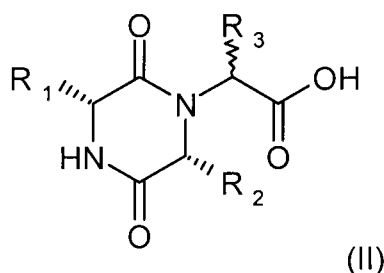
形式，并可含有配制制剂(formulatory agents)例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。或者，活性成分可以为粉末形式，在使用前与适合的载体，例如无菌、无热原的水配制。

根据本发明的组合物可包含 0.1-99%的活性成分，片剂和胶囊方便地为 1-50%，液体制剂为 3-50%。

本发明化合物的有利的药物代谢动力学特征易于使用用于测定生物活性化合物药物代谢动力学特征的常规方法来确定。

本发明的化合物及其药学上可接受的衍生物可通过下文描述的方法制备，所述方法构成了本发明的另一方面。在下述说明中，除非另有说明，所述基团如上述本发明化合物的定义。

因此，式(I)或式(IA)化合物可通过在用于由羧酸或其活性衍生物和胺制备酰胺的标准条件下，使羧酸(II)或其活性衍生物与胺 HNR_4R_5 反应制备得到，



其中，在羧酸(II)中， R_1 、 R_2 和 R_3 具有式(I)和式(IA)中定义的含义，且 R_3 处的手性为 *R* 或 *S* 或其混合物，在胺 HNR_4R_5 中， R_4 和 R_5 具有式(I)和式(IA)中定义的含义。

应当理解，由上述反应得到的式(I)或式(IA)化合物的非对映体混合物可使用本领域众所周知的标准拆分技术分离，例如柱色谱法。

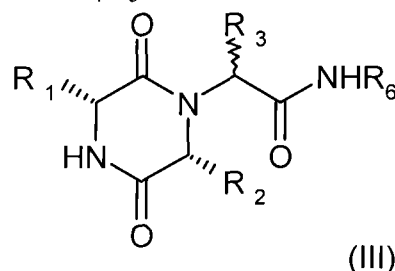
因此，式(I)或式(IA)的酰胺可通过下述方法制备：在非质子溶剂例如二氯甲烷中，任选地在叔胺例如三乙胺的存在下，将式(II)的羧酸用活化剂例如 BOP(苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐)、TBTU(2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐)、BOP-Cl(双(2-氧代-3-咪唑烷基)膦酰氯(phosphinic chloride))、草酰氯或 1,1'-羰基二咪唑处理，并然后使由此形成的反应产物，即式(II)化合物的活性衍生物与胺 HNR_4R_5 反应。

另外，式(I)或式(IA)的酰胺可通过在非质子溶剂例如四氢呋喃中，使由羧酸(II)衍生的混合酸酐与胺 HNR_4R_5 反应来制备。方便地，所述反应在低温

下进行, 例如在 25°C 至 -90°C, 更方便地在约 -78°C。

混合酸酐可方便地通过非质子溶剂例如乙酸乙酯中, 在叔有机碱例如三烷基胺如三乙胺存在下, 并在低温例如 25°C 至 -90°C, 方便地在约 -78°C 下, 使式(II)的羧酸与适宜的酰基氯例如新戊酰氯反应来制备。

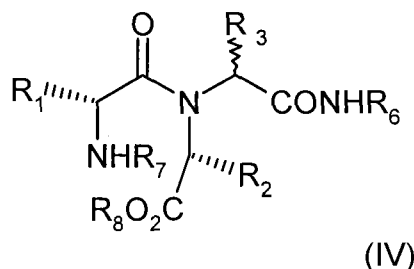
式(I)或式(IA)的化合物也可通过下述方法制备: 在适宜的溶剂例如二氯甲烷中, 使其中 R_1 、 R_2 和 R_3 具有式(I)和式(IA)中定义的含义, 且 R_6 为 2-羟基苯基的式(III)化合物与 1,1'-羰基二咪唑或 1,1'-硫代羰基二咪唑反应, 然后使如此形成的产物与胺 HNR_4R_5 反应。



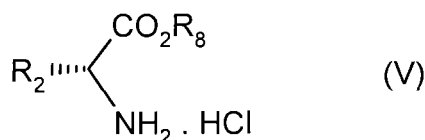
式(II)化合物可以由其中 R_6 为 2-羟基苯基的式(III)化合物通过与 1,1'-羰基二咪唑或 1,1'-硫代羰基二咪唑在适宜的溶剂如二氯甲烷中反应, 然后使如此形成的产物与含水丙酮反应而制备。

其中 R_6 为 2-羟基苯基的式(III)化合物可通过使用氢气和钯催化剂, 由其中 R_6 为 2-苄氧基苯基的相应的式(III)化合物氢解来制备。

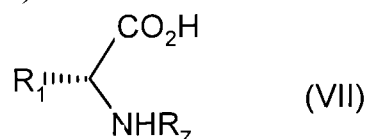
其中 R_6 为 2-苄氧基苯基的式(III)化合物可通过在溶剂如二噁烷中, 由其中 R_1 、 R_2 和 R_3 具有式(I)和式(IA)中定义的含义、 R_6 为 2-苄氧基苯基、 R_7 为叔-丁氧羰基和 R_8 为 C_{1-6} 烷基的式(IV)化合物与盐酸反应, 随后用碱如三乙胺的甲醇溶液处理。



式(IV)化合物可通过下述方法制备: 在三乙胺存在下, 且在溶剂例如三氟乙醇中, 使氨基酯盐酸化物(V)与其中 R_3 具有式(I)和式(IA)中定义的含义的醛 R_3CHO (VI)反应,



在式(V)中, R_1 具有式(I)和式(IA)中定义的含义, 且 R_8 为 C_{1-6} 烷基; 然后, 在溶剂例如三氟乙醇中, 使得到的产物与其中 R_1 具有式(I)和式(IA)中定义的含义、且 R_7 为叔-丁氧羰基或苄氧羰基的式(VII)化合物和其中 R_6 为 2-苄氧基苯基的异氰化物 CNR_6 (VIII) 反应。



其中 R_6 为 2-苄氧基苯基的式(III)化合物可按下述方法制备: 在二噁烷中, 使其中 R_1 、 R_2 和 R_3 具有式(I)和式(IA)中定义的含义、 R_6 为 2-苄氧基苯基和 R_7 为叔-丁氧羰基的式(IV)化合物与盐酸反应, 然后在溶剂例如二氯甲烷中与三乙胺反应。

其中 R_7 为叔-丁氧羰基的式(IV)化合物可通过上述途径, 使用其中 R_7 为叔-丁氧羰基的式(VII)化合物来制备。

R_2 取代基为 1-甲基丙基, 和其中 R_2 为 1-甲基丙基的具有(S)或(R)构型的式(I)和式(IA)化合物可以通过由其中 R_2 基团具有所需的(S)或(R)构型的氨基酯盐酸化物(V)开始来制备。

其中 R_1 具有式(I)和式(IA)中定义的含义、且 R_8 为 C_{1-6} 烷基的氨基酯盐酸化物(V)可通过 Schmidt, U; Kroner, M; Griesser, H. Synthesis (1989), (11), 832-5 中的方法, 由相应的市售氨基酸 D-别异亮氨酸或 D-异亮氨酸制备。

其中 R_3 具有式(I)和式(IA)中定义的含义的醛 $R_3\text{CHO}$ (VI)可通过 V. Auwers; Lange; Chem.Ber.; 55; 1922; 1141, 1157 中所述的方法, 由市售的其中 R_3 具有式(I)和式(IA)中定义的含义的溴代化合物 $R_3\text{Br}$ 制备。或者, 醛 $R_3\text{CHO}$ (VI)可通过 Halley, Frank; Sava, Xavier. Synthesis of 5-cyanoindazole and 1-methyl and 1-aryl-5-cyanoindazoles. Synthetic Communications (1997), 27(7), 1199-1207 中所述的方法, 由市售的其中 R_3 具有式(I)和式(IA)中定义的含义的腈化合物 $R_3\text{CN}$ 制备。

其中 R_1 具有式(I)和式(IA)中定义的含义、且 R_7 为叔-丁氧羰基的氨基酸衍生物(VII)为市售获得的; 其中 R_1 具有式(I)和式(IA)中定义的含义、且 R_7 为苄氧羰基的氨基酸衍生物(VII)可在溶剂例如二噁烷的水溶液中, 通过用 N-(苄氧羰基氧基)琥珀酰亚胺和三乙胺处理相应的市售氨基酸 (R)- $R_1\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ (IX) 制备, 其中 R_1 具有式(I)和式(IA)中定义的含义。

异氰化物 CNR_6 (VIII)可根据文献方法制备(Obrecht, Roland; Herrmann, Rudolf; Ugi, Ivar, *Synthesis*, 1985, 4, 400-402)。

式(I)和式(IA)化合物的酸加成盐可通过常规方法制备,例如通过将化合物在适宜溶剂例如二氯甲烷或丙酮中的溶液用适宜无机或有机酸的溶液处理来制备。

下述实施例用于阐述本发明的实施方案,而不对其构成限制。

试验

缩写

DIBAL-二异丁基氯化铝

命名法

所有的中间体和实施例使用 ISISDraw 中的 ACD Name Pro 6.02 来命名。

一般性纯化和分析方法

分析 HPLC 是在 Supelcosil LCABZ+PLUS 柱(3.3 cm x 4.6 mm ID)上进行的,用 0.1% HCO_2H 和 0.01 M 醋酸铵的水溶液(溶剂 A),和 0.05% HCO_2H 和 5%水的乙腈溶液(溶剂 B)洗脱,使用洗脱梯度 1, 0-0.7 分钟 0%B, 0.7-4.2 分钟 0%-100%B, 4.2-5.3 分钟 100%B, 5.3-5.5 分钟 0%B, 或者洗脱梯度 2, 0-0.7 分钟 0%B, 0.7-4.2 分钟 0%-100%B, 4.2-4.6 分钟 100%B, 4.6-4.8 分钟 0%B, 流速为 3 ml/分钟。保留时间(Rt)为按分钟计。用 Waters ZQ 2000 质谱仪记录质谱(MS),采用电喷雾正[ES+ve 得到 MH^+ 和 $\text{M}(\text{NH}_4)^+$ 分子离子]或电喷雾负[ES-ve, 得到 $(\text{M}-\text{H})^-$ 分子离子]模式。使用四甲基硅烷作为外标,使用 Bruker DPX 400MHz 波谱仪记录 ^1H NMR 谱。

使用二氧化硅柱(cartridges)纯化指使用 Presearch 提供的有 Redisep®柱的 Combiflash® Companion™ 进行的色谱。疏水玻璃料(frit)是指由 Whatman 出售的过滤管。SPE(固相萃取)涉及使用 International Sorbent Technology Ltd 出售的柱。TLC(薄层色谱)涉及使用 Merck 出售的涂敷有硅胶 60 F₂₅₄ 的 TLC 板。

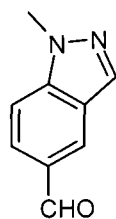
中间体 1 (方法 A)

1-甲基-1H-吲唑-5-甲醛(carbaldehyde)

在氮气下, 将 2.0 M 正丁基氯化镁的四氢呋喃溶液(3.05ml)加入到甲苯(20ml)中, 并冷却至 -10°C 。向其中加入 1.6M 的正丁基锂的己烷溶液(7.63ml), 1 小时后, 将反应混合物冷却至 -30°C 。向其中加入 5-溴-1-甲基-1H-吲唑¹(2.35g)的四氢呋喃(10ml)溶液, 并将反应混合物温热至 -10°C 。1 小时后, 加入二甲基甲酰胺(5ml), 并将反应混合物在 -10°C 下搅拌 1 小时。将该反应使用 2N 盐酸(20ml)终止, 并将该反应温热至室温。30 分钟后, 将反应混合物用饱和的碳酸氢钠水溶液碱化, 并然后使用乙酸乙酯(2 x 80ml)萃取。将有机相用碳酸氢钠溶液(2 x 100ml)、并然后用 10%氯化锂的水溶液(2 x 100ml)、并然后用盐水洗。将有机相经无水硫酸镁干燥, 并真空蒸发。将残余物加于二氧化硅 Redisep®柱(120g)上, 并用 10-30%乙酸乙酯的环己烷溶液洗脱。合并所需的级分(fractions), 并真空蒸发, 得到白色固体的 1-甲基-1H-吲唑-5-甲醛(1.43g, 80%)。

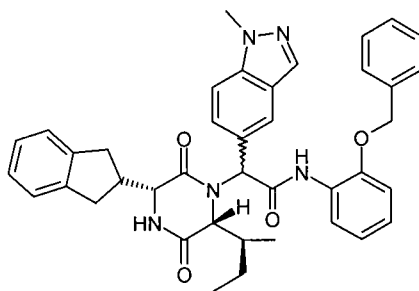
HPLC Rt = 2.2 分钟(梯度 1); m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 161$ (梯度 1)

中间体 1 (方法 B)

1-甲基-1H-吲唑-5-甲醛

在氮气下在 -70°C 下, 用大约 20 分钟的时间向 1-甲基-1H-吲唑-5-腈²(7g)的无水甲苯(300ml)溶液中滴加 1.5M 的 DIBAL 的甲苯溶液(59.4 ml)。使反应混合物温热至 -60°C , 并在此温度下搅拌 4 小时, 除去冷却浴, 并然后通过滴加乙酸(30ml)(小心气体的放出)来终止。加入水(240ml), 并将混合物剧烈搅拌 30 分钟, 并然后用乙酸乙酯(200ml)萃取。将有机相用水(100ml)并然后用盐水(100ml)洗, 经无水硫酸镁干燥, 过滤并真空浓缩, 得到淡黄色固体的 1-甲基-1H-吲唑-5-甲醛(6.8g, 95%), 其在所有方面都与由上述的 5-溴-1-甲基-1H-吲唑得到的 1-甲基-1H-吲唑-5-甲醛相一致。

中间体 2

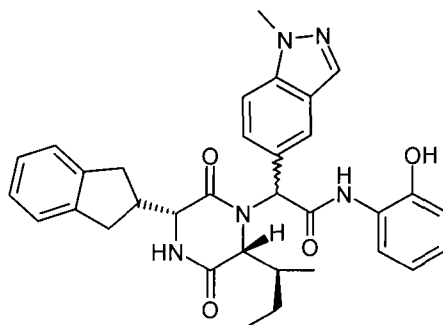


2-{(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-{2-[(苯基甲基)氧基]苯基}乙酰胺

将 1-甲基-1H-吡唑-5-甲醛(中间体 1) (1.66g)和 D-别异亮氨酸甲酯盐酸化物(1.88g)溶于 2,2,2-三氟代乙醇(30ml)和甲醇(30ml)中。向其中加入三乙胺(1.44ml), 并将反应混合物在室温下在 N₂ 下搅拌 3.5 小时。将(2R)-2,3-二氢-1H-茛-2-基({[(1,1-二甲基乙基)氧基]羰基}氨基)乙酸(3.01g)和 2-[(苯基甲基)氧基]苯基异氰化物(2.16g)加入到反应混合物中, 并将溶液在室温下静置 3 天。真空除去溶剂。将残余物溶于二氯甲烷中, 并真空蒸发。将残余物溶于 4N 氯化氢的二噁烷溶液中(20ml), 并将反应混合物搅拌 1 小时。真空除去溶剂, 并与甲醇 x3 共蒸发。将残余物溶于甲醇(70ml)中。向其中加入三乙胺(6ml), 同时将烧瓶放置在干冰上。将反应混合物在室温下静置 20 小时。真空蒸发溶剂, 并将残余物由甲醇(x1)和二氯甲烷(x1)浓缩。将残余物在乙酸乙酯和碳酸氢钠水溶液之间分离。将有机相用碳酸氢钠水溶液、水、盐水洗, 并经无水硫酸镁干燥。真空除去溶剂, 并将残余物加于二氧化硅柱(120g)上。将其用 30-70%乙酸乙酯的环己烷溶液洗脱。合并所需的级分, 并真空蒸发, 得到黄色固体的 2-{(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-{2-[(苯基甲基)氧基]苯基}乙酰胺(4.15g, 62%)。

HPLC Rt = 3.62, 3.66 分钟(梯度 1); m/z [M+H]⁺ = 656。

中间体 3 (方法 A)



2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-(2-羟基苯基)-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)乙酰胺

将 2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基)-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-N-2-[(苯基甲基)氧基]苯基}乙酰胺(中间体 2)(0.20g)溶于乙醇(20ml)中,并在披钨木炭(湿的 10%Pd,50mg)上氢化 20 小时。过滤除去催化剂,并用乙醇/二氯甲烷(1:1 v/v)洗。将合并的洗出液和滤液真空蒸发,得到白色固体的 2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基)-N-(2-羟基苯基)-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)乙酰胺(0.19g, 100%)。

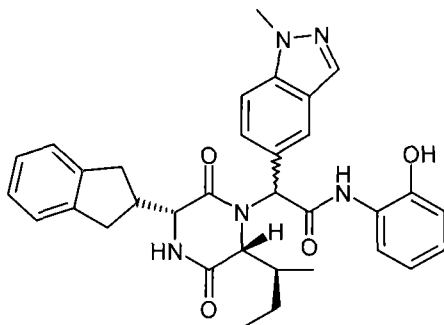
中间体 3(方法 A)

2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-(2-羟基苯基)-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)乙酰胺

将 2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基)-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-N-2-[(苯基甲基)氧基]苯基}乙酰胺(3.5g)溶于乙醇(200ml)中,并在披钨木炭(湿的 10%Pd, 350mg)上氢化 5 小时。过滤除去催化剂,洗涤,并真空浓缩滤液。将此残余物在 Redisep®二氧化硅柱(120g)上纯化,用 50-90%乙酸乙酯的环己烷溶液洗脱,得到白色固体的 2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基)-N-(2-羟基苯基)-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)乙酰胺(1.54g)。

HPLC Rt = 3.3 分钟(梯度 1); m/z [M+H]⁺ = 566。

中间体 3(方法 B)

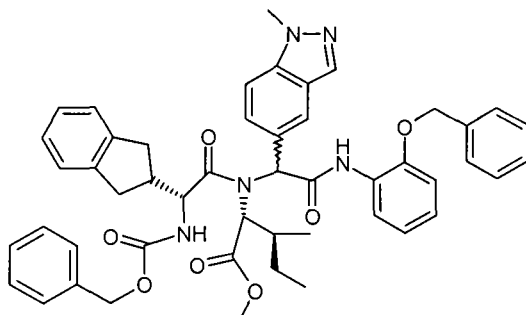


2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-(2-羟基苯基)-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)乙酰胺

将 N-[(2R)-2-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-2-([(苯基甲基)氧基]-羰基)氨基]乙酰基]-N-[1-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-2-氧代-2-({2-[(苯基甲基)氧基]苯基}氨基)乙基]-D-别异亮氨酸甲酯(中间体 4)(22.6g, 27.5mmol)溶于乙醇(750mL)和乙酸(70mL)中, 并将混合物在室温下在 1 大气压 H_2 下通过 10%钯碳(Degussa 型)(7.75g, 用水 1:1 w:w 润湿)氢化 3.5 小时。过滤反应混合物, 然后减压蒸发, 并将残余物分配于二氯甲烷(400ml)和饱和的碳酸氢钠水溶液(400ml, 小心 CO_2)中。将有机相通过疏水玻璃料分离, 并减压蒸发, 得到一对非对映体的标题化合物(15g)。

HPLC Rt = 3.27 分钟(梯度 2); $m/z [M+H]^+ = 566$

中间体 4



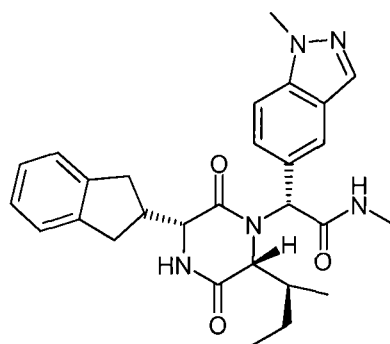
N-[(2R)-2-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-2-([(苯基甲基)氧基]-羰基)氨基]乙酰基]-N-[1-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-2-氧代-2-({2-[(苯基甲基)氧基]苯基}氨基)乙基]-D-别异亮氨酸甲酯

将 1-甲基-1H-咪唑-5-甲醛(5.78g, 34mmol)和(D)-别异亮氨酸甲酯盐酸化物(6.17g, 34mmol)在 2,2,2-三氟代乙醇(100mL)中用三乙胺(4.74mL, 34mmol)处理, 并将混合物在氮气下在室温下静置 18 小时。加入(2R)-[(苄氧基羰基)氨基](2,3-二氢-1H-茛-2-基)乙酸(11.05g, 34mmol)和 2-苄氧基苯基异

睛(7.52g, 36 mmol), 并将混合物在室温下在氮气下搅拌 3 天。减压浓缩混合物, 然后在乙酸乙酯(750mL)和水(500mL)之间分配。将水相用乙酸乙酯(250mL)反萃取, 并将合并的有机萃取物用饱和的氯化钠溶液(250mL)洗, 经无水硫酸镁干燥, 过滤并减压蒸发, 得到粗产物(29.6g)。将其在 Redisep® 二氧化硅柱(330g)上纯化, 用 10-50% 乙酸乙酯的环己烷溶液洗脱, 得到 22.6g 的一对非对映体的标题化合物。

HPLC Rt = 4.13 分钟(梯度 2); m/z [M+H]⁺ = 822.6

实施例 1



(2R)-2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-甲基-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)乙酰胺

将 2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-(2-羟基苯基)-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)乙酰胺(中间体 3)(0.5g) 和 1,1'-羰基二咪唑(0.23g)溶于干燥的二氯甲烷(10ml)中, 并在室温下在 N₂ 下静置 3 小时。加入 2.0M 甲胺的四氢呋喃溶液(2.2ml), 并将反应混合物静置 3 小时。真空蒸发反应混合物。将残余物加于二氧化硅柱(35g)上, 并用乙酸乙酯至 10% 甲醇的乙酸乙酯溶液进行梯度洗脱。真空蒸发所需的级分, 并将残余物使用 SCX SPE 柱(5g)进一步纯化, 用甲醇洗, 并浓缩甲醇, 得到白色固体的(2R)-2-((3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-甲基-2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)乙酰胺。

HPLC Rt = 2.9 分钟(梯度 1); m/z [M+H]⁺ = 488。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.99 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.47 (dd, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.25-7.12 (m, 4H), 6.55 (d, 1H), 6.12 (q, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.10 (s, 3H), 4.06 (dd, 1H), 3.96 (d, 1H), 3.22-3.05 (m, 3H), 2.97 (m, 1H), 2.85 (d, 3H), 2.76 (dd, 1H), 1.99 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.15 (m, 1H), 1.08 (d, 3H), 0.93 (t, 3H)。

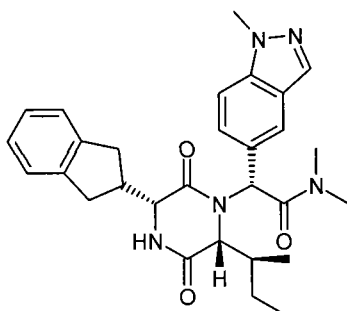
实施例 1

(2R)-2-{(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茚-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)乙酰胺

在氮气下，将 2-{(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茚-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-(2-羟基苯基)-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)乙酰胺 (15g) 和 1,1'-羰基二咪唑 (6.88g) 溶于干燥的二氯甲烷 (300mL) 中，并在室温下搅拌四小时。用 10 分钟的时间加入 2.0M 甲胺的四氢呋喃溶液 (66.3mL)，然后将反应混合物搅拌 30 分钟，然后将反应混合物静置 18 小时。将反应混合物用二氯甲烷 (200mL) 稀释，并用 0.1M HCl (400mL) 洗。将有机萃取物通过疏水玻璃料分离，并将含水萃取液用另外的二氯甲烷 (200ml) 洗。真空浓缩合并的有机萃取物，并将残余物加到 redisep® 二氧化硅柱 (339g) 上，并用乙酸乙酯至 10% 甲醇的乙酸乙酯溶液进行梯度洗脱。真空蒸发所需的级分，并将残余物使用 SCX-2 SPE 柱 (50g) 进一步纯化，用甲醇调节该柱，然后装填和用甲醇来洗脱该化合物。在浓缩相关级分后，得到白色固体的 (2R)-2-{(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茚-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N-甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)乙酰胺 (4.1g, 32%)。

HPLC Rt = 2.9 分钟 (梯度 1); m/z [M+H]⁺ = 488。

实施例 2



(2R)-2-{(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茚-2-基)-6-[(1S)-1-甲基丙基]-2,5-二氧代-1-哌嗪基}-N,N-二甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)乙酰胺

由中间体 3 和二胺类似制备标题化合物。

HPLC Rt = 3.0 分钟; m/z [M+H]⁺ = 502

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.02 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.53-7.44 (m, 2H), 7.30-7.15

(m, 4H), 6.45 (s, 1H), 6.20 (d, 1H), 4.16-4.10 (m, 5H), 3.19-3.11 (m, 3H), 2.99-2.85 (m, 1H), 2.96 (s, 3H), 2.87 (s, 3H), 2.75 (dd, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.05 (m, 1H), 0.78 (m, 1H), 0.60 (t, 3H), 0.39 (d, 3H).

Ref:

1. V. Auwers; Lange; Chem. Ber.; 55; 1922; 1141, 1157.

2: Halley, Frank; Sava, Xavier. Synthesis of 5-cyanoindazole and 1-methyl and 1-aryl-5-cyanoindazoles. Synthetic Communications (1997), 27(7), 1199-1207.

生物活性

在下文描述的所有试验中测试本发明的实施例 1 和 2。每个化合物的结果显示在下表 1 中。该表还包括用于比较的两个化合物 X 和 Y。

试验 1

使用 FLIPR 测定对人催产素-1 受体的拮抗剂亲和力

细胞培养

将稳定地表达重组体人催产素-1(hOT)受体的粘着性(Adherent)中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, 保存在 DMEM:F12 培养基(Sigma, cat no D6421)中培养, 所述培养基补充 10%热灭活的胎小牛血清(Gibco/Invitrogen, cat. no.01000-147)、2mM L-谷氨酰胺(Gibco/Invitrogen, cat. no. 25030-024)和 0.2mg/ml G418 (Gibco/Invitrogen, cat no. 10131-027)。在 37°C 下, 在 95%:5% 空气: CO₂ 中使细胞以单层生长, 使用 TrypLE™ Express(Gibco/Invitrogen, cat no. 12604-013)每 3-4 天传代。

使用 FLIPR™测定[Ca²⁺]_i

在如上述培养基中以每孔 10,000 细胞的密度将 CHO-hOT 细胞接种于黑壁净底(black walled clear-base)384-孔板(Nunc)中, 保存过夜(95%:5% 空气:CO₂, 在 37°C)。除去培养基后, 在 37°C, 在包含丙磺舒(probenacid)(0.7mg/ml)、细胞质钙指示剂、Fluo-4 (4μM; Teflabs, USA)和淬灭剂亮黑(Brilliant Black) (250μM; Molecular Devices, UK)的 Tyrode's 培养基(NaCl, 145mM; KCl, 2.5mM; HEPES, 10mM; 葡萄糖, 10mM; MgCl₂, 1.2mM;

CaCl₂, 1.5mM)中培养细胞 1 小时。然后在 37°C 下, 仅用缓冲液或用包含 OT 拮抗剂的缓冲液再培养细胞 30 分钟, 随后在加入次最大浓度的催产素(EC80)之前或之后将其放置入 FLIPR™(Molecular Devices, UK)中来检测细胞的荧光($\lambda_{\text{ex}} = 488\text{nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 540\text{nm}$)。

数据分析

使用 Activity Base Version 5.0.10 分析采用 FLIPR 的功能性反应。

试验 2

催产素结合试验

制品

由表达人重组体催产素受体的 CHO 细胞制备膜。在 -70°C 以等分试样冷冻该膜制品直到使用时。

结合试验方案

在没有(全部结合)或有(非特异性结合)1 μM 未标记的催产素和增加浓度的实施例 1 和 2 的化合物或比较化合物下, 在 200 μl 包含~2.4 nM 的[3H]-催产素的试验缓冲液(50 mM Tris, 10 mM MgCl₂ 和 0.1%牛血清白蛋白, pH 7.5)中培养膜(~50 μg)。在室温下进行培养 60 分钟。用 3 ml 冰冷的缓冲液终止反应, 通过 Whatman GF/C 滤纸过滤, 该滤纸在 0.3%聚氮丙啶中预浸。用 3 ml 缓冲液洗涤滤纸(filter)4 次, 使用 Brandel 细胞收集器收集。将滤纸在 3 ml Ready Safe 闪烁液(Beckman)中计数。

特异性结合占总结合的约 90%。

数据分析

使用非线性回归分析(GraphPad)由竞争性结合试验来确定 IC₅₀ 值, 使用 Cheng 和 Prusoff, 1974 的方法转化为 Ki。数据以平均值记录。

试验 3

微粒体中体外固有清除率(intrinsic clearance)的测定

用于培养的 NADP 再生缓冲液为在试验当天新制备的。在每 1mL 2% 的碳酸氢钠中，其包含 7.8mg 葡萄糖-6-磷酸盐(一钠盐)、1.7mg NADP 和 6 单位的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。在 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液中制备微粒体(人，女性；短尾猴，雌性；狗，雌性；大鼠，雌性)，其包含 0.625mg 蛋白/mL。

除非另有说明，通过 Tecan Genesis 150/8 RSP 进行所有的后续步骤。1.25mM 所述化合物的储备溶液是在乙腈/水(1:1)中制备的。将 25 μ L 的 1.25mM 储备溶液加入到 600 μ L 的乙腈/水(1:1)中，得到 50 μ M 溶液。对于每类而言，将 50 μ M 溶液(10 μ L)加入到微量培养板(Porvair, 96 深孔，正方形)上的微粒体(790 μ L)中。

将 400 μ L 包含所述化合物的微粒体溶液转移到微量培养板(Porvair, 96 深孔，圆形)上，在 37°C 预加热 5 分钟，然后开始培养。通过向预加热的微粒体中加入 100 μ L 的 NADP 再生体系来开始所有的培养。在 37°C，在 Techne 加热块(heating block)中培养混合物。0、3、6、12 和 30 分钟培养后，采集 20 μ L 等分试样，并加入到 100 μ L 包含内标的乙腈中。

为了确定代谢速率，以 0.5 μ M 的化合物浓度和 0.5mg/mL 的蛋白质浓度进行培养。培养液中溶剂的浓度为 0.5%。

通过 LC/MS/MS 确定试验化合物的浓度；结果以分析物：内标峰面积比表示。

通过使用 Excel 对浓度-时间曲线拟合单指数式衰减来计算消除(disappearance)速率，使用下式计算固有清除率：

$$Cl_i = \frac{[\text{消除速率(1/分钟)} \times 52.5\text{mg 蛋白/g 肝脏}]}{0.5\text{mg 蛋白/mL}}$$

结果

在上述试验中测试了本发明的实施例 1 和 2 以及两个比较化合物(比较化合物 X = (2R)-2-[(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-异丁基-2,5-二氧代哌嗪-1-基]-2-(1H-吡唑-5-基)-N,N-二甲基乙酰胺(WO 03/053443 中的实施例 172)和比较化合物 Y=(2R)-2-(2,4-二氟苯基)-2-[(3R,6R)-3-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)-6-异丁基-2,5-二氧代哌嗪-1-基]-N,N-二甲基乙酰胺(WO 03/053443 中的实施例 8)，除了在试验 1 和 2 中没有测试比较化合物 X。

然而，在试验 1 和 2 中测试了比较化合物 Y，并显示出与本发明化合物 1 和 2 类似的效能，事实上，这些化合物中的每个都显示出 8.5 至 8.7 的 $\text{fpKi}'\text{s}$ (试验 1)，以及 9.9 至 10.4 的 $\text{pKi}'\text{s}$ (试验 2)。

然而，当与比较化合物 X 和 Y 比较时，在微粒体中体外固有清除率(试验 3)方面，本发明的化合物表现出令人惊奇的改善。

表 1

	试验 3-微粒体 Cl (ml/min/g)			
	大鼠	狗	短尾猴	人
比较化合物 X	++	+++	+++++	+++++
比较化合物 Y	+	+	++++	+++
实施例 1	+	+	++	+
实施例 2	+	+	++	+

表 1 的注释

+ 对应于 1-8 ml/min/mg

++ 对应于 9-15 ml/min/mg

+++ 对应于 16-20 ml/min/mg

++++ 对应于 21-30 ml/min/mg

+++++ 对应于 > 31 ml/min/mg