

[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 200780032762.8

[51] Int. Cl.

C07D 403/12 (2006.01)
C07D 207/273 (2006.01)
C07D 317/72 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)

[43] 公开日 2009年8月19日

[11] 公开号 CN 101511822A

[22] 申请日 2007.7.26

[21] 申请号 200780032762.8

[30] 优先权

[32] 2006.7.28 [33] US [31] 60/834,235

[32] 2007.3.21 [33] US [31] 60/896,026

[32] 2007.7.25 [33] US [31] 11/782,704

[86] 国际申请 PCT/US2007/074438 2007.7.26

[87] 国际公布 WO2008/014381 英 2008.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2009.3.4

[71] 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 M·G·杨 R·J·榭尼

M·D·伊思特盖特

J·穆斯尔希丁诺格卢

S·J·普拉沙德 肖自力

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

权利要求书5页 说明书129页 附图16页

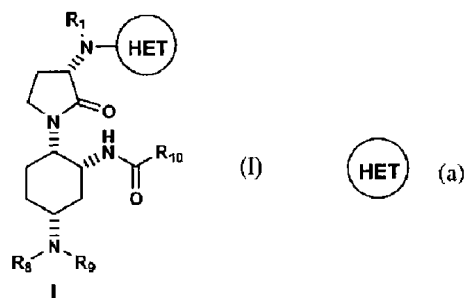
[54] 发明名称

趋化因子受体活性调节剂及其晶型和制法

[57] 摘要

本发明提供 MCP-1 受体活性的新颖拮抗剂或部分激动剂/拮抗剂: N - ((1R, 2S, 5R) - 5 - (异丙基(甲基)氨基) - 2 - ((S) - 2 - 氧代 - 3 - (6 - (三氟甲基)喹唑啉 - 4 - 基氨基)吡咯烷 - 1 - 基)环己基)乙酰胺或其药学上可接受的盐、溶剂合物或前体药物, 其具有所需药理学特性的令人意外的组合; 还提供本发明化合物的结晶型式及; 含有它们的医药组合物以及使用它们作为药剂以治疗炎症性疾病、过敏性、自身免疫、代谢、癌症和/或心血管疾病。 本公开内容还提供制备式(I)化合物的方法, 该化合物包括 N - ((1R, 2S, 5R) - 5 - (异丙基(甲基)氨基) - 2 - ((S) - 2 - 氧代 - 3 - (6 - (三氟甲基)喹唑啉 - 4 - 基氨基)吡咯烷 - 1 - 基)环己基)乙酰胺: 其中 R¹、R⁸、R⁹、R¹⁰和上式(a)均如本文中所述。 本文还提供可用于所述方法的中间体的化

合物。



1. 一种化合物，N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，或其药学上可接受的盐。

2. 权利要求1的化合物，其为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺或其药学上可接受盐的结晶型式。

3. 权利要求1-2的结晶型式，其包括N-2型式。

4. 权利要求1-3的结晶型式，其特征为基本上等于下列的单位晶胞参数：

晶胞尺寸：

$$a = 11.8427(3)$$

$$b = 18,1503(7)$$

$$c = 12.7923(4)$$

$$\alpha = 90$$

$$\beta = 105.362(2)$$

$$\gamma = 90$$

空间群 $P2_1$

分子/单位晶胞 2

其中所述晶体是在约+22°C的温度下。

5. 权利要求1-4的结晶型式，其特征为包含三个或更多个2 θ 值(CuK α λ = 1.541Å)的粉末x-射线衍射图，该2 θ 值选自7.2、8.7、9.7、12.5、12.8、13.3、16.0、16.6、18.2和18.8，在约22°C的温度下。

6. 权利要求1-5的结晶型式，其进一步特征为包含四个或更多个2 θ 值(CuK α λ = 1.541Å)的粉末x-射线衍射图，该2 θ 值选自7.2、8.7、9.7、12.5、12.8、13.3、16.0、16.6、18.2和18.8，在约22°C的温度下。

7. 权利要求1-6的结晶型式，其特征为基本上如列示于表7中的部分原子坐标。

8. 权利要求1-7的结晶型式，其具有基本上根据图2的粉末x射线衍射图。

9. 一种药物组合物，其包含如权利要求1-8的化合物和药学上可接受的载体或稀释剂。

10. 在哺乳动物中治疗疾病的方法，该方法包括给该哺乳动物施用治疗有效量的权利要求1-9的化合物，其中该疾病选自糖尿病、肥胖、代谢综合症、中风、神经性疼痛、缺血性心肌病、牛皮癣、高血压、硬皮病、骨关节炎、动脉瘤、发热、心血管疾病、克罗恩氏病、充血性心力衰竭、自身免疫疾病、HIV感染、与HIV有关的痴呆症、牛皮癣、特发性肺纤维变性、移植物动脉硬化、物理或化学诱导的脑部创伤、炎性肠疾病、肺泡炎、结肠炎、系统性红斑狼疮、肾毒血清肾炎、肾小球性肾炎、哮喘、多发性硬化、动脉粥样硬化、血管炎、易受伤害性斑块、风湿性关节炎、再狭窄、静脉新血管内膜增生、渗析-移植物新血管内膜增生、动脉-静脉旁路血管内膜增生、器官移植、慢性同种异体移植肾病和癌症。

11. 权利要求10的方法，其中该疾病选自糖尿病、肥胖、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、肾小球性肾炎、多发性硬化、动脉粥样硬化、再狭窄和器官移植。

12. 权利要求10-11的方法，其中该疾病选自多发性硬化、动脉粥样硬化、克罗恩氏病和糖尿病。

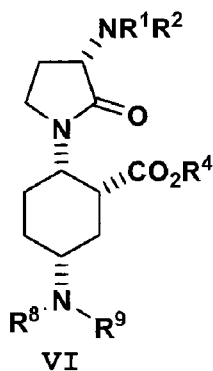
13. 权利要求10-12的方法，其中该疾病为糖尿病。

14. 权利要求10-12的方法，其中该疾病为动脉粥样硬化。

15. 权利要求10-12的方法，其中该疾病为克罗恩氏病。

16. 权利要求10-12的方法，其中该疾病为多发性硬化。

17. 制备具有下式(VI)的化合物或其盐的方法：

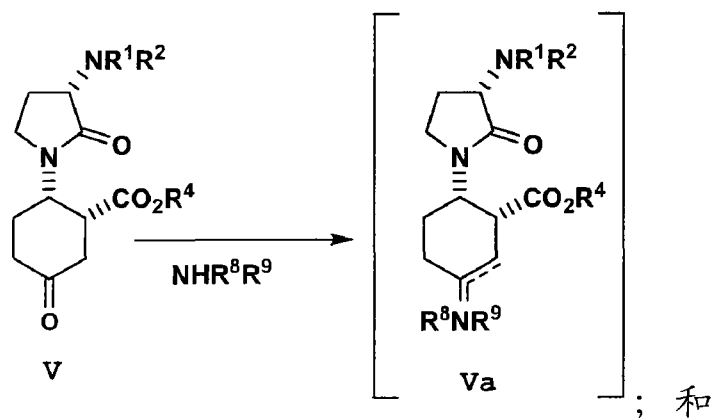


该方法包括：

使式V化合物与式NH(R⁸)(R⁹)的胺进行还原性胺化，得到式VI化合

物，所述还原性胺化包括以下步骤：

(a)将胺与脱水剂在温度约-20°至约+50°C下，添加至在非质子性溶剂中的式V化合物中，以形成式Va的亚胺/烯胺化合物；



(b)以氢气压力处理式Va的亚胺/烯胺化合物与铂催化剂5% Pt/S/C的溶液，得到式VI酯化合物；

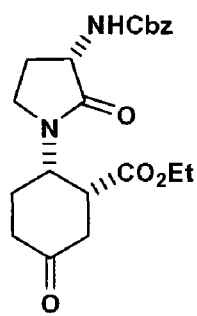
其中：

R_1 和 R_2 独立地为氢或选自以下的胺-保护基团：BOC、Cbz或苄基；

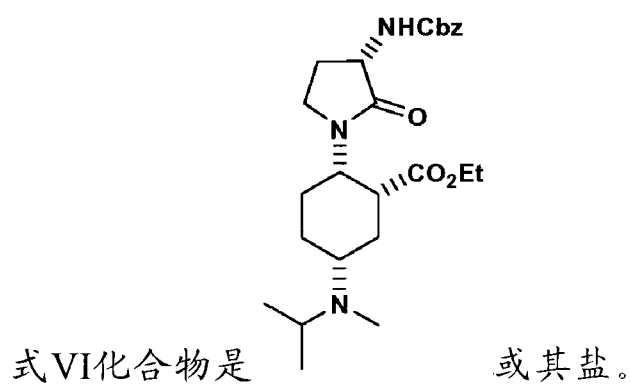
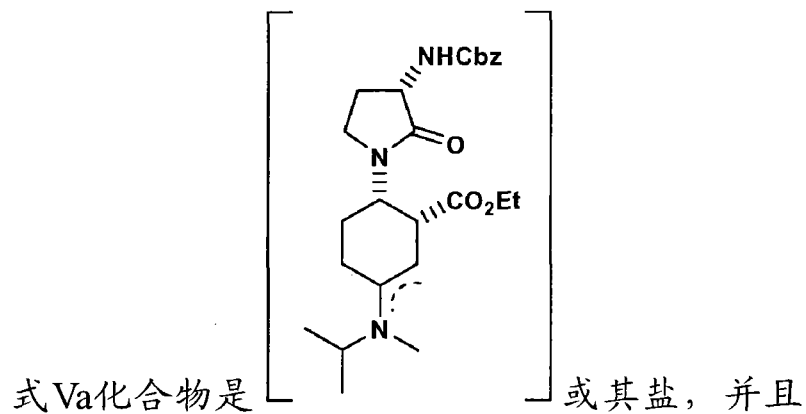
R_4 为 C_{1-6} 烷基；并且

R_8 和 R_9 独立地为氢或 C_{1-6} 烷基。

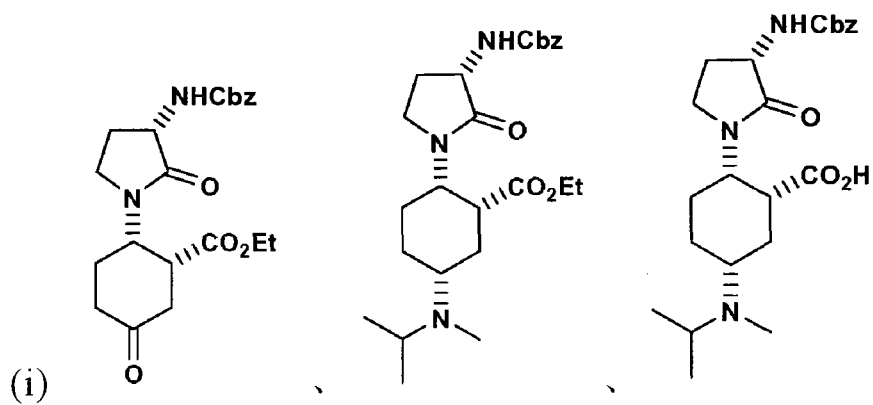
18. 权利要求17的方法，其中：

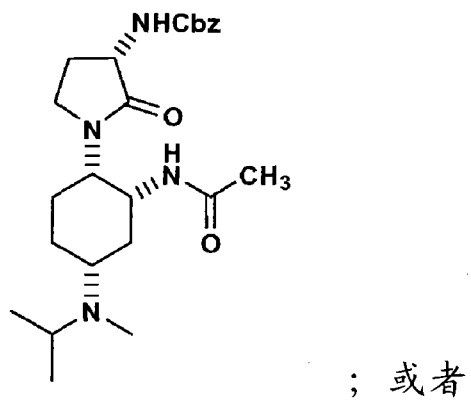
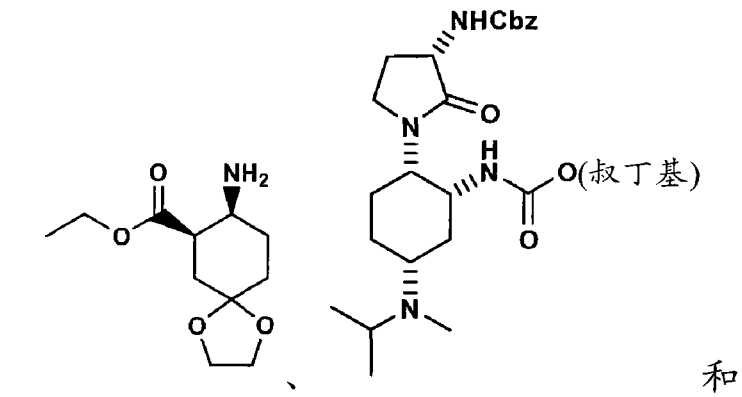


式V化合物是 或其盐；



19. 一种化合物，其选自：





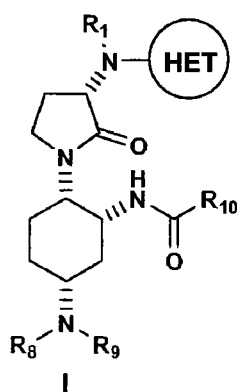
(ii) 该(i)的盐。


趋化因子受体活性调节剂及其晶型和制法

本申请要求分别于2006年7月28日和2007年3月21日提出的美国临时申请号60/834,235和60/896,026的优先权，此两案公开的内容均并入本文供参考。

发明领域

本发明提供N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺或其药学上可接受的盐、溶剂合物或前体药物，其具有所要药理学特性的令人意外的组合。还提供本发明的结晶型。含有它们的医药组合物和使用它们作为药剂以治疗炎症性疾病、过敏性、自身免疫、代谢、癌症和/或心血管疾病的方法也是本发明的目的。本公开内容还提供制备式(I)化合物的方法，该化合物包括N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺：



其中R¹、R⁸、R⁹、R¹⁰和  均如本文中所述。本文还提供可用于所述方法的中间体的化合物。

背景技术

趋化因子为分子量6-15 kDa的趋化细胞因子，其通过许多种细胞释

放, 以在其它细胞类型中吸引和活化巨噬细胞、T和B淋巴细胞、嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞及中性粒细胞(综述于: Charo and Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621; Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445; 以及Rollins, *Blood* 1997, 90, 909-928)。有两种主要趋化因子种类, CXC和CC, 依在氨基酸顺序中的最初两个半胱氨酸是被单一氨基酸分隔(CXC)或者为相邻(CC)而定。CXC趋化因子, 例如白细胞介素-8 (IL-8)、中性粒细胞活化蛋白质-2 (NAP-2)及黑色素瘤生长刺激活性蛋白质(MGSA), 主要是对中性粒细胞与T淋巴细胞具有趋化性, 而在其它细胞类型中, CC趋化因子例如RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、单细胞趋化性蛋白质(MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4及MCP-5)和嗜酸细胞活化趋化因子(eotaxin) (-1和-2)是针对巨噬细胞、T淋巴细胞、嗜酸粒细胞、树突细胞和嗜碱粒细胞具有趋化性。还存在趋化因子淋巴细胞趋化因子-1、淋巴细胞趋化因子-2 (两者均为C趋化因子)以及fractalkine (CX₃C趋化因子)存在, 它们并未落在任一种主要趋化因子亚族群中。

这些趋化因子结合到属于G-蛋白质偶合的七跨膜域蛋白质族群的特异性细胞表面受体(综述于: Horuk, *Trends Pharm. Sci.* 1994, 15, 159-165), 其被称为"趋化因子受体"。在结合其同源配位体时, 趋化因子受体会经过所缔合的三聚G蛋白质转导细胞内信号, 而在其它应答中, 造成细胞内钙浓度的快速增加, 细胞形状改变, 增加细胞粘附分子的表达, 去颗粒化作用和细胞迁移的促进作用。有至少十种人类趋化因子受体会对CC趋化因子结合或应答, 其具有下列特征型式: (综述于Zlotnik and Oshie *Immunity* 2000, 12, 121): CCR-1 (或者"CKR-1"或"CC-CKR-1") [MIP-1 α 、MCP-3、MCP-4、RANTES] (Ben-Barruch, et al., *Cell* 1993, 72, 415-425, 以及Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR-2A 和 CCR-2B (或"CKR-2A"/"CKR-2B"或"CC-CKR-2A"/"CC-CKR-2B") [MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 2752-2756, 以及Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR-3 (或"CKR-3"或"CC-CKR-3") [嗜酸细胞活化趋化因子-1, 嗜酸细胞活化趋化因子-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere, et al., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 16491-16494, 以及Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445);

CCR-4 (或者"CKR-4"或"CC-CKR-4") [TARC, MDC] (Power, et al., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 19495-19500, 以及Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR-5 (或者"CKR-5"或"CC-CKR-5") [MIP- α , RANTES, MIP-1 β] (Sanson, et al., *Biochemistry* 1996, 35, 3362-3367); CCR-6 (或者"CKR-6"或"CC-CKR-6") [LARC] (Baba, et al., *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 14893-14898); CCR-7 (或者"CKR-7"或"CC-CKR-7") [ELC] (Yoshie et al., *J. Leukoc. Biol.* 1997, 62, 634-644); CCR-8 (或者"CKR-8"或"CC-CKR-8") [I-309] (Napolitano et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 2759-2763); CCR-10 (或者"CKR-10"或"CC-CKR-10") [MCP-1, MCP-3] (Bonini, et al., *DNA and Cell Biol.* 1997, 16, 1249-1256); 以及CCR-11 [MCP-1, MCP-2及MCP-4] (Schweickert, et al., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 90550)。

除了哺乳动物趋化因子受体以外, 已证实哺乳动物巨细胞病毒、疱疹病毒及痘病毒会在受感染细胞中表达蛋白质而具有趋化因子受体的结合性质(综述于: Wells and Schwartz, *Curr. Opin. Biotech.* 1997, 8, 741-748)。人类CC趋化因子, 例如RANTES与MCP-3, 可通过这些病毒编码受体造成钙的快速移动。受体表达可通过使正常免疫系统监督和对感染的应答遭到破坏而随意受影响。此外, 人类趋化因子受体, 例如CXCR4、CCR2、CCR3、CCR5和CCR8, 可充当哺乳动物细胞被微生物(与例如人类免疫缺陷病毒(HIV)一样)感染的共受体。

趋化因子及其同源受体作为重要的介质与炎性、感染性及免疫调节病症和疾病有关, 所述病症和疾病包括哮喘和过敏性疾病, 以及自身免疫病理学疾病, 例如风湿性关节炎和多发性硬化; 以及代谢疾病, 例如动脉粥样硬化和糖尿病(综述于: Charo and Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621; Z. Gao and W. A. Metz, *Chem. Rev.* 2003, 103, 3733; P. H. Carter, *Current Opinion in Chemical Biology* 2002, 6, 510; Trivedi, et al, *Ann. Reports Med. Chem.* 2000, 35, 191; Saunders and Tarby, *Drug Disc. Today* 1999, 4, 80; Premack and Schall, *Nature Medicine* 1996, 2, 1174)。例如, 趋化因子单核细胞化学引诱剂-1 (MCP-1)及其受体CC趋化因子受体2 (CCR-2)在吸引白细胞至发炎位置及在接着活化这些细胞中发挥关键作用。当趋化因子MCP-1结合至CCR-2时, 其会引发胞内钙浓度的快速增加, 增加细胞粘附分子的表达,

以及促进白细胞迁移。MCP-1/CCR-2相互作用的重要性已通过使用基因变性小鼠的实验提供证明。MCP-1^{-/-}小鼠在数种不同类型的免疫激发后,不能够使单核细胞补充至发炎位置(Bao Lu, et al., *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601)。同样地,当用各种外源性药剂激发时,CCR-2^{-/-}小鼠不能够补充单核细胞或产生干扰素- γ ;再者,CCR-2裸鼠的白细胞不会在对MCP-1的应答中迁移(Landin Boring, et al., *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 2552),从而证实MCP-1/CCR-2相互作用的特异性。两个其它组已独立报道了使用不同品系的CCR-2^{-/-}小鼠的相效结果(William A. Kuziel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 12053, 以及Takao Kurihara, et al., *J. Exp. Med.* 1997, 186, 1757)。MCP-1^{-/-}和CCR-2^{-/-}动物的存活力和一般正常健康状况是值得注意的,因为MCP-1/CCR-2相互作用的中断不会导致生理危象。总之,这些数据得到的结论是,阻断MCP-1/CCR2作用的分子将可用于治疗多种炎性和自身免疫病症(综述于: M. Feria and F. Díaz-González, *Exp. Opin. Ther. Patents* 2006, 16, 49; 和J. Dawson, W. Miltz, and C. Wiessner, *C. Exp. Opin. Ther. Targets* 2003, 7, 35)。如下文所述,此项假说目前已在多种不同动物疾病模型中得到确认。

已知MCP-1在患有风湿性关节炎的患者中被上调(Alisa Koch, et al., *J. Clin. Invest.* 1992, 90, 772-779)。此外,在治疗风湿性关节炎中,多项临床前研究已证实MCP-1/CCR2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值。编码MCP-1的DNA疫苗最近已证实会改善大鼠的慢性多佐剂所引发的关节炎(Sawsan Youssef, et al., *J. Clin. Invest.* 2000, 106, 361)。同样地,通过直接给大鼠施用针对MCP-1的抗体,可以控制胶原诱导的关节炎(Hiroomi Ogata, et al., *J. Pathol.* 1997, 182, 106)或链球菌细胞壁诱导的关节炎(Ralph C. Schimmer, et al., *J. Immunol.* 1998, 160, 1466)的大鼠的疾病症状。可能最显著的是,在关节炎的MRL-1pr小鼠模型中,经证实MCP-1的肽拮抗剂MCP-1 (9-76)既会防止疾病发病又会降低疾病症状(取决于施用时间)(Jiang-Hong Gong, et al., *J. Exp. Med.* 1997, 186, 131)。此外,在关节炎的啮齿动物模型中,已证实施用小分子CCR2拮抗剂会降低临床评分(C. M. Brodmerkel, et al., *J. Immunol.* 2005, 175, 5370; 以及M. Xia, et al., 美国专利申请0069123, 2006)。施用抗CCR2抗体对鼠科动物CIA具有不同作用,这取决于施用时间(H.

Bruhl, et al., *J. Immunol.* 2004, 172, 890)。最近使用CCR2^{-/-}小鼠的研究已显示CCR2的缺失可在特定实验情况中使啮齿动物关节炎模型更为恶化(M. P. Quinones, et al., *J. Clin. Invest.* 2004, 113, 856; M. P. Quinones, et al., *J. Mol. Med.* 2006, 84, 503)。

已知MCP-1在动脉粥样硬化性病变中被上调,并且已证实MCP-1的循环水平通过用治疗剂治疗而被降低(Abdolreza Rezaie-Majd, et al, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 1194 – 1199)。在治疗动脉粥样硬化中,数项关键研究已证实MCP-1/CCR2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值。例如,当MCP-1^{-/-}小鼠与LDL受体-缺陷小鼠杂交时,发现主动脉脂质沉积降低83%(Long Gu, et al., *Mol. Cell* 1998, 2, 275)。同样地,当从已过度表达人类载脂蛋白B的小鼠中基因切除MCP-1时,相对于MCP-1^{+/+} apoB对照小鼠而言,使所得到的小鼠被保护而免于动脉粥样硬化性损伤形成(Jennifa Gosling, et al., *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 773)。同样地,当CCR-2^{-/-}小鼠与载脂蛋白E^{-/-}小鼠杂交时,发现显著降低动脉粥样硬化性损伤的发生率(Landin Boring, et al, *Nature* 1998, 394, 894; T. C. Dawson, et al., *Atherosclerosis* 1999, 143, 205)。最后,当载脂蛋白E^{-/-}小鼠被施用一种编码CCR2的肽拮抗剂的基因时,则损伤大小被降低,并且斑块稳定性被增加(W. Ni, et al., *Circulation* 2001, 103, 2096 – 2101)。得自CCR2^{-/-}小鼠的骨髓移植至ApoE3-Leiden小鼠中,会抑制早期动脉粥样硬化形成(J. Guo, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 447),但对已发展的损伤具有最小作用(J. Guo, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 1014)。

患有2型糖尿病的患者通常显示胰岛素抗药性,这是该疾病的标志特征之一。胰岛素抗药性还与称为"代谢综合症"或"综合征X"的异常族群有关联,该族群包括肥胖、动脉粥样硬化、高血压和脂血障碍(综述于: Eckel, et al., *Lancet* 2005, 365, 1415)。充分明了的是,发炎在使2型糖尿病与"综合征X"病理学疾病中的疾病过程更为恶化中发挥作用(综述于: Chen, *Pharmacological Research* 2006, 53, 469; Neels and Olefsky, *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 33; Danadona and Aljada, *Am J Cardiol.* 2002 90, 27G-33G; Pickup and Crook, *Diabetologia* 1998, 41, 1241)。MCP-1被认为在肥胖诱发的胰岛素抗药性中发挥作用。在培养物中,人类前脂肪细胞在构成上表达MCP-1 (Gerhardt, *Mol. Cell.*

Endocrinology 2001, 175, 81)。CCR2被表达于脂肪细胞上；在体外，添加MCP-1至经分化的脂肪细胞中，会降低经胰岛素刺激的葡萄糖吸收以及数种脂肪生成基因(LpL, adipsin, GLU-4)、 α 2、 β 3-肾上腺素能受体和PPAR γ 的表达(P. Sartipy and D. Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1999, 96, 6902)。患有2型糖尿病的患者具有比非糖尿病对照组更高水平的循环MCP-1 (S. Nomura, et al., *Clin. Exp. Immunol.* 2000, 121, 437)，并且MCP-1从脂肪组织的释放可通过用抗糖尿病治疗剂例如二甲双胍或噻唑烷二酮的治疗而被降低(J. M. Bruun, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90, 2282)。同样地，MCP-1也在肥胖的鼠科动物实验模型中过表达，并且主要由脂肪组织产生(Sartipy and Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 7265)。在肥胖小鼠中，MCP-1的表达既在胰岛素抗药性开始之前，又与其同时地发生(H. Xu, et al., *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1821)。另一项研究证实，在小鼠生殖腺周围脂肪组织中MCP-1的表达与体重呈正相关(Weisberg, et al., *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1796)。与这些数据一致，胰岛素抗药性在db/db小鼠中的发展是通过MCP-1的基因缺失或通过显性负肽基因诱导的表达而被改善(H. Kanda, et al., *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 1494)。相反逻辑也可证实：MCP-1在脂肪组织中的过表达会促进胰岛素抗药性(N. Kamei, et al., *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 26602)。证实MCP-1的基因缺失不会在db/db小鼠中影响胰岛素抗药性的一项矛盾结果也已出现(F. Y. Chow, et al., *Diabetologia* 2007, 50, 471)。与关于MCP-1的数据一致，使用CCR2 (MCP-1受体)的直接研究已证实其在肥胖的形成与肥胖诱导的胰岛素抗药性中发挥作用。高脂肪膳食的维持会在野生型小鼠(C. L. Tsou, et al., *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 902)和ApoE^{-/-}小鼠(F. Tacke, et al., *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 185)中增加循环CCR2⁺炎性单细胞的数目。CCR2的基因缺失会减少小鼠脂肪组织中活化的巨噬细胞的数目(C. N. Lumeng, et al., *Diabetes* 2007, 56, 16)，但不会影响被认为会保持"纤瘦"状态的M2脂肪巨噬细胞的群体(C. N. Lumeng, et al., *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 175)。在饮食诱导的肥胖模型中，CCR2的基因缺失会降低饮食诱导的肥胖并且改善胰岛素敏感性(S. P. Weisberg, et al., *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 115; P Cornelius, RP Gladue, RS Sebastian, WO专利2006/013427 A2, 2006)，这取决于实验条件(A. Chen, et al.,

Obes. Res. 2005, 13, 1311)。小分子CCR2拮抗剂的施用也会在此相同模型中改善胰岛素敏感性(S. P. Weisberg, et al., *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 115)。

两项研究描述了CCR2在高血压诱导的血管发炎、重构(remodeling)和肥大中的重要作用(E Bush, et al., *Hypertension* 2000, 36, 360; M Ishibashi, et al., *Circ. Res.* 2004, 94, 1203)。

已知MCP-1在人类多发性硬化中被向上调节,并且已证实使用干扰素 β -1b的有效疗法会降低末梢血液单核细胞中的MCP-1表达,这说明MCP-1在疾病进展中发挥作用(Carla Iarlori, et al., *J. Neuroimmunol.* 2002, 123, 170-179)。其它研究已证实,在治疗多发性硬化中,MCP-1/CCR-2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值;所有这些研究已在实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)中被证实,该实验性自身免疫脑脊髓炎为多发性硬化的常用动物模型。将对MCP-1的抗体施用于具有EAE的动物,显著地减少了疾病复发(K. J. Kennedy, et al., *J. Neuroimmunol.* 1998, 92, 98)。再者,两份报告已证实CCR-2^{-/-}小鼠对于EAE具抵抗性(B. T. Fife, et al., *J. Exp. Med.* 2000, 192, 899; L. Izikson, et al., *J. Exp. Med.* 2000, 192, 1075)。后续报告是通过检验来自不同品系的小鼠中CCR2缺失的作用来延伸这些最初观察的(S. Gaupp, et al., *Am. J. Pathol.* 2003, 162, 139)。值得注意的是,小分子CCR2拮抗剂的施用也会在C57BL/6小鼠中使疾病进展变得迟钝(C. M. Brodmerkel, et al., *J. Immunol.* 2005, 175, 5370)。

已知MCP-1在肺脏移植后发展闭塞性细支气管炎综合征的患者中被向上调节(Martine Reynaud-Gaubert, et al., *J. of Heart and Lung Transplant.*, 2002, 21, 721-730; John Belperio, et al., *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547-556)。在闭塞性细支气管炎综合征的鼠科动物模型中,施用对MCP-1的抗体会导致气道闭塞的减弱;同样地,CCR2^{-/-}小鼠在此相同模型中对于气道闭塞具有抵抗性(John Belperio, et al., *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547-556)。这些数据指出,MCP-1/CCR2的拮抗作用可有益于治疗移植后的器官排斥。此外,研究已证实MCP-1/CCR2轴的中断能够延长胰岛移植物的存活(I Lee, et al., *J Immunol* 2003, 171, 6929; R Abdi, et al., *J Immunol* 2004, 172, 767)。在大鼠移植模型中,CCR2和MCP-1经证实在发展移植物血管病的移植物中被向上调节(K

Horiguchi, et al., *J Heart Lung Transplant*. 2002, 21, 1090)。在另一项研究中, 抗-MCP-1基因疗法会减弱移植物血管病(A Saiura, et al., *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24, 1886)。一项研究描述了通过MCP-1的阻断对实验性静脉移植物新血管内膜形成的抑制作用(H Tatewaki, et al., *J Vasc Surg*. 2007, 45, 1236)。

其它研究已证实了在治疗哮喘中MCP-1/CCR2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值。在卵清蛋白激发的小鼠中, MCP-1与中和抗体的多价螯合作用会造成支气管高响应性和发炎的显著降低(Jose-Angel Gonzalo, et al., *J. Exp. Med.* 1998, 188, 157)。已证实可以通过施用对MCP-1的抗体, 而在曼氏裂体吸虫(*Schistosoma mansoni*)卵激发的小鼠中降低过敏性气道发炎(Nicholas W. Lukacs, et al., *J. Immunol.* 1997, 158, 4398)。与此一致, MCP-1^{-/-}小鼠显示降低对曼氏裂体吸虫卵激发的应答(Bao Lu, et al., *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601)。

其它研究已证实, 在治疗肾脏疾病中, MCP-1/CCR2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值。在肾小球性肾炎的鼠科动物模型中, 施用MCP-1的抗体会造成显著降低肾小球新月体形成和I型胶原的沉积(Clare M. Lloyd, et al., *J. Exp. Med.* 1997, 185, 371)。此外, 具有经诱导的肾中毒血清肾炎的MCP-1^{-/-}小鼠与其MCP-1^{+/+}相对物相比显示出显著更少的管状损伤(Gregory H. Tesch, et al., *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 73)。

数项研究已证实, 在治疗系统红斑狼疮中, MCP-1/CCR2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值。在系统性红斑狼疮的鼠科动物模型中, CCR2^{-/-}小鼠与其WT相对物相比显示出延长的存活期与降低的肾病(G. Perez de Lema, et al., *J. Am. Soc. Neph.* 2005, 16, 3592)。这些数据与最近研究中针对MCP-1基因缺失所发现的改善疾病的活性一致(S. Shimizu, et al., *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43, 1121; Gregory H. Tesch, et al., *J. Exp. Med.* 1999, 190, 1813), 或者与在狼疮的啮齿动物模型中CCR2拮抗剂的施用(H. Hasegawa, et al., *关节炎与风湿病*, 2003, 48, 2555)一致。

相对于未患病的回肠, CCR2⁺固有层淋巴细胞的显著30倍增加被发现于克罗恩氏患者的小肠中(S. J. Connor, et al., *Gut* 2004, 53, 1287)。还应注意的是, 相对于对照组, 在患有活性克罗恩氏病的患者中, 在

循环CCR2+/CD14+/CD56+单细胞的亚群中有扩大现象。数项啮齿动物研究已证实,在治疗克罗恩氏病/结肠炎中, MCP-1/ CCR2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值。CCR-2 -/-小鼠被保护而免受葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎的作用(Pietro G. Andres, et al., *J. Immunol.* 2000, 164, 6303)。CCR2、CCR5和CXCR3的小分子拮抗剂(小鼠结合亲和力分别= 24、236和369 nM)的施用也会保护抵抗葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎(H. Tokuyama, et al., *Int. Immunol.* 2005, 17, 1023)。最后, MCP-1-/-小鼠在结肠炎的半抗原诱导的模型中显示基本上降低的结肠伤害(肉眼和组织学两者)(W. I. Khan, et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006, 291, G803)。

两份报告描述MCP-1在患有炎性肠疾病的患者的肠上皮细胞和肠粘膜中的过表达(H. C. Reinecker, et al., *Gastroenterology* 1995, 108, 40, 以及Michael C. Grimm, et al., *J. Leukoc. Biol.* 1996, 59, 804)。

一项研究描述MCP-1基因中的启动子多晶型现象与硬皮病(系统性硬化症)的相关性(S Karrer, et al., *J Invest Dermatol.* 2005, 124, 92)。在组织纤维变性的相关模型中, CCR2/MCP-1轴的抑制会降低在皮肤(T Yamamoto与K Nishioka, *J Invest Dermatol.* 2003, 121, 510; AM Ferreira, et al., *J Invest Dermatol.* 2006, 126, 1900)、肺脏(T Okuma, et al., *J Pathol.* 2004, 204, 594; M Gharaee-Kermani, et al., *Cytokine* 2003, 24, 266)、肾脏(K Kitagawa, et al., *Am J Pathol.* 2004, 165, 237; T Wada, et al., *J Am Soc Nephrol* 2004, 15, 940)、心脏(S Hayashidani, et al., *Circulation* 2003, 108, 2134)以及肝脏(S Tsuruta, et al., *Int J Mol Med.* 2004, 14, 837)中的纤维变性。

一项研究已证实,在治疗肺炎中, MCP-1/CCR2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值。当IgA免疫复合肺脏伤害的大鼠以静脉内方式用抗大鼠MCP-1产生的抗体(JE)治疗时, 肺炎的症状被部分减轻(Michael L. Jones, et al., *J. Immunol.* 1992, 149, 2147)。

数项研究已证实,在治疗癌症中, MCP-1/CCR2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值(综述于: M. J. Craig and R. D. Loberg, *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25, 611; I. Conti and B. Rollins, *Seminars in Cancer Biology* 2004, 14, 149; R. Giles and R. D. Loberg, *Curr. Cancer Drug Targets* 2006, 6, 659)。当带有人类乳房癌细胞的免疫缺陷的小鼠用抗

-MCP-1抗体治疗时,发现肺脏微转移的抑制以及存活期增加(Rosalba Salcedo, et al., *Blood* 2000, 96, 34-40)。使用人类临床肿瘤样品,CCR2表达与前列腺癌进展有关(Y. Lu, et al., *J. Cell. Biochem.* 2007, 101, 676)。在体外,MCP-1表达已被证实会介导前列腺癌细胞生长和侵入(Y. Lu, et al., *Prostate* 2006, 66, 1311);再者,通过前列腺癌细胞表达的MCP-1会诱导用于骨质再吸收的人类骨髓原始粒子(Y. Lu, et al., *Cancer Res.* 2007, 67, 3646)。

多项研究已描述,在治疗再狭窄中,MCP-1/CCR2相互作用的拮抗作用的潜在治疗价值。在人类中,MCP-1水平直接与再狭窄的危险产生有关(F. Cipollone, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 327)。缺乏CCR2或MCP-1的小鼠显示动脉损伤后的血管内膜面积与血管内膜/介质比例的降低(相对于野生型小动物伙伴)(Merce Roque, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 554; A. Schober, et al., *Circ. Res.* 2004, 95, 1125; W. J. Kim, et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 310, 936)。在小鼠中,MCP-1的显性负抑制剂在骨骼肌中的转染(K. Egashira, et al., *Circ. Res.* 2002, 90, 1167)也会降低动脉损伤后的血管内膜增生。CCR2使用中和抗体的阻断会在将支架放置于灵长类动物之后降低新血管内膜增生(C. Horvath, et al., *Circ. Res.* 2002, 90, 488)。

两份报告描述具有诱发脑部创伤的MCP-1大鼠的过表达(J. S. King, et al., *J. Neuroimmunol.* 1994, 56, 127, 以及Joan W. Berman, et al., *J. Immunol.* 1996, 156, 3017)。此外,研究已证实CCR2^{-/-}(O. B. Dimitrijevic, et al., *Stroke* 2007, 38, 1345)和MCP-1^{-/-}小鼠(P. M. Hughes, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002, 22, 308)两者均被部分保护而免受缺血/再灌注损伤。

已知单细胞/巨噬细胞在神经性疼痛的发展上发挥重要作用(Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ, *Pain* 2000, 86, 25)。与此概念一致,最近已描述CCR2在治疗炎性与神经原性两种疼痛中的潜在作用。相对于其WT相对物而言,CCR2^{-/-}小鼠显示出对炎性疼痛的应答改变,包括足底内(intraplantar)福尔马林注射后的疼痛行为降低以及足底内CFA注射后的机械感觉异常稍微降低(C. Abbadie, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 2003, 100, 7947)。此外,CCR2^{-/-}小鼠并未在坐骨神经损伤后显

示出显著的机械感觉异常。同样地,小分子CCR2拮抗剂会在口服施用后降低机械感觉异常达到损伤前程度的~80%(C. Abbadie, J. A. Lindia 及H. Wang, WO PCT 110376, 2004)。

一项研究描述MCP-1在缺血性心肌病中的关键作用(N. G. rangogiannis, et al., *Circulation*2007, 115, 584)。另一项研究描述在MCP-1的抑制后,实验性心脏衰竭的减弱(S Hayashidani, et al., *Circulation*2003, 108, 2134)。

其它研究已提供MCP-1在未于上文提及的各种疾病状态中被过度表达的证据。这些报告提供相关证据显示, MCP-1拮抗剂可能是此种疾病的有用治疗剂。另一项研究已证实MCP-1在啮齿动物心脏同种异体移植物中的过表达,表明MCP-1在移植物动脉硬化的发病原理中的作用(Mary E. Russell, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 6086)。MCP-1的过表达已被发现于患有特发性肺纤维变性患者的肺脏内皮细胞中(Harry N. Antoniades, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5371)。同样地, MCP-1的过表达已被发现于患有牛皮癣患者的皮肤中(M. Deleuran, et al., *J. Dermatol. Sci.* 1996, 13, 228, 以及R. Gillitzer, et al., *J. Invest. Dermatol.* 1993, 101, 127); 与CCR2+细胞优势有关的发现也已被报告(C. Vestergaard, et al., *Acta Derm. Venerol.* 2004, 84, 353)。最后,最近的报告已证实, MCP-1被过度表达于患有HIV-1相关痴呆症患者的脑部与脑脊髓液中(Alfredo Garzino-Demo, WO 99/46991)。

此外, CCR2多晶型现象已被证实至少在患者的一个亚群中与肉状瘤病有关(P. Spagnolo, et al., *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, 168, 1162)。

还应注意的是, CCR-2已涉及作为一些HIV菌种的共受体(B. J. Doranz, et al., *Cell* 1996, 85, 1149)。还已测定出利用CCR-2作为HIV共受体可与疾病进展产生关联(Ruth I. Connor, et al., *J. Exp. Med.* 1997, 185, 621)。此项发现与最近发现一致, 该最近发现是, CCR-2突变种CCR2-64I的存在与HIV在人类体群中的延迟发病呈正相关(Michael W. Smith, et al., *Science* 1997, 277, 959)。虽然MCP-1未涉及这些过程, 但可能的情况是, 通过结合至CCR-2而起作用的MCP-1拮抗剂可具有在HIV感染的患者中延迟此疾病进展成AIDS的有益治疗作用。

应注意的是，CCR2也是人类趋化因子MCP-2、MCP-3和MCP-4的受体(Luster *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445)。由于本文所述式(I)新化合物会通过结合至CCR-2受体而拮抗MCP-1，因此这些式(I)化合物也可以是由CCR-2介导的MCP-2、MCP-3和MCP-4的作用的有效拮抗剂。因此，当于本文中提及"MCP-1的拮抗作用"时，是假定它相当于"CCR-2的趋化因子刺激的拮抗作用"。

因此，调节趋化因子活性的化合物可证实在治疗炎性、过敏性、自身免疫、代谢、癌症和/或心血管疾病中的广泛用途。美国专利申请公开WO2005021500 A1 (并入本文供参考，并且归属于本案申请人)公开了通过CCR2调节MCP-1、MCP-2、MCP-3和MCP-4活性的化合物。该文献还公开了制备这些化合物的各种方法，包括多步骤合成，其包括保护基团的引入和后续移除。

期待发现与已知趋化因子调节剂相比具有改良的药理学特性的新颖化合物。例如，期待发现具有改良的CCR-2抑制活性和对CCR-2相对于其它G蛋白质-偶合受体(意即5HT_{2A}受体)的选择性的新颖化合物。还期待发现具有一种或多种下述种类和有利和改良特性的化合物：

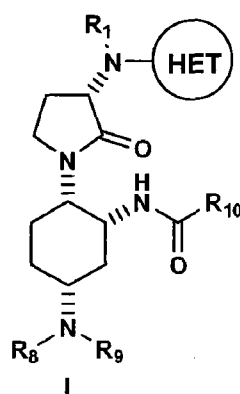
- (a) 医药性质(意即溶解度、渗透性、对持续释放配方的可顺从性)；
- (b) 剂量需求(例如，较低剂量和/或每日一次服药)；
- (c) 降低血液浓度峰顶至峰谷特性的因素(意即清除率和/或分布容积)；
- (d) 增加活性药物在受体处的浓度的因素(意即蛋白质结合、分布容积)；
- (e) 降低临床药物-药物相互作用倾向的因素(细胞色素P450酶抑制作用或诱导作用，例如CYP 2D6抑制作用，参阅G.K. Dresser, J.D. Spence, D.G. Bailey, *Clin. Pharmacokinet.* 2000, 38, 41-57, 其在此并入本文供参考)；
- (f) 降低不良副作用可能性的因素(例如除了G蛋白质-偶合受体以外的药理学选择性、潜在化学或代谢反应性、受限的CNS穿透、离子通道选择性)。特别期待发现具有前述药理学特性的期望组合的化合物。


本领域还期待提供制备这些化合物的新颖和/或改良的方法。这些方法的特征可以(非限制性的)是 a)容易改变成较大规模生产，例如试

验工厂或制造规模; b)能够改善中间体和/或最后化合物的纯度(包括手性纯度)、稳定性和/或容易处理性的操作步骤和/或技术; 和/或c)较少的操作步骤。

发明概述

本发明提供MCP-1受体活性的新颖拮抗剂或部分激动剂/拮抗剂: N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺, 或其药学上可接受的盐、溶剂合物或前体药物, 其具有所需药理学特性的令人意外的组合。还提供了本发明化合物的结晶型。含有它们的医药组合物以及使用它们作为药剂以治疗炎性疾病、过敏性、自身免疫、代谢、癌症和/或心血管疾病的方法也是本发明的目的。本公开内容还提供制备式(I)化合物的方法, 该化合物包括N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺:



其中 R^1 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 和  均如本文中所述。本文还提供可用于所述方法的中间体的化合物。

本发明公开内容还提供 N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺或药学上可接受的盐、溶剂合物或前体药物在药剂制造中的用途, 该药剂用于治疗炎性疾病、过敏性、自身免疫、代谢、癌症和/或心血管疾病。

附图简述

图1揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,二-苯磺酸盐,型式N-1的实验和模拟粉末图。

图2揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,游离碱,型式N-2的实验和模拟粉末图。

图3揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,游离碱,型式E-1(单-乙醇化物)的实验和模拟粉末图。

图4揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,HCl盐,型式H4-1(四水合物)的实验和模拟粉末图。

图5揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,游离碱,型式A-1(单-丙酮溶剂合物)的实验和模拟粉末图。

图6揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,游离碱,型式DC-1(单-二氯甲烷溶剂合物)的实验和模拟粉末图。

图7揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,游离碱,型式AN-3(单-乙腈溶剂合物)的实验和模拟粉末图。

图8揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,二-苯磺酸盐,型式N-1的差示扫描量热法分析。

图9揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,二-苯磺酸盐,型式N-1的热重分析。

图10揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,游离碱,型式N-2的差示扫描量热法分析。

图11揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代

-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，游离碱，型式N-2的热重分析。

图12揭示N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，游离碱，型式N-2的水份吸着等温线。

图13揭示(1R,3R,4S)-3-乙酰胺基-4-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)环己基氨基甲酸叔丁酯的X-射线晶体结构。

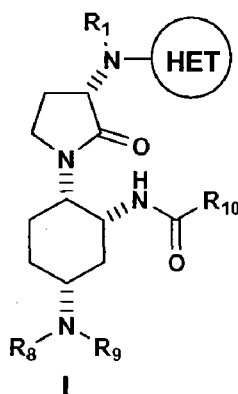
图14在hCCR2 KI小鼠中的48小时TG腹膜炎模型：单细胞/巨噬细胞浸润至腹膜腔中的实施例1抑制作用(分类细胞计数)。

图15在hCCR2 KI小鼠中的48小时TG腹膜炎模型：单细胞/巨噬细胞浸润至腹膜腔中的实施例1抑制作用(FACS分析)。

图16在hCCR2 KI小鼠中的EAE：实施例1治疗的临床评分。

详细说明

本发明提供MCP-1受体活性的新颖拮抗剂或部分激动剂/拮抗剂：N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，或其药学上可接受的盐、溶剂合物或前体药物，其具有所需药理学特性的令人意外的组合。还提供本发明的结晶型。含有它们的医药组合物以及使用它们作为药剂以治疗炎症性疾病、过敏性、自身免疫、代谢、癌症和/或心血管疾病的方法也是本发明的目的。本公开内容还提供制备式(I)化合物的方法，该化合物包括N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺：



其中R¹、R⁸、R⁹、R¹⁰和  均如本文中所述。本文还提供可用于所述方法的中间体的化合物。

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺, 其令人意外地证实所需药理学特性的组合, 包括令人惊讶的高度口服生物利用率和高度地有效且具有优越安全性标准的适应症的组合。

证实足够程度的细胞膜渗透性(口服生物利用率的一项重要因素)的已知CCR2受体调节剂, 例如在2005年3月10日公告的专利公报WO2005021500 A1 (2007年1月16日授予, 归属于本案申请人的美国专利7,163,937)中所揭示的, 当通过其CCR2-结合能力(功效的测量法)测量时其不充分有效, 和/或当通过hERG与Na⁺离子通道研究测量时其缺少如通过离子通道选择性所指示的适当安全性标准。

相比之下, 如本文中通过下文标题为"比较药理学特性"的部分中所提出的数据所示, 相对于更具极性的分子, 证实N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺的令人惊讶的高度细胞膜渗透性, 并且仍保持有效CCR2结合能力, 伴有优越的离子通道选择性。

因此, 本发明提供具有经改良药理学特性的新颖趋化因子调节剂, 预期其可用于治疗炎性、过敏性、自身免疫、代谢、癌症和/或心血管疾病。

实施方案

在一项实施方案中, 公开内容涉及N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺, 及其药学上可接受的盐。

另一项实施方案为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱的结晶型。

另一项实施方案为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游

离碱的结晶型，此结晶型包括N-2型式。

另一项实施方案为N-2型式，其特征为(或具有)基本上等于下列的单位晶胞参数：

晶胞尺寸：

$$a = 11.8427(3)$$

$$b = 18.1503(7)$$

$$c = 12.7923(4)$$

$$\alpha = 90$$

$$\beta = 105.362(2)$$

$$\gamma = 90$$

空间群 $P2_1$

分子/单位晶胞 2

其中该晶体是在约+22°C(RT)的温度下。

另一项实施方案为N-2型式，其特征为(或具有)包含三个或更多个2 θ 值(CuK α λ = 1.541Å)的粉末x-射线衍射图，该2 θ 值选自7.2、8.7、9.7、12.5、12.8、13.3、16.0、16.6、18.2和18.8，在约22°C的温度下。

另一项实施方案为N-2型式，其特征为(或具有)进一步包含四个或更多个2 θ 值(CuK α λ = 1.541Å)的粉末x-射线衍射图，该2 θ 值选自7.2、8.7、9.7、12.5、12.8、13.3、16.0、16.6、18.2和18.8，在约22°C的温度下。

另一项实施方案为N-2型式，其特征为(或具有)基本上如列示于表7中的部分原子坐标。

另一项实施方案为N-2型式，其特征为(或具有)基本上根据图2的粉末x射线衍射图。

另一项实施方案为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺二-苯磺酸盐的结晶型，包括型式N-1，其特征为于表1中所发现的单位晶胞参数；3或4或更多个选自表10的2 θ 值(CuK α λ = 1.541Å)；基本上如列示于表2中的部分原子坐标，和/或基本上根据图1的粉末x-射线衍射图。

另一项实施方案为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱的结晶型，包括型式E-1(单-乙醇化物)，其特征为于表1中所发现的单位晶胞参数；3或4或更多个选自表10的2 θ 值(CuK α λ = 1.541Å)；基

本上如列示于表5中的部分原子坐标, 和/或基本上根据图3的粉末x-射线衍射图。

另一项实施方案为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺HCl盐的结晶型, 包括型式H4-1(四水合物), 其特征为于表1中所发现的单位晶胞参数; 3或4或更多个选自表10的 2θ 值($\text{CuK}\alpha\lambda=1.541\text{\AA}$); 基本上如列示于表9中的部分原子坐标, 和/或基本上根据图4的粉末x-射线衍射图。

另一项实施方案为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱的结晶型图, 包括型式A-1(单-丙酮溶剂合物), 其特征为于表1中所发现的单位晶胞参数; 3或4或更多个选自表10的 2θ 值($\text{CuK}\alpha\lambda=1.541\text{\AA}$); 基本上如列示于表6中的部分原子坐标, 和/或基本上根据图5的粉末x-射线衍射图。

另一项实施方案为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱的结晶型, 包括型式DC-1(单-二氯甲烷溶剂合物), 其特征为于表1中所发现的单位晶胞参数; 3或4或更多个选自表10的 2θ 值($\text{CuK}\alpha\lambda=1.541\text{\AA}$); 基本上如列示于表3中的部分原子坐标, 和/或基本上根据图6的粉末x-射线衍射图。

另一项实施方案为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱的结晶型, 包括型式AN-3(单-乙腈溶剂合物), 其特征为于表1中所发现的单位晶胞参数; 3或4或更多个选自表10的 2θ 值($\text{CuK}\alpha\lambda=1.541\text{\AA}$); 基本上如列示于表8中的部分原子坐标, 和/或基本上根据图7的粉末x-射线衍射图。

另一项实施方案为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱的结晶型, 包括型式THOO-1(单-四氢呋喃溶剂合物), 其特征为于表1中所发现的单位晶胞参数; 3或4或更多个选自表10的 2θ 值($\text{CuK}\alpha\lambda=1.541\text{\AA}$); 和/或基本上如列示于表4中的部分原子坐标。

另一项实施方案为一种医药组合物, 包含药学上可接受的载体和

实施例的化合物。

另一项实施方案为一种调节趋化因子或趋化因子受体活性的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物。

另一项实施方案为一种调节CCR-2受体活性的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物。

另一项实施方案为一种调节通过CCR2受体所介导的MCP-1、MCP-2、MCP-3和MCP-4以及MCP-5活性的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物。

另一项实施方案为一种调节MCP-1活性的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物。

另一项实施方案为一种治疗病症的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物，该病症选自糖尿病、肥胖、代谢综合症、中风、神经性疼痛、缺血性心肌病、牛皮癣、高血压、硬皮病(scleroderma)、骨关节炎、动脉瘤、发热、心血管疾病、克罗恩氏病、充血性心力衰竭、自身免疫疾病、HIV感染、与HIV有关联的痴呆症、牛皮癣、特发性肺纤维变性、移植物动脉硬化、物理或化学诱导的脑部创伤、炎性肠疾病、肺泡炎、结肠炎、系统性红斑狼疮、肾毒血清肾炎、肾小球性肾炎、哮喘、多发性硬化、动脉粥样硬化、血管炎、易受伤害性斑块、风湿性关节炎、再狭窄、静脉新血管内膜增生(venous neointimal hyperplasia)、渗析-移植物新血管内膜增生、动脉-静脉旁路血管内膜增生、器官移植、慢性同种异体移植肾病和癌症。

另一项实施方案为一种治疗病症的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物，其中该病症选自糖尿病、肥胖、克罗恩氏病、牛皮癣、特发性肺纤维变性、移植物动脉硬化、物理或化学诱导的脑部创伤、炎性肠疾病、肺泡炎、结肠炎、系统性红斑狼疮、肾毒血清肾炎、肾小球性肾炎、哮喘、多发性硬化、动脉粥样硬化与风湿性关节炎、再狭窄、器官移植和癌症。

另一项实施方案为一种治疗病症的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物，其中该病症选自糖尿病、肥胖、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、肾小球性肾炎、多发性硬化、动脉粥样硬化、再狭窄和器官移植。

另一项实施方案为一种治疗病症的方法，其包括对有需要的患者

施用治疗有效量的实施例化合物，其中该病症选自多发性硬化、动脉粥样硬化、克罗恩氏病和糖尿病。

另一项实施方案为一种治疗病症的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物，其中该病症选自再狭窄、器官移植和癌症。

另一项实施方案为一种治疗糖尿病的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物。

另一项实施方案为一种治疗克罗恩氏病的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物。

另一项实施方案为一种治疗多发性硬化的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物。

另一项实施方案为一种治疗动脉粥样硬化的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物。

另一项实施方案为一种治疗再狭窄的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例化合物。

另一项实施方案为一种治疗器官移植的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例1化合物。

另一项实施方案为一种治疗癌症的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例1化合物。

另一项实施方案为一种治疗癌症的方法，其中癌症选自乳癌、肝癌、前列腺癌和黑色素瘤。

另一项实施方案为一种治疗炎性疾病、过敏性、自身免疫、代谢、癌症和/或心血管疾病的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例1化合物。

另一项实施方案为一种治疗至少部分通过CCR-2所介导的疾病的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例1化合物。

另一项实施方案为一种调节CCR2活性的方法，其包括对有需要的患者施用治疗有效量的实施例1化合物。

另一项实施方案为在医药的制剂中的实施例1的化合物，所述制剂用于治疗糖尿病、肥胖、代谢综合症、中风、神经性疼痛、缺血性心脏病、牛皮癣、高血压、硬皮病、骨关节炎、动脉瘤、发热、心血管疾病、克罗恩氏病、充血性心力衰竭、自身免疫疾病、HIV感染、与

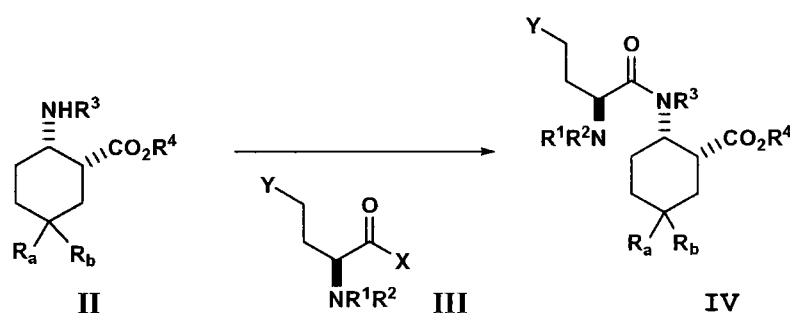
HIV有关联的痴呆症、牛皮癣、特发性肺纤维变性、移植物动脉硬化、物理或化学诱导的脑部创伤、炎性肠疾病、肺泡炎、结肠炎、系统性红斑狼疮、肾毒血清肾炎、肾小球性肾炎、哮喘、多发性硬化、动脉粥样硬化、血管炎、易受伤害性斑块、风湿性关节炎、再狭窄、静脉新血管内膜增生、渗析-移植物新血管内膜增生、动脉-静脉旁路血管内膜增生、器官移植、慢性同种异体移植肾病和癌症。

另一项实施方案为用于治疗的实施例的化合物。

本发明可在未偏离其精神或基本特质下，以其它特定形式具体体现。本发明还涵盖本文所指出本发明的替代方面和实施方案的所有组合。应明了的是，任何和所有实施方案，均可结合任何其它实施方案，以描述本发明的其它实施方案。再者，一项实施方案的任何要素意欲与来自任何实施方案的任何和所有其它要素合并，以描述其它实施方案。

方法实施方案

在第1项实施方案中，本公开内容提供一种制备式IV化合物或其盐的方法：

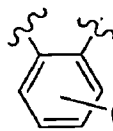


此方法包括以下步骤：

使式II的 β -氨基酯或其盐与式III的经适当保护的手性 α -氨基酸偶合，得到酰胺IV(参阅WO2005021500)；其中：

R_a 和 R_b 独立地为 C_{1-6} 烷氧基；

或 R_a 和 R_b 和它们均连接的碳一起合并以形成羰基、硫代羰基、环状缩醛或环状硫代缩醛，其中环状缩醛或环状硫代缩醛选自-O-Z-O-与



-S-Z-S-, Z为 $-(CT_1T_2)_2-$ 、 $-(CT_1T_2)_3-$ 或 $(T_3)_{0-4}$, 且 T_1 、 T_2 和 T_3 , 在每一存在处, 独立地选自氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 、 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基和 CO_2C_{1-4} 烷基(T_1 、 T_2 和 T_3 优选各自为氢);

R_1 、 R_2 和 R_3 独立地为氢, 或胺-保护基团, 选自苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(BOC)、芴基甲基氧基羰基(FMOC)、苄基(Bn)和对-甲氧基苄基(PMB) (胺-保护基团优选为Cbz、Bn或BOC, 尤其是Cbz或Bn);

R_4 为低级 C_{1-6} 烷基或苄基, 其任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 和 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代;

Y为卤素、 SR_{12} 或 OSO_2R_{13} ;

X为OH、卤素或 $OCOR_{14}$;

R_{12} 为 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)C(O)OR_{13}$ 或 $-(CH_2)C(O)R_{13}$;

R_{13} 在每一存在处为 C_{1-6} 烷基或苄基, 其任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 和 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代; 并且

R_{14} 在每一存在处为氢、 C_{1-6} 烷基或苄基, 其任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 和 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代。

当在本文中使用时, 任选被取代的苄基是指经过其亚甲基($-CH_2-$)连接的苄基, 并且任选在连接至亚甲基的苯环上被取代。

在第2项实施方案中, 本公开内容提供一种形成式IV产物或其盐的方法, 其中:

R_a 和 R_b 和它们均连接的碳原子一起合并以形成羰基或1,3-二氧戊环基团(优选的是, R_a 和 R_b 和它们均连接的碳原子一起合并以形成1,3-二氧戊环基团);

R_1 为氢;

R_2 为Cbz;

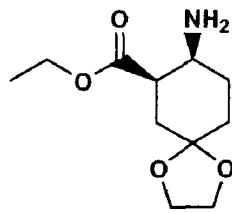
R_3 为氢;

R_4 为 C_{1-6} 氧烷基;

Y为S(Me); 以及

X为OH。

在第3项实施方案中，本公开内容提供一种方法，其中式II的 β -氨基酯为甲苯磺酸盐或氢溴酸盐。优选的式II的 β -氨基酯的盐为



的甲苯磺酸盐。

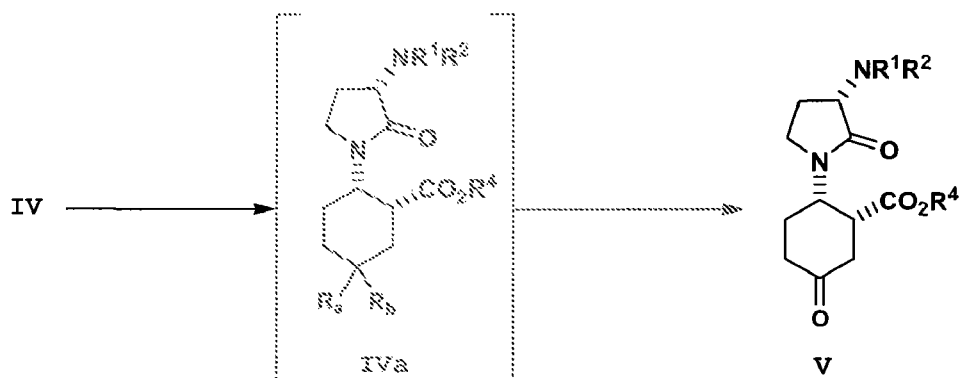
在第4项实施方案中，本公开内容提供一种形成式IV化合物或其盐的方法，其中偶合是在惰性气氛下，例如氮或氩(优选为氮)，在非质子性溶剂中进行，例如丙腈、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、乙酸叔丁酯或乙腈(尤其是乙腈和/或乙酸乙酯)。

在第5项实施方案中，本公开内容提供一种形成式IV化合物或其盐的方法，其中偶合是通过使式II的 β -氨基酯与二酰亚胺偶合试剂，在活化剂、经保护的式II的 β -氨基酯和叔胺碱存在下接触而完成。二酰亚胺偶合试剂包括例如EDAC的试剂。活化剂的实例包括1-羟基苯并三唑(HOBT; 该术语包括其水合物)与N',N'-4-二甲基氨基-吡啶。叔胺碱包括例如三烷基胺类，例如三乙胺、N,N-二异丙基-N-乙胺和三-正丙基胺。

在第6项实施方案中，本公开内容提供一种形成式IV化合物或其盐的方法，其中二酰亚胺偶合试剂为EDAC，活化剂为HOBT，而叔胺碱为三乙胺或N,N-二异丙基-N-乙胺。

在第7项实施方案中，本公开内容提供一种形成式IV化合物或其盐的方法，其中式II氨基酯比二酰亚胺偶合试剂比活化剂比三级胺的摩尔比分别为一比约0.90-1.50比约0.95-1.50比约2.00至3.00。该摩尔比优选分别为一比约0.95-1.05比约0.95-1.10和比约2.10至2.30。

在第8项实施方案中，本公开内容提供一种制备式V化合物或其盐的方法：



此方法包括以下步骤:

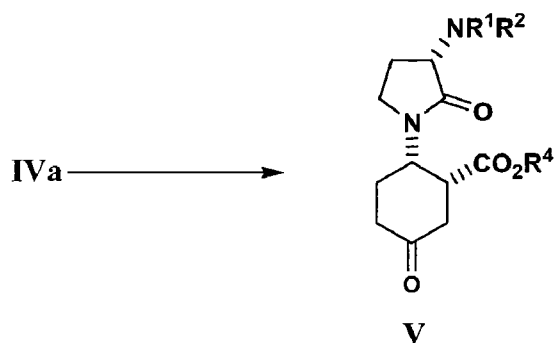
- a)使式IV化合物用烷基化剂进行烷基化,以形成经活化的化合物;
和
b)使经活化的化合物当场环化,得到式IVa化合物。

在第9项实施方案中,本公开内容提供一种制备式V化合物或其盐的方法,其中步骤a)的烷基化剂为硫烷基化剂,例如C₁₋₆烷基卤化物,且经活化的化合物为化合物IV的铯盐,其中Y为S[⊕](C₁₋₆烷基)R₁₂。优选的是,烷基化剂为碘化甲烷,且Y为S[⊕](CH₃)₂。

在第10项实施方案中,本公开内容提供一种形成式V化合物或其盐的方法,其中环化步骤包括将经活化的化合物或其盐与碱在溶剂存在下合并。该碱选自碳酸铯、重碳酸铯、碳酸钾、叔丁醇钠或六甲基二硅氮化钠(该碱优选为碳酸铯)。

在第11项实施方案中,本公开内容提供一种形成式V化合物或其盐的方法,其中环化步骤是在惰性气氛下,例如氮或氩,在溶剂中进行,溶剂选自DMSO、DMF、DMA、N-甲基吡咯烷酮和环丁砜。优选的是,惰性气氛为氮,并且溶剂选自DMSO和/或DMF。

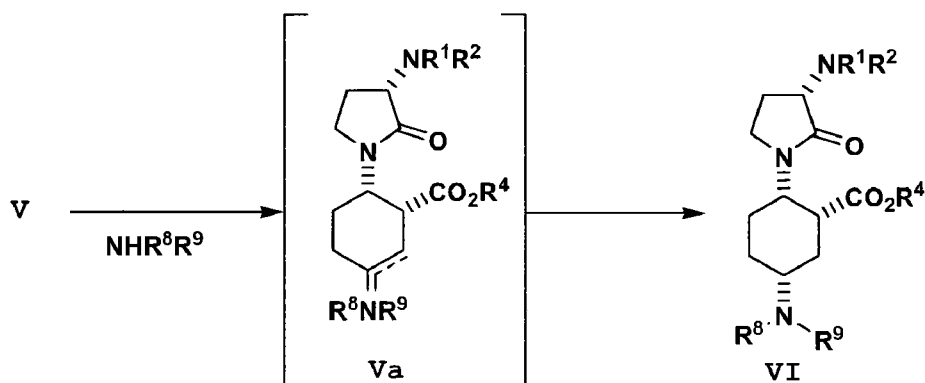
在第12项实施方案中,其中式IVa化合物具有缩醛部分基团,意即其中R_a和R_b独立地为C₁₋₆烷氧基,或和它们所连接的原子一起合并以形成环状缩醛或环状硫代缩醛,本公开内容提供一种形成式V化合物或其盐的方法,其进一步包括使具有缩醛部分基团的式IVa化合物水解的步骤:



以形成式V化合物。

水解步骤可根据本领域技术人员已知使缩醛基团水解的程序进行。例如，水解步骤可包括将式IVa化合物在溶剂中用酸处理，该溶剂例如丙酮、丁酮、乙腈及异丙醇或其水溶液。水解步骤优选包括将式IVa化合物在丙酮水溶液中用盐酸处理。

在第13项实施方案中，本发明本公开内容提供一种制备具有酯部分基团的式VI化合物或其盐的方法：



此方法包括以下步骤：

以还原方式使式V化合物与具有式NH(R⁸)(R⁹)的胺进行胺化，得到式Va的亚胺/烯胺，其中R₈和R₉独立地选自氢和C₁₋₆烷基。R₈和R₉优选独立地选自C₁₋₆烷基。胺更优选为N-甲基-N-异丙胺。

在第14项实施方案中，本公开内容提供一种形成式VI产物的方法，其包括以下的还原胺化步骤：

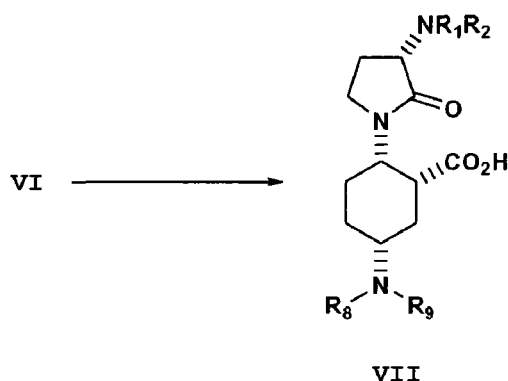
(a)将式NH(R⁸)(R⁹)的胺与脱水剂在温度约-20°至约+50°C下，添加至在非质子性溶剂中的式V化合物内，以形成式Va的亚胺/烯胺；和

(b)以氢气压力处理式Va的亚胺/烯胺与铂催化剂5% Pt/S/C的溶液，得到式VI化合物。

在第15项实施方案中，本公开内容提供一种形成式VI化合物或其盐的方法，其中步骤a)的脱水剂为路易斯酸/布朗斯特酸(Brønsted acid)(优选为四异丙氧化钛)，并且非质子性溶剂选自二氯乙烷、二氯甲烷、乙腈、DMSO、DMF和N-甲基-吡咯烷酮(优选为二氯甲烷)。

在第16项实施方案中，本公开内容提供一种形成式VI化合物或其盐的方法，其中在步骤b)中，5% Pt/S/C催化剂是以相对于化合物Va而言在大约0.5至50% (重量/重量)下存在。氢气优选为约15至约35 psig的压力。

在第17项实施方案中，本发明提供一种制备式VII化合物或其盐的方法：

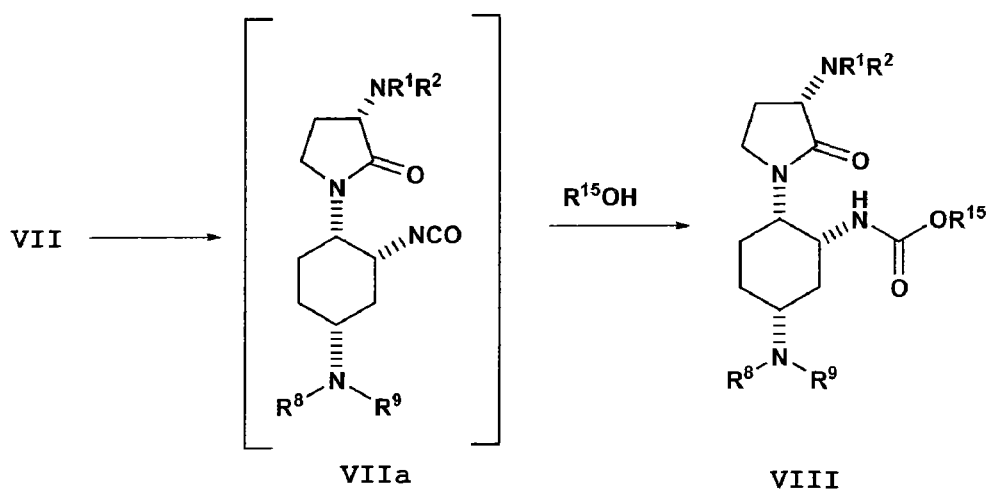


此方法包括以下步骤：

使式VI的酯化合物水解，得到式VII的酸化合物。温度范围为约40°C至约100°C(温度范围约50°C至约70°C是最优选的)。酸类选自硫酸、甲苯磺酸、硝酸、甲磺酸、氢溴酸和盐酸。最优选氢溴酸。优选的，水解步骤优选在盐酸水溶液中进行，以获得式VII化合物。

在第18项实施方案中，本公开内容提供一种制备式VII化合物的盐的方法，其进一步包括以下步骤，将碱与式VII酸化合物的溶液混合，任选当场进行。碱优选为碱金属氢氧化物，例如氢氧化钠。

在第19项实施方案中，本公开内容提供一种制备式VIII氨基甲酸酯化合物或其盐的方法：



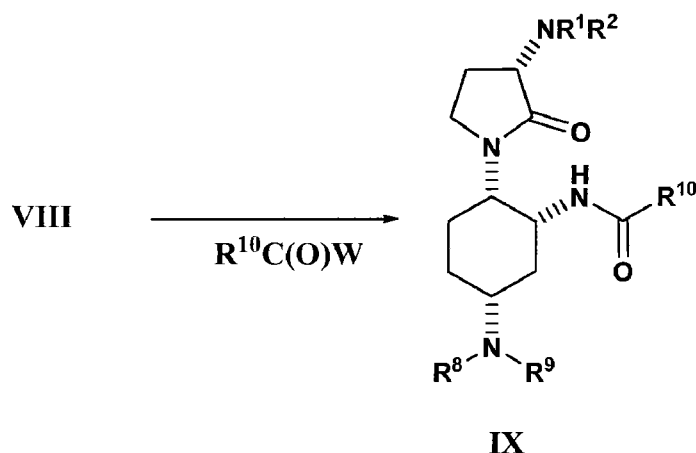
此方法包括以下步骤:

- a) 使式VII酸化合物转化成式VIIa异氰酸酯化合物; 和
- b) 使式VIIa异氰酸酯化合物与式 R^{15}OH 的醇反应, 得到式VIII氨基甲酸酯化合物;

其中 R^{15} 为 C_{1-6} 烷基或苄基, 其任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 和 $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基取代。 R^{15} 优选为叔丁基或未被取代的苄基。

在第20项实施方案中, 本公开内容提供一种通过Curtius重排以制备式VIII化合物或其盐的方法, 其包括使式VII化合物的钠盐与叠氮化物试剂(优选为叠氮化二苯基磷酰)在含有甲苯的溶剂(优选为叔丁醇)中, 在高于热重排触发点的温度下接触。温度优选大于 50°C 。

在第21项实施方案中, 本公开内容提供一种制备式IX化合物或其盐的方法:



此方法包括以下步骤:

- a) 使式VIII氨基甲酸酯化合物转变成游离胺中间体; 和
- b) 使游离胺中间体与试剂 $\text{R}^{10}\text{C(O)W}$ 当场酰化, 得到式IX化合物;

其中:

R^{10} 独立地为 C_{1-6} 烷基或苄基, 其任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 和 C(=O)C_{1-4} 烷基取代; 并且

W为卤素或 $\text{R}^{10}\text{C(O)-}$ 。

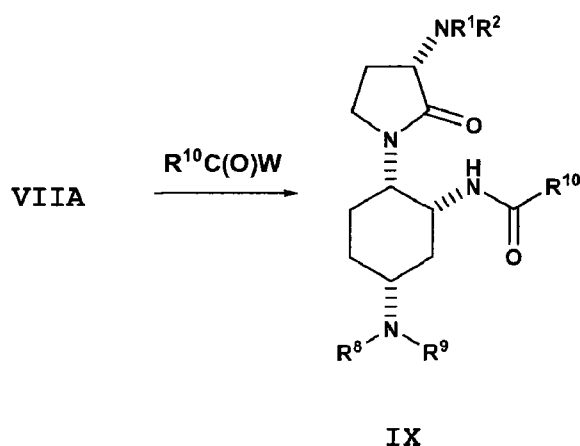
$\text{R}^{10}\text{C(O)W}$ 优选为乙酸酐。

在第22项实施方案中, 本公开内容提供一种制备式IX化合物或其盐的方法, 其中转变步骤包括以下步骤:

- a) 以酸处理式VIII化合物的溶液; 和
- b) 添加碱至溶液中, 得到游离胺中间体。

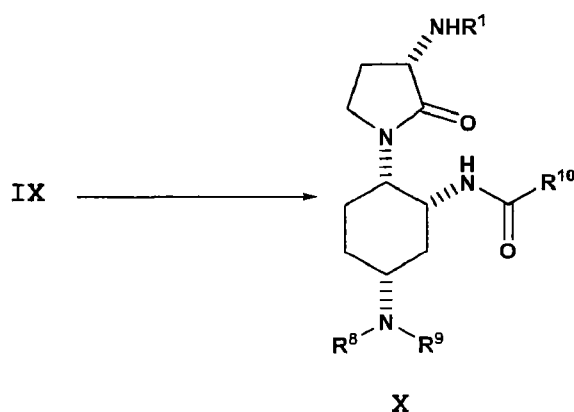
优选的该酸选自硫酸、甲苯磺酸、硝酸、甲磺酸、氢溴酸和盐酸, 更优选为甲磺酸。优选的是, 碱为三烷基胺, 优选为三乙胺。

在第23项实施方案中, 本公开内容提供一种制备式IX化合物或其盐的替代方法:



此方法包括以下步骤，将式VIIa异氰酸酯化合物在其相应酸 $R^{10}C(O)OH$ 存在下任选当场添加至酰化剂 $(R^{10}C(O))_2O$ 中，其中 R^{10} 独立地为 C_{1-6} 烷基或苄基，其任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 和 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代。 R^{10} 优选为 C_{1-6} 烷基，尤其是甲基。

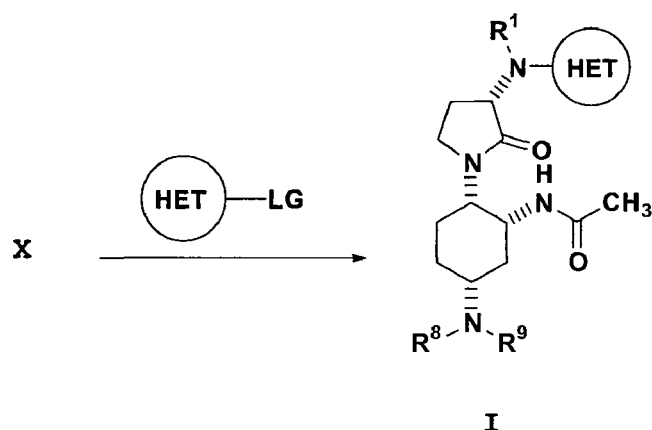
在第24项实施方案中，本公开内容提供一种制备式X化合物或其盐的方法：



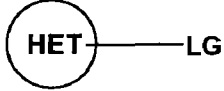
此方法包括以下步骤：

使经保护的式IX胺化合物去除保护，以提供式X化合物。优选的，当 R^2 为Cbz时，去除保护是通过在钯催化剂存在下氢化完成的。钯催化剂优选为10% Pd/C。

在第25项实施方案中，本公开内容提供一种制备式I化合物的方法：



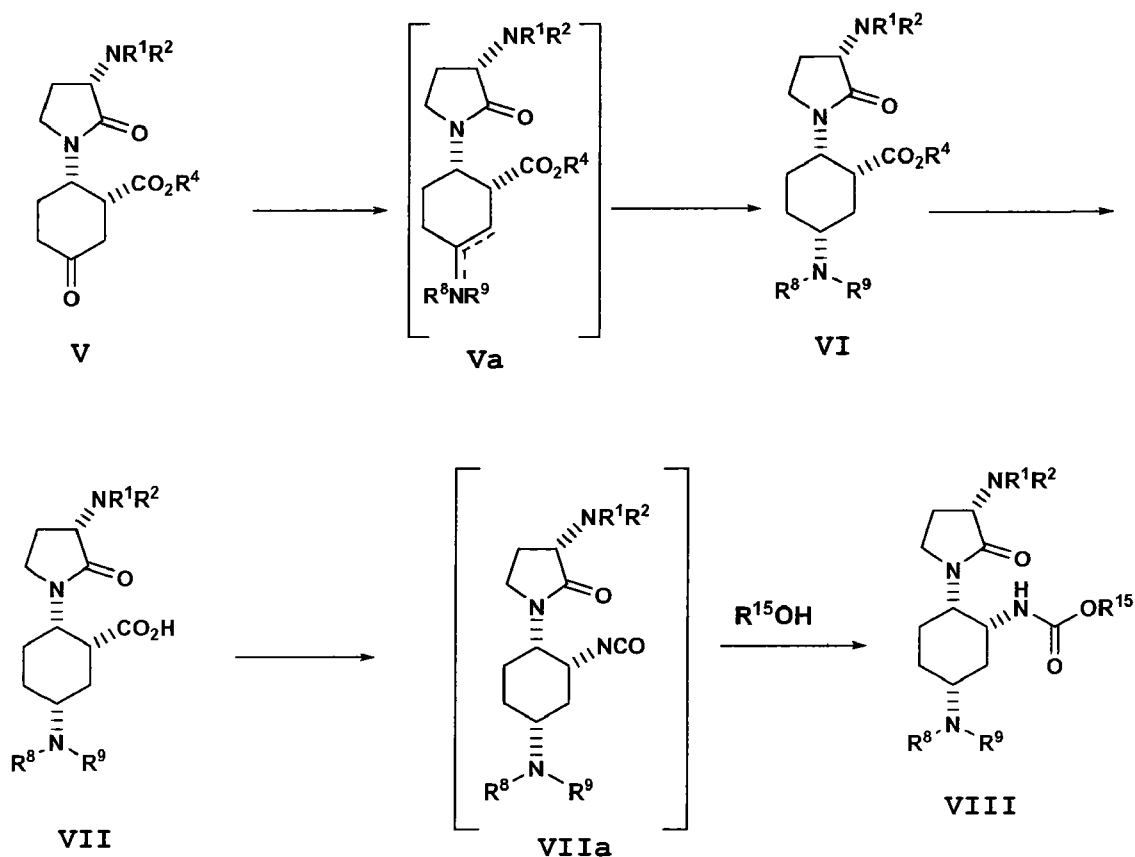
此方法包括以下步骤:

使式X化合物与下式化合物偶合: , 得到式I化合物;
其中:

HET为任选被取代的3-14元杂环基或杂芳基环, 其具有一至四个选自N、O或S的杂原子(优选为一至三个杂原子, 尤其是一至两个氮原子)在至少一个环中(HET优选为6-取代的喹唑啉-4-基, 更优选为6-三氟甲基-喹唑啉-4-基); 并且

LG为离去基团, 选自卤素或 $\text{OSO}_2\text{R}_{16}$ (LG优选为卤素, 更优选为氯), 其中 R_{16} 为 C_{1-6} 烷基, 苯基, 具有一或多个选自N、S或O的原子的5-至7-元杂芳基, 或者3-至7-元环烷基, 其全部均任选被取代(优选的, 对于 R_{16} 的任选取代基为一至三个选自卤素、 CF_3 和 C_{1-6} 烷基的基团)。

在第26项实施方案中, 本发明提供一种制备式VIII化合物或其盐的新颖方法:



此方法包括以下步骤：

以还原方式使式V化合物与式 $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ 的胺进行胺化，得到式VI化合物，包括以下步骤：

(a)将胺与脱水剂在温度约 -20° 至约 $+50^\circ\text{C}$ 下，添加至在非质子性溶剂中的式V化合物中，以形成式Va的亚胺/烯胺化合物；和

(b)以氢气压力处理式Va的亚胺/烯胺化合物和铂催化剂5% Pt/S/C的溶液，得到式VI酯化合物；

使式VI酯化合物水解，得到式VII酸化合物；

使式VII酸化合物转化成式VIIa异氰酸酯化合物；并且

使式VIIa异氰酸酯化合物与式 R^{15}OH 的醇反应，得到式VIII氨基甲酸酯化合物；

其中：

R_1 和 R_2 独立地为氢或胺-保护基团，选自苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(BOC)、苄基甲基氧基羰基(FMOC)、苄基(Bn)和对-甲氧基苄基(PMB)(胺-保护基团优选为Cbz、Bn或BOC，尤其是Cbz或Bn)；

R_4 为低级 C_{1-6} 烷基或苄基,其任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 和 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代;

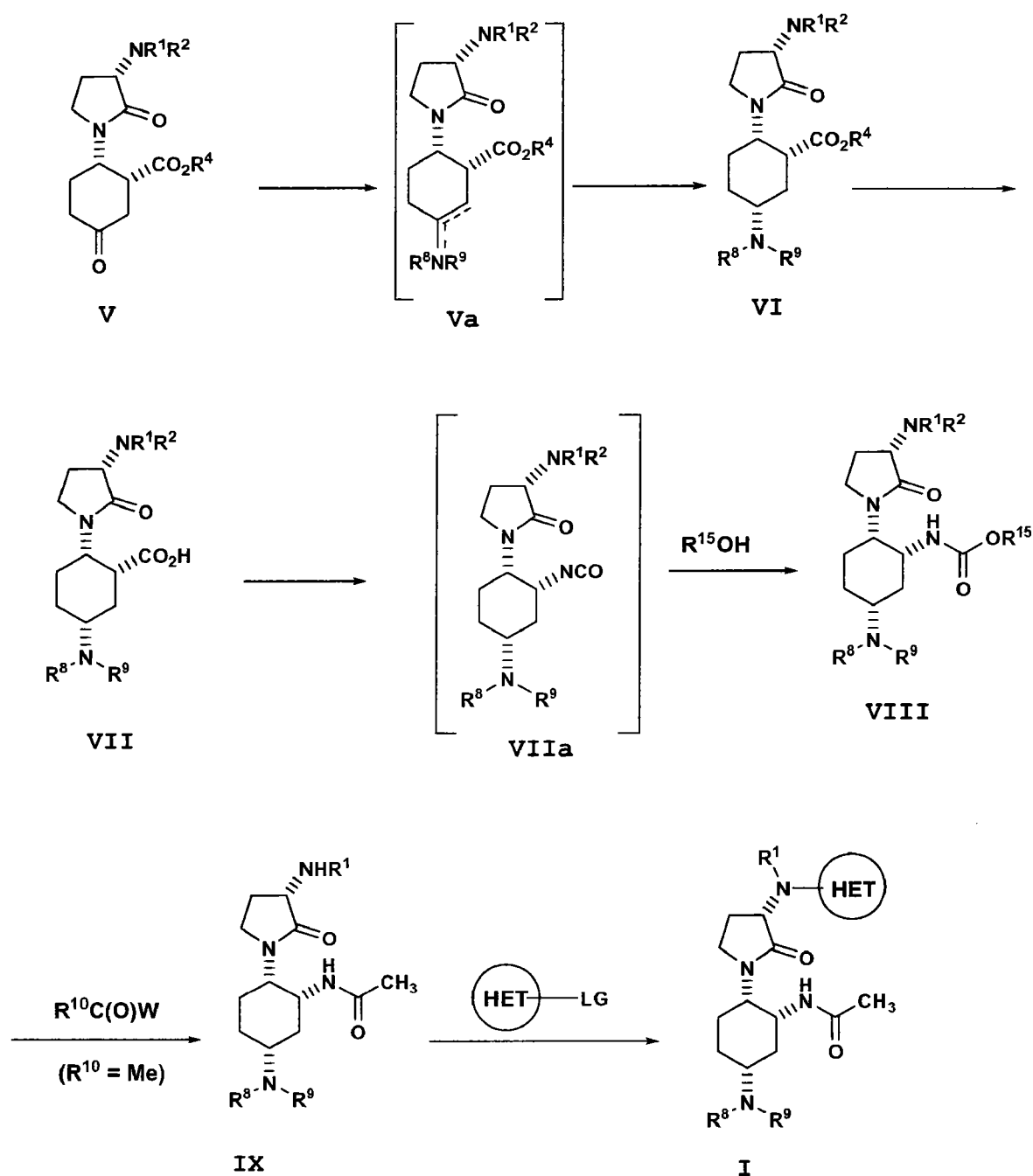
R_8 和 R_9 独立地为氢或 C_{1-6} 烷基;

R^{15} 为 C_{1-6} 烷基或苄基,其任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 和 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代(R^{15} 优选为叔丁基或未被取代的苄基,更优选为叔丁基);

HET为任选被取代的3-14元杂环基或杂芳基环,其具有一至四个选自N、O或S的杂原子(优选为一至三个杂原子,尤其是一至两个氮原子)在至少一个环中(HET优选为6-取代的喹唑啉-4-基,更优选为6-三氟甲基-喹唑啉-4-基);并且

LG为离去基团,选自卤素或 OSO_2R_{16} (LG优选为卤素,更优选为氯),其中 R_{16} 为 C_{1-6} 烷基,苯基,具有一或多个选自N、S或O的原子的5-至7-元杂芳基,或者3-至7-元环烷基,其全部均任选被取代(优选的,对于 R_{16} 的任选取代基为一至三个选自卤素、 CF_3 和 C_{1-6} 烷基的基团)。

在第27项实施方案中,本发明提供一种制备式I化合物或其盐的新颖方法:



此方法包括以下步骤:

以还原方式使式V化合物与式 $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ 的胺进行胺化, 得到式VI化合物, 以还原方式胺化包括以下步骤:

(a) 将胺与脱水剂在温度约 -20° 至约 $+50^\circ\text{C}$ 下, 添加至在非质子性溶剂中的式V化合物中, 以形成式Va的亚胺/烯胺化合物; 和

(b) 以氢气压力处理式Va的亚胺/烯胺化合物与铂催化剂5% Pt/S/C的溶液, 得到式VI酯化合物;

使式VI酯化合物水解，得到式VII酸化合物；

使式VII酸化合物转化成式VIIa异氰酸酯化合物；

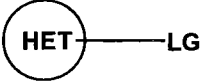
使式VIIa异氰酸酯化合物与式R¹⁵OH的醇反应，得到式VIII氨基甲酸酯化合物；

使式VIII氨基甲酸酯化合物转变成游离胺中间体；并且

使游离胺中间体以试剂R¹⁰C(O)W当场酰化，

得到经保护的式IX胺化合物；

使经保护的式IX胺化合物去除保护，得到式X化合物；并且

使式X化合物与下式化合物偶合：，得到式I化合物；

其中：

R₁和R₂独立地为氢或选自以下的胺-保护基团：苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(BOC)、芴基甲基氧基羰基(FMOC)、苄基(Bn)和对-甲氧基苄基(PMB) (胺-保护基团优选为Cbz、Bn或BOC，尤其是Cbz或Bn)；

R₄为低级C₁₋₆烷基或苄基，其任选被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃和C(=O)C₁₋₄烷基取代；

R₈和R₉独立地为氢或C₁₋₆烷基；

R¹⁰独立地为C₁₋₆烷基或苄基，其任选被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃和C(=O)C₁₋₄烷基取代(优选为C₁₋₆烷基，更优选为甲基)；

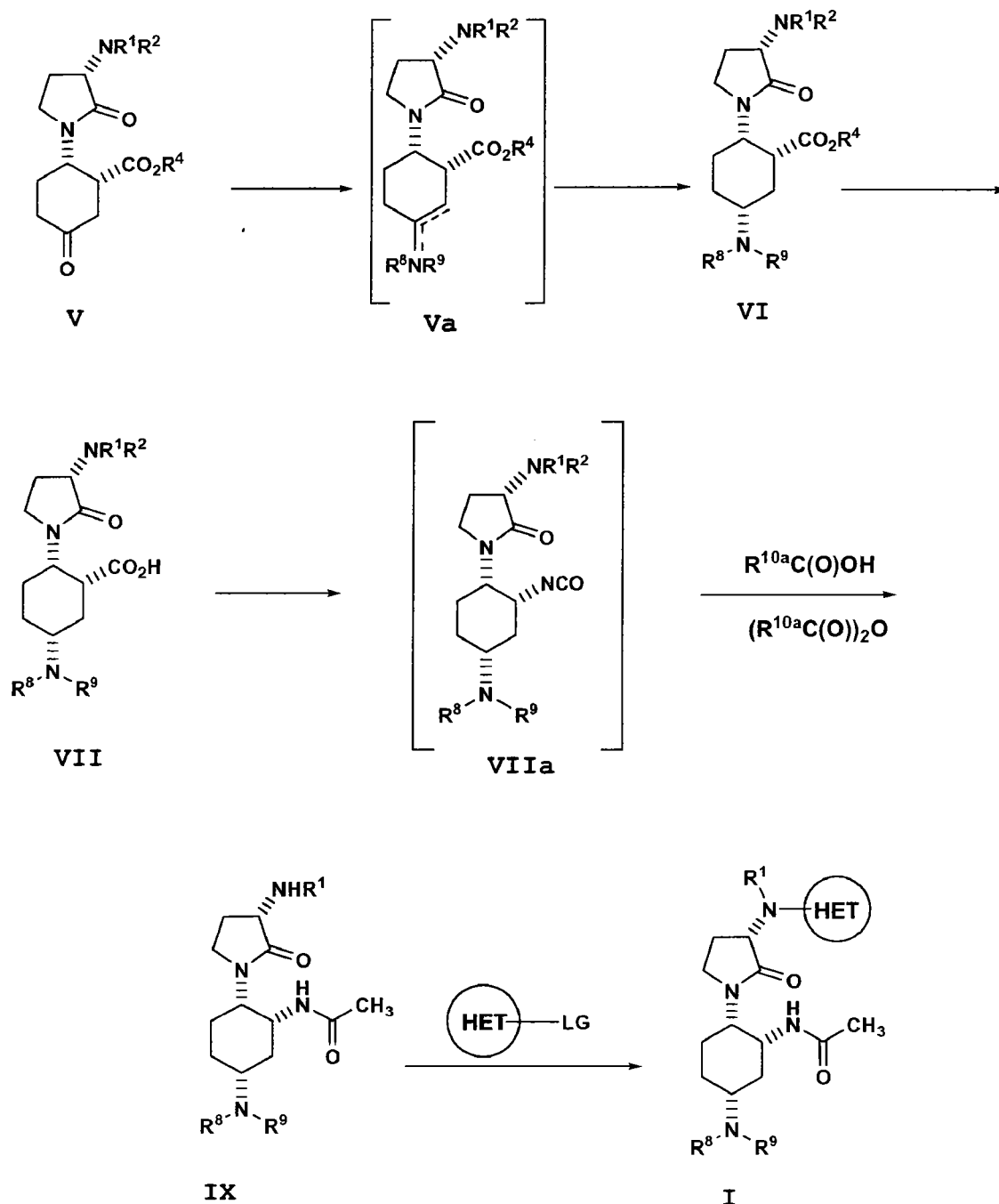
W为卤素或R¹⁰C(O)-；

R¹⁵为C₁₋₆烷基或苄基，其任选被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃和C(=O)C₁₋₄烷基取代(R¹⁵优选为叔丁基或未被取代的苄基，更优选为叔丁基)；

HET为任选被取代的3-14元杂环基或杂芳基环，其具有一至四个选自N、O或S的杂原子(优选为一至三个杂原子，尤其是一至两个氮原子)在至少一个环中(HET优选为6-取代的喹啉-4-基，更优选为6-三氟甲基-喹啉-4-基)；并且

LG为离去基团，选自卤素或OSO₂R₁₆(LG优选为卤素，更优选为氯)，其中R₁₆为C₁₋₆烷基，苯基，具有一或多个选自N、S或O的原子的5-至7-元杂芳基，或者3-至7-元环烷基，其全部均任选被取代(优选的，对于R₁₆的任选取代基为一至三个选自卤素、CF₃和C₁₋₆烷基的基团)。

在第28项实施方案中，本发明提供一种制备式I化合物或其盐的替代新颖方法：



此方法包括以下步骤：

以还原方式使式V化合物以式 $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ 的胺进行胺化，得到式VI化合物，以还原方式胺化包括以下步骤：

(a)将胺与脱水剂在温度约 -20° 至约 $+50^\circ\text{C}$ 下，添加至在非质子性溶剂中的式V化合物中，以形成式Va的亚胺/烯胺化合物；和

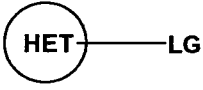
(b)以氢气压力处理式Va的亚胺/烯胺化合物与铂催化剂5% Pt/S/C的溶液,得到式VI酯化合物;

使式VI酯化合物水解,得到式VII酸化合物;

使式VII酸化合物转化成式VIIa异氰酸酯化合物;

将式VIIa异氰酸酯化合物,在其相应酸 $R^{10a}C(O)OH$ 存在下,任选当场添加至酰化剂 $(R^{10a}C(O))_2O$ 中,得到经保护的式IX胺化合物;

使经保护的式IX胺化合物去除保护,得到式X化合物;并且

使式X化合物与下式化合物偶合: , 得到式I化合物;

其中:

R_1 和 R_2 独立地为氢,或选自苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(BOC)、芴基甲基氧羰基(FMOC)、苄基(Bn)及对甲氧基苄基(PMB)的胺-保护基团(胺-保护基团优选为Cbz、Bn或BOC,尤其是Cbz或Bn);

R_4 为低级 C_{1-6} 烷基或苄基,其任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 和 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代;

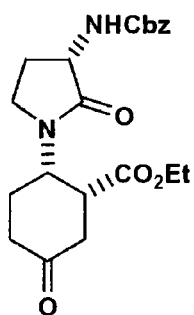
R_8 和 R_9 独立地为氢或 C_{1-6} 烷基;

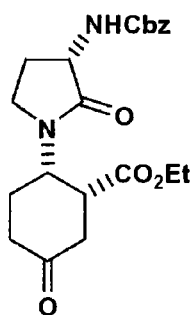
其中 R^{10a} 独立地为 C_{1-6} 烷基或任选被取代的苄基(R^{10a} 优选为甲基);

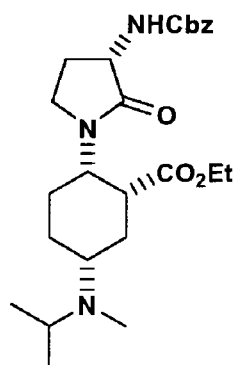
HET为任选被取代的3-14元杂环基或杂芳基环,其具有一至四个选自N、O或S的杂原子(优选为一至三个杂原子,尤其是一至两个氮原子)在至少一个环中(HET优选为6-取代的喹啉-4-基,更优选为6-三氟甲基-喹啉-4-基);并且

LG为离去基团,选自卤素或 OSO_2R_{16} (LG优选为卤素,更优选为氯),其中 R_{16} 为 C_{1-6} 烷基,苯基,具有一或多个选自N、S或O的原子的5-至7-元杂芳基,或者3-至7-元环烷基,其全部均任选被取代(优选的,对于 R_{16} 的任选取代基为一至三个选自卤素、 CF_3 和 C_{1-6} 烷基的基团)。

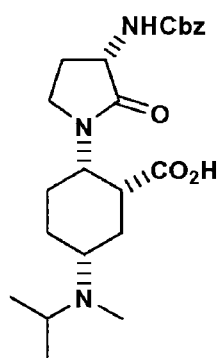
在第29项实施方案中,本公开内容提供根据任何前文实施方案的方法,其中:



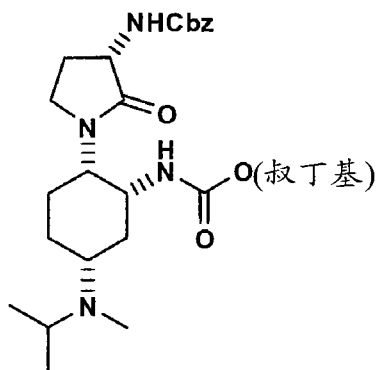
式V化合物为 ，或其盐；

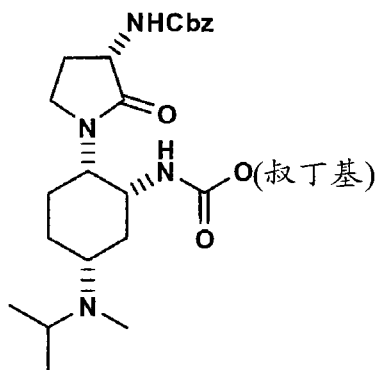


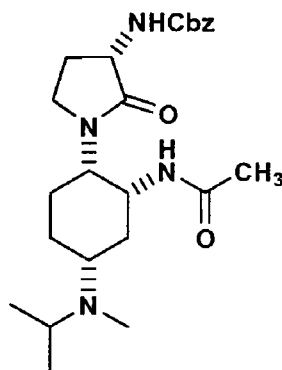
式VI化合物为 ，或其盐；

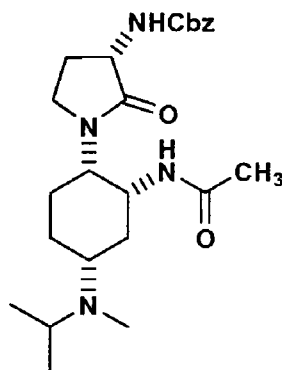


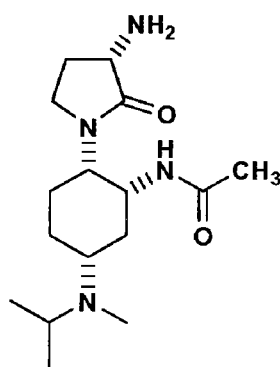
式VII化合物为 ，或其盐(优选为钠盐)；

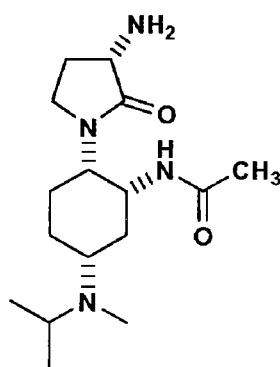


式VIII氨基甲酸酯化合物为 ，或其盐；



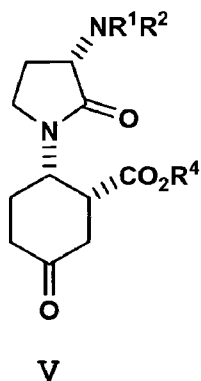
经保护的式IX胺化合物为 ，或其盐；



经去除保护的式X化合物为 ，或其盐；并且式I化

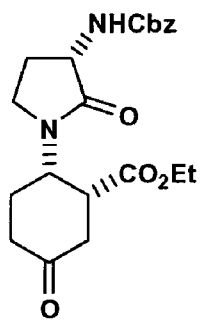
合物为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，或其盐。

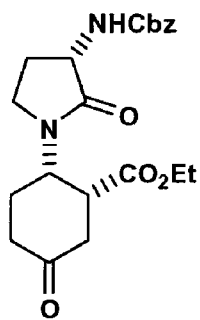
在第30项实施方案中，本公开内容提供式V化合物，或其盐：



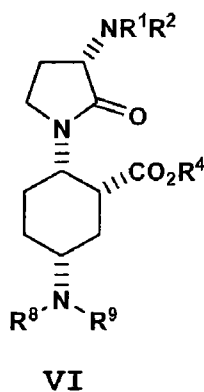
其中：

R_1 和 R_2 为氢，或者选自BOC、Cbz或苄基的胺-保护基团；并且 R_4 为低级 C_{1-6} 烷基。



优选的式V化合物为 ，或其盐。

在第31项实施方案中，本公开内容提供式VI化合物，或其盐：

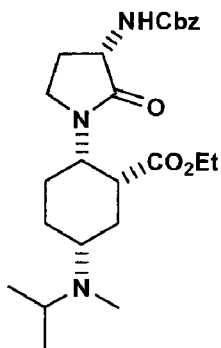


其中：

R_1 和 R_2 独立地为氢，或者选自BOC、Cbz或苄基的胺-保护基团；
并且

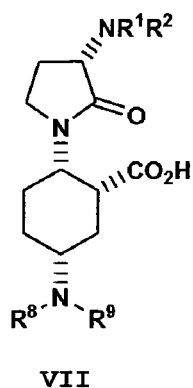
R_4 为 C_{1-6} 烷基；而且

R^8 和 R^9 独立地选自氢或 C_{1-6} 烷基。



优选的式VI化合物为 ，或其盐。

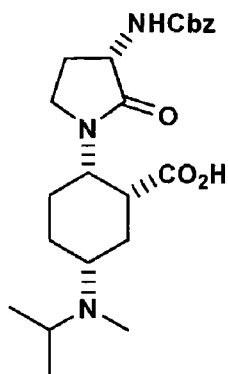
在第32项实施方案中，本公开内容提供式VII化合物，或其盐：

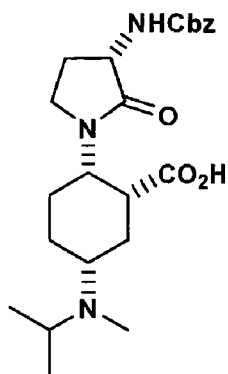


其中:

R¹和R²独立地为氢, 或者选自BOC、Cbz或苄基的胺-保护基团;
并且

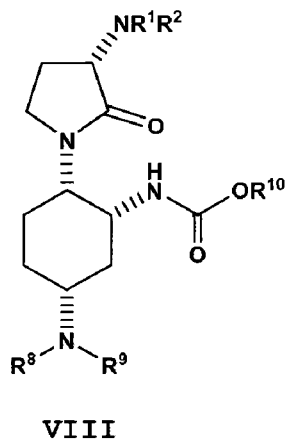
R⁸和R⁹独立地选自氢或C₁₋₆烷基。



优选的式VII化合物为  , 或其盐。

其优选的盐包括碱金属盐, 例如式VII化合物的钠盐。

在第33项实施方案中, 本公开内容提供式VII化合物, 或其盐:

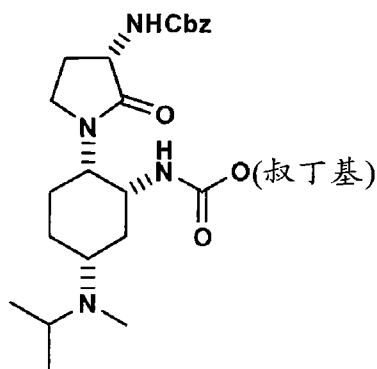


其中:

R^1 和 R^2 独立地为氢, 或者选自BOC、Cbz或苄基的胺-保护基团;

R^8 和 R^9 独立地选自氢或 C_{1-6} 烷基; 并且

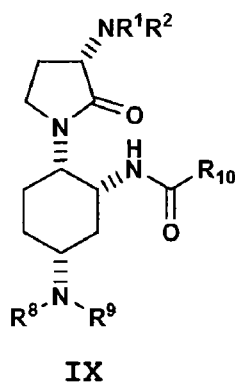
R_{10} 为 C_{1-6} 烷基或苄基。



优选的式VIII化合物为

, 或其盐。

在第34项实施方案中, 本公开内容提供式IX化合物, 或其盐:

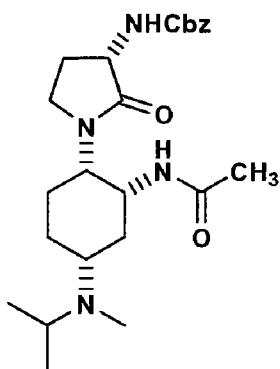


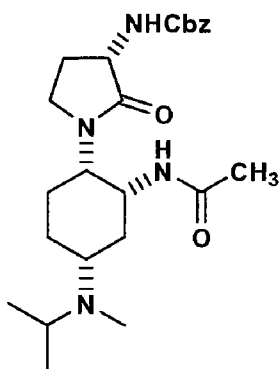
其中:

R^1 和 R^2 独立地为氢, 或者选自BOC、Cbz或苄基的胺-保护基团;

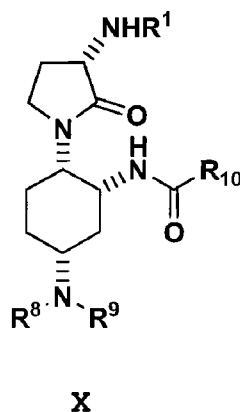
R^8 和 R^9 独立地选自氢或 C_{1-6} 烷基; 并且

R_{10} 为 C_{1-6} 烷基或任选被取代的苄基。



优选的式IX化合物为 ，或其盐。

在第35项实施方案中，本公开内容提供式X化合物，或其盐：

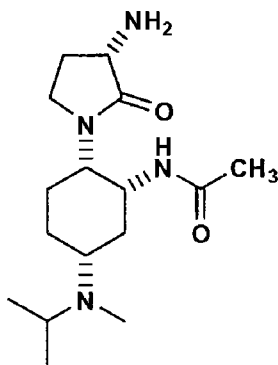


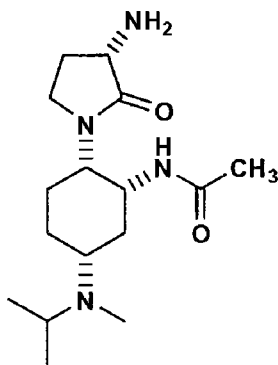
其中：

R^1 独立地为氢，或者选自BOC、Cbz或苄基的胺-保护基团；

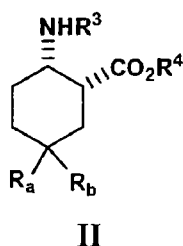
R^8 和 R^9 独立地选自氢或 C_{1-6} 烷基；并且

R_{10} 为 C_{1-6} 烷基或任选被取代的苄基。



优选的式X化合物为 ，或其盐。

在第36项实施方案中，本公开内容提供式II化合物，或其盐：



其中:

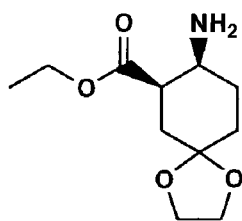
R_a 和 R_b 和它们均连接的碳原子一起合并以形成羰基或1,3-二氧戊环基团(优选的是, R_a 和 R_b 和它们均连接的碳原子一起合并以形成1,3-二氧戊环基团);

R_1 为氢;

R_2 为Cbz;

R_3 为氢; 并且

R_4 为 C_{1-6} 烷氧基。



优选的式II化合物为  , 或其盐。

优选的盐为甲苯磺酸盐或氢溴酸盐, 尤其是甲苯磺酸盐。

在第46项实施方案中, 本公开内容提供一种方法, 其中式I化合物为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺或其盐。

本发明可在未偏离其精神或基本特质下, 以其它特定形式具体体现。因此, 上述实施方案不应被认为是限制。本发明的任何和所有实施方案均可结合任何其它一或多项实施方案以描述其它实施方案。实施方案的各个别要素(例如优选的或特殊的方面)是其自身独立的实施方案。再者, 一项实施方案的任何要素意欲与来自任何实施方案的任何和所有其它要素合并, 以描述其它实施方案。此外, 本发明涵盖本文所指出的本发明的不同实施方案、部分实施方案、定义、说明例和实施例的组合。

定义

下文为本专利说明书和所附权利要求书中所使用术语的定义。对本文中基团或术语所提供的最初定义，在整个本专利说明书和权利要求书中适用于该基团或术语，个别地或作为另一种基团的一部分，除非另有指出。

"烷基"一词是指直链或分支链烃基，其具有1至12个碳原子，优选为1至6个碳原子。当数目以下标出现在符号"C"之后时，该下标更明确地界定特定基团可含有的碳原子数。例如，"C₁₋₆烷基"是指具有一至六个碳原子的直链与分支链烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、正戊基等等。下标"0"是指一个键。因此，术语羟基(C₀₋₂)烷基或(C₀₋₂)羟烷基包括羟基、羟甲基和羟乙基。烷基可被一至三个选自以下的基团取代：(C₁₋₆)烷基、(C₂₋₆)烯基、羟基、卤素、氰基、硝基、CF₃、O(C₁₋₆烷基)、OCF₃、C(=O)H、C(=O)(C₁₋₆烷基)、CO₂H、CO₂(C₁₋₆烷基)、NHCO₂(C₁₋₆烷基)、-S(C₁₋₆烷基)、NH₂、NH(C₁₋₆烷基)、N(C₁₋₆烷基)₂、N(CH₃)₃⁺、SO₂(C₁₋₆烷基)、C(=O)(C₁₋₄亚烷基)NH₂、C(=O)(C₁₋₄亚烷基)NH(烷基)、C(=O)(C₁₋₄亚烷基)N(C₁₋₄烷基)₂、C₃₋₇环烷基、苯基、苄基、苄基乙基、苄基氧基、苄氧基、萘基、四-至七-元杂环基和/或五-至六-元杂芳基。当被取代的烷基被芳基、杂环基、环烷基或杂芳基取代时，该环状系统均如下文定义，并且因此可具有零、一、二或三个也如下文定义的取代基。

当"烷基"一词与另一种基团一起使用时，例如在"芳烷基"中，此搭配更明确地定义被取代烷基将含有的取代基之一。例如，"芳烷基"是指如上文定义的取代的烷基，其中至少一个取代基为芳基，例如苄基。因此，芳基(C₀₋₄)烷基一词包括具有至少一个芳基取代基的取代的低级烷基，并且还包直接结合至另一个基团的芳基，意即芳基(C₀)烷基。

"烯基"一词是指直链或分支链烃基，其具有2至12个碳原子以及至少一个双键。2至6个碳原子并且具有一个双键的烯基是最优选的。烯基可如上文关于烷基所述被取代。

"炔基"一词是指直链或分支链烃基，其具有2至12个碳原子以及至少一个叁键。2至6个碳原子并且具有一个叁键的炔基是最优选的。炔基可如上文关于烷基所述被取代。

"亚烷基"一词是指二价直链或分支链烃基,其具有1至12个碳原子,优选为1至8个碳原子,例如 $\{-\text{CH}_2-\}_n$,其中 n 为1至12,优选为1-8。低级亚烷基,意即1至2个碳原子的亚烷基是最优选的。术语"亚烯基"和"亚炔基"分别指如上文定义的烯基和炔基的二价基团。亚烯基可如上文关于烷基所述被取代。

"烷氧基"一词是指被如本文所定义的烷基取代的氧原子。例如,"烷氧基"一词包括基团 $-\text{O}-\text{C}_{1-6}$ 烷基。

当下标涉及与烷氧基、硫基烷基或氨基烷基使用时,该下标是指该基团除了杂原子以外可含有的碳原子数。

应明了的是,对于所有基团的选择,包括例如烷氧基、硫基烷基和氨基烷基,将由本领域技术人员执行以提供稳定化合物。

"羰基"一词是指二价羰基 $-\text{C}(=\text{O})-$ 。

"酰基"一词是指连结至有机基团的羰基,更特别是基团 $\text{C}(=\text{O})\text{Re}$,以及二价基团 $-\text{C}(=\text{O})\text{Re}-$,其被连结至有机基团。基团 Re 可选自如本文定义的烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,或当合适时,为其相应的二价基团,例如亚烷基。

"环烷基"一词是指3至9个,优选为3至7个碳原子的完全饱和和部分不饱和烃环(并且因此包括"环烯基环")。"环烷基"一词包括具有零、一、二或三个取代基的环,所述取代基选自 (C_{1-4}) 烷基、 (C_{2-4}) 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 $\text{O}(\text{C}_{1-4}$ 烷基)、 OCF_3 、 $\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 、 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}$ 烷基)、 CO_2H 、 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}$ 烷基)、 $\text{NHCO}_2(\text{C}_{1-4}$ 烷基)、 $\text{S}(\text{C}_{1-4}$ 烷基)、 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4}$ 烷基)、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ 烷基) $_2$ 、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ 烷基) $_3^+$ 、 $\text{SO}_2(\text{C}_{1-4}$ 烷基)、 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}$ 亚烷基) NH_2 、 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}$ 亚烷基) $\text{NH}(\text{烷基})$ 和/或 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}$ 亚烷基) $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ 烷基) $_2$ 。"环烷基"一词还包括具有稠合到其上的第二环(例如,包括苯并、杂环基或杂芳基环)或者具有3至4个碳原子的碳-碳桥基的环。

"卤"或"卤素"术语是指氯、溴、氟及碘。

"卤烷基"一词表示具有一或多个卤素取代基的取代的烷基。例如,"卤烷基"包括单、双和三氟甲基。

"卤烷氧基"一词表示具有一或多个卤素取代基的烷氧基。例如,"卤烷氧基"包括 OCF_3 。

"杂原子"一词包括氧、硫和氮。

"芳基"一词是指苯基、联苯基、苄基、1-萘基和2-萘基。"芳基"一

词包括具有零、一、二或三个取代基的环，所述取代基选自(C₁₋₄)烷基、(C₂₋₄)烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、CF₃、O(C₁₋₄烷基)、OCF₃、C(=O)H、C(=O)(C₁₋₄烷基)、CO₂H、CO₂(C₁₋₄烷基)、NHCO₂(C₁₋₄烷基)、S(C₁₋₄烷基)、NH₂、NH(C₁₋₄烷基)、N(C₁₋₄烷基)₂、N(C₁₋₄烷基)₃⁺、SO₂(C₁₋₄烷基)、C(=O)(C₁₋₄亚烷基)NH₂、C(=O)(C₁₋₄亚烷基)NH(烷基)和/或C(=O)(C₁₋₄亚烷基)N(C₁₋₄烷基)₂。

术语"杂环基"或"杂环族"是指被取代与未被取代的非芳族(其可为部分或完全饱和)3-至15-元环，其具有一至四个杂原子。这些环可为3-至7-元单环状基团、7-至11-元双环状基团和10-至15-元三环状基团。含有杂原子的杂环基的各环可含有一或两个氧或硫原子和/或一至四个氮原子，其条件是各环中杂原子的总数为四或更少，以及进一步的条件是该环含有至少一个碳原子。完成双环状与三环状基团的稠合环可仅含有碳原子，并且可为饱和、部分饱和或不饱和。氮和硫原子可任选被氧化，并且氮原子可任选被季铵化。杂环基可被连接在任何可使用的氮或碳原子上。杂环基环可含有零、一、二或三个选自以下的取代基：(C₁₋₄)烷基、(C₂₋₄)烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、CF₃、O(C₁₋₄烷基)、OCF₃、C(=O)H、C(=O)(C₁₋₄烷基)、CO₂H、CO₂(C₁₋₄烷基)、NHCO₂(C₁₋₄烷基)、S(C₁₋₄烷基)、NH₂、NH(C₁₋₄烷基)、N(C₁₋₄烷基)₂、N(C₁₋₄烷基)₃⁺、SO₂(C₁₋₄烷基)、C(=O)(C₁₋₄亚烷基)NH₂、C(=O)(C₁₋₄亚烷基)NH(烷基)和/或C(=O)(C₁₋₄亚烷基)N(C₁₋₄烷基)₂。举例的杂环族基团包括氮杂环丁烷基、吡咯烷基、环氧丙烷基、咪唑啉基、噁唑烷基、异噁唑啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、哌嗪基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、2-氧代氮杂环庚烯基、氮杂环庚烯基(azepinyl)、4-哌啶酮基、四氢吡喃基、吗啉基、硫吗啉基、硫吗啉基亚砷、硫吗啉基砷、1,3-二氧戊环、奎宁啶基和四氢-1,1-二氧代噻吩基等。

"杂芳基"一词是指被取代与未被取代的芳族3-至14-元环，其在至少一个环中具有一至四个选自O、S或N的杂原子。该环可为5-或6-元单环状基团、9-或10-元双环状基团和11-至14-元三环状基团。含有杂原子的杂芳基的各环可含有一或两个氧或硫原子和/或一至四个氮原子，其条件是各环中杂原子的总数为四或更少，并且各环具有至少一个碳原子。完成双环状与三环状基团的稠合环可仅含有碳原子，并且可为饱

和、部分饱和或不饱和。氮和硫原子可任选被氧化，并且氮原子可任选被季铵化。双环状或三环状的杂芳基必须包含至少一个全芳族环，但一个或多个其它稠合环可为芳族或非芳族。杂芳基可被连接在任何环的任何可使用的氮或碳原子上。杂芳基环系统可含有零、一、二或三个选自以下的取代基： (C_{1-4}) 烷基、 (C_{2-4}) 烯基、卤素、羟基、氰基、硝基、 CF_3 、 $O(C_{1-4})$ 烷基、 OCF_3 、 $C(=O)H$ 、 $C(=O)(C_{1-4})$ 烷基、 CO_2H 、 $CO_2(C_{1-4})$ 烷基、 $NHCO_2(C_{1-4})$ 烷基、 $S(C_{1-4})$ 烷基、 NH_2 、 $NH(C_{1-4})$ 烷基、 $N(C_{1-4})$ 烷基)₂、 $N(C_{1-4})$ 烷基)₃⁺、 $SO_2(C_{1-4})$ 烷基、 $C(=O)(C_{1-4})$ 亚烷基) NH_2 、 $C(=O)(C_{1-4})$ 亚烷基) NH (烷基)和/或 $C(=O)(C_{1-4})$ 亚烷基) $N(C_{1-4})$ 烷基)₂。

举例的杂芳基包括吡咯基、吡唑基、吡唑烷基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、噻二唑基、异噻唑基、呋喃基、噻吩基、噁二唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、三嗪基、吲哚基、苯并噻唑基、苯并二氧戊环烯基、苯并噁唑基、苯并噻吩基、喹啉基、四氢异喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、苯并吡喃基、吲嗪基、苯并呋喃基、色酮基、香豆素基、苯并吡喃基、噌啉基、喹喔啉基、吲唑基、吡咯并吡啶基、呋喃并吡啶基、二氢异吲哚基、四氢喹啉基等。特定杂芳基包括例如6-取代的喹唑啉-4-基和6-三氟甲基-喹唑啉-4-基。

在基团为任选被取代的情况中，其包括被取代与未被取代的基团。

本文所描述的化合物可具有不对称中心。含有不对称取代原子的本发明化合物可以分离成光学活性或外消旋形式。本领域公知如何制备光学活性形式，例如通过外消旋形式的拆分，或通过光学活性起始物质的合成得到。烯烃、 $C=N$ 双键等多种几何异构体也可以存在于本文所述的化合物中，并且所有这些稳定的异构体均意欲涵盖在本发明中。本发明化合物的顺式和反式几何异构体被描述为并且可以被分为异构体的混合物或为分离的异构体形式。一种结构的所有手性、非对映异构体、外消旋形式和所有几何异构形式均是希望的，除非明确指示特定立体化学或异构物形式。

本文中所揭示化合物的一种对映体与另一种比较可显示优越的活性。因此，所有立体化学物质均被认为是本发明的一部分。当需要时，外消旋物质的分离可通过HPLC使用手性柱而完成，或者通过使用拆分试剂例如氯化樟脑磺酰拆分而完成，如Steven D. Young et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 2602-2605。

本文中使用的"药学上可接受"的措辞,是指在合理的医学判断的范围内,适用于与人类和动物的组织接触而不会有过度毒性、刺激性、过敏性应答或其它问题或并发症,并有合理的利益/风险比的化合物、物质、组合物和/或剂型。

本文中使用的"药学上可接受的盐"是指所揭示化合物的衍生物,其中该母体化合物通过制造其酸或碱盐而被修饰。药学上可接受盐的实例,包括但不限于碱性残基例如胺类的矿酸盐或有机酸盐;酸性残基例如羧酸类的碱或有机盐;等等。药学上可接受的盐,包括母体化合物的常用无毒性盐或季铵盐,例如来由无毒性无机酸或有机酸的盐。例如,这些常用的无毒性盐包括衍生自无机酸的盐,无机酸例如盐酸、苯磺酸、氢溴酸、硫酸、胺基磺酸、磷酸、硝酸等;以及由有机酸制得的盐,有机酸例如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、双羟萘酸、顺丁烯二酸、羟基顺丁烯二酸、苯基乙酸、麸胺酸、苯甲酸、柳酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、反丁烯二酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羟乙磺酸等。

本发明药学上可接受的盐可以从含有碱性或酸性部分的母体化合物通过常规化学方法合成得到。一般而言,这些盐可以在水中或在有机溶剂中或在此两者的混合物中,通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的适宜碱或酸反应而制成;一般而言,非水性介质例如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。适合的盐的列举可参阅 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, 其公开内容并入本文供参考。

由于已知前体药物会提高许多需要的医药质量(例如溶解度、生物利用率、制造等...),故本发明化合物可以前体药物形式递送。因此,本发明系意欲涵盖目前所主张的化合物的前体药物,它们的递送方法和含有它们的组合物。"前体药物"意欲包括任何共价结合的载体,当此种前体药物被施用于哺乳动物患者时,其会在体内释放本发明的活性母体药物。本发明中的前体药物是通过改变存在于化合物中的官能基而制成的,其方式是在例行操作中或在体内使这些修饰分裂成母体化合物。前体药物包括本发明的化合物,其中羟基、氨基或巯基结合至任何基团,当本发明的前体药物被施用于哺乳动物患者时,其会分别

分裂而形成游离羟基、游离胺基或游离巯基。前体药物的实例包括但不限于在本发明化合物中的醇与胺官能基的乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物。

"稳定化合物"与"稳定结构"意欲表示一种化合物，其足够强健而从反应混合物中留存着，分离至有用的纯度，以及配制成有效治疗剂。本发明意欲具体体现稳定化合物。

"治疗有效量"意欲包括本发明化合物单独的量，或者所主张的化合物的组合的量，或者本发明化合物与其它有效抑制MCP-1或有效治疗或预防本文中所讨论的病症的活性成份的量。

本文中使用的"治疗"或"治疗"涵盖在哺乳动物特别是人类中的疾病状态的治疗，并且包括：(a)预防该疾病状态发生于哺乳动物中，特别是当此种哺乳动物易罹患该疾病状态，但尚未被诊断为具有该疾病时；(b)抑制该疾病状态，意即遏制其发展；和/或(c)减轻该疾病状态，意即造成该疾病状态的退化。

本文中使用以指称特定型式例如"N-2"的名称，不应被认为是限制有关具有类似或相同物理和化学特性的任何其它物质，而是应理解为这些指称仅仅是鉴别符号，其应根据本文中提出的表征信息加以解释。

本发明提供作为一种新颖物质的N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺的游离碱的结晶型，特别是呈药学上可接受的型式。在某些优选实施方案中，游离碱的结晶型呈基本上纯净的型式。游离碱的优选实施方案公开于实施例1中，例如N-2、DC-1、THOO-1、E-1、A-1和AN-3。

本发明还提供一种新颖物质的N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺的盐的结晶型，特别是呈药学上可接受的型式。在某些优选实施方案中，盐的结晶型呈基本上纯净的型式。盐的优选实施方案公开于实施例1中，例如二-苯磺酸盐的N-1型式，和HCl盐的H4-1型式。

本文中使用的"多晶型物"是指形成晶体的分子、原子和/或离子具有相同化学组成但不同空间排列的结晶型。

本文中使用的"溶剂合物"是指分子、原子和/或离子的结晶型，其进一步含有被并入晶体结构中的一种或多种溶剂的分子。在溶剂合物

中的溶剂分子可以规则排列和/或非有序排列存在。溶剂合物可含有无论是化学计量或非化学计量的溶剂分子的量。例如，具有非化学计量的溶剂分子的量的溶剂合物可以从溶剂合物部分损失溶剂得到。

本文中使用的"非晶型"是指不是结晶性的分子、原子和/或离子的固体形式。非晶型固体不会显示明确的X-射线衍射图。

本文中使用的"基本上纯净"，当参考结晶型使用时，表示以化合物重量为基准，化合物具有纯度大于90重量%，包括大于90、91、92、93、94、95、96、97、98和99重量%，也包括等于约100重量%的化合物I。其余物质包括该化合物的其它型式，和/或由于其制备而产生的反应杂质和/或操作杂质。例如，N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺(游离碱或盐)的结晶型，当通过目前已知并且本领域通常接受的方式测量时，可被视为基本上纯净，因其具有纯度大于90重量%，其中其余小于10重量%的物质包含N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺(游离碱或盐)的其它型式，和/或反应杂质和/或操作杂质。

结晶型的样品可具有基本上纯净的相均一性，这显示有优势量的单晶型式和任选少量的一种或多种其它结晶型存在。超过一种结晶型存在于样品中，其可通过例如粉末X-射线衍射(PXRD)或固态核磁共振光谱学(SSNMR)的技术测定。例如，在以实验方式测量的PXRD图和模拟PXRD图的比较中，额外吸收峰的存在可表示超过一种结晶型在样品中。模拟PXRD可以从单晶X-射线数据算得。参阅Smith, D.K., "A FORTRAN Program for Calculating X-Ray Powder Diffraction Patterns," Lawrence Radiation Laboratory, Livermore, California, UCRL-7196 (April 1963)。

优选地，结晶型具有基本上纯净的相均一性，如通过在以实验方式测量的PXRD图中，由模拟PXRD图中不存在的额外吸收峰所产生的总吸收峰面积低于10%，优选低于5%，并且更优选低于2%所显示的。最优选的是一种这样的结晶型，其具有基本上纯净的相均一性，其在以实验方式测量的PXRD图中，由模拟PXRD图中不存在的额外吸收峰所产生的总吸收峰面积低于1%。

制备结晶型的操作是本领域已知的。结晶型可通过多种方法制备，

包括例如从适宜溶剂中结晶或重结晶，升华作用，从熔融体生长，从另一相的固态转变，从超临界流体结晶，以及喷射喷雾。结晶型来自溶剂混合物的结晶或重结晶化的技术，包括例如溶剂的蒸发，降低溶剂混合物的温度，将晶体播种到分子和/或盐的过饱和溶剂混合物中，使溶剂混合物冻干，以及将反溶剂(反萃溶剂)添加至溶剂混合物中。

该型式可使用单晶X-射线衍射表征和区别，其是以一种型式的单晶在固定分析温度下的单位晶胞测量为基础。单位晶胞的详细说明提供于Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., New York (1968), Chapter 3, 其并入本文供参考。或者，原子在晶格内空间关系上的独特排列，可根据所发现的部分原子坐标来表征。另一种表征晶体结构的方式是通过粉末X-射线衍射分析进行的，其中将实验或所发现的衍射分布形态与代表性的纯粉末物质的模拟分布形态作比较，两者均在相同分析温度下操作，并且主题型式的测量值以一系列 2θ 值表征。

可使用表征该型式的其它方式，例如固态核磁共振(SSNMR)、差示扫描量热法和热重分析。这些参数还可合并使用以表征主题型式。

本文中使用的"可忽视的重量损失"一词，当通过TGA表征时，显示存在纯(非溶剂化的)结晶型。

本文中使用的"可忽视的%吸水率"一词，当通过水份吸着等温线表征时，显示经测试的型式为非吸湿性。

在本发明的一项实施方案中，N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺(游离碱或盐)的结晶型是以基本上纯净的形式提供的。此结晶型可被使用于医药组合物中，该医药组合物可任选包含一种或多种其它选择的成份，例如选自赋形剂、载体以及其它不同分子结构的活性医药成份或活性化学个体之一。

优选地，结晶型具有基本上纯净的相均一性，如通过在以实验方式测量的PXRD图中，由模拟PXRD图中不存在的额外吸收峰所产生的总吸收峰面积低于10%，优选低于5%，并且更优选低于2%所显示的。最优选的是一种这样的结晶型，其具有基本上纯净的相均一性，其在以实验方式测量的PXRD图中，由模拟PXRD图中不存在的额外吸收峰所产生的总吸收峰面积低于1%。

在另一项实施方案中,提供了一种组合物,其包含基本上结晶型的N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺(游离碱或盐)。此项实施方案的组合物可包含至少90重量%该型式,以其在组合物中的重量为基准。

反应杂质和/或操作杂质的存在可通过本领域已知的分析技术测定,例如色谱法、核磁共振光谱法、质谱法或红外光谱法。

结晶型可通过多种方法制备,包括例如从适宜溶剂中结晶或重结晶,升华作用,从熔融体生长,从另一相的固态转变,从超临界流体结晶,以及喷射喷雾。结晶型来自溶剂混合物的结晶或重结晶化的技术,包括例如溶剂的蒸发,降低溶剂混合物的温度,将晶体播种到分子和/或盐的过饱和溶剂混合物中,使溶剂混合物冻干,以及将反溶剂(反萃溶剂)添加至溶剂混合物中。可使用高通过量结晶技术来制备结晶型(包括多晶型物)。

药物的晶体(包括多晶型物)、制备方法、以及药物晶体的表征,讨论于Solid-State Chemistry of Drugs, S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, and J.G. Stowell, 2nd Edition, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999)。

对于使用溶剂的结晶技术,一种或多种溶剂的选择通常取决于一种或多种因素,例如化合物的溶解度、结晶技术以及溶剂的蒸气压。可使用溶剂的组合;例如,可使化合物溶解至第一溶剂中得到溶液,接着添加反溶剂以降低化合物在溶液中的溶解度,再获得晶体的形成。"反溶剂"是化合物在其中具有低溶解度的溶剂。制备晶体的适宜溶剂包括极性溶剂和非极性溶剂。

在一种制备晶体的方法中,使N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺(为游离碱或盐)悬浮和/或搅拌于适宜溶剂中,得到浆液,可将其加热以促进溶解。本文中使用的"浆液"一词表示饱和溶液,其还可含有另一数量的固体,得到在给定温度下的不均匀混合物。关于这方面的适宜溶剂包括,例如,极性非质子性溶剂和极性质子性溶剂,以及它们的两种或多种的混合物,如本文中所公开的。

可将种子晶体添加至任何结晶混合物中以促进结晶。正如本领域技术人员理解的,使用晶种播种作为一种控制特定结晶型生长的方式,

或作为一种控制结晶性产物粒子大小分布的方式。因此,所需晶种量的计算取决于可使用晶种的大小和平均产物粒子的所需大小,例如在“Programmed cooling of batch crystallizers,” J.W. Mullin and J. Nyvlt, *Chemical Engineering Science* (1971) 26: 369-377中描述的。一般而言,需要小尺寸晶种以有效地控制晶体在批次中的生长。小尺寸晶种可通过较大晶体的筛滤、研磨或微粉化,或通过溶液的微结晶作用而产生。应当注意,晶体的研磨或微粉化不会造成所需结晶型在结晶度上的任何改变(意即改变成非晶型或另一种多晶型物)。

可以在真空下将冷却的混合物过滤,并且可将分离的固体用适宜溶剂(例如冷的重结晶溶剂)洗涤,再在氮气吹扫下干燥,得到所需的结晶型。分离的固体可通过适宜的光谱或分析技术分析,例如SSNMR、DSC、PXRD或其类似方式,以确保产物的优选结晶型形成。所形成的结晶型通常以大于约70重量%分离产率,但优选大于90重量%的量制成,以最初被使用于结晶操作中的N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺(游离碱或盐)的重量为基准。如果必要,此产物可经共研磨或过筛,以去除产物团块。

结晶型可直接从制备N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺(游离碱或盐)的最后处理步骤的反应介质中制备。这可例如通过在最后处理步骤中使用化合物可从其中结晶的溶剂或溶剂混合物来完成。或者,结晶型可通过蒸发或溶剂添加技术获得。为此目的使用的适宜溶剂,包括本文中所述的任何溶剂,包括质子性极性溶剂如醇类,以及非质子性极性溶剂如酮类。

以下述作为一般指导,可将反应混合物过滤以移除任何不期望的杂质、无机盐等,接着用反应或结晶溶剂洗涤。可使所形成的溶液浓缩,以移除过量溶剂或气态组份。若使用蒸馏,则所收集的馏出物的最后量可以改变,这取决于包括例如以下的操作因素:容器大小、搅拌能力等。以下述作为一般指导,在进行溶剂置换之前,可使反应溶液蒸馏至原先体积的约1/10。可根据标准操作技术,将反应物取样并检测,以测定反应的程度和重量%产物。如果需要,可添加或移除其它反应溶剂,以使反应浓度达到最佳。最终浓度优选被调整至约50重量%,

此时通常形成浆液。

优选可直接添加溶剂至反应容器，而无需蒸馏反应混合物。为此目的使用的优选溶剂是可以在最后参入到晶格中的，如上文关于溶剂交换所讨论的。虽然最终浓度可依所需的纯度、回收等而改变，但游离碱在溶液中的最终浓度，优选为约4%至约7%。可将反应混合物在溶剂添加之后搅拌，并且同时温热。以下述作为说明，可将反应混合物搅拌约1小时，同时温热至约70℃。反应优选经热过滤，并用反应溶剂、添加的溶剂或其组合洗涤。可添加种子晶体至任何结晶溶液中，以引发结晶。

本文中所述的各种型式可通过利用本领域技术人员已知的各种分析技术来使它们相互区别。这些技术包括但不限于粉末X-射线衍射(PXRD)、差示扫描量热法(DSC)和/或热重分析(TGA)。或者，这些型式可使用单晶X-射线衍射来表征和区别，其是以一种给定型式的单晶在固定分析温度下的单位晶胞测量为基础。单位晶胞的详细说明提供于Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., New York (1968), Chapter 3, 其并入本文供参考。具体地说，原子在晶格内在空间关系上的独特排列可根据所发现的部分原子坐标表征。另一种表征晶体结构的方式是通过粉末x-射线衍射分析，其中将所发现的衍射分布形态与单晶结构数据产生的模拟分布形态作比较。有关主题型式的粉末x-射线衍射测量值被表征为一系列2 θ 值(通常为四个或更多个)。

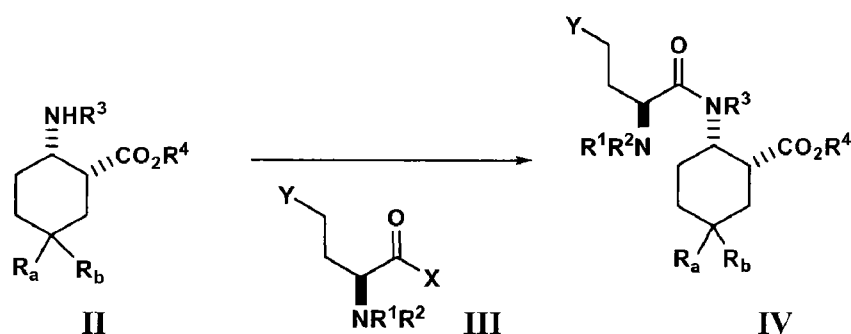
可使用表征此型式的其它方式，例如固态核磁共振(SSNMR)波谱法、差示扫描量热法(DSC)、热相图法(thermography)以及结晶性或非晶型型态学的总体检测。这些参数也可合并使用，以表征主题型式。

本领域普通技术人员将理解，可以获得具有测量误差的X-射线衍射图，其取决于所使用的测量条件。特别是，一般已知X-射线衍射图中的强度可能波动，这取决于所使用的测量条件以及晶体的形状或型态学。应进一步理解的是，相对强度还可根据实验条件而改变，因此确切的强度级数不应考虑在内。此外，有关常用X-射线衍射图衍射角度的测量误差，通常为约0.2° 2 θ 值或更低，优选为约0.1° 2 θ 值(如后文所讨论)，并且此种程度的测量误差应考虑在内，例如有关前文所提及的衍射角度。因此，应理解的是，本发明的结晶型并不限于提供X-射

线衍射图完全相同于本文所公开的附图中所描绘的X-射线衍射图的结晶型。提供X-射线衍射图基本上相同于附图中所公开的任何结晶型均落在本发明的范围内。确定X-射线衍射图基本上相同的能力是在本领域技术人员的视界范围内。

合成

图式1: 酰胺IV的制备



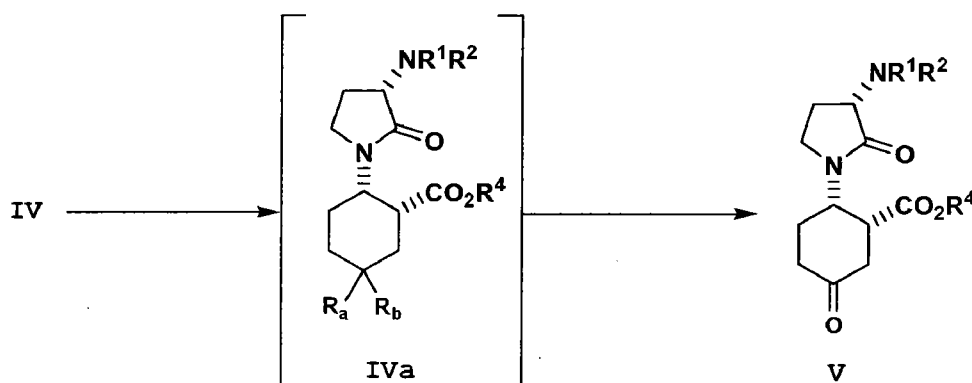
使用本领域已知的方法,将式II的 β -氨基酯或其盐(包括甲苯磺酸盐或氢溴酸盐)与适当保护的式III手性 α -氨基酸偶合,得到酰胺IV。参阅,例如WO2005021500中的制备。此偶合反应可以用二酰亚胺试剂,在活化剂和叔胺碱存在下,在惰性气氛例如氮或氩(优选为氮)气下,在非质子性溶剂例如丙腈、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、乙酸叔丁酯或乙腈(尤其是乙腈和/或乙酸乙酯)中进行。该二酰亚胺偶合试剂包括例如EDAC的试剂。活化剂的实例包括1-羟基苯并三唑(HOBt; 该术语包括其水合物)和N',N'-4-二甲基氨基-吡啶。叔胺碱包括例如三乙胺、N-N-二异丙基-N-乙胺和三-正丙基胺。式II氨基酯比二酰亚胺偶合试剂比活化剂比三级胺的摩尔比分别为1比约0.90-1.50比约0.95-1.50比约2.00至3.00。该摩尔比优选分别为1比约0.95-1.05比约0.95-1.10和比约2.10至2.30。

选择 β -氨基酯,以便使 R_a 和 R_b 为烷氧基或烷基硫醇化物基团,或与它们所连接的碳原子一起形成羰基,或形成环状或非环状缩醛或硫代缩醛,优选为1,3-二氧戊环基团。 R_4 为 C_{1-6} 烷基,优选为乙基。

式III手性 α -氨基酸并入可官能化的末端残基Y,其表示或可加工成烷基化基团,该烷基化基团适用于稍后Y所连接的侧链末端碳在酰胺氮上的环化,因此,Y可选自例如以下的基团:卤素、SMe或 OSO_2R_{12} ,

其中 R_{12} 为 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)C(O)OR_{13}$ 或 $-(CH_2)C(O)R_{13}$ ；并且 R_{13} 在每一存在处为 C_{1-6} 烷基。 X 为OH、卤素或 $OCOR_{14}$ ，其中 R_{14} 为 C_{1-6} 烷基。对于式III手性 α -氨基酸的适宜保护基团 R_1 和 R_2 独立地选自氢或胺-保护基团，其可在标准条件下通过水解或氢解而被移除。这些基团包括但不限于苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(BOC)、芴基甲基氧羰基(FMOC)、苄基(Bn)或对-甲氧基苄基(PMB)。优选基团为Cbz、BOC或Bn基团。Cbz为最优选。

图式2: 式IV酰胺的制备



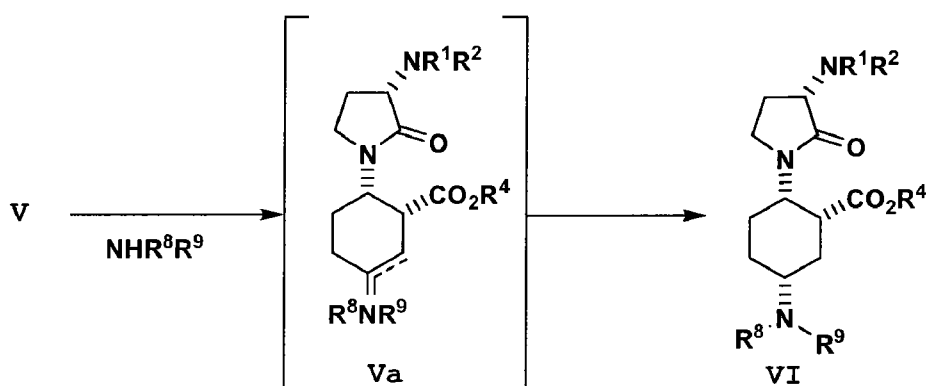
式V化合物是通过使烷基化部分基团Y与酰胺氮的环化以形成吡咯烷酮环而制成的，在该转变期间，Y充当离去基团。在一项优选实施方案中，烷基化部分基团表示铊盐($Y=S^{\oplus}(Me)R_{13}$ ，其中 R_{13} 为 C_{1-6} 烷基、苄基或被取代的苄基，最优选甲基)，该铊盐是通过使用本领域已知的硫-烷基化剂(例如 C_{1-6} 烷基或苄基卤化物，优选为碘化甲烷)活化甲硫胺酸衍生的酰胺IV ($Y=SMe$)所产生的。参阅，例如Freidinger, et al., J. Org. Chem. 1982, 47, 10。

环化作用是在惰性气氛例如氮或氩(优选为氮)气下、在溶剂中通过使化合物IV或其盐与碱在非质子性溶剂存在下接触而进行。这些碱可以为例如但不限于碳酸铯、重碳酸铯、碳酸钾、叔丁醇钠或六甲基二硅氮化钠，尤其是碳酸铯。非质子性溶剂包括例如但不限于DMSO、DMF、DMA、N-甲基吡咯烷酮(NMP)和环丁砜，优选为DMSO和/或DMF。

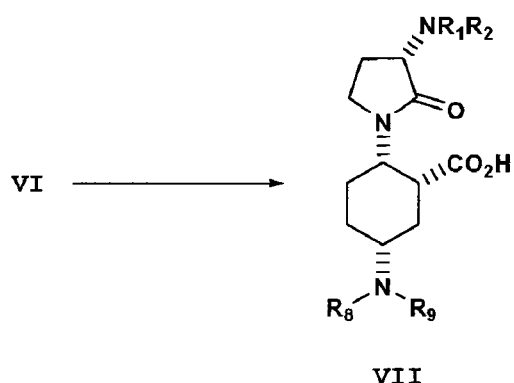
在 R_a 和 R_b 独立地为 C_{1-6} 烷氧基或者与它们所连接的原子一起合并

以形成环状或非环状缩醛或硫代缩醛的情况下，该缩醛基团是根据本领域已知的方法通过去除保护而被移除，以形成羰基。对于缩醛，去除保护可通过水解作用进行，优选在溶剂例如丙酮、丁酮、乙腈和异丙醇或其水溶液中进行，并且优选在丙酮水溶液中进行。其中该缩醛去除保护需要质子酸类，例如硫酸、甲苯磺酸、硝酸、甲磺酸、氢溴酸或盐酸，盐酸是最优选的。

图式3: 化合物V的还原胺化作用

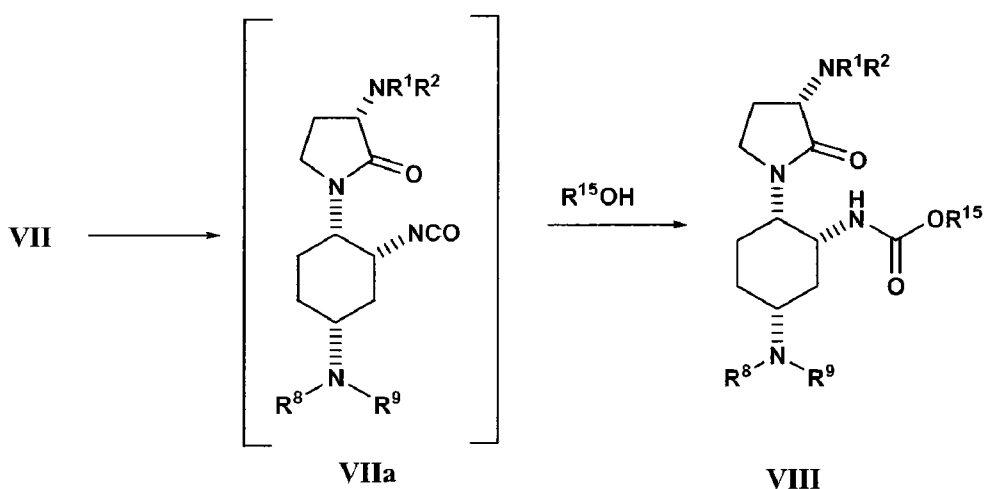


化合物VI是在两个步骤中通过还原方式使式V化合物胺化而制成，其方式是(a)将胺NH(R₈)(R₉)和脱水剂添加至式V在非质子性溶剂中的溶液中，并在-20°至+50°C的温度下混合，以形成式Va的亚胺/烯胺；和(b)在氢气压力下，以铂催化剂处理式Va亚胺/烯胺的溶液，该铂催化剂优选含有去活化剂，例如硫，优选为5% Pt/C/S。胺取代基R₈和R₉独立地选自氢和C₁₋₆烷基。式NH(R₈)(R₉)胺优选为N-甲基-N-异丙胺。脱水剂为路易斯酸/Brønsted酸脱水作用促进剂，其包括但不限于钛试剂，优选为四氯化钛或四异丙氧化钛或其混合物(尤其是四异丙氧化钛)。参阅，例如R. Mattson, et al., *J. Org. Chem.* 1990, 55, 2552-2554。非质子性溶剂可选自例如但不限于以下的溶剂：二氯乙烷、二氯甲烷、乙腈、DMSO、DMF和N-甲基-吡咯烷酮(优选为二氯甲烷)。优选地，在15-35 psig的压力和5% Pt/S/C下，在相对于化合物V为大约0.5至50% (重量/重量)下，用氢气处理中间体亚胺/烯胺Va在二氯甲烷中的溶液。最优选范围为5-10% (重量/重量)。

图式4: 式VII的 γ -氨基酸或其盐的制备

使式VI化合物的酯水解以获得相应的式VII酸或其盐。水解作用可通过使用本领域公知的方法经碱水解而进行,或者,在高温下使用酸类水溶液以获得其相应的式VII的 γ -氨基酸。酸水解作用是最优选的。温度范围为约40°C至约100°C(约50°C至约70°C的温度范围是最优选的)。酸类选自但不限于硫酸、甲苯磺酸、硝酸、甲磺酸、氢溴酸或盐酸。盐酸是最优选的。式VII化合物可任选被转化成其羧酸盐。VII优选被转化成其钠盐。

图式5: 氨基甲酸酯VIII的制备

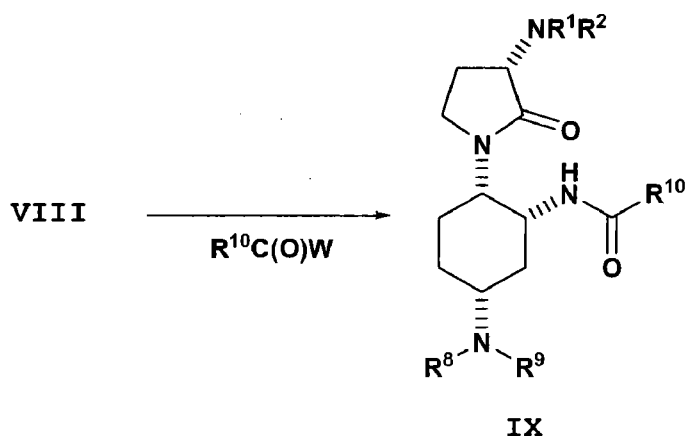


式VIII氨基甲酸酯类是通过使式VII的 γ -氨基酸转化成具有式VIIa的异氰酸酯;以及使异氰酸酯与式 $R^{15}OH$ 的醇反应得到式VIII氨基甲酸酯而制成。选择变量 R^{15} 以便使氨基甲酸酯形成胺-保护基团,其可在标

准水解或氢解条件下移除。这些胺-保护基团优选为N-CO₂-叔丁基(得自R¹⁵=叔丁基)或N-CO₂-苄基(得自R¹⁵=苄基)或N-CO₂-取代的苄基(得自R¹⁵=取代的苄基)。优选的醇为叔丁醇。

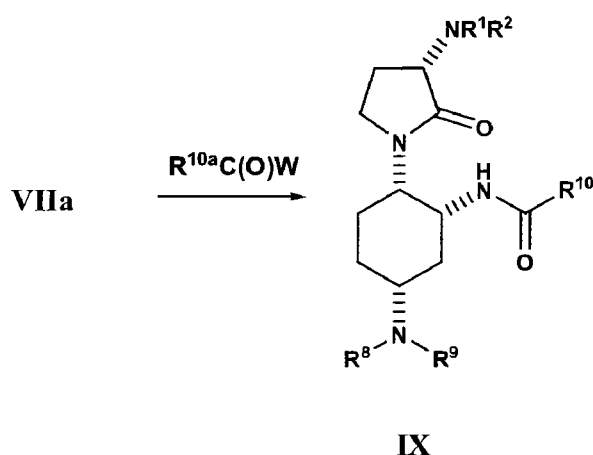
VII到异氰酸酯VIIa的转化可通过数种方法之一进行, 意即Curtius-、Hofmann-或Schmidt-Lossen重排。Curtius重排优选是通过使γ-氨基酸VII (或其盐)与叠氮化二苯基磷酰在醇溶剂(优选为叔丁醇)中, 优选但不限于含有甲苯或其它适当非质子性共溶剂, 在高于热重排成异氰酸酯的触发点的温度(优选在50℃或高于50℃下)下接触而进行。

图式6: 式IX化合物的制备



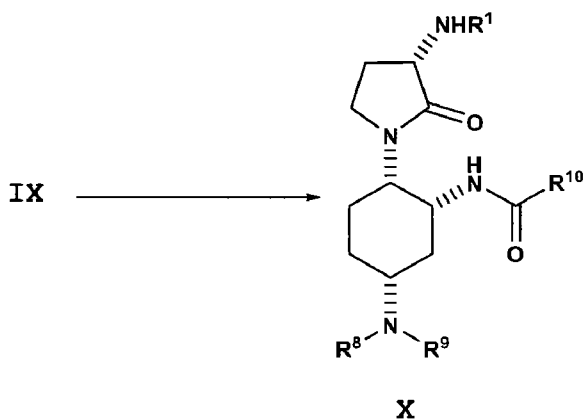
式IX化合物是以下述方式制成的: 使式VIII化合物中的氨基甲酸酯部分基团去除保护, 接着使游离胺以式R¹⁰C(O)W试剂酰化, 其中W为卤素或R¹⁰C(O), 得到式IX化合物。氨基甲酸酯去除保护是通过本领域公知的方法进行的(例如对于R¹⁰=叔丁基, 酸去除保护可以硫酸、甲苯磺酸、硝酸、甲磺酸、氢溴酸或盐酸进行—甲磺酸是最优选的)。然后添加碱(优选为三乙胺), 并使游离胺与式R¹⁰C(O)W化合物接触, 其中W为卤素或R¹⁰C(O), 得到结构IX化合物。

图式7: 式IX化合物的替代制备



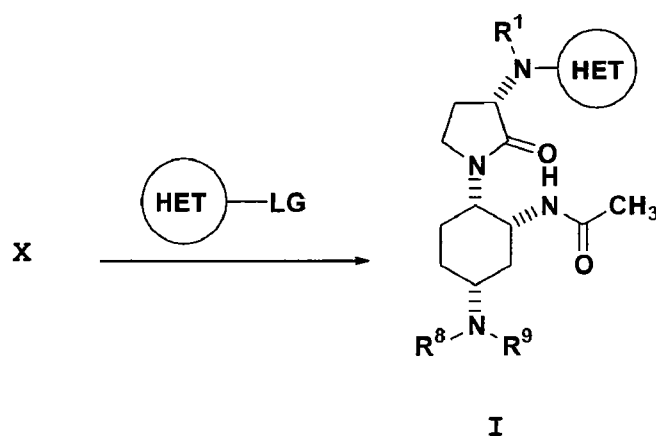
式IX化合物的替代制备包括直接酰化中间体异氰酸酯VIIa (参阅上文图式5), 其方式是在其相应酸(W=氢)存在下任选当场添加至酰化剂 $R^{10a}C(O)W$ 中, 其中W为 $R^{10a}C(O)$ 。优选的, 酰化作用是通过将异氰酸酯引入乙酸和乙酸酐的混合物(其中 R^{10a} 为甲基, 并且W为氢)中进行, 得到式IX化合物。

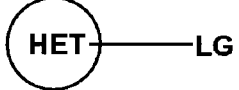
图式7: 式X化合物的制备



式IX化合物中的 R^2 基团是通过去除保护移除, 以得到式X化合物。优选的, 如果 R^2 为Cbz, 则去除保护是通过氢化作用在钯催化剂(优选为10% Pd/C)存在下完成的。

图式8: 式I化合物的制备



式I化合物是通过使已去除保护的式X胺与式  化合物偶合而制成，以获得式I化合物。此种偶合反应及其进行条件是本领域技术人员已知的。HET为任选被取代的3-14元杂环基或杂芳基环，其具有一个或多个选自N、O或S的杂原子(优选为一至三个杂原子，尤其是一至两个氮原子)。优选的杂芳基包括但不限于6-取代的喹唑啉-4-基，更优选为6-三氟甲基-喹唑啉-4-基。本文中使用的离去基团(LG)包括但不限于例如以下的基团：卤素、C₁₋₆烷氧基、甲磺酸盐、九氟烷磺酸盐(nonaflates)、磺酸盐、甲苯磺酸盐和三氟甲磺酸盐。LG优选为选自卤素或OSO₂R₁₆的离去基团，其中R₁₆为苯基，具有一或多个选自N、S或O的原子的5-至7-元杂芳基，C₁₋₆烷基或3-至7-元环烷基，其全部均任选被一至三个选自卤素、CF₃及C₁₋₆烷基的基团取代。优选离去基团为卤素，尤其是氯化物。

关于本发明的方法，起始物质是市售可得的或者可容易地由本领域技术人员制备。溶剂、温度、压力、具有所需基团的起始物质以及其它反应条件，可容易地由本领域技术人员按适宜方式选择。该方法可按比例增大，以制备较大量的式I化合物，例如以商业化生产设备制备。

实施例

下述实施例说明本发明化合物和起始物质的实施方案，而非意欲限制权利要求的范围。

按适宜方式,反应是在干燥氮(或氩)气氛下进行。对于无水反应,使用得自EM的Dri-Solv溶剂。对于其它反应,使用试剂级或HPLC级溶剂。除非另有描述,否则全部市售所得的试剂均以接收时的情况使用。

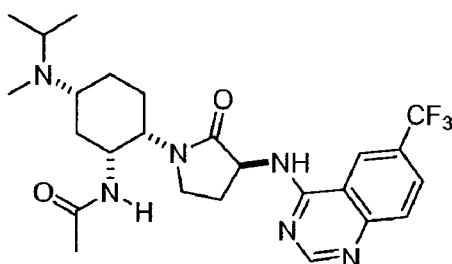
LC/MS测量值是使用Shimadzu HPLC/Waters ZQ单一四元质谱仪混合系统获得的。对于感兴趣峰的数据,它们根据正模式电喷雾离子化作用报告。NMR(核磁共振)光谱一般是在Bruker或JEOL 400 MHz和500 MHz仪器上,在所指示的溶剂中获得。所有化学位移是以距离具有溶剂共振而作为内标的四甲基硅烷的ppm报告的。¹H-NMR光谱数据一般报告如下:化学位移,多重性(s=单重峰,brs=宽单峰,d=二重峰,dd=二个二重峰,t=三重峰,q=四重峰,sep=七重峰,m=多重峰,app=表观),偶合常数(Hz)和积分。

本领域技术人员将理解本文中所使用的标准缩写。为了易于参考,缩写包括但不限于:sat.=饱和的,HPLC=高性能液相色谱法,AP=面积百分比,KF=Karl-Fischer,RT=室温(除非另有指定,否则RT为约22°C的温度),mmol=毫摩尔,HRMS=高分辨质量光谱,TBTU=四氟硼酸O-苯并三唑-2-基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓,MTBE=TBME=叔丁基甲基醚,EDAC=N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐,EDC=N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺,TEA=三乙胺,DPPA=叠氮化二苯基磷酰,IPA=异丙醇,TFA=三氟乙酸,DCM=二氯甲烷,THF=四氢呋喃,DMF=N,N-二甲基甲酰胺,BOP=六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷,EtOAc=乙酸乙酯,DMSO=二甲亚砜,°C=摄氏度数,eq=当量或数当量,g=克或数克,mg=毫克或数毫克,mL(或ml)=毫升或数毫升,h=小时或数小时,M=摩尔浓度,N=当量浓度,min=分钟或数分钟,MHz=百万赫兹,TLC=薄层色谱法,v/v=体积比体积的比。

" α "、" β "、"R"和"S"是本领域技术人员所熟悉的立体化学名称。

实施例1

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺



实施例1, 步骤1: 使(1R,2S,5R)-2-苄氧羰基氨基-7-氧代-6-氮杂-双环并[3.2.1]辛烷-6-羧酸叔丁酯(89.6克, 0.24摩尔, 参阅: P. H. Carter, et al., PCT申请WO 2005/021500)溶于乙酸乙酯(1.5升)中, 并将所形成的溶液以饱和NaHCO₃(2 x 0.45升)和饱和NaCl (1 x 0.45升)洗涤。使溶液干燥(Na₂SO₄), 然后直接过滤进入3颈3升圆底烧瓶中。将溶液以直接氮注入吹扫, 然后, 在氮大气下装填10% Pd/C (13.65克)。将烧瓶抽气, 再以氢逆充填; 将其再重复两次。使氢鼓泡经过此溶液30分钟, 接着, 将反应物在1大气压H₂下搅拌18小时。将烧瓶抽气, 以氮逆充填, 再装填新催化剂(6克10% Pd/C)。使氢鼓泡经过此溶液30分钟, 然后, 将反应物于1大气压H₂下搅拌18小时。将烧瓶抽气, 再以氮逆充填。使混合物经过硅藻土过滤; 接着, 用乙酸乙酯洗涤过滤垫。用乙腈(0.3升)稀释滤液(~1.6升EtOAc体积), 再相继装填L-N-Cbz-甲硫胺酸(68克, 0.24摩尔)、TBTU (77克, 0.24摩尔)和N,N-二异丙基乙胺(42毫升, 0.24摩尔)。将反应物在室温下搅拌4小时, 在此时间内, 其从悬浮液改变成透明溶液。通过添加饱和NH₄Cl (0.75升)和水(0.15升)使反应猝灭; 将混合物以EtOAc (0.75升)再稀释。将液相混合, 分离, 再将有机相以饱和Na₂CO₃(2 x 0.9升)和饱和NaCl (1 x 0.75升)洗涤。使溶液干燥(Na₂SO₄), 过滤, 再在真空中浓缩, 得到(1R,2S,5R)-2-((S)-2-(苄氧羰基氨基)-4-(甲硫基)丁酰胺基)-7-氧代-6-氮杂-双环并[3.2.1]辛烷-6-羧酸叔丁酯, 为油状物, 将其带至下一步骤而无需进一步纯化。主要吸收峰的LC/MS: [M-Boc+H]⁺ = 406.3; [M+Na]⁺ = 528.3。¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ7.36 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.2 (m, 1H), 4.0 (m, 1H), 2.5-2.7 (m, 3H), 2.25 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.05 (m, 4H), 1.9 (m, 1H), 1.7 (m, 2H), 1.54 (s, 9H)。还存在EtOAc [1.26 (t), 2.03 (s), 4.12 (q)]和N,N,N,N-四甲基脲[2.83 (s)]。

实施例1, 步骤2: 使(1R,2S,5R)-2-((S)-2-(苄氧羰基氨基)-4-(甲硫基)丁酰胺基)-7-氧代-6-氮杂-双环并[3.2.1]辛烷-6-羧酸叔丁酯的样品(假定为0.24摩尔; 参阅先前操作)溶于碘甲烷(1,250克)中, 并在室温下搅拌48小时。在真空中浓缩反应物。使残留物溶于二氯甲烷中, 再在真空中浓缩。将其再重复两次。使所形成的泥状物溶于二氯甲烷(0.4升)中, 并倒入正迅速搅拌的MTBE溶液(4.0升)中。将所形成的黄色固体通过抽气过滤收集, 再在高真空下干燥, 得到铈盐(179克)。将此物质带至下一步骤而无需进一步纯化。主要吸收峰的LC/MS: $[M-Me_2S+H]^+ = 458.4$; $[M]^+ = 520.4$ 。 ^1H-NMR (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.33 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.3-3.45 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 2.78 (m, 1H), 2.0-2.3 (m, 4H), 1.7 (m, 2H), 1.52 (s, 9H)。还存在MTBE [1.18 (s), 3.2 (s)]和微量的N,N,N,N-四甲基脲[2.81 (s)]。

实施例1, 步骤3: 使得自前一步骤的全部铈盐(假定为0.24摩尔)溶于DMSO (2.0升)中。将所形成的溶液在氮气和室温下搅拌, 并分次装填碳酸铯(216克)。将此悬浮液在室温下搅拌3小时, 然后过滤, 以移除固体。将溶液分成数份~0.22升, 并按下述处理: 将反应混合物(~0.22升)以乙酸乙酯(1.5升)稀释, 并以水(3 x 0.5升)和盐水(1 x 0.3升)连续洗涤。使有机相干燥(Na_2SO_4), 过滤, 再在真空中浓缩。获得所需的(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)-7-氧代-6-氮杂双环并[3.2.1]辛烷-6-羧酸叔丁酯(90.8克, 83%), 为微晶性泡沫物, 不含四甲基脲杂质。主要吸收峰的LC/MS: $[M-Boc+H]^+ = 358.4$; $[M+Na]^+ = 480.4$ 。 ^1H-NMR (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.2 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.3 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.28-2.42 (m, 2H), 2.15 (m, 1H), 1.7-2.0 (m, 5H), 1.55 (s, 9H)。若需要, 此物质可通过溶于MTBE (1体积)中, 添加至庚烷(3.3体积)中, 再收集所形成的沉淀物, 而被分离成固体。

实施例1, 步骤4: 于(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)-7-氧代-6-氮杂双环并[3.2.1]辛烷-6-羧酸叔丁酯(108克, 0.236摩尔)在THF (1升)中的正在搅拌溶液内, 装填氢氧化锂单水合物(21.74克, 0.519摩尔)。慢慢添加水(0.3升), 以致使温度不超过20°C。将反应物在室温下搅拌过夜, 并在真空中移除挥发性物质。通过添加1N HCl

(450毫升)和 NaH_2PO_4 调整pH值至 ~ 4 。将所形成的白色沉淀物通过过滤收集,并以水(2 x 1升)洗涤。使固体溶于二氯甲烷(1.5升)和水(~ 1 升)中。使有机层干燥(Na_2SO_4),过滤,再在真空中浓缩。使残留物溶于EtOAc (0.7升)中,并将所形成的溶液在回流下加热1小时。在冷却至室温后,分离固体,再通过过滤收集。使这些固体在异丙醇中通过再结晶纯化,得到所需的(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)-5-(叔丁氧羰基氨基)环己烷羧酸,为白色固体(104.5克,93%产率)。主要吸收峰的LC/MS: $[\text{M-tBu+H}]^+ = 420.2$; $[\text{M-Boc+H}]^+ = 376.2$; $[\text{M+H}]^+ = 476.2$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): $\delta 7.35$ (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.35 (m, 2H), 3.71 (m, 1H), 3.45-3.6 (m, 2H), 2.99 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 2.0 (m, 2H), 1.6-1.9 (m, 4H), 1.46 (s, 9H)。

实施例1, 步骤5: 在3升圆底烧瓶中, 装填(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)-5-(叔丁氧羰基氨基)环己烷羧酸(75.5克, 0.158摩尔)、EDC·HCl (33.5克, 0.175摩尔)、1-羟基苯并三唑(23.6克, 0.175摩尔)和二氯甲烷(1升)。将反应物在室温下搅拌2小时, 在此段时间内, 其从白色悬浮液改变成透明溶液。使氨(气体)鼓泡进入溶液中, 直到pH值为强碱性(纸)为止, 并将反应物搅拌10分钟; 重复添加此氨, 并将反应物再搅拌10分钟。添加水。将有机相以饱和 NaHCO_3 、 NaH_2PO_4 和盐水洗涤, 然后在真空中浓缩。将残留物以乙腈(0.5升)配成浆液, 然后浓缩, 获得(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)-5-(叔丁氧羰基氨基)环己烷羧酰胺, 为白色固体(75.9克, $\sim 100\%$), 将其使用于下一步骤而无需进一步纯化。主要吸收峰的LC/MS: $[\text{M-Boc+H}]^+ = 375.3$; $[\text{M+H}]^+ = 475.4$; $[\text{M-tBu+H}]^+ = 419.3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): $\delta 7.35$ (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.25 (m, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.9-2.05 (m, 2H), 1.65-1.9 (m, 4H), 1.46 (s, 9H)。

实施例1, 步骤6: 将反应以三等份进行, 并合并供水溶液处理。在5升3颈圆底烧瓶中, 添加(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)-5-(叔丁氧羰基氨基)环己烷羧酰胺(25.3克, 53毫摩尔)、乙腈(1.9升)和2.6升水/冰。将混合物搅拌, 并冷却至 0°C 。添加碘苯二乙酸盐(25.77克, 80毫摩尔), 并将反应物搅拌2小时; 添加另外0.5当量的

碘苯二乙酸盐。将反应物搅拌9小时(反应温度 $<10^{\circ}\text{C}$)。在混合物中,添加8当量N,N-二异丙基乙胺和2当量乙酸酐。在接下来的三十分钟内,每十分钟添加4当量N,N-二异丙基乙胺和2当量乙酸酐,直到反应已进行至完成(HPLC)为止。在真空中移除乙腈;自残留物分离出一些固体,再将其通过过滤收集。以二氯甲烷(3升,接着1升)萃取其余残留物。相继以水、饱和 NaHCO_3 和盐水洗涤有机相。将所收集的固体伴随着活性炭(15克)添加至有机相中。将混合物在 40°C 下搅拌30分钟,然后过滤,再在真空中浓缩。使残留物溶于EtOAc (1升)中,并将所形成的溶液在 75°C 下搅拌1小时,然后,使其冷却至室温。分离固体,再通过过滤收集。使此固体通过再结晶进一步纯化:首先,使其溶于0.5升 CH_2Cl_2 中,然后在真空中浓缩,接着自1升EtOAc再结晶;将其重复三次。将得自上述母液的固体使用相同方法再结晶三次。使合并的固体自乙腈(0.7升)再结晶两次,以提供66克(84%) (1R,3R,4S)-3-乙酰胺基-4-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)环己基氨基甲酸叔丁酯(纯度 $>99.5\%$,通过HPLC)。主要吸收峰的LC/MS: $[\text{M}+\text{H}]^+=489.4$; $[\text{M}-\text{tBu}+\text{H}]^+=433.3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{d}_4\text{-MeOH}$): $\delta 7.3-7.4$ (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.8 (m, 1H), 3.6 (m, 2H), 2.44 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.87-2.05 (m, 4H), 1.87 (s, 3H), 1.55-1.7 (m, 2H), 1.46 (s, 9H)。Hofmann重排的立体化学真实性是通过此化合物的X-射线晶体结构分析确认的,如图1中所示。

实施例1,步骤7:在(1R,3R,4S)-3-乙酰胺基-4-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)环己基氨基甲酸叔丁酯(66克,0.135摩尔)在二氯甲烷(216毫升)中的正在搅拌溶液中,添加三氟乙酸(216毫升)。将反应物在室温下搅拌2小时,再在真空中浓缩。使残留物溶解在甲醇中,并在真空中浓缩所形成的溶液;将其重复一次。获得(S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙酰胺基-4-氨基环己基)-2-氧代吡咯烷-3-基氨基甲酸苄酯,为油状物,再直接用于下文步骤8中。LC/MS实测值 $[\text{M}+\text{H}]^+=389.4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{d}_4\text{-MeOH}$): $\delta 7.3-7.4$ (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.41 (br. s, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.00 (t, $J=9.3$ Hz, 1H), 3.81 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 3.65 (q, $J=8.4$ Hz, 1H), 3.3-3.4 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 1.95-2.24 (m, 5H), 2.00 (s, 3H), 1.6-1.8 (m, 2H)。

实施例1,步骤8:在(S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙酰胺基-4-氨基环己基)-2-

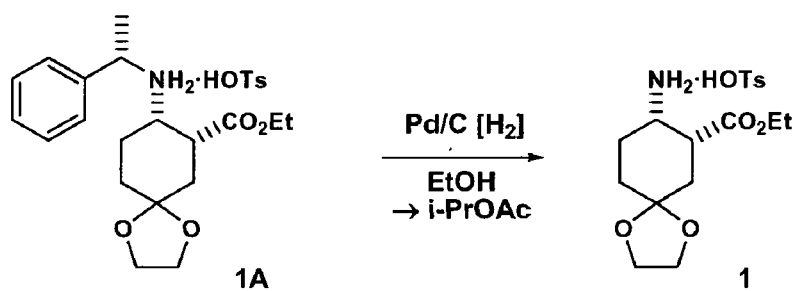
氧代吡咯烷-3-基胺基甲酸苄酯(~0.135摩尔)在甲醇(675毫升)中的正在搅拌溶液中,相继装填丙酮(37.8克,4当量)、乙酸钠(33.2克,3当量)和氰基硼氢化钠(16.9克,2当量)。将混合物在室温下搅拌6小时,再过滤。使滤液溶于二氯甲烷(1升)中;以1N NaOH(1升)洗涤此溶液。在0°C下,使在过滤中所收集的固体溶于1N NaOH(1升)中,然后以二氯甲烷(1升)萃取。合并有机萃取液,再以HCl水溶液(200毫升1N HCl + 800毫升水)萃取。以饱和NaHCO₃(500毫升),接着以1N NaOH(100毫升)使水相碱化,直到pH 11为止。以二氯甲烷(2升)萃取水相。合并有机萃取液,干燥(Na₂SO₄),过滤,再在真空中浓缩,得到(S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙酰胺基-4-(异丙基胺基)环己基)-2-氧代吡咯烷-3-基胺基甲酸苄酯,为油状物。LC/MS实测值[M+H]⁺ = 431.45。¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ7.3-7.4 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.31 (m, 1H), 4.24 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.61 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 3.52 (q, J = 8.6 Hz, 1H), 3.04 (br. s, 1H), 2.96 (七重峰, J = 6.3 Hz, 1H), 2.40 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.92 (s, 3H), 1.7-1.9 (m, 5H), 1.65 (m, 1H), 1.12 (app. dd, J = 6.3, 1.1 Hz, 6H)。

实施例1, 步骤9 (参阅下文替代步骤9): 使(S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙酰胺基-4-(异丙基胺基)环己基)-2-氧代吡咯烷-3-基胺基甲酸苄酯(~115毫摩尔)在二氯甲烷(600毫升)中的正在搅拌溶液冷却至0°C,并相继装填甲醛(18.6克,37重量%溶液)、三乙胺(23毫升)和三乙酰氧基硼氢化钠(28.7克)。将混合物在室温下搅拌30分钟,再以二氯甲烷(至高达1.2升)稀释。将此溶液以500毫升饱和NaHCO₃ + NaOH (饱和NaHCO₃, pH至11 w/1N NaOH)洗涤三次。以HCl水溶液(200毫升1N HCl + 600毫升水)萃取有机层。以饱和NaHCO₃(500毫升),接着以1N NaOH(100毫升)使水相碱化,直到pH 11为止。以二氯甲烷(1.2升)萃取水相。合并有机萃取液,干燥(Na₂SO₄),过滤,并在真空中浓缩,得到(S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙酰胺基-4-(异丙基(甲基)胺基)环己基)-2-氧代吡咯烷-3-基胺基甲酸苄酯,为油状物,将其直接用于下文步骤10中。LC/MS实测值[M+H]⁺ = 445.4。¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ7.3-7.4 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.33 (br s, 1H), 4.25 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 4.11 (br s, 1H), 3.5-3.6 (m, 2H), 2.77 (v br s, 2H), 2.41 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.0-2.1 (m, 2H), 1.92 (s, 3H), 1.7-1.9 (m, 5H), 1.10 (app. dd, J = 17, 6.4 Hz, 6H)。

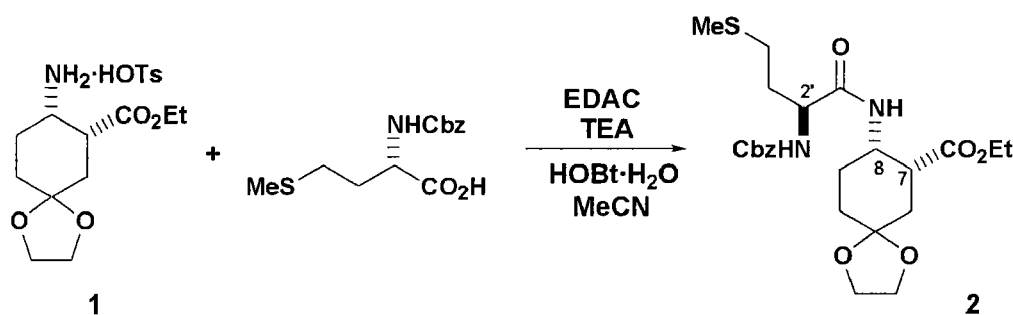
实施例1, 步骤10: 在(S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙酰胺基-4-(异丙基(甲基)氨基)-环己基)-2-氧代吡咯烷-3-基胺基甲酸苄酯(~0.115摩尔)在甲醇(600毫升)中的溶液中, 添加10% Pd/C (6克50%潮湿催化剂)。将烧瓶抽气, 并以氢逆充填。将混合物在1大气压H₂下搅拌2小时, 并通过经过硅藻土过滤移除催化剂。使滤液在真空中浓缩, 以提供N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-胺基-2-氧代吡咯烷-1-基)-5-(异丙基(甲基)氨基)环己基)乙酰胺, 为油状物, 将其带至下一步骤而无需进一步纯化。LC/MS实测值[M+H]⁺= 311.47。¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ4.39 (br s, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.3-3.5 (m, 4H), 2.73 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.0-2.2 (m, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.6-1.75 (m, 4H), 1.07 (app. dd, J = 21, 6.4 Hz, 6H)。

实施例1, 步骤11: 向N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-胺基-2-氧代吡咯烷-1-基)-5-(异丙基(甲基)氨基)环己基)乙酰胺(~35克, 0.115摩尔)在异丙醇(600毫升)中的溶液中, 添加4-氯基-6-(三氟甲基)喹唑啉(32克, 0.138摩尔, 1.2当量, 参阅: P.H. Carter, et al., PCT申请WO 2005/021500)。将混合物在室温下搅拌过夜, 然后添加三乙胺(46克, 0.46摩尔, 4当量)。将混合物在60℃下搅拌10小时。在减压下移除溶剂, 得到油状物。与异丙醇的共沸蒸馏进行两次。使残留物溶于二氯甲烷(600毫升)中, 并以水(250毫升, 含有4当量乙酸)萃取。将二氯甲烷(600毫升)添加至合并的含水洗液中, 并使混合物冷却至0℃。添加NaOH水溶液(50重量%), 并搅拌, 直到pH值达到11为止。以二氯甲烷(2 x 600毫升)萃取两次水层。使合并的有机萃取液干燥(Na₂SO₄), 过滤, 并在真空中浓缩, 得到标题化合物的非晶型游离碱(99%纯度, 通过HPLC)。LC/MS实测值[M+H]⁺= 507.3。¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ8.82 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.05 (dd, J = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.9 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.28 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 4.58 (br s, 1H), 4.06 (m, 1H), 3.52-3.68 (m, 2H), 3.43 (m, 1H), 2.76 (br s, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.1-2.3 (m, 3H), 2.0 (s, 3H), 2.0 (m, 1H), 1.65-1.8 (m, 3H), 1.09 (app. dd, J = 24, 6.4 Hz, 6H)。

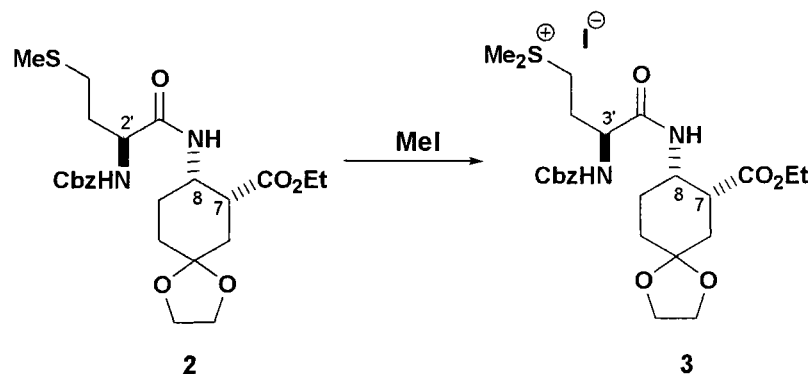
实施例1, 替代步骤9



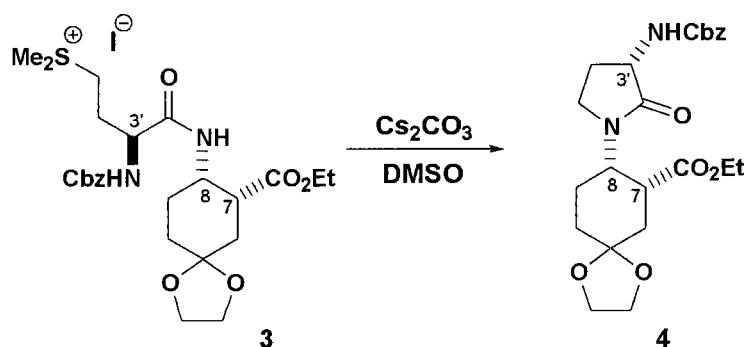
实施例1, 替代步骤9aⁱ: 向氢化器中, 添加(7R,8S)-8-((S)-1-苯基-乙胺基)-1,4-二氧-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯4-甲苯磺酸盐1A (1417克, 2.8摩尔, 参阅: WO2004098516, 类似于美国专利6,835,841制备)、乙醇(200标准纯度, 11.4升)和10% Pd/C催化剂 (50%潮湿, 284克)。将混合物以氮惰性化, 然后, 以氢气(45 psig)加压, 再在约40°C下激烈搅拌, 直到起始物质被消耗为止(HPLC)。使此悬浮液冷却, 以氮气吹扫, 并趁惰性化时, 通过过滤移除催化剂。将用过的催化剂以乙醇(4.3升)洗涤。合并滤液和洗液, 再在真空下浓缩至体积为2-3升, 同时保持批料在40°C-60°C之间。添加乙酸异丙酯(5升), 并使混合物浓缩至体积为~2升, 直到移除大部分乙醇(<0.5%)为止, 并且残留水份含量为<1,000 ppm。将批料体积通过添加乙酸异丙酯调整至~7.5升。将混合物加热至80°C, 直到透明为止, 接着冷却至65°C-70°C。添加1的种子晶体(5克), 再使批料冷却至50°C, 历经2小时, 然后再冷却至20°C, 历经4小时, 并保持~10小时。过滤所形成的浆液, 并以乙酸异丙酯(2升)洗涤滤饼。使产物在真空及~35°C下干燥, 直到使挥发性物质减至低于~1% (LOD)为止。获得(7R,8S)-8-氨基-1,4-二氧-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯4-甲苯磺酸盐1, 为白色结晶性固体(936克, 83%产率; HPLC纯度: 99.8%)。¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) 8.14-7.89 (brs, 3H), 7.75 (d, J 9.0 Hz, 2H), 7.15 (d, J 8.0 Hz, 2H), 4.22-4.04 (m, 2H), 4.01-3.77 (m, 4H), 3.55-3.43 (m, 1H), 3.20-3.13 (m, 1H), 2.40-2.27 (m, 4H), 2.21-1.94 (m, 2H), 1.81-1.51 (m, 3H), 1.23 (t, J 7.0 Hz, 3H); HPLC: Waters Xterra MS C18 4.6毫米x 150毫米内径, 3.5微米粒子大小, 0.05% NH₄OH (5% ACN, 95% H₂O, 溶剂A), 至0.05% NH₄OH (95% ACN, 5% H₂O, 溶剂B), 5% B至20% B, 在10分钟内, 改变至95% B, 在25分钟内, 然后改变至5% B, 在1分钟内; 11.1分钟(氨基酯1)。



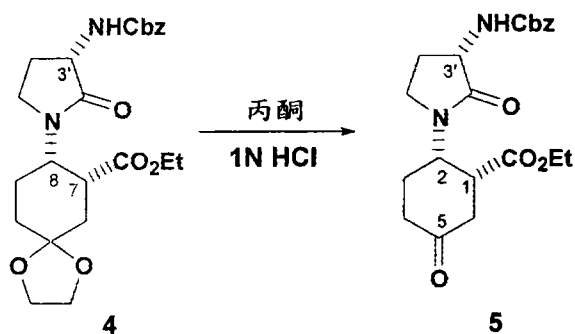
实施例1, 替代步骤9aⁱⁱ: 将氨基酯1 (63克, 0.16M, 1当量; 已知化合物的还原性去除保护的产物- (参阅例如R. J. Cherney, WO 2004/098516和G. V. Delucca & S. S. Ko, WO 2004/110993)放置在圆底烧瓶中, 并添加MeCN (500毫升)。然后添加EDAC (33.1克, 0.17M, 1.1当量)、HOBt·H₂O (21.2克, 0.16M, 1.0当量)和N-Cbz-L-甲硫胺酸(46.7克, 0.17M, 1.05当量), 接着为TEA (48.0毫升, 0.35M, 2.2当量)。发现放热至38°C。将反应物质在室温下留置搅拌。30分钟后, HPLC显示完全转化, 将反应物质以EtOAc (2.5升)稀释, 并以KHCO₃(4 x 500毫升, 20重量%水溶液)和盐水(500毫升)洗涤。分离有机相, 以MgSO₄干燥, 浓缩。使残留物溶于TBME中, 再浓缩, 得到(7R,8S)-8-{(2S)-2-苄氧羰基胺基-4-甲硫基-丁酰胺基}-1,4-二氧-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯2, 为粘性半固体(76.2克, 98%产率, 93AP纯度)。¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃)δ7.36-7.30 (m, 5H), 7.03 (d, J 9.0 Hz, 1H), 5.66 (d, J 8.0 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.35-4.25 (m, 2H), 4.19-4.04 (m, 2H), 3.98-3.86 (m, 4H), 2.87-2.80 (m, 1H), 2.55-2.45 (m, 2H), 2.18 (dd, J 14.0 Hz, 7.0 Hz, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.05-1.67 (m, 6H), 1.26 (t, J 7.0 Hz, 3H)。HPLC: YMC-Pack Pro C18 5微米4.6 x 150毫米, 0.05% TFA (20% MeOH, 80% H₂O)至0.05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), 0-100% 10分钟梯度液。10.01分钟(化合物2, 93.1 AP)。HRMS: m/z 495.2166 [计算值: C₂₄H₃₅N₂O₇S 495.2165]。



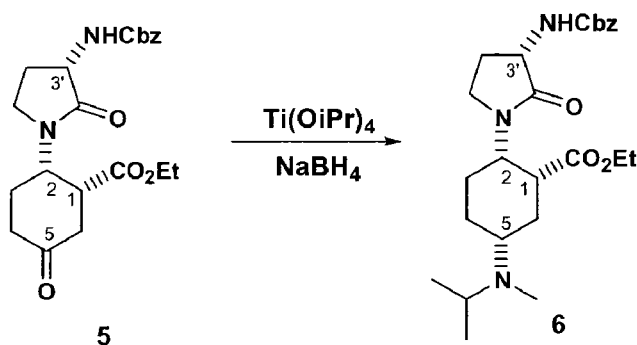
实施例1, 替代步骤9b: 使甲硫胺酸酰胺2 (75.0克, 0.15M)溶于MeI (225毫升, 3毫升/克)中-发现一部分出气但未放热。将反应物质留置于黑暗中搅拌16.5小时。在此段时间后, 已形成浓稠淡黄色沉淀物。然后, 将烧瓶抽空至200毫米Hg, 并移除一部分MeI。将残留物质在TBME (500毫升)中配成浆液, 在30分钟搅拌后, 过滤浆液, 以TBME (500毫升)洗涤滤饼。此物质的NMR分析显示少量MeI余留。将滤饼在TBME (500毫升)中再配成浆液, 过滤, 以TBME (500毫升)洗涤, 并在真空下干燥, 得到碘化[(3S)-3-苄氧羰基胺基-3-((7R,8S)-7-乙氧羰基-1,4-二-氧-螺[4.5]癸-8-基胺甲酰基)-丙基]-二甲基硫3, 为自由流动性灰白色固体 (93.5克, 97%, 99面积%纯度)。¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, J 9.0 Hz, 1H), 7.38-7.27 (m, 5H), 6.40 (d, J 7.0 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.76-4.65 (m, 1H), 4.48-4.39 (m, 1H), 4.14-3.85 (m, 6H), 3.84-7.73 (m, 1H), 3.68-3.55 (m, 1H), 3.21 (s, 3H), 3.12 (s, 3H), 2.90-2.83 (s, 1H), 2.52-1.55 (m, 8H), 1.24 (t, J 7.0 Hz, 3H)。HPLC: YMC-Pack Pro C18 5微米4.6 x 150毫米, 0.05% TFA (20% MeOH, 80% H₂O)至0.05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), 0-100% 10分钟梯度液. 2.45分钟(I-), 8.14分钟(化合物3, 43.6AP, I-54.6AP)。HRMS: m/z 509.2341 [计算值: C₂₅H₃₇N₂O₇S 509.2321]。



实施例1, 替代步骤9c: 将 Cs_2CO_3 (61.5克, 0.19M, 1.5当量) 放置在圆底烧瓶中, 并添加无水DMSO (2.4升)。然后分次添加铯盐3 (80.0克, 0.13M, 1.0当量)。一旦添加完成后, 立即将反应物质留置于黑暗中搅拌20小时。接着, 将反应物质分离成两半, 并将每一半分别处理: 将反应物质以EtOAc (2.0升) 稀释, 并以盐水(2升) 洗涤, 以盐水(500毫升) 洗涤有机相。然后, 以EtOAc (500毫升) 洗涤合并的水层。接着, 将合并的有机相以盐水(3 x 750毫升) 洗涤。将反应物质的第二个一半以相同方式处理, 并使合并的有机物质以 MgSO_4 干燥, 浓缩, 得到(7R,8S)-8-{(3S)-3-苄氧羰基氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基}-1,4-二氧-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯4, 为浅色油(56.5克, 0.13M, ~100面积-%纯度), 通过NMR分析为纯的。 $^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.30 (m, 5H), 5.37 (br d, J 4.0 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.27-4.18 (m, 1H), 4.17-3.82 (m, 8H), 3.32 (td, J 10.0 Hz, 60.0 Hz, 1H), 3.23 (q, J 5.0 Hz, 1H), 2.63-2.57 (m, 1H), 2.42-2.25 (m, 2H), 1.94-1.68 (m, 5H), 1.25 (t, J 7.0 Hz, 3H)。HPLC: YMC-Pack Pro C18 5微米4.6 x 150毫米, 0.05% TFA (20% MeOH, 80% H_2O) 至0.05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), 0-100% 10分钟梯度液。8.99分钟(化合物5, 在柱上制成, 4.2AP), 9.48 (化合物4, 74.3AP)。HRMS: m/z 447.2127 [计算值: $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_7$ 447.2131]。

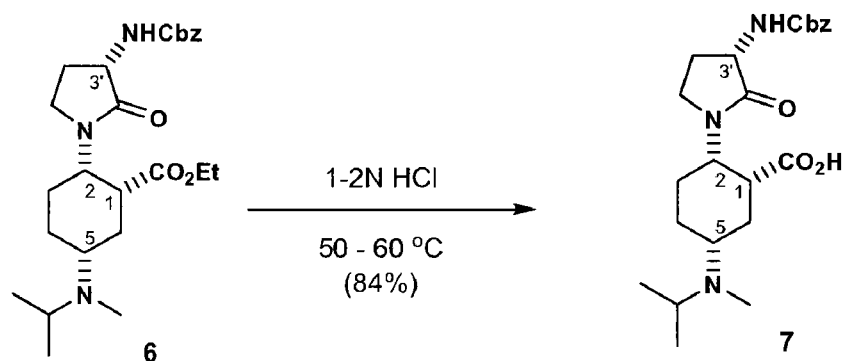


实施例1, 替代步骤9d: 使吡咯烷酮4 (50.0克, 0.11M)溶于丙酮(500毫升)中, 并添加1N HCl (500毫升)。然后, 将反应物质加热至65℃。20分钟后, HPLC显示完成反应。使反应物质冷却至室温, 并在回转式蒸发器上移除丙酮。在此蒸馏期间, 产物自溶液沉淀, 为白色固体。将其通过过滤分离, 并以水洗涤滤饼。接着, 使滤饼与甲苯(3 x 300毫升)以共沸方式干燥, 得到(1R,2S)-2-((3S)-3-苄氧羰基氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基)-5-氧代-环己烷羧酸乙酯5, 为白色固体(39.8克, 88%, 97面积-%纯度)。¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃)δ7.37-7.32 (m, 5H), 6.65 (br d, J 4.0 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.54-4.47 (m, 1H), 4.34-4.26 (m, 1H), 4.18 (dq, J 11.0 Hz, 7.0 Hz, 1H), 4.09 (dq, J 11.0 Hz, 7.0 Hz, 1H), 3.36-3.20 (m, 3H), 2.70-2.35 (m, 6H), 2.05-1.96 (m, 1H), 1.81 (五重峰, J 11.0 Hz, 1H), 1.24 (t, J 7.0 Hz, 3H)。HPLC: YMC-Pack Pro C18 5微米4.6 x 150毫米, 0.05% TFA (20% MeOH, 80% H₂O)至0.05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), 0-100% 10分钟梯度液。8.95分钟(化合物5)。HRMS: m/z 403.1864 [计算值: C₂₁H₂₇N₂O₆ 403.1869]。



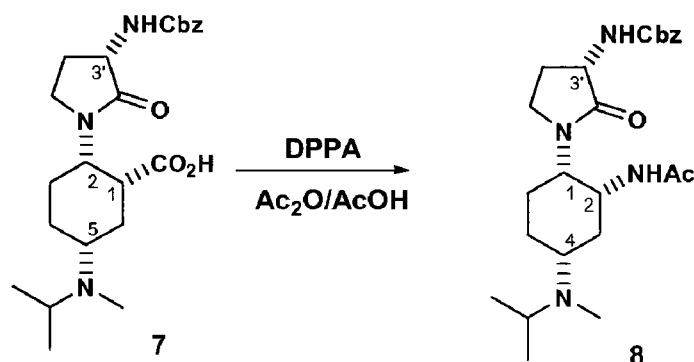
实施例1, 替代步骤9e: 将环己酮5 (22.5克, 0.06M, 1当量)、DMSO

(30毫升)和Ti(O-*i*Pr)₄(33.7毫升, 0.11M, 2.04当量)放置在圆底烧瓶中。然后, 以一份添加N-异丙基-N-甲胺(11.6毫升, 0.11M, 2.0当量)。将混合物在室温下留置搅拌30分钟, 然后在冰/水中冷却至<3°C。然后, 添加MeOH (30毫升), 接着分次添加NaBH₄(4.33克, 0.11M, 2.04当量) - 温度保持<8°C。在添加完成后30分钟, 将反应物质以二氯甲烷(300毫升), 然后以NaOH (1N, 40毫升)稀释。使所形成的浆液经过硅藻土过滤, 并以二氯甲烷(100毫升)洗涤滤饼。在减压下浓缩所形成的液体, 并使残留物溶于EtOAc (500毫升)中。将此溶液以1N HCl (2 x 400毫升)萃取, 然后, 使合并的水层以Na₂CO₃碱化。以EtOAc (4 x 250毫升)萃取, 得到透明且无色的有机相, 使其以Na₂SO₄干燥, 浓缩, 得到白色粉末(24.6克, 96%, 7: 1 d.r.)。然后, 将此物质在己烷(670毫升)中配成浆液过夜。通过过滤分离固体, 并在减压下干燥, 得到(1R,2S,5R)-2-((3S)-3-苄氧羰基氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基)-5-(异丙基-甲基-氨基)-环己烷羧酸乙酯6, 为白色固体(20.9克, 81%, 24: 1 d.r.)。¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃)δ7.37-7.28 (m, 5H), 5.55 (d, J 4.5, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.42 (q, J 4.5, 1H), 4.23-4.12 (m, 1H), 4.08 (dq, J 10.5, 7.0, 1H), 4.02 (dq, J 10.5, 7.0, 1H), 3.84 (t, J 9.0, 1H), 3.46-3.36 (m, 1H), 3.04 (七重峰, J 6.5, 1H), 2.86-2.80 (m, 1H), 2.63-2.48 (m, 2H), 2.17 (s, 3H, Me), 2.10-1.63 (m, 7H), 1.22 (t, J 7.0, 3H), 1.00 (d, J 6.5, 3H), 0.97 (d, J 6.5, 3H)。HPLC: YMC-Pack Pro C18 5微米4.6 x 150毫米, 0.01M NH₄OAc (MeOH: 水20: 80)至0.01M NH₄OAc (MeOH: 水: MeCN 20: 5: 75) 10至100% 15分钟梯度液。8.23 (化合物6), 8.88 (5-*epi*-化合物6)。HRMS: 460.2798 [计算值: C₂₅H₃₈N₃O₅ 460.2811]。



实施例1, 替代步骤9f: 使氨基酯6 (9.76克, 2.12毫摩尔)溶于2N HCl

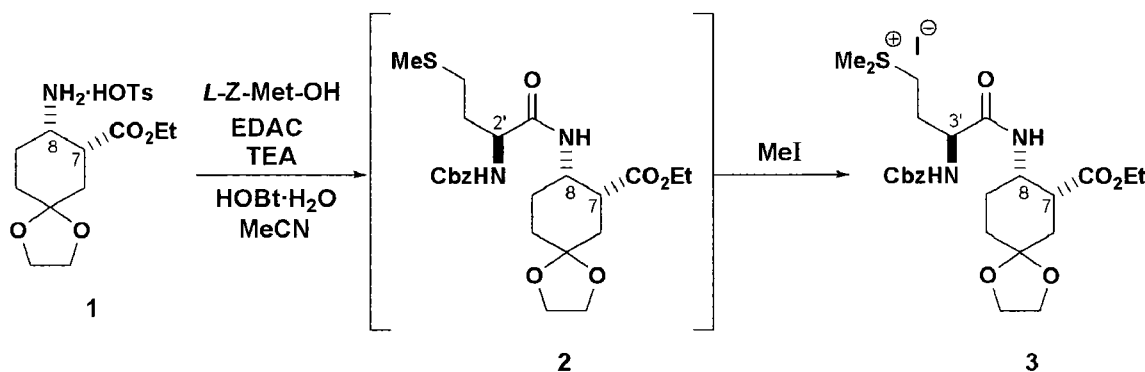
(80毫升)中,然后,在惰性气氛下加热至 $\sim 55^{\circ}\text{C}$ 。将反应物搅拌20小时,接着冷却至室温。将反应溶液以甲苯(数份25毫升)洗涤两次,通过添加KOH九粒中和至pH 6-7,然后,以二氯甲烷(数份100毫升)萃取八次。使合并的萃取液干燥(Na_2SO_4),过滤,并在减压下浓缩至50毫升总体积。接着,在添液漏斗中,将浓溶液慢慢添加至甲基叔丁基醚(300毫升)中,历经15分钟,并激烈搅拌。将所形成的白色浆液在环境温度下搅拌1小时,然后冷却至 0°C ,并搅拌1小时。过滤产物,并以甲基叔丁基醚(数份25毫升)洗涤两次。通过与乙腈(300毫升)共沸蒸馏,移除得自湿滤饼的水。使产物在减压下干燥,以提供(1R,2S,5R)-2-((3S)-3-苄氧羰基氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基)-5-(异丙基-甲基-胺基)-环己烷羧酸7 (7.69克,84%产率),为白色泡沫物。 $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, 50°C , CDCl_3) δ 7.44-7.32 (m, 5H), 6.10 (br. s, 1H), 5.19 (app. s, 2H), 4.42 (dd, $J = 15.6, 7.8$ Hz, 1H), 4.29-4.23 (m, 1H), 3.68-3.60 (m, 2H), 3.33-3.27 (m, 2H), 3.20 (br. s, 1H), 2.99 (br. s, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.49-2.45 (m, 3H), 2.33-2.31 (m, 1H), 2.00 (ddd, $J = 9.0, 8.6, 3.9$ Hz, 1H), 1.95-1.78 (m, 2H), 1.36-1.21 (m, 6H)。LCMS: m/z 432.20 [计算值: $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5$ 432.25]。



实施例1, 替代步骤9g: 在 N_2 下,使氨基酸7 (6.3克, 14.7毫摩尔, 1.0当量)溶于THF (80毫升)中,并分次添加NaH (584毫克, 14.7毫摩尔, 1.0当量, 在矿油中的60重量%分散液)。当添加完成并且气体释放已停止时,使反应物质在减压下浓缩,并使所形成的固体与甲苯(50毫升)共沸,得到白色固体(KF 0.59重量%)。将此固体在 N_2 下,在甲苯(100毫升)中配成浆液,并加热至 90°C 。逐滴添加DPPA (3.32毫升, 15.3毫摩尔, 1.05当量),历经 ~ 2 分钟。 ~ 5 分钟后,所有固体已溶解,10分钟后,发现白色固体的沉淀。30分钟后,HPLC分析显示完成反应。使反

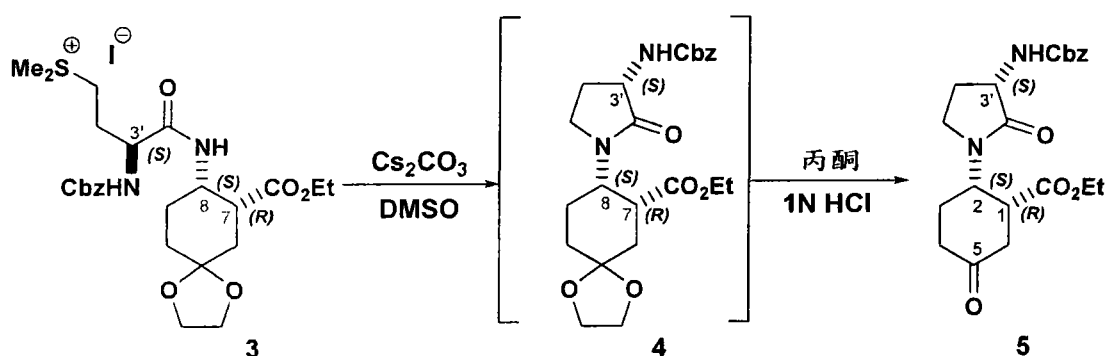
应物质冷却至室温，然后过滤，以甲苯洗涤滤饼。接着，将液体在90℃下慢慢添加至AcOH/Ac₂O (80/20, 168毫升)溶液中。45分钟后，HPLC仍然显示一些异氰酸酯。在1.15小时时，使反应物质冷却至室温，并以甲苯(100毫升)和水(100毫升)稀释。移除有机层，再以1N HCl (100毫升)洗涤甲苯。然后，使合并的水相以K₂CO₃(s)碱化，并以NaOH (10N)达到pH 12，保持温度低于20℃。接着，以二氯甲烷(4 x 150毫升)萃取水层，使合并的有机层以K₂CO₃干燥，浓缩，得到(S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙酰胺基-4-(异丙基(甲基)氨基)环己基)-2-氧代吡咯烷-3-基氨基甲酸苄酯8，为白色泡沫物(4.5克，70%，94AP纯度)。¹H-NMR与得自上述途径的物质相同(实施例1，步骤9)。HPLC: YMC-Pack Pro C18 5微米4.6 x 150毫米，0.05% TFA (20% MeOH, 80% H₂O)至0.05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN)，0-100% 10分钟梯度液。7.20分钟(化合物8)，7.85分钟(尿素二聚体)。HRMS: 445.2809 [计算值: C₂₄H₃₇N₄O₄ 445.2815]。

实施例1的替代制备

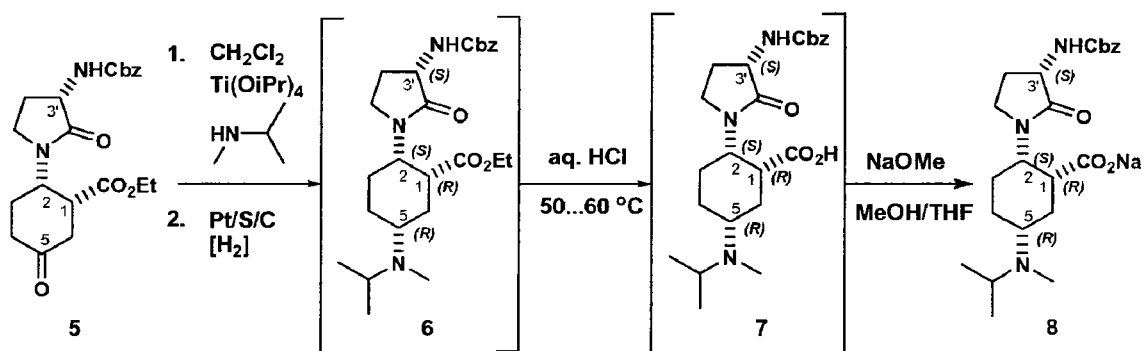


实施例1，替代制备，步骤1：将(7R,8S)-8-氨基-1,4-二氧-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯4-甲苯磺酸盐1 (450.1克)和1-乙基-3-(3-二甲基-氨基-丙基)碳化二亚胺盐酸盐(236.3克)、1-羟基苯并三唑水合物(171.9克)、N-苄氧羰基-L-甲硫胺酸(333.4克)和乙腈(3.1升)合并。在此搅拌的混合物中，在低于30℃下三乙胺(249.5克)添加。在反应完成(HPLC)时，将混合物以乙酸乙酯(8.2升)稀释，并以25%碳酸氢钾水溶液(2 x 4.5升)，接着以水(4.5升)洗涤。分离有机相，并在减压下浓缩，获得(7R,8S)-8-((S)-2-苄氧羰基氨基-4-甲硫基-丁酰基氨基)-1,4-二氧-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯2的溶液(1.4升)。添加碘化甲烷(2.39公斤)，使容器隔

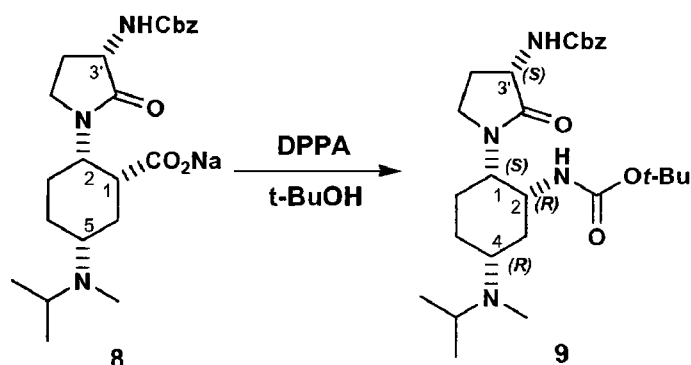
离光线，并使混合物在缓慢搅拌下保持约24小时。在浓稠黄色沉淀物中，添加甲基叔丁基醚(2.7升)，并使混合物保持约1小时。通过过滤分离产物，并将滤饼以甲基叔丁基醚(2 x 1.4升)洗涤，然后在真空下干燥，产生碘化[(S)-3-苄氧基-羰基氨基-3-((7R,8S)-7-乙氧羰基-1,4-二氧-螺[4.5]癸-8-基胺甲酰基)-丙基]-二甲基铯3 (671.4克，~94%产率)，为灰白色固体(HPLC纯度99.9%)。



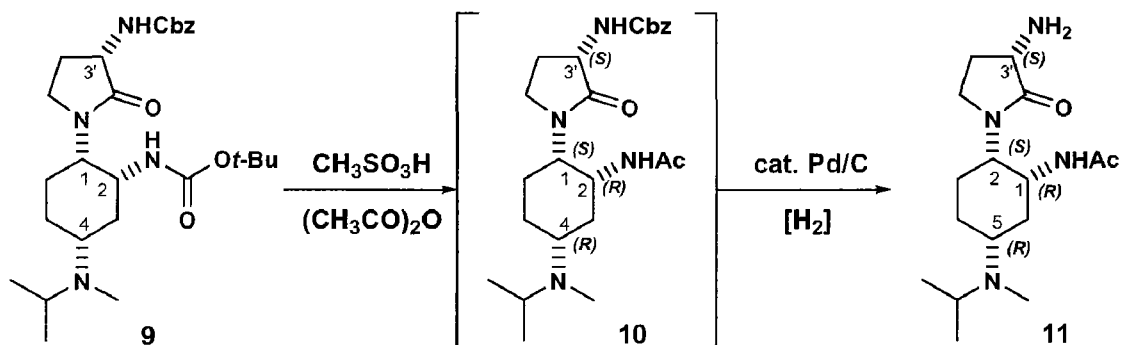
实施例1，替代制备，步骤2：将铯盐3 (619.4克)和碳酸铯(416.8克)以及无水二甲亚砜(6.2升)在装有洗气器的反应器中合并，以中和挥发性硫化物。保持剧烈搅拌，直到获得完全转化(HPLC)为止。添加乙酸乙酯(12.4升)，接着添加20%盐水(3升)。分离有机相，以盐水(2 x 3升)洗涤两次，蒸发，获得(7R,8S)-8-((S)-3-苄氧羰基氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基)-1,4-二氧-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯4在乙酸乙酯中的溶液(~0.8升)。添加丙酮(2.55升)，接着添加0.5M盐酸水溶液(2.3升)。伴随着良好混合，将溶液加热至50到60℃，直到完成4转化成(1R,2S)-2-((S)-3-苄氧羰基氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基)-5-氧代-环己烷羧酸乙酯5为止(HPLC)。在低于40℃时，使混合物在减压下浓缩，冷却至~30℃，添加水(4.1升)。使所形成的浆液冷却至5到10℃，并搅拌~1小时。过滤产物，并以水(2 x 2.5升)洗涤滤饼。在脱液时，使滤饼在真空烘箱中，在低于40℃下干燥至恒重，获得环己酮5 (272克，70%产率)(HPLC纯度98.7%)。



实施例1, 替代制备, 步骤3: 使环己酮5 (206克)溶于二氯甲烷(1.1升)中, 并装填至氢化器中。添加四异丙氧化钛(218.2克)和N-异丙基N-甲胺(63.64克), 并将混合物在环境温度(23至25°C)下搅拌至少5小时。添加铂催化剂 (5% Pt/S/C, 15克, 约7.5%, 相对于5), 并在~30 psig下进行氢化至少6小时, 产生(1R,2S,5R)-2-((S)-3-苄氧羰基氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基)-5-(异丙基-甲基-胺基)-环己烷羧酸乙酯6及其5-epi-异构物 (~7%)的混合物。通过过滤移除催化剂, 并使滤液在减压下浓缩至约~600毫升。添加潮湿乙酸乙酯(~3%水, 2.0升), 剧烈搅拌, 历经至少1.5小时期间。持续搅拌至少另外6小时。过滤浆液。将滤饼以乙酸乙酯(1.0升)洗涤, 抛弃。使合并的滤液和洗液浓缩至~400毫升。添加甲苯(2.0升), 并以2M盐酸水溶液(2 x 400毫升)洗涤溶液。使水层温热至50°到60°C, 历经约20小时, 或6的水解作用被视为完成(HPLC)。添加氢氧化钠水溶液以调整至pH~10, 并以甲苯(3 x 600毫升)萃取混合物。抛弃有机相, 并通过添加盐酸水溶液将pH再调整至~6。使水相在减压下浓缩至~600毫升, 并以二氯甲烷(至少3 x 2.0升)萃取。使合并的二氯甲烷层在减压下蒸发, 并连续以THF置换, 获得(1R,2S,5R)-2-((S)-3-苄氧羰基氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基)-5-(异丙基-甲基-胺基)-环己烷羧酸7 (~148克)在THF (~4升)中的溶液。在低于25°C下添加8的种子晶体, 接着添加甲醇钠(81.24克)在甲醇中的25%溶液。搅拌下使浆液保持至少另外16小时。通过过滤分离产物, 并以THF (4 x 200毫升)洗涤滤饼, 再在真空中、在低于30°C下干燥至恒重。获得干燥的(1R,2S,5R)-2-((S)-3-苄氧羰基-胺基-2-氧代-吡咯烷-1-基)-5-(异丙基-甲基-胺基)-环己烷-羧酸钠盐8 (139克, ~60%产率, 得自5)。



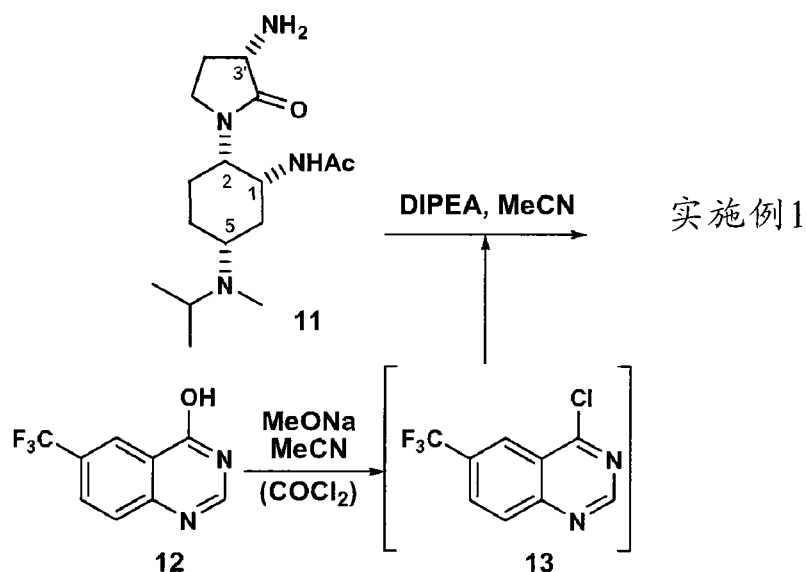
实施例1, 替代制备, 步骤4: 将氨基酯钠盐8 (100克)、磷酸二苯酯(3.86克)、叔-BuOH (1275毫升)和甲苯(225毫升)合并, 并在减压下加热至回流。收集约500毫升馏出物, 抛弃, 同时连续以甲苯在叔-BuOH中的溶液置换。移除真空, 并将馏出物转换经过装满分子筛的柱子渗滤, 及使其返回容器。在干燥完成后, 将DPPA (52.4毫升; 已溶于60毫升甲苯中)在80℃下慢慢添加至浆液中。在完全转化(HPLC)时, 通过真空蒸馏移除叔-BuOH, 并连续以甲苯置换。使混合物冷却至室温, 并以10% K₂HPO₄水溶液(1 x 800毫升, 1 x 400毫升)和水(400毫升)洗涤两次。将有机相加热, 并在真空中浓缩至约270毫升。移除真空, 并在约80℃下慢慢添加庚烷(1.1升), 接着添加9的种子晶体(~1克)。使浆液慢慢冷却至室温, 并将{(S)-1-[(1S,2R,4R)-2-叔丁氧羰基氨基-4-(异丙基-甲基-氨基)-环-己基]-2-氧代-吡咯烷-3-基}-氨基甲酸苄酯9通过过滤分离, 为白色固体(86.76克, 78%产率)。



实施例1, 替代制备, 步骤5: 使氨基甲酸叔丁酯9 (50克)溶于甲苯(500毫升)和i-PrOH (150毫升)中。然后, 将所形成的溶液加热至60℃。

在低于65°C下添加甲磺酸(19.6毫升)。在反应完成(HPLC)时,使混合物冷却至室温,在低于25°C下慢慢添加三乙胺(69.4毫升)。接着,在低于25°C下添加乙酸酐。1小时后,在低于25°C下添加乙酸(250毫升)。抛弃甲苯相,并将2-甲基-THF (500毫升)添加至水相中。将混合物激烈搅拌,并以NaOH (25%水溶液)碱化至pH 12。抛弃水相,并将有机层以盐水(250毫升)洗涤。在减压下浓缩有机层,再连续以*i*-PrOH置换。使溶液冷却,过滤,以提供在*i*-PrOH溶液中的{(S)-1-[(1S,2R,4R)-2-乙酰胺基-4-(异丙基-甲基-胺基)-环己基]-2-氧代-吡咯烷-3-基}-胺基甲酸苄酯10,将其直接使用于氢化作用。

实施例1,替代制备,步骤6:向含有乙酰胺10 (~61克)在*i*-PrOH (~625毫升)中的溶液中,添加10% Pd/C潮湿催化剂(2.5克),并使此悬浮液在30 psig和约25°C下氢化至少2小时。在完成(HPLC)时,通过过滤移除催化剂,再使滤液浓缩至约550毫升。添加水(8.8毫升),接着添加在*i*-PrOH溶液中的5.6N盐酸(69.5毫升)。使所形成的浆液在室温下保持过夜。通过过滤分离产物,并将滤饼以*i*-PrOH (2 x 100毫升)冲洗,再于~50°C下、在真空中干燥至恒重,得到N-[(1R,2S,5R)-2-((S)-3-胺基-2-氧代-吡咯烷-1-基)-5-(异丙基-甲基-胺基)-环己基]-乙酰胺11 (55.6克,97%产率),为其盐酸盐(73.6%游离碱检测, HPLC)。



实施例1,替代制备,步骤7:向在MeCN (400毫升)中的6-三氟甲基-喹唑啉-4-醇12 (20.1克)中,添加甲醇钠在甲醇中的5.5M溶液(17.0毫

升)。使所形成的悬浮液在减压下蒸馏，并连续以MeCN置换，以移除甲醇。在低于50℃下向浆液中添加DMF (1.4克)，接着添加氯化草酰(13.0毫升)。在反应完成(HPLC)时，在减压下移除过量试剂，得到~400毫升浆液。使混合物冷却至室温，并以10% K₂HPO₄水溶液(1 x 1.0升，1 x 0.5升)洗涤，得到约450毫升潮湿MeCN溶液中的4-氯基-6-三氟甲基-喹唑啉13 (~21.2克)，将其直接使用于后续偶合反应中(HPLC纯度99.8%)。

实施例1，替代制备，步骤8：向乙酰胺11 (28.5克，HCl盐，73.6%游离碱检测)、乙腈(100毫升)、N,N-二-异丙基-N-乙胺(61毫升)的混合物中，在室温下添加13 (~21.2克)在MeCN (~450毫升)中的溶液。使均匀混合物保持过夜。在反应完成(HPLC)时，使混合物在真空中浓缩至约125毫升。添加乙酸的9.5%水溶液(240毫升)，并以二氯甲烷萃取水相。分离水相，添加甲基叔丁基醚(450毫升)，接着添加2N氢氧化锂水溶液，以调整至pH >11.5。分离有机层，以水洗涤，过滤。将约一半的醚相以甲基叔丁基醚(~250毫升)稀释，再在真空中浓缩。在低于60℃下慢慢添加庚烷(45毫升)，接着添加实施例1的种子晶体(0.4克)。添加另外的庚烷(125毫升)，并使混合物慢慢冷却至室温，使所形成的浆液保持过夜。通过过滤分离产物，将滤饼以庚烷洗涤，再在真空中干燥至恒重，得到N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)-喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺14 (15.0克，85%产率)。

关于实施例1的结晶操作

实施例1，双-BSA盐的制备和纯化：使得自实施例1步骤11的全部非晶型游离碱溶于甲醇(600毫升)中。将所形成的溶液在60℃下加热，并添加苯磺酸(2.5当量)。使混合物冷却至室温，并通过过滤收集所形成的白色固体，得到标题化合物的双-苯磺酸盐(95克，86%)。此物质为>99%纯，通过HPLC。使此物质从80/20 EtOH/H₂O中通过再结晶进一步纯化，其提供不含任何残留甲醇的盐。HPLC纯度=99.8%。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δppm 8.75 (1H, s), 8.66 (1H, s), 8.25 (1H, d, J = 8.80 Hz), 7.90 (1H, d, J = 8.80 Hz), 7.75 (4H, d, J = 8.25 Hz), 7.43-7.57 (6H, m), 5.42 (1H, t), 4.33-4.44 (1H, m), 4.09-4.19 (1H, m), 3.83-3.91 (1H, m), 3.74-3.83 (2H, m), 3.61 (1H, t, J = 11.55 Hz), 2.75 (3H, d, J =

6.60 Hz), 2.61-2.70 (1H, m), 2.31-2.44 (1H, m), 2.20-2.27 (1H, m), 2.17 (2H, d, $J = 12.10$ Hz), 1.94-2.04 (1H, m, $J = 12.65$ Hz), 1.90-1.95 (3H, m), 1.72-1.91 (2H, m), 1.37 (3H, d, $J = 6.05$ Hz), 1.29 (3H, d, $J = 6.60$ Hz)。差示扫描量热法使用了 $10^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的加热速率, 并且显现出溶解/分解吸热峰, 其中开始温度为 297.6°C , 而尖峰温度为 299.1°C 。

实施例1, 游离碱的结晶: 使N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺的非晶型游离碱的样品(1克)溶于二氯甲烷(5毫升)中。在溶液中装入庚烷(30毫升), 然后温热以蒸馏二氯甲烷。使溶液冷却至 40°C ; 沉淀出白色固体。将此悬浮液加热至 90°C , 并搅拌2小时。使此悬浮液冷却至室温, 过滤, 得到标题化合物的纯游离碱。通过 $^1\text{H-NMR}$ 显现无残留溶剂。

实施例2

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺的结晶型

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺的各种结晶型, 包括游离碱与盐型式及其溶剂合物, 是按下述制备和表征的。

表征型式的操作

单晶数据

数据是在Bruker-Nonius (BRUKER AXS公司, 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA) CAD4序列衍射仪上收集的。单位晶胞参数是经过25个高角度反射的实验衍射仪设定的最小平方分析获得的。强度是使用Cu $K\alpha$ 放射($\lambda = 1.5418\text{\AA}$), 在恒温下, 以 θ - 2θ 可变扫描技术测量的, 并且仅对Lorentz-极化因子校正。背景计数是在扫描极端处, 对一半扫描时间收集的。或者, 单晶数据是在Bruker-Nonius Kappa CCD 2000系统上, 使用Cu $K\alpha$ 放射($\lambda = 1.5418\text{\AA}$)收集的。所测量强度数据的标引(indexing)和处理是在收集程序套装中的HKL2000软件包装(Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) in *Macromolecular Crystallography*, eds. Carter, W.C. Jr & Sweet, R.M. (Academic, NY), Vol. 276, pp.

307-326)进行(收集数据集与处理使用者界面: 收集: 数据集软件, R. Hooft, Nonius B. V., 1998)。或者, 单晶数据是在Bruker-AXS APEX2 CCD系统上, 使用Cu K α 放射($\lambda = 1.5418\text{\AA}$)收集的。所测量强度数据的标引和处理是以APEX2软件包装/程序套装(APEX2数据收集与处理使用者界面: APEX2使用者手册, v1.27; BRUKER AXS公司, 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA)进行。

当需要时, 晶体是在数据收集期间, 在Oxford低温系统(Oxford Cryosystems Cryostream冷却器: J. Cosier与A.M. Glazer, J. Appl. Cryst., 1986, 19, 105)的冷流体中冷却的。

结构是通过直接方法解析的, 并以所发现的反射为基础, 使用以下的任一种精化(refine), SDP (SDP, 结构测定包装, Enraf-Nonius, Bohemia NY 11716。散射因子, 包括 f' 与 f'' , 在SDP软件中, 取自"国际结晶学表", Kynoch出版社, Birmingham, England, 1974; 第IV卷, 表2.2A与2.3.1)包装软件, 其伴有少许局部修正, 或者结晶学包装MAXUS (maXus解决和精化软件套装: S. Mackay, C. J. Gilmore, C. Edwards, M. Tremayne, N. Stewart, K. Shankland. maXus: 关于得自衍射数据或SHELXTL4的晶体结构解决与精化的计算机程序。所导出的原子参数(坐标和温度因子)是经过全矩阵最小平方精化的。在精化中被降至最少的函数为 $\sum w(|F_o| - |F_c|)^2$ 。R定义为 $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, 而 $R_w = [\sum w(|F_o| - |F_c|)^2 / \sum w |F_o|^2]^{1/2}$, 其中 w 为以所发现强度的误差为基础的适当的加权函数。差异图是在所有精化阶段下检验的。氢是在理想化位置上以均向性温度因子引进的, 但未改变氢参数。

X-射线粉末衍射数据(PXRD)

PXRD数据是使用Bruker C2 GADDS获得的。放射为Cu K α (40 KV, 50 mA)。样品-检测器距离为15厘米。将粉末样品放置在1毫米或更小直径的密封玻璃毛细管中; 将毛细管在数据收集期间旋转。收集 $3 \leq 2\theta \leq 35^\circ$ 的数据, 其中样品曝露时间为至少2000秒。将所形成的二维衍射弧积分, 以产生传规的一维PXRD图, 其在3至35度的 2θ 的范围内具有步阶大小为0.02度的 2θ 。将约200毫克装填至Philips粉末X-射线衍射(PXRD)样品支持器中。将样品转移至Philips MPD单元(45 KV, 40 mA, Cu K α)中。数据是在室温下, 在2至32的 $2-\theta$ 范围内收集的(连续扫

描模式，扫描速率0.03度/秒，自动发散和抗散射狭缝，接收狭缝：0.2毫米，样品转子：ON)

差示扫描量热法(DSC)

DSC实验是在TA Instruments™ Q1000或2920型中进行的。将样品(约2-6毫克)在铝浅盘中称重，并精确地记录至百分之一毫克，再转移至DSC。仪器是用氮气以50毫升/分钟吹扫。在10°C/分钟加热速率下，在室温和300°C之间收集数据。图形是以吸热峰向下行制成的。

热重分析(TGA)

TGA实验是在TA Instruments™ Q500或2950型中进行的。将样品(约10-30毫克)置于预先称量皮重的铂浅盘中。样品的重量是通过仪器精确地测量的，并记录至千分之一毫克。将炉子用氮气以100毫升/分钟吹扫。在10°C/分钟加热速率下，在室温和300°C之间收集数据。

型式的制备与分析

这些实施例的单位晶胞数据和其它性质呈现于表1中。单位晶胞参数得自单晶X-射线结晶学分析。单位晶胞的详细说明可参阅Stout & Jensen, *X-Ray Structure Determination: a Practical Guide*, (MacMillan, 1968)的第3章。

实施例2a、b、c、d、e、f、g和h的部分原子坐标分别呈现于表2、3、4、5、6、7、8和9中。

此外，实施例2a、b、d、e、f、g和h的特性粉末X-射线衍射吸收峰位置(度 $2\theta \pm 0.1$)@RT呈现于表10中。其全部均以高质量图为基础，以衍射仪(Cu K α)收集，使用旋转毛细管，其中 2θ 是用NIST其它适当标准校准的。

最后，图1、2、3、4、5、6和7分别呈现了实施例2a、b、d、e、f、g和h的XRPD图。图8和9分别揭示实施例2a的DSC和TGA分析，而图10、11和12分别揭示实施例2f的DSC、TGA和水份吸着等温线波谱。

型式制备、XRD、DSC和TGA表征

实施例2a，N-1型式，二苯磺酸盐：

使N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺二-苯磺酸盐从乙酸乙酯、乙醇、甲醇和丙酮中结晶。型式N-1二苯磺酸盐为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺二-苯磺酸盐的不含溶剂(无水或溶剂的分子)型式。型式N-1二苯磺酸盐的特征为XRD图,该XRD图符合由单晶结构数据所产生的模拟图。型式N-1二苯磺酸盐的特征为DSC热分析图,其具有溶解/分解吸热峰,该吸热峰通常在约296°C下开始。型式N-1二苯磺酸盐的特征为TGA热曲线,其在达到约280°C下具有可忽略的重量损失(与非溶剂化型式一致)。

实施例2b, DC-1型式:

使N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺(约0.5克)的油状类凝胶(非晶型)游离碱的样品,在BSA盐的样品萃取后,溶解于二氯甲烷(约3毫升)中。在此溶液中,添加约5毫升庚烷,并将所形成的油状混合物在开口烧杯中、在20-25°C下通过磁搅拌棒激烈搅拌。蒸发溶剂后,获得白色固体。使固体再悬浮于约5毫升庚烷和0.2毫升二氯甲烷的混合物中,并在25°C下搅拌7天。过滤所形成的浆液,风干,以提供N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,游离碱,型式DC-1。型式DC-1的特征为每摩尔N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱有一摩尔二氯甲烷。型式DC-1的特征为XRD图,其符合由单晶结构数据所产生的模拟图。

实施例2c, THOO-1型式:

使N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺,游离碱,1毫克,溶解于80微升THF中。将溶剂通过Speed-vac (SpeedVac Plus, SC250DDA, Savant/热电子公司)在高真空和22°C下历经16小时移除。将总共100微升MIBK/庚烷(1/2体积比)添加至此孔中。在环境温度(20-25°C)下保持2周后,在此孔中发现结晶。型式THOO的特征为每一摩尔N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹

唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱有一摩尔THF。

实施例2d, E-1型式:

使N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱,由乙醇和庚烷的溶液结晶。型式E-1的特征为每一摩尔N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱有一摩尔乙醇。型式E-1的特征为XRD图,其符合由单晶结构数据所产生的模拟图。

实施例2e, A-1型式:

使N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱以超过150毫克/毫升的浓度悬浮丙酮中。使此悬浮液在室温下达到平衡,以提供稍微稀的悬浮液。过滤一部分此悬浮液,并将滤液与此悬浮液两者在5℃下冷冻,以提供单丙酮溶剂合物的结晶(A-1)。型式A-1的特征为每一摩尔N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱有一摩尔丙酮。型式A-1游离碱的特征为XRD图,其符合由单晶结构数据所产生的模拟图。

实施例2f, N-2型式:

使从BSA盐样品中萃取的N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺的油状似凝胶(非晶型)游离碱样品(约0.5克)悬浮于庚烷(约5毫升)中。将烧瓶以金属刮勺刮搔,并将此悬浮液于25℃下通过磁搅拌棒激烈搅拌。搅拌24小时后,获得结晶性粒子的白色浆液。过滤浆液,并使湿滤饼在真空中干燥(40℃),以提供游离碱的纯N-2型式(通过PXRD确认)。型式N-2的特征为XRD图,其符合由单晶结构数据所产生的模拟图。型式N-2为N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱的不含溶剂(无溶剂合物分子,或无水或溶剂的分子)型式。型式N-2的特征为DSC热分析图,其具有通常开始于约158℃至约162℃的溶解吸热峰。型式N-2的特征为TGA热曲线在达到约145℃下具有可忽略的重量损失,其与单晶结构数据一致。重量损失系符合外来溶剂。水份吸着等温线的特征为在约25%至约75% RH的范围内、在25℃下重量增加

0.15%，这表示N-2型式为轻微吸湿性(我陈述为极轻微或非吸湿性)。

实施例2g, 型式AN-3:

将N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱的悬浮液以~200毫克/毫升制备于乙腈中, 并使其在室温下达到平衡, 以提供稍微稀的悬浮液。过滤一部分此悬浮液, 并使滤液与此悬浮液两者在5°C下冷冻, 以提供乙腈溶剂合物的结晶(AN-3)。型式AN-3的特征为每一摩尔N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺游离碱有一摩尔乙腈。型式AN-3的特征为XRD图, 其符合由单晶结构数据所产生的模拟图。

实施例2h, 型式H4-1, HCl:

使N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺的游离碱的样品(约0.2克)溶于乙醇(约1毫升)中。向该游离碱溶液中添加约310微升在乙醇中的HCl溶液(约1.25M浓度)。将此溶液以少量HCl盐的结晶浆液接种。向所形成的混浊溶液中添加3毫升庚烷。在20-25°C下搅拌的同时, 历经1-2小时逐渐形成白色浆液。将浆液在20°C下再搅拌12小时, 过滤, 并以庚烷洗涤。使湿滤饼在真空中干燥(40°C), 以提供HCl盐四水合物, 型式H4-1, HCl。型式H4-1, HCl的特征为每摩尔N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺盐酸盐具有4摩尔水。型式H4-1, HCl盐四水合物的特征为SRD图, 其符合由单晶结构数据所产生的模拟图。

表1
单位晶胞参数

化合物	盐	型式	T	a(Å)	b(Å)	c(Å)	α°	β°	γ°	V(Å ³)
实施例2a	二-BSA	N-1	RT	15.1737(8)	7.6544(4)	16.7722(9)	90	93.758(2)	90	1943.8(2)
实施例2b	碱	DC-1	RT	8.7496(5)	10.729(2)	31.029(3)	90	90	90	2912.8(6)
实施例2c	碱	THOO-1	-50	8.7909(6)	11.1527(5)	30.862(2)	90	90	90	3025.8(3)
实施例2d	碱	E-1	RT	8.2050(5)	11.2186(5)	32.041(2)	90	90	90	2949.3(3)
实施例2e	碱	A-1	RT	8.8773(7)	10.5735(8)	31.319(2)	90	90	90	2939.8(4)
实施例2f	碱	N-2	RT	11.8427(3)	18.1503(7)	12.7923(4)	90	105.362(2)	90	2651.4(2)
实施例2g	碱	AN-3	RT	7.5341(9)	13.514(2)	14.342(2)	90	91.671(8)	90	1459.6(4)
实施例2h	HCl	H4-1	RT	11.8391(2)	11.8391(2)	78.158(2)	90	90	90	9487.2(4)

表1 (续)
单位晶胞参数

化合物	Z'	Vm	sg	dcalc
实施例2a	1	972	P2 ₁	1.406
实施例2b	1	728	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1.349
实施例2c	1	756	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1.340
实施例2d	1	737	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1.245
实施例2e	1	735	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1.276
实施例2f	2	663	P2 ₁	1.269
实施例2g	1	730	P2 ₁	1.246
实施例2h	1	791	P6 ₁ 22	1.292

表1中使用的变量定义如下:

T = 结晶学数据的摄氏温度(RT为室温, 其为约+22°C)

V = 单位晶胞的体积

Z' = 每不对称单位的药物分子数目

Vm = V (单位晶胞)/(每晶胞的Z药物分子)

sg = 空间群

dcalc = 计算的晶体密度

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C29	0.5694	0.5442	0.2072	H69	0.7752	0.7851	0.0338
C30	0.8956	0.7650	0.0399	H70	0.7087	0.4513	0.0715
F31	-0.0040	0.3354	0.0005	H71	0.5635	0.3648	0.0972
C32	-0.0935	0.2269	0.0831	H72	0.5326	0.4265	0.0453
F33	0.1425	0.1946	0.0181	H73	0.2091	0.6032	0.2400
C34	1.0774	0.7297	0.0973	H75	-0.7132	-0.0216	0.1657
C35	0.9360	0.6480	0.0149				
C36	0.9736	0.8757	0.0185				
CL37	-0.6723	0.0636	0.0976				
CL38	-0.6200	0.1776	0.1776				
C39	-0.7292	0.0689	0.1511				
CL40	-0.8261	0.1021	0.1984				
CL41	-0.5719	0.1649	0.1533				

表4

实施例2c, 型式THOO-1的原子坐标

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
N1	0.6241	0.6511	0.1036	H44	0.8469	0.6491	-0.0084
N2	0.5165	0.6586	0.1938	H45	1.0426	0.6769	-0.0009
N3	0.0409	0.4138	0.2209	H46	0.9420	0.5884	0.0369
N4	0.9119	0.7577	0.0893	H47	0.9710	0.8879	-0.0108
N5	0.2188	0.5080	0.1767	H48	0.9644	0.9636	0.0393
N6	-0.1428	0.2821	0.1910	H49	1.1113	0.8600	0.0288
F7	0.2088	0.4068	0.0184	H50	1.1138	0.6612	0.0823
F8	0.1464	0.2269	0.0085	H51	1.1368	0.8124	0.0977
F9	-0.0051	0.3616	-0.0061	H52	1.0715	0.7062	0.1357
O10	0.3873	0.5694	0.1019	H53	0.8967	0.9395	0.1069
O11	0.2971	0.7711	0.1928	H54	0.8364	0.9249	0.1799
C12	-0.0831	0.2960	0.1506	H55	0.9892	0.8264	0.1696
C13	0.0371	0.3738	0.1430	H56	0.6557	0.8698	0.0727
C14	0.5812	0.7621	0.1256	H57	0.6337	0.9476	0.1221
C15	0.0986	0.4345	0.1815	H58	0.7936	0.7360	0.2193
C16	-0.0886	0.2415	0.0746	H59	0.8150	0.6527	0.1711
C17	0.6739	0.8655	0.1071	H60	0.5860	0.8385	0.1901
C18	0.0331	0.3225	0.0673	H61	0.4619	0.7796	0.1196
C19	0.6111	0.7539	0.1748	H62	0.7430	0.6376	0.0952
C20	0.7789	0.7380	0.1846	H63	0.5034	0.3895	0.0665
C21	0.0953	0.3862	0.1014	H64	0.6466	0.4797	0.0433
C22	-0.1446	0.2303	0.1158	H65	0.6742	0.4155	0.0950
C23	0.8438	0.8556	0.1148	H66	0.5931	0.4838	0.1746
C24	0.3673	0.6754	0.2001	H67	0.6760	0.5373	0.2229
C25	-0.0810	0.3420	0.2233	H68	0.4199	0.3911	0.2235
C26	0.8681	0.8418	0.1645	H69	0.4543	0.4982	0.2644

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C27	0.5709	0.5348	0.2038	H70	0.2110	0.5756	0.2404
C28	0.8975	0.7762	0.0422	H71	0.2578	0.5312	0.1447
C29	0.2923	0.5573	0.2150	H72	-0.1392	0.3344	0.2555
C30	0.4345	0.4867	0.2295	H73	0.1922	0.4468	0.0960
C31	0.0958	0.3306	0.0236	H74	-0.2394	0.1689	0.1216
C32	0.9346	0.6664	0.0161	H75	-0.1341	0.1904	0.0479
C33	0.9942	0.8828	0.0245	H76	0.7798	0.8064	0.0354
C34	1.0667	0.7324	0.1019	H77	-0.5859	0.2979	0.1468
C35	0.5239	0.5633	0.0937	H78	-0.6934	0.1865	0.0883
C36	0.5916	0.4548	0.0733	H79	-0.5532	0.0802	0.1023
O37	-0.4684	0.1388	0.1701	H80	-0.7442	-0.0491	0.1228
O38	-0.4289	0.2122	0.2075	H81	-0.8828	0.0626	0.1139
O39	-0.7214	0.1782	0.1852	H82	-0.7168	0.0010	0.1956
C40	-0.6079	0.2004	0.1513	H83	-0.8983	0.0662	0.1893
C41	-0.7805	0.0664	0.1760	H84	-0.3123	0.2450	0.2037
C42	-0.6561	0.1265	0.1151				
C43	-0.7758	0.0381	0.1281				

表5

实施例2d, 型式E-1的原子坐标

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
N1	0.5556	0.6575	0.1971	H40	0.2903	0.5250	0.1486
N2	0.9580	0.7945	0.0952	H41	0.7902	0.6695	0.0980
N3	0.0504	0.4000	0.2167	H42	0.6121	0.8376	0.1960
N4	0.2466	0.4969	0.1788	H43	0.4802	0.7853	0.1289
N5	0.6640	0.6706	0.1083	H44	-0.1345	0.3091	0.2471
O6	0.4235	0.5727	0.1071	H45	0.2219	0.4518	0.0971
O7	0.3141	0.7585	0.2020	H46	0.8518	0.7434	0.2205
C8	0.0563	0.3683	0.1425	H47	0.8769	0.6703	0.1722
C9	0.3945	0.6665	0.2051	H48	-0.2356	0.1657	0.1154
N10	-0.1464	0.2693	0.1855	H49	0.2468	0.5491	0.2421
C11	0.1179	0.4244	0.1805	H50	-0.1137	0.1969	0.0471
C12	-0.0757	0.2900	0.1475	H51	0.9339	0.9678	0.1186
C13	0.5699	0.5796	0.0976	H52	0.6715	0.8931	0.0836
C14	0.6460	0.7574	0.1795	H53	0.6450	0.9623	0.1326
C15	0.6096	0.7741	0.1332	H54	0.5054	0.4773	0.2603
C16	-0.0804	0.3256	0.2169	H55	0.4724	0.3825	0.2172
C17	0.1256	0.3867	0.1021	H56	0.8706	0.9373	0.1867
C18	0.8278	0.7497	0.1874	H57	1.0434	0.8510	0.1741
C19	-0.1350	0.2278	0.1118	H58	0.6429	0.4941	0.1737
C20	0.3307	0.5423	0.2161	H59	0.7309	0.5392	0.2214
C21	-0.0669	0.2438	0.0739	H60	0.5606	0.4154	0.0654
C22	0.8827	0.8818	0.1241	H61	0.6932	0.5215	0.0431

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C23	0.6945	0.8866	0.1168	H62	0.7497	0.4462	0.0892
C24	0.4824	0.4737	0.2271	H63	1.1678	0.6903	0.0868
C25	0.0642	0.3239	0.0689	H64	1.2002	0.8299	0.1107
C26	0.9139	0.8598	0.1701	H65	1.1111	0.7125	0.1393
C27	0.6193	0.5376	0.2034	H66	0.8527	0.8919	0.0459
C28	0.1332	0.3426	0.0264	H67	0.9828	0.7726	-0.0103
C29	0.6490	0.4838	0.0720	H68	1.0893	0.6894	0.0276
F30	0.1426	0.2490	0.0048	H69	0.8751	0.6798	0.0245
F31	0.2603	0.4035	0.0246	H70	1.1045	0.9693	0.0155
C32	1.1203	0.7545	0.1087	H71	1.0868	1.0079	0.0687
C33	0.9653	0.8421	0.0525	H72	1.2197	0.8923	0.0534
C34	0.9802	0.7362	0.0215	H73	-0.3356	0.1901	0.1827
C35	1.1042	0.9365	0.0471	H74	-0.6100	0.2427	0.1853
F36	0.0282	0.4017	0.0020	H75	-0.5435	0.1919	0.1361
O37	-0.4308	0.1231	0.1846	H76	-0.8101	0.1237	0.1519
C38	-0.5696	0.1669	0.1671	H77	-0.6709	0.0043	0.1485
C39	-0.7016	0.0870	0.1643	H78	-0.7374	0.0551	0.1977

表6

实施例2e, 型式A-1的原子坐标

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
O1	0.3737	0.5677	0.1038	H34	-0.1640	0.1792	0.0657
N2	0.6127	0.6388	0.1027	H16	0.1740	0.4180	0.1027
O3	0.3132	0.7830	0.1897	H32	-0.2563	0.1746	0.1343
C4	0.5064	0.5520	0.0949	H24	-0.1168	0.3282	0.2594
N5	0.2190	0.5059	0.1814	H5	0.2557	0.5241	0.1532
C6	0.1016	0.4290	0.1870	H28A	0.4510	0.5073	0.2614
N7	0.9018	0.7409	0.0835	H28B	0.4099	0.3978	0.2297
N8	0.5246	0.6588	0.1932	H30A	0.5706	0.4800	0.1779
C9	0.3746	0.6827	0.1988	H30B	0.6614	0.5265	0.2179
N10	0.0495	0.4145	0.2272	H15	0.2312	0.5873	0.2385
C11	0.5829	0.7591	0.1239	H17	0.5966	0.8294	0.1852
C12	0.0312	0.3644	0.1517	H2	0.7132	0.6191	0.0935
C13	-0.0936	0.2901	0.1617	H18A	0.6668	0.4348	0.0693
N14	-0.1492	0.2774	0.2023	H18B	0.5096	0.4227	0.0469
C15	0.3004	0.5650	0.2162	H18C	0.5363	0.3599	0.0916
C16	0.0858	0.3691	0.1092	H22A	0.8097	0.7261	0.2084
C17	0.6197	0.7499	0.1719	H22B	0.8144	0.6500	0.1655
C18	0.5600	0.4313	0.0739	H11	0.4780	0.7781	0.1200
C19	0.6747	0.8657	0.1038	H19A	0.6550	0.8673	0.0737
F20	0.1808	0.3831	0.0261	H19B	0.6472	0.9456	0.1161
C21	0.0143	0.3015	0.0775	H27A	0.8511	0.9136	0.1702
C22	0.7871	0.7290	0.1785	H27B	0.9840	0.8202	0.1605

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C23	0.8454	0.8483	0.1091	H23	0.8972	0.9223	0.0991
C24	-0.0739	0.3401	0.2315	H33A	1.0920	0.6435	0.0741
F25	0.1345	0.1856	0.0238	H33B	1.0747	0.6924	0.1211
C26	0.0743	0.2971	0.0335	H33C	1.1211	0.7863	0.0846
C27	0.8780	0.8348	0.1570	H31	0.7694	0.7749	0.0364
C28	0.4326	0.4864	0.2320	H37A	0.9230	0.8700	-0.0130
F29	-0.0287	0.3175	0.0040	H37B	1.0541	0.8649	0.0205
C30	0.5653	0.5283	0.2038	H37C	0.9089	0.9442	0.0302
C31	0.8750	0.7554	0.0374	H36A	0.8874	0.6527	-0.0172
C32	-0.1674	0.2229	0.1280	H36B	0.8419	0.5709	0.0225
C33	1.0612	0.7135	0.0915	H36C	1.0100	0.6124	0.0161
C34	-0.1156	0.2277	0.0877	H40A	-0.7132	0.1528	0.2120
C35	-0.6607	0.1145	0.1509	H40B	-0.7533	0.0132	0.1994
C36	0.9067	0.6372	0.0125	H40C	-0.8560	0.1249	0.1840
C37	0.9468	0.8688	0.0169	H38A	-0.7948	0.0004	0.1242
C38	-0.7123	0.0511	0.1141	H38B	-0.6331	-0.0032	0.1041
O39	-0.5629	0.1869	0.1523	H38C	-0.7461	0.1041	0.0912
C40	-0.7542	0.0996	0.1900				

表7

实施例2f, 型式N-2原子坐标

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C1	-0.1614	0.2577	0.0383	F7	0.6225	0.2634	0.5011
C2	0.0133	0.3873	0.0895	F8	0.7150	0.2806	0.6609
C3	-0.0055	0.3310	-0.0010	F9	0.5345	0.2749	0.6173
C4	-0.0893	0.3603	-0.1048	F10	0.6186	0.2737	0.7242
C5	-0.0096	0.1977	-0.0307	F11	0.7090	0.2767	0.6039
C6	0.1226	0.1850	-0.0004	F12	0.5230	0.2690	0.5624
C7	-0.0693	0.1244	-0.0205	H10A	-0.0413	0.1190	0.1459
C8	0.1708	0.1498	0.1106	H10B	-0.0615	0.0409	0.0911
C9	0.1075	0.0771	0.1147	H11	0.0996	0.2283	0.1837
C10	-0.0234	0.0881	0.0905	H12	0.3217	-0.0767	0.3481
C11	0.2617	0.0045	0.2339	H13A	0.1891	-0.0144	0.4538
C12	0.2925	-0.0262	0.3476	H13B	0.1378	-0.0726	0.3618
C13	0.1771	-0.0254	0.3775	H14A	0.0237	0.0225	0.2848
C14	0.1062	0.0350	0.3075	H14B	0.1156	0.0818	0.3457
C15	0.2367	0.2052	0.2942	H16A	0.1608	0.2374	0.4116
C16	0.2078	0.2604	0.3702	H16B	0.1652	0.3007	0.3293
C17	0.5499	-0.0989	0.6085	H16C	0.2789	0.2786	0.4183
C18	0.4630	-0.0041	0.5011	H17	0.5477	-0.1488	0.6244
C19	0.5492	0.0453	0.5666	H1A	-0.1774	0.3007	0.0757
C20	0.6362	0.0119	0.6505	H1B	-0.1761	0.2143	0.0756
C21	0.5475	0.1213	0.5540	H1C	-0.2111	0.2575	-0.0344

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C22	0.7226	0.0568	0.7150	H21	0.4899	0.1433	0.4990
C23	0.7201	0.1309	0.7026	H22	0.7832	0.0354	0.7676
C24	0.6306	0.1640	0.6225	H23	0.7779	0.1599	0.7473
C25	0.6233	0.2457	0.6114	H26A	0.3405	0.0047	-0.3327
C26	0.3178	0.0508	-0.3076	H26B	0.3247	0.0893	-0.3570
C27	0.3677	0.1429	-0.1554	H26C	0.2382	0.0477	-0.3035
C28	0.2847	-0.0135	-0.1112	H27A	0.2885	0.1420	-0.1496
C29	0.3985	0.0680	-0.1941	H27B	0.3753	0.1801	-0.2063
C30	0.4839	-0.0499	-0.1192	H27C	0.4198	0.1537	-0.0857
C31	0.4689	-0.1207	-0.0596	H28A	0.2347	0.0287	-0.1160
C32	0.6120	-0.0241	-0.0769	H28B	0.2875	-0.0400	-0.0457
C33	0.6492	-0.0164	0.0464	H28C	0.2545	-0.0451	-0.1725
C34	0.6335	-0.0892	0.1001	H29	0.4782	0.0723	-0.2025
C35	0.5063	-0.1148	0.0626	H2A	-0.0589	0.3951	0.1087
C36	0.6313	0.0922	0.1569	H2B	0.0389	0.4330	0.0656
C37	0.5494	0.1489	0.1804	H2C	0.0717	0.3696	0.1516
C38	0.7946	-0.0826	0.2650	H3	0.0704	0.3241	-0.0167
C39	0.6078	-0.0715	0.2941	H30	0.4704	-0.0619	-0.1962
C40	0.6937	-0.0843	0.4027	H31A	0.3871	-0.1351	-0.0819
C41	0.8124	-0.0650	0.3838	H31B	0.5139	-0.1595	-0.0817
C42	0.8969	0.0402	0.4994	H32A	0.6629	-0.0594	-0.0989
C43	0.9918	0.0223	0.6769	H32B	0.6212	0.0230	-0.1096
C44	0.9164	0.1178	0.5156	H33	0.7326	-0.0036	0.0683
C45	1.0010	0.2152	0.6420	H34	0.6810	-0.1261	0.0750
C46	0.9795	0.1403	0.6212	H35A	0.4983	-0.1624	0.0944
C47	0.9601	0.2664	0.5640	H35B	0.4564	-0.0799	0.0866
C48	0.8959	0.2447	0.4599	H37A	0.5607	0.1528	0.2573
C49	0.8756	0.1715	0.4360	H37B	0.4700	0.1346	0.1467
C50	0.8489	0.3015	0.3761	H37C	0.5650	0.1957	0.1521
N1	1.0171	0.0906	0.7037	H39A	0.5425	-0.1055	0.2823
N2	0.6368	-0.0622	0.6704	H39B	0.5781	-0.0214	0.2880
N3	0.9331	-0.0075	0.5810	H40A	0.6920	-0.1353	0.4251
N4	0.4627	-0.0749	0.5246	H40B	0.6765	-0.0527	0.4577
N5	0.8420	0.0126	0.4015	H41	0.8743	-0.0960	0.4288
N6	0.6777	-0.0849	0.2178	H43	1.0183	-0.0115	0.7327
N7	0.5849	0.0426	0.0803	H45	1.0440	0.2303	0.7105
N8	0.4025	0.0106	-0.1105	H47	0.9746	0.3161	0.5795
N9	0.3818	0.0211	0.4149	H49	0.8344	0.1575	0.3664
N10	0.1561	0.0378	0.2158	H4A	-0.1020	0.3231	-0.1600
N11	0.1599	0.2000	0.1967	H4B	-0.0560	0.4033	-0.1288
N12	-0.0389	0.2585	0.0355	H4C	-0.1627	0.3731	-0.0908
O1	0.8718	-0.0902	0.2185	H5	0.8235	0.0422	0.3470
O2	0.7359	0.0910	0.2072	H5A	-0.0340	0.2128	-0.1069
O3	0.3220	0.0019	0.1698	H6A	0.1414	0.1536	-0.0548
O4	0.3257	0.1671	0.3217	H6B	0.1615	0.2319	-0.0017

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
F1	0.7539	0.2815	0.3030	H7	0.5113	0.0460	0.0488
F2	0.9209	0.3190	0.3146	H7A	-0.1528	0.1327	-0.0337
F3	0.8233	0.3648	0.4151	H7B	-0.0576	0.0910	-0.0759
F4	0.8500	0.2791	0.2840	H8	0.2540	0.1393	0.1202
F5	0.9132	0.3571	0.3931	H9	0.3825	0.0671	0.3986
F6	0.7377	0.3127	0.3710	H9A	0.1212	0.0462	0.0565

表8

实施例2g, 型式AN-3原子坐标

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
N1	0.3835	0.0757	0.0375	H21	-0.1570	0.4019	0.0806
N2	0.7286	-0.0185	0.1260	H6	0.2566	0.2184	0.1457
N3	0.2667	0.0953	-0.1106	H15	-0.1768	0.3372	-0.0677
O4	0.4406	0.1041	0.2348	H20	0.1322	0.1240	-0.2309
C6	0.1693	0.2426	0.1013	H1	0.3709	0.0824	0.1036
N7	0.6875	0.0647	0.3206	H17	0.4819	-0.0292	-0.0463
C8	0.0362	0.2388	-0.0548	H28A	0.7603	0.0328	-0.0600
O9	0.5030	-0.1317	0.1098	H28B	0.6637	0.1325	-0.0383
C10	0.5797	-0.0561	0.0855	H24A	0.7555	0.1274	0.1175
N11	0.9744	0.0244	0.4480	H24B	0.9167	0.0696	0.0774
C12	0.0569	0.3162	0.1260	H19	0.8001	-0.1313	0.2000
C5	0.1605	0.2026	0.0109	H22A	1.0680	-0.0427	0.1790
C13	0.2745	0.1240	-0.0211	H22B	1.0006	0.0401	0.2458
N14	0.0255	0.2060	-0.1450	H29A	1.0737	-0.1556	0.3001
C15	-0.0858	0.3132	-0.0252	H29B	1.1889	-0.0637	0.3299
C16	0.5624	0.1278	0.2890	H27	1.0060	-0.1224	0.4487
C17	0.5237	0.0103	0.0054	H23A	0.6964	-0.0882	0.4334
C18	1.1544	0.0668	0.4534	H23B	0.7596	-0.1700	0.3643
C19	0.8045	-0.0612	0.2107	H25	0.5708	-0.0620	0.2829
C20	0.1422	0.1402	-0.1658	H7	0.7807	0.0874	0.3623
C21	-0.0752	0.3517	0.0617	H34A	0.6865	0.2365	0.3642
C22	0.9970	-0.0294	0.2320	H34B	0.4795	0.2484	0.3581
C23	0.7649	-0.1008	0.3793	H34C	0.5937	0.2759	0.2722
C24	0.7898	0.0709	0.0816	H36A	0.7774	-0.0065	0.5345
C25	0.6909	-0.0417	0.2964	H36B	0.8886	0.0871	0.5638
C26	0.6097	0.2153	0.6473	H36C	0.9671	-0.0190	0.5809
C27	0.9604	-0.0758	0.4035	H18	1.1968	0.0630	0.3910
C28	0.6935	0.0679	-0.0147	H35A	1.4009	0.0440	0.5102
C29	1.0708	-0.0864	0.3149	H35B	1.3030	-0.0555	0.4859
F30	0.1149	0.3018	0.2839	H35C	1.2530	0.0042	0.5751
C31	1.1447	0.1747	0.4843	H31A	1.2617	0.2028	0.4883
C32	0.0681	0.3603	0.2194	H31B	1.0911	0.1790	0.5441
F33	-0.0775	0.3987	0.2482	H31C	1.0736	0.2106	0.4391

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C34	0.5829	0.2314	0.3240	H37A	0.5614	0.1191	0.7457
C35	1.2896	0.0095	0.5118	H37B	0.5364	0.2293	0.7767
C36	0.8948	0.0210	0.5396	H37C	0.7279	0.1858	0.7670
C37	0.6085	0.1849	0.7418				
N38	0.6123	0.2421	0.5722				
F39	0.1781	0.4283	0.2274				

表9

实施例2h, 型式H4-1, HCl原子坐标

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
N1	-0.1488	0.2098	-0.0343	H42	0.3077	0.3275	0.1257
O2	0.3490	0.4972	0.0272	H43	0.1538	0.2201	0.0743
N3	0.2326	0.3477	0.0060	H44	0.5279	0.4347	0.1149
N4	0.2975	0.2676	0.0466	H45	0.7124	0.4674	0.0613
N5	0.0807	0.4627	0.0181	H46	0.4192	0.2973	0.0255
N6	0.5197	0.3793	0.0531	H47	0.2578	0.0900	0.0153
F7	-0.0010	0.2280	0.0989	H48	0.1288	0.1011	0.0254
O8	0.1939	0.6851	0.0181	H49	0.0936	0.1554	-0.0028
C9	0.2189	0.4432	-0.0048	H50	0.2571	0.2098	-0.0092
C10	0.3038	0.3881	0.0205	H51	0.3036	0.5397	-0.0022
N11	0.5990	0.4425	0.0823	H52	0.2392	0.5114	-0.0309
C12	0.0927	0.4487	-0.0003	H53	0.2974	0.4009	-0.0274
C13	-0.0342	0.3317	-0.0074	H54	0.0792	0.2199	-0.0265
C14	0.3955	0.3262	0.0584	H55	0.1025	0.3114	-0.0456
C15	0.4700	0.3861	0.0880	H56	-0.0076	0.4161	-0.0330
C16	0.3630	0.3248	0.0764	H57	-0.0551	0.2416	-0.0013
C17	0.1395	0.5810	0.0261	H58	-0.1201	0.3469	-0.0044
C18	0.3194	0.2774	0.0280	H59	0.0964	0.5331	-0.0071
C19	-0.1511	0.2151	-0.0542	H60	0.1837	0.6722	0.0512
C20	0.1983	0.2123	0.0011	H61	0.0338	0.5217	0.0502
C21	0.0952	0.3112	-0.0319	H62	0.1844	0.5224	0.0503
C22	-0.0230	0.3271	-0.0270	H63	-0.2772	0.1614	-0.0127
C23	0.2130	0.2691	0.1003	H64	-0.2760	0.2805	-0.0267
C24	0.2222	0.4228	-0.0243	H65	-0.3579	0.1133	-0.0329
C25	0.2358	0.2673	0.0829	H66	-0.0504	0.2577	-0.0592
C26	0.4468	0.3881	0.1058	H67	-0.1794	0.3278	-0.0737
C27	0.3218	0.3305	0.1117	H68	-0.3053	0.2578	-0.0581
C28	0.1344	0.5769	0.0455	H69	-0.1526	0.3966	-0.0528
C29	-0.2730	0.1906	-0.0263	H70	-0.2410	0.0701	-0.0746
F30	0.0717	0.2300	0.1235	H71	-0.1946	0.0132	-0.0562
C31	0.2191	0.1567	0.0180	H72	-0.3347	0.0316	-0.0554
C32	0.6135	0.4326	0.0655	H73	-0.1530	0.1183	-0.0305
F33	0.0240	0.0760	0.1070	H74	0.0220	0.3750	0.0260

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C34	0.0782	0.2012	0.1072	H75	0.1982	0.2109	0.0512
C35	-0.2346	0.0735	-0.0609	H76	0.2980	0.8016	0.0030
C36	-0.1999	0.3066	-0.0603	H77	0.4177	0.8365	-0.0131
CL37	0.0168	0.2311	0.0469	H78	-0.2680	0.2326	0.0385
O38	-0.1364	0.0296	0.0183	H79	-0.2444	0.1328	0.0235
O39	0.3598	0.8724	-0.0063	H80	-0.2485	0.2185	0.0683
O40	-0.2980	0.1857	0.0261	H81	-0.1126	0.2683	0.0544
O41	-0.1879	0.2915	0.0585	H82	-0.0947	0.0714	0.0059
				H83	-0.0825	0.1005	0.0284

表10

关于实施例2a、b、d、e、f、g和h的特性粉末x-射线衍射吸收峰位置(度 $2\theta \pm 0.1$)@RT, 以高质量图为基础, 以衍射仪(Cu $K\alpha$)收集, 使用旋转毛细管, 其中 2θ 以NIST其它适当标准作校准。

实施例 2a	实施例 2b	实施例 2d	实施例 2e	实施例 2f	实施例 2g	实施例 2h
8.1	10.0	5.5	10.1	7.2	6.3	6.9
11.7	11.4	9.6	11.3	8.7	9.0	8.7
13.0	11.9	11.4	11.9	9.7	11.7	9.8
13.9	14.3	14.5	13.3	12.5	15.0	10.3
16.6	15.6	15.8	14.2	12.8	17.6	11.8
17.0	16.5	16.6	15.6	13.3	18.6	13.5
17.6	19.1	18.4	16.8	16.0	19.7	15.0
21.1	19.4	19.2	19.0	16.6	20.7	18.8
23.2	20.2	20.0	19.5	18.2	21.4	21.4
23.9	21.2	23.6	20.4	18.8	23.8	22.9

比较药理学特性

将实施例1与WO2005021500 (相当于美国专利号7,163,937, 授予本案申请人)中所发现化合物的药理学特性作比较的检测和数据提供于下文。

人类末梢血液单核细胞结合("CCR2结合")

还参阅: Yoshimura, et al., *J. Immunol.* 1990, 145, 292。人类CCR2结合检测是以人类末梢血液单核细胞(hPBMC), 使用 125 I-人类MCP-1作为示踪剂配位体而建立的。hPBMC使用具有Ficoll-Hypaque (Mediatech

Cellgro)的标准方案从人类leukopak (Biological Specialty公司)中分离的。将分离的hPBMC洗涤,并在结合缓冲剂(RPMI-1640, 0.1% BSA, 20 mM HEPES, pH 7.4)中稀释至 1×10^7 /毫升。将 ^{125}I -MCP-1 (NEN/Perk Elmer)在结合缓冲剂中稀释至0.45 nM。在结合缓冲剂中,将化合物在结合检测中所用最终浓度的3-倍下稀释。结合检测使用96-孔滤板(Millipore)进行。总 ^{125}I -MCP-1结合按下述评估:在总体积为150微升的各反应物中,添加 5×10^5 个细胞、0.15 nM ^{125}I -MCP-1和使最终浓度范围为0至100 nM的化合物。使板在室温下培养30分钟,接着使用真空歧管过滤(Millipore),以RPMI-1640, 0.1% BSA, 0.4M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4三次洗涤。洗涤后,使板在室温下风干60分钟。接着添加25微升Microscint 20至各孔中。将板密封,并在Trilux上计数1分钟。非特异性结合是在300 nM冷MCP-1 (PeproTech公司)存在下测定的。特异性 ^{125}I -MCP-1以全部和非特异性结合间的差异计算。所有条件均重复测试。IC50定义为降低特异性结合达50%所需竞争化合物的浓度。

hERG通量

使稳定地表达hERG通道的HEK293细胞在培养器上,在经补充10% Sigma牛胎儿血清、非必须氨基酸、2 mM L-谷氨酰胺和500微克/毫升G418的Dulbecco氏改良Eagle氏培养基中生长(37°C, 5% CO₂)。使用细胞分解缓冲剂从烧瓶中萃取细胞,然后将其以每孔(20微升) 2×10^4 个细胞的密度,在10%血清培养基中,覆盖至384-孔Corning聚-D-离胺酸涂覆的黑色/透明板中,并在37°C下,在5% CO₂培养器中培养15-24小时,直到获得细胞的融合单层为止。

BTC-AM染料(Molecular Probes, Eugene, OR)的2 mM储备液是在100% DMSO中制成的,然后在检测当天,以1:1添加至DMSO中的10% (w/v)普朗尼克(pluronic)酸内。然后,将染料在hERG外部EP缓冲剂(140 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.3和10 mM葡萄糖;所有缓冲剂成份均得自Sigma化学公司)中稀释。将此BTC染料混合物(30微升)添加至细胞中,并产生2.5 μM 的最终装填浓度。使细胞在21°C下培养45分钟。

将待测化合物以60微升稀释至10mM DMSO。然后在1:2比例下,在DMSO中,在384-孔板的行1-10和11-20内,连续地稀释这些化合物。

预备检测板是通过从DMSO连续地经稀释板点取2.5微升而产生的，其是在Velocity 11 BioCel上制成的。含水板是通过添加48微升EP缓冲剂而产生的，然后稀释30-45分钟，接着在FLIPR上读取检测。在染料装填后，将稀化合物水溶液添加至三个重复板(10微升)的细胞中，产生80 μ M至0.156 nM的十点浓度范围。检测中的最后DMSO浓度为1%。制备预备检测含水板，并在Cybio液体处理器上稀释。

装填染料的细胞是在FLIPR384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)上读取，其使用氩激光的488nm线激发染料。发射光使用540 \pm 30nm带通道滤波器过滤。hERG通道是通过添加含有66 mM K₂SO₄和1.3 mM Tl₂SO₄(Sigma/Aldrich)的20微升/孔EP缓冲剂刺激而开启的。对于各板，每秒收集数据，历经12秒期间，此时添加含TI⁺的刺激缓冲剂。每秒进行数据收集，历经48秒，然后每三秒持续进行另外的2分钟。

检测的动态范围是从空白试验与总体试验孔测定的。总体试验孔(行21和22)确定板(还存在待测化合物)的最大hERG活化作用，而空白试验孔(行23和24)确定100% hERG抑制。空白试验孔含有400 nM的标准hERG抑制剂多非利特(dofetilide) (Ficker, et al., 1998)或E-4031的任一种。首先将各样品孔中的原始数据点校正细胞/信号偏差、阴性对照组(空白试验)背景，并使用在线FLIPR软件对阳性对照组(总体试验)作标准化。然后，使用Excel Fit (ID Business Solutions有限公司, Surrey, UK)，以单侧逻辑方程式($Y = A + ((B-A)/(1 + ((C/X)^D))$)，其中A=最大抑制)对hERG TI⁺通量数据的待测化合物浓度应答曲线进行拟合。通过将待测化合物在给定条件下对TI⁺通量的荧光最高变化幅度进行拟合来分析数据。化合物的效能(IC₅₀值)是由自三份重复孔的平均值计算的。

钠通道，位置2结合检测

还参阅：W. A. Catterall, et al., *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 8922。标准结合缓冲剂含有50 mM HEPES、50 mM Tris-HCl, pH 7.4、130 mM 氯化胆碱、5.4 mM KCl、0.8 mM MgCl₂、5.5 mM葡萄糖、40微克/毫升LqT。通过将突触体(由Wistar大鼠脑部制得)添加至反应混合物中而启动结合反应，该反应混合物中含有在标准结合缓冲剂中的5 nM [³H]-虾膜毒素以及所需浓度的待测化合物。然后将样品混合，并在37 $^{\circ}$ C下培养60分钟。通过添加含有50 mM HEPES、50 mM Tris-HCl, pH 7.4、1.8

mM CaCl₂、0.8 mM MgCl₂和1毫克/毫升牛血清白蛋白的冰冷洗涤缓冲剂而使反应停止。立即将突触体收集至玻璃纤维过滤器上，并用洗涤缓冲剂洗涤3次。残留在过滤器上的[³H]-虾膜毒素的放射活性是使用液体闪烁分光计计数的。

平行人工膜渗透性检测(PAMPA)

平行人工膜渗透性检测(PAMPA)包括称为胃肠道(GIT)脂质的特殊调配的卵磷脂为基料的脂质组合。使用该GIT脂质，以便在类似于Caco-2检测中所使用的夹层板组装中形成膜。当通过已知会被动地吸收到人中的标准化合物测量时，GIT脂质非常类似于体内的膜组合物和性能。PAMPA被广泛地用作发现化合物渗透性筛选的体外模型。将化合物经过PAMPA膜的通过的速率用于测定渗透系数(P_c),其可能与化合物的体内被动渗透性有关。

特定化合物的渗透系数(P_c)是在具有顶端以及底外侧pH为7.4的pH依赖性环境中检验的。所有实验均是在三份重复测定中进行的。

将化合物(在100% DMSO中的10 mM储备液)在pH 7.4供体孔缓冲剂(pION目录#110151)中以1: 100稀释，得到在1% DMSO中的100μM检测溶液。将在供体孔缓冲剂中稀释的化合物转移至Whatman单过滤器板中，并在将200微升分配到检测板(pION目录#110163)的供体孔中之前过滤。通过将4微升脂质溶液(pION目录#110169)吸取到滤板(VWR目录#13503)上而形成PAMPA膜。然后，将该膜用pH 7.4的200微升受体孔缓冲剂(pION目录#110139)覆盖。合并PAMPA检测板(供体侧和受体侧)，并使其在室温下培养4小时。接着将板拆开，并将分光光度计板(VWR目录#655801)填充(150微升/孔)。供体、受体、参比和空白试验板是在SpectraMax UV板读取器中读取的。通过pION软件捕获数据，该软件分析光谱并产生P_c值。

CCR2趋化性

人类CCR2趋化性检测是使用人类单核血球细胞系THP-1进行的。在37°C下，在不含酚红、不含BSA的RPMI-1640 (pH 7.4)中，首先将THP-1细胞用荧光染料钙黄绿素-AM标记30分钟，同时每15分钟轻轻混合。然后洗涤标识的细胞，并以1x10⁵/毫升再悬浮于趋化性缓冲剂(不

含酚红的RPMI-1640, 0.1% BSA, pH 7.4)中。将待测化合物在趋化性缓冲剂中稀释, 以致使最终检测浓度范围为0.01 nM至1 μ M。将配位体MCP-1 (PeproTech公司)在趋化性缓冲剂中稀释至20 nM。为进行此检测, 将等体积的待测化合物稀释液与等体积的标识的THP-1细胞混合(混合物1), 并将等体积的待测化合物稀释液与等体积的稀MCP-1配位体混合(混合物2)。使两种混合物独立地在37 $^{\circ}$ C下培养10分钟, 接着轻轻混合。然后在趋化性板(Becton Dickinson)中, 通过将50微升混合物1置于顶部室中并将225微升混合物2置于底部室中来测定MCP-1-诱导的趋化性。将板用盖子覆盖, 并在37 $^{\circ}$ C下培养30分钟。30分钟后, 在Cytofluor上读板。所有条件均重复测试。对于信号对噪声的测定, 将单独50微升标识的THP-1细胞(5×10^4 /孔)置于顶部室中, 并将单独225微升配位体MCP-1置于底部室中(最终浓度为10 nM)。通过待测化合物的分级浓度所达到的抑制作用是以不含化合物的MCP-1对照组的百分比计算的。IC₅₀被定义为达到细胞趋化性的50%抑制作用所需要待测化合物的浓度。

hERG贴片夹持

将全细胞贴片夹持用于直接测量在稳定地表达克隆的hERG钾通道 α 亚单位的HEK-293细胞中的hERG电流。在室温下、在pH 7.4的缓冲水溶液中测试化合物。从-80 mV至+20 mV的保持电位施加重复性试验脉冲(0.05 Hz)达2秒, 再在试验脉冲之后通过使电压步至-65 mV而引出尾电流。通过测量尖峰尾电流的抑制来计算化合物的作用。

钠通道贴片夹持

将全细胞贴片夹持用于直接测量在表达人类心脏钠通道SCN5A的HEK-293细胞中向内钠电流。在不含蛋白质的缓冲水溶液中测试化合物。为了测定稳定状态的抑制作用, 使用下述电压方案每5秒引出钠电流: 将细胞保持在-90 mV的电位下, 并经历60毫秒步至-20 mV。在试验脉冲至-20 mV期间, 通过测量峰电流的抑制来计算其作用。通过在1 Hz和4 Hz频率下的刺激来评估抑制的速率依赖性。

大鼠的单一剂量药物动力学

将雄性Sprague-Dawley大鼠(250-300克)用于药物动力学研究。在经口服药之前使大鼠禁食过夜，并在服药后4小时喂食。从颈静脉收集血液样品(~0.3毫升)至含K₂EDTA的管中，然后在4℃下离心(1500-2000 x g)，以获得血浆。在口服生物利用率研究中，使2组动物(每组N=2-3)接受待测化合物，无论是通过颈静脉以静脉内(IV)灌注(历经10分钟)或者通过口腔灌食法。在服药后0.17 (仅针对IV)、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8和24小时获得序列血液样品。将通过在4℃下离心(1500-2000 x g)获得的血浆样品在-20℃下储存，直到通过LC/MS/MS分析。

猴的单一剂量药物动力学

在雄性猕猴属猴中以交叉设计评估各种待测化合物的药物动力学。在经口服药之前使猴子禁食过夜，并在服药后4小时喂食。使一组1-3只动物(3至5公斤)通过股静脉经IV灌注(历经10分钟)以及通过口腔灌食法接受化合物，各治疗之间清洗1周。在服药后0.17 (仅IV)、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8和24小时，从股动脉收集序列血液样品(~0.3毫升)，并在4℃下离心(1500-2000 x g)，以获得血浆。将样品在-20℃下储存，直到通过LC/MS/MS分析。

药物动力学检测的数据分析

药物动力学参数是通过血浆浓度对时间数据的非隔室分析法(KINETICATM软件，4.2版，InnaPhase公司，Philadelphia, PA)获得的。峰浓度(C_{max})与C_{max}的时间是直接由实验观察记录的。从零时间至最后取样时间的曲线下面积(AUC(0-T))是使用线性和对数梯形总和的组合计算得到的。总血浆清除率(CLT_p)、分布的稳态体积(V_{ss})、表观清除半生期(T_{1/2})和平均滞留时间(MRT)是在静脉内施用后估计的。T_{1/2}的估计是使用具有可计量浓度的3个时间点的最小值施行的。绝对口服生物利用率(F)是以口服和IV剂量后的剂量标准化AUC值的比例估计的。

当在上述检测中测量时，发现下文各化合物的数据。

表11. 比较体外数据

化合物	CCR2结合 IC ₅₀ (nM)	hERG通量 IC ₅₀ (nM)	Na ⁺ 通道 结合 (%抑制)	PAMPA 渗透性 (nm/秒)
实施例12as, WO2005021500	0.27 (1)	2,800	不可得	不可得
实施例12aj WO2005021500	0.43 ± 0.06 (2)	770	不可得	不可得
实施例2k WO2005021500	0.88 ± 0.60 (23)	51,000	97%, 10,000 nM	529 ± 157 (9)
实施例12bd WO2005021500	1.15 ± 0.07 (2)	>80,000	54%, 10,000 nM	392
实施例8a WO2005021500	1.83 ± 0.80 (12)	>80,000	3%, 10,000 nM 33%, 30,000 nM	94 ± 58 (10)
实施例8e, WO2005021500	2.20 ± 0.03 (2)	>80,000	6%, 10,000 nM	2 ± 2 (2)
实施例9c, WO2005021500	0.96 ± 0.26 (19)	>80,000	48%, 10,000 nM 75%, 30,000 nM	145 ± 71 (8)
实施例1 本发明	1.14 ± 0.69 (18)	>80,000	0%, 10,000 nM; 21%, 30,000 nM	443 ± 114 (8)

表12a. 其它比较体外数据

化合物	CCR2趋化性 IC ₅₀ (nM)	hERG贴片夹持 (%抑制)	Na ⁺ 通道贴片夹持 (%抑制)
实施例2k 美国专利7,163,937	0.24 ± 0.16 (12)	83%, 10,000 nM	52%, 10,000 nM 90%, 30,000 nM
实施例8a WO2005021500	2.63 ± 1.24 (4)	4%, 10,000 nM	22%, 10,000 nM 49%, 30,000 nM
实施例9c, WO2005021500	0.21	4%, 10,000 nM	19%, 10,000 nM 39%, 30,000 nM
实施例1, 本发明	0.67 ± 0.42 (22)	33%, 10,000 nM 61%, 30,000 nM	17%, 10,000 nM 19%, 30,000 nM

表12b. 在大鼠中的比较体内药物动力学数据

化合物	剂量IV/PO (mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	F%	口服AUC (nM*h)
实施例2k WO2005021500	2.5 / 25	40	68	9294
实施例8a WO2005021500	6 / 72	42	1.4	690
实施例9c, WO2005021500	4 / 43	54	14	1855
实施例1, 本发明	2 / 10	43	51	3794

表12c. 在猴中的比较体内药物动力学数据

化合物	剂量IV/PO (mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	F%	口服AUC (nM*h)
实施例2k WO2005021500	1 / 1.4	25	46	862
实施例8a WO2005021500	1 / 11	14	9.4	1896
实施例9c, WO2005021500	1 / 10	12	26	6763
实施例1, 本发明	1 / 1.3	23	47	836

实用性

使用本领域技术人员已知的检测，证实实施例的代表性化合物为趋化因子受体活性的调节剂。在本部分中，我们描述了这些检测法并且给予其文献参考资料。更多的检测被描述于本文前述标题为"比较药理学特性"的部分中。由于在这些MCP-1拮抗作用的检测中显现活性，因此预期实施例的化合物可用于治疗与趋化因子及其同源受体有关的人类疾病。当在特定检测中测量时，在这些检测中活性的定义为在浓度上证实IC₅₀为30μM或较低的化合物。

MCP-1结合至人类PBMC的拮抗作用

(Yoshimura, et al., *J. Immunol.* 1990, 145, 292)

在此处描述的MCP-1结合至人类PBMC (人类末梢血液单核细胞)的拮抗作用中，实施例中描述的至少一种化合物具有活性。

将微孔滤器板(#MABVN1250)用100微升结合缓冲剂(0.5%牛血清

白蛋白；20 mM HEPES缓冲剂和5 mM氯化镁在RPMI 1640培养基中），在室温下处理三十分钟。为了测量结合作用，将50微升结合缓冲剂（使用或未使用已知浓度的化合物）与50微升的¹²⁵-I标识的人类MCP-1（以获得最终浓度为150 pM放射配位体）以及含有 5×10^5 个细胞的50微升结合缓冲剂合并。用于此结合检测的细胞可包括通过Ficoll-Hypaque梯度离心所分离的人类末梢血液单核细胞、人类单细胞(Weiner, et al., *J. Immunol. Methods*. 1980, 36, 89)或者表达内源受体的THP-1细胞系。将化合物、细胞和放射配位体的混合物在室温下培养三十分钟。将板置于真空歧管上，施加真空，再将板用含有0.5 M NaCl的结合缓冲剂洗涤三次。将塑料边缘从板上移除，使板风干，将孔穿孔，计数。结合的百分抑制是使用不存在任何竞争化合物获得的总计数以及通过添加100 nM MCP-1替代待测化合物所测得的背景结合而计算得到的。

MCP-1-诱导的钙流入量的拮抗作用

(Sullivan, et al., *Methods Mot. Biol.*, 114,125-133 (1999))

在此处描述的MCP-1-诱导的钙流入量检测的拮抗作用中，实施例中描述的至少一种化合物具有活性。

钙移动系使用荧光Ca²⁺指示剂染料Fluo-3测量的。在37°C下使细胞以 8×10^5 个细胞/毫升在磷酸盐缓冲盐水中培养60分钟，该磷酸盐缓冲盐水含有0.1%牛血清白蛋白、20 mM HEPES缓冲剂、5 mM葡萄糖、1%牛胎儿血清、4μM Fluo-3 AM和2.5 mM羧苯磺胺。用于此种钙检测的细胞可包括如由Weiner, et al., *J. Immunol. Methods*, 36, 89-97 (1980)所述分离的人类单细胞或者表达内源CCR2受体例如THP-1与MonoMac-6的细胞系。然后，将细胞在含有0.1%牛血清白蛋白、20 mM HEPES、5 mM葡萄糖和2.5 mM羧苯磺胺的磷酸盐缓冲盐水中洗涤三次。以最终浓度 $2-4 \times 10^6$ 个细胞/毫升使细胞再悬浮于含有0.5%牛血清白蛋白、20 mM HEPES和2.5 mM羧苯磺胺的磷酸盐缓冲盐水中。将细胞覆盖于96-孔黑色壁微板(100微升/孔)中，并使板在200 x g下离心5分钟。将不同浓度的化合物添加至孔(50微升/孔)中，再在5分钟后添加50微升/孔的MCP-1，得到10 nM的最终浓度。利用荧光成像板读取器检测钙移动。以氩激光(488 nM)使细胞单层激发，并测量细胞结合的荧光达3分钟(对前90秒为每秒钟，而对后90秒为每10秒钟)。数据系以任意荧

光单位产生，而对各孔的荧光改变是以最高-最低差别测得的。化合物依赖性的抑制是相对于单独MCP-1的应答计算得到的。

MCP-1-诱导的人类PBMC趋化性的拮抗作用

(Bacon, et al., *Brit. J. Pharmacol.* 1988, 95, 966)

在此处描述的MCP-1-诱导的人类PBMC趋化性检测的拮抗作用中，实施例描述的至少一种化合物具有活性。

将Neuroprobe MBA96-96-孔趋化室、Polyfiltronics MPC 96孔板和Neuroprobe不含聚乙烯基吡咯烷酮的聚碳酸酯PFD5 8-微米过滤器在37°C培养器中温热。使刚通过标准聚蔗糖密度分离方法分离的人类末梢血液单核细胞(PBMC) (Boyum, et al., *Scand. J. Clin. Lab Invest. Suppl.* 1968, 97, 31)以 1×10^7 c/毫升悬浮于DMEM中，并在37°C下温热。还将人类MCP-1的60 nM溶液在37°C下温热。待测化合物的稀释液是在DMEM中以所需浓度的2x制成的。将PBMC悬浮液与60 nm MCP-1溶液以1: 1混合在具有预先温热的DMEM的聚丙烯管中，使用或未使用待测化合物的稀释液。使这些混合物在37°C管温热器中温热。为了开始检测，将MCP-1/化合物混合物添加至Polyfiltronics MPC 96孔板的孔中，该板已被置于Neuroprobe趋化室的底部中。各孔的大约体积为400微升，并且在分配后应为正弯月面。将8微米过滤器轻轻地置于96孔板的顶部，使橡胶垫片连接至上方室的底部，并将该室组装在一起。将200微升体积的细胞悬浮液/化合物混合物添加至上方室的适当孔中。将上方室以板封闭器覆盖，并将组装好的单元置于37°C培养器中45分钟。培养后，移除板封闭器，并吸出所有残留细胞悬浮液。将此室拆开，并轻轻地移除过滤器。在将过滤器保持为90度角时，使用磷酸盐缓冲盐水的温和液流，洗离未迁移的细胞，并将过滤器顶部用橡胶刮板的尖端擦拭。再重复此洗涤两次。使过滤器风干，然后完全浸没在Wright Geimsa着色料中45秒。通过浸泡在蒸馏水中7分钟，洗涤过滤器，然后在刚蒸馏的水中再洗涤15秒。使过滤器再一次风干。通过目视显微镜法对过滤器上的迁移的细胞定量。

哺乳动物趋化因子受体提供用于干扰或促进哺乳动物(例如人类)中免疫细胞功能的靶标。抑制或促进趋化因子受体功能的化合物特别可用于为提供治疗目的而调节免疫细胞功能。因此，本发明涉及可用

于预防和/或治疗极多种炎性、传染性和免疫调节病症和疾病的化合物，该病症和疾病包括哮喘和过敏性疾病，被致病微生物(其通过定义系包括病毒)感染，以及自身免疫病理学疾病，例如风湿性关节炎和动脉粥样硬化。

例如，可施用抑制哺乳动物趋化因子受体(例如人类趋化因子受体)的一种或多种功能的本发明化合物，以抑制(意即降低或防止)发炎或传染病。结果，一种或多种炎性过程，例如白血球迁移、粘附、趋化性、胞裂外排(例如酶、组胺的胞裂外排)或炎性介质释放，均被抑制。

同样地，施用促进哺乳动物趋化因子受体(例如人类趋化因子)的一种或多种功能的本发明化合物，以刺激(诱发或增强)免疫或炎性应答，例如白血球游出、粘附、趋化性、胞裂外排(例如酶、组胺的胞裂外排)或炎性介质释放，导致炎性过程的有利刺激。例如，可添补嗜酸性细胞以对抗寄生虫感染。此外，如果人们意欲递送足量化合物以通过诱导趋化因子受体内部化作用而造成细胞中受体表达的损失，或者以造成细胞迁移的方向错误的方式递送化合物，则前述炎性、过敏性和自身免疫疾病的治疗也可考虑在本发明的化合物中，其会促进哺乳动物趋化因子受体的一种或多种功能。

除了灵长类动物例如人类之外，多种其它哺乳动物也可根据本发明的方法进行治疗。例如，可以治疗哺乳动物，包括但不限于乳牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、天竺鼠、大鼠，或其它牛、羊、马、犬、猫科动物、啮齿动物或小鼠物种。但是，此方法还可实施在其它物种上，例如鸟类物种。在上述方法中治疗的受试者是想要在其中调节趋化因子受体活性的雄性或雌性哺乳动物。本文中使用的"调节"意欲涵盖拮抗作用、激动作用、部分拮抗作用和/或部分激动作用。

CCR5结合与功能性检测

细胞衍生与细胞培养物：稳定地表达内源CC趋化因子受体5 (CCR5)的HT1080细胞库是使用由Harrington、Sherf和Rundlett所概述的方法发育的(参阅美国专利US 6,361,972和US 6,410,266)。最高表达的克隆是使用重复性流动细胞计数法分离的，接着亚克隆。然后，将这些细胞以 3×10^5 个细胞/孔在6-孔培养皿中培养，并以含有嵌合HA-标记的G蛋白质Gqi5的DNA载体转染(分子装置；得自酶的15微升Ex-Gen中的5

微克线性化载体DNA被用于该转染)。转染后两天,将孔合并,并覆盖至P100板中。覆盖后七天,选取菌落,展开,并通过蛋白质印迹法(Western blot)分析Gqi5含量。选择具有Gqi5(得自转染)和CCR5(内源)的高度表达的克隆(称为3559.1.6),并使用于下文所述的实验。在37°C和5% CO₂下、在增湿气氛中,用经补充10%渗析的牛胎儿血清、2%青霉素/链霉素/谷氨酰胺和500微克/毫升潮霉素B(最终浓度)的 α -MEM培养HT1080细胞(克隆3559.1.6)。

膜制剂:使含有 1×10^8 个HT1080细胞(克隆3559.1.6)的细胞丸粒再悬浮于5毫升冰冷膜制备缓冲剂(50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂)中,再在冰中、在Polytron均化器上高速均化20秒。将匀浆物用另外25毫升膜制备缓冲剂稀释,再离心12分钟(48,000 x g, 在4°C下)。在如前述再均化之前,使细胞丸粒再悬浮于5毫升膜制备缓冲剂中。将匀浆以5毫升细胞膜制备缓冲剂稀释,并检测CCR5蛋白质浓度。

结合检测:将得自上述膜制剂的刚制成的匀浆物在结合缓冲剂(50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA; 检测前添加一份完全蛋白酶抑制剂片剂)中稀释,以达到10微克/孔的最后蛋白质浓度(得自Corning公司的固体白色96-孔板)。将此膜制剂与WGA-SPA珠粒(Amerhsam; 预先浸泡于结合缓冲剂中)混合,以获得200微克/孔的浓度。然后,将膜/SPA珠粒混合物(100微升/孔)添加至板中,该板已用2微升含有不同浓度待测物的DMSO预加斑点(对于阴性对照组为纯DMSO; 对于待测对象为不同浓度的本发明实施例; 500 nM MIP-1 β 作为阳性对照组)。结合检测是通过添加50微升 [¹²⁵I]-MIP-1 β (PerkinElmer; 将物质在结合缓冲剂中稀释,以致添加50微升/孔获得0.1 nM [¹²⁵I]-MIP-1 β 的最终浓度)诱发。将板密封,使其在室温下静置4-6小时,然后在Packard TopCount上计数。计算待测对象的百分结合,使用阴性和阳性对照组以确定各实验的窗口。

荧光计成像板读取器(FLIPR)-为基础的功能性检测:将HT1080细胞(克隆3559.1.6)以10,000个细胞/孔(30微升)覆盖于384-孔板(黑色/透明底部Biocoat PDL, Beckton Dickinson)中,并装填30微升/孔的Fluro-4 AM荧光染料(通过将1毫克Fluro-4 AM溶解于440微升DMSO中,并在用10毫升Hanks缓冲剂进一步稀释之前,用100微升普朗尼克(pluronic)溶液稀释而制成)。将细胞在洗涤三次之前,在37°C和5% CO₂下培养30分

钟,并悬浮于检测缓冲液(20 mM HEPES, 1.2 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 2.5毫米羧苄磺胺(probenecid), 0.5% BSA, 1x Hanks)中。将待测对象在DMSO中连续稀释,然后在添加至细胞(10微升/孔)中之前,用检测缓冲液1:10稀释。使用FLIPR,读取板的通量诱发(意即激动剂活性)(10-70秒)。接着将细胞用激动剂溶液(30微升/孔;通过将30微升的100微摩尔浓度MIP-1 β 稀释在100毫升检测缓冲液中而制成;此方案在此检测中给予5 nM MIP-1 β 的最终浓度)进一步装填,再使用FLIPR读取板达一分钟。相对于0.4% DMSO/缓冲剂阴性对照组测定待测对象的拮抗剂活性。

可以用趋化因子受体功能抑制剂治疗的人类或其它物种的疾病或症状,包括但不限于:炎性或过敏性疾病和症状,包括呼吸过敏性疾病,例如哮喘、过敏性鼻炎、过敏性肺病、过敏性肺炎、嗜酸性蜂窝组织炎(例如Well氏综合征)、嗜酸细胞性肺炎(例如Loeffler氏综合征、慢性嗜酸细胞性肺炎)、嗜酸细胞性筋膜炎(例如Shulman氏综合征)、延迟型过敏、组织间隙肺脏疾病(ILD)(例如特发性肺纤维变性或与ILD有关的风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、关节粘附脊椎炎、系统性硬化、Sjogren氏综合征、多肌炎或皮炎);全身过敏或过敏性应答、药物过敏反应(例如对青霉素、头孢菌素类)、由于摄食受污染色氨酸所引发的嗜酸细胞增多性肌痛综合征、昆虫螫伤过敏反应;自身免疫疾病,例如风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、多发性硬化、全身性红斑狼疮、重症肌无力、青少年型糖尿病;肾小球性肾炎、自身免疫性甲状腺炎、Behcet氏疾病;移植排斥(例如在移植时),包括同种异体移植排斥或移植物-对-宿主疾病;炎性肠疾病,例如克罗恩氏病与溃疡性结肠炎;脊椎关节病;硬皮病;牛皮癣(包括T-细胞介导的牛皮癣),以及炎性皮肤病,例如皮炎、湿疹、异位性皮炎、过敏性接触性皮炎、荨麻疹;血管炎(例如坏死性、皮肤和过敏性血管炎);嗜酸细胞性肌炎、嗜酸细胞性筋膜炎;伴有皮肤或器官的白血球浸入的癌症。可以治疗其中不想要的炎性应答期望被抑制的其它疾病或症状,其包括但不限于血管炎、易受伤害性斑块、静脉新血管内膜增生再灌注损伤、渗析-移植物新血管内膜增生、动脉-静脉旁路血管内膜增生、动脉粥样硬化、某些血液学恶性病症、细胞因子诱导的毒性(例如败血性休克、内毒素休克)、多肌炎、皮炎。人类或其它物种中可以用趋化因子受体功能抑制剂

治疗的传染性疾病或症状包括但不限于HIV。

可以用趋化因子受体功能的抑制剂治疗的人类或其它物种的疾病或症状，包括但不限于：免疫抑制，例如在具有免疫缺陷综合征的个体中的免疫抑制，例如AIDS或其它病毒感染，进行放射疗法、化学疗法，对于自身免疫疾病的疗法或药物疗法(例如皮质类固醇疗法)的个体，以上疗法会造成免疫抑制；由于先天性缺乏受体功能或其它原因所致的免疫抑制；以及感染疾病，例如寄生虫疾病，包括但不限于蠕虫感染，例如线虫(圆形虫)；(鞭虫病、蛲虫病、蛔虫病、钩虫病、类圆线虫病、旋毛虫病、丝虫病)；吸虫(血吸虫)(血吸虫病、支睾吸虫病)、绦虫(带虫)(包虫病、肥胖绦虫病(*Taeniasis saginata*)、囊虫病)；内脏蠕虫、内脏游走性幼虫(例如弓蛔虫属)、嗜酸细胞性胃肠炎(例如异尖属、鼠海豚线虫属)、皮肤游走性幼虫(巴西钩虫、犬钩虫)。因此，本发明化合物可用于预防和治理极多种炎性、感染性和免疫调节性病征和疾病。

此外，如果人们意欲递送足量化合物以通过诱导趋化因子受体内部化作用而造成细胞中受体表达的损失，或者以造成细胞迁移的方向错误的方式递送化合物，则前述炎性、过敏性和自身免疫疾病的治疗也可考虑用于促进趋化因子受体的功能。

另一方面，本发明可用以评估G蛋白质偶合受体的推断特异性激动剂或拮抗剂。本发明涉及利用这些化合物在调节趋化因子受体活性的化合物的筛选检测的制备和实施中的用途。再者，本发明化合物可用于确立或测定其它化合物对趋化因子受体的结合位置，例如在一检测中通过竞争性抑制或作为参比，以将其已知活性与具有未知活性的化合物作比较。当开发出新检测或方案时，根据本发明的化合物可用以测试其有效性。具体地说，这些化合物可以提供于市售药盒中，例如供使用于涉及前述疾病的医药研究上。本发明化合物还可用于评估趋化因子受体的推断特异性调节剂。此外，通过作为不会结合化合物的实例，或者作为在可帮助确定相互作用特定位置的受体上具有活性的化合物的结构变型，人们可利用本发明的化合物来检验不被认为是趋化因子受体的G蛋白质偶合受体的特异性。

本文公开的化合物可用于治疗或预防选自以下的病症：风湿性关节炎、骨关节炎、败血性休克、动脉粥样硬化、动脉瘤、发热、心血

管作用、血液流动性休克、败血症综合征、缺血再灌注后的损伤、疟疾、克罗恩氏病、炎性肠疾病、分支杆菌(mycobacterial)感染、脑膜炎、牛皮癣、充血性心力衰竭、纤维变性疾病、恶病质、移植物排斥、自身免疫疾病、皮肤炎性疾病、多发性硬化、辐射损伤、氧过多肺胞伤害、HIV、HIV痴呆症、非胰岛素依赖性糖尿病、哮喘、过敏性鼻炎、异位性皮炎、特发性肺纤维变性、大泡型类天疱疮、蠕虫寄生虫感染、过敏性结肠炎、湿疹、结膜炎、移植、家族性嗜酸细胞增多、嗜酸性蜂窝组织炎、嗜酸细胞性肺炎、嗜酸细胞性筋膜炎、嗜酸细胞性胃肠炎、药物诱导的嗜酸细胞增多、胆囊纤维变性、Churg-Strauss综合征、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、结肠癌、Felty氏综合征、肉状瘤病、葡萄膜炎、阿耳滋海默氏、肾小球性肾炎和系统性红斑狼疮、食管鳞状细胞癌、神经性疼痛和肥胖。

另一方面，该化合物可用以治疗或预防炎症病症，选自风湿性关节炎、骨关节炎、动脉粥样硬化、动脉瘤、发热、心血管作用、克罗恩氏病、炎性肠疾病、牛皮癣、充血性心力衰竭、多发性硬化、自身免疫疾病、皮肤炎性疾病。

另一方面，该化合物用以治疗或预防炎症病症，选自风湿性关节炎、骨关节炎、动脉粥样硬化、克罗恩氏病、炎性肠疾病和多发性硬化。

另一方面，本文公开的实施例可用于治疗多种癌症，包括但不限于下述：

癌瘤，包括以下的癌瘤，膀胱(包括加速与转移性膀胱癌)、乳房、结肠(包括结肠直肠癌)、肾脏、肝脏、肺脏(包括小与非小细胞肺癌以及肺脏腺癌)、卵巢、前列腺、睾丸、尿生殖道、淋巴系统、直肠、喉、胰脏(包括外分泌胰癌)、食道、胃、胆囊、子宫颈、甲状腺和皮肤(包括鳞状细胞癌)；

淋巴样血统的造血肿瘤，包括白血病、急性淋巴球白血病、急性淋巴胚细胞白血病、B-细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、有毛细胞淋巴瘤、组织胞淋巴瘤和Burkett's淋巴瘤；

髓样血统的造血肿瘤，包括急性与慢性骨髓性白血病、脊髓发育不良综合征、髓样白血病以及前骨髓细胞白血病；

中枢与末梢神经系统的肿瘤，包括星细胞瘤、神经胚细胞瘤、神

经胶质瘤和神经鞘瘤；

间叶来源的肿瘤，包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤；以及其它肿瘤，包括黑色素瘤、着色性干皮病(xenoderma pigmentosum)、角质棘皮瘤(keratoactanthoma)、精原细胞瘤、甲状腺滤胞癌和畸胎癌。

在另一项实施方案中，本文公开的是治疗癌症的方法，其中癌症选自乳癌、肝癌、前列腺癌和黑色素瘤。此外，本文公开的化合物可用于治疗卵巢癌和多发性骨髓瘤。

本发明提供了用于治疗多种非癌性增生疾病的方法。

预防和治疗炎性、传染性、免疫调节病症和疾病，包括哮喘和过敏性疾病，以及自身免疫病理学疾病，例如风湿性关节炎和动脉粥样硬化以及上文所指出的病理学疾病的合并治疗法是通过本发明化合物与其它已知用于此用途的化合物的组合进行说明。例如，在发炎的治疗或预防中，本发明化合物可并用消炎或止痛剂，例如阿片制剂激动剂、脂肪氧化酶抑制剂、环氧化酶-2抑制剂、白细胞介素抑制剂(例如白细胞介素-1抑制剂)、肿瘤坏死因子抑制剂、NMDA拮抗剂、氧化氮的抑制剂或氧化氮合成的抑制剂、非甾体抗炎剂、磷酸二酯酶抑制剂或细胞因子抑制用抗炎剂，例如并用以下化合物，例如对乙酰氨基酚、阿司匹林、可待因、芬太尼、布洛芬、吲哚美辛、酮咯酸、吗啡、萘普生、非那西丁、吡罗昔康、甾体止痛剂、舒芬太尼(sufentanyl)、sunlindac、干扰素 α 等。同样地，本发明化合物可伴随以下药物一起施用：疼痛缓解剂；增效剂，例如咖啡因、H₂-拮抗剂、二甲硅油、氢氧化铝或镁；解除充血剂，例如去氧肾上腺素、苯丙醇胺、伪麻黄碱、羟甲唑啉、麻黄碱、萘甲唑啉、赛洛唑啉、丙己君或左旋脱氧-麻黄碱；以及镇咳药，例如可待因、二氢可待因酮、卡拉美芬、咳必清(carbetapentane)或右美沙芬(dexamethorphan)；利尿剂；以及镇静或非镇静抗组胺药。同样地，本文公开的化合物可并用其它药物，此药物用于治疗/预防/抑制或改善本发明化合物对其有用的疾病或症状。这些其它药物可通过其常用途径和量与本发明化合物同时或相继地施用。当化合物与一种或多种其它药物同时使用时，可使用含有除了本发明化合物以外的此种其它药物的医药组合物。因此，该医药组合物包括除了本发明公开内容的化合物以外，还含有一种或多种其它活性成份。

可与本发明化合物并用的其它活性成份的实例，无论是分别或在

相同医药组合物中施用，包括但不限于：(a)整联蛋白(integrin)拮抗剂，例如用于选择蛋白ICAM和VLA-4的那些；(b)类固醇类，例如倍氯米松、甲基氢化泼尼松、倍他米松、泼尼松、地塞米松及氢基可的松；(c)免疫抑制剂，例如环孢素、他克莫司(tacrolimus)、雷帕霉素及其它FK-506型免疫抑制剂；(d)抗组胺类(H1-组胺拮抗剂)，例如溴苯那敏(bromopheniramine)、氯苯那敏(chlorpheniramine)、右氯苯那敏(dexchlorpheniramine)、曲普利啶、氯马斯汀、苯海拉明、二苯拉林、曲吡那敏、羟嗪、甲地嗪、异丙嗪、异丁嗪(trimeprazine)、阿扎他定、赛庚啶、安他唑啉、非尼拉敏新安替根、阿司咪唑、特非那定、氯雷他定(loratadin)、西替利嗪、非索非那定、脱羧基乙氧基氯雷他定等；(e)非甾体抗哮喘剂，例如b2-激动剂(特布他林、间羟异丙肾上腺素(metaproterenol)、非诺特罗、新异丙肾上腺素、沙丁胺醇(albuteral)、比托特罗和吡布特罗)、茶碱、色甘酸钠、阿托品、异丙托溴铵、白三烯素拮抗剂(扎鲁司特、孟鲁司特、普仑司特、伊拉司特、泊比司特、SKB-102,203)、白三烯素生物合成抑制剂(齐留通、BAY-1005)；(f)非甾体抗炎药(NSAID)，例如丙酸衍生物(阿明洛芬、苯萨丙吩(benxaprofen)、布氯酸、卡洛芬、芬布芬、非诺洛芬、氟洛芬、氟比洛芬、布洛芬、吲哚洛芬(indoprofen)、酮洛芬、咪洛芬、萘普生(naproxen)、奥沙普秦、吡洛芬、普拉洛芬、舒洛芬、噻洛芬酸和硫噁洛芬)，乙酸衍生物(吲哚美辛、阿西美辛、阿氯芬酸、环氯萸酸、双氯芬酸、芬氯酸、芬克洛酸、芬替酸、吠罗芬酸、异丁芬酸、伊索克酸、oxpinac、舒林酸、硫平酸、托美丁、齐多美辛和佐美酸)，灭酸衍生物(氟芬那酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、尼氟酸和托芬那酸)，联苯基羧酸衍生物(二氟尼柳和氟苯柳)，昔康类(伊索昔康、吡罗昔康、舒多昔康和替诺昔康)，水杨酸酯类(乙酰水杨酸、柳氮磺吡啶)，以及吡唑酮类(阿扎丙宗、bezpiperylon、非普拉宗、莫非布宗、羟布宗、保泰松)；(g)环氧化酶-2 (COX-2)抑制剂；(h)磷酸二酯酶IV型(PDE-IV)抑制剂；(i)趋化因子受体的其它拮抗剂；(j)胆固醇降低剂，例如HMG-COA还原酶抑制剂(洛伐他汀、辛伐他汀和普伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀及其它他汀类)，多价螯合剂(考来烯胺和考来替泊)，烟酸(nicotonic acid)，非诺贝酸衍生物(吉非贝齐、氯贝丁酯(clofibrat)、非诺贝特和苯扎贝特)，以及普罗布考；(k)抗糖尿病剂，例如胰岛素、磺酰脲类、双胍类(二甲双胍)、 α -葡萄糖苷酶抑制

剂(阿卡波糖)和格列酮类(曲格列酮和吡格列酮); (l)干扰素制剂(干扰素 α -2a、干扰素-2B、干扰素 α -N3、干扰素 β -1a、干扰素 β -1b、干扰素 γ -1b); (m)抗病毒化合物, 例如依法韦仑(efavirenz)、奈韦拉平、茚地那韦、更昔洛韦、拉米夫定、泛昔洛韦和扎西他滨; (o)其它化合物, 例如5-氨基水杨酸及其前体药物, 抗代谢物例如硫唑嘌呤和6-巯基嘌呤, 以及细胞毒性癌症化学治疗剂。本发明化合物比第二种活性成份的重量比可以改变, 并且将根据各成份的有效剂量而定。

通常, 将使用每一种的有效剂量。因此, 例如, 化合物与NSAID并用时, 本发明化合物比NSAID的重量比的一般范围为约1000: 1至约1: 1000, 或者, 从约200: 1至约1: 200。本发明化合物与其它活性成份的组合通常也在前述范围内, 但在各情况中, 应使用各活性成份的有效剂量。

在治疗癌症中, 化学治疗剂和/或其它治疗法(例如放射疗法)的组合通常是有利的。第二种(或第三种)药剂可具有与主要治疗剂相同或不同的作用机制。使用细胞毒性药物组合可能是特别有用的, 其中施用的两种或多种药物是以不同方式或在细胞循环的不同阶段中发生作用, 和/或其中两种或多种药物具有重叠毒性或副作用, 和/或其中被合并的药物在治疗通过患者所显示的特定疾病状态上各自具有证明的效果。

因此, 本文公开的化合物(或本文公开的其它化学式)可并用其它抗癌和细胞毒剂一起施用, 并且可用于治疗癌症或其它增生性疾病。本文的发明进一步包括本文中的化合物(或本文公开的其它化学式)在制备用于治疗癌症的医药中的用途, 和/或其包括本文化合物与说明书一起的包装, 该说明书是指示化合物可并用其它抗癌或细胞毒剂以及用于治疗癌症的治疗法。本发明进一步包括化合物与一种或多种其它药剂呈药盒形式的组合, 例如在该药盒中它们被包装在一起, 或置于将被作为药盒一起销售的分离包装中, 或在该药盒中它们被包装以一起调配。

第二种(或多种)抗癌剂可选自下列的任一种或多种:

烷基化剂(包括氮芥类、烷基磺酸盐/酯类、亚硝基脲类、乙撑亚胺(ethylenimine)衍生物和三氮烯类); 抗血管生成剂(包括间质金属蛋白酶抑制剂); 抗代谢物(包括腺苷脱氨酶抑制剂、叶酸拮抗剂、嘌呤类似物

和嘧啶类似物); 抗生素或抗体(包括单克隆抗体、CTLA-4抗体、萘环类抗生素); 芳香酶抑制剂;

细胞循环应答改变剂; 酶; 法呢基蛋白质转移酶抑制剂;

激素和抗激素剂以及类固醇(包括合成类似物、糖皮质激素类、雌激素/抗雌激素剂[例如SERM]、雄激素/抗雄激素剂、黄体激素、黄体酮受体激动剂以及促黄体生成激素释放[LHRH]激动剂与拮抗剂); 胰岛素样生长因子(IGF)/胰岛素样生长因子受体(IGFR)系统调节剂(包括IGFR1抑制剂); 整联蛋白发出信号抑制剂; 激酶抑制剂(包括多激酶抑制剂和/或Src激酶或Src/abl的抑制剂、周期素依赖性蛋白激酶[CDK]抑制剂、panHer、Her-1和Her-2抗体, VEGF抑制剂, 包括抗-VEGF抗体, EGFR抑制剂、有丝分裂原活化蛋白质[MAP]抑制剂、MEK抑制剂、极光体(Aurora)激酶抑制剂、PDGF抑制剂以及其它酪氨酸激酶抑制剂或丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂;

微管破裂剂, 例如ecteinascidin或其类似物及衍生物; 微管稳定化剂, 例如紫杉烷类, 以及天然产生的epothilones及其合成和半合成类似物;

微管结合、去稳定化剂(包括长春花生物碱); 以及

拓扑异构酶抑制剂; 异戊烯基蛋白质转移酶抑制剂; 铂配位络合物; 信号转导抑制剂; 以及其它作为抗癌使用的药剂, 和细胞毒剂例如生物应答改变剂、生长因子和免疫调节剂。

此外, 本发明化合物可其它治疗剂一起调配或共同施用, 该其它治疗剂是针对它们在寻求解决与前述症状有关的副作用的特定实用性来选择的。例如, 本发明化合物可与数种药剂一起调配, 以预防恶心、过敏性和胃刺激, 例如止吐药, 以及H₁和H₂抗组胺药。

上述其它治疗剂, 当与本发明化合物合并使用时, 可例如以Physicians' Desk Reference (PDR)中所指示的量使用, 或如本领域普通技术人员确定的其它量使用。

这些化合物是以治疗有效的量施用于哺乳动物。所谓"治疗有效量", 是指本发明公开内容的化合物当单独或并用另一种治疗剂施用于哺乳动物时, 有效预防或改善疾病状态或疾病进展的量。

剂量与配方

本公开内容的化合物可以口服剂型施用，所述剂型例如片剂、胶囊剂(其各自均包括持续释放或定时释放配方)、丸剂、粉末剂、颗粒剂、酏剂、酞剂、混悬剂、糖浆剂和乳剂。它们也可以静脉内(推注或灌注)、腹膜腔内、皮下或肌内形式施用，全部均使用医药领域技术人员公知的剂型。它们可以单独施用，但通常与医药载体一起施用，所述医药载体根据所选定的施用途径和标准医药实践作选择。

本发明化合物的剂量服用法将当然地会根据例如以下的已知因素而改变：特定药剂的药效学特性及其施用模式和途径；接受者的物种、年龄、性别、健康状况、医疗状况和体重；病征的性质与程度；共同治疗的种类；治疗频率；施药途径，患者的肾和肝功能，以及期望的作用。医师或兽医可决定和开立所需药物的有效量，以预防、抗衡或遏制病症的发展。

以下述作为一般指引，各活性成份的每日口服剂量，当用于指定的作用时，其范围是在约0.001至1000mg/kg体重之间，或在每天约0.01至100mg/kg体重之间，或者，在约1.0至20mg/kg/天之间。在以恒定速率灌注期间，静脉内方式的剂量为约1至约10mg/kg/分钟。本发明化合物可以单次日服剂量施用，或者总日服剂量可以每日分成二、三或四次的剂量施用。在一项实施方案中，无论是每日施用一次还是以分离剂量每日施用两次，活性成份的每日口服剂量为3至600毫克之间。或者，活性成份可以10-20毫克的剂量施用，每日投药两次，或以40至100毫克，每日投药一次。或者，活性成份可以每天以12.5毫克的剂量施用，或每天一次75毫克。或者，活性成份可以3、10、30、100、300和600毫克的剂量施用，每天施用一次或两次。

本发明化合物可以以鼻内形式通过局部使用适宜的鼻内载剂施用，或通过经皮途径使用透皮贴片施用。当以经皮递送系统的形式施用时，剂量施用将当然地在整个剂量服用中是连续的，而非间歇性的。

这些化合物通常与适宜的医药稀释剂、赋形剂或载体(在本文中总称为医药载体)混合施用，它们是适当地针对所意欲施用的形式来选择，意即口服片剂、胶囊剂、酏剂、糖浆剂等，并且与常用的医药实践一致。

例如，对于呈片剂或胶囊形式的口服施用而言，活性药物成份可与口服、无毒性、药学上可接受的惰性载体合并，该载体例如乳糖、

淀粉、蔗糖、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸二钙、硫酸钙、甘露醇、山梨醇等；对于呈液体形式的口服施用而言，口服药物成份可与任何口服、无毒性药学上可接受的惰性载体合并，例如乙醇、甘油、水等。再者，当想要或必要时，也可将适宜的粘合剂、润滑剂、崩解剂和着色剂并入混合物中。适宜的粘合剂包括淀粉，明胶，天然糖类例如葡萄糖或 β -乳糖，玉米增甜剂，天然和合成树胶例如阿拉伯胶、西黄蓍胶或海藻酸钠，羧甲基纤维素，聚乙二醇，蜡类等。在这些剂型中使用的润滑剂包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。崩解剂包括但不限于淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土、黄原胶等。

本发明化合物也可以脂质体递送系统的形式施用，该脂质体递送系统例如小单层状泡囊、大单层状泡囊和多层状泡囊。脂质体可制自多种磷脂类，例如胆固醇、硬脂酰胺或磷脂酰胆碱。

本发明化合物也可与作为可靶向的药物载体的可溶性聚合物偶合。这些聚合物可包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、多羟基丙基甲基丙烯酸酰胺-酚、多羟基乙基天门冬氨酸酰胺或被棕榈酰基残基取代的聚氧化乙烯-聚赖氨酸。再者，本发明化合物可以与可用于实现药物控制释放的生物可降解聚合物种类偶合，该聚合物例如聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸与聚乙醇酸的共聚物、聚 ϵ -己内酯(polyepsilon caprolactone)、聚羟丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基酰化物和凝胶的交联或两亲性嵌段共聚物。

适用于施用的剂型(医药组合物)每剂量单位可含有约1毫克至约100毫克的活性成份。在这些医药组合物中，以组合物的总重量为基准，活性成份通常是以约0.5-95重量%的量存在的。

明胶胶囊剂可含有活性成份和粉末状载体，例如乳糖、淀粉、纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸等。可使用类似稀释剂，以制造压制片剂。片剂和胶囊剂可被制缓释产物，以提供药物历经数小时期间的连续释放。压制片剂可经糖包衣或薄膜包衣，以掩盖任何令人不愉快的味道并保护片剂与大气隔离，或经肠溶性物质包衣，以在胃肠道中选择性崩解。

供口服施用的液体剂型可含有着色和矫味剂，以增加病人可接受性。

一般而言，水、适合的油、盐水、含水右旋糖(葡萄糖)和相关的糖溶液以及二醇类例如丙二醇或聚乙二醇是胃肠外用溶液的适宜载体。供胃肠外施用的溶液可含有活性成份的水溶性盐，适宜的稳定剂，以及需要时的使用的缓冲物质。抗氧化剂例如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠或抗坏血酸，无论是单独或组合，均是适宜的稳定剂。还使用的是柠檬酸及其盐类，以及EDTA钠。此外，胃肠外用溶液可含有防腐剂，例如苯扎氯铵、对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、以及三氯叔丁醇。

适当医药载体描述于*Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company中，它是本领域的标准参考书。

供本发明化合物施用代表性的有用的医药剂型可以说明如下：

胶囊

大量单位胶囊可通过充填标准的两片式硬明胶胶囊而制成，每粒含有100毫克粉末状活性成份、150毫克乳糖、50毫克纤维素和6毫克硬脂酸镁。

软明胶胶囊

可制备活性成份在可消化油例如大豆油、棉籽油或橄榄油中的混合物，并通过容积式泵注入明胶中，以形成含有100毫克活性成份的软明胶胶囊。这些胶囊应经洗涤并干燥。

片剂

片剂可通过常规操作制成，由此其剂量单元为100毫克活性成份、0.2毫克胶体二氧化硅、5毫克硬脂酸镁、275毫克微晶性纤维素、11毫克淀粉以及98.8毫克乳糖。可使用适宜的包衣材料以增加可口性或延迟吸收。

可注射液

适合于通过注射施用的胃肠外组合物可外通过将1.5重量%的活性成份在10体积%的丙二醇与水中搅拌而制成。该溶液应当用氯化钠形成等渗性并灭菌。

混悬剂

可制备含水混悬剂以供口服施用，由此每5毫升含有100毫克细分化的活性成份、200毫克羧甲基纤维素钠、5毫克苯甲酸钠、1.0克山梨醇溶液(美国药典)以及0.025毫升香草醛。

在本发明化合物与例如其它抗凝血剂合并的情况中，日服剂量可为每千克病人体重为约0.1至100毫克的式I化合物，以及约1至7.5毫克的第二种抗凝血剂。对片剂剂型而言，本发明化合物一般可以每剂量单位约5至10毫克的量存在，而第二种抗凝血剂的量为每剂量单位约1至5毫克。

在两种或多种前述第二种治疗剂和实施例的化合物一起施用的情况下，鉴于治疗剂在组合施用时的增效或协同作用，通常各成份在典型日服剂量和典型剂型中的量相对于当该药剂单独施用时的常用剂量可被降低。

特别是当以单一剂量单位提供时，在所合并的活性成份之间可能存在化学相互作用。因此，当实施例的化合物与第二种治疗剂合并于单一剂量单位中时，将它们调配成这样，即虽然将活性成份合并于单一剂量单位中，但活性成份间的物理接触被降至最低(意即减少)。例如，可将一种活性成份用肠溶性物质包衣。通过肠溶性衣包裹其中一种活性成份，则不仅能够使所合并活性成份间的接触降至最低，而且能够控制这些成份中的一种在胃肠道中释放，以致使这些成份中的一种不会在胃中释放，而是在肠中释放。其中一种活性成份还可用一种物质包衣，其会在整个胃肠道中达到持续释放，并且还会使所合并活性成份间的物理接触降至最低。再者，此持续释放成份可另外用肠溶性物质包衣，以致使此成份的释放仅发生于肠中。再另一种方法涉及组合产物的调配，其中将一种成份包裹持续和/或肠溶性释放的聚合物，而另一种成份也包裹聚合物，例如低粘度级的羟丙甲基纤维素(HPMC)或者本领域已知的其它适宜物质，以便将各活性成份进一步分离。此聚合物包衣用于形成与另一种成份相互作用的额外屏障。

使本发明组合产物成份间的接触降至最低的这些以及其它方式，无论是以单一剂型施用或以分离的形式但同时通过相同方式施用，一旦了解本发明公开内容后，均将是本领域技术人员容易了解的。

此外，本文公开的某些化合物可作为其它化合物的代谢物使用。

因此，在—项实施方案中，化合物可以以基本上纯净化合物使用，然后其也可被掺入医药组合物中，或可以以代谢物使用，该代谢物是在该化合物的前体药物施用后产生的。在—项实施方案中，化合物可通过使用用于治疗如本文中所述的病症而以代谢物使用。

本文中使用的"基本上纯净"意欲包括具有纯度大于约90重量百分比的化合物，包括约90、91、92、93、94、95、96、97、98、99和100百分比。

作为—项实施例，本文公开的化合物可以是基本上纯净的，具有大于约90百分比(重量比)的纯度，其中剩余小于约10百分比的物质包括化合物的其它代谢物，化合物的前体药物，和/或由于其制备而产生的反应和/或操作杂质。

显然，根据上文教导，本发明的许多修饰和变型是可能的。因此，应理解的是，在随文所附权利要求的范围内，本发明可以按不同于本文中所述的方式实施。

体内检测和效果

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺(也被称为"实施例1")是在如下文所述的下述体内检测中评估的。

部分1. 猕猴属猴的皮内(ID) MCP-1激发模型

方法

MCP-1的皮内注射会造成单核细胞浸润到注射位置。此模型最初开用于评估CCR2拮抗剂对单核细胞浸润至用人类MCP-1所注射皮肤组织中的抑制作用。

如下文所述，使各猴每日—次服用实施例1或其载剂对照物(0.5% [w/v]羧甲基纤维素)，历经三天。在第3天服药后，在背侧胸部上的分离位置处，立即使所有动物接受至少2次10微克(50微升/注射)人类MCP-1 (R&D系统)的皮内注射，以及至少2次其DPBS对照组(50微升/注射)的皮内注射。所有位置的真皮切片检查均在MCP-1 (或DPBS)激发后大约18小时获得。使切片检查进行半定量组织学评估。皮肤样品的代表性切片是通过光学显微镜检查法检验的，注意微小损伤和细胞浸

润，并将其发生率以表列出。

在研究1中，将实施例1以0、6.5、13或26mg/kg的剂量口服施用于3只猕猴属猴的组(每性别每组1或2只)。在研究2中，首次用于实验的动物是以0-、10-或30-mg/kg的剂量在2或4只动物的组(对载剂服药组，为1只/性别；对实施例1-服药组，为2只/性别)中，用以评估实施例1。

对于两项研究，除了切片检查分析以外，收集血液，并评估全血液计数与细胞分类。还评估血浆样品的化合物浓度以及血清样品的系统炎性介质含量。

结果

在第一项研究中，单核细胞添补至载剂处理的对照动物的皮肤诱导的MCP-1为 2.7 ± 0.3 (在0至4的规模下，表13)。在26mg/kg下，实施例1会抑制浸润(56%)。13和6.5mg/kg的两种较低剂量达到较低水平的抑制。该化合物也会抑制其它细胞类型的浸润，例如嗜酸粒细胞与中性粒细胞。化合物在18小时时血浆浓度，及其与抑制水平和Cyno趋化性IC90值的关系总结于表13中。

使用两种方法以在体外趋化性检测中测定实施例1的抑制效果。第一种方法使用猴PBMC，而第二种方法使用以Cyno CCR2稳定地转染的L1.2细胞。已发现前者为高度地可变($IC_{50} = 5.5 \pm 10$ nM)，第二种获得较高平均值，但更加一致($IC_{50} = 11.4 \pm 8$ nM)。以此第二个数值为基准，26mg/kg剂量会在服药后18小时时造成游离血浆浓度为2X趋化性IC90(表13)。

表13

猕猴属猴中实施例1于单核细胞及其它细胞类型应答MCP-1攻击的浸润的作用的总结

剂量 (mg/kg)	游离 血浆 浓度(nM)	CTX IC90 ^a 倍数	CTX IC90 ^b 倍数	MNC 评分 (抑制%)	PMN 评分	Eos 评分	总细胞 评分
0	0	0	0	2.7±0.3 (0%)	0.8±0.3	1.83±0.3	5.3±0.6
6.5	53	1.8	0.5	2.2±0.6 (19%)	0.8±0.3	1.3±0.8	4.3±1.6
13	101	3.4	0.9	2.2±0.3 (19%)	0.7±0.3	1.2±0.6	4.0±0.5
26	238	7.9	2.2	1.2±0.6 (56%)	0.2±0.3	0.5±0	1.8±0.8

a猕猴属PBMC为基础的趋化性

b使用稳定地表达猕猴属CCR2的L1.2细胞的趋化性

第二项研究是在首次用于实验的猴中进行的。与第一项研究作比较，实施例1是在30mg/kg(高剂量)下，抑制单核细胞浸润达到较大程度(91%)，而在10mg/kg下获得87%的抑制(表14)。

表14

猕猴属猴中实施例1对于单核细胞及其它细胞类型应答MCP-1攻击的浸润的作用的总结

剂量 (mg/kg)	游离 血浆 浓度(nM)	CTX IC90 ^a 倍数	CTX IC90 ^b 倍数	MNC 评分 (抑制%)	PMN 评分	Eos 评分	总细胞 评分
0	0	0	0	1.5 (0%)	1.3	0.4	3.2
10	34	1.1	0.37	0.2 ± 0.2 (87%)	0	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2
30	83	2.8	0.91	0.1 ± 0.3 (91%)	0.1 ± 0.3	0.6 ± 0.7	0.8 ± 0.8

a猕猴属PBMC为基础的趋化性检测

b使用稳定地表达猕猴属CCR2的L1.2细胞的趋化性检测

在两项研究中，与载体对照组相比，血清炎性介质变化的评估显示在实施例1-治疗组中MCP-1含量的增加(~3倍)。此外，与载体对照组相比，全血液计数(CBC)分析显示在实施例1-治疗组中中性粒细胞的增加(~3倍)。

进行hCCR2 KI小鼠研究，在使用细胞分类计数为基础和流动细胞计数为基础的操作法的巯基乙酸酯(TG)腹膜炎模型中，评估实施例1对单细胞/巨噬细胞浸润的作用。

部分2. 人类CCR2敲入(hCCR2 KI)小鼠的表征

方法

hCCR2 KI小鼠是通过用人类CCR2编码序列置换小鼠CCR2基因以基因方式设计的。小鼠得自California San Francisco大学的Gladstone心血管疾病研究所。

使用标准PCR (基因特异性和定量)方法，以区别野生型(小鼠CCR2基因)与靶向的等位基因(人类CCR2基因)，并以耳部或尾部样品测定人类CCR2基因复制数目和小鼠CCR2基因复制数目。还进行从血液白血球分离的总RNA的RT-PCR分析，以测定人类和小鼠CCR2 mRNA的表达水平。使用流动细胞计数分析，以测定人类或小鼠CCR2蛋白质在血液单细胞表面的表达。在TG-所诱导的腹膜炎模型中，使用腹膜腔中蓄积的单细胞/巨噬细胞的FACS分析(参阅部分3)，以测定人类CCR2在这些小鼠中的功能性。

结果

hCCR2 KI小鼠是通过用人类CCR2编码序列置换小鼠CCR2基因以基因方式设计的。在实施例1的体内评估中使用这些动物之前，进行这些小鼠的基因型与表现型特征鉴定。耳部或尾部样品的PCR为基础的基因型研究(基因特异性和定量)检测了两份复制的人类CCR2基因和不同量的PCR产物，显示存在小鼠CCR2基因的0至2份复制。使用从这些KI小鼠的血液白血球所分离的总细胞RNA，使用经设计以检测小鼠CCR2 mRNA的引物组，相对定量RT-PCR分析检测出人类CCR2 mRNA与最低限度含量的PCR产物。当在CCR2 KI小鼠，人类CCR2，而非小鼠CCR2

中，使用流动细胞计数分析以检测蛋白质表达时，表面蛋白质是通过分别用特异性抗-人类CCR2和抗-小鼠CCR2抗体使全血液细胞分离物染色而被检出的。

当血浆稳态水平覆盖人类CCR2趋化性的IC₉₀，但低于抑制小鼠CCR2趋化性所需要的含量时，hCCR2-选择性拮抗剂会在这些hCCR2 KI小鼠中，但不在野生型小鼠中，阻断单细胞浸润。再者，在模拟hCCR2 KI环境(小鼠MCP-1/人类CCR2)的体外检测中，实施例1会抑制小鼠MCP-1结合至表达hPBMC的人类CCR2 (IC₅₀ = 2.2±1.2 nM)，以及5THP-1细胞的小鼠MCP-1-诱导的/人类CCR2所介导的趋化性(IC₅₀ = 0.6±0.3 nM)。

部分3. 在hCCR2 KI小鼠中的48-小时巯基乙酸酯(TG)-诱导的腹膜炎模型

方法

将hCCR2 KI小鼠(C57BL/6-SVJ129)以腹腔内方式注射1毫升巯基乙酸酯(TG) (Hardy Diagnostics)。对于各研究，使用每组八只雄性小鼠。在TG注射前1小时，以口服方式服用实施例1。所使用的载剂为水中的0.01N HCl。TG注射后四十八小时，通过注射5毫升PBS/10 mM EDTA/10% BSA至腹腔中进行腹膜灌洗。

对于48-小时TG腹膜炎研究，一天两次服用实施例1，其中第一次服用是在TG注射前一小时。总腹膜细胞计数是在分离的细胞上通过细胞计数器获得的。进行细胞离心涂片(Cytospins)以测定分类白血球计数。将细胞以Wright-Giemsa染料(Sigma-Aldrich)染色3分钟，然后用去离子水冲洗5分钟。分类计数是以每样品所计数的总共200个细胞为基准计算得到的。在各研究结束时，自后眶窦收集血液于EDTA中，以测定药物浓度。

对于流动细胞计数分析，将腹膜渗出物细胞(1×10^6)用FACS缓冲剂(PBS/0.5% BSA)洗涤一次，并且再悬浮于FACS缓冲剂中。使细胞在冰上用Fc-阻断抗体(BD Pharmingen)培养15分钟，接着添加下列抗体(BD Pharmingen): PE共轭抗-F4/80、FITC共轭抗-Ly6c和Alexa 647共轭抗-hCCR2。在冰上45分钟后，使细胞在冰上通过BD Cytotfix固定15分钟，用FACS缓冲剂洗涤两次，并且再悬浮于200微升FACS缓冲剂中。对于

各样品获得细胞事件(40,000), 并且使用FloJo软件(TreeStar)分析数据。设定FSC/SSC门, 以包含所有单细胞(低SSC, 较高FSC), 同时将粒性细胞排除在分析之外。然后, 将此选通的群体分析Ly6C (FITC)、F4/80 (PE)表达。腹膜单细胞/巨噬细胞数目是用下述方式测定, 将通过细胞计数器所获得的总腹膜细胞计数, 与通过得自流动细胞计数的F4/80⁺细胞所确认的单细胞/巨噬细胞的百分比相乘。平均值间差异的统计学显著性是使用成对的双-尾式t试验法分析的, 具有p值低于0.05的显著性。

结果

实施例1是在hCCR2 KI小鼠TG腹膜炎模型中评估的, 以测定其在抑制单细胞/巨噬细胞浸润中的EC50。给小鼠施用巯基乙酸酯, 并且口服给予实施例1为1、5或25mg/kg, BID。TG治疗后四十八小时, 获得腹膜灌洗物, 以供细胞浸润分析。实施例1显示通过细胞计数器所获得的总腹膜白血球数目的剂量依赖性降低(图15)。以通过灌洗物样品形态学评估的分类白血球计数为基准, 实施例1证实了单细胞/巨噬细胞流入量的剂量依赖性抑制作用。1、5、25mg/kg的剂量分别获得20%、62%和69%的抑制作用。在5和25mg/kg下达到统计学显著的抑制作用(图15)。在两项分别的研究中, 对于抑制单细胞/巨噬细胞浸润的平均EC50被估计为 3.0 ± 0.9 nM。

添补的单细胞/巨噬细胞浸润物还通过流动细胞计数法定量。为了对添补的单细胞/巨噬细胞与留置的巨噬细胞和粒性细胞之间作区分, 使用F4/80和Ly6C单细胞/巨噬细胞表面标记物的染色, 以确定添补的单细胞/巨噬细胞。通过此方法发现单细胞/巨噬细胞浸润的类似剂量依赖性抑制作用, 其中全部三种剂量均显示统计学显著性的抑制作用(图16)。1、5、25mg/kg的剂量分别获得38%、71%和86%的抑制作用。在两项分别的研究中, 地于抑制单细胞/巨噬细胞浸润, 通过此分析的平均EC50被估计为 2.2 ± 0.5 nM。

为了在48-小时巯基乙酸酯腹膜炎模型中使用hCCR2敲入的小鼠以通过实施例1评估受体占据的体内水平, 测量了实施例1和小鼠CCR2配位体MCP-1两者的血浆水平。对于此评估要注意的是, 仅CCR2及其主要配位体MCP-1被考虑在内。在竞争性抑制剂存在下, 配位体的受体

占据是通过Gaddum方程确定的:

$$\frac{[RL]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_d / [L]) (1 + [I] / K_i)}$$

由于实施例1是MCP-1结合至CCR2的竞争性抑制剂，因此小鼠MCP-1/CCR2受体复合物与实施例1/CCR2受体复合物两者的量可使用小鼠MCP-1与蛋白质-未结合实施例1两者在血浆中的血清水平测得。小鼠MCP-1结合至hCCR2的 K_d 为 0.91 ± 0.08 nM ($n=8$)，其是在冷竞争配位体结合实验中使用 ^{125}I -人类MCP-1测得的。实施例1结合至hCCR2的平均 K_i 为1.2 nM。小鼠MCP-1/CCR2受体复合物的分数是使用上述方程的形式测定的。为测定实施例1/CCR2复合物的分数，该方程重新定义为:

$$\frac{[RI]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_i / [I]) (1 + [L] / K_d)}$$

最后，不含CCR2的量系测定自:

$$[\text{CCR2}]_{\text{总计}} = [\text{CCR2}]_{\text{不含}} + [\text{小鼠MCP-1/CCR2}] + [\text{实施例1/CCR2}]$$

如表15中所示，在48小时时单细胞/巨噬细胞浸润至腹膜中的抑制百分比，反映了实施例1/CCR2受体复合物的百分比(实施例1-占据的CCR2)。

表15
在48-小时TG腹膜炎模型中， hCCR2 KI小鼠血液
中体内受体占据的测定

剂量 (mg/kg)	血浆中 小鼠MCP-1 的浓度(nM)	血浆中游离实施例 1的浓度(nM) (IC90 CCR2结合倍数)	%小鼠MCP-1 结合的CCR2	实施例1- 结合CCR2 的%	%游离 CCR2	单细胞/巨噬 细胞浸润的 %抑制 ^a
25	0.041	24 (1.4)	0.2	95.0	4.8	86
5	0.043	4 (0.2)	1.1	76.1	22.8	71
1	0.027	1 (0.05)	1.6	44.7	53.7	38
0 (载剂)	0.03	0	3.2	0	96.8	0

^a FACS为基础的总单细胞/巨噬细胞的分析

部分4. 长期有效性研究

方法

为了研究实施例1对多发性硬化的EAE (实验自身免疫脑脊髓炎)模型的作用，使用每组10只小鼠。在第0天，使hCCR2 KI小鼠皮下方式免疫，使用总共200微升的在不完全Freund氏佐剂(IFA) (Sigma- Aldrich)中的、以1: 1与300微克结核分支杆菌(H37Ra) (Becton-Dickinson)混合的300微克髓磷脂寡树突胶质细胞糖蛋白(MOG) 35-55 (Genemed Synthesis)。在第0天(免疫作用后两小时)和第2天，将小鼠以腹腔内方式注射100微升的400毫微克百日咳毒素。在第10天开始临床记分，在整个研究中每周持续三次，并且以0-5的等级为基础: 0, 没有疾病迹象; 0.5, 部分尾部虚弱; 1, 下垂尾或摇摆步态并有尾部紧张性; 1.5, 摇摆步态并有尾部虚弱; 2, 摇摆步态并有下垂尾(失调); 2.5 (失调并有部分肢体瘫痪; 3, 一个肢体完全瘫痪; 3.5, 一个肢体完全瘫痪并且第二个肢体部分瘫痪; 4, 两个肢体完全瘫痪; 4.5, 垂死; 5, 死亡。在

第1天起始以55mg/kg口服实施例1(每天两次)。

结果

在所进行三项研究的两项中，实施例1显著地降低临床评分($p < 0.05$) (图17)。对于实施例1，在 ^{125}I -小鼠MCP-1结合至hCCR2-表达细胞、hPBMC (模拟hCCR2 KI环境)上，IC₅₀为2.2 nM。以此IC₅₀值为基准，55mg/kg剂量会造成游离血浆峰谷浓度为结合IC₉₀的~2-倍。在第22天，在以实施例1对载剂所治疗的小鼠之间，脊髓的组织学评估并未证实总炎性细胞浸润的显著差异。在用化合物治疗的小鼠中发现明显的中性粒细胞浸润。

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，二-苯磺酸盐，型式N-1 (实施例2a)的实验和模拟粉末图

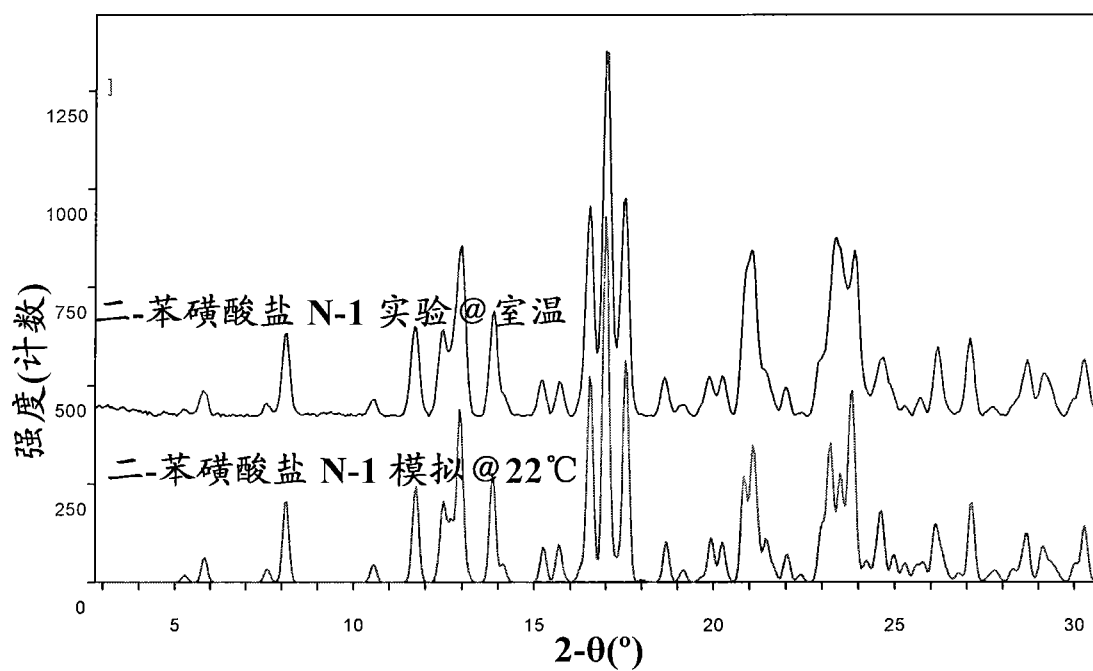


图 1

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺, 游离碱, 型式N-2 (实施例2f)
的实验和模拟粉末图

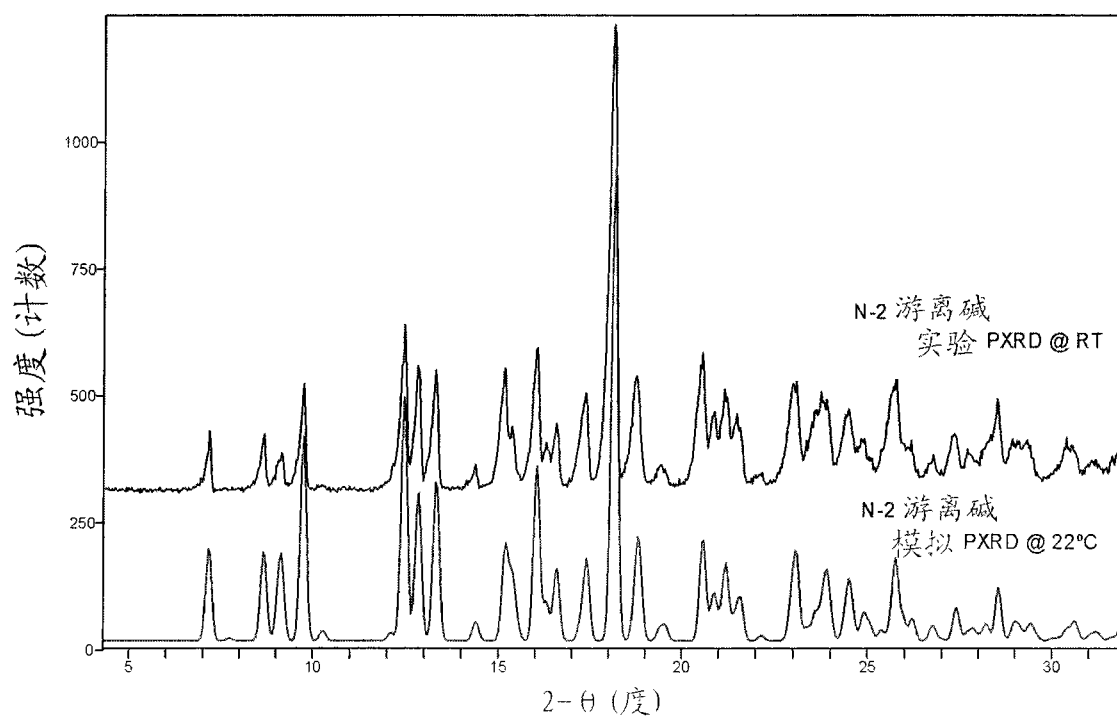


图 2

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺, 游离碱, 型式E-1 (单-乙醇化物)(实施例2d)的实验和模拟粉末图

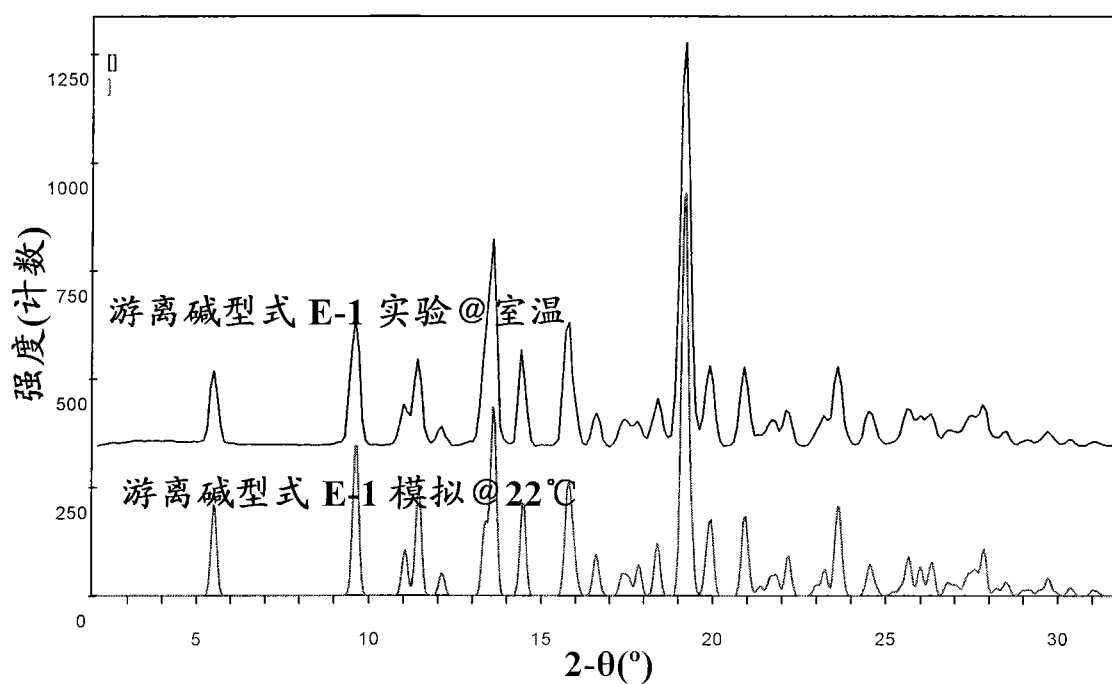


图 3

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺, HCl盐, 型式H4-1 (四水合物)(实施例2h)的实验和模拟粉末图

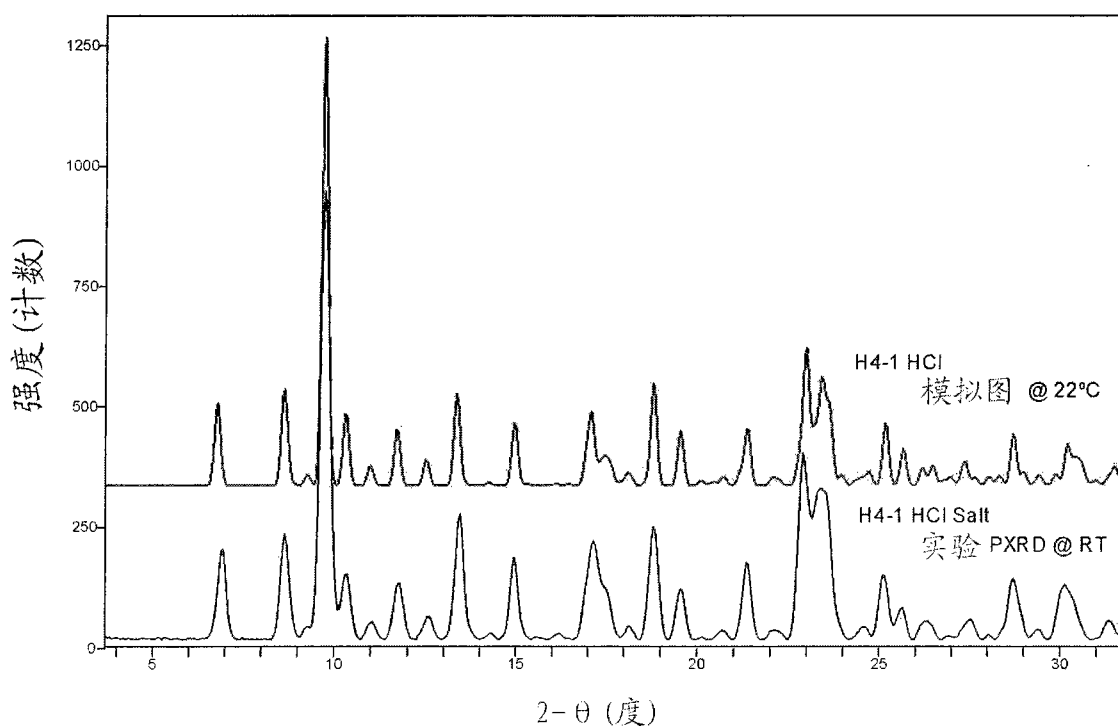


图 4

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺, 游离碱, 型式A-1 (单-丙酮溶剂合物)(实施例2e)的实验和模拟粉末图

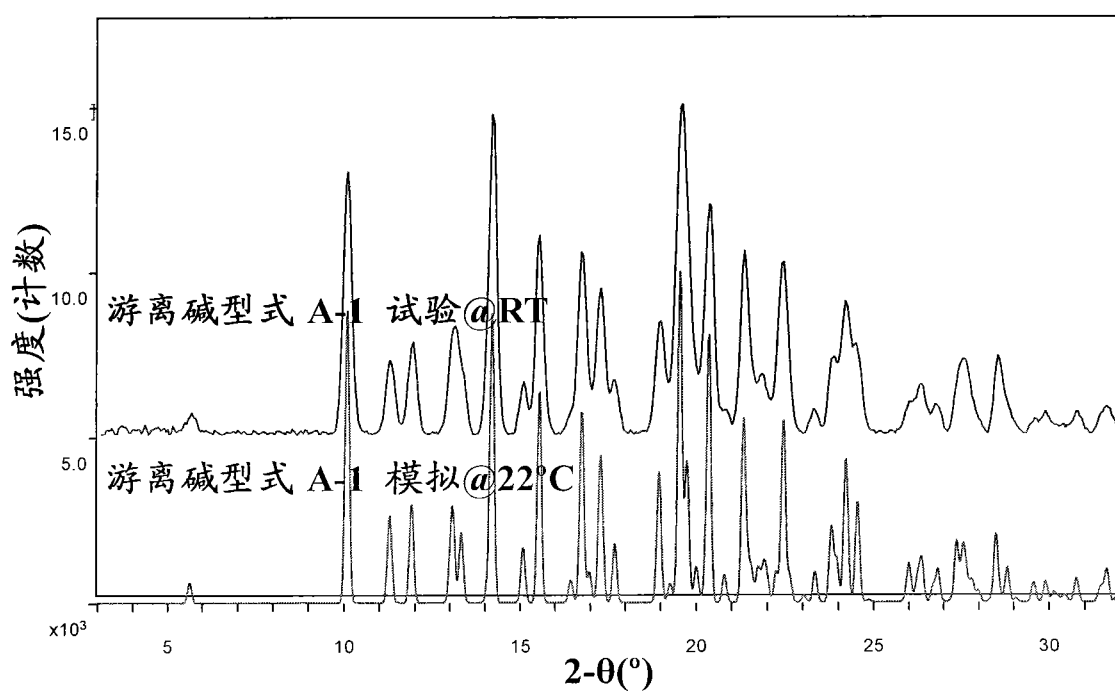


图 5

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺, 游离碱, 型式DC-1 (单-二氯甲烷溶剂合物)(实施例2b)的实验和模拟粉末图

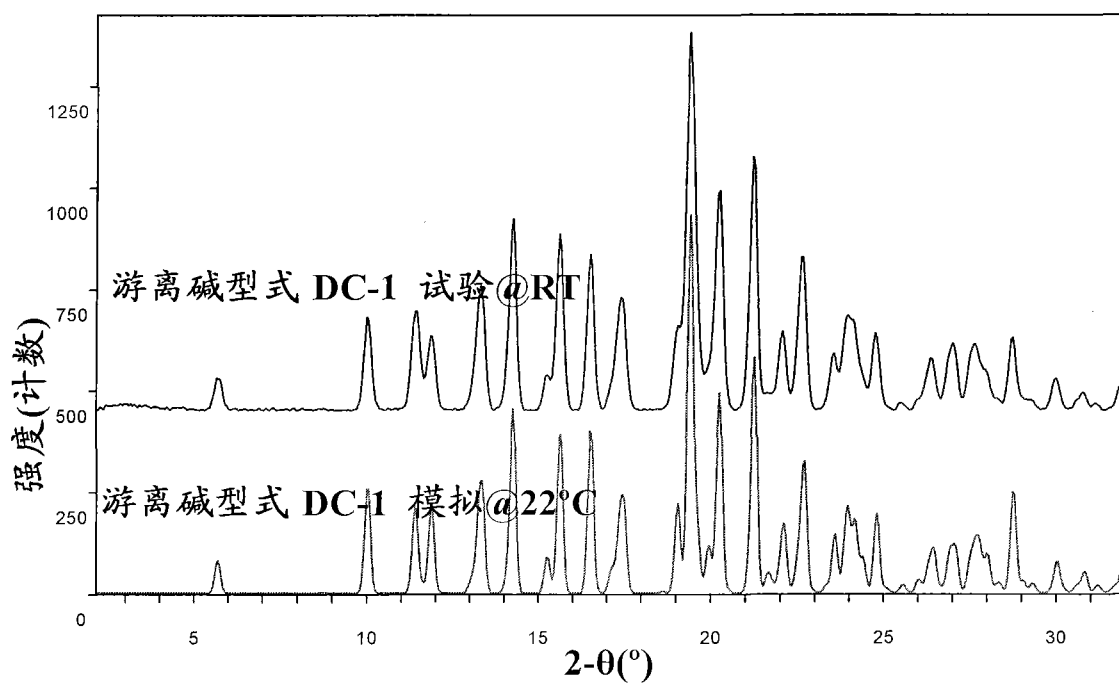


图 6

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺, 游离碱, 型式AN-3 (单-乙腈溶剂合物)(实施例2g)的实验和模拟粉末图

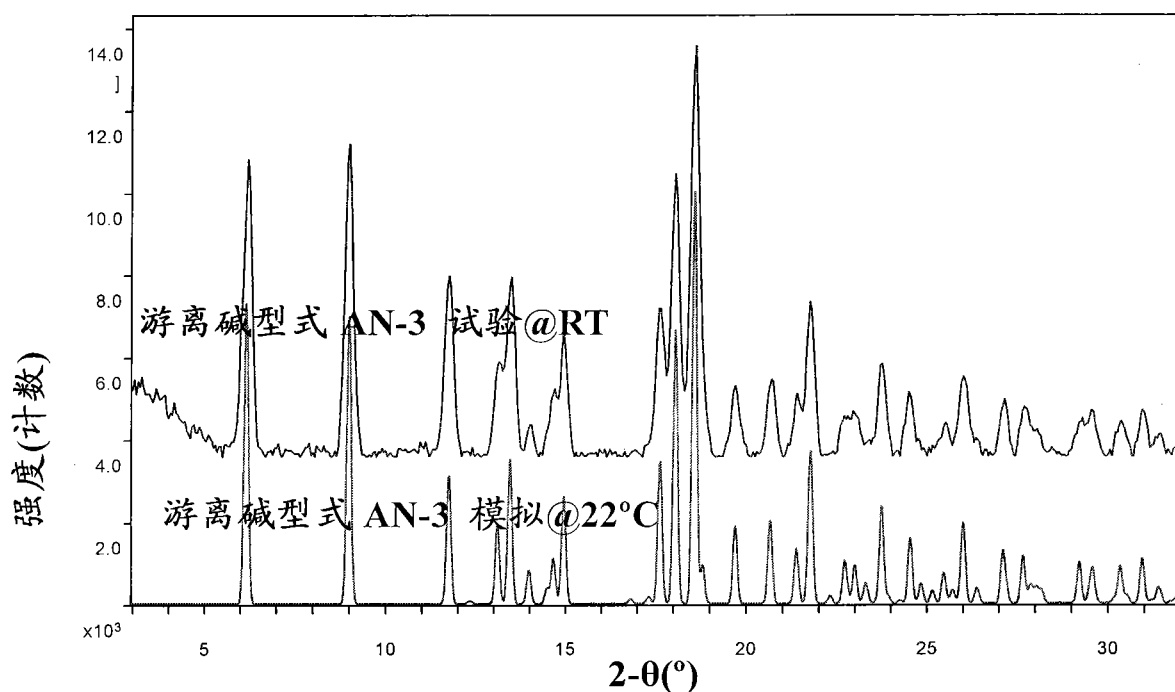


图 7

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，二-苯磺酸盐，型式N-1 (实施例2a)的DSC

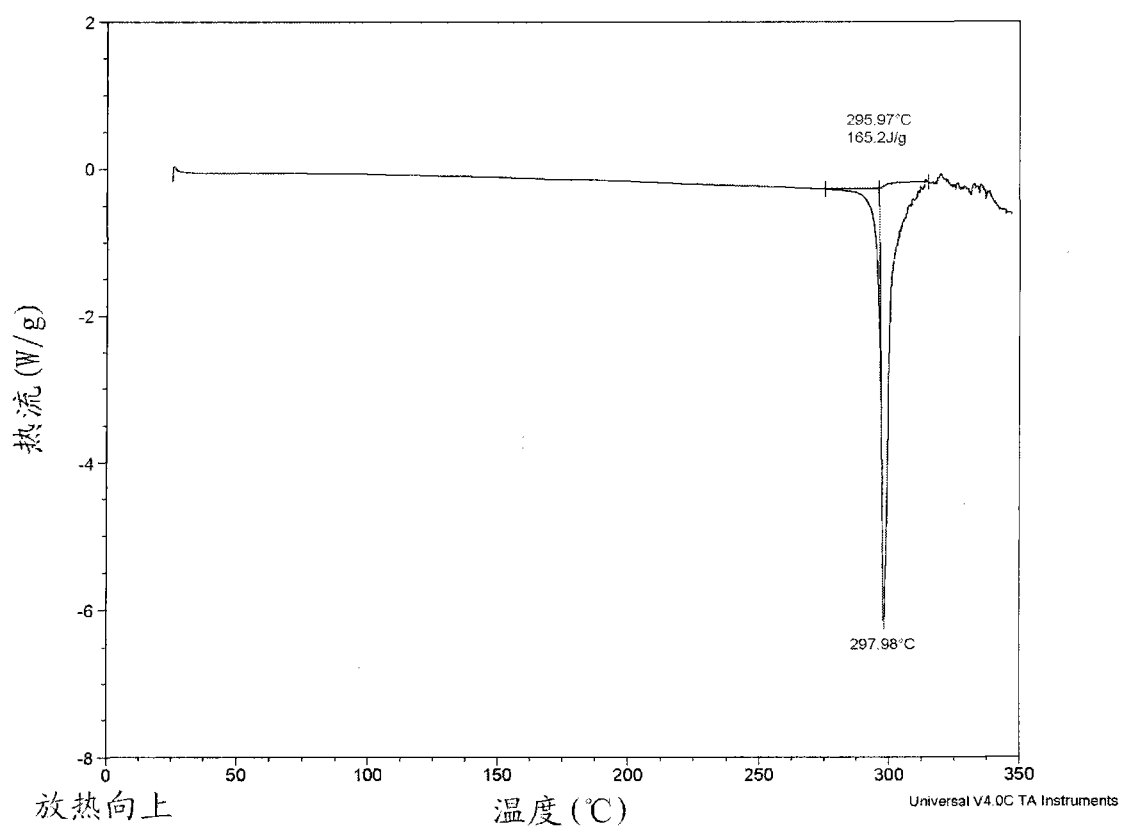


图 8

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，二-苯磺酸盐，型式N-1 (实施例2a)的TGA

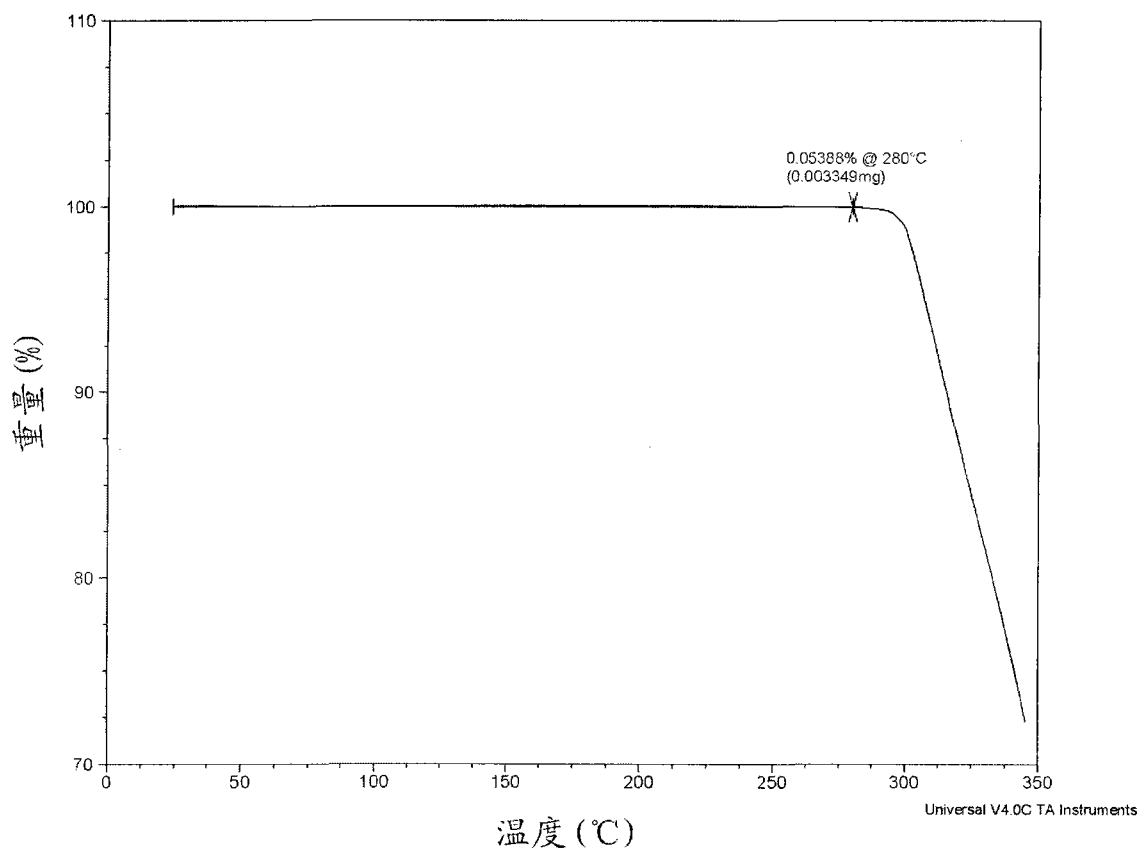


图 9

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，游离碱，型式N-2 (实施例2f)
的DSC

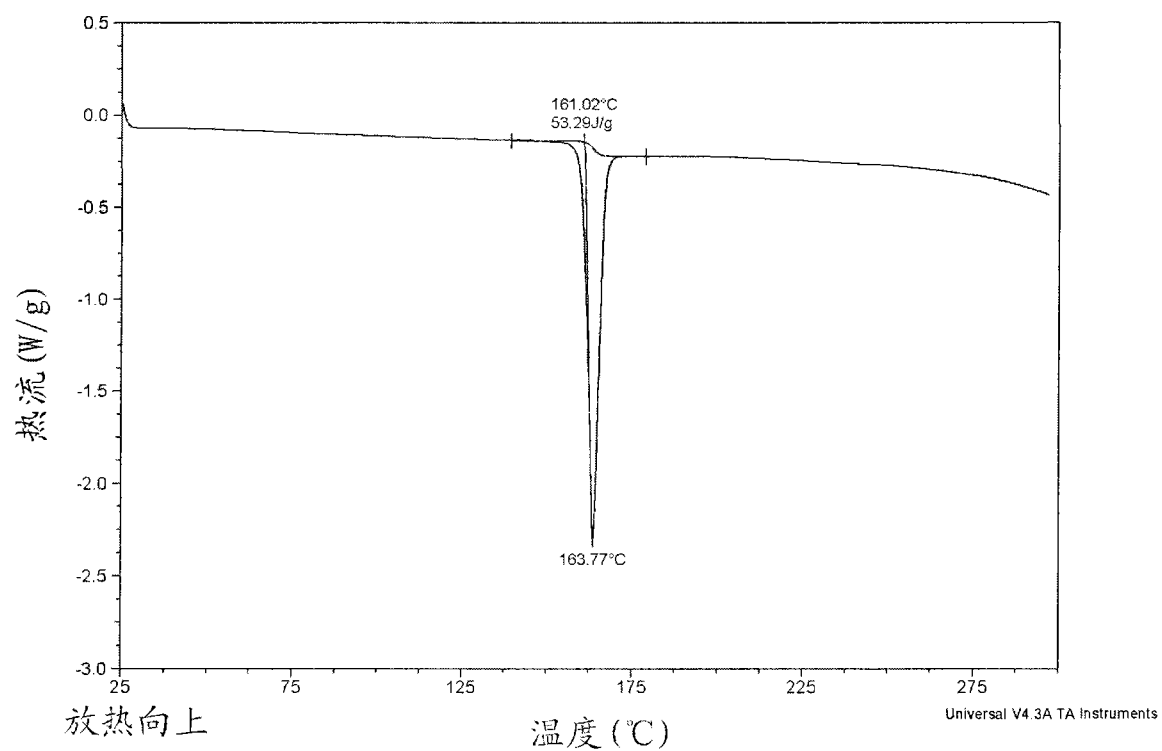


图 10

**N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，游离碱，型式N-2 (实施例2f)
的TGA**

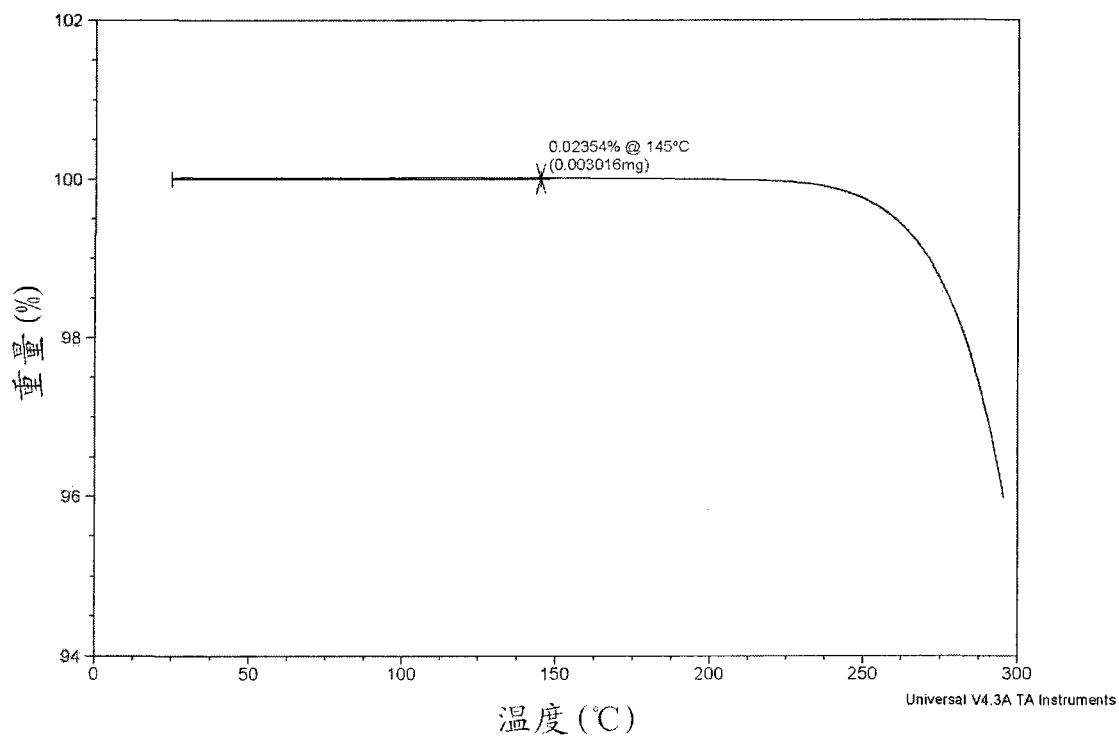


图 11

N-((1R,2S,5R)-5-(异丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-氧代-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)吡咯烷-1-基)环己基)乙酰胺，游离碱，型式N-2 (实施例2f)
的水份吸着等温线

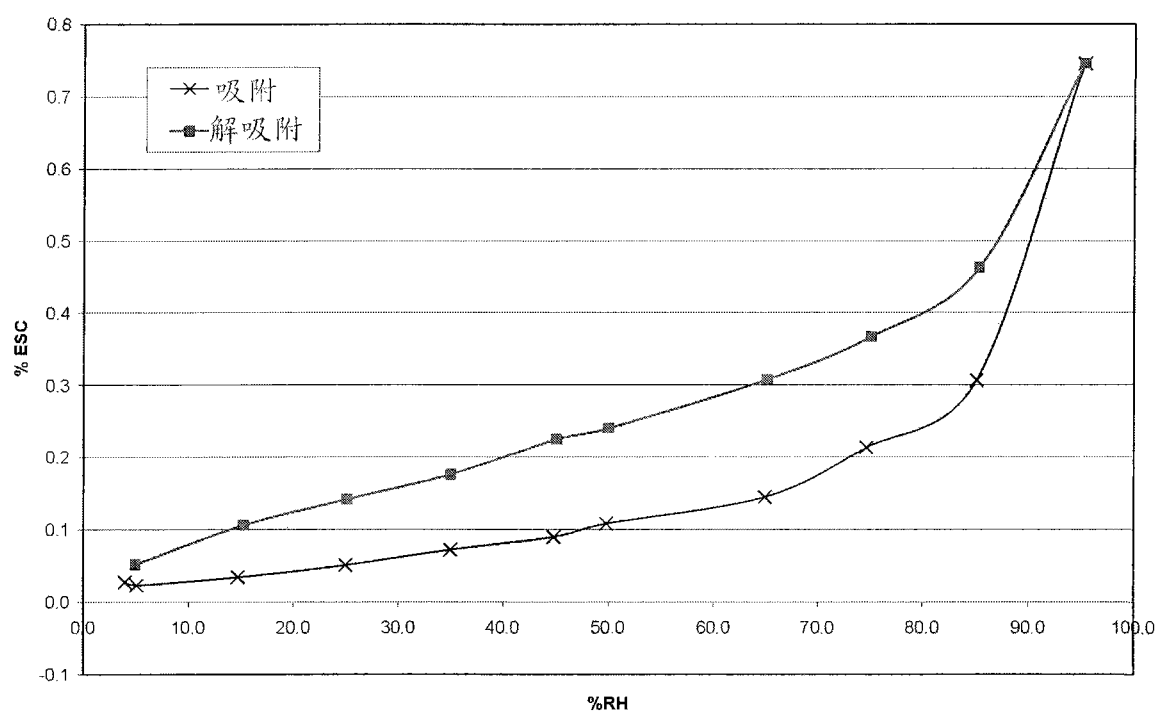


图 12

(1R,3R,4S)-3-乙酰胺基-4-((S)-3-(苄氧羰基氨基)-2-氧代吡咯烷-1-基)环己基氨基甲酸叔丁酯的X-射线晶体结构

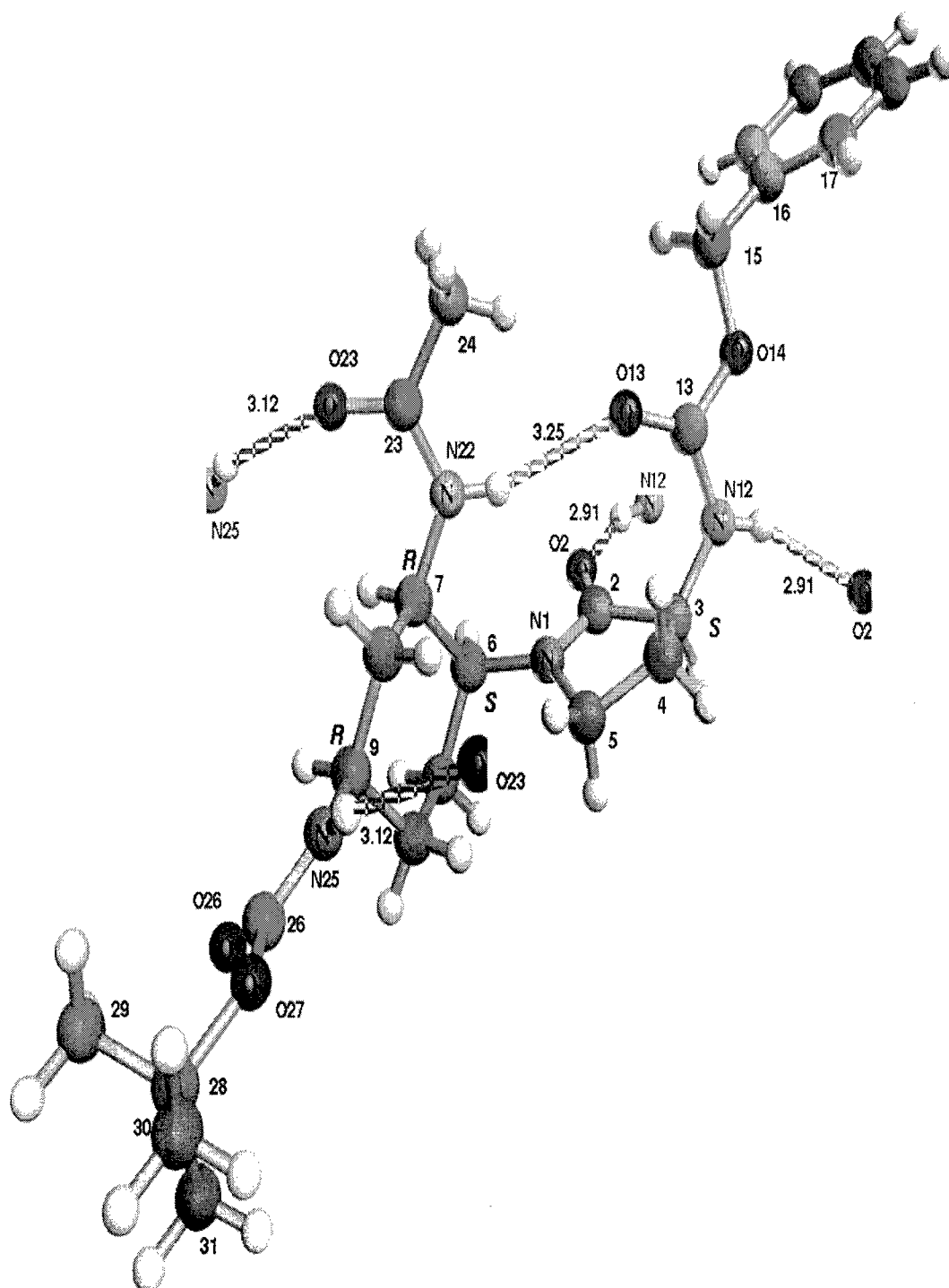


图 13

在hCCR2 KI小鼠中的48小时TG腹膜炎模型：单细胞/巨噬细胞浸润至腹膜腔中的实施例1抑制作用(分类细胞计数)

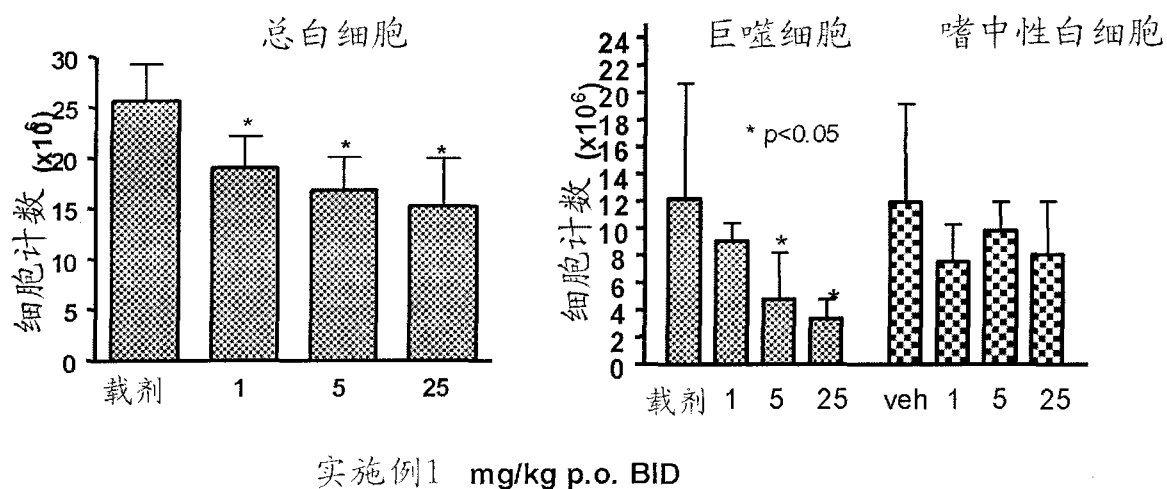


图 14

在hCCR2 KI小鼠中的48小时TG腹膜炎模型：单细胞/巨噬细胞浸润至腹膜腔中的实施例1抑制作用(FACS分析)

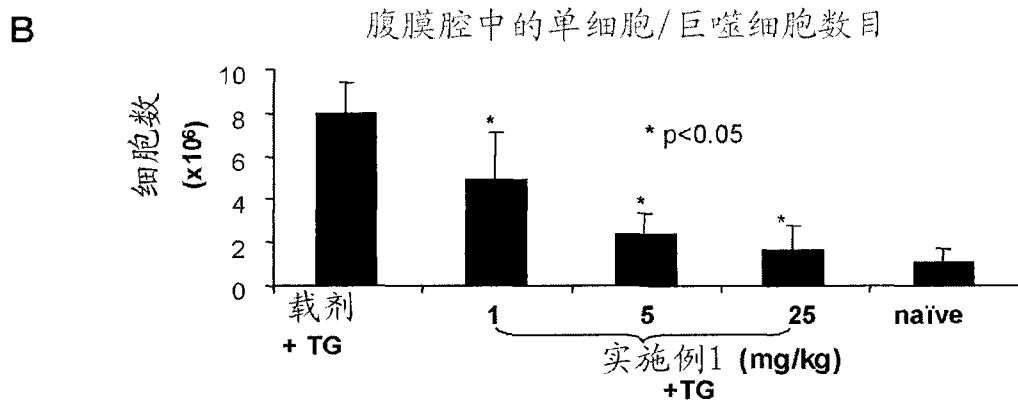
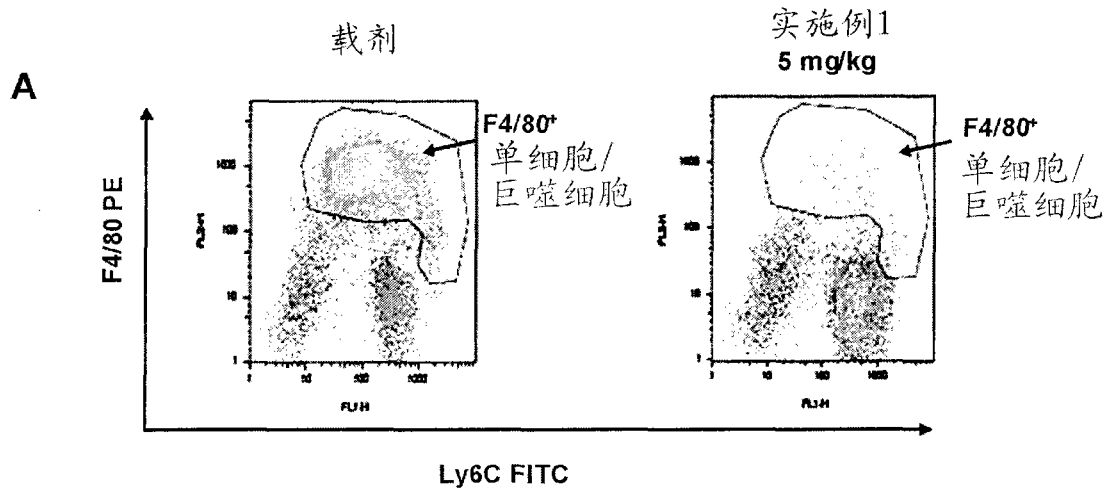


图 15

在hCCR2 KI小鼠中的EAE: 实施例1治疗的临床评分

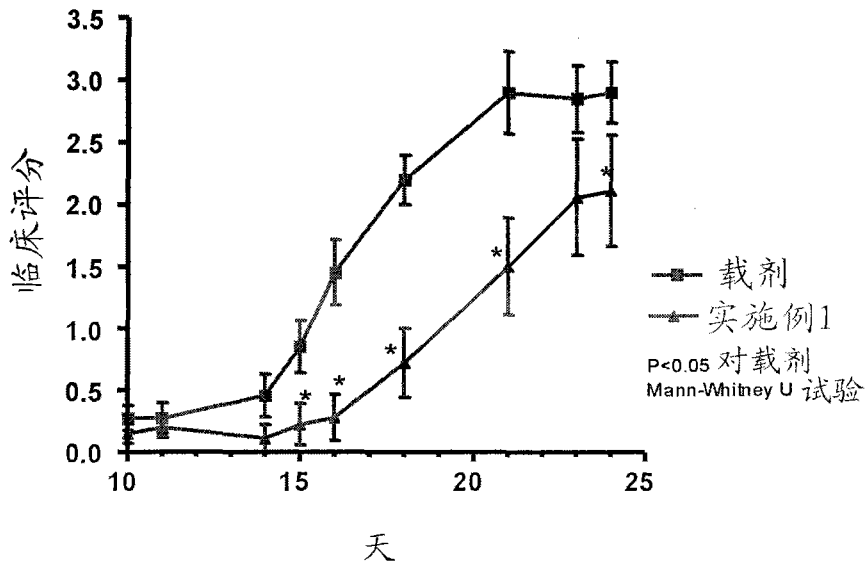


图 16