



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103936716 B

(45)授权公告日 2016.09.07

(21)申请号 201410175377.0

理查德·D·威尔逊 罗斯·严

(22)申请日 2010.04.16

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103936716 A

代理人 章蕾

(43)申请公布日 2014.07.23

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C07D 401/12(2006.01)

61/172,039 2009.04.23 US

A61K 31/4709(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61P 11/00(2006.01)

201080017581.X 2010.04.16

A61P 11/06(2006.01)

(73)专利权人 施万呼吸有限责任公司
地址 美国加利福尼亚州

(56)对比文件

US 2006/0035931 A1,2006.02.16,

US 7141671 B2,2006.11.28,

(72)发明人 阿达姆·休斯 丹尼尔·卞 陈燕
梅丽莎·弗勒里
约翰·R·雅各布森
埃里克·L·斯唐厄兰

WO 2007/090859 A1,2007.08.16,

审查员 李帅

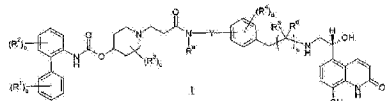
权利要求书2页 说明书83页

(54)发明名称

具蕈毒碱受体拮抗剂和β2肾上腺素受体激动剂活性的二酰胺化合物

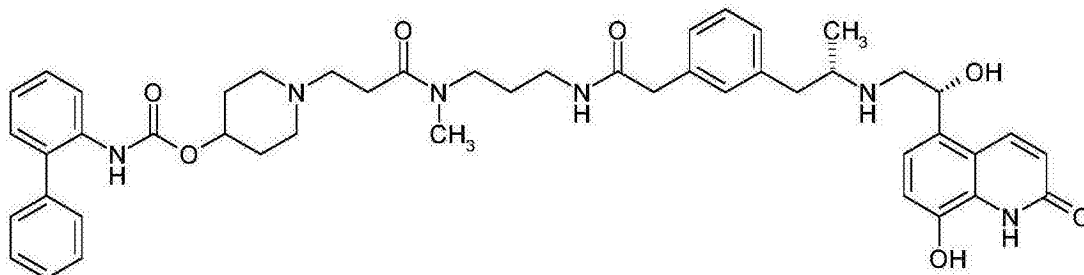
(57)摘要

本发明涉及一种式I化合物;或其医药学上可接受的盐。所述化合物同时具有蕈毒碱受体拮抗剂与β2肾上腺素受体激动剂活性。本发明还涉及包含所述化合物的医药组合物、用于制备所述化合物的方法和中间物,以及使用所述化合物作为支气管扩张剂来治疗肺部病症的方法。



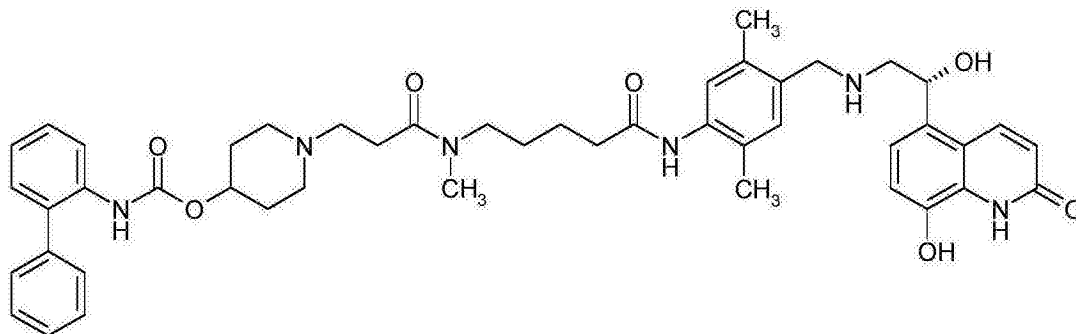
1. 一种选自如下的化合物，

(a) 联苯-2-基氨基甲酸1-[2-({3-[2-(3-((S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酰基氨基]-丙基)甲基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯：



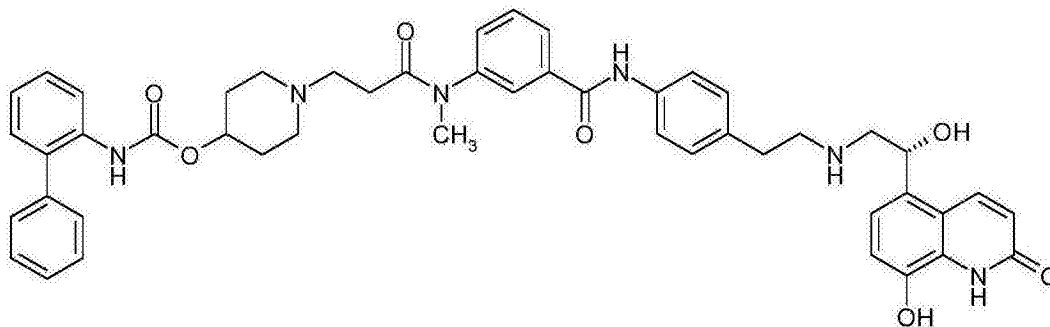
或其医药学上可接受的盐；

(b) 联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{4-(4-{{(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基}甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基}丁基)甲基氨基甲酰基}乙基)-哌啶-4-基酯：



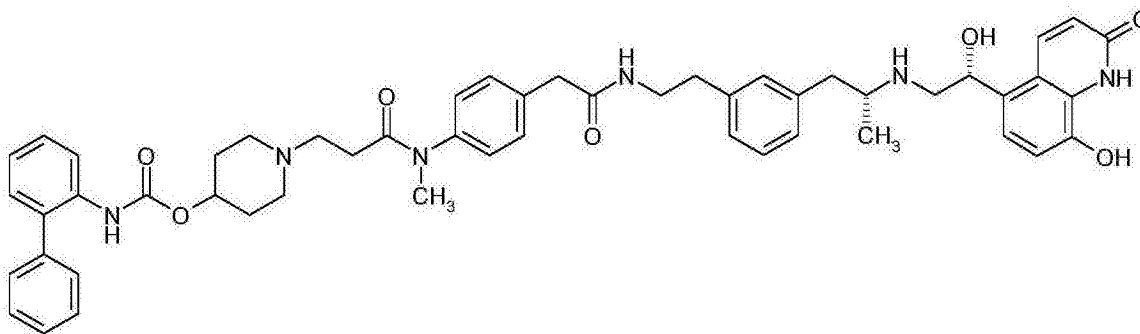
或其医药学上可接受的盐；

(c) 联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]乙基}苯基氨基甲酰基)苯基}甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯：



或其医药学上可接受的盐；以及

(d) 联苯-2-基氨基甲酸1-{2-[(4-[[2-(3-((R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酰基氨基]甲基)苯基)-甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯：



或其医药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为联苯-2-基氨基甲酸1-[2-({3-[2-(3-((S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酰基氨基]-丙基}甲基氨甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯或其医药学上可接受的盐。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{4-(4-{{[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基氨甲酰基}丁基]甲基氨甲酰基}乙基)-哌啶-4-基酯或其医药学上可接受的盐。

4. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(4-{{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]乙基}苯基氨甲酰基}苯基]甲基氨甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯或其医药学上可接受的盐。

5. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为联苯-2-基氨基甲酸1-{{2-[(4-{{2-{{3-{{(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苯基)乙基氨甲酰基}甲基}苯基)-甲基氨甲酰基}乙基}哌啶-4-基酯或其医药学上可接受的盐。

6. 一种医药组合物,其包含根据权利要求1至5中任一权利要求所述的化合物或其医药学上可接受的盐;及医药学上可接受的载剂。

7. 根据权利要求6所述的医药组合物,其中所述组合物包含另一治疗剂。

8. 根据权利要求7所述的医药组合物,其中所述治疗剂为类固醇消炎剂或其医药学上可接受的盐或溶剂化物。

9. 根据权利要求8所述的医药组合物,其中所述类固醇消炎剂为皮质类固醇或其医药学上可接受的盐或溶剂化物。

10. 一种权利要求1至5中任一权利要求所述的化合物的用途,其用于制造药剂,所述药剂用于治疗由蕈毒碱受体或 β_2 肾上腺素受体介导的医学病状的疗法。

11. 一种权利要求1至5中任一权利要求所述的化合物的用途,其用于制造用于治疗肺部病症的药剂。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述肺部病症为慢性阻塞性肺病或哮喘。

具蕈毒碱受体拮抗剂和 β_2 肾上腺素受体激动剂活性的二酰胺化合物

[0001] 本申请是申请日为2010年4月16日,申请号为“201080017581.X”,发明名称为“具蕈毒碱受体拮抗剂和 β_2 肾上腺素受体激动剂活性的二酰胺化合物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及具蕈毒碱受体拮抗剂和 β_2 肾上腺素受体激动剂活性的新颖二酰胺化合物。本发明还涉及包含所述化合物的医药组合物、用于制备所述化合物的方法和中间物,以及使用所述化合物作为支气管扩张剂来治疗肺部病症的方法。

背景技术

[0003] 通常用支气管扩张药来治疗例如慢性阻塞性肺病(COPD)和哮喘等肺部病症。参见例如泽塔斯基(Ziedalski)等人,慢性阻塞性肺病的管理进展(Advances in the Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease),药物治疗专家评论(Expert Opin.Pharmacother.), (2003)4(7),1063-1082;塔希金(Tashkin)等人,长效支气管扩张药在管理稳定COPD方面的作用(The Role of Long-Acting Bronchodilators in the Management of Stable COPD),胸(Chest),2004:125;249-259;及多诺赫(Donohue),哮喘和COPD中的治疗反应(Therapeutic Responses in Asthma and COPD:Bronchodilators),胸(Chest),2004:126;125-137。这些支气管扩张药通常使用手持式吸入器装置通过吸入投予。

[0004] 常用支气管扩张剂通常具有蕈毒碱受体拮抗剂活性(即抗胆碱剂)或 β_2 肾上腺素受体(肾上腺素受体)激动剂活性。近来,已报导在同一分子中同时具蕈毒碱受体拮抗剂与 β_2 肾上腺素受体激动剂(MABA)活性的化合物。举例来说,2006年11月28日颁予的美国专利第7,141,671号揭示同时具蕈毒碱受体拮抗剂与 β_2 肾上腺素受体激动剂活性的联苯化合物。

[0005] 预期双重作用的MABA化合物尤其适用于治疗肺部病症,因为这些化合物可经调配成单一治疗剂并以单一治疗剂形式投予,而且一旦投予,其就会经由两种不同且可能协同起效的作用模式提供支气管扩张作用。另外,MABA化合物有可能与例如吸入式皮质类固醇(ICS)等消炎剂组合,以在单一吸入器中仅使用两种治疗剂(MABA+ICS)而提供三重治疗。

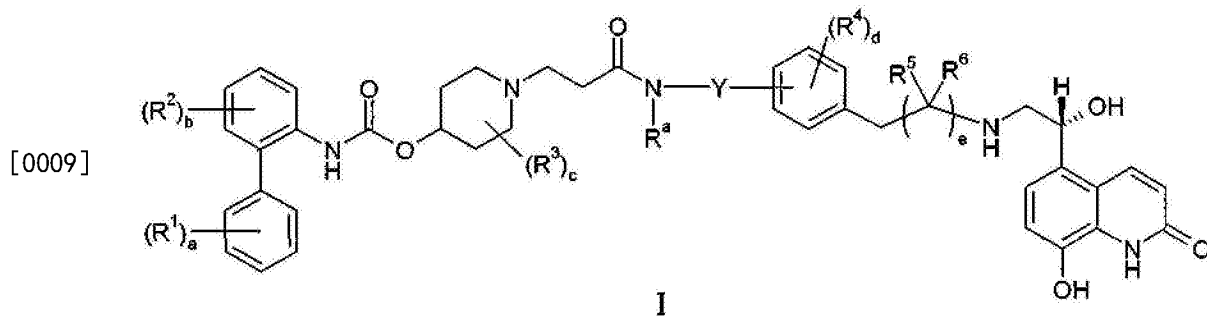
[0006] 因此,需要存在新颖MABA化合物。具体说来,需要存在极有效地作为蕈毒碱受体拮抗剂与 β_2 肾上腺素受体激动剂的新颖MABA化合物。另外,具有较长作用持续时间的MABA化合物(即在通过吸入投予后提供至少约24小时的显著支气管扩张作用的化合物)尤其适用于治疗需要每日一次投予支气管扩张剂的某些肺部病症。

发明内容

[0007] 本发明涉及同时具有蕈毒碱受体拮抗剂与 β_2 肾上腺素受体激动剂活性的新颖二

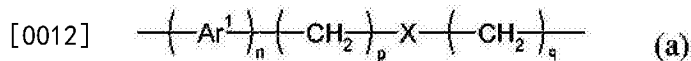
酰胺化合物。所述化合物在通过吸入授予哺乳动物时产生支气管扩张作用。在一些情况下，已发现本发明化合物具有较长作用持续时间，即在投药后产生至少约24小时的支气管扩张作用。因此，预期本发明化合物适用作且有利于作为支气管扩张剂以治疗肺部病症。

[0008] 一方面，本发明涉及一种式I化合物：



[0010] 其中

[0011] Y为式(a)的基团：



[0013] 且Y相对于 $\text{---CH}_2\text{---}(\text{CR}^5\text{R}^6)_e\text{---}$ 基团连接于亚苯基环的3位或4位；

[0014] X选自 ---C(O)NH--- 和 ---NHC(O)--- ；

[0015] Ar^1 选自苯-1,3-亚基和苯-1,4-亚基，其中所述亚苯基未经取代或经1至3个独立地选自 C_{1-3} 烷基、 $\text{---O---}(\text{C}_{1-3}$ 烷基)和卤基的取代基取代；

[0016] 各 R^1 独立地选自 C_{1-3} 烷基、 $\text{---O---}(\text{C}_{1-3}$ 烷基)、羟基和卤基；

[0017] 各 R^2 独立地选自 C_{1-3} 烷基、 $\text{---O---}(\text{C}_{1-3}$ 烷基)和卤基；

[0018] 各 R^3 独立地选自 C_{1-3} 烷基；或两个 R^3 基团联接形成 C_{1-3} 亚烷基、 C_{2-3} 亚烯基或环氧乙烷-2,3-二基；

[0019] 各 R^4 独立地选自 C_{1-3} 烷基、 $\text{---O---}(\text{C}_{1-3}$ 烷基)和卤基；

[0020] R^5 选自氢、甲基和乙基；

[0021] R^6 选自氢、甲基和乙基；

[0022] R^a 选自 C_{1-6} 烷基；

[0023] a为0、1、2或3；

[0024] b为0、1、2或3；

[0025] c为0、1、2、3或4；

[0026] d为0、1、2或3；

[0027] e为0或1；

[0028] n为0或1；

[0029] p为0、1、2、3、4、5或6；限制条件为当n为0时，p为1、2、3、4、5或6；

[0030] q为0、1、2、3、4、5或6；

[0031] 或其医药学上可接受的盐。

[0032] 如下文所用，除非另外说明，否则短语“式I化合物”意思指式I化合物或其医药学上可接受的盐；即，此短语意思指呈游离碱形式或呈医药学上可接受的盐形式的式I化合物。

[0033] 另一方面,本发明涉及一种医药组合物,其包含(a)式I化合物;(b)医药学上可接受的载剂。本发明这一方面包括例如适于通过吸入投予的医药组合物。

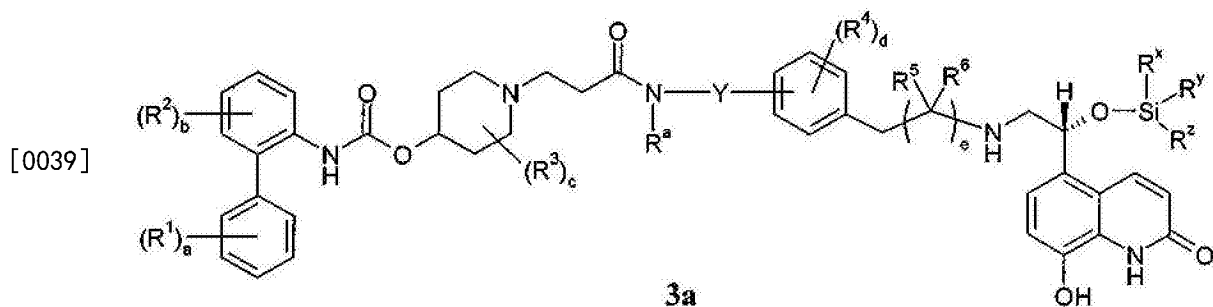
[0034] 另一方面,本发明涉及一种组合物,其包含(a)式I化合物,和(b)类固醇消炎剂(例如皮质类固醇)。除非另外说明,否则如本文所用的术语“类固醇消炎剂”包括所述药剂的医药学上可接受的盐和/或溶剂化物。本发明还涉及一种医药组合物,其包含(a)式I化合物;(b)类固醇消炎剂;和(c)医药学上可接受的载剂。本发明这些方面包括例如适于通过吸入投予的组合物。在一特定实施例中,类固醇消炎剂为皮质类固醇(例如糖皮质类固醇),例如丙酸氟替卡松(fluticasone propionate)或其溶剂化物;或糠酸氟替卡松(fluticasone furoate)或其溶剂化物。

[0035] 另一方面,本发明涉及一种治疗患者的肺部病症的方法,其包含向患者投予式I化合物。本发明这一方面包括例如治疗慢性阻塞性肺病或哮喘。本发明也包括同时或依序投予类固醇消炎剂与式I化合物来治疗肺部病症的方法。

[0036] 另一方面,本发明涉及一种在哺乳动物中产生支气管扩张作用的方法,其包含向哺乳动物投予产生支气管扩张作用的量的式I化合物。这一方面包括例如在人体中产生支气管扩张作用。

[0037] 另一方面,本发明涉及一种在包含蕈毒碱受体和 β_2 肾上腺素受体的生物系统或样品中拮抗蕈毒碱受体和使 β_2 肾上腺素受体增效的方法,所述方法包含用式I化合物处理生物系统或样品。这一方面包括体内与体外方法。

[0038] 本发明也涉及适用于制备式I化合物的方法和新颖中间物。在一个此实施例中,本发明涉及一种式3a化合物:



[0040] 或其盐,其中 R^x 和 R^y 独立地选自 C_{1-4} 烷基、苯基和 $-C_{1-4}$ 烷基-(苯基);且 R^z 选自 C_{1-4} 烷基、苯基、 $-C_{1-4}$ 烷基-(苯基)和 $-O-(C_{1-4}$ 烷基)。

[0041] 在另一方法方面中,本发明涉及一种制备式I化合物的方法,所述方法包含脱除式3a化合物的保护基以提供式I化合物。

[0042] 本文中描述本发明的其它方面和实施例。

具体实施方式

[0043] 在一个组合物方面中,本发明涉及式I化合物。这些化合物含有一个或一个以上手性中心,且因此所述化合物(及其中间物)可以外消旋混合物、纯立体异构体(即对映异构体或非对映异构体)、富集立体异构体的混合物等形式存在。除非另外说明,否则本文中展示或命名的在手性中心不具有确定立体化学的手性化合物拟包括在未确定立体中心的任何或所有可能的立体异构体变化形式。除非另外说明,否则特定立体异构体的描述或命

名意思指所述立体中心具有指定立体化学,同时应理解为也可存在少量其它立体异构体,限制条件为所述或所命名的化合物的效用不因存在另一立体异构体而消除。

[0044] 式I化合物也含有若干个碱性基团(例如氨基),且因此这些化合物可以游离碱或各种盐形式存在,例如单质子化盐形式或二质子化盐形式或其混合物。除非另外说明,否则所有所述形式均包括在本发明的范围内。

[0045] 本发明也包括经同位素标记的式I化合物,即,原子经具有相同原子序数但原子质量不同于自然界中占优势的原子质量的原子置换或增浓的式I化合物。可并入式I化合物中的同位素的实例包括(但不限于)²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹³N、¹⁵N、¹⁵O、¹⁷O、¹⁸O、³⁵S、³⁶Cl和¹⁸F。特别值得关注的是富含氘或碳-14的式I化合物,这些化合物可例如用于组织分布研究。特别值得关注的还有尤其在代谢位点富含氘的式I化合物,这些化合物预期具有较高代谢稳定性。特别值得关注的还有富含正电子发射同位素(例如 ¹¹C、¹⁸F、¹⁵O和¹³N)的式I化合物,这些化合物可例如用于正电子发射断层摄影法(Positron Emission Tomography,PET)研究中。

[0046] 另外,除非另有规定,否则适当时本发明化合物的所有顺-反或E/Z异构体(几何异构体)、互变异构形式和拓扑异构形式均包括在本发明的范围内。

[0047] 本文所述的化合物通常使用市售MDL[®] ISIS/Draw软件(塞米斯公司(Symyx),位于加利福尼亚州圣克拉拉(Santa Clara,California))的AutoNom特征来命名。

[0048] 代表性实施例

[0049] 以下取代基和值打算提供本发明各个方面和实施例的代表性实例。这些代表性值打算进一步限定和说明所述方面和实施例,且并不打算排除其它实施例或限制本发明的范围。就此而言,除非明确说明,否则优选特定值或取代基的陈述并不打算以任何方式自本发明排除其它值或取代基。

[0050] 在一实施例中,n为0,且Ar¹不存在。在另一实施例中,n为1,且Ar¹存在。

[0051] 当存在时,在一实施例中,Ar¹为未经取代的苯-1,3-亚基。在另一实施例中,Ar¹为经1至3个独立地选自C₁₋₃烷基、-O-(C₁₋₃烷基)和卤基的取代基取代的苯-1,3-亚基。在另一实施例中,Ar¹为经1或2个独立地选自甲基、乙基、甲氧基、氟或氯的取代基取代的苯-1,3-亚基。Ar¹的代表性实例包括(但不限于)苯-1,3-亚基、2-甲基苯-1,3-亚基、4-甲基苯-1,3-亚基、5-甲基苯-1,3-亚基、6-甲基苯-1,3-亚基、2-甲氧基苯-1,3-亚基、4-甲氧基苯-1,3-亚基、5-甲氧基苯-1,3-亚基、6-甲氧基苯-1,3-亚基、2-氟苯-1,3-亚基、4-氟苯-1,3-亚基、5-氟苯-1,3-亚基、6-氟苯-1,3-亚基、2-氯苯-1,3-亚基、4-氯苯-1,3-亚基、5-氯苯-1,3-亚基、6-氯苯-1,3-亚基、2,4-二甲基苯-1,3-亚基、2,5-二甲基苯-1,3-亚基、2,6-二甲基苯-1,3-亚基、4,6-二甲基苯-1,3-亚基、2-氯-5-甲氧基苯-1,3-亚基和5-氯-2-甲氧基苯-1,3-亚基。在一特定实施例中,Ar¹为苯-1,3-亚基或6-甲基苯-1,3-亚基。

[0052] 在另一实施例中,Ar¹为未经取代的苯-1,4-亚基。在另一实施例中,Ar¹为经1至3个独立地选自C₁₋₃烷基、-O-(C₁₋₃烷基)和卤基的取代基取代的苯-1,4-亚基。在另一实施例中,Ar¹为经1或2个独立地选自甲基、乙基、甲氧基、氟或氯的取代基取代的苯-1,4-亚基。Ar¹的代表性实例包括(但不限于)苯-1,4-亚基、2-甲基苯-1,4-亚基、3-甲基苯-1,4-亚基、5-甲基苯-1,4-亚基、6-甲基苯-1,4-亚基、2-甲氧基苯-1,4-亚基、3-甲氧基苯-1,4-亚基、5-甲氧基苯-1,4-亚基、6-甲氧基苯-1,4-亚基、2-氟苯-1,4-亚基、3-氟苯-1,4-亚基、5-氟苯-1,4-亚基、6-氟苯-1,4-亚基、2-氯苯-1,4-亚基、3-氯苯-1,4-亚基、5-氯苯-1,4-亚基、6-氯

苯-1,4-亚基、2,3-二甲基苯-1,4-亚基、2,5-二甲基苯-1,4-亚基、2,6-二甲基苯-1,4-亚基、3,5-二甲基苯-1,4-亚基、2-氯-5-甲氧基苯-1,4-亚基和5-氯-2-甲氧基苯-1,4-亚基。

[0053] 在一特定实施例中,Ar¹为苯-1,3-亚基、苯-1,4-亚基或6-甲基苯-1,3-亚基。

[0054] 在个别实施例中,p为0、1、2、3、4、5或6;限制条件为当n为0时,p不可为0。另外,在一实施例中,当n为0且X为-NHC(O)-时,则p通常不为1。代表性-(CH₂)_p-基团包括-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-和-(CH₂)₆-。在一特定实施例中,p为0、1、2、3或4。

[0055] 在个别实施例中,q为0、1、2、3、4、5或6。代表性-(CH₂)_q-基团包括-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-和-(CH₂)₆-。在一特定实施例中,q为0、1或2。

[0056] 在一实施例中,X为-C(O)NH-。在另一实施例中,X为-NHC(O)-。

[0057] 在一特定实施例中,Y形成式-(CH₂)_p-X-(CH₂)_q-的基团,其中X、p和q如本文中所定义。代表性实例包括:

[0058] -(CH₂)_p-C(O)NH-(CH₂)_q-;和

[0059] -(CH₂)_p-NHC(O)-(CH₂)_q-。

[0060] 在另一特定实施例中,Y形成式-(CH₂)_p-X-的基团,其中X和p如本文中所定义。代表性实例包括:

[0061] -(CH₂)_p-C(O)NH-;和

[0062] -(CH₂)_p-NHC(O)-。

[0063] 在另一特定实施例中,Y形成式-Ar¹-(CH₂)_p-X-(CH₂)_q-的基团,其中Ar¹、X、p和q如本文中所定义。代表性实例包括:

[0064] -(苯-1,3-亚基)-(CH₂)_p-C(O)NH-(CH₂)_q-;

[0065] -(苯-1,3-亚基)-(CH₂)_p-NHC(O)-(CH₂)_q-;

[0066] -(苯-1,4-亚基)-(CH₂)_p-C(O)NH-(CH₂)_q-;和

[0067] -(苯-1,4-亚基)-(CH₂)_p-NHC(O)-(CH₂)_q-;

[0068] 其中所述苯-1,3-亚基或苯-1,4-亚基未经取代或如本文中所定义经取代。

[0069] 在另一特定实施例中,Y形成式-Ar¹-(CH₂)_p-X-的基团,其中Ar¹、X和p如本文中所定义。代表性实例包括:

[0070] -(苯-1,3-亚基)-(CH₂)_p-C(O)NH-;

[0071] -(苯-1,3-亚基)-(CH₂)_p-NHC(O)-;

[0072] -(苯-1,4-亚基)-(CH₂)_p-C(O)NH-;和

[0073] -(苯-1,4-亚基)-(CH₂)_p-NHC(O)-;

[0074] 其中所述苯-1,3-亚基或苯-1,4-亚基未经取代或如本文中所定义经取代。

[0075] 在另一特定实施例中,Y形成式-Ar¹-X-(CH₂)_q-的基团,其中Ar¹、X和q如本文中所定义。代表性实例包括:

[0076] -(苯-1,3-亚基)-C(O)NH-(CH₂)_q-;

[0077] -(苯-1,3-亚基)-NHC(O)-(CH₂)_q-;

[0078] -(苯-1,4-亚基)-C(O)NH-(CH₂)_q-;和

[0079] -(苯-1,4-亚基)-NHC(O)-(CH₂)_q-;

[0080] 其中所述苯-1,3-亚基或苯-1,4-亚基未经取代或如本文中所定义经取代。

[0081] 在另一特定实施例中,Y形成式-Ar¹-X-的基团,其中Ar¹和X如本文中所定义。代表

性实例包括:

[0082] $-(\text{苯-1,3-亚基})-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$;

[0083] $-(\text{苯-1,3-亚基})-\text{NHC}(\text{O})-$;

[0084] $-(\text{苯-1,4-亚基})-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$;和

[0085] $-(\text{苯-1,4-亚基})-\text{NHC}(\text{O})-$;

[0086] 其中所述苯-1,3-亚基或苯-1,4-亚基未经取代或如本文中所定义经取代。

[0087] 在一实施例中, Y相对于 $-\text{CH}_2-(\text{CR}^5\text{R}^6)_e-$ 基团连接于亚苯基环的3位。在另一实施例中, Y相对于 $-\text{CH}_2-(\text{CR}^5\text{R}^6)_e-$ 基团连接于亚苯基环的4位。

[0088] 在一实施例中, a为0, 且 R^1 不存在。在其它个别实施例中, a为1、2或3, 即, 一个、两个或三个 R^1 基团存在于 R^1 所连接苯环的任何可用位置。举例来说, 当a为1时, R^1 可处于 R^1 所连接苯环的2位、3位、4位、5位或6位; 当a为2时, R^1 基团可处于 R^1 所连接苯环的2,3位、2,4位、2,5位、2,6位、3,4位或3,5位; 且当a为3时, R^1 基团可处于 R^1 所连接苯环的2,3,4位、2,3,5位、2,3,6位、2,4,5位、2,4,6位或3,4,5位。

[0089] 当存在时, 在一实施例中, 各 R^1 独立地选自 C_{1-3} 烷基、 $-\text{O}-(\text{C}_{1-3}\text{烷基})$ 、羟基和卤基。在另一实施例中, 各 R^1 独立地选自 C_{1-3} 烷基、 $-\text{O}-(\text{C}_{1-3}\text{烷基})$ 和卤基。在另一实施例中, 各 R^1 独立地选自甲基、乙基、甲氧基、氟、氯和溴。

[0090] 在一实施例中, b为0, 且 R^2 不存在。在其它个别实施例中, b为1、2或3, 即, 一个、两个或三个 R^2 基团存在于 R^2 所连接亚苯基环的任何可用位置。举例来说, 当b为1时, R^2 基团可处于 R^2 所连接亚苯-1,2-基环的3位、4位、5位或6位; 当b为2时, R^2 基团可处于 R^2 所连接亚苯-1,2-基环的3,4位、3,5位、3,6位、4,5位、4,6位或5,6位; 且当b为3时, R^2 基团可处于 R^2 所连接亚苯-1,2-基环的3,4,5位、3,4,6位或4,5,6位。

[0091] 当存在时, 在一实施例中, 各 R^2 独立地选自 C_{1-3} 烷基、 $-\text{O}-(\text{C}_{1-3}\text{烷基})$ 和卤基。在另一实施例中, 各 R^2 独立地选自卤基。在另一实施例中, 各 R^2 独立地选自甲基、乙基、甲氧基、氟、氯和溴。

[0092] 在一实施例中, c为0, 且 R^2 不存在。在其它个别实施例中, c为1、2、3或4, 即, 一个、两个、三个或四个 R^3 基团存在于 R^3 所连接哌啶-1,4-基环的任何可用位置。

[0093] 当存在时, 在一实施例中, 各 R^3 独立地选自 C_{1-3} 烷基。在另一实施例中, 各 R^3 为甲基。代表性 R^3 基团包括甲基、乙基、正丙基和异丙基。

[0094] 在另一实施例中, 两个 R^3 基团联接形成 C_{1-3} 亚烷基或 C_{2-3} 亚烯基或环氧乙烷-2,3-二基。代表性基团包括 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ 。举例来说, 处于哌啶环上2位和6位的两个 R^3 基团可联接形成亚乙基桥(即, 哌啶环与所述 R^3 基团形成8-氮杂双环[3.2.1]辛烷环); 或处于哌啶环上1位和4位的两个 R^3 基团可联接形成亚乙基桥(即, 哌啶环与所述 R^3 基团形成1-氮杂双环[2.2.2]辛烷环); 或处于哌啶环上2位和6位的两个 R^3 基团可联接形成亚乙烯基桥(即, 哌啶环与所述 R^3 基团形成8-氮杂双环[3.2.1]辛-6-烯环)。在此实施例中, 也可存在如本文中所定义的其他 R^3 基团。

[0095] 在另一实施例中, 两个 R^3 基团联接形成环氧乙烷-2,3-二基。举例来说, 处于哌啶环上2位和6位的两个 R^3 基团可联接形成3-氧杂三环[3.3.1.0^{2,4}]壬烷环。在此实施例中, 也可存在如本文中所定义的其他 R^3 基团。

[0096] 在一实施例中, d为0, 且 R^4 不存在。

[0097] 在其它个别实施例中,d为1、2或3,即,一个、两个或三个R⁴基团可连接于R⁴所连接亚苯基环的任何可用位置。举例来说,当d为1且Y连接于亚苯基环的3位时,R⁴基团可处于R⁴所连接苯-1,3-亚基环的2位、4位、5位或6位。当d为1且Y连接于亚苯基环的4位时,R⁴基团可处于例如R⁴所连接苯-1,4-亚基环的2位、3位、5位或6位。

[0098] 当d为2且Y连接于亚苯基环的3位时,R⁴基团可处于例如R⁴所连接苯-1,3-亚基环的2,4位、2,5位、2,6位、4,5位、4,6位或5,6位。当d为2且Y连接于亚苯基环的4位时,R⁴基团可处于例如R⁴所连接苯-1,4-亚基环的2,3位、2,5位、2,6位、3,5位、3,6位或5,6位。

[0099] 当d为3且Y连接于亚苯基环的3位时,R⁴基团可处于例如R⁴所连接亚苯基环的2,4,5位、2,4,6位、2,5,6位或4,5,6位。当d为3且Y连接于亚苯基环的4位时,R⁴基团可处于例如R⁴所连接亚苯基环的2,3,5位、2,3,6位、2,5,6位或3,5,6位。

[0100] 当存在时,在一实施例中,各R⁴独立地选自C₁₋₃烷基、-O-(C₁₋₃烷基)和卤基。在另一实施例中,各R⁴独立地选自甲基、乙基、甲氧基、氟、氯和溴。在一特定实施例中,R⁴选自甲基、甲氧基、氯和氟。在另一特定实施例中,d为2,且各R⁴为甲基。在另一特定实施例中,d为2,且一个R⁴为甲氧基,而另一个R⁴为氯。

[0101] 在一实施例中,e为0,且-CR⁵R⁶-不存在。在另一实施例中,e为1。

[0102] 当存在时,在一实施例中,R⁵为氢。在另一实施例中,R⁵为甲基。在另一实施例中,R⁵为乙基。

[0103] 当存在时,在一实施例中,R⁶为氢。在另一实施例中,R⁶为甲基。在另一实施例中,R⁶为乙基。在一特定实施例中,R⁶为氢,且R⁵为氢或甲基。在另一特定实施例中,R⁵与R⁶都为甲基。

[0104] 当R⁵≠R⁶时,R⁵和R⁶所连接的碳具手性。在一实施例中,此立体中心具有(R)构型。在另一实施例中,此立体中心具有(S)构型。在特定实施例中,基团-CH₂-(CR⁵R⁶)_e-选自-CH₂-、-CH₂CH₂-、-CH₂C*(H)(CH₃)-,其中C*具有(R)构型、(S)构型或为外消旋。

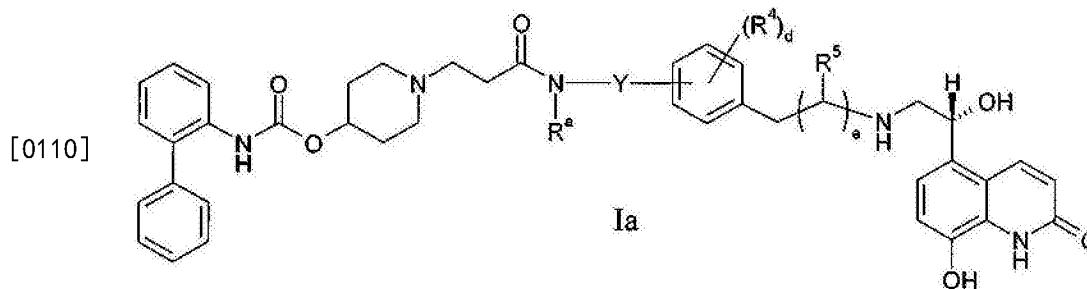
[0105] 在一实施例中,R^a选自C₁₋₆烷基。在另一实施例中,R^a为C₁₋₄烷基。在另一实施例中,R^a为C₁₋₃烷基。代表性R^a基团包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基和正己基。在一特定实施例中,R^a为甲基。

[0106] 在一实施例中,式I化合物为游离碱。在另一实施例中,式I化合物为单盐形式。在另一实施例中,式I化合物为二盐形式。

[0107] 代表性子类分组

[0108] 除非另外说明,否则以下子类式和分组打算提供本发明各个方面和实施例的代表性实例,且因此其不欲排除其它实施例或限制实施例或本发明的范围。

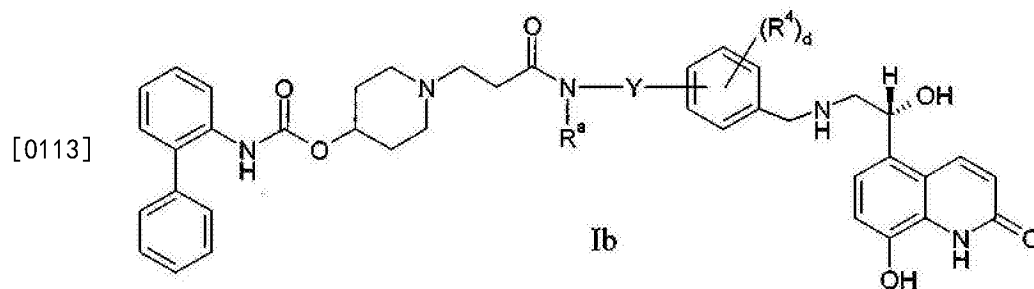
[0109] 本发明的一个特定实施例涉及一种式Ia化合物:



[0111] 即,一种式I化合物,其中a、b和c为0(即,R¹、R²和R³不存在),R⁶为氢,且R⁴、R⁵、R^a、Y、

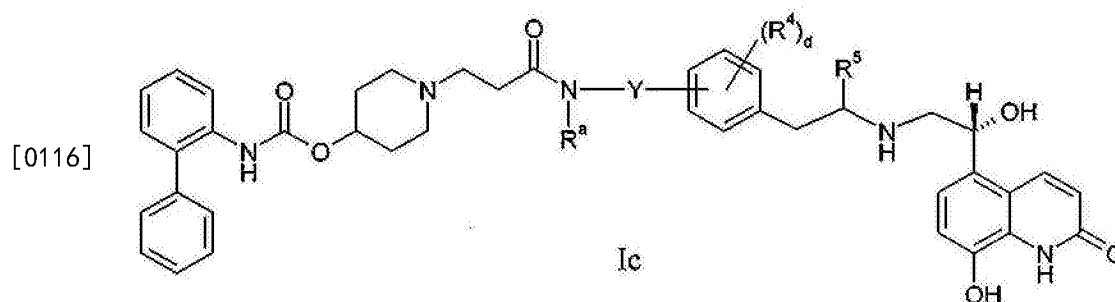
d和e如本文中所定义,或其医药学上可接受的盐。

[0112] 另一特定实施例涉及一种式Ib化合物:



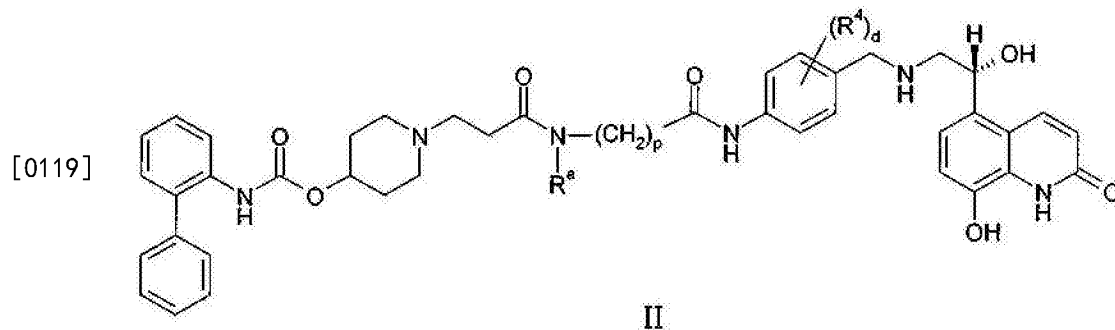
[0114] 即,一种式I化合物,其中a、b、c和e为0(即, R^1 、 R^2 、 R^3 和 CR^5R^6 不存在),且 R^4 、 R^a 、Y和d如本文中所定义,或其医药学上可接受的盐。

[0115] 另一特定实施例涉及一种式Ic化合物:



[0117] 即,一种式I化合物,其中a、b和c为0(即, R^1 、 R^2 及 R^3 不存在), R^6 为氢,e为1,且 R^4 、 R^5 、 R^a 、Y和d如本文中所定义,或其医药学上可接受的盐。

[0118] 另一特定实施例涉及一种式II化合物:

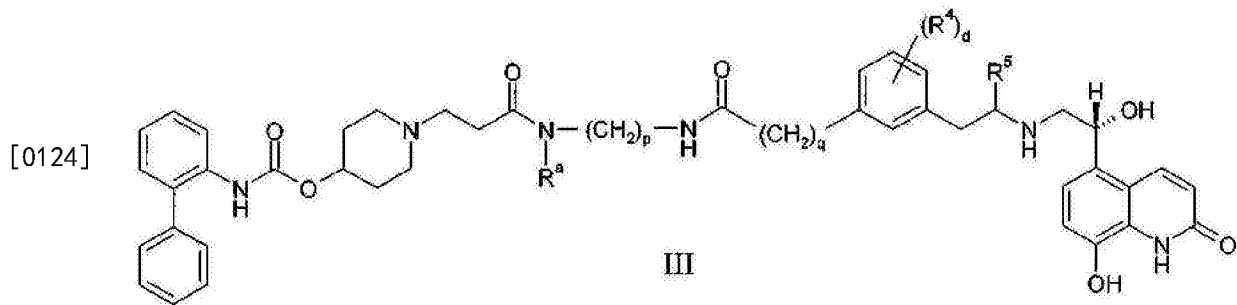


[0120] 即,一种式I化合物,其中a、b、c和e为0(即, R^1 、 R^2 、 R^3 和 CR^5R^6 不存在),Y形成式 $-(CH_2)_p-C(=O)NH-$ 的基团,且 R^4 、 R^a 、d和p如本文中所定义,或其医药学上可接受的盐。

[0121] 在式II化合物的一个特定实施例中, R^a 为甲基;p为3或4;且d为0、1或2;且各 R^4 独立地选自甲基、甲氧基、氯和氟。

[0122] 在式II化合物的另一特定实施例中, R^a 为甲基;p为4;且d为0、1或2;且各 R^4 独立地选自甲基、甲氧基、氯和氟。如表III中所示,在大鼠艾因托芬分析法(Einthoven assay)中测试的此实施例的所有化合物(100 μ g)在24小时均展现支气管保护作用。

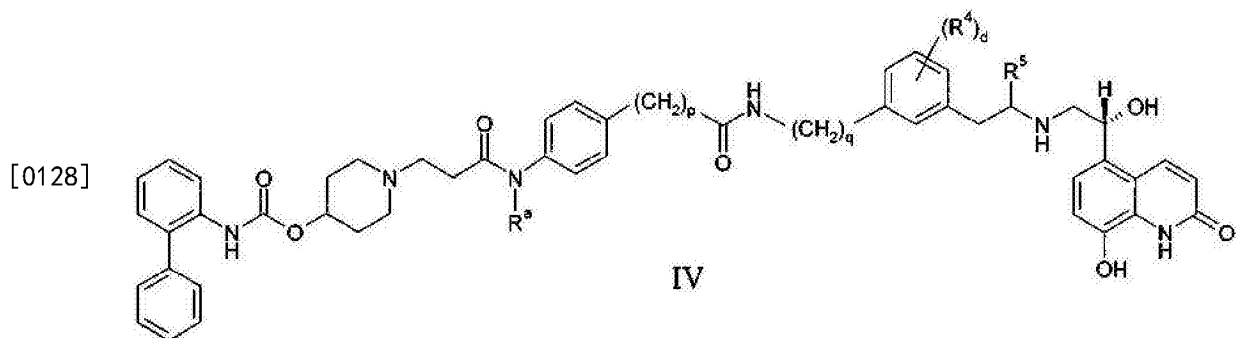
[0123] 另一特定实施例涉及一种式III化合物:



[0125] 即,一种式I化合物,其中a、b和c为0(即, R^1 、 R^2 和 R^3 不存在), R^6 为氢,e为1,Y形成式 $-(CH_2)_p-NHC(O)-(CH_2)_q-$ 的基团,且 R^4 、 R^5 、 R^a 、d、p和q如本文中所定义,或其医药学上可接受的盐。

[0126] 在式III化合物的一个特定实施例中, R^a 为甲基;p为3或4;q为1; R^5 为甲基;且d为0。

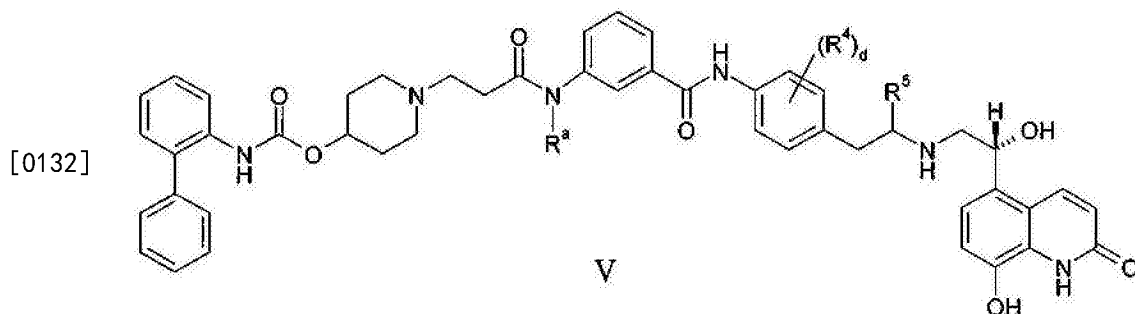
[0127] 在另一实施例中,本发明涉及一种式IV化合物:



[0129] 即,一种式I化合物,其中a、b和c为0(即, R^1 、 R^2 和 R^3 不存在), R^6 为氢,e为1,Y形成式 $-Ar^1-(CH_2)_p-C(O)NH-(CH_2)_q-$ 的基团, Ar^1 为苯-1,4-亚基,且 R^4 、 R^5 、 R^a 、d、p和q如本文中所定义,或其医药学上可接受的盐。

[0130] 在式IV化合物的一个特定实施例中, R^a 为甲基;p为1;q为1或2; R^5 为氢或甲基;d为0或1;且 R^4 选自甲基、甲氧基和氟。

[0131] 在另一实施例中,本发明涉及一种式V化合物:



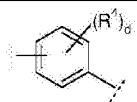
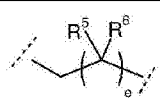
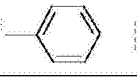
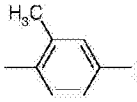
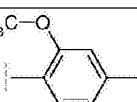
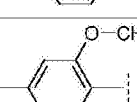
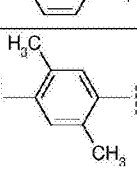
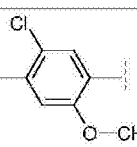
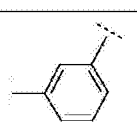
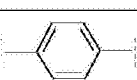
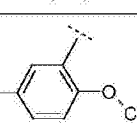
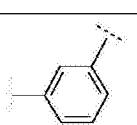
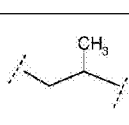
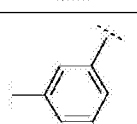
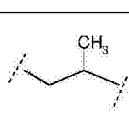
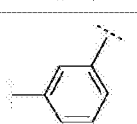
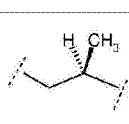
[0133] 即,一种式I化合物,其中a、b和c为0(即, R^1 、 R^2 和 R^3 不存在), R^6 为氢,e为1,Y形成式 $-Ar^1-C(O)NH-$ 的基团, Ar^1 为苯-1,3-亚基,且 R^4 、 R^5 、 R^a 和d如本文中所定义,或其医药学上可接受的盐。

[0134] 在式V化合物的一个特定实施例中, R^a 为甲基; R^5 为氢或甲基;d为0、1或2;且各 R^4 独立地选自甲基、甲氧基、氯和氟。

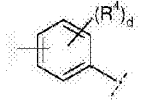
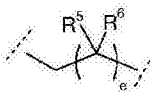
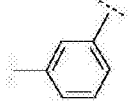
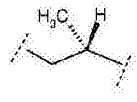
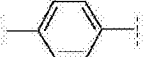
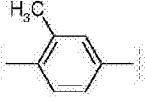
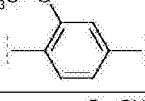
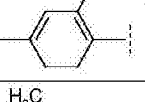
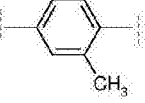
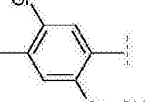

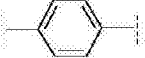
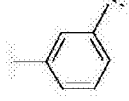
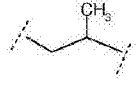
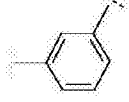
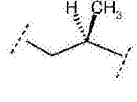
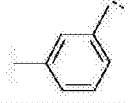
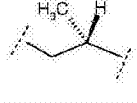
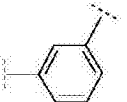
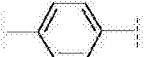
[0135] 式I化合物的特定实施例为a、b和c为0(即, R^1 、 R^2 和 R^3 不存在), R^a 为甲基;且 $(Ar^1)_n$ 、 $(CH_2)_p$ 、X、 $(CH_2)_q$ 、 $(R^4)_d$ (及其所连接的亚苯基环)和 $-CH_2(CR^5R^6)_e-$ 如表I中所定义的化合物:

[0136] 表I

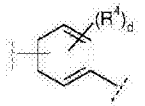
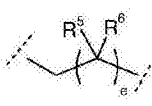
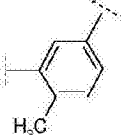

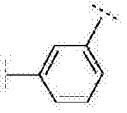
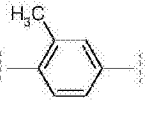
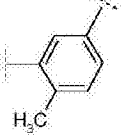
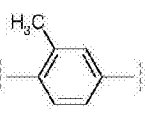
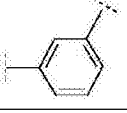
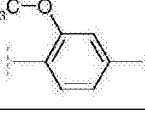
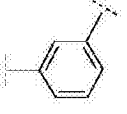
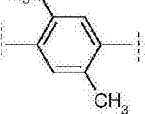
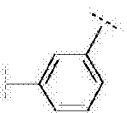
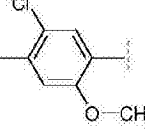
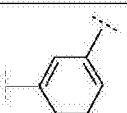
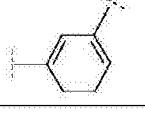
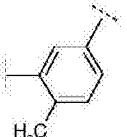
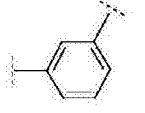
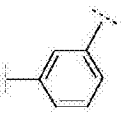
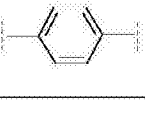
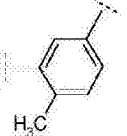
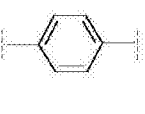
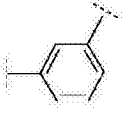
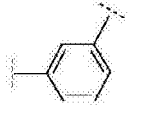
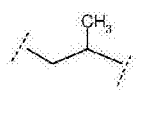
[0137]

ID	$(Ar^1)_n$	$(CH_2)_p$	X	$(CH_2)_q$		
I-1	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		CH_2
I-2	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		CH_2
I-3	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		CH_2
I-4	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		CH_2
I-5	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		CH_2
I-6	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		CH_2
I-7	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		$(CH_2)_2$
I-8	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		$(CH_2)_2$
I-9	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		$(CH_2)_2$
I-10	---	$(CH_2)_3$	C(O)NH	---		
I-11	---	$(CH_2)_3$	NHC(O)	CH_2		
I-12	---	$(CH_2)_3$	NHC(O)	CH_2		

[0138]

ID	$(Ar^d)_n$	$(CH_2)_p$	X	$(CH_2)_q$		
I-13	---	$(CH_2)_3$	NHC(O)	CH_2		
I-14	---	$(CH_2)_4$	C(O)NH	---		CH_2
I-15	---	$(CH_2)_4$	C(O)NH	---		CH_2
I-16	---	$(CH_2)_4$	C(O)NH	---		CH_2
I-17	---	$(CH_2)_4$	C(O)NH	---		CH_2
I-18	---	$(CH_2)_4$	C(O)NH	---		CH_2
I-19	---	$(CH_2)_4$	C(O)NH	---		CH_2
I-20	---	$(CH_2)_4$	C(O)NH	---		$(CH_2)_2$
I-21	---	$(CH_2)_4$	C(O)NH	---		$(CH_2)_2$
I-22	---	$(CH_2)_4$	NHC(O)	CH_2		
I-23	---	$(CH_2)_4$	NHC(O)	CH_2		
I-24	---	$(CH_2)_4$	NHC(O)	CH_2		
I-25		---	C(O)NH	---		CH_2

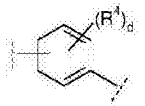
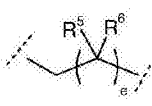
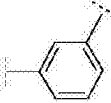
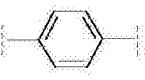
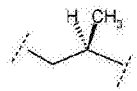
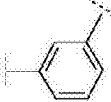
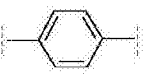
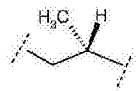
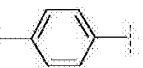
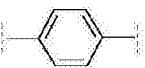
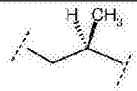
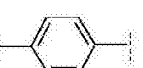

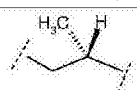
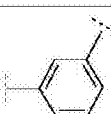
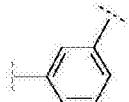
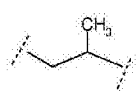
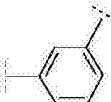
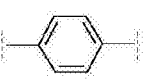
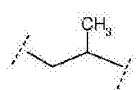
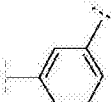
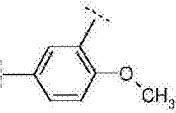
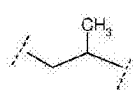
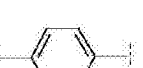
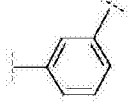
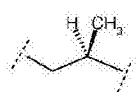
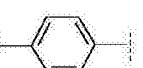
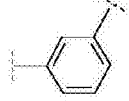
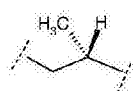
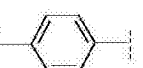
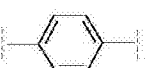
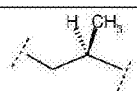
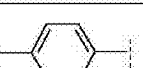
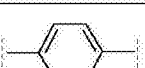
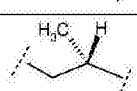
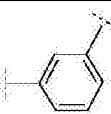
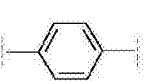
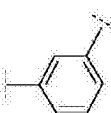
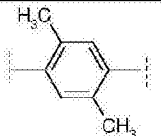
[0139]

ID	(Ar) ¹ _n	(CH ₂) _p	X	(CH ₂) _d		
I-26		---	C(O)NH	---		CH ₂
I-27		---	C(O)NH	---		CH ₂
I-28		---	C(O)NH	---		CH ₂
I-29		---	C(O)NH	---		CH ₂
I-30		---	C(O)NH	---		CH ₂
I-31		---	C(O)NH	---		CH ₂
I-32		---	C(O)NH	---		(CH ₂) ₂
I-33		---	C(O)NH	---		(CH ₂) ₂
I-34		---	C(O)NH	---		(CH ₂) ₂
I-35		---	C(O)NH	---		(CH ₂) ₂
I-36		---	C(O)NH	---		

[0140]

ID	$(Ar^1)_n$	$(CH_2)_p$	X	$(CH_2)_q$	$(R^1)_d$	$(R^5, R^6)_e$
I-37		---	C(O)NH	---		
I-38		---	C(O)NH	---		
I-39		---	C(O)NH	---		
I-40		---	C(O)NH	---		
I-41		---	C(O)NH	---		
I-42		---	C(O)NH	---		
I-43		---	C(O)NH	---		
I-44		---	C(O)NH	CH ₂		
I-45		---	C(O)NH	CH ₂		
I-46		---	C(O)NH	CH ₂		
I-47		---	C(O)NH	CH ₂		

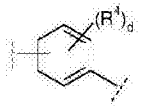
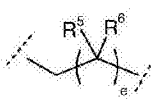
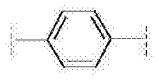
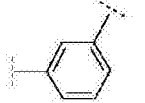
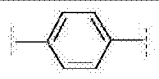
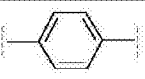
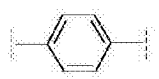
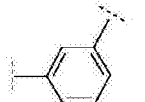
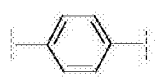
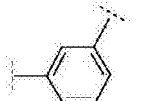
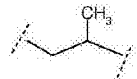
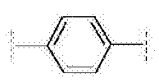
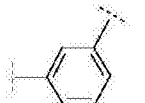
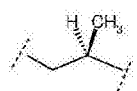
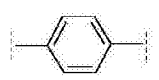
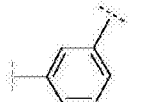
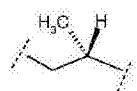
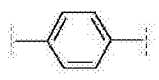
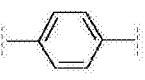
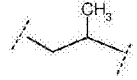
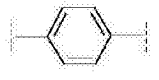
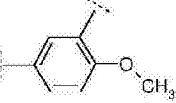
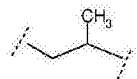
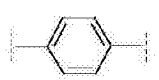
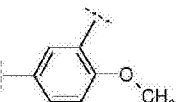
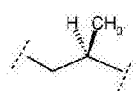
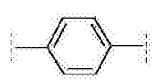
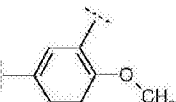
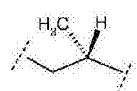
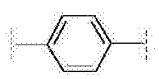
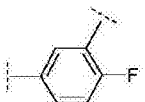
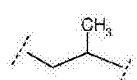
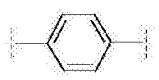
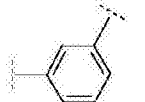
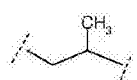
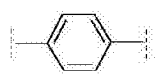
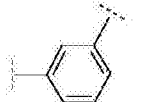
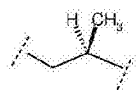
[0141]

ID	$(Ar^1)_n$	$(CH_2)_p$	X	$(CH_2)_q$		
I-48		---	C(O)NH	CH ₂		
I-49		---	C(O)NH	CH ₂		
I-50		---	C(O)NH	CH ₂		
I-51		---	C(O)NH	CH ₂		
I-52		---	NHC(O)	CH ₂		
I-53		---	NHC(O)	CH ₂		
I-54		---	NHC(O)	CH ₂		
I-55		---	C(O)NH	(CH ₂) ₂		
I-56		---	C(O)NH	(CH ₂) ₂		
I-57		---	C(O)NH	(CH ₂) ₂		
I-58		---	C(O)NH	(CH ₂) ₂		
I-59		CH ₂	C(O)NH	---		CH ₂
I-60		CH ₂	C(O)NH	---		CH ₂

[0142]

ID	$(Ar^1)_n$	$(CH_2)_p$	X	$(CH_2)_q$	$(R^1)_d$	$(R^5, R^6)_e$
I-61		CH ₂	C(O)NH	---		CH ₂
I-62		CH ₂	C(O)NH	---		(CH ₂) ₂
I-63		CH ₂	C(O)NH	---		(CH ₂) ₂
I-64		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		(CH ₂) ₂
I-65		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		(CH ₂) ₂
I-66		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		
I-67		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		
I-68		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		
I-69		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		
I-70		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		
I-71		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		
I-72		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		
I-73		CH ₂	C(O)NH	CH ₂		

[0143]

ID	$(Ar^1)_n$	$(CH_2)_p$	X	$(CH_2)_q$		
I-74		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		CH ₂
I-75		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		CH ₂
I-76		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		(CH ₂) ₂
I-77		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		
I-78		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		
I-79		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		
I-80		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		
I-81		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		
I-82		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		
I-83		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		
I-84		CH ₂	NHC(O)	CH ₂		
I-85		CH ₂	C(O)NH	(CH ₂) ₂		
I-86		CH ₂	C(O)NH	(CH ₂) ₂		

[0144]

ID	$(Ar^1)_n$	$(CH_2)_p$	X	$(CH_2)_q$	$(R^1)_d$	$(R^5, R^6)_e$
I-87		CH ₂	C(O)NH	(CH ₂) ₂		
I-88		CH ₂	C(O)NH	(CH ₂) ₂		
I-89		CH ₂	C(O)NH	(CH ₂) ₂		
I-90		CH ₂	C(O)NH	(CH ₂) ₂		
I-91		CH ₂	NHC(O)	(CH ₂) ₂		
I-92		CH ₂	NHC(O)	(CH ₂) ₂		
I-93		CH ₂	NHC(O)	(CH ₂) ₂		
I-94		CH ₂	NHC(O)	(CH ₂) ₂		
I-95		CH ₂	NHC(O)	(CH ₂) ₂		
I-96		(CH ₂) ₂	NHC(O)	CH ₂		CH ₂

[0145] 表I中所列的化合物可呈游离碱形式或可呈医药学上可接受的盐形式。特别值得关注的是在通过吸入投予后24小时显示支气管保护作用(例如在大鼠艾因托芬分析法中所测定)的表I化合物。

[0146] 定义

[0147] 除非另外说明,否则当描述本发明(包括其各个方面和实施例)时,以下术语具有以下含义。

[0148] 除非使用内容另外明确指出,否则单数术语“一”和“所述”包括相应复数术语。

[0149] 术语“烷基”意思指可为直链或分支链的单价饱和烃基。除非另外定义,否则所述烷基通常含有1至10个碳原子。代表性烷基包括例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲

丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基等。

[0150] 当对特定术语指定碳原子的具体数目时,碳原子数展示于所述术语前。举例来说,术语“C₁₋₃烷基”意思指具有1至3个碳原子的烷基,其中碳原子呈任何化学上可接受的构型,包括直链或分支链构型。

[0151] 术语“亚烷基”意思指可为直链或分支链的二价饱和烃基。除非另外定义,否则所述亚烷基通常含有1至10个碳原子。代表性亚烷基包括例如亚甲基、乙烷-1,2-二基(“亚乙基”)、丙烷-1,2-二基、丙烷-1,3-二基、丁烷-1,4-二基、戊烷-1,5-二基等。

[0152] 术语“氨基保护基”意思指适于防止氨基发生不当反应的保护基。代表性氨基保护基团包括(但不限于)叔丁氧基羰基(BOC)、三苯甲基(Tr)、苄氧基羰基(Cbz)、9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)、苄基、甲酰基、三甲基硅烷基(TMS)、叔丁基二甲基硅烷基(TBS)等。

[0153] 术语“羧基保护基”意思指适于防止羧基(即,-COOH)发生不当反应的保护基。代表性羧基保护基包括(但不限于)酯,例如甲酯、乙酯、叔丁酯、苄基(Bn)酯、对甲氧基苄基(PMB)酯、9-芴基甲基(Fm)酯、三甲基硅烷基(TMS)酯、叔丁基二甲基硅烷基(TBS, TBDMS)酯、二苯基甲基(二苯甲基, DPM)酯等。

[0154] 术语“卤基”意思指氟、氯、溴和碘。

[0155] 术语“羟基保护基”意思指适于防止羟基发生不当反应的保护基。代表性羟基保护基包括(但不限于)硅烷基,包括三(C₁₋₆烷基)硅烷基,例如三甲基硅烷基(TMS)、三乙基硅烷基(TEs)、叔丁基二甲基硅烷基(TBS)等;酯(酰基),包括C₁₋₆烷酰基,例如甲酰基、乙酰基等;芳基甲基,例如苄基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)、9-芴基甲基(Fm)、二苯基甲基(二苯甲基, DPM)等。另外,两个羟基也可经保护为亚烷基,例如通过例如与例如丙酮等酮反应形成的丙-2-亚基。

[0156] 术语“离去基”意思指在例如亲核取代反应等取代反应中可由另一官能团或原子置换的官能团或原子。举例来说,代表性离去基包括(但不限于)氯基、溴基和碘基;磺酸酯基,例如甲磺酸酯基、甲苯磺酸酯基、溴苯磺酸酯基、硝基苯磺酸酯基等;及酰氧基,例如乙酰氧基、三氟乙酰氧基等。

[0157] 除非另外说明,否则术语“微粉化”或“呈微粉化形式”意思指至少约90%粒子的直径小于约10 μ m的粒子。

[0158] 术语“医药学上可接受的盐”意思指可接受用于授予患者或哺乳动物(例如人类)的盐(例如,对于指定给药方案具有可接受的哺乳动物安全性的盐)。代表性医药学上可接受的盐包括乙酸盐、抗坏血酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、乙烷磺酸盐、乙二磺酸盐、反丁烯二酸盐、龙胆酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、谷氨酸盐、马尿酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、顺丁烯二酸盐、苹果酸盐、扁桃酸盐、甲烷磺酸盐、粘液酸盐、萘磺酸盐、萘-1,5-二磺酸盐、萘-2,6-二磺酸盐、烟碱酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、双羟萘酸盐、泛酸盐、磷酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、对甲苯磺酸盐和羟萘甲酸盐等。

[0159] 术语“其经保护的衍生物”意思指指定化合物的衍生物,其中所述化合物的一个或一个以上官能团经保护基或阻隔基保护或阻隔以免发生不当反应。可经保护的官能团包括例如羧基、氨基、羟基、硫醇基、羰基等。适用于所述官能团的保护基为所属领域技术人员众所周知,如由T.w. 格里尼(T.w. Greene)和P.G.M. 伍兹(P.G.M. Wuts),有机合成中的保护基

(Protecting groups in Organic Synthesis),第3版,威立出版公司(Wiley),纽约(New York),1999,以及其中引用的参考文献中的教示内容所例示。

[0160] 术语“其盐”意思指当酸的氢由阳离子(例如金属阳离子或有机阳离子等)置换时所形成的化合物。举例来说,阳离子可为式I化合物的质子化形式,即其中一个或一个以上氨基已经被酸质子化。通常,盐为医药学上可接受的盐,但这一点对于不打算投予患者的中间化合物的盐来说不是必需的。

[0161] 术语“溶剂化物”意思指由一个或一个以上溶质分子(即式I化合物或其医药学上可接受的盐)与一个或一个以上溶剂分子形成的复合物或聚集体。所述溶剂化物通常为溶质与溶剂具有实质上固定的摩尔比的结晶固体。代表性溶剂包括例如水、甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸及其类似物。当溶剂为水时,所形成的溶剂化物为水合物。

[0162] 术语“治疗有效量”意思指当投予需要治疗的患者时足以实现治疗的量。

[0163] 如本文所用的术语“治疗”意思指对于例如哺乳动物(例如人类)的患者的疾病或医学病状(例如COPD或哮喘)的治疗,其包括以下任一者或其组合:

[0164] (a)预防疾病或医学病状发生,即对于患者的预防性治疗;

[0165] (b)改善疾病或医学病状,即消除患者的疾病或医学病状,或使患者疾病或医学病状消退;

[0166] (c)抑制疾病或医学病状,即减缓或停滞患者的疾病或医学病状的发展;或

[0167] (d)减轻患者的疾病或医学病状的症状。

[0168] 本文中所使用的所有其它术语意欲具有如其所属领域技术人员所了解的其一般含义。

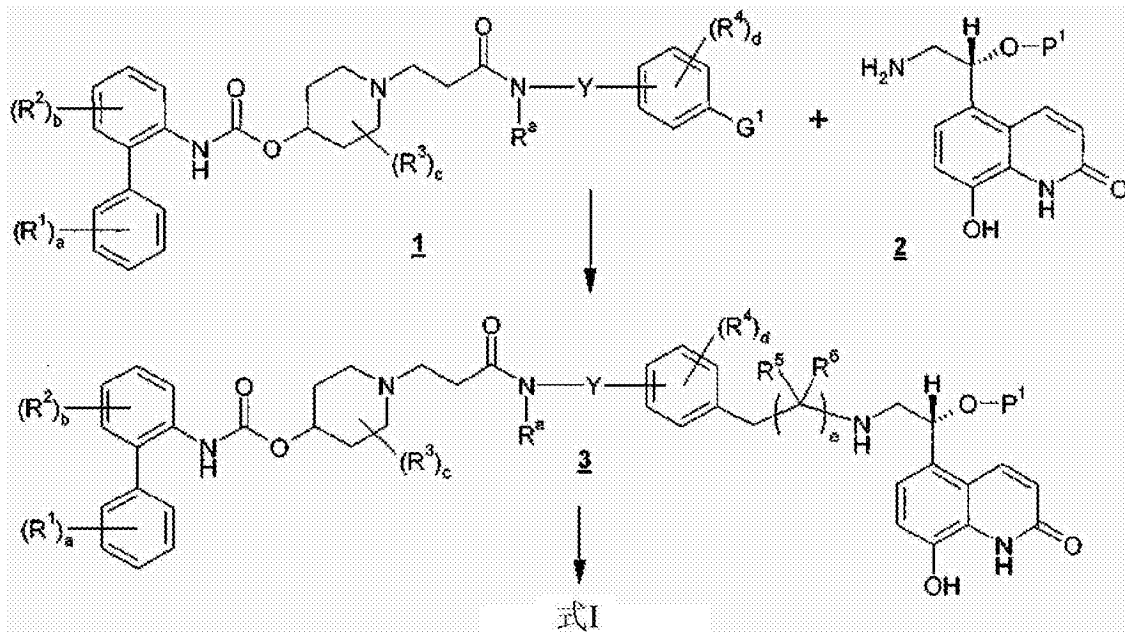
[0169] 一般合成程序

[0170] 本发明化合物及其中间物可根据以下一般方法和程序使用市售或常规制备的起始物质和试剂来制备。除非另外说明,否则以下方案中所用的取代基和代号(例如, R^1 、 R^2 、Y、a、b等)具有与本文其它地方所定义相同的含义。另外,除非另外说明,否则具有酸性或碱性原子或官能团的化合物可以盐形式使用或可制备成盐形式(在一些情况下,在特定反应中使用盐将需要在进行反应前使用常规程序将盐转化成非盐形式,例如游离碱形式)。

[0171] 方案1说明用于制备式I化合物(其中 R^6 为氢)的典型程序:

[0172] 方案1

[0173]



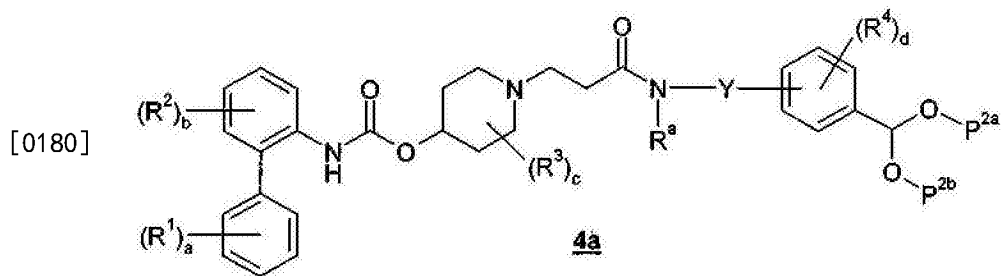
[0174] 其中

[0175] G^1 为-CHO或- $CH_2C(O)R^5$;且[0176] P^1 为羟基保护基,例如叔丁基二甲基硅烷基。

[0177] 在此程序中,使化合物1与约0.95摩尔当量至约1.5摩尔当量的化合物2在还原剂存在下反应,得到化合物3。任何适合的还原剂都可用于此反应中,包括(作为说明)金属氢化物试剂,例如硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠、氰基硼氢化钠等;或氢和金属催化剂,例如钯/碳,等等。此反应通常在约-20℃至约30℃范围内的温度(例如,约0℃至约5℃)下进行约1小时至约6小时,或直至反应实质上完成。通常,此反应是在例如二氯甲烷(DCM)、二氯乙烷等稀释剂中进行。稀释剂可任选含有质子性溶剂,例如甲醇等。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。或者,必要时,含有化合物3的反应混合物可不经进一步分离或纯化而直接用于下一合成步骤中。

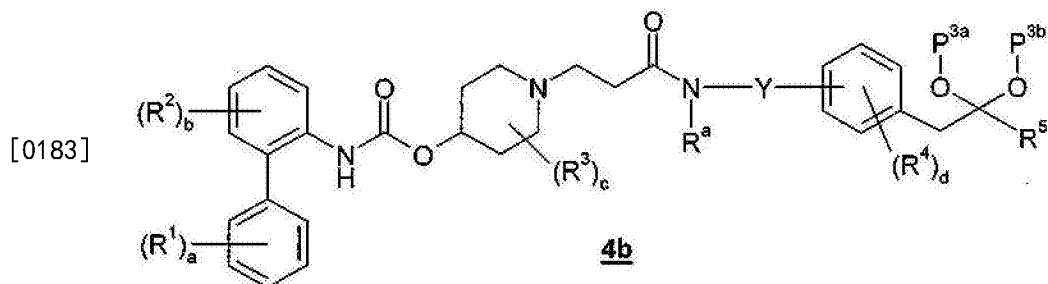
[0178] 随后脱除化合物3的保护基,得到式I化合物。用于脱除化合物3的保护基的特定条件将视所用保护基而定。举例来说,当 P^1 为例如叔丁基二甲基硅烷基、叔丁基二苯基硅烷基、二苯基甲基硅烷基、二叔丁基甲基硅烷基、叔丁氧基二苯基硅烷基等硅烷基保护基时(即,如本文中所定义的式3a化合物),通常通过使化合物3与氟离子源接触来进行此保护基脱除反应。在一特定实施例中,氟离子源为三氢氟化三乙胺。其它合适氟离子源包括四丁基氟化铵、含有18-冠-6的氟化钾、氟化氢、氢氟化吡啶等。此反应通常在约0℃至约50℃范围内的温度(例如,约10℃至约25℃)下进行约24小时至约72小时,或直至反应实质上完成。通常,此反应是在例如DCM、二氯乙烷等稀释剂中进行。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。

[0179] 通常通过脱除相应缩醛或缩酮中间物的保护基来制备式1化合物。举例来说,当 G^1 为-CHO时,通常通过脱除式4a中间物的保护基来制备式1化合物:



[0181] 其中P^{2a}和P^{2b}独立地选自C₁₋₆烷基,或P^{2a}与P^{2b}联接形成C₂₋₆亚烷基,通常为C₂₋₄亚烷基。

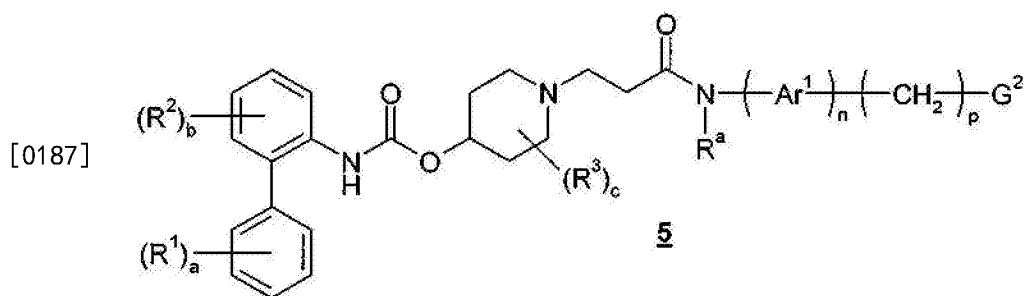
[0182] 类似地,当G¹为-CH₂C(O)R⁵时,通常通过脱除式4b中间物的保护基来制备式1化合物:



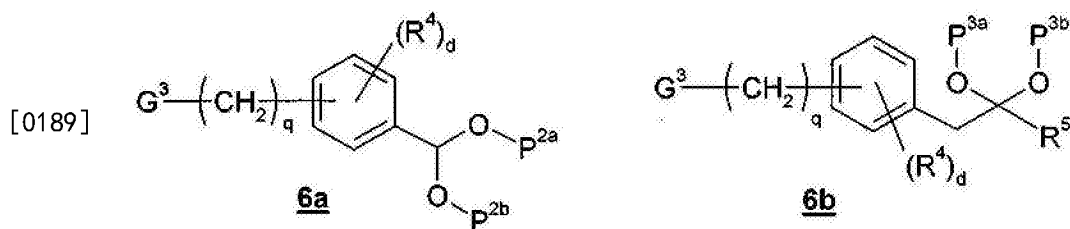
[0184] 其中P^{3a}和P^{3b}独立地选自C₁₋₆烷基,或P^{3a}与P^{3b}联接形成C₂₋₆亚烷基,通常为C₂₋₄亚烷基。

[0185] 通常通过使4a或4b与酸水溶液反应以使缩醛或缩酮基团水解且得到相应醛或酮化合物1来进行化合物4a或4b的保护基脱除。任何合适酸都可用于此反应中,包括例如盐酸、硫酸、甲烷磺酸、对甲苯磺酸等。水解反应通常在约0℃至约30℃范围内的温度(例如,约20℃至约25℃)下进行约1小时至约6小时,或直至反应实质上完成。通常,此反应是在例如甲醇、乙醇、异丙醇、二氯甲烷/乙醇、乙腈等稀释剂中进行。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。或者,含有化合物1的反应混合物可直接用于下一合成步骤中。

[0186] 式4a或4b的化合物通常是通过使式5化合物:



[0188] 与式6a或6b的化合物偶合来制备:



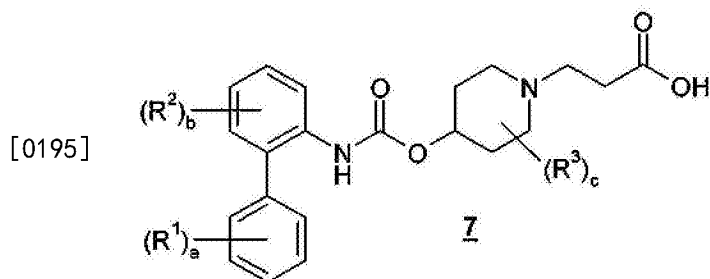
[0190] 其中

[0191] G^2 为 $-NH_2$ 且 G^3 为 $-COOH$;或 G^2 为 $-COOH$ 且 G^3 为 $-NH_2$ 。

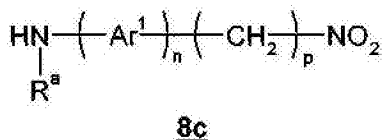
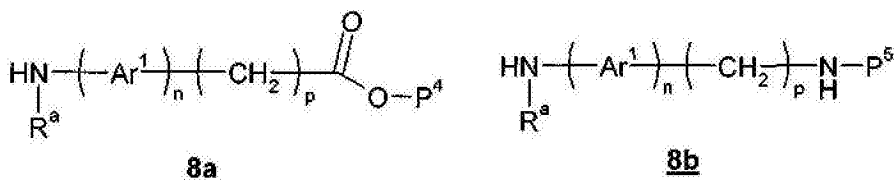
[0192] 化合物5与化合物6a或6b之间形成化合物4a或4b的偶合反应通常是使用羧酸-胺偶合试剂进行。任何合适的羧酸-胺偶合试剂都可用于此反应中,包括(作为说明)六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-三(二甲基氨基)膦(BOP);N,N'-羰基二咪唑(CDI);二环己基碳化二亚胺(DCC);3-(二乙氧基磷酰基氧基)-1,2,3-苯并三唑-4(3H)-酮(DEPBT);1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC HCl);六氟磷酸2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲脒(HATU);六氟磷酸2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲脒(HBTU);六氟磷酸2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基铵(HCTU);1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt);N-羟基苯并三唑(HOBT);六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-三吡咯烷基膦(PyBOP);六氟磷酸溴-三吡咯烷基膦(PyBrOP);四氟硼酸0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲脒(TATU);四氟硼酸2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲脒(TBTU);四氟硼酸N,N,N',N'-四甲基-0-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三唑-3-基)铀(TDBTU);四氟硼酸0-(N-丁二酰亚胺基)-1,1,3,3-四甲基铀(TSTU);及其组合,例如EDC与HOBT。

[0193] 偶合反应通常通过使约0.95摩尔当量至约1.5摩尔当量的胺化合物(5,当 G^2 为 $-NH_2$ 时;或6a或6b,当 G^3 为 $-NH_2$ 时)与羧酸(5,当 G^2 为 $-COOH$ 时;或6a或6b,当 G^3 为 $-COOH$ 时)在偶合试剂存在下反应来进行。通常使用相对于羧酸约1.0摩尔当量至约1.5摩尔当量范围内的量的偶合试剂。一般说来,此反应是在例如二异丙基乙胺(DIEA)、N-甲基吗啉(NMM)、三甲基吡啶、2,3,5,6-四甲基吡啶(TEMP)、2,6-二叔丁基-4-二甲基氨基吡啶(DBDMAP)等受阻胺存在下在例如二氯甲烷、四氢呋喃、1,4-二噁烷、乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮或其混合物等稀释剂中进行。所述反应通常在约 $-20^{\circ}C$ 至约 $50^{\circ}C$ 范围内的温度(例如,约 $20^{\circ}C$ 至约 $25^{\circ}C$)下进行约1小时至约30小时,或直至反应实质上完成。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。

[0194] 式5化合物通常通过使式7化合物:



[0196] 与式8a、8b或8c的化合物偶合来制备:



[0198] 其中P⁴为羧基保护基(例如C₁₋₆烷基,包括甲基、乙基、正丙基等;或苄基);且P⁵为氨基保护基(例如BOC、Fmoc、Cbz等)。当使用式8c化合物时,随后使用例如锌、锡或铁金属及酸(例如乙酸、盐酸等)或催化氢化的标准试剂和程序将硝基还原成氨基。在此实施例中,p通常为0。

[0199] 式8a、8b和8c的化合物可为市售,在此项技术中已知或可使用此项技术中已知程序的常规变化来制备。

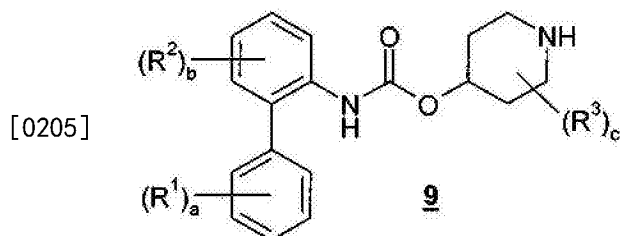
[0200] 代表性式8a化合物包括例如4-(甲基氨基)丁酸甲酯、5-(甲基氨基)戊酸甲酯、3-(甲基氨基)苯甲酸甲酯、4-(甲基氨基)苯甲酸甲酯、3-(甲基氨基)-4-甲基苯甲酸甲酯、[3-(甲基氨基)苄基]乙酸甲酯等。

[0201] 代表性式8b化合物包括例如(3-甲基氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯、(3-甲基氨基丙基)氨基甲酸9H-芴-9-基甲酯、(4-甲基氨基丁基)氨基甲酸叔丁酯、(4-甲基氨基丁基)氨基甲酸9H-芴-9-基甲酯、(3-甲基氨基苄基)氨基甲酸叔丁酯、(3-甲基氨基苄基)氨基甲酸9H-芴-9-基甲酯、(4-甲基氨基苄基)氨基甲酸叔丁酯、(4-甲基氨基苄基)氨基甲酸9H-芴-9-基甲酯、(3-甲基氨基苄基)氨基甲酸叔丁酯、(3-甲基氨基苄基)氨基甲酸9H-芴-9-基甲酯、(4-甲基氨基苄基)氨基甲酸叔丁酯、(4-甲基氨基苄基)氨基甲酸9H-芴-9-基甲酯等。

[0202] 代表性式8c化合物包括例如N-甲基-3-硝基苯胺、N-甲基-4-硝基苯胺、N-乙基-3-硝基苯胺、N-乙基-4-硝基苯胺等。

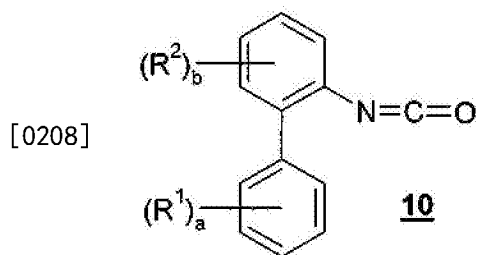
[0203] 化合物7与化合物8a或8b之间形成化合物5的羧酸-胺偶合反应通常是使用本文中关于羧酸与胺(例如,化合物5与化合物6a或6b)的偶合所述的试剂和反应条件来进行。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。

[0204] 式7化合物通常通过使式9化合物:

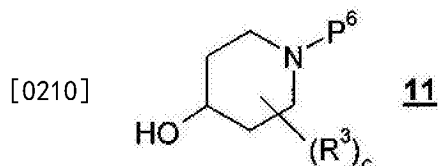


[0206] 与约0.95摩尔当量至约1.5摩尔当量的丙烯酸反应来制备。此反应通常在例如二氯甲烷等稀释剂中在约20℃至约70℃范围内的温度(例如,约50℃)下进行约6小时至约30小时,或直至反应实质上完成。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。

[0207] 式9化合物为此项技术中已知的或可使用此项技术中已知程序的常规变化来制备。举例来说,用于制备所述化合物的程序可见于美国专利申请公开案第U.S.2004/0167167A1号及R.内藤(R.Naito)等人,化学与药学通报(Chem.Pharm.Bull.),46(8)1286-1294(1998)中。作为说明,式9化合物通常通过使式10化合物:



[0209] 与式11的醇反应来制备：



[0211] 其中P⁶为氨基保护基，例如苄基、BOC、Fmoc、Cbz等。

[0212] 代表性式10化合物包括例如异氰酸2-(苄基)苯酯、异氰酸2-(苄基)-5-甲基苯酯、异氰酸2-(3-氯苄基)-4,6-二氟苯酯、异氰酸2-(苄基)-6-氟苯酯、异氰酸2-(苄基)-5-溴苯酯、异氰酸2-(4-溴苄基)-5-溴苯酯、异氰酸2-(苄基)-4-甲氧基苯酯、异氰酸2-(4-甲氧基苄基)苯酯、异氰酸2-(苄基)-5-甲氧基苯酯等。

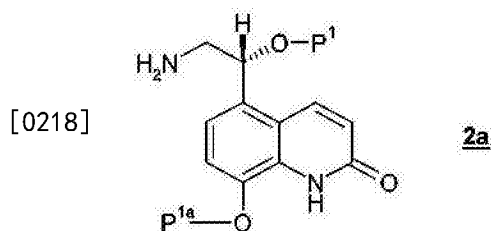
[0213] 代表性式11化合物包括例如4-羟基-1-苄基哌啶、4-羟基哌啶-1-甲酸叔丁酯、4-羟基哌啶-1-甲酸9H-芴-9-基甲酯、4-羟基-4-甲基-1-苄基哌啶、2-苄基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-醇、2-苄基-2-氮杂双环[2.2.2]辛-5-醇、8-苄基-8-氮杂双环[3.2.1]辛-6-烯-3-醇、3-苄基-3-氮杂双环[3.2.1]辛-8-醇、8-苄基-8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-醇、3-苄基-3-氮杂双环[3.3.1]壬-9-醇、9-苄基-9-氮杂双环[3.3.1]壬-3-醇、8-苄基降托品碱(nortropine)、8-苄基降假托品碱(norpseudotropine)等。

[0214] 此反应通常通过使10与约0.95摩尔当量至约1.2摩尔当量的11在约20℃至约100℃范围内的温度(例如,约60℃至约80℃)下反应约6小时至约24小时或直至反应实质上完成来进行。必要时,此反应可在例如二氯甲烷、甲苯等稀释剂中进行。或者,此反应可在不存在稀释剂的情况下进行。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。或者,反应混合物不经产物分离即直接用于下一合成步骤中。

[0215] 随后使用常规程序移除氨基保护基P⁶,得到化合物9。举例来说,当P⁶为苄基时,通常在例如钯催化剂等催化剂存在下使用氢或甲酸铵来进行保护基脱除反应。代表性催化剂包括(作为说明)钯/碳、氢氧化钯/碳等。此反应通常在约20℃至约50℃范围内的温度(例如,约40℃)下进行约6小时至约24小时,或直至反应实质上完成。通常,此反应在例如甲醇、乙醇、异丙醇等稀释剂中进行。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离化合物9。

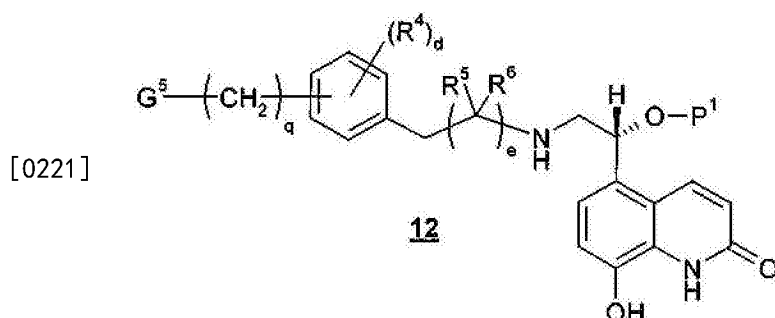
[0216] 式2化合物是此项技术中已知的或可使用已知程序由市售起始物质和试剂来制备。举例来说,P¹为叔丁基二甲基硅烷基的式2化合物的制备描述于2006年2月16日公开的美国专利申请公开案第2006/0035931号中。可用于P¹的其它保护基包括例如二甲基异丙基硅烷基、二乙基异丙基硅烷基、二甲基己基硅烷基、叔丁基二苯基硅烷基、二苯基甲基硅烷基等。

[0217] 另外,必要时,2的羟基也可经保护,即,可使用式2a化合物:



[0219] 其中P^{1a}为羟基保护基,例如苄基或4-甲氧基苄基。举例来说,P¹为叔丁基二甲基硅烷基且羟基经保护为4-甲氧基苄基的式2a化合物的制备描述于W02008/096129中。当使用2a时,例如3、12等中间物通常将含有P^{1a}基团。随后使用常规程序和试剂移除P^{1a}。举例来说,当P^{1a}为苄基时,通常在例如钯催化剂等催化剂存在下使用氢或甲酸铵来进行保护基脱除反应。当P^{1a}为4-甲氧基苄基时,可在酸性水解条件(例如30%TFA的DCM溶液)下移除此基团。

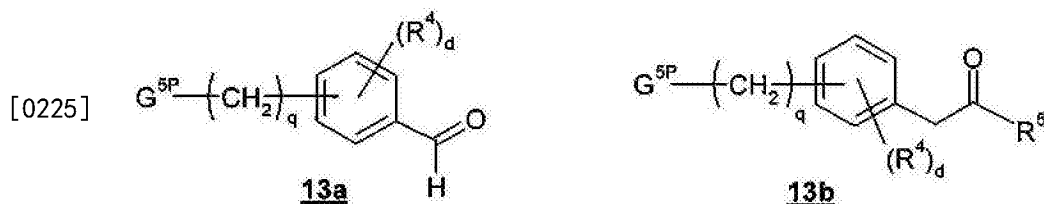
[0220] 或者,通过使式5化合物与式12化合物偶合来制各式I化合物:



[0222] 其中G⁵为-COOH(当G²为-NH₂时);或G⁵为-NH₂(当G²为-COOH时)。

[0223] 化合物5与化合物12之间的羧酸-胺偶合反应通常是使用本文中关于羧酸与胺(例如,化合物5与化合物6a或6b)的偶合所述的试剂和反应条件来进行。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。随后使用标准试剂和条件脱除所得产物的保护基(例如,移除P¹),得到式I化合物。

[0224] 式12化合物是通过使式2化合物与式13a或13b的化合物:



[0226] 在还原剂存在下反应来制备;其中G^{5P}选自:

[0227] -COOP⁷,其中P⁷为羧基保护基(例如C₁₋₆烷基,包括甲基、乙基、正丙基等;或苄基);
及

[0228] -NHP⁸,其中P⁸为氨基保护基(例如Boc、Fmoc、Cbz等)。或者,G^{5P}为硝基,或G^{5P}-(CH₂)_q-为NC-(CH₂)_{q-1}-,其中硝基或氰基随后使用标准试剂和程序还原成氨基。

[0229] 化合物2与化合物13a或13b的反应通常是使用本文中关于胺与醛或酮(例如,化合物1与化合物2)的还原烷基化所述的试剂和反应条件来进行。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。

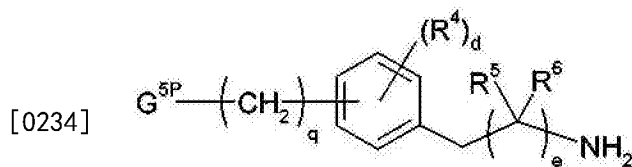
[0230] 式13a和13b的化合物可为市售、在此项技术中已知或可使用此项技术中已知程序

的常规变化来制备。

[0231] 代表性式13a化合物包括例如3-甲酰基苯甲酸甲酯、4-甲酰基苯甲酸甲酯、(3-甲酰基苯基)乙酸甲酯、(4-甲酰基苯基)乙酸甲酯、3-(3-甲酰基苯基)丙酸甲酯、3-(4-甲酰基苯基)丙酸甲酯、(3-甲酰基苯基)氨基甲酸叔丁酯、(4-甲酰基苯基)氨基甲酸叔丁酯、(3-甲酰基苯基)氨基甲酸叔丁酯、(4-甲酰基苯基)氨基甲酸叔丁酯、[2-(3-甲酰基苯基)乙基]氨基甲酸叔丁酯、[2-(4-甲酰基苯基)乙基]氨基甲酸叔丁酯等。

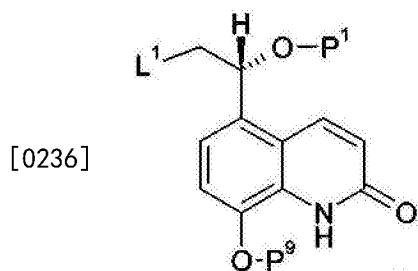
[0232] 代表性式13b化合物包括例如3-(2-氧代乙基)苯甲酸甲酯、4-(2-氧代乙基)苯甲酸甲酯、[3-(2-氧代乙基)苯基]乙酸甲酯、[4-(2-氧代乙基)苯基]乙酸甲酯、3-[3-(2-氧代乙基)苯基]丙酸甲酯、3-[4-(2-氧代乙基)苯基]丙酸甲酯、2-(3-叔丁氧基羰基氨基苯基)乙醛、2-(4-叔丁氧基羰基氨基苯基)-乙醛、2-[3-(叔丁氧基羰基氨基甲基)苯基]乙醛、2-[4-(叔丁氧基羰基氨基甲基)苯基]乙醛、2-{3-[2-(叔丁氧基羰基氨基)-乙基]苯基}乙醛、2-{4-[2-(叔丁氧基羰基氨基)乙基]苯基}-乙醛等。

[0233] 式12的中间化合物也可通过使式14化合物：



14

[0235] 与式15化合物反应来制备：



15

[0237] 其中L¹为例如氯、溴、碘、甲苯磺酰基、硝基苯磺酰基等离去基；且P⁹为例如苄基等羟基保护基。随后部分脱除所得产物的保护基(通过移除P⁷或P⁸,和P⁹),得到式12化合物。

[0238] 化合物14与化合物15的反应通常通过使化合物14与约0.95摩尔当量至约1.1摩尔当量的化合物15在过量碱存在下反应来进行。代表性碱包括例如碳酸氧钠、碳酸钠、碳酸氢钾、碳酸钾、三烷基胺(例如三乙胺、二异丙基乙胺等)等。此反应通常在约20℃至约120℃范围内的温度(例如,约100℃)下进行约2小时至约24小时,或直至反应实质上完成。通常,此反应是在例如N-甲基-吡咯烷酮、乙腈等稀释剂中进行。必要时,可通过对反应混合物进行微波辐射(例如,300瓦)来促进此反应。也可以纯形式进行反应,即,不存在稀释剂。另外,必要时,可使用过量胺14来替代另一种碱。反应完成后,通常使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物。

[0239] 随后部分脱除所得产物的保护基(即,移除P⁷或P⁸;且必要时,移除P⁹),得到式12化合物。用于移除保护基的特定条件将视所用特定基团而定。举例来说,当P⁷为C₁₋₆烷基时,通常通过在例如甲醇与水的混合物等稀释剂中用例如氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾等碱

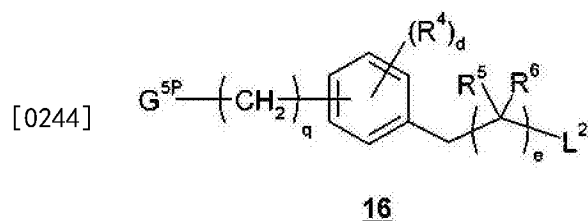
使酯部分水解来移除所述基团。此反应通常在环境温度下进行约30分钟至约24小时,或直至反应实质上完成。当P⁸为叔丁氧基羰基时,通常在环境温度下在酸性水解条件(例如20%三氟乙酸的DCM溶液)下移除此基团。当P⁹为苄基时,通过氢解容易地移除此基团。通常,通过在例如钯催化剂等催化剂存在下使化合物与氢接触来进行此反应。代表性催化剂包括氢氧化钯/碳、钯/碳等。一般说来,在例如乙酸、甲酸等酸存在下进行此脱苄基反应。此反应通常是在约10℃至约50℃范围内的温度(例如约25℃)下进行约6小时至约24小时,或直至反应实质上完成。通常,此反应是在例如甲醇、乙醇等稀释剂中进行。反应完成后,可使用例如萃取、再结晶、色谱法等常规程序分离产物,或将产物直接用于下一反应中。

[0240] 式14化合物是此项技术中已知的或可使用已知程序由市售起始物质和试剂来制备。举例来说,式14化合物可通过使13a或13b与苄胺在还原烷基化条件下反应且随后通过氢解移除苄基以得到式14化合物来制备。可使用的代表性苄胺包括苄胺、(S)-1-苄基乙胺、(R)-1-苄基乙胺等。具体说来,手性苄胺适用于制备R⁵存在(即,e=1)且R⁵所连接的碳原子具有特定立体化学(即,R或S)的式14中间物。

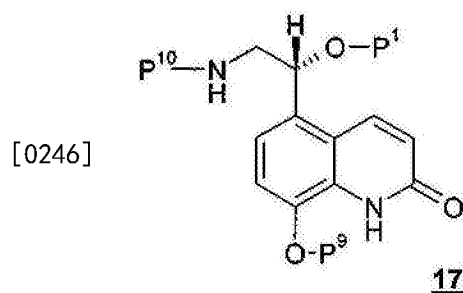
[0241] 另外,R⁵和R⁶独立地为甲基或乙基(即,不为氢)的式14化合物是此项技术中已知的或可使用常规程序来制备,如2005年8月4日公开的美国专利申请公开案2005/0171147A1;2005年12月15日公开的美国专利申请公开案2005/0277632A1;2005年10月6日公开的W02005/092861A1等文献中的教导内容所例示。

[0242] 式15化合物也是此项技术中已知的或可使用已知程序由市售起始物质和试剂来制备。举例来说,式15化合物(其中L¹为溴:P¹为叔丁基二甲基硅烷基,且P⁹为苄基)的制备描述于2006年2月16日公开的美国专利申请公开案第2006/0035931号中。

[0243] 或者,式12化合物是通过使式16化合物:



[0245] 与式17化合物反应来制备:



[0247] 其中L²为例如氯、溴、碘、甲苯磺酰基、硝基苯磺酰基等离去基;且P¹⁰为例如苄基等氨基保护基。在此实施例中,R⁵和R⁶如果存在的话,那么其通常为氢。此反应是在与关于14与15的反应所述类似的条件下进行。式16和17的化合物是此项技术中已知的或可使用已知程序由市售起始物质和试剂来制备。举例来说,式17化合物(其中P¹为叔丁基二甲基硅烷基,P⁹为苄基,且P¹⁰为苄基)的制备描述于2006年2月16日公开的美国专利申请公开案第2006/0035931号中。

[0248] 必要时,通过使游离碱形式的式I化合物与医药学上可接受的酸接触来制备式I化合物的医药学上可接受的盐。

[0249] 关于制备本发明的代表性化合物或其中间物的具体反应条件和其它程序的更多细节描述于本文中阐述的实例中。

[0250] 医药组合物、组合和调配物

[0251] 式I化合物可与载剂或赋形剂一起调配以形成医药组合物或调配物。所述医药组合物通常将含有治疗有效量的式I化合物。然而,在一些情况下,医药组合物可含有大于治疗有效量,例如,浓缩松散组合物;或小于治疗有效量,例如,设计用于多次投药来达成治疗有效量的个别单位剂量。

[0252] 医药组合物通常将含有约0.01重量%至约95重量%的式I化合物,包括例如约0.01重量%至约30重量%;或约0.01重量%至约10重量%;或约0.01重量%至约1重量%。

[0253] 通常使用常规载剂或赋形剂来制备所述医药组合物。特定载剂或赋形剂或者载剂或赋形剂的组合的选择将视各种因素而定,例如组合物的投药模式或所治疗的医学病状或疾病状况。适用于制备医药组合物的许多载剂和赋形剂可为市售。举例来说,所述材料可购自西格玛公司(Sigma)(位于密苏里州圣路易斯(St.Louis,MO))。用于制备适于特定投药模式的医药组合物的程序和材料描述于医药技术中,包括例如雷明顿:药学技术与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),第20版,利平科特威廉姆斯与怀特出版公司(Lippincott Williams&White),马里兰州巴尔的摩(Baltimore,Maryland)(2000);及H.C.安塞尔(H.C.Ansel)等人,医药剂型和药物传递系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),第7版,利平科特威廉姆斯与怀特出版公司,马里兰州巴尔的摩(1999)。

[0254] 可充当医药学上可接受的载剂的材料代表性实例包括(但不限于)以下:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;(4)粉末状黄芪胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;(9)油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,例如丙二醇;(11)多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;(12)酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原质水;(17)等渗生理盐水;(18)林格氏溶液(Ringer's solution);(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;(21)压缩推进剂气体,例如氯氟碳化物和氢氟碳化物;以及(22)用于医药组合物中的其它无毒可相容物质。

[0255] 通常通过将式I化合物与医药学上可接受的载剂和任何任选使用的成分充分且紧密地混合或掺合来制备医药组合物。需要时或必要时,随后可使用常规程序和设备将所得均匀掺合的混合物形成或装载于片剂、胶囊、丸剂、小罐、药筒、分配器等中。

[0256] 在一实施例中,医药组合物适于吸入投予。用于吸入投予的医药组合物通常将为气雾剂或散剂形式。所述组合物一般使用众所周知的传递装置来投予,例如喷雾器吸入器、定量吸入器(MDI)、干粉吸入器(DPI)或类似传递装置。

[0257] 在一个特定实施例中,使用喷雾器吸入器通过吸入投予包含治疗剂的医药组合物。所述喷雾器装置通常产生高速气流,其使得包含治疗剂的医药组合物以薄雾形式喷雾,被载运至患者的呼吸道中。因此,当调配成在喷雾器吸入器中使用,通常将治疗剂溶解于

合适载剂中以形成溶液。或者,治疗剂可经微粉化且与合适载剂组合以形成微粉化粒子的悬浮液。适于通过吸入授予治疗剂的喷雾器装置描述于此项技术中,或所述装置可为市售。举例来说,代表性喷雾器装置或产品包括雷普玛特(Respimat)软雾吸入器(波英格英格海姆公司(Boehringer Ingelheim));AERx肺部传递系统(阿拉迪姆公司(Aradigm Corp.));PARI LC Plus可再用喷雾器(百瑞公司(Pari GmbH))等。

[0258] 供在喷雾器吸入器中使用的代表性医药组合物包含包括约0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约10 mg/mL 式I化合物的等渗水溶液。在一实施例中,溶液的pH值为约4至约6。

[0259] 在另一特定实施例中,使用干粉吸入器通过吸入授予包含治疗剂的医药组合物。所述干粉吸入器通常授予自由流动粉末形式的治疗剂,所述自由流动粉末在吸气期间分散于患者的气流中。为获得自由流动的粉末,通常将治疗剂与例如乳糖、淀粉、甘露糖醇、右旋糖、聚乳酸(PLA)、聚丙交酯-共-乙交酯(PLGA)或其组合等合适赋形剂一起调配。通常,治疗剂经微粉化且与合适载剂组合以形成适于吸入的掺合物。因此,在一实施例中,式I化合物呈微粉化形式。

[0260] 供在干粉吸入器中使用的代表性医药组合物包含干式研磨乳糖和式I化合物的微粉化粒子。

[0261] 所述干粉调配物可例如通过组合乳糖与治疗剂且随后干式掺合所述组分来制备。或者,必要时,可在无赋形剂情况下调配治疗剂。随后通常将医药组合物装载于干粉分配器中,或装载于吸入药筒或胶囊中,以供干粉传递装置使用。

[0262] 适于通过吸入授予治疗剂的干粉吸入器传递装置描述于此项技术中,或所述装置可为市售。举例来说,代表性干粉吸入器传递装置或产品包括艾莱泽吸入器(Aeolizer)(诺华公司(Novartis));艾玛斯(Airmax)(IVAX公司);柯林克吸入器(ClickHaler)(因诺塔生物医药公司(Innovata Biomed));迪斯科吸入器(Diskhaler)(葛兰素史克公司(GlaxoSmithKline));迪库斯(Diskus)/艾克吸入器(Accuhaler)(葛兰素史克公司);伊泽吸入器(Easyhaler)(奥伦制药公司(Orion Pharma));艾克利浦(Eclipse)(安万特公司(Aventis));弗洛坎普(FlowCaps)(好利安公司(Hovione));海迪吸入器(Handihaler)(波英格英格海姆公司(Boehringer Ingelheim));帕维诺(Pulvinal)(凯西(Chiesi));罗塔吸入器(Rotahaler)(葛兰素史克公司);斯凯吸入器(SkyeHaler)/赛特吸入器(Certihaler)(斯凯制药公司(SkyePharma));特维斯吸入器(Twisthaler)(先灵葆雅公司(Schering-Plough));特伯吸入器(Turbuhaler)(阿斯特捷利康公司(AstraZeneca));奥特吸入器(Ultrahaler)(安万特公司)等。

[0263] 在另一特定实施例中,使用定剂量吸入器通过吸入授予包含治疗剂的医药组合物。所述定剂量吸入器通常使用压缩推进剂气体排出经测量的量的治疗剂。因此,使用定剂量吸入器授予的医药组合物通常包含治疗剂于液化推进剂中的溶液或悬浮液。可采用任何合适的液化推进剂,包括氢氟烷烃(HFA),例如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA134a)和1,1,1,2,3,3,3-七氟-正丙烷(HFA227);和氯氟碳化物,例如 CCl_3F 。在一特定实施例中,推进剂为氢氟烷烃。在一些实施例中,氢氟烷烃调配物含有共溶剂,例如乙醇或戊烷;和/或表面活性剂,例如脱水山梨糖醇三油酸酯、油酸、卵磷脂和甘油。

[0264] 供在定剂量吸入器中使用的代表性医药组合物包含约0.01重量%至约5重量%的式I化合物;约0重量%至约20重量%乙醇;和约0重量%至约5重量%表面活性剂;其余为

HFA推进剂。

[0265] 所述组合物通常通过将冷的或加压的氢氟烷烃添加至含有治疗剂、乙醇(如果存在的话)和表面活性剂(如果存在的话)的合适容器中来制备。为制备悬浮液,将治疗剂微粉化且随后与推进剂组合。随后将调配物装载入气雾剂小罐中,所述气雾剂小罐通常形成定剂量吸入器装置的一部分。

[0266] 适于通过吸入授予治疗剂的定剂量吸入器装置描述于此项技术中,或所述装置可为市售。举例来说,代表性定剂量吸入器装置或产品包括埃洛彼德(AeroBid)吸入器系统(福斯特制药公司(Forest Pharmaceuticals));埃托文特(Atrovent)吸入气雾剂(波英格英格海姆公司(Boehringer Ingelheim));弗洛文特(Flovent)(葛兰素史克公司(GlaxoSmithKline));马克赛尔(Maxair)吸入器(3M公司);普维提(Proventil)吸入器(先灵公司(Schering));塞拉文特(Serevent)吸入气雾剂(葛兰素史克公司)等。

[0267] 在另一实施例中,医药组合物适于经口授予。供经口授予的医药组合物可呈胶囊、片剂、丸剂、口含片、扁胶剂、糖衣药丸、散剂、颗粒剂形式;或呈于水性或非水性液体中的溶液或悬浮液形式;或呈水包油或油包水液体乳液形式;或呈酞剂或糖浆形式等;每一者含有预定量的实施例化合物作为活性成分。

[0268] 当打算以固体剂型(即,胶囊、片剂、丸剂等剂型)经口授予时,医药组合物通常将包含式I化合物和一种或一种以上医药学上可接受的载剂(例如柠檬酸钠或磷酸氢钙)。任选或作为替代,所述固体剂型也可包含:(1)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)保湿剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐,和/或碳酸钠;(5)溶解延迟剂,例如石蜡;(6)吸收促进剂,例如季铵化合物;(7)湿润剂,例如十六烷醇和/或单硬脂酸甘油酯;(8)吸附剂,例如高岭土和/或膨润土;(9)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠和/或其混合物;(10)着色剂;及(11)缓冲剂。

[0269] 脱模剂、湿润剂、涂布剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于医药组合物中。医药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。用于片剂、胶囊、丸剂等剂型的涂布剂包括用于肠溶包衣的涂布剂,例如乙酸邻苯二甲酸纤维素(CAP)、聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯(PVAP)、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、甲基丙烯酸-甲基丙烯酸酯共聚物、乙酸偏苯三酸纤维素(CAT)、羧甲基乙基纤维素(CMEC)、乙酸丁二酸羟丙基甲基纤维素(HPMCAS)等。

[0270] 必要时,也可使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素;或其它聚合物基质、脂质体和/或微球体,调配医药组合物以提供活性成分的缓慢或控制释放。

[0271] 另外,医药组合物可任选含有遮光剂且可经调配以使得活性成分主要于胃肠道的某一部分中释放或以延迟方式释放。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。活性成分或含有活性成分的医药组合物也可呈微囊封形式。

[0272] 供经口授予的合适液体剂型包括(作为说明)医药学上可接受的乳液、微乳液、溶

液、悬浮液、糖浆和酞剂。所述液体剂型通常包含活性成分和惰性稀释剂(例如水或其它溶剂)、增溶剂及乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(尤其是棉籽油、落花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯,及其混合物。除活性成分以外,悬浮液还可含有悬浮剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄芪胶,及其混合物。

[0273] 当打算经口投予时,医药组合物可包装成单位剂型形式。术语“单位剂型”意思指适合于对患者给药的物理不连续单元,即每一单元含有经计算以单独或组合一个或一个以上额外单元产生所需治疗作用的预定量的活性剂。举例来说,所述单位剂型可为胶囊、片剂、丸剂等。

[0274] 式I化合物也可使用已知的透皮传递系统和赋形剂透皮投予。举例来说,可将实施例化合物与例如丙二醇、聚乙二醇单月桂酸酯、氮杂环烷-2-酮等渗透增强剂混合,且并入贴片或类似传递系统中。必要时,在所述透皮组合物中可使用其它赋形剂,包括胶凝剂、乳化剂和缓冲剂。

[0275] 另外,式I化合物可不经肠(即静脉内、皮下或肌肉内)投予。对于不经肠投予,通常将式I化合物溶解于例如无菌水、生理盐水、植物油等不经肠投药可接受的载剂中。作为说明,静脉内组合物通常包含式I化合物的无菌水溶液,其中所述溶液的pH值在约4至约7范围内。

[0276] 必要时,式I化合物可与一种或一种以上其它治疗剂组合投予。在本发明这一方面中,将式I化合物与另一治疗剂物理混合以形成含有两种药剂的组合物;或各药剂存在于同时或依序投予患者的独立且不同的组合物中。

[0277] 举例来说,可使用常规程序和设备将式I化合物与第二治疗剂组合以形成包含式I化合物和第二治疗剂的组合物。另外,治疗剂可与医药学上可接受的载剂组合以形成包含式I化合物、第二治疗剂和医药学上可接受的载剂的医药组合物。在此实施例中,组合物的组分通常经混合或掺合以产生物理混合物。随后使用任何本文描述的途径投予治疗有效量的物理混合物。

[0278] 或者,治疗剂在投予患者之前可保持分离及不同。在此实施例中,治疗剂在投予之前未经物理混合在一起,而是以独立组合物形式同时或依序投予。举例来说,可使用对各治疗剂采用独立隔室(例如发泡包装)的吸入传递装置将式I化合物与另一治疗剂同时或依序通过吸入投予。或者,可使用独立传递装置投予组合,即,对于每一治疗剂使用一个传递装置。另外,可通过不同投药途径传递治疗剂,即,一种治疗剂通过吸入投予,而另一治疗剂经口投予。

[0279] 可与式I化合物相容的任何治疗剂都可与所述化合物组合使用。在一个特定实施例中,第二治疗剂是可有效通过吸入投予的治疗剂。作为说明,可与所述实施例的化合物一起使用的治疗剂的代表性类型包括(但不限于)消炎剂,例如类固醇消炎剂(包括皮质类固醇和糖皮质类固醇)、非类固醇消炎剂(NSAID)和PDE₄抑制剂;支气管扩张药,例如PDE₃抑制剂、腺苷2b调节剂和B₂肾上腺素受体激动剂;抗感染剂,例如革兰氏阳性(Gram-positive)抗生素、革兰氏阴性(Gram-negative)抗生素,及抗病毒剂;抗组胺剂;蛋白酶抑制剂;传入阻断剂,例如D₂激动剂和神经激肽调节剂;以及蕈毒碱受体拮抗剂(抗胆碱剂)。所述治疗剂

的众多实例为此项技术中众所周知的。与所述实施例的化合物组合投予的其它治疗剂的合适剂量通常在每天约0.05 μ g至每天约500mg范围内。

[0280] 在一个特定实施例中,式I化合物是与类固醇消炎剂组合投予。可与所述实施例的化合物组合使用的类固醇消炎剂的代表性实例包括(但不限于)二丙酸倍氯米松(beclomethasone dipropionate);布地奈德(budesonide);丙酸布替可特(butixocort propionate);20R-16 α ,17 α -[亚丁基双(氧基)]-6 α ,9 α -二氟-11 β -羟基-17 β -(甲基硫基)雄甾-4-烯-3-酮(RPR-106541);环索奈德(ciclesonide);地塞米松(dexamethasone);6 α ,9 α -二氟-17 α -[(2-呋喃基羰基)氧基]-11 β -羟基-16 α -甲基-3-氧代雄甾-1,4-二烯-17 β -硫代碳酸S-氟甲酯;6 α ,9 α -二氟-11 β -羟基-16 α -甲基-17 α -[(4-甲基-1,3-噻唑-5-羰基)氧基]-3-氧代雄甾-1,4-二烯-17 β -硫代碳酸S-氟甲酯;6 α ,9 α -二氟-11 β -羟基-16 α -甲基-3-氧代-17 α -丙酰基氧基雄甾-1,4-二烯-17 β -硫代碳酸(S)-(2-氧代四氢呋喃-3S-基)酯;氟尼缩松(flunisolide);糠酸氟替卡松(fluticasone furoate);丙酸氟替卡松(fluticasone propionate);甲泼尼龙(methyl prednisolone);糠酸莫美他松(mometasone furoate);泼尼松龙(prednisolone);泼尼松(prednisone);罗氟奈德(rofleponide);ST-126;曲安奈德(triamcinolone acetonide)等,或其医药学上可接受的盐或溶剂化物。所述类固醇消炎剂可为市售或可使用常规程序和试剂来制备。举例来说,类固醇消炎剂的制备和使用描述于2003年3月25日颁予的美国专利第6,537,983号;2004年6月15日颁予的美国专利第6,750,210B2号;2004年7月6日颁予的美国专利第6,759,398B2号;2005年2月22日颁予的美国专利第6,858,596B2号;2006年9月5日颁予的U.S.7,101,866B2;及其中引用的参考文献中。

[0281] 当使用时,类固醇消炎剂通常以当与所述实施例的化合物共同投予时产生治疗有益作用的量投予。通常,类固醇消炎剂将以足以提供每剂约0.05 μ g至约500 μ g的量投予。

[0282] 以下实例说明代表性医药组合物:

[0283] A. 干粉组合物

[0284] 将微粉化的式I化合物(100mg)与经研磨乳糖(25g)(例如,不多于约85%的粒子具有约60 μ m至约90 μ m的MMD且不少于15%的粒子具有小于15 μ m的MMD的乳糖)掺合在一起。随后将此掺合混合物以足以提供每剂约10 μ g至约500 μ g式I化合物的量装载于可剥离发泡包装的个别泡中。使用干粉吸入器投予所述泡的内含物。

[0285] B. 干粉组合物

[0286] 将微粉化的式I化合物(1g)与经研磨乳糖(200g)掺合在一起以形成化合物与经研磨乳糖的重量比为1:200的松散组合物。将经掺合组合物包装到能够传递每剂约10 μ g至约500 μ g式I化合物的干粉吸入装置中。

[0287] C. 干粉组合物

[0288] 将微粉化的式I化合物(100mg)和微粉化的类固醇消炎剂(500mg)与经研磨乳糖(30g)掺合在一起。随后将此掺合混合物以足以提供每剂约10 μ g至约500 μ g式I化合物的量装载于可剥离发泡包装的个别泡中。使用干粉吸入器投予所述泡的内含物。

[0289] D. 定剂量吸入器组合物

[0290] 将微粉化的式I化合物(10g)分散于通过将卵磷脂(0.2g)溶解于去矿质水(200mL)中所制备的溶液中。将所得悬浮液喷雾干燥且随后微粉化以形成包含平均直径小于约1.5 μ m的粒子的微粉化组合物。随后将微粉化组合物以当通过定剂量吸入器投予时足以提供每

剂约10 μ g至约500 μ g式I化合物的量装载于含有经加压1,1,1,2-四氟乙烷的定剂量吸入器药筒中。

[0291] E. 喷雾器组合物

[0292] 将式I化合物(25mg)溶解于柠檬酸盐缓冲(pH5)的等渗生理盐水(125mL)中。搅拌混合物且进行声波处理,直至化合物溶解。检查溶液的pH值,且必要时通过缓慢添加1N氢氧化钠水溶液调节至pH5。使用每剂提供约10 μ g至约500 μ g式I化合物的喷雾器装置投予溶液。

[0293] F. 硬明胶胶囊

[0294] 将式I化合物(50g)、经喷雾干燥的乳糖(440g)和硬脂酸镁(10g)充分掺合。将所得组合物装载于经口投予的硬明胶胶囊(每胶囊500mg组合物)中。

[0295] G. 可注射组合物

[0296] 将式I化合物(0.2g)与0.4M乙酸钠缓冲溶液(2.0mL)掺合在一起。必要时使用0.5N盐酸水溶液或0.5N氢氧化钠水溶液将所得溶液的pH值调节至pH4,且随后添加足够的注射用水以提供20mL的总体积。随后经由无菌过滤器(0.22微米)过滤混合物以提供适于通过注射投予的无菌溶液。

[0297] 效用

[0298] 式I化合物同时具有蕈毒碱受体拮抗剂活性与 β_2 肾上腺素受体激动剂活性,且因此,预期所述化合物适用作治疗由蕈毒碱受体和/或 β_2 肾上腺素受体介导的医学病状(即可通过用蕈毒碱受体拮抗剂或 β_2 肾上腺素受体激动剂治疗而改善或缓和的医学病状)的治疗剂。所述医学病状为所属领域技术人员众所周知的,如由以下文献教导内容所例示:爱格伦(Eglen)等人,蕈毒碱受体受体亚型:药理学与治疗潜力(Muscarinic Receptor Subtypes: Pharmacology and Therapeutic Potential),DN&P10(8),462-469(1997);艾米莉(Emilien)等人, β -肾上腺受体激动剂和拮抗剂的当前治疗用途和潜力(Current Therapeutic Uses and Potential of beta-Adrenoceptor Agonists and Antagonists),欧洲临床药理学杂志(European J. Clinical Pharm.),53(6),389-404(1998);及其中引用的参考文献。所述医学病状包括例如与可逆性气道阻塞相关的肺部病症或疾病,例如慢性阻塞性肺病(例如,慢性和喘息型支气管炎及肺气肿)、哮喘、肺部纤维化、成人/急性呼吸窘迫综合症(ARDS)、慢性呼吸道阻塞、支气管机能亢进、过敏性鼻炎、肺尘埃沉着症(例如铝末沉着病、炭末沉着病、石棉沉着病、石硝沉着病、驼鸟毛尘肺病(ptilosis)、铁质沉着病、硅粉沉着病、烟末沉着病和棉屑沉着病),及其它可自治疗剂诱导的支气管扩张获益的未知病因肺部病症。另外,已知可至少部分用蕈毒碱受体拮抗剂或 β_2 肾上腺素受体激动剂治疗的其它病状包括早产、抑郁症、充血性心脏衰竭、皮肤病(例如,炎性、过敏性、牛皮癣性及增生性皮肤病)、需要降低胃酸度的病状(例如,消化性溃疡及胃溃疡)和肌肉萎缩疾病。

[0299] 因此,本发明一个实施例涉及一种用于治疗肺部病症的方法,所述方法包含向需要治疗的患者投予治疗有效量的式I化合物。当用于治疗肺部病症时,式I化合物通常将以每天多个剂量、每天单一剂量或每周单一剂量通过吸入投予。一般说来,预期用于治疗肺部病症的剂量在每天约10 μ g至每天约1500 μ g范围内;例如每天约25 μ g至每天约1000 μ g;包括每天约50 μ g至每天约500 μ g。

[0300] 在一个方法方面中,本发明涉及一种治疗慢性阻塞性肺病或哮喘的方法,所述方

法包含向患者投予治疗有效量的式I化合物。一股说来,预期用于治疗COPD或哮喘的剂量在每天约10 μ g至每天约1500 μ g范围内。具体说来,此方法包括减轻COPD或哮喘的症状。所属领域技术人员应了解术语“COPD”包括多种呼吸道病状,包括慢性阻塞性支气管炎和肺气肿,如由以下文献的教示内容所例示:巴恩斯(Barnes),慢性阻塞性肺病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease),新英格兰医学杂志(N.Engl.J.Med.),2000:343:269-78,及其中引用的参考文献。

[0301] 当通过吸入投予时,式I化合物通常具有引起支气管扩张的作用。因此,在另一方面中,本发明涉及一种在哺乳动物中引起支气管扩张的方法,所述方法包含向哺乳动物投予引起支气管扩张的量的式I化合物。一股说来,引起支气管扩张的剂量将在每天约10 μ g至每天约1500 μ g范围内。

[0302] 当用作治疗剂时,式I化合物任选与另一(或其它)治疗剂组合投予。具体说来,通过投予式I化合物与类固醇消炎剂,预期仅使用两种治疗剂就能实现三重疗法,即,蕈毒碱受体拮抗剂活性、 β_2 肾上腺素受体激动剂活性和消炎活性。因为含有两种治疗剂的医药组合物(及组合)通常比含有三种治疗剂的组合物更易于调配和/或投予,所以所述双组分组合物提供优于含有三种治疗剂的组合物的显著优点。因此,在特定实施例中,本发明的医药组合物、组合和方法进一步包含类固醇消炎剂。

[0303] 因为式I化合物同时具有蕈毒碱受体拮抗剂活性与 β_2 肾上腺素受体激动剂活性,所以所述化合物也可用作调查或研究具有蕈毒碱受体或 β_2 肾上腺素受体的生物系统或样品的研究工具。另外,所述化合物可用于筛选分析法中,以发现例如同时具有蕈毒碱受体拮抗剂活性与 β_2 肾上腺素受体激动剂活性的新颖化合物。所用生物系统或样品可包含蕈毒碱受体或 β_2 肾上腺素受体或两者。任何具有蕈毒碱受体和/或 β_2 肾上腺素受体的合适生物系统或样品均可用于可在体外或体内进行的所述研究中。适于所述研究的代表性生物系统或样品包括(但不限于)细胞、细胞提取物、质膜、组织样品、哺乳动物(例如小鼠、大鼠、天竺鼠、兔、狗、猪等)等。

[0304] 当用作研究工具时,通常使包含蕈毒碱受体和/或 β_2 肾上腺素受体的生物系统或样品与拮抗蕈毒碱受体或使 β_2 肾上腺素受体增效的量的式I化合物接触。随后使用常规程序和设备测定或测量化合物对生物系统或样品产生的影响,例如通过测量放射性配体结合分析法中的结合或功能分析法中配体介导的变化,或通过用支气管保护分析法中测定哺乳动物中由化合物提供的支气管保护的量。代表性功能分析法包括配体介导的细胞内环腺苷单磷酸(cAMP)的变化;配体介导的酶腺苷酰基环化酶(其合成cAMP)活性的变化;配体介导的经由受体催化的[35 S]GTPS替换GDP将5'-O-(硫代)三磷酸鸟苷([35 S]GTPS)并入分离的膜中的变化;配体介导的游离细胞内钙离子的变化(例如用来自分子仪器公司(Molecular Devices, Inc.)的荧光联结成像板读取器或FLIPR[®]来测量)等。预期式I化合物在本文中列出的功能分析法中或在类似性质的分析法中拮抗或减少蕈毒碱受体的活化或者增效或引起 β_2 肾上腺素受体的活化。这些研究中所用式I化合物的浓度通常将在约0.1纳摩尔浓度至约100纳摩尔浓度的范围内。

[0305] 另外,式I化合物可用作评估其它化合物的研究工具。在这一方面中,使用式I化合物作为分析法中的标准物以允许比较利用测试化合物与利用式I化合物获得的结果。举例来说,将蕈毒碱受体和/或 β_2 肾上腺素受体与某一测试化合物或一组测试化合物的结合数

据(如例如通过体外放射性配体置换分析法测定)与蕈毒碱受体和/或 β_2 肾上腺素受体与式I化合物的结合数据进行比较,以鉴别具有所需结合的测试化合物,即具有大致等于或优于式I化合物的结合的测试化合物(如果存在的话)。或者,例如,可在支气管保护分析法中测定测试化合物和式I化合物在哺乳动物中的支气管保护作用,且比较此数据以鉴别提供大致相等或更佳的支气管保护作用或作用持续时间的测试化合物。在个别实施例中,这一方面包括(i)产生比较数据(使用适当分析法)与(ii)分析测试数据以鉴别相关测试化合物。

[0306] 可使用所属领域技术人员已知的各种体外和体内分析法来证明式I化合物的性质和效用。举例来说,以下实例中将更详细地描述代表性分析法。

[0307] 实例

[0308] 除非具体说明,否则提供以下实例来说明本发明的各种代表性实施例和方面,且这些实例不打算以任何方式限制本发明的范围。

[0309] 除非另外说明,否则以下实例中所用的所有试剂、起始物质和溶剂均购自商业供应商(例如阿尔德里奇化学品公司(Aldrich Chemical Company),威斯康星州密尔沃基(Milwaukee,WI))且不经进一步纯化即使用。

[0310] 除非另外说明,否则用400MHz瓦里安(Varian)AS400光谱仪记录 ^1H NMR光谱。以相对于作为内标的四甲基硅烷(TMS)的 δ 值(ppm)报导化学位移。以赫兹(Hz)为单位给出耦合常数(J值)且使用以下缩写报导多重性:s=单峰,d=双重峰,t=三重峰,q=四重峰,m=多重峰,bt=宽峰,nd=未测定。

[0311] 液相色谱质谱(LC-MS)条件

[0312] 使用安捷伦1100型(Agilent1100)液相色谱系统-G1312A二元泵(安捷伦技术公司(Agilent Technologies))、ZORBAX快速高分离系统3.5 μm Rx、伯纳斯-RP(Bonus-RP)柱(3.5 μm 粒度;2.1mm \times 50mm)(安捷伦技术公司)和API150EX单级四极杆LC/MS质谱仪(珀金-埃尔默塞克斯仪器公司(Perkin-Elmer Sciex Instruments)),来获得LC-MS数据。所用溶剂系统为:

溶剂 A: 98%水和 2%乙腈 (v/v) +1 mL/L TFA

溶剂 B: 90%乙腈和 10%水 (v/v) +1 mL/L TFA

流动速率: 500 $\mu\text{L}/\text{min}$

[0313]

梯度: (方法 10-90): 3 分钟内 10% B 至 90% B

(方法 2-90): 3 分钟内 2% B 至 90% B

(方法 10-70): 3 分钟内 10% B 至 70% B。

[0314] HPLC条件

[0315] 使用HP1100系列HPLC系统(安捷伦技术公司(Agilent Technologies))和ZORBAX快速高分离系统3.5 μm Rx、伯纳斯-RP柱(3.5 μm 粒度;2.1mm \times 50mm)(安捷伦技术公司)或安塞提斯伊普斯(Ascentis Express)C18HPLC柱(2.7 μm 粒度,3.0mm \times 3cm)进行HPLC。所用溶剂系统为:

溶剂 A: 98%水和 2%乙腈 (v/v) +1 mL/L TFA

溶剂 B: 90%乙腈和 10%水 (v/v) +1 mL/L TFA

流动速率: 500 μ L/min

[0316]

梯度: (方法 10-50): 6 分钟内 10% B 至 50% B

(方法 10-70): 6 分钟内 10% B 至 70% B

(方法 2-90): 6 分钟内 2% B 至 90% B。

[0317] 实例1

[0318] 制备3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酸

[0319] 将经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸哌啶-4-基酯(50.0g, 168.7mmol)(参见例如2006年2月16日公开的美国专利公开案第2006/0035931A1号)和丙烯酸(15.1mL, 219.3mmol)于DCM(500mL)中的溶液在50 $^{\circ}$ C下加热过夜。在减压下浓缩反应混合物并将残余物溶解于MeOH(600mL)中。在75 $^{\circ}$ C下加热所得溶液2小时,随后使其在室温下静置约48小时。通过过滤收集所得固体,用MeOH洗涤且干燥,得到标题化合物(61.5g, 99%产率)。

[0320] 实例2

[0321] 制备4-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}甲基-氨基)丁酸甲酯

[0322] 向经搅拌的4-甲基氨基丁酸甲酯盐酸盐(546mg, 3.26mmol)与3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酸(1.20g, 3.26mmol)于DCM(15mL)中的混合物中添加六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)脲(1.36g, 3.58mmol),接着添加N,N-异丙基乙胺(1.42mL, 8.15mmol)。LC-MS(方法2-90)展示存在产物(滞留时间3.11分钟; m/z 482.4[M+H]⁺)。添加水和DCM且分离各层。用水(2 \times)和盐水洗涤有机层,经硫酸钠干燥,过滤且在减压下浓缩,得到浅黄色油状标题化合物(2.0g, 100%产率)。

[0323] 实例3

[0324] 制备4-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}甲基氨基)丁酸

[0325] 向经搅拌的4-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]-丙酰基}甲基氨基)丁酸甲酯(1.00g, 2.08mmol)于THF(10mL)中的溶液中逐滴添加氢氧化钠水溶液(1.0M, 10.4mL, 10.4mmol),并在室温下搅拌反应混合物过夜。LC-MS(方法10-90)展示存在产物(滞留时间3.34分钟; m/z 468.2[M+H]⁺)。混合物的pH值用盐酸水溶液(6M)调节至pH5且在减压下浓缩混合物。将氯化铵水溶液添加至残余物中,并用EtOAc洗涤此混合物。水层的pH值用磷酸盐缓冲溶液调节至pH4,且随后用乙酸异丙酯/氯仿的1:3混合物(4 \times)萃取水层。合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤且在减压下浓缩,得到无色油状标题化合物,其未经进一步纯化即使用。

[0326] 实例4

[0327] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-({3-(4-(1,3-二氧戊环-2-基)-苯基氨基甲酰基)丙基}甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯

[0328] 向4-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]-丙酰基}甲基氨基)丁酸(75mg, 0.16 mmol)和4-(1,3-二氧戊环-2-基)苯胺(26mg, 0.16mmol)于DCM(3mL)中的溶液

中添加六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)脲(73.2mg, 0.192mmol), 接着添加N,N-异丙基乙胺(55.9uL, 0.321mmol)。在室温下搅拌反应混合物约48小时。LC-MS(方法2-90)展示存在产物(滞留时间3.87分钟; m/z 615.4[M+H]⁺)。添加水和DCM且分离各层。用水(2×)和盐水洗涤有机层, 经硫酸钠干燥, 过滤且在减压下浓缩, 得到黄色油状标题化合物, 其未经进一步纯化即使用。在后续实验中, 也分离出呈可过滤固体形式的此化合物。

[0329] 实例5

[0330] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-甲酰基苯基氨基甲酰基)-丙基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0331] 向经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-(1,3-二氧戊环-2-基)苯基氨基甲酰基)丙基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(98mg, 0.16mmol)于乙腈(2mL)中的溶液中添加盐酸水溶液(3M, 1.07mL)。在室温下搅拌所得深橙色溶液。添加水且用DCM(2×)萃取所得混合物。合并的有机层经硫酸钠干燥, 过滤且在减压下浓缩, 得到标题化合物, 其未经进一步纯化即使用。

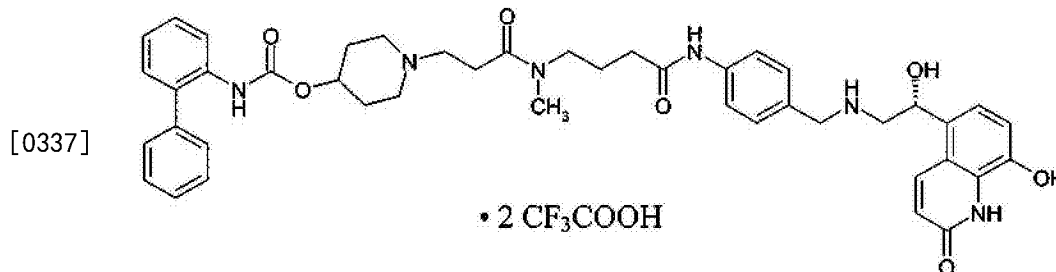
[0332] 实例6

[0333] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-{[(R)-2-(叔丁基二甲基-硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基}-苯基氨基甲酰基)丙基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0334] 向经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-甲酰基-苯基氨基甲酰基)丙基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(91mg, 0.16mmol)于DCM(2mL)中的溶液中添加5-[(R)-2-氨基-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-羟基-1H-喹啉-2-酮乙酸盐(101mg, 0.256mmol)(参见例如2006年2月16日公开的美国专利公开案第2006/0035931A1号), 接着添加MeOH(1mL)。在室温下搅拌所得黄色溶液10分钟, 随后添加三乙酰氧基硼氢化钠(89mg, 0.40mmol), 并搅拌此混合物过夜。LC-MS(方法2-90)展示存在产物(滞留时间3.25分钟; m/z 889.8[M+H]⁺)。添加水和DCM且分离各层。用水(2×)和盐水洗涤有机层, 经硫酸钠干燥, 过滤且在减压下浓缩, 得到标题化合物, 其未经进一步纯化即使用。

[0335] 实例7

[0336] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-{[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基}-苯基氨基甲酰基)丙基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐(化合物I-1)



[0338] 向联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-{[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基}苯基氨基甲酰基)丙基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(约0.16mmol)于DCM(3mL)中的溶液中添加三氢氟化三乙胺(260uL, 1.60mmol)。在室温下搅拌反应混合物过夜。LC-MS(方法2-90)展示存在产物(滞留时间3.00

分钟; m/z 775.4[M+H]⁺)。在减压下浓缩反应混合物且通过HPLC纯化残余物,得到标题化合物(27.8mg,39%产率,94%纯度)。

[0339] 实例8

[0340] 制备[3-(三苯甲基氨基)苯基]乙酸

[0341] 在氮气下,在0℃下经5分钟时间向经搅拌的(3-氨基苯基)乙酸(30.20g,199.8mmol)于吡啶(200mL)中的溶液中逐滴添加三苯甲基溴(77.5g,240mmol)于DCM(120mL)中的溶液。在室温下搅拌反应混合物14小时,随后在减压下浓缩。向残余物中添加DCM(约800mL)和水(约800mL)且分离各层。用水(3×约500mL)洗涤有机层,经硫酸钠干燥,过滤且在减压下浓缩,得到带棕色的灰白色固体(100.1g)。将固体悬浮于EtOH(500mL)中且在60℃下加热此混合物1小时,随后冷却至室温。通过过滤收集固体,用EtOH洗涤且在高真空下干燥,得到白色固体状标题化合物(67.2g,85%产率)。

[0342] ¹H NMR(DMSO-d₆)δ7.25(m);7.13(m);6.70(s);6.63(t);6.55(d);6.27(d);6.09(m);3.29(br s);3.16(s)。

[0343] 实例9

[0344] 制备2-[3-(三苯甲基氨基)苯基]乙醇

[0345] 在氮气下,在0℃下经45分钟时间向经搅拌的[3-(三苯甲基氨基)苯基]乙酸(30.00g,76.24mmol)于THF(126mL)中的悬浮液中逐滴添加硼烷二甲基硫醚络合物的THF溶液(2M,76.2mL,152mmol),同时维持温度≤1.8℃。在室温下搅拌所得浅黄色均质溶液18小时。缓慢添加饱和碳酸氢钠水溶液(约300mL)(在初始添加时剧烈起泡),并在室温下搅拌所得混合物过夜。用EtOAc(2×约330mL)萃取混合物,且合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到白色固体状标题化合物(25.6g,86%产率)。

[0346] ¹H NMR(CDCl₃)δ7.25(m);6.9(t);6.4(m);6.3(m);6.1(s);5.0(s);3.5(m);2.5(t)。

[0347] 实例10

[0348] 制备4-硝基苯磺酸2-[3-(三苯甲基氨基)苯基]乙酯

[0349] 在氮气下,在0℃下经5分钟时间向经搅拌的2-[3-(三苯甲基氨基)苯基]乙醇(5.00g,13.2mmol)和三亚乙基二胺(2.22g,19.8mmol)于DCM(52.7mL)中的溶液中逐份添加对硝基苯磺酰氯(3.50g,15.8mmol)。在0℃下搅拌所得混合物40分钟,随后添加饱和碳酸氢钠水溶液(约50mL)。在室温下搅拌混合物10分钟,且随后分离各层。用DCM(2×约50mL)萃取水层,且合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到橙黄色泡沫固体状标题化合物(7.44g,100%产率)。

[0350] ¹H NMR(CDCl₃)δ8.20(m);7.70(m);7.30(m);6.70(m);6.30(m);6.10(m);5.30(s);5.00(s);4.00(t);3.20(m);2.60(m)。

[0351] 实例11

[0352] 制备5-[(R)-2-[[2-(3-氨基苯基)乙基]苄基氨基]-1-(叔丁基-二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮

[0353] 将经搅拌的4-硝基苯磺酸2-[3-(三苯甲基氨基)苯基]乙酯(7.44g,13.2mmol);5-[(R)-2-苄基氨基-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮(5.42g,10.5mmol)(参见例如2006年2月16日公开的美国专利公开案第2006/0035931A1号)

和碳酸氢钠(3.32g, 39.5mmol)于乙腈(26.4mL)中的混合物在75°C在氮气下加热18小时。混合物冷却至室温,且pH值用盐酸水溶液(1N,约40mL)调节至pH<2。在室温下搅拌混合物1小时,且混合物的pH值随后用饱和碳酸氢钠水溶液(约30mL)调节至pH7-8。添加水(约50mL)和EtOAc(约50mL)且分离各层(添加少量稀氯化钠水溶液以改良分离)。用EtOAc(2×30mL)萃取水层,且合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(30-60%EtOAc的己烷溶液)纯化残余物,得到浅黄色泡沫固体状标题化合物(5.7g,68%产率)。

[0354] $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 9.10(s);7.90(br s);7.40(m);7.20(m);7.10(m);7.00(t);6.90(s);6.50(m);6.30(s);5.20(s);4.80(m);3.60(m);2.80(m);2.60(m);0.80(s);-0.2(s)。

[0355] 实例12

[0356] 制备4-(叔丁氧基羰基甲基氨基)丁酸

[0357] 在室温下向经搅拌的4-(甲基氨基)丁酸盐(1.00g,6.51mmol)和三乙胺(2.72mL,19.5mmol)于DCM(60mL)中的混合物中添加二碳酸二叔丁酯(1.56g,7.16mmol)。将所得混合物搅拌约72小时。LC-MS展示存在产物(滞留时间4.11分钟; m/z 216.2[M+H]⁺)。添加DCM和水,且水层的pH值用盐酸水溶液(1M)调节至pH4.5-6。分离各层且有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到浅黄色浓稠油状标题化合物(1.5g,100%产率)。

[0358] $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 3.28(br s);2.85(s);2.35(t);1.84(t);1.46(s)。

[0359] 实例13

[0360] 制备{3-[3-(2-{苄基-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]氨基}乙基)苯基氨基甲酰基]-丙基}甲基氨基甲酸叔丁酯

[0361] 在室温下向经搅拌的4-(叔丁氧基羰基甲基氨基)丁酸(72.0mg,0.331mmol);5-[(R)-2-[[2-(3-氨基苄基)乙基]苄基氨基]-1-(叔丁基-二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮(210mg,0.331mmol);2,6-二甲基吡啶(46.5μL,0.398mmol);和N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(69.8mg,0.364mmol)于DMF(3mL)中的溶液中添加1-羟基-7-氮杂苯并三唑的DMF溶液(0.5M,0.729mL,0.364mmol)。在室温下搅拌所得混合物过夜。LC-MS(方法2-90)展示存在产物(滞留时间4.56分钟; m/z 833.6[M+H]⁺)。添加水且用10%氯化锂水溶液和DCM稀释此混合物。分离各层,且用10%氯化锂水溶液(2×)洗涤有机层,经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。在高真空下进一步浓缩残余物,得到标题化合物(含有少量DMF),其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0362] 实例14

[0363] 制备N-[3-(2-{苄基-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]氨基}乙基)苯基]-4-甲基氨基丁酰胺

[0364] 在室温下向经搅拌的{3-[3-(2-{苄基-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]氨基}乙基)-苯基氨基甲酰基]丙基}甲基氨基甲酸叔丁酯(276mg,0.331mmol)于DCM(3mL)中的溶液中添加三氟乙酸(2mL,20mmol),且在室温下搅拌所得混合物过夜。LC-MS(方法2-90)展示存在产物(滞留时间2.69分钟; m/z 733.4[M+H]⁺)。在减压下浓缩反应混合物,并将残余物溶解于DCM中。用饱和碳酸氢钠水溶液(2×)洗涤此溶液,经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到黄棕色油状标题化合物(249mg,100%产率),其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0365] 实例15

[0366] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-[2-({3-[3-(2-{苄基-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-氨基}乙基)苯基氨基甲酰基]丙基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

[0367] 在室温下向经搅拌的3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]-丙酸(127mg, 0.344mmol)和N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(69.0mg, 0.360mmol)于DMF(5mL)中的溶液中添加1-羟基-7-氮杂苯并三唑的DMF溶液(0.5M, 0.720mL, 0.360mmol)。添加N-[3-(2-{苄基-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-氨基}乙基)苯基]-4-甲基氨基丁酰胺(240mg, 0.327mmol)和2,6-二甲基吡啶(114μL, 0.982mmol), 并将所得混合物搅拌过夜。LC-MS(方法2-90)展示存在产物(滞留时间4.13分钟; m/z 1083.7[M⁺])。添加水且用DCM稀释此混合物。分离各层, 并用10%氯化锂水溶液(2×)洗涤有机层, 经硫酸钠干燥, 过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(含有1% TEA的0-20% MeOH的DCM溶液)纯化残余物, 得到黄色油状标题化合物(258mg, 72%产率)。

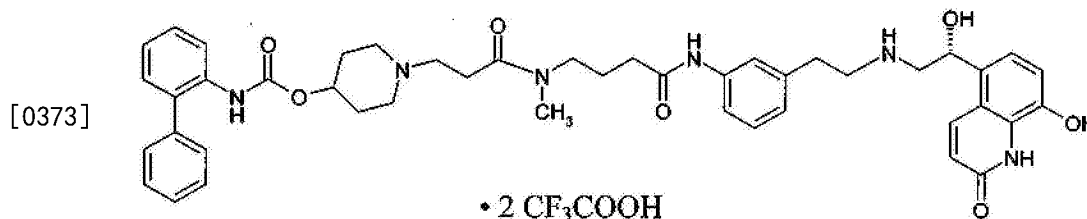
[0368] 实例16

[0369] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(3-{2-[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]-乙基}苯基氨基甲酰基)丙基}甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯

[0370] 在室温下向经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-[2-({3-[3-(2-{苄基-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-氨基}乙基)苯基氨基甲酰基]丙基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(258mg, 0.238mmol)于MeOH(3mL)中的溶液中添加乙酸的水溶液(17.4M, 41.4μL, 0.720mmol)。用氮气(3次真空循环, 随后为干燥氮气)净化所得溶液, 且随后添加氢氧化钾(47mg, 0.34mmol)。再次相继用氮气和氢气(5×)净化此混合物, 且随后在室温下在氢气下(带有浸没的针的气球)搅拌6小时。LC-MS(方法2-90)展示存在产物(滞留时间3.71分钟; m/z 903.6[M+H]⁺)。经由膜过滤器过滤反应混合物并在减压下浓缩滤液, 得到标题化合物, 其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0371] 实例17

[0372] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]-乙基}苯基氨基甲酰基)-丙基}甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐(化合物I-7)



[0374] 在室温下向经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(3-{2-[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]-乙基}苯基氨基甲酰基)丙基}甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯(202mg, 0.224mmol)于DCM(4mL)中的溶液中添加三氟化三乙胺(364μL, 2.24mmol), 并将所得混合物搅拌过夜。LC-MS(方法2-90)展示存在产物(滞留时间2.77分钟; m/z 789.6[M+H]⁺)。在减压下浓缩反应混合物并通过HPLC纯化残余

物,得到标题化合物(101.6mg,47%产率,100%纯度)。

[0375] 实例18

[0376] 制备(3-溴苯基)乙酸甲酯

[0377] 将经搅拌的(3-溴苯基)乙酸(10.0g,0.0465mol)和浓硫酸(4.5mL)于MeOH(230mL)中的溶液在40℃下加热16小时。在减压下浓缩反应混合物,并将残余物与水(50mL)和DCM(100mL)混合。分离各层且在减压下浓缩有机层。通过硅胶快速色谱法(0-10%EtOAc/己烷)纯化残余物,得到无色油状标题化合物(19.8g,91%产率)。

[0378] LC-MS(方法10-90):滞留时间3.36分钟; m/z 300.4[M+H]⁺;229.6[M⁺]¹H NMR(CD₃OD)δ7.48(s,1H);7.44(d,1H);7.26-7.25(m,2H);3.71(s,3H);3.66(s,2H)。

[0379] 实例19

[0380] 制备[3-(2-氧代丙基)苯基]乙酸甲酯

[0381] 将经搅拌的(3-溴苯基)乙酸甲酯(19.7g,86.0mmol)、甲氧基三丁基锡(37.1mL,129mmol)、乙酸异丙烯酯(14.2mL,129mmol)、乙酸钡(961mg,4.28mmol)和三-邻甲苯基膦(2.63g,8.64mmol)于甲苯(70mL)中的混合物在100℃下加热6小时。添加氟化钾水溶液(4M,120mL)和EtOAc(200mL),并将所得混合物搅拌过夜。随后经由硅藻土(Celite)过滤混合物且分离各层。用水洗涤有机层且随后在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-8%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到标题化合物(11.8g,66%产率)。

[0382] LC-MS(方法10-90):滞留时间4.24分钟; m/z 207.3[M+H]⁺。

[0383] 实例20

[0384] 制备{3-[(S)-2-((S)-1-苯基乙基氨基)丙基]苯基}乙酸甲酯盐酸盐

[0385] 将[3-(2-氧代丙基)苯基]乙酸甲酯(2.31g,11.2mmol)、(S)-1-苯基乙胺(3.4mL,27.0mmol)、三乙酰氧基硼氢化钠(14g,68.0mmol)和硫酸镁(3.2g,27.0mmol)于DCM(69mL)中的混合物搅拌过夜。将反应混合物冷却至0℃,且添加饱和碳酸氢钠水溶液(150mL)直至停止起泡。分离各层且用DCM(70mL)萃取水层。合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-10%MeOH的DCM溶液)纯化残余物。添加盐酸水溶液(6N,2mL)至产物中以形成盐酸盐。添加MeOH(50mL)且在减压下浓缩所得混合物。重复此程序且随后添加最少量MeOH(5mL)以完全溶解固体。添加二异丙基醚(9mL)并将所得混合物在室温下静置2小时。通过过滤收集所得沉淀物且用乙醚洗涤,得到白色固体状标题化合物(2.85g;81%产率;分离的S,S为10:1)。

[0386] LC-MS(方法2-90):滞留时间2.28分钟; m/z 312.2[M+H]⁺。¹H NMR(CD₃OD)δ7.71-7.69(m,4H);7.45(t,1H);7.35(t,1H);7.20-7.17(m,3H);4.80-4.76(m,1H);3.85(s,3H);3.81(s,2H);3.42-3.40(m,1H);2.80(t,2H);1.86(d,3H);1.37(d,3H)。

[0387] 实例21

[0388] 制备[3-((S)-2-氨基丙基)苯基]乙酸甲酯

[0389] 将经搅拌的{3-[(S)-2-((S)-1-苯基乙基氨基)丙基]-苯基}乙酸甲酯盐酸盐(1.12g,3.60mmol)、甲酸铵(1.16g,257mmol)和氢氧化钡(0.30g,2.1mmol)于EtOH(40mL)中的溶液在75℃下加热1小时。经由硅藻土过滤反应混合物,并用EtOAc(2×50mL)洗涤滤饼。在减压下浓缩滤液,且将残余物溶解于DCM(50mL)和20%氨水溶液(50mL)中。分离各层且用DCM萃取水层。合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到无色油状标题化合

物(437mg, 58%产率)。

[0390] LC-MS(方法2-90): 滞留时间1.18分钟; m/z 208.4[M+H]⁺。¹H NMR(CD₃OD) δ 7.43(t, 1H); 7.29-7.25(m, 3H); 3.85(s, 3H); 3.81(s, 2H); 3.31-3.23(m, 1H); 2.85-2.75(m, 2H); 1.26(d, 3H)。

[0391] 实例22

[0392] 制备(3-((S)-2-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酸甲酯

[0393] 将[3-((S)-2-氨基丙基)苯基]乙酸甲酯(632mg, 3.05mmol)和三乙胺(1.27mL, 9.15mmol)于N-甲基吡咯烷酮(3.4mL, 35mmol)中的溶液添加至8-苄基氧基-5-[(R)-2-溴-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-乙基]-1H-喹啉-2-酮(1.5g, 3.0mmol)中(参见例如2006年2月16日公开的美国专利公开案第2006/0035931A1号)。所得混合物在100°C下微波加热(300瓦)1.5小时。随后用EtOAc(20mL)稀释混合物,且反复用盐水(100mL)洗涤此溶液,经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-10%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到黄色油状标题化合物(400mg, 20%产率)。

[0394] LC-MS(方法2-90): 滞留时间2.79分钟; m/z 615.4[M+H]⁺。

[0395] 实例23

[0396] 制备(3-((S)-2-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酸

[0397] 向(3-((S)-2-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酸甲酯(810mg, 1.3mmol)于THF/MeOH/水的3:2:1混合物(4mL)中的溶液中添加氢氧化锂(158mg, 6.59mmol)。所得混合物在室温下搅拌3小时,且随后用浓盐酸水溶液酸化至pH6。在减压下浓缩此混合物,得到黄色固体(307mg, 39%产率),其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0398] LC-MS(方法2-90): 滞留时间3.10分钟; m/z 601.4[M+H]⁺。

[0399] 实例24

[0400] 制备(3-((S)-2-[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酸

[0401] 用干燥氮气净化(3-((S)-2-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酸(约1.3mmol)于EtOH(8mL)中的溶液,且随后添加钨/碳(10%, 约50%水, 德古萨型(Degussa type), 300mg)。用氢气净化此混合物,且随后在氢气氛围(气球)下搅拌1小时。随后经由硅藻土过滤混合物且用MeOH(20mL)和EtOAc(20mL)洗涤滤床。在减压下浓缩滤液,并通过硅胶快速色谱法(0-20%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到黄色固体状标题化合物(300mg, 40%产率)。

[0402] LC-MS(方法2-90): 滞留时间2.67分钟; m/z 511.6[M+H]⁺。

[0403] 实例25

[0404] 制备[3-(9H-苻-9-基甲氧基羰基氨基)丙基]甲基氨基甲酸叔丁酯

[0405] 在0°C下向经搅拌的N-(3-氨基丙基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(2.00g, 10.6mmol)和碳酸钠(2.81g, 26.6mmol)于水(7mL)中的溶液中添加氯甲酸9-苻基甲酯(2.75g, 10.6mmol)于1,4-二噁烷(5mL)中的溶液。所得混合物在室温下搅拌2小时,且随后倒入水

(10mL)中。用乙醚(2×50mL)萃取此混合物,且合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到澄清油状物。通过硅胶快速色谱法(0-70%EtOAc的己烷溶液)纯化油状物,得到澄清油状标题化合物(4.24g,77%产率)(产物含有少量杂质,但未经进一步纯化即使用)。

[0406] LC-MS(方法2-90):滞留时间4.05分钟; m/z 411.2[M+H]⁺。¹H NMR(CD₃OD)δ7.96(d, 2H);7.81(d,2H),7.56(t,2H);7.48(t,2H);4.55(d,2H);4.37(t,1H);3.41(t,2H);3.27(t, 2H);3.01(s,3H);1.89-1.85(m,2H);1.61(s,9H)。

[0407] 实例26

[0408] 制备(3-甲基氨基丙基)氨基甲酸9H-苈-9-基甲酯盐酸盐

[0409] 向经搅拌的[3-(9H-苈-9-基甲氧基羰基氨基)丙基]-甲基氨基甲酸叔丁酯(4.24g,10.3mmol)于EtOAc(8mL)中的溶液中缓慢添加浓盐酸(2mL,60mmol),并将所得混合物在室温下搅拌过夜。在减压下浓缩混合物,得到白色固体状标题化合物(3.21g,78%产率)。

[0410] LC-MS(方法2-90):滞留时间2.32分钟; m/z 311.4[M+H]⁺。¹H NMR(CD₃OD)δ7.82(d, 2H);7.66(d,2H),7.42(t,2H);7.34(t,2H);4.45(d,2H);4.12(t,1H);3.23(t,2H);2.99(t, 2H);2.71(s,3H);1.88-1.83(m,2H)。

[0411] 实例27

[0412] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-([3-(9H-苈-9-基甲氧基羰基氨基)丙基]甲基氨甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯

[0413] 向经搅拌的3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]-丙酸(2.8g,7.6mmol)和N,N-二异丙基乙胺(2.6mL,15mmol)于DMF(31mL)中的混合物中添加2-氯-1-甲基碘化吡啶(3.9g,15mmol)。一旦固体溶解,即添加(3-甲基氨基丙基)氨基甲酸9H-苈-9-基甲酯盐酸盐(2.63g,7.58mmol),并在室温下搅拌所得混合物,直至由HPLC和LCMS测定基本上完成。随后在减压下浓缩混合物以移除大部分DMF,并将残余物溶解于DCM(30mL)中。用水(3×20mL)和盐水(3×20mL)洗涤此混合物,经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-20%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到白色固体状标题化合物(5.0g,97%产率)。

[0414] LC-MS(方法2-90):滞留时间3.24分钟; m/z 661.4[M+H]⁺。

[0415] 实例28

[0416] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-{2-[(3-氨基丙基)-甲基氨甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯

[0417] 向联苯-2-基氨基甲酸1-(2-([3-(9H-苈-9-基甲氧基羰基-氨基)丙基]甲基氨甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯(2.2g,3.3mmol)中添加哌啶(0.31g,3.3mmol)于DCM(3.2mL)中的10%溶液,并将所得混合物在室温下振荡1小时。在减压下浓缩混合物,并将残余物溶解于DCM(100mL)中。用水(2×20mL)洗涤此混合物,且随后用氯化铵(1N,2×20mL)萃取。分离各层且将DCM添加至水层中。通过添加氢氧化钾水溶液(1N)使水层呈碱性且分离各层。用氢氧化钾水溶液(1N,2×20mL)和盐水(1×20mL)洗涤有机层,经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到澄清油状标题化合物(1.0g,66%产率)。

[0418] LC-MS(方法2-90):滞留时间1.85分钟; m/z 439.4[M+H]⁺。

[0419] 实例29

[0420] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-[2-({3-[2-(3-((S)-2-[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基

氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苯基)乙酰基氨基]丙基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

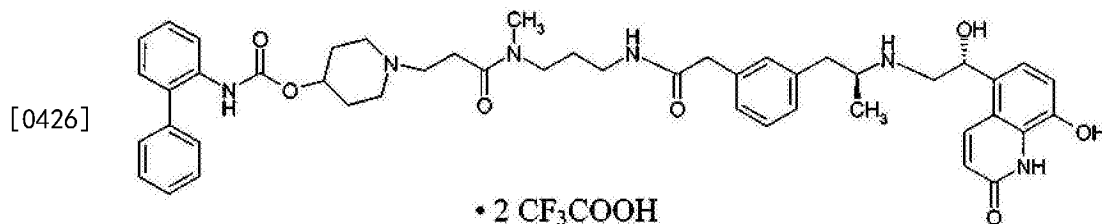
[0421] 将(3-((S)-2-((R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苯基)乙酸(135mg, 0.264mmol); 三氟甲磺酸2-氯吡啶/王氏树脂(Wang resin)(聚合物支撑的向山试剂(polymer-supported Mukaiyama reagent))(1.19mmol/g装载量; 635mg, 0.775mmol)和N,N-异丙基乙胺(132 μ L, 0.755mmol)于DMF(4.78mL)中的混合物在室温下搅拌30分钟。添加联苯-2-基氨基甲酸1-((2-((3-氨基丙基)甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯(122mg, 0.278mmol), 并将此混合物在室温下搅拌过夜。过滤混合物, 并用DCM(4mL)、MeOH(4mL)和THF(4mL)洗涤树脂。在减压下浓缩滤液且将残余物溶解于DCM中。用水(2 \times 10mL)、饱和碳酸氢钠水溶液(2 \times 10mL)和盐水(1 \times 10mL)洗涤此溶液; 且随后经硫酸钠干燥, 过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-20%MeOH的DCM溶液)纯化残余物, 得到白色固体状标题化合物(59mg, 24%产率)。

[0422] LC-MS(方法2-90): 滞留时间4.35分钟; m/z 931.7[M+H]⁺。

[0423] 或者, 可使用EDC与HOBt的组合作为偶合试剂来进行此反应。

[0424] 实例30

[0425] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-((2-((3-((2-((3-((S)-2-((R)-2-(叔丁基-二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苯基)乙酰基氨基]-丙基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐(化合物I-13)



[0427] 将联苯-2-基氨基甲酸1-((2-((3-((2-((3-((S)-2-((R)-2-(叔丁基-二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}-苯基)乙酰基氨基]-丙基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(59mg, 0.063mmol)和三氟化三乙胺(10.3 μ L, 0.0634mmol)于DCM(1mL)中的溶液在80 $^{\circ}$ C下微波加热(300瓦)20分钟。随后在减压下浓缩反应混合物, 并通过HPLC(方法10-50)纯化残余物, 得到标题化合物(35.2mg, 52%产率)。

[0428] LC-MS(方法2-90): 滞留时间2.16分钟; m/z 817.6[M+H]⁺。

[0429] 实例31

[0430] 制备5-甲基氨基戊酸甲酯盐酸盐

[0431] 将经搅拌的1-甲基-2-哌啶酮(4.40mL, 40.0mmol)于氢氧化钠水溶液(4M, 11.0mL, 44.0mmol)中的溶液在100 $^{\circ}$ C下加热15小时。将反应混合物冷却至室温, 且随后用浓盐酸酸化至pH2。随后在减压下浓缩混合物, 得到带粉红色的白色固体状粗5-甲基氨基戊酸。向所述粗5-甲基氨基戊酸中添加MeOH(40.0mL, 987mmol)和浓盐酸(0.33mL, 4.0mmol)。将所得混浊溶液在60 $^{\circ}$ C下加热39小时, 此时LC-MS展示仍有起始物质剩余。再添加浓盐酸(0.33mL, 4.0mmol), 并将所得混合物在60 $^{\circ}$ C下加热33小时, 随后在65 $^{\circ}$ C下再加热24小时。LC-MS展示仍有起始物质剩余。在减压下浓缩反应混合物, 并将氯化氢的MeOH溶液(1.25M)添加至残余物中。将所得混合物在60 $^{\circ}$ C下加热72小时, 此时通过LC-MS观测到无剩余起始物质。在减压

下部分浓缩反应混合物且通过过滤移除所形成的固体物质,用MeOH洗涤。随后在减压下浓缩滤液,得到浅黄色固体状5-甲基氨基戊酸甲酯盐酸盐(7.57g,100%产率)。

[0432] LC-MS(方法2-90):滞留时间1.10分钟; m/z 146.4[M+H]⁺。¹H NMR(CD₃OD)δ4.86(s), 3.66(s), 3.30(t), 3.00(t), 2.69(s), 2.41(t), 1.71(m)。

[0433] 实例32

[0434] 制备5-({3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}甲基氨基)戊酸甲酯

[0435] 将5-甲基氨基戊酸甲酯盐酸盐(7.27g,40.0mmol)、3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酸(13.3g,36.0mmol)和1-羟基-7-氮杂苯并三唑(5.14g,37.8mmol)于DCM(160mL)和2,6-二甲基吡啶(12.5mL,108mmol)中的混合物在室温下搅拌3小时。添加N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(10.4g,54.0mmol),并将所得混合物在室温下搅拌2小时。添加饱和碳酸氢钠水溶液(约100mL)且分离各层。用DCM(50mL)萃取水层,并合并有机层,经硫酸钠干燥,过滤且在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(30-100%EtOAc的己烷溶液;随后2-10%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到浅黄色浓稠油状/白色固体状标题化合物(12.38g,69%产率)。

[0436] LC-MS(方法2-90):滞留时间2.43分钟; m/z 496.6[M+H]⁺。¹H NMR(CDC₁₃)δ8.10(d, 1H), 7.40(m, 6H), 7.20(m, 2H), 6.58(s, 1H), 4.74(m, 1H), 3.66(d, 3H), 3.37(t, 1H), 3.29(m, 1H), 2.97(s, 2H), 2.91(s, 1H), 2.70(m, 4H), 2.49(m, 2H), 2.34(m, 4H), 1.92(m, 2H), 1.60(m, 5H)。

[0437] 实例33

[0438] 制备5-({3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}甲基氨基)戊酸

[0439] 向5-({3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}-甲基氨基)戊酸甲酯(10.21g,20.60mmol)、叔丁醇(20mL)和水(20mL)的混合物中添加LiOH:水的1:1混合物(1.97g,41.2mmol)。所得混合物在室温下搅拌4小时,且随后混合物的pH值使用盐酸水溶液(1N)调节至约pH2。用DCM(2×约80mL)萃取水层,且合并有机层,经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到灰白色泡沫固体状标题化合物(12.23g,定量)(含有残余叔丁醇)。

[0440] LC-MS(方法2-90):滞留时间2.32分钟; m/z 482.4[M+H]⁺。

[0441] 实例34

[0442] 制备2-(4-硝基苯基)-1,3-二氧戊环

[0443] 将经搅拌的对硝基苯甲醛(101.5g,672mmol)、乙二醇(112mL)和对甲苯磺酸(12.8g,67.2mmol)于甲苯(800mL)中的溶液在配备有迪恩-斯达克分水器(Dean-Starktrap)的烧瓶中在120℃下加热4小时。冷却至室温后,在减压下浓缩反应混合物。向残余物中添加饱和碳酸氢钠水溶液(800mL),并将此混合物在室温下搅拌15分钟。通过过滤分离所得固体且在真空下干燥,得到黄色固体状标题化合物(121.8g,92%产率)。

[0444] ¹H NMR(DMSO-d₆):δ8.12(d, 2H), 7.59(d, 2H), 5.78(s, 1H), 3.8-4.0(m, 4H)。

[0445] 实例35

[0446] 制备4-(1,3-二氧戊环-2-基)苯胺

[0447] 在干燥氮气下向二氧化铂(227mg,1.00mmol)和碳酸氢钠(420mg,5.00mmol)的混合物中添加2-(4-硝基苯基)-1,3-二氧戊环(976mg,5.00mmol)于EtOH(30.0mL)中的溶液。

用氢气在反应混合物中鼓泡15分钟,且随后在氢气氛围(气球)下搅拌2小时。随后经由硅藻土垫过滤反应混合物,同时用MeOH洗涤。在减压下浓缩滤液,得到标题化合物(0.80g,96%产率)。

[0448] 实例36

[0449] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[4-(4-(1,3-二氧戊环-2-基)-苯基氨甲酰基)丁基]甲基氨甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0450] 向经搅拌的5-({3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]-丙酰基}甲基氨基)戊酸(2.33g,4.84mmol)、4-(1,3-二氧戊环-2-基)苯胺(800mg,5mmol)和N,N-二异丙基乙胺(1.26mL,7.26mmol)于DCM(48.4mL)中的溶液中添加1-羟基-7-氮杂苯并三唑(692mg,5.08mmol)和N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(1.39g,7.26mmol)。所得混合物在室温下搅拌过夜。随后用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤反应混合物,经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到黄色固体状标题化合物(3.04g,100%产率)。

[0451] LC-MS(方法10-70):滞留时间2.67分钟; m/z 629.6[M+H]⁺。

[0452] 实例37

[0453] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[4-(4-甲酰基苯基氨甲酰基)丁基]甲基氨甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0454] 将经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[4-(4-(1,3-二氧戊环-2-基)苯基氨甲酰基)丁基]甲基氨甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(3.04g,4.84mmol)于盐酸水溶液(1M,10mL)和乙腈(10mL)中的混合物在50℃下加热2小时。在减压下浓缩反应混合物,并将饱和碳酸氢钠水溶液和DCM添加至残余物中。分离各层,且有机层经硫酸钠干燥,过滤且在减压下浓缩,得到标题化合物(2.83g,100%产率)。

[0455] LC-MS(方法10-70):滞留时间2.67分钟; m/z 585.4[M+H]⁺。

[0456] 实例38

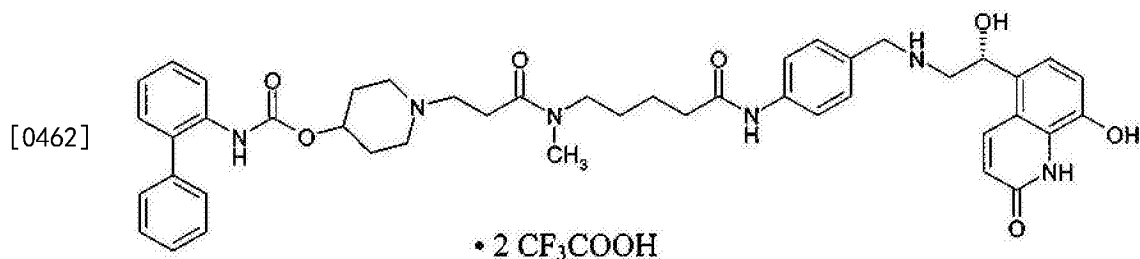
[0457] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[4-(4-[(R)-2-(叔丁基二甲基-硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基)-苯基氨甲酰基)丁基]甲基氨甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0458] 向经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[4-(4-甲酰基-苯基氨甲酰基)丁基]甲基氨甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(2.83g,4.84mmol)和5-[(R)-2-氨基-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-羟基-1H-喹啉-2-酮乙酸盐(1.91g,4.84mmol)于MeOH:DCM的1:1混合物(40.0mL,312mmol)中的溶液中添加三乙酰氧基硼氢化钠(3.08g,14.5mmol)。反应混合物在室温下搅拌2小时且随后分离各层。用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤有机层,经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到黄色固体。通过硅胶快速色谱法(0-30%MeOH的DCM溶液+0.5%NH₄OH)纯化固体,得到黄色固体状标题化合物(3.60g,82%产率)。

[0459] LC-MS(方法10-70):滞留时间2.72分钟; m/z 903.8[M+H]⁺。

[0460] 实例39

[0461] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[4-(4-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基)-苯基氨甲酰基)-丁基]甲基氨甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐(化合物I-14)



[0463] 向经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-(2-[[4-(4-[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]-甲基)苯基氨基甲酰基]丁基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(3.60g, 3.98mmol)于DCM:DMF的9:1混合物(32.9mL)中的溶液中添加三氢氟化三乙胺(1.95mL, 12.0mmol)。所得混合物在室温下搅拌过夜,且随后在减压下浓缩。通过HPLC(方法10-70)纯化残余物,得到白色固体状标题化合物(1.90g, 46%产率)。

[0464] LC-MS(方法10-70):滞留时间2.12分钟; m/z 789.6[M+H]⁺。

[0465] 实例40

[0466] 制备二苄基-(4-碘-2,5-二甲基苯基)胺

[0467] 将2,5-二甲基-4-碘苯胺(6.44g, 26.1mmol)、苄基溴(11.50g, 67.24mmol)和碳酸钾(8.20g, 59.3mmol)于EtOH(100mL)中的混合物在50℃下搅拌12小时。随后在减压下浓缩反应混合物。将残余物(紫色固体)与DCM混合且使用真空过滤此混合物。通过硅胶快速色谱法(0-5%MeOH的DCM溶液)纯化滤液,得到油状标题化合物(9.35g, 83%产率)。

[0468] LC-MS(方法10-90):滞留时间3.99分钟; m/z 428.4[M+H]⁺。

[0469] 实例41

[0470] 制备4-二苄基氨基-2,5-二甲基苯甲醛

[0471] 在氮气下,在-15℃下经由注射器经30分钟时间向经搅拌的二苄基-(4-碘-2,5-二甲基苯基)胺(9.35g, 21.9mmol)于甲苯(100mL)中的溶液中逐滴添加正丁基锂的己烷溶液(1.6M, 20.5mL, 32.8mmol)。所得混合物在-15℃下搅拌15分钟,且随后经10分钟时间逐滴添加N,N-甲基甲酰胺(1.86mL, 24.1mmol)。2小时后,添加盐酸水溶液(1M, 46.6mL)和盐水(30mL),并将所得混合物搅拌15分钟。分离各层,且用盐水萃取有机层,经硫酸镁干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-50%DCM的己烷溶液)纯化残余物,得到澄清油状标题化合物(3.60g, 49%产率)。

[0472] LC-MS(方法10-90):滞留时间3.76分钟; m/z 330.4[M+H]⁺。

[0473] 实例42

[0474] 制备二苄基-[4-(1,3-二氧戊环-2-基)-2,5-二甲基苯基]胺

[0475] 在氮气下向经搅拌的4-二苄基氨基-2,5-二甲基苯甲醛(3.60g, 10.9mmol)于甲苯(35.0mL)中的溶液中添加1,2-乙二醇(1.83mL, 32.8mmol)和对甲苯磺酸(451mg, 2.62mmol)。反应混合物在80℃下加热过夜。TLC(3:1己烷:EtOAc)展示产物与起始物质的约50:50混合物。添加硫酸镁(1.32g, 10.9mmol)且继续搅拌6小时。随后过滤反应混合物并在减压下浓缩,得到油状标题化合物(3.19g, 78%产率)。

[0476] 实例43

[0477] 制备(4-氨基-2,5-二甲基苯基)甲醇

[0478] 用氮气吹拂经搅拌的二苄基-[4-(1,3-二氧戊环-2-基)-2,5-二甲基苯基]胺(2.00g,5.35mmol)于EtOH(14.0mL)和EtOAc(7.00mL)中的溶液3分钟,且随后添加碳酸氢钠(0.200g,2.38mmol)和钯/活性碳(10重量%,约50%水;0.800g,0.360mmol)。用氢气吹拂反应混合物3分钟,且随后在氢气氛围(气球)下搅拌3小时。随后经由硅藻土垫过滤混合物,并用MeOH(10mL)洗涤垫。在减压下浓缩滤液,得到标题化合物,其未经任何进一步纯化即使用。

[0479] 实例44

[0480] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(4-羟基甲基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)丙基}甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0481] 将5-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}-甲基氨基)戊酸(1.19g,2.46mmol);(4-氨基-2,5-二甲基苯基)-甲醇(372mg,2.46mmol)和N,N-异丙基乙胺(858 μ L,4.93mmol)于DCM(18.5mL)中的溶液在室温下搅拌30分钟。添加N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(708mg,3.69mmol),并将所得混合物在室温下搅拌3小时。添加饱和碳酸氢钠水溶液(5mL)且用DCM(2 \times 2mL)萃取此混合物。合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-10%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到黄色油状标题化合物(460mg,31%产率)。

[0482] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.53分钟;m/z599.4[M+H]⁺。

[0483] 实例45

[0484] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{4-(4-甲酰基-2,5-二甲基-苯基氨基甲酰基)丁基}甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0485] 在0 $^{\circ}$ C下向经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{4-(4-羟基甲基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)丁基}甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(0.460g,0.748mmol)和二甲基亚砜(0.531mL,7.48mmol)于DCM(2.58mL)中的溶液中添加N,N-异丙基乙胺(0.65mL,3.7mmol)。添加三氧化硫-吡啶络合物(0.357g,2.24mmol),并将所得混合物在0 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。添加水(3mL)且分离各层。有机层经硫酸钠干燥且过滤,得到标题化合物的DCM溶液,其立即用于下一反应中。

[0486] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.44分钟;m/z613.4[M+H]⁺。

[0487] 实例46

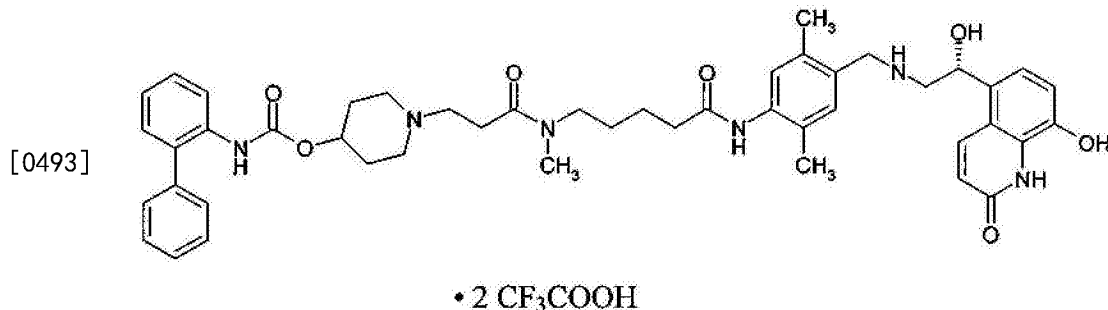
[0488] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{4-(4-{{(R)-2-(叔丁基二甲基-硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基}甲基}-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)丁基}甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0489] 向来自先前反应的经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{4-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)丁基}甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(约0.748mmol)的DCM溶液中添加5-((R)-2-氨基-1-(叔丁基-二甲基硅烷基氧基)乙基)-8-羟基-1H-喹啉-2-酮乙酸盐(0.295g,0.748mmol)的1:1MeOH:DCM(3.0mL)溶液。所得混合物在室温下搅拌30分钟且随后添加三乙酰氧基硼氢化钠(0.476g,2.24mmol),并在室温下继续搅拌4小时。添加NaOH水溶液(1M,3mL)和DCM(3mL)且分离各层。有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-15%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到黄色固体状标题化合物(420mg,60%产率)。

[0490] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.39分钟; m/z 931.6[M⁺].

[0491] 实例47

[0492] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[4-(4-{[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)丁基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐(化合物I-18)



[0494] 将联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[4-(4-{[(R)-2-(叔丁基-二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)丁基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(0.420g, 0.451mmol)和三氢氟化三乙胺(0.220mL, 1.35mmol)于DCM(2.00mL)中的溶液在80℃下微波加热(300瓦)10分钟。在减压下浓缩反应混合物,并将残余物与1:1AcOH:水混合且过滤。通过HPLC(方法2-90)纯化滤液,得到白色固体状标题化合物(124mg, 26%产率)。

[0495] LC-MS(方法10-90):滞留时间1.75分钟; m/z 817.8[M+H]⁺。¹H NMR(CD₃OD)δ8.30(m), 7.56(m), 7.40(m), 7.06(m), 6.68(d), 5.46(m), 4.35(s), 3.51(m), 3.30(m), 3.16(m), 2.94(m), 2.42(m), 2.27(m), 1.97(m), 1.72(m)。

[0496] 实例48

[0497] 制备3-甲基氨基苯甲酸甲酯

[0498] 在室温下搅拌甲酸(106mL)和乙酸酐(53.0mL)的溶液1小时。添加3-氨基苯甲酸甲酯(8.50g, 56.2mmol),并将所得混合物搅拌过夜。随后在减压下浓缩反应混合物,得到固体。固体溶解于THF(50.0mL)中且将此溶液冷却至0℃。缓慢添加硼烷二甲基硫醚(10.7mL, 112mmol),并将所得混合物在室温下搅拌过夜。随后将反应混合物冷却至0℃且缓慢添加MeOH(10mL)。搅拌此混合物3小时,且随后在减压下浓缩,得到标题化合物,其未经任何进一步纯化即使用。

[0499] LC-MS(方法10-90):滞留时间1.25分钟; m/z 166.4[M+H]⁺。

[0500] 实例49

[0501] 制备3-(丙烯酰基甲基氨基)苯甲酸甲酯

[0502] 在0℃下向经搅拌的3-甲基氨基苯甲酸甲酯(3.11g, 18.8mmol)和碳酸氢钠(3.16g, 37.6mmol)于DCM(20.0mL)中的混合物中添加2-丙烯酰氯(2.29mL, 28.2mmol)。反应混合物在室温下搅拌过夜。添加饱和碳酸氢钠水溶液且分离各层。有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到标题化合物(4.12g, 100%产率),其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0503] 实例50

[0504] 制备3-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}甲基氨基)苯甲酸

甲酯

[0505] 将经搅拌的3-(丙烯酰基甲基氨基)苯甲酸甲酯(估计约56mmol)和联苯-2-基氨基甲酸哌啶-4-基酯(16.6g, 56.0mmol)于EtOH(20.0mL)中的溶液在90℃下加热过夜。在减压下浓缩反应混合物,并通过硅胶快速色谱法(0-10%MeOH的DCM溶液)纯化所得残余物,得到灰白色固体状标题化合物(13.0g, 45%产率)。

[0506] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.30分钟; m/z 516.2[M+H]⁺。

[0507] 实例51

[0508] 制备3-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}甲基氨基)苯甲酸

[0509] 在室温下搅拌3-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]-丙酰基}甲基氨基)苯甲酸甲酯(6.80g, 13.2mmol)和氢氧化锂(1.58g, 65.9mmol)于乙腈:水的1:1混合物(25.0mL)中的溶液过夜。反应混合物的pH值用盐酸水溶液(1M)调节至pH5,并用DCM(20mL)萃取此混合物。有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-10%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到灰白色粉末状标题化合物(5.80g, 87%产率)。

[0510] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.15分钟; m/z 502.2[M+H]⁺。

[0511] 实例52

[0512] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-[(3-氯羰基苯基)甲基-氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯

[0513] 在室温下搅拌3-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}-甲基氨基)苯甲酸(1.00g, 2.00mmol)和亚硫酸氯(1.50mL, 20.6mmol)的混合物1小时。随后在减压下浓缩反应混合物,得到标题化合物,其未经进一步纯化即立即用于下一反应。

[0514] 实例53

[0515] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(4-(1,3-二氧戊环-2-基)-苯基氨基甲酰基)苯基}甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0516] 在室温下向经搅拌的4-(1,3-二氧戊环-2-基)苯胺(0.0826g, 0.500mmol)和N,N-二异丙基乙胺(348μL, 2.00mmol)于DCM(2.0mL)中的溶液中添加联苯-2-基氨基甲酸1-{{2-[(3-氯羰基苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯(0.260g, 0.500mmol)于DCM(1.0mL)中的溶液。所得混合物在室温下搅拌1小时。LC-MS(方法10-90)展示存在产物(滞留时间3.41分钟; m/z 649.4[M+H]⁺)。添加饱和碳酸氢钠水溶液且分离各层。有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-5%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到棕色油状标题化合物(345mg, 含有一些溶剂残余物,约100%产率)。

[0517] 实例54

[0518] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(4-甲酰基苯基氨基甲酰基)-苯基}甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0519] 在室温下向经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(4-(1,3-二氧戊环-2-基)苯基氨基甲酰基)苯基}甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(345mg, 含有一些溶剂残余物,约0.500mmol)于乙腈(2.00mL)中的溶液中添加盐酸水溶液(1N, 2.00mL)。反应混合物在室温下搅拌3小时。LC-MS(方法10-90)展示存在产物(滞留时间3.45分钟; m/z 605.0[M+H]⁺)。添加饱和碳酸氢钠水溶液且分离各层。有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到标题化合物,其未经进一步纯化即用于下一反应。

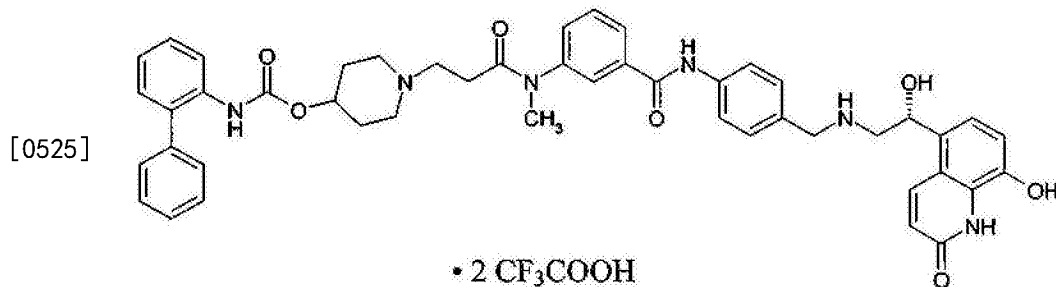
[0520] 实例55

[0521] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-{[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]-甲基}苯基氨基甲酰基)苯基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0522] 在室温下搅拌联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-甲酰基苯基氨基甲酰基)-苯基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(151mg, 0.250mmol)和5-[(R)-2-氨基-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-羟基-1H-喹啉-2-酮乙酸盐(98.6mg, 0.250mmol)于1:1MeOH:DCM(2.0mL)中的溶液3小时。添加三乙氧基硼氢化钠(159mg, 0.750mmol), 并将反应混合物在室温下搅拌3小时。LC-MS(方法10-90)展示存在产物(滞留时间3.32分钟; m/z 923.6[M+H]⁺)。添加饱和碳酸氢钠水溶液且分离各层。有机层经硫酸钠干燥, 过滤并在减压下浓缩, 得到标题化合物, 其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0523] 实例56

[0524] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-{2-[4-{[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基}-3-甲氧基苯基]-甲基氨基甲酰基}乙基}哌啶-4-基酯二-三氟乙酸(化合物1-25)



[0526] 在室温下搅拌联苯-2-基氨基甲酸1-{2-[4-{[(R)-2-(叔丁基二甲基-硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基}-3-甲氧基苯基)甲基氨基甲酰基}乙基}哌啶-4-基酯(231mg, 0.250mmol)和三氟化三乙胺(204 μ L, 1.25mmol)于DCM(2.00mL)中的溶液过夜。LC-MS(方法10-90)展示存在产物(滞留时间2.73分钟; m/z 809.6[M+H]⁺)。在减压下浓缩反应混合物, 并通过HPLC(方法10-50)纯化残余物, 得到白色固体状标题化合物(47.3mg, 23.4%产率, 99%纯度)。

[0527] 实例57

[0528] 制备4-硝基苯磺酸2-(4-硝基苯基)乙酯

[0529] 在0 $^{\circ}$ C下经5分钟时间向经搅拌的4-硝基苯乙醇(3.34g, 20.0mmol)和三亚乙基二胺(3.36g, 30.0mmol)于DCM(62.7mL)中的溶液中逐份添加4-硝基苯磺酰氯(4.97g, 22.43mmol)。反应混合物随后在室温下搅拌2小时。添加水(50mL)且将所得混合物搅拌10分钟。分离有机层, 经硫酸钠干燥, 过滤并在减压下浓缩, 得到黄色固体状粗标题化合物(5.8g, 82%产率)。

[0530] HPLC(方法2-90):滞留时间4.23分钟(214nm)。

[0531] 实例58

[0532] 制备5-[(R)-2-{苄基-[2-(4-硝基苯基)乙基]氨基}-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮

[0533] 将经搅拌的4-硝基苯磺酸2-(4-硝基苯基)乙酯(3.78g, 10.7mmol); 5-[(R)-2-苄

基氨基-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮(4.620g, 8.975mmol)和N,N-异丙基乙胺(3.59mL, 20.6mmol)于乙腈(39.2mL)中的溶液在65℃下加热过夜。反应混合物冷却至室温后,添加EtOAc(20mL)并用盐水(20mL)洗涤此混合物。有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶色谱法(0-30%EtOAc的己烷溶液)纯化残余物,得到黄色油状标题化合物(3.0g, 50%产率)。

[0534] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.94分钟; m/z 664.4[M+H]⁺。

[0535] 实例59

[0536] 制备5-[(R)-2-{[2-(4-氨基苯基)乙基]苄基氨基}-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮

[0537] 在80℃下搅拌5-[(R)-2-{苄基-[2-(4-硝基苯基)乙基]氨基}-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮(3.00g, 4.52mmol);铁(2.52g, 45.2mmol)和四水合氯化铁(II)(0.18g, 0.90mmol)于EtOH(27.3mL)和AcOH(9.09mL)中的混合物过夜。经由硅藻土垫过滤反应混合物,同时用EtOAc(20mL)洗涤。用盐水(10mL)洗涤有机层,经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到标题化合物,其未经任何进一步纯化即使用。

[0538] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.43分钟; m/z 634.4[M+H]⁺。

[0539] 实例60

[0540] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-[2-({3-[4-(2-{苄基-[噁]-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-氨基}乙基)苯基氨甲酰基)苄基)甲基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

[0541] 在室温下搅拌5-[仁)-2-{{2-(4-氨基苯基)乙基}苄基氨基}-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮(1.27g, 2.00mmol);3-({3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}甲基氨基)苯甲酸(1.00g, 2.00mmol);1-羟基-7-氮杂苯并三唑(0.286g, 2.10mmol)和N,N-异丙基乙胺(0.697mL, 4.00mmol)于DCM(5.00mL)中的混合物30分钟。添加N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(0.575g, 3.00mmol),并将所得混合物搅拌3小时。添加饱和碳酸氢钠水溶液(5mL)且用DCM(2×5mL)萃取此混合物。合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-10%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到黄色固体状标题化合物(1.74g, 77%产率)。

[0542] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.73分钟; m/z 1117.8[M]⁺。

[0543] 实例61

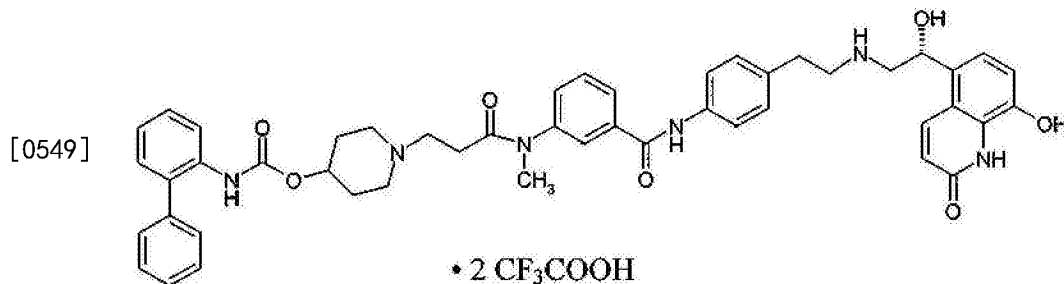
[0544] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{{3-(4-{{2-[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]-乙基}苄基氨甲酰基)苄基}甲基氨甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯

[0545] 用氮气吹拂联苯-2-基氨基甲酸1-[2-({3-[4-(2-{苄基-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-氨基}乙基)苯基氨甲酰基)苄基)甲基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(1.74g, 1.56mmol)于EtOH(12.2mL)和AcOH(0.122mL)中的溶液3分钟。添加钯/碳(10%, 约50%水, 0.18g),并用氢气吹拂反应混合物4分钟。在氢气氛围(气球)下搅拌混合物过夜,且随后过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法(0-15%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到带棕色的浓稠液体状标题化合物(1.11g, 76%产率)。

[0546] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.46分钟; m/z 937.6[M+H]⁺。

[0547] 实例62

[0548] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]乙基}苯基氨基甲酰基)-苯基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐(化合物1-34)



[0550] 将联苯-2-基氨基甲酸1-(2-{[3-(4-{2-[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]-乙基}苯基氨基甲酰基)苯基]甲基氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯(估计约1.56mmol)和三氢氟化三乙胺(299 μ L, 1.84mmol)于DCM(3.06mL)中的溶液在80 $^{\circ}$ C下微波加热(300瓦)10分钟。在减压下浓缩反应混合物,并通过HPLC(方法10-50)纯化残余物,得到白色固体状标题化合物(280mg, 17%)。

[0551] LC-MS(方法10-90):滞留时间1.98分钟; m/z 823.4[M+H]⁺。

[0552] 实例63

[0553] 制备[3-(2-氧代丙基)苯基]乙腈

[0554] 将经搅拌的3-溴苯基乙腈(10.0g, 51.0mmol)、甲氧化三丁基锡(17.6mL, 61.2mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(500mg, 0.5mmol)、乙酸异丙烯酯(6.74mL, 61.2mmol)和2-二环己基膦基-2'-(N,N-甲基氨基)联苯(800mg, 2mmol)于甲苯(100mL, 脱气)中的溶液在氮气下在100 $^{\circ}$ C下加热6小时。反应混合物冷却至室温,并添加EtOAc(30mL)。随后添加氟化钾(10g, 200mmol)于水(52mL)中的溶液,且将所得混合物搅拌过夜。添加盐水并经由硅藻土垫过滤混合物。分离各层,且有机层经硫酸钠干燥,过滤(棉塞)且在减压下浓缩。通过硅胶色谱法(0-30%EtOAc的己烷溶液)纯化残余物,得到棕色油状标题化合物(6.1g, 69%产率)。

[0555] ¹H NMR(CD₃OD) δ 7.32(t, 1H); 7.24(d, 1H); 7.19(s, 1H); 7.16(d, 1H); 3.85(s, 2H); 3.77(s, 2H); 2.14(s, 3H)。

[0556] 实例64

[0557] 制备{3-[(R)-2-((R)-1-苯基乙基氨基)丙基]苯基}乙腈盐酸盐

[0558] 向经搅拌的[3-(2-氧代丙基)苯基]乙腈(2.00g, 11.5mmol)和(R)-1-苯基乙胺(1.52mL, 11.9mmol)于DCM(50.0mL)中的溶液中添加三乙酰氧基硼氢化钠(7.59g, 35.8mmol)。所得混合物在室温下搅拌过夜。添加氢氧化钠水溶液(1M, 10mL)和饱和碳酸氢钠水溶液(20mL)且分离各层。有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶色谱法(0-5%MeOH的DCM溶液)部分纯化残余物。所得物质溶解于MeOH中且添加乙酰氯(0.5mL)。在减压下浓缩此混合物,并将残余物溶解于MeOH(15mL)中。缓慢添加二异丙基醚(30mL)以在溶液顶部形成第二层。在室温下静置后,标题化合物(2.0g, 55%产率)沉淀并通过过滤收集。

[0559] ^1H NMR(CD_3OD) δ 7.53-7.51(m, 5H); 7.32(t, 1H); 7.24(t, 1H); 7.10(s, 1H); 7.05(d, 1H); 4.64-4.59(m, 1H); 3.21-3.16(m, 2H); 1.70(d, 3H); 1.17(d, 3H)。

[0560] 实例65

[0561] 制备{(R)-2-[3-(2-氨基乙基)苯基]-1-甲基乙基}-((R)-1-苯基乙基)胺

[0562] 在0℃下向经搅拌的{3-[(R)-2-((R)-1-苯基乙基氨基)丙基]苯基}-乙腈盐酸盐(2.00g, 6.35mmol)和六水合氯化钴(II)(4.27g, 18.0mmol)于MeOH(40.0mL)中的溶液中逐份添加四氢硼酸钠(2.72g, 71.8mmol)(反应放热)。反应混合物在室温下搅拌1小时,且随后添加浓盐酸水溶液,并继续搅拌直至已形成的固体破碎。随后通过添加氢氧化钠水溶液(1M)使混合物呈碱性。过滤此混合物并用DCM(50mL)萃取滤液。有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到标题化合物,其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0563] LC-MS(方法10-90):滞留时间0.938分钟; m/z 283.6[M+H] $^+$ 。

[0564] 或者,可使用氢化锂铝和六水合氯化钴(II)于THF中进行此还原反应。

[0565] 实例66

[0566] 制备(2-{3-[(R)-2-((R)-1-苯基乙基氨基)丙基]苯基}乙基)氨基甲酸叔丁酯

[0567] 将{(R)-2-[3-(2-氨基乙基)苯基]-1-甲基乙基}-((R)-1-苯基乙基)胺(约6.35mmol)、二碳酸二叔丁酯(1.41g, 6.46mmol)和N,N-异丙基乙胺(1.50mL, 8.62mmol)于DCM(20.0mL)中的溶液在室温下搅拌约72小时。添加饱和碳酸氢钠水溶液(20mL),并用DCM(2×10mL)萃取所得混合物。合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶色谱法(0-5%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到无色油状标题化合物(1.24g, 51%产率, 2个步骤)。

[0568] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.42分钟; m/z 383.2[M+H] $^+$ 。

[0569] 实例67

[0570] 制备{2-[3-((R)-2-氨基丙基)苯基]乙基}氨基甲酸叔丁酯

[0571] 将经搅拌的(2-{3-[(R)-2-((R)-1-苯基乙基氨基)丙基]苯基}乙基)-氨基甲酸叔丁酯(1.54g, 4.02mmol)、氢氧化钡/碳(10重量%, 约50%水, 2.24g, 0.805mmol)和甲酸铵(1.27g, 20.1mmol)于EtOH(50.0mL)中的溶液逐渐加热至50℃,且随后在50℃下搅拌1.5小时。经由硅藻土垫过滤反应混合物,并在减压下浓缩滤液,得到标题化合物,其未经进一步纯化即使用。

[0572] LC-MS(方法10-90):滞留时间1.91分钟; m/z 279.4[M+H] $^+$ 。

[0573] 实例68

[0574] 制备[2-(3-{(R)-2-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基氨基]丙基}苯基)乙基]氨基甲酸叔丁酯

[0575] 将经搅拌的8-苄基氧基-5-[(R)-2-溴-1-(叔丁基二甲基-硅烷基氧基)乙基]-1H-喹啉-2-酮(3.14g, 6.43mmol); {2-[3-((R)-2-氨基丙基)-苯基]乙基}氨基甲酸叔丁酯(1.79g, 6.43mmol)和三乙胺(1.08mL, 7.72mmol)于DMF(21.0mL)中的溶液在80℃下微波加热(300瓦)15小时。添加饱和碳酸氢钠水溶液(10mL),并用DCM(2×10mL)萃取所得混合物。合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶色谱法(0-5%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到灰白色固体状标题化合物(2.8g, 63%产率)。

[0576] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.97分钟; m/z 686.4[M+H] $^+$ 。

[0577] 实例69

[0578] 制备5-[(R)-2-[(R)-2-[3-(2-氨基乙基)苯基]-1-甲基乙基氨基]-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮

[0579] 将[2-(3-[(R)-2-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基氨基]丙基)苯基)乙基]氨基甲酸叔丁酯(2.8g)于20%三氟乙酸的DCM溶液中的溶液在室温下搅拌3小时。添加饱和碳酸氢钠水溶液以中和TFA,且分离各层。有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到标题化合物,其未经进一步纯化即使用。

[0580] LC-MS(方法10-90):滞留时间1.91分钟; m/z 586.4[M+H]⁺。

[0581] 实例70

[0582] 制备(4-甲酰基氨基苯基)乙酸甲酯

[0583] 将乙酸酐(14.3mL,151mmol)和甲酸(22.8mL,605mmol)的溶液在室温下搅拌1小时。添加(4-氨基苯基)乙酸甲酯(5.00g,30.3mmol),并将所得混合物搅拌过夜。添加饱和碳酸氢钠水溶液(10mL)且用DCM(2×10mL)萃取所得混合物。合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到黄色油状标题化合物(4.31g),其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0584] LC-MS(方法10-90):滞留时间1.57分钟; m/z 194.4[M+H]⁺。

[0585] 实例71

[0586] 制备(4-甲基氨基苯基)乙酸甲酯

[0587] 在0℃下向经搅拌的(4-甲酰基氨基苯基)乙酸甲酯(4.31g)于THF(20.0mL)中的溶液中缓慢添加硼烷二甲基硫醚(8.61mL,90.8mmol)。反应混合物在室温下搅拌过夜,且随后冷却至0℃。小心地添加MeOH(15mL),并将所得混合物搅拌3小时。随后在减压下浓缩混合物,得到澄清油状标题化合物(4.0g,73%产率,2个步骤)。

[0588] LC-MS(方法10-90):滞留时间0.67分钟; m/z 180.2[M+H]⁺。

[0589] 实例72

[0590] 制备[4-(丙烯酰基甲基氨基)苯基]乙酸甲酯

[0591] 在0℃下向(4-甲基氨基苯基)乙酸甲酯(4.00g,22.3mmol)和N,N-异丙基乙胺(7.78mL,44.6mmol)于DCM(20.0mL)中的溶液中缓慢添加2-丙烯酰氯(2.18mL,26.8mmol)。反应混合物在室温下搅拌2小时,且随后添加饱和碳酸氢钠水溶液(20.0mL)。用DCM(10mL)萃取此混合物,且有机层经硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩,得到标题化合物,其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0592] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.20分钟; m/z 234.0[M+H]⁺。

[0593] 实例73

[0594] 制备[4-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}-甲基氨基)苯基]乙酸甲酯

[0595] 在回流下加热经搅拌的[4-(丙烯酰基甲基氨基)苯基]乙酸甲酯(约22.3mmol)和联苯-2-基氨基甲酸哌啶-4-基酯(6.61g,22.3mmol)于EtOH(15.0mL)中的溶液过夜。在减压下浓缩反应混合物,并通过硅胶色谱法(0-5%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到棕色粘性固体状标题化合物(8.41g,71%产率,2个步骤)。

[0596] LC-MS(方法10-90):滞留时间2.36分钟; m/z 530.6[M+H]⁺。

[0597] 实例74

[0598] 制备[4-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}-甲基氨基)苯基]乙酸

[0599] 在60℃下加热经搅拌的[4-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]-丙酰基}甲基氨基)苯基]乙酸甲酯(8.00g, 15.1mmol)和氢氧化锂(1.81g, 75.5mmol)于乙腈(20.0mL)和水(20.0mL)中的溶液3小时。反应混合物的pH值用盐酸水溶液(1M)调节至pH5, 并用DCM萃取混合物。有机层经硫酸钠干燥, 过滤并在减压下浓缩。通过硅胶色谱法(0-20% MeOH的DCM溶液)纯化残余物, 得到灰白色固体状标题化合物(6.7g, 86%产率)。

[0600] LC-MS(方法10-90): 滞留时间2.17分钟; m/z 516.4[M+H]⁺。

[0601] 实例75

[0602] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-{2-[(4-{{2-(3-{{(R)-2-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-乙基氨基}丙基}苯基)乙基氨基甲酰基}甲基}苯基)-甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯

[0603] 将5-[(R)-2-{{(R)-2-[3-(2-氨基乙基)苯基]-1-甲基乙基氨基}-1-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)乙基]-8-苄基氧基-1H-喹啉-2-酮(0.586g, 1.00mmol); [4-({3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基}甲基氨基)-苯基]乙酸(0.516g, 1.00mmol); 三氟甲磺酸2-氯吡啶/王氏树脂(聚合物支撑的向山试剂)(1.19mmol/g装载量; 1.68g, 2.00mmol); 和N,N-异丙基乙胺(522μL, 3.00mmol)于DCM(5.00mL)中的混合物在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物并在减压下浓缩滤液。通过硅胶色谱法(0-5% MeOH的DCM溶液)纯化残余物, 得到灰白色油状标题化合物(412mg, 38%产率)。

[0604] LC-MS(方法10-90): 滞留时间2.65分钟; m/z 1083.8[M+H]⁺。

[0605] 实例76

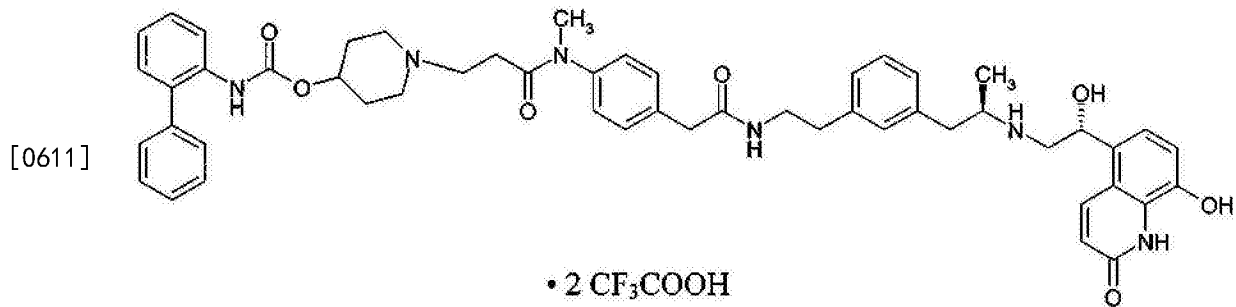
[0606] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-{2-[(4-{{2-(3-{{(R)-2-[(R)-2-(叔丁基-二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]-丙基}苯基)乙基氨基甲酰基}甲基)-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯

[0607] 干燥氮气鼓泡通入经搅拌的联苯-2-基氨基甲酸1-{2-[(4-{{2-(3-{{(R)-2-[(R)-2-(8-苄基氧基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-乙基氨基}丙基}苯基)乙基氨基甲酰基]-甲基}苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}-哌啶-4-基酯(0.704g, 0.650mmol)于EtOH(5.00mL)中的溶液中持续3分钟, 且随后添加钨/碳(10重量%, 约50%水; 0.289g, 0.130mmol)。氢气鼓泡通入反应混合物中持续3分钟, 且随后在氢气氛围(气球)下搅拌混合物1小时。过滤反应混合物, 并在减压下浓缩滤液, 得到标题化合物, 其未经进一步纯化即用于下一反应。

[0608] LC-MS(方法10-90): 滞留时间2.49分钟; m/z 994.0[M+H]⁺。

[0609] 实例77

[0610] 制备联苯-2-基氨基甲酸1-{2-[(4-{{2-(3-{{(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基}丙基}苯基)-乙基氨基甲酰基}甲基}苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐(化合物1-86)



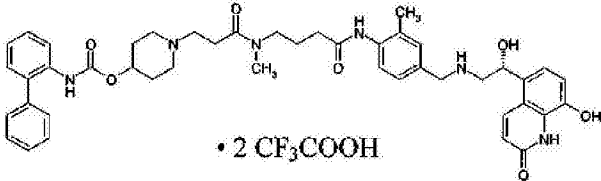
[0612] 将联苯-2-基氨基甲酸1-{2-[(4-[[2-(3-[(R)-2-[(R)-2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]-丙基)苯基)乙基氨基]甲基]苯基)甲基氨基]乙基}哌啶-4-基酯(约0.65mmol)和三氟化三乙胺(184μL, 1.13mmol)于DCM(3.00mL)中的溶液在80℃下微波加热(300瓦)10分钟。在减压下浓缩反应混合物,并通过HPLC(方法10-50)纯化残余物,得到白色固体状标题化合物(24.7mg, 4%产率, 2个步骤)。

[0613] LC-MS(方法10-90):滞留时间1.78分钟; m/z 879.8[M+H]⁺。

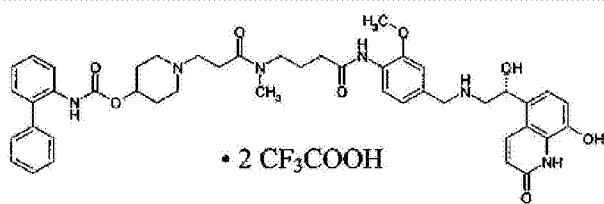
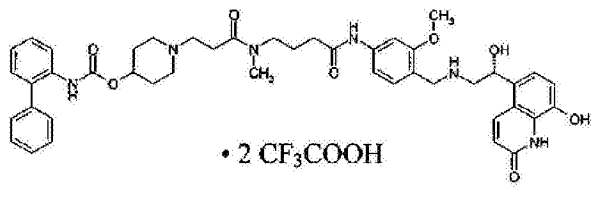
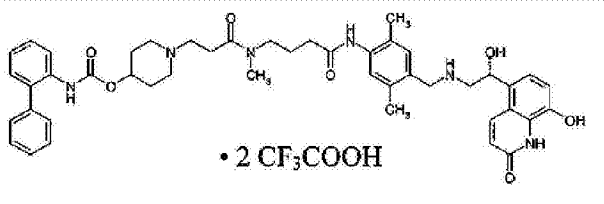
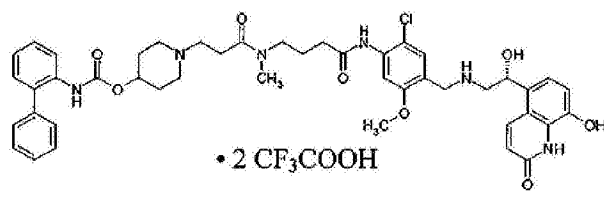
[0614] 通过改变先前实例中使用的起始物质或通过使用类似程序,制备表II中所示的化合物:

[0615] 表II

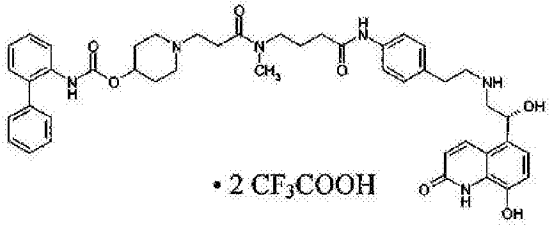
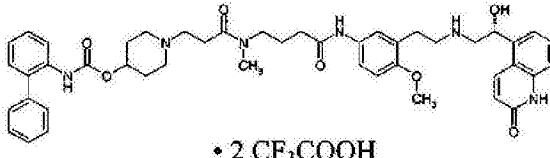
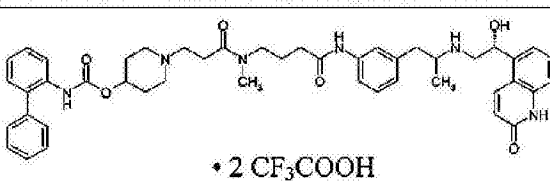
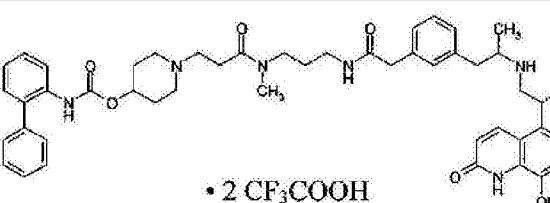
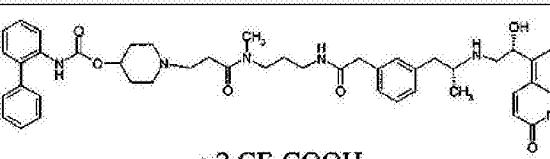
[0616]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
78	I-2	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(4-[[<i>(R)</i>-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基]-2-甲基苯基氨基]乙基}哌啶-4-基酯</p>	39 mg Rt 2.94 分钟; m/z 789.6

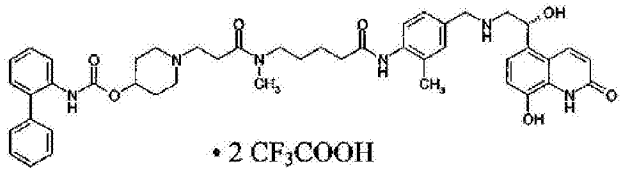
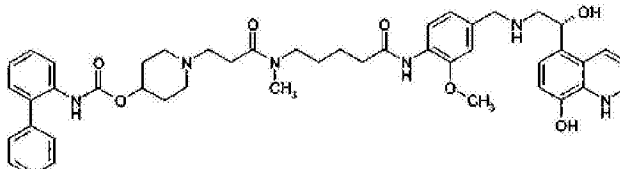
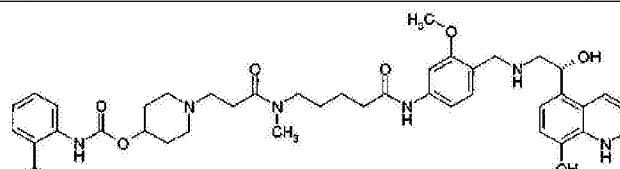
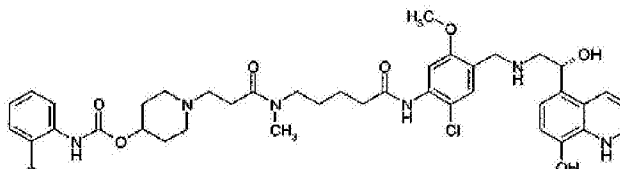
[0617]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
79	I-3	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-([3-(4-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基)-2-甲氧基苯基氨基甲酰基)-丙基]甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	14 mg Rt 2.90 分钟; <i>m/z</i> 805.8
80	I-4	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-([3-(4-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基)-3-甲氧基苯基氨基甲酰基)-丙基]甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	9 mg Rt 3.18 分钟; <i>m/z</i> 805.6
81	I-5	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-([3-(4-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-丙基]甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	50 mg Rt 2.20 分钟; <i>m/z</i> 803.6
82	I-6	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-([3-(2-氯-4-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]乙基)-5-甲氧基苯基氨基甲酰基)-丙基]甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	20 mg Rt 2.15 分钟; <i>m/z</i> 839.6

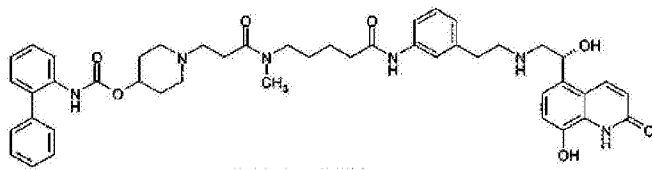
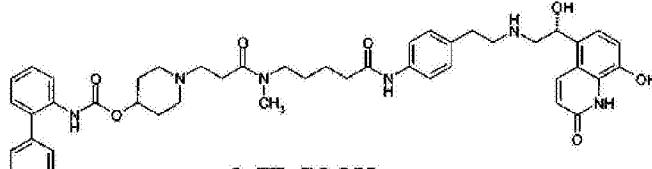
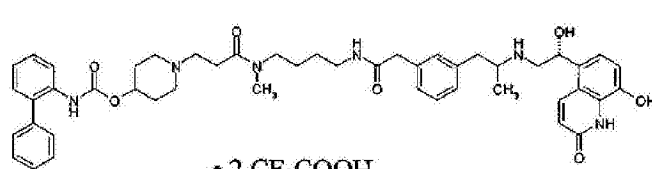
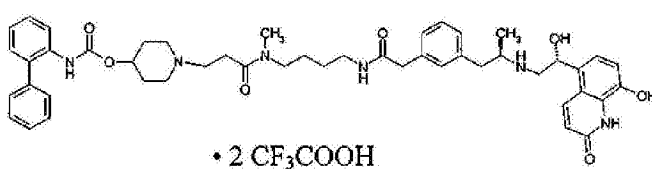
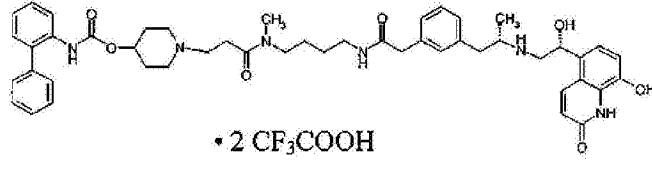
[0618]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
83	I-8	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[[3-(4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]乙基}-苯基氨基甲酰基)丙基]甲基-氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	144 mg Rt 2.77 分钟; m/z 789.6
84	I-9	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[[3-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]乙基}-4-甲氧基苯基氨基甲酰基)-丙基]甲基-氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	29 mg Rt 2.81 分钟; m/z 819.6
85	I-10	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[[3-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}-苯基氨基甲酰基)丙基]甲基-氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	38 mg Rt 2.93 分钟; m/z 803.6
86	I-11	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-({3-[2-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基]乙酰基氨基}丙基)-甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	35 mg Rt 2.95 分钟; m/z 817.8
87	I-12	 <p>• 2 CF₃COOH</p>	10 mg Rt 2.23 分钟; m/z 817.6

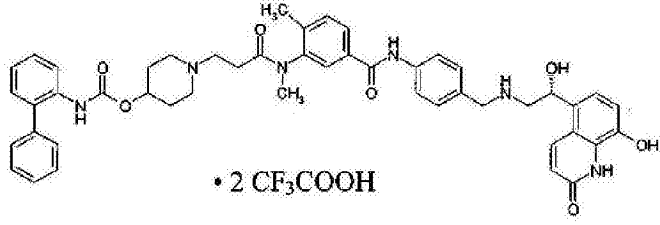
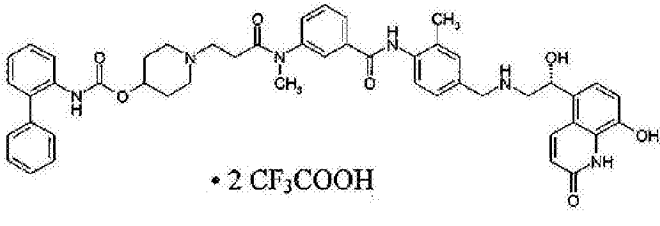
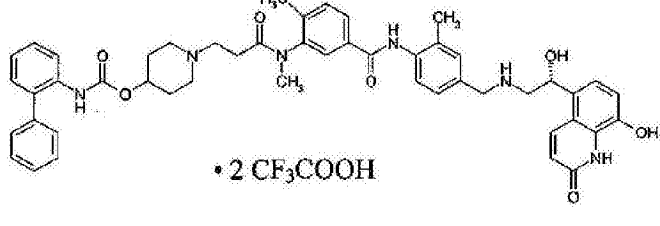
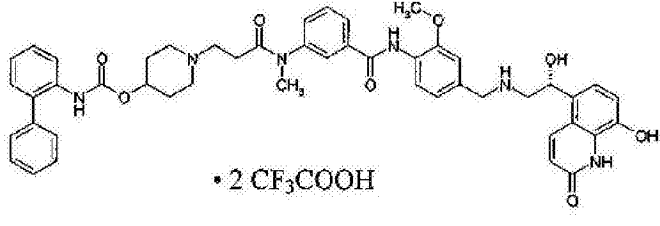
[0619]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
		联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((3-[2-(3-((R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酰基氨基]丙基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐	
88	I-15	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[4-(4-[[<i>(R)</i>-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基)-2-甲基苯基氨基甲酰基]-丁基]-甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	43 mg Rt 2.81 分钟; <i>m/z</i> 803.6
89	I-16	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[4-(4-[[<i>(R)</i>-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基)-2-甲氧基苯基氨基甲酰基]-丁基]-甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	10 mg Rt 2.18 分钟; <i>m/z</i> 819.8
90	I-17	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[4-(4-[[<i>(R)</i>-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基)-3-甲氧基苯基氨基甲酰基]-丁基]-甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	85 mg Rt 2.18 分钟; <i>m/z</i> 819.8
91	I-19	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[4-(2-氯-4-[[<i>(R)</i>-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基)-5-甲氧基苯基氨基甲酰基]-丁基]-甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	30 mg Rt 3.52 分钟; <i>m/z</i> 853.4

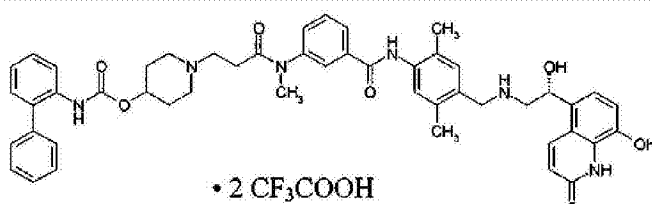
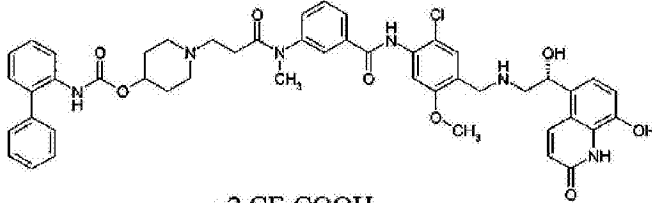
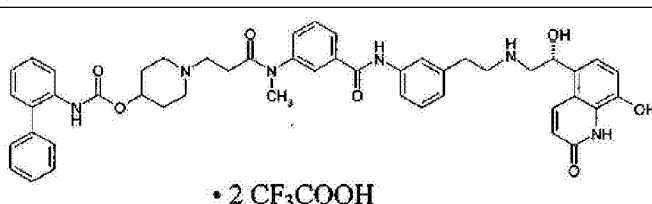
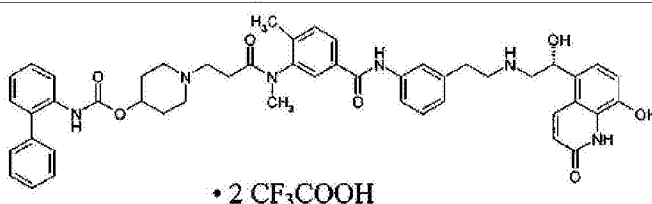
[0620]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
92	I-20	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[4-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]乙基}苯基氨基甲酰基)丁基]甲基-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	53 mg Rt 2.84 分钟; <i>m/z</i> 803.6
93	I-21	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[4-(4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]乙基}苯基氨基甲酰基)丁基]甲基-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	46 mg Rt 2.82 分钟; <i>m/z</i> 803.6
94	I-22	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-({4-[2-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苯基)乙酰基氨基]丁基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	25 mg Rt 2.95 分钟; <i>m/z</i> 831.8
95	I-23	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-({4-[2-(3-{(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苯基)乙酰基氨基]丁基)甲基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	10 mg Rt 2.26 分钟; <i>m/z</i> 831.6
96	I-24	 <p>• 2 CF₃COOH</p>	4 mg Rt 4.34 分钟; <i>m/z</i> 831.4

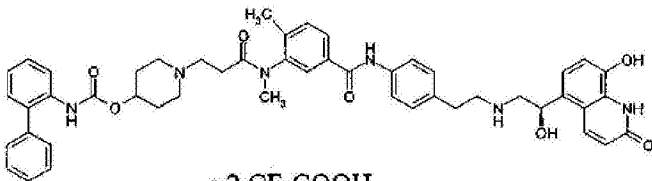
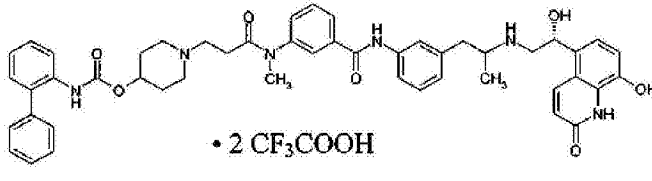
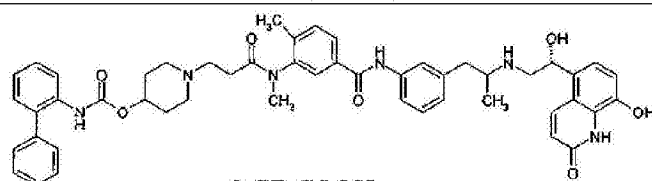
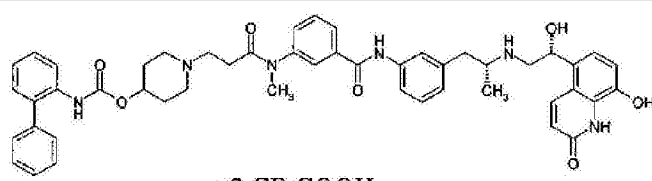
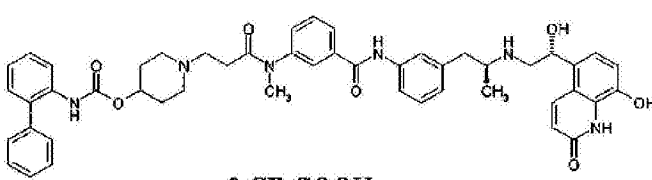
[0621]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
		联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((4-[2-(3-((S)-2-((R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基)丙基)苯基)乙酰基氨基]丁基)甲基-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐	
97	I-26	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[5-(4-[[<i>(R)</i>-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基)苯基氨基甲酰基]-2-甲基苯基]-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	21 mg Rt 2.78 分钟; <i>m/z</i> na
98	I-27	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(4-[[<i>(R)</i>-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基)-2-甲基苯基氨基甲酰基]苯基]-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	92 mg Rt 2.66 分钟; <i>m/z</i> 823.6
99	I-28	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[5-(4-[[<i>(R)</i>-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基)-2-甲基苯基氨基甲酰基]-2-甲基苯基]-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	37 mg Rt 3.07 分钟; <i>m/z</i> 837.5
100	I-29	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(4-[[<i>(R)</i>-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基)-2-甲氧基苯基氨基甲酰基]苯基]-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	28 mg Rt 2.76 分钟; <i>m/z</i> 839.4

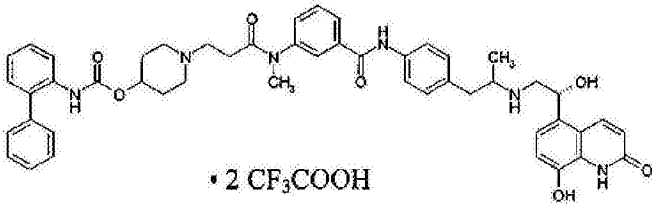
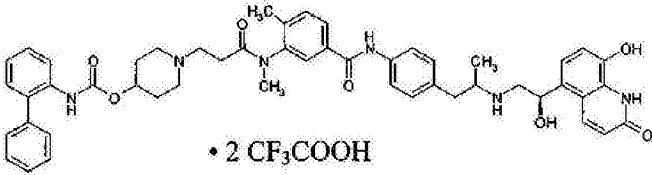
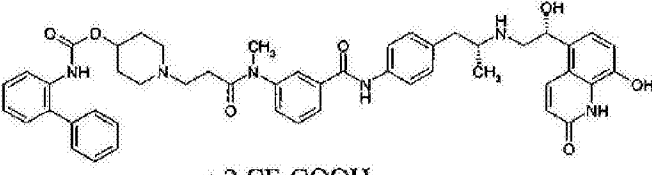
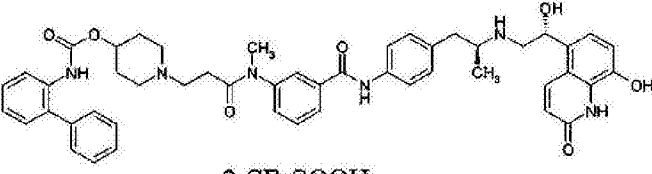
[0622]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
101	I-30	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(4-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基]-苯基]甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	29 mg Rt 3.51 分钟; <i>m/z</i> 837.5
102	I-31	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(2-氯-4-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]甲基)-5-甲氧基苯基氨基甲酰基]-苯基]甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	45 mg Rt 3.42 分钟; <i>m/z</i> 873.6
103	I-32	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(3-{2-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]乙基}苯基氨基甲酰基)苯基]甲基-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	31 mg Rt 2.92 分钟; <i>m/z</i> 823.5
104	I-33	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[5-(3-{2-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]乙基}苯基氨基甲酰基)-2-甲基苯基]-甲基氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	48 mg Rt 3.21 分钟; <i>m/z</i> 837.5

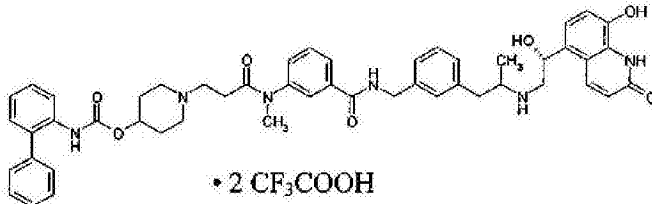
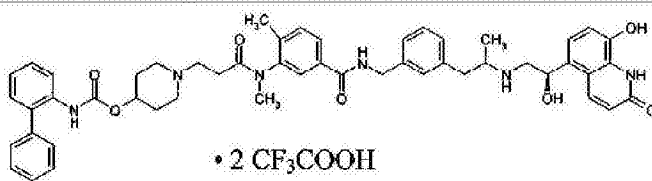
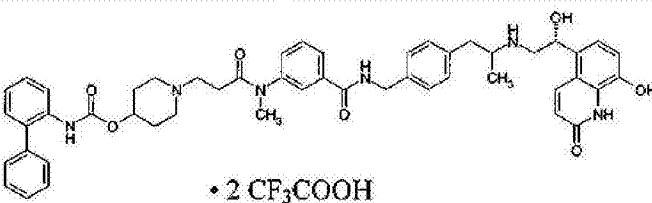
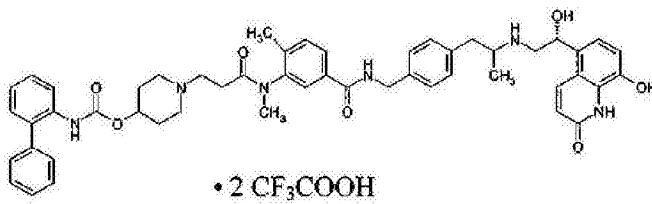
[0623]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
105	I-34	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[5-(4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]乙基}苯基氨基甲酰基)-2-甲基苯基]-甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	56 mg Rt 3.15 分钟; <i>m/z</i> 837.4
106	I-36	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苯基氨基甲酰基)苯基]甲基-氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	20 mg Rt 3.16 分钟; <i>m/z</i> 837.4
107	I-37	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[5-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苯基氨基甲酰基)-2-甲基苯基]-甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	13 mg Rt 3.10 分钟; <i>m/z</i> 851.6
108	I-38	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(3-{(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苯基氨基甲酰基)苯基]甲基-氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	5 mg Rt 4.15 分钟; <i>m/z</i> 837.5
109	I-39	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p>	28 mg Rt 2.12 分钟; <i>m/z</i> 837.8

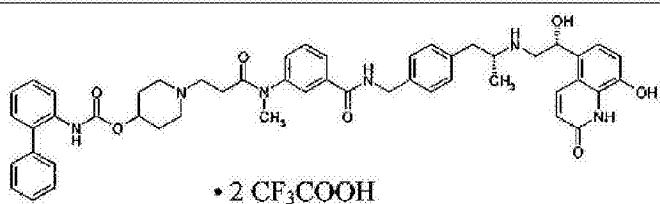
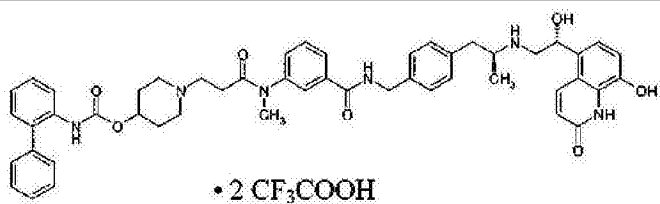
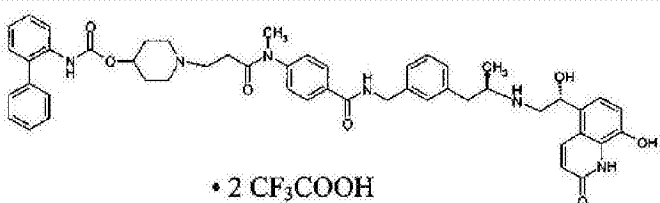
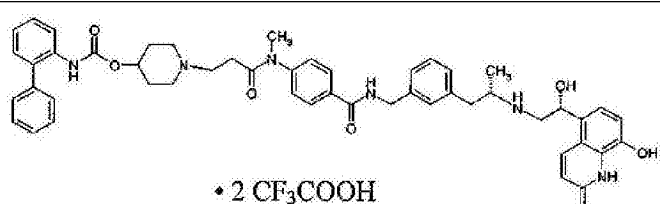
[0624]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
		联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-([3-(3-((S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基氨基甲酰基)苯基)甲基-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐	
110	I-40	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-([3-(4-(2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基氨基甲酰基)苯基)甲基-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	7 mg Rt 3.06 分钟; m/z 837.5
111	I-41	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-([5-(4-(2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基氨基甲酰基)-2-甲基苯基]甲基-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯</p>	13 mg Rt 3.26 分钟; m/z 851.3
112	I-42	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-([3-(4-[(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基氨基甲酰基)苯基)甲基-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	5 mg Rt 3.64 分钟; m/z 837.6
113	I-43	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-([3-(4-((S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基氨基甲酰基)苯基)甲基-氨基甲酰基)乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	39 mg Rt 3.51 分钟; m/z 837.5

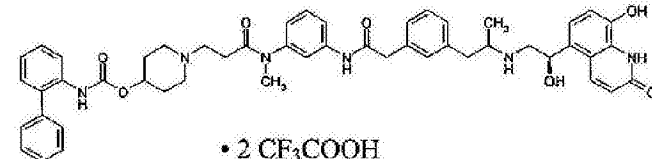
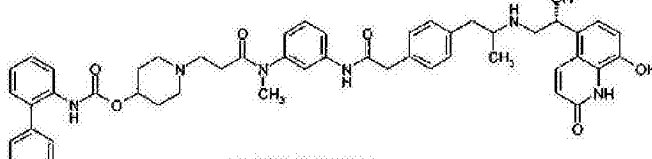
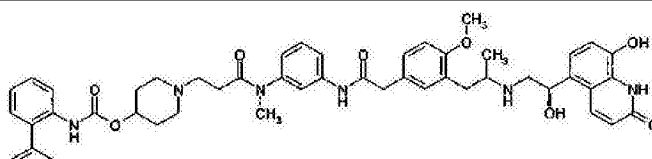
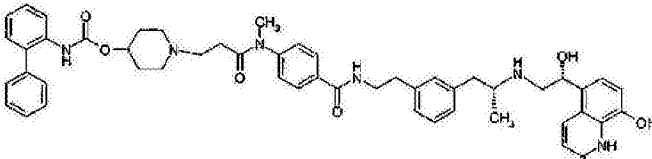
[0625]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
114	I-44	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[[3-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苄基氨基甲酰基)苯基]甲基-氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	11 mg Rt 3.20 分钟; <i>m/z</i> 851.5
115	I-45	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[[5-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苄基氨基甲酰基)-2-甲基苯基]-甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	10 mg Rt 3.20 分钟; <i>m/z</i> 865.5
116	I-46	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[[3-(4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苄基氨基甲酰基)苯基]甲基-氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	6 mg Rt 3.11 分钟; <i>m/z</i> 851.6
117	I-47	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[[5-(4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苄基氨基甲酰基)-2-甲基苯基]-甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	19 mg Rt 3.30 分钟; <i>m/z</i> 865.7

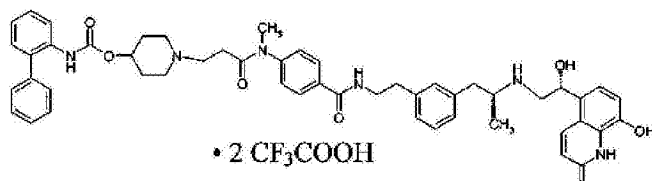
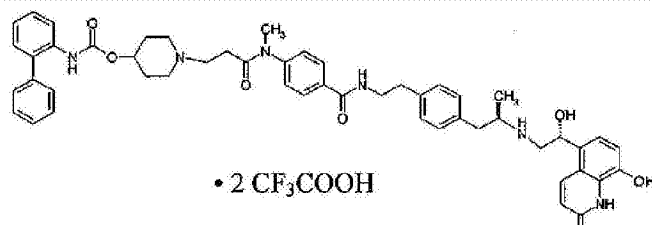
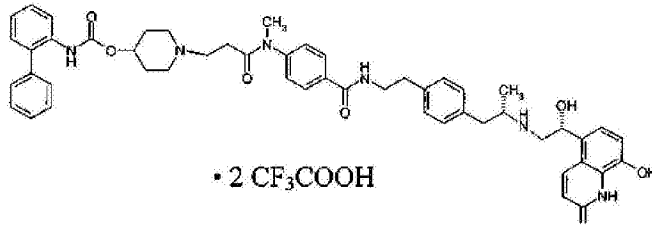
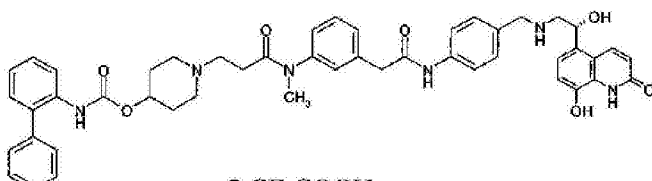
[0626]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
118	I-48	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(4-[(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苄基氨基甲酰基)苄基]甲基-氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	41 mg Rt 3.47 分钟; <i>m/z</i> 851.5
119	I-49	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[3-(4-[(S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苄基氨基甲酰基)苄基]甲基-氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	108 mg Rt 3.58 分钟; <i>m/z</i> 851.6
120	I-50	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[4-(3-[(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苄基氨基甲酰基)苄基]甲基-氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	6 mg Rt 2.35 分钟; <i>m/z</i> 851.4
121	I-51	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[[4-(3-[(S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苄基氨基甲酰基)苄基]甲基-氨基甲酰基}乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	6 mg Rt 2.33 分钟; <i>m/z</i> 851.4

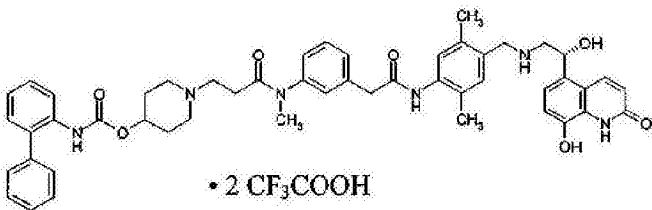
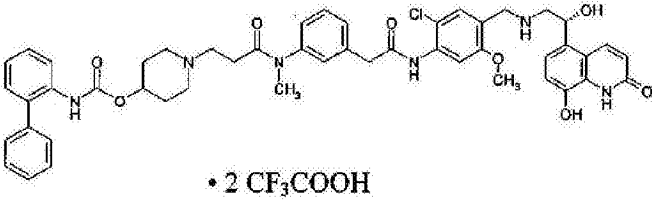
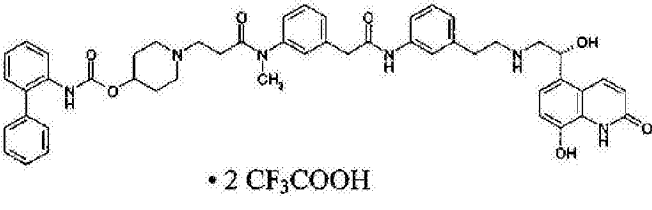
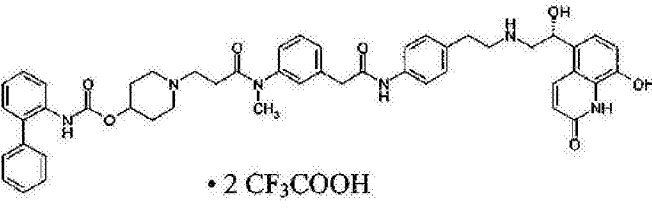
[0627]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
122	I-52	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((3-[2-(3-[2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基]乙酰基氨基]苯基)甲基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	11 mg Rt 3.31 分钟; m/z 851.6
123	I-53	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((3-[2-(4-[2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基]乙酰基氨基]苯基)甲基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	11 mg Rt 3.17 分钟; m/z 851.4
124	I-54	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((3-[2-(3-[2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基]-4-甲氧基苯基]乙酰基氨基]苯基)甲基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	15 mg Rt 3.32 分钟; m/z 881.6
125	I-55	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((4-[2-(3-((R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙基氨基甲酰基]苯基)-甲基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	15 mg Rt 2.33 分钟; m/z 865.6

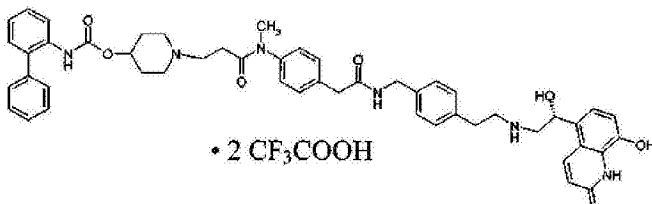
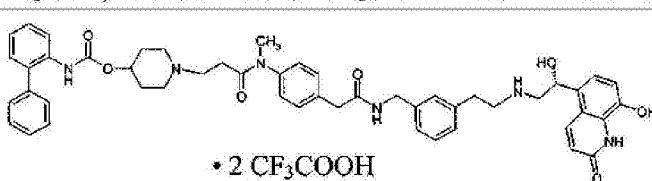
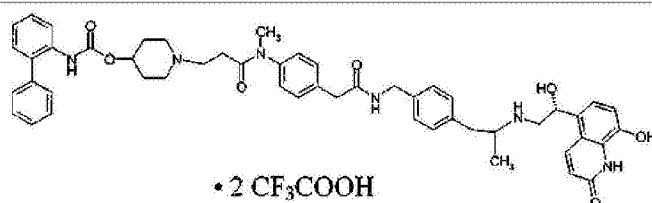
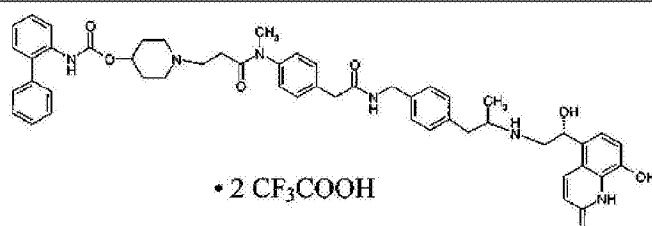
[0628]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
126	I-56	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((4-[2-(3-((S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基)丙基]苯基)乙基氨基甲酰基]苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	5 mg Rt 4.5 分钟; m/z 865.6
127	I-57	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((4-[2-(4-((R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基]苯基)乙基氨基甲酰基]苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	7 mg Rt 4.38 分钟; m/z 865.4
128	I-58	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((4-[2-(4-((S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基]苯基)乙基氨基甲酰基]苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	4 mg Rt 4.56 分钟; m/z 865.5
129	I-59	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((3-((4-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基]苯基氨基甲酰基)甲基]苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	65 mg Rt 2.02 分钟; m/z 823.6

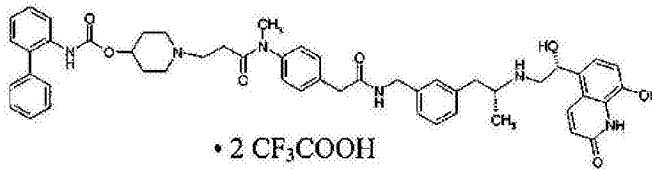
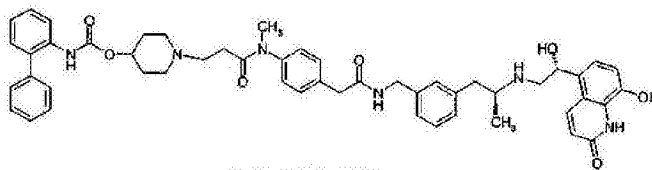
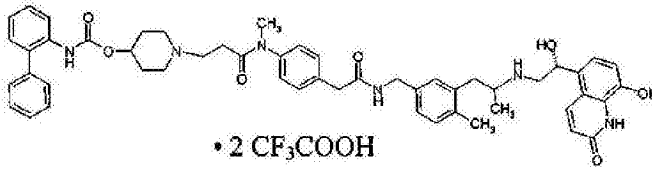
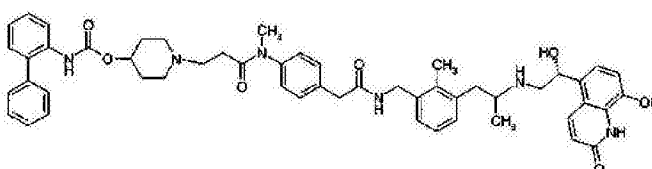
[0629]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
130	I-60	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((3-((4-((R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基)甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-甲基)苯基)甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	28 mg Rt 2.05 分钟; m/z 851.6
131	I-61	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((3-((2-氯-4-((R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基)甲基]-5-甲氧基苯基氨基甲酰基)-甲基)苯基)甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯</p>	41 mg Rt 2.32 分钟; m/z 887.6
132	I-62	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((3-((3-((2-((R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基)乙基)苯基氨基甲酰基)甲基)苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	42 mg Rt 2.05 分钟; m/z 837.4
133	I-63	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((3-((4-((2-((R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基)乙基)苯基氨基甲酰基)甲基)苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	34 mg Rt 2.02 分钟; m/z 837.4

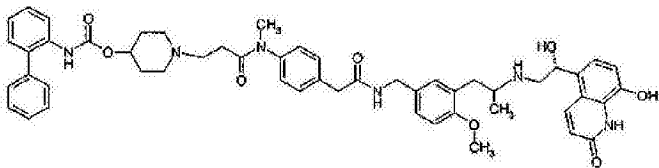
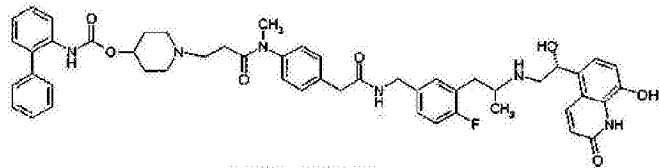
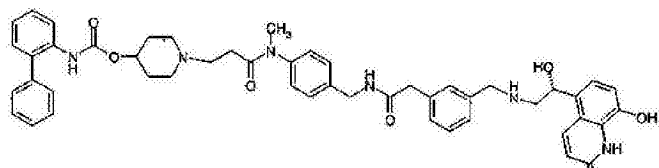
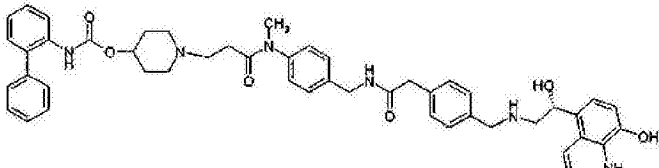
[0630]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
134	I-64	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((4-((4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]乙基}苯基氨基甲酰基)甲基}苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	na Rt 2.29 分钟; m/z 851.6
135	I-65	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((4-((3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]乙基}苯基氨基甲酰基)甲基}苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	5 mg Rt 2.33 分钟; m/z 851.6
136	I-66	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((4-((4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苯基氨基甲酰基)甲基}苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	na Rt 3.57 分钟; m/z 865.7
137	I-67	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-((4-((4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苯基氨基甲酰基)甲基}苯基)-甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	15 mg Rt 3.70 分钟; m/z 865.4

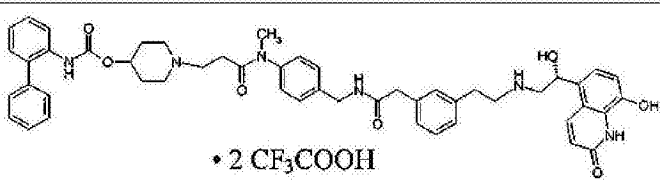
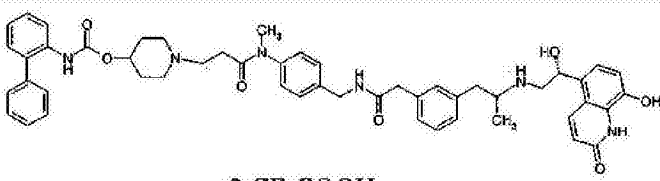
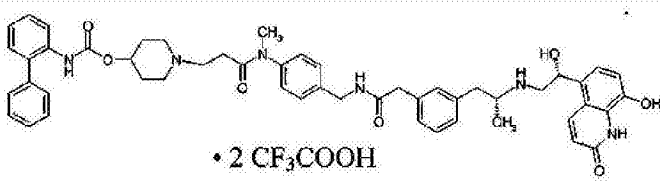
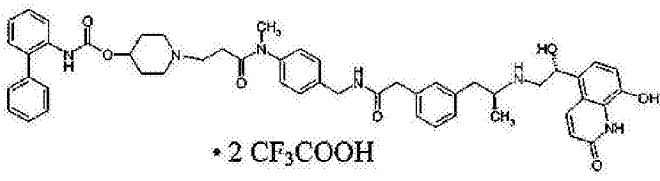
[0631]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
138	I-68	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-({4-[3-({(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苄基氨基甲酰基)甲基]-苄基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	7 mg Rt 4.41 分钟; m/z 865.6
139	I-69	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-({4-[3-({(S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苄基氨基甲酰基)甲基]-苄基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	7 mg Rt 4.50 分钟; m/z 865.6
140	I-70	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-({4-[3-({2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}-4-甲基苄基氨基甲酰基)甲基]-苄基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	2 mg Rt 4.14 分钟; m/z 879.6
141	I-71	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-({4-[3-({2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}-2-甲基苄基氨基甲酰基)甲基]-苄基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	5 mg Rt 2.37 分钟; m/z 879.6

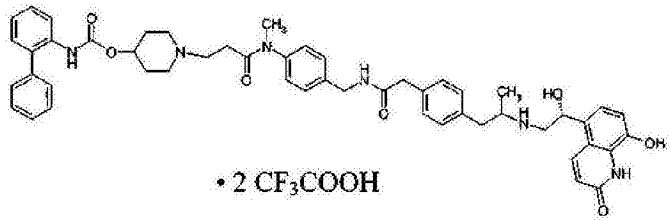
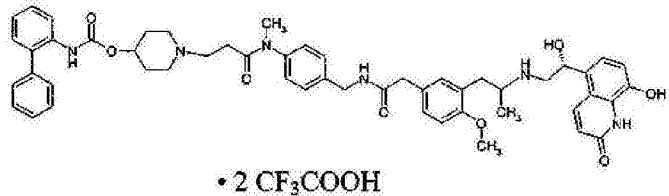
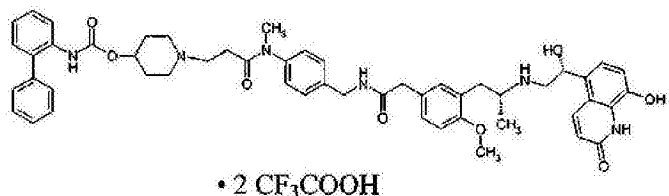
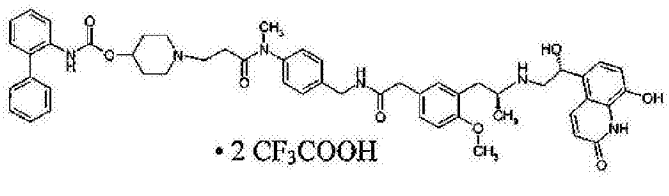
[0632]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
142	I-72	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-({4-[(3-[2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基]-4-甲氧基苄基氨基甲酰基)-甲基]苯基}甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	2 mg Rt 4.24 分钟; m/z 895.7
143	I-73	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-({4-[(4-氟-3-[2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基]-苄基氨基甲酰基)甲基]苯基}甲基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	3 mg Rt 4.14 分钟; m/z 883.6
144	I-74	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[(4-[[2-(3-[[[R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基]苯基]乙酰基氨基]甲基]-苄基)甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	15 mg Rt 3.23 分钟; m/z 837.5
145	I-75	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[(4-[[2-(4-[[[R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基]苯基]乙酰基氨基]甲基]-苄基)甲基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	10 mg Rt 3.63 分钟; m/z 837.5

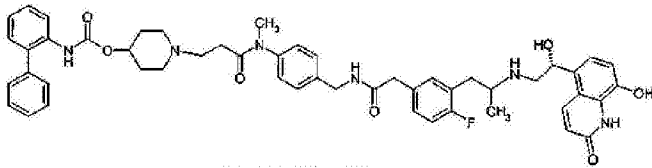
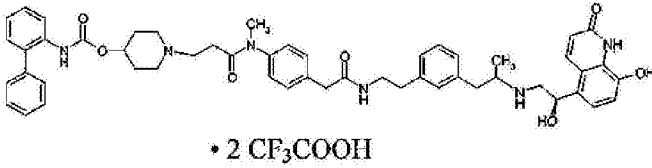
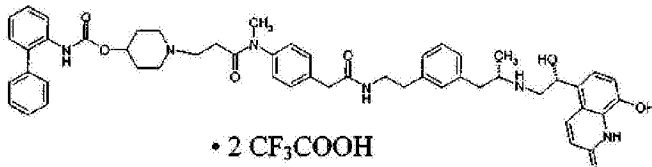
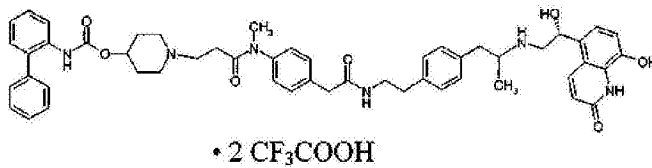
[0633]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
146	I-76	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[(4-[[2-(3-[2-(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]乙基)苯基)乙酰基氨基]甲基]苯基)-甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	0.6 mg Rt 3.56 分钟; <i>m/z</i> 851.4
147	I-77	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-(2-[(4-[[2-(3-[2-(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基)乙酰基氨基]甲基]-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	15 mg Rt 4.31 分钟; <i>m/z</i> 865.3
148	I-78	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[(4-[[2-(3-[(<i>R</i>)-2-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酰基氨基]甲基]-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	5 mg Rt 3.73 分钟; <i>m/z</i> 865.5
149	I-79	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[(4-[[2-(3-[(<i>S</i>)-2-[(<i>R</i>)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙酰基氨基]甲基]-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	10 mg Rt 3.50 分钟; <i>m/z</i> 865.5

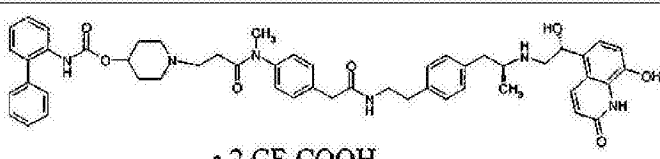
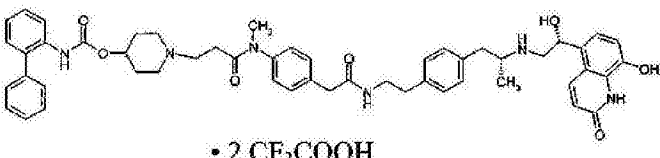
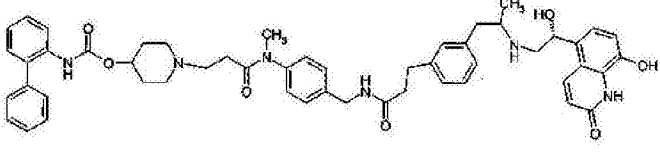
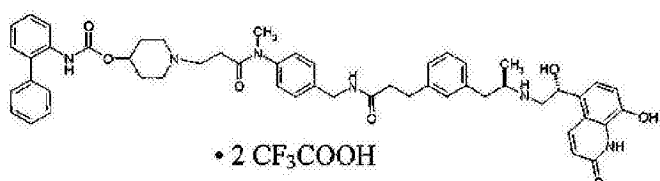
[0634]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
150	I-80	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-[(4-[[2-(4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基)乙酰基氨基]甲基]-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	10 mg
151	I-81	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-[(4-[[2-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)-4-甲氧基苯基)乙酰基氨基]-甲基]苯基)甲基氨基甲酰基]乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	10 mg Rt 3.78 分钟; m/z 895.5
152	I-82	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-[(4-[[2-(3-{(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)-4-甲氧基苯基)乙酰基氨基]-甲基]苯基)甲基氨基甲酰基]乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	10 mg Rt 3.78 分钟; m/z 895.6
153	I-83	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-[(4-[[2-(3-{(S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)-4-甲氧基苯基)乙酰基氨基]-甲基]苯基)甲基氨基甲酰基]乙基]哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	5 mg Rt 3.02 分钟; m/z 895.6

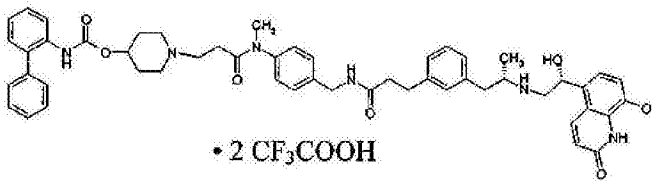
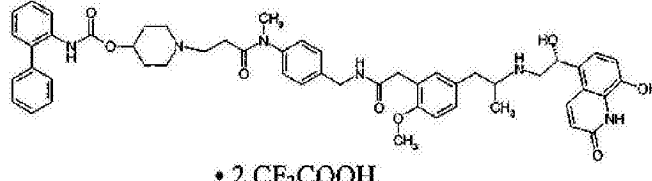
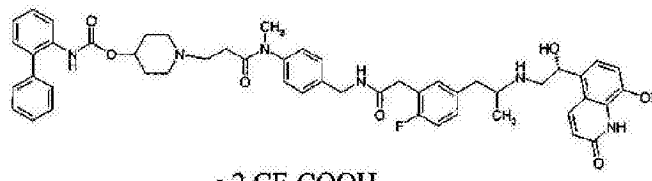
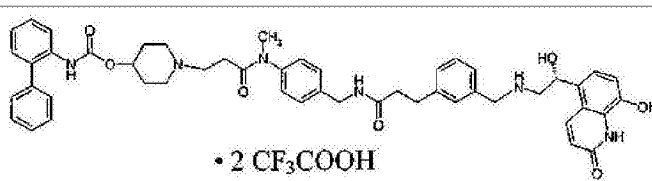
[0635]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
154	I-84	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[4-[[2-(4-氟-3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苯基)乙基氨基]甲基}苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	15 mg Rt 3.50 分钟; m/z 883.6
155	I-85	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[4-[[2-(3-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苯基)乙基氨基甲酰基]甲基}-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	7 mg Rt 3.05 分钟; m/z 879.8
156	I-86	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[4-[[2-(3-{(S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苯基)乙基氨基甲酰基]-甲基}苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	5 mg Rt 4.45 分钟; m/z 879.6
157	I-88	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[4-[[2-(4-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}苯基)乙基氨基甲酰基]甲基}-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	7 mg Rt 3.03 分钟; m/z 879.6

[0636]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
158	I-89	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-[(4-[[2-(4-[(S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙基氨基甲酰基]甲基]-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	8 mg Rt 4.53 分钟; m/z 879.5
159	I-90	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-[(4-[[2-(4-[(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)乙基氨基甲酰基]甲基]-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	10 mg Rt 2.36 分钟; m/z 879.6
160	I-91	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-[(4-[[3-(3-[2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基)苯基)丙酰基氨基]甲基]-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	20 mg Rt 3.61 分钟; m/z 879.6
161	I-92	 <p style="text-align: center;">• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-[(4-[[3-(3-[(R)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基)苯基)丙酰基氨基]甲基]-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基)哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	7 mg Rt 4.52 分钟; m/z 879.7

[0637]

实例编号	ID 编号	化合物	量/LC-MS ¹
162	I-93	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[(4-{[3-(3-{(S)-2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苯基)丙酰基氨基]甲基}-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	4 mg Rt 4.24 分钟; m/z 879.7
163	I-94	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[(4-{[2-(5-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]丙基}-2-甲氧基苯基)乙酰基氨基]-甲基}苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	15 mg Rt 3.39 分钟; m/z 895.5
164	I-95	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[(4-{[2-(2-氟-5-{2-[(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)乙基氨基]丙基}苯基)-乙酰基氨基]-甲基}苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}-哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	12 mg Rt 4.10 分钟; m/z 883.5
165	I-96	 <p>• 2 CF₃COOH</p> <p>联苯-2-基氨基甲酸 1-{2-[(4-{[3-(3-{(R)-2-羟基-2-(8-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-5-基)-乙基氨基]甲基}苯基)丙酰基氨基]甲基}-苯基)甲基氨基甲酰基]乙基}哌啶-4-基酯二-三氟乙酸盐</p>	3 mg Rt 4.34 分钟; m/z 851.4

[0638] ¹分离的量(粗或纯)(毫克);Rt=滞留时间(分钟);LC-MS:m/z观测值,通常为[M+H]⁺;na=未获得。

[0639] 生物分析法和制剂

[0640] 实例A

[0641] 来自表达人类M₁、M₂、M₃和M₄蕈毒碱受体的细胞的细胞培养物和膜制剂

[0642] 使分别稳定表达经克隆人类hM₁、hM₂、hM₃和hM₄蕈毒碱受体亚型的CHO细胞系在补充有10%FBS和250μg/mL遗传霉素(Geneticin)的汉斯F-12(Hams F-12)培养基中生长至接近汇合。使细胞在5%CO₂、37℃恒温箱中生长,并用2mM EDTA的dPBS溶液分散。通过在650×g下离心5分钟来收集细胞,并将细胞小球冷冻储存于-80℃下或立即制备膜以供使用。

[0643] 对于膜制备,将细胞小球再悬浮于溶解缓冲液中,并以普利顿PT-2100(PolytronPT-2100)组织破裂器(凯内玛提卡AG公司(Kinematica AG);20秒×2次突发)均质化。在4℃下将粗膜在40,000×g下离心15分钟。随后用再悬浮缓冲液再悬浮膜小球,并用普利顿组织破裂器再次均质化。

[0644] 通过拉瑞(Lowry)等人,1951,生物化学杂志(Journal of Biochemistry),193,265中所述的方法测定膜悬浮液的蛋白质浓度。所有膜分成数等分试样冷冻储存于-80℃下或立即使用。

[0645] 所制备hM_s受体膜的等分试样是购自珀金埃尔默公司(PerkinElmer, Inc.)(马萨诸塞州韦尔斯利(Wellesley, MA))且储存于-80℃下待用。

[0646] 实例B

[0647] 针对蕈毒碱受体的放射性配体结合分析法

[0648] 在96孔微量滴定板中以100μL的总分析体积进行针对经克隆蕈毒碱受体的放射性配体结合分析法。将稳定表达hM₁、hM₂、hM₃、hM₄或hM_s蕈毒碱亚型的CHO细胞膜于分析缓冲液中稀释至以下特定目标蛋白质浓度(微克/孔):10μg(hM₁)、10μg至15μg(hM₂)、10μg至20μg(hM₃)、10μg至20μg(hM₄)和10μg至12μg(hM_s),以得到类似信号(cpm)。在分析板添加之前,使用普利顿组织破裂器(10秒)将膜简短均质化。

[0649] 使用浓度在0.001nM至20nM范围内的L-[N-甲基-³H]莨菪碱甲基氯([³H]-NMS)(TRK666,84.0Ci/mmol,安玛法西亚生物技术公司(Amersham Pharmacia Biotech),英格兰白金汉郡(Buckinghamshire, England))进行用于测定放射性配体的K_D值的饱和结合研究。

[0650] 用1nM的[³H]-NMS和11种不同的测试化合物浓度进行测定测试化合物的K_i值的置换分析法。最初将测试化合物溶解于稀释缓冲液中达到浓度为400μM,且随后用稀释缓冲液连续5倍稀释至在10pM至100μM范围内的最终浓度。添加顺序和添加至分析板中的体积如下:25μL放射性配体、25μL经稀释测试化合物和50μL膜。分析板在37℃下培育6小时。通过用在1%BSA中预处理的GF/B玻璃纤维过滤板(珀金埃尔默公司(PerkinElmer, Inc.))快速过滤来终止结合反应。用洗涤缓冲液(10mM HEPES)冲洗过滤板三次以移除未结合的放射性。随后在空气中干燥板,并将50μL麦克森特-20(Microscint-20)液体闪烁液(珀金埃尔默公司)添加至各孔中。随后以珀金埃尔默托普坎特(PerkinElmer Topcount)液体闪烁计数器(珀金埃尔默公司)对板进行计数。

[0651] 通过使用单位点竞争模型(one-site competition model),用格拉夫帕德普雷姆(GraphPad Prism)软件包(格拉夫帕德软件公司(GraphPad Software, Inc.)),加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego, CA))进行非线性回归分析来分析结合数据。使用程-普鲁索夫(Cheng-Prusoff)等式(程Y(Cheng Y);普鲁索夫WH.(PrusoffWH.)(1973)生物化学药理学(Biochemical Pharmacology),22(23):3099-108),根据放射性配体的观测IC₅₀值和K_D值来计算测试化合物的K_i值。将K_i值转换成pK_i值以确定几何平均值和95%信赖区间。随后将这

些概括统计量再转换成 K_i 值以进行数据报导。

[0652] 在本分析法中, K_i 值较低意味着测试化合物对受体具有较高结合亲和力。本发明化合物的hM₃受体结合(K_i)数据展示于表III中。

[0653] 实例C

[0654] 来自表达人类 β_1 、 β_2 或 β_3 肾上腺素受体的细胞的细胞培养物和膜制剂

[0655] 使稳定表达经克隆人类 β_1 和 β_2 肾上腺素受体的人类胚肾(HEK-293)细胞系或稳定表达经克隆人类 β_3 肾上腺素受体的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系在含有10%FBS的DMEM或汉斯F-12培养基中在500 μ g/mL遗传霉素存在下生长至接近汇合。用2mMEDTA的PBS溶液分散细胞单层。通过在1,000rpm下离心使细胞聚结成团,并将细胞小球冷冻储存于-80 $^{\circ}$ C下或立即制备膜以供使用。

[0656] 为制备表达 β_1 和 β_2 受体的膜,将细胞小球再悬浮于溶解缓冲液(10mM HEPES/HCl, 10mM EDTA, pH7.4, 在4 $^{\circ}$ C下)中,并使用紧密配合的杜恩斯玻璃均质器(Dounce glasshomogenizer)(30冲程)于冰上均质化。

[0657] 对于具有较强蛋白酶敏感性的表达 β_3 受体的膜,在每50mL缓冲液(罗氏分子生物化学公司(Roche Molecular Biochemicals),印第安那州印第安纳波利斯(Indianapolis, IN))补充有一片“含有2mM EDTA的完全蛋白酶抑制剂混合片(Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet)”的溶解缓冲液(10mM Tris/HCl, pH7.4)中将细胞小球均质化。在20,000 \times g下离心均浆,并通过如本文所述的再悬浮和离心,用溶解缓冲液将所得小球洗涤一次。随后将最终小球再悬浮于冰冷的结合分析缓冲液(75mM Tris/HCl(pH7.4)、12.5mM MgCl₂、1mM EDTA)中。

[0658] 通过拉瑞(Lowry)等人,1951,生物化学杂志(Journal of Biological Chemistry),193,265;及布勒德福德(Bradford),分析生物化学(Analytical Biochemistry),1976,72,248-54中所述的方法测定膜悬浮液的蛋白质浓度。所有膜分数等分试样冷冻储存于-80 $^{\circ}$ C下或立即使用。

[0659] 实例D

[0660] 用于测定肾上腺素受体激动剂效能的分析法

[0661] 根据制造商说明,使用闪烁板腺苷酰基环化酶活化分析系统(Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System),用[¹²⁵I]-cAMP(NEN SMP004,珀金埃尔默生命科学公司(PerkinElmer Life Sciences Inc.),马萨诸塞州波士顿(Boston,MA))以放射性免疫分析格式进行cAMP分析法。对于此分析法,使稳定表达经克隆人类 β_1 或 β_2 受体的HEK-293细胞系在补充有10%FBS和遗传霉素(500 μ g/mL)的DMEM中生长至接近汇合;或使稳定表达经克隆人类 β_3 肾上腺素受体的CHO-K1细胞系在补充有10%FBS和遗传霉素(250 μ g/mL)的汉斯F-12培养基中生长至接近汇合。用PBS冲洗细胞,并在含有2mM EDTA或胰蛋白酶-EDTA溶液(0.05%胰蛋白酶/0.53mM EDTA)的dPBS(杜贝卡氏磷酸盐缓冲生理盐水(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)),不含CaCl₂和MgCl₂)中分开。用康特(Coulter)细胞计数器对细胞计数后,通过在1,000rpm下离心使细胞聚结成团,并在经预先温至室温的含有IBMX的刺激缓冲液(珀金埃尔默试剂盒(PerkinElmer Kit))中再悬浮至浓度为1.6 \times 10⁶个细胞/毫升至2.8 \times 10⁶个细胞/毫升。在此分析法中每孔使用约40,000至80,000个细胞。将测试化合物(10mM,于DMSO的溶液)在贝克曼拜耳米克-2000(Beckman

Biomek-2000)中稀释于含有0.1%BSA的PBS中,并以在100 μ M至1 pM范围内的11种不同浓度测试。将反应物在37 $^{\circ}$ C下培育10分钟,并通过添加100 μ L含有[125 I]-cAMP(NEN SMP004,珀金埃尔默生命科学公司,马萨诸塞州波士顿)的冷检测缓冲液停止反应。如制造商的用户手册中所述,根据所观测的样品和cAMP标准物的数量来计算所产生的cAMP量(皮摩尔/孔)。

[0662] 通过利用S型等式,用格拉夫帕德普雷姆(GraphPad Prism)软件包(格拉夫帕德软件公司(GraphPad Software, Inc.),加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego, CA))进行非线性回归分析来分析数据。使用程-普鲁索夫等式(程Y(Cheng Y)和普鲁索夫WH.(Prusoff WH.),生物化学药理学(Biochemical Pharmacology),1973,22,23,3099-108)来计算EC₅₀值。

[0663] 在本分析法中,较低EC₅₀值意味着测试化合物对所测试受体具有较高功能活性。本发明化合物的h β ₂功效(EC₅₀)数据展示于表III中。

[0664] 实例E

[0665] 艾因托芬分析法

[0666] 此分析法测量测试化合物针对大鼠中乙酰甲胆碱(methacholine, MCh)诱发的支气管收缩提供支气管保护的能力。

[0667] 所有研究都使用体重介于200g与350g之间的雄性施普拉格-道来(Sprague-Dawley)大鼠(哈兰公司(Harlan),印第安那州印第安纳波利斯(Indianapolis, IN))。

[0668] 使用5mL给药溶液在饼形吸入腔室(R+S模具公司(R+S Molds),加利福尼亚州圣卡洛斯(San Carlos, CA))中经10分钟时间通过吸入(IH)给予测试化合物或媒剂(无菌去离子水)。使大鼠暴露于气雾剂中,所述气雾剂是在22psi压力下由拜耳布雷德(Bioblend)(5% CO₂/95%大气)驱动的22F51型LC Star喷雾器装置(PARI呼吸设备公司(PARI Respiratory Equipment, Inc.),弗吉尼亚州中洛锡安(Midlothian, VA))产生。除非另外说明,否则向大鼠给予100 μ g测试化合物。

[0669] 在预定时间点,利用腹膜内(IP)注射120mg/kg依那汀(inactin)(硫代丁比妥(thiobutabarbital))将大鼠麻醉。如果动物对身体刺激(例如夹脚趾)有反应,那么授予补充剂量(40mg/kg, IP)。将手术部位剃毛,并在颈部腹面切出1-2cm的中线切口。分离出颈静脉,并插入填充生理盐水的聚乙烯导管(PE-50)以允许静脉内输注MCh。自由切开气管,并插入14G针(#NE-014,斯莫帕特公司(Small Parts),佛罗里达州迈阿密湖(Miami Lakes, FL))。放置好气管插管后,使用设置为每100g体重1mL的搏动量(但不超过2.5mL体积)和每分钟90次搏动的速率的呼吸器(683型,哈佛设备公司(Harvard Apparatus, Inc.),马萨诸塞州(MA))对各大鼠通气。沿呼吸器呼气管道放置T形连接器以允许使用连接至拜耳帕克(Biopac)(TSD137C)预放大器的拜耳帕克传感器测量通气压力(VP)的变化。使用加热垫将体温维持在37 $^{\circ}$ C。

[0670] 使用艾克诺基数据收集软件(Acknowledge Data Collection Software)(加利福尼亚州圣巴巴拉(Santa Barbara, CA))记录VP变化。收集基线值持续至少2.5分钟。随后利用非累积性静脉内(IV)输注40 μ g/kg和80 μ g/kg MCh激发大鼠。自注射泵(sp210iw,世界精密仪器公司(World Precision Instruments, Inc.),佛罗里达州萨拉索塔(Sarasota, FL))以2mL/kg/min速率静脉内输注MCh持续2.5分钟,其中两次MCh剂量之间间隔 2分钟。以相对于对照动物的MCh反应抑制%来表示经治疗动物中通气压力的变化(cm H₂O)。

[0671] 在此分析法中可使用例如组胺和乙酰胆碱等其它支气管收缩剂来替代MCh。另外，可使用天竺鼠替代大鼠。

[0672] 在此分析法中，较高MCh反应抑制%表明测试化合物提供较大支气管保护作用。在24小时大于或等于30%的抑制作用指示作用持续时间长。本发明化合物的支气管保护数据展示于表III中。

[0673] 表III

[0674]

ID 编号	hM ₃ K _i (nM) ¹	hβ ₂ EC ₅₀ (nM) ²	24 小时的 支气管保 护 ³	ID 编号	hM ₃ K _i (nM) ¹	hβ ₂ EC ₅₀ (nM) ²	24 小时的 支气管保 护 ³
I-1	0.1	3	nd	I-2	0.1	1	否
I-3	0.1	1	是	I-4	0.1	2	是
I-5	0.1	1	是	I-6	0.1	1	是
I-7	0.1	1	是	I-8	0.1	1	是
I-9	0.1	6	nd	I-10	0.1	1	是
I-11	0.1	1	是	I-12	0.1	1	否
I-13	0.1	1	是	I-14	0.1	1	是
I-15	0.1	1	是	I-16	0.1	1	是
I-17	0.1	1	是	I-18	0.1	1	是
I-19	0.1	1	是	I-20	0.1	1	是
I-21	0.1	1	是	I-22	0.1	1	是
I-23	0.1	1	是	I-24	0.1	1	是
I-25	0.1	1	是	I-26	0.2	1	是
I-27	0.1	1	否	I-28	0.2	1	否
I-29	0.1	1	否	I-30	0.2	1	否
I-31	0.2	1	是	I-32	0.1	1	否
I-33	0.2	1	否	I-34	0.1	1	是
I-35	0.2	1	是	I-36	0.2	1	是
I-37	0.2	1	否	I-38	0.2	1	否
I-39	0.2	1	否	I-40	0.1	1	是
I-41	0.3	1	否	I-42	0.2	1	否
I-43	0.1	1	是	I-44	0.1	1	否
I-45	0.2	1	否	I-46	0.1	1	是
I-47	0.2	3	nd	I-48	0.3	1	是
I-49	0.1	1	是	I-50	0.4	nd	nd
I-51	0.2	1	nd	I-52	0.2	1	否
I-53	0.1	1	否	I-54	0.2	2	nd
I-55	0.2	1	是	I-56	0.2	1	否
I-57	0.1	1	nd	I-58	0.2	1	nd

[0675]

ID 编号	hM ₃ K _i (nM) ¹	hβ ₂ EC ₅₀ (nM) ²	24 小时的 支气管保 护 ³	ID 编号	hM ₃ K _i (nM) ¹	hβ ₂ EC ₅₀ (nM) ²	24 小时的 支气管保 护 ³
I-59	0.1	3	nd	I-60	0.1	3	nd
I-61	0.1	1	是	I-62	0.1	1	是
I-63	0.1	1	nd	I-64	0.3	1	否
I-65	0.1	1	是	I-66	0.2	1	否
I-67	0.1	1	是	I-68	0.1	1	是
I-69	0.1	1	是	I-70	0.3	1	nd
I-71	0.1	1	nd	I-72	0.4	4	nd
I-73	0.2	1	nd	I-74	0.3	2	nd
I-75	0.2	2	nd	I-76	0.3	1	nd
I-77	0.1	1	是	I-78	0.3	1	是
I-79	0.1	1	否	I-80	0.2	1	否
I-81	0.1	1	是	I-82	0.1	1	是
I-83	0.2	2	是	I-84	0.1	1	nd
I-85	0.2	2	是	I-86	0.2	1	是
I-87	0.1	1	是	I-88	0.1	1	是
I-89	0.1	1	是	I-90	0.1	1	nd
I-91	0.2	1	是	I-92	0.2	1	是
I-93	0.8	11	nd	I-94	0.1	1	是
I-95	0.2	1	是	I-96	0.1	3	nd

[0676] nd=未测定。

[0677] ¹hM₃蕈毒碱受体结合(K_i)(数据舍入至最接近0.1nM)。

[0678] ²hβ₂肾上腺素受体激动剂效能(EC₅₀)(资料舍入至最接近1nM)。

[0679] ³在24小时时存在的支气管保护作用,例如在大鼠艾因托芬分析法(100_μg)中24小时时的MCh反应抑制≥30%。

[0680] 表III中的数据表明所有测试化合物均具有在0.1nM至0.8nM范围内的hM₃受体结合(K_i)值。此外,所有测试化合物均具有在1nM至11nM范围内的hβ₂功效(EC₅₀)值。另外,在大鼠艾因托芬分析法中测试的大多数化合物(使用100_μg测试化合物)在投予后24小时提供显著支气管保护作用(对MCh诱发的支气管收缩的抑制≥30%)。