



(12) 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 90110248.2

[51] Int.Cl⁵

C07D209/18

[43] 公开日 1991年7月17日

[22] 申请日 90.12.31

[30] 优先权

[32]90.1.2 [33]US [31]460,207

[32]90.7.31 [33]US [31]560,699

[71] 申请人 美国辉瑞有限公司

地址 美国纽约州

共同申请人 自然产品科学有限公司

[72] 发明人 尼古拉斯·A·萨科曼诺
罗伯德·A·福尔克曼

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 孟八一 杨九昌

A61K 31/405

说明书页数: 27

附图页数:

[54] 发明名称 用作兴奋型氨基酸神经传导递质拮抗剂的聚胺类化合物

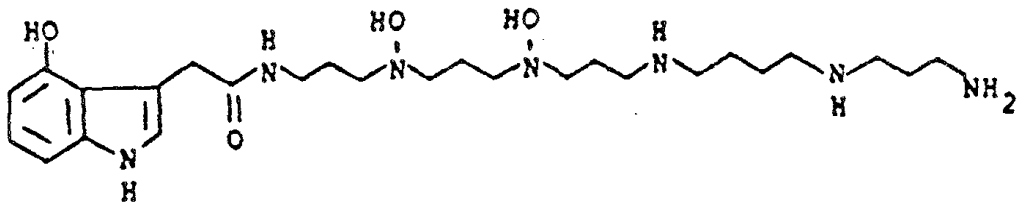
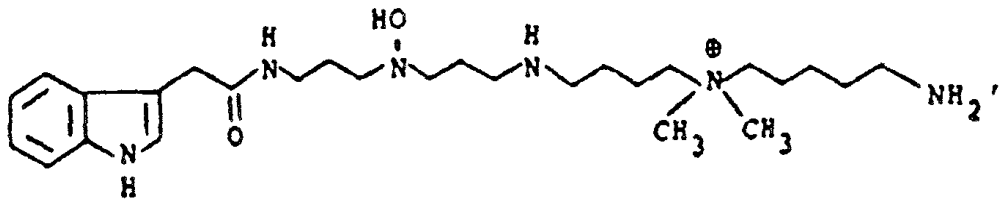
[57] 摘要

本发明涉及某些发现于棚蛛属 *aperta* 蜘蛛毒液中的聚胺类化合物。这类聚胺及其盐拮抗兴奋型氨基酸神经传导递质, 该传导递质作用于各种生物的细胞, 并可拮抗兴奋型氨基酸神经传导递质本身, 以及用于治疗由兴奋型氨基酸神经传导递质诱发的疾病和症状, 防治无脊椎类害虫, 还涉及包括所述聚胺及其盐的组分物。

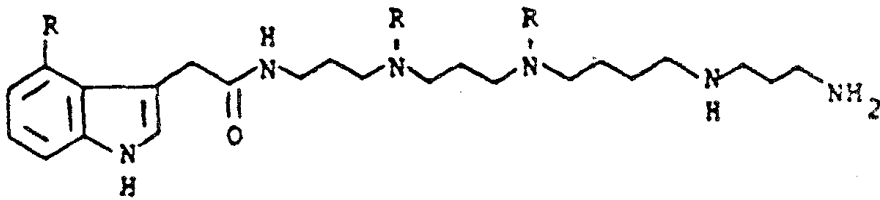
△
20
▽

权 利 要 求 书

1. 一种制备基本纯净的选自下述化合物及其药学上可以接受的盐的方法

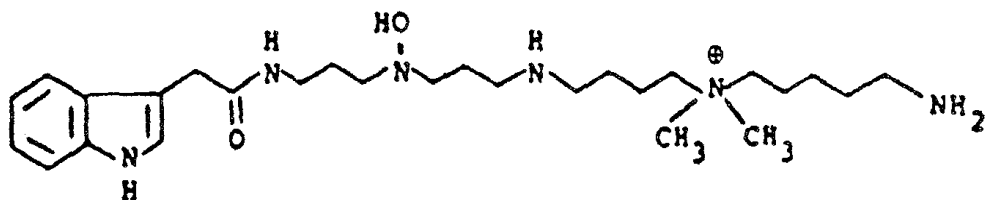


和



式中各R相同，并代表H或OH，该方法的特征在于：

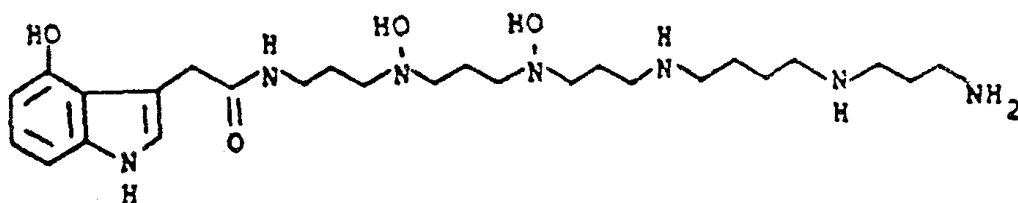
(a) 如果期望得到下式化合物



将棚蛛属蜘蛛 (*Agelenopsis aperta*) 的全毒液载于C-18

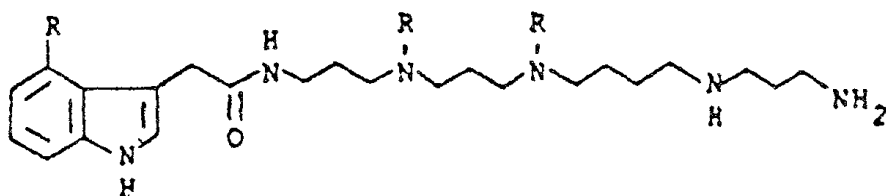
Vydac®柱(22mm×250mm, 300 Å 孔径, 粒径为10μ), 采用15毫升/分的流速进行洗脱, 采用下述线性梯度程序溶剂系统: 0%→20%乙腈、100%→80% 0.1% 三氟乙酸水溶液, 在220 nm 处进行单色谱峰检测, 收集在大约26.0分钟时洗脱出的级份, 如果采用Dynamax Phenyl 柱(4.6mm×250mm, 60 Å 孔径, 粒径为8μ), 以1毫升/分的流速洗脱, 采用10%乙腈和90% 0.1%三氟乙酸恒溶条件, 在220 nm 处进行峰检测, 则收集在大约55.27分钟洗脱出的级份, 任意地冻干, 再混悬于水中, 冻干除去水;

(b)如果制备下式化合物



将棚蛛属蜘蛛 (*Agelenopsis aperta*) 全毒液载于C-18 Vydac®柱(22mm×250mm, 孔径300 Å, 粒径10μ), 采用15毫升/分的流速洗脱, 采用下述线性梯度程序溶剂系统: 0%→20%乙腈、100%→80% 0.1%三氟乙酸水溶液, 在220 nm 进行单色谱峰检测, 收集大约22.3分钟洗脱出的级份; 如果采用C-18 Baker 柱(4.6mm×250mm, 孔径300 Å, 粒径5μ), 则以1毫升/分的流速进行洗脱, 采用8%乙腈和92% 0.1%三氟乙酸水溶液的恒溶条件, 在220 nm 处进行峰检测, 收集大约19.5分钟洗脱出的级份; 任意地冻干, 再混悬于水中, 冻干除去水;

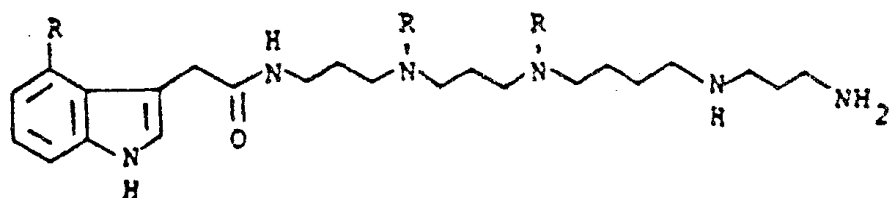
(c) 如果制备下式化合物



式中各R是羟基,

将棚蛛属蜘蛛 (*Agelenopsis aperta*) 全毒液载于C-18 Vydac® 柱 (22mm×250mm, 孔径 300 Å, 粒径 10μ), 采用 15 毫升/分的流速洗脱, 采用下述线性梯度程序溶剂系统: 0%→20% 乙腈, 100%→80% 0.1% 三氟乙酸水溶液, 在 220nm 进行单色谱峰检测, 收集大约 23.1 分钟洗脱出的级份; 如果采用 Dynamax Phenyl 柱 (4.6mm×250mm, 孔径 60 Å, 粒径 8μ), 则以 1 毫升/分的流速进行洗脱, 采用 10% 乙腈和 90% 0.1% 三氟乙酸水溶液的恒溶条件, 在 220nm 处进行峰检测, 收集大约 37.76 分钟洗脱出的级份; 任意地冻干, 再混悬于水中, 冻干除去水;

(d) 如果制备下式化合物

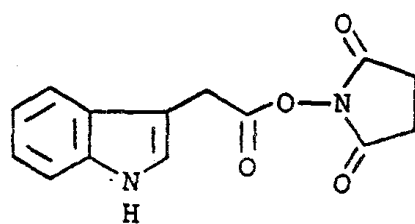


式中各R是H

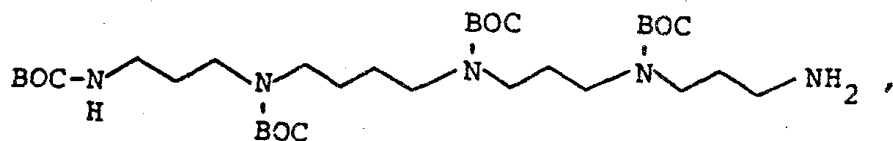
将棚蛛属蜘蛛 (*Agelenopsis aperta*) 全毒液载于C-18

Vydac®柱(22mm×250mm, 孔径300 Å, 粒径10μ), 采用15毫升/分的流速洗脱, 采用下述线性梯度程序溶剂系统: 0%→20% 乙腈, 100%→80% 0.1% 三氟乙酸水溶液, 在220nm 进行单色谱峰检测, 收集大约23.1分钟洗脱出的级份; 如果采用Dynamax Phenyl柱(4.6mm×250mm, 孔径60 Å, 粒径8μ), 则以1毫升/分的流速进行洗脱, 采用10% 乙腈和90% 0.1% 三氟乙酸水溶液的恒溶条件, 在220nm 处进行峰检测, 收集大约26.47分钟洗脱出的级份; 任意地冻干, 再混悬于水中, 冻干除去水;

或者, 另一方法是在反应惰性溶剂中, 在惰性气氛下, 下式(IX)化合物与式(VIII)化合物反应,



(IX)



(VIII)

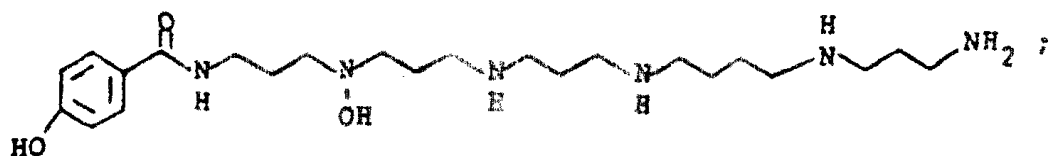
使其产物在惰性气氛下与二叔丁基二碳酸酯反应, 然后与4-(N,N-二甲基氨基)吡啶反应, 并使其产物在惰性气氛中与三氟乙酸反应; 任意地采用众所周知的已知方法, 将所述化合物转化为药物上可以接受的盐。

用作兴奋型氨基酸神经
传导递质拮抗剂的聚胺类化合物

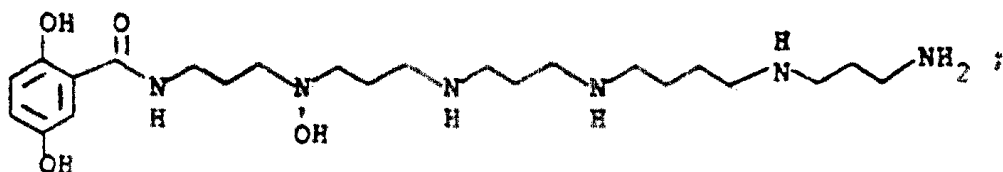
本发明涉及某些发现于棚蛛属 *aperta* 蜘蛛毒液中的聚胺类化合物。这类聚胺及其药物上可以接受的盐是兴奋型氨基酸神经传导递质拮抗剂,该传导递质作用于各种生物(包括无脊椎和脊椎类)神经细胞在内的细胞。本发明还涉及这类聚胺及其盐在拮抗兴奋型氨基酸神经传导递质中的应用(所述传导递质作用于诸如生物体神经系统细胞之类的细胞),以及用于治疗哺乳动物中由兴奋型氨基酸神经传导递质诱发的疾病和症状,防治无脊椎类害虫,还涉及包括所述聚胺及其盐的组合物。

文献中报道了棚蛛属 *aperta* 蜘蛛毒液中至少含有两种作用于钙流的有毒物质。参见: Jackson, H., et al., Soc. Neu. Sci., Abstr. 12:1078 (1987)。这些作者公开了一种在该本文称之为 AG₂ 的毒物,其分子量低于 1000 道尔顿,它似乎在许多组织中抑制钙流。另有 (Further, Jackson, H., et al., Soc. Neu. Sci. Abstr. 12:730 (1986)) 报道了来自棚蛛属 *aperta* 蜘蛛的另一种毒物,该成分的分子量约为 6000 道尔顿。据报道该毒物影响传递过程中突触前阻断,并推测该毒物阻断与释放神经传导递质有关的钙通道。1989 年 4 月 28 日提交的并转让给受让人的申请号为 07/346,181 的美国专利申请书中公开了发现于棚蛛属 *aperta* 蜘蛛毒液中的某些聚胺类化合物。在该申请中公开的那些聚胺是作为细胞兴奋型氨基酸受体的阻断剂,在该申请中还公开了一种称之为 B₁ 的上述聚胺作为细胞钙通道阻断剂。该申请中公开的聚胺如下所述:

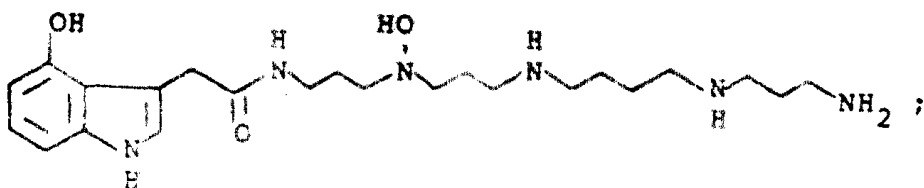
AGEL 452:



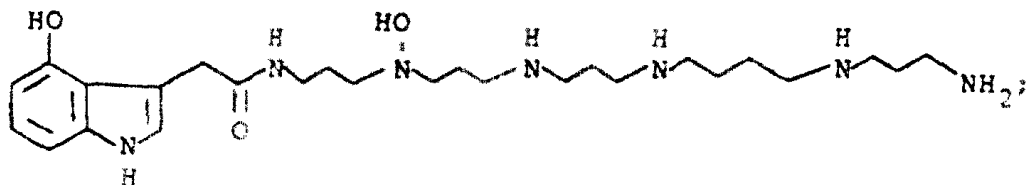
AGEL 468:



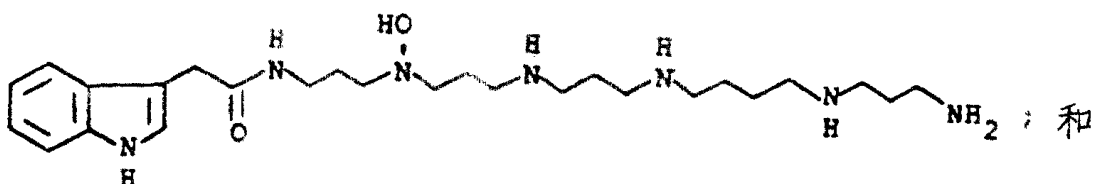
AGEL 448:



AGEL 505:



AGEL 489:



和AGEL 504:

它是具有如下鉴别特征的化合物:

(a) 存在于按如下方式洗脱棚蛛属 *aperta* 蜘蛛毒液粗品所得的级

份中：c-18 Vydac® 22mm×250mm，孔径为300 Å，粒度为10μ的柱，流速为15ml/分，采用如下线性梯度程度的溶剂系统：5%→20%B，95%→80%A[0→30分钟。]，然后，20%→70%B，80%→30%A[30→55分钟。]，其中A是0.1% TFA水溶液，B是乙腈，滞留时间大约为22.75分钟；

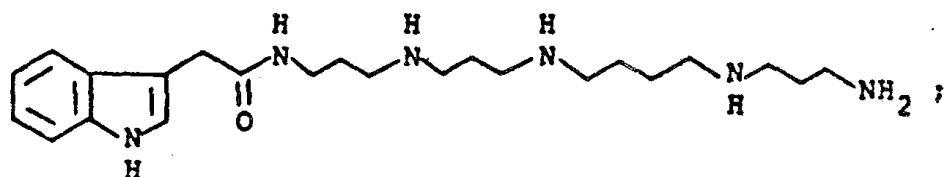
(b)存在于上述(a)洗脱级份经如下方式再洗脱的级份中：c-18 Vydac® 22mm×250mm，300 Å 孔径，10μ粒径的柱，流速为15ml/min.，溶剂系统：非线性梯度程序0%→0%B，100%→100%A[0-5分钟。]，然后0%→10%B，100%→90%A[5-20分钟](Waters曲线1)，然后10%→20%B，90%→80%A[20→30分钟](Waters曲线6)，然后20%→50%B，80%→50%A[30→40分钟](Waters曲线11)，其中A是0.1% TFA的水溶液，B是乙腈，滞留时间约为21.5分钟；和

(c) FAB MS：高分辨：505.3861，经计算为C₂₇H₄₃N₆O₃。

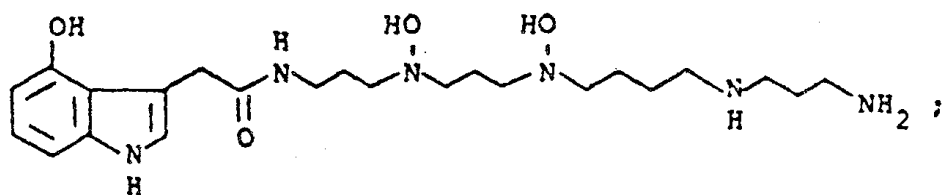
兴奋型氨基酸神经传导递质拮抗剂化合物具有多种用途。兴奋型氨基酸神经传导递质拮抗剂在临床上可用于治疗下述疾病：例如，中风、脑缺血、神经退化性疾病，例如，阿耳茨海默氏病和癫痫，尤其可用作精神治疗剂。参见：Excitatory Amino Acids in Health and Disease, D. Lodge, Ed., John Wiley and Sons Ltd., New York, NY 1988，该文引为本发明的对比文献。此外，这类化合物还可用于研究细胞(如：神经细胞)生理，并用于防治无脊椎类害虫。

本发明涉及某些存在于棚蛛属 *aperta* 蜘蛛毒液中的聚胺类化合物。本发明的聚胺如下所述：

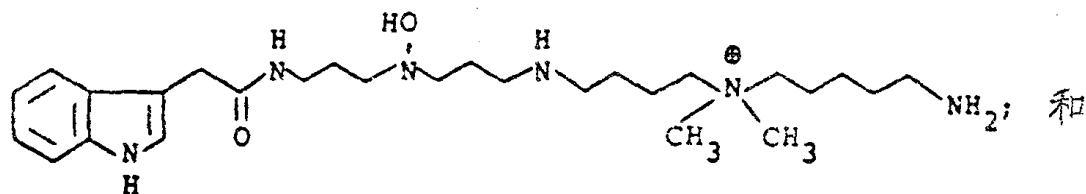
AGEL 416:



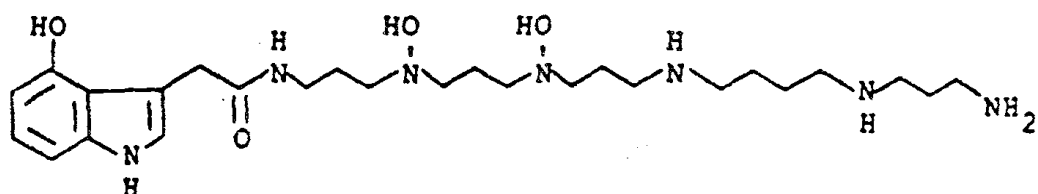
AGEL 464:



AGEL 489 (A):



AGEL 521:



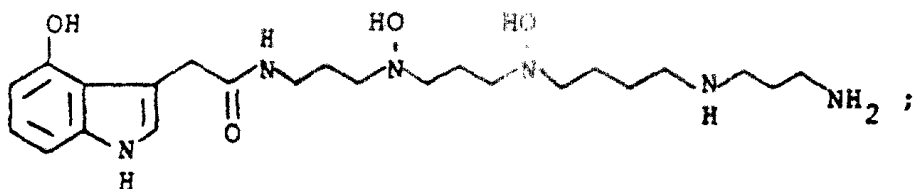
本发明所述聚胺类化合物及其药物上可以接受的盐是作用于细胞的兴奋型氨基酸神经传导递质拮抗剂。因此，所述聚胺类化合物可用于拮抗这类兴奋型氨基酸神经传导递质本身。本发明的聚胺类也可用于防治无脊椎害虫，用于治疗人类由兴奋型氨基酸神经传导递质诱发的疾病。所述聚胺还可用于人类精神病治疗剂。

本发明还涉及包括所述聚胺的组合物和服用所述聚胺的方法。

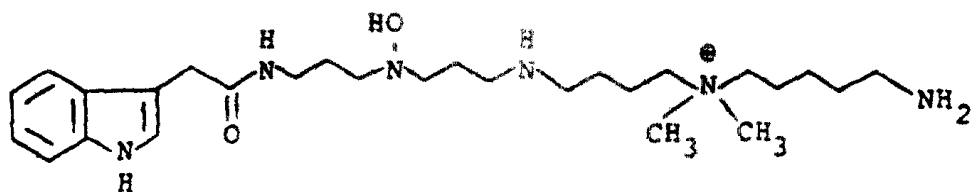
按照本领域技术人员所熟知的标准方法，即电刺激挤出法，从蜘蛛属 *aperta* 蜘蛛制得毒液。所采用的优选方法应保护整个毒液不受腹腔反流或血淋巴的污染。这类方法对本领域技术人员而言是已知的。直到按下述方法纯化前，由此所得的全部毒液应保持在 -78°C 左右的冷冻状态。

在下述制备或半制备柱上，通过反相高效液相层析 (HPLC) 纯化整个毒液中的各种成分。所述柱包括：C-4 和 C-18 Vydac® 柱 (Rainin Instrument Co. Inc., Mack Road, Woburn Massachusetts 01801), C-18 Baker 柱 (J. T. Baker Inc., 22 Red School Lane, Phillipsburg, NJ 08865) 和 Dynamax Phenyl 柱 (Rainin Instrument Co. Inc., Mack Road, Woburn Massachusetts 01801)。在 220-230 nm 处采用单色法进行峰检测。例如，采用 Waters 990 二级管阵列检测器 (diode array detector) (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757) 收集多色 UV 数据，可以对各级份做进一步分析。采用已知方法，例如，使用 ISCO/“FOXY” 级份收集器和 ISCO 2159 峰检测器 (ISCO, 4700 Superior, Lincoln, Nebraska 68504) 收集来自柱的各级份。将各级份收集在适宜大小的容器中，例如，无菌聚乙烯实验室制品。然后采用冻干法将来自洗脱液的各级份浓缩，最后冻干除水。然后可以采用下述方法测定所得各构成级份的纯度：即，利用梯度系统采用分析柱进行色谱分析，与各级份最后纯化中所使用的系统相比，上述梯度系统是更强的恒溶剂。

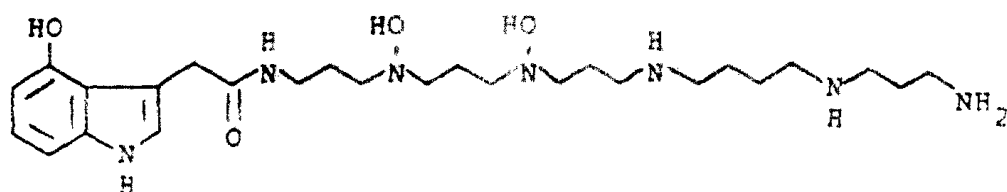
AGEL 464:



AGEL 489(A):

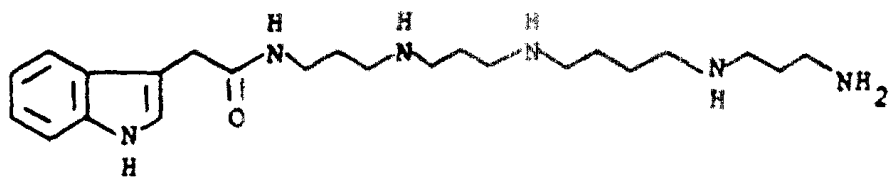


AGEL 521:

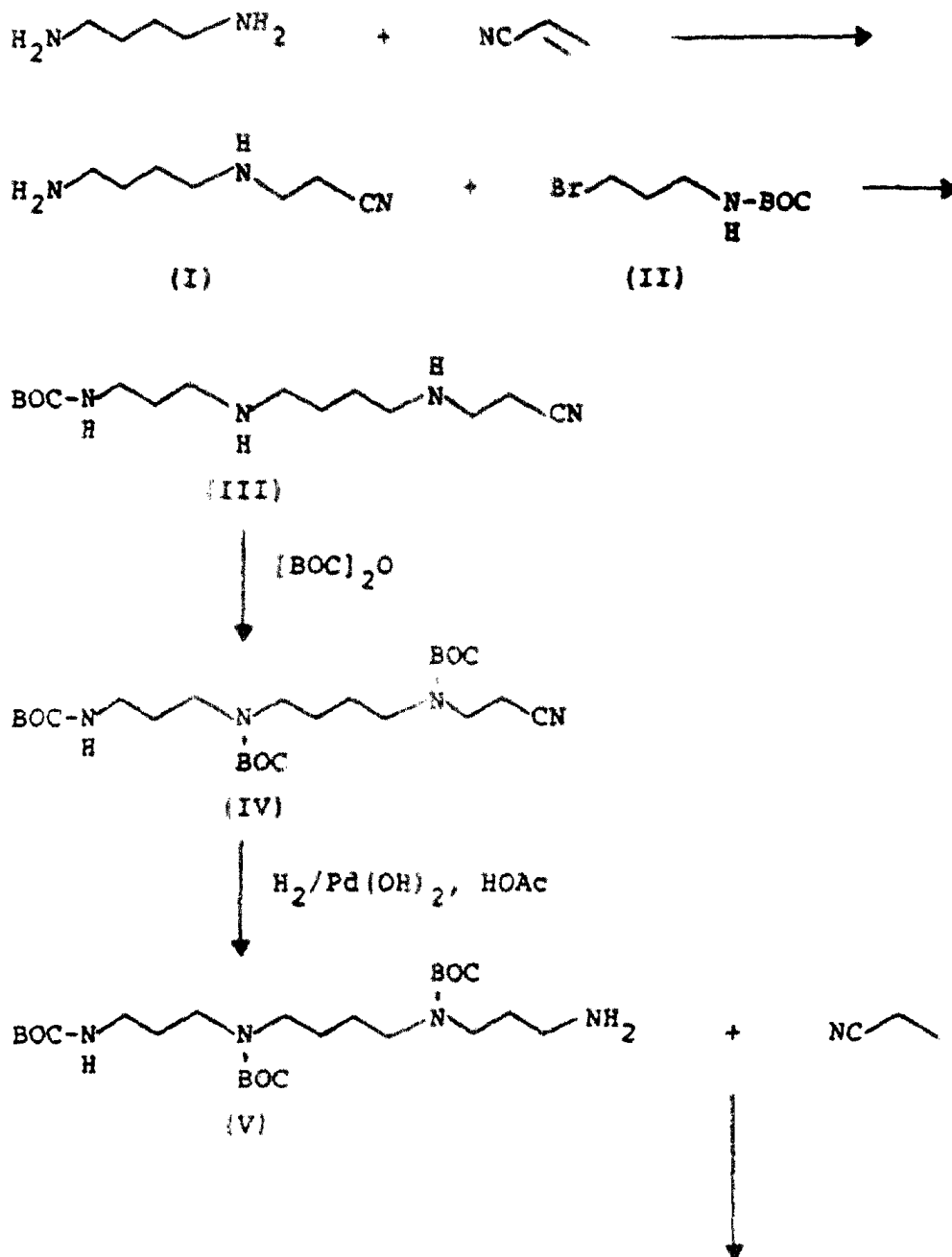


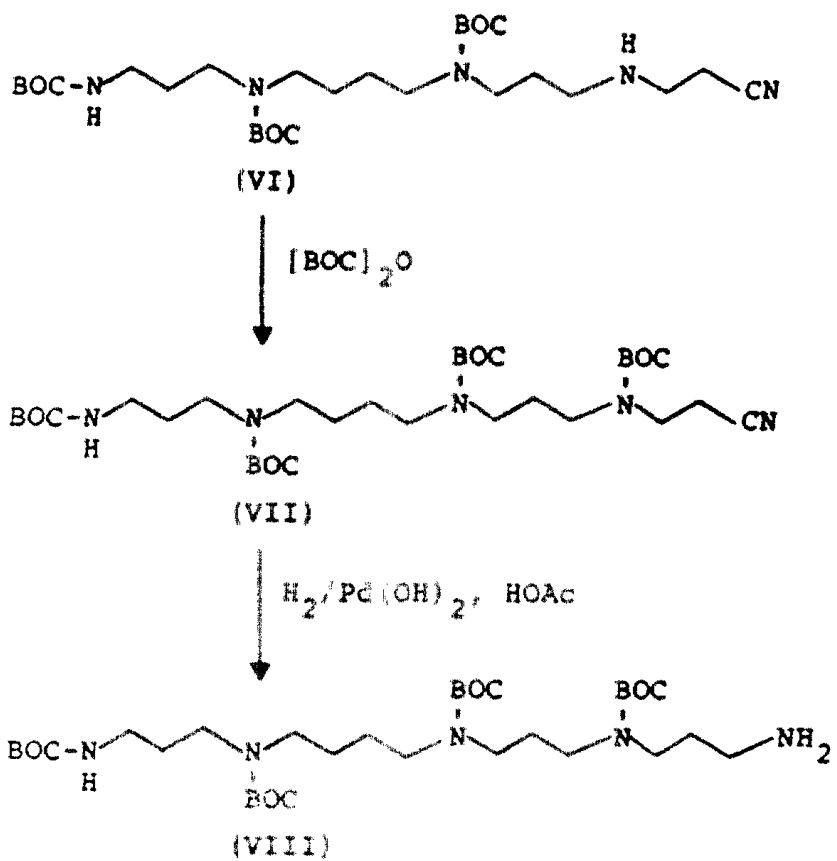
尽管作为本发明的优点公开了存在于级份AGEL 416、AGEL 464, AGEL 489(A)及AGEL 521 中的各化合物, 但是现在除了从棚蛛属 *aperta* 蜘蛛全毒液中分离/纯化外, 还可以采用其他方法制得所述化合物。所有这些方法都属于本发明的范畴, 例如, 通过合成法可直接制得本发明的聚胺类化合物。

下文所示反应路线A至C 示出了生产下式本发明聚胺的合成路线:

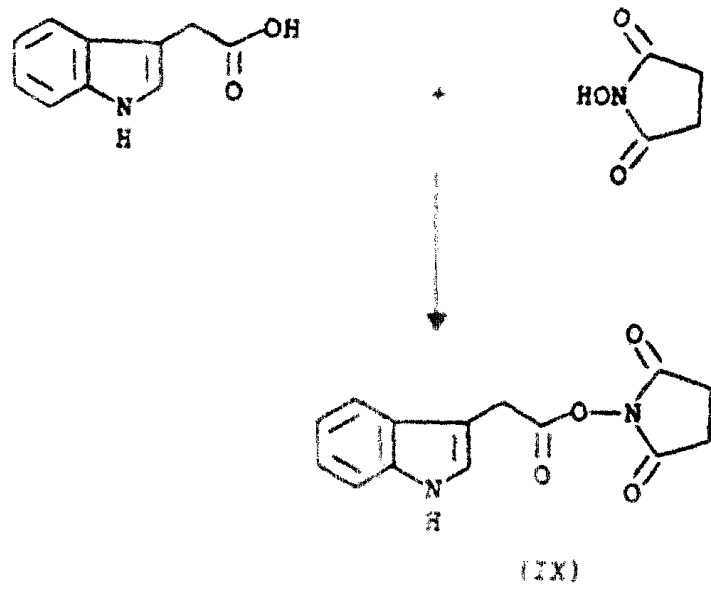


反应路线 A.

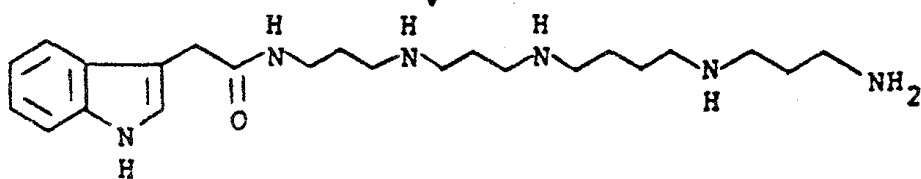
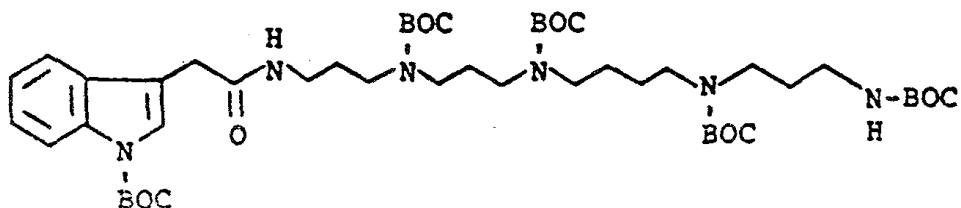
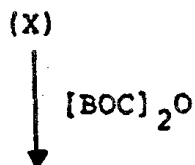
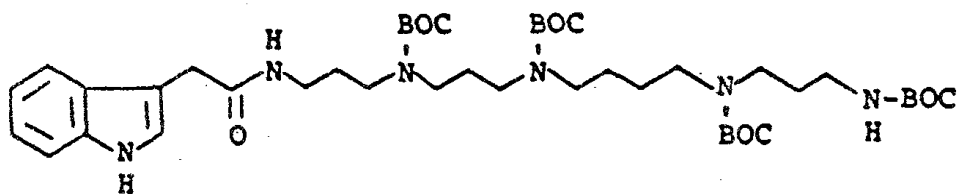




反应路线B



反应路线C



按照反应路线A，从丁二胺开始，按各步顺序反应，制得式IV聚胺中间体。在实施例5A至G部分，给出了适用于按反应路线A制备式VIII中间体的反应条件。反应路线B解释了制备式IX中间体的方法。在实施例5的H部分给出了适用于按反应路线B制备该中间体的反应条件。反应路线C示出了式XII所示本发明聚胺化合物的制备方法。在实施例5的I至K部分给出了适用于将式VIII与式IX中间

体化合物偶合、然后制备式 XII 化合物的反应条件。

本发明聚胺可逆性地拮抗作用于细胞的兴奋型氨基酸神经传导递质，所述细胞包括各种生物（包括无脊椎和脊椎类）神经系统中的细胞。贯穿本文所采用的术语“脊椎类”意指包括哺乳类动物、“无脊椎类”包括例如，昆虫，外寄生虫和内寄生虫。

按照下述方法，根据它们在新生大鼠小脑中阻断 N-甲基-D-天冬氨酸诱发 (NMDA) 的 cGMP 上升的能力，可以证实本发明聚胺类化合物拮抗兴奋型氨基酸神经传导递质的能力。所述方法是：从 10 只出生 8-14 天的 Wistar 大鼠中迅速切除小脑，并将其置于 PH 为 7.4 的温度为 4℃ 的 Krebs / 碳酸氢盐缓冲液中，然后用 McIlwain 组织切片机 (The Nickle Laboratory Engineering Co., Gomshall, Surrey, England) 将其切割成 0.5mm×0.5mm 的小块。将所得脑组织碎片移至 100ml, 37℃、用 95:5 O₂/CO₂ 不断平衡的 Krebs / 碳酸氢盐缓冲液中。以这种方式将脑组织碎片保温 90 分钟，并将缓冲液更换 3 次。然后倾出缓冲液，将该组织离心 (1 分钟., 3200r.p.m)，继之混悬于 20ml Krebs / 碳酸氢盐缓冲液中。接着以 250μl 的等份 (约 2mg) 移出，放入 1.5ml 的微型离心管中。在这些管中加入 10μl 受试化合物储液，然后加入 10μl 2.5mM NMDA 溶液使反应开始。最终 NMDA 浓度是 100 μM。对照组不加 NMDA。在振荡水浴中，于 37℃ 将这些管保温一分钟，然后加入 750μl 50mM Tris-Cl, 5mM EDTA 溶液使反应停止。立即将这些管放入沸水浴中持续 5 分钟。然后采用探管近程声电定位器 (probe sonicator) 将功率水平设置在 3，将每只管中的组份用声波处理 15 秒。取出 10 微升，按 Lowry, Anal.

Biochem. 100:201-220(1979) 所述方法测定蛋白。然后将这些管离心(5分钟、10000xg), 移出100 μ l上清液, 采用New England Nuclear (Boston, Massachusetts) cGMP 测定仪, 按厂商提供的方法, 测定环化GMP(cGMP)水平。所得数据是每毫克蛋白产生cGMP的皮摩尔数。

此外, 按照下述方法, 根据本发明聚胺类化合物通过阻断裂解小脑粒细胞的NMDA/甘氨酸, 从而使胞液中游离 $[Ca^{+2}]_i$ 增加的能力来证实其对兴奋型氨基酸神经传导递质的拮抗能力。所述方法是: 从出生8天大鼠的小脑中制备小脑粒细胞(Wilkin, G.P. et al., Brain Res:115:181-199, 1976)。用聚-L-赖氨酸涂布聚三氟氯乙烯小块(1cm²)(Proplastics Inc., 5033 Industrial Ave., Wall, N.J., 07719), 然后置于含有1ml Eagles Basal 培养基的12孔培养皿中。将细胞打散, 将含有 6.25×10^6 细胞的等份加到每个含有聚三氟氯乙烯块的孔中。接种后24小时加入胞嘧啶- β -D-阿拉伯呋喃糖苷(终浓度为10 μ M)。将第6、7和8天的培养物作细胞fura2分析。将细胞(连接于聚三氟氯乙烯块)移至含有(1ml)于HEPES缓冲液中的2 μ M fura2/AM(Molecular Probes Inc., Eugene, OR, 97402)的12孔培养皿中, 所述缓冲液含有0.1%小牛血清白蛋白, 0.1%右旋糖, pH = 7.4, 无镁离子。将该细胞在37 $^{\circ}$ C保温40分钟; 移出含fura2/AM的缓冲液, 用1ml不含fura2/AM的相同缓冲液代替之。将2.0ml预温(37 $^{\circ}$ C)过的缓冲液加到一石英杯中。将连接在聚三氟氯乙烯上的细胞放入杯中, 将该杯插入装有磁力搅拌器的恒温(37 $^{\circ}$ C)箱中, 用荧光分光光度计(Biomedical Instrument

Group, University of Pennsylvania)测定荧光。使荧光信号稳定约2分钟。通过加入 $50\mu\text{M}$ NMDA和 $1\mu\text{M}$ 的甘氨酸可使胞液游离钙增加,(以荧光增强表示)。将 $5-20\mu\text{l}$ 受试化合物储液置磷酸缓冲液(PBS, pH7.4)中,以适宜浓度加入杯中。采用Grynkiwicz, G. 等(J. Biol. Chem. 260:3440(1985))建立的方法标定荧光信号及fura2/AM 溢出校正。在完成各步试验后,加入伊屋诺霉素($35\mu\text{M}$)测定最大荧光值(F_{max}),继之加入EGTA(12mM)将钙螯合,测定最小荧光值(F_{min})。采用前述程序时,根据加入题目化合物所出现的荧光降低,即表示该化合物拮抗兴奋型氨基酸神经传导递质的能力。

本发明的聚胺本身就可用于拮抗兴奋型氨基酸神经传导递质。因此,也可将这类聚胺用于防治无脊椎害虫,以及用于治疗哺乳动物类兴奋型氨基酸神经传导递质诱发的疾病和症状,例如,中风,脑缺血,神经退化病(如: Alzheimer氏病)和癫痫。所述聚胺还可用作哺乳类动物的精神病治疗剂。此外,该聚胺还可用于研究包括(但不限于)神经细胞在内的细胞生理。

本发明聚胺的药物上可以接受的盐也属于本发明的范畴。采用本技术领域普通技术人员熟知的方法即可制得这些盐。例如,采用常规方法可以制得聚胺的酸成盐。该聚胺的酸成盐优选例如盐酸盐,三氟乙酸盐。特别优选者是盐酸盐。

当将本发明聚胺或其药物上可以接受的盐施用于哺乳动物时,即可单独服用,也可按规范制药方法以药用组合物的形式与药物上可接受的载体或稀释剂配伍使用。该类聚胺或其药物上可以接受的盐既可口服也可胃肠道外给药。胃肠道外给药包括:静脉、肌内、腹膜内、

皮下及外用给药。

口服使用本发明聚胺或其药物上可接受的盐时，可以下列剂型服用该化合物，例如，片剂或胶囊剂，或者是水溶液或混悬液。就口服片剂而言，通常加入惯用的载体，其中包括乳糖、玉米淀粉，以及润滑剂，例如，硬脂酸镁。就用于口服的胶囊剂而言，有用的稀释剂是乳糖和干燥玉米淀粉。在将含水混悬液用于口服时，将活性成分与乳化剂和悬浮剂混合。如有必要，还可加入某些甜味剂和/或香味剂。

就肌肉、腹膜内、皮下及静脉给药而言，通常配制成活性成分的无菌溶液，并应适当地调整该溶液的 pH 并制成缓冲液。在用于静脉注射时，应控制所有溶质的总浓度以制成等渗制剂。

在将本发明聚胺或其盐用于人类时，一般临床医生即可确定其日剂量。但是，本发明聚胺适宜的剂量范围是约 3 至 30 mg / kg / 天。另外，该剂量可根据下述因素而变：患者本身的年龄、体重和反应、以及患者症状的严重程度和所服用具体化合物的效力。因此，也可超出上述给定的剂量范围，并且这也属于本发明的范畴。

在将本发明聚胺或其盐用于防治无脊椎害虫时，将所述化合物直接施用于所说无脊椎害虫，或施于所说无脊椎害虫的生活环境。例如，将本发明化合物的溶液喷洒于所说无脊椎害虫。控制所说无脊椎害虫所需化合物的量随害虫及其生存环境而异，并且也可由施用该化合物的人员决定。

在将本发明聚胺或其盐用于研究细胞生理时，可根据本领域普通技术人员熟知的方法将所述化合物施用于细胞。例如，以适宜的生理缓冲液将所述化合物施用于细胞。用于这类研究中的本发明化合物的适宜浓度是 100 μM。但是，在这类研究中，所述化合物的浓度可以

高于或低于 $100\mu\text{M}$ 。按照众所周知的方法，本领域普通技术人员可以确定施用化合物的量。

实施例 1. 棚蛛属 *aperta* 蜘蛛全毒液的初分离

将棚蛛属 *aperta* 蜘蛛全毒液 (得自: Natural Product Sciences, Inc., Salt Lake City, Utah 84108, 并在 -78°C 冷冻贮存) 解冻, 并将其从 $10-60\mu\text{l}$ 稀释至 $200\mu\text{l}$, 载于 C-18 Vydac[®] ($22\text{mm}\times 250\text{mm}$, 孔径 300\AA , 粒径 10μ) 柱, 以 $15\text{ml}/\text{min}$ 的流速洗脱, 采用下述线性梯度程序: $0\% \rightarrow 20\% \text{ B}$, $100\% \rightarrow 80\% \text{ A}$ ($0 \rightarrow 30$ 分钟), 其中, A 是 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液, B 是乙腈。在 220nm 处进行单色峰检测, 采用 ISCO/“FOXY” 级份收集器及 ISCO 2159 峰检器收集级份。收集 0 至 30 分钟的级份。根据峰检测, 特别收集了如下级份:

<u>级份</u>	<u>洗脱时间</u>
1	约 13.8 分钟
2	约 19.25 分钟
3	约 21.0 分钟
4	约 22.3 分钟
5	约 23.1 分钟
6	约 26.0 分钟

采用相同的柱及前述条件对级份 1 作了再分离, 不同之处是使用了 Waters 990 二极管阵列检测器, 结果发现: 级份 1 含有聚胺 AGEL 452。在共同未决的申请号为 07/346,181 的美国专利申请书中介绍了该聚胺, 它并不构成本发明的部分。按照再分离级份 1

的方法对级份 2 再分离。结果发现：级份 2 含有聚胺 AGEL 448 和 AGEL 468，在上述美国专利申请书（序号为 07/346,181）中对两者均作了介绍。这两个聚胺均不构成本发明的任何部分。此外，采用 C-4 Vydac® (22mm×250mm，孔径 300 Å，粒径 10μ) 柱，对级份 3 进行了再分离，所采用的线性梯度为 5%→10% B，95%→90% A (0→30分钟)，其中，A 和 B 如前所述，并且还采用了 Waters 990 二极管阵列检测器。现已发现：级份 2 含有序号为 07/346,181 的美国专利申请书所介绍的聚胺 504 和 505，这并不构成本申请的部分。

实施例 2. 对级份 4 的再分离并确定其中的结构

将按实施例 1 所得的级份 4 载于 C-18 Baker (4.6mm×250 mm，孔径 300 Å，粒度 5μ) 柱，以 1ml/分 的流速洗脱，并采用 8% B，92% A 的恒溶条件，其中 A 和 B 如实施例 2 所述。采用 Waters 990 二极管阵列峰检器 (λ=220nm) 进行峰检测，按实施例 1 所述收集级份。在大约 19.50 分洗脱出再分离级份，在此，称之为 AGEL 521。按照标准方法，通过冻干除去洗脱剂，然后再冻干除水来制备供光谱分析用的级份 AGEL 521。将冻干的级份 AGEL 521 化合物充氩下于大约 -80℃ 保存，直到使用。

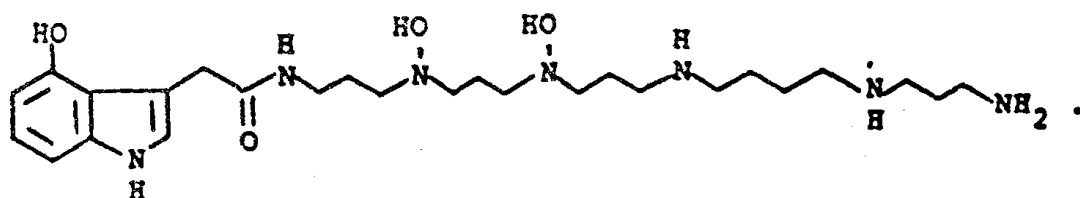
然后，采用 FAB MS 测定级份 AGEL 521 所含化合物的结构。所得数据及由此推论出的结构如下：

AGEL 521 :

FAB MS : (高分辨) 观察到 (M+H) M/Z=522.3774, 经计算为分子式 C₂₆ H₄₈ N₇ O₄ (要求值: 522.3768)。

结构: 1H-吡啶-3-乙酰胺-N-(20-氨基-4,8-二羟基-4,

8,12,17-四氮杂二十烷-1-基)



实施例3. 级份5的再分离并测定其结构

将按实施例1所得级份5载于Dynamax Phenyl柱(4.6 mm×250mm, 孔径60 Å, 粒径8 μ), 以1ml/分的流速进行洗脱, 采用10% B, 90% A的恒溶条件, 其中A和B如实施例1所述。按实施例2所述方法进行峰检测并收集级份。如下所述得到本文称之为AGEL 464和416的级份:

级份	洗脱时间
AGEL 416	约26.47分钟
AGEL 464	约37.76分钟

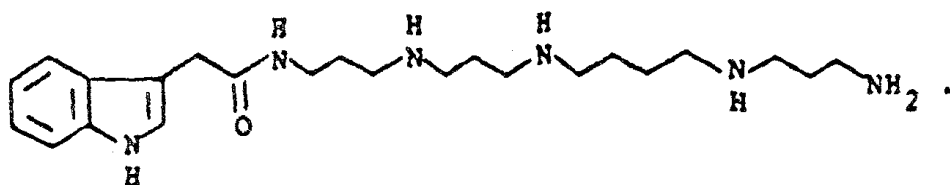
按实施例2所述方法制备并贮存供光谱分析用的级份AGEL 416和AGEL 464。

采用FAB MS测定级份416所含化合物的结构, 结果如下:

FAB MS: (高分辨) 观察到(M+H)

M/Z=417.3336, 经计算为C₂₃H₄₁N₀O₄ (要求值: 417.3342)

结构: 1H-吲哚-3-乙酰胺-N-(16-氨基-4,8,13-三氮杂十六烷-1-基)

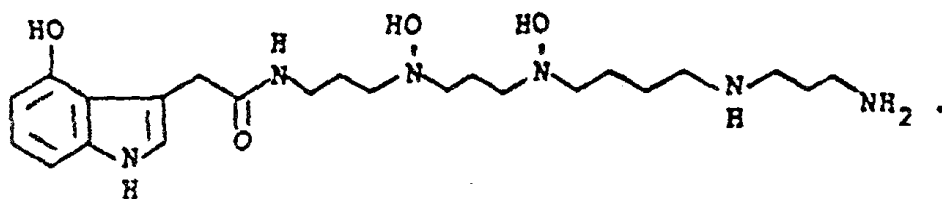


采用 FAB MS 测定了级份 AGEL 464 所含化合物的结构, 结果如下:

FAB MB : (高分辨) 观察到 (M+H)

M/Z = 465.3173, 经计算为 $C_{23}H_{41}O_4$ (要求值: 465.3189)

结构: 1H-吲哚-3-乙酰胺-N-(16-氨基-4,8-二羟基-4,8,13-三氮杂十六烷-1-基)



实施例 4. 将级份 6 再分离并测定其结构

将按实施例 1 制得的级份 6 按实施例 3 方法载于 Dynamax Phenyl 柱, 并洗脱。按实施例 2 所述方法进行峰检测并收集级份。如下所示制得本文称之为 AGEL 489(A) 和 AGEL 489 的级份:

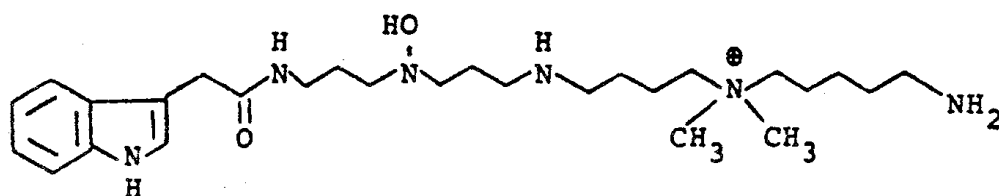
级份	洗脱时间
AGEL 489	约 41.9 5 分钟
AGEL 489(A)	约 55.27 分钟

按实施例 2 所述方法制备并贮存供光谱分析用的级份 AGEL 489 (A) 和 AGEL 489。

采用 FAB MB 测定了级份 AGEL 489(A) 所含化合物的结构, 结果如下:

FAB MS: (高分辨) 观察到 $(M+H)M/Z=489.3896$, 经计算为 $C_{27}H_{49}N_6O_2$ (要求值: 489.3917)。

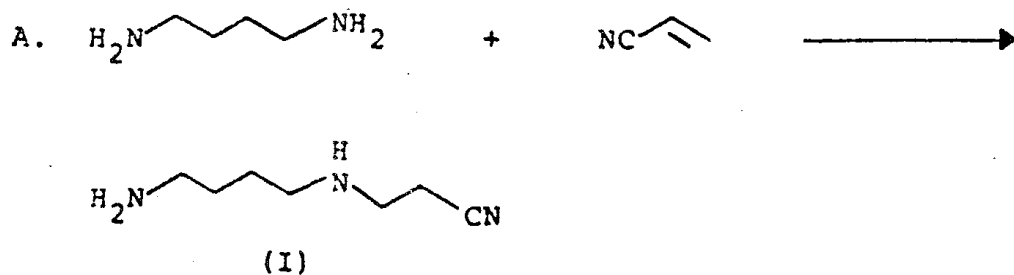
结构: 1H-吡啶-3-乙酰胺-N-(18-氨基-13,13-二甲基-4-羟基-4,8,13-三氮杂十八烷-1-基)。



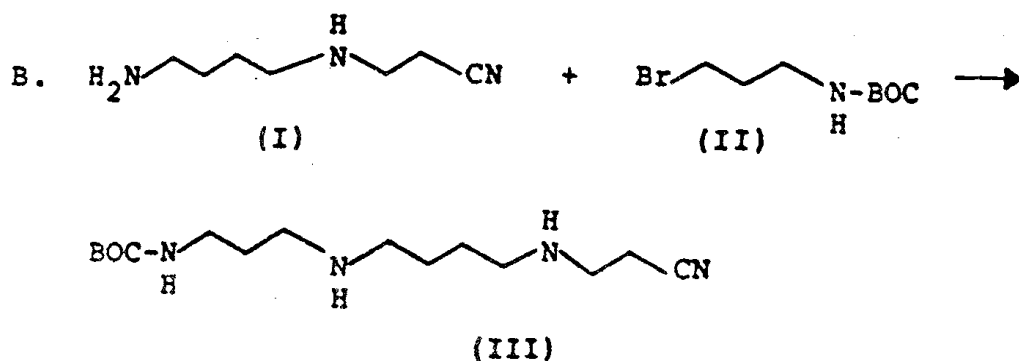
采用 FAB MS 测定了级份 AGEL 489 所含化合物的结构, 发现它是申请号为 07/346,181 的美国专利申请所述化合物 AGEL 489。后者并不构成本发明的部分。

实施例 5. 1H-吡啶-3-乙酰胺-N-(16-氨基-4,8,13-三氮杂十六烷-1-基)。

按下述方法合成了题目化合物, 经确定为是实施例 3 所述级份 AGEL 416 所含的化合物:

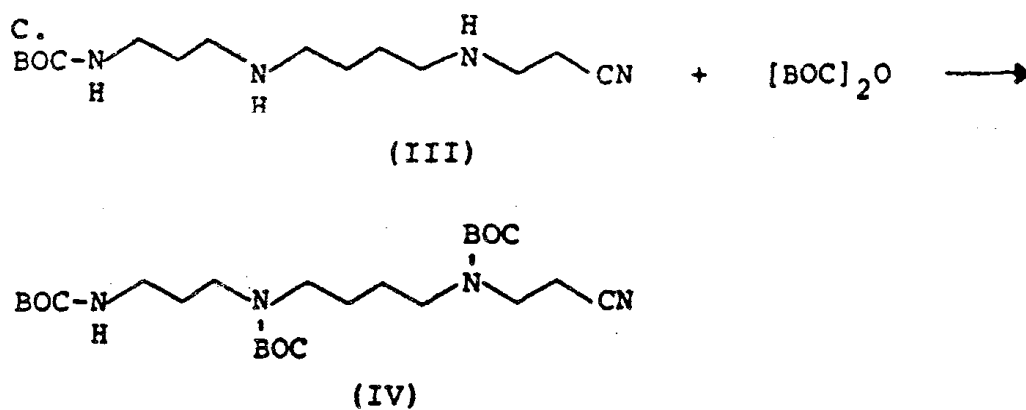


按 Yamamoto, Hisashi, (J. Am. Chem. Soc. 103:6133-6136 (1981)) 公开的方法, 由丁二胺和丙烯腈制得了式 I 化合物。

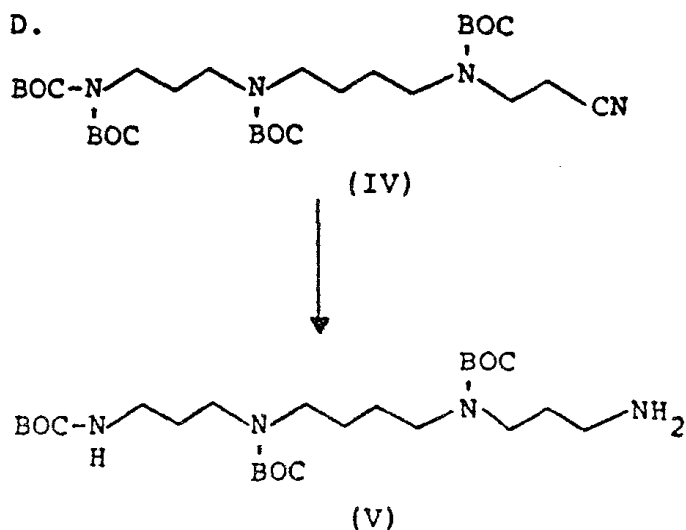


在氮气下, 将 5.78 g (0.041 mole) 式 I 化合物 (按前述 A 部分制得) 加到 75 ml CH_3CN 和 11.48 g KP-硅藻土中, 并搅拌之。搅拌下, 将溶于 25 ml CH_3CN 中的 9.75 g (0.041 mole) 式 II 化合物 (按制备 A 所述方法制得) 加到前述混合物中。将该反应物加热回流 6 小时, 然后冷却至室温, 放置过夜。然后滤除 KP-硅藻土, 用 CH_3CN 充分洗涤滤饼, 将滤液减压浓缩, 得到 14 g 粗油产物。将该粗产物在 400 g 硅胶上进行层析, 依次采用下述溶剂洗脱: 500 ml 二氯甲烷, 然后 1 升 85:15 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 继之 1 升 75:25 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 加有 25 ml 异丙胺的 1 升 75:25 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 加有 50 ml 异丙胺的 1 升 75:25 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$;

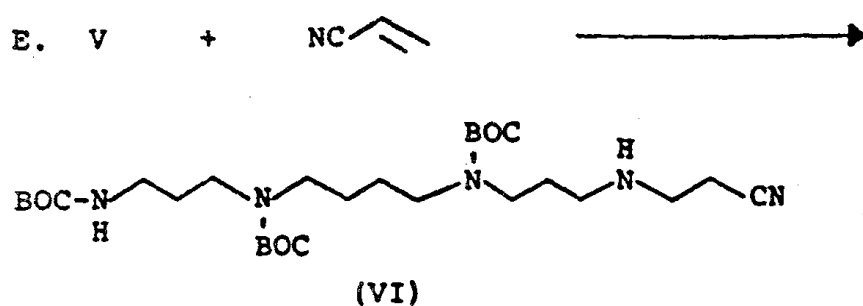
MeOH；最后是加有 75 ml 异丙胺的 400 ml 75:25 CH₂Cl₂/MeOH。采用薄层层析监测级份，经 NMR 确认含有所期产物的级份，收集、减压浓缩，得到 4.7 g 前述式 III 产物。



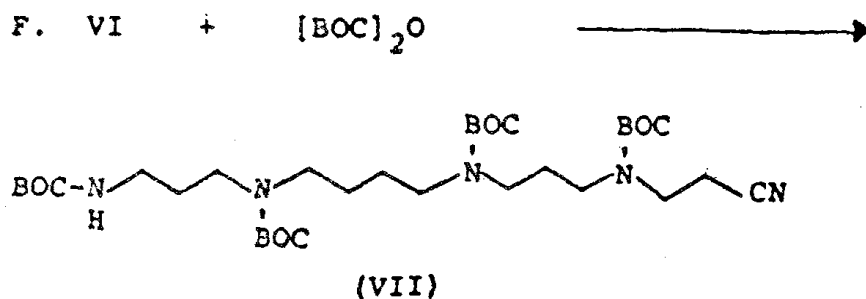
在氮气条件下，将 4.7 g (15.8 mmol) 式 III 化合物 (按前文 B 部分制备) 溶解在 150 ml 二氯甲烷中，然后加入 7.56 g (34.7 mmol) 二叔丁基二碳酸酯，将该反应混合物在室温下搅拌过夜，然后将该反应混合物减压浓缩，在 400 g 硅胶上进行层析，采用 50:50 乙酸乙酯/己烷洗脱，采用 TLC (50:50 乙酸乙酯/己烷) 监测级份，合并含有式 IV 产物的级份，减压浓缩，得到 7.9 g 油状产物。



在氮气条件下，将 7.85g (15.8 mmol) 式 IV 化合物 (按前文 C 部分制备) 及 6.5g Pd(OH)₂/炭 加到 125ml 乙酸中。在 50P.s.i 下将该混合物氢化 2 小时。滤除催化剂，用乙酸充分洗涤滤饼，将滤液浓缩，移至 250ml 二氯甲烷中，用 100ml 1N NaOH 洗涤两次，用 K₂CO₃ 干燥。将该溶液过滤，将滤液减压浓缩，得到 7.8g 式 V 化合物。

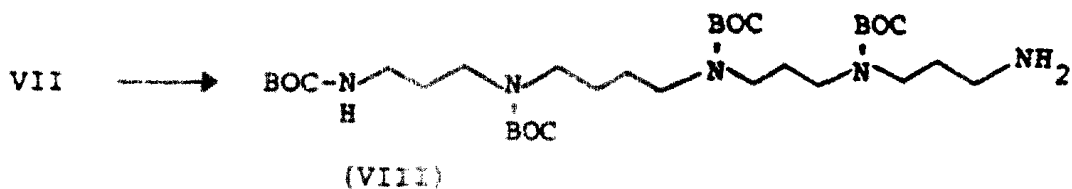


在氮气条件下，将 7.15g (14.2 mmol) 式 V 化合物 (按前述 D 部分制备) 溶于 150ml 甲醇中，然后加入 1.03ml (15.6 mmol) 丙烯腈，将该反应物在室温下搅拌 72 小时，然后减压浓缩，加入二氯甲烷反复浓缩 3 次，汽提除去溶剂后，得到 7.65g 油状式 VI 产物。



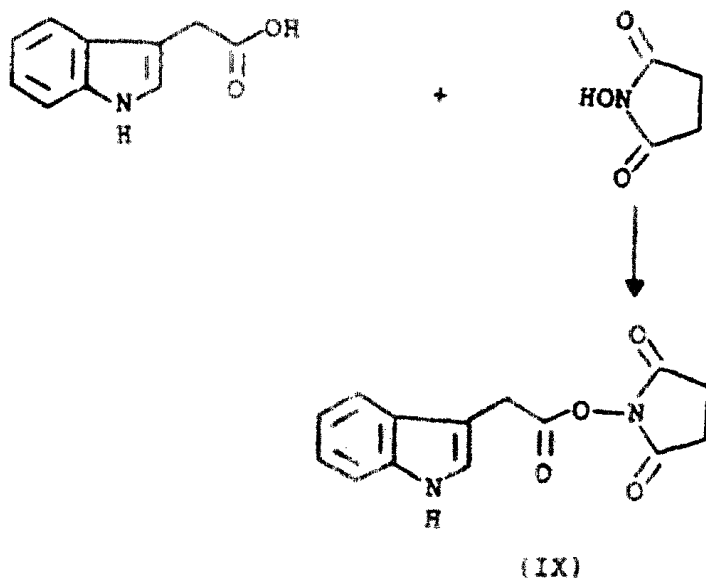
在氮气氛下，将 6.45g (11.6mmoles) 式VI 化合物 (按前述E 部分制备) 溶于 125ml 二氯甲烷中，在该溶液中加入 2.6g (12mmoles) 二叔丁基二碳酸酯，并将该反应物在室温下搅拌过夜。然后将该反应混合物浓缩，在 400g 硅胶上进行层析，采用 50:50 乙酸乙酯/己烷洗脱。将产物级份合并，浓缩，得到 6.6g 油状式 VIII 产物。

G.

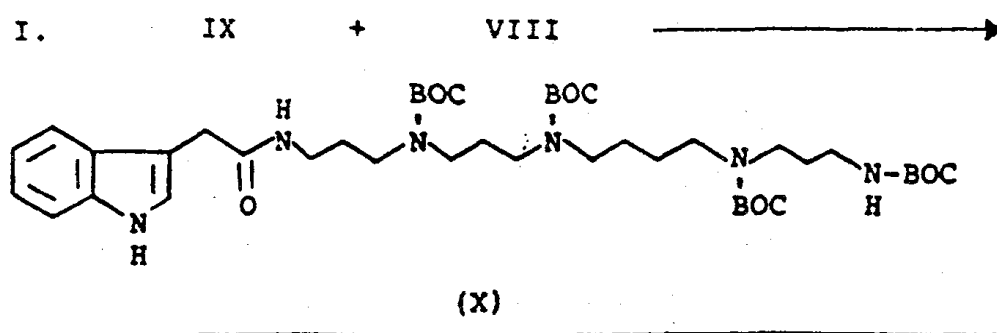


在氮气氛下，将 6.6g (10.1mmoles) 式VII 化合物 (按前述 F 部分制备) 及 6g $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{炭}$ 加到 150ml 乙酸中。在 50 p.s.i 下将该混合物氢化 2 小时，滤除催化剂，用乙酸反复洗涤滤饼，将滤液浓缩，移入 200ml 二氯甲烷中，用 100ml 1 N NaOH 洗涤两次，将滤液减压浓缩，得到 6.5g 式VIII 产物。

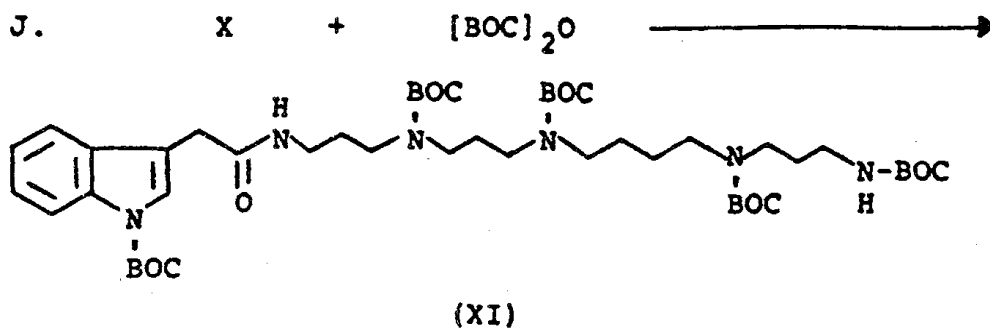
H.



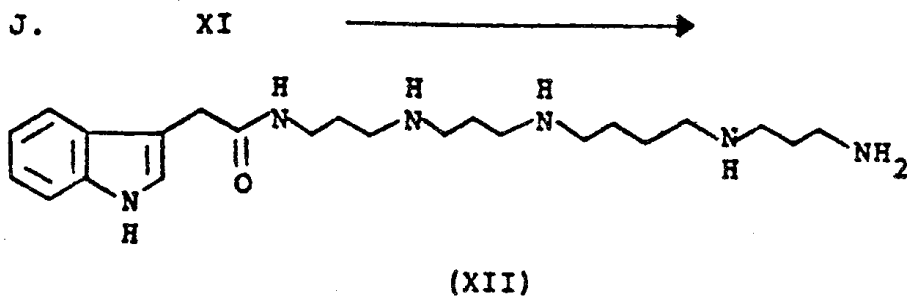
在氮气氛下，将 1.75g (10mmoles) 吲哚乙酸，1.15g (10mmoles) N-羟基琥珀酰亚胺，2.06g (10mmoles) 二环己基碳化二亚胺加到 75ml 四氢呋喃中。在室温下搅拌该反应混合物，大约 5 分钟后出现沉淀。大约 1.5 小时后，滤除沉淀，用 75ml 四氢呋喃洗涤滤饼，将该滤饼空气干燥 (1.84g)。合并滤液，浓缩，移至乙酸乙酯中，过滤，用乙酸乙酯洗涤滤饼。浓缩滤液，得到一泡沫状物，将该泡沫状物在 75ml 乙酸乙酯中研制，得到一硬质凝胶。然后加入约 30ml 乙酸乙酯，继之加入乙醚。过滤分离固体，用乙醚洗涤，在氮气中干燥，得到 1.74g 式 IX 产物。用石油醚处理母液还可得到 0.47g 产物。



在氮气氛下，将 0.33g (5mmoles) 式 VIII 化合物 (按前述 G 部分制备) 在搅拌下溶于 10ml 二氯甲烷中，然后加入 0.136g (5mmoles) 式 IX 化合物 (按前述 H 部分制备)。将该反应物在室温下搅拌过夜。用二氯甲烷将该反应混合物稀释至 35ml，用 10ml 0.5N NaOH 洗涤，用 K_2CO_3 干燥，浓缩。该浓缩物经硅胶层析，用 4 : 1 乙酸乙酯 / 己烷洗脱。将产物级份浓缩，得到 0.37g 含有式 X 产物及少量乙酸乙酯的白色泡沫状物体。

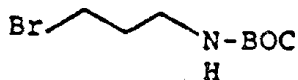


在氮气氛下，将 0.37g (0.45mmoles) 式 X 化合物 (按前述 I 部分制备) 溶于 10ml 二氯甲烷中，然后加入 0.218g (1mmole) 二叔丁基二碳酸酯，继之加入 12ml (0.1mole) 4-(N,N-二甲基氨基)吡啶。将该反应物在室温下反应 1 小时，然后静置过夜。该反应混合物经硅胶层析，用 4 : 1 乙酸乙酯/己烷洗脱，浓缩产物级份，得到 0.32g 白色泡沫状式 XI 产物。



在氮气氛下，将 0.32g (0.35mmoles) 式 XI 化合物 (按前述 J 部分制备) 加到 15ml 三氟乙酸中，搅拌 15 分钟，然后将该反应混合物减压浓缩，用乙醚研制，得到 0.30g 白色粉末状产物。

制备 A.



在氮气氛下，将34.5 g (157.6 mmol) 3-溴丙胺·HBr置于600 ml N,N-二甲基甲酰胺中，搅拌，在该溶液中加入34.4 g (157.6 mmol) 二叔丁基二碳酸酯，然后加入32.3 ml (236 mmol) 三乙胺。立即出现沉淀。将该反应物搅拌过夜，然后用乙酸乙酯将该反应物稀释至1.5升，用500 ml 1N HCl 洗涤1次，用500 ml 水洗涤3次，再用盐水洗涤1次，最后用Na₂SO₄干燥。经浓缩后，将产物在800 g 硅胶上进行层析，用4 : 1 己烷/乙酸乙酯洗脱，采用TLC (KMnO₄/I₂) 监测级份，合并含产物的级份，减压浓缩，用50 ml 二氯甲烷共蒸馏2次，高真空蒸馏纯化，得到25.8 g 本制备的产物。