

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780014218.0

[51] Int. Cl.

C07D 211/46 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 5 月 6 日

[11] 公开号 CN 101426765A

[22] 申请日 2007.4.24

[21] 申请号 200780014218.0

[30] 优先权

[32] 2006.4.25 [33] US [31] 60/794,709

[86] 国际申请 PCT/US2007/010120 2007.4.24

[87] 国际公布 WO2007/127297 英 2007.11.8

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.20

[71] 申请人 施万制药

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 珍妮弗·博尔顿 罗伯特·查奥
米罗斯拉夫·拉普塔 莉萨·威廉斯
理查德·D·威尔逊

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责
任公司
代理人 刘国伟

权利要求书 2 页 说明书 37 页 附图 6 页

[54] 发明名称

二甲基苯基化合物的晶形

[57] 摘要

本发明涉及联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-
-{[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-
羟乙基氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)
乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型,或其溶剂合
物。本发明也涉及含有所述晶形或自所述晶形制备
的医药组合物;可用于制备所述晶形的方法和中间
体;以及使用所述晶形(例如)治疗肺病的方法。

- 1、一种联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(*R*)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型。
- 2、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其具有型 I。
- 3、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其具有型 II。
- 4、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其具有型 III。
- 5、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为粉末 x-射线衍射图在 2 θ 值为约 17.7 $\pm$ 0.3、18.2 $\pm$ 0.3、21.7 $\pm$ 0.3 和 23.2 $\pm$ 0.3 处具有衍射峰。
- 6、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为粉末 x-射线衍射图在 2 θ 值为约 20.7 $\pm$ 0.3、21.6 $\pm$ 0.3、22.5 $\pm$ 0.3 和 23.2 $\pm$ 0.3 处具有衍射峰。
- 7、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为粉末 x-射线衍射图在 2 θ 值为约 15.5 $\pm$ 0.3、18.1 $\pm$ 0.3、19.2 $\pm$ 0.3 和 21.8 $\pm$ 0.3 处具有衍射峰。
- 8、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为粉末 x-射线衍射图中峰的位置实质上与图 1 中所示图的峰位置一致。
- 9、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为粉末 x-射线衍射图中峰的位置实质上与图 2 中所示图的峰位置一致。
- 10、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为粉末 x-射线衍射图中峰的位置实质上与图 3 中所示图的峰位置一致。
- 11、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为差示扫描量热法的图形显示最高吸热热流在约 132 $^{\circ}$ C 至约 138 $^{\circ}$ C 范围内。
- 12、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为差示扫描量热法的图形显示最高吸热热流在约 142 $^{\circ}$ C 至约 150 $^{\circ}$ C 范围内。
- 13、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为差示扫描量热法的图形显示最高吸热热流在约 134 $^{\circ}$ C 至约 140 $^{\circ}$ C 范围内。
- 14、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为差示扫描量热法的图形实质上与图 4 中所示者一致。
- 15、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为差示扫描量热法的图形实质上与图 5 中所示者一致。
- 16、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其中所述结晶游离碱型的特征为差示扫描量热法的图形实质上与图 6 中所示者一致。
- 17、如权利要求 1 所述的结晶游离碱型，其是呈微粉化型。
- 18、一种医药组合物，其包含医药上可接受的载剂和如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型。
- 19、一种医药组合物，其包含：

- (a) 如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型；
- (b) 类固醇消炎药；和
- (c) 医药上可接受的载剂。

20、一种等渗盐水溶液，其是通过使如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型溶于等渗盐水中来制备；其中所述溶液具有在约 4 至约 6 范围内的 pH 值。

21、一种治疗药剂的组合，其包含：

- (a) 如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型；和
- (b) 类固醇消炎药。

22、一种治疗肺病的方法，所述方法包含向需要治疗的患者投与治疗有效量的如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型。

23、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与治疗有效量的如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型。

24、一种在哺乳动物中产生支气管扩张的方法，所述方法包含向哺乳动物投与支气管扩张产生量的如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型。

25、一种在哺乳动物中拮抗毒蕈碱受体并激动 β_2 肾上腺素能受体的方法，所述方法包含向所述哺乳动物投与如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型。

26、一种制备如权利要求 1 所述的结晶游离碱型的方法，所述方法包含：

- (a) 提供联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯存于稀释剂中的溶液；
- (b) 向来自步骤(a)的溶液添加反萃溶剂以产生浊点。

27、一种制备如权利要求 1 所述的结晶游离碱型的方法，所述方法包含：

- (a) 提供联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯存于稀释剂中的溶液；
- (b) 向来自步骤(a)的溶液添加反萃溶剂以产生浊点；并且然后
- (c) 添加联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型的种晶。

28、如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型，其用于治疗。

29、一种如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的结晶游离碱型的用途，其用于制造供治疗肺病的药物。

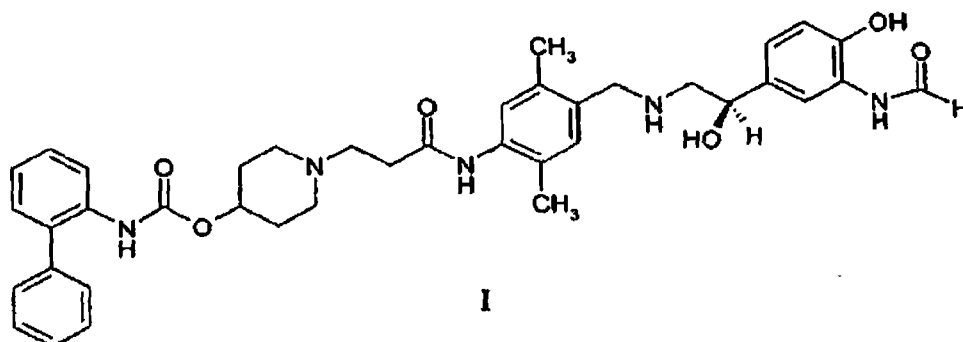
二甲基苯基化合物的晶形

技术领域

本发明涉及二甲基苯基化合物的新颖结晶游离碱型，预期所述化合物可用作治疗肺病的治疗药剂。本发明也涉及含有所述晶形或自所述晶形制备的医药组合物；可用于制备所述晶形的方法和中间体；以及使用所述晶形（例如）治疗肺病的方法。

背景技术

与本案在同一日期提出申请的共同让予的美国专利申请案第_____号（代理档案号 P-221-US1）和在 2006 年 4 月 25 日提出申请的美国临时专利申请案第 60/794,702 号（其揭示内容是全文以引用方式并于本文中）揭示新颖二烷基苯基化合物，其可用作治疗肺病的治疗药剂，例如慢性阻塞性肺病(COPD)和哮喘。具体来说，由于具有毒蕈碱拮抗剂和 β_2 肾上腺素能受体激动剂两种活性，本发明特别揭示化合物联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基]乙基]-哌啶-4-基酯。联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基]乙基]-哌啶-4-基酯的化学结构表示为式 I：



可用于治疗肺病的治疗药剂有利地通过吸入直接投与至呼吸道中。就这点来说，已研发出数种类型的医药吸入装置以供通过吸入投与治疗药剂，包括干粉吸入器(DPI)、定量式吸入器(MDI)和雾化罐吸入器。当制备用于所述装置中的医药组合物和调配物时，高度期望治疗药剂具有非吸湿性非潮解性晶形且其具有相对高熔点（即大于约 130℃），以允许所述物质被微粉化而不显著分解或损失结晶性。

先前未揭示过式 I 化合物的晶形。因此，仍需要式 I 化合物的稳定非潮解性晶形，其具有可接受程度的吸湿性和相对高的熔点。

发明内容

本发明涉及联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物。令人惊讶的是,已发现式 I 化合物的所述结晶游离碱型不具有潮解性,即使暴露于大气湿度下也是如此。此外,所述晶形具有可接受程度的吸湿性和高熔点(例如大于约 130°C)。

在特定方面中,本发明涉及呈微粉化型的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物。

式 I 化合物的结晶游离碱型尤其可用于制备预期可用于治疗肺病的医药组合物。因此,在本发明组合物的另一方面中,本发明涉及医药组合物,其包含医药上可接受的载剂和联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物。

如果需要,本发明晶形可与其它治疗药剂组合投与,例如类固醇消炎药。因此,在本发明组合物的另一方面中,本发明涉及医药组合物,其包含(a)联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物;和(b)第二治疗药剂。在本发明组合物的另一方面中,本发明涉及医药组合物,其包含(a)联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物; (b)第二治疗药剂;和(c)医药上可接受的载剂。

在本发明组合物的另一方面中,本发明涉及治疗药剂的组合,所述组合包含(a)联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物;和(b)第二治疗药剂。在本发明组合物的另一方面中,本发明涉及医药组合物的组合,所述组合包含(a)医药组合物,其包含联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物和医药上可接受的载剂;和(b)医药组合物,其包含第二治疗药剂和医药上可接受的载剂。

式 I 化合物同时具有 β_2 肾上腺素能受体激动剂活性和毒蕈碱受体拮抗剂活性。因此,预期式 I 化合物的结晶游离碱型可用作治疗肺病的治疗药剂,例如哮喘和慢性阻塞性肺病。

因此,在本发明方法的一方面中,本发明涉及治疗肺病的方法,所述方法包含对需要治疗的患者投与治疗有效量的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱

型或其溶剂合物。

本发明也涉及治疗慢性阻塞性肺病或哮喘的方法，所述方法包含对患者投与治疗有效量的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物。

此外，在本发明方法的另一方面中，本发明涉及在哺乳动物中产生支气管扩大的方法，所述方法包含对哺乳动物投与支气管扩大产生量的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物。

本发明也涉及在哺乳动物中拮抗毒蕈碱受体并激动 β_2 肾上腺素能受体的方法，所述方法包含对所述哺乳动物投与联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物。

本发明也涉及制备式 I 化合物游离碱型的方法。因此，在本发明方法的另一方面中，本发明涉及制备联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型的方法，所述方法包含：

(a) 提供存于稀释剂中的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯（化合物 IIa）的溶液；

(b) 将反萃溶剂添加至得自步骤(a)的溶液中以产生浊点。

此方法视情况另外包括以下步骤：

(c) 将联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型的种晶添加至步骤(b)的产物中。在这些方法的具体实施例中，稀释剂为甲醇并且反萃溶剂为水。

此外，本发明涉及用于治疗中的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物。本发明也涉及此一结晶游离碱型的用途，其用于制造治疗肺病的治疗药剂。本文中揭示本发明的其它方面和实施例。

附图说明

参照附图来说明本发明的各方面。

图 1、2 和 3 分别显示联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱的型 I、II 和 III 的粉末 x-射线衍射(PXRD)图。

图 4、5 和 6 分别显示联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-

羟乙基氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱的型 I、II 和 III 的差示扫描量热法(DSC)的图形(trace)。

图 7、8 和 9 分别显示联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱的型 I、II 和 III 的热重分析(TGA)的图形。

图 10、11 和 12 分别显示关于联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱的型 I、II 和 III 的动态湿气吸附(DMS)的图形。

具体实施方式

本发明涉及联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型或其溶剂合物。呈这些盐型的活性治疗药剂(即式 I 化合物)含有一个具有(R)构型的手性中心。但是,熟习此项技术者应理解,除非另外说明,否则本发明组合物中可存在少量(S)立体异构体,条件是此一异构体的存在不会消除组合物作为整体的任何利用性。

可使用市售奥托诺姆(AutoNom)软件(MDL, 圣莱昂纳多, 加利福尼亚)命名式 I 化合物。

定义

当描述本发明化合物、组合物、方法和过程时,除非另外说明,否则下述术语具有下述意义。

本文所用术语“熔点”意指通过差示扫描量热法可观测到最高吸热热流时的温度。

在用于表示粒子时,术语“质量中位直径”或“MMD”意指其中一半质量的粒子为直径大于所述直径的粒子而另一半为直径小于所述直径的粒子时的直径。

除非另外说明,否则术语“微粉化”或“呈微粉化型”意指粒子中至少约 90%粒子的直径小于约 10 μm 。

术语“溶剂合物”意指由一或多种溶质分子(即式 I 化合物的游离碱型)和一或多中溶剂分子形成的复合物或聚集体。所述溶剂合物的溶质和溶剂的莫耳比通常基本不变。此术语也包括晶笼化合物,包括具有水的晶笼化合物。代表性溶剂包括(例如)水、甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸等。当溶剂为水时,所形成溶剂合物为水合物。

术语“治疗有效量”意指在投与需要治疗的患者时足以达成治疗的量。

本文所用术语“治疗”意指在患者(例如哺乳动物(特别是人类))中治疗疾病或医疗病况(例如 COPD),其包括:

- (a) 预防疾病或医疗病况发生,即患者的预防性治疗;
- (b) 改善疾病或医疗病况,即在患者中消除疾病或医疗病况或使其消退;
- (c) 抑制疾病或医疗病况,即在患者中减慢或遏制疾病或医疗病况的发展;或

(d) 在患者中减轻疾病或医疗病况的症状。

术语“单位剂型”意指适合患者服药的物理离散单位，即各单位含有经计算可单独或与一或多个其它单位组合产生期望治疗效果的预定量的本发明盐。例如，所述单位剂型可为干粉吸入器胶囊，来自定量式吸入器的经计量剂量、胶囊、片剂、丸剂等。

本文所用所有其它术语都意欲具有熟习其所属领域技术者所知的其一般意义。

本发明的代表性结晶游离碱型

已发现联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(*R*)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯是以至少三种不同结晶游离碱型存在。出于本发明目的，这些形式在本文中表示为型 I、型 II 和型 III。式 I 化合物的这些晶形可通过至少下列性质来区分：

型 I：差示扫描量热法(DSC)的图形在约 132℃ 至约 138℃ 范围内显示吸热热流峰值；并且粉末 x-射线衍射(PXRD)图尤其在 2θ 值为约 17.7±0.3、18.2±0.3、21.7±0.3 和 23.2±0.3 处具有显著衍射峰。

型 II：差示扫描量热法(DSC)的图形在吸热流中于约 142℃ 至约 150℃ 处显示峰值；并且粉末 x-射线衍射(PXRD)图尤其在 2θ 值为约 20.7±0.3、21.6±0.3、22.5±0.3 和 23.2±0.3 处具有显著衍射峰。

型 III：差示扫描量热法(DSC)的图形在约 134℃ 至约 140℃ 范围内显示吸热热流峰值；并且粉末 x-射线衍射(PXRD)图尤其在 2θ 值为约 15.5±0.3、18.1±0.3、19.2±0.3 和 21.8±0.3 处具有显著衍射峰。

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(*R*)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的结晶游离碱型是通过联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(*R*)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯或其溶剂合物的结晶来制备。

在一种制备方法中，式 I 化合物的结晶游离碱型是通过下述方式来制备：在溶剂中形成所述化合物的浆液并将所形成的浆液搅拌足够时间以形成结晶物质。通常，在环境温度（即约 20℃ 至约 30℃）下将所述浆液搅拌约 24 至约 72 小时。一般来说，浆液可包含约 35 mg 至约 45 mg（即约 40 mg）化合物/毫升溶剂。在某些情况下，溶剂的选择将决定自浆液产生何种结晶游离碱型。例如，当溶剂为乙腈时，所产生主要形式是型 I。或者，当溶剂为异丙醇时，所产生主要形式是型 II。此外，当溶剂为乙醇时，所产生主要形式是型 III。除溶剂外，其它因素也可影响产生何种固体型。

在另一种制备方法中，使联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(*R*)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]-哌啶-4-基酯溶于稀释剂中，例如甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、乙腈等，并添加反萃溶剂（反溶剂）（例如水等）来使结晶游离碱形成。一般来说，结晶程序可在环境温度下实施，或通过将混合物加热然后使其冷却至环境温度来实施。在此方法的具体实施例，稀释剂为甲醇并且反萃溶剂为水。

本发明中所采用联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯可使用下文实例中所述的程序自市售起始物质和试剂容易地制备；或通过使用本申请案背景部分中所述共同让予的美国专利申请案中所述程序来制备。

制备本发明结晶游离碱型的方法可视情况包括使用种晶主要产生一种特定游离碱型。例如，通过使用型 II 的种晶可制备式 I 化合物的结晶游离碱型，其具有与种晶基本相同的形式（即型 II）。在最初形成结晶游离碱型时可使用这些种晶，或可使用其使结晶或部分结晶游离碱型再结晶。

通常，种晶是通过在不搅拌并且不冷却的情况下缓慢结晶来制备。例如，为获得种晶，通常在足以提供溶解的温度下使式 I 化合物溶于稀释剂中。例如，在约 75°C 至约 80°C 下使式 I 化合物溶于乙腈与水的 1:2 混合物中，然后经约 12 小时至 24 小时使其冷却至环境温度以提供结晶游离碱型。在另一实施例中，使用含有约 40 体积%至约 80 体积%水的甲醇作为稀释剂。通过过滤或其它习用方式来分离所形成的晶体。或者，种晶可自结晶物质的先前制剂中获得。

在使用种晶的再结晶方法的具体实施例中，在环境温度下使式 I 化合物的游离碱型溶于甲醇中（通常约 120 mL 至约 160 mL（包括 140 mL）甲醇/克化合物），并添加水直到到达浊点。然后添加种晶（通常约 1 至约 5 mg 种晶/克化合物）。在环境温度下搅拌所形成的混合物，在此期间式 I 化合物结晶。使用习用程序（例如过滤）来分离所形成的晶体。应了解，用于结晶或再结晶程序的具体温度是根据稀释剂的特性和结晶盐在稀释剂中的浓度来选择。此外，可使用蒸发或反萃溶剂代替冷却来实施再结晶程序以促进结晶。

在本发明的一方面中，本发明的结晶游离碱型是通过其物理和/或光谱特征来界定。因此，在一实施例中，本发明涉及式 I 化合物的结晶游离碱型，其特征为粉末 x-射线衍射(PXRD)图在 2θ 值为约 17.7 ± 0.3 、 18.2 ± 0.3 、 21.7 ± 0.3 和 23.2 ± 0.3 处具有显著衍射峰。在此实施例的特定方面中，本发明涉及结晶游离碱型，其特征为粉末 x-射线衍射图中峰的位置实质上与图 1 中所示者一致。

在另一实施例中，本发明涉及式 I 化合物的结晶游离碱型，其特征为粉末 x-射线衍射(PXRD)图在 2θ 值为约 20.7 ± 0.3 、 21.6 ± 0.3 、 22.5 ± 0.3 和 23.2 ± 0.3 处具有显著衍射峰。在此实施例的特定方面中，本发明涉及结晶游离碱型，其特征为粉末 x-射线衍射图中峰的位置实质上与图 2 中所示者一致。

在另一实施例中，本发明涉及式 I 化合物的结晶游离碱型，其特征为粉末 x-射线衍射(PXRD)图在 2θ 值为约 15.5 ± 0.3 、 18.1 ± 0.3 、 19.2 ± 0.3 和 21.8 ± 0.3 处具有显著衍射峰。在此实施例的特定方面中，本发明涉及结晶游离碱型，其特征为粉末 x-射线衍射图中峰的位置实质上与图 3 中所示者一致。

在另一实施例中，本发明涉及式 I 化合物的结晶游离碱型，其 DSC 的图形实质上与图 4 中所示的图形一致。在其它实施例中，本发明涉及式 I 化合物的结晶游离碱型，

其 DSC 的图形实质上与图 5 中所示的图形一致。在另一实施例中,本发明涉及式 I 化合物的结晶游离碱型,其 DSC 的图形实质上与图 6 中所示的图形一致。

已证实型 II 的结晶游离碱具有可逆吸附/解吸附特性,其在 40%相对湿度至 75% 相对湿度的湿度范围中具有低于约 0.5% 的重量增加。

在下文实例中进一步说明本发明结晶游离碱型的这些性质。

医药组合物、组合和调配物

本发明化合物通常是以医药组合物或调配物的形式投与患者。这些医药组合物可通过任何可接受投与途径投与患者,包括(但不限于)吸入、经口、经鼻、局部(包括经皮)和不经肠投与模式。

因此,在本发明组合物的一方面中,本发明涉及医药组合物,其包含医药上可接受的载剂或赋形剂和式 I 化合物的结晶游离碱型。如果需要,这些医药组合物可视情况含有其它治疗性和/或调配性药剂。

本发明医药组合物通常含有治疗有效量的式 I 化合物的结晶游离碱型。但是,熟习此项技术者应明了,医药组合物可含有大于治疗有效量(即总体组合物)或低于治疗有效量(即经设计用于多次投与以达成治疗有效量的个别单位剂量)。

通常,医药组合物可含有约 0.01 重量%至约 95 重量%的治疗药剂;包括约 0.01 重量%至约 30 重量%;例如约 0.01 重量%至约 10 重量%的治疗药剂。

任何习用载剂或赋形剂都可使用于本发明医药组合物中。特定载剂或赋形剂、或载剂或赋形剂的组合的选择可取决于治疗特定患者投与模式或医疗病况或疾病状态的类型。就这一点来说,熟习医药领域技术者精用于特定投与模式的适当医药组合物的制备。

在本发明医药组合物中使用市售载剂或赋形剂。例如,这些物质可购自西格玛(Sigma)(圣路易斯(St. Louis), MO)。例如,习用调配技术为熟习此项技术者所习知,其例示于雷鸣登(*Remington: 药物科学与实践(The Science and Practice of Pharmacy)*, 第 20 版,利平科特威廉姆斯与怀特公司(Lippincott Williams & White),巴尔的摩(Baltimore),马里兰(Maryland) (2000);和 H.C. 安塞尔(H.C. Ansel)等人,医药剂型与药物递送系统(*Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*),第 7 版,利平科特威廉姆斯与怀特公司,巴尔的摩,马里兰(1999)的教示中。

可用作医药上可接受载剂的物质的代表性实例包括(但不限于)以下物质:(1)糖类,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、乙基纤维素和纤维素乙酸酯;(4)粉末状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;(9)油类,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)二醇类,例如丙二醇;(11)多元醇类,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲液,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏(Ringer's)溶液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;(21)

压缩推进剂气体，例如氯氟烃类和氢氟烃类；以及(22)医药组合物中所用其它无毒性可相容物质。

本发明医药组合物通常是通过将本发明结晶游离碱型与医药上可接受的载剂和任何可选成份充分和密切混合或掺合来制备。如果需要或期望，之后可使用习用程序和设备将所得均匀掺合混合物制成片剂、胶囊、丸剂等或装填至药罐、药筒、分配器等之中。

在一实施例中，本发明医药组合物适用于吸入投与。适用于吸入投与的医药组合物通常可呈气溶胶或粉末形式。这些组合物一般是使用习知递送装置来投与，例如雾化罐吸入器、定量式吸入器(MDI)、干粉吸入器(DPI)或类似递送装置。

在本发明具体实施例中，包含治疗药剂的医药组合物是使用雾化罐吸入器通过吸入来投与。这些雾化罐装置通常产生高速度空气流，其使包含治疗药剂的医药组合物以雾气形式被喷雾输送至患者的呼吸道中。因此，当经调配用于雾化罐吸入器时，通常使治疗药剂溶于适当载剂中以形成溶液。或者，治疗药剂可被微粉化并与适当载剂合并形成微粉化粒子的悬浮液。适用于吸入投与治疗药剂的雾化罐装置是熟习此项技术者熟知的，或这些装置是市售装置。例如，代表性雾化罐装置或产品包括肺部输药微雾吸入器(Respimat Softmist Inhalaler) (勃林格殷格翰(Boehringer Ingelheim))；AERx肺递送系统(阿拉迪金(Aradigm)公司)；PARI LC Plus 可重复使用雾化罐(Pari GmbH)等。

用于雾化罐吸入器的代表性医药组合物包含等渗水溶液，其包含约 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 至约 10 mg/mL 的式 I 化合物。所述组合物通常是通过使式 I 化合物的结晶游离碱型溶于等渗盐水中来制备。在一实施例中，此一溶液具有约 4 至约 6 的 pH 值。

在本发明的另一具体实施例中，使用干粉吸入器通过吸入来投与包含治疗药剂的医药组合物。这些干粉吸入器通常以自由流动性粉末形式投与治疗药剂，所述自由流动粉末在吸气期间分散于患者的气流中。为达成自由流动性粉末，通常将治疗药剂与适当赋形剂一起调配，所述赋形剂例如乳糖、淀粉、甘露醇、右旋糖、聚乳酸(PLA)、聚交酯-共-乙交酯(PLGA)或其组合。通常，治疗药剂经微粉化并与适当载剂合并以形成适用于吸入的掺合物。

用于干粉吸入器的代表性医药组合物包含干磨乳糖和式 I 化合物的结晶游离碱型的微粉化粒子。

此干粉调配物可(例如)通过将乳糖与治疗药剂合并然后干掺合所述组份来制造。或者，如果需要，可在不使用赋形剂的情况下调配治疗药剂。然后，通常将医药组合物装填至干粉分配器中，或装填至吸入药筒或胶囊中以便与干粉递送装置一起使用。

适用于吸入投与治疗药剂的干粉吸入器递送装置是熟习此项技术者熟知的或这些装置是市售装置。例如，代表性干粉吸入器递送装置或产品包括伊欧雷斯(Aeolizer) (诺华(Novartis))；埃尔麦克斯(Airmax) (IVAX)；单击式吸入器(ClickHaler) (伊诺威

达生物医药公司(Innovata Biomed))；碟式吸入器(Diskhaler)(葛兰素史克(GlaxoSmithKline))；迪斯科斯/阿库吸入器(Diskus/Accuhaler)(葛兰素史克)；易吸干粉定量吸入器(Easyhaler)(芬恩制药公司(Orion Pharma))；伊克利普斯(Eclipse)(安万特(Aventis))；福鲁开普(FlowCaps)(好利安(Hovione))；便利型吸入器(Handihaler)(勃林格殷格翰)；帕维诺(Pulvinal)(凯西(Chiesi))；旋转吸入器(Rotahaler)(葛兰素史克)；斯基吸入器/斯而特吸入器(SkyeHaler/Certihaler)(斯基制药(SkyePharma))；旋蝶形吸入器(Twisthaler)(先灵葆雅(Schering-Plough))；涡轮吸入器(Turbuhaler)(阿斯利康(AstraZeneca))；储库型吸入器(Ultrahaler)(安万特)等。

在本发明另一具体实施例中，包含治疗药剂的医药组合物是使用定量式吸入器通过吸入来投与。这些定量式吸入器通常使用压缩推进剂气体来排放经测量数量的治疗药剂。因此，使用定量式吸入器投与的医药组合物通常包含存于液化推进剂中的治疗药剂溶液或悬浮液。可采用任何适当液化推进剂，包括氯氟烃类(例如 CCl_3F)和氢氟烷类(HFA)(例如 1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134a)和 1,1,1,2,3,3,3-七氟-正-丙烷(HFA 227))。由于顾虑氯氟烃类会影响臭氧层，因此一般含有 HFA 的调配物是优选的。HFA 调配物的其它可选组份包括共溶剂(例如乙醇或戊烷)和表面活性剂(例如山梨醇三油酸酯、油酸、卵磷脂和甘油)。

用于定量式吸入器的代表性医药组合物包含约 0.01 重量%至约 5 重量%的式 I 化合物的结晶游离碱型；约 0 重量%至约 20 重量%的乙醇；和约 0 重量%至约 5 重量%的表面活性剂；其余部分为 HFA 推进剂。

这些组合物通常是通过将经冷冻或加压的氢氟烷添加至含有治疗药剂、乙醇(如果存在)和表面活性剂(如果存在)的适当容器中来制备。为制备悬浮液，将治疗药剂微粉化然后将其与推进剂合并。然后，将调配物装填至气溶胶罐中，所述罐形成定量式吸入器装置的一部分。

适用于吸入投与治疗药剂的定量式吸入器装置是熟习此项技术者熟知的，或这些装置是市售装置。例如，代表性定量式吸入器装置或产品包括氟尼松气雾(AeroBid)吸入器系统(森林制药公司(ForestPharmaceuticals))；爱全乐(Atrovent)吸入气溶胶(勃林格殷格翰)；弗洛温特(Flovent)(葛兰素史克)；吡布特罗(Maxair)吸入器(3M)；舒喘灵(Proventil)吸入器(先灵)；施立稳(Serevent)吸入气溶胶(葛兰素史克)等。

在另一实施例中，本发明医药组合物适用于口服投与。口服投与的适当医药组合物可呈胶囊、片剂、丸剂、锭剂、扁囊剂、糖衣锭、粉末、颗粒形式；或作为存于水性或非水性液体中的溶液或悬浮液；或作为水包油或油包水液体乳液；或作为酞剂或糖浆；及其类似物；其各自含有预定量的本发明结晶游离碱型作为活性成份。

当欲以固体剂型(即作为胶囊、片剂、丸剂等)口服投与时，本发明医药组合物通常可包含作为活性成份的本发明结晶游离碱型和一或多种医药上可接受的载剂，例如柠檬酸钠或磷酸二钙。视情况或替代地，这些固体剂型也可包含：(1)填充剂或增量剂，例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸；(2)粘合剂，例如羧甲基纤维

素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、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)溶液阻滞剂，例如石蜡；(6)吸收促进剂，例如季铵化合物；(7)润湿剂，例如鲸蜡醇和/或单硬脂酸甘油酯；(8)吸收剂，例如高岭土(kaolin)和/或膨润土(bentonite clay)；(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；以及(11)缓冲液。

离型剂、润湿剂、涂布剂，增甜、矫味和芳香剂，防腐剂和抗氧化剂也可存在于本发明医药组合物中。医药上可接受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、偏亚硫酸钠、亚硫酸钠等；(2)油溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等；以及(3)金属螯合剂，例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。用于片剂、胶囊、丸剂等涂布剂包括用于肠溶包衣者，例如纤维素乙酸酐酸酯(CAP)、聚酞酸乙酸乙烯酯(PVAP)、羟丙基甲基纤维素酞酸酯、甲基丙烯酸/甲基丙烯酸酯共聚物、乙酸均苯三甲酸纤维素(CAT)、羧甲基乙基纤维素(CMEC)、羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯(HPMCAS)等。

如果需要，也可以不同比例使用(例如)羟丙基甲基纤维素、或其它聚合体基质、脂质体和/或微球体来调配本发明医药组合物以提供活性成份的缓慢或受控释放。

此外，本发明医药组合物可视情况含有遮光剂并且可经调配以使其只在或优先在胃肠道的某一部分中(视情况)以延迟方式释放活性成份。可用包埋组合物的实例包括聚物质和蜡。如果适当，活性成份也可和一或多种上述赋形剂一起呈微囊封形式。

用于口服投与的适当液体剂型包括(例如)医药上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。这些液体剂型通常包含活性成份和惰性稀释剂，例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂，例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜基酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类(尤其棉籽油、花生油、玉米油、胚油、橄榄油、蓖麻油及芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和山梨醇的脂肪酸酯、及其混合物。除了活性成份以外，悬浮液可含有悬浮剂，例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨醇酯、微晶性纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶、及其混合物。当然，在以呈液体剂型的溶液形式投与时，结晶游离碱型不再呈晶型，而是溶于液体载剂中。

当欲用于口服投与时，可以单位剂型包装本发明医药组合物。术语“单位剂型”意指适合患者服药的物理离散单位，即各单位含有经计算可单独或和一或多个其它单位组合产生期望治疗效果的预定量活性药剂。例如，这些单位剂型可为胶囊、片剂、丸剂等。

也可使用已知经皮递送系统和赋形剂以经皮方式投与本发明结晶游离碱型。例如，可将本发明结晶游离碱型与渗透增强剂(例如丙二醇、聚乙二醇单月桂酸酯、氮杂环烷-2-酮等)互混并将其纳入贴剂或类似递送系统中。如果需要可将其它赋形剂(包

括胶凝剂、乳化剂和缓冲液)用于这些经皮组合物中。

此外,本发明结晶游离碱型可以不经肠方式投与,即以静脉内方式、皮下方式或肌内方式投与。对于不经肠投与,通常使式 I 化合物的结晶游离碱型溶于不经肠投与可接受的载剂中,例如无菌水、盐水、植物油等。例如,静脉内组合物通常包含自式 I 化合物的结晶游离碱型制备的无菌水溶液,其中所述溶液的 pH 值在约 4 至约 7 范围内。

如果需要,本发明结晶游离碱型可与一或多种其它治疗药剂组合投与。在此实施例中,以物理方式将本发明结晶游离碱型与另一治疗药剂混合来形成含有两种药剂的组合物;或各药剂存在于分开的不同组合物中,并将其同时或相继投与患者。

例如,可使用习用程序和设备将式 I 化合物的结晶游离碱型与第二治疗药剂组合以形成包含式 I 化合物的结晶游离碱型和第二治疗药剂的组合物。此外,可将治疗药剂和医药上可接受的载剂组合以形成包含式 I 化合物的结晶游离碱型、第二治疗药剂和医药上可接受载剂的医药组合物。在此实施例中,通常将组合物的组份混合或掺合以产生物理混合物。然后,使用本文所述任何途径以治疗有效量投与所述物理混合物。

或者,在投与患者前,可使治疗药剂保持分开和不同。在此实施例中,在投与前并未以物理方式将治疗药剂混合在一起,而是将其作为分开的组合物同时或相继投与。例如,可使用吸入递送装置以吸入方式同时或相继投与式 I 化合物的结晶游离碱型和另一治疗药剂,所述装置对各治疗药剂采用分开的隔室(例如泡壳包装)。或者,可使用分开递送装置投与组合,即每种治疗药剂都各自使用一种递送装置。此外,可通过不同投与途径递送治疗药剂,即一种通过吸入投与而另一种通过口服投与。

可与本发明结晶游离碱型相容的任何治疗药剂都可以这些形式组合使用。在特定实施例中,第二治疗药剂是可通过吸入有效投与者。例如,可与本发明化合物一起使用的治疗药剂的代表性类型包括(但不限于)消炎药,例如类固醇消炎药(包括皮质类固醇和糖皮质激素)、非类固醇消炎药(NSAID)和 PDE₄ 抑制剂;支气管扩张药,例如 PDE₃ 抑制剂、腺苷 2b 调制剂和 β_2 肾上腺素能受体激动剂;抗感染药,例如革兰氏(Gram)阳性抗生素、革兰氏阴性抗生素和抗病毒药;抗组胺药;蛋白酶抑制剂;传入阻断剂,例如 D₂ 激动剂和神经肽调节剂;和毒蕈碱受体拮抗剂(抗胆碱能剂)。这些治疗药剂的许多实例是业内熟知的。与本发明化合物组合投与的其它治疗药剂的适当剂量通常在约 0.05 μ g/天至约 500 mg/天的范围内。

在本发明的特定实施例中,式 I 化合物的结晶游离碱型是与类固醇消炎药组合投与。可和本发明结晶游离碱型组合使用的类固醇消炎药的代表性实例包括(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 -硫代甲酸 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 -硫代甲酸 S-氟甲酯; 6 α ,9 α -二氟-11 β -羟基-16 α -甲基-3-氧-17 α -丙酰氧基雄甾-1,4-二烯-17 β -硫代甲酸(S)-(2-氧代四氢呋喃-3S-基)酯; 氟尼缩松(flunisolide); 丙酸氟替卡松(fluticasone propionate); 甲基泼尼松龙(methyl prednisolone); 糠酸莫米松(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, 或其医药上可接受的盐。这些类固醇消炎药是市售的或可使用习用程序和试剂来制备。例如, 类固醇消炎药的制备和用途描述于 2004 年 6 月 15 日颁布的美国专利第 6,750,210 B2 号; 2004 年 7 月 6 日颁布的美国专利第 6,759,398 B2 号; 2003 年 3 月 25 日颁布的美国专利第 6,537,983 号; 2002 年 2 月 14 日公开的美国专利申请公开案第 2002/0019378 A1 号; 及其中所引用参考资料。

在使用时, 类固醇消炎药通常是以在与本发明结晶游离碱型共投与时可产生治疗上有利效应的量来投与。通常, 类固醇消炎药可以足以提供每剂量约 0.05 μ g 至约 500 μ g 的量来投与。

下述实例阐释本发明代表性医药组合物:

实例 A

干粉组合物

使经微粉化的式 I 化合物的结晶游离碱型(100 mg)与经研磨乳糖(25 g) (例如其中约 85%以下粒子的 MMD 为约 60 μ m 至约 90 μ m 并且 15%以上粒子的 MMD 低于 15 μ m 的乳糖) 掺合。然后, 将此掺合混合物装填至可剥离泡壳包装的单独泡壳中, 其量足以提供每剂量约 10 μ g 至约 500 μ g 的式 I 化合物。使用干粉吸入器投与泡壳内含物。

实例 B

干粉组合物

使微粉化式 I 化合物的结晶游离碱型(1 g)与经研磨乳糖(200 g)掺合以形成结晶游离碱型与经研磨乳糖的重量比为 1:200 的总体组合物。将掺合组合物包装至干粉吸入装置中, 其每剂量能够递送约 10 μ g 至约 500 μ g 式 I 化合物。

实例 C

干粉组合物

使微粉化式 I 化合物的结晶游离碱型(100 mg)和微粉化类固醇消炎药(500 mg)与经研磨乳糖(30 g)掺合。然后, 将此掺合混合物装填至可剥离泡壳包装的单独泡壳中, 其量足以提供每剂量约 10 μ g 至约 500 μ g 的式 I 化合物。使用干粉吸入器投与泡壳内含物。

实例 D

定量式吸入器组合物

使经微粉化式 I 化合物的结晶游离碱型(10 g)分散于通过使卵磷脂(0.2 g)溶解在脱矿质水(200 mL)中所制成的溶液内。将所形成的悬浮液喷雾干燥然后微粉化以形成包

含平均直径小于约 1.5 μm 的粒子的经微粉化组合物。然后将经微粉化组合物装填至含有加压 1,1,1,2-四氟乙烷的定量式吸入器药筒中,当通过定量式吸入器投与时装填量足以提供每剂量约 10 μg 至约 500 μg 的式 I 化合物。

实例 E

雾化罐组合物

使式 I 化合物的结晶游离碱型(25 mg)溶于柠檬酸盐缓冲(pH 5)等渗盐水(125 mL)中。将混合物搅拌并实施超声处理直至化合物溶解。检查溶液的 pH 值并且如果需要就通过慢慢添加 1 N 氢氧化钠水溶液调整至 pH 5。使用雾化罐装置投与溶液,其可提供每剂量约 10 μg 至约 500 μg 的式 I 化合物。

实例 F

硬明胶胶囊

将式 I 化合物的结晶游离碱型(50 g)、经喷雾干燥乳糖(440 g)和硬脂酸镁(10 g)充分地掺合。将所形成组合物装填至以口服方式投与的硬明胶胶囊(每胶囊 500 mg 组合物)中。

实例 G

口服悬浮液将下列成份充分混合以形成口服投与用的悬浮液:

成份	数量
式 I 化合物的结晶游离碱型	1.0 g
反丁烯二酸	0.5 g
氯化钠	2.0 g
对羟基苯甲酸甲酯	0.15 g
对羟基苯甲酸丙酯	0.05 g
砂糖	25.5 g
山梨醇(70%溶液)	12.85 g
VEEGUM® K(硅酸镁铝)	1.0 g
矫味剂	0.035 mL
着色剂	0.5 mg
蒸馏水	补足至 100 mL

所形成悬浮液含有 100 mg 活性成份/10 mL 悬浮液。悬浮液是以口服方式投与。

实例 H

可注射组合物

将式 I 化合物的结晶游离碱型(0.2 g)与 0.4 M 乙酸钠缓冲溶液(2.0 mL)掺合。根据需要使用 0.5 N 盐酸水溶液或 0.5 N 氢氧化钠水溶液将所形成溶液的 pH 值调整至 pH 4,然后添加足够注射用水以提供 20 mL 的总体积。然后将混合物经过无菌滤器(0.22 微米)过滤以提供适合通过注射投与的无菌溶液。

效用

式 I 化合物同时具有 β_2 肾上腺素能受体激动剂和毒蕈碱受体拮抗剂活性, 因此预期式 I 化合物的结晶游离碱型可用作治疗药剂来治疗由 β_2 肾上腺素能受体或毒蕈碱受体所介导的医疗病况, 即通过以 β_2 肾上腺素能受体激动剂或毒蕈碱受体拮抗剂治疗可改善的医疗病况。这些医疗病况是熟习此项技术者熟知的, 其例示于如埃格林(Eglen)等人, 毒蕈碱受体亚型: 医药学与治疗功效(*Muscarinic Receptor Subtypes: Pharmacology and Therapeutic Potential*), *DN&P* 10(8), 462-469 (1997); 艾美林(Emilien)等人, β -肾上腺素能受体激动剂和拮抗剂的当前治疗应用与功效(*Current Therapeutic Uses and Potential of beta-Adrenoceptor Agonists and Antagonists*), *欧洲临床医药杂志(European J. Clinical Pharm.)*, 53(6), 389-404 (1998); 和其中所引用参考文献的教示中。这些医疗病况包括(例如)肺病或与可逆气道阻塞相关的疾病, 例如慢性阻塞性肺病(例如慢性和喘息性支气管炎和气肿)、哮喘、肺纤维化等。其它病况包括早产、抑郁、充血性心力衰竭、皮肤病(例如炎症性、过敏性、干癣性和增生性皮肤病), 其中期望降低胃液素酸度的病况(例如消化性溃疡和胃溃疡), 以及肌肉萎缩疾病。

因此, 在一实施例, 本发明涉及治疗肺病的方法, 所述方法包含对需要治疗的患者投与治疗有效量的式 I 化合物的结晶游离碱型。当用于治疗肺病时, 本发明结晶游离碱型通常是通过吸入以每天多次剂量、每天单次剂量或每周单次剂量投与。一般来说, 治疗肺病的剂量是在约 10 μg /天至约 500 μg /天范围内。

在本发明方法的一方面中, 本发明涉及治疗慢性阻塞性肺病或哮喘的方法, 所述方法包含对患者投与治疗有效量的式 I 化合物的结晶游离碱型。一般来说, 治疗 COPD 或哮喘的剂量是在约 10 μg /天至约 500 μg /天范围内。熟习此项技术者可理解术语“COPD”包括多种呼吸病况, 包括慢性阻塞性支气管炎和气肿, 其例示于伯纳斯(Barnes), *慢性阻塞性肺病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease)*, *新英格兰医学期刊(N. Engl. J. Med.)*, 2000: 343: 269-78, 及其中所引用参考文献的教示中。

当通过吸入投与时, 本发明化合物通常具有产生支气管扩张的效应。因此, 在本发明方法的另一方面中, 本发明涉及在哺乳动物中产生支气管扩张的方法, 所述方法包含对哺乳动物投与支气管扩张产生量的式 I 化合物的结晶游离碱型。一般来说, 产生支气管扩张的剂量是在约 10 μg /天至约 500 μg /天范围内。

当用作治疗药剂时, 本发明结晶游离碱型视情况与其它治疗药剂组合投与。具体来说, 通过将本发明结晶游离碱型与类固醇消炎药组合投与, 仅使用两种治疗药剂即可达成三联疗法(即 β_2 肾上腺素能受体激动剂活性、毒蕈碱受体拮抗剂活性和消炎活性)。由于含有两种治疗药剂的医药组合物(和组合)通常比含有三种治疗药剂的组合物更易于调配和/或投与, 因此这些二组份组合物与含有三种治疗药剂的组合物相比具有显著优势。因此, 在特定实施例, 本发明医药组合物、组合和方法另外包含类固醇消炎药。

可使用熟习此项技术者所习知的各种活体外和活体内分析来证实式 I 化合物的结

晶游离碱型的性质和效用。例如，代表性分析更详细地描述于下述实例中。

实例

提供下述制备和实例来说明本发明具体实施例和方面。但是，除非明确地指出，否则具体实施例和方面的说明并不意欲以任何方式限制本发明范围。

除非另外说明，否则下述实例中使用的所有试剂、起始物质和溶剂都是购自市场供应商（例如奥德里奇(Aldrich)、弗路卡(Fluka)、西格玛等）并且都是未经进一步纯化就使用。

在下述实例中，HPLC 分析通常是使用由安捷伦(Agilent)提供、具有 Zorbax Bonus 型 RP 2.1 x 50 毫米管柱（C14 管柱）并且粒径为 3.5 微米的安捷伦（帕洛阿尔托(Palo Alto), CA) 系列 1100 仪器来进行。通过 214 nm 下的 UV 吸光率来实施检测。流动相“A”为 2%乙腈、97.9%水和 0.1%三氟乙酸(v/v/v)；并且流动相“B”为 89.9%乙腈、10%水和 0.1%三氟乙酸(v/v/v)。HPLC (10-70)数据是用 10%至 70%流动相 B 梯度以 0.5 mL/分钟的流速经 6 分钟获得；HPLC (5-35)数据是用 5%至 35%流动相 B 梯度以 0.5 mL/分钟的流速经 5 分钟获得；且 HPLC (10-90)数据是用 10%至 90%流动相 B 梯度以 0.5 mL/分钟的流速经 5 分钟获得。

液相色谱质谱(LCMS)数据通常是以应用生物系统（福斯特市(Foster City), CA) 型 API-150EX 仪器来获得。LCMS 10-90 数据是以 10%至 90%流动相 B 梯度经 5 分钟获得。

小规模纯化通常是使用得自应用生物系统(Applied Biosystems)的 API 150EX 制备工作站系统来进行。流动相“A”为含有 0.05%三氟乙酸(v/v)的水；并且流动相“B”为含有 0.05%三氟乙酸(v/v)的乙腈。对于小型试样（约 3 至 50 mg 的回收样品尺寸）通常使用以下条件：20 mL/min 流速；15 min 梯度和粒径为 5 微米的 20 mm x 50 mm 普锐斯(Prism) RP 管柱（塞默飞世尔-拱石公司(Thermo Hypersil-Keystone)，白露枫丹(Bellefonte)，PA)。对于较大试样（即粗试样大于约 100 mg）通常使用以下条件：60 mL/min 流速；30 min 梯度和粒径为 10 微米的 41.4 mm x 250 mm 麦克若陶伯(Microsorb) BDS 管柱（瓦里安(Varian)，帕洛阿尔托，CA)。

对于 ^1H NMR 数据，使用下列缩写：s = 单峰，d = 双峰，t = 三峰，q = 四重峰，m = 多重峰，br = 宽峰，nd = 未测出。

实例 1

联苯-2-基氨基甲酸哌啶-4-基酯

在 70°C 下将 2-异氰酸联苯基酯(97.5 g, 521 mmol)和 4-羟基-1-苯甲基哌啶(105 g, 549 mmol)（两者都可购自奥德里奇，密尔沃基(Milwaukee)，WI）一起加热 12 小时，在此期间通过 LCMS 监测联苯-2-基氨基甲酸 1-苯甲基哌啶-4-基酯的形成。然后，使反应混合物冷却至 50°C 并添加乙醇(1 L)，之后慢慢添加 6 M 盐酸(191 mL)。然后，使反应混合物冷却至环境温度并添加甲酸铵(98.5 g, 1.56 mol)，并且使氮气激烈鼓泡经过溶液 20 min。然后添加钡（10 重量%（以干重计）存于活性碳上）(20 g)。在 40°C

下将反应混合物加热 12 小时，然后经硅藻土垫过滤。然后在减压下去除溶剂，并将 1 M 盐酸(40 mL)添加至粗制残留物中。然后添加氢氧化钠(10 N)以调整 pH 至 12。用乙酸乙酯(2 x 150 mL)萃取水层并干燥(硫酸镁)，之后在减压下去除溶剂而获得联苯-2-基氨基甲酸哌啶-4-基酯(155 g, 100%)。HPLC (10-70) $R_t = 2.52$; MS m/z : $[M+H]^+$ 计算值 $C_{18}H_{20}N_2O_2$ 297.15; 实验值 297.3。

实例 2

3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酸

向联苯-2-基氨基甲酸哌啶-4-基酯(50 g, 67.6 mmol)存于二氯甲烷(500 mL)中的溶液中添加丙烯酸(15.05 mL, 100 mmol)。在 50°C 及回流下将所形成混合物加热 18 小时，然后去除溶剂。添加甲醇(600 mL)并在 75°C 下将此混合物加热 2 小时，之后冷却至室温以形成浓稠浆液。通过过滤收集固体，用甲醇(50 mL)洗涤并风干而获得呈白色粉末形式的 3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酸 (61 g, 96%纯度)。

实例 3

N-{5-[(R)-2-氨基-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]-2-羟苯基}-甲酰胺乙酸盐

步骤 A - N-{5-[(R)-2-苄氨基-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]-2-苯甲氧基苯基}甲酰胺

向 500 mL 三颈圆底烧瓶中添加 N-{2-苯甲氧基-5-[(R)-2-溴-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]苯基}甲酰胺(100 g, 215 mmol)和 N-甲基-2-吡咯烷酮(300 mL)。添加苄胺(69.4 mL, 648 mol)并用氮冲洗反应混合物。然后将反应混合物加热至 90°C 并搅拌约 8 小时。然后使反应混合物冷却至室温并添加水(1.5 L)和乙酸乙酯(1.5 L)。分离各层并用水(500 mL)、水和饱和盐水的 1:1 混合物(总计 500 mL)洗涤有机层，之后再次用水(500 mL)洗涤。然后经无水硫酸镁干燥有机层，过滤并在减压下浓缩以提供呈橙褐色浓稠油形式的粗制 N-{5-[(R)-2-苄氨基-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]-2-苯甲氧基苯基}甲酰胺 (100 g, 90%产率, 75-80%纯度)。

步骤 B - N-{5-[(R)-2-氨基-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]-2-羟苯基}-甲酰胺乙酸盐

使粗制 N-{5-[(R)-2-苄氨基-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]-2-苯甲氧基苯基}甲酰胺(100 g, 194 mmol)溶于甲醇(1 L)和乙酸(25 mL, 291 mmol)中。用干燥氮吹扫所形成混合物，然后添加氢氧化钡/碳(20 g, 20 重量%, 约 50%水)。使氢鼓泡经过反应混合物，同时在室温下搅拌约 10 小时。然后用干燥氮吹扫混合物，并经硅藻土过滤混合物。在回转式蒸发器上浓缩滤液并将乙酸乙酯(600 mL)添加至残留物中。将此混合物搅拌约 2 小时，此时已形成浓稠黄色浆液。过滤浆液并使沉淀物风干以提供呈黄白色固体形式的 N-{5-[(R)-2-氨基-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]-2-羟苯基}甲酰胺乙酸盐(48 g, 98%纯度)。LCMS (10-70) $R_t = 3.62$; $[M+H]^+$ 实验值 311.3。

实例 4

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二

甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯**步骤 A - 2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸甲酯**

在 0°C 和干燥氮下向 2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸(480 mg, 2.4 mmol)存于无水甲醇(8.2 mL)中的经搅拌溶液中添加亚硫酸氯(0.538 mL, 7.38 mmol)。使所形成混合物升温至室温并搅拌约 7 小时。另外添加亚硫酸氯(0.300 mL)并在室温下持续搅拌过夜。于减压下去除溶剂并使残留物溶于乙酸乙酯中。用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤此溶液, 经无水硫酸钠干燥并在减压下浓缩以提供呈淡黄色固体形式的 2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸甲酯(578 mg)。HPLC (10-70) $R_t = 4.61$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.57 (3H, s), 2.61 (3H, s), 3.94 (3H, s), 7.82 (1H, s), 7.87 (1H, s)。

步骤 B - 4-氨基-2,5-二甲基苯甲酸甲酯

在 0°C 下向 2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸甲酯(523 mg, 2.5 mmol)存于甲醇和水的 9:1 混合物(总计 25 mL)中的经搅拌溶液中添加氯化铵(401 mg, 7.5 mmol)。逐份添加锌(1.63 g, 25 mmol)并在室温下将所形成混合物搅拌过夜。然后经硅藻土过滤反应混合物并用甲醇洗涤硅藻土垫。使滤液在减压下浓缩并且使所得残留物溶于乙酸乙酯中。用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤此溶液, 以无水硫酸钠干燥并在减压下浓缩以提供呈黄色油形式的 4-氨基-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(450 mg)。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.14 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.85 (br s, 2H), 6.48 (s, 1H), 7.72 (s, 1H)。

步骤 C - 4-{3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基氨基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯

向 3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酸(670 mg, 1.82 mmol)和 4-氨基-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(390 mg, 2.18 mmol)存于二氯甲烷(3.6 mL)和二异丙基乙胺(0.413 mL)中的经搅拌溶液中添加六氟磷酸 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲阳离子 (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) (HATU) (829 mg, 2.18 mmol)。在室温下将所形成混合物搅拌过夜。然后用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤混合物, 以无水硫酸钠干燥, 过滤并在减压下浓缩。通过硅胶色谱纯化残留物, 其中用含有 3% 至 5% 甲醇的二氯甲烷洗脱以提供 4-{3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基氨基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(568 mg, 59% 产率)。LCMS (10-70) $R_t = 4.55$; $[\text{M}+\text{H}^+]$ 实验值 530.4。

步骤 D - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-羟甲基-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

在 0°C 下向 1 M 氢化锂铝存于 THF 中的经搅拌溶液(1.52 mL, 1.52 mmol)中添加 4-{3-[4-(联苯-2-基氨甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基氨基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(400 mg, 0.76 mmol)。在 0°C 下将所形成混合物搅拌 30 分钟, 然后添加 1 M 氢氧化钠水溶液(5 mL)和水(5 mL)的 1:1 混合物, 并持续搅拌 2 小时。添加二氯甲烷并分离有机层, 以硫酸钠干燥并在减压下去除溶剂。通过硅胶色谱纯化残留物, 其中用含有 5% 甲醇的二氯甲烷洗脱以提供联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-羟甲基-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)-乙

基]哌啶-4-基酯。LCMS (10-70) $R_t = 3.94$; $[M+H]^+$ 实验值 502.5。

步骤 E - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

在 0°C 下向联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-羟甲基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(151 mg, 0.3 mmol)存于二氯甲烷(3 mL)中的溶液中添加二甲亚砜(128 μ L, 1.8 mmol)和二异丙基乙胺(157 μ L, 0.9 mmol)。15 分钟后, 添加三氧化硫吡啶复合物(143 mg, 0.9 mmol), 并在 0°C 下持续搅拌 1 小时。添加水以终止反应, 并分离各层。以无水硫酸钠干燥有机层, 过滤并在减压下去除溶剂而获得联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯 (150 mg, 100%产率), 其不经进一步纯化就可使用。 $[M+H]^+$ 实验值 500.4。

步骤 F - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)乙氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

在室温下将联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(150 mg, 0.30 mmol)和 N-{5-[(R)-2-氨基-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]-2-羟苯基}甲酰胺(112 mg, 0.36 mmol)存于二氯甲烷和甲醇的 1:1 混合物 (总计 3.0 mL) 中的溶液搅拌 30 分钟。添加三乙酰氧基硼氢化钠(191 mg, 0.9 mmol)并在室温下将所形成混合物搅拌过夜。添加乙酸以终止反应, 并在减压下浓缩混合物而获得联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)乙氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯, 其不经进一步纯化就可使用。LCMS (10-70) $R_t = 4.55$; $[M+H]^+$ 实验值 794.6。

步骤 G - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

向联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)乙氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯(238 mg, 0.30 mmol)存于二氯甲烷(3.0 mL)中的悬浮液中添加三乙胺三氢氟酸盐(147 μ L, 0.90 mmol)。在室温下将此混合物搅拌过夜, 然后在减压下浓缩混合物。然后通过制备型 RP-HPLC (梯度: 存于含 0.05% TFA 的水中的 2-50%乙腈)纯化残余物。收集适当流份并将其合并并且冻干而获得呈二(三氟乙酸盐)型的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯 (50 mg, 97%纯度)。LPLC (2-90) $R_t = 2.76$; $[M+H]^+$ 实验值 680.8。

实例 5

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

步骤 A - 二苯甲基-(4-碘-2,5-二甲基苯基)胺

向装有顶置式搅拌器、温度控制和加料漏斗的 2 升圆底烧瓶中添加 4-碘-2,5-二甲基苯胺(100.0 g, 0.405 mol) (得自波谱集团有限公司, 米尔伯里, OH)。添加乙醇(1 L)

和固体碳酸钾(160 g, 1.159 mol), 然后以一份添加纯溴化苄(140 mL, 1.179 mol)。在 30℃下将所形成混合物搅拌约 18 小时, 此时 HPLC 显示大于 98%的转化率。然后使混合物冷却至室温并添加己烷(1 L)。将此混合物搅拌 15 分钟, 然后经滤纸过滤以去除固体, 并用己烷(200 mL)洗涤滤饼。使用回转式蒸发器使滤液的体积降低至约 500 mL 并添加浓盐酸(30 mL)。然后, 将使用回转式蒸发器去除残留溶剂。向所得残留物中添加己烷(500 mL), 并将此混合物搅拌约 30 分钟, 此时自由流动性浆液已形成。过滤浆液并用己烷(200 mL)洗涤滤饼并干燥以提供呈绿色固体形式的二苯甲基-(4-碘-2,5-二甲基苯基)胺盐酸盐 (115 g, 62%产率, 97.5%纯度)。

将二苯甲基-(4-碘-2,5-二甲基苯基)胺盐酸盐转移至 3 L 烧瓶中, 并添加甲苯(1 L)和 1 M 氢氧化钠水溶液(1 L)。将所形成混合物搅拌 1 小时, 然后分离各层。用稀盐水(500 mL)洗涤有机层并通过回转式蒸发器去除溶剂以提供呈半固体浓稠油形式的二苯甲基-(4-碘-2,5-二甲基苯基)胺(80 g)。(或者, 在此步骤中可使用二氯甲烷来替代甲苯)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2.05 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 3.90 (s, 4H), 6.91 (s, 1H), 7.05-7.20 (m, 10H), 7.42 (s, 1H); MS [M+H⁺]实验值 428。

步骤 B - 4-二苯甲基氨基-2,5-二甲基苯甲醛盐酸盐

向装有顶置式搅拌器、温度控制和加料漏斗的 1 升 3 颈圆底烧瓶中添加二苯甲基-(4-碘-2,5-二甲基苯基)胺(15 g, 35 mmol)。添加甲苯(300 mL), 并将所形成混合物搅拌约 15 分钟。用干燥氮吹扫反应烧瓶, 并冷却至约 -20℃, 并且通过加料漏斗逐滴添加存于己烷中的 1.6 M 正-丁基锂(33 mL, 53 mmol)。在添加期间, 使反应混合物的内部温度保持低于 -10℃。当添加完成时, 在约 -15℃下将所形成混合物搅拌 15 分钟。然后逐滴添加 N,N-二甲基甲酰胺(10 mL, 129 mmol), 同时保持内部反应温度低于 0℃。然后在 -20℃至 0℃下将所形成混合物搅拌约 1 小时。然后经 5 分钟添加 1 M 盐酸水溶液(200 mL), 并将所形成混合物搅拌 15 分钟。然后分离各层并用稀盐水(100 mL)洗涤有机层。然后以无水硫酸钠干燥有机层, 将其过滤并在减压下去除溶剂以提供呈浓稠油形式的 4-二苯甲基氨基-2,5-二甲基苯甲醛盐酸盐 (11.5 g, 90%产率, 95%纯度), 其在静置后固化。产物含有约 3-5%脱碘副产物。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.42 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 4.25 (s, 4H), 6.82 (s, 1H), 7.10-7.30 (10H, m), 7.62 (1H, s), 10.15 (1H, s); MS [M+H⁺]实验值 330.3。

步骤 C - 4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯胺

向 500 mL 圆底烧瓶中添加 4-二苯甲基氨基-2,5-二甲基苯甲醛盐酸盐(11.5 g, 31.4 mmol)和甲苯(150 mL), 并搅拌所形成混合物直至盐完全溶解。然后, 用干燥氮将反应烧瓶吹扫 5 分钟。添加乙二醇(5.25 mL, 94.2 mmol)和对-甲苯磺酸(760 mg, 6.2 mmol), 并在 60℃至 80℃下将所形成混合物加热约 20 小时。然后在 40℃下于回转式蒸发器上慢慢去除溶剂(经约 40 分钟)。将甲苯(100 mL)添加至残留物中, 并在 40℃下于回转式蒸发器上再次慢慢地去除溶剂。使用另一等份甲苯(100 mL)重复此过程, 并使混合物蒸发至干燥。将乙酸乙酯(150 mL)和饱和碳酸氢钠水溶液(100 mL)添加至残留物中

并分离各层。用盐水(50 mL)洗涤有机层,然后以无水硫酸钠干燥,过滤并在减压下浓缩以提供粗制二苯甲基-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基-苯基)胺(11.4 g)。

使粗制二苯甲基-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基-苯基)胺溶于乙醇与水的 2:1 混合物(总计 150 mL)中,并用干燥氮将所形成混合物吹扫 5 分钟。添加钯/碳(2.3 g, 10 wt%, 含有约 50%水)和固态碳酸氢钠(1.0 g),并在约 1 atm 的氢气和 25°C 至 30°C 下使所形成混合物氢化约 8 小时。然后,经硅藻土过滤混合物,并在回转式蒸发器上浓缩滤液以提供呈浓稠油形式的粗制 4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯胺(5.6 g, 92% 产率)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2.05 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 3.7-3.9 (m, 4H), 3.95 (s, 4H), 5.59 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 7.0-7.25 (m, 1¹H)。

步骤 D - N-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯酰胺

向 500 mL 圆底烧瓶中添加粗制 4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯胺(5.6 g, 29 mmol)、二氯甲烷(100 mL)和二异丙基乙胺(7.6 mL, 43.5 mmol)。在室温下搅拌所形成混合物直至成份溶解,然后使混合物冷却至 0°C。然后经 5 分钟逐滴添加丙烯酰氯(2.35 mL, 29 mmol)。在 0°C 至 5°C 下将反应混合物搅拌 1 小时,之后添加水(50 mL)并持续搅拌约 30 分钟,此时微细固体已形成。过滤混合物以收集固体。然后分离滤液各层,并在减压下使有机层浓缩至干燥。将二氯甲烷(50 mL)添加至残留物中并将此混合物搅拌至形成自由流动性浆液。过滤浆液(使用收集上文微细固体所用的相同漏斗),并用二氯甲烷(10 mL)洗涤滤饼并干燥以提供呈白色至灰白色固体形式的 N-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯酰胺(3.1 g, 97%纯度)。

然后,使得自上文的滤液蒸发至干燥,并将甲醇(10 mL)添加至残留物中。将此混合物搅拌 15 分钟,之后通过过滤收集沉淀物,以甲醇(5 mL)洗涤并干燥以获得第二批 N-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯酰胺(0.8 克, 95%纯度)。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 2.10 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 3.85-4.10 (m, 4H), 5.60-6.40 (m, 3H), 5.59 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.23 (s, 1H)。

步骤 E - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯盐酸盐

向 50 mL 圆底烧瓶中添加联苯-2-基氨基甲酸哌啶-4-基酯(1.2 g, 4.04 mmol)和 N-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯酰胺(1.0 g, 4.04 mmol)。添加乙醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)以形成浆液。在 45°C 至 50°C 下将反应混合物加热约 18 小时,然后冷却至室温。添加 1 M 盐酸水溶液(10 mL),并将所形成混合物剧烈搅拌约 3 小时。添加二氯甲烷(10 mL),并将所形成混合物搅拌约 5 分钟。然后分离各层,并以无水硫酸钠干燥有机层,过滤并在回转式蒸发器上浓缩以提供粗制联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯盐酸盐(1.9 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1.2-1.4 (m, 2H), 1.58-1.75 (m, 2H), 2.0-2.17 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.41-2.50 (m, 4H), 2.5-2.75 (m, 2H), 4.31-4.42 (m, 1H), 7.10-7.35 (m, 9H), 7.55 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.98 (s, 1H); MS [M+H⁺]实验值 500.2。

步骤 F - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟基苯基)乙氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

向 2 L 三颈圆底烧瓶中添加联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯盐酸盐(38 g, 70 mmol)和 N-{5-[(R)-2-氨基-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]-2-羟基苯基}甲酰胺乙酸盐(33.6 g, 91 mmol)。添加二氯甲烷(500 mL)和甲醇(500 mL)，并在室温和干燥氮下将所形成混合物搅拌约 3 小时。然后，使反应混合物冷却至 0°C 至 5°C，并经 10 分钟逐份添加固体三乙酰氧基硼氢化钠(44.5 g, 381 mmol)。使反应混合物经约 2 小时自 0°C 慢慢升温至室温，然后冷却至 0°C。添加饱和碳酸氢钠水溶液(500 mL)和二氯甲烷(500 mL)。将此混合物充分搅拌之后分离各层。用盐水(500 mL)洗涤有机层，以无水硫酸钠将其干燥，过滤并在减压下浓缩以获得呈黄色固体形式的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟基苯基)乙氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯 (55 g, 86%纯度)。

使粗产物(30 g)溶于含有 2% 甲醇的二氯甲烷 (总计 150 mL) 中，并将其装填至已经用含有 2% 甲醇和 0.5% 氢氧化铵的二氯甲烷填装并平衡的硅胶管柱(300 g)上。使用以下洗脱液自管柱洗脱产物：含有 2% 甲醇和 0.5% 氢氧化铵的二氯甲烷(1 L)；含有 4% 甲醇和 0.5% 氢氧化铵的二氯甲烷(1 L)；和含有 5% 甲醇和 0.5% 氢氧化铵的二氯甲烷(约 3 L)。收集流份(200 mL)并合并那些纯度大于 90% 的流份，并且在减压下将其浓缩以提供呈黄色固体形式的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟基苯基)乙氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯 (21.6 g, 96.5%纯度)。MS [M+H⁺]实验值 794.6。

步骤 G - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟基苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯氢氟酸盐

向 1 L 圆底烧瓶中添加联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟基苯基)乙氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(21.5 g, 27.1 mmol)和二氯甲烷(200 mL)。在室温下搅拌所形成混合物直至成份溶解，然后添加三乙胺三氢氟酸盐(8.85 mL, 54.2 mmol)，并在 25°C 下将所形成混合物搅拌约 48 小时。在回转式蒸发器上去除溶剂以提供浓稠糊剂。将二氯甲烷(100 mL)和乙酸乙酯(200 mL)添加至糊剂中，并将所形成混合物搅拌 30 分钟。在干燥氮下慢慢过滤所形成的浆液，并用二氯甲烷和乙酸乙酯的 1:2 混合物 (总计 100 mL) 洗涤滤饼，在氮气下将其干燥 2 小时，之后在真空下干燥过夜以提供呈氢氟酸盐形式的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟基苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯 (25 g, 96.9%纯度)，其为硬质黏土状固体。MS [M+H⁺]实验值 680.8。

步骤 H - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟基苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯

在 6 英寸反相管柱（麦克若陶伯固相）上，使用存于水（含有 1%三氟乙酸）中的乙腈的 10%至 50%混合物作为流动相，以三等量批次纯化联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯氢氟酸盐(25 g)。合并纯度大于 99%的流份，然后用一体积水稀释。使所形成混合物冷却至 0℃并添加固态碳酸氢钠直至混合物的 pH 为约 7.5 至 8.0。在约 5 分钟内，形成成白色浆液。将浆液搅拌 30 分钟后过滤。用水(500 mL)洗涤滤饼，将其风干约 4 小时，之后在真空中干燥过夜以提供呈半结晶游离碱型的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基-氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯（12 g，99+%纯度）。

实例 6

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

步骤 A - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

向 500 mL 圆底烧瓶中添加联苯-2-基氨基甲酸哌啶-4-基酯(17.0 g, 58 mmol)和 N-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯酰胺(13.1 g, 52.9 mmol)。添加乙醇(150 mL)和二氯甲烷(150 mL)以形成浆液。在 50℃至 55℃下将反应混合物加热约 24 小时，然后冷却至室温。在回转式蒸发器上去除大部分溶剂而获得浓稠浆液。添加乙醇（试剂级）以形成约 200 mL 的总体积，并将所形成混合物加热至 80℃，然后慢慢冷却至室温。过滤所形成的浓稠白色浆液，用乙醇(20 mL)洗涤并在真空中干燥以提供呈白色固体形式的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯（23.8 g，约 98%纯度）。

步骤 B - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基-氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

向 500 mL 圆底烧瓶中添加联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[1,3]二氧戊环-2-基-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(15 g, 27.6 mmol)和乙腈(150 mL)以形成浆液。添加 2 M 盐酸水溶液(75 mL)并在 30℃下将所形成混合物搅拌 1 小时。然后使混合物冷却至室温，并添加乙酸乙酯(150 mL)。添加 2 M 氢氧化钠水溶液(75 mL)，检查 pH 值之后另外添加 2 M 氢氧化钠直至溶液的 pH 到达 9 至 10 范围内。分离各层并用稀盐水（75 mL；1:1 盐水/水）洗涤有机层，以无水硫酸钠干燥，并在回转式蒸发器上去除溶剂而获得联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基-氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯（12.5 g，约 98%纯度）。如果需要，可通过以下步骤来提高此中间体的纯度：用乙醇（3 体积乙醇）形成浆液，将浆液加热至 80℃，之后慢慢冷却至室温，并通过过滤来分离。

步骤 C - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)乙基亚氨基]甲基)-2,5-二甲基-苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

向 250 mL 圆底烧瓶中添加联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(7.1 g, 14.2 mmol)和 N-{5-[(R)-2-氨基-1-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)乙基]-2-羟苯基}甲酰胺乙酸盐(5.8 g, 15.6 mmol)。添加甲醇(100 mL)以形成浆液,并在 45°C 至 50°C 及氮气下将此混合物搅拌 1 小时。然后使混合物冷却至室温并添加甲苯(50 mL),并且在 35°C 至 45°C 范围的温度下于回转式蒸发器上去除溶剂。将甲苯(50 mL)添加至残留物中,并去除溶剂以提供呈黄-橙色固体形式的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)乙基亚氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(12 g)。

步骤 D - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)乙氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

向氢化作用烧瓶中添加联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)乙基亚氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(4.6 g)和 2-甲基四氢呋喃(50 mL)。搅拌所形成混合物直至固体溶解(约 5 分钟),然后用氮吹扫混合物。添加铂/碳(920 mg, 5 wt.%, 活性碳载体)并在 50 psi 下使混合物氢化(帕尔(Parr)振荡器)6 小时。然后经硅藻土过滤混合物,并用 2-甲基四氢呋喃(10 mL)洗涤硅藻土。向滤液中添加经疏丙基改质的硅胶(溶液重量的 20%, 硅环(Silicycle)),并在 25°C 至 30°C 下将此混合物搅拌 3 小时。然后,经硅藻土过滤混合物并浓缩以去除溶剂。使残余物溶于甲醇(5 mL/克残余物)中之后将所得溶液缓慢添加至经剧烈搅拌的饱和碳酸氢钠水溶液与水的 1:1 混合物中(40 mL/克残余物)。将所得灰白色浆液搅拌 20 分钟后过滤。用水(20 体积)洗涤滤饼,将其风干 3 小时,之后在真空中于室温下干燥过夜以提供联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)乙氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(80%回收率,约 96%纯度)。

步骤 E - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯 L-酒石酸盐

向 200 mL 圆底烧瓶中添加联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基硅烷氧基)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)乙氨基]-甲基}-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(3.8 g, 4.8 mmol)和 2-甲基四氢呋喃(40 mL)。在室温下搅拌所形成混合物直至成份溶解(约 15 分钟),然后添加三乙胺三氢氟酸盐(0.94 mL, 5.76 mmol),并在 25°C 下将所形成混合物搅拌约 24 小时。向此混合物中添加饱和碳酸氢钠水溶液与水的 1:1 混合物(40 mL)和 2-甲基四氢呋喃,并搅拌所形成混合物直至固体溶解(溶液 pH 为约 8)。分离各层,并用盐水(30 mL)洗涤有机层,以无水硫酸钠干燥,过滤并在回转式蒸发器上浓缩。使残留物溶于 2-甲基四氢呋喃(50 mL)中,并添加固体 L-酒石酸(650 mg)。在 25°C 至 30°C 下将所形成混合物搅拌 18 小时,然后经滤纸过滤。用 2-甲基四氢呋喃(10 mL)、异丙醇(10 mL)洗涤滤饼,并将其立即置于真空下以提供联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯 L-酒石酸盐。

甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯 L-酒石酸盐 (3.7 g, >97%纯度)。

步骤 F - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯

向 250 mL 圆底烧瓶中添加联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯 L-酒石酸盐(3.5 g)和甲醇(35 mL), 并将所形成混合物搅拌 15 分钟。经 5 分钟添加饱和碳酸氢钠水溶液与水的 1:1 混合物(70 mL), 并持续搅拌 2 小时。过滤所形成的灰白色浆液并用水(20 mL)洗涤滤饼, 风干 2 小时之后在真空中干燥过夜以提供呈半结晶游离碱型的联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯(2.3 g)。

在环境温度下, 使用 JEOL ECX-400 NMR 波谱仪获得联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯试样 (22.2 mg, 存于约 0.75 mL DMSO-d₆ 中) 的 ¹H 和 ¹³C NMR 波谱:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), 主要异构体 δ 9.64 (br, 1H), 9.54 (br s, 1H), 9.43 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.03 (d, J = 1.9, 1H), 7.25-7.45 (m, -9.0H), ~7.3 (nd, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.88 (dd, J = 8.2, 1.9, 1H), 6.79 (d, J = 8.2, 1H), 5.15 (br, 1H), 4.53 (dd, J = 7.3, 4.7, 1H), 4.47 (m, 1H), ~3.65 和 ~3.60 (AB 对, 2H), 2.68 (br m, 2H), ~2.59 (nd, 4H), 2.44 (br t, J = 6.5, 2H), 2.20 (s, 3H), ~2.17 (br m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.73 (br, 2H), 1.44 (br q, J = ~9.0, 2H)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), 次要异构体 δ 9.64 (br, 1H), 9.43 (s, 1H), 9.26 (br d, J = ~7.0, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.50 (br d, J = ~7.0, 1H), 7.25-7.45 (m, 9H), ~7.3 (nd, 1H), 7.07 (s, 1H), ~7.07 (nd, 1H), 6.95 (dd, J = 8.3, 1.8, 1H), 6.83 (d, J = 8.3, 1H), 5.15 (br, 1H), 4.47 (m, 1H), ~3.65 和 ~3.60 (AB 对, 2H), 2.68 (br m, 2H), ~2.59 (nd, 2H), 2.44 (br t, J = 6.5, 2H), 2.20 (s, 3H), ~2.17 (br m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.73 (br, 2H), 1.44 (br q, J = ~9.0, 2H)。

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), 主要异构体 δ 170.0, 159.9, 153.9, 145.5, 139.3, 137.6, 135.2, 135.0, 134.8, 133.4, 133.4, 130.2, 130.2, 128.6, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 126.1, 125.7, 125.6, 118.6, 114.5, 71.4, 70.0, 57.4, 53.9, 50.3, 50.1, 33.7, 30.7, 18.2, 17.5。

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), 次要异构体 δ 170.0, 163.4, 153.9, 147.8, 139.3, 137.6, 135.7, 135.2, 135.0, 134.8, 133.4, 133.4, 130.2, 130.2, 128.6, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 127.0, 126.1, 125.7, 123.0, 119.6, 115.6, 71.0, 70.0, 57.3, 53.9, 50.3, 50.1, 33.7, 30.7, 18.2, 17.5。

¹H 和 ¹³C NMR 波谱显示主要异构体 (约 82mol%) 和次要异构体 (约 18mol%) 的存在, 据信其都是得自环绕-NH-C(O)H 键的受阻旋转的旋转异构体。据信在主要异构体中苯基和羰基氧在同侧, 而在次要异构体中在对侧。

实例 7

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]-哌啶-4-基酯

步骤 A - 4-碘-2,5-二甲基苯胺

向 2,5-二甲基苯胺(20 g, 165 mmol)存于二氯甲烷与甲醇的 1:1 混合物(400 mL)中的溶液中添加碳酸氢钠(20.8 g, 250 mmol)和四甲基二氯碘酸(I)铵(44.7 g, 165 mmol)。在室温下将所形成混合物搅拌 1 小时, 然后添加水(500 mL)。去除有机层, 并用 5% 硫代硫酸钠水溶液(500 mL)和盐水(500 mL)洗涤。然后以无水硫酸镁干燥有机层, 过滤并在真空下浓缩以提供 4-碘-2,5-二甲基苯胺 (39.6 g, 98%产率)。不经进一步纯化就使用此产物。

步骤 B - N-(4-碘-2,5-二甲基苯基)丙烯酰胺

向 4-碘-2,5-二甲基苯胺(37.2 g, 151 mmol)存于二氯甲烷(500 mL)中的溶液中添加碳酸氢钠(25.4 g, 302 mmol)。使所形成混合物冷却至 0°C, 并经 25 分钟慢慢添加丙烯酰氯(12.3 mL, 151 mmol)。在室温下将所形成混合物搅拌过夜然后过滤。使滤液的体积降低至约 100 mL 并形成沉淀物。过滤沉淀物, 将其干燥并用水(1 L)洗涤, 之后再一次干燥而获得 N-(4-碘-2,5-二甲基苯基)丙烯酰胺 (42.98 g, 95%纯度, 90%产率)。不经进一步纯化就使用此产物。

步骤 C - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

向 N-(4-碘-2,5-二甲基苯基)丙烯酰胺(32.2 g, 107 mmol)存于 N,N-二甲基甲酰胺与异丙醇的 6:1 v/v 混合物(700 mL)中的溶液中添加联苯-2-基氨基甲酸哌啶-4-基酯(36.3 g, 123 mmol)。在 50°C 下将所形成混合物加热 24 小时, 之后在 80°C 下加热 24 小时。然后, 使反应混合物冷却至室温并在真空下浓缩。使残留物溶于二氯甲烷(1 L)中, 并用 1 N 盐酸水溶液(500 mL)、水(500 mL)、盐水(500 mL)和饱和碳酸氢钠水溶液(500 mL)洗涤此溶液。然后以无水硫酸镁干燥有机层并过滤。添加乙醇(400 mL), 并在真空下使所形成混合物浓缩至体积为约 400 mL, 此时沉淀物已形成。过滤沉淀物并干燥而获得联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-碘-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯 (59.6 g, 84%纯度, 79%产率)。m/z: [M+H⁺]对 C₂₉H₃₂IN₃O₃ 的计算值 598.49; 实验值 598.5。

步骤 D - 4-{3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基氨基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯

向联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-碘-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(56 g, 94 mmol)存于 N,N-二甲基甲酰胺与甲醇的 5:1 v/v 混合物(600 mL)中的溶液中添加二异丙基乙胺(49 mL, 281 mmol)、1,3-双(二苯基膦基)丙烷(3.9 g, 9.4 mmol)和乙酸钯(II) (2.1 g, 9.4 mmol)。用一氧化碳吹扫所形成混合物, 然后在 70°C 至 80°C 及一氧化碳气氛(气囊压力)下搅拌过夜。在真空下浓缩反应混合物, 并使残留物溶于二氯甲烷(500 mL)中。用 1 N 盐酸水溶液(500 mL)、水(500 mL)洗涤此混合物, 之后用盐水(500 mL)洗涤。然后以无水硫酸镁干燥有机层, 将其过滤之后在真空下浓缩。将残留物与乙醇混合(约

5:1 v/w 乙醇对残留物)，且加热混合物直至所有固体物质溶解。使此溶液慢慢冷却至室温，并通过过滤来分离所形成沉淀物而获得 4-{3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基氨基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(47.3 g, 97%纯度, 92%产率)。m/z: [M+H⁺] 对 C₂₉H₃₂IN₃O₃ 的计算值 530.63; 实验值 530.4。

步骤 E - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-羟甲基-2,5-二甲基-苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

使 4-{3-[4-(联苯-2-基氨基甲酰基氧基)哌啶-1-基]丙酰基氨基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(49.8 g, 93.9 mmol)存于四氢呋喃(200 mL)中的溶液冷却至 0℃，并逐份(10 x 1.07 g)添加氢化锂铝(10.7 g, 281.7 mmol)。将所形成混合物搅拌 3 小时，然后添加水(10.7 mL)，之后添加 1 N 氢氧化钠水溶液(10.7 mL)和其它水(32.1 mL)。将此混合物搅拌过夜之后过滤。在真空下浓缩有机层，并将残留物与乙酸乙酯混合(约 5:1 v/w 乙酸乙酯对残留物)。加热此混合物直至所有固体物质溶解，然后使溶液冷却至室温。过滤所得沉淀物并干燥而获得联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-羟甲基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(24.6 g, 95%纯度, 47.5%产率)。不经进一步纯化就使用此物质。m/z: [M+H⁺] 对 C₂₉H₃₂IN₃O₃ 的计算值 502.62; 实验值 502.5。

步骤 F - 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯

向联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-羟甲基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(5.0 g, 10 mmol)存于二氯甲烷(200 mL)中的溶液中添加二异丙基乙胺(8.7 mL, 50 mmol)和二甲亚砷(5.6 mL, 100 mmol)。使所形成混合物冷却至 0℃，并添加三氧化硫吡啶复合物(8.0 g, 50 mmol)。在 0℃下将反应混合物搅拌 1 小时，然后添加水(300 mL)。去除有机层，并用 1 N 盐酸水溶液(300 mL)和盐水(300 mL)洗涤。然后以无水硫酸镁干燥有机层并过滤。不经进一步纯化就使用所得含有联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-甲酰基-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的溶液。m/z: [M+H⁺] 对 C₂₉H₃₂IN₃O₃ 的计算值 500.60; 实验值 500.4。

实例 8

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的型 I 的制备

制备联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰基氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯(55 mg)存于乙腈(2 mL)中的浆液并在环境温度下搅拌 2 天。通过过滤去除溶剂，并在环境温度下干燥固体以提供型 I (50 mg)。此结晶游离碱型的 PXRD、DSC 和 TGA 波谱分别展示于图 1、4 和 7 中。

实例 9

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的型 II 的制备

制备联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯(46 mg)存于异丙醇(2 mL)中的浆液并

在环境温度下搅拌 2 天。通过过滤去除溶剂，并在环境温度下干燥固体以提供型 II (43 mg)。此结晶游离碱型的 PXRD、DSC 和 TGA 波谱分别展示于图 2、5 和 8 中。

实例 10

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的型 III 的制备

制备联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯(54 mg)存于乙醇(2 mL)中的浆液并在环境温度下搅拌 2 天。通过过滤去除溶剂，并在环境温度下干燥固体以提供型 III (48 mg)。此结晶游离碱型的 PXRD、DSC 和 TGA 波谱分别展示于图 3、6 和 9 中。

实例 11

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的型 II 的种晶的制备

使半结晶型联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(500 mg)溶于甲醇(50 mL)中，并添加水直至达成浊点。在 25℃下将所形成混合物搅拌 3 小时，并通过过滤来分离所形成结晶物质以提供结晶联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的型 II(420 mg)。

实例 12

联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的型 II 的结晶

向装有顶置式搅拌器、温度控制和加料漏斗的 3 L 三颈圆底烧瓶中添加半结晶型联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(14 g)和甲醇(1.4 L)。以一份添加水(500 mL)，然后另外慢慢添加水(200 mL)直至达成浊点。添加联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基-氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的型 II 的种晶(50 mg)，并在 25℃下将所形成混合物搅拌 3 小时，此时已形成自由流动性浆液。经 15 分钟添加水(300 mL)，并在 25℃下将所形成混合物搅拌过夜。然后过滤混合物并用水(100 mL)洗涤滤饼，风干约 2 小时之后在真空和室温下干燥 48 小时以提供结晶联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯的型 II (12.5 g, 99.6%纯度)。

实例 13

粉末 X-射线衍射

粉末 x-射线衍射图是以赛默 ARL X-射线衍射仪 X'TRA 型(赛默 ARL SA, 瑞士)使用 Cu K α 辐射在 1.542 Å(45 kV, 40 mA)下以固态派尔提尔(Peltier)侦测器来获得。所述分析通常是在 2°/分钟的扫描速率下以每点 0.03°的步长和 2-40°范围的 2 θ 角来实施。在测量之前，对型 II 实施 30 秒的轻微手动研磨以降低粒径。对型 I 和 III 未实施

机械粒径降低。将试样缓慢装填至定制石英试样盘中，其经设计可安装至分析用仪器顶部填装式试样杯中。每周根据硅金属标准品将仪器校准在 $\pm 0.02^\circ 2\theta$ 角内。结晶联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯的型 I、型 II 和型 III 的代表性原始未处理 PXRD 图分别展示于图 1、2 和 3 中。

此外，以下每种型的 2θ 峰位置是使用分布拟合函数来获得，其包括本底扣除和平滑化常规程序：

型 I: 8.3 ± 0.3 ; 10.7 ± 0.3 ; 12.2 ± 0.3 ; 13.5 ± 0.3 ; 14.5 ± 0.3 ; 15.2 ± 0.3 ; 17.7 ± 0.3 ; 18.2 ± 0.3 ; 19.6 ± 0.3 ; 20.7 ± 0.3 ; 21.7 ± 0.3 和 23.2 ± 0.3 。

型 II: 8.4 ± 0.3 ; 10.4 ± 0.3 ; 10.7 ± 0.3 ; 11.9 ± 0.3 ; 12.3 ± 0.3 ; 12.6 ± 0.3 ; 13.4 ± 0.3 ; 13.6 ± 0.3 ; 14.3 ± 0.3 ; 14.7 ± 0.3 ; 15.3 ± 0.3 ; 16.8 ± 0.3 ; 17.1 ± 0.3 ; 17.8 ± 0.3 ; 18.2 ± 0.3 ; 18.7 ± 0.3 ; 19.2 ± 0.3 ; 19.8 ± 0.3 ; 20.7 ± 0.3 ; 21.6 ± 0.3 ; 22.3 ± 0.3 ; 22.5 ± 0.3 和 23.2 ± 0.3 。

型 III: 8.5 ± 0.3 ; 10.5 ± 0.3 ; 11.3 ± 0.3 ; 12.1 ± 0.3 ; 12.8 ± 0.3 ; 13.6 ± 0.3 ; 14.2 ± 0.3 ; 15.5 ± 0.3 ; 16.6 ± 0.3 ; 17.1 ± 0.3 ; 18.1 ± 0.3 ; 19.2 ± 0.3 ; 21.0 ± 0.3 ; 21.8 ± 0.3 ; 22.6 ± 0.3 ; 23.3 ± 0.3 和 24.5 ± 0.3 。

实例 14

差示扫描量热法

差示扫描量热法(DSC)是使用具有热分析仪(Thermal Analyst)控制器的 TA 仪器 Q-100 型模组来实施。收集数据并使用 TA 仪器热解析(Thermal Solutions)软件来分析。将约 1 mg 试样精确地称重至有盖铝盘中。使用 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 的线性加热斜率在环境温度至大约 300°C 下评估试样。在使用期间用干燥氮吹扫 DSC 室。结晶联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯的型 I、型 II 和型 III 试样的代表性 DSC 的图形分别展示于图 4、5 和 6 中。图 5 显示结晶联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯的型 II 具有优越热稳定性和约 143°C 的熔点。

实例 15

热重分析

热重分析(TGA)是使用装有高分辨能力的 TA 仪器 Q-500 型模组来进行。收集数据并使用 TA 仪器热解析软件分析。将重约 10 mg 的试样置于铂盘上并用高分辨-加热速率自环境温度至 300°C 进行扫描。在使用期间用氮气流吹扫天平和炉室。结晶联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[[R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基]-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯的型 I、型 II 和型 III 试样的代表性 TGA 的图形分别展示于图 7、8 和 9 中。

实例 16

动态湿气吸附评估

使用 VTI 大气微量天平、SGA-100 系统 (VTI 公司, 海厄利亚, FL 33016) 对结晶联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)-乙基]哌啶-4-基酯的型 I、型 II 及型 III 的手动研磨试样实施动态湿气吸附(DMS)评估 (也称为湿气吸附-解吸附分析)。使用大约 10 mg 的试样大小, 并在开始分析时将湿度设定为环境值。典型 DMS 分析由三次扫描组成: 环境至 2% 相对湿度(RH)、2% RH 至 90% RH、90% RH 至 5% RH, 扫描速率为 5% RH/步。每两分钟测量质量, 并在试样质量在 5 个连续点都稳定于 0.01% 内时将 RH 改变至下一数值($\pm 5\%$ RH)。型 I、型 II 和型 III 的代表性 DMS 的图形分别展示于图 10、11 和 12 中。

图 11 的 DMS 的图形证实型 II 具有可逆吸附/解吸附特性和中等($<5\%$)吸湿性。在 40% RH 至 75% RH 的湿度范围下, 型 II 具有约 0.3 重量%的不显著重量增加。可逆湿气吸附/解吸附特性显示型 II 具有可接受的吸湿性并且不具有潮解性。

实例 17

自表达人类 M_1 、 M_2 、 M_3 和 M_4 毒蕈碱受体的细胞实施细胞培养和膜制备

使稳定表达经克隆人类 hM_1 、 hM_2 、 hM_3 和 hM_4 毒蕈碱受体亚型的 CHO 细胞系分别在补加 10% FBS 和 250 $\mu\text{g/mL}$ 遗传霉素的哈莫斯(Hams) F-12 培养基中生长至几乎汇合。使细胞在 5% CO_2 下于 37°C 培养器中生长, 并用存于 dPBS 中的 2 mM EDTA 提取出来。通过在 650 $\times g$ 下离心 5 分钟来收集细胞, 并将细胞沉淀在 -80°C 下冷冻储存或立即制备膜供使用。对于膜的制备, 使细胞沉淀再悬浮于溶胞缓冲液中, 并用保利通(Polytron) PT-2100 组织破碎器匀浆 (凯恩迈特格(Kinematica) AG; 20 秒 $\times$ 2 次破裂)。在 4°C 下以 40,000 $\times g$ 将粗制膜离心 15 分钟。然后用再悬浮缓冲液使膜沉淀再悬浮, 并用保利通组织破碎器再次匀浆。膜悬浮液的蛋白质浓度是通过劳瑞(Lowry)等人, 1951, 生物化学期刊(*Journal of Biochemistry*), 193, 265 中所述方法来测定。在 -80°C 下等份冷冻储存所有膜或将其立即使用。所制成 hM_5 受体膜的等份是直接购自铂金埃尔默(PerkinElmer)公司 (韦尔兹利(Wellesley), MA), 并储存在 -80°C 下直至使用。

实例 18

对毒蕈碱受体的放射性配体结合分析

对经克隆毒蕈碱受体的放射性配体结合分析是在 96-孔微滴定板中以 100 μL 总分析体积进行。使稳定表达 hM_1 、 hM_2 、 hM_3 、 hM_4 或 hM_5 毒蕈碱亚型的 CHO 细胞膜在分析缓冲液中稀释至以下具体目标蛋白浓度 ($\mu\text{g/孔}$): 10 $\mu\text{g } hM_1$ 、10-15 $\mu\text{g } hM_2$ 、10-20 $\mu\text{g } hM_3$ 、10-20 $\mu\text{g } hM_4$ 、和 10-12 $\mu\text{g } hM_5$ 以获得相似信号(cpm)。在分析板添加前, 使用保利通组织破碎器对膜实施短暂匀浆 (10 秒)。测定放射性配体 K_D 值的饱和结合研究是以 0.001 nM 至 20 nM 范围的浓度使用 L-[N-甲基- ^3H]氯化甲基东莨菪碱(^3H -NMS) (TRK666, 84.0 Ci/mmol, 安法玛西亚生物制药公司(Amersham Pharmacia

Biotech), 白金汉郡(Buckinghamshire), 英格兰) 来进行。用于测定测试化合物 K_i 值的置换分析是以 1 nM 使用 [^3H]-NMS 和十一种不同测试化合物浓度来进行。首先使测试化合物以 400 μM 的浓度溶于稀释缓冲液中, 然后以稀释缓冲液连续性稀释 5 x 至 10 pM 至 100 μM 的最终浓度。向分析板中添加的顺序和体积如下所述: 25 μL 放射性配体, 25 μL 经稀释测试化合物, 和 50 μL 膜。在 37°C 下将分析板培养 60 分钟。通过经已用 1% BSA 预处理的 GF/B 玻璃纤维滤板(铂金埃尔默公司)快速过滤来终止结合反应。用洗涤缓冲液(10 mM HEPES)将滤板冲洗三次以去除未结合的放射活性。然后使板风干, 并将 50 μL 微森特(Microscint)-20 液态闪烁流体(铂金埃尔默公司)添加至各孔中。然后在铂金埃尔默拓普康(TopCount)液体闪烁计数器(铂金埃尔默公司)上对板实施计数。结合数据是通过非线性回归分析使用格拉夫派得普锐斯(GraphPad Prism)软件包(格拉夫派得(GraphPad)软件公司, 圣地亚哥, CA)以单一位点竞争模式来分析。测试化合物的 K_i 值是使用程-普鲁萨福方程(程 Y 和普鲁萨福 WH., 生化药理学, 1973, 22, 23, 3099-108)自所观测到放射性配体的 IC_{50} 值和 K_d 值来计算。使 K_i 值转化成 $\text{p}K_i$ 值以测定几何平均和 95% 置信区间。然后, 将这些汇总统计值转化回 K_i 值以用于数据报告。

在此分析中, 较低 K_i 值表示测试化合物对所测试受体具有较高结合亲和力。发现联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基]乙基]哌啶-4-基酯(式 I 化合物)对 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 和 M_5 毒草碱受体亚型的 K_i 值低于 10 nM。

实例 19

自表达人类 β_1 、 β_2 或 β_3 肾上腺素能受体的细胞实施细胞培养和膜制备

在 500 $\mu\text{g/mL}$ 遗传霉素存在下, 使稳定表达克隆人类 β_1 和 β_2 肾上腺素能受体的人类胚肾(HEK-293)细胞系或稳定表达克隆人类 β_3 肾上腺素能受体之中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系在具有 10% FBS 的 DMEM 或哈莫斯 F-12 培养基中生长至几乎汇合。用存于 PBS 中的 2 mM EDTA 将细胞单层提取出来。通过在 1,000 rpm 下离心使细胞沉淀, 并将细胞沉淀在 -80°C 下冷冻储存或立即制备膜供使用。对于表达 β_1 和 β_2 受体的膜的制备, 使细胞沉淀再悬浮于溶胞缓冲液(10 mM HEPES/HCl, 10 mM EDTA, 在 4°C 下 pH 7.4)中, 并使用紧配杜恩斯(Dounce)玻璃匀浆器(30 次冲程)在冰上匀浆。对于对蛋白酶更敏感的表达 β_3 受体的膜, 在溶胞缓冲液(10 mM Tris/HCl, pH 7.4)中匀浆细胞沉淀, 其中每 50 mL 缓冲液补加有一片“完全蛋白酶抑制剂混合片剂和 2 mM EDTA”(罗氏分子生化公司(Roche Molecular Biochemicals), 印第安纳波利斯, IN)。使匀浆在 20,000 x g 下离心, 并通过上述再悬浮和离心用溶胞缓冲液将所形成沉淀洗涤一次。然后使最终沉淀再悬浮于冰冷结合分析缓冲液(75 mM Tris/HCl, pH 7.4, 12.5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA)中。膜悬浮液的蛋白质浓度是通过劳瑞等人, 1951, 生物化学期刊, 193, 265; 和布莱德福特(Bradford), 分析生物化学(Analytical Biochemistry), 1976, 72, 248-54 中所述方法来测定。将全部膜以数等份冷冻储存在 -80

℃下或立即使用。

实例 20

对人类 β_1 、 β_2 和 β_3 肾上腺素能受体的放射性配体结合分析

在 96-孔微滴定板中以 100 μ L 总分析体积使用存于分析缓冲液(75 mM Tris/HCl, pH 7.4, 在 25℃下, 12.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0.2% BSA) 中的含有人类 β_1 、 β_2 或 β_3 肾上腺素能受体的 10-15 μ g 膜蛋白质来进行结合分析。用于测定放射性配体的 K_d 值的饱和结合研究是以介于 0.01 nM 和 20 nM 之间的 10 或 11 种不同浓度针对 β_1 和 β_2 受体使用 [3H]-二氢烯丙洛尔(dihydroalprenolol) (NET-720, 100 Ci/ mmol, 铂金埃尔默生命科学公司, 波士顿, MA) 以及使用 [^{125}I]-(-)-碘氰吲哚洛尔(iodocyanopindolol) (NEX-189, 220 Ci/mmol, 铂金埃尔默生命科学公司, 波士顿, MA) 来进行。用于测定测试化合物 K_i 值的置换分析是针对介于 10 pM 至 10 μ M 之间的 10 或 11 种不同浓度的测试化合物使用 1 nM 的 [3H]-二氢烯丙洛尔和 0.5 nM 的 [^{125}I]-(-)-碘氰吲哚洛尔来进行。非特异性结合是在 10 μ M 普萘洛尔(propranolol)存在下测定。在 37℃下将分析物培养 1 小时, 然后通过经已在 0.3%聚乙烯亚胺中预浸泡的 GF/B (针对 β_1 和 β_2 受体) 或 GF/C 玻璃纤维滤板 (派克(Packard)生物科技公司, 梅里登, CT) (针对 β_3 受体) 快速过滤来终止结合反应。用过滤缓冲液 (75 mM Tris/HCl, 在 4℃下 pH 7.4, 12.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA) 将滤板洗涤三次以去除未结合放射活性。然后使板干燥并添加 50 μ L 微森特-20 液态闪烁流体 (派克生物科技公司, 梅里登, CT), 并且在派克拓普康液体闪烁计数器 (派克生物科技公司, 梅里登, CT) 上对板实施计数。结合数据是通过非线性回归分析以格拉夫派得普锐斯软件包 (格拉夫派得软件公司, 圣地亚哥, CA) 使用单一位点竞争的 3-参数模式来分析。将曲线最低值固定为在 10 μ M 普萘洛尔存在下测定的非特异性结合的数值。测试化合物的 K_i 值是使用程-普鲁萨福方程 (程 Y 和普鲁萨福 WH., 生化药理学, 1973, 22, 23, 3099-108) 自所观测到放射性配体的 IC_{50} 值和 K_d 值来计算。

在此分析中, 较低 K_i 值表示测试化合物对所测试的受体具有较高结合亲和力。发现联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯 (式 I 化合物) 对 β_2 肾上腺素能受体的 K_i 值低于 10 nM, 并且对 β_1 和 β_3 肾上腺素能受体的 K_i 值大于 1000 nM。

实例 21

对毒蕈碱受体亚型的拮抗作用的功能性分析

分析 A - cAMP 积累的激动剂介导抑制的阻断

在此分析中, 测试化合物作为 hM_2 受体拮抗剂的功能性功效是通过测量测试化合物在表达 hM_2 受体的 CHO-K1 细胞中阻断福司柯林(forskolin)介导 cAMP 积累的氧代震颤素抑制的能力来测定。cAMP 分析是根据制造商说明书使用具有 ^{125}I -cAMP (NEN SMP004B, 铂金埃尔默生命科学公司, 波士顿, MA) 的闪光板腺苷酸环化酶活化分析系统在放射性免疫分析格式下进行。用 dPBS 将细胞冲洗一次并用胰蛋白酶-EDTA 溶

液(0.05%胰蛋白酶/0.53 mM EDTA)将细胞提取出来,如上文细胞培养和膜制备部分中所述。通过在 650 x g 下离心五分钟将已分离细胞在 50 mL dPBS 中洗涤两次。然后使细胞沉淀再悬浮于 10 mL dPBS 中,并用 Coulter Z1 双粒子计数器(贝克曼库尔特(Beckman Coulter), 富勒顿, CA)对细胞实施计数。将细胞在 650 x g 下再离心五分钟,并以 1.6×10^6 至 2.8×10^6 个细胞/mL 的分析浓度再悬浮于刺激缓冲液中。

首先以 400 μ M 的浓度使测试化合物溶于稀释缓冲液(补加有 1 mg/mL BSA (0.1%)的 dPBS)中,然后用稀释缓冲液连续性稀释至介于 100 μ M 至 0.1 nM 之间的最终摩尔浓度。以类似方式稀释氧代震颤素。

为测量腺苷酸环化酶活性的氧代震颤素抑制,将 25 μ L 福司柯林(以 25 μ M 最后浓度稀释于 dPBS 中)、25 μ L 经稀释氧代震颤素和 50 μ L 细胞添加至激动剂分析孔中。为测量测试化合物阻断氧代震颤素抑制的腺苷酸环化酶活性的能力,将 25 μ L 福司柯林和氧代震颤素(分别以 25 μ M 和 5 μ M 的最后浓度稀释于 dPBS 中)、25 μ L 经稀释测试化合物和 50 μ L 细胞添加至其余分析孔中。

在 37°C 下将反应物培养 10 分钟,并通过添加 100 μ L 冰冷检测缓冲液终止反应。将板密封,在室温下培养过夜,并在隔天早上在铂金埃尔默拓普康液体闪烁计数器(铂金埃尔默公司, 韦尔兹利, MA)上计数。所产生 cAMP 量(pmol/孔)是根据制造商的使用者手册基于所观测到试样和 cAMP 标准品的计数来计算。数据是通过非线性回归分析以格拉夫派得普锐斯软件包(格拉夫派得软件公司, 圣地亚哥, CA)使用非线性回归单一位点竞争方程来分析。使用程-普鲁萨福方程来计算 K_{obs} , 其中分别使用氧代震颤素浓度-反应曲线的 EC_{50} 和氧代震颤素分析浓度来作为 K_D 和 $[L]$ 。

在此分析中,较低 K_{obs} 值表示测试化合物对所测试的受体具有较高功能性活性。发现联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基]乙基]哌啶-4-基酯(式 I 化合物)在表达 hM₂ 受体的 CHO-K1 细胞中阻断福司柯林介导 cAMP 积累的氧代震颤素抑制的 K_{obs} 值低于约 10 nM。

分析 B -激动剂介导[³⁵S]GTP γ S 结合的阻断

在此功能性分析中,测试化合物作为 hM₂ 受体拮抗剂的功能性功效是通过测量测试化合物在表达 hM₂ 受体的 CHO-K1 细胞中阻断氧代震颤素刺激的[³⁵S]GTP γ S 结合的能力来测定。

在使用时,使冷冻膜解冻,然后以 5-10 μ g 蛋白质/孔的最终目标组织浓度使其稀释于分析缓冲液中。使用保利通 PT-2100 组织破碎器将膜短暂匀浆,然后添加至分析板。

在每个实验中测定激动剂氧代震颤素刺激[³⁵S]GTP γ S 结合的 EC_{90} 值(90%最大反应的有效浓度)。

为测定测试化合物抑制氧代震颤素刺激的[³⁵S]GTP γ S 结合的能力,将以下物质添加至 96 孔板的各孔中: 25 μ L 具有[³⁵S]GTP γ S (0.4nM)的分析缓冲液、25 μ L 氧代震颤

素(EC_{90})和 GDP (3 μ M)、25 μ L 经稀释测试化合物和 25 μ L 表达 hM_2 受体的 CHO 细胞膜。然后在 37°C 下将分析板培养 60 分钟。用经 1% BSA 预处理并且使用铂金埃尔默 96-孔采集器的 GF/B 滤器过滤分析板。用冰冷洗涤缓冲液将板冲洗 3 x 3 秒, 然后风干或真空干燥。将微森特-20 闪烁液体(50 μ L)添加至各孔中, 并将各板密封并在拓普康(铂金埃尔默)上计数放射性活性。数据是通过非线性回归分析以格拉夫派得普锐斯软件包(格拉夫派得软件公司, 圣地亚哥, CA)使用非线性回归单一位点竞争方程来分析。使用程-普鲁萨福方程来计算 K_{obs} , 其中分别使用测试化合物的浓度-反应曲线的 IC_{50} 值和分析中氧代震颤素的浓度作为 K_D 和 $[L]$ (配体浓度)。

在此分析中, 较低 K_{obs} 值表示测试化合物对所测试的受体具有较高功能性活性。发现联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(*R*)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨基甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(式 I 化合物)在表达 hM_2 受体的 CHO-K1 细胞中阻断氧代震颤素刺激的 [35 S]GTP γ S 结合的 K_{obs} 值低于约 10 nM。

分析 C -通过 FLIPR 分析激动剂介导钙释放的阻断

在此功能性分析中, 测试化合物作为 hM_1 、 hM_3 和 cM_5 受体拮抗剂的功能性功效是通过测量测试化合物抑制激动剂介导的细胞内钙增加的能力来测定。

在实施分析之前一晚, 将稳定表达受体的 CHO 细胞接种于 96-孔 FLIPR 板中。使用细胞洗涤器(Cellwash)(MTX 雷勃系统(Labsystems)公司)以 FLIPR 缓冲液(10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM 氯化钙, 2.5 mM 羧苯磺胺(probenecid), 存于不含钙和镁的 Hank 氏缓冲盐溶液(HBSS)中)将所接种细胞洗涤两次以去除生长培养基。在洗涤后, 各孔含有 50 μ L FLIPR 缓冲液。然后, 在 37°C 和 5%二氧化碳下将细胞和 50 μ L/孔 4 μ M FLUO-4AM (制成 2 X 溶液)一起培养 40 分钟。在染料培养期之后, 用 FLIPR 缓冲液将细胞洗涤两次, 在各孔中留下 50 μ L 的最终体积。

测定氧代震颤素对细胞内 Ca^{2+} 释放的剂量依赖性刺激以使得可在 EC_{90} 浓度下针对氧代震颤素刺激来测量测试化合物。首先, 将细胞和化合物稀缓冲液一起培养 20 分钟, 然后添加氧代震颤素。根据下文 FLIPR 测量和数据简化部分中所详述方法, 结合公式 $EC_F = ((F/100-F)^{1/H}) * EC_{50}$ 来获得氧代震颤素的 EC_{90} 值。在刺激板中制备 3 x EC_F 浓度的氧代震颤素以将 EC_{90} 浓度的氧代震颤素添加至测试分析板的各孔中。

用于 FLIPR 的参数是: 0.4 秒的暴露时间、0.5 瓦特的激光强度、488 nm 的攻击波长、和 550 nm 的发射波长。在添加氧代震颤素前, 通过测量 10 秒内的荧光变化来确定基线。在氧代震颤素刺激之后, FLIPR 在 1.5 分钟内每 0.5 至 1 秒连续测量荧光变化以捕获最大荧光变化。

荧光变化表示为各孔的最大荧光减去基线荧光。原始数据是通过非线性回归以格拉夫派得普锐斯(格拉夫派得软件公司, 圣地亚哥, CA)使用 S 形剂量-反应的内建模式针对测试化合物浓度的对数来分析。拮抗剂 K_{obs} 值是根据程-普鲁萨福方程(程和普鲁萨福, 1973)通过普锐斯来测定, 其中使用氧代震颤素 EC_{50} 值作为 K_D 并用氧代震颤素 EC_{90} 作为配体浓度。

在此分析中, 较低 K_{obs} 值表示测试化合物对所测试的受体具有较高功能性活性。发现联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(式 I 化合物)在稳定表达 hM_1 、 hM_3 和 cM_5 受体的 CHO 细胞中对阻断激动剂介导的钙释放的 K_{obs} 值低于约 10 nM。

实例 22

在异源性表达人类 β_1 、 β_2 或 β_3 肾上腺素能受体的 HEK-293 和 CHO 细胞系中实施全细胞 cAMP 闪光板分析

cAMP 分析是根据制造商说明书使用具有 [125 I]-cAMP (NEN SMP004, 铂金埃尔默生命科学公司, 波士顿, MA) 的闪光板腺苷酸环化酶活化分析系统以放射性免疫分析格式来进行。为测定 β_1 和 β_2 受体激动剂功效(EC_{50}), 使稳定表达克隆人类 β_1 和 β_2 受体的 CHO-K1 HEK-293 细胞系在补加有 10% FBS 和遗传霉素(500 μ g/mL)的 DMEM 中生长至几乎汇合。为测定 β_3 受体激动剂功效(EC_{50}), 使稳定表达克隆人类或 β_3 肾上腺素能受体的 CHO-K1 细胞系在补加有 10% FBS 和遗传霉素(250 μ g/mL)的哈莫斯 F-12 培养基中生长至几乎汇合。用 PBS 冲洗细胞并在含有 2 mM EDTA 的 dPBS (达尔贝科(Dulbecco)氏磷酸盐缓冲的盐水, 不含 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$) 或胰蛋白酶-EDTA 溶液 (0.05%胰蛋白酶/0.53 mM EDTA) 中使细胞分离。在 Coulter 细胞计数器中对细胞实施计数后, 通过以 1,000 rpm 离心来使细胞沉淀, 并使细胞在预升温至室温并含有 IBMX 的刺激缓冲液中(铂金埃尔默试剂盒)再悬浮至 1.6×10^6 至 2.8×10^6 个细胞/mL 的浓度。在此分析中, 每孔使用约 40,000 至 80,000 个细胞。在贝克曼贝尔麦克-2000 中, 将测试化合物 (10 mM, 存于 DMSO 中) 稀释至含有 0.1% BSA 的 PBS 中, 并以 100 μ M 至 1 pM 范围内的 11 种不同浓度测试。在 37°C 下将反应物培养 10 分钟, 并通过添加 100 μ L 含有 125 I-cAMP (NEN SMP004, 铂金埃尔默生命科学公司, 波士顿, M.A.) 的冷检测缓冲液来使反应停止。所产生 cAMP 的量 (pmol/孔) 是根据制造商的使用者手册基于所观察到试样和标准品的计数来计算。数据是通过非线性回归分析以格拉夫派得普锐斯软件包(格拉夫派得软件公司, 圣地亚哥, CA)使用 S 形方程进行分析。使用程-普鲁萨福方程(程 Y 和普鲁萨福 WH., 生化药理学, 1973, 22, 23, 3099-108)来计算 EC_{50} 值。

在此分析中, 较低 EC_{50} 值表示测试化合物对受体测试具有较高功能性活性。发现联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基-氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(式 I 化合物)对 β_2 肾上腺素能受体的 EC_{50} 值低于约 10 nM; 对 β_1 肾上腺素能受体的 EC_{50} 值为约 30 nM; 并且对 β_3 肾上腺素能受体的 EC_{50} 值大于 700 nM。

实例 23

以内源性表达人类 β_2 肾上腺素能受体的肺上皮细胞系实施全细胞 cAMP 闪光板分析

在此分析中, 测试化合物的激动剂功效和内在活性是使用表达内源含量的 β_2 肾上腺素能受体的细胞系来测定。在无血清完全培养基(含有肾上腺素和视黄酸的 LHC-9

培养基, 本源国际(Biosource International), 卡马里奥, CA) 中使得自人类肺上皮细胞系(BEAS-2B) (ATCCC RL-9609, 美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection), 马纳萨斯, VA) 的细胞生长至 75-90% 汇合(翟组尔瑞(January) B 等人, 英国药理学期刊(*British Journal of Pharmacology*), 1998, 123, 4, 701-11)。在分析前一天, 将培养基转换成 LHC-8 (无肾上腺素或视黄酸, 本源国际, 卡马里奥, CA)。cAMP 分析是根据制造商说明书使用具有 [125 I]-cAMP 的闪光板腺苷酸环化酶活化分析系统(NEN SMP004, 铂金埃尔默生命科学公司, 波士顿, MA) 以放射性免疫分析格式来进行。

在分析当天, 用 PBS 冲洗细胞, 通过用存于 PBS 中的 5 mM EDTA 磨擦将细胞提取出来并实施计数。通过以 1,000 rpm 离心使细胞沉淀, 并以 600,000 个细胞/mL 的最终浓度使其再悬浮于预热至 37°C 的刺激缓冲液中。在此分析中, 细胞是在 100,000 至 120,000 个细胞/孔的最终浓度下使用。在贝克曼贝尔麦克(Biomek)-2000 中, 将测试化合物连续性稀释至分析缓冲液(75 mM Tris/HCl, 在 25°C 下 pH 7.4, 12.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.2% BSA) 中。在分析中, 以 10 μ M 至 10 pM 范围内的 11 种不同浓度来测试测试化合物。在 37°C 下将反应物培养 10 分钟, 并通过添加 100 μ L 冰冷检测缓冲液来终止反应。将板密封, 在 4°C 下培养过夜并在隔天早上在拓普康闪烁计数器(派克生物科技公司, 梅里登, CT) 中计数。根据制造商的使用者手册中所述, 基于所观察到试样和 cAMP 标准品的计数来计算每 mL 反应物所产生的 cAMP 量。数据是通过非线性回归分析以格拉夫派得普锐斯软件包(格拉夫派得软件公司, 圣地亚哥, CA) 使用 S 形剂量-反应的 4-参数模式来分析。

在此分析中, 较低 EC₅₀ 值表示测试化合物对受体测试具有较高功能性活性。发现与完整 β_2 激动剂异丙基肾上腺素(1.0)相比, 联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基)-2,5-二甲基苯基-氨甲酰基]乙基]哌啶-4-基酯(式 I 化合物) 的 EC₅₀ 值低于 10 nM, 并且内在活性值大于 0.3。

实例 24

用于测定支气管保护性效能和持续时间的爱因托芬(Einthoven)分析

在此分析中, 使用天竺鼠来测定测试化合物的支气管保护性效能和持续时间。此分析是得自爱因托芬(1892) *Pfugers Arch.* 51: 367 – 445; 和默罕默德(Mohammed)等人(2000), 肺脏药理学与治疗学(*Pulm Pharmacol Ther.*), 13(6):287-92 中所述程序。在此分析中, 使用换气压力的变化作为气道阻力的替代量度。在用测试化合物预处理后, 在普萘洛尔存在下使用对静脉内乙酰甲胆碱的支气管收缩剂量-反应曲线来测定毒蕈碱拮抗剂功效。同样地, 使用组胺来测定 β_2 激动剂支气管保护性功效。在不存在普萘洛尔的情况下使用乙酰甲胆碱来测定组合支气管保护性功效。

使用体重在 250 和 400 g 之间的雄性邓肯-哈特利(Duncan-Hartley)天竺鼠(哈兰(Harlan), 印第安纳波利斯, IN) 来进行分析。在全身暴露投与室(R+S 模具, 圣卡洛斯, CA) 中使用 5 mL 投与溶液经 10 分钟通过吸入(IH)投用测试化合物或媒剂(即无

菌水)。使动物暴露于自 LC 星式(Star)雾化罐组(22F51 型, PARI 呼吸设备公司(PARI Respiratory Equipment, Inc.), 中洛锡安(Midlothian), VA)产生并且以 22 psi 的压力通过生物掺合物(Bioblend)(5% CO₂、21% O₂、和 74% N₂ 的混合物)喷出的气溶胶中。在吸入投与后, 在不同时间点评估肺功能。

在分析开始前七十五分钟时, 通过肌肉(IM)注射氯胺酮(43.7 mg/kg)/甲苯噻嗪(3.5 mg/kg)/乙酰丙嗪(1.05 mg/kg)的混合物来使天竺鼠麻醉。根据需要投与此混合物的补充剂量(首次剂量的 50%)。分离颈静脉和颈动脉并用填充盐水的聚乙烯导管(分别为微瑞那散(renathane)和 PE-50, 贝克曼迪金逊(Beckton Dickinson), 斯帕克斯(Sparks), MD)进行插管。将颈动脉连接至压力传感器以允许测量血压, 并且将颈静脉插管用于乙酰甲胆碱或组胺的 IV 注射。然后将气管分割开来, 并用 14G 针头(第 NE-014 号, 小部件(Small Parts), 迈阿密湖, FL)实施插管。一旦完成插管, 使用呼吸器(683 型, 哈佛(Harvard)装置公司, MA)对天竺鼠实施换气, 其中每搏量设定为 1 mL/100 g 体重但不超过 2.5 mL 体积, 并且速率设定 100 搏/分钟。换气压力(VP)是在气管插管中使用连接至贝尔派克(Biopac) (TSD 137C)预放大器的贝尔派克传感器来测量。使用加热垫将体温保持在 37°C。在开始收集数据之前, 以腹腔腔内方式(IP)投与戊巴比妥(pentobarbital) (25 mg/kg)以抑制自主呼吸并获得稳定基线。在贝尔派克窗口(Windows)数据收集界面上记录 VP 变化。经至少 5 分钟收集基线值, 在此之后以非累积方式使用 2 倍增加剂量的支气管收缩剂(乙酰甲胆碱或组胺) IV 攻击天竺鼠。当使用乙酰甲胆碱作为支气管收缩剂时, 用普萘洛尔(5 mg/kg, IV)将动物预处理以隔离测试化合物的抗毒蕈碱效应。在构建对乙酰甲胆碱或组胺的剂量反应曲线前 30 分钟投与普萘洛尔。使用艾克诺类(Acknowledge)数据收集软件(圣巴巴拉(Santa Barbara), CA)记录 VP 的变化。在研究完成后, 使动物安乐死。

以水的 cm 数测量 VP 的变化。VP 的变化(cm H₂O) = 峰值压力(支气管收缩剂攻击后) - 峰值基线压力。使用格拉夫派得普锐斯的窗口 3.00 版(格拉夫派得软件, 圣地亚哥, 加利福尼亚)将对乙酰甲胆碱或组胺的剂量反应曲线拟合至四参数对数方程。使用下列方程:

$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{((\log \text{ID}_{50} - X) \cdot \text{希尔斜率})})$$

其中 X 为剂量的对数, Y 为反应。Y 始于 Min 并且以 S 形形状渐近地到达 Max。

在每种测试化合物剂量下使用以下方程来计算对次极大剂量乙酰甲胆碱或组胺的支气管收缩反应的抑制百分比: 反应的%抑制 = 100 - ((峰值压力(在支气管收缩剂攻击后, 经处理) - 峰值基线压力(经处理)) / (峰值压力(在支气管收缩剂攻击后, 水) - 峰值基线压力(水)) x 100)。使用来自格拉夫派得软件的四参数对数方程拟合抑制曲线。如果适宜, 同样估计 ID₅₀(产生支气管收缩剂反应的 50%抑制所需剂量)和 Emax(最高抑制)。

使用吸入测试化合物后不同时间点的支气管保护强度来估计药效半衰期(PD

$T_{1/2}$)。使用非线性回归拟合以一阶指数衰减方程(格拉夫派得普锐斯, 4.00 版)来测定 PD $T_{1/2}$: $Y = \text{Span} * \exp(-K * X) + \text{稳定期}$; 始于 Span+稳定期并衰减至速率常数为 K 的稳定期。PD $T_{1/2} = 0.69/K$ 。稳定期降低至 0。

在投与后 1.5 小时, 发现联苯-2-基氨基甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲酰氨基-4-羟苯基)-2-羟乙基氨基]甲基}-2,5-二甲基苯基氨甲酰基)乙基]哌啶-4-基酯(式 I 化合物)对乙酰甲胆碱所诱导的支气管收缩和组胺所诱导的支气管收缩两者的 ID_{50} 低于约 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

此外, 当以单一次极大剂量(100 $\mu\text{g/mL}$)投与时, 此化合物在最长约 72 小时内产生显著支气管保护。在此分析中, 沙美特罗(3 $\mu\text{g/mL}$, IH) (β_2 肾上腺素能受体激动剂) 在 6 至 14 小时内表现显著支气管保护; 并且噻托铵(10 $\mu\text{g/mL}$) (毒蕈碱受体拮抗剂) 在大于 72 小时内表现显著支气管保护。

虽然已参考其特定方面或实施例来描述本发明, 但熟习此项技术者应理解, 在不偏离本发明的真实精神和范围的情况下可进行各种改变或可取代等效内容。此外, 根据适用专利法和条例所允许的程度, 本文中所引用的所有出版物、专利和专利申请案都是全文以引用方式并入本文中, 其并入程度如同每个文件均单独地以引用方式并入本文中一般。

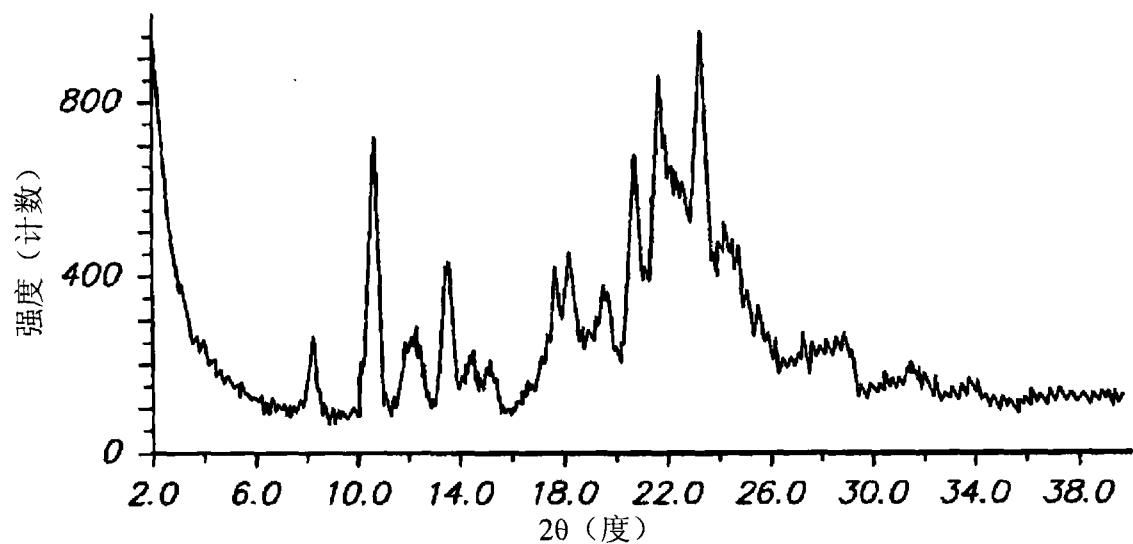


图 1

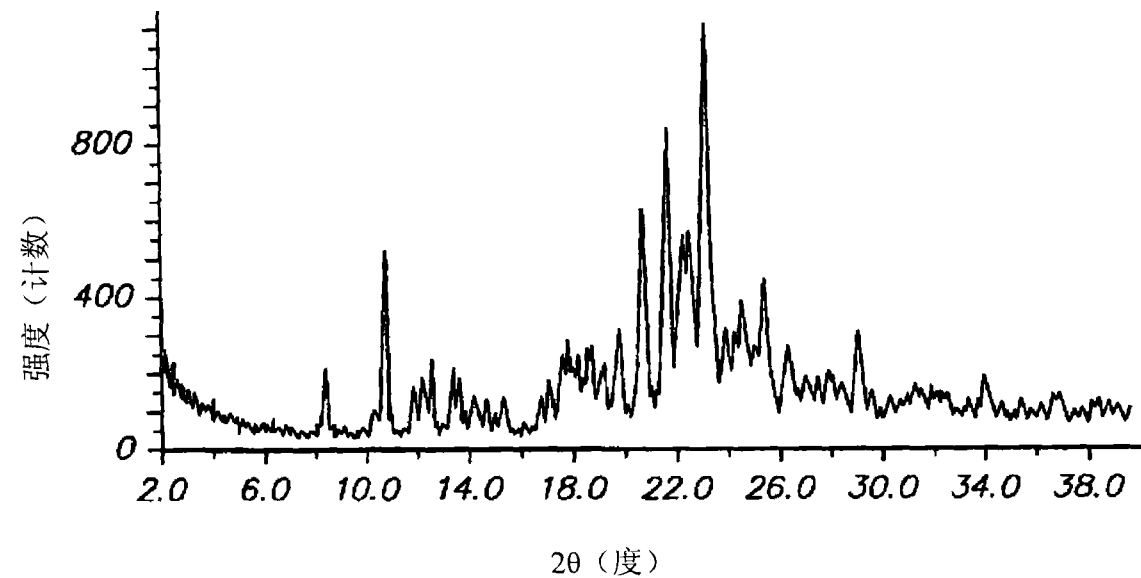


图 2

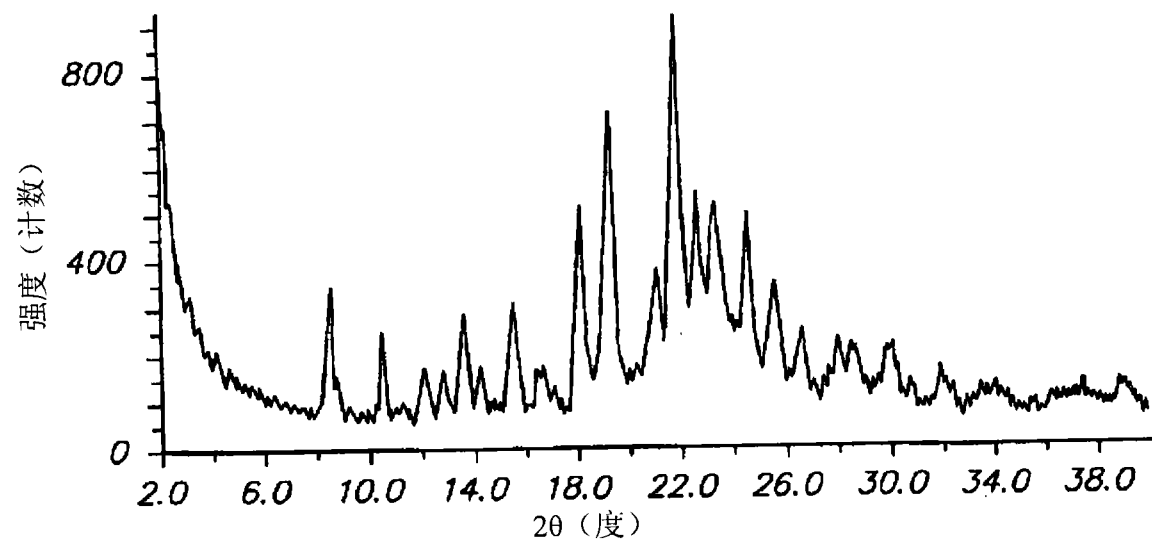


图 3

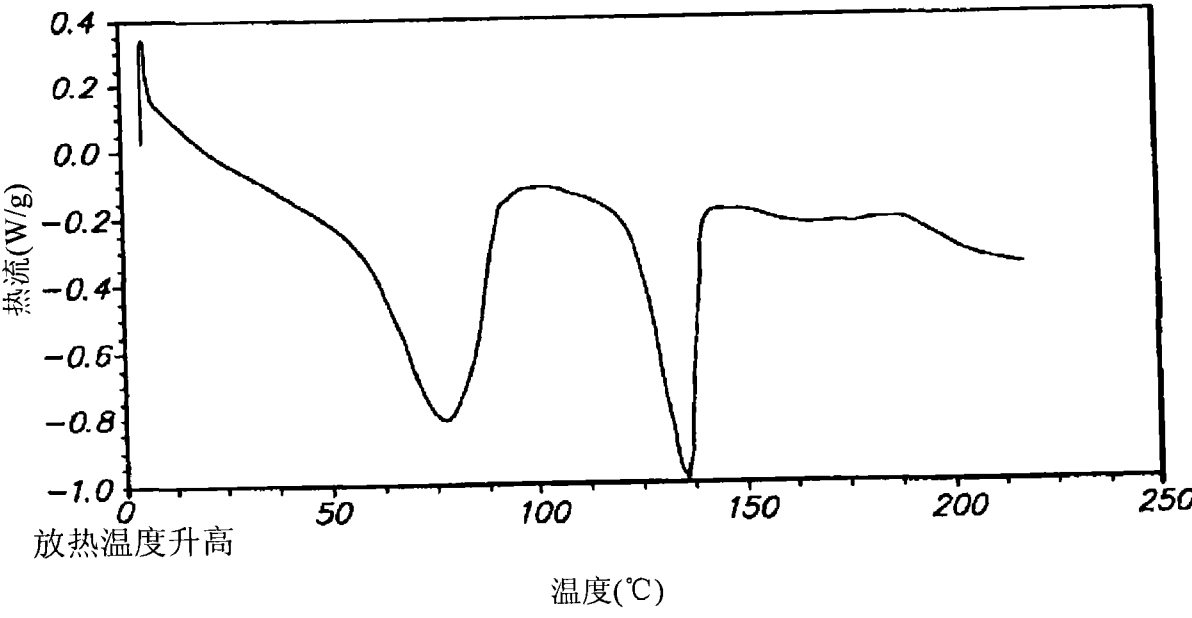


图 4

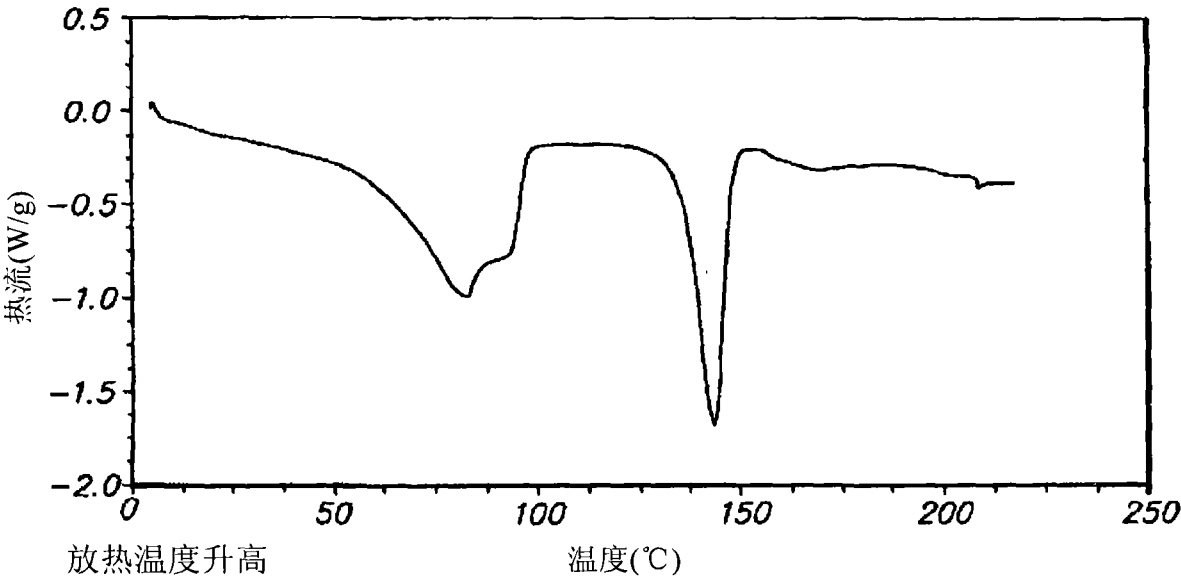


图 5

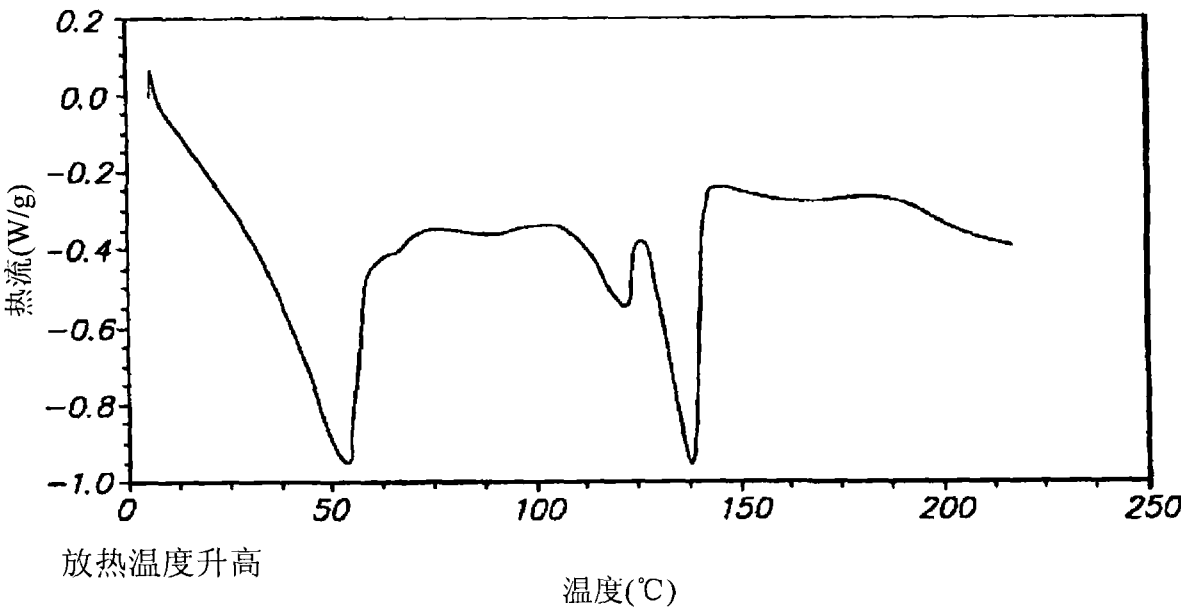


图 6

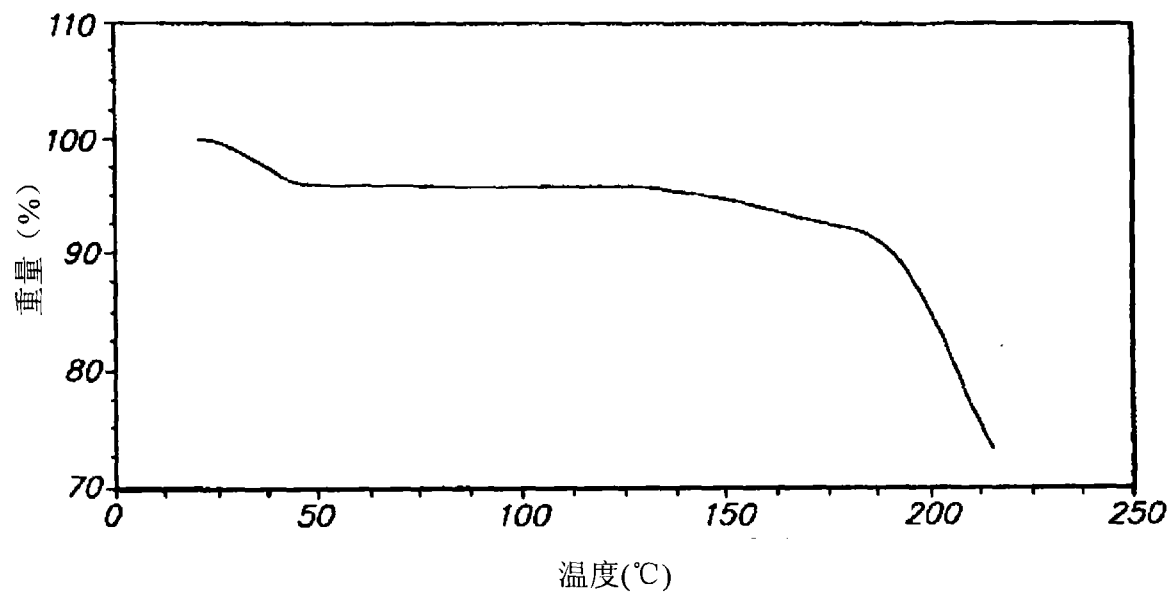


图 7

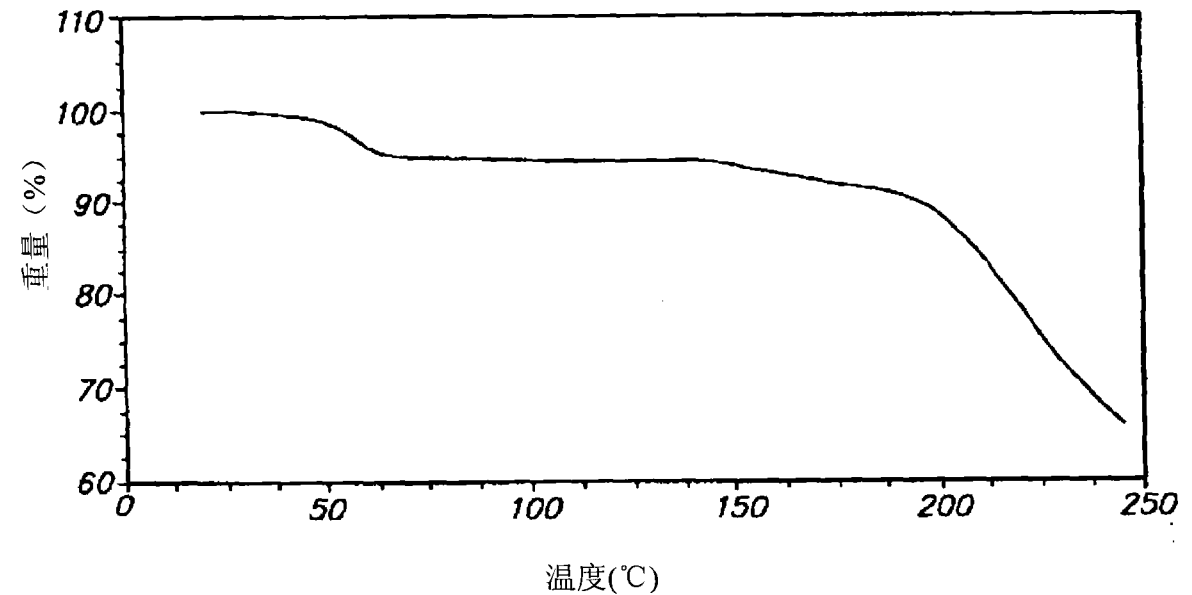


图 8

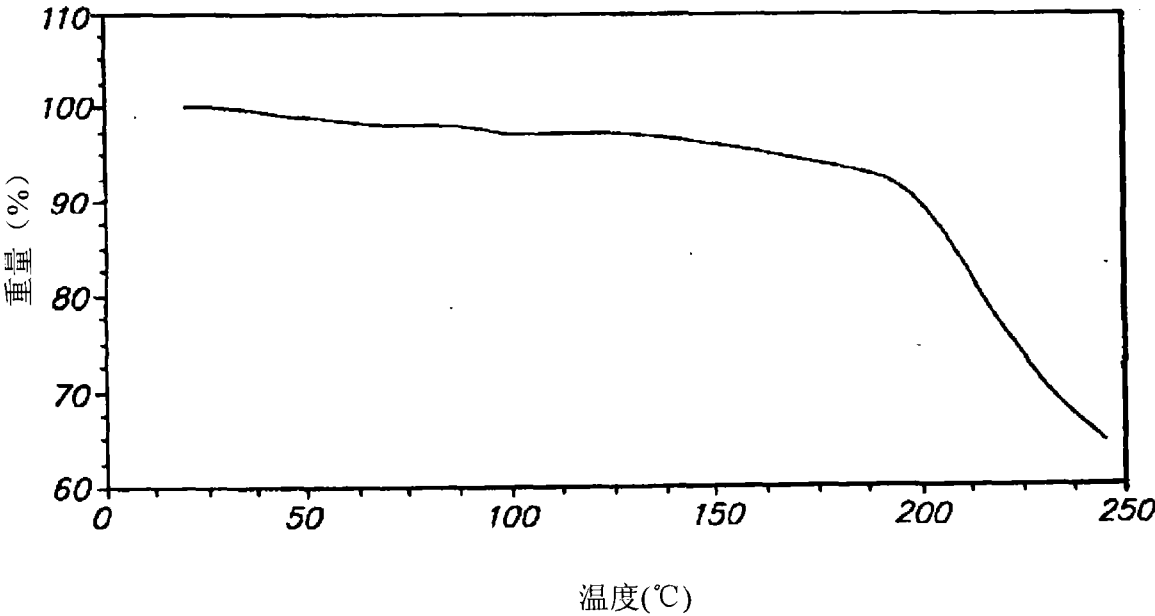


图 9

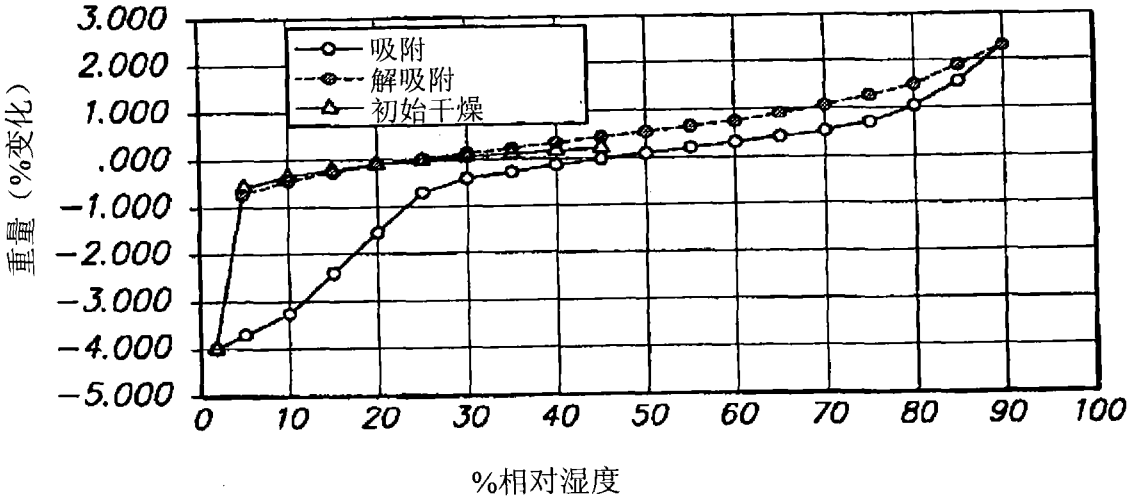


图 10

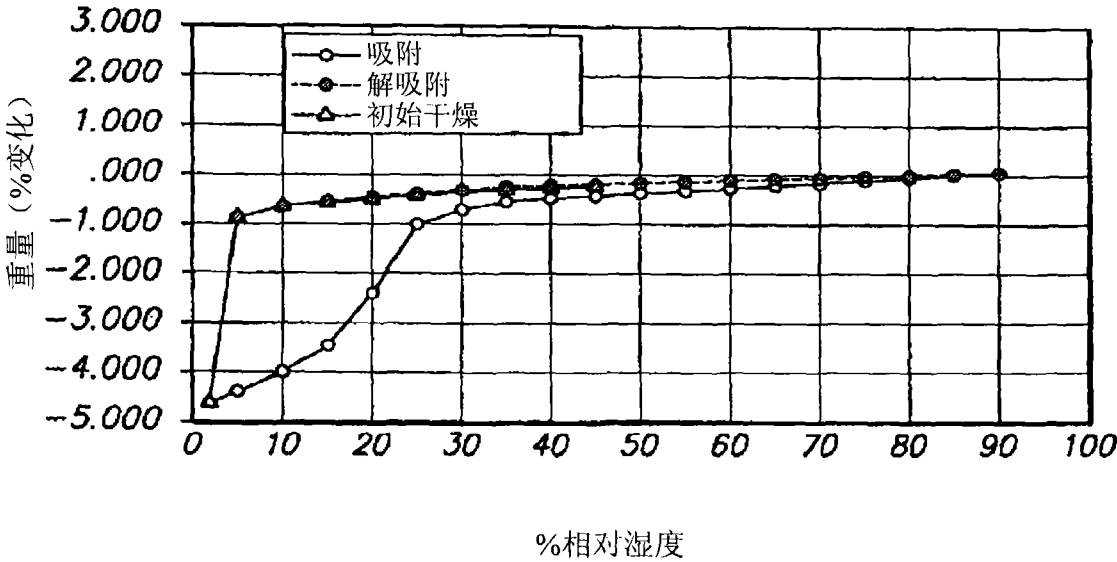


图 11

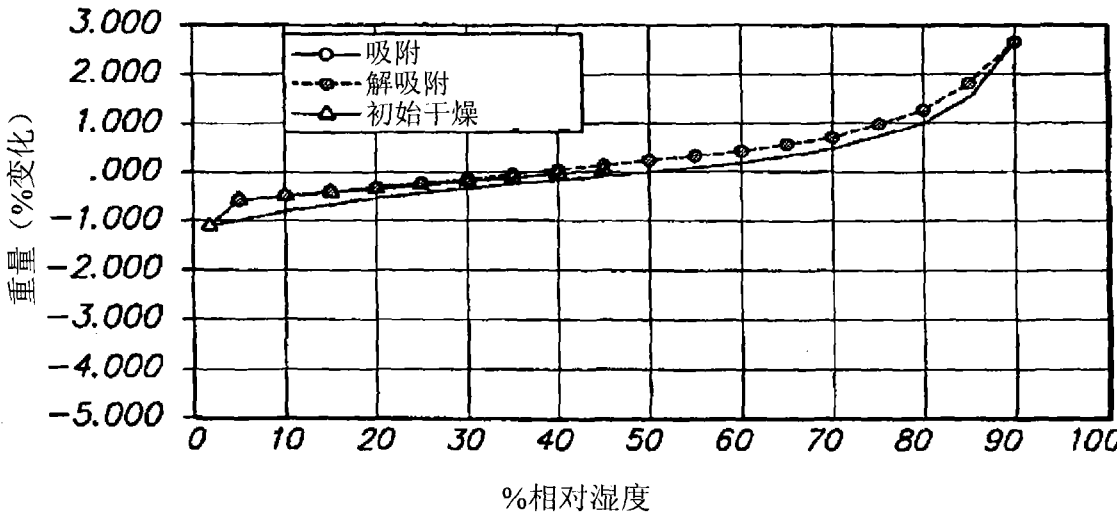


图 12