



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101312967 B

(45) 授权公告日 2011.08.24

(21) 申请号 200680043313.9

(22) 申请日 2006.11.21

(30) 优先权数据

60/738,702 2005.11.22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.05.20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/045099 2006.11.21

(87) PCT申请的公布数据

W02007/062058 EN 2007.05.31

(73) 专利权人 施万制药

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 丹尼尔·朗 崔锡基

保罗·R·法瑟雷

亚当·戈德布卢姆 丹尼尔·马凯斯

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 刘国伟

(51) Int. Cl.

C07D 451/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61K 31/46 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 0908459 A1, 1999.04.14, 说明书1-8页.

EP 0710662 A1, 1996.05.08, 说明书1-13页.

WO 2005080389 A1, 2005.09.01, 说明书1-11页.

审查员 宫方斌

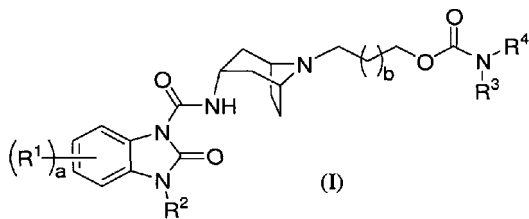
权利要求书 3 页 说明书 33 页

(54) 发明名称

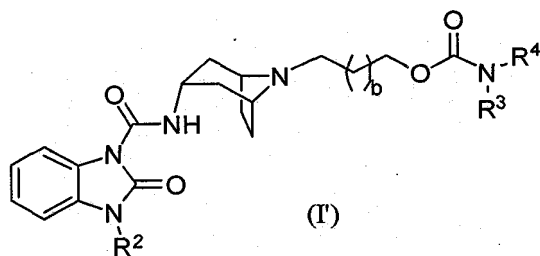
作为 5-HT₄ 受体激动剂的氨基甲酸酯化合物

(57) 摘要

本发明提供式 (I) 的新颖苯并咪唑酮-羧酰胺衍生的氨基甲酸酯 5-HT₄受体激动剂化合物: 其中 R¹、R²、R³、R⁴、a 和 b 在揭示内容中定义。本发明也提供包含所述化合物的医药组合物、使用所述化合物治疗与 5-HT₄受体活性相关的疾病的方法、和用于制备所述化合物的方法和中间体。



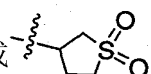
1. 一种式 (I') 化合物或其医药学上可接受的盐,



其中:

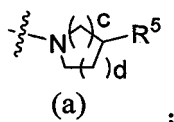
R² 为异丙基;

R³ 为 C₁₋₃ 烷基;且

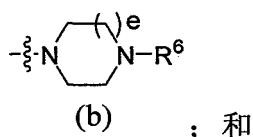
R⁴ 为 $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ 或 ,

或 R³ 和 R⁴ 连同与其连接的氮原子形成选自下列的部分:

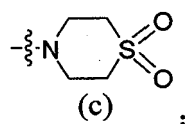
(i) 式 (a) 的部分:



(ii) 式 (b) 的部分:



(iii) 式 (c) 的部分:



其中:

R⁵ 为 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$;

R⁶ 为 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^f$ 、 $-(\text{CH}_2)_2\text{OR}^g$ 或 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^a\text{R}^b$;

R^a、R^b 和 R^g 独立地为氢或甲基;

R^f 为甲基、四氢呋喃基或 $-\text{NR}^a\text{R}^b$;

b 为 1;

c 为 1 或 2;

d 为 1;且

e 为 1。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物或其医药学上可接受的盐,其中 R³ 和 R⁴ 连同与其连接的氮原子形成式 (b) 的部分,其中 R⁶ 为 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^f$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物或其医药学上可接受的盐,其中所述化合物选自:

4-(四氢呋喃-2-羰基)哌嗪-1-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,

3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环-[3.2.1]辛-8-基}丙酯;

4-(2-羟乙基)哌嗪-1-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环-[3.2.1]辛-8-基}丙酯;

4-乙酰基-哌嗪-1-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢-苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环 [3.2.1] 辛-8-基}丙酯;

4-二甲基氨基甲酰基氧基哌啶-1-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂-双环 [3.2.1] 辛-8-基}丙酯;

3-氨基甲酰基哌啶-1-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢-苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环 [3.2.1] 辛-8-基}丙酯;

1,1-二氧代-1 λ^6 -硫代吗啉-4-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环 [3.2.1] 辛-8-基}丙酯;

(1,1-二氧代四氢-1 λ^6 -噻吩-3-基)甲基氨基甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环-[3.2.1]辛-8-基}丙酯;

(R)-2-氨基甲酰基吡咯烷-1-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环 [3.2.1] 辛-8-基}丙酯;

二甲基氨基甲酰基甲基-甲基氨基甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环 [3.2.1] 辛-8-基}丙酯;

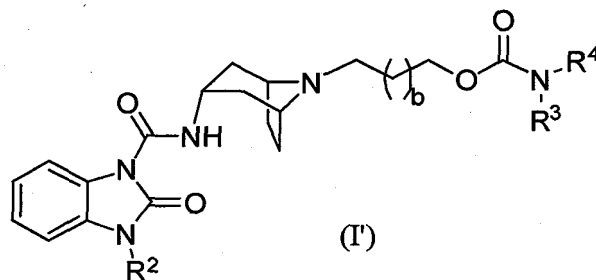
4-二甲基氨基甲酰基哌嗪-1-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环 [3.2.1] 辛-8-基}丙酯;和

4-二甲基胺磺酰基哌嗪-1-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环 [3.2.1] 辛-8-基}丙酯。

4. 根据权利要求1所述的化合物或其医药学上可接受的盐,其中所述化合物为1,1-二氧代-1 λ^6 -硫代吗啉-4-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环 [3.2.1] 辛-8-基}丙酯。

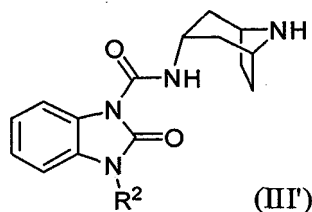
5. 一种医药组合物,其包含治疗有效量的根据权利要求1至4中任一权利要求所述的化合物和医药学上可接受的载剂。

6. 一种用于制备式(I')化合物的方法:

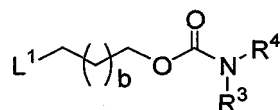


其中 R^2 、 R^3 、 R^4 和 b 如权利要求1中所定义,所述方法包含:

(a) 使式(III')化合物:

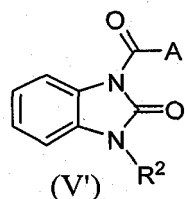


与式 (IV) 化合物反应：

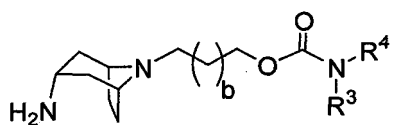


(IV)

其中 L¹ 为离去基团；或
(b) 使式 (V') 化合物：



其中 A 为离去基团；
与式 (VI) 化合物反应：



(VI)

以提供式 (I') 化合物。

7. 一种根据权利要求 1 至 4 中任一权利要求所述的化合物的用途，其用于制备用于治疗哺乳动物中的与 5-HT₄ 受体活性相关的医学病况的药剂。

8. 根据权利要求 7 所述的用途，其中所述医学病况为肠易激综合征、慢性便秘、功能性消化不良、胃排空延迟、胃食管反流病、胃轻瘫、手术后肠梗阻、肠假性阻塞或药物诱发性延迟传输。

9. 一种根据权利要求 1 至 4 中任一权利要求所述的化合物的用途，其用于制备用于治疗胃肠道活动性降低的病况的药剂，其中所述活动性降低的病况为慢性便秘、便秘型肠易激综合征、糖尿病性和自发性胃轻瘫或功能性消化不良。

作为 5-HT₄ 受体激动剂的氨基甲酸酯化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用作 5-HT₄ 受体激动剂的苯并咪唑酮-羧酰胺衍生的氨基甲酸酯化合物。本发明也涉及包含所述化合物的医药组合物、使用所述化合物用于治疗或防止由 5-HT₄ 受体活性介导的医学病况的方法，和用于制备所述化合物的方法和中间体。

背景技术

[0002] 血清素 (5-羟基色胺, 5-HT) 为广泛分布在整个身体 (同时在中枢神经系统和周边系统两者中) 的神经传递素。已识别至少七种血清素受体的亚型, 且血清素与这些不同受体的相互作用与多种生理功能相关联。因此, 实质上关注于开发靶向特异性 5-HT 受体亚型的治疗剂。

[0003] 具体来说, 5-HT₄ 受体的表征和与其相互作用的药剂的识别已成为重大新近活动的焦点。(例如参看 Langlois 和 Fischmeister 的综述, 药物化学杂志 (J. Med. Chem.) 2003, 46, 319-344。)5-HT₄ 受体激动剂用于治疗胃肠道活动性降低的病况。所述病况包括肠易激综合征 (IBS)、慢性便秘、功能性消化不良、胃排空延迟、胃食管反流病 (GERD)、胃轻瘫、手术后肠梗阻、肠假性阻塞和药物诱发性延迟传输。另外, 建议某些 5-HT₄ 受体激动剂化合物可用于治疗包括认知病症、行为病症、情感病症和自主功能控制病症的中枢神经系统病症。

[0004] 尽管调节 5-HT₄ 受体活性的药剂有广泛效用, 但目前仅少数 5-HT₄ 受体激动剂化合物用于临床用途中。

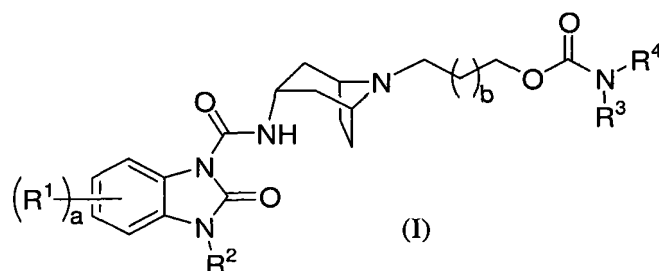
[0005] 因此, 需要以最小副作用达到其所要效应的新颖 5-HT₄ 受体激动剂。优选药剂可拥有 (除其它特性以外) 改良的选择性、效能、药物动力学特性和 / 或作用持续时间。

发明内容

[0006] 本发明提供一种新颖化合物, 其具有 5-HT₄ 受体激动剂活性。除其它特性以外, 已发现本发明的化合物为有效和选择性 5-HT₄ 受体激动剂。另外, 发现本发明的化合物展现在口服投药后预期具有良好生物可用性的有利药物动力学特性。

[0007] 因此, 本发明提供一种式 (I) 化合物:

[0008]



[0009] 或其医药学上可接受的盐或溶剂合物或立体异构体,

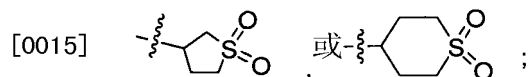
[0010] 其中:

[0011] R¹ 为卤基或 C₁₋₃ 烷基, 其中 C₁₋₃ 烷基视情况经羟基或卤基取代;

[0012] R^2 为氢或 C_{1-3} 烷基, 其中 C_{1-3} 烷基视情况经羟基取代;

[0013] R^3 为 C_{1-3} 烷基或氢;

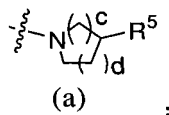
[0014] R^4 为 $-(CH_2)_{1-3}C(O)NR^aR^b$,



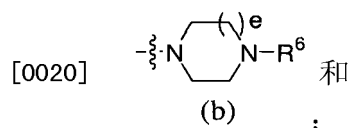
[0016] 或 R^3 和 R^4 连同与其连接的氮原子形成一部分, 所述部分选自:

[0017] (i) 式 (a) 的部分:

[0018]

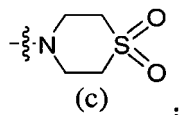


[0019] (ii) 式 (b) 的部分:



[0021] (iii) 式 (c) 的部分:

[0022]



[0023] 其中:

[0024] R^5 为 $-OC(O)NR^aR^b$ 、 $-C(O)NR^aR^b$ 、 $-NR^dS(O)_2C_{1-3}$ 烷基、 $-NR^dC(O)R^c$ 、 $-NR^dS(O)_2NR^aR^b$ 或 $-NR^dC(O)OR^e$;

[0025] R^6 为 $-C(O)R^f$ 、 $-(CH_2)_2OR^g$ 、 $-S(O)_2NR^aR^b$ 、 $-S(O)_2C_{1-3}$ 烷基或 $-S(O)_2(CH_2)_{1-3}S(O)_2C_{1-3}$ 烷基;

[0026] R^a 、 R^b 和 R^c 独立地为氢或 C_{1-3} 烷基;

[0027] R^d 为氢或 C_{1-3} 烷基, 其中 C_{1-3} 烷基视情况经羟基取代;

[0028] R^e 为 C_{1-3} 烷基;

[0029] R^f 为氢、 C_{1-3} 烷基、四氢呋喃基或 $-NR^aR^b$;

[0030] R^g 为氢或 C_{1-3} 烷基;

[0031] a 为 0、1 或 2;

[0032] b 为 0、1、2 或 3;

[0033] c 为 0、1 或 2;

[0034] d 为 1 或 2; 且

[0035] e 为 1 或 2;

[0036] 其限制条件为当 c 为 0 时, 则 d 为 2, 且 R^5 为 $-C(O)NR^aR^b$; 且当 c 为 2 时, 则 d 为 1。

[0037] 本发明也提供一种包含本发明的化合物和医药学上可接受的载剂的医药组合物。

[0038] 此外, 本发明提供一种治疗与 $5-HT_4$ 受体活性相关的疾病或病况 (例如, 胃肠道活动性降低的病况) 的方法, 所述方法包含投与哺乳动物治疗有效量的化合物或本发明的医药组合物。

[0039] 本发明的化合物也可用作研究工具（也就是用以研究生物系统或样品或用于研究其它化合物的活性）。因此，在其方法方面的另一者中，本发明提供一种使用式 (I) 化合物或其医药学上可接受的盐或溶剂合物或立体异构体作为用于研究生物系统或样品或用于发现新颖 5-HT₄ 受体激动剂的研究工具的方法，所述方法包含使生物系统或样品与本发明的化合物接触且测定由所述化合物对于生物系统或样品引起的效应。

[0040] 在独立和不同方面中，本发明也提供用于制备本发明的化合物的本文所述的合成方法和中间体。

[0041] 本发明也提供一种如本文所述用于药物治疗中的本发明的化合物，以及本发明的化合物在制造供治疗哺乳动物与 5-HT₄ 受体活性相关的疾病或病况（例如，胃肠道活动性降低的病况）的调配物或药剂中的用途。

附图说明

[0042] 无

具体实施方式

[0043] 本发明提供一种式 (I) 的新颖苯并咪唑酮 - 羧酰胺衍生的氨基甲酸酯 5-HT₄ 受体激动剂，或其医药学上可接受的盐或溶剂合物或立体异构体。以下取代基和值意欲提供本发明的多个方面的代表性实例。这些代表值意欲进一步定义所述方面，且不欲排除其它值或限制本发明的范畴。

[0044] 在本发明的特定方面中，R¹ 为卤基或 C₁₋₃ 烷基；或 R¹ 为氟基、氯基、溴基或甲基。

[0045] 在一特定方面中，R² 为氢。

[0046] 在另一特定方面中，R² 为 C₁₋₃ 烷基，其中 C₁₋₃ 烷基视情况经羟基取代。

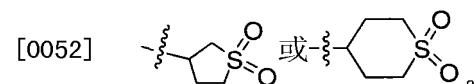
[0047] 在又一特定方面中，R² 为氢或 C₁₋₃ 烷基。

[0048] 在本发明的其它特定方面中，R² 为甲基、乙基、丙基或异丙基；R² 为乙基或异丙基；或 R² 为异丙基。

[0049] 在特定方面中，R³ 为 C₁₋₃ 烷基；R³ 为甲基或乙基；或 R³ 为甲基。

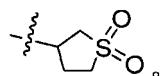
[0050] 在一特定方面中，R⁴ 为 -(CH₂)₁₋₃C(O)NR^aR^b。

[0051] 在另一特定方面中，R⁴ 为



[0053] 在另一特定方面中，R⁴ 为 -(CH₂)₁₋₃C(O)NR^aR^b 或

[0054]



[0055] 在本发明的一特定方面中，R³ 和 R⁴ 连同与其连接的氮原子形成选自式 (a) 的部分、式 (b) 的部分和式 (c) 的部分的部分。

[0056] 在一特定方面中，R³ 和 R⁴ 连同与其连接的氮原子形成式 (a) 的部分。在另一特定方面中，R³ 和 R⁴ 连同与其连接的氮原子形成式 (a) 的部分，其中 R⁵ 为 -OC(O)NR^aR^b 或 -C(O)NR^aR^b。

[0057] 在一特定方面中, R^3 和 R^4 连同与其连接的氮原子形成式 (b) 的部分。在其它特定方面中, R^3 和 R^4 连同与其连接的氮原子形成式 (b) 的部分, 其中 R^6 为 $-C(O)R^f$ 、 $-(CH_2)_2OR^g$ 或 $-S(O)_2NR^aR^b$; 或 R^6 为 $-C(O)R^f$, 且 e 为 1。

[0058] 在本发明的又一方面中, R^3 和 R^4 连同与其连接的氮原子形成式 (c) 的部分。

[0059] 在特定方面中, R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 和 R^e 独立地为氢、甲基或乙基; 或 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 和 R^e 独立地为氢或甲基。

[0060] 在特定方面中, R^e 为甲基或乙基; 或 R^e 为甲基。

[0061] 在特定方面中, R^f 为 C_{1-3} 烷基、四氢呋喃基或 $-NR^aR^b$ 或 R^f 为甲基、四氢呋喃基或 $-NR^aR^b$ 。

[0062] 在另一特定方面中, R^f 为四氢呋喃基。

[0063] 在其它特定方面中, R^f 为 C_{1-3} 烷基或 R^f 为甲基。

[0064] 在又一特定方面中, R^f 为 $-NR^aR^b$, 其中 R^a 和 R^b 如本文所定义。

[0065] 在特定方面中, a 为 0 或 1; 或 a 为 0 或 2。在另一特定方面中, a 为 0。

[0066] 在特定方面中, b 为 0、1 或 2; 或 b 为 1 或 2。在另一特定方面中, b 为 1。

[0067] 在一特定方面中, c 为 1 或 2。在另一特定方面中, c 为 1。

[0068] 在一特定方面中, d 为 1。

[0069] 在一特定方面中, e 为 1。

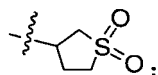
[0070] 在一方面中, 本发明提供一种式 (I) 化合物, 其中 c 为 1 或 2; d 为 1; 且 e 为 1。

[0071] 在另一方面中, 本发明提供一种式 (I) 化合物, 其中:

[0072] R^3 为 C_{1-3} 烷基; 且

[0073] R^4 为 $-(CH_2)_{1-3}C(O)NR^aR^b$ 或

[0074]



[0075] 或 R^3 和 R^4 连同与其连接的氮原子形成一选自式 (a) 的部分、式 (b) 的部分和式 (c) 的部分的部分;

[0076] 其中:

[0077] R^5 为 $-OC(O)NR^aR^b$ 或 $-C(O)NR^aR^b$; 且

[0078] R^6 为 $-C(O)R^f$ 、 $-(CH_2)_2OR^g$ 或 $-S(O)_2NR^aR^b$ 。

[0079] 在又一方面中, 本发明提供一种式 (I) 化合物, 其中 R^3 和 R^4 连同与其连接的氮原子形成选自式 (a) 的部分、式 (b) 的部分和式 (c) 的部分的部分; 其中:

[0080] R^5 为 $-OC(O)NR^aR^b$ 或 $-C(O)NR^aR^b$;

[0081] R^6 为 $-C(O)R^f$ 、 $-(CH_2)_2OR^g$ 或 $-S(O)_2NR^aR^b$;

[0082] R^a 、 R^b 和 R^g 独立地为氢或甲基;

[0083] R^f 为甲基、四氢呋喃基或 $-NR^aR^b$;

[0084] c 为 1 或 2; d 为 1; 且 e 为 1。

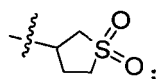
[0085] 在又一方面中, 本发明提供一种式 (I) 化合物, 其中:

[0086] R^2 为乙基或异丙基;

[0087] R^3 为 C_{1-3} 烷基; 且

[0088] R^4 为 $-(CH_2)_{1-3}C(O)NR^aR^b$ 或

[0089]



[0090] 或 R^3 和 R^4 连同与其连接的氮原子形成选自式 (a) 的部分、式 (b) 的部分和式 (c) 的部分的部分；其中：

[0091] R^5 为 $-OC(O)NR^aR^b$ 或 $-C(O)NR^aR^b$ ；

[0092] R^6 为 $-C(O)R^f$ 、 $-(CH_2)_2OR^g$ 或 $-S(O)_2NR^aR^b$ ；

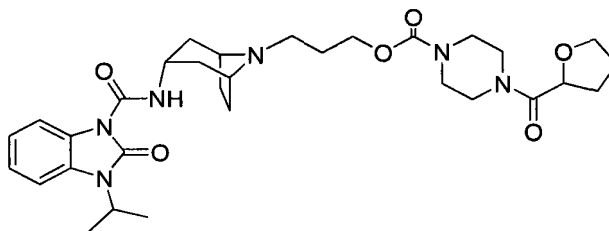
[0093] R^a 、 R^b 和 R^g 独立地为氢或甲基；

[0094] R^f 为甲基、四氢呋喃基或 $-NR^aR^b$ ；

[0095] a 为 0；c 为 1 或 2；d 为 1；且 e 为 1。

[0096] 说明本文所用的化学命名惯例用于实例 1 的化合物：

[0097]



[0098] 根据由 MDL 信息系统 (MDL Information Systems), GmbH (德国法兰克福) 所提供的 AutoNom 软件, 将其命名为 4-(四氢呋喃-2-羰基)哌嗪-1-甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂-双环[3.2.1]辛-8-基)丙酯。符号 (1S, 3R, 5R) 描述与双环系统相关的键的相对方位, 所述键描绘成为实心和虚线楔形。在上述本发明的所有化合物中, 苯并咪唑酮-羧酰胺相对氮杂双环辛烷基为内向。

[0099] 可特别提及以下化合物：

[0100] 4-(四氢呋喃-2-羰基)哌嗪-1-甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环-[3.2.1]辛-8-基)丙酯；

[0101] 4-(2-羟乙基)哌嗪-1-甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环-[3.2.1]辛-8-基)丙酯；

[0102] 4-乙酰基-哌嗪-1-甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢-苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基)丙酯；

[0103] 4-二甲基氨基甲酰基氧基哌啶-1-甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂-双环[3.2.1]辛-8-基)丙酯；

[0104] 3-氨基甲酰基哌啶-1-甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢-苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基)丙酯；

[0105] 1,1-二氧化-1 λ^6 -硫代吗啉-4-甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基)丙酯；

[0106] (1,1-二氧化四氢-1 λ^6 -噻吩-3-基)甲基氨基甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环-[3.2.1]辛-8-基)丙

酯；

[0107] (R)-2-氨基甲酰基吡咯烷-1-甲酸3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基}丙酯；

[0108] 4-乙酰基-[1,4]二氮杂环庚烷-1-甲酸3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢-苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基}丙酯；

[0109] 二甲基氨基甲酰基甲基-甲基氨基甲酸3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基}丙酯；

[0110] 4-二甲基氨基甲酰基哌嗪-1-甲酸3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基}丙酯；和

[0111] 4-二甲基胺磺酰基哌嗪-1-甲酸3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基}丙酯。

[0112] 如由上述列出的特定化合物所示范，本发明的化合物可含有一个或一个以上手性中心。因此，除非另外指出，否则本发明包括外消旋混合物、纯立体异构体和所述异构体的立体异构体富集的混合物。当展示特定立体异构体时，所属领域的技术人员应了解，除非另外指出，否则较小量的其它立体异构体可存在于本发明的组合物中，其限制条件为组合物作为整体的任何效用并未由所述其它异构体的存在消除。

[0113] 定义

[0114] 当描述本发明的化合物、组合物和方法时，除非另外指出，否则以下术语具有以下含义。

[0115] 术语“烷基”意思是单价饱和烃基，其可为直链或分枝链或其组合。代表性烷基包括（例如）甲基、乙基、正丙基（n-Pr）、异丙基（i-Pr）、正丁基（n-Bu）、仲丁基、异丁基、叔丁基等等。

[0116] 术语“卤基”意思是氟基、氯基、溴基或碘基。

[0117] 术语“化合物”意思是合成制备或以任何其它方法（诸如通过代谢作用）产生的化合物。

[0118] 术语“治疗有效量”意思是当投与需要治疗的患者时足以实现治疗的量。

[0119] 如本文所用的术语“治疗”意思是治疗诸如哺乳动物（尤其为人类）的患者的疾病、病症或医学病况，其包括：

[0120] (a) 防止疾病、病症或医学病况发生，也就是患者的预防治疗；

[0121] (b) 改善疾病、病症或医学病况，也就是消除或引起患者的疾病、病症或医学病况的消退；

[0122] (c) 抑制疾病、病症或医学病况，也就是减慢或阻止患者的疾病、病症或医学病况的发展；或

[0123] (d) 减轻患者的疾病、病症或医学病况的症状。

[0124] 术语“医药学上可接受的盐”意思是由酸或碱制备的可接受用于给患者（诸如哺乳动物）投药的盐。所述盐可衍生自医药学上可接受的无机或有机酸和来源于医药学上可接受的碱。通常，本发明化合物的医药学上可接受的盐由酸制备。

[0125] 衍生自医药学上可接受的酸的盐包括（但不限于）乙酸、己二酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、反丁烯二酸、葡萄糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、乳酸、顺丁烯

二酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、泛酸、磷酸、丁二酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸、羟-2-萘甲酸(xinafoic)(1-羟基-2-萘甲酸)、萘-1,5-二磺酸等等。

[0126] 术语“溶剂合物”意思是由溶质(也就是本发明的化合物或其医药学上可接受的盐)的一个或一个以上分子和溶剂的一个或一个以上分子形成的络合物或聚集体。所述溶剂合物通常为具有实质上固定的溶质与溶剂摩尔比的结晶固体。代表性溶剂包括例如水、甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸等等。当溶剂为水时,形成的溶剂合物为水合物。

[0127] 应了解术语“或其医药学上可接受的盐或溶剂合物或立体异构体”意欲包括盐、溶剂合物和立体异构体的所有排列组合,诸如式(I)化合物的立体异构体的医药学上可接受盐的溶剂合物。

[0128] 术语“离去基团”意思是在诸如亲核取代反应的取代反应中可由另一官能团或原子置换的官能团或原子。例如,代表性离去基团包括氯基、溴基和碘基;诸如甲磺酸酯基、甲苯磺酸酯基、溴苯磺酸酯基、硝基苯磺酸酯基等等的磺酸酯基;诸如乙酰氧基、三氟乙酰氧基等等的酰氧基。术语“离去基团”进一步包括诸如 $-\text{OC}_6\text{F}_5$ 、 $-\text{CCl}_3$ 、对 $-\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ 和咪唑基的基团。

[0129] 术语“其经保护的衍生物”意思是指定化合物的衍生物,其中化合物的一个或一个以上官能团经保护基或阻隔基保护免于不需要的反应。可被保护的官能团包括(例如)羧酸基、氨基、羟基、硫醇基、羰基等等。羧酸的代表性保护基包括酯类(诸如对甲氧基苯甲酯)、酰胺类和酰肼类;氨基的代表性保护基包括氨基甲酸酯类(诸如叔丁氧基羰基)和酰胺类;羟基的代表性保护基包括醚类和酯类;硫醇基的代表性保护基包括硫醚类和硫酯类;羰基的代表性保护基包括缩醛类和缩酮类;等等。所属领域的技术人员熟知所述保护基,且描述于(例如)T. W. Greene和G. M. Wuts有机合成中的保护基(Protecting Groups in Organic Synthesis),第三版,Wiley,纽约(New York),1999和其中引用的文献中。

[0130] 术语“氨基保护基”意思是适合于防止氨基氮上的不想要的反应的保护基。代表性氨基保护基包括(但不限于)甲酰基;例如烷酰基的酰基,诸如乙酰基;烷氧羰基,诸如叔丁氧基羰基(Boc);芳基甲氧基羰基,诸如苯甲氧基羰基(Cbz)和9-苄基甲氧基羰基(Fmoc);芳甲基,诸如苯甲基(Bn)、三苯甲基(Tr)和1,1-二-(4'-甲氧基苯基)甲基;硅烷基,诸如三甲基硅烷基(TMS)和叔丁基二甲基硅烷基(TBDMS);等等。

[0131] 通用合成程序

[0132] 本发明的化合物可使用以下通用方法和程序由易得的起始物质来制备。尽管本发明的特定方面于以下流程中说明,但所属领域的技术人员会认可本发明的所有方面可使用本文所述的方法制备或通过使用所属领域的技术人员已知的其它方法、试剂和起始物质来制备。也应了解在给定典型或优选方法条件(也就是反应温度、时间、试剂的摩尔比、溶剂、压力等)的情况下,除非另外规定否则也可使用其它方法条件。最佳反应条件可随所用的特殊试剂或溶剂而变化,但所属领域的技术人员可由路线最优化程序来确定所述条件。

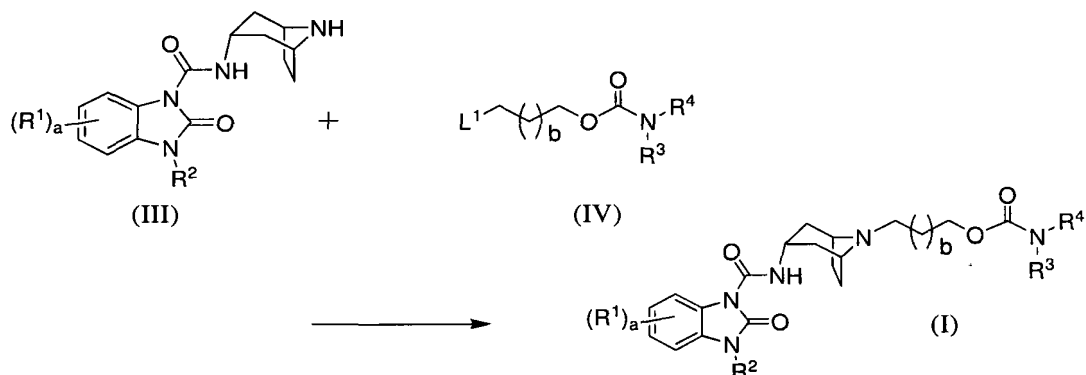
[0133] 另外,如所属领域的技术人员可显而易见,常规保护基必需防止某些官能团经历不需要的反应。在此项技术中用于特定官能团的适合保护基的选择,和用于保护和去保护的适合条件已为我们所熟知。举例来说,多数保护基和其引入和去除描述于T. W. Greene和G. M. Wuts,有机合成中的保护基,第三版,Wiley,纽约,1999和其中引用的文献中。

[0134] 除非另外指出,否则在以下流程中所示的取代基和变量具有本文所提供的定义。

[0135] 在一个合成方法中,式 (I) 化合物可如流程 A 中所说明来制备。

[0136] 流程 A

[0137]



[0138] 使苯并咪唑酮-羧酰胺萸萸烷中间体 (III) 与式 (IV) 化合物 (其中 L^1 为离去基团) 反应以提供式 (I) 化合物。通常, L^1 为 S_N2 -有利的离去基团, 诸如氯基、碘基或溴基。在惰性稀释剂中, 式 (IV) 化合物与介于约 0.25 与约 1.5 当量之间的苯并咪唑酮-羧酰胺萸萸烷 (III) 在诸如 N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA) 的碱和诸如碘化钠的催化剂存在下接触。适合的惰性稀释剂包括二甲基甲酰胺、乙腈、四氢呋喃、N-甲基-2-吡咯烷酮等等。适合的碱也包括 (例如) 三乙胺、1,8-二氮杂双环-[5.4.0]十一-7-烯 (DBU) 和碳酸钾。适合的催化剂也包括 (例如) 碘化钾和四丁基碘化铵。这个反应通常在约 40°C 至约 100°C 的温度下进行, 历时介于约 2 与约 24 小时之间或直到反应大体上完全。

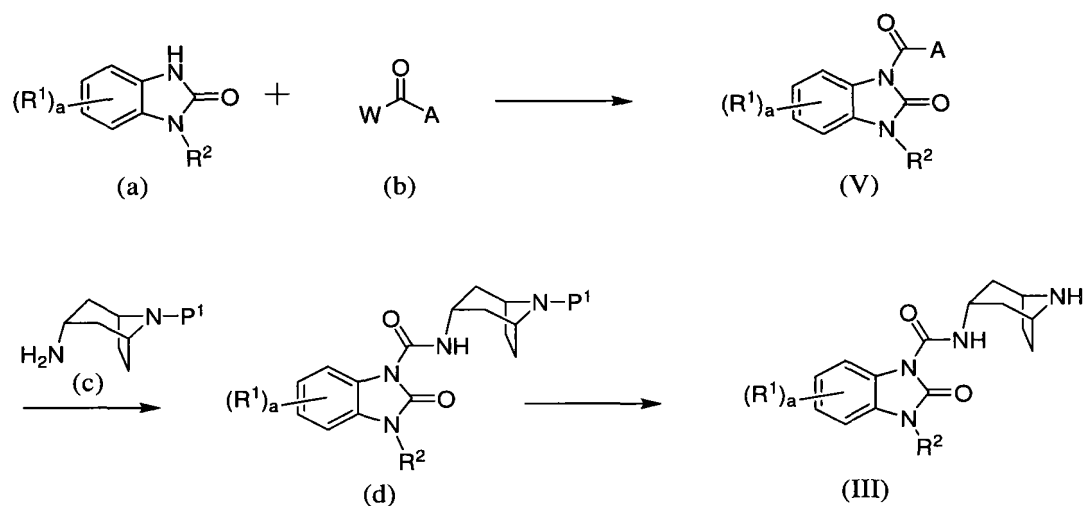
[0139] 通过常规程序分离且提纯式 (I) 的产物。举例来说, 所述产物可减压浓缩直到干燥, 在弱酸水溶液中溶解且通过高效液相色谱法 (HPLC) 提纯。

[0140] 应了解在使用式 (III) 化合物的本文所述的流程 A 的方法和其它方法中, 如所属领域的技术人员所知式 (III) 化合物可以游离碱的形式或以盐的形式提供, 其中 (若必要) 适当调节反应条件。

[0141] 式 (III) 化合物可如以下流程 B 中所示来制备。

[0142] 流程 B

[0143]



[0144] 在流程 B 中,使中间体 (a) (视情况经取代的 1,3-二氢苯并-咪唑-2-酮) 与中间体 (b) 反应以提供式 (V) 化合物,其中 W 为离去基团 (诸如卤基,也就是氟基、氯基或溴基) 且 A 为选定之离去基团使得其在不同于 W 的条件下反应 (诸如 $-\text{OC}_6\text{F}_5$ 、 $-\text{CCl}_3$ 、对 $-\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ 或咪唑-1-基);或 W 和 A 各为咪唑-1-基,使式 (V) 化合物与中间体 (c) (其中 P^1 表示诸如 Boc 的氨基保护基) 反应以提供中间体 (d)。通过标准程序将保护基 P^1 从中间体 (d) 去除以提供式 (III) 化合物。

[0145] 虽然最佳反应条件可视所用的特定反应物或溶剂而变化,但所属领域的技术人员可易于由路线最优化程序来确定所述条件。

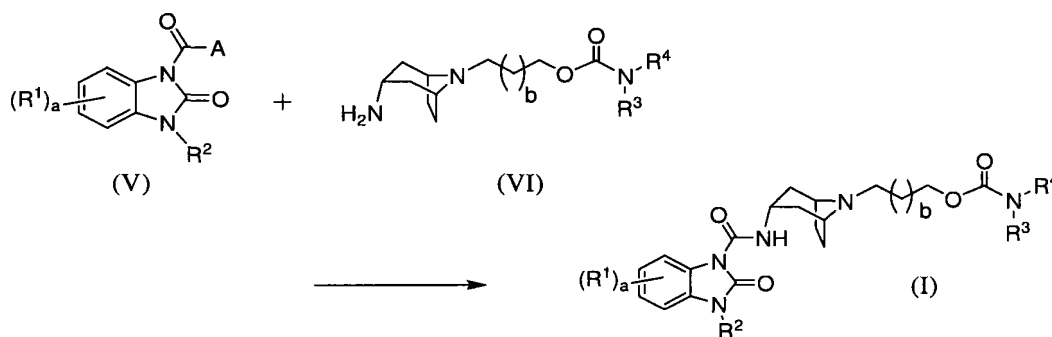
[0146] 举例来说,在使用氯甲酸 4-硝基苯酯作为中间体 (b) 的示范性方法中,使苯并咪唑酮中间体 (a) 在惰性气氛下在强碱 (诸如氢氧化钠、二异丙基胺锂和正丁基锂) 存在下溶解于诸如四氢呋喃、乙醚、DMF 或其组合的惰性稀释剂中,且使其与介于约 1 与约 1.3 当量之间的氯甲酸 4-硝基苯酯接触。在约 0°C 至约 40°C 下搅拌混合物,历时介于约 12 与约 24 小时之间或直到反应大体上完全,以形成活化酯 (式 (V) 化合物)。分离且提纯式 (V) 化合物,或使其与经保护的氨基-萘苄烷 (中间体 (c)) 在惰性稀释剂 (诸如四氢呋喃) 存在下在约 30°C 至约 90°C 的温度下原位反应,历时介于约 10 与约 24 小时之间以提供经保护的中间体 (d)。

[0147] 使用常规方法,将氨基保护基 P^1 从中间体 (d) 去除以提供式 (III) 的苯并咪唑酮-羧酰胺萘苄烷化合物。使用氯甲酸 4-硝基苯酯作为中间体 (b) 来制备中间体 (III) 的上述方法的变化描述于以下实例 13 中。

[0148] 或者,式 (I) 化合物可如以下流程 C 中所示来制备。

[0149] 流程 C

[0150]

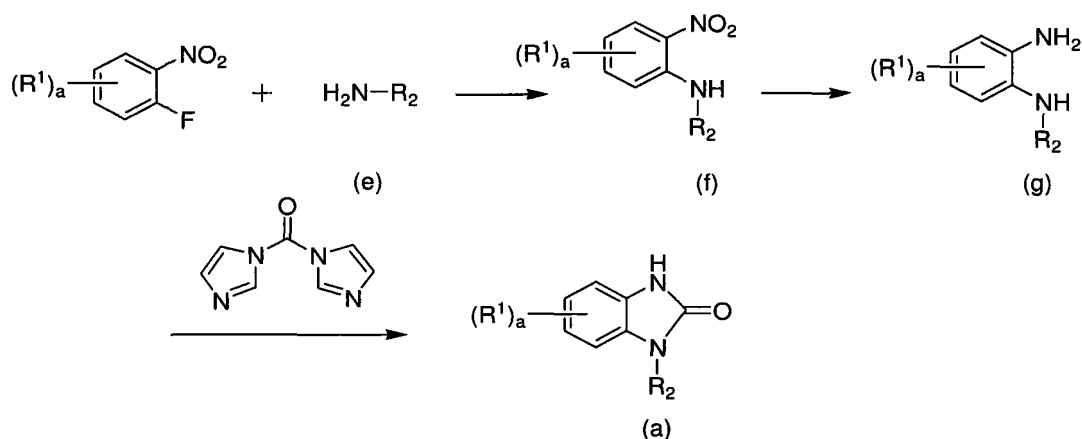


[0151] 使苯并咪唑酮-羧酰胺中间体 (V) 与式 (VI) 的萘苄烷-伸烷基-羧酰胺化合物反应以提供式 (I) 化合物。分离且提纯式 (V) 化合物 (其合成描述于流程 B 中), 或使其与式 (VI) 化合物在约 30°C 至约 90°C 的温度范围下在诸如四氢呋喃的惰性稀释剂存在下原位反应, 历时介于约 10 与约 24 小时之间, 或直到反应完全, 以提供式 (I) 化合物。

[0152] 苯并咪唑酮中间体 (a) 可如以下流程 D 中所示来制备。

[0153] 流程 D

[0154]



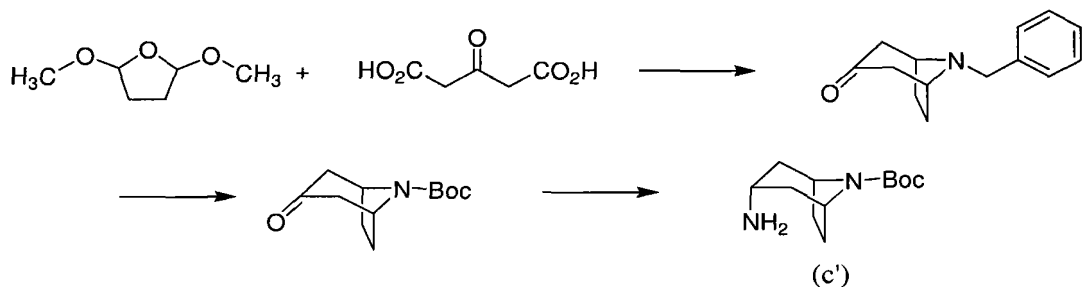
[0155] 在流程 D 中,使视情况经取代的 2- 氟硝基苯与伯胺 (中间体 (e)) 反应以提供中间体 (f),所述中间体 (f) 被还原成二氨基苯 (中间体 (g))。使二氨基苯与羰基二咪唑在诸如四氢呋喃的惰性稀释剂存在下,在约 20°C 至约 40°C 的温度下反应,历时介于约 12 与约 30 小时之间,以提供苯并咪唑酮中间体 (a)。

[0156] 中间体 (a) 的化合物的代表性合成于以下制备 1 中描述。中间体 (a) 的经取代化合物也易于由类似于文献中所述的彼等程序来制备。例如参看化学研究杂志 (The Journal of Chemical Research) (1), 21-22 (2005); 杂原子化学 (Heteroatom Chemistry), 5 (5/6): 437-40 (1994) 和德国专利 (Ger. Offen.), 3839743, 1990 年 5 月 31 日。

[0157] 经保护的氨基莨菪烷 (在本申请案中所述的反应中使用的中间体 (c)) 由易可得的起始物质制备。举例来说,当氨基保护基 P¹ 为 Boc 时,经保护的氨基莨菪烷可如以下流程 E 中所示制备。

[0158] 流程 E

[0159]



[0160] 如以下制备 2 中详细描述,使 2,5- 二甲氧基四氢呋喃与介于约 1 与 2 当量之间的苯胺和稍微过量 (例如约 1.1 当量) 的 1,3- 丙酮二甲酸在酸性水溶液中在诸如磷酸氢二钠的缓冲剂存在下接触以制备经 Boc- 保护的中间体 (c')。将反应混合物加热到介于约 60°C 与约 100°C 之间以确保产物 (8- 苯甲基 -8- 氮杂双环 -[3.2.1] 辛 -3- 酮,通常为 N- 苯甲基莨菪酮) 中任何羧化中间体的脱羧基作用。

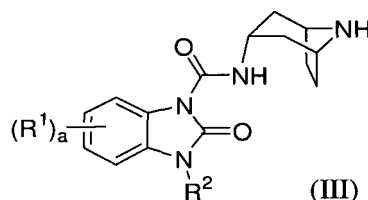
[0161] 通常使 N- 苯甲基莨菪酮中间体与稍微过量 (例如约 1.1 当量) 的二碳酸二叔丁酯 (通常为 (Boc)₂O) 在氢气氛下在过渡金属催化剂存在下反应以提供 3- 氧代 -8- 氮杂双环 [3.2.1] 辛烷 -8- 甲酸叔丁酯。反应通常在环境温度下进行约 12 至约 72 小时。最终,使 3- 氧代 -8- 氮杂双环 [3.2.1] 辛烷 -8- 甲酸叔丁酯与过量较多 (例如至少约 25 当量) 的甲酸铵在诸如甲醇的惰性稀释剂中,在过渡金属催化剂存在下接触,以提供在具有较高

诸如三氟乙酸的酸的处理来去除以提供中间体的酸式盐。中间体的酸式盐（若需要）可通过碱的常规处理转化为游离碱。保护基 Cbz 可通过经由诸如碳载钨的适合金属催化剂氢解便利地去除。关于特定反应条件和制备本发明的代表性化合物或其中间体的其它程序的更多细节在以下实例中描述。

[0173] 因此，在一方法方面中，本发明提供一种制备式 (I) 化合物或其盐或溶剂合物或立体异构体的方法，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 a 和 b 如本文所定义，所述方法包含：

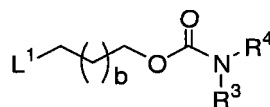
[0174] (a) 使式 (III) 化合物：

[0175]



[0176] 与式 (IV) 化合物：

[0177]

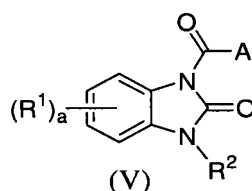


(IV)

[0178] (其中 L^1 为离去基团) 反应；或

[0179] (b) 使式 (V) 化合物：

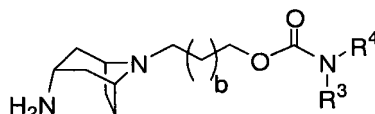
[0180]



[0181] (其中 A 为离去基团)；

[0182] 与式 (VI) 化合物：

[0183]



(VI)

[0184] 以提供式 (I) 化合物，或其盐或溶剂合物或立体异构体。

[0185] 在另外的实施例中，本发明涉及本文所述的其它方法，且涉及通过本文所述的任何方法制备的产物。

[0186] 医药组合物

[0187] 本发明的苯并咪唑酮羧酰胺衍生的氨基甲酸酯化合物通常以医药组合物的形式投药给患者。所述医药组合物可由投药的任何可接受途径投与患者，所述途径包括（但不限于）口服、直肠、阴道、鼻、吸入、局部（包括经皮）和肠道外模式的投药。

[0188] 因此,在其组合物方面的一者中,本发明涉及一种医药组合物,其包含医药学上可接受的载剂或赋形剂和治疗有效量的式(I)化合物或其医药学上可接受的盐。若需要,则所述医药组合物视情况可含有其它治疗剂和/或调配剂。

[0189] 本发明的医药组合物通常含有治疗有效量的本发明的化合物或其医药学上可接受的盐。通常,所述医药组合物可含有约0.1至约95重量%的活性剂;优选为约5至约70重量%;且更优选为约10至约60重量%的活性剂。任何常规的载剂或赋形剂可用于本发明的医药组合物中。特定载剂或赋形剂的选择,或载剂或赋形剂的组合,可取决于用于治疗特定患者的投药模式或医学病况或疾病状态的类型。在这点上,用于特定模式投药的适合医药组合物的制备正好在熟习医药技术者的范畴内。另外,用于所述组合物的成份可购自(例如)Sigma、P. O. Box 14508、St. Louis、MO 63178。为进一步说明,常规调配技术描述于雷明登氏药学的理论与实践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy),第20版, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland(2000)和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, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland(1999)中。

[0190] 可用作医药学上可接受的载剂的材料代表性实例包括(但不限于)下列:(1)糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素,诸如微晶纤维素和其衍生物(诸如羧甲基纤维素钠盐、乙基纤维素和乙酸纤维素);(4)粉末黄耆胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石粉;(8)赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;(9)油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇类,诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)褐藻酸;(16)无热原质水;(17)生理盐水;(18)林格氏液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;和(21)其它用于医药组合物中的无毒相容性物质。

[0191] 通常通过使本发明的化合物与医药学上可接受的载剂和一种或一种以上视情况可选的成份充分且密切地混合或掺合来制备本发明的医药组合物。若必要或需要,接着使用常规程序和设备将所得的均匀经掺合混合物加工成形或装入片剂、胶囊、药丸等等内。

[0192] 本发明的医药组合物优选以单位剂型封装。术语“单位剂型”意思是适合于对患者给药的物理上离散单元,也就是每一单元含有经计算从而单独或与一个或一个以上其他单元组合产生所要治疗效应的预定量的活性剂。举例来说,所述单位剂型可为胶囊、片剂、药丸等等。

[0193] 在一优选实施例中,本发明的医药组合物适合于口服投药。用于口服投药的适合医药组合物可为胶囊、片剂、药丸、锭剂、扁囊剂(cachets)、糖衣药丸、散剂、颗粒剂的形式;或为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液形式;或为水包油或油包水型液体乳液形式;或为酏剂或糖浆形式;等等;每一者均含有预定量的本发明化合物作为活性成份。

[0194] 当意欲以固体剂型(也就是以胶囊、片剂、药丸等等形式)口服投药时,本发明的医药组合物通常可包含作为活性成份的本发明化合物和一种或一种以上诸如柠檬酸钠或磷酸二钙的医药学上可接受的载剂。视情况或另一选择为,所述固体剂型也可包含:(1)填充剂或增量剂,诸如淀粉、微晶纤维素、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸;(2)粘合剂,诸如羧甲基纤维素、褐藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)保湿

剂,诸如甘油;(4)崩解剂,诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯或树薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐和/或碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,诸如石蜡;(6)吸收促进剂,诸如季铵化合物;(7)湿润剂,诸如十六碳醇和/或单硬脂酸甘油酯;(8)吸附剂,诸如高岭土和/或膨润土;(9)润滑剂,诸如滑石粉、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;和(11)缓冲剂。

[0195] 脱模剂、湿润剂、涂布剂、甜味剂、调味剂和香化剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于本发明的医药组合物中。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,诸如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等等;(2)油溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等等;和(3)金属螯合剂,诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等等。用于片剂、胶囊、药丸等等的涂布剂包括可用于肠溶衣的那些涂布剂,诸如邻苯二甲酸乙酸纤维素(CAP)、聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯(PVAP)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基丙烯酸-甲基丙烯酸酯共聚物、乙酸纤维素偏苯三酸酯(CAT)、羧甲基乙基纤维素(CMEC)、丁二酸乙酸羟丙基甲基纤维素(HPMCAS)等等。

[0196] 若需要,则也可使用(例如)以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/或微球体来调配本发明的医药组合物以提供活性成份的缓慢或受控释放。

[0197] 另外,本发明的医药组合物可视情况含有乳浊剂,且可经调配以便其仅释放活性成份,或视情况以延时方式优先在胃肠道的特定部分释放。可使用的嵌入组合物的实例包括聚物质和蜡。活性成份也可以微囊形式存在,若适当,则具有一种或一种以上上述赋形剂。

[0198] 用于口服投药的适合液态剂型包括(例如)医药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。所述液态剂型通常包含活性成份和惰性稀释剂(诸如水或其它溶剂)、增溶剂和乳化剂(诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇)、油(诸如棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯和其混合物。除活性成份以外,悬浮液可含有悬浮剂,诸如乙氧基化异硬脂醇、聚氧化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、琼脂和黄耆胶和其混合物。

[0199] 或者,本发明的医药组合物经调配得以由吸入投药。用于由吸入投药的适合医药组合物通常可以喷雾或粉末的形式存在。所述组合物通常使用熟知的传递装置(诸如定量吸入器、干粉吸入器、喷雾器或类似传递装置)加以投药。

[0200] 当使用加压容器由吸入投药时,本发明的医药组合物通常可包含活性成份和诸如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适合气体的适合推进剂。

[0201] 另外,医药组合物可以胶囊或滤筒(由(例如)明胶制成)的形式存在,所述胶囊或滤筒包含本发明的化合物和适用于粉末吸入器的粉末。适合的粉末基质包括(例如)乳糖或淀粉。

[0202] 本发明的化合物也可使用已知的经皮传递系统和赋形剂经皮投药。举例来说,使本发明的化合物与诸如丙二醇、单月桂酸聚乙二醇酯、氮杂环烷-2-酮等等的渗透增强剂混合,且并入贴片(patch)或类似传递系统。若需要,则包括胶凝剂、乳化剂和缓冲剂的其他赋形剂可用于所述经皮的组合物中。

[0203] 下列调配物说明本发明的代表性医药组合物：

[0204] 调配物实例 A

[0205] 如下制备用于口服投药的硬明胶胶囊：

	<u>成份</u>	<u>量</u>
[0206]	本发明的化合物	50 mg
	乳糖（喷雾干燥）	200 mg
	<u>硬脂酸镁</u>	<u>10 mg</u>

[0207] 代表性程序：充分地掺合成份且接着装入硬明胶胶囊内（每胶囊 260mg 组合物）。

[0208] 调配物实例 B

[0209] 如下制备用于口服投药的硬明胶胶囊：

	<u>成份</u>	<u>量</u>
[0210]	本发明的化合物	20 mg
	淀粉	89 mg
	微晶纤维素	89 mg
	<u>硬脂酸镁</u>	<u>2 mg</u>

[0211] 代表性程序：充分地掺合成份且接着通过第 45 号筛目美国筛，且装入硬明胶胶囊内（每胶囊 200mg 组合物）。

[0212] 调配物实例 C

[0213] 如下制备用于口服投药的胶囊：

	<u>成份</u>	<u>量</u>
[0214]	本发明的化合物	10 mg
	聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯	50 mg
	<u>淀粉粉末</u>	<u>250 mg</u>

[0215] 代表性程序：充分地掺合成份且接着装入明胶胶囊内（每胶囊 310mg 组合物）。

[0216] 调配物实例 D

[0217] 如下制备用于口服投药的片剂：

	<u>成份</u>	<u>量</u>
[0218]	本发明的化合物	5 mg
	淀粉	50 mg
	微晶纤维素	35 mg
	聚乙烯吡咯烷酮（在水中 10 重量%）	4 mg
	羧甲基淀粉钠	4.5 mg
	硬脂酸镁	0.5 mg
	<u>滑石粉</u>	<u>1 mg</u>

[0219] 代表性程序：使活性成份、淀粉和纤维素通过第 45 号筛目美国筛且充分地混合。将聚乙烯吡咯烷酮的溶液与所得的粉末混合，且接着使混合物通过第 14 号筛目美国筛。在 50-60℃ 下干燥如此制得的颗粒，且通过第 18 号筛目美国筛。接着将羧甲基淀粉钠、硬脂酸镁和滑石粉（先前已通过第 60 号筛目美国筛）添加到所述颗粒中。混合后，在压片机上压制混合物以提供重 100mg 的片剂。

[0220] 调配物实例 E

[0221] 如下制备用于口服投药的片剂：

	<u>成份</u>	<u>量</u>
	本发明的化合物	25 mg
[0222]	微晶纤维素	400 mg
	烟雾状二氧化硅	10 mg
	<u>硬脂酸</u>	<u>5 mg</u>

[0223] 代表性程序：将成份充分地掺合且接着压制以形成片剂（每片剂 440mg 组合物）。

[0224] 调配物实例 F

[0225] 如下制备用于口服投药的单刻痕（Single-scored）片剂：

	<u>成份</u>	<u>量</u>
	本发明的化合物	15 mg
	玉米淀粉	50 mg
[0226]	交联羧甲基纤维素钠	25 mg
	乳糖	120 mg
	<u>硬脂酸镁</u>	<u>5 mg</u>

[0227] 代表性程序：将成份充分地掺合且压制以形成单刻痕片剂（每片剂 215mg 组合物）。

[0228] 调配物实例 G

[0229] 如下制备用于口服投药的悬浮液：

	成份	量
	本发明的化合物	0.1 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
[0230]	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 g
	砂糖	25.5 g
	山梨糖醇 (70%溶液)	12.85 g
	Veegum k(Vanderbilt Co.)	1.0 g
	调味剂	0.035 mL
	着色剂	0.5 mg
	蒸馏水	适量至 100 mL

[0231] 代表性程序:混合成份以形成每 10mL 悬浮液含有 10mg 活性成份的悬浮液。

[0232] 调配物实例 H

[0233] 如下制备用于通过吸入投药的干粉:

	成份	量
[0234]	本发明的化合物	1.0 mg
	乳糖	25 mg

[0235] 代表性程序:使活性成份微粉化,且接着与乳糖掺合。接着将此掺合混合物装入明胶吸入滤筒。使用粉末吸入器投与滤筒的内容物。

[0236] 调配物实例 I

[0237] 如下在定剂量吸入器中制备用于通过吸入投药的干粉:

[0238] 代表性程序:通过使 10g 活性化合物作为具有平均尺寸小于 $10\ \mu\text{m}$ 的微粉化颗粒分散于由 0.2g 卵磷脂溶解于 200mL 脱矿质水中形成的溶液中来制备含有 5 重量%本发明的化合物和 0.1 重量%卵磷脂的悬浮液。所述悬浮液经喷雾干燥且所得物质为经微粉化为平均直径小于 $1.5\ \mu\text{m}$ 的颗粒。将所述颗粒装入具有加压 1,1,1,2-四氟乙烷的滤筒内。

[0239] 调配物实例 J

[0240] 如下制备可注射的调配物:

	成份	量
	本发明的化合物	0.2 g
[0241]	乙酸钠缓冲溶液(0.4 M)	40 mL
	HCl(0.5 N)或 NaOH(0.5 N)	适量至 pH 4
	水(经蒸馏, 无菌)	适量至 20 mL

[0242] 代表性程序:掺合上述成份且使用 0.5N HCl 或 0.5N NaOH 调节 pH 值至 4 ± 0.5 。

[0243] 调配物实例 K

[0244] 如下制备用于口服投药的胶囊：

	成份	量
	本发明的化合物	4.05 mg
[0245]	微晶纤维素(Avicel PH 103)	259.2 mg
	硬脂酸镁	0.75 mg

[0246] 代表性程序：充分地掺合成份且接着装入明胶胶囊（尺寸 #1, 白色, 不透明）（每胶囊 264mg 组合物）。

[0247] 调配物实例 L

[0248] 如下制备用于口服投药的胶囊：

	成份	量
	本发明的化合物	8.2 mg
[0249]	微晶纤维素（Avicel PH 103）	139.05 mg
	硬脂酸镁	0.75 mg

[0250] 代表性程序：充分地掺合成份且接着装入明胶胶囊（尺寸 #1, 白色, 不透明）（每胶囊 148mg 组合物）。

[0251] 应了解适用于特定模式投药的任何形式的本发明的化合物（也就是游离碱、医药盐或溶剂合物）可用于如上所述的医药组合物中。

[0252] 效用

[0253] 本发明的苯并咪唑酮-羧酰胺衍生的氨基甲酸酯化合物为 5-HT₄ 受体激动剂, 且因此预期用于治疗由 5-HT₄ 受体介导或与 5-HT₄ 受体活性相关的医学病况, 也就是可通过 5-HT₄ 受体激动剂治疗得到改善的医学病况。所述医学病况包括（但不限于）肠易激综合征（IBS）、慢性便秘、功能性消化不良、胃排空延迟、胃食管反流病（GERD）、胃轻瘫、手术后肠梗阻、肠假性阻塞和药物诱发性延迟传输。另外, 建议某些 5-HT₄ 受体激动剂化合物可用于治疗中枢神经系统病症, 包括认知病症、行为病症、情感病症和自主功能控制病症。

[0254] 具体来说, 本发明的化合物能增加胃肠（GI）道的活动性, 且因此预期用于治疗包括人类的哺乳动物中由活动性降低引起的 GI 道病症。所述 GI 活动性病症包括（例如）慢性便秘、便秘型肠易激综合征（C-IBS）、糖尿病性和自发性胃轻瘫和功能性消化不良。

[0255] 因此, 在一方面中本发明提供一种增加哺乳动物胃肠道活动性的方法, 所述方法包含投与哺乳动物治疗有效量的包含医药学上可接受的载剂和本发明化合物的医药组合物。

[0256] 当用于治疗 GI 道活动性降低的病症或其它由 5-HT₄ 受体介导的病况时, 本发明的组合物通常可以每日单剂量或多倍剂量口服投药, 但也可使用其它投药形式。每一剂量投与的活性剂的量或每天投与的总量通常由医师根据相关情况加以确定, 所述情况包括被治疗的病况、选择的投药途径、投与的实际化合物和其相对活性、个别患者的年龄、体重和反应、患者症状严重性和其类似情况。

[0257] 用于治疗 GI 道活动性降低的病症或其它由 5-HT₄ 受体介导的病症的适合剂量可在约 0.0007 至约 20mg/kg/ 天的活性剂范围内, 其包括约 0.0007 至约 1mg/kg/ 天。对于平

均 70kg 的人来说,这将相当于每天约 0.05 至约 70mg 的活性剂量。

[0258] 在本发明的一方面中,本发明的化合物用于治疗慢性便秘。当用于治疗慢性便秘时,本发明的化合物通常以每日单剂量或多倍剂量口服投药。优选地,用于治疗慢性便秘的剂量在每天约 0.05 至约 70mg 的范围内。

[0259] 在本发明的另一方面中,本发明的化合物用于治疗肠易激综合征。当用于治疗便秘型肠易激综合征时,本发明的化合物通常可以每日单剂量或多倍剂量口服投药。优选地,用于治疗便秘型肠易激综合征的剂量可在每天约 0.05 至约 70mg 的范围内。

[0260] 在本发明的又一方面中,本发明的化合物用于治疗糖尿病性胃轻瘫。当用于治疗糖尿病性胃轻瘫时,本发明的化合物通常可以每日单剂量或多倍剂量口服投药。优选地,用于治疗糖尿病性胃轻瘫的剂量可在每天约 0.05 至约 70mg 的范围内。

[0261] 在本发明的又一方面中,本发明的化合物用于治疗功能性消化不良。当用于治疗功能性消化不良时,本发明的化合物通常可以每日单剂量或多倍剂量口服投药。优选地,用于治疗功能性消化不良的剂量可在每天约 0.05 至约 70mg 的范围内。

[0262] 本发明也提供一种治疗哺乳动物与 5-HT₄ 受体活性相关的疾病或病况的方法,所述方法包含投与哺乳动物治疗有效量的本发明的化合物或治疗有效量的包含本发明的化合物的医药组合物。

[0263] 因为本发明的化合物为 5-HT₄ 受体激动剂,所以所述化合物也作用于调查或研究具有 5-HT₄ 受体的生物系统或样品,或用于发现新颖 5-HT₄ 受体激动剂的研究工具。此外,因为与结合至其它 5-HT 亚型的受体(尤其 5-HT₃ 受体)相比较,本发明的化合物展现对于 5-HT₄ 受体的结合选择性,所以所述化合物尤其用于研究生物系统或样品中 5-HT₄ 受体的选择性促效作用的效应。任何具有 5-HT₄ 受体的适合生物系统或样品可用于可在活体外或活体内进行的每一研究中。适合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(诸如小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、狗、猪等)等等。

[0264] 在本发明的此方面中,使包含 5-HT₄ 受体的生物系统或样品与 5-HT₄ 受体促效量的本发明的化合物接触。接着使用诸如放射性配体结合分析和功能分析的常规程序和设备来测定促进 5-HT₄ 受体的效应。所述功能分析包括细胞内环单磷酸腺苷(cAMP)的配体介导性变化、酶腺苷酸环化酶(其合成 cAMP)的活性的配体介导性变化、鸟苷三磷酸(GTP)的类似物(诸如 [³⁵S]GTP γ S(鸟苷 5' -O-(γ - 硫基)三磷酸)或 GTP-Eu)经由受体催化的 GTP 类似物与 GDP 类似物的交换并入隔离膜内方面的配体介导性变化、游离的细胞内钙离子的配体介导性变化(用(例如)荧光联结成像平板阅读器或来自 Molecular Devices, Inc. 的 FLIPR[®]测量)和促细胞分裂剂活化蛋白激酶(MAPK)活化作用的测量。在以上所列的任何功能分析或类似性质的分析中,本发明的化合物可使促进或增加 5-HT₄ 受体活化。本发明化合物的 5-HT₄ 受体促效量通常是在约 1 纳摩尔浓度(nM)至约 500 纳摩尔浓度范围内。

[0265] 另外,本发明的化合物可用作用于发现新颖 5-HT₄ 受体激动剂的研究工具。在这个实施例中,比较一个测试化合物或一组测试化合物的 5-HT₄ 受体结合或功能数据与本发明化合物的 5-HT₄ 受体结合或功能数据,若有的话用于识别具有优良结合或功能活性的测试化合物。本发明的此方面包括(作为独立实施例)比较数据的产生(使用适当分析)和测试数据的分析两者,以识别所关注的测试化合物。

[0266] 除其它特性以外,已发现本发明的化合物为 5-HT₄ 受体的有效激动剂,且在放射性

配体结合分析中对 5-HT₄ 受体亚型展现优于 5-HT₃ 受体亚型的实质选择性。此外,本发明的代表性化合物在大鼠模型中展现优良的药物动力学特性。因此,预期本发明的化合物当口服投药时展现良好的生物可用度。此外,在使用表现 hERG 心脏钾离子通道的分离全细胞的活体外电压钳模型中测试的本发明的代表性化合物经证实并未展现不可接受水平的钾离子流的抑制。电压钳分析为经接受的临床前方法,其分析药剂改变与心律失常相关的心脏复极化模式(尤其引起所谓的 QT 延长)的潜能。(Cavero 等人,药物治疗意见 (Opinion on Pharmacotherapy), 2000, 1, 947-73, Fermini 等人,药物发现自然评论 (Nature Reviews Drug Discovery), 2003, 2, 439-447) 因此,预期包含本发明的化合物的医药组合物具有可接受的心脏概况 (cardiac profile)。

[0267] 可使用多种所属领域的技术人员熟知的活体外和活体内分析证明本发明化合物的这些特性以及效用。代表性分析在以下实例中更详尽地描述。

[0268] 实例

[0269] 提供以下合成和生物学实例以说明本发明,且不得以任何限制本发明的范畴的方法来解释。在以下实例中,除非另外指出,否则以下缩写具有以下含义。以下未定义的缩写具有其一般接受的含义。

[0270]	Boc	=	叔丁氧基羰基
[0271]	(Boc) ₂ O	=	二碳酸二叔丁酯
[0272]	DCM	=	二氯甲烷
[0273]	DMF	=	N, N- 二甲基甲酰胺
[0274]	DMSO	=	二甲亚砜
[0275]	EtOAc	=	乙酸乙酯
[0276]	mCPBA	=	间氯过苯甲酸
[0277]	MeCN	=	乙腈
[0278]	MTBE	=	叔丁基甲基醚
[0279]	PyBop	=	六氟磷酸苯并三唑 -1- 基 - 氧基三吡咯烷膦
[0280]	R _f	=	保留因子
[0281]	RT	=	室温
[0282]	TFA	=	三氟乙酸
[0283]	THF	=	四氢呋喃

[0284] 试剂(包括仲胺)和溶剂均购自商业供应(Aldrich、Fluka、Sigma等),且未经进一步提纯即使用。除非另外规定,否则反应在氮气氛下进行。反应混合物的进程由薄层色谱法(TLC)、分析高效液相色谱法(分析 HPLC)和质谱法来监测,所述方法的细节在以下和分别在反应的特定实例中给出。反应混合物如在每一反应中明确地描述而处理;通常其通过萃取和其它诸如温度和溶剂依赖性结晶和沉淀的提纯方法进行提纯。另外,反应混合物通常由制备 HPLC 提纯;下文描述通用方法。反应产物的特征化通常由质谱法和 ¹H-NMR 光谱测定法进行。对于 NMR 测量来说,将样品溶解于氘化溶剂(CD₃OD、CDCl₃或 DMSO-d₆)中,且 ¹H-NMR 光谱在标准观测条件下由 Varian Gemini2000 仪器(300MHz)获得。除非另外指出,否则化合物的质谱鉴别由用 Applied Biosystems (Foster City, CA) 模式 API 150EX 仪器或 Agilent (Palo Alto, CA) 模式 1100LC/MSD 仪器的电喷雾电离法(ESMS)进行。

[0285] 一种分析 HPLC 的通用方案:使每一粗制化合物以 0.5-1.0mg/mL 的浓度溶解于 50% MeCN/H₂O(含有 0.1% TFA)中,且通过使用分析 HPLC 来分析:1)反相分析柱:Zorbax Bonus-RP(3.5 μm 粒度,2.1×50mm);2)流速:0.5mL/min;3)含 0.1% TFA 的 5% MeCN/H₂O(等强度;0-0.5min);含 0.1% TFA 的 5% MeCN/H₂O 至含 0.1% TFA 的 75% MeCN/H₂O(线性梯度;0.5-4min);4)检测波:214,254 和 280nm。必要时指出其它所用条件。

[0286] 一种制备 HPLC 的通用方案:使粗制化合物以 50-100mg/mL 的浓度溶解于水中的 50% 乙酸中,过滤且使用制备 HPLC 分馏:1)管柱:YMC Pack-Pro C18(50a×20mm;ID=5 μm);2)线性梯度:10% A/90% B 至 50% A/50% B,经 30min;3)流速:40mL/min;4)检测波:214nm。

[0287] 仲胺的制备

[0288] 以下描述在式 (I) 化合物的合成中用作中间体的多种仲胺的制备。

[0289] 通过与个别磺酰氯(*i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 0°C)反应且除去 N-Boc 基的保护(CF₃CO₂H, CH₂Cl₂)由 N-Boc 哌嗪制备哌嗪的 N-磺酰基衍生物。1-甲烷磺酰基哌嗪:¹H-NMR(CDCl₃;中性):δ(ppm)3.1(t, 4H), 2.9(t, 4H), 2.7(s, 3H)。甲烷磺酰基哌嗪也通过使甲烷磺酰氯与过量哌嗪(>2 当量)在水中反应来制备。

[0290] 通过使哌嗪分别与二甲氨基氯甲酸酯或二甲氨基胺磺酰氯反应制备哌嗪的 N-衍生物,诸如 1-(二甲氨基羰基)哌嗪和 1-二甲氨基磺酰基)哌嗪。

[0291] 通过用乙酰氯(*i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 0°C)处理 N¹-Boc-3-氨基吡咯烷(外消旋物, 3R 或 3S)且除去 N-Boc 基的保护(CF₃CO₂H, CH₂Cl₂)来制备外消旋或单一手性异构体形式的 3-乙酰基氨基吡咯烷。3-(乙酰氨基)吡咯烷:¹H-NMR(DMSO-d₆;TFA 盐):δ(ppm)4.2(五重峰, 1H), 3.3-3.1(m, 3H), 2.9(m, 1H), 2.0(m, 1H), 1.8(br s, 4H)。

[0292] 通过用丙酰基磺酰氯或环己基甲基磺酰氯(*i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 0°C)处理 N¹-Boc-(3R)-氨基吡咯烷且除去 N-Boc 基的保护(CF₃CO₂H, CH₂Cl₂)来获得 (3R)-氨基吡咯烷的 N³-烷磺酰基衍生物。

[0293] 根据 Loev, B. 有机化学杂志(J. Org. Chem.)1961, 26, 4394-9 的方案通过使 3-环丁烯砜与必需的甲醇中的伯胺(cat. KOH, rt)反应来制备四氢-3-噻吩胺-1,1-二氧化物的衍生物。N-甲基-3-四氢噻吩胺 1,1-二氧化物(TFA 盐):¹H-NMR(DMSO-d₆):δ(ppm)9.4(br s, 2H), 4.0-3.8(五重峰, 1H), 3.6-3.5(dd, 1H), 3.4-3.3(m, 1H), 3.2-3.1(m, 2H), 2.5(s, 3H), 2.4(m, 1H), 2.1(m, 1H)。

[0294] 如下制备 (S)-1,1-二氧化代-四氢-1λ⁶-噻吩-3-基胺:

[0295] 1)通过在室温下用甲醇中的 (Boc)₂O 处理约 12h 以进行 (S)-3-四氢噻吩胺 (Dehmlow, E. V.; Westerheide, R. 合成法 (Synthesis) 1992, 10, 947-9) 的 N-Boc 保护;2)在 0°C 下通过用二氯甲烷中的 mCPBA 处理以氧化成经 N-Boc 保护的 (S)-1,1-二氧化代-四氢-1λ⁶-噻吩-3-基胺,历时约 5h;和 3)用二氯甲烷中的 TFA 在室温下使砜衍生物除去 N-Boc 的保护成为视作 TFA 盐分离的游离胺,历时 1h。使用相同方法来制备 (R)-1,1-二氧化代-四氢-1λ⁶-噻吩-3-基胺,但用 (R)-3-四氢噻吩胺来替代 (S)-3-四氢噻吩胺。

[0296] 由四氢-4H-噻喃-4-酮制备 N-甲基-四氢-2H-噻喃-4-胺-1,1-二氧化物:i)MeNH₂, NaBH₄;ii)(Boc)₂O, MeOH;iii)mCPBA, CH₂Cl₂, 0 °C;iv)CF₃CO₂H, CH₂Cl₂。(m/z):[M+H]⁺C₆H₁₃NO₂S 的计算值:164.07;实验值:164.9。¹H-NMR(CD₃OD;TFA 盐):

δ (ppm) 3.4–3.1 (m, 5H), 2.7 (s, 3H), 2.4 (br d, 2H), 2.1 (br m, 2H)。

[0297] 脯氨酸二甲基酰胺、异六氢烟碱酰胺（哌啶-4-羧酰胺）和 1-(四氢-2-呋喃甲酰基)哌嗪可于市面购得，且购自商业来源。

[0298] 通过使氨基氯甲酸二甲酯与经 N-Boc 保护的 4-哌啶醇反应来制备氨基甲酸 4-哌啶醇-二甲酯。

[0299] 制备 1

[0300] 1-异丙基-1,3-二氢-2H-苯并咪唑-2-酮的制备

[0301] a. N-异丙基-N-(2-硝基苯)胺的制备

[0302] 向在冰浴中冷却的乙醇 (300mL) 中的 2-氟基-硝基苯 (31.8g, 0.225mol) 的冷溶液添加异丙基胺 (54.0mL, 0.634mol)，随后添加水 (120mL) 中的碳酸钾 (31.1g, 0.225mol) 溶液。在 0°C 下搅拌混合物 1h，接着回流 6h。通过将混合物冷却到环境温度来终止反应，且将其减压蒸发而得橙色残余物。使残余物在乙醚 (800mL) 和盐水溶液 (300mL) 之间分溶。干燥且过滤有机层以提供呈橙色液体的标题中间体 (39g)。¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ (ppm) 8.06 (d, 1H), 7.30 (t, 1H), 6.74 (d, 1H), 6.48 (t, 1H), 3.73 (七重峰, 1H), 1.20 (d, 6H)。

[0303] b. N-(2-氨基苯基)-N-异丙基胺的制备

[0304] 向在冰浴中冷却的乙醇 (600mL) 和 2M 氢氧化钠溶液 (320mL) 的混合物缓慢添加锌粉 (59.5g)。在搅拌锌浆体的同时，添加溶解于乙醇 (50mL) 中的 N-异丙基-N-(2-硝基苯基)胺 (41g, 0.228mol)。在 0°C 下搅拌混合物 30min，接着加热到 85°C。将混合物在 85°C 下搅拌约 12h 直到混合物的回流溶液变成无色溶液。接着使混合物冷却到 0°C 且过滤。用 EtOAc (200mL) 清洗收集的固体。合并滤液和清洗的溶液，且在真空中蒸发以去除过量的挥发性溶剂。在浓缩期间，混合物变成淡棕色/黄色。用 EtOAc (800mL) 萃取水性浓缩物。将有机溶液浓缩直到干燥，以提供呈粉棕色油的标题中间体 (33g)，其未经进一步处理即用于下一步骤中。¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ (ppm) 6.73–6.5 (m, 4H), 3.58–3.55 (七重峰, 1H), 1.2 (d, 6H)。

[0305] c. 1-异丙基-1,3-二氢-2H-苯并咪唑-2-酮的制备

[0306] 向四氢呋喃 (500mL) 中的步骤 (b) 的产物 (N-(2-氨基苯基)-N-异丙基胺 (34g, 0.226mol)) 的溶液中添加固体形式的羰基二咪唑 (36.7g, 0.226mol)。混合物在环境温度于氮气的气氛下搅拌约 24h。在真空中浓缩混合物，且所得的深褐色残余物在 EtOAc (700mL) 和盐水溶液 (300mL) 之间分配。接着用 1M 磷酸多次 (约 3×300mL) 洗涤有机层直到有机层的颜色由茶褐色转变为浅黄色。蒸发有机溶液至干燥以提供静置时缓慢凝固的呈浅黄色油的标题中间体 (34g)。通过表明无可检测到的杂质的 ¹H-NMR 来评估材料的纯度：¹H-NMR(CD₃OD, 300MHz) : δ (ppm) 7.2 (m, 1H), 7.0 (m, 3H), 4.6 (七重峰, 1H), 1.46 (d, 6H)。(m/z) : [M+H]⁺C₁₀H₁₂N₂O 的计算值 : 177.09 ; 实验值 : 177.2。

[0307] 分析 HPLC : 保留时间 = 2.7min (纯度为 99%) : 1) 管柱 : Zorbax, Bonus-RP, 3.5 μ m 粒度, 2.1×50mm ; 2) 流速 : 0.5mL/min ; 3) 等强度条件 (10% 溶剂 B/90% 溶剂 A), 历时 0 至 0.5min ; 接着线性梯度至 50% 溶剂 B/50% 溶剂 A (溶剂 A = 98% 水 / 2% MeCN / 0.1% TFA ; 溶剂 B = 90% MeCN / 10% 水 / 0.1% TFA), 经 5min。TLC 分析 (硅胶板) : R_f = 0.5 (CH₂Cl₂)。液相色谱质谱分析法 (LCMS) (m/z) : [M+H]⁺C₁₀H₁₂N₂O 的计算值 : 177.09 ; 实验值 : 177.3。

[0308] 制备 2

[0309] (1S,3R,5R)-3-氨基-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯的制备

[0310] a. 8-苯甲基-8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-酮的制备

[0311] 在搅拌下将浓盐酸(30mL)添加到水(170mL)中的2,5-二甲氧基四氢呋喃(82.2g,0.622mol)的非匀质溶液。在冷却到0℃(冰浴)的单独烧瓶中,将浓盐酸(92mL)缓慢添加到水(350mL)中的苯甲胺(100g,0.933mol)溶液。搅拌2,5-二甲氧基四氢呋喃溶液大约20min,用水(250mL)稀释且接着添加苯甲胺溶液,随后添加水(400mL)中的1,3-丙酮二甲酸(100g,0.684mol)溶液且接着添加水(200mL)中的磷酸氢二钠(44g,0.31mol)。使用40%NaOH调节pH值为pH1至pH约4.5。过夜搅拌所得溶液。接着使用50%盐酸使溶液从pH7.5酸化到pH3,加热到85℃且搅拌2小时。溶液冷却到室温,使用40%NaOH碱化到pH12且用DCM(3×500mL)萃取。用盐水洗涤混合的有机层,干燥、过滤且减压浓缩以产生呈粘性棕色油的粗制标题中间体(52g)。

[0312] 在0℃向甲醇(1000mL)中的粗制中间体溶液添加二碳酸二叔丁酯(74.6g,0.342mol)。使溶液变温暖到室温且过夜搅拌。在减压下去除甲醇且使所得的油溶解于二氯甲烷(1000mL)中。中间体于1M H₃PO₄(1000mL)内萃取且用二氯甲烷(3×250mL)洗涤。使用NaOH水溶液将水层碱化为pH12,且用二氯甲烷(3×500mL)萃取。混合的有机层经干燥、过滤且减压浓缩以提供呈粘性、浅棕色油的标题中间体。¹H-NMR(CDCl₃) δ(ppm)7.5-7.2(m,5H,C₆H₅),3.7(s,2H,CH₂Ph),3.45(宽峰s,2H,CH-NBn),2.7-2.6(dd,2H,CH₂CO),2.2-2.1(dd,2H,CH₂CO),2.1-2.0(m,2H,CH₂CH₂),1.6(m,2H,CH₂CH₂)。(m/z):[M+H]⁺C₁₄H₁₇NO的计算值:216.14;实验值:216.0。

[0313] b. 3-氧代-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯的制备

[0314] 向EtOAc(300mL)中的8-苯甲基-8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-酮(75g,0.348mol)溶液添加EtOAc(300mL)中的二碳酸二叔丁酯(83.6g,0.383mol,1.1当量)溶液。在氮气流下将所得溶液和清洗液(100mL EtOAc)添加到含有23g氢氧化钡(20重量%碳载钡,干基,水湿约50%;例如,Pearlman 催化剂)的1L帕氏(Parr)氢化容器中。使反应容器脱气(使真空和N₂交替五次)且加压到60psi的H₂气。反应溶液搅拌两天且如需要则再充入H₂以保持H₂压力在60psi直到如由二氧化硅薄层色谱法监控反应完全。接着通过Celite®的衬垫过滤且减压浓缩黑色溶液以提供呈粘性、黄色至橙色的油的标题中间体。其未经进一步处理即用于下一步骤中。¹H NMR(CDCl₃) δ(ppm)4.5(宽峰,2H,CH-NBoc),2.7(宽峰,2H,CH₂CO),2.4-2.3(dd,2H,CH₂CH₂),2.1(宽峰m,2H,CH₂CO),1.7-1.6(dd,2H,CH₂CH₂),1.5(s,9H,(CH₃)₃COCON)。

[0315] c. (1S,3R,5R)-3-氨基-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯的制备

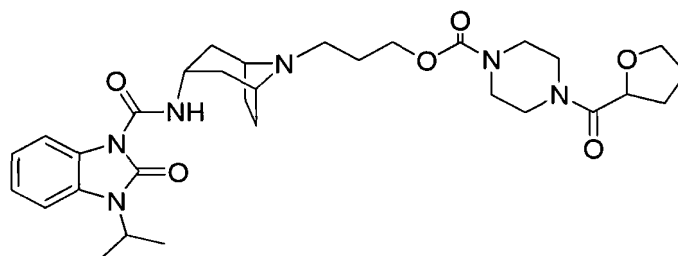
[0316] 在经由机械搅拌器搅拌下,在N₂流下向甲醇(1L)中的先前步骤的产物(75.4g,0.335mol)的溶液添加甲酸铵(422.5g,6.7mol)、水(115mL)和65g碳载钡(10%在干基上,水湿约50%;Degussa 型E101NE/W)。在24和48小时后,每次添加甲酸铵(132g,2.1mol)的其他部分。一旦反应进程终止(如由分析HPLC所监测),则添加Celite®(>500g)且过滤所得的稠密悬浮液,且接着用甲醇(约500mL)清洗所收集的固体。合并滤液且减压浓缩。接着用1M磷酸稀释所得混浊、两相溶液成pH2的约1.5至2.0L的最终体积且用二氯甲烷(3×700mL)洗涤。使用40%水性NaOH将水层碱化为pH12,且用二氯甲烷(3×700mL)萃

取。混合有机层经干燥、过滤且由旋转蒸发浓缩,接着高真空以提供呈白色至浅黄色固体的标题中间体 (52g) (通常为 N-Boc-内-3-氨基莨菪烷)。基于 $^1\text{H-NMR}$ 分析,产物的内胺与外胺的异构体比率为 $> 99 : 1$ (分析 HPLC 纯度 $> 96\%$)。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ (ppm) 4.2-4.0 (宽峰 d, 2H, CHNBoc), 3.25 (t, 1H, CHNH_2), 2.1-2.05 (m, 4H), 1.9 (m, 2H), 1.4 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{OCON}$), 1.2-1.1 (宽峰, 2H)。 (m/z) : $[\text{M}+\text{H}]^+\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ 的计算值 : 227.18 ; 实验值 : 227.2。分析 HPLC (等强度方法 ; 2 : 98 (A : B) 至 90 : 10 (A : B) 经 5min) : 保留时间 = 3.68min。

[0317] 实例 1

[0318] 4-(四氢呋喃-2-羰基)哌嗪-1-甲酸 3-[(1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂-双环[3.2.1]辛-8-基]丙酯的合成

[0319]



[0320] a. (1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯的制备

[0321] 在氮气氛下向在冰浴中的无水 THF (1000L) 中的氢化钠 (9.25g ; 231.4mmol ; 60% 分散在矿物油中) 的冷悬浮液添加 THF (50mL) 中的制备 1 的产物, 1-异丙基-1,3-二氢-2H-苯并咪唑-2-酮 (27.2g, 154.2mmol)。混合物在约 0-5°C 下搅拌 30min, 接着添加 THF (50mL) 中的氯甲酸 4-硝基苯酯 (34.2g, 170mmol)。在使混合物逐渐变温暖到环境温度同时搅拌混合物过夜。接着向形成的活化酯添加 THF (50mL) 中的 (1S, 3R, 5R)-3-氨基-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯 (36.7g, 162mmol)。混合物在环境温度下搅拌约 12h 且在约 75°C 下搅拌约 3h, 此时反应样品的 LCMS 指示偶合反应完成。混合物在真空中浓缩, 溶解于二氯甲烷 (1L) 中且首先用 1M H_3PO_4 和接着用饱和 NaHCO_3 溶液洗涤。干燥后, 蒸发有机溶液以提供呈淡黄色残余物的标题中间体, 其未经进一步处理即用于下一步骤中。

[0322] b. 三氟乙酸盐形式的 N-[(1S, 3R, 5R)-3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-甲酸 (8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基) 酰胺的制备

[0323] 向在冰浴中的二氯甲烷 (200mL) 中的 (1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯 (先前步骤的产物) 添加三氟乙酸 (200mL)。混合物在约 5°C 下搅拌 30min, 且在室温下搅拌约 1h。在混合物的蒸发后, 将乙醚 (约 500mL) 添加到含油残余物, 以引起残余物的凝固。收集沉淀, 用大量乙醚清洗且在真空中干燥以提供呈 TFA 盐的标题中间体 (47g)。所述标题中间体通常也称作内-N-(8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基)-3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羧酰胺。

[0324] c. N-[(1S, 3R, 5R)-3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-甲酸 (8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基) 酰胺 (游离碱) 的制备

[0325] 向二氯甲烷 (500mL) 中的先前步骤的产物 (15g, 33.9mmol) 的悬浮液添加水 (500mL)。将 N,N-二异丙基乙胺 (约 20mL) 添加到反应混合物以使得水层 pH 为 8-9。分离所述层, 保留有机层。用二氯甲烷 (100mL) 第二次萃取水层。合并所得萃取液, 且接着用盐水洗涤。在经 Na₂SO₄ 干燥和过滤、溶剂去除后产出呈游离碱的黄色粉末的标题化合物 (9.7g)。¹H NMR (DMSO-d₆) : 1.48 (d, 6H), 1.40-2.00 (m, 8H), 3.53 (m, 2H), 4.07 (m, 1H), 4.69 (七重峰, 1H), 7.21 (m, 2H), 7.45 (d, 1H), 8.08 (d, 1H), 9.31 (d, 1H)。 (m/z) : [M+H]⁺C₁₈H₂₄N₄O₂ 的计算值 : 329.20 ; 实验值 : 329.2。分析 HPLC : (2-50% MeCN/H₂O 经 6min) 保留时间 = 3.67min。

[0326] d. 3-氯丙基-4-(四氢呋喃-2-基-羰基)哌嗪-1-甲酸盐的制备

[0327] 向二氯甲烷 (5mL) 中的 1-(四氢呋喃-2-基-羰基)哌嗪 (202mg, 1.1mmol) 的 0°C 溶液中添加氯甲酸 3-氯丙基酯 (133 μL, 1.1mmol), 随后添加 N,N-二异丙基乙胺 (192 μL, 1.1mmol)。使反应经 2h 达室温, 此时反应经蒸发产出呈小麦色油状的标题化合物, 其未经进一步提纯即使用。

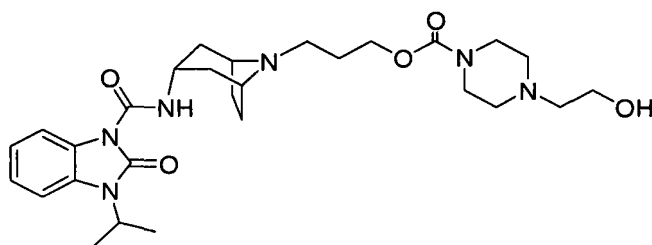
[0328] e. 4-(四氢呋喃-2-羰基)哌嗪-1-甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基)丙酯的合成

[0329] 使 3-氯丙基-4-(四氢呋喃-2-基-羰基)哌嗪-1-甲酸盐 (335mg, 1.1mmol) 溶解于二甲基甲酰胺 (5.0mL), 且添加到步骤 (c) 的固体游离碱产物 (118mg, 0.36mmol) 和 NaI (164mg, 0.72mmol) 中。添加 N,N-二异丙基乙胺 (64 μL, 0.36mmol) 且在 90°C 下过夜搅拌混合物。去除挥发物且经由制备 HPLC (反相) 经 50min 的 15-45% 梯度、流速 20mL/min 完成提纯以提供呈白色固体的 TFA 盐形式的标题化合物 (45mg)。 (m/z) : [M+H]⁺C₃₁H₄₄N₆O₆ 的计算值 : 597.33 ; 实验值 : 597.1。分析 HPLC : (5-65% MeCN/H₂O 经 4min) 保留时间 = 2.58。

[0330] 实例 2

[0331] 4-(2-羟乙基)哌嗪-1-甲酸 3-((1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基)丙酯的合成

[0332]

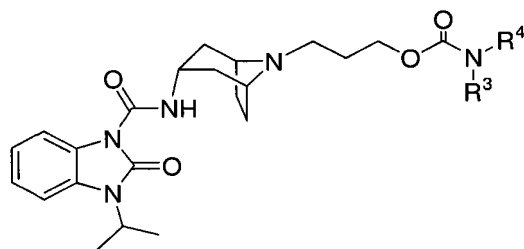


[0333] 除步骤 (d) 中用 2-哌嗪-1-基乙醇代替 1-(四氢呋喃-2-基羰基)哌嗪以外, 使用实例 1 中所述的方法制备呈 TFA 盐形式的标题化合物 (13.8mg)。 (m/z) : [M+H]⁺C₂₈H₄₂N₆O₅ 的计算值 : 543.32 ; 实验值 : 543.5。

[0334] 实例 3-12

[0335] 除在步骤 (d) 中用适当试剂代替 1-(四氢呋喃-2-基-羰基)哌嗪以外, 使用实例 1 中所述的方法制备下列实例 3-12 的化合物。

[0336]



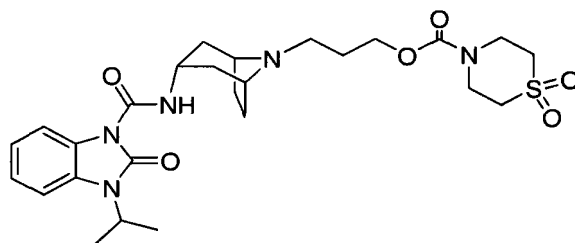
[0337]

实例	-NR ³ R ⁴	分子式	计算值 [M+H] ⁺	实验值 [M+H] ⁺
3		C ₂₈ H ₄₀ N ₆ O ₅	541.31	541.2
4		C ₃₀ H ₄₄ N ₆ O ₆	585.33	585.2
5		C ₂₈ H ₄₀ N ₆ O ₅	541.31	541.2
6		C ₂₆ H ₃₇ N ₅ O ₆ S	548.25	548.2
7		C ₂₇ H ₃₉ N ₅ O ₆ S	562.26	562.2
8		C ₂₇ H ₃₈ N ₆ O ₅	527.29	527.2
9		C ₂₉ H ₄₂ N ₆ O ₅	555.32	555.2
10		C ₂₇ H ₄₀ N ₆ O ₅	529.31	529.2
11		C ₂₉ H ₄₃ N ₇ O ₅	570.30	570.4
12		C ₂₈ H ₄₃ N ₇ O ₆ S	606.30	606.2

[0338] 实例 13

[0339] 1,1-二氧化-1λ⁶-硫代吗啉-4-甲酸3-[(1S, 3R, 5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基]丙酯的替代性合成

[0340]



[0341] a. (1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯的制备

[0342] 在氮气氛下向含有 1-异丙基-1,3-二氢-2H-苯并咪唑-2-酮 (17.6g, 100mmol) 和氯甲酸 4-硝基苯酯 (20.2g, 100mmol) 的 500mL 反应烧瓶添加二氯甲烷 (350ml), 且接着缓慢添加三乙胺 (30.5mL, 220mmol)。搅拌溶液 15min 且接着添加 (1S,3R,5R)-3-氨基-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯 (22.6g, 100mmol)。使反应在室温下搅拌过夜。用饱和碳酸氢钠水溶液 (2×200mL) 洗涤反应混合物。通过蒸馏去除二氯甲烷且添加 MTBE (350ml)。用 1N 磷酸 (2×200mL)、饱和碳酸氢钠 (200mL) 和水 (200mL) 洗涤 MTBE 溶液。有机层经无水硫酸钠 (40g) 干燥且过滤, 且接着通过蒸馏去除溶剂以产出呈浅棕色固体的标题中间体 (35.7g, 83% 产量)。

[0343] b. N-[(1S,3R,5R)-3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-甲酸(8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基)酰胺三氟乙酸盐的制备

[0344] 在 500ml 烧瓶中, 使 (1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯 (21.4g, 50mmol) 溶解于二氯甲烷 (200ml) 中。添加三氟乙酸 (37mL, 500mmol) 且使反应混合物在室温下搅拌 3h。用水 (2×100mL) 洗涤反应混合物。通过蒸馏去除有机层中的溶剂且通过添加 MTBE (200mL) 湿磨粗制产物残余物。在室温下搅拌 1h 后, 固体经过滤分离, 用 MTBE (2×25mL) 洗涤且在真空下干燥以提供标题中间体 (21.0g, 97% 产量)。

[0345] c. 1,1-二氧化-1λ⁶-硫代吗啉-4-甲酸 3-氯丙酯的制备

[0346] 在 500ml 烧瓶中, 使二氧化硫代吗啉 (13.5g, 100mmol) 在室温下溶解于二氯甲烷 (150mL) 中且添加 N,N-二异丙基乙胺 (19.2mL, 110mmol)。在室温下搅拌 10min 后, 在冰浴中将反应混合物冷却到大约 5°C。经由加料漏斗以维持反应温度低于 10°C 的速率向反应混合物添加 1-氯-3-氯甲氧基丙烷 (11.8mL, 100mmol)。当添加完全时, 使反应混合物变暖到室温。用水 (2×100mL) 洗涤反应混合物, 且经无水硫酸钠 (25g) 干燥有机相。在过滤后, 通过蒸馏去除溶剂以产出静置时凝固的呈油状固体的标题化合物 (24.0g, 94% 产量)。

[0347] e. 1,1-二氧化-1λ⁶-硫代吗啉-4-甲酸 3-[(1S,3R,5R)-3-[(3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-羰基)氨基]-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基}丙酯的合成

[0348] 向二氯甲烷 (100ml) 中的 N-[(1S,3R,5R)-3-异丙基-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-1-甲酸(8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基)酰胺三氟乙酸盐 (8.8g, 20mmol) 的溶液添加水 (100ml)。调节水层的 pH 值到约 12 以提供盐的游离碱。分离有机层, 经硫酸钠干燥且通过蒸馏去除溶剂。使游离碱溶解于 N-甲基-2-吡咯烷酮 (100mL) 中且将溶液转移到含有 1,1-二氧化-1λ⁶-硫代吗啉-4-甲酸 3-氯丙酯 (7.2g, 28mmol) 和 NaI (3.0g, 20mmol) 的 250ml 烧瓶。添加 N,N-二异丙基乙胺 (4.2mL, 24mmol) 且将反应混合物加热到 50°C 历

时 18h。通过蒸馏去除溶剂。使粗制产物残余物溶解于 EtOAc (200mL) 中,用水 (2×50mL) 洗涤且经硫酸钠 (10g) 干燥。通过蒸馏去除溶剂以获得粗制产物残余物 (约 12g)。

[0349] 粗制产物残余物经 2" 管柱上的制备 HPLC 提纯;填料:碱钝化的硅胶 (BDS), 流速:200mL/min;洗脱剂 A:水中的 0.1% TFA;洗脱剂 B:水中的 90% 乙腈 /10% 0.1% TFA;梯度 (时间, % B): (0, 5); (25, 30); (35, 80); (45, 80); (50, 5); (60, 5)。产物通过纯洗脱分的冻干而分离以提供标题化合物 (3.4g, 26% 产量)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 9.35 (d, 1H), 8.07 (d, 1H), 7.46 (d, 1H), 7.22 (t, 1H), 7.16 (t, 1H), 4.69 (七重峰, 1H), 4.20-4.00 (m, 3H), 4.12 (t, 2H), 3.90-3.70 (m, 4H), 3.70 (t, 2H), 3.25-3.05 (m, 4H), 2.5-2.0 (m, 8H), 2.15 (dt, 2H), 1.49 (d, 6H)。(m/z): [M+H]⁺C₂₆H₃₇N₅O₆S 的计算值: 548.2; 实验值: 548.4。

[0350] 分析 1: 对于 5-HT_{4(c)} 人类受体的放射性配体结合分析

[0351] a. 膜制备 5-HT_{4(c)}

[0352] 使经人类 5-HT_{4(c)} 受体 cDNA (Bmax = 约 6.0pmol/mg 蛋白质, 如使用 [³H]-GR113808 膜放射性配体结合分析所确定) 稳定转染的 HEK-293 (人类胚胎肾脏) 细胞生长于含有 4,500mg/L D-葡萄糖和盐酸吡哆醇 (GIBCO-Invitrogen Corp., Carlsbad CA: 目录号 11965) 的达尔伯克 (Dulbecco's) 改良伊格尔 (Eagles) 培养基 (DMEM) 中的 T-225 烧瓶中, 其中在 37°C 下、5% CO₂、湿润恒温箱中补充 10% 胎牛血清 (FBS) (GIBCO-Invitrogen Corp.: 目录号 10437)、2mM L-谷氨酰胺和 (100 单位) 盘尼西林-(100 μg) 链霉素 / ml (GIBCO-Invitrogen Corp.: 目录号 15140)。细胞在连续选择压力下通过向培养基添加 800 μg/mL 遗传霉素 (GIBCO-Invitrogen Corp.: 目录号 10131) 来生长。

[0353] 细胞可培养成大约 60-80% 融合 (< 35 继代培养)。在收集之前的 20-22 小时, 用无血清 DMEM 两次洗涤细胞且喂养。膜制备的所有步骤均在冰上进行。通过平缓的机械搅拌和 25mL 吸量管的研磨提升细胞单层。通过 1000rpm 的离心 (5min) 收集细胞。

[0354] 对于膜制备来说, 细胞小球在冰冷的 pH7.4 的 50mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) (膜制备缓冲液) (来自 30-40 个 T225 烧瓶的 40mL/ 总细胞产量) 中再悬浮, 且在冰上使用均匀化破碎仪 (设置为 19, 2×10s) 均匀化。生成的匀浆以 1200g 在 4°C 离心 5min。弃去小球且在 40,000g (20min) 下离心上清液。通过膜制备缓冲液的再悬浮和在 40,000g (20min) 下离心洗涤小球一次。最终小球在 pH7.4 的 50mM HEPES (分析缓冲液) (1 当量 T225 烧瓶 / 1mL) 中再悬浮。膜悬浮液的蛋白质浓度由布莱德福 (Bradford) 方法 (Bradford, 1976) 测定。在 -80°C 将膜等分冷冻存储。

[0355] b. 放射性配体结合分析

[0356] 放射性配体结合分析以 pH7.4 的 50mM HEPES (含有 0.025% 的牛血清蛋白 (BSA)) 中含有 2 μg 膜蛋白质的 400 μL 总分析体积在 1.1mL 96 深孔聚丙烯分析板 (Axygen) 中进行。使用 [³H]-GR113808 (Amersham Inc., Bucks, UK: 目录号 TRK944; 特异性活性为约 82Ci/mmol) 以在 0.001nM-5.0nM 范围内的 8-12 种不同浓度进行用于测定放射性配体的 K_d 值的饱和结合研究。用 [³H]-GR113808 以 0.15nM 和在 10nM-100 μM 范围内的化合物的 11 种不同浓度进行用于确定化合物的 pK_i 值的置换分析。

[0357] 测试化合物以 DMSO 中的 10mM 储备溶液形式接收且在 25°C 于 pH7.4 的 50mMHEPES (含有 0.1% BSA) 内稀释到 400 μM, 且接着在相同缓冲液中完成连续 (1:5) 稀释。在 1 μM 未标记的 GR113808 存在下测定非特异性结合。将分析物在室温下培养 60min,

且接着通过经 0.3% 聚乙烯亚胺中预浸泡的 96 孔 GF/B 玻璃纤维滤板 (PackardBioScience Co., Meriden, CT) 的快速过滤来终止结合反应。滤板用过滤缓冲液 (冰冷的 pH7.4 的 50mM HEPES) 洗涤三次以去除未结合的放射性活性。板经干燥, 向每一孔添加 35 μ L Microscint-20 液体闪烁流体 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 且所述板以 Packard Topcount 液体闪烁计数器 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 来计数。

[0358] 使用用于单-位点竞争的 3 参数模型通过 GraphPad Prism 软件包 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 的非线性回归分析来分析结合数据。如在 1 μ M GR113808 存在下所确定, BOTTOM (曲线最小值) 固定为非特异性结合的值。用 Prism 由最佳拟合 IC_{50} 值计算测试化合物的 K_i 值, 且使用 Cheng-Prusoff 方程式 (Cheng 和 Prusoff, 生化药理学 (Biochemical Pharmacology), 1973, 22, 3099-108) : $K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$ (其中 $[L]$ = 浓度 [3 H]-GR113808) 来计算放射性配体的 K_d 值。结果以 K_i 值的负的以十为底的对数 (pK_i) 表示。

[0359] 在这个分析中具有较高 pK_i 值的测试化合物具有对于 5-HT₄ 受体的较高结合亲和力。在这个分析中测试的本发明的化合物具有在约 7.0 至约 9.0 范围内的 pK_i 值, 通常在约 7.5 至约 8.5 范围内。举例来说, 在这个分析中实例 1 的化合物展现 7.9 的 pK_i 值。

[0360] 分析 2 : 对于 5-HT_{3A} 人类受体的放射性结合分析 : 受体亚型选择性的确定

[0361] a. 膜制备 5-HT_{3A}

[0362] 从 Dr. Michael Bruess (University of Bonn, GDR) (B_{max} = 约 9.0 pmol/mg 蛋白质, 如使用 [3 H]-GR65630 膜放射性配体结合分析所确定) 获得经人类 5-HT_{3A} 受体 cDNA 稳定转染的 HEK-293 (人类胚胎肾脏) 细胞。细胞于 50% 达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM) (GIBCO-Invitrogen Corp., Carlsbad, CA : 目录号 11965) 和 50% Ham' sF12 (GIBCO-Invitrogen Corp. : 目录号 11765) 中在 T-225 烧瓶或细胞工厂中生长, 其中在 37°C 下 5% CO₂、湿润恒温箱中补充 10% 热非活化胎牛血清 (FBS) (Hyclone, Logan, UT : 目录号 SH30070.03) 和 (50 单位) 盘尼西林 - (50g) 链霉素 /ml (GIBCO-Invitrogen Corp. : 目录号 15140)。

[0363] 细胞生长到大约 70-80% 融合 (< 35 继代培养)。膜制备的所有步骤均在冰上进行。为收集细胞, 抽出培养基且用不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的达尔伯克磷酸盐缓冲生理盐水 (dPBS) 清洗。通过缓慢机械搅拌提升细胞单层。通过以 1000rpm (5min) 的离心收集细胞。膜制备的后续步骤遵循用于表示 5-HT_{4(c)} 受体的膜的上述方案。

[0364] b. 放射性配体结合分析

[0365] 在 96 孔聚丙烯分析板中以 pH7.4 的 50mM HEPES (含有 0.025% BSA 分析缓冲液) 中含有 1.5-2 μ g 膜蛋白质的 200 μ L 总分析体积进行放射性配体结合分析。使用 [3 H]-GR65630 (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA : 目录号 NET1011, 特异性活性为约 85Ci/mmol) 以 0.005nM 至 20nM 范围内的 12 种不同浓度来进行用于测定放射性配体的 K_d 值的饱和结合研究。使用 [3 H]-GR65630 以 10pM 至 100 μ M 范围内的化合物的 11 种不同浓度来进行用于测定化合物的 pK_i 值的置换分析。化合物以 DMSO 中的 10mM 储备溶液形式接收 (见 3.1 部分), 在 25°C 下于 pH7.4 的 50mM HEPES (含有 0.1% BSA) 内稀释到 400 μ M, 且接着在相同缓冲液中完成连续 (1 : 5) 稀释。在 10 μ M 未标记 MDL72222 存在下测定非特异性结合。将分析物在室温下培养 60min, 接着通过经 0.3% 聚乙烯亚胺中预浸泡

的 96 孔 GF/B 玻璃纤维滤板 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 快速过滤来终止结合反应。用过滤缓冲液 (冰冷的 pH7.4 的 50mM HEPES) 清洗滤板三次以去除非结合放射活性。板经干燥, 向每一孔添加 35 μ L Microscint-20 液体闪烁流体 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 且以 Packard Topcount 液体闪烁计数器 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 来计数。

[0366] 使用上述非线性回归程序来分析结合数据以测定 K_i 值。使 BOTTOM (曲线最小值) 固定为非特异性结合的值, 如在 10 μ M MDL72222 存在下所确定。Cheng-Prusoff 方程式中量 [L] 定义为浓度 [3 H]-GR65630。

[0367] 关于 5-HT₃ 受体亚型的 5-HT₄ 受体亚型的选择性以比率 $K_i(5\text{-HT}_{3A})/K_i(5\text{-HT}_{4(c)})$ 来计算。在这个分析中测试的本发明的化合物具有在约 10 至约 950 范围内 (通常在约 50 至约 500 范围内) 的 5-HT₄/5-HT₃ 受体亚型选择性。举例来说, 实例 1 展现 160 的亚型选择性。

[0368] 分析 3: 利用表现人类 5-HT_{4(c)} 受体的 HEK-293 细胞的全细胞 cAMP 积累闪烁板分析

[0369] 在这个分析中, 通过测量表现 5-HT₄ 受体的 HEK-293 细胞与不同浓度的测试化合物接触时所产生的环 AMP 的量来确定测试化合物的功能效能。

[0370] a. 细胞培养物

[0371] 将经克隆人类 5-HT_{4(c)} 受体 cDNA 稳定转染的表现受体的 HEK-293 (人类胚胎肾脏) 细胞以两种不同密度来制备: (1) 如使用 [3 H]-GR113808 膜放射配体结合分析所确定, 以约 0.5-0.6 pmol/mg 蛋白质的密度, 和 (2) 以约 6.0 pmol/mg 蛋白质的密度。细胞生长于含有 4,500mg/L D-葡萄糖 (GIBCO-Invitrogen Corp.: 目录号 11965) 的达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM) (GIBCO-Invitrogen Corp., Carlsbad, CA: 目录号 11965) 中的 T-225 烧瓶中, 其中在 37°C 下 5% CO₂、湿润恒温箱中补充 10% 胎牛血清 (FBS) (GIBCO-Invitrogen Corp.: 目录号 10437) 和 (100 单位) 盘尼西林-(100 μ g) 链霉素/ml (GIBCO-Invitrogen Corp.: 目录号 15140)。细胞在连续选择压力下通过向培养基添加遗传霉素 (800 μ g/mL: GIBCO-Invitrogen Corp.: 目录号 10131) 来生长。

[0372] b. 细胞制备

[0373] 细胞生长到大约 60-80% 融合。在分析之前的 20 至 22 小时, 用含有 4,500mg/L D-葡萄糖 (GIBCO-Invitrogen Corp.: 目录号 11965) 的不含血清 DMEM 洗涤细胞两次且喂养。为收集细胞, 抽出培养基且向每一 T-225 烧瓶添加 10mL Versene (GIBCO-Invitrogen Corp.: 目录号 15040)。细胞在 RT 培养 5min 且接着通过机械搅拌从烧瓶移去。将细胞悬浮液转移到含有等体积的预温 (37°C) dPBS 的离心管, 且以 1000rpm 离心 5min。弃去上清液且使小球在预温 (37°C) 荧光放射增强缓冲液 (每 2-3 个 T-225 烧瓶 10mL 当量) 中预悬浮。记录这个时间且标记为时间零点。用 Coulter 计数器来计数细胞 (8 μ m 以上计数, 烧瓶产量为 1-2 $\times 10^7$ 细胞/烧瓶)。细胞在预温 (37°C) 荧光放射增强缓冲液中 (如闪烁板试剂盒中所提供) 以 5 $\times 10^5$ 细胞/ml 的浓度预悬浮且在 37°C 预培养 10min。

[0374] 根据制造厂家的说明, 以放射性免疫分析格式使用具有 125 I-cAMP (SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) 的闪烁板腺苷酸环化酶活化分析系统来进

行 cAMP 分析。

[0375] 细胞如上所述生长且制备。在分析中最终细胞浓度为 25×10^3 细胞 / 孔且最终分析体积为 $100 \mu\text{L}$ 。测试化合物以 DMSO 中的 10mM 储备溶液接收, 在 25°C pH7.4 的 50mM HEPES (含有 0.1% BSA) 内稀释到 $400 \mu\text{M}$ 且接着在相同缓冲液中完成连续 (1 : 5) 稀释。用在 10pM 至 $100 \mu\text{M}$ (最终分析浓度) 范围内的化合物的不同浓度进行环 AMP 积累分析。在每一板上包括 5-HT 浓度反应曲线 (10pM 至 $100 \mu\text{M}$)。在 37°C 下震荡 15min 来培养细胞, 且通过向每一孔添加 $100 \mu\text{L}$ 冰冷的检测缓冲液 (如在闪烁板试剂盒中所提供) 来终止反应。密封所述板且在 4°C 培养过夜。通过使用 Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 的亲近闪烁光谱法量化结合放射性。

[0376] 根据制造厂家的使用者手册中所提供的说明, 将每 mL 反应所产生的 cAMP 量从 cAMP 标准曲线外推。使用 3- 参数 S 型剂量 - 反应模式 (使斜率限制为统一) 通过具有 GraphPad Prism 软件包的非线性回归分析来分析数据。效能数据报道为 pEC_{50} 值 (EC_{50} 值的负的以十为底的对数), 其中 EC_{50} 为对于 50% 最大反应来说的有效浓度。

[0377] 在这个分析中展现较高 pEC_{50} 值的测试化合物具有促进 5-HT_4 受体的较高效能。在这个分析中使用具有约 $0.5\text{-}0.6\text{pmol}/\text{mg}$ 蛋白质密度的细胞系 (1) 测试的本发明化合物具有在约 7.5 至约 9.0 范围内的 pEC_{50} 值, 通常在约 8.0 至约 9.0 的范围内。举例来说, 实例 1 的化合物具有 8.4 的 pEC_{50} 值。

[0378] 分析 4 : 表现 hERG 心脏钾离子通道的全细胞中的抑制钾离子流的活体外电压钳分析

[0379] 经 hERG cDNA 稳定转染的 CHO-K1 细胞由 University of Wisconsin 的 Gail Robertson 获得。细胞保持在低温存储器中直到需要。细胞在用 10% 胎牛血清和 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 遗传霉素补充的达尔伯克改良伊格尔培养基 /F12 中扩展且继代。细胞在涂布聚-D-赖氨酸 ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的玻璃盖片上、在 35mm^2 皿 (含有 2mL 培养基) 中以能够使分离的细胞经选择用于全细胞电压钳研究的密度接种。所述皿在 37°C 下于湿润、 5% CO_2 环境中维持。

[0380] 细胞外溶液至少每 7 天制备且不用时则在 4°C 下存储。细胞外溶液含有 (mM) : NaCl (137)、KCl (4)、 CaCl_2 (1.8)、 MgCl_2 (1)、葡萄糖 (10)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) (10) (经 NaOH 调 pH 为 7.4)。在测试化合物不存在或存在下, 细胞外溶液包含在储集器中, 其由储集器以大约 $0.5\text{mL}/\text{min}$ 流入记录槽内。制备、等分且在 -20°C 存储细胞内溶液直到使用日。细胞内溶液含有 (mM) : KCl (130)、 MgCl_2 (1)、乙二醇 - 双 (β -氨基乙基醚) N,N,N',N' - 四乙酸盐 (EGTA) (5)、MgATP (5)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) (10) (经 KOH 调节 pH 值为 7.2)。所有试验均在室温 ($20\text{-}22^\circ\text{C}$) 下进行。

[0381] 将细胞在其上接种的盖片转移到记录槽且连续灌注。在细胞与贴片电极之间形成千兆欧姆密封部分。一旦获得稳定贴片, 则记录以电压钳模式开始, 其中最初的保持电位在 -80mV 。在达到稳定全细胞电流之后, 细胞暴露于测试化合物。标准电压方法为: 从 -80mV 到 $+20\text{mV}$ 的保持电位的步骤历时 4.8sec , 复极化至 -50mV 历时 5sec 且接着回到原始保持电位 (-80mV)。这个电压方案每 15sec (0.067Hz) 运行一次。在复极化阶段期间使用 pClamp 软件来确定峰值电流振幅。以 $3 \mu\text{M}$ 浓度的测试化合物经细胞灌注 5 分钟, 随后在不存在化合物下冲洗 5 分钟。最终向灌注液添加阳性对照 (西沙必利 (cisapride), 20nM) 以测试细胞的功能。从 -80mV 到 $+20\text{mV}$ 的步骤激活 hERG 通道, 导致外向电流。回到 -50mV 的步骤导

致外向尾电流,同时通道由失活和钝化而恢复。

[0382] 使用 pCLAMP 软件来确定在复极化阶段期间的峰值电流振幅。将对照和测试物品数据输出到 Origin® (OriginLab Corp., Northampton MA), 其中个别电流振幅在不存在化合物时正规化为最初电流振幅。计算经正规化的电流均值和每一条件的标准误差且与试验的时程相比较而绘图。

[0383] 在暴露于测试物品或媒介对照 (通常为 0.3% DMSO) 5 分钟后, 在观测到的 K^+ 电流抑制作用之间作出比较。使用两个群体的独立 t 检验 (Microcal Origin v. 6.0) 进行试验组之间的统计比较。差异在 $p < 0.05$ 时考虑为显著的。

[0384] 在这个分析中钾离子流的抑制百分率越小, 则当用作治疗剂时测试化合物改变心脏复极化模式的潜力越小。在这个分析中以 $3 \mu M$ 浓度测试的本发明的化合物通常展现小于约 40% 的钾离子流抑制, 更通常为小于约 25%。举例来说, 实例 1 的化合物在这个分析中展现约 9% 的抑制。

[0385] 分析 5 : 口服生物可用性的活体外模式 : Caco-2 渗透分析

[0386] 进行 Caco-2 渗透分析以示范测试化合物在口服投药后通过肠且进入血流的能力。测定溶解状态的测试化合物渗透经设计以模拟人类小肠单层的紧密接合的细胞单层的速率。Caco-2 (结肠、腺癌; 人类) 细胞由 ATCC (美国典型微生物菌种保藏中心 (American Type Culture Collection); Rockville, MD) 获得。为进行渗透研究, 将细胞在预润湿的 transwells 聚碳酸酯过滤器 (Costar; Cambridge, MA) 上以 $63,000$ 个细胞 / cm^2 的密度接种。细胞单层在 21 天后形成于培养物中。细胞在 transwell 板中培养后, 含有细胞单层的膜从 transwell 板分离且插入扩散盒 (Costar; Cambridge, MA) 内。将扩散盒插入加热块中, 所述加热块装备有外部循环、恒温调节 $37^\circ C$ 的水以用于温度控制。气体歧管将 $95\% O_2/5\% CO_2$ 传递至每半个扩散盒且产生跨越细胞单层的层流模式, 所述模式有效减少未被搅拌的边界层。

[0387] 用以 $100 \mu M$ 的测试化合物浓度和 ^{14}C - 甘露糖醇进行渗透研究以监测单层的完整性。所有试验均在 $37^\circ C$ 进行 60min。样品从扩散盒的供体和接受者两端在 0、30 和 60min 取得。通过 HPLC 或液体闪烁计数测试化合物和甘露糖醇浓度分析样品。计算以 cm/sec 计之渗透系数 (K_p)。

[0388] 在这个分析中, 大于约 $10 \times 10^{-6} cm/sec$ 的 K_p 值被认为表现出有利的生物可用性。在这个分析中测试的本发明的化合物通常展现介于约 $20 \times 10^{-6} cm/sec$ 与约 $60 \times 10^{-6} cm/sec$ 之间的 K_p 值, 更通常介于约 $30 \times 10^{-6} cm/sec$ 与约 $60 \times 10^{-6} cm/sec$ 之间。举例来说, 实例 1 的化合物展现约 $60 \times 10^{-6} cm/sec$ 的 K_p 值。

[0389] 分析 6 : 大鼠的药物动力学研究

[0390] 以介于约 5 与约 6 之间的 pH 值在 0.1% 乳酸中制备测试化合物的水溶液调配物。通过以 $2.5 mg/kg$ 剂量静脉内投药 (IV) 或通过以 $5 mg/kg$ 剂量口服管饲 (PO) 给雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (CD 系, 查尔斯河实验室 (Charles River Laboratories), Wilmington, MA) 服用测试化合物。对于 IV 投药的给药量为 $1 mL/kg$ 且对 PO 投药的给药量为 $2 mL/kg$ 。从给药前的动物和给药后 2 (仅 IV)、5、15 和 30min 和 1、2、4、8 和 24 小时的动物收集连续血液样品。通过具有 $1 ng/mL$ 的量下限的液相色谱 - 质谱法分析 (LC-MS/MS) (MDS SCIEX, API 4000, Applied Biosystems, Foster City, CA) 来确定血浆中测试化合物

的浓度。

[0391] 使用 WinNonlin(第 4.0.1 版, Pharsight, Mountain View, CA) 的非隔室分析(对于 IV 为 Model 201 和对于 PO 为 Model 200) 来评估标准药物动力学参数。在血浆中的测试化合物浓度相对时间曲线中的最大值表示为 C_{\max} 。通过线性梯形法则来计算在从给药时间到最后可测量浓度 ($AUC(0-t)$) 的浓度相对时间曲线下的面积。口服生物可用性 ($F(\%)$) (也就是, PO 投药的 $AUC(0-t)$ 相对于 IV 投药的 $AUC(0-t)$ 的剂量正规化比率) 可如下计算:

$$[0392] \quad F(\%) = AUC_{PO}/AUC_{IV} \times \text{剂量}_{IV} / \text{剂量}_{PO} \times 100\%$$

[0393] 在这个分析中展现参数 C_{\max} 、 $AUC(0-t)$ 和 $F(\%)$ 较大值的测试化合物当口服给药时预期具有更大生物可用性。在这个分析中测试的本发明化合物具有介于约 0.15 与约 0.35 $\mu\text{g/mL}$ 之间的 C_{\max} 值和介于 0.5 与约 1.1 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/mL}$ 之间的 $AUC(0-t)$ 值。具体来说, 实例 1 的化合物具有以下值: 0.32 $\mu\text{g/mL}$ 的 C_{\max} 、0.97 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/mL}$ 的 $AUC(0-t)$ 和 55% 的口服生物可用性 $F(\%)$ 。

[0394] 虽然本发明已参考其特定实施例描述, 但所属领域的技术人员应了解不悖离本发明的真实精神和范畴可做出多种改变且可取代等效物。另外, 可做出多种修改以使得特殊情况、材料、物质的组合、方法、方法步骤或步骤适应本发明的目的、精神和范畴。所有所述修改均意欲在此所附的权利要求书的范畴内。此外, 所有在本文所引用的公开案、专利和专利文件均以全文引用的方式并入, 如同个别引用一般并入。