

[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 200810009290.0

[51] Int. Cl.

C07D 451/02 (2006.01)

A61K 31/46 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 101230062A

[22] 申请日 2004.10.12

[21] 申请号 200810009290.0

分案原申请号 200480037266.8

[30] 优先权

[32] 2003.10.14 [33] US [31] 60/511,009

[71] 申请人 葛兰素集团有限公司

地址 英国米德尔塞克斯

[72] 发明人 雅各布·布希-彼得森

迈克尔·R·帕洛维奇 万泽红

严洪兴 祝翀捷

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

权利要求书 3 页 说明书 20 页

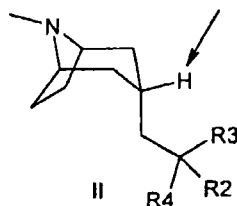
[54] 发明名称

蕈毒碱性乙酰胆碱受体拮抗剂

[57] 摘要

提供蕈毒碱性乙酰胆碱受体拮抗剂及使用它们的方法。

1.具有结构 II 的化合物,条件是当 R4 是-OC(O)CH₃ 时, R2 和 R3 不是 2-噻吩:



其中:

所示 H 原子的位置为外型;

R2 和 R3 独立地选自芳基和杂芳基;

R4 选自(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₁₂)环烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₁₂)环烷基、芳基、杂芳基、(C₁-C₆)烷基-芳基、(C₁-C₆)烷基-杂芳基、-OR₅、-CH₂OR₅、-CH₂OH、-CN、-CF₃、-CH₂O(CO)R₆、-CO₂R₇、-CH₂NH₂、-CH₂N(R₇)SO₂R₅、-SO₂N(R₇)(R₈)、-CON(R₇)(R₈)、-CH₂N(R₈)CO(R₆)、-CH₂N(R₈)SO₂(R₆)、-CH₂N(R₈)CO₂(R₅)、-CH₂N(R₈)CONH(R₇);

R₅ 选自(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₁₂)环烷基、(C₁-C₆)烷基-芳基、(C₁-C₆)烷基-杂芳基;

R₆ 选自(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₁₂)环烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₁₂)环烷基、芳基、杂芳基、(C₁-C₆)烷基-芳基、(C₁-C₆)烷基-杂芳基;

R₇ 和 R₈ 独立地选自 H、(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₁₂)环烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₁₂)环烷基、(C₁-C₆)烷基-芳基和(C₁-C₆)烷基-杂芳基。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中

R2 和 R3 独立地选自芳基或杂芳基;

R4 选自芳基、-OR₅、-CH₂OR₅、-CH₂OH、-CN、-CO₂R₇、-CH₂N(R₇)SO₂R₅、-CON(R₇)(R₈)、-CH₂N(R₈)CO(R₆)、-CH₂N(R₈)SO₂(R₆)、-CH₂N(R₈)CO₂(R₅)、-CH₂N(R₈)CONH(R₇);

R₅ 为(C₁-C₆)烷基;

R₆ 选自(C₁-C₆)烷基或芳基; 以及

R₇ 和 R₈ 独立地选自 H 或(C₁-C₆)烷基。

3. 根据权利要求 2 的化合物, 其中 R2 和 R3 都为苯基。

4. 根据权利要求3的化合物, 其中R4为氰基。
5. 根据权利要求2的化合物, 其中R4为氰基。
6. 根据权利要求2的化合物, 其中R2和R3都为杂芳基。
7. 根据权利要求6的化合物, 其中R2和R3都为噻吩基。
8. 根据权利要求2的化合物, 其中R4为CON(R7)(R8)。
9. 根据权利要求8的化合物, 其中R7和R8都为氢。
10. 根据权利要求2的化合物, 其中R6为氢。
11. 根据权利要求2的化合物, 其中R6为芳基。
12. 根据权利要求2的化合物, 其中R4为-OR5、-CH₂OR5和-CH₂OH。
13. 根据权利要求12的化合物, 其中R5为甲基。
14. 根据权利要求2的化合物, 其中R4为-CO₂R7, 以及R7为氢。
15. 根据权利要求2的化合物, 其中R4为-CH₂N(R7)SO₂R5以及R5为甲基。
16. 根据权利要求2的化合物, 其中R4为-CH₂N(R8)CO(R6), R8为氢, 以及R6为芳基。
17. 根据权利要求2的化合物, 其中R4为-CH₂N(R8)CO(R6), R8为氢, 以及R6为(C₁-C₆)烷基。
18. 根据权利要求2的化合物, 其中R4为-CH₂N(R8)CONH(R7), R8为氢, 以及R7为(C₁-C₆)烷基。
19. 根据权利要求1的化合物, 其为:
 - 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙腈;
 - (内)-8-甲基-3-(2,2,2-三苯基-乙基)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷;
 - 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酰胺;
 - 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酸;
 - 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙-1-醇;
 - 1-乙基-3-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-脲;
 - N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-乙酰胺;
 - N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-苯甲酰胺;
 - 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二-噻吩-2-基-丙腈;

N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-苯磺酰胺;

[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-脲; 和
N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-甲磺酰胺。

20. 化合物, 其为 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙腈。

21. 药物组合物, 其包含权利要求 1 或 2 的化合物及药学上可接受的载体或稀释剂。

22. 药物组合物, 其包含权利要求 19 的化合物及药学上可接受的载体或稀释剂。

23. 药物组合物, 其包含权利要求 20 的化合物及药学上可接受的载体或稀释剂。

蕈毒碱性乙酰胆碱受体拮抗剂

本申请是申请日为2004年10月12日、申请号为200480037266.8、发明名称为“蕈毒碱性乙酰胆碱受体拮抗剂”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

本发明涉及8-氮杂双环[3,2,1]辛烷的新衍生物,药物组合物,它们的制备方法,以及它们在治疗M₃蕈毒碱性(muscarinic)乙酰胆碱受体介导的疾病中的用途。

发明背景

从外周神经系统和中枢神经系统的胆碱能神经元中释放的乙酰胆碱通过与两种主要类型的乙酰胆碱受体-烟碱乙酰胆碱受体和蕈毒碱性乙酰胆碱受体的相互作用影响许多不同的生物进程。蕈毒碱性乙酰胆碱受体(mAChRs)属于具有七个跨膜区的G-蛋白偶联受体的超家族。存在五种亚型的mAChRs,称为M₁-M₅,每种是不同基因的产物。这五种亚型中的每一个都表现出独特的药理学性质。蕈毒碱性乙酰胆碱受体广泛地分布于脊椎动物器官中,并且这些受体可以介导抑制性作用和刺激性作用。例如,在气道、膀胱和胃肠道中的平滑肌中发现M₃ mAChRs介导收缩性反应。关于评述,请参见{Brown 1989 247/id}。

蕈毒碱性乙酰胆碱受体功能障碍已经在许多不同的病理生理学状态中被记录。例如,在哮喘和慢性阻塞性肺病(COPD)中,炎症病症导致对支配肺平滑肌的副交感神经起作用的抑制性M₂蕈毒碱性乙酰胆碱自身受体功能的缺失,造成迷走神经(vagal nerve)刺激后乙酰胆碱释放增加。这种mAChR功能障碍导致由M₃ mAChRs刺激增加介导的气道高反应性{Costello, Evans, et al. 1999 72/id}{Minette, Lammers, et al. 1989 248/id}。类似地,在炎性肠病(IBD)中的胃肠道炎症导致M₃ mAChR-介导的运动过强{Oprins, Meijer, et al. 2000 245/id}。由于膀胱高收缩性引起的失禁同样被证明是通过增加M₃ mAChRs刺激来介导。{Hegde & Eglen 1999 251/id}。因此,鉴定出亚型-选择性mAChR拮抗剂可以有效的用于治疗这些mAChR-介导的疾病。

尽管大量证据支持使用抗毒蕈碱受体疗法来治疗许多疾病,但是相对很少的

抗毒蕈碱化合物在临床上被使用。因此，仍需要新的化合物，其能够造成 M_3 mAChRs 处的阻断。与 M_3 mAChRs 刺激增加有关的病症，例如哮喘、COPD、IBD 和尿失禁将得益于 mAChR 结合的抑制剂化合物。

发明概述

本发明提供一种治疗毒蕈碱性乙酰胆碱受体(mAChR)介导的疾病的方法，其中乙酰胆碱与 M_3 mAChR 结合并且该方法包括给予有效量的式(I)或式(II)的化合物[其中 R2 和 R3 是 2-噻吩以及 R4 是 $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 的式(II)化合物除外]或其药学上可接受的盐。

本发明还涉及一种在需要的哺乳动物中抑制乙酰胆碱与其受体结合的方法，该方法包括给予上述哺乳动物有效量的式(I)或式(II)的化合物。

本发明还提供新的式(I)或式(II)的化合物，以及包含式(I)或式(II)化合物和药物载体或稀释剂的药物组合物。

在本发明中使用的式(I)或式(II)的化合物由下面的结构表示：



其中：

所示 H 原子的位置为外型；

R1⁻表示与 N 原子的正电荷有关的阴离子。R1⁻可以是但不局限于氯离子(chloride)、溴离子(bromide)、碘离子(bromide)、硫酸根(sulfate)、苯磺酸根(benzene sulfonate)和甲苯磺酸根(toluen sulfonate)；

R2 和 R3 独立地选自直链或支链的低级烷基(优选具有 1-6 个碳原子)、环烷基(具有 5-6 个碳原子)、环烷基-烷基(具有 6-10 个碳原子)、N 或 O 作为杂原子的杂环烷基(具有 5-6 个碳原子)、N 或 O 作为杂原子的杂环烷基-烷基(具有 6-10 个碳原子)、芳基、任选取代的芳基、杂芳基和任选取代的杂芳基；

R4 选自 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基、 $(\text{C}_3\text{-C}_{12})$ 环烷基、 $(\text{C}_3\text{-C}_7)$ 杂环烷基、 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基 $(\text{C}_3\text{-C}_{12})$ 环烷基、 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基 $(\text{C}_3\text{-C}_7)$ 杂环烷基、芳基、杂芳基、 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基-芳基、 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基-杂芳基、 $-\text{OR}_5$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}_5$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CO})\text{R}_6$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}_7$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_7)\text{SO}_2\text{R}_5$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}_7)(\text{R}_8)$ 、

-CON(R7)(R8)、-CH₂N(R8)CO(R6)、-CH₂N(R8)SO₂(R6)、-CH₂N(R8)CO₂(R5)、-CH₂N(R8)CONH(R7);

R5 选自(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₁₂)环烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₇)杂环烷基、(C₁-C₆)烷基-芳基、(C₁-C₆)烷基-杂芳基;

R6 选自(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₁₂)环烷基、(C₃-C₇)杂环烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₁₂)环烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₇)杂环烷基、芳基、杂芳基、(C₁-C₆)烷基-芳基、(C₁-C₆)烷基-杂芳基;

R7 和 R8 独立地选自 H、(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₁₂)环烷基、(C₃-C₇)杂环烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₁₂)环烷基、(C₁-C₆)烷基(C₃-C₇)杂环烷基、(C₁-C₆)烷基-芳基和(C₁-C₆)烷基-杂芳基。

合适的药学上可接受的盐对本领域熟练技术人员来说是公知的,并且包括无机和有机酸的碱式盐,该无机和有机酸例如是盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、乙酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、草酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、苯甲酸、水杨酸、苯乙酸和扁桃酸。此外,式(I)或式(II)化合物的药学上可接受的盐还可以用药学上可接受的阳离子制备。合适的药学上可接受的阳离子对本领域熟练技术人员来说是公知的,并且包括碱金属、碱土金属、铵和季铵阳离子。

在此所使用的下列术语是指:

- "卤素"-所有卤素,即氯、氟、溴和碘。
- "C1-10 烷基"或"烷基"-1-10 个碳原子的直链和支链部分,除非链长另有限制,包括但不限于,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基等。
- 在此使用的术语"环烷基"是指环状部分,优选 3-8 个碳原子,包括,但不局限于环丙基、环戊基、环己基等。
- 在此使用的术语"链烯基"在每次出现时是指 2-10 个碳原子的直链或支链部分,除非链长另有限制,包括但不限于乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基等。
- "芳基"-苯基和萘基;
- "杂芳基"(它自己或在任何组合中,例如"杂芳氧基"或"杂芳基烷基")-5-10 元芳香族环系,其中一个或多个环含有一个或多个选自 N、O 或 S 的杂

原子, 例如, 但不限于, 吡咯、吡唑、呋喃、噻吩、喹啉、异喹啉、喹唑啉基、吡啶、嘧啶、咪唑、四唑、噻唑、噻二唑、三唑、咪唑或苯并咪唑。

- "杂环的"(它自己或在任何组合中, 例如"杂环烷基") - 饱和的或部分不饱和的 4-10 元环系, 其中一个或多个环含有一个或多个选自 N、O 或 S 的杂原子; 例如, 但不限于, 吡咯烷、哌啶、哌嗪、吗啉、四氢吡喃、硫吗啉(thiomorpholine)或咪唑烷。此外, 硫可以任选被氧化成砷或亚砷。

- 在此使用的"芳烷基"或"杂芳基烷基"或"杂环烷基"除非另有说明是指与同样在此所定义的芳基、杂芳基或杂环部分相连的如上所定义的 C1-10 烷基。

- "亚磺酰基" - 相应的硫化物的氧化物 S(O), 术语"硫(thio)"是指硫化物, 以及术语"磺酰基"是指完全氧化的 S(O)₂ 部分。

- 在此使用的"其中两个 R1 部分(或两个 Y 部分)可以一起形成 5 或 6 元饱和的或不饱和的环"是指形成芳香族环系, 例如萘, 或是连接 6 元部分饱和或不饱和环的苯基部分, 例如 C6 环烯基, 即己烯, 或 C5 环烯基部分, 例如环戊烯。

在本发明中有用的优选化合物包括:

(内)-3-(2-甲氧基-2,2-二-噻吩-2-基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物;

3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙腈;

(内)-8-甲基-3-(2,2,2-三苯基-乙基)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷;

3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酰胺;

3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酸;

(内)-3-(2-氰基-2,2-二苯基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物;

(内)-3-(2-氰基-2,2-二苯基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷溴化物;

3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙-1-醇;

N-苄基-3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酰胺;

(内)-3-(2-氨基甲酰基-2,2-二苯基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物;

1-苄基-3-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-

脲;

1-乙基-3-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-

脲;

N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-乙酰胺;

N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-苯甲酰

胺;

3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二-噻吩-2-基-丙腈;

(内)-3-(2-氰基-2,2-二-噻吩-2-基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物;

N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-苯磺酰胺;

[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-脲;

N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-甲磺酰胺; 和

(内)-3-{2,2-二苯基-3-[(1-苯基-甲酰基(methanoyl))-氨基]-丙基}-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷溴化物。

在本发明中有用的更优选化合物包括:

(内)-3-(2-甲氧基-2,2-二-噻吩-2-基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物;

(内)-3-(2-氰基-2,2-二苯基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物;

(内)-3-(2-氰基-2,2-二苯基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷溴化物;

(内)-3-(2-氨基甲酰基-2,2-二苯基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物;

(内)-3-(2-氰基-2,2-二-噻吩-2-基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物; 和

(内)-3-{2,2-二苯基-3-[(1-苯基-甲酰基)-氨基]-丙基}-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷溴化物。

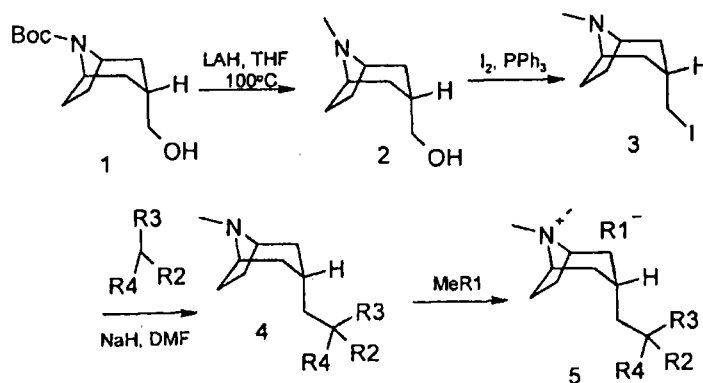
制备方法

制备

式(I)和式(II)的化合物可以通过使用合成步骤获得,其中一些在下面的流程中进行说明。为这些流程而设的合成适合于制备具有各种不同的 R1、R2、R3 和 R4 的式(I)和式(II)的化合物,其使用合适保护的取代基进行反应以达到与在此所列的反应相适应。随后脱保护,在那些情况中,然后得到一般公开性质的化合物。虽然一些流程仅仅以式(II)的化合物表示,但是这种做法仅仅是以说明为目的。

一般制备方法表示在流程 I 中。该合成从化合物 1 开始。用氢化铝锂(LAH)还原,得到醇 2。用碘置换得到 3。然后与来源于 $\text{HCR}_2(\text{R}_3)(\text{R}_4)$ 的阴离子偶联反应,得到化合物 4,其很容易转化为铵盐 5。

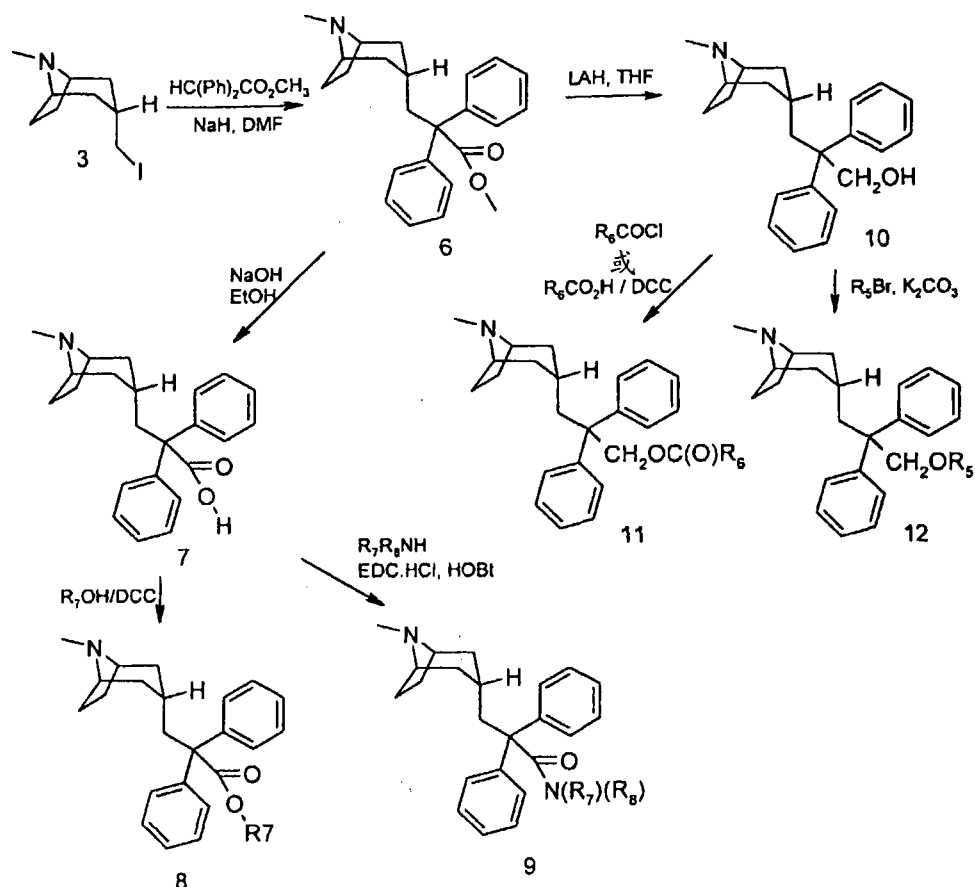
流程 I.



式(II)化合物的更具体制备方法在流程 II 中给出。酯 $\text{HC}(\text{Ph})_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ 与 3 烷基化得到化合物 6。6 水解生成酸 7。然后,该酸与醇(R7)OH 在 1,3-二环己基碳二亚胺介导下缩合生成酯 8。酸 7 与胺(R7)(R8)NH 在本领域熟练技术人员公知的合适的酰胺偶联条件下缩合,例如盐酸 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC.HCl)和 1-羟基苯并三唑水合物(HOBt),得到酰胺 9。6 还原生成醇 10。10 与酰基氯(R6)COCl 或酸(R6)CO₂H 反应得到酯 11。然后,10 与合适的试剂如(R5)Br 烷基化反应,得到 12。

通过与合适的反应试剂如 MeBr 和 MeI 反应(没有在流程中表示出来),将结构类似于 6、7、8、9、10、11 和 12 的化合物转化为相应的铵盐。在一些制备步骤中使用合适的保护和脱保护方法。

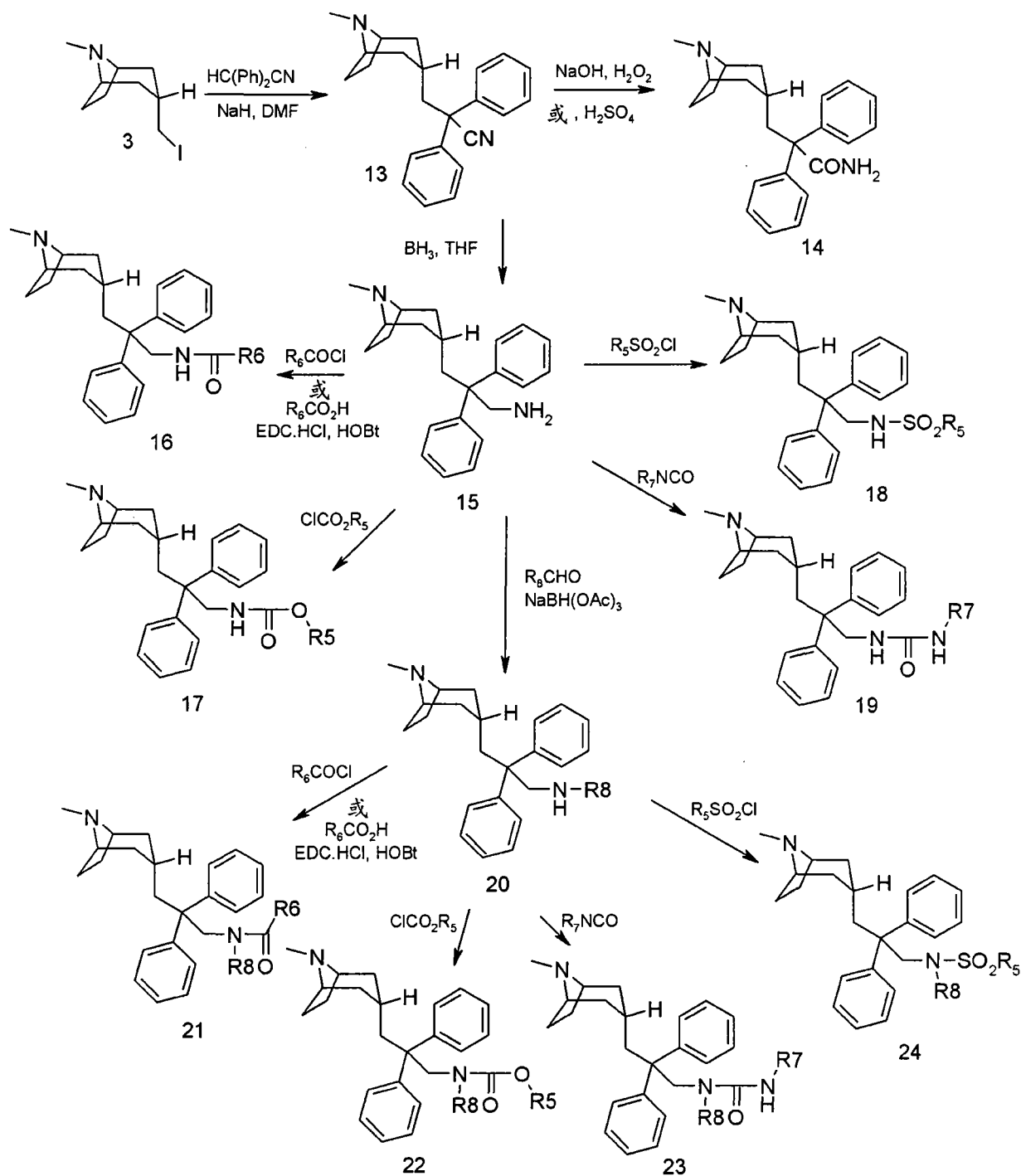
流程 II.



式(II)化合物的更具体制备方法在流程 III 中给出。使 $\text{HC(Ph)}_2\text{CN}$ 与 3 进行烷基化反应得到腈 13。13 在碱性条件(例如, NaOH 和 H_2O_2)或酸性条件(例如, H_2SO_4)下水解得到酰胺 14。还原 13 得到胺 15, 胺 15 可以方便地转化为酰胺 16、氨基甲酸酯(carbamide)17、磺酰胺 18 和脲 19。15 与醛 $(\text{R}_8)\text{CH(O)}$ 缩合, 接着用 NaBH(OAc)_3 还原, 得到胺 20, 很容易将胺 20 转化为酰胺 21、氨基甲酸酯 22、脲 23 和磺酰胺 24。

通过与合适的反应试剂如 MeBr 和 MeI 反应(没有在流程中表示出来), 将结构类似于 13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 和 24 的化合物转化为相应的铵盐。在一些制备步骤中使用合适的保护和脱保护方法。

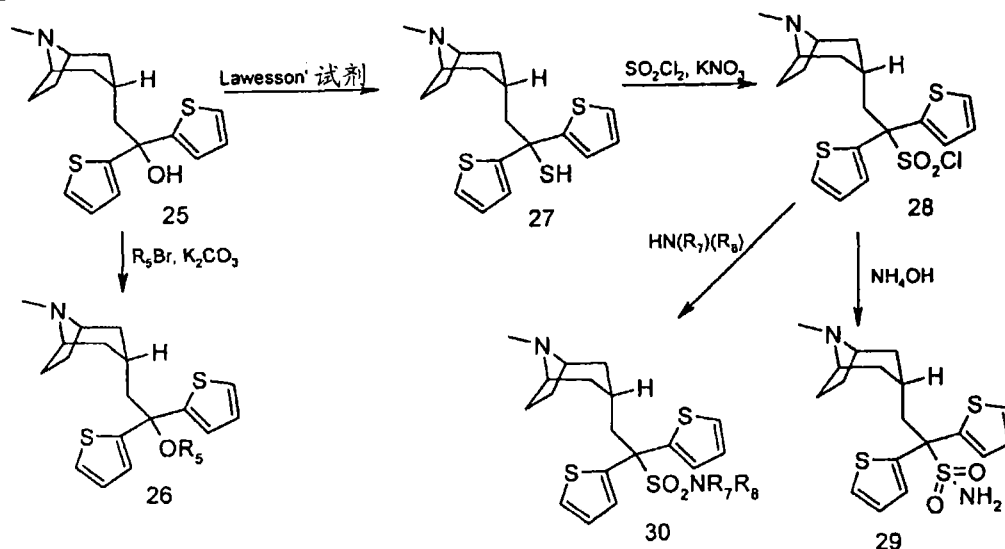
流程 III.



式(II)化合物的更具体制备方法在流程 IV 中给出。25 与 $(\text{R}_5)\text{Br}$ 进行烷基化反应得到 26。25 与 Lawesson's 试剂反应得到 27。27 用 SO_2Cl_2 和 KNO_3 氧化, 得到 28, 接着将 28 转化为 29 或磺酰胺 30。

通过与合适的反应试剂如 MeBr 和 MeI 反应(没有在流程中表示出来), 很容易将结构类似于 26、27、29 和 30 的化合物转化为相应的铵盐。在一些制备步骤中使用合适的保护和脱保护方法。

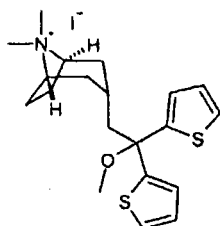
方案 IV



合成实施例

下列实施例用于说明本发明，而不是以任何方式对本发明构成限制：

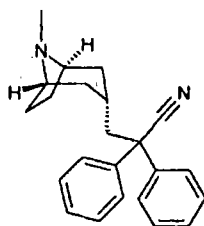
实施例 1



(内)-3-(2-甲氧基-2,2-二噻吩-2-基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]

辛烷碘化物

向 2-(8-甲基-8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基)-1,1-二噻吩-2-基-乙醇(根据 US2800482 制备)(212mg, 0.64mmol)在 5 mL 二氯甲烷和碘甲烷(0.40ml, 6.4 mmol)中的溶液中加入 50%含水氢氧化钾(0.25ml, 3.2 mmol)和四丁铵氯化物(5mg, 3 mol%)。将反应混合物加热至回流 5 天。每天，加入额外的 0.2mL 碘甲烷和 0.1mL 氢氧化钾。反应结束后，将反应混合物冷却至室温，用二氯甲烷稀释，接着用水洗涤。水层用二氯甲烷萃取，合并的有机层用盐水洗涤，在 MgSO_4 中干燥，接着在真空中进行浓缩。粗产物用二氯甲烷/乙酸乙酯重结晶，得到 109mg 标题化合物：LCMS(ES)m/z 362(M)⁺。

实施例 2**3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙腈****2a)((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-甲醇的制备**

将 1,1-二甲基乙基(内)-3-(羟甲基)-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸酯(0.50 g, 2.05 mmol)和 LiAlH_4 (6.16 mL, 1.0 M 的 THF 溶液, 6.16 mmol)的混合物用微波反应器在 80℃加热 60 分钟。然后,将该溶液与饱和 Na_2SO_4 溶液混合,通过硅藻土(celite)过滤,浓缩,得到标题化合物 (0.31 g, 97 %): LCMS(ES) m/z 156($\text{M}+\text{H}^+$); $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 1.28(s, 1H), 1.59(m, 4H), 1.90(m, 1H), 2.13(m, 4H), 2.32(s, 3H), 3.17(s, 2H), 3.59(d, 2H).

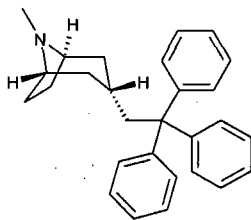
2b)(内)-3-碘甲基-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷的制备

将碘(6.67 g, 25.8 mmol)和((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-甲醇(2.0 g, 12.9 mmol)在 CH_2Cl_2 (120 mL)中的溶液与 PPh_3 (在树脂上, 8.6 g, 3 mmol/g, 25.8 mmol)混合。所得混合物搅拌 17 小时,过滤,浓缩,得到标题化合物(2.63 g, 77 %): LCMS(ES) m/z 266($\text{M}+\text{H}^+$); $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 2.05(m, 4H), 2.39(m, 3H), 2.79(d, 3H), 2.98(m, 2H), 3.45(d, 2H), 3.81(s, 2H).

2c)3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙腈的制备

将(内)-3-碘甲基-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷(1.06 g, 4.0 mmol)和 Ph_2CHCN (2.32 g, 12.0 mmol)在 DMF(20 mL)中的溶液与 NaH (0.288 g, 12.0 mmol)混合。所得混合物在室温下搅拌 60 分钟。过滤,然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯,得到标题化合物(1.16 g, 93 %): LCMS(ES) m/z 331($\text{M}+\text{H}^+$); $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 1.64(m, 2H), 2.14(m, 1H), 2.26(m, 2H), 2.34(m, 2H), 2.52(m, 2H), 2.75(m, 5H), 3.83(s, 2H), 7.39(d, 10H).

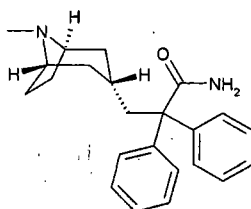
实施例3



(1R,2R,3R,4R)-8-甲基-3-(2,2,2-三苯基-乙基)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷

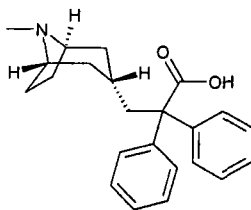
将三苯基甲烷(0.276 g, 1.13 mmol)在 THF(0.5 mL)中的溶液与正丁基锂(0.706 mL, 1.6 M 的己烷溶液, 1.13 mmol)混合。将溶液搅拌 10 分钟, 接着加入(1R,2R,3R,4R)-3-碘甲基-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷(100 mg, 0.377 mmol)在 DMF(1.0 mL)中的溶液。混合物在室温下搅拌 60 分钟, 与 H₂O(0.1 mL)混合, 浓缩, 接着过滤。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯, 得到标题化合物(23.8 mg, 17 %): LCMS(ES)*m/z* 382(M+H)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.07(d, 2H), 2.12(m, 1H), 2.22(m, 4H), 2.31(m, 2H), 2.65(d, 3H), 2.97(d, 2H), 3.63(s, 2H), 7.21(m, 3H), 7.30(d, 12H).

实施例4

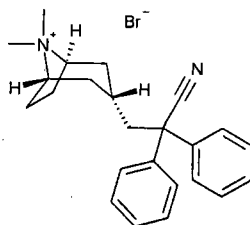


3-((1R,2R,3R,4R)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酰胺

将 3-((1R,2R,3R,4R)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙腈(53 mg, 0.16 mmol)在 CH₂Cl₂(0.25 mL)中的溶液与 H₂SO₄(0.28 mL, 96 %)混合并在 40℃下搅拌 30 小时。然后, 将混合物倒入到冰中, 用 NH₃·H₂O 中和, 用 EtOAc 萃取, 接着浓缩。将所得残余物溶于 DMSO 中, 接着过滤。经由反相 HPLC(Gilson)提纯, 得到标题化合物 (17.2 mg, 30 %): MS(ES)*m/z* 347(M+H)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.31(d, 2H), 1.98(m, 1H), 2.28(m, 4H), 2.39(m, 2H), 2.67(d, 3H), 2.79(d, 2H), 3.66(s, 2H), 5.82(s, br, 1H), 6.88(s, br, 1H), 7.37(m, 10H).

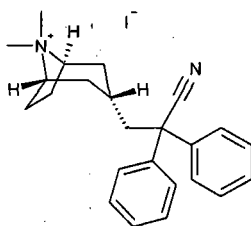
实施例5**3-((1R,2R)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酸**

在 0℃ 下, 向 2-[(1R,2R)-8-甲基-8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基]-1,1-二苯基乙醇 (100 mg, 1.56 mmol) 在 HCOOH (0.25 mL) 中的溶液中快速加入 H₂SO₄ (2.73 mL, 90 %)。立即盖上反应瓶, 接着在 -20℃ 冰箱贮存 7 天。将溶液倒入到冰中, 用 NH₃·H₂O 中和, 用 EtOAc 萃取, 接着浓缩。将所得残余物溶于 DMSO 中, 接着过滤。然后经由反相 HPLC (Gilson) 提纯, 得到标题化合物 (52 mg, 48 %): LCMS(ES) *m/z* 350 (M+H)⁺; ¹H-NMR (MeOD) δ 1.39 (d, 2H), 1.86 (m, 1H), 1.97 (m, 2H), 2.30 (m, 4H), 2.69 (s, 3H), 2.84 (d, 2H), 3.69 (s, 2H), 7.28 (m, 2H), 7.36 (m, 8H)。

实施例6**(1R,2R)-3-(2-氰基-2,2-二苯基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷溴化物**

将 3-((1R,2R)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙腈 (310 mg, 0.938 mmol) 在丙酮 (6.0 mL) 中的溶液与 MeBr (4.69 mL, 2.0 M 的 t-BuOMe 溶液, 9.38 mmol) 混合。所得混合物在室温下搅拌 60 分钟, 接着过滤。固体用丙酮 (2 x 3 mL) 洗涤, 得到标题化合物 (333 mg, 83 %): LCMS(ES) *m/z* 345 (M)⁺; ¹H-NMR (MeOD) δ 1.82 (d, 2H), 2.17 (m, 1H), 2.35 (m, 2H), 2.49 (m, 4H), 3.01 (d, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 3.79 (s, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.43 (m, 4H), 7.49 (m, 4H)。

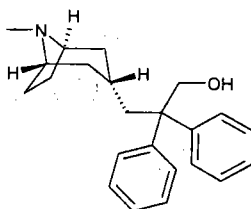
实施例7



(1R,2R,3R,4R,5R,6R)-3-(2-氰基-2,2-二苯基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物

将 3-((1R,2R,3R,4R,5R,6R)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙腈(26.5 mg, 0.080 mmol)在 CH_2Cl_2 (0.5 mL)和 MeCN(0.5 mL)中的溶液与 MeI(0.125 mL, 2.00 mmol)混合。将所得混合物在室温下搅拌 3 小时,用 DMSO(0.3 mL)稀释,接着浓缩。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯,得到标题化合物(22.9 mg, 60 %): LCMS(ES) m/z 345(M^+); $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 1.83(d, 2H), 2.17(m, 1H), 2.35(m, 2H), 2.49(m, 4H), 3.01(d, 2H), 3.07(s, 3H), 3.10(s, 3H), 3.79(s, 2H), 7.36(m, 2H), 7.43(m, 4H), 7.49(m, 4H)。

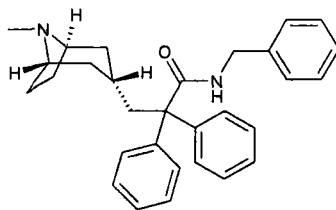
实施例8



3-((1R,2R,3R,4R,5R,6R)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙-1-醇

将 3-((1R,2R,3R,4R,5R,6R)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酸(42.5 mg, 0.122 mmol)和 LiAlH_4 (0.488 mL, 1.0 M 的 THF 溶液, 0.488 mmol)的混合物用微波反应器在 100°C 下加热 1 小时。该混合物用饱和 Na_2SO_4 溶液稀释,通过硅藻土过滤,接着浓缩。将所得残余物溶于 DMSO 中,接着过滤。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯,得到标题化合物 (29.1 mg, 71 %): LCMS(ES) m/z 336($\text{M}+\text{H}^+$); $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 1.40(d, 2H), 1.92(m, 1H), 2.29(m, 6H), 2.59(m, 2H), 2.68(d, 3H), 3.72(s, 2H), 4.16(s, 2H), 7.13(m, 3H), 7.30(m, 7H)。

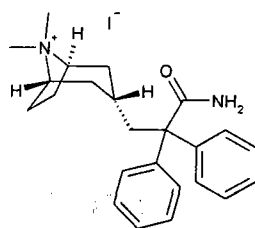
实施例9



N-苄基-3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酰胺

将 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酸(82.0 mg, 0.235 mmol)在 CH_2Cl_2 (3.0 mL)中的溶液与 PhCH_2NH_2 (28.2 μL , 0.258 mmol)、EDC(49.5 mg, 0.258 mmol)、HOBt(3.2 mg, 0.024 mmol)和 $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ (0.232 mL, 1.65 mmol)混合。混合物在室温下搅拌 60 小时,接着浓缩。将所得残余物溶于 DMSO 中,接着过滤。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯,得到标题化合物(29.8 mg, 30 %): LCMS(ES) m/z 439($\text{M}+\text{H}^+$); $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 1.34(d, 2H), 1.96(m, 1H), 2.23(m, 2H), 2.38(m, 4H), 2.63(d, 3H), 2.83(d, 2H), 3.66(s, 2H), 4.41(d, 2H), 6.93(m, 2H), 7.22(m, 3H), 7.38(m, 10H).

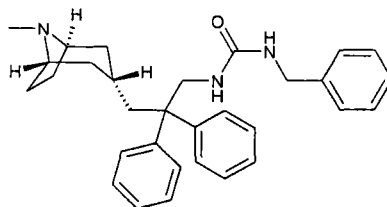
实施例 10



(内)-3-(2-氨基甲酰基-2,2-二苯基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物

标题化合物由 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙酰胺通过按照实施例 7 的步骤制得(33 %收率): LCMS(ES) m/z 363(M^+); $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 1.49(d, 2H), 1.95(m, 1H), 2.25(m, 2H), 2.42(m, 4H), 2.84(d, 2H), 3.17(s, 3H), 3.23(s, 3H), 3.93(s, 2H), 5.65(s, 1H), 5.91(s, 1H), 7.39(m, 10H).

实施例 11



1-苄基-3-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-
脲

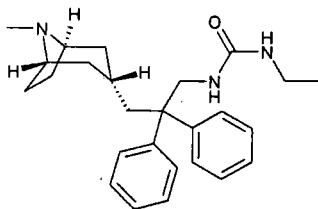
11a)3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙胺

将 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙腈(250 mg, 0.758 mmol)在 THF(2.5 mL)中的溶液与 BH_3 (2.53 mL, 1.5 M 的 THF 溶液, 3.79 mmol)在 0°C 下混合。混合物在室温下搅拌 20 小时,接着用 H_2O (1.0 mL)稀释。然后,该溶液与 K_2CO_3 (0.1 g)混合,接着在室温下搅拌 1 小时。分离有机层,水层用 EtOAc(2 x 3 mL)萃取。将有机层合并,在 Na_2SO_4 中干燥,接着浓缩。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯,得到标题化合物(159mg, 63%): LCMS(ES) m/z 335($\text{M}+\text{H}^+$); $^1\text{H-NMR}$ (MeOD) δ 1.35(d, 2H), 2.01(m, 3H), 2.34(s, 4H), 2.55(s, 2H), 2.68(s, 3H), 3.73(m, 5H), 7.26(m, 4H), 7.33(m, 2H), 7.43(m, 4H).

11b)1-苄基-3-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-
脲

将 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙胺(50.0 mg, 0.149 mmol)在 CH_2Cl_2 (2.0 mL)中的溶液与 PhCH_2NCO (20.4 μL , 0.164 mmol)和 $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ (62.8 μL , 0.447 mmol)混合。将所得混合物在室温下搅拌 1 小时,接着浓缩。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯,得到标题化合物(13.0mg, 19%): LCMS(ES) m/z 468($\text{M}+\text{H}^+$); $^1\text{H-NMR}$ (MeOD) δ 1.24(d, 2H), 1.94(m, 3H), 2.25(m, 4H), 2.49(d, 2H), 2.67(s, 3H), 3.62(s, 2H), 3.97(s, 2H), 4.23(s, 2H), 7.22(m, 6H), 7.33(m, 4H).

实施例 12

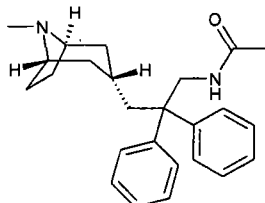


1-乙基-3-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-
脲

标题化合物由 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙胺和 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCO}$ 通过按照实施例 11 的步骤制得(45%收率): LCMS(ES) m/z

406(M+H)⁺; ¹H-NMR(MeOD)δ 1.03(t, 3H), 1.33(d, 2H), 1.94(m, 3H), 2.25(m, 4H), 2.55(d, 2H), 2.67(s, 3H), 3.07(q, 2H), 3.68(s, 2H), 3.94(s, 2H), 7.24(m, 6H), 7.34(m, 4H).

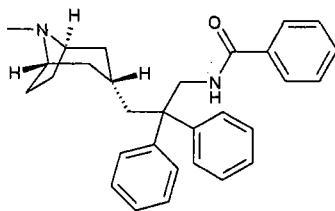
实施例 13



N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-乙酰胺

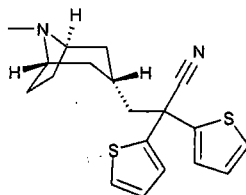
将 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙胺(33.4 mg, 0.10 mmol)在 CH₂Cl₂(0.5 mL)中的溶液与 Ac₂O(18.9 μL, 0.20 mmol)和吡啶(16.2 μL, 0.20 mmol)混合。将混合物在室温下搅拌 1 小时, 接着浓缩。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯, 得到标题化合物(10.7mg, 29%): LCMS(ES)*m/z* 377(M+H)⁺; ¹H-NMR(MeOD)δ 1.26(d, 2H), 1.82(s, 3H), 1.96(m, 3H), 2.26(s, 4H), 2.53(d, 2H), 2.67(s, 3H), 3.66(s, 2H), 4.00(s, 2H), 7.24(m, 6H), 7.33(m, 4H).

实施例 14

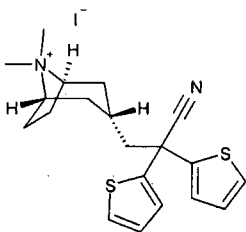


N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-苯甲酰胺

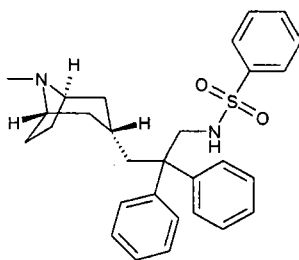
标题化合物由 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙胺和 (PhCO)₂O 通过按照实施例 13 的步骤制得(8%收率): LCMS(ES)*m/z* 439(M+H)⁺; ¹H-NMR(MeOD)δ 1.28(d, 2H), 2.00(m, 3H), 2.24(s, 4H), 2.59(d, 2H), 2.67(s, 3H), 3.65(s, 2H), 4.21(s, 2H), 7.31(m, 6H), 7.39(m, 6H), 7.50(m, 3H).

实施例 15**3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二-噻吩-2-基-丙腈**

标题化合物由(内)-3-碘甲基-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷和 2,2-二-噻吩-2-基-乙腈通过按照实施例 2C 中的步骤制得(34 %收率): LCMS(ES) m/z 343($M+H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.79(m, 2H), 2.21(m, 2H), 2.33(m, 2H), 2.62(m, 2H), 2.73(m, 4H), 3.80(m, 2H), 4.35(s, 2H), 7.02(m, 2H), 7.23(m, 2H), 7.37(m, 2H).

实施例 16**(内)-3-(2-氰基-2,2-二-噻吩-2-基-乙基)-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷碘化物**

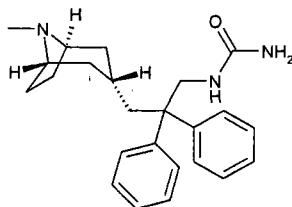
标题化合物由 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二-噻吩-2-基-丙腈通过按照实施例 7 的步骤制得(43%): LCMS(ES) m/z 345(M)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.82(d, 2H), 2.35(m, 2H), 2.23(m, 3H), 2.58(m, 4H), 2.82(m, 2H), 3.37(s, 6H), 4.25(s, 2H), 7.02(m, 2H), 7.24(m, 2H), 7.36(m, 2H).

实施例 17

N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-苯磺酰胺

将 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙胺(67.0 mg, 0.20 mmol)在 CH_2Cl_2 (2.0 mL)中的溶液与 PhSO_2Cl (28.2 μL , 0.22 mmol)和 $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ (84.3 μL , 0.60 mmol)混合。将所得混合物在室温下搅拌 1 小时,接着浓缩。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯,得到标题化合物(51.5mg, 54%): LCMS(ES) m/z 475($\text{M}+\text{H}^+$); $^1\text{H-NMR}$ (MeOD) δ 1.39(d, 2H), 2.01(m, 3H), 2.30(s, 4H), 2.69(s, 5H), 3.60(s, 2H), 3.68(s, 2H), 7.12(m, 4H), 7.27(m, 6H), 7.55(m, 2H), 7.63(m, 1H), 7.78(m, 2H).

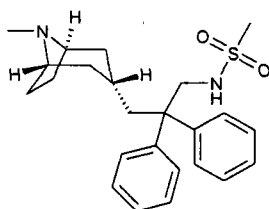
实施例 18



[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-脲

向 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙胺(50.0 mg, 0.149 mmol)在 CH_2Cl_2 (4.0 mL)中的溶液中加入 ClSO_2NCO (31.2 μL , 0.358 mmol)。将混合物在室温下搅拌 2 天,接着浓缩。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯,得到标题化合物(21.6mg, 38%): LCMS(ES) m/z 378($\text{M}+\text{H}^+$); $^1\text{H-NMR}$ (MeOD) δ 1.33(d, 2H), 2.01(m, 3H), 2.29(s, 4H), 2.57(m, 2H), 2.68(s, 3H), 3.69(s, 2H), 4.01(s, 2H), 7.25(m, 6H), 7.34(m, 4H).

实施例 19

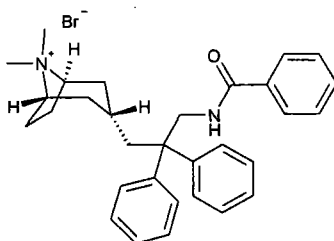


N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-甲磺酰胺

标题化合物由 3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙胺和 MeSO_2Cl 通过按照实施例 17 的步骤制得(28%收率): LCMS(ES) m/z

413(M+H)⁺; ¹H-NMR(MeOD)δ 1.39(d, 2H), 1.97(m, 3H), 2.30(s, 4H), 2.68(s, 3H), 2.76(s, 3H), 3.68(s, 2H), 3.84(s, 2H), 7.23(s, 6H), 7.33(s, 4H).

实施例 20



(内)-3-{2,2-二苯基-3-[(1-苯基-甲酰基)-氨基]-丙基}-8,8-二甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷溴化物

将 N-[3-((内)-8-甲基-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基)-2,2-二苯基-丙基]-苯甲酰胺(29 mg, 0.0683 mmol)在 CH₂Cl₂(0.5 mL)和丙酮(0.5 mL)中的溶液与 MeBr(0.342 mL, 2.0 M 的叔丁基甲醚溶液, 0.683 mmol)混合。将所得混合物在室温下搅拌 3 小时, 接着浓缩。然后经由反相 HPLC(Gilson)提纯, 得到标题化合物(19.6 mg, 64 %): LCMS(ES)*m/z* 453(M)⁺; ¹H-NMR(MeOD)δ 1.20(d, 2H), 2.32(m, 7H), 2.65(d, 2H), 2.98(s, 3H), 3.02(s, 3H), 3.60(s, 2H), 4.22(s, 2H), 7.30(m, 6H), 7.39(m, 6H), 7.50(s, 3H).

生物学实施例

通过下列体外和体内试验测定本发明化合物对 M3 mAChR 的抑制作用:

由钙动员抑制受体激活的分析:

通过如之前所述的监测受体-激活的钙动员分析在 CHO 细胞上表达的 mAChRs 的刺激¹⁰。将稳定表达 M₃ mAChRs 的 CHO 细胞平铺在 96 孔黑壁/透明底的板中。18-24 小时后, 吸出培养基, 用 100 μl 负载培养基(含厄尔盐(Earl's salts)、0.1% RIA-级 BSA(Sigma, St. Louis MO)和 4 μM Fluo-3-乙酰氧基甲基酯荧光指示剂染料(Fluo-3 AM, Molecular Probes, Eugene, OR)的 EMEM)替换, 接着在 37°C 培养 1 小时。然后吸出含染料培养基, 用新鲜培养基(没有 Fluo-3 AM)替换, 接着将细胞在 37°C 培养 10 分钟。然后, 将细胞洗涤 3 次, 接着在 100 μl 试验缓冲液(0.1%明胶(Sigma)、120 mM NaCl、4.6 mM KCl、

1 mM KH_2PO_4 、25 mM NaHCO_3 、1.0 mM CaCl_2 、1.1 mM MgCl_2 、11 mM 葡萄糖、20mM HEPES(pH 7.4))中在 37°C 培养 10 分钟。加入 50 μl 化合物(在试验中最终为 1×10^{-11} - 1×10^{-5} M), 接着将该板在 37°C 培养 10 分钟。然后, 将板放在荧光强度板读数器(fluorescent light intensity plate reader)(FLIPR, Molecular Probes)中, 在那里将负载染料的细胞暴露于从 6 瓦特氩激光器发出的激发光(488 nm)中。通过以 50 μl /秒的速度加入 50 μl 乙酰胆碱(最终为 0.1-10 nM)来激活细胞, 该乙酰胆碱在含 0.1% BSA 的缓冲液中制得。以胞质钙浓度的改变监测, 在 566 nm 发射强度下测定钙动员。发射强度的变化与胞质钙水平之间有直接关系¹¹。使用冷却的 CCD 摄影机同时测定从所有 96 孔中发射出的荧光。每隔一秒收集数据点。然后, 将此数据绘图, 使用 GraphPad PRISM 软件分析。

乙酰甲胆碱诱导的支气管收缩

在醒的不受限制的 BalbC 小鼠(n=6 每组)中测定对乙酰甲胆碱的气道反应性。气压体积描记法用来测定增加的间歇(enhanced pause)(Penh), 无单位测定已经表明与在用乙酰甲胆碱激发支气管期间发生的气道阻力变化有关¹²。将小鼠用 50 μl 在 50 μl 赋形剂(10% DMSO)中的化合物(0.003-10 μg /小鼠)通过鼻内预处理, 然后放入体积描记室中。在体积描记室中, 在进行基线 Penh 测定 5 分钟之前, 让小鼠平衡 10 分钟。然后, 用乙酰甲胆碱气雾剂(10 mg/ml)激发小鼠 2 分钟。从使用乙酰甲胆碱气雾剂开始, 连续记录 Penh 7 分钟, 然后继续 5 分钟。分析每只小鼠的数据并使用 GraphPad PRISM 软件绘图。