



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1874996 B

(45) 授权公告日 2011.05.18

(21) 申请号 200480026236.7

C07F 9/09 (2006.01)

(22) 申请日 2004.08.27

A61K 31/137 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/661 (2006.01)

0320196.9 2003.08.28 GB

A61P 37/02 (2006.01)

0324206.2 2003.10.15 GB

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

US 6437165 B1, 2002.08.20, 说明书第20栏
化合物 V 以及第24栏实施例20.

2006.03.13

W0 02076995 A2, 2002.10.03, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

审查员 陈宁

PCT/EP2004/009589 2004.08.27

(87) PCT申请的公布数据

W02005/021503 EN 2005.03.10

(73) 专利权人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 R·阿尔伯特 E·弗朗科特

F·泽克里 M·佐林格尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 隗永良

(51) Int. Cl.

C07D 209/46 (2006.01)

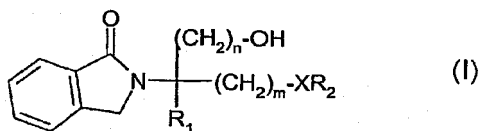
权利要求书 3 页 说明书 21 页

(54) 发明名称

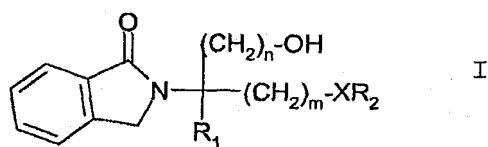
氨基丙醇衍生物

(57) 摘要

式(I)化合物、它们的生产方法、
它们的用途和含有它们的药物组合物,
其中 R_1 、 R_2 、 n 和 m 如说明书所定义。



1. 游离形式或盐形式的式 I 化合物：



其中：

m 和 n 各自独立地是 1、2 或 3；

X 是 O 或直键；

R₁ 是

- 其中烷基是直链或支链 C₆₋₂₀ 碳链的苯基烷基；或者

- 其中烷基是直链或支链 C₁₋₃₀ 碳链的苯基烷基，其中所述苯基烷基在苯基残基上被如下基团取代：

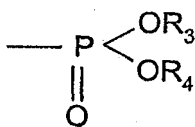
- 任选被卤素取代的直链或支链 C₆₋₂₀ 碳链，

- 任选被卤素取代的直链或支链 C₆₋₂₀ 烷氧基链，

- 直链或支链 C₆₋₂₀ 链烯氧基，

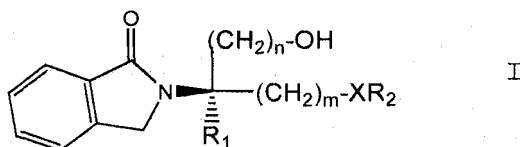
- 苯基烷氧基、卤代苯基烷氧基、苯基烷氧基烷基、苯氧基烷氧基或苯氧基烷基，

R₂ 是



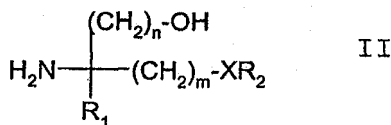
其中 R₃ 和 R₄ 各自独立地是 H 或 C₁₋₄ 烷基，其中烷基任选被 1、2 或 3 个卤原子取代。

2. 根据权利要求 1 的式 I 化合物，为基本上纯的对映异构体形式，具有下述三维构型



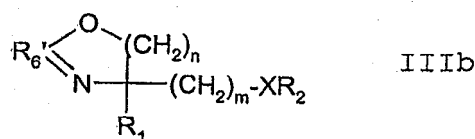
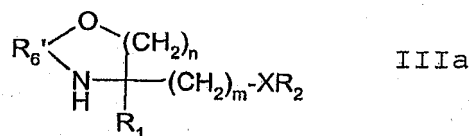
3. 根据权利要求 2 的化合物，为磷酸单-[2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-丁基]酯的 S 对映异构体。

4. 生产如权利要求 1 中定义的式 I 化合物的方法，该方法包括使式 II 化合物与芳族 1,2-二甲醛反应，并回收游离或盐形式的所得式 I 化合物，



其中 m、n、X、R₁ 和 R₂ 如权利要求 1 的式 I 中定义。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中大于 70% 重量的式 II 化合物是 R 或 S 对映异构体形式，并且所述式 II 化合物的生产方法包括使式 IIIa 或 IIIb 化合物去保护，其中大于 70% 重量的式 IIIa 或 IIIb 化合物是 R 或 S 对映异构体形式：



其中 n 、 m 、 X 、 R_1 和 R_2 如式 II 中所定义,且 R_6' 是 OH 和氨基两者的保护基团;

并且酌情将游离形式的所得式 II 化合物转化为所需的盐形式,或者反之亦然。

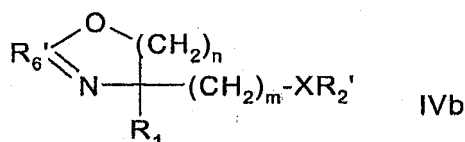
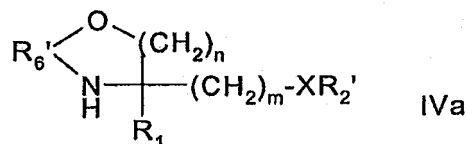
6. 根据权利要求 4 的方法,其中所述的式 II 化合物是磷酸单-[2-氨基-2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-丁基]酯,且式 I 化合物是磷酸单-[2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吡啶-2-基)-丁基]酯。

7. 根据权利要求 5 的方法,其中大于 70% 重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式的式 IIIa 或 IIIb 化合物的生产方法包括利用具有基于多糖类的手性固定相的色谱法或者模拟移动床色谱法使式 IIIa 或 IIIb 化合物的外消旋混合物中的 S 对映异构体与 R 对映异构体分离。

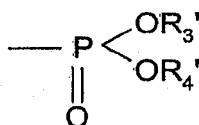
8. 根据权利要求 7 的方法,其中所述的固定相为直链淀粉型相。

9. 根据权利要求 5 的方法,其中大于 70% 重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式的式 IIIa 或 IIIb 化合物的生产方法包括:

(i) 获得式 IVa 或 IVb 化合物,其中大于 70% 重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式,



其中 m 、 n 、 X 、 R_1 如权利要求 1 所定义,且 R_2' 是



其中 R_3' 和 R_4' 各自是可水解的基团,

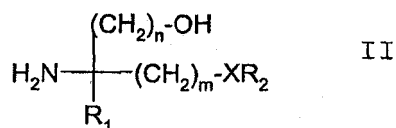
且 R_6' 是 OH 和氨基两者的保护基团;和

(ii) 除去 R_2' 中的可水解基团。

10. 根据权利要求 9 的方法,其中 R_3' 和 R_4' 一起构成环状系统。

11. 分离如权利要求 1 所定义的式 I 化合物的 R 与 S 对映异构体的方法,该方法包括通过采用基于氨基甲酸奎宁或氨基甲酸奎尼丁的手性离子交换相的高效液相色谱法分离对映异构体。

12. 根据权利要求 5 的方法, 其中式 II 化合物的 R 和 / 或 S 异构体含量通过如下方法测定,



其中 m、n、X、R₁ 和 R₂ 如权利要求 1 的式 I 中定义,

该方法包括 (a) 使式 II 化合物与芳族 1,2-二甲醛反应, 生成式 I 化合物, 通过高效液相色谱法分离式 I 化合物的 R 与 S 异构体。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其中高效液相色谱法采用基于氨基甲酸奎宁或氨基甲酸奎尼丁的手性离子交换相进行。

14. 根据权利要求 12 或 13 的方法, 其中式 II 化合物是磷酸单-[2-氨基-2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-丁基]酯。

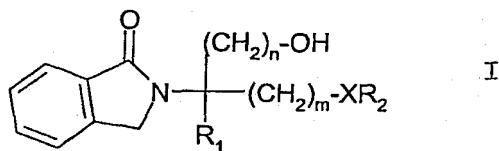
15. 权利要求 1 的化合物在制备药物中的用途, 所述药物用于在需要这类治疗的受治疗者中预防或治疗急性或慢性移植排斥或者 T-细胞介导的炎性或自身免疫性疾病。

氨基丙醇衍生物

[0001] 本发明涉及有机化合物、它们的生产方法和含有它们的药物组合物。

[0002] 更具体而言,本发明提供了游离形式或盐形式的式 I 化合物:

[0003]



[0004] 其中:

[0005] m 和 n 各自独立地是 1、2 或 3;

[0006] X 是 O 或直键;

[0007] R₁ 是

[0008] - 其中烷基是直链或支链 (C₆₋₂₀) 碳链的苯基烷基;或者

[0009] - 其中烷基是直链或支链 (C₁₋₃₀) 碳链的苯基烷基,其中所述苯基烷基在苯基残基上被如下基团取代:

[0010] - 任选被卤素取代的直链或支链 (C₆₋₂₀) 碳链,

[0011] - 任选被卤素取代的直链或支链 (C₆₋₂₀) 烷氧基链,

[0012] - 直链或支链 (C₆₋₂₀) 链烯氧基,

[0013] - 苯基烷氧基、卤代苯基烷氧基、苯基烷氧基烷基、苯氧基烷氧基或苯氧基烷基,

[0014] - 被 C₆₋₂₀ 烷基取代的环烷基烷基,

[0015] - 被 C₆₋₂₀ 烷基取代的杂芳基烷基,

[0016] - 杂环 C₆₋₂₀ 烷基,或

[0017] - 被 C₂₋₂₀ 烷基取代的杂环烷基,

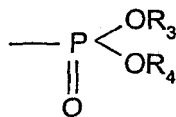
[0018] 且其中,烷基部分可以

[0019] - 在碳链中具有选自双键、叁键、O、S、亚磺酰基、磺酰基或 NR₅ 的键或杂原子,其中 R₅ 是 H、烷基、芳烷基、酰基或烷氧羰基,

[0020] - 具有作为取代基的烷氧基、链烯氧基、炔氧基、芳烷氧基、酰基、烷基氨基、烷硫基、酰基氨基、烷氧羰基、烷氧羰基氨基、酰氧基、烷基氨基甲酰基、硝基、卤素、氨基、羟基或羧基,且

[0021] R₂ 是

[0022]



[0023] 其中 R₃ 和 R₄ 各自独立地是 H 或 C₁₋₄ 烷基,其中烷基任选被 1、2 或 3 个卤原子取代。

[0024] 卤素是 F、Cl、Br 或 I。烷基或烷氧基可以是直链或支链。

[0025] 环烷基优选是 C₃₋₁₀ 环烷基,更优选是 C₃₋₈ 环烷基,例如包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基。

[0026] 酰基可以是残基 $R_y\text{-CO-}$, 其中 R_y 是 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、苯基或苯基- C_{1-4} 烷基。

[0027] 当式 I 化合物中作为 R_1 的碳链被取代时, 它优选被卤素、硝基、氨基、羟基或羧基取代。当碳链被任选被取代的亚苯基中断时, 该碳链优选是未取代的。当亚苯基部分被取代时, 它优选被卤素、硝基、氨基、甲氧基、羟基或羧基取代。

[0028] 在本发明的化合物中, 下列含义单独或在任意亚组合中是优选的:

[0029] 1. m 和 n 各自是 1 或 2, 优选 1。

[0030] 2. X 是 O。

[0031] 3. R_1 是任选被硝基、卤素、氨基、羟基或羧基取代的 C_{13-20} 烷基, 更优选 R_1 是被任选被卤素取代的 C_{6-14} 烷基链取代的苯基烷基, 其中烷基部分是任选被羟基取代的 C_{1-6} 烷基。更优选 R_1 是苯基- C_{1-6} 烷基, 例如苯基- C_{1-6} 烷基, 例如苯基- C_2 烷基, 它在苯基上被直链或支链、优选直链 C_{6-14} 烷基链取代。 C_{6-14} 烷基链可以位于邻位、间位或对位, 优选对位。

[0032] 4. R_3 和 R_4 各自是 H。

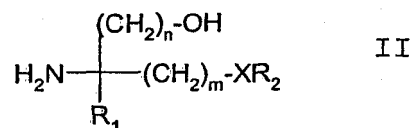
[0033] 特别优选的化合物是磷酸单-[2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吡啶-2-基)-丁基]酯。

[0034] 式 I 化合物可以以游离形式或盐形式存在, 例如与无机酸的加成盐, 例如盐酸盐、氢溴酸盐或硫酸盐; 与有机酸的盐, 例如乙酸盐、富马酸盐、马来酸盐、苯甲酸盐、柠檬酸盐、苹果酸盐、甲磺酸盐或苯磺酸盐; 当 R_3 或 R_4 是 H 时, R_2 还可以以盐形式存在, 例如铵盐或金属盐或者它们的混合物, 所述金属例如钠、钾、钙、锌或镁。式 I 化合物及其盐的水合物或溶剂化物形式也是本发明的一部分。

[0035] 式 I 化合物在分子中具有一个或一个以上不对称中心, 因而可以得到多种旋光异构体。本发明还涵盖对映异构体、外消旋物、非立体异构体和它们的混合物。中心不对称碳原子可以具有 R 或 S 构型。而且, 当式 I 化合物包括几何异构体时, 本发明涵盖顺式-化合物、反式-化合物和它们的混合物。相似的考虑适用于表现出上述不对称碳原子或不饱和键的原料。

[0036] 式 I 化合物可如下制备: 使式 II 化合物:

[0037]



[0038] 其中 m 、 n 、 X 、 R_1 和 R_2 如式 I 中所定义,

[0039] 与芳族 1,2-二甲醛如苯-1,2-二甲醛反应, 并回收游离或盐形式的所得式 I 化合物。

[0040] 该方法可以按照本领域已知的方法进行, 例如实施例所述。

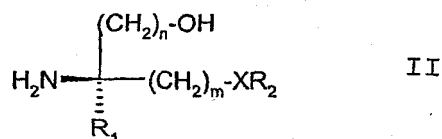
[0041] 式 II 化合物 (例如其外消旋混合物) 可以如 WO 02/18395 或 WO02/076995 所述得到。

[0042] 本发明还提供了这样的式 I 或式 II 化合物, 其中大于 70% 重量的化合物是 S 对映异构体形式, 或者大于 70% 重量的化合物是 R 对映异构体形式, 例如大于 90% 是 R 或 S 对映异构体形式。更优选大于 95% 重量、例如大于 99% 重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式。因而本发明可以涉及式 I 或式 II 化合物基本上纯的 R 或 S 对映异构体 (例如基

本上不含 R 对映异构体的 S 对映异构体,反之亦然),优选 S 对映异构体。特别优选的是磷酸单-[2-氨基-2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-丁基]酯(FTY720-磷酸酯)和磷酸单-[2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-丁基]酯基本上纯的(例如大于 99%重量)的 R 或 S 对映异构体,尤其是 S 对映异构体。

[0043] 具有下述三维构型的化合物通常是优选的:

[0044]



[0045] 式 I 和 II 化合物的对映异构体不能借助标准方法令人满意地加以分离。按照本发明,利用新的分离技术和合成策略实现了对映异构体的分离。

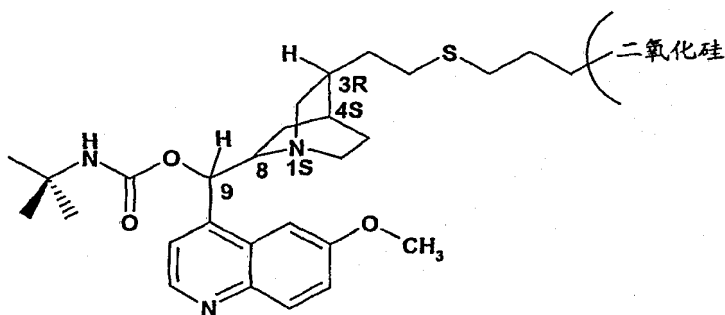
[0046] 式 I 化合物,其中大于 70%重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式、例如基本上纯的 R 或 S 对映异构体,可以这样得到:

[0047] a) 利用手性固定相色谱法,在式 I 化合物的外消旋混合物中使 S 对映异构体与 R 对映异构体分离;或者

[0048] b) 使式 II 化合物,其中大于 70%重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式、例如式 II 化合物基本上纯的 R 或 S 对映异构体,与芳族 1,2-二甲醛如苯-1,2-二甲醛反应。

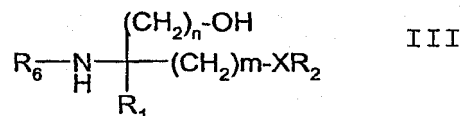
[0049] 按照方法 a),优选利用手性离子交换相进行色谱法分离,以氨基甲酸奎宁或氨基甲酸奎尼丁作为手性选择剂,例如以商品名 ProntoSIL ChiralAX QN-1 购得的氨基甲酸奎宁相 (8S,9R):

[0050]



[0051] 式 II 化合物,其中大于 70%重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式,可以通过使式 III 化合物去保护而得,其中大于 70%重量的式 III 化合物是 R 或 S 对映异构体形式,

[0052]



[0053] 其中 m、n、X、R₁ 和 R₂ 如上所定义,且 R₆ 是氨基保护基团,

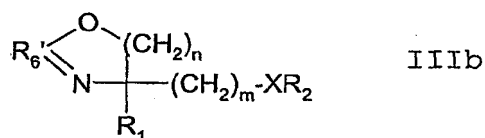
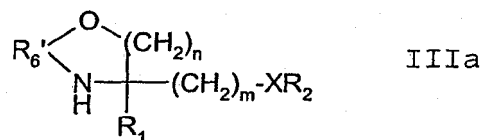
[0054] 并且酌情将游离形式的所得式 II 化合物转化为所需的盐形式,或者反之亦然。

[0055] 适合作为 R₆ 的氨基保护基团的实例例如在 "Protective Groups in Organic Synthesis" T.W. Greene, J. Wiley & Sons NY, 第 2 版, 第 7 章, 1991 和其中的参考文献中

有描述,例如酰基,例如叔丁氧羰基、苄氧羰基、9-苄基甲氧羰基、三氟乙酰基、三甲代甲硅烷基乙磺酰基等。

[0056] 或者和更优选式 III 化合物,其中大于 70% 重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式,可以通过使式 IIIa 或 IIIb 化合物去保护而得,其中大于 70% 重量的式 IIIa 或 IIIb 化合物是 R 或 S 对映异构体形式:

[0057]



[0058] 其中 n、m、X、R₁ 和 R₂ 如上所定义,且 R₆' 是 OH 和氨基两者的保护基团,例如以便 R₆' 与它所连接的 O 和 N 原子、不对称碳原子和 1 至 3 个其它碳原子一起构成环状残基,例如 5-至 7-元杂环,例如噁唑烷-2-酮 (IIIa 中 R₆' 是 -C(O)-) 或 2-甲基-4,5-二氢-噁唑 (IIIb 中 R₆' 是 -C(CH₃)-)。

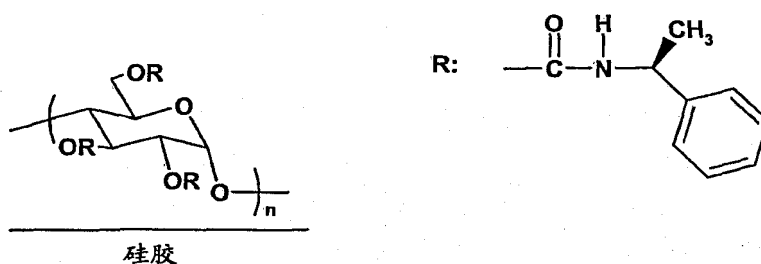
[0059] 式 III、IIIa 或 IIIb 化合物中 R₆ 或 R₆' 保护基团的除去可以适宜地按照本领域已知的方法进行,例如借助水解,例如在碱性介质中,例如使用氢氧化物如氢氧化钡。还可以借助氢解作用进行,例如在 Pearlman's 催化剂的存在下,例如 J. Org. Chem., 1998, 63, 2375-2377 所述。

[0060] 因而在进一步的可选方面,本发明提供了如上所定义的自由或盐形式的式 III、IIIa 或 IIIb 化合物。式 III、IIIa 或 IIIb 化合物在分子中具有一个或一个以上不对称中心,因而可以得到多种旋光异构体。本发明还涵盖对映异构体、外消旋物、非立体异构体和它们的混合物。

[0061] 式 III、IIIa 或 IIIb 化合物中 R₆ 或 R₆' 保护基团的除去可以适宜地按照本领域已知的方法进行,例如借助水解,例如在碱性介质中,例如使用氢氧化物如氢氧化钡。还可以借助氢解作用进行,例如在 Pearlman's 催化剂的存在下,例如 J. Org. Chem., 1998, 63, 2375-2377 所述。

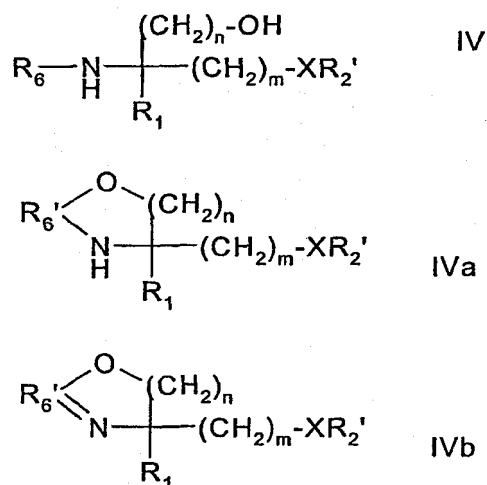
[0062] 包含大于 70% 重量的 R 或 S 对映异构体的式 III、IIIa 或 IIIb 化合物可如下得到: 通过利用基于多糖类的手性固定相的色谱法 (MPLC、HPLC、SFC) 或者模拟移动床 (多层柱) 色谱法,使式 III、IIIa 或 IIIb 化合物的外消旋混合物中的 S 对映异构体与 R 对映异构体分离,所述的固定相优选为直链淀粉型相,例如涂在硅胶基质上的直链淀粉三 [(S)-α-甲基苄基氨基甲酸酯], 如商品名为 CHIRALPAK AS, 如下所示,或者在按照 WO 97/04011 和 WO 97/49733 所述方法制备的固定化形式中:

[0063]



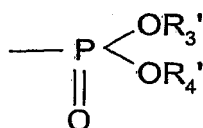
[0064] 或者,包含大于 70%重量的 R 或 S 对映异构体的式 III、IIIa 或 IIIb 化合物可如下得到:除去存在于包含大于 70%重量的 R 或 S 对映异构体的式 IV、IVa 或 IVb 化合物的 R_2' 中的可水解基团:

[0065]



[0066] 其中 m 、 n 、 X 、 R_1 、 R_6 和 R_6' 如上所定义,且 R_2' 是

[0067]



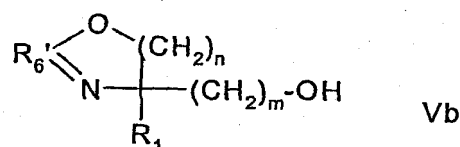
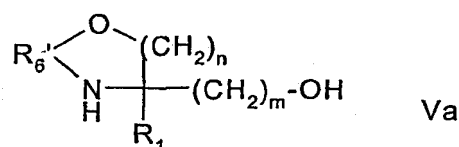
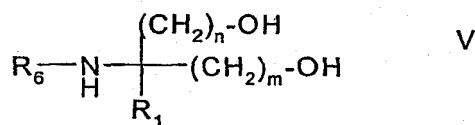
[0068] 其中 R_3' 和 R_4' 各自是可水解的基团。

[0069] 优选 R_3' 和 R_4' 是等同的,具有例如苯基或苄基的含义,或者一起构成环状系统,例如在 1,5-二氢-2,4,3-苯并二氧杂磷杂萘中。

[0070] 包含大于 70%重量的 R 或 S 对映异构体的式 IV、IVa 或 IVb 化合物可如下得到:使式 IV、IVa 或 IVb 化合物的外消旋混合物中的 S 对映异构体与 R 对映异构体分离,例如上述式 III、IIIa 或 IIIb 化合物的对映异构体的分离中所述。

[0071] 其中 X 是 O 的式 IV、IVa 或 IVb 化合物、例如其外消旋混合物可如下得到:使式 V、Va 或 Vb 化合物:

[0072]

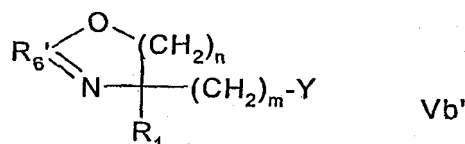
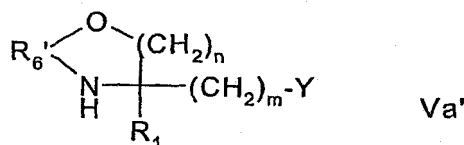
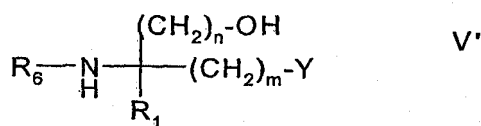


[0073] 其中 m 、 n 、 R_1 、 R_6 和 R_6' 如上所定义，

[0074] 与磷酸化剂反应，例如氯代磷酸酯，例如氯代磷酸二苄基酯或氯代磷酸二苄基酯；磷酸氰乙基酯；氨基磷酸酯，例如 N -苄基氨基磷酸酯；3-(二乙氨基)-1,5-二氢-2,4,3-苯并二氧杂磷杂萘等。反应可以按照本领域已知的方法进行，例如 J. Org. Chem. 所述，出处同上。在式 IIIa 化合物中，当 R_4 不是酰基时，氨基优选是被保护的形式，如 R_4' 。

[0075] 其中 X 是直键的式 IV、IVa 或 IVb 化合物、例如其外消旋混合物可如下得到：使式 V' 、 Va' 或 Vb' 化合物：

[0076]

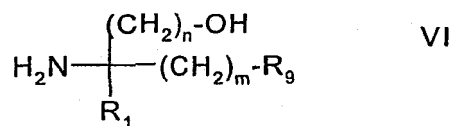


[0077] 其中 m 、 n 、 R_1 、 R_6 和 R_6' 如上所定义，且 Y 是离去基团，例如 Br ，在还原条件下、例如在 NaH 存在下与磷酸化剂、例如亚磷酸二乙酯反应。反应可以按照本领域已知的方法进行。

[0078] 或者，可以在该方法的早期阶段进行手性分离。因而包含大于 70% 重量的 R 或 S 对映异构体的式 IV、IVa 或 IVb 化合物可如下得到：使包含大于 70% 重量的 R 或 S 对映异构体的式 V、Va、Vb、 V' 、 Va' 或 Vb' 化合物与磷酸化剂反应。包含大于 70% 重量的 R 或 S 对映异构体的式 V、Va、Vb、 V' 、 Va' 或 Vb' 化合物可如下得到：使式 V、Va、Vb、 V' 、 Va' 或 Vb' 化合物的外消旋混合物中的 S 对映异构体与 R 对映异构体分离，例如通过利用基于多糖类的手性固定相的 HPLC 或者模拟移动床（多层柱）色谱法来进行，所述固定相如上述式 IV、IVa 或 IVb 化合物的对映异构体的分离中所述。

[0079] 式 V 或 V' 化合物可如下制备 : 使式 VI 化合物 :

[0080]



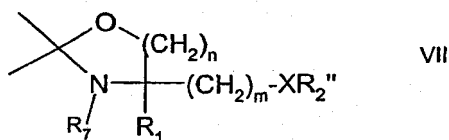
[0081] 其中 m 、 n 和 R_1 如上所定义, 且 R_9 是 OH 或离去基团, 例如 Br, 与氨基保护基团供体化合物反应。式 Va、Va'、Vb 或 Vb' 化合物可如下制备 : 使式 VI 化合物与 OH 和氨基保护化合物反应, 例如使式 VI 的游离氨基醇或氨基二醇反应同时进行 OH 和氨基保护, 以得到环状残基, 例如 5- 至 7- 元杂环, 例如噁唑烷-2- 酮或 2- 甲基-4,5- 二氢-噁唑, 例如与 Cbo-Cl、Boc- 酸酐、原乙酸三乙酯和乙腈反应, 或者在碱性条件下与光气反应。

[0082] 在该方法的任意阶段, 任意上式中的 R_1 可以利用已知方法任选转化为替代的 R_1 基团。例如, 其中 R_1 是 (4- 苄氧基- 苯基)- 乙基的式 Vb 化合物可以这样转化为其中 R_1 是 [4-(6- 氟- 己氧基)- 苯基]- 乙基的式 Vb 化合物 : (a) 借助氢化作用除去 R_1 中的苄基, 留下 (4- 羟基- 苯基)- 乙基残基, 继之以 (b) 与 1- 溴-6- 氟己烷反应。替代的式 Vb 化合物然后可以经历手性分离或者转化为式 IVb 化合物, 如上所述。

[0083] 用作原料的包含大于 70% 重量的 R 或 S 对映异构体的式 III、IIIa、IIIb、IV、IVa 和 IVb 化合物及其盐也是新的, 构成本发明的一部分。

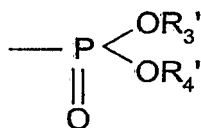
[0084] 在进一步的替代方面, 式 II 化合物, 其中大于 70% 重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式, 可如下得到 : 使式 VII 化合物去保护和水解, 其中大于 70% 重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式 :

[0085]



[0086] 其中 m 、 n 、 X 和 R_1 如上所定义, 且 R_2'' 是

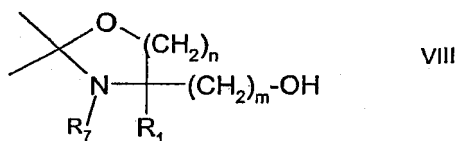
[0087]



[0088] 其中 R_3' 和 R_4' 各自是可水解的基团, 例如叔丁基, 且 R_7 是氨基保护基团, 例如苄氧羰基。

[0089] 式 VII 化合物, 其中大于 70% 重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式, 可如下得到 : 使式 VIII 化合物, 其中大于 70% 重量的化合物是 R 或 S 对映异构体形式,

[0090]



[0091] 与磷酸化剂反应, 例如如上所述。

[0092] 在没有确切描述原料生产的情况下,这些化合物是已知的,或者可以类似于本领域已知方法或下文实施例所述加以制备。

[0093] 下列实施例是本发明的说明。

[0094] RT = 室温

[0095] CBO = 苄氧羰基

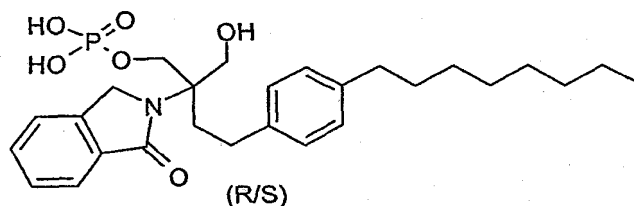
[0096] FTY720 = 2-氨基-2-[2-(4-辛基苯基)乙基]丙烷-1,3-二醇

[0097] EDTA = 乙二胺四乙酸

[0098] OPA = 邻苯二醛(苯-1,2-二甲醛)

[0099] 实施例 1:磷酸单-[(R/S)-2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-丁基]酯

[0100]



[0101] a) (R/S)-4-羟甲基-4-[2-(4-辛基-苯基)-乙基]-噁唑烷-2-酮:

[0102] 将氯甲酸苄基酯(0.45ml;3.2mmol)加入 FTY720.HCl(1.03g,3mmol)的 2N NaOH(20ml)混悬液中。使反应物于室温保持过夜,为了完成反应,加入另外的氯甲酸苄基酯(0.9ml;6.4mmol)。于室温 2 天后,将反应物用 1N HCl 酸化,用二氯甲烷萃取,经硅胶柱纯化,使用二氯甲烷/甲醇/乙酸_{50%}(9/1/0.125)作为流动相。 $[M+H]^+$:334(ESI-MS)

[0103] b) (R/S)-4-[2-(4-辛基-苯基)-乙基]-4-(3-氧代-1,5-二氢-3λ⁵-苯并[e][1,3,2]二氧杂磷杂~~革~~-3-基氧基甲基)-噁唑烷-2-酮:

[0104] 于 0℃向 a) 的终产物(2.4g;7.2mmol)的二氯甲烷/THF 1/1(100ml)溶液中加入四唑(经过重结晶;2.52g;36mmol)和 3-(二乙氨基)-1,5-二氢-2,4,3-苯并二氧杂磷杂~~革~~三苯基-亚磷酸酯(5.17g;21.6mmol)。于室温 18 小时后,向溶液中加入 H₂O₂(8.2ml[30%水溶液];72mmol)(冷却),于室温另外保持 90 分钟。用饱和 Na₂S₂O₃ 溶液(100ml)淬灭后,用乙酸乙酯萃取反应物(三次)。将有机层经 Na₂SO₄ 干燥,化合物经硅胶纯化,使用环己烷/乙酸乙酯 1/1 作为流动相。

[0105] c) 磷酸单-{(R/S)-4-[2-(4-辛基-苯基)-乙基]-2-氧代-噁唑烷-4-基甲基}酯

[0106] 将步骤 b) 的终产物(1.03g;2mmol)在常压下氢化(Pd/C_{10%};50mg)90 分钟。过滤后,浓缩反应物,未经进一步纯化用于步骤 d)。

[0107] d) 磷酸单-[(R/S)-2-氨基-2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-丁基]酯((R/S)-FTY720-磷酸酯)

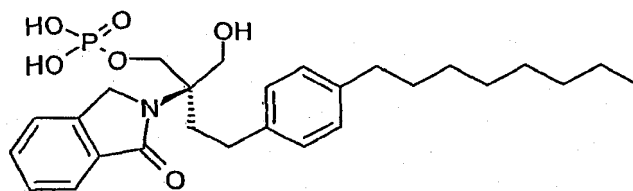
[0108] 向步骤 c) 的终产物的乙醇(20ml)溶液中加入 LiOH(20ml;10%水溶液)。回流 24 小时后,用 HCl(1N 水溶液)中和反应物,浓缩。将残余物用冰乙酸(5ml)处理,加入水(50ml)后发生终产物的沉淀。过滤后,洗涤(水)并干燥,得到纯的终产物,未经进一步纯化。

[0109] e) 磷酸单-[(R/S)-2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-丁基]酯 (OPA-衍生化)

[0110] 将步骤 d) 的终产物 ((R/S)-FTY720-磷酸酯) (50mg ;0.125mmol) 悬浮在 EDTA 溶液 (0.5ml ;10mM 水溶液) 和硼酸水溶液 (0.5ml ;3% 水溶液 ;用 KOH_{10%} 水溶液调至 pH 10.5) 中。加入 OPA (33mg, 0.25mmol) 后, 溶于乙醇 (0.5ml), 使反应物于室温保持 1 小时 (超声)。然后调节 pH 至 3.5 (HCl 水溶液 ;1N), 用乙酸乙酯萃取 (三次)。将有机层经 Na₂SO₄ 干燥, 化合物经硅胶纯化, 使用二氯甲烷/甲醇 (95/5 → 0/100) 作为流动相。[M-H]⁻ :502.5 (ESI-MS)

[0111] 实施例 2 : 磷酸单-[(R)-2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-丁基]酯

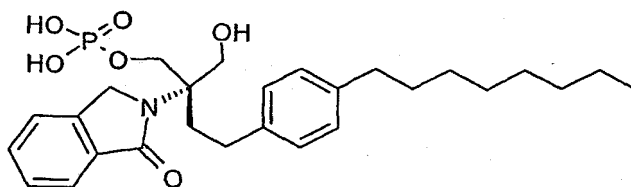
[0112]



[0113] 通过制备规模 CHIRALPAK AS 柱 HPLC (乙醇 / 正己烷 40/60 作为流动相), 或者通过装有固定化直链淀粉三 [(S)-α-甲基苄基氨基甲酸酯] 涂覆硅胶的 HPLC 柱模拟移动床色谱法 (正己烷 / 乙醇 / 氯仿 60/20/20 作为流动相, 进料浓度 1%), 分离步骤 b) 的终产物, 再如实施例 1 所述进行步骤 c)、d) 和 e), 得到实施例 2 化合物。

[0114] 实施例 3 : 磷酸单-[(S)-2-羟甲基-4-(4-辛基-苯基)-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-丁基]酯

[0115]



[0116] 通过制备规模 CHIRALPAK AS 柱 HPLC (乙醇 / 正己烷 40/60 作为流动相), 或者通过装有固定化直链淀粉三 [(S)-α-甲基苄基氨基甲酸酯] 涂覆硅胶的 HPLC 柱模拟移动床色谱法 (正己烷 / 乙醇 / 氯仿 60/20/20 作为流动相, 进料浓度 1%) 分离步骤 b) 最终产物, 再如实施例 1 所述进行步骤 c)、d) 和 e), 得到实施例 3 化合物。

[0117] 实施例 4 : ((R/S)-4-{2-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-乙基}-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基)-甲醇

[0118] a) 向 4-(2-羟基-乙基)-苯酚 (50g, 0.36mol) 的乙醇 (400ml) 溶液中加入碳酸钾 (75g, 0.54mol, 1.5 当量) 和苄基溴 (47.2ml, 0.39mol, 1.1 当量), 将反应混合物于室温搅拌过夜。然后将反应混合物通过 celite 过滤, 真空浓缩。用乙醚结晶后, 分离出 2-(4-苄氧基-苯基)-乙醇。

[0119] b) 向 2-(4-苄氧基-苯基)-乙醇 (78.72g, 0.34mol) 的二氯甲烷 (400ml) 溶液中加入三乙胺 (67.3ml, 0.44mol, 1.4 当量), 然后于 0°C 加入甲磺酰氯 (34.8ml, 0.44mol, 1.3 当量)。将反应混合物于 0°C 搅拌 30 分钟, 升温至 RT。将反应混合物用二氯甲烷萃取

(2×300ml), 合并有机层, 然后用盐水洗涤 (2×300ml), 真空浓缩。

[0120] c) 向粗产物的乙酸乙酯 (600ml) 溶液中加入碘化钠 (67.2g, 0.44mol, 1.3 当量), 将反应混合物回流搅拌 6 小时。过滤后, 将有机层用盐水洗涤 (3×400ml), 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。用乙醚结晶后, 分离出 1- 苄氧基 -4-(2- 碘 - 乙基) - 苯。

[0121] d) 在 0℃ 和惰性气氛下, 向丙二酸乙酰氨基酯 (59.4g, 0.27mol, 2 当量) 的无水二甲基甲酰胺 (400ml) 溶液中加入氢化钠 (60% 油悬液) (9.94g, 0.49mol, 1.8 当量), 将反应混合物于 0℃ 搅拌 3 小时。然后于 0℃ 缓慢加入 1- 苄氧基 -4-(2- 碘 - 乙基) 苯 (46.8g, 0.13mol, 1 当量) 的无水二甲基甲酰胺 (250ml) 溶液, 将反应混合物于室温搅拌过夜。将反应混合物用几滴甲醇淬灭, 真空浓缩近干, 然后用乙酸乙酯萃取, 随后用 1N HCl (2×500ml)、饱和 NaHCO₃ 溶液 (2×500ml) 和盐水 (2×500ml) 洗涤, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。用乙醚多次结晶后, 分离出 2- 乙酰氨基 -2-[2-(4- 苄氧基 - 苯基) - 乙基] - 丙二酸二乙酯。

[0122] e) 向 2- 乙酰氨基 -2-[2-(4- 苄氧基 - 苯基) - 乙基] - 丙二酸二乙酯 (44.1g, 0.1mol) 的乙醇 / 水 (2/1) (285ml/285ml) 溶液中加入 CaCl₂ (28.5g, 0.26mol, 2.5 当量) 和逐份的 NaBH₄ (19.4g, 0.52mol, 5.0 当量), 将反应混合物于室温搅拌过夜。于 0℃, 将反应混合物小心地逐滴用甲醇 (10ml) 淬灭, 真空浓缩近干。将粗混合物用乙酸乙酯萃取 (4×500ml), 随后用 1N HCl (2×300ml)、饱和 NaHCO₃ 溶液 (2×300ml) 和盐水 (2×300ml) 洗涤。合并有机层, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。N-[3-(4- 苄氧基 - 苯基) - 1,1- 双 - 羟甲基 - 丙基] - 乙酰胺未经进一步纯化使用。

[0123] f) 于室温, 向粗的 N-[3-(4- 苄氧基 - 苯基) - 1,1- 双 - 羟甲基 - 丙基] - 乙酰胺在四氢呋喃 / 甲醇 / 水混合物 (1/2/2) (450ml/900ml/900ml) 中的溶液中加入氢氧化锂 (32.7g, 1.36mol, 8.0 当量)。将反应混合物于 55℃ 搅拌 5 小时, 然后用乙酸乙酯 (500ml) 萃取, 用盐水洗涤 (2×300ml), 合并有机层, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。用乙酸乙酯结晶后, 分离出 2- 氨基 -2-[2-(4- 苄氧基 - 苯基) - 乙基] - 丙烷 -1,3- 二醇。

[0124] g) 向 2- 氨基 -2-[2-(4- 苄氧基 - 苯基) - 乙基] - 丙烷 -1,3- 二醇 (31.1g, 0.10mol) 的乙腈 (2.38l) 溶液中加入原乙酸三乙酯 (17.1ml, 0.12mol, 1.2 当量) 和乙酸 (5.48ml, 0.11mol, 1.1 当量), 然后将反应混合物于 80℃ 搅拌 5 小时。然后真空浓缩反应混合物, 用乙酸乙酯结晶后, 分离出 {4-[2-(4- 苄氧基 - 苯基) - 乙基] - 2- 甲基 - 4,5- 二氢 - 噁唑 - 4- 基} - 甲醇。

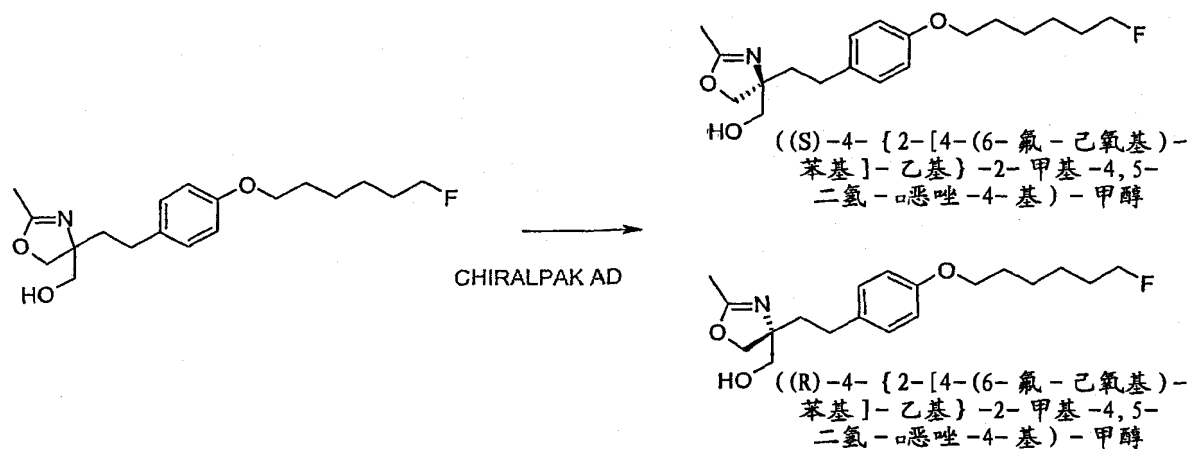
[0125] h) 向 {4-[2-(4- 苄氧基 - 苯基) - 乙基] - 2- 甲基 - 4,5- 二氢 - 噁唑 - 4- 基} - 甲醇 (26.1g, 0.08mol) 的甲醇 (800ml) 溶液中加入披钨炭 (2.6g, 10% wt), 将反应混合物在氢气氛围和 RT 下搅拌 5 小时。然后通过 celite 过滤反应混合物, 真空浓缩。用乙酸乙酯和己烷结晶后, 以定量收率分离 (R/S) - 4-[2-(4- 羟甲基 - 2- 甲基 - 4,5- 二氢 - 噁唑 - 4- 基) - 乙基] - 苯酚。

[0126] i) 在惰性气氛下, 向 (R/S) - 4-[2-(4- 羟甲基 - 2- 甲基 - 4,5- 二氢 - 噁唑 - 4- 基) - 乙基] - 苯酚 (500mg, 2.12mmol) 的无水 DMF (8ml) 溶液中加入 Cs₂O (901mg, 2.76mmol, 1.3 当量) 和 1- 溴 - 6- 氟 - 己烷 (464.1mg, 2.55mmol, 1.2 量)。将反应混合物在惰性气氛和 85℃ 下搅拌过夜。然后加入饱和 NaOH 溶液 (20ml) 和乙酸乙酯 (40ml)。分离有机层, 水相用乙酸乙酯萃取 (3×40ml 合并有机萃取液, 用盐水和 1M HCl 洗涤, 经 MgSO₄

干燥,蒸发至干。快速色谱法纯化(环己烷/乙酸乙酯(9/1)至(1/1)和(0/1)),得(R/S)-(4-{2-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-乙基}-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基)-甲为无色的油。

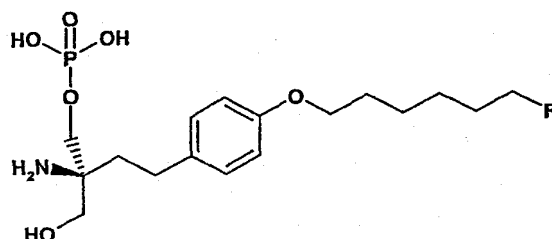
[0127] 借助制备规模 CHIRALPAK AD 柱 HPLC, 分离((R/S)-4-{2-[4-(6-己氧基)-苯基]-乙基}-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基)-甲醇的对映异构体(以己烷/2-丙醇 96/6 作为流动相)。

[0128]



[0129] 实施例 5: 磷酸单-[(S)-2-氨基-4-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-2-羟甲基-丁基]

[0130]



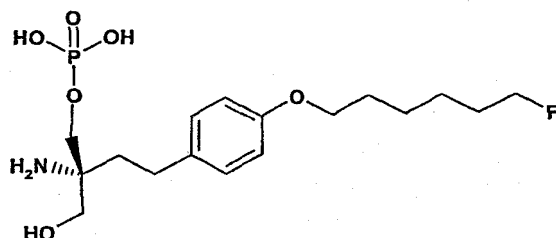
[0131] a) 在 -25°C 下, 向手性((S)-4-{2-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-乙基}-2-甲基-4,5-二氢噁唑-4-基)-甲醇(300mg, 0.80mmol) 与四唑(337.4mg, 4.82mmol, 6 当经过甲苯重结晶) 的无水 THF(6ml) 溶液中加入 3-二乙氨基-1,5-二氢苯[e][1,3,2]二氧杂磷杂萘(433.5 μL , 1.56mmol, 1.95 当量)。将反应混合物在和 -25°C 下搅拌 3 小时, 然后恢复至 RT。然后于 0°C 注入 H_2O_2 (30%, 75 μL , 4.0mmol, 5 当量), 同时剧烈搅拌。将反应混合物另外搅拌 30 分钟, 继之以加入饱和硫代硫酸钠溶液(1ml)。分离有机层, 水相用乙醚萃取($3 \times 20\text{ml}$)。合并有机萃取液, 用盐水洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 蒸发至干。经快速色谱法纯化(乙酸乙酯), 得到磷酸二叔丁基酯(S)-4-{2-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-乙基}-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯, 为无色的油。

[0132] b) 向磷酸二叔丁基酯(S)-4-{2-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-乙基}-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯(33mg, 0.050mmol) 的乙醇(2ml) 溶液中加入浓 HCl(2ml)。将反应混合物于 85°C 搅拌 2 小时, 然后浓缩至干。将残余物重新溶于乙酸乙酯, 用己烷沉淀。滤出固体, 用无水乙醚洗涤, 真空干燥, 得到磷酸单-[(S)-2-氨基-4-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-2-羟甲基-丁基]。

基]-2-羟甲基-丁基}酯,为无色粉末。

[0133] 实施例 6:磷酸单-[(R)-2-氨基-4-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-2-羟甲基-丁基}酯

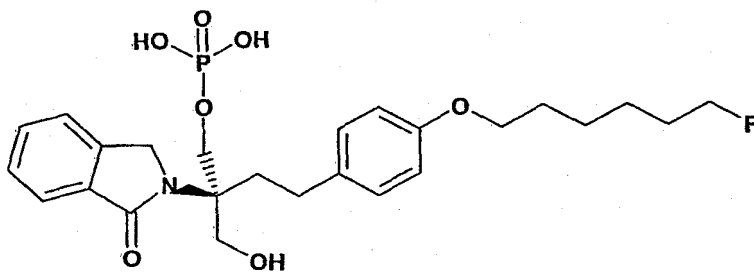
[0134]



[0135] 采用实施例 5 所述化学进行合成。

[0136] 实施例 7:磷酸单-[(S)-4-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-2-羟甲基-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-丁基]酯

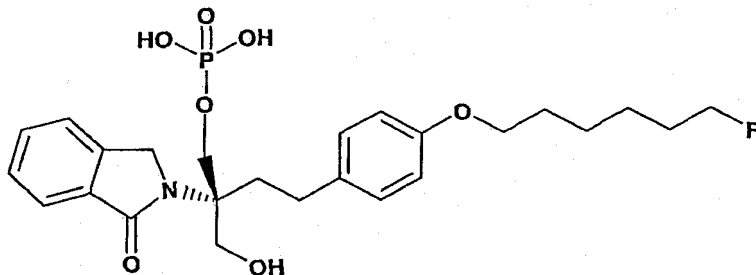
[0137]



[0138] 按照实施例 1 步骤 e 所给出的工艺进行 OPA-衍生化。

[0139] 实施例 8:磷酸单-[(R)-4-[4-(6-氟-己氧基)-苯基]-2-羟甲基-2-(1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-丁基]酯

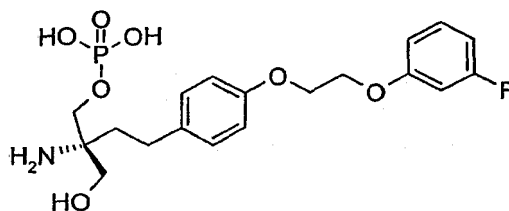
[0140]



[0141] 按照实施例 1 步骤 e 所给出的工艺进行 OPA-衍生化。

[0142] 实施例 9:磷酸单-((R)-2-氨基-4-{4-[2-(3-氟-苯氧基)-乙氧基]-苯基}-2-羟甲基-丁基)酯

[0143]



[0144] 向 4-(2-羟基-乙基)-苯酚 (50g, 0.36mol) 的乙醇 (400ml) 溶液中加入碳酸钾 (75g, 0.54mol, 1.5 当量) 和苄基溴 (47.2ml, 0.39mol, 1.1 当量), 将反应混合物于室温搅拌过夜。然后通过 celite 滤出反应混合物, 真空浓缩。用乙醚结晶后, 分离出 2-(4-苄氧基-苯基)-乙醇 (82.6g, 95%)。

[0145] 向 2-(4-苄氧基-苯基)-乙醇 (78.72g, 0.34mol) 的二氯甲烷 (400ml) 溶液中加入三乙胺 (67.3ml, 0.44mol, 1.4 当量), 然后于 0℃ 加入甲磺酰氯 (34.8ml, 0.44mol, 1.3 当量)。将反应混合物于 0℃ 搅拌 30 分钟, 升温至室温。将反应混合物用二氯甲烷萃取 (2×300ml), 合并有机层, 然后用盐水洗涤 (2×300ml), 真空浓缩。向粗产物的乙酸乙酯 (600ml) 溶液中加入碘化钠 (67.2g, 0.44mol, 1.3 当量), 将反应混合物回流搅拌 6 小时。过滤后, 将有机层用盐水洗涤 (3×400ml), 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。用乙醚结晶后, 分离出 1-苄氧基-4-(2-碘-乙基)-苯 (116.5g, 86%)。

[0146] 在 0℃ 和惰性气氛下, 向丙二酸乙酰氨基酯 (59.4g, 0.27mol, 2 当量) 的无水二甲基甲酰胺 (400ml) 溶液中加入氢化钠 (60% 油悬液) (9.94g, 0.49mol, 1.8 当量), 将反应混合物于 0℃ 搅拌 3 小时。然后于 0℃ 缓慢加入 1-苄氧基-4-(2-碘-乙基)-苯 (46.8g, 0.13mol, 1 当量) 的无水二甲基甲酰胺 (250ml) 溶液, 将反应混合物于室温搅拌过夜。将反应混合物用几滴甲醇淬灭, 真空浓缩近干, 然后用乙酸乙酯萃取, 随后用 1N HCl (2×500ml)、饱和 NaHCO₃ 溶液 (2×500ml) 和盐水 (2×500ml) 洗涤, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。用乙醚多次结晶后, 分离出 2-乙酰氨基-2-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-丙二酸二乙基酯 (47.3g, 80%)。

[0147] 向 2-乙酰氨基-2-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-丙二酸二乙基酯 (44.1g, 0.1mol) 的乙醇/水 (2/1) (285ml/285ml) 溶液中加入 CaCl₂ (28.5g, 0.26mol, 2.5 当量) 和逐份的 NaBH₄ (19.4g, 0.52mol, 5.0 当量), 将反应混合物于室温搅拌过夜。于 0℃ 将反应混合物小心地逐滴用甲醇 (10ml) 淬灭, 真空浓缩近干。将粗混合物用乙酸乙酯萃取 (4×500ml), 随后用 1N HCl (2×300ml)、饱和 NaHCO₃ 溶液 (2×300ml) 和盐水 (2×300ml) 洗涤。合并有机层, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。N-[3-(4-苄氧基-苯基)-1,1-双-羟甲基-丙基]-乙酰胺未经进一步纯化使用。

[0148] 在室温下, 向粗的 N-[3-(4-苄氧基-苯基)-1,1-双-羟甲基-丙基]-乙酰胺在四氢呋喃/甲醇/水混合物 (1/2/2) (450ml/900ml/900ml) 中的溶液中加入氢氧化锂 (32.7g, 1.36mol, 8.0 当量)。将反应混合物于 55℃ 搅拌 5 小时, 然后用乙酸乙酯 (500ml) 萃取, 用盐水洗涤 (2×300ml), 合并有机层, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。用乙酸乙酯结晶后, 分离出 2-氨基-2-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-丙烷-1,3-二醇 (28.8g, 97%)。

[0149] 向 2-氨基-2-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-丙烷-1,3-二醇 (200mg, 0.66mmol) 的二噁烷 (10ml) 溶液中加入 1M NaOH 溶液 (0.73ml, 0.73mmol, 1.1 当量) 和 Boc 酸酐 (217mg, 0.99mmol, 1.5 当量)。然后将反应混合物于室温搅拌过夜。用乙酸乙酯 (80ml) 萃

取,用盐水洗涤 (2×50ml),合并有机层,然后用 Na_2SO_4 干燥,过滤,真空浓缩。经快速色谱法处理 (乙酸乙酯/己烷 (3/1)) 和用乙醚结晶后,分离出 2-氨基-2-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-丙烷-1,3-二醇,为白色固体 (204mg, 87%)。

[0150] 在室温下,向 2-氨基-2-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-丙烷-1,3-二醇 (6.31g, 0.16mol) 的二氯甲烷 (120ml) 与吡啶 (1.26ml, 0.16mol) 溶液中加入邻-硝基苯甲酰氯 (2.27ml, 0.017mol)。然后将反应混合物于室温搅拌过夜。用二氯甲烷萃取 (300ml),用盐水洗涤 (2×200ml),合并有机层,然后用 Na_2SO_4 干燥,过滤,真空浓缩。经快速色谱法处理 (乙酸乙酯/己烷 (1/1)) 和用乙醚结晶后,分离出 2-硝基-苯甲酸 4-(4-苄氧基-苯基)-2-叔丁氧羰基氨基-2-羟甲基-丁基酯,为白色固体 (6.55mg, 76%)。可分离出 1.40g 原料。

[0151] 向 2-硝基-苯甲酸 4-(4-苄氧基-苯基)-2-叔丁氧羰基氨基-2-羟甲基-丁基酯 (105mg; 0.19mmol) 的甲苯 (2ml) 溶液中加入 2,2-二甲氧基丙烷 (0.06ml, 0.57mmol, 3 当量) 和催化量的对-甲苯磺酸。将反应混合物于 95℃ 搅拌 6 小时,然后在负压下浓缩至干。经快速色谱法纯化 (乙酸乙酯/己烷 (1/3)) 后,分离出 4-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-2,2-二甲基-4-(2-硝基-苯甲酰氧基-甲基)-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯,为油 (88mg, 78%)。

[0152] 向 4-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-2,2-二甲基-4-(2-硝基-苯甲酰氧基-甲基)-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯 (80mg, 0.13mmol) 的甲醇 (1ml) 与 THF (1ml) 溶液中加入 K_2CO_3 (1.5mg, 0.076 当量),将反应混合物于室温搅拌过夜。将反应混合物浓缩至干,经快速色谱法处理 (乙酸乙酯/己烷 (1/4)) 后,分离出 4-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-4-羟甲基-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯,为白色固体 (51mg, 85%)。

[0153] 向 4-[2-(4-苄氧基-苯基)-乙基]-4-羟甲基-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯 (25mg, 0.05mmol) 的甲醇 (10ml) 溶液中加入催化量的披钨炭 (10% wt)。将反应混合物在 H_2 气氛和室温下搅拌 2 小时。将混悬液通过 celite 过滤并浓缩至干后,分离出 4-羟甲基-4-[2-(4-羟基-苯基)-乙基]-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯,为白色固体。

[0154] 向 (S)-4-羟甲基-4-[2-(4-羟基-苯基)-乙基]-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯 (100mg, 0.28mmol) 的 DMF (5ml) 溶液中加入 Cs_2CO_3 (120.5mg, 0.37mmol, 1.3 当量) 和 1-(2-溴-乙氧基)-3-氟-苯 (80.7mg, 0.37mmol, 1.3 当量)。将反应混合物于 85℃ 搅拌 4 小时。然后加入乙酸乙酯和水,分离有机层,水相用乙酸乙酯萃取 (3×50ml)。合并有机萃取液,用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥,蒸发至干。经快速色谱法纯化 (AcOEt/Hx 9 : 1),得到 (S)-4-(2-{4-[2-(3-氟-苯氧基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-4-羟甲基-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯,为无色的油。

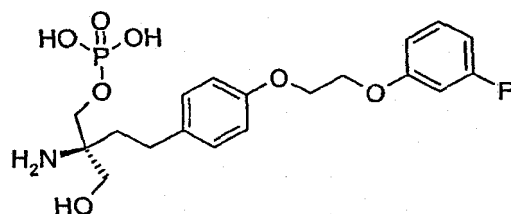
[0155] 向 (S)-4-(2-{4-[2-(3-氟-苯氧基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-4-羟甲基-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯 (70mg, 0.14mmol) 与四唑 (49mg, 0.7mmol, 5 当量, 经过甲苯重结晶) 的无水 THF (5ml) 溶液中加入二-tBu-N, N-二异丙基磷酰胺 (155mg, 0.56mmol, 4 当量)。在氩气和 RT 下搅拌 3 小时后,于 0℃ 缓慢加入 H_2O_2 (30%, 10 当量),同时剧烈搅拌。将反应混合物另外搅拌 30 分钟,继之以加入饱和硫代硫酸钠溶液 (5ml)。分离有机层,水相用乙醚萃取 (3×20ml)。合并有机萃取液,用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥,蒸发至干。经快速色谱法纯化 (AcOEt/Hx 1 : 1),得到 (R)-4-(二叔丁氧基-磷酰氧基甲

基)-4-(2-{4-[2-(3-氟-苯氧基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯,为无色的油。

[0156] 最后,将(R)-4-(二叔丁氧基-磷酰氧基甲基)-4-(2-{4-[2-(3-氟-苯氧基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯(70mg,0.10mmol)的浓HCl(2ml)溶液于室温搅拌1小时,然后加热至95℃达2小时,然后浓缩至干。将残余物重新溶于乙酸乙酯,用己烷沉淀。滤出固体,用无水乙醚洗涤,真空干燥,得到磷酸单-((R)-2-氨基-4-{4-[2-(3-氟-苯氧基)-乙氧基]-苯基}-2-羟甲基-丁基)酯,为无色粉末。

[0157] 实施例10:磷酸单-((S)-2-氨基-4-{4-[2-(3-氟-苯氧基)-乙氧基]-苯基}-2-羟甲基-丁基)酯。

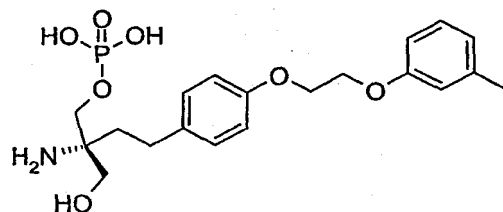
[0158]



[0159] 使用(R)-4-羟甲基-4-[2-(4-羟基-苯基)-乙基]-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯代替(S)-4-羟甲基-4-[2-(4-羟基-苯基)-乙基]-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯,如实施例9所述制备磷酸单-((S)-2-氨基-4-{4-[2-(3-氟-苯氧基)-乙氧基]-苯基}-2-羟甲基-丁基)酯。

[0160] 实施例11:磷酸单-((R)-2-氨基-2-羟甲基-4-[4-(2-间-甲苯氧基-乙氧基)-苯基]-丁基)酯

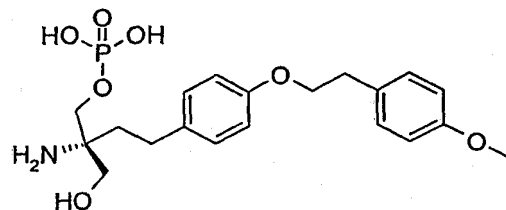
[0161]



[0162] 利用与实施例9所述类似的方法制备磷酸单-((R)-2-氨基-2-羟甲基-4-[4-(2-间-甲苯氧基-乙氧基)-苯基]-丁基)酯。

[0163] 实施例12:磷酸单-((R)-2-氨基-2-羟甲基-4-{4-[2-(4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-丁基)酯

[0164]

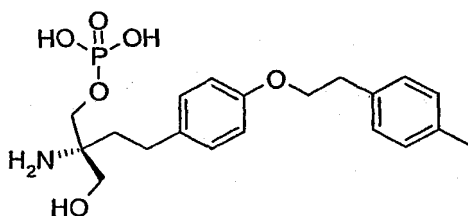


[0165] 利用与实施例9所述类似的方法制备磷酸单-((R)-2-氨基-2-羟甲

基-4-{4-[2-(4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-丁基)酯。

[0166] 实施例 13:磷酸单-{(R)-2-氨基-2-羟甲基-4-[4-(2-对-甲苯基-乙氧基)-苯基]-丁基}酯

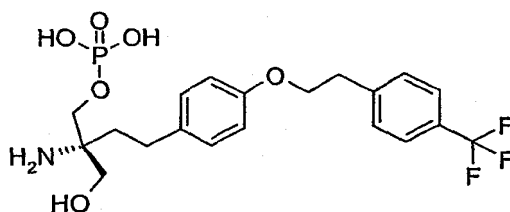
[0167]



[0168] 利用与实施例 9 所述类似的方法制备磷酸单-{(R)-2-氨基-2-羟甲基-4-[4-(2-对-甲苯基-乙氧基)-苯基]-丁基}酯。

[0169] 实施例 14:磷酸单-((R)-2-氨基-2-羟甲基-4-{4-[2-(4-三氟甲基-苯基)-乙氧基]-苯基}-丁基)酯

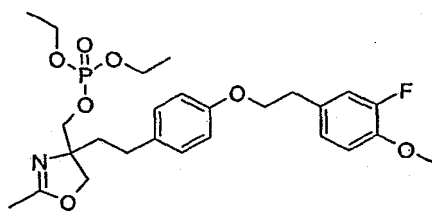
[0170]



[0171] 利用与实施例 9 所述类似的方法制备磷酸单-((R)-2-氨基-2-羟甲基-4-{4-[2-(4-三氟甲基-苯基)-乙氧基]-苯基}-丁基)酯。

[0172] 实施例 15:磷酸二乙基酯 4-(2-{4-[2-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯

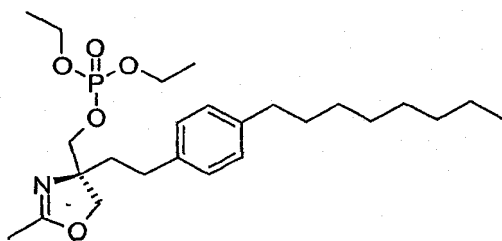
[0173]



[0174] 向磷酸单-(2-氨基-4-{4-[2-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-2-羟甲基-丁基)酯 (100mg, 0.22mmol) 的原乙酸三乙酯 (5ml) 溶液中加入乙酸 (13 μ L, 0.22mmol)。将反应混合物于 80℃ 搅拌 2 小时, 浓缩至干。经快速色谱法纯化 (AcOEt/Hx 1 : 4), 得到磷酸二乙基酯 4-(2-{4-[2-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯, 为无色的油。

[0175] 实施例 16:磷酸二乙基酯 (S)-2-甲基-4-[2-(4-辛基-苯基)-乙基]-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯

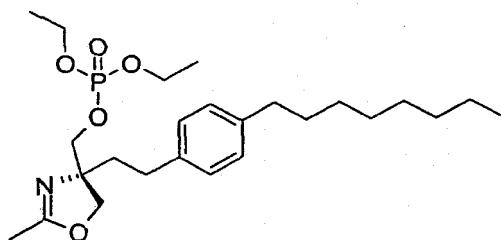
[0176]



[0177] 使用磷酸单-(2-氨基-4-{4-[2-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-2-羟甲基-丁基)酯,如实施例 15 所述制备磷酸二乙基酯(S)-2-甲基-4-[2-(4-辛基-苯基)-乙基]-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯。

[0178] 实施例 17:磷酸二乙基酯(R)-2-甲基-4-[2-(4-辛基-苯基)-乙基]-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯

[0179]



[0180] 使用磷酸单-(2-氨基-4-{4-[2-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-2-羟甲基-丁基)酯,如实施例 15 所述制备磷酸二乙基酯(R)-2-甲基-4-[2-(4-辛基-苯基)-乙基]-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯。

[0181] 实施例 18:外消旋 4-羟甲基-4-[2-(4-羟基-苯基)-乙基]-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯的色谱拆分

[0182] 将外消旋 4-羟甲基-4-[2-(4-羟基-苯基)-乙基]-2,2-二甲基-噁唑烷-3-甲酸叔丁酯的 10 μ L 0.1%乙醇溶液注射上 Chiralcel OD-H 柱 (0.46 $\times$ 25cm;购自 Chiral Technologies)。于室温实现色谱分离,流速 1ml/min,使用含有 0.1%三氟乙酸(TFA)的正己烷/乙醇 90/10(体积)混合物作为流动相。在 210nm 下进行 UV 检测。对映异构体分别在 7.23 分钟和 9.39 分钟洗脱(分离因子 α :1.52)。

[0183] 实施例 19:外消旋磷酸二乙基酯 4-(2-{4-[2-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯的色谱拆分

[0184] 将外消旋磷酸二乙基酯 4-(2-{4-[2-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯的 10 μ L 0.1%乙醇溶液注射上 Chiralcel OD-H 柱 (0.46 $\times$ 25cm;购自 Chiral Technologies)。于室温实现色谱分离,流速 1ml/min,使用正己烷/乙醇 95/5(体积)混合物作为流动相。在 210nm 下进行 UV 检测。对映异构体分别在 31.17 分钟和 35.44 分钟洗脱(分离因子 α :1.15)。

[0185] 实施例 20:对映异构体磷酸二乙基酯 4-(2-{4-[2-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯的色谱分离

[0186] 将对映异构体磷酸二乙基酯 4-(2-{4-[2-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-乙氧基]-苯基}-乙基)-2-甲基-4,5-二氢-噁唑-4-基甲基酯混合物的 10 μ L 0.1%乙醇溶液注射上 Chiralcel OJ-H 柱 (0.46 $\times$ 25cm;购自 Chiral Technologies)。于室温实现色谱分离,

流速 1ml/min, 使用正己烷 /2- 丙醇 75/25 (体积) 混合物作为流动相。在 210nm 下进行 UV 检测。对映异构体分别在 13.89 分钟和 16.77 分钟洗脱 (分离因子 α :1.27)。

[0187] 实施例 21 :对映异构体磷酸二乙基酯 (S)-2- 甲基 -4-[2-(4- 辛基 - 苯基)- 乙基]-4,5- 二氢 - 噁唑 -4- 基甲基酯的色谱分离

[0188] 将对映异构体磷酸二乙基酯 (S)-2- 甲基 -4-[2-(4- 辛基 - 苯基)- 乙基]-4,5- 二氢 - 噁唑 -4- 基甲基酯混合物的 10 μ L 0.1% 乙醇溶液注射上 Chiralpak AD-H 柱 (0.46 $\times$ 25cm ;购自 Chiral Technologies)。于室温实现色谱分离,流速 1ml/min,使用正己烷 / 乙醇 95/5 (体积) 混合物作为流动相。在 210nm 下进行 UV 检测。对映异构体分别在 10.35 分钟和 12.32 分钟洗脱 (分离因子 α :1.27)。

[0189] 游离形式或可药用盐形式的包含大于 70% R 或 S 对映异构体、尤其是 S 对映异构体的式 II 化合物 (以下称为本发明的化合物) 表现出重要的药理性质,例如淋巴细胞再循环调节性质,例如体外和体内试验所示,因此适用于治疗。

[0190] A. 体外

[0191] 如下列测定法所测定的,本发明的化合物对个体人 S1P 受体具有结合亲和性 :

[0192] 人 S1P 受体向 HEK293 细胞的瞬时转染

[0193] 克隆 S1P 受体和 G_i 蛋白,混合等量的 S1P 受体、 G_i - α 、 G_i - β 和 G_i - γ 的 4 种 cDNA, 用于通过磷酸钙沉淀法转染 HEK293 细胞单层 (M. Wigler 等人, Cell. 1977 ;11 ;223 和 DS. Im 等人, Mol. Pharmacol. 2000 ;57 ;753)。简言之,向 HEPES- 缓冲的 2mM Na_2HPO_4 中加入含有 25 μ g DNA 和 0.25M $CaCl_2$ 的 DNA 混合物。将 HEK293 细胞亚汇合单层用 25mM 氯奎毒化,然后向细胞施用 DNA 沉淀。4 小时后,将单层用磷酸盐 - 缓冲盐水洗涤,重新加入培养基 (90% 1 : 1 Dulbecco' s 改性必需培养基 (DMEM) :F-12+10% 胎牛血清)。加入 DNA 后 48-72 小时,于冰上在含有 10% 蔗糖的 HME 缓冲液 (20mM HEPES, 5mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, pH 7.4) 中刮取收获细胞,利用 Dounce 匀化器破坏。在 800 $\times$ g 下离心后,将上清液用不含蔗糖的 HME 稀释,在 100,000 $\times$ g 下离心 1 小时。将所得沉淀重新匀化,在 100,000 $\times$ g 下离心第二个 1 小时。将这种粗的膜沉淀重新悬浮在含蔗糖的 HME 中,分为等分试样,浸入液氮中骤冷。将膜于 70 $^{\circ}$ C 贮存。借助 Bradford 蛋白质测定法分光测定蛋白质浓度。

[0194] 使用 S1P 受体 /HEK293 膜制备物的 GTP γ S 结合测定法

[0195] 如 DS. Im 等人, Mol. Pharmacol. 2000 ;57 ;753 所述进行 GTP γ S 结合实验。使用 25 μ g 来自瞬时转染的 HEK293 细胞的膜制备物,在 GTP 结合缓冲液 (50mM HEPES, 100mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, pH 7.5) 中测量配体 - 介导的 GTP γ S 与 G - 蛋白的结合。在 10 μ M GDP 和 0.1nM [35 S]GTP γ S (1200Ci/mmol) 的存在下向膜中加入配体,于 30 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。利用 Brandel 收获器 (盖瑟斯堡, MD) 分离已结合与未结合的 GTP γ S, 用液闪计数器计数。

[0196] 在这些测定法中,本发明的化合物在亚 - μ M 范围内对 S1P 受体具有结合亲和性。确切而言,下表显示了下列化合物对各 S1P 受体的 EC_{50} 值,以 nM 计 :

[0197]

	S1P-1	S1P-3	S1P-2	S1P-4	S1P-5

	EC ₅₀ nM	EC ₅₀ nM	EC ₅₀ nM	EC ₅₀ nM	EC ₅₀ nM
(R)-FTY720-P	191.15	28.91	> 10000	80.13	> 10000
(S)-FTY720-P	0.33	3.21	> 10000	0.75	0.33
实施例 14	0.4	140	> 10000	6.6	7.7

[0198] 其中 (R)-FTY720-P 是 (R)-FTY720- 磷酸酯, (S)-FTY720-P 是 (S)-FTY720- 磷酸酯。与仅在非常高浓度下显示对 S1P 受体的激动效应的 (R)-FTY720- 磷酸酯相反, (S)-FTY720- 磷酸酯在低纳摩尔范围内是 S1P1 与 S1P3 的全激动剂和 S1P4 与 S1P5 的部分激动剂。

[0199] B. 体内 : 血液淋巴细胞消减

[0200] 借助管饲法向大鼠口服给予本发明的化合物或载体。在前 1 天取尾血供血液学监测, 得到个体基线值, 在用药后 2、6、24、48 和 72 小时取尾血。在这种测定法中, 本发明的化合物在 0.03 至 3mg/kg 剂量给药时消减外周血液淋巴细胞。

[0201] 因此, 本发明的化合物可用于治疗和 / 或预防由淋巴细胞相互作用所介导的疾病或紊乱, 例如在移植术中, 例如细胞、组织或器官同种异体或异种移植物的急性或慢性排斥或者移植物功能延迟、移植物抗宿主疾病; 自身免疫性疾病, 例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、桥本氏甲状腺炎、多发性硬化、重症肌无力、I 或 II 型糖尿病和与之有关的紊乱、脉管炎、恶性贫血、舍格伦综合征、眼色素层炎、牛皮癣、Graves 眼病、局限性脱发和其它; 变应性疾病, 例如过敏性哮喘、特应性皮炎、过敏性鼻炎 / 结膜炎、过敏性接触性皮炎; 任选伴有异常反应的炎性疾病, 例如炎性肠病、节段性回肠炎或溃疡性结肠炎; 内源性哮喘、炎性肺损伤、炎性肝损伤、炎性肾小球损伤、动脉粥样硬化、骨关节炎、刺激性接触性皮炎和进一步的湿疹性皮炎、脂溢性皮炎、免疫介导紊乱的皮肤表现、炎性眼疾病、角膜结膜炎、心肌炎或肝炎; 缺血 / 再灌注损伤, 例如心肌梗塞、中风、肠缺血、肾衰竭或出血性休克、创伤性休克等; 癌症, 例如 T 细胞淋巴瘤或 T 细胞白血病; 感染性疾病, 例如中毒性休克 (例如超抗原诱发的)、败血症性休克、成人呼吸窘迫综合征或者病毒感染, 例如 AIDS、病毒性肝炎, 或慢性细菌感染。细胞、组织或实体器官移植物的实例包括例如胰岛、干细胞、骨髓、角膜组织、神经元组织、心、肺、联合心肺、肾脏、肝脏、肠、胰、气管或食管。

[0202] 就上述用途而言, 所需剂量当然将因给药方式、所治疗的特定病症和所需效果而异。通常而言, 以约 0.03 至 2.5mg/kg 体重的日剂量全身给药可以获得令人满意的结果。大型哺乳动物、例如人类的指定每日剂量在约 0.5mg 至约 100mg 的范围内, 方便地以例如一天至多四次的分开剂量或以延迟形式施用。适于口服给药的单元剂型包含约 1 至 50mg 活性成分。

[0203] 本发明的化合物可以借助任意常规途径给药, 特别是肠内途径, 例如口服, 例如以片剂或胶囊形式; 胃肠道外途径, 例如以可注射溶液或混悬液形式; 局部途径, 例如以洗剂、凝胶、软膏或霜剂形式, 或者鼻用或栓剂形式。包含游离形式或可药用盐形式的本发明的化合物以及至少一种可药用载体或稀释剂的药物组合物可按照常规方式与可药用载体

或稀释剂混合来生产。

[0204] 本发明的化合物可以按游离形式或可药用盐形式给药,例如上文所示。这类盐可以按常规方式制备,表现出与游离化合物相同级别的活性。

[0205] 按照上述,本发明进一步提供了:

[0206] 1.1 在需要这类治疗的受治疗者中预防或治疗由淋巴细胞介导的紊乱或疾病、例如上文所示那些的方法,该方法包括对所述受治疗者给予有效量的包含大于 70%重量的 R 或 S 对映异构体的式 II 化合物或其可药用盐;

[0207] 1.2 在需要这类治疗的受治疗者中预防或治疗急性或慢性移植排斥或者 T- 细胞介导的炎性或自身免疫性疾病、例如上文所示那些的方法,该方法包括对所述受治疗者给予有效量的包含大于 70%重量的 R 或 S 对映异构体的式 II 化合物或其可药用盐;

[0208] 2. 游离形式或可药用盐形式的包含大于 70%重量的 R 或 S 对映异构体的式 II 化合物,用作药物,例如在上文 1.1 或 1.2 项下所示的任一方法中用作药物;

[0209] 3. 药物组合物,例如用于上文 1.1 或 1.2 项下所示的任一方法,该组合物含有游离形式或可药用盐形式的包含大于 70%重量的 R 或 S 对映异构体的式 II 化合物以及用于此的可药用稀释剂或载体;

[0210] 4. 包含大于 70%重量的 R 或 S 对映异构体的式 II 化合物或其可药用盐,用于制备药物组合物,该组合物用于上文 1.1 或 1.2 项下所示的任一方法。

[0211] 本发明的化合物可以作为唯一活性成分给药或者例如作为辅药与其它药物组合给药,其它药物例如是免疫抑制或免疫调节剂或者其它抗炎剂,例如用于治疗或预防同种异体或异种移植急性或慢性排斥或者炎性或自身免疫性紊乱,或者化疗剂,例如恶性细胞抗增殖剂。例如,本发明的化合物可以与下列药物组合使用:钙调磷酸酶抑制剂,例如环孢菌素 A 或 FK506; mTOR 抑制剂,例如雷帕霉素、40-O-(2-羟乙基)-雷帕霉素、CC1779 或 ABT578; 具有免疫抑制性质的子囊菌素,例如 ABT-281、ASM981 等;皮质类固醇;环磷酰胺;硫唑嘌呤;甲氨蝶呤;来氟米特;咪唑立宾;麦考酚酸;麦考酚酸吗乙酯;15-脱氧精脒菌素或其免疫抑制同系物、类似物或衍生物;免疫抑制性单克隆抗体,例如白细胞受体的单克隆抗体,例如 MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD25、CD28、CD40、CD45、CD58、CD80、CD86 或它们的配体;其它免疫调节化合物,例如具有 CTLA4 或其突变体胞外域的至少一部分、例如与非-CTLA4 蛋白序列连接的 CTLA4 或其突变体胞外域的至少一部分、例如 CTLA4Ig(例如指定为 ATCC 68629)或其突变体的重组结合分子,例如 LEA29Y;粘连分子抑制剂,例如 LFA-1 拮抗剂、ICAM-1 或 -3 拮抗剂、VCAM-4 拮抗剂或 VLA-4 拮抗剂;或者化疗剂,例如紫杉醇、吉西他滨、顺铂、阿霉素或 5-氟尿嘧啶。

[0212] 若本发明的化合物与其它免疫抑制/免疫调节、抗炎或化疗疗法组合施用,共同施用的免疫抑制、免疫调节、抗炎或化疗化合物的剂量当然将依赖于所采用的辅助药物类型(例如它是类固醇或钙调磷酸酶抑制剂)、所用具体药物、所治疗的病症等而不同。按照上述,本发明在更进一步的方面提供了:

[0213] 5. 如上所定义的方法,该方法包括共同施用、例如同时或依次施用治疗有效无毒量的本发明的化合物和至少一种第二种药物物质,所述第二种药物物质例如是免疫抑制药、免疫调节药、抗炎药或化疗药,例如上文所示;

[0214] 6. 药物组合,例如药盒,包含 a) 第一种药物,它是如本文所公开的游离形式或可

药用盐形式的本发明的化合物,和 b) 至少一种辅助药物,例如免疫抑制药、免疫调节药、抗炎药或化疗药。药盒可包含其施用指导。

[0215] 本文所用的术语“共同给药”或“组合给药”等意欲涵盖所选择的治疗剂对个体患者给药,并且意欲包括其中各成分不一定借助相同给药途径或者同时给药的治疗方案。

[0216] 本文所用的术语“药物组合”表示将一种以上活性成分混合或合并所得的产品,包括活性成分的固定和不固定组合。术语“固定组合”意味着活性成分、例如本发明的化合物和辅助成分以单一实体或剂量形式同时施用于患者。术语“不固定组合”意味着活性成分、例如本发明的化合物和辅助成分作为单独实体同时、并行或没有具体时间限制地依次施用于患者,其中所述施用给患者体内提供了治疗有效水平的两种化合物。后者还应用于鸡尾酒疗法,例如施用 3 种或 3 种以上活性成分。

[0217] 在其它方面,本发明提供了分离式 I 化合物的 R 与 S 对映异构体的方法,该方法包括通过采用手性离子交换相的高效液相色谱法 (HPLC) 分离对映异构体,例如如上所述基于氨基甲酸奎宁或氨基甲酸奎尼丁。

[0218] 在其它方面,本发明提供了确定样品中式 II 化合物的 R 和 / 或 S 异构体含量的方法,该方法包括 (a) 使样品中的式 II 化合物与苯-1,2-二甲醛反应,生成式 I 化合物,通过 HPLC 分离式 I 化合物的 R 与 S 异构体。优选如上所述进行 HPLC,采用手性离子交换相,例如基于氨基甲酸奎宁或氨基甲酸奎尼丁。式 I 化合物在该方法中可用作中间体。样品可以是例如来自体液的样品,例如血液、血浆、唾液或尿液,可以首先进行一个或一个以上的分离步骤(例如甲醇萃取和 / 或非手性 HPLC),目的是从体液中分离出式 II 化合物。借助这样的方法,可以测定样品中活性 R 或 S 对映异构体的量。因而,该方法可用于例如在对受治疗者给予式 II 化合物(例如其外消旋混合物)或式 II 化合物前体(体内生成代谢产物式 II 化合物)之后,监测受治疗者中式 II 化合物的活性 S 对映异构体的血药浓度。

[0219] 例如,对大鼠口服 (7.5mg/kg) 或静脉内输注 (4mg/kg) 给予手性 ^{14}C - 标记的 FTY720。手性 ^{14}C - 标记的 FTY720- 磷酸酯在大鼠体内作为 ^{14}C - 标记的 FTY720 的代谢产物生成。给药后在不同时间(例如 3 或 72 小时)取血样。每份血样用甲醇萃取,借助非手性 HPLC 分离出 ^{14}C FTY720- 磷酸酯。将所分离的 ^{14}C FTY720- 磷酸酯用 OPA 衍生化。衍生物中掺入未标记的 OPA- 衍生化 R- 与 S-FTY720- 磷酸酯作为保留时间标识物(在 215nm 用 UV 监测),利用 ProntoSIL Chiral AX QN-1 柱进行手性 HPLC 分离。所有血样中的 ^{14}C FTY720- 磷酸酯仅代表有药理活性的 S- 对映异构体。无活性的 R- 对映异构体是不可检测的。