[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07D 215/52 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680019673.5

[43] 公开日 2008 年 5 月 28 日

[11] 公开号 CN 101189211A

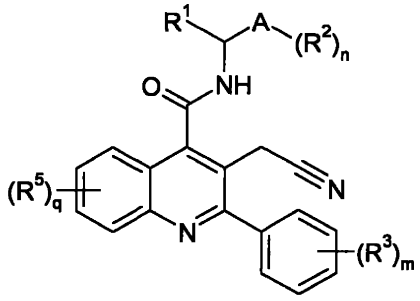
[22] 申请日 2006.5.30
[21] 申请号 200680019673.5
[30] 优先权
[32] 2005. 6. 3 [33] US [31] 60/687,418
[86] 国际申请 PCT/SE2006/000630 2006.5.30
[87] 国际公布 WO2006/130080 英 2006.12.7
[85] 进入国家阶段日期 2007.12.3
[71] 申请人 阿斯利康（瑞典）有限公司
地址 瑞典南泰利耶
[72] 发明人 R·托马斯·辛普森 詹姆斯·康
S·杰弗里·艾伯特
克里斯托巴尔·阿尔汉布拉
M·杰勒德·凯瑟
M·詹姆斯·伍兹 李 燕
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴
权利要求书 5 页 说明书 22 页

[54] 发明名称

作为 NK3 拮抗剂的喹啉衍生物

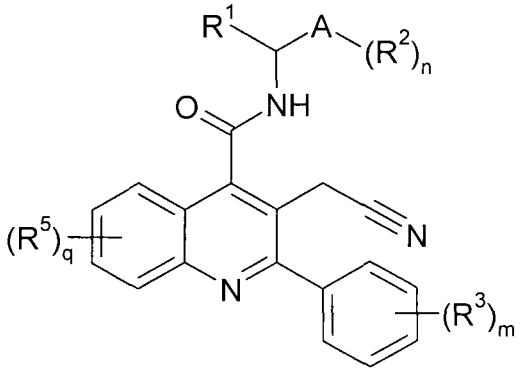
[57] 摘要

本发明披露式 I 化合物或其可药用盐、其制备方法、包含所述化合物的药物组合物及其使用方法，其中 R^1、A、R^2、n、R^3、m、R^5 和 q 如说明书所定义。



I

1. 式 I 化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐，



I

其中：

R^1 选自 H、C_{1-6} 烷基-、C_{3-6} 环烷基-、C_{1-6} 烷基-C(O)-或 C_{1-4} 烷基 OC(O)-；

A 为苯基或 C_{3-7} 环烷基-；

n 为 1、2 或 3；

R^2 在每种情况下独立选自 H、-OH、$-NH_2$、-CN、卤素、C_{1-6} 烷基-、C_{3-7} 环烷基-、C_{1-6} 烷氧基-和 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基-；

R^3 在每种情况下独立选自 H、-OH、$-NH_2$、$-NO_2$、-CN、卤素、C_{1-6} 烷基-、C_{1-6} 烷氧基-和 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基-；

m 为 1、2 或 3；

R^5 在每种情况下独立选自 H、-OH、-CN、卤素、$-R^6$、$-OR^6$、$-NR^6R^7$、$-SR^6$、$-SOR^6$ 和 $-SO_2R^6$；

q 为 1、2 或 3；

其中：

R^6 和 R^7 在每种情况下独立选自 H、C_{1-6} 直链或支链烷基、C_{2-6} 直链或支链烯基、C_{2-6} 直链或支链炔基和具有零个、一个或两个双键或三键的 C_{3-7} 环碳基，其中所述基团是未取代的，或被选自-OH、=O、$-NH_2$、-CN、卤素、芳基和 C_{1-3} 烷氧基-中的一个或多个基团取代；

以及

当 R^1、R^2 或 R^3 为烷基、环烷基、烷氧基或烷氧基烷基时，所述基团是未取代的，或具有 1、2、3、4 或 5 个各自独立选自-OH、$-NH_2$、-CN、苯

基和卤素的取代基。

2. 权利要求 1 的化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐，其中：

A 为苯基；

R^1 选自 C_{1-6} 烷基-、C_{3-6} 环烷基-和 C_{1-6} 烷基-O-C(O)-；

n 在每种情况下独立选自 1 或 2。

3. 权利要求 1 的化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐，其中：

A 为苯基；

R^1 选自 C_{1-6} 烷基-或-(CO)-O-C_{1-6} 烷基；

n 在每种情况下都为 1。

4. 权利要求 1 的化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐，其选自：

3-(氰基甲基)-2-苯基-N-[(1*S*)-1-苯基丙基]喹啉-4-甲酰胺；

3-(氰基甲基)-2-苯基-N-[(1*S*)-1-苯基乙基]喹啉-4-甲酰胺；

(2*R*)-({[3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-基]羰基}氨基)(苯基)乙酸甲酯；

3-(氰基甲基)-N-[(*S*)-环丙基(3-氟苯基)甲基]-2-苯基喹啉-4-甲酰胺；

3-(氰基甲基)-2-(3-氟苯基)-N-[(1*S*)-1-苯基丙基]喹啉-4-甲酰胺；

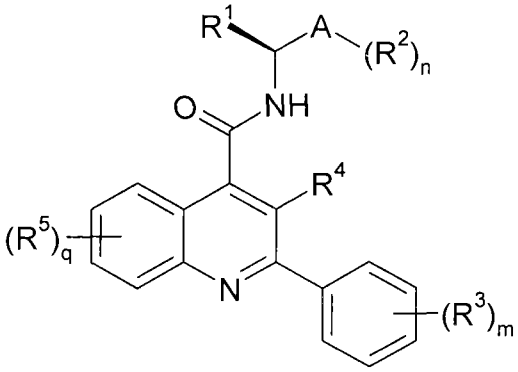
3-(氰基甲基)-N-[(*S*)-环丙基(3-氟苯基)甲基]-2-(3-氟苯基)喹啉-4-甲酰胺；

2-(3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-甲酰氨基)-2-苯基乙酸甲酯；

3-(氰基甲基)-2-苯基-N-(1-苯基乙基)喹啉-4-甲酰胺；以及

3-(氰基甲基)-2-苯基-N-(1-苯基丙基)喹啉-4-甲酰胺。

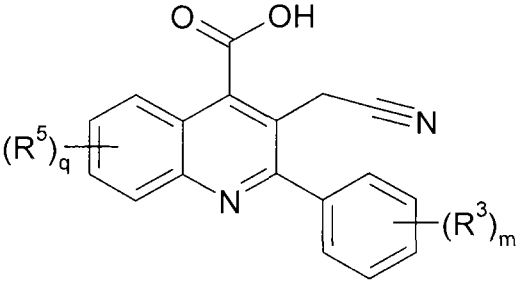
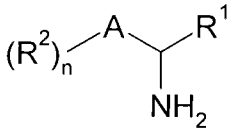
5. 权利要求 1 的化合物或其立体异构体、体内可水解的前体或可药用盐，其符合式 III，



III

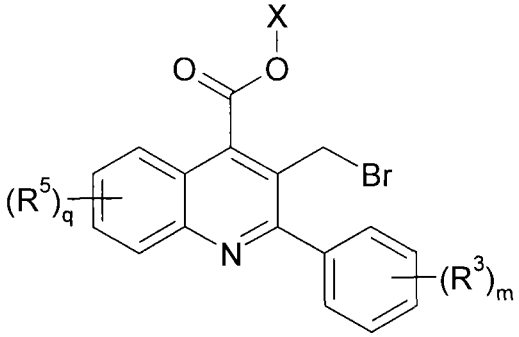
其中 R^1、A、R^2、n、R^3、m、R^4、R^5和 q 如式 I 所定义。

6. 制备权利要求 1 的化合物的方法，所述方法包括:

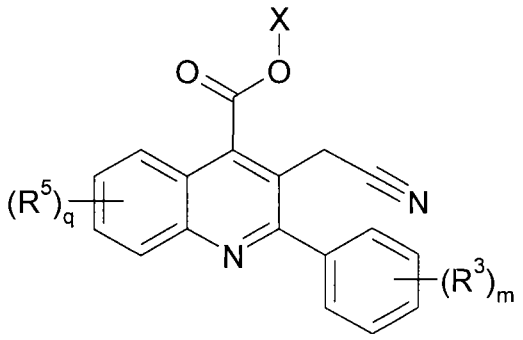
使酸  和胺  与 EDC (*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N*'-乙基碳二亚胺)、HOBt (羟基苯并三唑) 和吗啉的 CH_2Cl_2 溶液反应，从而将所述酸和所述胺偶联，形成所述式 I 化合物，其中 R^1、A、R^2、n、R^3、m、R^5和 q 如说明书所定义。

7. 制备权利要求 1 的化合物的方法，所述方法包括:

使其中 X 为烷基的溴甲基取代的喹啉酯

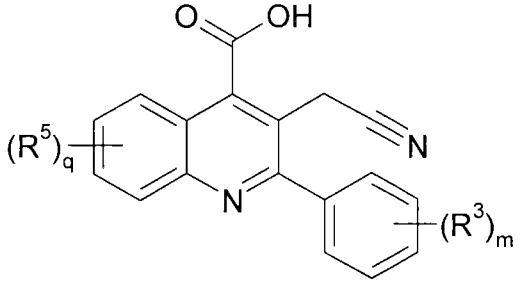


与氰化钠的 DMF 溶液反应，形成腈

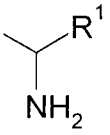


；

使所述腈与 LiOH 在 THF/水溶剂中反应，形成酸



；

使所述酸和胺与 EDC (*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N*'-乙基碳二亚胺)、HOBt (羟基苯并三唑) 和吗啉的 CH_2Cl_2 溶液反应，从而将所述酸和所述胺偶联，形成所述式 I 化合物，其中 R^1、A、R^2、n、R^3、m、R^5 和 q 如说明书所定义。

8. 治疗或预防对 NK-3 受体的调节是有益的疾病或病症的方法，该方法包括将治疗有效量的权利要求 1 的化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐给予患有所述疾病或病症的患者。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述疾病或病症选自焦虑、抑郁、精神分裂症和肥胖。

10. 一种药物组合物，其包括可药用稀释剂、润滑剂或载体和权利要求 1 的化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐。

11. 治疗或预防对 NK-3 受体的调节是有益的疾病或病症的方法，该方法包括将治疗有效量的权利要求 10 的药物组合物给予患有所述疾病或病症的患者。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述疾病或病症选自焦虑、抑郁、精神分裂症和肥胖。

13. 权利要求 1 的化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的

前体或可药用盐用于治疗或预防对 NK-3 受体的调节是有益的疾病或病症的用途。

14. 权利要求 13 的用途，其中所述疾病或病症选自焦虑、抑郁、精神分裂症和肥胖。

15. 权利要求 1 的化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐在制备用于治疗或预防对 NK-3 受体的调节是有益的疾病或病症的药物中的用途。

16. 权利要求 15 的用途，其中所述疾病或病症选自焦虑、抑郁、精神分裂症和肥胖。

作为 NK3 拮抗剂的喹啉衍生物

技术领域

本申请披露喹啉衍生物、包括这些喹啉衍生物的药物组合物和这些化合物在治疗外周和中枢神经系统疾病或障碍中的用途。

背景技术

焦虑、抑郁、精神分裂症和肥胖日常影响着成千上万的人。这些病症被认为是脑功能障碍，严重并且持久地干扰着人们的生活，影响着患者及其亲朋。

患有精神分裂症的人们通常难以清晰地思考或不能做出判断。他们可能很难辨别现实生活和幻想。他们可能患有所谓的阳性症状例如他们所经历但非反映现实的错觉或幻觉，并且看见或相信不存在的事物；或他们可能患有阴性症状，缺乏正常人所具有的行为或情感，逃避社会接触，并且在感情上是畏缩的。通常，他们开始做事却不能坚持到底，在生活中没有任何快乐或兴趣；他们可能以没有意义的方式糊里糊涂地思考、说话和行动。

患有广泛性焦虑症 (generalized anxiety disorder, GAD) 的人们对日常事物产生过度并且不可控制的忧虑。这种持续的忧虑影响了每日机能，并且能导致包括出汗、恶心、胃肠不适或腹泻的生理症状。患者往往易激怒，由于感到不安而怨天尤人，容易疲劳，并且很难睡眠。GAD 可能与其它焦虑症、抑郁症或药物滥用一起出现。忧虑的强度、持续时间和频率是变化的，但不与结果相对应，并且妨碍患者做事的行为和集中注意力的能力。

抑郁症是牵涉身体、情绪和思维的疾病。它影响人们饮食和睡眠的方式，影响人们感知自我的方式，并且影响人们思考事物的方式。患有抑郁症的人们几乎不能自已，也不能有所好转。在不进行治疗的情况下，症状可能持续数周、数月甚至数年。严重的抑郁症妨碍人们工作、学习、睡眠、饮食和享受生活的能力。抑郁症使人丧失能力的发作一生可能只发生一次，

但更普遍地是一生发生数次。严重程度较轻的抑郁症称为精神抑郁症，包括长期、慢性的症状，这些症状不会使人丧失能力，但使人不能很好地发挥机能，也使人心情不悦。许多患有精神抑郁症的人们在其一生中于某些时候也经历严重的抑郁症发作。双相性精神障碍是另一种类型的抑郁症，也称为躁狂性-抑郁症。双相性精神障碍不如其它形式的抑郁症那样普遍，双相性精神障碍的特征在于，情绪在亢奋的躁狂状态和低迷的抑郁状态之间交替变化。有些时候，情绪转变是鲜明和迅速的，但最经常地是渐进的。当处于抑郁期时，病人可能具有抑郁症症状中的任何一种或全部。当处于躁狂期时，病人可能是过分活跃、过分健谈的，并且精力旺盛。躁狂病人通常思维困难，并且他们的判断力和社会行为发生改变，导致严重的问题和困窘；他们可能情绪高涨，筹措宏伟的计划，做出不明智的商业决定，或沉溺于花天酒地。未经治疗的躁狂症也可能发展成精神病。

肥胖的人们在很多职业和商业领域中工作，在人们的生活中，肥胖可能基本不会或根本不会导致麻烦。然而，随着时间的推移，肥胖可能导致不适甚至身体疼痛，并且影响正常的日常活动。重度肥胖者可能发现，由于他们能力有所丧失，他们从事其所选择的职业的能力不得不大打折扣。另外，许多人寻找治疗肥胖的措施，但肥胖仍是很难对付的病症。

综上，焦虑、抑郁、精神分裂症和肥胖日常影响着成千上万的人，亟待需要对这些病症的有效治疗措施。

速激肽受体是一类结构相关肽的靶标，这类肽包括 P 物质 (SP)、神经激肽 A (NKA) 和神经激肽 B (NKB)，总称为“速激肽”。速激肽在中枢神经系统 (CNS) 和外周组织合成，并且在那里发挥多种生物活性。三种速激肽受体是已知的，命名为神经激肽-1 (NK-1) 受体、神经激肽-2 (NK-2) 受体和神经激肽-3 (NK-3) 受体。NK-1 受体和 NK-2 受体在多种外周组织表达，并且 NK-1 受体也在 CNS 表达，而 NK-3 受体主要在 CNS 表达。

神经激肽受体介导速激肽所引起的多种生物效应，包括在 CNS 和外周传导兴奋的神经信号 (例如疼痛信号)，调节平滑肌收缩活性，调节免疫应答和炎症应答，通过扩张血管引发降压作用，以及刺激内分泌腺和外分泌腺分泌。

在 CNS 中，NK-3 受体的激活显现出调节多巴胺、乙酰胆碱和 5-羟色胺的释放，这表明 NK-3 配体对包括焦虑、抑郁、精神分裂症和肥胖在内的

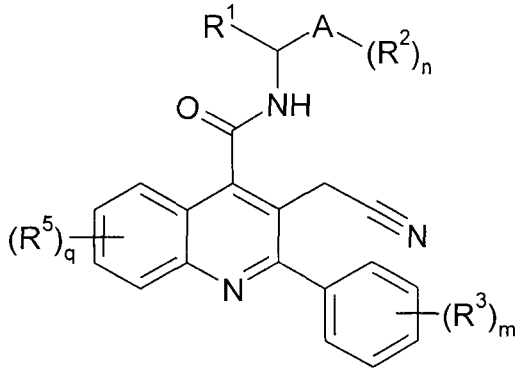
多种疾病具有治疗功效。对灵长类动物大脑的研究显示，NK-3 mRNA 存在于与这些疾病相关的多个区域中。对大鼠的研究显示，NK-3 受体位于在外侧下丘脑和未定带中的包含 MCH 的神经元上，这再次表明 NK-3 配体对肥胖具有治疗功效。

对于每种速激肽受体，都已经开发出了非肽配体，然而，已知的非肽 NK-3 受体拮抗剂具有很多问题例如种属选择性，这限制了在许多合适的疾病模型中对这些药物进行评价的可能性。因此，需要 NK-3 受体的新型非肽配体，用作治疗药物和研究 NK-3 受体调节的生物结果的工具。

发明内容

本发明披露对 NK-3 受体(NK-3r)有亲和力的化合物，尤其是喹啉衍生物。这些化合物可能用于治疗多种疾病、障碍和病症，包括但不局限于抑郁、焦虑、精神分裂症、认知障碍、精神病、肥胖、炎症疾病，包括肠应激综合征 (irritable bowel syndrome) 和炎症性肠病(inflammatory bowel disorder)；呕吐、先兆子痫 (pre-eclampsia)、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease)、与促性腺激素(gonadotrophin)和/或雄性激素(androgen)分泌过多相关的疾病，包括痛经；良性前列腺增生症 (benign prostatic hyperplasia)、前列腺癌 (prostatic cancer) 和睾丸癌 (testicular cancer)，在这些疾病中，对 NK-3 受体活性的调节是有益的。

在此所披露的 NK-3 受体的配体或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐为式 I 化合物，



I

其中：

R^1 选自 H、C_{1-6} 烷基-、C_{3-6} 环烷基-、C_{1-6} 烷基-C(O)-和 C_{1-4} 烷基 OC(O)-；

A 为苯基或 C_{3-7} 环烷基-；

n 为 1、2 或 3;

R^2 在每种情况下独立选自 H、-OH、$-NH_2$、-CN、卤素、C_{1-6} 烷基-、C_{3-7} 环烷基-、C_{1-6} 烷氧基-和 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基-;

R^3 在每种情况下独立选自 H、-OH、$-NH_2$、$-NO_2$、-CN、卤素、C_{1-6} 烷基-、C_{1-6} 烷氧基-和 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基-;

m 为 1、2 或 3;

R^5 在每种情况下独立选自 H、-OH、-CN、卤素、$-R^6$、$-OR^6$、$-NR^6R^7$、$-SR^6$、$-SOR^6$ 和 $-SO_2R^6$;

q 为 1、2 或 3;

其中:

R^6 和 R^7 在每种情况下独立选自 H、C_{1-6} 直链或支链烷基、C_{2-6} 直链或支链烯基、C_{2-6} 直链或支链炔基和具有零个、一个或两个双键或三键的 C_{3-7} 环碳基,其中所述基团是未取代的,或被选自-OH、=O、$-NH_2$、-CN、卤素、芳基和 C_{1-3} 烷氧基-中的一个或多个基团取代;

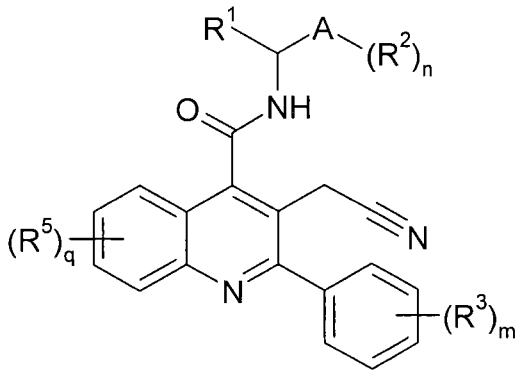
以及

当 R^1、R^2 或 R^3 为烷基、环烷基、烷氧基或烷氧基烷基时,所述基团是未取代的,或具有 1、2、3、4 或 5 个各自独立选自-OH、$-NH_2$、-CN、苯基和卤素的取代基。

所披露的还有包含这些化合物的组合物和制剂、使用它们进行疾病和病症治疗的方法 (既可以单独使用也可以与其它具有治疗活性的化合物或物质联用)、用于制备其的方法和中间体、其作为药物的用途、其在制备药物中的用途和其在诊断和分析中的用途。具体地,本发明披露的是化合物、包含其的组合物和使用它们治疗和预防与多种疾病和障碍相关的病症和障碍的方法,在这些疾病和障碍中,NK-3 受体被认为发挥作用。

具体实施方式

本申请披露的化合物为式 I 化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐,



I

其中：

R^1选自 H、C_{1-6}烷基-、C_{3-6}环烷基-、C_{1-6}烷基-C(O)-或 C_{1-4}烷基 OC(O)-；

A 为苯基或 C_{3-7}环烷基-；

n 为 1、2 或 3；

R^2在每种情况下独立选自 H、-OH、$-NH_2$、-CN、卤素、C_{1-6}烷基-、C_{3-7}环烷基-、C_{1-6}烷氧基-和 C_{1-6}烷氧基 C_{1-6}烷基-；

R^3在每种情况下独立选自 H、-OH、$-NH_2$、$-NO_2$、-CN、卤素、C_{1-6}烷基-、C_{1-6}烷氧基-和 C_{1-6}烷氧基 C_{1-6}烷基-；

m 为 1、2 或 3；

R^5在每种情况下独立选自 H、-OH、-CN、卤素、$-R^6$、$-OR^6$、$-NR^6R^7$、$-SR^6$、$-SOR^6$和$-SO_2R^6$；

q 为 1、2 或 3；

其中：

R^6和 R^7在每种情况下独立选自 H、C_{1-6}直链或支链烷基、C_{2-6}直链或支链烯基、C_{2-6}直链或支链炔基和具有零个、一个或两个双键或三键的 C_{3-7}环碳基，其中所述基团是未取代的，或被选自-OH、=O、$-NH_2$、-CN、卤素、芳基和 C_{1-3}烷氧基-中的一个或多个基团取代；

以及

当 R^1、R^2或 R^3为烷基、环烷基、烷氧基或烷氧基烷基时，所述基团是未取代的，或具有 1、2、3、4 或 5 个各自独立选自-OH、$-NH_2$、-CN、苯基和卤素的取代基。

一些化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐符合式 I，

其中：

A 为苯基;

R^1 选自 C_{1-6} 烷基-、C_{3-6} 环烷基-或 C_{1-6} 烷基-O-C(O)-;

n 在每种情况下独立选自 1 或 2。

其它化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐符合式 I,

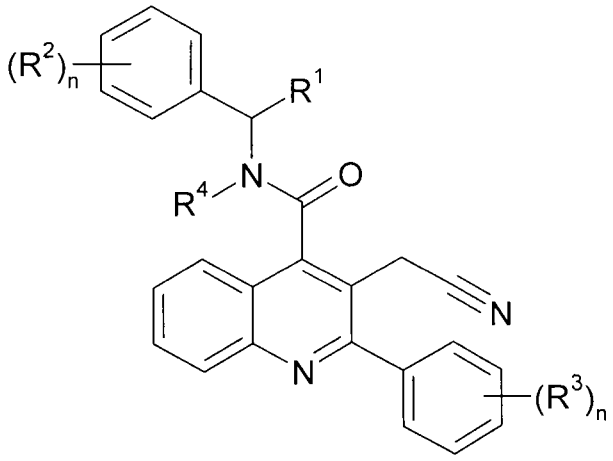
其中:

A 为苯基;

R^1 选自 C_{1-6} 烷基-或-(CO)-O-C_{1-6} 烷基;

n 在每种情况下都为 1。

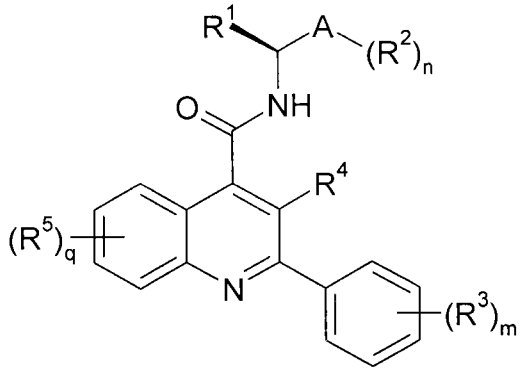
其它化合物或其立体异构体、对映异构体、体内可水解的前体或可药用盐符合式 II,



II

其中 R^4 为 H,而 R^1、R^2 和 R^3 如式 I 所定义,n 和 m 选自 1、2、3、4 或 5。

其它化合物符合式 III,



III

其中 R^1、A、R^2、n、R^3、m、R^4、R^5 和 q 如式 I 所定义。

具体的式 I 化合物为以下化合物或其立体异构体、对映异构体、体内

可水解的前体或可药用盐:

3-(氰基甲基)-2-苯基-N-[(1*S*)-1-苯基丙基]喹啉-4-甲酰胺;

3-(氰基甲基)-2-苯基-N-[(1*S*)-1-苯基乙基]喹啉-4-甲酰胺;

(2*R*)-({[3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-基]羰基}氨基)(苯基)乙酸甲酯;

3-(氰基甲基)-N-[(*S*)-环丙基(3-氟苯基)甲基]-2-苯基喹啉-4-甲酰胺;

3-(氰基甲基)-2-(3-氟苯基)-N-[(1*S*)-1-苯基丙基]喹啉-4-甲酰胺; 以及

3-(氰基甲基)-N-[(*S*)-环丙基(3-氟苯基)甲基]-2-(3-氟苯基)喹啉-4-甲酰胺。

与已知的化合物相比，所披露的化合物具有以下优点：其具有更大的溶解度，更容易被吸收，并且在体内是更有效的，产生更少的副作用，具有更小的毒性，具有更强的效力、更高的选择性和更长的作用时间，更少被代谢并且/或具有更好的药动特征或具有其它有用的药理或物化性质。通过测定本申请披露的机能活性，对于 NK-3 受体，本申请披露的化合物所具有的 IC50 小于大约 1 μM，并且对于 NK-3 受体，许多化合物所具有的 IC50 可能小于大约 100 nM。在本申请中完整引入 U.S. Provisional Application 60/687,418 所披露的内容。

缩写和定义

如在此所使用的那样，除非另有说明，C_{1-6}烷基包括但不局限于甲基、乙基、正丙基、正丁基、异丙基、异丁基、叔丁基、仲丁基，不论单独存在还是作为另一个基团的部分，并且烷基可以是直链或支链的。

如在此所使用的那样，除非另有说明，C_{1-6} 烷氧基包括但不局限于-O-甲基、-O-乙基、-O-正丙基、-O-正丁基、-O-异丙基、-O-异丁基、-O-叔丁基、-O-仲丁基，不论单独存在还是作为另一个基团的部分，并且烷氧基可以是直链或支链的。

如在此所使用的那样，C_{3-6}环烷基包括但不局限于环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

如在此所使用的那样，除非另有说明，C_{2-6}烯基包括但不局限于 1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基和 3-丁烯基。

如在此所使用的那样，除非另有说明，C_{2-6}炔基包括但不局限于乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基和 3-丁炔基。

如在此所使用的那样，除非另有说明，卤素指代氟、氯、溴或碘。

如在此所使用的那样，芳基包括苯基和萘基。

如在此所使用的那样，芳族杂环或非芳族杂环包括但不局限于N-或C-链接的呋喃基、咪唑基、噁唑基、吡咯烷基、噻唑基、噻吩基、吡咯基、吗啉基、哌啶基、哌嗪基、吡嗪基、吡啶基、嘧啶基、茚满基、吲哚基、喹啉基、异喹啉基、喹唑啉基、喹喔啉基、苯并噻吩基、苯并噁唑基或苯并噻唑基。

DMF 指代二甲基甲酰胺;

THF 指代四氢呋喃;

HOBT 指代 1-羟基苯并三唑;

DCM 指代二氯甲烷;

EtOAc 指代乙酸乙酯;

EDC 指代 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺;

EDTA 指代乙二胺四乙酸;

HEPES 指代 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸一钠盐；以及

TEA 指代三乙胺。

对于本申请披露的方法，RT 为室温，h 为小时，而其它缩写为其常用意义。

对于本申请披露的方法，如果需要的话，如在范文“Protecting groups in Organic Synthesis”〔第 3 版 (1999)，Greene 和 Wuts 著〕中所述的那样，使用保护基团，可对羟基、氨基或其它反应基团进行保护。

除非另有说明，反应在惰性气氛下进行，优选地在氮气气氛下进行，并且通常在大约一个到大约三个大气压下进行，优选地在环境压力 (大约一个大气压) 下进行。

化合物和中间体可以通过常规技术从反应混合物分离。

可提及的式 I 化合物的酸加成盐包括无机酸例如盐酸盐和氢溴酸盐以及与有机酸形成的盐例如甲酸盐、乙酸盐、马来酸盐、苯甲酸盐、酒石酸盐和富马酸盐。

式 I 化合物的酸加成盐可以通过使游离的碱或其盐、对映异构体或受保护的衍生物与一个或多个当量的合适的酸反应而形成。反应可以在盐不溶于其中的溶剂或介质中或在盐溶于其中的溶剂中进行，例如水、二噁烷、

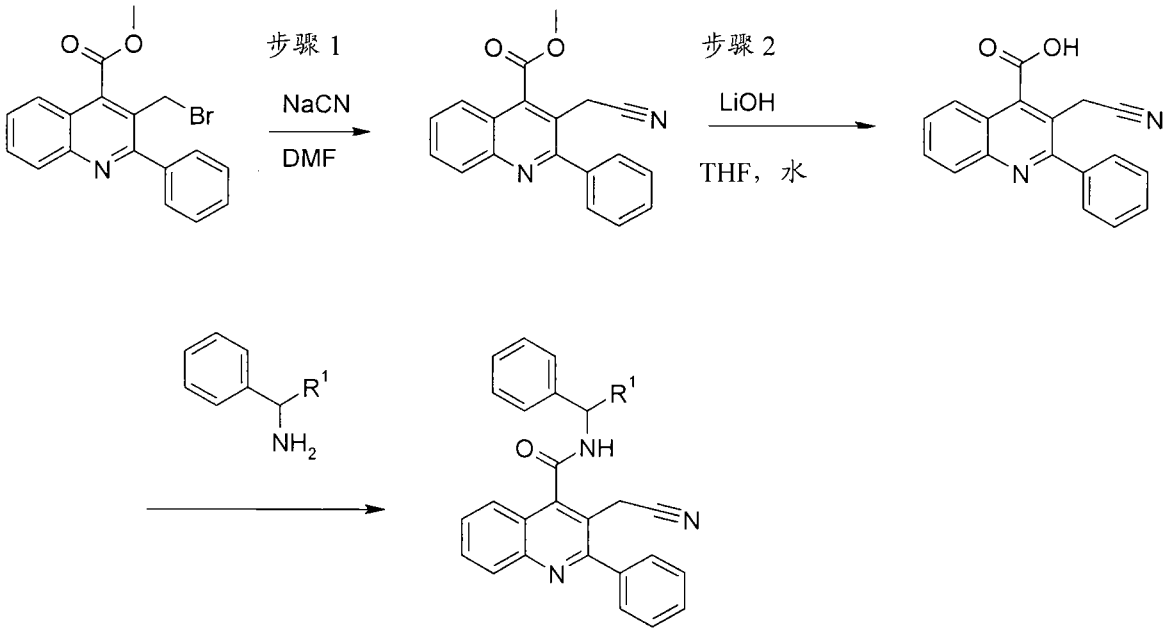
乙醇、四氢呋喃、二乙醚或溶剂的混合物，这些溶剂可以真空或通过冻干除去。反应可以是复分解过程，也可以在离子交换树脂上进行。

某些式 I 化合物可能以互变异构或对映异构的形式存在，所有这些形式都在式 I 的范围内。通过使用常规技术例如分级结晶或手性 HPLC 而对化合物的外消旋混合物进行分离，可以分离各种光学异构体。可选择地，通过在不会引起外消旋化的反应条件下使具有合适光学活性的起始原料发生反应，可以得到单纯的对映异构体。

合成方案

通过方案 A 所示的方法，可以得到其中 A 为苯基的式 I 化合物。

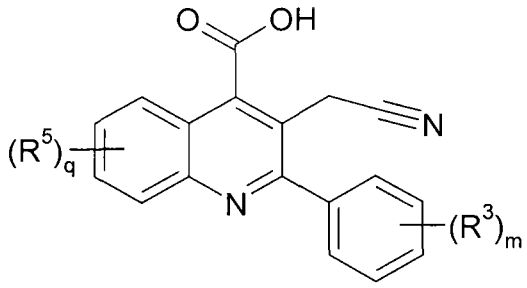
方案 A

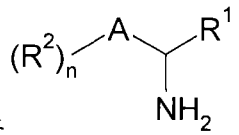


通过使合适的溴甲基取代的喹啉与氰化钠的 DMF 溶液反应，合成了步骤 1 的腈酯产物。然后，如步骤 2 所示，该腈酯可以通过与 LiOH 在 THF/水溶剂中反应而转化成酸。然后，使该酸和合适的胺与 EDC (*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N*'-乙基碳二亚胺)、HOBt (羟基苯并三唑) 和吗啉的 CH_2Cl_2 溶液反应，从而将所述酸和所述胺偶联。

通过类似于方案 A 所示的方法，可以得到其中 A 为 C_{3-7} 环烷基的化合物，以及 A 为取代的苯基或 C_{3-7} 环烷基的化合物。

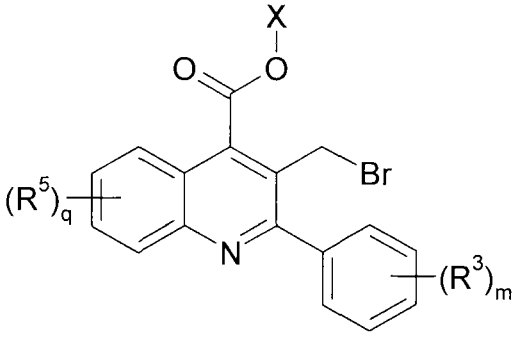
通过包括以下步骤的方法，可以得到式 I、II 或 III 化合物：使酸



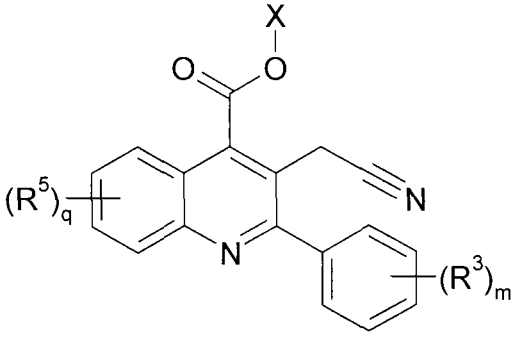


和胺 与 EDC (*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N*'-乙基碳二亚胺)、HOBt (羟基苯并三唑) 和吗啉的 CH_2Cl_2 溶液反应，从而将所述酸和所述胺偶联，形成所述式 I 化合物，其中 R^1、A、R^2、n、R^3、m、R^5 和 q 如说明书所定义。

通过包括以下步骤的方法，可以得到其它式 I、II 或 III 化合物：使其中 X 为烷基的溴甲基取代的喹啉酯

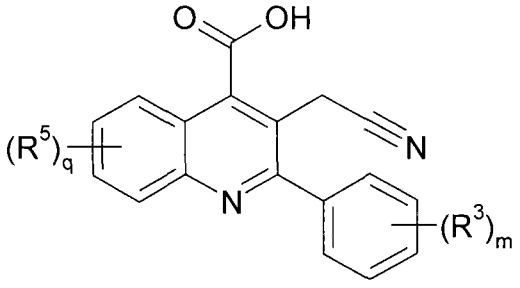


与氰化钠的 DMF 溶液反应，形成腈

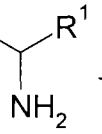


;

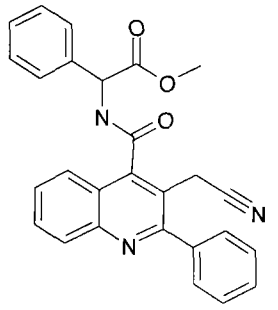
使所述腈与 LiOH 在 THF/水溶剂中反应，形成酸



;

使所述酸和胺与 EDC (*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N*'-乙基碳二亚胺)、HOBt (羟基苯并三唑) 和吗啉的 CH_2Cl_2 溶液反应，从而将所述酸和所述胺偶联，形成所述式 I 化合物，其中 R^1、A、R^2、n、R^3、m、R^5 和 q 如说明书所定义。

根据方案 A 的方法，通过使 3-溴甲基-2-苯基-喹啉-4-甲酸甲酯与氰化钠的 DMF 溶液反应，形成 3-氰基甲基-2-苯基-喹啉-4-甲酸甲酯，可以制备实施例化合物 2-(3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-甲酰氨基)-2-苯基乙酸甲酯



。

然后，通过与 LiOH 在 THF/水溶剂中反应，3-氰基甲基-2-苯基-喹啉-4-甲酸甲酯可以转化成酸。然后，在 EDC、HOBt 和吗啉的 CH_2Cl_2 溶液中，所形成的 3-氰基甲基-2-苯基-喹啉-4-甲酸可以与氨基-苯基-乙酸甲酯反应，形成标题化合物。

如在此所具体描述的那样，或通过类似于本申请披露的方法，可以使用合适的胺制备实施例 1 到 6 的化合物和本申请披露的其它式 I 化合物。本领域技术人员可以容易地认识到，多种合适的胺可以用于形成如式 I 那样的本发明主题范围内的化合物。

放射性标记的化合物

另一方面，本申请披露的化合物为其中一个或多个原子为相同元素的放射性同位素的化合物。在此方面的具体形式中，化合物用氚标记。通过合并放射性标记的起始原料或在氚的情况下用已知的方法将氢交换成氚，引入这些放射性标记的化合物。已知的方法包括 (1) 进行亲电卤化，随后在存在氚源的情况下还原卤素，例如在存在钯催化剂的情况下用氚气进行氢化，或(2)在存在氚气和合适的有机金属催化剂(例如钯)的情况下，将氢交换成氚。

标记有氚的本发明化合物可用于发现新的药用化合物，所述新的药用化合物与 NK-3 受体结合并通过激动作用、部分激动作用或拮抗作用调节 NK-3 受体的活性。这氚标记的化合物可用于测定中，来测量该化合物的置换，进而评价配体与 NK-3 受体的结合。

另一方面，本申请披露的化合物还包括一个或多个放射性同位素原子。在此方面的具体形式中，化合物包括放射性卤素。通过用已知的方法合并放射性标记的起始原料，合成这些放射性标记的化合物。在此方面的具体实施方案中，放射性同位素为 ^{18}F、^{123}I、^{125}I、^{131}I、^{75}Br、^{76}Br、^{77}Br 或 ^{82}Br。在此方面的最具体实施方案中，放射性同位素为 ^{18}F。这些包括一个或多个放射性同位素原子的化合物可以用作电子发射断层扫描 (positron emission tomography)(PET) 配体，并且可以用于其它用途和技术，以测定 NK-3 受体的位置。

化合物的治疗用途

另一方面涉及式 I 化合物在治疗和用于治疗的组合物中的用途。

另一方面包括本申请披露的化合物用于治疗 NK-3 受体的作用所介导的疾病的用途。该方面包括治疗或预防对 NK-3 受体的调节是有益的疾病或病症的方法，这些方法包括将治疗有效量的本申请披露的拮抗化合物给予患有所述疾病或病症的患者。

该方面的一个实施方案为治疗或预防病症的方法，该方法包括将药理有效量的式 I 化合物给予需要其的患者，其中所述病症为抑郁、焦虑、精神分裂症、认知障碍、精神病、肥胖、炎症疾病，包括肠应激综合征和炎症性肠病；呕吐、先兆子痫、慢性阻塞性肺疾病、与促性腺激素和/或雄性激素分泌过多相关的疾病，包括痛经；良性前列腺增生症、前列腺癌或睾丸癌。

另一方面为式 I 化合物或其对映异构体或其可药用盐用于治疗或预防对 NK-3 受体的调节是有益的疾病或病症的用途。可治疗的具体疾病或病症有抑郁、焦虑、精神分裂症、认知障碍、精神病、肥胖、炎症疾病，包括肠应激综合征和炎症性肠病；呕吐、先兆子痫、慢性阻塞性肺疾病、与促性腺激素和/或雄性激素分泌过多相关的疾病，包括痛经；良性前列腺增生症、前列腺癌或睾丸癌。更具体的实施方案包括化合物用于治疗或预防焦

虑、抑郁、精神分裂症和肥胖的用途。另一方面为式I化合物、其对映异构体或其可药用盐在制备用于治疗或预防在此所提及的疾病或病症的药物中的用途。

该方面的具体实施方案为本申请披露的化合物在制备用于治疗或预防以下疾病的药物中的用途：抑郁、焦虑、精神分裂症、认知障碍、精神病、肥胖、炎症疾病，包括肠应激综合征和炎症性肠病；呕吐、先兆子痫、慢性阻塞性肺疾病、与促性腺激素和/或雄性激素分泌过多相关的疾病，包括痛经；良性前列腺增生症、前列腺癌或睾丸癌。

药用组合物

式 I 化合物、其对映异构体和其可药用盐可以单独使用，也可以以合适的药物制剂的形式使用，经肠或非经肠给药。因而，根据另一方面，提供了药物组合物，包括优选少于 80 % 并且更优选少于 50 % 重量的在此所述化合物，以及混有惰性可药用稀释剂、润滑剂或载体。

稀释剂、润滑剂或载体的实例有：

-对于片剂和锭剂：乳糖、淀粉、滑石、硬脂酸；

-对于胶囊剂：酒石酸或乳糖；

-对于注射液：水、醇、甘油、植物油；

-对于栓剂：天然或硬化油或蜡。

通过包括以下步骤的方法，可以制备这种药物组合物：将各成分混合或复合在一起，并且使混合的各成分形成片剂、栓剂或其它给药形式，将各成分装入胶囊剂，或将成分溶解以形成注射液。

可药用衍生物包括溶剂化物和盐。例如，本申请披露的式 I 化合物可以与酸形成酸加成盐，所述酸为例如常规的可药用酸，包括马来酸、盐酸、氢溴酸、磷酸、乙酸、富马酸、水杨酸、柠檬酸、乳酸、扁桃酸、酒石酸和甲磺酸。可提及的式I化合物的酸加成盐包括无机酸例如盐酸盐和氢溴酸盐以及与有机酸形成的盐例如甲酸盐、乙酸盐、马来酸盐、苯甲酸盐、酒石酸盐或富马酸盐。式I化合物的酸加成盐可以通过使游离的碱或其盐、对映异构体或受保护的衍生物与一个或多个当量的合适的酸反应而形成。反应可以在盐不溶于其中的溶剂或介质中或在盐溶于其中的溶剂中进行，例如水、二噁烷、乙醇、四氢呋喃、二乙醚或溶剂的混合物，这些溶剂可以

真空或通过冻干除去。反应可以是复分解过程，也可以在离子交换树脂上进行。

对于在此所提及的用途、方法、药物和组合物，化合物的用量和所给药的剂型当然可以随所使用化合物、给药模式和预期治疗目的而变化。然而，一般当式I化合物以大约0.1 mg到大约20 mg/kg动物体重的每日剂量给药时，得到满意的结果。这些剂量可以按分份剂量以每日1到4次给予，也可以以缓释的形式给予。对于人类，每日总剂量的范围为5 mg到1,400 mg，更优选地为10 mg到100 mg，适于口服给药的单位剂量形式包括2 mg到1,400 mg的化合物，混有固态或液态可药用载体、润滑剂或稀释剂。

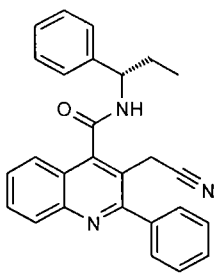
一些式I化合物可能以互变异构、对映异构、立体异构或几何异构的形式存在，所有这些形式都包括在所述内容的范围内。可通过使用常规技术例如分级结晶或手性HPLC而对化合物的外消旋混合物进行分离，从而分离光学异构体。可选择地，通过在不会引起外消旋化的反应条件下使具有合适光学活性的起始原料发生反应，可以得到单纯的光学异构体。

通过类似方案A所述的方法，可以得到示例化合物。本领域技术人员可以容易地认识到，多种合适的胺、酰氯和羧酸可以用于形成如式I那样的说明书主题范围内的化合物。

化合物实施例

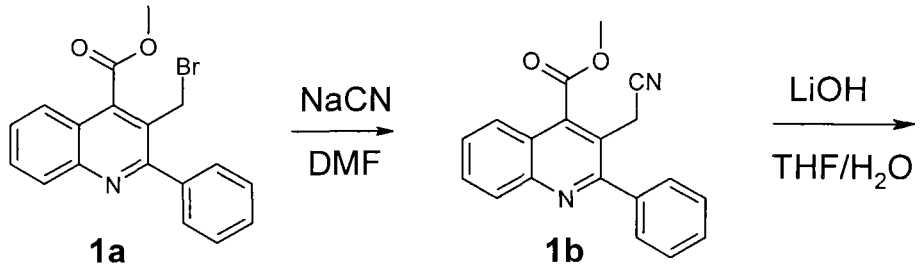
为了清楚地理解，通过说明和举例，提供了化合物和方法。然而，对于本领域技术人员而言，当审视在此所述化合物、工艺和方法的教导时，在不偏离所述内容的主旨或范围的情况下，可以对其所做的修改和变更是显而易见的。

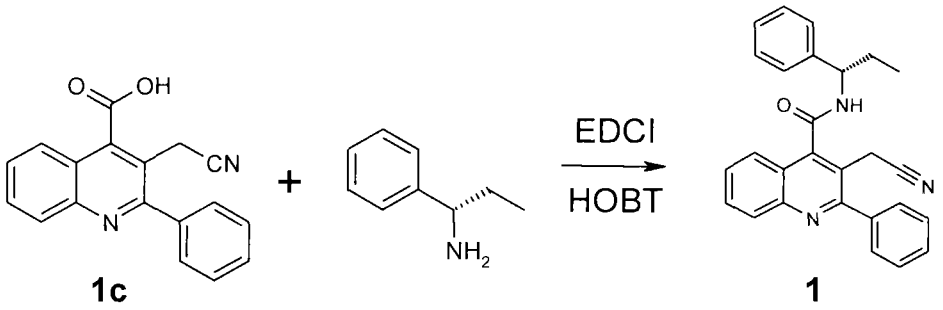
实施例1. 3-(氰基甲基)-2-苯基-N-[(1*S*)-1-苯基丙基]喹啉-4-甲酰胺



根据方案1，制备标题化合物。

方案 1:





在 RT 和 N_2 下，将 EDC (58 mg, 0.30 mmol) 加至 3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-甲酸 (1c) (57.6 mg, 0.20 mmol)、HOBT 水合物 (46 mg, 0.30 mmol)、4-甲基吗啉 (40 μL, 0.30 mmol) 的二氯甲烷 (10 mL) 溶液。然后，添加(*S*)-1-苯基丙胺 (25.4 mg, 0.21 mmol)，并且将反应混合物在 RT 搅拌 12 h。反应混合物用二氯甲烷 (30 mL) 进一步稀释，依次用 5 % 柠檬酸、10 % 碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤。分离有机相，用无水硫酸钠干燥，然后真空浓缩。残余物通过用 10 - 35 % 乙酸乙酯/己烷洗脱的色谱进行纯化，得到标题化合物 (50 mg, 62 %)，为淡黄色固体。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.96 (t, 3H), 2.01 (m, 2H), 4.67 (s, 2H), 5.29 (q, 1H), 6.50 (d, 1H), 7.32 (d, 2H), 7.34 (d, 2H), 7.39 (m, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.84 (m, 2H), 8.08 (m, 1H), 8.30 (m, 2H), 8.42 (m, 2H)。MS APCI, m/z = 406 (M + 1)。LCMS: 2.30 min。

按照以下方式，制备原料酸 3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-甲酸 (1c)。

a) 3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-甲酸甲酯 (1b)

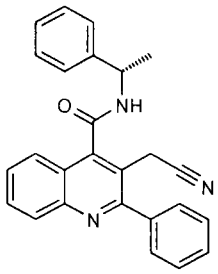
将氰化钠 (54 mg, 1.1 mmol) 加至 3-(溴甲基)-2-苯基喹啉-4-甲酸甲酯 (1a) (356 mg, 1.0 mmol) 的 DMF (10 mL) 溶液，将反应混合物在 RT 搅拌 12 h。真空除去所有溶剂，残余物在乙酸乙酯和 10 % 碳酸氢钠水溶液之间分配，用硫酸钠干燥，然后真空浓缩。残余物通过用 10 - 15 % 乙酸乙酯/己烷洗脱的色谱进行纯化，得到标题化合物 (287 mg, 95 %)，为灰白色固体。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.01 (s, 3H), 4.65 (s, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.78 (m, 2H),

7.79 (m, 1H), 8.10 (m, 1H), 8.30 (m, 1H), 8.37 (m, 2H), 8.54 (m, 1H)。MS APCI, m/z = 303 (M + 1)。LCMS: 2.12 min。

b) 3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-甲酸 (1c)

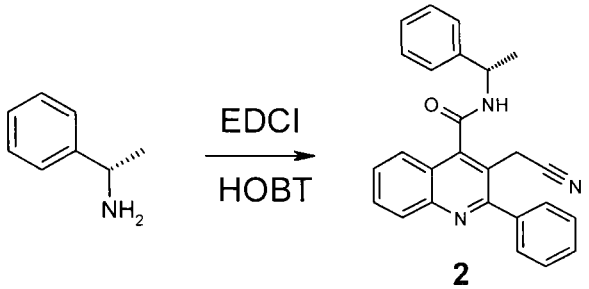
将氢氧化锂一水合物 (46 mg, 1.9 mmol) 的水 (5 ml) 溶液加至 3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-甲酸甲酯 (1b) (287 mg, 0.95 mmol) 的 THF (10 mL)溶液。将反应混合物在 RT 搅拌 12 h。残余物用 5 % 柠檬酸酸化，用乙酸乙酯萃取 (50 ml x 2)。分离有机相，用盐水 (20 ml) 洗涤，用硫酸钠干燥，然后真空浓缩，得到标题化合物 (216 mg, 78.9 %)，为灰白色固体。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.69 (s, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.82 (m, 1H), 8.20 (m, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.39 (m, 2H), 8.59 (m, 1H)。MS APCI, m/z = 289 (M + 1)。LCMS: 0.91 min。

实施例 2. 3-(氰基甲基)-2-苯基-N-[(1*S*)-1-苯基乙基]喹啉-4-甲酰胺



使用类似实施例 1 所述的方法，制备标题化合物，不同的是将(1*S*)-1-苯基乙胺 (25.4 mg, 0.21 mmol) 用作所述胺组分。

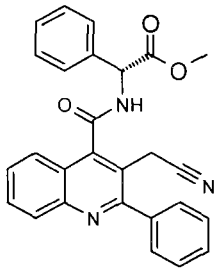
方案 2:



2

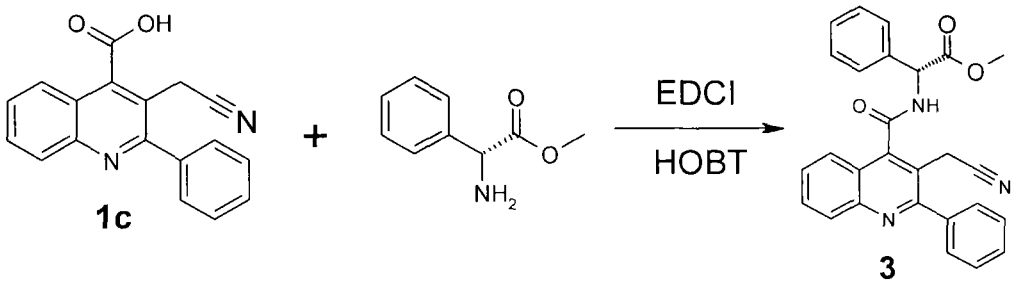
通过方案 2 所示的反应，得到标题化合物 (2) (30 mg, 38 %)，为白色固体。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.56 (d, 3H), 4.73 (s, 2H), 5.39 (m, 1H), 6.48 (d, 1H), 7.31 (d, 2H), 7.34 (d, 2H), 7.39 (m, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.84 (m, 2H), 8.08 (m, 1H), 8.30 (m, 2H), 8.42 (m, 2H)。MS APCI, m/z = 392 (M + 1)。LCMS: 2.21 min。

实施例 3. (2*R*)-({[3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-基]羰基}氨基)(苯基)乙酸甲酯



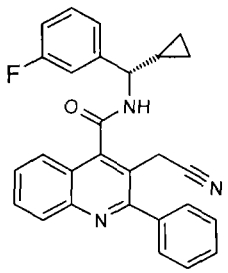
使用类似实施例 1 所述的方法，制备标题化合物，不同的是将(2*R*)-氨基(苯基)乙酸甲酯 (42.2 mg, 0.21 mmol) 用作所述胺组分。

方案 3:



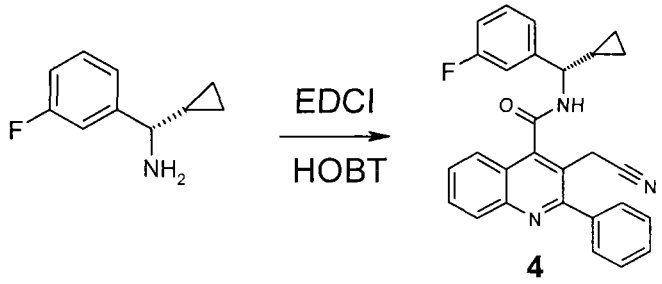
通过方案 3 所示的反应，得到标题化合物 (3) (40 mg, 46 %)，为白色固体。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.78 (s, 3H), 3.83 (s, 2H), 5.87 (d, 1H), 6.72 (d, 1H), 6.74 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 7.06 (m, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.76 (m, 1H), 7.84 (m, 2H), 8.04 - 8.19 (m, 2H)。MS APCI, m/z = 436 (M + 1)。LCMS: 2.20 min。

实施例 4. 3-(氰基甲基)-N-[(*S*)-环丙基(3-氟苯基)甲基]-2-苯基喹啉-4-甲酰胺



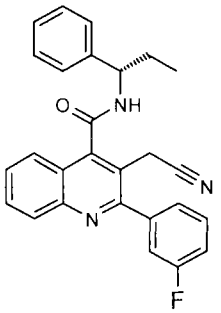
使用类似实施例 1 所述的方法，制备标题化合物，不同的是将(*S*)-1-环丙基-1-(3-氟苯基)甲基胺盐酸盐 (44.6 mg, 0.21 mmol) 用作所述胺组分。

方案 4:



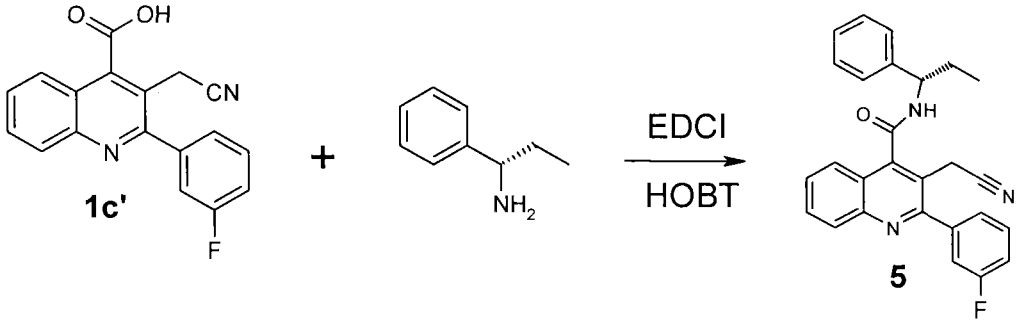
通过方案 4 所示的反应，得到标题化合物 (4) (39.2 mg, 45 %)，为白色固体。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.52 (m, 2H), 0.70 (m, 2H), 1.60 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 5.03 (d, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.94 (d, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.24 (m, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.84 (m, 2H), 8.04-8.19 (m, 4H)。MS APCI, m/z = 436 (M + 1)。LCMS: 2.37 min。

实施例 5. 3-(氰基甲基)-2-(3-氟苯基)-N-[(1*S*)-1-苯基丙基]喹啉-4-甲酰胺



使用类似实施例 1 所述的方法，制备标题化合物，不同的是将 3-(氰基甲基)-2-(3-氟苯基)喹啉-4-甲酸 (61.2 mg, 0.2 mmol) 用作所述酸组分 (1c')。

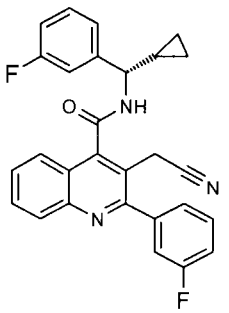
方案 5:



通过方案 5 所示的反应，得到标题化合物 (5) (45 mg, 52.8 %)，为白色固体。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.96 (t, 3H), 2.0 (m, 2H), 4.62 (s, 2H), 5.25 (q, 1H), 5.72 (m, 1H), 6.81 (d, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.32 (m, 1H), 7.35 (m, 1H),

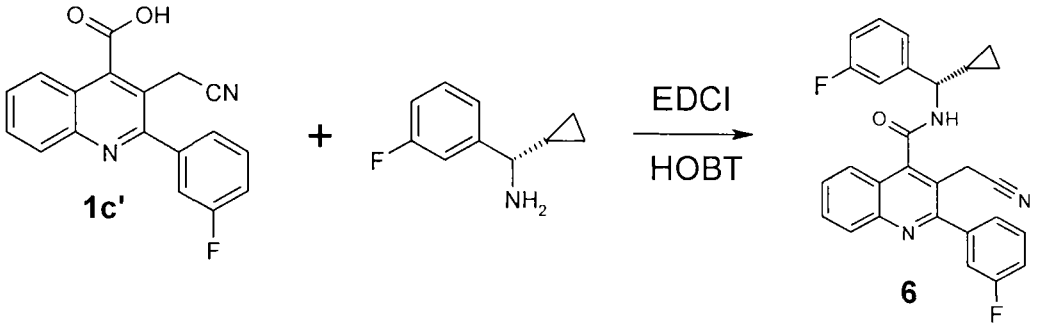
7.80 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 8.08 (m, 2H), 8.14 (m, 1H), 8.30-8.36 (m, 4H)。MS APCI, m/z = 424 (M + 1)。LCMS: 2.37 min。

实施例 6. 3-(氰基甲基)-N-[(*S*)-环丙基(3-氟苯基)甲基]-2-(3-氟苯基)喹啉-4-甲酰胺



使用类似实施例 4 所述的方法，制备标题化合物，不同的是将 3-(氰基甲基)-2-(3-氟苯基)喹啉-4-甲酸 (61.2 mg, 0.2 mmol) 用作所述酸组分 (1c')，并且将(*S*)-1-环丙基-1-(3-氟苯基)甲基胺盐酸盐 (44.6 mg, 0.21 mmol) 用作所述胺组分。

方案 6:



通过方案 6 所示的反应，得到标题化合物 (6) (35 mg, 38.6 %)，为白色固体。H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.52 (m, 2H), 0.70 (m, 2H), 1.60 (m, 1H), 4.62 (s, 2H), 5.02 (m, 1H), 6.81 (m, 1H), 6.92 (m, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.24 (m, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.80 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.84 (m, 1H), 8.05 (m, 2H), 8.04 (m, 1H), 8.14-8.36 (m, 2H)。MS APCI, m/z = 454 (M + 1)。LCMS: 2.42 min。

对于实施例 5 和 6，使用类似实施例 1 所述的方法，制备原料酸 3-(氰基甲基)-2-(3-氟苯基)喹啉-4-甲酸 (1c')，即将 3-(溴甲基)-2-(3-氟苯基)喹啉-4-甲酸甲酯用作起始原料，得到化合物 (1c') (232 mg, 80 %)，为白色固体。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.65 (s, 2H), 6.81 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.91 (m, 1H), 8.11 (m, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.37 (m, 1H), 8.59 (m, 1H)。MS

APCI, m/z = 307 (M + 1)。LCMS: 1.22 min。

其它化合物包括:

2-(3-(氰基甲基)-2-苯基喹啉-4-甲酰胺)-2-苯乙酸甲酯;

3-(氰基甲基)-2-苯基-N-(1-苯基乙基)喹啉-4-甲酰胺; 以及

3-(氰基甲基)-2-苯基-N-(1-苯基丙基)喹啉-4-甲酰胺。

生物检验

NK-3 受体结合活性

一般，通过如在 Krause *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 310 - 315, 1997 中所述的那样进行测定，可以评价 NK-3r 结合活性。通过标准操作，从人下丘脑 RNA 克隆 NK-3r 的互补 DNA。将该受体的 cDNA 插入到合适的转染到中国仓鼠卵巢细胞系的表达载体中，并且可以分离稳定表达的细胞系，表征，并用于试验。

通过本领域技术人员所已知的技术，可以使细胞可以在组织培养基中生长，通过低速离心，可以收回这些细胞。可以对细胞沉淀进行匀浆，通过高速离心分离所有细胞膜，使其悬浮于缓冲盐水中。一般，在存在或不存在检验化合物的情况下，通过将合适量的纯化的膜制品与 ^{125}I-甲基苯丙氨酸 7-神经激肽 B 一起孵育，可以测定受体结合程度。可以通过快速过滤，获得膜蛋白; 可以在 β-板闪烁计数器中，对放射性进行定量。可以通过使用合适的对照品，将非特异性结合从特异性结合区分出来，并且可以通过使用不同浓度的化合物，测定化合物对所表达的受体的亲和力。

从用克隆的 NK-3 受体转染的 CHO 细胞制备膜

使用类似用于克隆其它人 NK 受体的方法 (Aharony *et al.*, Mol. Pharmacol. 45: 9 - 19, 1994; Caccese *et al.*, Neuropeptides 33, 239 - 243, 1999)，克隆人 NK-3 受体的基因。所克隆的 NK-3 受体的 DNA 序列不同于公布了的序列 (Buell *et al.*, FEBS Letts. 299, 90 - 95, 1992; Huang *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 966 - 972, 1992)，后者在编码序列的核苷 1320 处出现静默的单一 T > C 碱基变化。由于变化是静默的，所以对于所编码的 NK-3 受体的蛋白质，所克隆的基因所提供的主要的氨基酸序列与上述所公布的序列相同。通过标准的方法和稳定表达的克隆，使用该受体 cDNA 转染 CHO-K1 细胞，分离该受体，表征。源于这些细胞的质膜如所公布的那

样制备 (Aharony *et al.*, 1994)。

收集细胞，离心，除去基质。在包含 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、120 mM NaCl、5 mM KCl、10 mM EDTA 和蛋白酶抑制剂 (0.1 mg/ml 大豆胰蛋白酶抑制剂和 1 mM 碘乙酰胺) 的缓冲液中，对沉淀的细胞进行匀浆 (Brinkman Polytron，在冰上进行三次，每次 15 sec)。匀浆在 4 °C 以 1000 x g 离心 10 min，除去细胞碎片。沉淀用匀浆缓冲液洗涤一次。合并上清液，在 4 °C 以 40,000 x g 离心 20 min。如先前那样，用 Polytron 对包含膜的沉淀进行匀浆。悬浮液在 4 °C 以 40,000 x g 离心 20 min，沉淀悬浮在缓冲液 (20 mM HEPES，pH 7.4，包含 3 mM $MgCl_2$、30 mM KCl 和 100 μM thiorphan) 中，测定蛋白质浓度。然后，膜悬浮液用包含 0.02 % BSA 的缓冲液稀释至 3 mg/ml，并且快速冷冻。样品在使用之前贮存在-80 °C。

对 NK-3 受体结合活性进行测定

通过 Aharony *et al.*, J. Pharmacol. Exper. Ther., 274: 1216 - 1221, 1995 所述的内容，修改了以[^{125}I]-MePhe7-NKB 测定受体结合程度的方法。

竞争试验在包含膜 (2 μg 蛋白质/反应)、所检验的竞争剂和[^{125}I]-MePhe7NKB (0.2 nM) 的 0.2 mL 测定缓冲液 (50 mM Tris-HCl，4 mM $MnCl_2$，10 μM thiorphan，pH 7.4) 中进行。未标记的同源配体 (0.5 μM) 用于测定非特异性结合程度。在 25 °C 孵育 90 min。通过在 Packard Harvester 中真空过滤到预浸在 0.5 % BSA 中的 GF/C 板上，分离结合受体的配体。板用 pH 为 7.4 的 0.02 M Tris 洗涤。如先前所公布的那样 (Aharony *et al.*, 1995)，使用 GraphPad Prism 或 IDBS XLfit 软件，对平衡结合常数 (K_D 和 Ki)、受体密度 (Bmax) 和统计学分析进行计算。

NK-3 机能活性

一般，通过测定在稳定表达 NK-3r 的细胞系中的钙动员程度，可以对 NK-3 机能活性进行评价。以制造商所述的方式使用 FLIPR (Molecular Devices) 装置，可以监测由甲基苯丙氨酸 7-神经激肽 B 激动剂引发的钙动员。激动剂可以加至这些细胞，并且连续记录荧光响应直到 5 min。通过在给予甲基苯丙氨酸 7-神经激肽 B 激动剂之前对细胞进行预孵，可以评价拮抗剂的作用。通过在这种体系中观测其内在活性，可以评价激动剂的作用。

对 NK-3 机能活性进行测定

表达NK-3受体的CHO细胞维持在生长基 (Ham's F12 基质、10 % FBS、

2 mM L-谷氨酰胺和 50 mg/mL 潮霉素 B) 中。在进行测定的前一天，在含有 2 mM L-谷氨酰胺的超培养基 (Cambrex Bio Science) 中，将细胞分布在 384-孔板内，使融合率达到 70 – 90 %。为了对 NK-3 受体所引发的钙动员程度进行定量，细胞首先用 pH 为 7.4 的包含 Hanks'平衡盐溶液、15 mM HEPES 和 2.5 mM 丙磺舒的测定缓冲液洗涤。然后，在测定缓冲液中，为这些细胞加载 Fluo4/AM 染料 (4.4 μM)。将细胞孵育一小时，然后用测定缓冲液洗涤，接触 0.02 - 300 nM senktide，并且通过 FLIPR 装置 (Molecular Devices Corporation) 记录荧光响应。为了定量对激动剂响应的拮抗作用，细胞用不同浓度的检验化合物预孵 2 - 20 min，然后接触单独引起大约 70 % 最大钙响应浓度的 2 nM senktide。使用 XLfit 软件 (制造商为 IDBS)，对所得到的数据进行分析，测定 EC50 和 IC50 值。