

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07H 15/26
A61K 31/70



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01821133. X

[43] 公开日 2004 年 3 月 17 日

[11] 公开号 CN 1483039A

[22] 申请日 2001. 12. 17 [21] 申请号 01821133. X
[30] 优先权
[32] 2000. 12. 20 [33] US [31] 60/256,875
[86] 国际申请 PCT/US01/49127 2001. 12. 17
[87] 国际公布 WO02/50090 英 2002. 6. 27
[85] 进入国家阶段日期 2003. 6. 20
[71] 申请人 先灵公司
地址 美国新泽西州
[72] 发明人 A · 戈萨尔 S · 兹拜达
S · K · 乔胡里 R · M · 伊安努茨
W · 冯 K · B · 阿尔顿
J · E · 帕特里克 H · R · 达维斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘元金 刘 玥

权利要求书 8 页 说明书 17 页

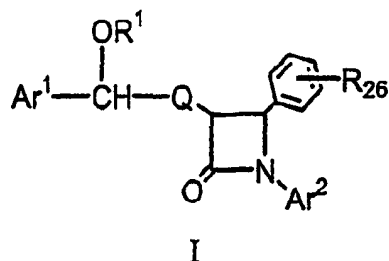
[54] 发明名称 作为降血胆甾醇剂的糖取代的 2 - 氮杂环丁烷酮

[57] 摘要

本发明公开了降低血胆甾醇作用的式 I 的糖取代的 2 - 氮杂环丁烷酮化合物和通过施用所述化合物降低胆甾醇的方法、用于治疗或预防动脉粥样硬化的含有所述化合物的药物组合物以及糖取代的 2 - 氮杂环丁烷酮胆甾醇降低剂和胆甾醇生物合成抑制剂的联用药物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 结构式 I 表示的化合物或其可药用盐:



5 其中

 R^{26} 选自:

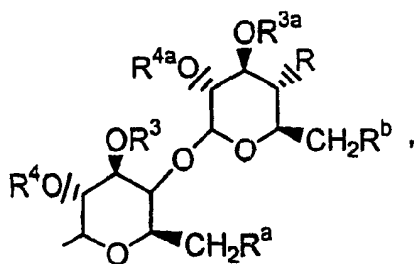
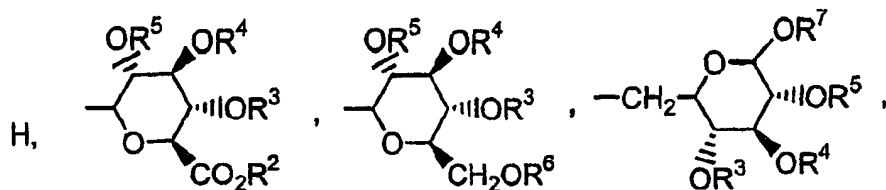
a) OH;

b) OCH_3 ;

c) 氟; 和

10

d) 氯;

 R^1 选自-SO₃H; 天然的和非天然的氨基酸,

15 R 、 R^a 和 R^b 独立地选自 H、OH、卤素、-NH₂、叠氮基、(C₁-C₆) 烷氧基 (C₁-C₆)-烷氧基和 -W-R³⁰;

W 独立地选自 -NH-C(O)-、-O-C(O)-、-O-C(O)-N(R³¹)-、-NH-C(O)-N(R³¹)-和 -O-C(S)-N(R³¹)-;

R^2 和 R^6 独立地选自 H、(C₁-C₆) 烷基、芳基和芳基 (C₁-C₆) 烷基;

R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^7 、 R^{3a} 和 R^{4a} 独立地选自 H、(C₁-C₆) 烷基、芳基 (C₁-C₆)

烷基、-C(O)(C₁-C₆)烷基和-C(O)芳基;

R³⁰独立地选自 R³²-取代的 T、R³²-取代的-T-(C₁-C₆)烷基、R³²-取代的-(C₂-C₄)链烯基、R³²-取代的-(C₁-C₆)烷基、R³²-取代的-(C₃-C₇)环烷基和 R³²-取代的-(C₃-C₇)环烷基(C₁-C₆)烷基;

5 R³¹独立地选自 H 和 (C₁-C₄)烷基;

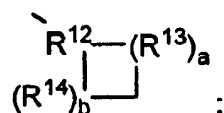
T 独立地选自苯基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、咪唑基、异咪唑基、噻唑基、异噻唑基、苯并噻唑基、噻二唑基、吡唑基、咪唑基和吡啶基;

10 R³²独立地选自 1-3 个独立地选自下列的取代基: H、卤素、(C₁-C₄)烷基、-OH、苯氧基、-CF₃、-NO₂、(C₁-C₄)烷氧基、亚甲二氧基、氧化、(C₁-C₄)烷硫基、(C₁-C₄)烷基亚磺酰基、(C₁-C₄)烷基磺酰基、-N(CH₃)₂、-C(O)-NH(C₁-C₄)烷基、-C(O)-N((C₁-C₄)烷基)₂、-C(O)(C₁-C₄)烷基、-C(O)-(C₁-C₄)烷氧基和吡咯烷基羰基; 或者 R³²是共价键并且 R³¹、与其相连的氮原子和 R³²一起形成吡咯烷基、哌啶基、N-甲基-
15 哌嗪基、二氢吲哚基或吗啉基, 或者是 (C₁-C₄)烷氧羰基-取代的吡咯烷基、哌啶基、N-甲基哌嗪基、二氢吲哚基或吗啉基;

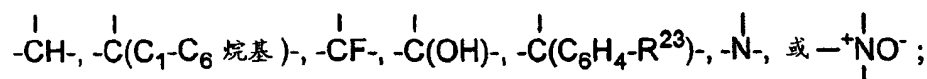
Ar¹是芳基或 R¹⁰-取代的芳基;

Ar²是芳基或 R¹¹-取代的芳基;

20 Q 是-(CH₂)_q-, 其中 q 是 2-6, 或者与氮杂环丁烷酮的 3 位环碳原子一起形成螺环基团



R¹²是



25 R¹³和 R¹⁴独立地选自-CH₂-, -CH(C₁-C₆烷基)-, -C(二-(C₁-C₆烷基))-、-CH=CH-和-C(C₁-C₆烷基)=CH-; 或者 R¹²与相邻的 R¹³, 或者 R¹²与相邻的 R¹⁴一起形成-CH=CH-或-CH=C(C₁-C₆烷基)-;

a 和 b 独立地是 0、1、2 或 3, 条件是二者不都是零; 条件是当 R¹³是-CH=CH-或-C(C₁-C₆烷基)=CH-时, a 是 1; 条件是当 R¹⁴是-CH=CH-

或 $-C(C_1-C_6\text{烷基})=CH-$ 时, b 是 1; 条件是当 a 是 2 或 3 时, 各个 R^{13} 可以相同或不同; 以及条件是当 b 是 2 或 3 时, 各个 R^{14} 可以相同或不同;

R^{10} 和 R^{11} 独立地选自 1-3 个独立地选自下列的取代基: (C_1-C_6) 烷基、 $-OR^{19}$ 、 $-O(CO)R^{19}$ 、 $-O(CO)OR^{21}$ 、 $-O(CH_2)_{1-5}OR^{19}$ 、 $-O(CO)NR^{19}R^{20}$ 、
5 $-NR^{19}R^{20}$ 、 $-NR^{19}(CO)R^{20}$ 、 $-NR^{19}(CO)OR^{21}$ 、 $NR^{19}(CO)NR^{20}R^{25}$ 、 $-NR^{19}SO_2R^{21}$ 、 $-COOR^{19}$ 、 $-CONR^{19}R^{20}$ 、 $-COR^{19}$ 、 $SO_2NR^{19}R^{20}$ 、 $S(O)_{0-2}R^{21}$ 、 $-O(CH_2)_{1-10}-COOR^{19}$ 、 $-O(CH_2)_{1-10}CONR^{19}R^{20}$ 、 $-(C_1-C_6\text{亚烷基})-COOR^{19}$ 、 $-CH=CH-COOR^{19}$ 、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 和 卤素;

Ar^1 可以是吡啶基、异噁唑基、呋喃基、吡咯基、噻吩基、咪唑基、
10 吡唑基、噻唑基、吡嗪基、嘧啶基或哒嗪基;

R^{19} 和 R^{20} 独立地选自 H、 (C_1-C_6) 烷基、芳基和芳基-取代的 (C_1-C_6) 烷基;

R^{21} 是 (C_1-C_6) 烷基、芳基或 R^{24} -取代的芳基;

R^{22} 是 H、 (C_1-C_6) 烷基、芳基 (C_1-C_6) 烷基、 $-C(O)R^{19}$ 或 $-COOR^{19}$;

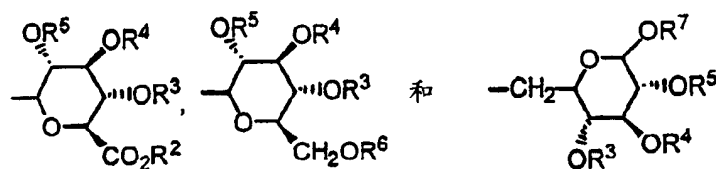
15 R^{23} 和 R^{24} 独立地是 1-3 个独立地选自 H、 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、 $-COOH$ 、 NO_2 、 $-NR^{19}R^{20}$ 、 $-OH$ 和 卤素的基团; 并且

R^{25} 是 H、 $-OH$ 或 (C_1-C_6) 烷氧基。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中 Ar^1 是苯基或 R^{10} -取代的苯基并且 Ar^2 是苯基或者 R^{11} -苯基。

20 3. 权利要求 2 的化合物, 其中 R^{10} 是卤素并且 R^{11} 是低级烷氧基或者卤素。

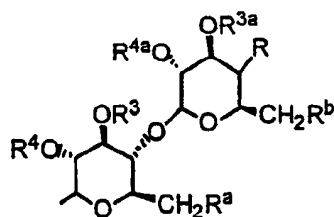
4. 权利要求 1 的化合物, 其中 R^1 选自:



25 其中:

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立地选自 H、 (C_1-C_6) 烷基、芳基和乙酰基。

5. 权利要求 1 的化合物, 其中 R^1 选自:



其中:

5 R^3 、 R^{3a} 、 R^4 和 R^{4a} 选自 H、 (C_1-C_6) 烷基、苄基和乙酰基;

R 、 R^a 和 R^b 独立地选自 H、 $-OH$ 、卤素、 $-NH_2$ 、叠氮基、 (C_1-C_6) 烷氧基 (C_1-C_6) 烷氧基和 $-W-R^{30}$, 其中 W 是 $-O-C(O)-$ 或 $-O-C(O)-NR^{31}-$, R^{31} 是 H 并且 R^{30} 是 (C_1-C_6) 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基- (C_1-C_6) 烷基、T、
10 T- (C_1-C_6) 烷基或者其中 T 被一个或两个卤素或 (C_1-C_6) 烷基取代的 T 或 T- (C_1-C_6) 烷基。

6. 权利要求 5 的化合物, 其中 R^{30} 是 2-氟苯基、2,4-二氟苯基、2-甲基苯基、2-噻吩基甲基、2-甲氧基羰基-乙基、噻唑-2-基-甲基、2-甲氧基羰基丁基或苯基, 或者 W 是 $-O-C(O)-$ 且 R^{30} 是 (C_1-C_6) 烷基、T 或被一个或两个卤素或 (C_1-C_6) 烷基取代的 T。

15 7. 权利要求 1 的化合物, 其中:

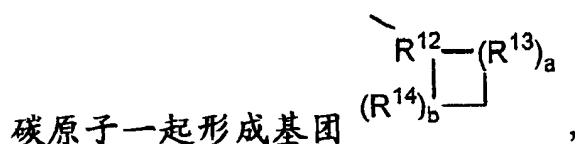
Ar^1 是苯基或 R^{10} -取代的苯基;

Ar^2 是苯基或者 R^{11} -苯基;

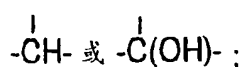
R^{10} 是卤素;

R^{11} 是低级烷氧基或卤素;

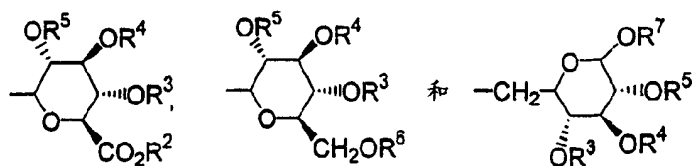
20 Q 是 $-(CH_2)_q-$, 其中 q 是 2-6; 或者 Q 与氮杂环丁烷酮的 3 位环



其中 R^{13} 和 R^{14} 各自是亚乙基并且 a 和 b 各自是 1, 且其中 R^{12} 是

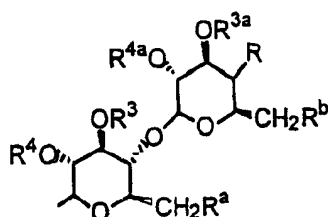


R^1 选自



其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立地选自 H、 (C_1-C_6) 烷基、苄基和乙酰基；或者 R^1 是

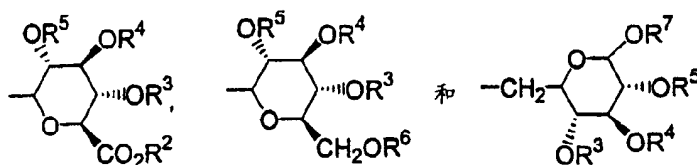
5



其中 R^3 、 R^{3a} 、 R^4 和 R^{4a} 选自 H、 (C_1-C_6) 烷基、苄基和乙酰基；并且 R 、 R^a 和 R^b 独立地选自 H、 $-OH$ 、卤素、 $-NH_2$ 、叠氮基、 (C_1-C_6) 烷氧基 (C_1-C_6) 烷氧基和 $-W-R^{30}$ ，其中 W 是 $-O-C(O)-$ 或 $-O-C(O)-NR^{31}-$ ， R^{31} 是 H 且 R^{30} 是 (C_1-C_6) 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基 (C_1-C_6) 烷基、T、T- (C_1-C_6) 烷基或者其中 T 被一个或两个卤素或 (C_1-C_6) 烷基取代的 T 或 T- (C_1-C_6) 烷基。

10

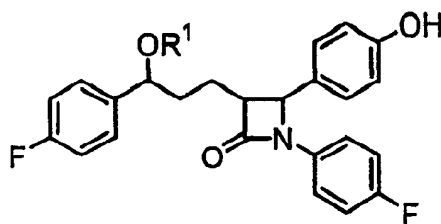
8. 权利要求 7 的化合物，其中 R^1 选自



15

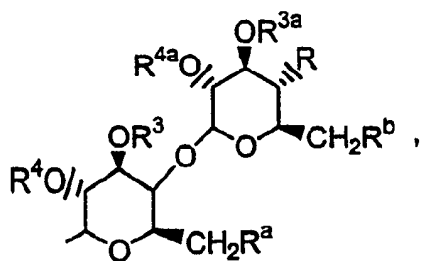
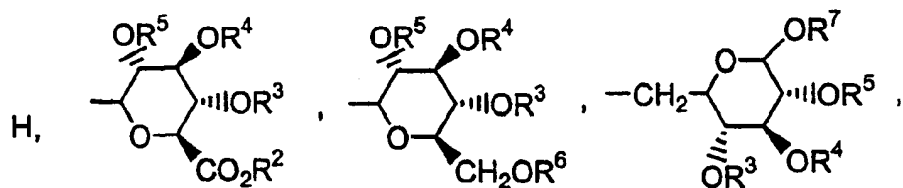
其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立地选自 H、 (C_1-C_6) 烷基、苄基和乙酰基。

9. 式 II 的化合物：



II

其中 R¹ 选自

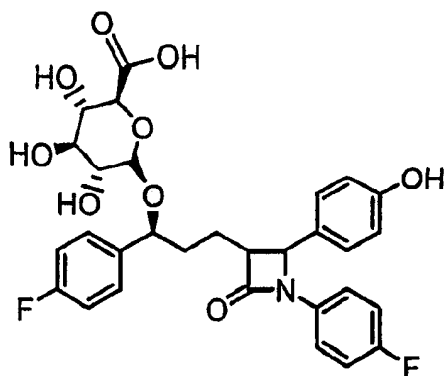


-SO₃H; 天然和非天然的氨基酸;

其中 R²、R³、R³ᵃ、R⁴、R⁴ᵃ、R⁵、R⁶ 和 R⁷ 独立地选自 H、(C₁-C₆) 烷基、苄基和乙酰基;

R、Rᵃ 和 Rᵇ 独立地选自 H、-OH、卤素、-NH₂、叠氮基、(C₁-C₆) 烷氧基 (C₁-C₆) 烷氧基和 -W-R³⁰, 其中 W 是 -O-C(O)- 或 -O-C(O)-NR³¹-, R³¹ 是 H 且 R³⁰ 是 (C₁-C₆) 烷基、-C(O)-(C₁-C₄) 烷氧基-(C₁-C₆) 烷基、T、T-(C₁-C₆) 烷基或者其中 T 被一个或两个卤素或 (C₁-C₆) 烷基取代的 T 或 T-(C₁-C₆) 烷基。

10. 式 III 的化合物:



III

11. 一种降低哺乳动物中胆甾醇水平的方法，所述方法包括给需此治疗的哺乳动物施用有效量的权利要求 1 的化合物。

12. 一种药物组合物，包含存在于可药用载体中的有效量的权利要求 1 的化合物。

13. 一种治疗或预防动脉粥样硬化或者降低胆甾醇水平的药物组合物，其包含有效量的权利要求 1 的化合物和胆甾醇生物合成抑制剂的联用药物以及可药用载体。

14. 权利要求 13 的药物组合物，其中胆甾醇生物合成抑制剂选自洛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、辛伐他汀、阿伐他汀、L-659,699、squalenestatin 1、NB-598、NK-104 (伊伐他汀) 和 ZD4522。

15. 权利要求 13 的药物组合物，其中胆甾醇生物合成抑制剂是辛伐他汀。

16. 一种治疗或预防动脉粥样硬化或降低胆甾醇水平的药盒，其在一个包装内的分开的容器中包含联用的药物组合物，该药盒的一个容器中包含可药用载体中的有效量的胆甾醇生物合成抑制剂，在第二个容器中包含可药用载体中的有效量的权利要求 1 的化合物。

17. 一种预防或治疗动脉粥样硬化或降低胆甾醇水平的方法，该方法包括同时或顺序给需此治疗的哺乳动物施用有效量的胆甾醇生物合成抑制剂和权利要求 1 化合物的联用药物。

18. 权利要求 17 的方法，其中胆甾醇生物合成抑制剂选自洛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、辛伐他汀、阿伐他汀、L-659,699、squalenestatin 1、NB-598、NK-104 (伊伐他汀) 和 ZD4522。

19. 权利要求 17 的方法，其中胆甾醇生物合成抑制剂是辛伐他

汀。

20. 一种降低哺乳动物中胆甾醇水平的方法，包括给需此治疗的哺乳动物施用有效量的权利要求 10 的化合物。

21. 一种药物组合物，其包含有效量的权利要求 10 的化合物和可药用载体。

22. 一种治疗或预防动脉粥样硬化或者降低胆甾醇水平的药物组合物，其包含有效量的权利要求 10 的化合物和胆甾醇生物合成抑制剂的联用药物以及可药用载体。

23. 权利要求 22 的药物组合物，其中胆甾醇生物合成抑制剂选自洛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、辛伐他汀、阿伐他汀、L-659,699、squalestatin 1、NB-598、NK-104 (伊伐他汀)和 ZD4522。

24. 权利要求 22 的药物组合物，其中胆甾醇生物合成抑制剂是辛伐他汀。

25. 一种治疗或预防动脉粥样硬化或降低胆甾醇水平的药盒，其在一个包装内的分开的容器中包含联用的药物组合物，该药盒的一个容器中包含可药用载体中的有效量的胆甾醇生物合成抑制剂，在第二个容器中包含可药用载体中的有效量的权利要求 10 的化合物。

26. 一种预防或治疗动脉粥样硬化或降低胆甾醇水平的方法，该方法包括同时或顺序给需此治疗的哺乳动物施用有效量的胆甾醇生物合成抑制剂和权利要求 10 的化合物的联用药物。

27. 权利要求 26 的方法，其中胆甾醇生物合成抑制剂选自洛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、辛伐他汀、阿伐他汀、L-659,699、squalestatin 1、NB-598、NK-104 (伊伐他汀)和 ZD4522。

28. 权利要求 26 的方法，其中胆甾醇生物合成抑制剂是辛伐他汀。

作为降血胆固醇剂的糖取代的 2-氮杂环丁烷酮

发明背景

5 本发明涉及在动脉粥样硬化的治疗和预防中作为降血胆固醇剂的糖取代的 2-氮杂环丁烷酮，并涉及用于治疗 and 预防动脉粥样硬化的本发明糖取代的 2-氮杂环丁烷酮与胆固醇生物合成抑制剂的联用药物。

在西方世界，动脉粥样硬化性冠心病是死亡和心血管发病的主要原因。动脉粥样硬化性冠心病的危险因素包括高血压、糖尿病、家族
10 史、男性、吸烟和血清胆固醇水平。总胆固醇水平超过 225-250 mg/dl 与明显增高的危险性有关。

胆固醇酯是动脉粥样硬化损伤的主要成分并且是胆固醇在动脉壁细胞中的主要储存形式。胆固醇酯的形成也是食物胆固醇的小肠吸收中的关键步骤。在人和动物中，除食物胆固醇的调节外，整个机体胆固醇动态平衡的调节包括胆固醇生物合成、胆汁酸生物合成的调节和
15 含胆固醇的血浆脂蛋白的分解代谢。肝脏是负责胆固醇生物合成和分解代谢的主要器官，基于这一原因，肝脏对血浆胆固醇水平起根本性的决定作用。肝脏是极低密度脂蛋白 (VLDL) 的合成和分泌场所，极低密度脂蛋白随后在循环中被代谢为低密度脂蛋白 (LDL)。LDL 是血浆中
20 携带胆固醇的主要脂蛋白，其浓度的增高与动脉粥样硬化的加剧有关。

无论通过何种手段，当小肠的胆固醇吸收减少时，较少的胆固醇被递送到肝脏。这种作用的结果是肝脂蛋白 (VLDL) 的产生减少并且血浆胆固醇 (大多数呈 LDL 形式) 的肝脏清除增加。因此，抑制小肠胆固醇吸收的净效应是血浆胆固醇水平降低。
25

据报道已将数种 2-氮杂环丁烷酮化合物用于降低胆固醇和/或抑制哺乳动物动脉壁中含胆固醇的损伤的形成：WO 93/02048 描述了 2-氮杂环丁烷酮化合物，其中 3 位取代基是其中亚烷基、亚链烯基或亚烷基部分被杂原子间隔的芳基亚烷基、芳基亚链烯基或芳基亚烷基，
30 亚苯基或亚环烷基；WO 94/17038 描述了 2-氮杂环丁烷酮化合物，其中 3 位取代基是芳基烷基螺环基；WO 95/08532 描述了 2-氮杂环丁烷酮化合物，其中 3 位取代基是其中亚烷基部分被羟基取代的芳基亚烷

基; PCT/US 95/03196 描述了其中 3 位取代基是芳基(氧代或硫代)亚烷基的化合物, 其中亚烷基部分被羟基取代; 以及 1995 年 6 月 5 日提交的美国专利申请 08/463, 619 描述了其中 3 位取代基是芳基亚烷基的化合物的制备方法, 其中亚烷基部分被羟基取代, 并且其中的亚烷基通过-S(O)₀₋₂-基团与氮杂环丁烷酮环相连。

另外, 欧洲专利 199, 630 B1 和欧洲专利申请 337, 549 A1 公开了弹性蛋白酶抑制性的取代的氮杂环丁烷酮, 它们用于治疗导致与各种疾病, 如动脉粥样硬化有关的组织破坏的炎症病症。

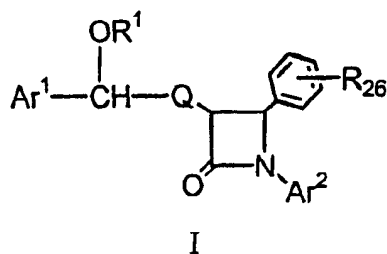
其它已知的降血胆固醇剂包括植物提取物, 如皂甙元, 特别是提果皂甙元和薯蓣皂甙元。提果皂甙元和/或薯蓣皂甙元的糖甙衍生物公开于 WO 94/00480 和 WO 95/18143 中。

据显示, 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶(EC1.1.1.34)抑制剂对胆固醇生物合成的抑制作用是降低血浆胆固醇(Witzum, Circulation, 80, 5 (1989), p. 1101-1114)和减轻动脉粥样硬化的有效途径。已经证实, HMG CoA 还原酶抑制剂与胆汁酸螯合剂的联合疗法比它们各自的单独疗法对高脂血症人类患者更有效(Illingworth, Drugs, 36 (Suppl. 3) (1988), p. 63-71)。

发明概述

本发明涉及糖取代的 2-氮杂环丁烷酮, 特别是降低胆固醇的 1 位具有芳基或取代的芳基作为取代基并且 4 位具有羟基取代的苯基, 特别是 4-羟基苯基的 2-氮杂环丁烷酮的葡萄糖衍生的轭合物。本发明中用作取代基的糖的实例包括, 但不限于己糖和核糖。

本发明化合物由式 I 或其可药用盐表示:

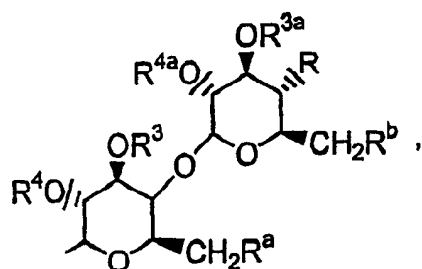
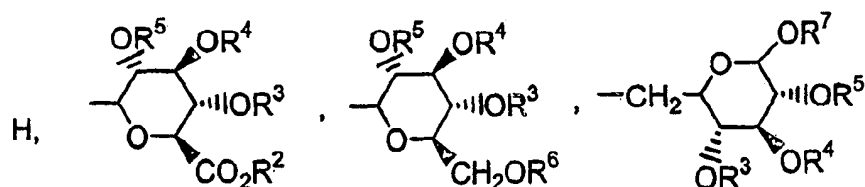


其中

R²⁶ 选自:

- a) OH;
b) OCH₃;
c) 氟; 和
d) 氯。

5 R¹ 选自



-SO₃H; 天然的和非天然的氨基酸。

10 R、R^a和R^b独立地选自H、OH、卤素、-NH₂、叠氮基、(C₁-C₆)烷氧基(C₁-C₆)-烷氧基和-W-R³⁰;

W独立地选自-NH-C(O)-、-O-C(O)-、-O-C(O)-N(R³¹)-、-NH-C(O)-N(R³¹)-和-O-C(S)-N(R³¹)-;

R²和R⁶独立地选自H、(C₁-C₆)烷基、芳基和芳基(C₁-C₆)烷基;

15 R³、R⁴、R⁵、R⁷、R^{3a}和R^{4a}独立地选自H、(C₁-C₆)烷基、芳基(C₁-C₆)烷基、-C(O)(C₁-C₆)烷基和-C(O)芳基;

R³⁰独立地选自R³²-取代的T、R³²-取代的-T-(C₁-C₆)烷基、R³²-取代的-(C₂-C₄)链烯基、R³²-取代的-(C₁-C₆)烷基、R³²-取代的-(C₃-C₇)环烷基和R³²-取代的-(C₃-C₇)环烷基(C₁-C₆)烷基;

20 R³¹独立地选自H和(C₁-C₄)烷基;

T独立地选自苯基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、咪唑基、异咪唑基、噻唑基、异噻唑基、苯并噻唑基、噻二唑基、吡唑基、咪唑基和吡啶基;

R³²独立地选自1-3个独立地选自下列的取代基: H、卤素、(C₁-

- C₄) 烷基、-OH、苯氧基、-CF₃、-NO₂、(C₁-C₄) 烷氧基、亚甲二氧基、氧代、(C₁-C₄) 烷硫基、(C₁-C₄) 烷基亚磺酰基、(C₁-C₄) 烷基磺酰基、-N(CH₃)₂、-C(O)-NH(C₁-C₄) 烷基、-C(O)-N((C₁-C₄) 烷基)₂、-C(O)(C₁-C₄) 烷基、-C(O)-(C₁-C₄) 烷氧基和吡咯烷基羰基；或者 R³² 是共价键并且 R³¹、与其相连的氮原子和 R³² 一起形成吡咯烷基、哌啶基、N-甲基-哌嗪基、二氢吡啶基或吗啉基，或者是 (C₁-C₄) 烷氧羰基-取代的吡咯烷基、哌啶基、N-甲基哌嗪基、二氢吡啶基或吗啉基；

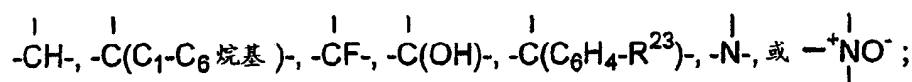
Ar¹ 是芳基或 R¹⁰-取代的芳基；

Ar² 是芳基或 R¹¹-取代的芳基；

- 10 Q 是 -(CH₂)_q-, 其中 q 是 2 - 6, 或者与氮杂环丁烷酮的 3 位环碳



R¹² 是



- 15 R¹³ 和 R¹⁴ 独立地选自 -CH₂-, -CH(C₁-C₆ 烷基)-, -C(二-(C₁-C₆) 烷基)、-CH=CH-和 -C(C₁-C₆ 烷基)=CH-; 或者 R¹² 与相邻的 R¹³, 或者 R¹² 与相邻的 R¹⁴ 一起形成 -CH=CH-或 -CH=C(C₁-C₆ 烷基)-;

- 20 a 和 b 独立地是 0、1、2 或 3, 条件是二者不都是零; 条件是当 R¹³ 是 -CH=CH-或 -C(C₁-C₆ 烷基)=CH-时, a 是 1; 条件是当 R¹⁴ 是 -CH=CH-或 -C(C₁-C₆ 烷基)=CH-时, b 是 1; 条件是当 a 是 2 或 3 时, 各个 R¹³ 可以相同或不同; 以及条件是当 b 是 2 或 3 时, 各个 R¹⁴ 可以相同或不同;

- 25 R¹⁰ 和 R¹¹ 独立地选自 1 - 3 个独立地选自下列的取代基: (C₁-C₆) 烷基、-OR¹⁹、-O(CO)R¹⁹、-O(CO)OR²¹、-O(CH₂)₁₋₅OR¹⁹、-O(CO)NR¹⁹R²⁰、-NR¹⁹R²⁰、-NR¹⁹(CO)R²⁰、-NR¹⁹(CO)OR²¹、NR¹⁹(CO)NR²⁰R²⁵、-NR¹⁹SO₂R²¹、-COOR¹⁹、-CONR¹⁹R²⁰、-COR¹⁹、SO₂NR¹⁹R²⁰、S(O)₀₋₂R²¹、-O(CH₂)₁₋₁₀-COOR¹⁹、-O(CH₂)₁₋₁₀CONR¹⁹R²⁰、-(C₁-C₆ 亚烷基)-COOR¹⁹、-CH=CH-COOR¹⁹、-CF₃、-CN、-NO₂ 和卤素;

Ar¹ 可以是吡啶基、异噁唑基、呋喃基、吡咯基、噻吩基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、吡嗪基、嘧啶基或哒嗪基;

R^{19} 和 R^{20} 独立地选自 H、 (C_1-C_6) 烷基、芳基和芳基-取代的 (C_1-C_6) 烷基;

R^{21} 是 (C_1-C_6) 烷基、芳基或 R^{24} -取代的芳基;

R^{22} 是 H、 (C_1-C_6) 烷基、芳基 (C_1-C_6) 烷基、 $-C(O)R^{19}$ 或 $-COOR^{19}$;

5 R^{23} 和 R^{24} 独立地是 1-3 个独立地选自 H、 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、 $-COOH$ 、 NO_2 、 $-NR^{19}R^{20}$ 、 $-OH$ 和卤素的基团; 并且

R^{25} 是 H、 $-OH$ 或 (C_1-C_6) 烷氧基。

Ar^2 优选是苯基或 R^{11} -苯基, 特别是 $(4-R^{11})$ -取代的苯基。 R^{11} 的优选定义是低级烷氧基, 特别是甲氧基; 以及卤素, 特别是氟。

10 Ar^1 优选是苯基或者 R^{10} -取代的苯基, 特别是 $(4-R^{10})$ -取代的苯基。 R^{10} 的优选定义是卤素, 特别是氟。

Q 优选是低级烷基或者如上定义的螺环基团, 其中 R^{13} 和 R^{14} 优选各

自是亚乙基并且 R^{12} 是 $\begin{array}{c} | \\ -CH- \\ | \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} | \\ -C(OH)- \\ | \end{array}$ 。

因此, 优选的式 I 化合物是其中 R^1 定义如上并且其中其余变项具有下列定义的化合物:

Ar^1 是苯基或 R^{10} -取代的苯基, 其中 R^{10} 是卤素;

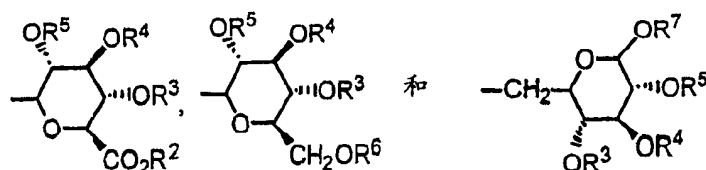
Ar^2 是苯基或 R^{11} -苯基, 其中 R^{11} 是 1-3 个独立地选自 C_1-C_6 烷氧基和卤素的取代基;

Q 是低级烷基(即 C-1-C-2), $Q = C-2$ 是优选的, 或者 Q 与氮

20 杂环丁烷酮的 3 位环碳原子一起形成基团 $\begin{array}{c} R^{12}-(R^{13})_a \\ | \\ (R^{14})_b \end{array}$

其中 R^{13} 和 R^{14} 优选各自是亚乙基且 a 和 b 各自是 1, 并且 R^{12} 是 $\begin{array}{c} | \\ -CH- \\ | \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} | \\ -C(OH)- \\ | \end{array}$;

下式的 R^1 基团



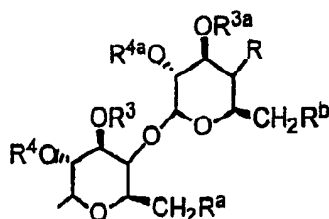
25

的优选的变项如下:

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立地选自H、 (C_1-C_6) 烷基、苄基和乙酰基。

下式的 R^1 基团

5



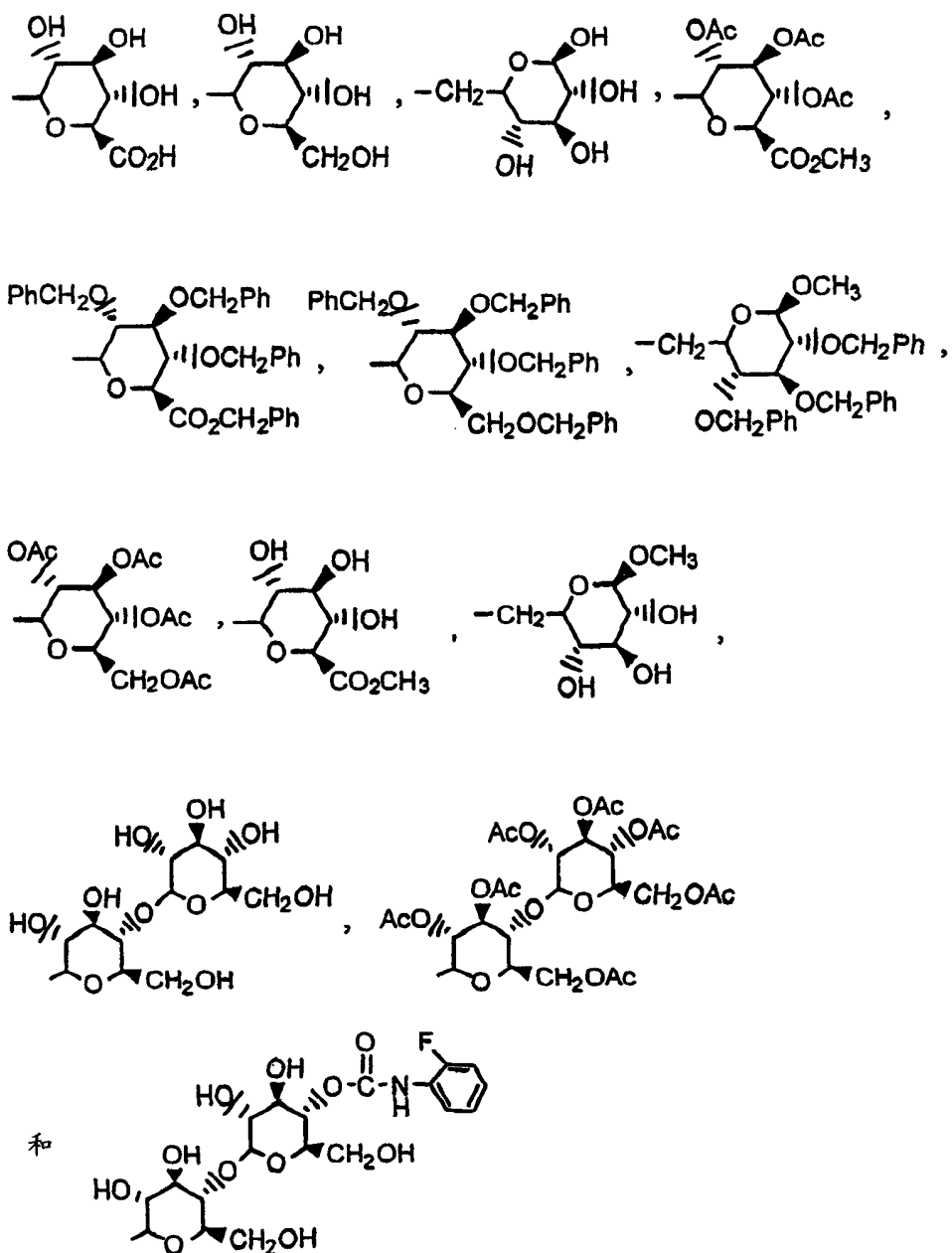
的优选的变项如下:

R^3 、 R^{3a} 、 R^4 和 R^{4a} 选自H、 (C_1-C_6) 烷基、苄基和乙酰基;

R 、 R^a 和 R^b 独立地选自H、OH、卤素、 $-NH_2$ 、叠氮基、 (C_1-C_6) 烷氧基
10 基 (C_1-C_6) 烷氧基和 $-W-R^{30}$, 其中W是 $-O-C(O)-$ 或 $-O-C(O)-NR^{31}-$, R^{31} 是H且 R^{30} 是 (C_1-C_6) 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基- (C_1-C_6) 烷基、T、T- (C_1-C_6) 烷基或者其中T被一个或两个卤素或 (C_1-C_6) 烷基取代的T或T- (C_1-C_6) 烷基。

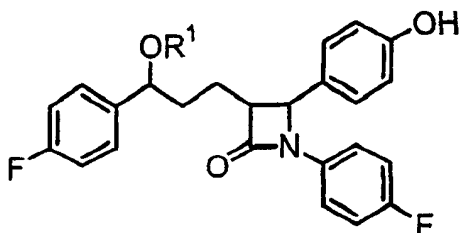
优选的 R^{30} 取代基是2-氟苯基、2,4-二氟苯基、2,6-二氟苯基、
15 2-甲基苯基、2-噻吩基甲基、2-甲氧基羰基乙基、噻唑-2-基甲基、2-咪喃基、2-甲氧基羰基丁基和苯基。 R 、 R^a 和 R^b 的优选组合如下: 1) R 、 R^a 和 R^b 独立地是 $-OH$ 或 $-O-C(O)-NH-R^{30}$, 特别地, 其中 R^a 是 $-OH$, 而 R 和 R^b 是 $-O-C(O)-NH-R^{30}$ 且 R^{30} 选自如上定义的优选取代基; 或者其中 R 和 R^a 是 $-OH$, 而 R^b 是 $-O-C(O)-NH-R^{30}$, 其中 R^{30} 是2-氟苯基、2,4-二氟
20 苯基、2,6-二氟苯基; 2) R^a 是 $-OH$ 、卤素、叠氮基或 (C_1-C_6) -烷氧基 (C_1-C_6) 烷氧基, R^b 是H、卤素、叠氮基或 (C_1-C_6) 烷氧基 (C_1-C_6) -烷氧基且 R 是 $-O-C(O)-NH-R^{30}$, 特别是那些化合物, 其中 R^a 是 $-OH$, R^b 是H且 R^{30} 是2-氟苯基; 3) R 、 R^a 和 R^b 独立地是 $-OH$ 或 $-O-C(O)-R^{30}$ 且 R^{30} 是 (C_1-C_6) 烷基、T或者被一个或两个卤素或 (C_1-C_6) 烷基取代的T, 特别是那些化
25 合物, 其中 R 是 $-OH$ 并且 R^a 和 R^b 是 $-O-C(O)-R^{30}$, 其中 R^{30} 是2-咪喃基; 和4) R 、 R^a 和 R^b 独立地是 $-OH$ 或卤素。优选的三类其它的化合物是那些, 其中 $C^{1'}$ 异头氧(anomeric oxy)是 β , 其中 $C^{2'}$ 异头氧是 β , 并且其中R基团是 α 。

R' 优选选自:



其中 Ac 是乙酰基且 Ph 是苯基。

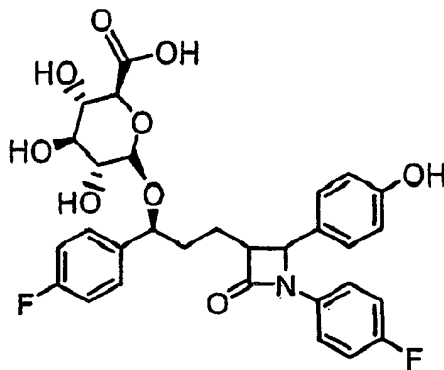
5 因此, 本发明的优选化合物是式 II 表示的化合物:



II

其中 R^1 定义如上。

更优选的化合物是式 III 表示的化合物：



III

- 5 本发明还涉及使用糖取代的 2-氮杂环丁烷酮，特别是式 I 的化合物治疗或预防动脉粥样硬化或降低血浆胆甾醇水平的方法，该方法包括给需此治疗、预防或降低血浆胆甾醇水平的哺乳动物施用有效量的式 I 化合物。

10 另一方面，本发明涉及包含糖取代的 2-氮杂环丁烷酮，特别是式 I 化合物和可药用载体的药物组合物。

本发明还涉及降低肝脏胆甾醇酯水平的方法，降低血浆胆甾醇水平的方法，以及治疗或预防动脉粥样硬化的方法，所述方法包括给需此治疗的哺乳动物施用有效量的本发明的糖取代的 2-氮杂环丁烷酮，特别是式 I 化合物与胆甾醇生物合成抑制剂的联用药物。也就是说，
15 本发明涉及糖取代的 2-氮杂环丁烷酮与胆甾醇生物合成抑制剂联合（以及同样地，胆甾醇生物合成抑制剂与糖取代的 2-氮杂环丁烷酮联合）治疗或预防动脉粥样硬化或者降低血浆胆甾醇水平的应用。

20 另一方面，本发明涉及一种药物组合物，其包含有效量的糖取代的 2-氮杂环丁烷酮和胆甾醇生物合成抑制剂的联用药物以及可药用载体。最后一方面，本发明涉及一种药盒，该药盒在一个容器中包含可药用载体中的有效量的糖取代的 2-氮杂环丁烷酮，以及在一个分开的容器中包含可药用载体中的有效量的胆甾醇生物合成抑制剂。

发明详述

本文中使用的术语“烷基”或“低级烷基”是指包含 1-6 个碳原

子的直链或支链的烷基,类似地,“烷氧基”是指具有1-6个碳原子的烷氧基。

“链烯基”是指链中具有一个或多个共轭或非共轭的双键的直链或支链的碳链。类似地,“炔基”是指链中具有一个或多个三键的直链或支链的碳链。在烷基、链烯基或炔基链连接两个其它的可变基团的情况下,它们是二价的,因而使用术语亚烷基、亚链烯基或亚炔基。

“环烷基”是指3-6个碳原子的饱和碳环,“亚环烷基”是指对应于二价的环的基团,其中与其它基团的连接点包括所有位置的异构体。

10 “卤素”指氟、氯、溴或碘。

“芳基”是指苯基、萘基、茚基、四氢化萘基或二氢化茚基。

“亚苯基”是指二价的苯基,包括邻、间和对位的取代。

“氨基酸”是指天然和非天然的氨基酸,包括,但不限于丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、亮氨酸、丝氨酸和缬氨酸。

15 R^{24} -苄基和 R^{24} -苄氧基是指苯环上被取代的苄基和苄氧基。

据述上面的例如 R^{19} 、 R^{20} 和 R^{25} 独立地选自取代基,即 R^{19} 、 R^{20} 和 R^{25} 不仅是独立地进行选择,而且 R^{19} 、 R^{20} 或 R^{25} 可变基团在分子中可存在一次以上,这些存在基团也是独立地进行选择(例如,如果 R^{10} 是 $-OR^{19}$, 其中 R^{19} 是氢, R^{11} 可以是 $-OR^{19}$, 其中 R^{19} 是低级烷基)。本领域专业技术人员将会认识到,取代基的大小和性质将影响可能存在的取代基的数量。

25 本发明化合物具有至少一个不对称碳原子,因此所有的异构体,包括非对映体和旋光异构体均被认为是本发明的一部分。本发明包括光学纯形式的和混合形式的 α 和 β 立体异构体,包括外消旋混合物。

异构体可采用常规技术,通过使用光学纯的或富含光学活性物质的原料进行反应或者通过分离式I化合物的异构体来制备。

30 具有氨基的本发明化合物可与有机酸或无机酸形成可药用盐。用于成盐的适合的有机酸和无机酸的实例是盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、柠檬酸、草酸、丙二酸、水杨酸、苹果酸、富马酸、琥珀酸、抗坏血酸、马来酸、甲磺酸以及本领域专业技术人员公知的其它有机和无机羧酸。盐的制备可通过使游离碱与足量所需的酸接触以产生盐。可通

过使用适合的稀碱水溶液，如稀碳酸氢钠水溶液处理盐再生游离碱。游离碱在某些物理性质，如在极性溶剂中的溶解性方面与其各自的盐存在着一定差异，但在其它方面，对于本发明的目的而言，盐则等同于其各自的游离碱形式。

- 5 本发明的某些化合物是酸性的(如，具有羧基的那些化合物)。这些化合物与无机碱和有机碱形成可药用盐。这类盐的实例是钠、钾、钙、铝、金和银盐。还包括与可药用胺，如氨、烷基胺、羟基烷基胺、N-甲基葡糖胺等形成的盐。

- 10 用于与本发明化合物联合的胆甾醇生物合成抑制剂包括 HMG CoA 还原酶抑制剂，如洛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、辛伐他汀、阿伐他汀(atorvastatin)、NK-104 (伊伐他汀(itavastatin))和 ZD4522; HMG CoA 合成酶抑制剂，例如 L-659,699 ((E,E-11-[3'R-(羟基-甲基)-4'-氧代-2'R-氧杂环丁烷基]-3,5,7R-三甲基-2,4-十一碳二烯酸); 角鲨烯合成抑制剂，例如 squalenstatin 1; 和角鲨烯环氧酶抑制剂，例如 NB-598 ((E)-N-乙基-N-(6,6-二甲基-2-庚烯-4-炔基)-3-[(3,3'-二噻吩-5-基)甲氧基]苯-甲胺盐酸盐)。优选的 HMG CoA 还原酶抑制剂是洛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、阿伐他汀和辛伐他汀。HMG CoA 还原酶抑制剂中，辛伐他汀是最优选的。

- 20 降低胆甾醇的式 I 化合物的 2-氮杂环丁烷酮部分可通过已知方法制备。

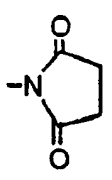
由如上定义的 R^1 取代基限定的糖及其衍生物是本领域已知的或者很容易通过已知方法制备。

- 25 优选地，上述的反应涉及糖衍生物，其中非反应性羟基通过适合的保护基，如针对 R^2 、 R^3 、 R^{3a} 、 R^4 、 R^{4a} 、 R^5 和 R^7 的定义中非氢的那些进行保护，例如低级烷基、乙酰基或苄基，这些保护基可在反应后除去，以获得糖甾合物。当 2-氮杂环丁烷酮的 1 位和 4 位侧链包括在使用条件下具有反应性的取代基时，在与糖或其衍生物反应之前，所述反应性基团通过适合的保护基进行保护，并且随后除去保护基。根据保护基的性质，糖部分上的和氮杂环丁烷酮的 1 位和 4 位侧链的保护基可依次或同时除去。

- 30 在反应期间，不参与上述过程的反应性基团用常规保护基进行保护，反应后，这些保护基可通过标准的步骤除去。下表 1 显示了一些

典型的保护基:

表1

被保护的基团	被保护的基团和保护基
$-\text{COOH}$	$-\text{COO}$ 烷基, $-\text{COO}$ 苄基, $-\text{COO}$ 苯基
$>\text{NH}$	$>\text{NCO}$ 烷基, $>\text{NCO}$ 苄基, $>\text{NCO}$ 苯基, $>\text{NCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $>\text{NC}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, $>\text{N}$ -苄基, $>\text{NSi}(\text{CH}_3)_3$, $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ >\text{NSi}-\text{C}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
$-\text{NH}_2$	
$-\text{OH}$	$-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OSi}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{OSi}-\text{C}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ or $-\text{OCH}_2$ 苄基

与没有被糖取代的 2-氮杂环丁烷酮降胆甾醇剂相比, 本发明化合物表现出数种药理学和物理学性质的优势。化合物以较低的速率被吸收, 产生较低的血浆水平和较高的小肠水平。先前的试验表明, 小肠极有可能是缺乏糖取代基的 2-氮杂环丁烷酮化合物的活性位点。参见 van Heek, M. 等人, “通过 SCH 48461 的活性代谢物的鉴别, 基于体内机制发现的高效胆甾醇吸收抑制剂 (SCH 58235)”, J. Pharmacol Exp. Ther., 283 (1997), pp. 157-163 和 van Heek M. 等人, “新的胆甾醇吸收抑制剂 SCH 58235 与其葡萄糖苷酸的活性和沉积的比较” Br. J. Pharmacol., 129, (2001) pp. 1748-1754。本发明要求保护的化合物 (它们是胆汁分泌的) 提供了化合物向所需位点的有效传递, 同时使系统暴露减至最少, 由此降低了潜在的毒性问题。

除了化合物方面, 本发明还涉及降低血浆胆甾醇水平的方法, 该方法包括给需此治疗的哺乳动物施用降血胆甾醇有效量的本发明式 I 化合物。所述化合物优选以在适于口服的可药用载体中的形式施用。

本发明还涉及药物组合物, 该组合物包含本发明的式 I 化合物和

可药用载体。式 I 化合物可以以任何常规的口服剂型形式给药，如胶囊剂、片剂、粉末、扁囊剂、悬浮液或溶液。制剂和药物组合物可使用常规的可药用赋形剂和添加剂以及常规技术进行制备。这类可药用赋形剂和添加剂包括无毒的相容性填充剂、粘合剂、崩解剂、缓冲剂、防腐

5 防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、矫味剂、增稠剂、着色剂、乳化剂等。

式 I 化合物的有效量为约 0.001 至约 30 mg/kg 体重/天，优选约 0.001 至约 1 mg/kg，单次或分次给药。对于平均体重为 70 kg，该日有效量为约 0.1 至约 100 mg 药物，以单次或分 2-4 次给药。但确切的剂量由主治医师确定并取决于施用的化合物的效价、患者的年龄、

10 适应症、体重和反应。

对于其中取代的氮杂环丁烷酮与胆甾醇生物合成抑制剂联合施用的本发明联用药物，胆甾醇生物合成抑制剂的典型日剂量为 0.1-80 mg/kg 哺乳动物体重/天，以单次或分次给药，通常是每日一次或二次：例如对于 HMG CoA 还原酶抑制剂，每剂给予约 10 至约 40 mg，每天 1

15 -2 次，给予的总日剂量为约 10-80 mg/天，对于其它胆甾醇生物合成抑制剂，每剂给予约 1-1000 mg，每天给药 1-2 次，给予的总日剂量为约 1 mg 至约 2 g/天。但联用的任何组分的确切给药剂量由主治医师确定并且取决于施用化合物的效价、患者的年龄、体重、适应症和反应。

在联用组分单独施用的情况下，每天给予的每种组分的给药次数可以不必相同，如一种组分可能具有较长期的活性，因此需以较低的频率给药。

20

由于本发明涉及通过使用联用的活性成分治疗来降低血浆胆甾醇水平，其中所述活性成分可单独施用，因此本发明还涉及药盒形式的联用的分开的药物组合物。即，药盒被认为是其中两种分开的单位被组合在一起：胆甾醇生物合成抑制剂的药物组合物与糖取代的 2-氮杂环丁烷酮吸收抑制剂的药物组合物。药盒优选包括施用分开的组分的说明。当分开的组分必须以不同剂量形式(如口服和非胃肠)或者以不同的给药间隔施用时，药盒形式是特别有利的。

25

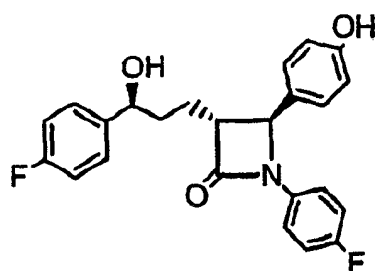
我们发现，本发明化合物降低血浆脂质的水平和肝脏胆甾醇酯的水平。现已发现，在动物模型中，本发明化合物抑制小肠胆甾醇的吸收并显著减少肝脏胆甾醇酯的形成。由于它们能抑制胆甾醇的酯化和/

30

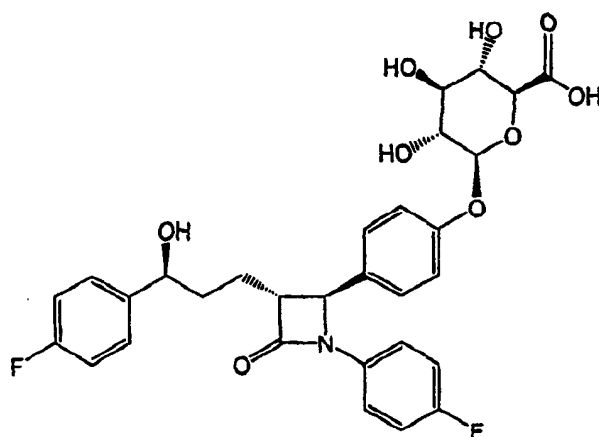
或小肠吸收，因此本发明化合物是降血胆甾醇剂；因此它们可用于治疗和预防哺乳动物，特别是人的动脉粥样硬化。

分别公开于美国专利 5,767,115 和 5,756,470 中的化合物 6A 和下面实施例 1 的化合物显示出作为降血胆甾醇剂的药理活性。

5



6A



实施例 1

上面化合物 6A 和实施例 1 的化合物的体内活性(参见下表 1)可通过下列方法证实。

10 使用高脂血症仓鼠体内测定降血胆甾醇剂

将仓鼠分为六组并给予七天控制胆甾醇的饲料(Purina Chow #5001, 含 0.5%胆甾醇)。监测饲料的消耗,以确定在试验化合物存在下的饮食胆甾醇暴露。在饲喂开始时,对动物每日给予一次试验化合物。如下给药:口饲 0.2 mL 单独的玉米油(对照组)或试验化合物的玉米油溶液(或悬浮液)。对垂死的或机体状况差的所有动物施行安乐死。七天后,通过肌肉注射氯胺酮进行麻醉并斩首处死。将血液收集到含 EDTA 的 Vacutainer™ 管中,用于血浆总胆甾醇和甘油三酯的分析,切除的肝脏用于游离的和酯化的胆甾醇以及甘油三酯组织分析。

数据以与对照水平相比的血浆胆甾醇和肝脏胆甾醇酯的百分减少报告。

数据以相对于对照的百分变化(即, 血浆胆甾醇和肝脏胆甾醇酯的百分减少)报告, 因此负数表示阳性的降胆甾醇作用。分析结果如表 1 所示。

表 1

	血浆胆甾醇的%减少	胆甾醇酯的%减少	剂量 (mg/kg)
实施例 1	- 58	- 95	3
6A	- 59	- 95	1

下面描述的实验 3 证明了在使用 β -葡糖苷酸酶水解后, 式 III 化合物和实施例 1 均得到化合物 6A(均示于上文中)。实验 1 和 2 证实, 在将化合物 6A 与胃肠道微粒体或 UGT2B7 一起培养后, 化合物 6A 可得到实施例 1 和式 III 的化合物。由于化合物 6A 和实施例 1 化合物均显示出药理活性(表 1), 因此预期本发明的式 I、II 和 III 化合物表现出类似的药理学活性。

实验

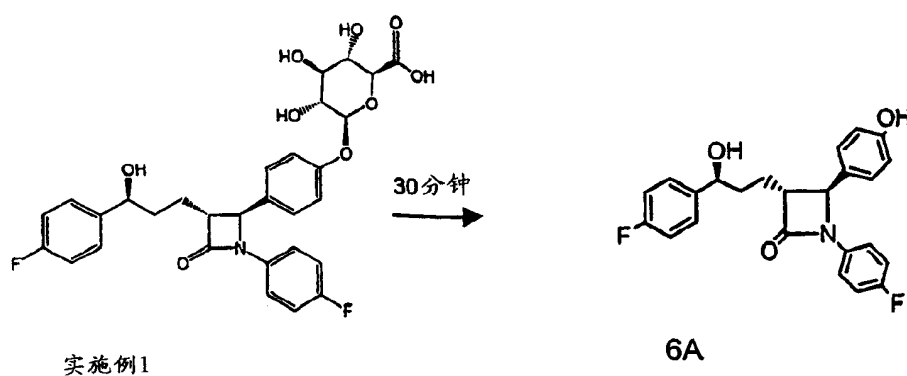
1. 将化合物 6A 与合并的人肝脏微粒体 (n=10) (其中补充有尿苷 5'-二磷酸-葡萄糖醛酸 (UDPGA)) 培养, 得到化合物 6A-葡萄糖苷酸(保留时间 ~7 分钟), 其与实施例 1 (酚类葡萄糖苷酸) 一致。但是, 化合物 6A 与合并的 (n=4) 和两个人的空肠微粒体 (其中补充有 UDPGA) 培养, 得到两种不同的化合物 6A-葡萄糖苷酸 (保留时间为 ~7 和 ~9 分钟), 它们分别与实施例 1 (酚类) 和化合物 III (苄基类) 葡萄糖苷酸一致。LC/MS 分析显示, 两个峰都具有 m/z 584。

2. 在 UDPGA 的存在下, 将化合物 6A 与市售的 9 个重组 cDNA 表达的人 UDP-葡萄糖醛酸基 (Glucuronosyl) 转移酶 (UGT 超微粒体 (supersomes)) 培养(表 2)。超微粒体 UGT1A1 和 UGT1A3 专门地得到实施例 1 化合物。与 UGT2B7 超微粒体的培养主要得到化合物 III, 其中伴随有少量实施例 1 的化合物。

表 2 UGT 同工酶的筛选与用 100 μ M 化合物 6A 形成的
化合物 6A-葡萄糖苷酸

人UGT超微粒体+UDPGA	转化为实施例 1 化合物的%	转化为化合物 III 的%
UGT1A1	79.50	0
UGT1A3	73.40	0
UGT1A4	0	0.78
UGT1A6	0	0
UGT1A7	0	0
UGT1A9	0.30	0.50
UGT1A10	0	0
UGT2B7	0.50	6.16
UGT2B15	6.06	0
昆虫对照	0	0

- 5 3. 由空肠微粒体获得的实施例 1 和化合物 III 的混合物(化合物 6A-苄基类葡萄糖苷酸)的 β -葡萄糖苷酸酶(5、10、20、30 和 180 分钟, 表 3)的水解证明实施例 1 以快于化合物 III 的速率被水解。水解 18 小时后, 两个峰均被水解为单一化合物 6A 的峰。



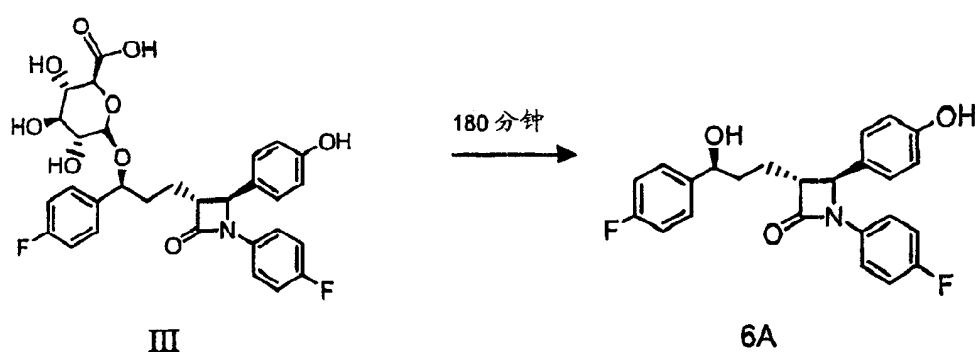


表 3 人空肠微粒体与补充有 UDPGA 的 50 μ M 化合物 6A
培养 2 小时后的 β -葡萄糖苷酸酶的水解

水解时间	实施例 1(酚类 葡萄糖苷酸)的%	化合物 III(苄基类 葡萄糖苷酸)的%	化合物 6A 的%
未水解	31.68	32.14	32.06
5 min	2.23	19.30	68.10
10 min	1.04	18.58	61.88
20 min	0.77	15.12	66.02
30 min	0	11.22	80.14
180 min	0	6.5	84.67
对照 180 min, 无微粒体, 无 UDPGA	—	—	72.92

5 化合物 III 的大规模制备与结构鉴别

化合物 III 的大规模制备与提取

化合物 III 的大规模制备如下进行, 即, 在 pH 7.4 的 60 ml Tris 缓冲液中, 使用 1.23 mg (0.05 mM) 14 C-SCH 58235 和 60 mg cDNA 表达的重组人 UGT2B7 超微粒体并补加 UDPGA (2 mM) 的蛋白质。培养在 37 $^{\circ}$ C 进行 2 小时, 然后进行固相提取 (SPE)。将 SPE 的甲醇洗脱液干燥并如下进一步纯化化合物 III。

用于 LC/NMR 分析的化合物 III 的分离

使用制备性 HPLC 分离化合物 III, 收集馏分。在约 3 mL CH₃OH 中重建由 SPE 甲醇洗脱液得到的干燥的残余物并离心 (16,000 g), 以

除去固体沉淀。蒸发甲醇，将残余物重新溶于约 2 mL CH₃OH:DMSO (20:80, v:v) 中。在保留时间为约 15.0 和 20.6 分钟时，制备性 HPLC 柱(Inertsil C8, 250 x 20 mm)分别提供实施例 1 和化合物 III。将 200 μL 注射(共 10 次)到制备性柱上，收集 0.5 分钟的馏分，分离出 5 化合物 III。每次注射，化合物 III 在第 37(18.5 分钟) - 44(22.0 分钟)份馏分中被洗脱。通过 LC-MS/MS 分析观测的保留时间内的这些馏分中的化合物 III。合并馏分(18.5 - 22 分钟)并将其干燥。

通过 LC/NMR 的化合物 III 的结构测定

用 20 mM 乙酸铵-d₃ (pH 7.0) 和乙腈的流动相进行 LC-NMR。用 30% 10 乙腈对 HPLC 梯度洗脱 10 分钟，然后乙腈浓度升至 40%洗脱 20 分钟。在大约 10 分钟时洗脱下代谢物。在该代谢物峰顶点上以间歇流动方式进行 LC-NMR。在 20℃下，在 Varian 600 MHz NMR 分光仪上记录 1D 质子和 2D 质子-质子相关光谱。获得合成标准化合物 6A 和实施例 1(化合物 6A-酚类葡萄糖苷酸)的相应 NMR 数据。根据样品的 NMR 数据以及 15 它们与标准品的比较，确定该代谢物的质子分配(MW 585)。该代谢物的结构被鉴定为化合物 6A-苄基类-葡萄糖苷酸(化合物 III)。