

[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 200910159420.3

[51] Int. Cl.

A61K 31/137 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 16 日

[11] 公开号 CN 101601665A

[22] 申请日 2002.12.20

[21] 申请号 200910159420.3

分案原申请号 02825324.8

[30] 优先权

[32] 2001.12.21 [33] GB [31] 0130763.6

[71] 申请人 诺金欧洲公司

地址 荷兰阿姆斯特丹

[72] 发明人 诺曼·巴雷斯

杰弗里·马丁·汤普森

[74] 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

代理人 傅强国

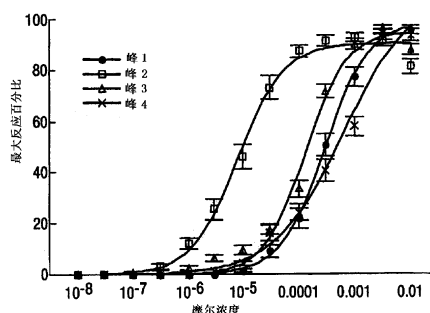
权利要求书 1 页 说明书 33 页 附图 14 页

[54] 发明名称

1R,2S - 甲氧胺在制备治疗大便失禁和其他相关疾病的药物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及 1R, 2S - 甲氧胺在制备治疗大便失禁和其他相关疾病的药物中的应用。1R, 2S - 甲氧胺局部低剂量使用可有效治疗大便失禁, 且没有局部或全身副作用, 例如, 不影响血压。1R, 2S - 甲氧胺可用于治疗其它胃肠道紊乱和疾病, 可用作提高血压的制剂, 用作鼻减充血剂和眼科, 低剂量使用时没有副作用。



1. 1R,2S 甲氧胺或其生理性可耐受的盐在制备治疗大便失禁的药物中的用途, 其中, 1R,2S 甲氧胺的剂量减小至具有同等效力的甲氧胺消旋体的剂量的一半或更少。
2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中 1R,2S 甲氧胺的剂量减小至具有同等效力的甲氧胺消旋体的剂量的四分之一。
3. 如权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述药物用来提高肛门括约肌收缩力。
4. 如权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述药物用来提高肛门内括约肌静态压。
5. 如权利要求 3-4 中任一项所述的用途, 其中, 不伴有血压上升。
6. 如权利要求 1-4 中任一项所述的用途, 其中, 所述药物的剂型适合局部给药。
7. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述药物的剂型适合肛门区域局部给药。
8. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述药物的剂型适合对肛膜、肛门腔、肛门内括约肌、肛门周围区域和臀部的一部分或者全部进行局部给药。
9. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述药物的剂型是霜剂或软膏剂。
10. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述药物的剂型是凝胶、糊剂、泡沫剂或粘贴剂。
11. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述药物置于管子里。
12. 如权利要求 1-4 中任一项所述的用途, 其中, 所述药物是单位剂量的形式。
13. 如权利要求 5 所述的用途, 其中, 所述药物是单位剂量的形式。
14. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述药物是单位剂量的形式。
15. 如权利要求 7-11 中任一项所述的用途, 其中, 所述药物是单位剂量的形式。
16. 如权利要求 12 所述的用途, 其中, 所述单位剂量的形式是气泡包或小袋, 每个气泡包或小袋含有单位剂量的凝胶、霜剂或软膏。
17. 如权利要求 12 所述的用途, 其中, 所述单位剂量的形式以剂量计量器提供。
18. 如权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述药物含有小于等于 4 重量%的 1R,2S 甲氧胺。
19. 如权利要求 18 所述的用途, 其中, 所述药物含有 0.3 重量%-3 重量%的 1R,2S 甲氧胺。
20. 如权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述药物含有小于等于 1 重量%的 1R,2S 甲氧胺。
21. 如权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述药物含有 0.3 重量%或更少的 1R,2S 甲氧胺。
22. 如权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述药物是以 0.5mg 至 40mg 范围内的 1R,2S 甲氧胺的剂量给药。
23. 如权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述药物是以 0.5ml 至 3ml 的量局部给药。
24. 如权利要求 23 所述的用途, 其中, 所述药物是以 1ml 的量局部给药。

1R,2S-甲氧胺在制备治疗大便失禁和其他相关疾病的药物中的应用

本申请是基于以下中国专利申请的分案申请：

原案申请日：2002 年 12 月 20 日

原案申请号：02825324.8 (PCT/GB02/05864)

原案申请名称：用 1R, 2S-甲氧胺治疗大便失禁和其他相关疾病

技术领域

本发明涉及大便失禁和其他相关疾病的治疗。

背景技术

成人中大便失禁约为 2%¹，老年人中更加多见，而且许多人似乎并未为他们的症状寻求帮助。造成大便失禁最常见的原因是在分娩时损伤了肛门括约肌复合体，这种损伤可由阴部神经病变或分娩的直接损伤造成²。大便失禁还可在无结构损伤的情况下发生；在这种情况下，肛门内括约肌(IAS)的单一退行性变是最常见的原因³。

对轻度大便失禁的保守治疗包括衬垫⁴、肛门塞⁵、抗腹泻治疗⁶和改变饮食。然而有些病人用上述方法不能得到控制。尽管肛门内括约肌修复术的结果令人失望⁸，但肛门外括约肌的损伤可经重叠手术修复⁷。对于更深度的损伤需进行更大的手术，包括人造肠括约肌⁹，骶部神经刺激¹⁰和细微成形术(graciloplasty)¹¹。这些是主要的治疗方法，但对许多病人而言要么不适合，要么难以忍受。

采用局部给药治疗大便失禁是解决这一老问题的一种不同方法。W098/27971 提出了多种药剂在治疗大便失禁中的应用。这些药剂包括 α -肾上腺素能受体激动剂、一氧化氮合成酶抑制剂、前列腺素 F_{2a}、多巴胺、吗啡、 β -受体阻断剂和 5 羟色胺。然而，仅有去氧肾上腺素和一氧化氮合成酶抑制剂 N ω -氮-L-精氨酸有实验数据。

迄今为止，所有大便失禁局部治疗的临床研究均集中在去氧肾上腺素，一种 α -1 肾上腺素能受体激动剂（这种药物以前称为 α -1 肾上腺素能激动剂）。据认为正常人局部使用去氧肾上腺素后，会产生剂量依赖的肛门腔静态压力升高。当含量有 10%重量去氧肾上腺素的凝胶应用于正常人肛门时，肛门腔静态压力增加 33%，平均持续时间为 7 小时¹²，参见 W098/27971。肛门括约肌超声图象正常的病人反复局部应用去氧肾上腺素凝胶时，却导

致了肛门腔静态压降低和大便失禁症状。然而,在该试验组中,含有 10%到 20%重量去氧肾上腺素的凝胶并未产生肛门静态压力的显著升高,虽然采用含量 30%到 40%凝胶的受试者中产生的升高达到统计学意义¹³。该数据提示,大便失禁病人的肛门内括约肌对肾上腺素能受体激动剂的敏感性较正常人为低。这一结果还得到体外研究数据的支持¹⁴。

该事实还可以解释,为何当去氧肾上腺素扩大用于包括 36 位大便失禁和肛门括约肌超声图象正常病人的随机对照试验,采用盐酸去氧肾上腺素含量为 10%的凝胶时,大便失禁评分、肛门腔静态压力或肛门皮肤血流均未见显著全面改善的原因¹⁵。相反,在一项小型的随机对照试验中,回肠肛门窝建立后发生粪漏的病人中,发现 10%的去氧肾上腺素凝胶与安慰剂相比较,产生了非常显著而持久的改善¹⁶。

这些结果表明,要有效地治疗大便失禁,用于局部治疗的去氧肾上腺素制剂必需含有高浓度的去氧肾上腺素,其重量应达到 30%到 40%。此浓度时,报道有肛周烧灼感¹⁵。单就这一原因,该类制剂不适合用于治疗。

去氧肾上腺素作用于血管平滑肌的 α -肾上腺素能受体,具有升高血压的作用,已知还有抗低血压或加压作用,并已用于低血压时的系统治疗。局部应用去氧肾上腺素治疗大便失禁的另一个担心是需要高剂量才有效,即局部用药制剂中含有的去氧肾上腺素重量为 30%到 40%,局部给予 α -肾上腺素能受体激动剂可能会作用于全身血管,影响血压和/或心率。

去氧肾上腺素眼科局部应用时所见的心血管副作用事实¹⁷,支持了对于局部应用高剂量 α -肾上腺素能受体激动剂治疗大便失禁的担心,另外还观察到局部刺激作用¹⁸。这类担心还包括作用于血管 α -肾上腺素能受体的其他 α -肾上腺素能受体激动剂,它们具有与去氧肾上腺素相似的血管收缩和升高血压特性,即作为升压剂和血管收缩剂。甲氧胺(2-氨基-1-(2,5-二甲氧苯基)-1-丙醇)即是该类 α -肾上腺素能受体激动剂的一个实例。

甲氧胺有两个手性中心,因此有四种立体异构体。目前甲氧胺以异构体混合物形式,在临床上用作升压剂和血管收缩剂。

Fujita 和 Hiyama¹⁹描述了一种据说在酸性介质中的氢化硅烷(帮助下)使 α -取代链烷酮赤向还原方法。所产生的一种化合物称为(1R,2S)-2-氨基-1-(2,5-二甲氧基苯基)-1-丙醇,Fujita 和 Hiyama 又称之为 L-红-甲氧胺。然而,Fujita 和 Hiyama 并未明确地鉴定到推测的 1R,2S-甲氧胺异构体(或它们所生产的其他异构体),即通过单晶 X 线衍射计量法进行检测,但他们没有进行过推测的 1R,2S-甲氧胺异构体(或他们所产生的其他异构体)的生物活性研究。再者,虽然所描述的合成方法适合于生产大约 1 克的小剂量产品,但我们发现当生

产规模扩大到1克以上例如生产大约30克到50克异构体时,这种方法不能选择性地生产出所述的1R,2S-异构体。

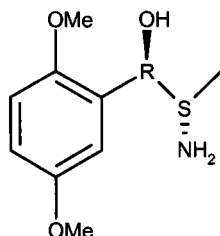
Fujita 和 Hiyama 的方法包括将 α -氨基酮还原为醇。作者指出在以往描述的还原 α -氨基酮的方法中常会发现烃的过度还原。作者声称,采用他们的方法,用常规分析方法未测到烃的形成。此外,还注意到高红式选择性还原。据说发现选择性>99%。

虽然我们在大约1克的小规模生产所述甲氧胺 1R,2S-异构体(L-红-甲氧胺)时,我们得到了相似的结果,但当批量生产规模放大到30克到50克时,我们发现,与 Fujita 和 Hiyama 的发现正相反,发生了过度还原,产品中有60%以上到70%为烃,而不是所需要的醇。此外,此过程不是红向选择。形成了大量苏型异构体。

当涉及到他们的生产方法和所产生的异构体时,Fujita 和 Hiyama 采用了“R, S”命名和“红/苏”命名两种方法。鉴于 Cahn-Ingold-Prelog“R, S”命名法被广泛接受来明确定义异构体,因此本文用“R, S”术语而不是“红/苏”术语来定义甲氧胺异构体。

发明内容

我们已经合成了 1R,2S-甲氧胺,又称 L-红-甲氧胺,并通过核磁共振(NMR)、分光镜和单晶 X 线衍射仪证实,该异构体具有下列结构:



本发明提供用作药物的 1R,2S-甲氧胺。

本发明提供用作 α -肾上腺素能受体激动剂的 1R,2S-甲氧胺。

本发明提供 1R,2S-甲氧胺,用于提高胃肠道平滑肌伸缩力,和用于治疗因胃肠道平滑肌失去伸缩力而导致的紊乱或疾病。

本发明还提供 1R,2S-甲氧胺用于提高胃肠道括约肌的张力,和用于治疗因胃肠道括约肌失去伸缩而导致的紊乱和疾病。例如,本发明提供 1R,2S 甲氧胺用于提高幽门括约肌伸缩力治疗胃源性腹泻,和用于提高胃食管括约肌伸缩治疗食管反流和 Barrett's 病。

本发明提供 1R,2S-甲氧胺用于提高肛门括约肌张力和用于治疗大便失禁。

本发明还提供 1R,2S-甲氧胺用于预防或治疗心功能紊乱和疾病,例如,心律紊乱或疾病。

本发明还提供 1R,2S-甲氧胺用作血管收缩剂。本发明还提供 1R,2S-甲氧胺用作鼻减充血剂和用作眼科血管收缩剂, 以及用作扩大眼睛瞳孔的扩瞳剂。

本发明还提供 1R,2S-甲氧胺用作升血压(加压)剂, 例如, 用于预防或治疗低血压, 例如, 在麻醉期间和/或之后维持血压。

本发明还提供 1R,2S-甲氧胺在制造上述任一种用途的药物中的用途。

本发明还提供治疗需要用 α -肾上腺素能受体激动剂治疗的哺乳动物的方法, 包括给予哺乳动物治疗有效剂量的 1R,2S-甲氧胺。

本发明提供了一种提高哺乳动物胃肠道平滑肌张力的方法, 包括给予哺乳动物治疗有效剂量的 1R,2S-甲氧胺。

本发明提供一种治疗因胃肠道平滑肌失去张力而导致的紊乱和疾病的方法, 包括给予需要所述治疗的哺乳动物治疗有效剂量的 1R,2S-甲氧胺。

本发明提供一种提高哺乳动物胃肠道括约肌, 例如幽门括约肌和肛门括约肌伸缩的方法, 包括给予哺乳动物治疗有效剂量的 1R,2S-甲氧胺。

本发明提供一种治疗因胃肠道括约肌失去伸缩力而导致的紊乱和疾病的方法, 包括给予需要所述治疗的哺乳动物治疗有效剂量的 1R,2S-甲氧胺。该类疾病包括胃源性腹泻和大便失禁。

本发明还提供一种预防或治疗哺乳动物心功能紊乱或疾病的方法, 包括给予需要所述预防或治疗的哺乳动物治疗有效剂量的 1R,2S-甲氧胺。该类紊乱或疾病包括心律紊乱或疾病。

本发明还提供一种治疗需要用血管收缩剂治疗的哺乳动物的方法, 包括给予需要这种治疗的哺乳动物治疗有效剂量的 1R,2S-甲氧胺。需要治疗的可以是鼻充血、眼发红, 或可以是眼睛的扩瞳。

本发明还提供一种治疗或预防低血压的方法, 例如, 在麻醉期间维持血压, 包括给予需要这种治疗的哺乳动物治疗有效剂量的 1R,2S-甲氧胺。

1R,2S-甲氧胺可以其游离碱或盐的形式存在。在用于治疗时, 盐应为生理学上可耐受的盐。

本发明还提供了一种药物组合物, 其含有 1R,2S-甲氧胺或其生理学上可以耐受的盐与药学上适合的运载体的混合物或结合物。

本发明还提供一种适合生产 1R,2S-甲氧胺的制造方法, 此方法包括向含有二甲基苯基硅烷和(S)-氨基-1-(2,5-二甲氧-苯基)-1-丙酮的溶液中逐滴加入三氟醋酸, 其中, 氨基基团用

例如, 烷氧基-或芳氧基羧基基团, (例如, 甲氧羧基基团) 保护, 并从所得到的氨基受保护的(1R,2S)-2-氨基-1-(2,5-二甲氧基-苯基)-1-丙醇上除去该保护基团。硅烷和丙酮溶液的溶剂具体是氯化烃, 例如, 二氯甲烷。用二甲基苯基硅烷还原丙酮应在冷却下进行。该反应通常在用冰冷却下进行, 例如, 区域温度为 0°C。该制造方法可使 1R,2S-盐酸甲氧胺的生产超过 1 克规模, 例如, 达到 30 克到 50 克或更大的规模。

可将所得到的 1R,2S-甲氧胺转变为其盐, 例如, 加酸产生的盐, 例如, 所述盐是通过与酸反应而产生的。

本发明还提供了一种从甲氧胺异构体混合物中分离 1R,2S-甲氧胺异构体的方法, 该方法包括用高压液相层析处理异构体混合物, 所用层析介质含有 β -环糊精 R, S-羟丙基醚, 结合于二氧化硅胶, 最好随后用反相层析法分离, 所用层析介质含有在乙烯醇共聚体的羟基引入十八烷基而衍生得到的乙烯醇共聚体基层。

附图说明

图 1 显示的是一个超级融合器官槽, 槽中为采用甲氧胺消旋物和四种异构体检测猪肛门内括约肌的肌肉条。

图 2 至图 5 显示体外测定的肛门内括约肌的剂量/反应曲线。在图 2 和图 4 中, 用去氧肾上腺素作为对照品。在实施例 3 所列的条件下用液相层析法分离四种甲氧胺异构体。层析法分离的异构体以峰 1 到峰 4 命名。

图 2 显示采用甲氧胺消旋物(黑色圆圈)和去氧肾上腺素(空心方块)的剂量反应曲线。

图 3 显示在实施例 3 所列条件下用液相层析法所得到的四种甲氧胺异构体的剂量反应曲线, 峰 1(黑色圆圈), 峰 2(空心方块), 峰 3(空心三角形)和峰 4($\times$),

图 4 显示采用甲氧胺消旋物(黑色圆圈), 峰 2(空心三角形)和去氧肾上腺素(空心圆圈)的剂量反应曲线。

图 5 显示采用实施例 4 合成的 1R,2S-甲氧胺, 表示为峰 2(合成的)(空心方块), 和实施例 3 层析法分离得到的 1R,2S-甲氧胺, 表示为峰 2(分离的)(黑色圆圈)的剂量反应曲线。

图 6 至图 11 显示氧明消旋物和在实施例 3 所列条件下用液相层析法得到的四种异构体的色谱图。

图 6 是消旋物的色谱图, 显示四个峰(WWD1 A, 波长=225nm(样品\01-16-8.D))。

图 7 是甲氧胺消旋物的色谱图, 剖视图显示了收集的分离峰 1 到峰 4。

图 8 是显示峰 3 纯度的色谱图(WWD1 A, 波长=225nm(样品\0116P3-5.D))。

图 9 是显示峰 4 纯度的色谱图(WWD1 A, 波长=225nm(样品\0116P4-1.D)。

图 10 是显示峰 1 纯度的色谱图(WWD1 A, 波长=225nm(样品\0116P1-4.D)。

图 11 是显示峰 2 纯度的色谱图(WWD1 A, 波长=225nm(样品\0116P2-4.D)。

图 12 显示峰 1 的 nmr 范围, 图 13 是峰 3 的 nmr 范围, 图 14 是峰 2 的 nmr 范围, 而图 15 为峰 4 的 nmr 范围。

图 16 显示 1R,2S 甲氧胺的立体化学结构(峰 2)。

图 17 显示 0.5 毫升剂量的安慰剂和 0.3%, 1%, 3% w/w 1R,2S-甲氧胺凝胶对猪外周动脉收缩压的影响。

图 18 显示 0.5 毫升剂量的安慰剂和 0.3%, 1%和 3% w/w1R,2S-甲氧胺凝胶对猪外的周动脉舒张压的影响。

图 19 显示 0.5 毫升剂量的安慰剂和 0.3%, 1%和 3% w/w1R,2S-甲氧胺凝胶对猪外周动脉平均血压的影响。

图 20 显示 0.5 毫升剂量的安慰剂和 0.3%, 1%, 3% w/w1R,2S-甲氧胺凝胶对猪肛门平均静压的影响。

图 21 显示 0.5 毫升剂量的安慰剂和 0.3%, 1%, 3% w/w1R,2S-甲氧胺凝胶对猪的心率的影响。

在图 17 到图 21 的每张图中, 黑色圆圈为平均值, 空心圆圈为猪 1 的检测值, 空心三角为猪 3 的检测值, 而空心方块为猪 4 的检测值。

具体实施方式

本发明涉及 1R,2S-甲氧胺和及其治疗用途, 例如, 用作 α -肾上腺素能受体激动剂。

我们发现, 1R,2S-甲氧胺低剂量体外和体内局部使用时能有效诱导肛门内括约肌收缩, 而且其体内作用不伴有血压的升高。

我们发现, 1R,2S-甲氧胺在体外诱导肛门内括约肌收缩时比去氧肾上腺素至少强四倍以上。我们还发现, 猪体外试验中, 0.5 毫升含 1%重量的 1R,2S-甲氧胺凝胶, 甚至剂量小到 0.5 毫升含 0.3%重量的 1R,2S-甲氧胺凝胶, 也就是剂量分别为 5 毫克和 1.5 毫克的 1R,2S-甲氧胺局部使用时, 提高了肛门内括约肌压, 而对血压无影响。

这些发现具有极重要的意义, 因为当仅限于局部给予所需去氧肾上腺素浓度和剂量的几分之一时, 局部给予 1R,2S-甲氧胺引起的肛门肌肉张力和肛门腔压的提高, 在提高的数量上与局部使用去氧肾上腺素相似, 而不引起血压升高。

以往已报道过，甲氧胺以异构体混合物形式，作为一种 α -肾上腺素能受体激动剂作用于血管肌肉系统的 α -肾上腺素能受体。不受下列因素的限制，我们认为所观察到的 1R,2S-甲氧胺体外对肛门肌肉伸缩力的作用和体内对肛门括约肌伸缩力的作用，是 1R,2S-甲氧胺通过括约肌本身的 α -肾上腺素能受体直接作用于肛门括约肌的结果，而非通过对肌肉供血血管肌肉系统的间接作用。

α -肾上腺素能受体存在于整个胃肠道自身的平滑肌系统和各种括约肌中，包括肛门内括约肌、胃食管括约肌、幽门括约肌、Oddi 括约肌和回肠结肠括约肌。胃肠道(GI)平滑肌伸缩力或任何胃肠道括约肌伸缩力的减退，可能导致胃肠道正常功能的紊乱，或导致临床疾病。例如，肛门括约肌伸缩力减退可导致大便失禁；幽门括约肌伸缩力减退可能是胃源性腹泻的原因。

1R,2S-甲氧胺可用于提高胃肠道平滑肌伸缩力，治疗因胃肠道平滑肌失去张伸缩力所致的紊乱或疾病。1R,2S-甲氧胺还可用于提高胃肠道括约肌伸缩力，治疗因胃肠道括约肌失去伸缩力所致的紊乱或疾病。

例如，1R,2S-甲氧胺可用于提高肛门括约肌伸缩力，治疗大便失禁。局部给予 1R,2S-甲氧胺能够有效治疗大便失禁而无显著的全身副作用，特别是没有心血管的副作用，例如血压，且无局部刺激。1R,2S-甲氧胺可用于提高幽门括约肌张力，治疗胃源性腹泻。

α -肾上腺素能受体也存在于心肌中。心功能紊乱，例如心律紊乱，可用 1R,2S-甲氧胺预防和治疗，一般采用全身给药。

目前，甲氧胺以异构体混合物形式被用作升压剂，也称为升压剂或抗低血压剂和作为血管收缩剂。据认为升压剂和血管收缩剂的作用，是通过甲氧胺作用于血管肌肉系统的 α -肾上腺素能受体而实现的。1R,2S-甲氧胺可用于治疗任何需要用 α -肾上腺素能激动剂的适应症，特别是作为 α -肾上腺素能受体激动剂作用于血管肌肉系统的 α -肾上腺素能受体，例如何需用或已用异构体混合物形式的甲氧胺，或去氧肾上腺素治疗的适应症。1R,2S-甲氧胺具体可作为升压剂和血管收缩剂使用。

本发明所治疗的对象为哺乳动物。哺乳动物一般指人，但也可以是商用饲养动物或陪伴动物。

用于治疗时，1R,2S-甲氧胺可如此使用，即以游离碱形式，或以其生理上可耐受的盐的形式使用。除非另有说明，以下所用的术语“1R,2S-甲氧胺”包括其游离碱和生理上可耐受的盐。当给予一定数量或百分比的 1R,2S-甲氧胺或其盐时，盐的数量或浓度宜根据 1R,2S-甲氧胺的游离碱计算。

1R,2S-甲氧胺的盐是,例如,加酸的盐,包括酸加成盐。盐的例子为:盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、醋酸、三氟醋酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、富马酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸、抗坏血酸、草酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、对甲苯磺酸、苯磺酸、羟乙磺酸或樟脑酸的盐。

1R,2S-甲氧胺一般可以本发明的药物组合物形式全身给药或非全身给药。1R,2S-甲氧胺的给药途径、合适的药物组合物及适宜的剂量取决于其用途。

本发明还提供了一种适合于以药用规模生产 1R,2S-甲氧胺的方法,例如,约 1 克以上的量,例如,约 30 克到 50 克或更多的量。上面已对该方法进行了描述,下面将作更为详细的描述。Fujita 等先前提出方法的仅适合于小规模生产,量大约为 1 克。这种规模即使对生产临床试验用药而言也太小了。因此,本文不可能描述在本发明开发的生产工艺之前该制剂的用途。

本发明提供了一种含有 1R,2S-甲氧胺或其生理上可耐受的盐作为活性成分,与药学上适合的载体的混合物或结合物的药物组合物。

本发明的药物组合物可以适当的形式实现其全身或局部的作用。本文所用术语“全身性”表示关系或影响到“整个”机体。术语“局部”用于表示“局限于或关系到一个点或一部分,而不是全部”。术语“体表局部”意味着“关系到特定的表面部分”。适合于特殊体表区域,(例如皮肤),局部给药的药物组合物,通常提供的作用是局部性的而非全身性的。然而,可设计一些体表局部给药配方主要用于全身给予活性成分。除非另有说明,术语“体表局部”,例如,作为体表局部给药或体表局部药物组合物,本文用于指“关系到某特定表面区域和具有局部作用”。

本发明的药物组合物包括适合于注射或输注给予 1R,2S-甲氧胺的组合物;适合于皮下给药;经皮给药;口服,包括舌下给药;直肠给药;和体表局部给药,例如皮肤给药、眼表面给药或鼻粘膜给药。

已经知道适合口服和舌下给药的药物组合物。片剂和胶囊广泛用于口服,而其他制剂,例如,药丸、颗粒剂、糖衣丸和糯米纸囊剂较少使用。也可采用缓释或靶向释放制剂,例如,向事先确定的胃肠道某一部分靶向释放的制剂,例如。延时释放或 pH 依赖剂型,例如,向胃、十二指肠或胃肠道下部(例如结肠),靶向释放的制剂。例如,可使用设计成在结肠的 pH 环境下释放活性成分的制剂,因为靶向结肠的制剂包括易受结肠细菌降解的包衣。可使制剂靶向胃肠道的其他部分,例如胃或十二指肠。液体制剂,例如糖浆或浓缩液,例如浓缩凝胶或浆液,可用于口服。

适合于直肠给药的药物组合物包括栓剂、明胶直肠胶囊和灌肠溶液。

适合于鼻粘膜给药的药物组合物是，例如滴鼻剂、喷雾剂和气雾剂。用于眼表面给药的组合物是，例如滴眼剂、眼霜和眼膏。

本发明的药物组合物可以是，例如适合于皮肤局部给药的形式，例如凝胶、霜剂、软膏、糊剂、泡沫剂或粘贴剂。

药物组合物可用于皮下给药。一些组合物，例如皮下储存制剂和粘贴剂可提供缓释或持续释放。

以上所述的药物组合物还可包含除 1R,2S-甲氧胺以外的一种或多种活性成分。例如，用于治疗大便失禁的肛门区局部给药的组合物可含有通常用于肛门区局部给药组合物中的活性成分，例如，类固醇，其作用是减轻刺激，和/或局部麻醉剂。用于肛门区皮肤局部给药的药物组合物还可包含一种或多种选自皮肤渗透增强剂、皮肤水合剂和皮肤柔软剂的成分。皮肤局部给药的组合物可放在，例如管子里，带泵的容器中，或气雾剂容器中。

本发明的用于皮肤局部给药的药物制剂，例如，凝胶、霜剂或软膏，尤其是用于治疗大便失禁的组合物，一般包含不到 10%重量的 1R,2S-甲氧胺，例如通常不到 10%，包含 8%，包含 5%，包含 4%，3%，或 1%的 1R,2S-甲氧胺。也可采用 1R,2S-甲氧胺含量小于 1%的制剂，例如 0.8%或更低，0.5%或更低，0.3%或更低，例如 0.1%含量的 1R,2S-甲氧胺。组合物可含有，例如，0.1%到 5%重量，0.3 到 3%重量的 1R,2S-甲氧胺。该制剂可每天一次或多次给药，例如，每天两或三次，甚至更多次，例如，每天四或五次。体表局部制剂的单位剂量，通常约为 1 毫升凝胶、软膏或霜剂，例如，其含有上述量的 1R,2S-甲氧胺。每次应用时给予的 1R,2S-甲氧胺剂量，可通过所给予的组合物体积和该组合物中 1R,2S-甲氧胺的浓度计算。例如，1 毫升 1%含量的 1R,2S-甲氧胺凝胶可提供 10 毫克剂量的 1R,2S-甲氧胺。

本发明的药物组合物可以为单位剂型。上面描述了全身给药的单位剂型的例子。口服或直肠给药的单位剂型包括，例如片剂、胶囊和栓剂，注射或输注给药的单位剂型包括，例如小瓶和安瓿。皮肤局部给药的单位剂型为气泡包或或小袋，每个气泡和小袋含有上述一个单位剂量的，凝胶、霜剂或软膏。可提供一种剂量计量器，例如泵装置，给予预先定好量的局部给药组合物，例如霜剂、软膏或凝胶。用作眼睛扩瞳的扩瞳剂时，提供一滴单位计量。可提供持续释放的制剂为储存制剂或粘贴剂。

已经知道上述多种类型的药物组合物和适合于上述给药途径的其他组合物，这些组合物的配方及其制备方法。文献包括手册，例如，EW Martin 的 Remington's 药物科学。综述

和文献描述了标准和更复杂的配方及设备，例如，各种类型的粘贴剂。

如以上所指出，1R,2S-甲氧胺的给药途径，适当的药物组合物，和适宜的剂量取决于其用途。在临床治疗中，一般宜采用可达到所需效果的最低剂量。1R,2S-甲氧胺比甲氧胺消旋物至少强四倍，就是说具有四种异构体等摩尔混合物的效力。因此，当用于治疗甲氧胺消旋物以往治疗的适应症时，一般应减少1R,2S-甲氧胺的剂量，例如，至多应为原剂量的一半，例如，为原剂量的四分之一。甚至可用更低的剂量。

当用作增压剂，治疗低血压时，1R,2S-甲氧胺一般为全身给药。例如，当用于麻醉期间维持血压时，1R,2S-甲氧胺是注射或输注给药，一般是静脉注射或输注。

商业上适合于用作增压剂以维持麻醉期间的血压，以异构体混合物形式的推荐剂量为含有20毫克/毫升甲氧胺溶液，静脉给药时，为0.15到0.25毫升，肌肉给药时为1毫升，即静脉给药的推荐剂量为3到5毫克，而肌肉给药的推荐剂量为20毫克。作为增压剂维持麻醉期间血压的1R,2S-甲氧胺的剂量可以是比剂量的一半或更低，例如，四分之一剂量或更低，例如，静脉给药时为1毫克或更低，肌肉给药时为5毫克或更低。

作为鼻减充血剂使用时，1R,2S-甲氧胺一般是鼻粘膜局部给药，例如，以滴鼻剂、喷雾剂或气雾剂形式给药。

1R,2S-甲氧胺可以作为眼科血管收缩剂使用，例如，用于治疗眼发红，例如，由过敏反应、干燥、灰尘或烟雾环境，不能正常眨眼，或疲劳引起的眼发红。1R,2S-甲氧胺还可用作扩瞳剂，用来扩大眼睛瞳孔。作为眼科用药，1R,2S-甲氧胺可眼表面局部给药，例如，以滴眼剂、眼霜或眼膏形式给药。

对于大便失禁治疗，1R,2S-甲氧胺可局部给药，例如，在肛门和臀部区域。适合于这类局部给药的药物组合物包括凝胶、霜剂、软膏、糊剂和泡沫剂；液体组合物，特别是浓缩液；皮下储存制剂；和透皮贴剂。

本发明的1R,2S-甲氧胺的体表局部给药，即具有局部作用的体表局部给药，具有降低甲氧胺全身作用例如对血压的影响的优点。

1R,2S-甲氧胺肛门区局部给药可能是有利的，就是说，对所有或部分肛门、肛门腔和肛门周围区域（称为肛周区）给药；例如，对一部分或所有肛膜、肛门腔、肛门内括约肌和臀部给药。例如，可以用涂药器或手指将霜剂、软膏、凝胶或泡沫剂涂抹在肛门腔或肛门周围皮肤上。

另一种给药方法为直接将1R,2S-甲氧胺注射到肛门括约肌中或肛门区域的其他组织中。在臀部具体在肛门区附近施加全身给药的透皮贴剂的，除了全身作用外，还有局部作

用。

当局部制剂为管装软膏、霜剂、凝胶或糊剂时，用药说明书可推荐适当的用药剂量，例如，从管中挤出约 2-3 厘米的制剂。局部制剂可放在一种带泵和计量装置的容器中提供使用，计量装置可帮助提供正确的给药剂量。一般而言，从 0.5 到约 3 毫升，例如，约 1 毫升，是霜剂、凝胶或软膏局部给药的合适体积。然而，当施加局部制剂时，特别是当用手指给药时，要给予精确的剂量常常是困难的。采用涂药器可给予更精确的药量。

用药说明书应标明给药的推荐部位，例如，该制剂是否应该施加在肛周皮肤，或是否还应塞到肛门里。

为有效治疗大便失禁，必须使用 30-40%浓度的去氧肾上腺素局部制剂，例如凝胶，通常为 1 毫升，给予的去氧肾上腺素剂量为 400 毫克。去氧肾上腺素的总剂量和高浓度，将产生全身性和局部副作用，特别是心血管副作用，例如血压升高和局部皮肤刺激。相反，在猪试验中，使用含量 1%的 1R,2S-甲氧胺凝胶，和含量为 0.3%的 1R,2S-甲氧胺凝胶 0.5 毫升，发现可提高肛门内括约肌压而对血压无影响。

根据本发明，治疗大便失禁最好采用适合局部给药的药物组合物，例如凝胶、霜剂或软膏，一般含有量不到 10%重量的 1R,2S-甲氧胺，且通常不到 10%，包括 8%，包括 5%，包括 4%，3%，2%或 1%的 1R,2S-甲氧胺。可以使用含 1%或更低重量的甲氧胺制剂，例如，0.8%或更低，0.5%或更低，0.3%或更低，或 0.1%重量的 1R,2S-甲氧胺。约 0.5 到约 2 毫升，最好约 1 毫升，这是霜剂、凝胶或软膏局部用药的适合体积。

该组合物可每天给药一次或多次，例如，每天两到三次，甚至更频繁，例如，每天四到五次。局部给药的单位剂量通常为 1 毫升凝胶、软膏或霜剂，例如，含有上述量的 1R,2S-甲氧胺。1R,2S-甲氧胺的每次给药剂量，可根据所给组合物的体积和该组合物中 1R,2S-甲氧胺的浓度计算出来。例如，1 毫升含量为 1%的 1R,2S-甲氧胺凝胶可提供 10 毫克剂量的 1R,2S-甲氧胺。作为实施例，可给予的药物剂量范围从 0.5 毫克到 40 毫克。应认识到相关部位的实际给药剂量，可能低于理论剂量，因为在给药过程中存在损耗。

用于提高胃肠道平滑肌伸缩力，和用于治疗因胃肠道平滑肌失去伸缩力而导致的紊乱和疾病，以及用于提高胃肠道括约肌伸缩力，和用于治疗因胃肠道括约肌失去伸缩力而导致的紊乱和疾病时，1R,2S-甲氧胺最好局部给药，例如，采用上述药物组合物以避免不良的全身副作用。可采用适合缓释或靶向给药的组合物。例如，用于提高胃食管括约肌伸缩力，和用于治疗反流（例如 Barnett's 病）时，1R,2S-甲氧胺可以浓缩液形式例如粘胶，或浆液给药。用于提高幽门括约肌伸缩力和治疗胃源性腹泻时，1R,2S-甲氧胺可以浓缩液形

式例如粘胶，或浆液给药，或是靶向胃中释放的固体口服组合物。

用于预防或治疗心功能紊乱或疾病，例如心律紊乱或疾病时，1R,2S-甲氧胺采用全身性给药，具体是注射或输注，例如，以上述适当的药物组合物形式。

作为一般原则，需要局部作用时，例如治疗鼻塞，用于眼科和治疗大便失禁，理想的是获得局部作用而无全身作用，例如不影响血压。事实上 1R,2S 异构体较其他异构体或消旋物本身具有更强的活性，意味着可以低得多的剂量达到同样的药理作用，同时降低了不良副作用的程度。

至于全身使用 1R,2S-甲氧胺，可用较低的剂量而达到与用较高剂量甲氧胺消旋物的同样效果。

如上所述的，我们发现用 Fujita 和 Hiyama 的方法只能生产非常少量的 1R,2S-甲氧胺²⁰，例如，达到约 1 克，这种生产量对于实际应用实在太小。因此，宜采用本发明的工艺生产异构体，这使得能以大得多的规模批量生产至少 30 到 50 克。

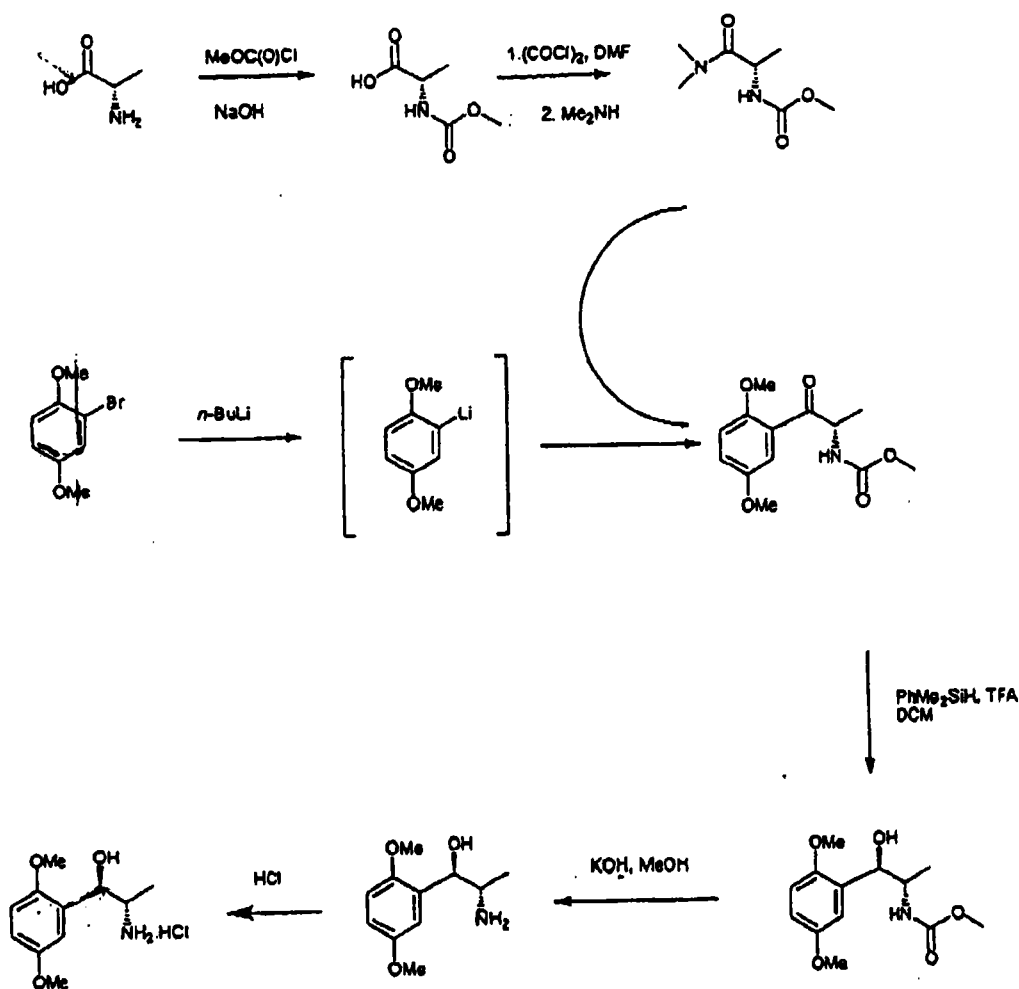
本发明的工艺包括向含有二甲基苯基硅烷和(S)-氨基-1-(2,5-二甲氧-苯基)-1-丙酮的溶液中滴加三氟醋酸，其氨基基团受到保护，并从所得到的氨基受保护的(1R,2S)-2-氨基-1-(2,5-二甲氧基-苯基)-1-丙醇上除去该保护基团。所述保护基团可以是，例如烷氧基或芳氧基羧基，例如甲氧基羧基或叔丁氧羧基。所用的保护基团，一般最好相对于其他保护基团而言。小而不庞大，以最大限度地减小保护基团对反应立体特性的影响。一般优选甲氧基羧基保护基团。硅烷和丙酮溶液的溶剂具体是氯化烃，例如，二氯甲烷。二氯甲烷较其他氯化烃（例如氯仿），具有低毒性的优点。用二甲基苯基硅烷还原丙酮，应在冷却条件下进行，因为该反应时会产热。反应一般在冰致冷条件下进行，例如，区域温度为 0℃，此时加入三氟醋酸，产生的反应混合物最好保持在该温度，例如约 1 小时。

反应可通过加入碱例如氢氧化钠来停止。如有需要，产品可用结晶法纯化。用还原法，最好用碱，例如氢氧化钾在反流条件下约 20 个小时，除去产品上的保护基团，将其转变为 1R,2S-甲氧胺。

本发明还提供生产(1R,2S)-2-氨基-1-(2,5-二甲氧基-苯基)-1-丙醇的工艺，如上所述，其氨基基团得到保护，该工艺包括向一种包含有二甲基苯基硅烷和(S)-氨基-1-(2,5-二甲氧-苯基)-1-丙酮的溶液中滴加三氟醋酸，如上所述，使其氨基基团得到保护。试剂和反应条件最好如上所述。

氨基基团得到保护的(S)-氨基-1-(2,5-二甲氧-苯基)-1-丙酮，可用 Fujita 和 Hiyama 描述的方法由 L-丙氨酸产生²⁰。总之，该方法包括保护 L-丙氨酸的氨基，通过与胺反应，将

N-受保护的丙氨酸的羧基原位转变为氯化酰基，产生出 N-受保护的(S)-丙氨酰胺，并在正丁锂或镁试剂（例如，Grignard 或 Grignard 类试剂）存在下，将该化合物与氯化 2,5-二甲氧基苯偶联，产生(S)-氨基-1-(2,5-二甲氧基-苯基)-1-丙酮，使其氨基得到保护。在 Fujita 和 Hiyama 所描述的方法中，氨基保护基团为甲氧基羰基，胺是二甲基胺，氯化 2,5-二甲氧基苯为溴-2,5-二甲氧基苯，偶联反应所用的试剂为正丁锂。反应步骤如下：



Fujita 和 Hiyama 给出了以上所列的反应步骤中各种中间产生的详细生产方案。然而，Fujita 和 Hiyama 反应步骤中的任何中间体，都可用不同的或改良工艺产生。例如，不必要遵循那些方案的每一个细节。试剂和/或反应条件可以不同。例如，Fujita 和 Hiyama 在偶联步骤用了 3 当量的溴-2,5-二甲氧基苯。然而，当将该工艺规模从每批约 1 克扩大到每批约 30 克到 50 克时，发现很难纯化所产生的(S)-[(甲氧基羰基)氨基]-1-(2,5-二甲氧基-苯基)-1-丙酮。还发现，改用 1.5 当量的溴-2,5-二甲氧基苯和正丁锂，产品的纯化要容易得多，而且，出人意料的是，得率并无损失，按丙氨酸起始原料计算得率高达 98%。在以下实施例中会给出更详细的内容。

反应试剂和反应条件可根据需要而不同，例如，如上所述。例如，可买用不同的氨基

保护基团,例如叔丁氧羰基。除了二甲基胺,还可用甲氧基甲基胺。氯-或碘-2,5-二甲氧基苯可用于替代溴-2,5-二甲氧基苯。然而,这种变化可能导致得率下降和/或反应立体特性的减弱。因此,最好还是采用所推荐的试剂和反应条件。

生产 1R,2S-甲氧胺的另外一种方法,是甲氧胺消旋物或甲氧胺异构体混合物的层析分离法。然而,用传统层析法分离几乎是不可能的。手性高压液相层析法(hplc)是唯一可行的方法,采用该技术需要特殊的改进。

宜采用设计的用于分离异构体的层析介质来进行手性层析分离。例如,采用含有 β -环糊精 R,S-羟基丙醚的层析介质。这种介质具有形成包涵体复合物的特性。例如,可采用 Cyclobond 1 2000 RSP, (得自 Advanced Separation Technologies, 1 Blake Street, Congelton, Cheshire, England)。该介质是一种用通过共价键将 β -环糊精结合到二氧化硅颗粒的反相层析介质。环糊精的一些仲位羟基可用消旋性(R,S)羟丙基衍生,能使其与溶质发生进一步的氢键相互作用。将该溶质以反相包含在环糊精空隙内,并与羟丙基侧链相互作用,产生对映选择性。环糊精层析技术的综述,例如,可参见 Ward & Armstrong²¹。可采用含有 0.1% 三乙基胺水溶液的流动相进行层析。例如,可用冰醋酸将 0.1%三乙基胺水溶液的 pH 调整至 4.1。

采用 Cyclobond 1 RSP 可使两种甲氧胺异构体从甲氧胺消旋物中以很高的纯度分离出来。为分离其它两种异构体,最好将含有两种异构体的洗脱液作进一步的层析分离,例如,采用含有经导入十八烷基(C18)到乙烯醇的羟基上,产生的乙烯醇共聚物基质的层析介质。例如,这种介质 C18 柱也得自 Advanced Separation Technologies, 1 Blake Street, Congelton, Cheshire, England。C18 柱可浓缩流动相的样品。用水洗涤可去除缓冲液。用甲醇洗脱层析柱可回收纯化的对映体。

Cyclobond 1 RSP 后接着用 C18,可得到所有四种异构体的纯样品。在下面的实施例中给予更详细的描述。其他类似的层析介质可用于替代 Cyclobond 1 RSP 和 C18,例如,含有相同或相似化学组成和/或相同或相似理化层析性质的层析介质。

虽然适用于分析目的,但层析法不能生产出足够大规模量的 1R,2S-甲氧胺供实际应用,例如临床应用。

即使采用手性层析法,也不可能明确地将层析组分与异构体化学结构联系起来。需联合使用 nmr 分光镜和单晶 X 线衍射分析,方能明确鉴定甲氧胺的 1R,2S 异构体,又称 1R,2S-甲氧胺。

如上所述,现已发现,1R,2S-甲氧胺体外诱导肛门内括约肌收缩的能力较去氧肾上腺

素至少强四倍。在猪体内试验中,发现含 1%重量的和甚至低至 0.1%的 1R,2S-甲氧胺(L-红-甲氧胺)凝胶能提高肛门内括约肌压力,而对血压无任何影响。该发现具有极其重要的意义,因为肛门腔压升高的数量级类似于采用去氧肾上腺素时所见的数量级,但只需去氧肾上腺素浓度的几分之一。故认为 1R,2S-甲氧胺是通过括约肌上的 α -肾上腺素能受体而作用于肛门内括约肌的。

下面通过非限制性实施例阐明本发明

实施例 1

甲氧胺异构体对肛内括约肌作用的体外研究

方法

从当地一屠宰场获得雌性大白猪的组织。将肛内括约肌切片并立即转入 4℃ 克莱博斯 (Crebs) 溶液中 (120 毫摩尔氯化钠, 5.9 毫摩尔氯化钾, 15.4 毫摩尔碳酸氢二钠, 1.2 毫摩尔磷酸二氢钠, 2.5 毫摩尔氯化钙, 1.2 毫摩尔氯化镁, 1.5 毫摩尔葡萄糖, 用 97% 的氧和 3% 的二氧化碳平衡保持 pH 在 7.4 ± 0.05)。将肛门腔上皮沿着粘膜下层去掉。肛内括约肌 (IAS) 切割成条, 每条尺度约 $1 \times 1 \times 7$ 毫米, 重 2 毫克到 8 毫克并且含有平行的肌束。5—0 号细丝绳捆扎每个末端并将这些肌肉条以相等张力固定在如图 1 所示的超级融合器官槽中 (容积 0.2 毫升)¹⁹。肌肉条 1 用绳子 2 将其固定在有机玻璃套 3 内部。通过流入口 4 和流出口 5, 用克莱博斯 (Crebs) 溶液 (37℃) 以 1 毫升/分钟的速度连续灌注这些肌肉条。这个装置可以同时研究六条肌肉条。这些肌肉条最初负载 1 克张力并得以平衡至少 90 分钟。通过包括张力转换器 6 和环形电极 7 和 7a 的皮尔顿 (Pioden) 动力计 UF1 转换器 (Pioden Controls, Canterbury, England) 测定张力, 并记录在六通路 Tekman900 笔式记录器 (Tekman Electronics, Leamington Spa, UK) 上, 并采用 Chart v3.6 和 MacLab 数据库获取系统 (AD Instruments, Australia)。

将苯福林 (Sigma chemical.Co., Poole, UK) 甲氧胺消旋物和四种甲氧胺异构体溶于克莱博斯 (Crebs) 溶液中并测试它们对 IAS 伸缩力的作用。甲氧胺消旋物, 即四种异构体的等摩尔混合物, 是 Prosyth Limited, Acton, Sudbury, Suffolk 生产的。按实施例 3 所述分离这四种异构体 (称为峰 1 到 4)。峰 2 是 1R,2S 甲氧胺。1R,2S 甲氧胺也可以按实施例 4 所述合成。通过结晶图证实峰 2 即是 1R,2S 甲氧胺。

在平衡期 IAS 肌肉条发挥了其内在伸缩力。平衡后, 将递增每种浓度的各测试化合物依次加入 20 秒, 当中的洗涤时间至少 10 分钟, 直到伸缩力回复到基线。

结果用均值（均值的标准误差）和产生这些肌肉条的手术标本编号来表示。每种测试化合物用每头猪的最多六条肌肉测试。

测试化合物—诱导的伸缩力提高通过施加测试化合物后获得的伸缩力峰值减去基础伸缩力值而计算出来。这个数字表示为在所用（ 10^{-2}M 到 10^{-8}M ）剂量范围内见到的伸缩力最大提高的百分比。所有的分析都用 Chart v3.6 软件来执行。

EC₅₀ 值通过绘制每条肌肉条的浓度—反应曲线计算。引起 50%最大收缩的剂量用线性回归计算。不同药的 EC₅₀ 值的比较采用 two-tailed t 检验，假设方差不等，和 $p<0.05$ 时有统计学意义。

结果

甲氧胺消旋物和苯福林

甲氧胺消旋物和苯福林都引起了 IAS 平滑肌肌肉条的剂量—依赖性收缩。甲氧胺消旋物和苯福林的 EC₅₀ 值没有显著差异（ $5.8\times 10^{-5}\text{M}$ 对 $7.5\times 10^{-5}\text{M}$; $p=0.44$ ）。浓度—反应曲线见图 2, $n=24(4)$ 。

甲氧胺立体异构体

所有异构体（峰 1 到 4）引起了 IAS 平滑肌的剂量—依赖性收缩。EC₅₀ 值见表 1。

表 1

测试化合物	消旋物或异构体	EC ₅₀ 值 $\mu\text{M}(\pm\text{SE})$
苯福林	消旋物	74.7(± 16.5)
甲氧胺	消旋物	58.3(± 13.4)
	峰 1:	317(± 4.06)
	峰 2: 1R,2S	17.6(± 3.71)
	峰 3:	165(± 12.1)
	峰 4:	483(± 80.6)

峰 2 为 1R,2S 异构体，显然比峰 1、3 和 4（ $p<0.001$ ）更强。四种异构体的浓度—反应曲线见图 3。峰 2 为 1R,2S 异构体，也显然比甲氧胺消旋物和苯福林（ $p<0.01$ ）更强，如图 4 浓度—反应曲线所示。

化学合成的 1R,2S 甲氧胺（峰 2）

按实施例 4 所述化学合成的 1R,2S 甲氧胺，也引起了肛门内括约肌肌肉条的剂量依赖性收缩。其 EC₅₀ 为 $10.5(1.97)\mu\text{M}$ 。EC₅₀ 与峰 2 的没有显著差异，它与从消旋物（ $p=0.10$ ）

中层析分离获得的异构体是相同的, 见图 5。化学合成的 1R,2S 异构体也明显比甲氧胺消旋物 ($p < 0.01$), 苯福林 ($p < 0.001$), 及峰 1、3 和 4 更强。见图 3 和 4。

实施例 2

甲氧胺异构体的层析分离

分析纯化

在以下层析条件下, 将从 Prosynth Limited 获得的甲氧胺消旋物样品, 见实施例 2, 分析解析成四种对映体:

用流动相 5/95; v/v; 乙腈/0.1%三乙胺乙酸 pH4.1 调节 Cyclobone 1 2000 RSP (Advanced Separation Technologies Ltd Astec 37 Leslie Court, P. O. Box 297, Whippany, NJ07981 USA), 直至达到稳定的基线。甲氧胺消旋物样品 (1 毫克/毫升) 用甲醇配制。将 10 微升制备好的样品注入层析柱, 流速 0.6 毫升/分钟。UV 检测器波长设置为 254 纳米, 监测层析柱流出物。观察到 4 个峰, 见图 6。当用激光偏振仪监测层析柱流出物时, 观察到前面两个峰是非对映体, 这意味峰 1 和 3 及峰 2 和 4 是对映体对。

制备性纯化

每种对映体纯化 100 毫克, 先跑手性固定相并收集峰 1 和 2。作为非对映体, 这两个峰用 Astec C18 柱进一步纯化 (精提)。同样跑 RSP 柱, 收集纯的峰 3 和纯的峰 4。因为跑 C18 分辨峰 1 和 2, 以及跑 Cyclobone 12000RSP 都含有非挥发性缓冲液, 因此开发了一种将已分离的甲氧胺对映体吸附到 C18 固定相的方法。C18 柱可浓缩流动相中的样品来, 通过用水洗涤去除缓冲液。最后, 用甲醇洗脱 C18 柱得以回收纯化的对映体。

制备性纯化方法

1. 制备乙酸三乙胺: 搅拌 0.1%的 HPLC 级三乙酸水溶液, 用试剂级冰醋酸调节 PH 至 4.1。

2. 为了纯化每种对映体 100 毫克, 必须将 800 毫克甲氧胺消旋物溶解于 80 毫升流动相中。用上述分析柱所用的流动相, 以 20ml/分调节用 5 微米 Cyclobone 12000RSP Astec Catalog #20344) 装填 22.1×250 毫米层析柱。该柱用 254 纳米波长紫外光监测, 每隔 20 分钟注入 2.5 毫克, 共注入 320 毫克。图 7 剖视图的箭头指示的为收集的分离峰。分别削减峰 1 和峰 2 的小部分并合并, 而峰 3 和 4 则单独采集并合并。

用 C18 柱回收分离的峰

1. 水洗涤装填了 5 微米固定相的 22.1×250 毫米 C18 柱洗。将合并溶液的 pH 值用三

乙胺调节至 7.0, 用 HPLC 级水使体积增加一倍。

2. 将调节过 pH 的样品以 10 毫升/分钟泵入 C18 柱。

3. 水清洗烧瓶, 且将清洗液过柱。加水过柱直至洗去注中所有的三乙胺乙酸, 在 254 纳米紫外线检测下, 回复至稳定基线。泵入甲醇通过柱洗脱样品。通过 254 纳米波长监测观察是否洗脱已完全。

4. 洗脱后, 柱子再用水洗涤准备加工下一个样品。峰 1、2、3 和峰 4 按此方法分别处理。

5. 甲醇中回收的样品在 40℃ 水浴中浓缩至干燥。

峰 3 和峰 4 的处理

将甲醇/C18 处理的残余物, 用 20 毫升甲醇化 JCL (0.1%) 重新溶解, 并重蒸发。残余物用醚 (~15 毫升) 磨成粉末。图 8 是峰 3 (140 毫克) 的纯度分析, 图 9 是峰 4 (105 毫克) 的纯度分析。

峰 1 和 2 的进一步纯化

1. 用流动相: 20/80; 0.1%TEAA, pH4.1 平衡 250×30 毫米, 5 微米 C18 柱, 流速 35 毫升/分钟。

2. 将 C18 柱回收的合并峰 1 和 2 的残余物溶解于流动相中, 并制备 1 毫克注射原液。

峰 1 和峰 2 的回收

1. 用 HPLC 级水调节 22.1×250 毫米层析柱。

2. 收集并合并的峰 1 和峰 2 组分用三乙胺调节 pH 至 7.0, 并用 HPLC 级水使体积增加一倍。

3. 将合并组分别泵入 C18 柱, 用水洗涤该柱洗去缓冲液, 最后用甲醇洗脱。

4. 40℃ 水浴浓缩甲醇至干燥。

5. 将甲醇残余物重溶于甲醇化的 HCL 中, 并再浓缩。

6. 这样处理的残留物用乙醚磨成粉末, 峰 1 (44 毫克) 和峰 1 的产量为 44 毫克, 峰 2 的产量为 29 毫克。

第二次跑峰 1 和 2

峰 1 和峰 2 的第一次样品产量低且纯度比目标低, 并且粉末颜色深 (淡绿色)。据信重复第一次跑柱的方法可能导致某种程度的自氧化。因此决定先将所有消旋物重跑 RSP 柱。在这个例子中峰 1 和 2 很接近, 因此不必重层析。

用上述方法处理的峰 1 和峰 2 的回收结果实质上提高了, 并且颜色也更浅。图 10 显

示了峰 1 的纯度 (45 毫克), 图 11 显示了峰 2 的纯度 (34 毫克)。

用 NMR 光谱学特征分析异构体

四个组分 (峰 1 到 4) 在二甲硫氧 (d_6 -DMSO) 中的质子 nmr 光谱是在室温下用 Bruker DRX 500MHz nmr 光谱仪获得的, 见图 12 到 15。虽然共振可以归因于这些结构中的特殊质子环境, 但却没有方法可确定相关的立体化学结构。

峰 1 (图 12) 和峰 3 (图 13) 的光谱几乎相同, 特别是两种结构及 nmr 光谱在 4.8ppm (标为 b) 特征峰和 6.0ppm (d) 特征峰, 形成了对映体对。同样, 峰 2 (图 14) 和峰 4 (图 15) 的光谱也在 b 和 d 的位置彼此十分相似, 又使他们形成对映体对, 但与峰 1 和 3 不同。甚至可以同样匹配 7.5ppm (c) 以上的胺类蛋白质。可互换的环境比如那些由于胺类或醇类共振而致的环境往往不如它们的化学变换位那样可靠依赖于浓度和温度。醇类 OH 共振在 3.3ppm 时不能借助化学交换效应与残余的水共振相鉴别。因此, 峰 1 和 3 是峰 2 和 4 的非对映体。

实施例 3

1R,2S-甲氧胺的合成

(S)-N-甲氧基羧基丙氨酸

在 0°C 冰浴条件下, 向搅拌着的 L-丙氨酸溶液 (300 克, 3.37 摩尔氢氧化钠 (1N, 1800 立方厘米)) 中, 用 2 小时以上的时间, 逐滴加入甲基氯仿 (274 立方厘米, 3.54 摩尔)。通过加入氢氧化钠 (5N) 使溶液的 pH 维持在 9。反应混合物在 0°C 搅拌 3 小时, 向其加入磷酸溶液 (15%) 使之酸化至 pH 为 1, 并用乙醚萃取 (5×1000 立方厘米)。合并的有机萃取物经干燥 (硫酸镁) 和减压浓缩产生粘性绿色油状产物 (386 克, 78%)。 ^1H NMR (250MHz; C^2HCl_3) 1.48 (3H, d, J7.25, CH_3), 3.72 (3H, s, COCH_3), 4.40 (1H, 五重峰, J7.25, CH), 5.31 (1H, bs, NH)。

(S)-N-甲氧基羧基丙氨酰二甲胺

在 0°C 条件下, 用 2 小时以上的时间, 向搅拌的 MeOC-丙氨酸 (227 克, 1.54 摩尔) 和干燥二氯尿烷 (DCM) (2000 立方厘米) 中的二甲基甲酰胺 (DMF) (25 立方厘米) 的溶液中逐滴加入草酰氯 (146 立方厘米, 1.62 摩尔)。0°C 搅拌溶液直至停止产生气体, 向其加入以氢氧化钠 (3N, 2000 立方厘米) 配的二甲胺 (676 克, 7.70 摩尔) 碱性溶液。用乙醚 (2×500 立方厘米) 萃取含水层, 干燥合并的有机层 (硫酸镁), 并减压浓缩, 得到的产品为一种白色晶状固体, 不再需要进一步的纯化 (230 克, 86%)。 ^1H NMR (250MHz; C^2HCl_3) 1.33 (3H, d, J6.75, CH_3), 2.99 (3H, s, OCH_3), 3.08 (3H, s, OCH_3), 3.66 (3H, s, COCH_3), 4.66 (H, 五重峰, J7.00, CH),

5.75(1H, d, J5.75, NH)。

(S)-2-[(甲氧基羧基)氨基]-1-(2,5-二甲氧苯基)-1-丙酮。

在氮气-20℃条件下，向溴-2,5-二甲氧基苯(55 克，0.25 摩尔)的 THF(1000 立方厘米)溶液中加入正丁锂(100 立方厘米，溶于己烷中 2.5M，0.25 摩尔)。-20℃搅拌 0.75 小时，通过插管向其中加入胺(30 克，0.17 摩尔)的 THF(100 立方厘米)溶液。 -20℃搅拌溶液 2 小时，接着回暖至室温 1 小时以上，加入氯化铵溶液(700 立方厘米)终止反应。用乙醚(1000 立方厘米)稀释该溶液，干燥有机层(硫酸镁)，减压浓缩，得到一种黄色油。该产物通过干性快速二氧化硅层析法纯化(洗脱液 4:1 己烷/醋酸乙酯，然后 3:2 己烷/醋酸乙酯)，得到一种白色晶状固体产品(45 克，98%)。 ¹H NMR(250MHz; C²HC1₃) 1.36(3H, d, J7.0, CH₃), 3.70(3H, s, OCH₃), 3.82(3H, s, OCH₃), 3.92(3H, s, OCH₃), 5.43(1H, 五重峰, J7.3, H-2), 5.80(1H, bs, NH), 6.94(1H, d, J9.0, ArH), 7.10(1H, dd, J9.0, 3.3, ArH), 7.32(1H, d, J3.3, ArH)。

(1R,2S)-2-[(甲氧基羧基)氨基]-1-(2,5-二甲氧苯基)-1-丙醇。

在 0℃冰浴条件下，向搅拌的酮，即(S)-2-[(甲氧基羧基)氨基]-1-(2,5-二甲氧苯基)-丙酮(20 克，74.9 毫摩尔)和溶于干性 DCM(500 立方厘米)中的二甲苯基硅烷(10.7 克，78.6 毫摩尔)溶液中，逐滴加入三氟醋酸(TFA)(50 立方厘米)。0℃搅拌该溶液 1 小时，然后加入氢氧化钠(500 立方厘米，1N)终止反应。干燥有机层并减压浓缩，得到一种在静止状态凝固的黄色油。该固体经乙醚/己烷结晶后得到一种白色晶状固体产品(15.6 克，75%)。 ¹H NMR (250 MHz; C²HC1₃) 1.03 (3 H, d, J7.0, CH₃), 3.04 (1 H, d, J4.3, OH), 3.68 (3 H, s, COCH₃), 3.78 (3 H, s, OCH₃), 3.80 (3 H, s, OCH₃), 3.94-3.99 (1 H, m, H-2), 5.05-5.15 (2 H, m, H-1 and NH), 6.72-6.85 (2 H, m, ArH) 6.97 (1 H, d, J 2.0, ArH)。

(1R,2S)-甲氧胺

向搅拌的甲氧基羧基(MeOC)保护的醇，即溶于甲醇(175 立方厘米)的(1R,2S)-2[(甲氧基羧基)氨基]-1-(2,5-二甲苯基)-丙醇(4.0 克，14.9 摩尔)溶液中，加入氢氧化钾(4.06 克，72.8 毫摩尔)(溶于 60 立方厘米水)。冷却此溶液，并用磷酸(15%, 容积比)酸化。用 DCM(2×50 立方厘米)萃取溶液，加入碳酸钾碱化含水层。用乙醚(5×50 立方厘米)萃取含水层，干燥合并的乙醚萃取物(硫酸镁)，减压浓缩，得到一种清澄的黄色油(1.9 克，61%)。 ¹H NMR (250 MHz; C²HC1₃) 0.84 (3 H, d, J 7.0, CH₃), 3.19-3.22 (1 H, m, H-2), 3.71 (6 H, s, 2 x OCH₃), 4.67 (1 H, d, J 5.0, H-1), 6.66-6.72 (2 H, m, ArH), 6.92 (1 H, d, J 2.5, ArH)。

(1R,2S)-盐酸甲氧胺

向溶于无水乙醚(30 立方厘米)的(1R,2S)-甲氧胺(1.9 克，9.00 毫摩尔)冰冷却溶液中，

通入干燥的盐酸气流 45 分钟。抽滤反应沉淀物，用冷乙醚洗涤，在氮气中干燥，产生白色固体标题化合物。(1.5 克, 68%)。¹H NMR (250 MHz; [C²H₃]₂SO) 0.89 (3 H, d, J 6.8, CH₃), 3.37-3.42 (1 H, m, H-2), 3.71 (3 H, s, OCH₃), 3.75 (3 H, s, OCH₃), 5.12 (1 H, s, H-1), 5.92 (1 H, d, J 4.3, OH), 6.84 (1 H, dd, J 8.8, 3.0, ArH), 6.92-7.00 (2 H, m, ArH); 高压液相。

甲氧胺的分析方法

用以下方法分析甲氧胺样品。

方法

层析柱	:	Cyclobond I RSP 250×4.6mm
柱温度	:	23℃
流动相	:	0.1%四乙基铵, pH 4.1*, 95% 容积比
	:	乙腈 5%容积比
流速	:	0.6 毫升/分钟
溶液		
浓度	:	5 毫克/升
注射体积	:	2.5 微升到 20 微升
检测	:	紫外线 230 纳米

*pH 4.1 四乙基铵醋酸盐需每天新鲜配置。

实施例 4

经单晶 X 线分析 1R,2S-甲氧胺的立体化学特征

单晶 X 线分析是确定结构的确切工具。用实施例 3 所描述的方法，合成推测的甲氧胺 1R,2S 异构体(又称为 L-红异构体)的盐酸盐。按照改良的 Fujita 和 Hyama 方法合成推测的 1R,2R(D-苏异构体)盐酸盐，其中用氢硼化钠作还原剂，产生 1R,2R-(D-苏)和 1R,2S-(D-红)异构体的混合物。用二氧化硅柱快速层析法纯化 1R,2R-异构体。

在己烷雾气中下，从甲醇/醋酸乙酯溶液结晶两种化合物。所产生的晶体为非常精细的片状物，可以得到绝佳的数据，从中获得的可靠精确系数能解决其结构问题。用 Nonius KappaCCD 进行 X 线晶体图制作。原子配价键和等价各向同性置换参数见表 2。晶体数据和结构细节见表 3。键的长度和角度见表 4。双折射置换参数见表 5，氢配价键和单折射置换参数见表 6。

表 2. nb0103.U(eq)的原子配价键[$\times 10^4$]和等价各向同性置换参数[$\text{\AA}^2 \times 10^3$]. U(eq)定义为互相垂直的 U_{ij} 张量轨迹的三分之一量。

	x	y	z	U(eq)
Cl(1)	-3293(1)	5351(1)	670(1)	29(1)
O(1)	-889(3)	2022(2)	957(1)	28(1)
O(2)	2949(3)	4524(2)	3752(1)	38(1)
O(3)	-4256(3)	-221(2)	3208(1)	30(1)
N(1)	-1904(3)	-935(2)	408(1)	24(1)
C(1)	1183(4)	3350(3)	3583(2)	28(1)
C(2)	583(4)	2757(3)	2715(1)	25(1)
C(3)	-1260(4)	1583(3)	2599(1)	23(1)
C(4)	-2503(4)	969(3)	3369(1)	24(1)
C(5)	-1909(4)	1570(3)	4237(1)	27(1)
C(6)	-105(4)	2762(3)	4335(1)	29(1)
C(7)	-2078(4)	1072(3)	1638(1)	23(1)
C(8)	-1501(4)	-703(3)	1421(1)	24(1)
C(9)	1147(4)	-1230(3)	1640(2)	38(1)
C(10)	4470(4)	5030(3)	3006(2)	37(1)
C(11)	-5712(4)	-746(3)	3969(2)	33(1)

表 3. nb0103 晶体数据和结构细节

鉴定密码	nb0103
经验分子式	$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{ClNO}_3$
化学式分子量	247.1
温度	180(2) K
波长	0.7107 $\text{\AA}$

晶体系统	单斜晶
空间基团	$P2_1$
单位晶格尺寸	$a = 3.3331(3) \text{ \AA}$ $b = 8.2342(6) \text{ \AA}$ $c = 14.6198(7) \text{ \AA}$
体积	$642.01(7) \text{ \AA}^3$
Z	2
密度(计算所得)	1.281 毫克/立方米
吸收系数	0.291 毫米^{-1}
F(000)	264
晶体大小	$0.23 \times 0.18 \times 0.01$ 毫米
数据收集的 θ 范围	3.73 到 27.44°
指数范围	$-6 \leq h \leq 6, -10 \leq k \leq 9, -17 \leq l \leq 18$
收集的反射光	4436
独立反射光	2536($R_{\text{int}}=0.0288$)
吸收校正	等价半经验式
最大和最小透射光	0.997 和 0.957
细致方法	F^2 上的全矩阵 最小平方
数据/约束/参数	2536/1/153
F^2 适合特性	1.099
最终 R 指数[$I > 2\sigma(I)$]	$R1=0.0331, wR2=0.0832$
R 指数(所有数据)	$R1=0.0379, wR2=0.0861$
绝对结构参数	0.00(6)
最大差别峰和孔	0.188 和 $-0.212 e \text{ \AA}^{-3}$

表 6. nb0103 键的长度[Å]和角度[°]

O(1)-C(7)	1.417(2)	O(1)-H(1)	0.86(3)
O(2)-C(1)	1.372(3)	O(2)-C(10)	1.423(3)
O(3)-C(4)	1.375(3)	O(3)-C(11)	1.426(3)
N(1)-C(8)	1.509(2)	N(1)-H(1A)	0.9100
N(1)-H(1B)	0.9100	N(1)-H(1C)	0.9100
C(1)-C(6)	1.386(3)	C(1)-C(2)	1.396(3)
C(2)-C(3)	1.388(3)	C(2)-H(2A)	0.9500
C(3)-C(4)	1.401(3)	C(3)-C(7)	1.529(3)
C(4)-C(5)	1.398(3)	C(5)-C(6)	1.381(3)
C(5)-H(5A)	0.9500	C(6)-H(6A)	0.9500
C(7)-C(8)	1.527(3)	C(7)-H(7A)	1.0000
C(8)-C(9)	1.511(3)	C(8)-H(8A)	1.0000
C(9)-H(9A)	0.9800	C(9)-H(9B)	0.9800
C(9)-H(9C)	0.9800	C(10)-H(10A)	0.9800
C(10)-H(10B)	0.9800	C(10)-H(10C)	0.9800
C(11)-H(11A)	0.9800	C(11)-H(11B)	0.9800
C(11)-H(11C)	0.9800		
C(7)-O(1)-H(1)	104.6(18)	C(1)-O(2)-C(10)	117.49(17)
C(4)-O(3)-C(11)	117.06(17)	C(8)-N(1)-H(1A)	109.5
C(8)-N(1)-H(1B)	109.5	H(1A)-N(1)-H(1B)	109.5
C(8)-N(1)-H(1C)	109.5	H(1A)-N(1)-H(1C)	109.5
H(1B)-N(1)-H(1C)	109.5	O(2)-C(1)-C(6)	116.45(19)
O(2)-C(1)-C(2)	124.41(19)	C(6)-C(1)-C(2)	119.1(2)
C(3)-C(2)-C(1)	120.92(18)	C(3)-C(2)-H(2A)	119.5
C(1)-C(2)-H(2A)	119.5	C(2)-C(3)-C(4)	119.34(18)
C(2)-C(3)-C(7)	120.18(17)	C(4)-C(3)-C(7)	120.27(19)
O(3)-C(4)-C(5)	124.01(18)	O(3)-C(4)-C(3)	116.32(18)
C(5)-C(4)-C(3)	119.7(2)	C(6)-C(5)-C(4)	120.07(18)
C(6)-C(5)-H(5A)	120.0	C(4)-C(5)-H(5A)	120.0
C(5)-C(6)-C(1)	120.84(19)	C(5)-C(6)-H(6A)	119.6
C(1)-C(6)-H(6A)	119.6	O(1)-C(7)-C(8)	106.94(16)
O(1)-C(7)-C(3)	111.52(18)	C(8)-C(7)-C(3)	113.41(18)
O(1)-C(7)-H(7A)	108.3	C(8)-C(7)-H(7A)	108.3
C(3)-C(7)-H(7A)	108.3	N(1)-C(8)-C(9)	107.55(17)
N(1)-C(8)-C(7)	107.30(17)	C(9)-C(8)-C(7)	114.8(2)

N(1)-C(8)-H(8A)	109.0	C(9)-C(8)-H(8A)	109.0
C(7)-C(8)-H(8A)	109.0	C(8)-C(9)-H(9A)	109.5
C(8)-C(9)-H(9B)	109.5	H(9A)-C(9)-H(9B)	109.5
C(8)-C(9)-H(9C)	109.5	H(9A)-C(9)-H(9C)	109.5
H(9B)-C(9)-H(9C)	109.5	O(2)-C(10)-H(10A)	109.5
O(2)-C(10)-H(10B)	109.5	H(10A)-C(10)-H(10B)	109.5
O(2)-C(10)-H(10C)	109.5	H(10A)-C(10)-H(10C)	109.5
H(10B)-C(10)-H(10C)	109.5	O(3)-C(11)-H(11A)	109.5
O(3)-C(11)-H(11B)	109.5	H(11A)-C(11)-H(11B)	109.5
O(3)-C(11)-H(11C)	109.5	H(11A)-C(11)-H(11C)	109.5
H(11B)-C(11)-H(11C)	109.5		

用对称转化产生等价原子。

表 4. nb0103 的双折射置换参数[Å²×10³]

双折射置换因子指数采取以下形式: $-2\pi^2[(ha^*)^2U_{11} + \dots + 2hka^*b^*U_{12}]$ 。

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Cl(1)	32(1)	21(1)	33(1)	1(1)	0(1)	-2(1)
O(1)	43(1)	19(1)	21(1)	1(1)	8(1)	2(1)
O(2)	41(1)	43(1)	30(1)	-13(1)	7(1)	-15(1)
O(3)	36(1)	34(1)	21(1)	1(1)	6(1)	-10(1)
N(1)	28(1)	19(1)	24(1)	-2(1)	-1(1)	0(1)
C(1)	29(1)	26(1)	30(1)	-5(1)	3(1)	1(1)
C(2)	29(1)	24(1)	23(1)	-2(1)	5(1)	2(1)
C(3)	28(1)	20(1)	20(1)	0(1)	2(1)	2(1)
C(4)	24(1)	24(1)	23(1)	0(1)	1(1)	2(1)
C(5)	30(1)	33(1)	19(1)	1(1)	6(1)	2(1)
C(6)	34(1)	34(1)	20(1)	-5(1)	2(1)	2(1)
C(7)	29(1)	22(1)	18(1)	2(1)	2(1)	0(1)
C(8)	33(1)	20(1)	20(1)	3(1)	0(1)	-1(1)
C(9)	44(1)	34(1)	35(1)	-6(1)	-13(1)	14(1)
C(10)	36(1)	33(2)	41(1)	-3(1)	7(1)	-4(1)
C(11)	32(1)	39(1)	28(1)	7(1)	5(1)	-3(1)

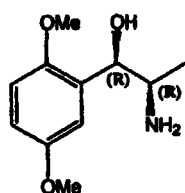
表 5. nb0103 的氢配价键($\times 10^4$)和单折射置换参数($\text{\AA}^2 \times 10^3$)

	x	y	z	U(eq)
H(1)	-1670(50)	2940(40)	968(18)	40(8)
H(1A)	-3403	-494	242	36
H(1B)	-1905	-2015	275	36
H(1C)	-648	-437	95	36
H(2A)	1447	3162	2196	30
H(5A)	-2747	1158	4760	33
H(6A)	257	3184	4926	35
H(7A)	-3930	1238	1584	27
H(8A)	-2700	-1412	1762	29
H(9A)	1427	-2328	1403	56
H(9B)	1398	-1226	2304	56
H(9C)	2335	-478	1355	56
H(10A)	5757	5785	3227	55
H(10B)	3423	5573	2547	55
H(10C)	5279	4080	2731	55
H(11A)	-6911	-1575	3768	49
H(11B)	-6623	181	4225	49
H(11C)	-4602	-1206	4438	49

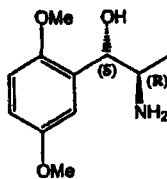
这些结果能够明确地鉴定出实施例 3 中合成的异构体，和实施例 2 中峰 2 用层析法分离出来的异构体，为甲氧胺的 1R,2S-异构体。

该异构体的结构见图 17。

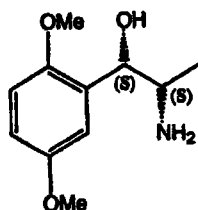
晶体图法的结果和基于上述实施例 2 所述的 nmr 光谱学推断，使甲氧胺异构体的完整结构可显示如下：



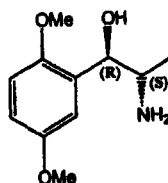
1R,2R-甲氧胺
(D-苏-甲氧胺)



1S,2R-甲氧胺
(D-红-甲氧胺)



1S,2S-甲氧胺
(L-苏-甲氧胺)



1R,2S-甲氧胺
(L-红-甲氧胺)

实施例 5

测试对麻醉的猪局部肛膜给予 1R,2S-甲氧胺后对几种心血管参数和平均肛门静态压 (MARP) 的影响

方法

按下列方案进行该研究:

测试物:

- 安慰剂以 4% w/w 凝胶配制
- 0.3% 重量的 1R,2S-甲氧胺以 4% w/w 凝胶配制
- 1% 重量的 1R,2S-甲氧胺以 4% w/w 凝胶配制
- 3% 重量的 1R,2S-甲氧胺以 4% w/w 凝胶配制

4% w/w 凝胶是在 96 毫升 0.5M 1% 的醋酸缓冲液中含有 4 克羟丙甲基纤维素。

含 1% 重量 1R,2S-甲氧胺的 4% w/w 凝胶是在 99g 4% 凝胶中含有 1 克 1R,2S-甲氧胺。

动物/动物饲养

此项研究采用从 Ellegaard Göttingen Minipigs ApS (Soro Landevej 302, DK-4261 Dalmose, 丹麦) 获得的 Gottingen-小型猪。这些动物为 4-5 月龄, 每头猪在研究开始时的体重在 6.9 到 8.7 公斤。用了 4 头雄性动物。第 2 号动物被第 4 号动物代替, 见下。

饮食和饮水

小型猪的饮食由 Ellegaard Göttingen Minipigs ApS 提供。在适应期每头猪每天两次提供 200 克/公斤体重的食物。鉴于动物食欲差，延长进食时间（多达 8 小时）。给药前一天小型猪不吃食物。饮水不限。

住所

猪单独养在室内栅栏里，面积大约 3 平方米，铺上稻草保持温度在 22℃±3℃（最大范围）和自然的光照循环。

麻醉

这些小型猪用氯醛糖—氨基甲酸乙酯混合物（比率 1+5）麻醉。需要时增加麻醉量。为了确保小型猪处于稳定的常规条件，试验开始前从右侧或者左侧股动脉获得血液用血气分析仪 ABL70(Radiometer, Copenhagen, Denmark)测定其血气和 pH 值。为了补偿液体流失，持续供给林格氏溶液（5 毫升/公斤体重/小时）。通过外部供暖在整个实验过程中维持动物体温在 38℃。

测试物的给药

测试物以 0.5 毫升/每只动物的体积肛膜局部给药。间隔 20 分钟观察一次。给药采用 1 毫升注射器插入肛门腔约 1 厘米来完成。旋转注射器同时缓慢给予测试物。准备及使得循环功能稳定至少 15 分钟后，用安慰剂或者所选剂量水平的测试物通过肛膜给药治疗动物。

第一次给药前和给药后适当时间，静脉注射给予异丙肾上腺素以作为对照。

只有在完成用于毒理学的血样品收集后，该研究结束时，才经动脉（盐酸肾上腺素，也称为 L-去甲肾上腺素）给药以作为对照。

剂量水平

本研究使用了下列剂量：

	测试物剂量 (4%w/w 凝胶中的测试物含量)		
	1 号猪	2 号猪	3 号猪
阶段 I	0.5 毫升安慰剂	0.5 毫升安慰剂	0.5 毫升安慰剂
阶段 II	0.3% 0.5 毫升	1% 0.5 毫升	0.3% 0.5 毫升
阶段 III	1% 0.5 毫升	3% 0.5 毫升	3% 0.5 毫升

2 号猪被 4 号猪替代是因为 2 号猪给药前水平超出正常范围。

参数测量

准备

在麻醉下，将小型猪背部固定在操作台上。

外周动脉血压

将动脉内内在导管（尺寸 0.8X1.4 毫米, B.Braun Melsungen AG, D-34212 Melsungen, 德国）连接到压力转换器（DTX, Pfrimmer-Viggo, Erlangen, 德国）上，记录右侧或者左侧股动脉的收缩压和舒张压。信号通过 Hellige Servomed SMV 178 T 扩增仪（Hellige GmbH, D-79100 Freiburg, 德国）增强。血压通过 Hellige 心电图仪 EK 512P（纸速：2.5mm/秒）记录 and 监测。测定收缩压和舒张压并且根据下列公式计算平均血压：

平均血压[mmHg]=(收缩压+ (2×舒张压))/3。

心率和心电图

ECG 记录用标准肢体导联 I,II 和 III 和放大的肢体导联 aVR,aVL 和 aVF 进行。采用标准的 10 毫米/1 毫伏及 50 毫米/秒纸速。记录用 HELLIGE Marquette mac 5000 12SL 进行。肉眼观察这些记录有无心率不齐和复合波异常。此外，评估肢体导联 II 的以下参数：心率[跳/分钟]；P 段[毫秒]；P-Q 间隔[毫秒]；QRS 复合波[毫秒]；Q-T 间隔[毫秒]。QTc 值按范德法特（van de Water）-公式计算：QTc=QT-0.087(R-R 距离-1000)。

均值和静态压

肛门静态压通过持一个压力测量探头（Unisensor Microtipcatheter 814-00-9409-D；Medical Measurement System b.v., Collosseum 25,NL-7521 P.V. Enschede, The Netherlands）插入直肠测定三次。取三次测量值的均值作为肛门静态压（MARP）用 Rikadenki 多头记录仪记录。

取血样品

在给药前即刻和给药后 10、20、40、60、90 和 120 分钟时采取血样品（5 毫升/每时间点），并收集到锂-肝素容器中。用 IsoTherm-Rack 系统（Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH,D-22331 Hamburg, 德国）立即将血样品冷却到 2℃到 8℃。加工全血获得 EDTA-血浆。该血浆通过离心（5 分钟，4000rpm，5℃）分成大约每份 1 毫升等份。血浆等份立即至少-80℃冷冻并储存于这个温度直到需要取一份置于干冰上用于分析。

给这些样品标上研究编号，种类，动物编号，取样时间，样品类型，日期和剂量水平。分析样品的甲氧胺血浆水平。结果见附录 3。

肉眼观察

实验中对肛膜进行肉眼观察。记录较低 pH 值测试物所引起的明显刺激和/或红斑。

*评估及记录时间

在给药前刻和给药后 5、10、15、20、40 和 60 分钟每次测量持续 30 秒的心率、ECG 及股动脉血压，此后每隔 20 分钟检测一次直至其效应减退。

统计

将每只动物的每种剂量、获得的值与初始值作比较，用 Student's 配对 t 检验 (Colquhoun, Lectures on Biostatistics, 10.6,167-9(1971), Clarendon Press, 牛津, 英格兰) 比较安慰剂对照组的平均值。使用下列限制: $p=0.01$ $t=4.604$ (4 级自由度)。表中显示与初始值相比有显著性差异 ($p \leq 0.01$)。所有的计算都尽可能地高精度并在记录时小数位数四舍五入，四舍五入的结果最多可能引起 1% 的偏差。

研究结束

实验结束处死动物。

结果

外周动脉血压

任何测试剂量水平的 1R,2S 甲氧胺对舒张压、收缩压或者平均血压没有影响。

所有测试浓度的 1R,2S—甲氧胺在个别动物中记录到血压的变化。但这些变化认为与所测物质不相关，而在每个时间点所用两口动物长时间麻醉所致的正常变动范围内。

图 17 到 19 给出了个别值及平均值。图 17 显示外周动脉舒张压。图 18 显示外周动脉收缩压，图 19 显示外周动脉平均血压。

平均肛门静态压 (MARP)

用浓度为 0.3% 的 1R,2S—甲氧胺的治疗，在两头猪给药后 5 分钟起算的 110 分钟里引起 MARP 剂量—相关的增加至平均 50 毫米汞柱(与初始值相比增加了 73%)。1% 的凝胶在给药后的 20 分钟里引起 MARP 进一步平均增加到 64 毫米汞柱 (227% 的增长)。3% 凝胶给药引起 MARP 剂量相关增加到大约 70 毫米汞柱。两个动物受影响的程度相似。

图 20 给出了个别值及平均值。

心率和 ECG

心率和 ECG 参数评估显示在任何测试剂量水平对 P-段、P-Q 间隔、Q-T 间隔 QTc 值、以及 QRS 复合波没有所测物质相关的影响。特别是，没有 QT—间隔延长的证据。

肉眼评估 ECG 记录没有显示任何心室早搏复合波群。

在 1% 和 3% 浓度的 1R,2S—甲氧胺使用后 2 小时观察到猪 1 和猪 3 的心率增加到大约平均 100 跳/分钟 (29% 增加)。此后逐渐回复常态。这些变化认为与所测物质无关，而在每个时间点所用两头动物长时间麻醉所致的正常变动范围内。

同样，该研究个别动物中记录到的所有其它变化认为也与所测物质无关，而在每个时间点所用两头动物长时间麻醉所致的正常变动范围内。

图 21 给出了心率的个别值及平均值。

循环功能的反应

对去甲肾上腺素或者异丙肾上腺素的预期反应没受到任何 1R,2S-甲氧胺凝胶的影响。

肉眼观察

在使用了 0.3%、1%、或者 3% 的 1R,2S-甲氧胺后没有观察到病理变化。

甲氧胺血浆水平

分析 3 样品的甲氧胺血浆水平。在所有的动物中记录到了甲氧胺的剂量相关血浆水平：剂量水平为 0.3% 的凝胶在 40 分钟后达到 4.90 和 6.97 纳克/毫升的平均峰值血浆水平。

剂量水平为 1% 的凝胶在 20 分钟到 40 分钟时达到 9.88 和 11.0 纳克/毫升的平均峰值血浆水平。

剂量水平为 3.0% 的凝胶在 40 分钟到 60 分钟时达到 50.4 和 61.3 纳克/毫升的平均峰值血浆水平。

猪之间几乎没有差异。

结论

本实验的目的是评估麻醉的微型猪在肛膜局部给药 1R,2S-甲氧胺后对几种心血管参数及平均肛门静态压（MARP）的影响。

每个动物肛膜给予 0.5 毫升的测试物剂，即安慰剂、0.3%、1% 或者 3% 的 1R,2S 甲氧胺（w/w），每次给药间隔至少 2 个小时。结果与对应的给药前值作比较。

在此实验条件下，用 0.3%、1% 或者 3% 的 1R,2S 甲氧胺治疗没有引起心血管参数的变化。在三种浓度下都记录到了 MARP 的剂量相关性增加。

浓度 0.3% 的 1R,2S-甲氧胺引起 MARP 与初始值相比增加到 50 毫米汞柱，1% 的浓度引起 MARP 增加到 64 毫米汞柱，3% 的浓度引起 MARP 增加到 70 毫米汞柱。两个动物受影响的程度类似。

没有记录到对心率和 ECG 参数 P 段、P-Q 间隔、Q-T 间隔、QRS 复合波，和 QTc 值的影响。特别是，没有记录到 Q-T 间隔延长的证据。去甲肾上腺素或者异丙肾上腺素的预期反应没有受影响。

在肉眼观察中没有记录到病理变化。

0.3%、1%或者3%制剂的最大血浆水平分别为6、10和56ng 甲氧胺/ml 血浆，反应出甲氧胺的血浆水平是剂量相关的。给药后约40分钟观察到最大血浆水平。猪之间几乎没有差异。

猪是一种已知的与人类特别相关的动物模型。以上获得的结果，证明了低浓度及低剂量的1R,2S-甲氧胺局部给药可增加肛门内括约肌静态压，而没有局部或全身副作用，特别是没有局部刺激及对血压无影响，预计人身上结果相似，并可预计局部1R,2S-甲氧胺给药对大便失禁及类似症状的治疗有效，尤其对需要增加括约肌紧张度的那些疾病。

参考文献

1. Nelson R, Norton N, Cautley E et al. Community-based prevalence of anal incontinence. JAMA 1995; 274: 559-61.
2. Kamm MA. Obstetric damage and faecal incontinence. Lancet 1994; 334: 730-3.
3. Vaizey CJ, Kamm MA, Bartram CI. Primary degeneration of the internal anal sphincter.
4. Jorge JM, Wexner SD. Etiology and management of fecal incontinence. Dis Colon Rectum 1993; 36: 77-97.
5. Mortensen N, Humphreys MS. The anal continence plug: a disposable device for patients with anorectal incontinence. Lancet 1991; 338: 1163-5.
6. Musial F, Enck P, Kalveram KT et al. The effect of loperamide on anorectal function in normal healthymen. J Clin Gastroenteral 1992; 15: 321-4.
7. Cook TA, Mortensen NJ. Management of faecal incontinence following obstetric injury. Br J Surg 1998; 85: 293-9.
8. Deen KI, Kumar D, Williams JG et al. Randomized trial of internal anal sphincter application with pelvic floor repair for neuropathic fecal incontinence. Dis Colon Rectum 1995; 38: 14-8.
9. Vaizey CJ, Kamm MA, Gold DM et al. Clinical, physiological and radiological study of a new purpose-designed artificial bowel sphincter. Lancet 1998; 353: 105-9.
10. Maloug AJ, Vaizey CJ, Nicholls RJ et al. Permanent sacral nerve stimulation for fecal incontinence. Ann Surg 2000; 232: 143-8.
11. Baeten CG, Konsten J, Spaans F et al. Dynamic graciloplasty for treatment of faecal incontinence. Lancet 1991; 338: 1163-5.
12. Carapeti EA, Kamm MA, Evans BK et al. Topical phenylephrine increases anal sphincter

resting pressure. Br J Surg 1999; 86: 267-70.

13. Cheetham MJ, Kamm MA, Phillips RKS. Topical phenylephrine increases anal canal resting pressure in patients with faecal incontinence. Gut 2001; 48: 356-9.

14. Speakman CT, Hoyle CH, Kamm MA et al. Adrenergic control of the internal anal sphincter is abnormal in patients with idiopathic faecal incontinence. Br J Surg 1990; 77: 1342-4.

15. Carapeti EA, Kamm MA, Phillips RKS. Randomized controlled trial of topical phenylephrine in the treatment of faecal incontinence. Br J Surg 2000; 87: 38-42.

16. Carapeti EA, Kamm MA, Nicholls RJ et al. Randomized, controlled trial of topical phenylephrine for fecal incontinence in patients after ileoanal pouch construction. Dis Colon Rectum 2000; 43: 1059-63.

17. Fraunfelder FT, Scafidi AF. Possible adverse effects from topical ocular 10% phenylephrine-. Am J Ophthalmol 1978 ; 85: 447-53.

18. Antbarro B, Barranco P, Ojeda JA. Allergic contact blepharoconjunctivitis-caused by phenylephrine eyedrops. Contact Dermatitis 1991; 25: 323-4.

19. Brading AF, Sibley GN. A superfusion apparatus to study field stimulation of smooth muscle from mammalian urinary bladder. J Physiol 1983 334: 11-12P.

20. Fujita M, Hiyama T. Erythro-Directive Reduction of α -Substituted Alkanones by Means of Hydrosilanes in Acidic Media. J Org Chem 1988; 53: 5415-5421.

21. Ward TJ & Armstrong DW, Improved Cyclodextrin Chiral Phases: A Comparison & Review, J of Liq. Chrom. 9 (2 & 3), 407- 423 (1986).

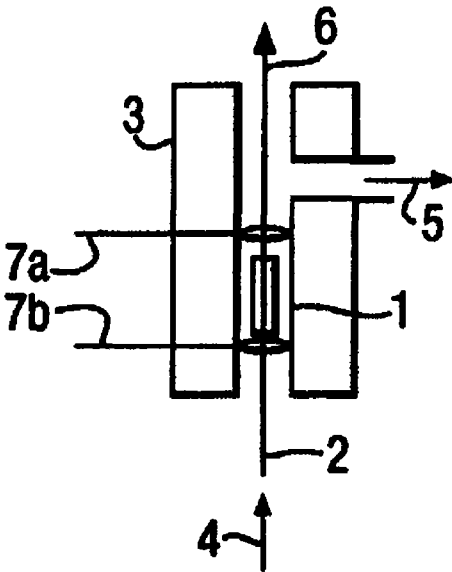


图 1

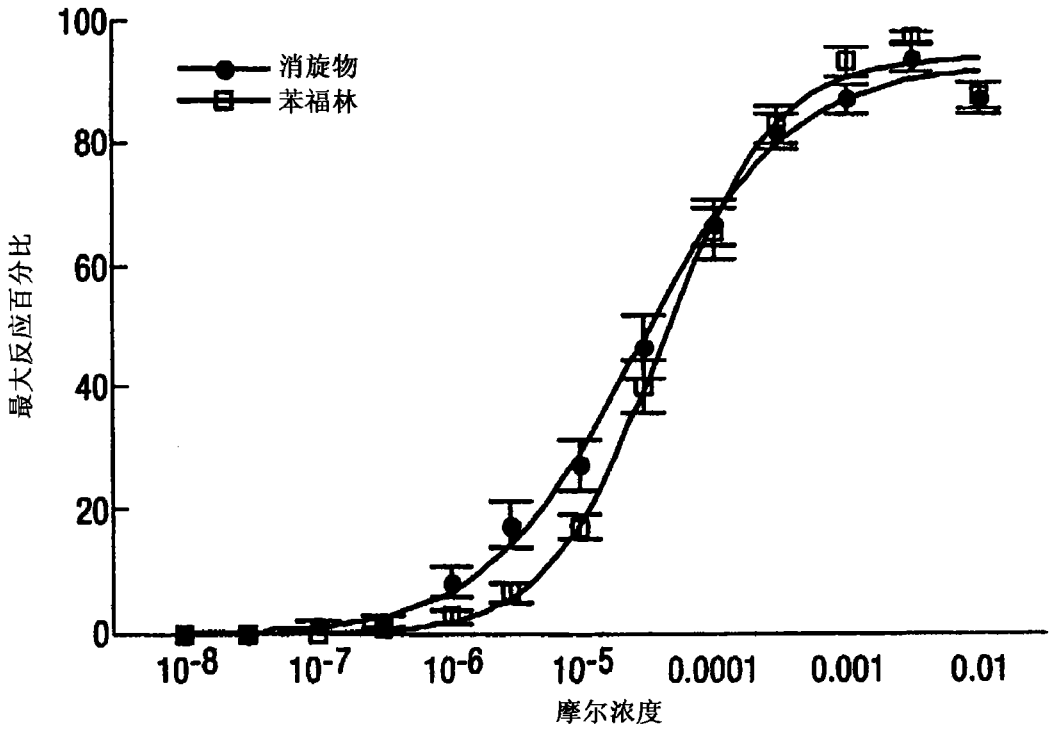


图 2

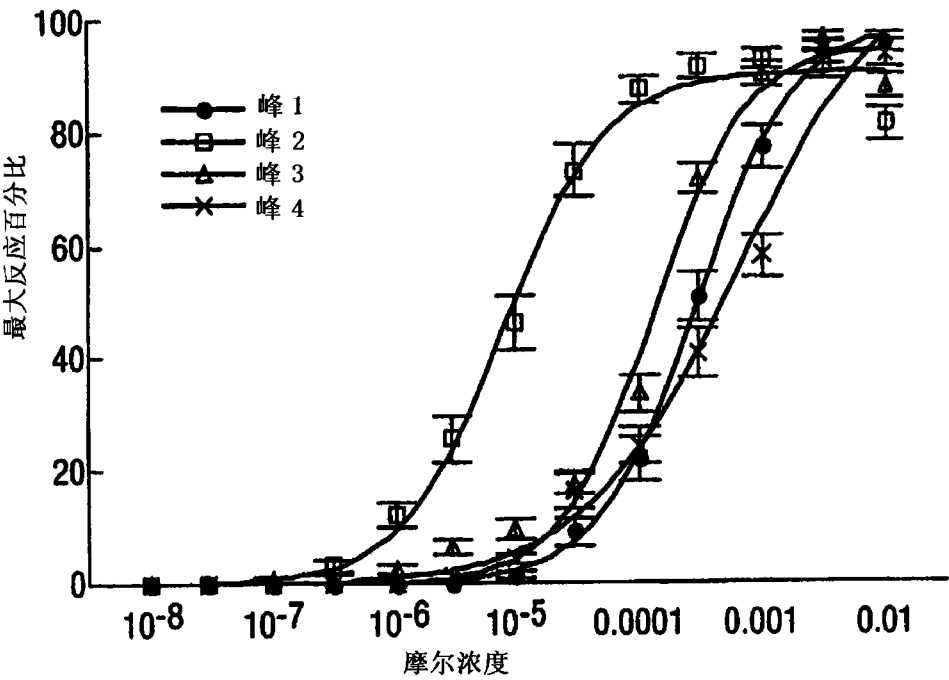


图 3

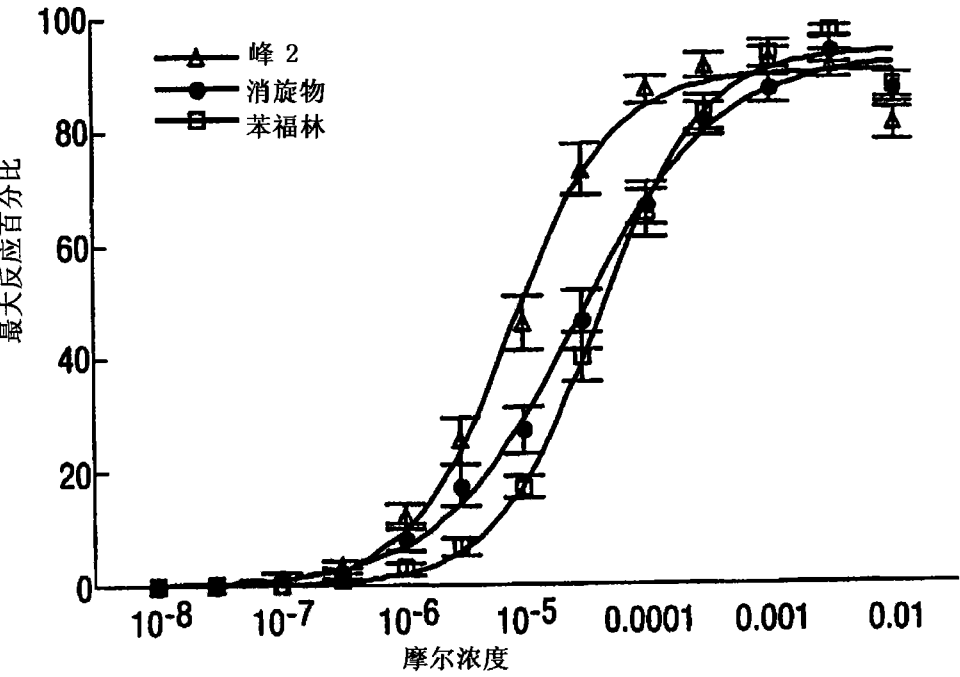


图 4

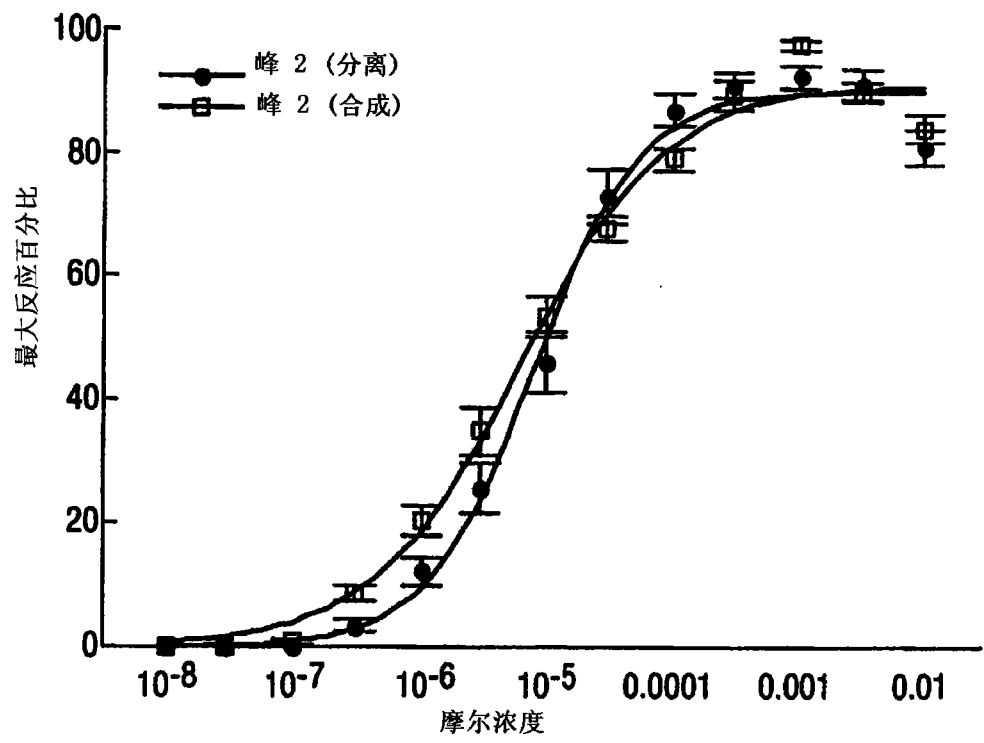


图 5

VWD 1A, 波长=225纳米 (样品\01-16-8. D)

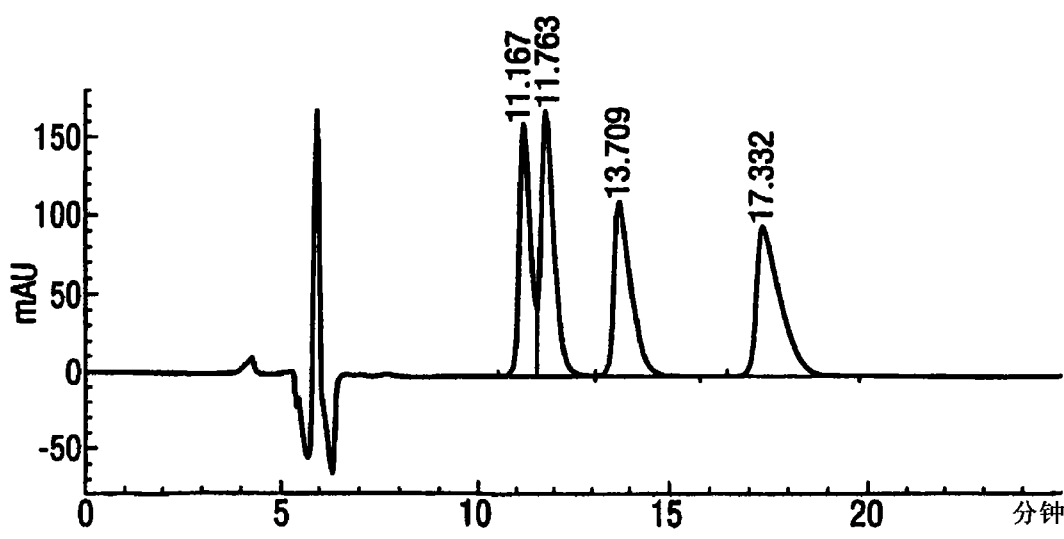


图 6

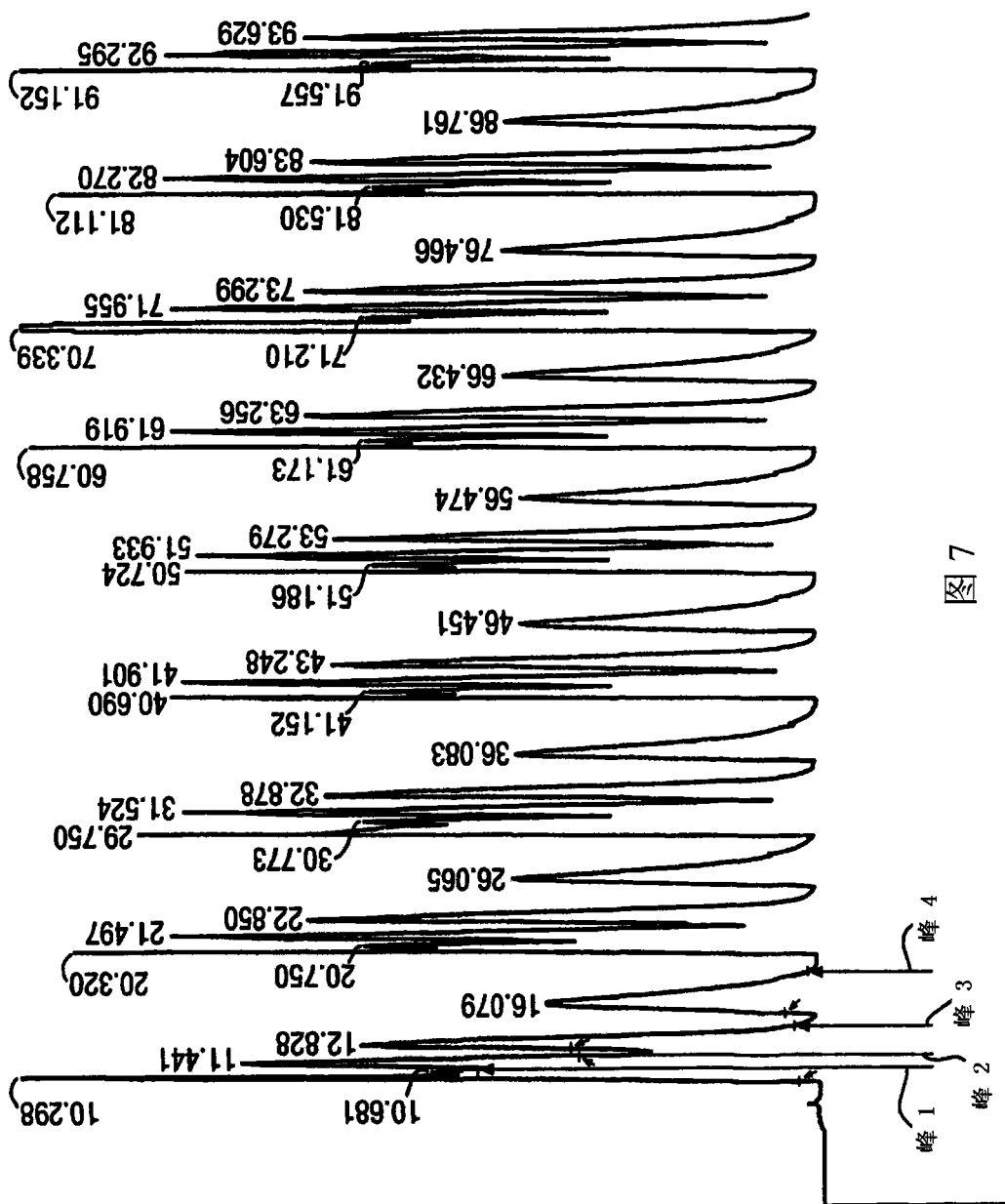
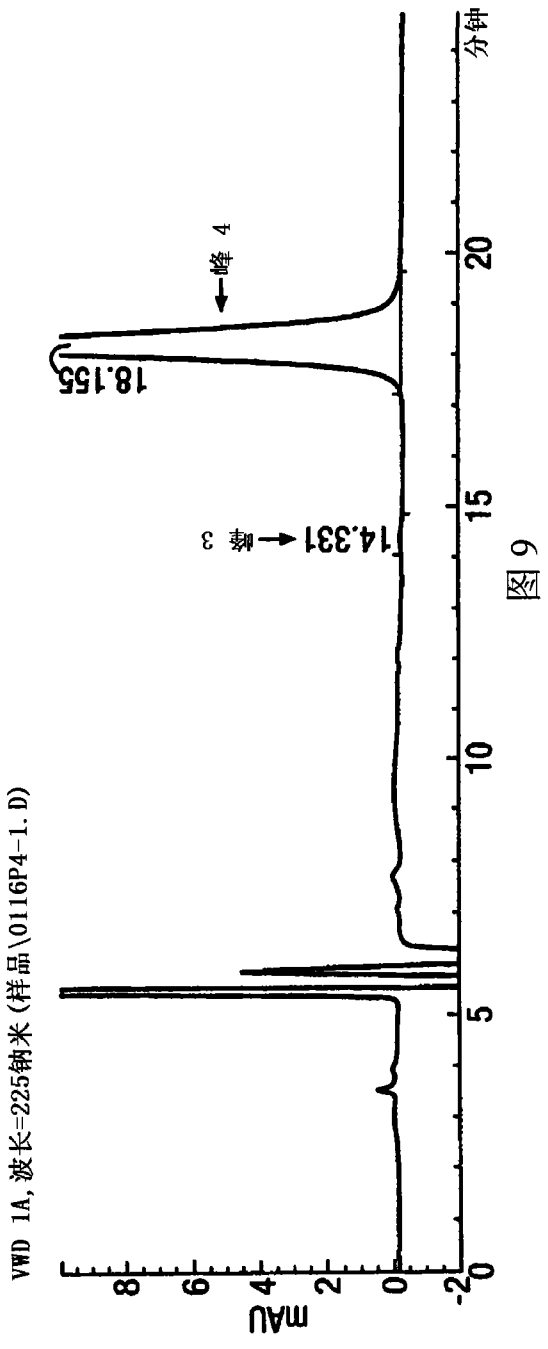
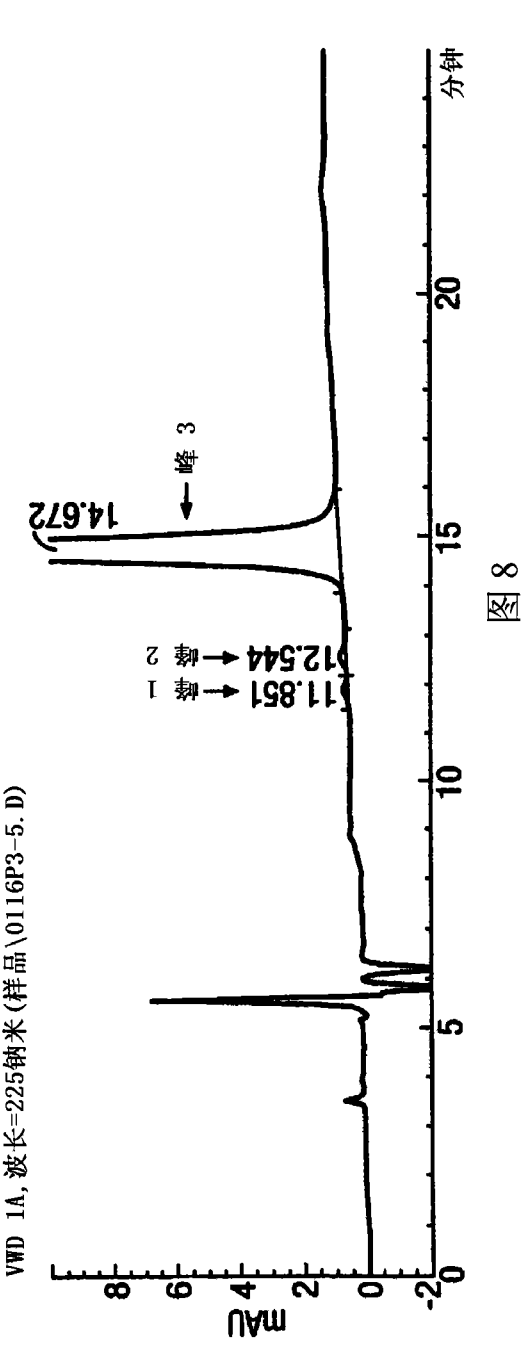


图 7



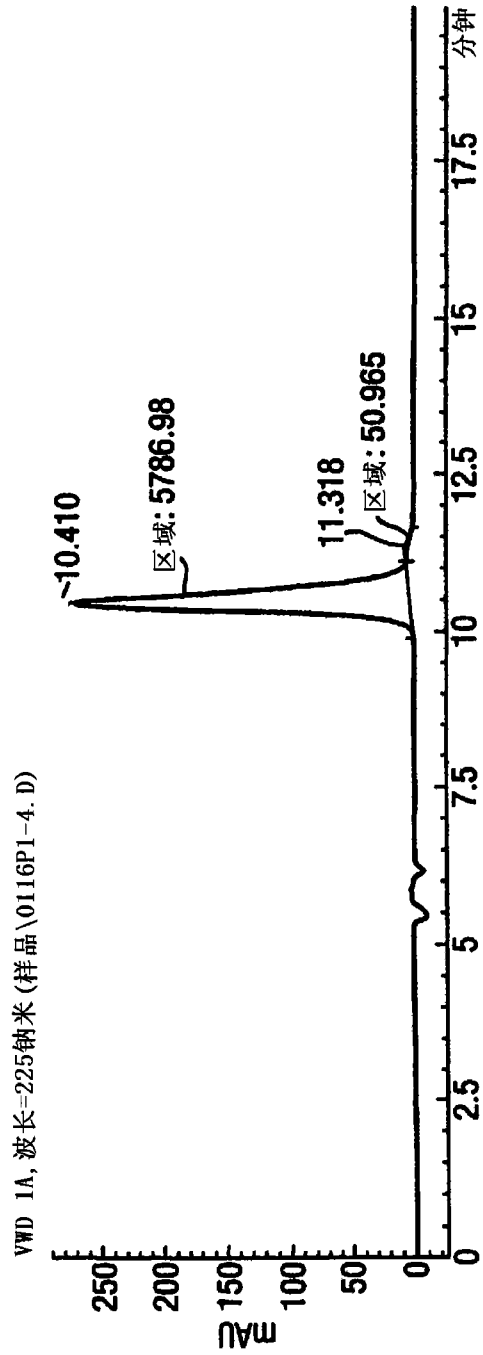


图 10

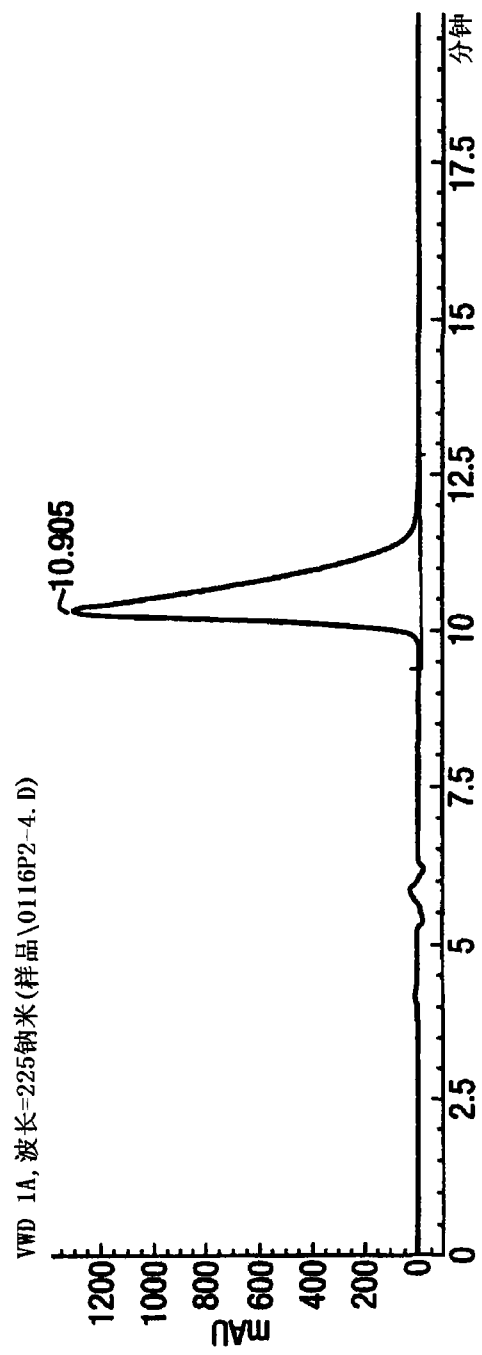


图 11

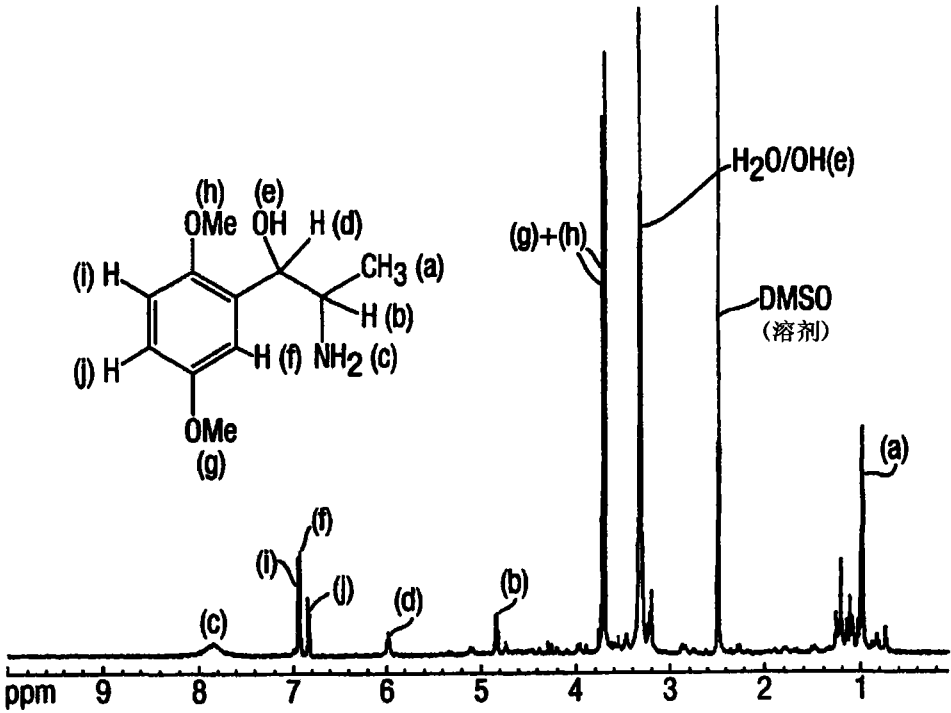


图 12

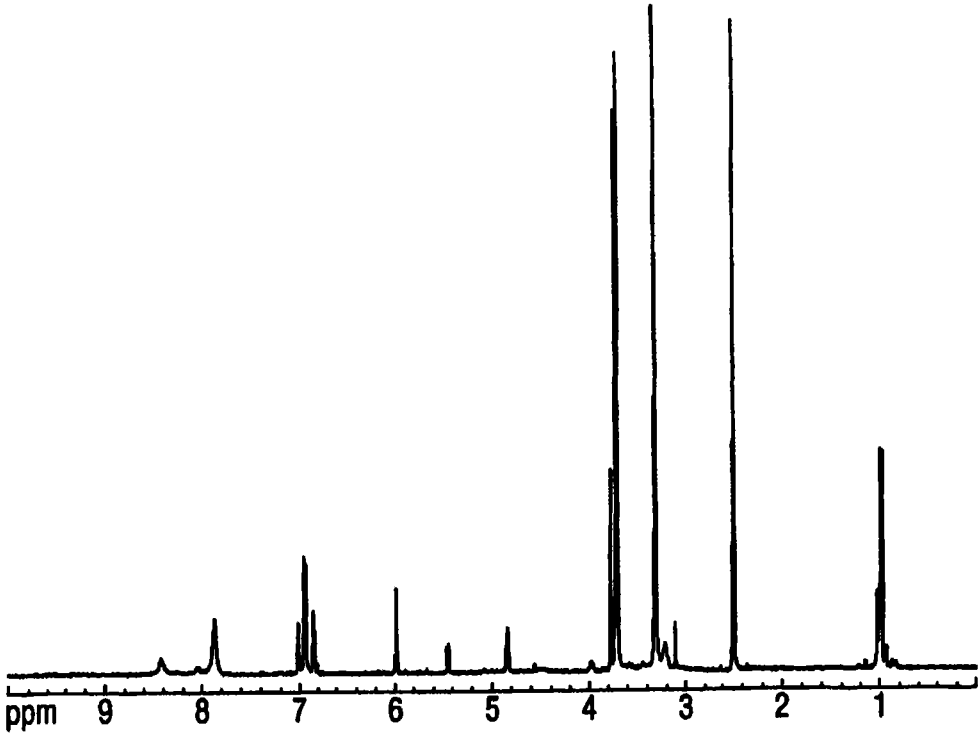


图 13

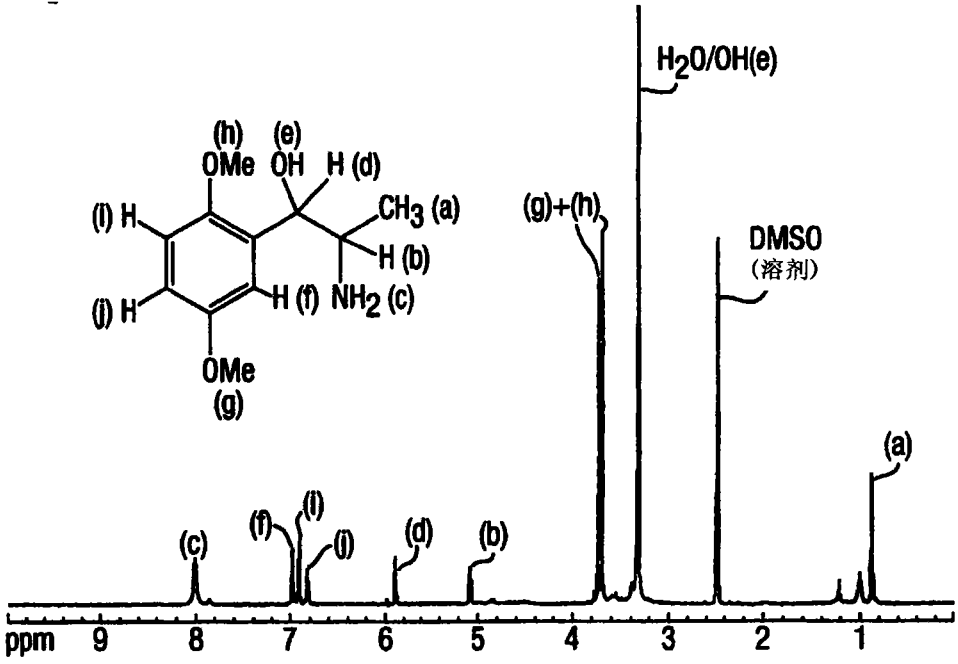


图 14

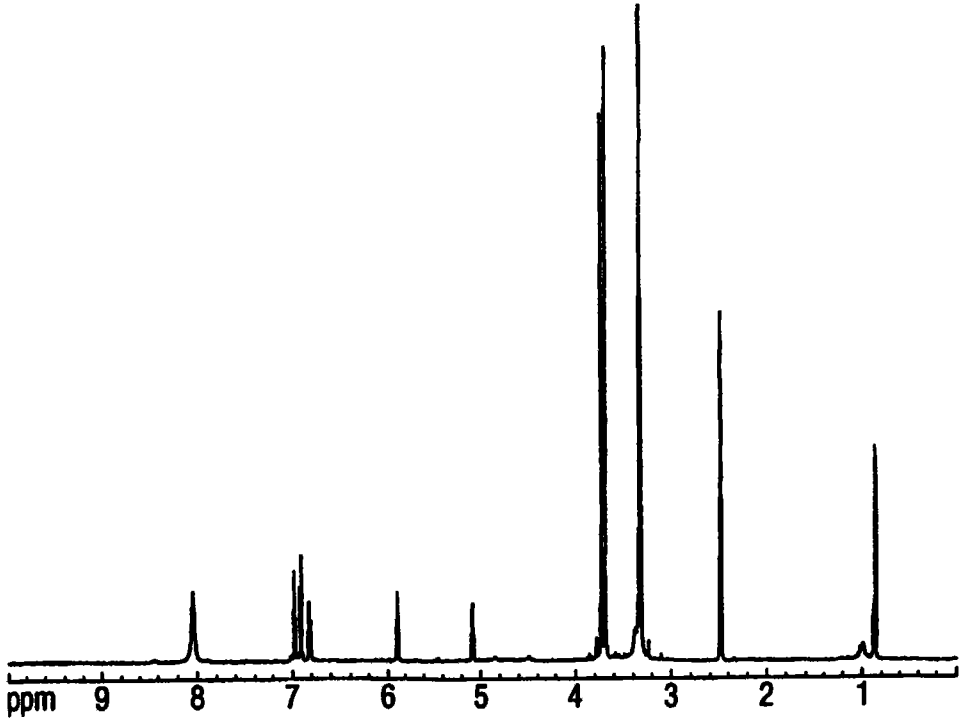


图 15

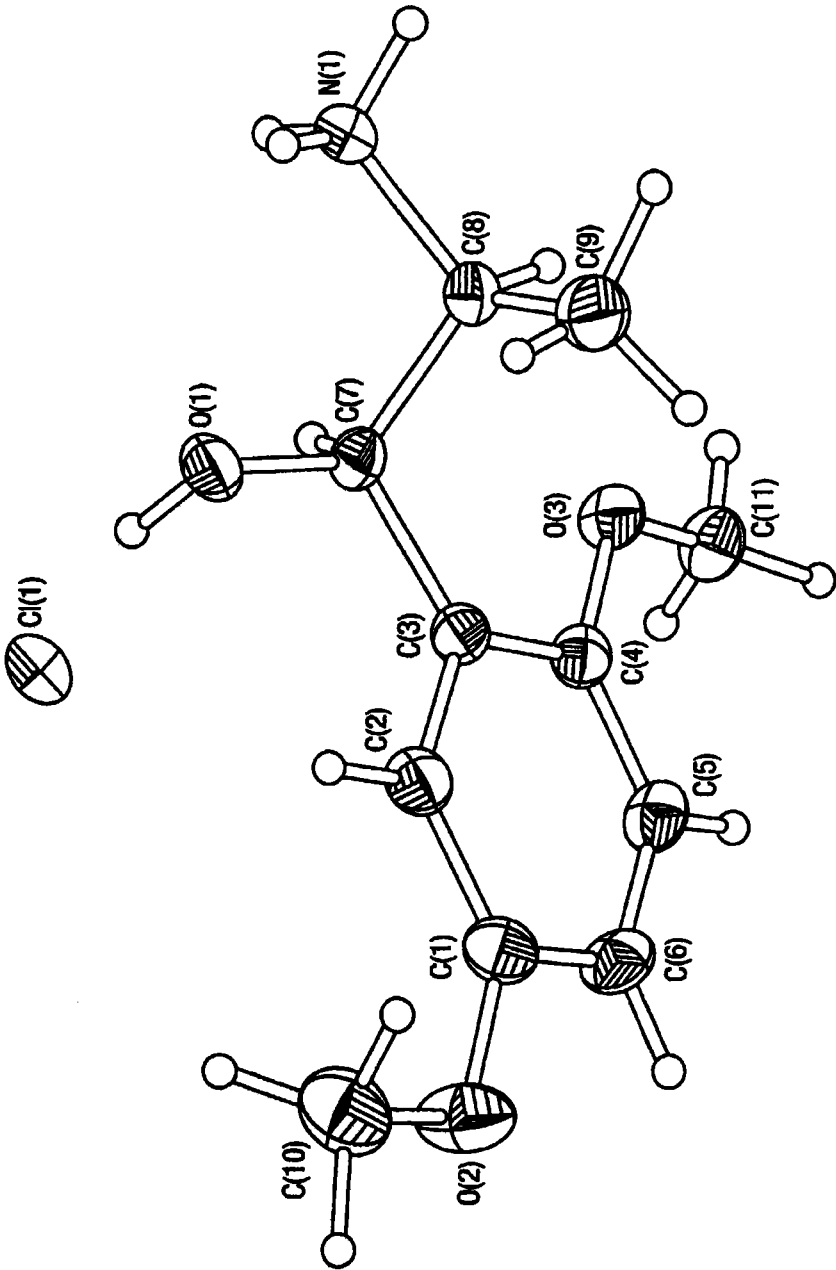


图 16

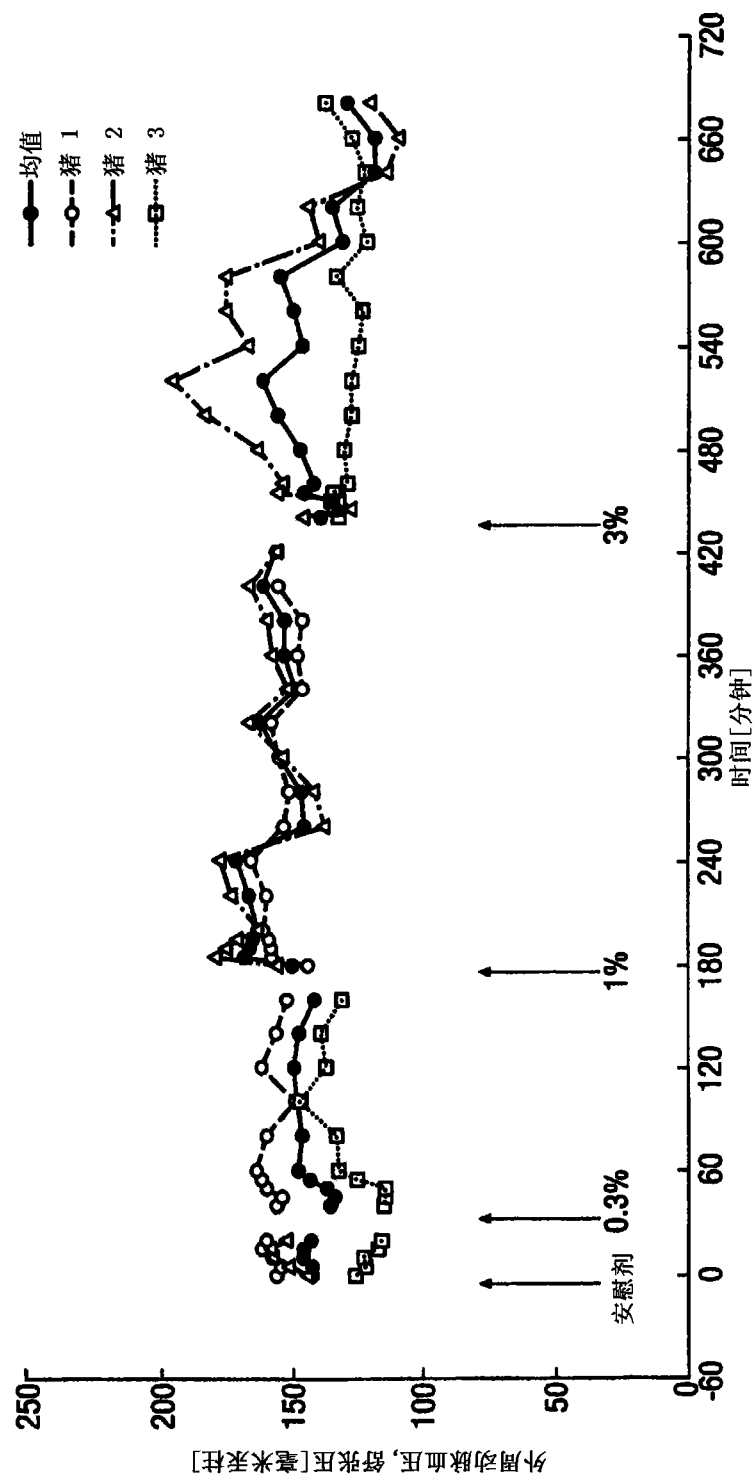


图 17

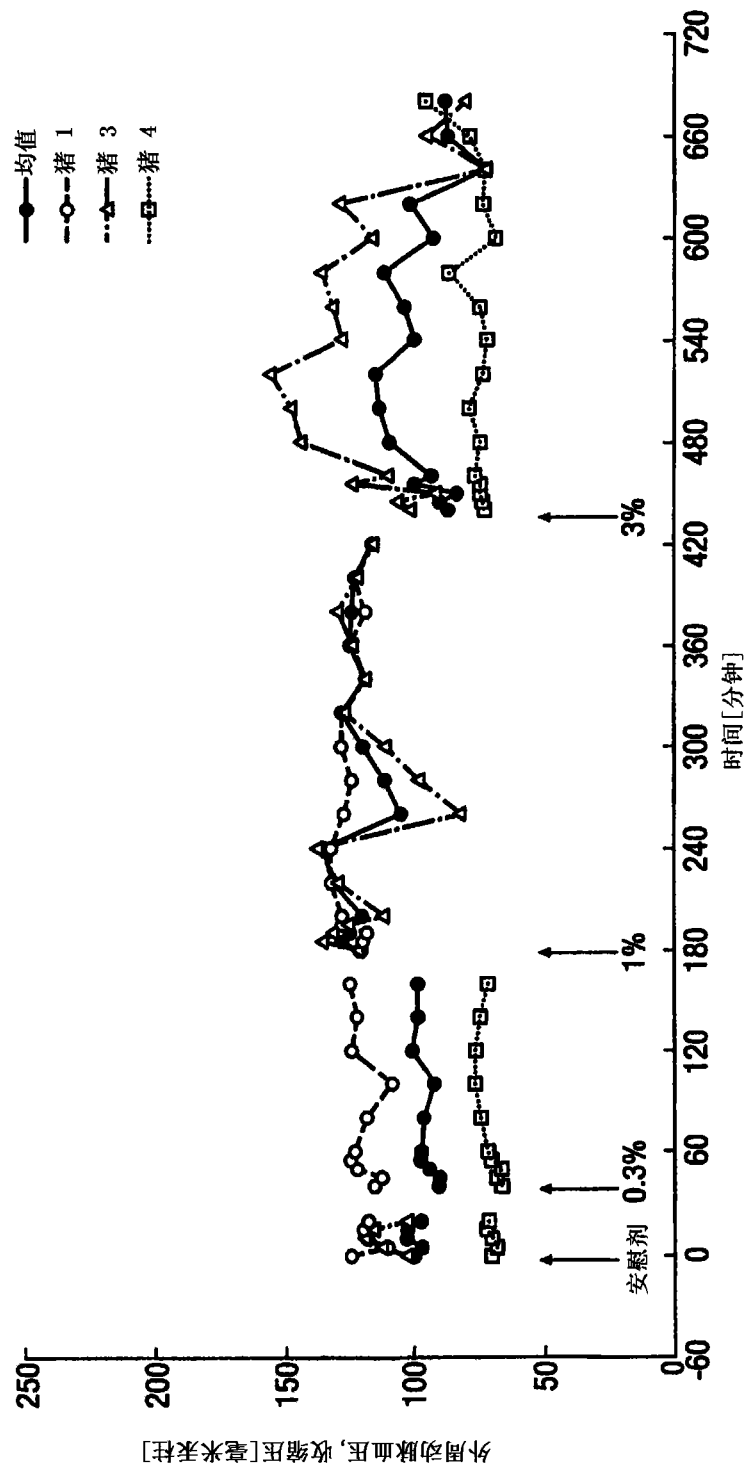


图 18

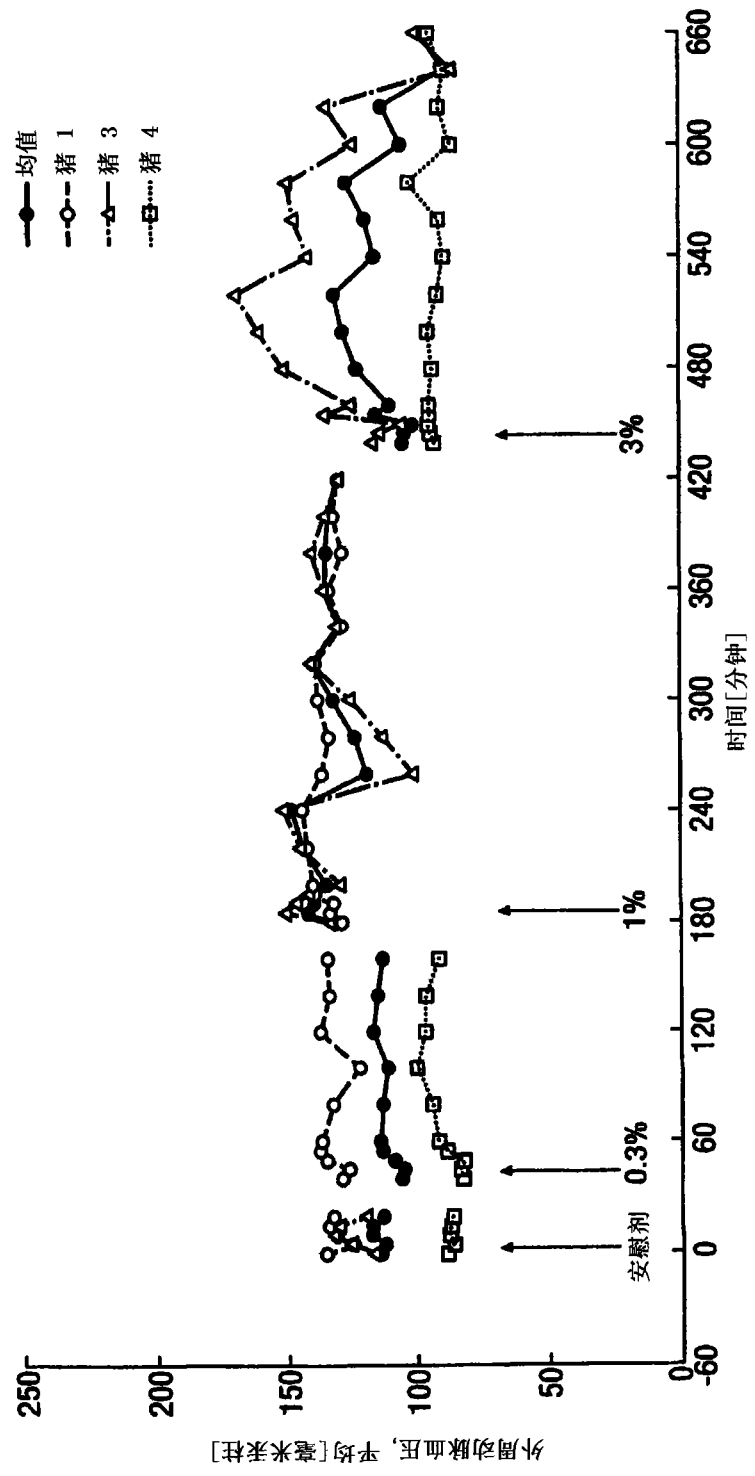


图 19

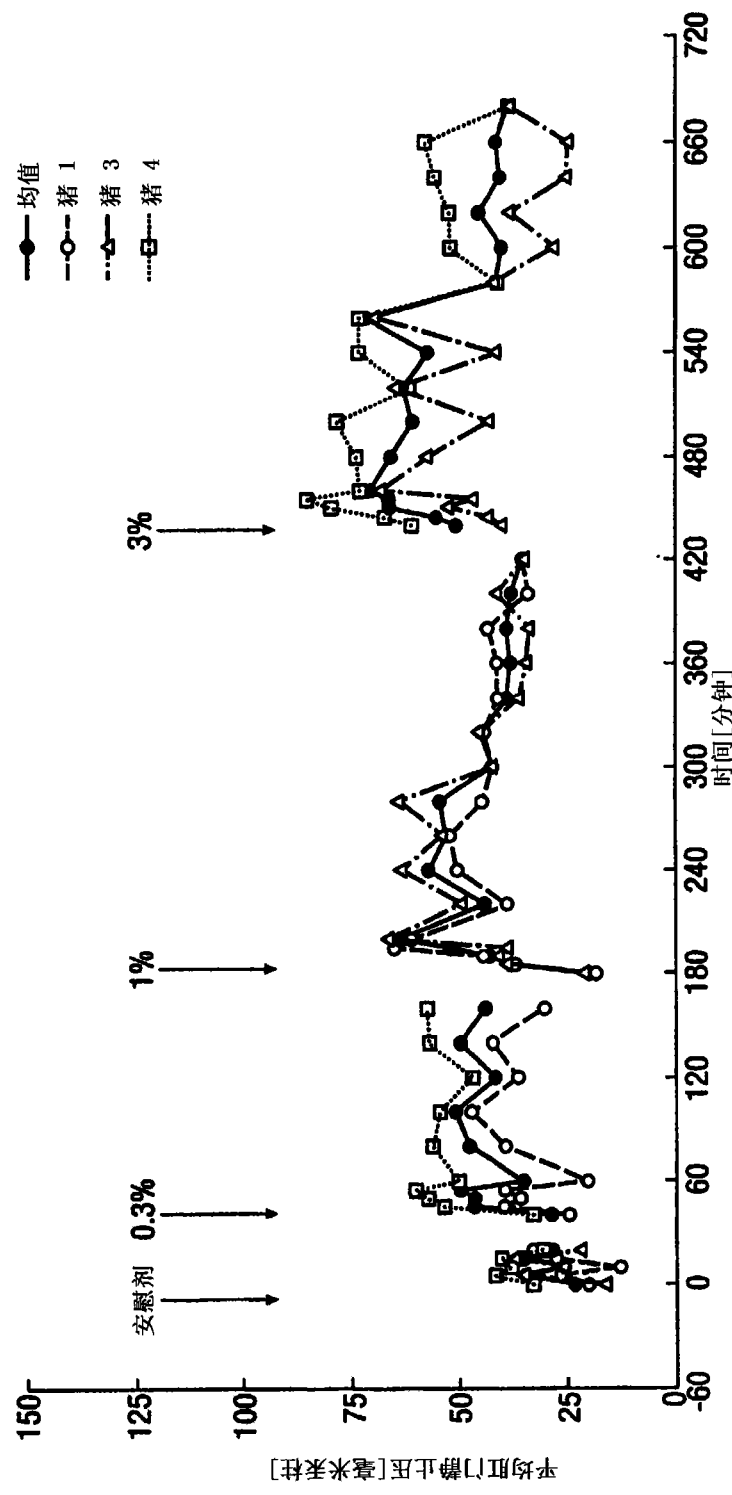


图 20

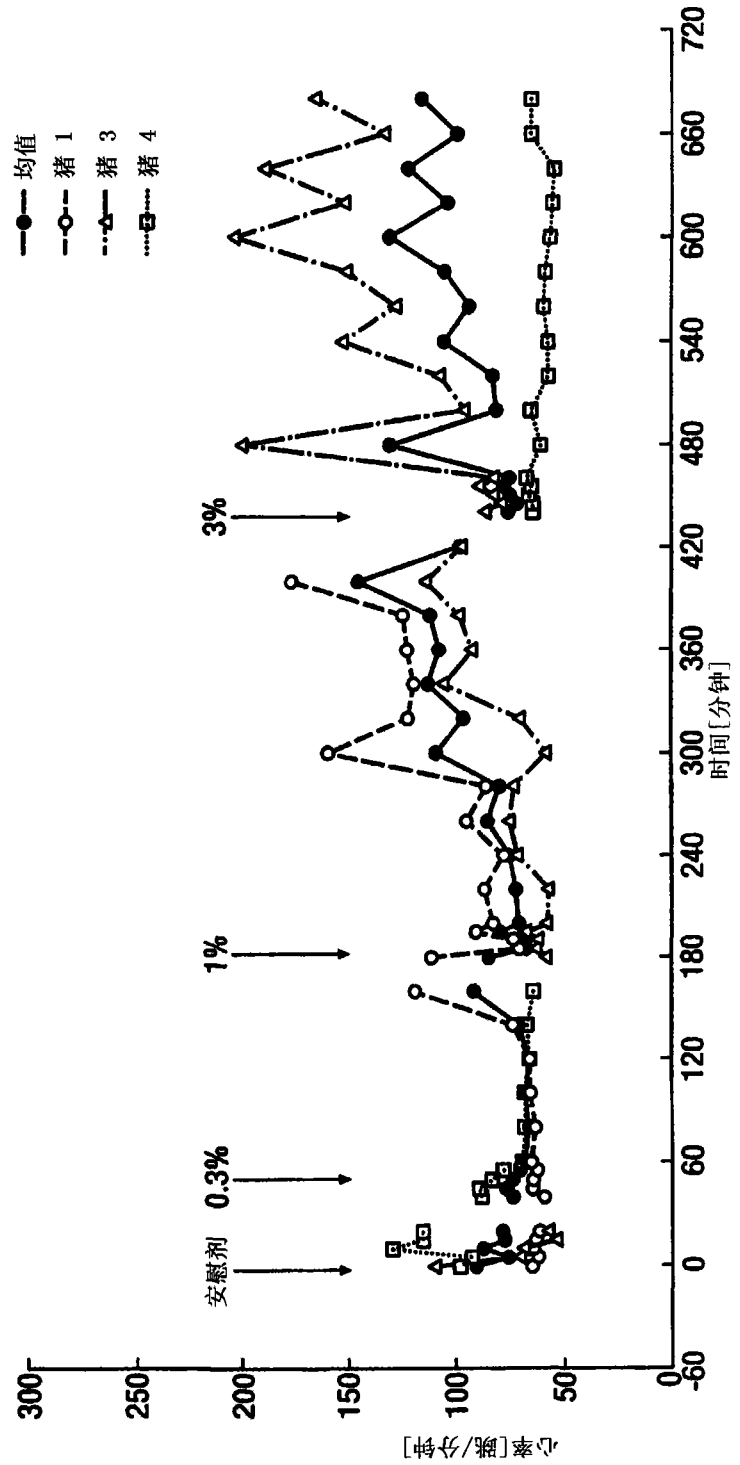


图 21