

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07D213/55



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01821324.3

C07D213/63 C07D239/32
C07D241/18 A61K 31/435
A61K 31/445 A61K 31/495
A61K 31/505 A61K 31/50

[43] 公开日 2004 年 8 月 11 日

[11] 公开号 CN 1520401A

[22] 申请日 2001. 10. 25 [21] 申请号 01821324. 3
[30] 优先权
[32] 2000. 10. 25 [33] US [31] 60/243,006
[86] 国际申请 PCT/US2001/046184 2001. 10. 25
[87] 国际公布 WO2002/038106 英 2002. 5. 16
[85] 进入国家阶段日期 2003. 6. 25
[71] 申请人 史密丝克莱恩比彻姆公司
地址 美国宾夕法尼亚州
[72] 发明人 普拉迪普·巴特纳加尔
乔尔·L·伯吉斯
詹姆斯·F·卡拉汉
玛丽亚·A·拉戈

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 贾静环 宋 莉

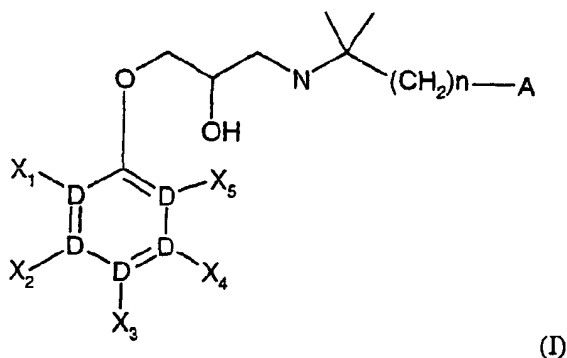
权利要求书 2 页 说明书 15 页

[54] 发明名称 钙离子阻断化合物
[57] 摘要

本发明提供了一种新的磷酸酯类化合物以及将其作为钙离子阻断化合物应用的方法。

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

1、具有下述通式(I)的化合物或其药学上可接受的盐:



5

其中:

A 是芳基或稠合的芳基、二氢或四氢稠合的芳基、杂芳基或稠合的杂芳基、二氢或四氢稠合的杂芳基, 它们是未取代的或被选自 OH、卤素、C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基、C₃₋₆环烷基、CF₃、OCF₃、CN 和 NO₂ 的基团取代的;

10 D 是 C 或 N, 在环中具有 1-2-N, 条件是: 当 D 为 N 时, X₁-X₅ 不存在; X₁ 和 X₅ 独立地选自氢、卤素、CN 和 NO₂, 条件是 X₁ 或 X₅ 是氢; 另外条件还有当 D 为 N 时, X₁ 和 X₅ 不存在;

X₂、X₃ 和 X₄ 选自氢、卤素、O-C₁₋₄烷基和 J-K, 其中:

J 是共价键、亚烷基、O-亚烷基或亚烯基; 和

15 K 选自 CO₂R₅、CONR₄R₄'、OH、NR₄R₄' 和 CN, 条件是当 D 是 N 时, X₂、X₃ 和 X₄ 不存在;

R₄ 和 R₄' 独立地是氢、烷基、芳基或杂芳基;

R₅ 是氢、烷基、烷基-(O-烷基)_m-O-烷基、芳基或杂芳基;

n 是 0-4 的整数; 和,

20 m 是 1-3 的整数。

2、按照权利要求 1 所述的化合物, 所述化合物选自:

3-{6-氰基-5-[(R)-2-羟基-3-(2-茚满-2-基-1,1-二甲基-乙基氨基)-丙氧基]-吡啶-2-基}-丙酸乙酯;

- 3-{6-氟基-5-[(R)-2-羟基-3-(2-茚满-2-基-1,1-二甲基-乙基氨基)-丙氧基]-吡啶-2-基}-丙酸;
- 3-(6-氟基-5-[(R)-2-羟基-3-[2-(4-甲氧基-苯基)-1,1-二甲基-乙基氨基]-丙氧基]-吡啶-2-基)-丙酸乙酯;
- 5 3-(6-氟基-5-[(R)-2-羟基-3-[2-(4-甲氧基-苯基)-1,1-二甲基-乙基氨基]-丙氧基]-吡啶-2-基)-丙酸;
- 3-(6-氟基-5-[(R)-2-羟基-3-[2-(4-甲氧基-苯基)-1,1-二甲基-丁基氨基]-丙氧基]-吡啶-2-基)-丙酸乙酯; 和
- 3-(6-氟基-5-[(R)-2-羟基-3-[2-(4-甲氧基-苯基)-1,1-二甲基-丁基氨基]-丙氧基]-吡啶-2-基)-丙酸。
- 10 3、一种拮抗钙受体的方法，其包括给有所需要的受试主体服用有效量的权利要求 1 所述的化合物。
- 4、一种治疗特征为骨或矿物质体内平衡异常的疾病或失调的方法，其包括给有所需要的受试主体服用有效量的权利要求 1 所述的化合物。
- 15 5、按照权利要求 4 所述的方法，其中骨或矿物质疾病或失调选自骨肉瘤、牙周病、骨折愈合、骨关节炎、关节复位、风湿性关节炎、Paget 氏疾病、体液性血钙过多、恶性肿瘤和骨质疏松。
- 6、按照权利要求 5 所述的方法，其中骨或矿物质疾病或失调是骨质疏松。
- 20 7、按照权利要求 6 所述的方法，其中化合物与抗吸收剂联合应用。
- 8、按照权利要求 7 所述的方法，其中抗吸收剂选自雌激素、1,25-二羟基维生素 D3、降血钙素、选择性雌激素受体调节剂、血浆糖蛋白受体拮抗剂、V-H⁺-ATP 酶抑制剂、src SH2 拮抗剂、二磷酸和组织蛋白酶 K 抑制剂。
- 9、一种增加血清甲状旁腺量的方法，其包括给有所需要的受试主体服用有效量的权利要求 1 所述的化合物。
- 25 10、按照权利要求 9 所述的方法，其中化合物与抗吸收剂联合应用。
- 11、按照权利要求 10 所述的方法，其中抗吸收剂选自雌激素、1,25-二羟基维生素 D3、降血钙素、选择性雌激素受体调节剂、血浆糖蛋白受体拮抗剂、V-H⁺-ATP 酶抑制剂、src SH2 拮抗剂、二磷酸和组织蛋白酶 K 抑制剂。
- 30 剂。

钙离子阻断化合物

5 发明领域

本发明涉及一种新的钙离子阻断化合物(calcilytic compound), 含有该化合物的组合物及其作为钙受体拮抗剂的应用。

在哺乳动物中, 细胞外 Ca^{2+} 处于严格的体内平衡控制下, 调节着诸如凝血、中枢和肌肉的兴奋性、适当的骨形成等多种过程。细胞外 Ca^{2+} 抑制了甲状旁腺细胞分泌甲状旁腺激素(“PTH”), 抑制了碎骨细胞的吸收, 并且刺激了 C-细胞分泌降钙素。钙受体蛋白能够使得某些特异性细胞来响应细胞外 Ca^{2+} 浓度的改变。

PTH 是血液和细胞外液中调节体内 Ca^{2+} 平衡的主要内分泌因子。PTH, 通过作用于骨和肾细胞, 增加了血液中 Ca^{2+} 的水平。这种细胞外 Ca^{2+} 的增加会起负反馈信号的作用, 抑制 PTH 的分泌。细胞外 Ca^{2+} 和 PTH 分泌之间的这种成反比的关系形成了一个重要的维持体内 Ca^{2+} 平衡的机理。

细胞外 Ca^{2+} 直接作用于甲状旁腺细胞来调节 PTH 的分泌。检测细胞外 Ca^{2+} 的变化的甲状旁腺细胞表面蛋白的存在已经得到确认。见 Brown 等, Nature 366: 574, 1993。在甲状旁腺细胞中, 这种蛋白即钙受体起细胞外 Ca^{2+} 受体的作用, 能检测到细胞外 Ca^{2+} 离子浓度的改变, 引发细胞的响应功能, 即 PTH 的分泌。

细胞外 Ca^{2+} 影响多种细胞功能, 综述在 Nemeth 等的 Cell Calcium 11: 319, 1990 文献中。例如, 细胞外 Ca^{2+} 在滤泡旁(C-细胞)和甲状旁腺细胞中起重要作用。参见 Nemeth 的 Cell Calcium 11: 323, 1990。已经研究了细胞外 Ca^{2+} 对碎骨细胞的作用。参见 Zaidi 的 Bioscience Reports 10: 493, 1990。

已经发现多种化合物可模仿出细胞外 Ca^{2+} 对钙受体分子的效果。钙离子阻断化合物是能够抑制钙受体活性, 导致由细胞外 Ca^{2+} 引起的一个或多个钙受体活性降低的化合物。钙离子阻断化合物在钙受体调节剂的发现、发展、设计、修饰和/或构造中用作先导(lead)分子, 其对 Ca^{2+} 受体表现出活性。钙离子阻断化合物可用于治疗多种疾病, 这些疾病的特征为: 一种或多种成分的量异常, 这些成分例如为多肽, 如激素, 酶或生长因子, 它

们的表达和 / 或分泌受在一个或多个 Ca^{2+} 受体上的活性的调节或影响。钙离子阻断化合物的目标疾病或失调包括骨和矿物质的体内平衡异常 (abnormal bone and mineral homeostasis)。

- 钙体内平衡异常的特征为具有一个或多个下列活性：血清中钙的异常
- 5 增加或减少；排泌尿中钙的异常增加或减少；骨钙水平(例如，按照骨矿物质密度测量得到的)的异常增加或减少；饮食中钙的异常吸收；影响血清中钙量的信使如 PTH 和降血钙素的产生和 / 或释放的异常增加或减少；由影响血清中钙量的信使引起的响应中的异常改变。

- 因此，钙受体拮抗剂提供了一种独特的对与骨或矿物质体内平衡异常
- 10 有关的疾病或失调的药物治疗方法，所述疾病或失调例如甲状旁腺功能减退、骨肉瘤、牙周病、骨折康复、骨关节炎、风湿性关节炎、Paget 氏疾病，恶性肿瘤和骨折康复所致的体液性血钙过多以及骨质疏松。

发明内容

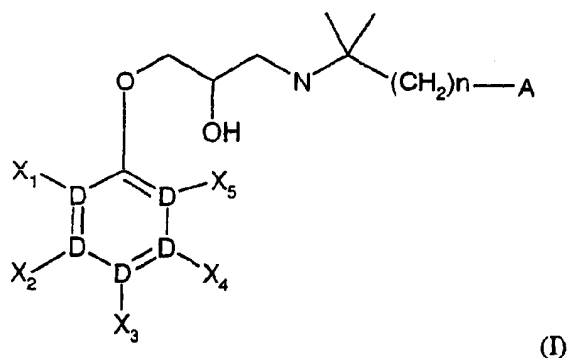
- 15 本发明包括下文通式(I)表示的新的钙受体拮抗剂，以及其作为钙受体拮抗剂在治疗与骨或矿物质体内平衡异常有关的疾病中的应用，所述疾病包括但不限于甲状旁腺功能减退、骨肉瘤、牙周病、骨折康复、骨关节炎、风湿性关节炎、Paget 氏疾病，恶性肿瘤和骨折康复所致的体液性血钙过多以及骨质疏松。

- 20 本发明还提供一种拮抗哺乳动物(包括人)体内钙受体的方法，其包括给有所需要的动物服用有效量的下文所述的通式(I)化合物。

本发明还提供一种增加哺乳动物(包括人)体内血清中甲状旁腺量的方法，其包括给有所需要的动物服用有效量的下文所述的通式(I)化合物。

- 25 发明详述

本发明的化合物选自下述通式(I)：



其中：

- A 是芳基或稠合的芳基、二氢或四氢稠合的芳基、杂芳基或稠合的杂芳基、二氢或四氢稠合的杂芳基，它们是未取代的或被选自 OH、卤素、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷基、CF₃、OCF₃、CN 和 NO₂ 的基团取代的；
- D 是 C 或 N，在环中具有 1-2-N，条件是：当 D 为 N 时，X₁-X₅ 不存在；X₁ 和 X₅ 独立地选自氢、卤素、CN 和 NO₂，条件是或者 X₁ 或者 X₅ 是氢；另外条件还有当 D 为 N 时，X₁ 和 X₅ 不存在；
- 10 X₂、X₃ 和 X₄ 选自氢、卤素、O-C₁₋₄ 烷基和 J-K，其中：
- J 是共价键、亚烷基、O-亚烷基或亚烯基；和
- K 选自 CO₂R₅、CONR₄R₄'、OH、NR₄R₄'和 CN，条件是当 D 是 N 时，X₂、X₃ 和 X₄ 不存在；
- R₄ 和 R₄'独立地是氢、烷基、芳基或杂芳基；
- 15 R₅ 是氢、烷基、烷基-(O-烷基)_m-O-烷基、芳基或杂芳基；
- n 是 0-4 的整数；和，
- m 是 1-3 的整数。

- 本文中所述“烷基”指的是任选取代的由碳-碳单键连接形成的并且含有 1-20 个碳原子的烃基。烷烃可以是饱和的或不饱和的直链、支链或环状。
- 20 优选的，任选取代的烷基上的取代基选自芳基、CO₂R、CO₂NHR、OH、OR、CO、NH₂、卤素、CF₃、OCF₃ 和 NO₂，其中 R 是 H、C₁₋₄ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、C₂₋₅ 烯基、C₂₋₅ 炔基、杂环烷基或芳基。另外的取代基选自 F、Cl、Br、I、N、S 和 O。优选取代基不多于 3 个。更优选，烷基具有 1-12 个碳原子并且

是未取代的。优选烷基是直链烷基。

本文中所述“环烷基”指的是任选取代的 3-7 元碳环，除非另外说明，其中的取代基选自 F、Cl、Br、I、N(R₄)₂、SR₄ 和 OR₄。

本文中所述“芳基”指的是任选取代的具有至少一个共轭 π 电子体系的环的芳族基团，该芳族基团最多包含两个共扼或稠合的环系。芳基包括碳环芳基和双芳基基团，均可被任选取代。优选的芳基包括苯基和萘基。更优选的芳基包括苯基。优选的取代基选自卤素、C₁₋₄ 烷基、OCF₃、CF₃、OMe、CN、OSO₂R 和 NO₂，其中 R 是 C₁₋₄ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基。

本文中所述的“杂芳基”指的是含有 1、2 或 3 个诸如 N、S 或 O 杂原子的芳环。

本文中所述的“烯基”指的是任选取代的包含至少一个碳-碳双键并且含有多至 5 个碳原子的烃基。烯烃链可以是直链、支链或环状。任意的取代基选自卤素、C₁₋₄ 烷基、OCF₃、CF₃、OMe、CN、OSO₂R 和 NO₂，其中 R 是 C₁₋₄ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基。

本文中所述的“炔基”指的是任选取代的包含至少一个碳-碳三键并且含有多至 5 个碳原子的烃基。炔烃链可以是直链、支链或环状。任意的取代基选自卤素、C₁₋₄ 烷基、OCF₃、CF₃、OMe、CN、OSO₂R 和 NO₂，其中 R 是 C₁₋₄ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基。

本发明的化合物可以包括一个或多个不对称碳原子，也可以消旋或立体活性形式存在。所有这些化合物及其非对映异构体均在本发明范围之内。

本发明的优选化合物包括：

3-{6-氰基-5-[(R)-2-羟基-3-(2-茚满(indan)-2-基-1,1-二甲基-乙基氨基)-丙氧基]-吡啶-2-基}-丙酸乙酯；

3-{6-氰基-5-[(R)-2-羟基-3-(2-茚满-2-基-1,1-二甲基-乙基氨基)-丙氧基]-吡啶-2-基}-丙酸；

3-(6-氰基-5-{(R)-2-羟基-3-[2-(4-甲氧基-苯基)-1,1-二甲基-乙基氨基]-丙氧基}-吡啶-2-基)-丙酸乙酯；

3-(6-氰基-5-{(R)-2-羟基-3-[2-(4-甲氧基-苯基)-1,1-二甲基-乙基氨基]-丙氧基}-吡啶-2-基)-丙酸；

3-(6-氰基-5-{(R)-2-羟基-3-[2-(4-甲氧基-苯基)-1,1-二甲基-丁基氨基]-丙氧基}-吡啶-2-基)-丙酸乙酯；和

3-(6-氰基-5-{{(R)-2-羟基-3-[2-(4-甲氧基-苯基)-1,1-二甲基-丁基氨基]-丙氧基}-吡啶-2-基)-丙酸。

药学上可接受的盐是在其服用时数量和浓度下没有毒性的盐。

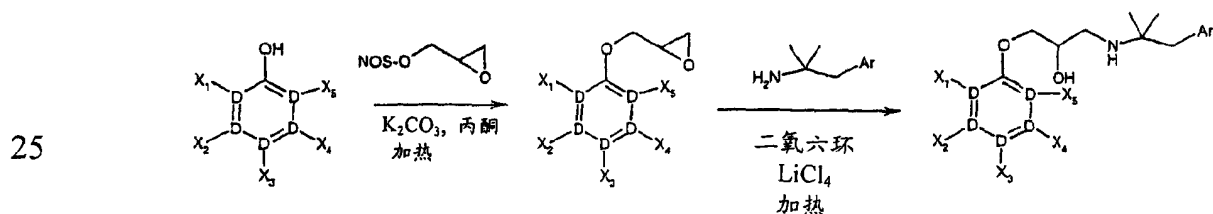
药学上可接受的盐包括酸加成盐，如硫酸盐、盐酸盐、富马酸盐、马来酸盐、磷酸盐、氨基磺酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、环己基氨基磺酸盐和奎尼酸盐。优选的盐是盐酸盐。药学上可接受的盐可以通过如盐酸、马来酸、硫酸、磷酸、氨基磺酸、醋酸、柠檬酸、乳酸、酒石酸、丙二酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、环己基氨基磺酸和奎尼酸获得。

药学上可接受的盐也包括当存在酸性官能团如羧酸或羟基时，与诸如苺星(benzathine)、氯普鲁卡因(chloroprocaine)、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、甲葡胺(meglumine)、普鲁卡因、铝、钙、锂、镁、钾、钠、铵、烷基胺和锌形成的碱加成盐。

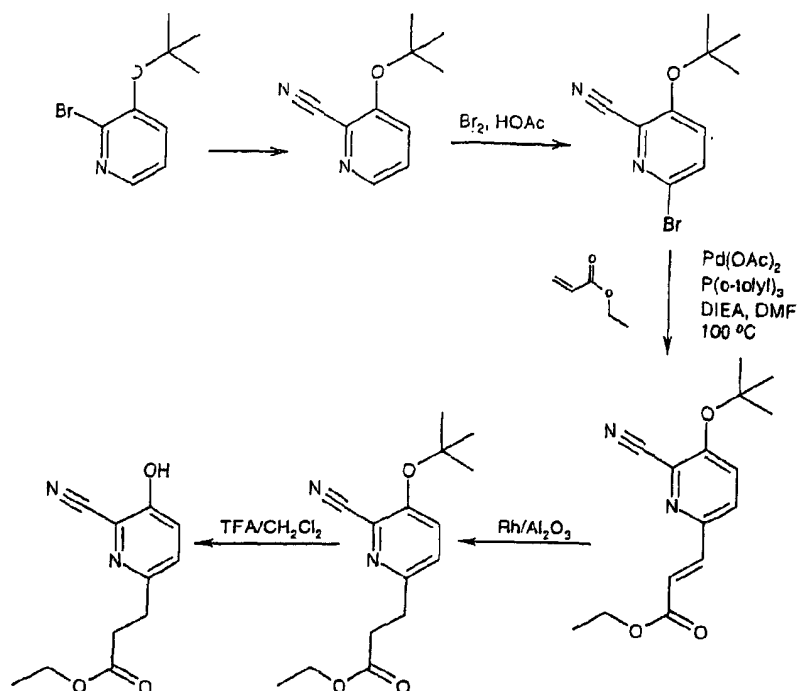
本发明提供的通式(I)化合物可以采用标准的工艺来制备。制备优选化合物的方法可以按照下述内容进行。接下来的实施例举例说明了具体化合物的合成方法。根据本文所描述的方案，将其作为模型，本领域普通技术人员可以容易地生产出本发明所述的其他化合物。

本文中所用的试剂和溶剂都是购得的，起始材料可以通过标准工艺和步骤合成得到。

流程图 1



流程图 2



一般制备方法

- 5 按照流程图 1, 根据该一般的步骤, 可以合成许多本发明的化合物:
- 杂芳基酚的丙酮溶液用适当的碱如碳酸钾处理, 加热 15 分钟。加入 R-缩水甘油基-O-SO₂N(R-glycidyl nosylate), 持续反应过夜, 得到相应的缩水甘油基醚(流程图 1)。取代的缩水甘油基醚和过量的胺(例如 1,1-二甲基-2-(4-甲氧苯基)乙胺)在无水乙醇、乙腈、THF、二氧六环(dioxane)、甲苯或其他类似溶剂中形成的溶液, 在 LiClO₄ 等合适的催化剂的存在下, 搅拌、回流过夜。
- 10 产品通过色谱纯化。盐酸盐可以通过向相应的碱中加入氯化氢气体或氯化氢的 4M 的二氧六环溶液来制得, 或也可以采用其他标准方式制得。流程图 2 说明了杂芳基酚的典型制法。2-溴-吡啶-3-酚与异丁烯的二氯甲烷溶液在硫酸的作用下反应得到相应的叔丁醚, 将其和氰化锌 Zn(CN)₂ 在钯催化剂下作用得到 3-叔丁氧基-吡啶-2-腈。进行选择性溴化得到 6-溴-3-叔丁氧基-吡啶-2-腈。用丙烯酸乙酯进行 Heck 偶合, 然后进行选择性还原, 得到 3-(5-叔丁氧基-6-氰基-吡啶-2-基)-丙酸乙酯, 接着用 TFA 脱保护得到 3-(5-羟基-6-氰基-吡啶-2-基)-丙酸乙酯。
- 15

为了将通式(I)的化合物或其药学上可接受的盐用于人和其他哺乳动

物，采用标准的制药操作，按照一般的方法将其配制成药物组合物。

钙离子阻断化合物可以通过不同的途径给药，包括静脉、腹膜、皮下、肌内、口服、局部(经皮)或粘膜给药。对于全身给药，优选口服方式。对于口服给药，化合物例如能够配制成常规的口服剂型如胶囊、片剂和液体制剂形式如糖浆、酏剂和滴剂等。

可选的，注射剂(非肠胃给药)可以用于例如肌内、静脉、腹膜和皮下。作为注射剂，本发明的化合物配制成溶液，优选配制在生理上相容的缓冲剂或溶液如生理盐水、Hank 溶液或 Ringer 溶液中。另外，化合物也可以配制成固体形式，使用前重新溶解或悬浮后，然后立即使用。冻干剂(lyophilized form)也可以应用。

全身服用(systemic administration)也可以通过经皮或粘膜方式给药。对于经皮或粘膜给药，在制剂中加入适宜将药物透过要穿透的屏障的渗透剂。这种渗透剂是本领域已知的，例如包括；用于粘膜给药的胆汁酸盐和梭链孢酸(fusidic acid)衍生物。另外，净化剂也可用来促进渗透。粘膜给药可以通过诸如鼻喷雾器、直肠栓剂或阴道栓剂等方式。

对于局部给药，本发明的化合物可以配制成本领域常用的药膏(ointment)、软膏(salve)、凝胶(gel)或乳膏(cream)等剂型。

各种钙离子阻断化合物的用量可以通过标准步骤，考虑到如化合物的 IC_{50} 、 EC_{50} 、化合物的生物半衰期、病人的年龄、身高和体重以及病人所患病症的因素来确定，这些因素以及其他要考虑的因素的重要性对于本领域普通技术人员而言是已知的。

服用剂量也依赖于服用方式和生物利用度。例如，对于口服生物利用度低的化合物，服用时所用的剂量将相应的增加。

组合物优选是单位剂量形式。对于口服方式，可以采用片剂或胶囊，对于鼻用方式，可采用可计量的气雾剂剂型，对于经皮给药，可以采用局部用制剂或贴片，对于粘膜给药方式，可以采用口腔贴片。对于每一种情况，制剂都要使得患者能够服用一个剂型。

对于口服给药，每个剂量单位适宜包含 0.01-500mg/Kg，优选 0.1-50mg/Kg 的通式(I)化合物或其药学上可接受的盐，按游离碱计算。对于肠胃外给药、鼻内给药、口服吸入给药、粘膜给药或经皮给药途径，每日剂量适宜包含 0.01-100mg/Kg 的通式(I)化合物。局部用制剂适宜包含

0.01-5.0%的通式(I)化合物。活性成分可以每天给服例如 1-6 次,优选一天一次,要足以产生所需的活性,这对于本领域技术人员来说是清楚的。

本文中所述的“治疗”疾病包括但不限于防止、延缓和预防疾病。

可被治疗或预防的疾病和失调,基于受侵袭的细胞,包括与骨和矿物质有关的疾病或失调;甲状旁腺机能减退;中枢神经系统疾病,如发作()、发作综合征(stroke)、头部创伤、脊髓损伤、缺氧引起的神经细胞受损如心动停止或新生儿呼吸窘迫(neonatal distresss)时发生的那些情况、癫痫、神经退化疾病如阿尔茨海默疾病、亨廷顿病和帕金森氏症、痴呆、肌肉紧张、抑郁、焦虑、恐慌(panic disorder)、强迫观念和行为的疾病,外伤后紧张性刺激(post-traumatic stresss disorder),精神分裂症、抗精神病药的恶性综合征和 Tourette 综合征;涉及过量水由肾吸收的疾病如 ADH 分泌失调综合症(SIADH)、(肝)硬化、充血性心力衰竭和肾(变)病;高血压;预防和/或减少来自阳离子抗生素(例如氨基糖苷类抗生素)的肾脏毒性;消化道能动性失调(gut motility disorders)如腹泻和结肠痉挛(spastic colon); GI 溃疡;具有过
10 量钙吸收的 GI 疾病例如肉状瘤病(sarcoidosis);自身免疫系统疾病和器官移植的排斥反应;鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma);以及胰腺炎(pancreatitis)。
15

在本发明的优选实施方案中,本发明的化合物被用于增加血清中甲状旁腺激素(“PTH”)水平。增加血清中 PTH 水平有助于治疗诸如甲状旁腺功能
20 失调(hypoparathyroidism)、骨肉瘤(osteosarcoma)、牙周病(periodontal disease)、骨折愈合、骨关节炎、关节复位(joint replacement)、风湿性关节炎、Paget 氏疾病、体液性血钙过多(humoral hypercalcemia)、恶性肿瘤(malignancy)和骨质疏松等疾病。

在本发明的优选实施方案中,本发明的化合物与抗吸收剂
25 (anti-resorptive agent)联合应用。这种药剂包括但不限于雌激素、1,25-二羟基维生素 D3、降血钙素(calcitonin)、选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen recaptor modulators)、血浆糖蛋白(vitronectin)受体拮抗剂、V-H⁺-ATP 酶抑制剂、src SH2 拮抗剂、二膦酸类(bisphosphonates)和组织蛋白酶
(cathepsin)K 抑制剂。

30 本发明的另一方面还公开了一种治疗患者的方法,该方法包括给患者服用足以增加血清中 PTH 水平量的本发明化合物。优选,该方法是给患者

服用有效量的化合物，以有效增加血清中 PTH 水平的持久性和 / 或数量，从而产生治疗效果。

在各种实施方案中，给患者服用的本发明化合物可以使血清中 PTH 水平持续增加高至 1 小时，约 1-约 24 小时，约 1-约 12 小时，约 1-约 6 小时，
5 约 1-约 5 小时，约 1-约 4 小时，约 2-约 5 小时，约 2-约 4 小时，或者约 3-约 6 小时。

在本发明可供选择的实施方案中，给患者服用的本发明化合物可以使血清中 PTH 水平增加持续约 24 小时以上，条件是本发明的化合物和抗再吸收剂联合给药。

10 在另外的不同的实施方案中，给患者服用的本发明化合物使血清中 PTH 水平比病人的血清中 PTH 最高值增加高至 2 倍，2-5 倍，5-10 倍，以及至少 10 倍。血清中 PTH 最高值是在病人没有进行治疗的时候测定的。

通式(I)化合物及其药学上可接受的盐作为活性物质在口服服用时，可以制成糖浆、片剂、胶囊和锭剂等剂型。糖浆剂通常是化合物或盐在液体
15 载体中的悬浮液或溶液，其中的液态载体例如乙醇，花生油，橄榄油，甘油或水，其中还含有矫味剂或着色剂。当组合物是片剂形式时，通常用于制备固体剂型的药物载体都可以应用。这些载体的实例包括硬脂酸镁，高岭土(terra alba)，滑石，明胶，阿拉伯胶，硬脂酸，淀粉，乳糖和蔗糖。当组合物是胶囊形式时，任何常规的包封材料都是可用的，例如在硬明胶壳
20 时使用上述载体。当组合物是软明胶壳胶囊形式时，常规的用于制备分散体或悬浮液的任何药用载体都是可用的，例如含水(树)胶，纤维素，硅酸盐或油，将它们加入到软明胶胶囊壳中。

典型的非肠胃给药的组合物的组成为化合物或其盐在一种灭菌的含水或不含水的载体中的溶液或悬浮液，其任选地含有肠胃外可接受的油，例
25 如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、卵磷脂(lecithin)、花生油(arachis oil)或芝麻油。

典型的用于吸入的组合物是溶液、悬浮液或乳液的形式，它们可以通过干粉形式给药，或者采用诸如二氯二氟甲烷或三氯氟代甲烷的常规推进剂的气雾剂形式给药。

30 典型的栓剂含有在以这种形式给药时作为活性物质的通式(I)化合物或其药学上可接受的盐，以及粘合剂和 / 或润滑剂，例如聚二醇类，明胶，

可可脂或其他低熔点的植物蜡或脂肪或它们的合成的类似物。

典型的真皮(dermal)和经皮剂型含有常规的水或非水载体,例如乳膏、药膏、洗液或糊剂形式,它们是药用的膏药、贴剂或膜剂形式。

5 优选,本发明的组合物为单位剂量形式,例如片剂、胶囊或可计量气雾剂形式,这样病人可以服用单一的剂量。

当根据本发明进行给药时,本发明的化合物没有不可接受的毒性作用。

通式(I)化合物的生物活性可以通过下列试验证明:

(I)钙受体拮抗剂试验

10 钙离子阻断化合物的活性可以通过测定待测化合物阻断稳定表达人钙受体的 HEK 293 4.0-7 细胞中的由细胞外 Ca^{2+} 引起的细胞内 Ca^{2+} 的增加所致的 IC_{50} 来进行确定。HEK 293 4.0-7 细胞可以通过 Rogers 等人在 J. Bone Miner. Res. 10 Suppl. 1: S483, 1995(在此引入作为参考文献)中记载的方法构建。细胞内 Ca^{2+} 的增加可以由细胞外 Ca^{2+} 的浓度从 1 到 1.75mM 的增加而引起。细胞内 Ca^{2+} 可以采用荧光-3(fluo-3), 一种荧光性钙指示剂来测定。

15 方法如下:

1. 在 T-150 烧瓶中, 将细胞在 5% 二氧化碳: 95% 空气中, 37°C 下, 采用选择培养基(DMEM 中补充 10% 胎牛血清和 200ug/ml 的潮霉素 B)培养, 融合生长到高达 90%。

20 2. 保持温度在 37°C, 缓慢倒出培养液, 用磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗涤细胞单层两次。第二次洗后, 加入 6mL 的 0.02% EDTA 的 PBS 溶液, 在 37°C 培养 4 分钟。培养以后, 通过缓慢搅拌来分散细胞。

3. 集中 2 或 3 个烧瓶中的细胞, 球化(pellet)(100 x g), 将细胞球(cellular pellet)再次悬浮在 10-15mL 的 SPF-PCB+ 中, 通过离心分离再次球化。洗涤两次。

25 无硫酸或磷酸的甲状旁腺细胞缓冲剂(SPF-PCB)含有 20mM 为 pH7.4 的 Na-Hepes、126mL 的氯化钠、5mM 氯化钾和 1mM 氯化镁。SPF-PCB 在 4°C 制备和储存。使用的当天, 补充加入 1mg/mL 的 D-葡萄糖和 1mM 氯化钙, 然后分成两部分。一部分中加入 5mg/mL(SPF-PCB +)的牛血清蛋白(BSA; 部分 V, ICN)。该缓冲液被用来洗涤、载荷和保持细胞。没有 BSA
30 的部分用来稀释试管中的用于荧光检测的细胞。

4. 用 10mL 含有 2.2uM 的荧光-3(分子化探针)的 SPF-PCB + 将细胞球

重新悬浮，在室温下培养 35 分钟。

5. 培养后，通过离心分离将细胞球化。得到的细胞球用 SPF-PCB + 洗涤。洗毕，用 SPF-PCB + 将细胞球再次悬浮，密度为 $1-2 \times 10^6$ 细胞 / mL。

6. 为了记录荧光信号，用 1.2mL 含有 1mM 氯化钙和 1mg/mL 的 D-葡萄糖的 SPF 缓冲液稀释 300uL 的细胞悬浮液。荧光的测量是在 37℃ 恒速搅拌下用分光荧光计(spectrofluorimeter)测得。激发和发射波长分别在 485 和 535nm 测得。为了校正荧光信号，加入洋地黄皂苷(digitonin)(在乙醇中浓度为 5mg/mL)得到 $F_{\max}$ ，通过加入 Tris-EGTA(2.5M Tris-Base, 0.3M EGTA)得到表观 $F_{\min}$ 。细胞内钙的浓度通过下式计算得到：

10 细胞内钙浓度 = $(F - F_{\min} / F_{\max}) \times K_d$ ；在此 $K_d = 400\text{nm}$ 。

7. 为了确定待测化合物潜在的钙离子阻断化合物活性，在将细胞外 Ca^{2+} 浓度从 1 增加到 2mM 之前，将细胞和待测化合物(或作为对照物的载体)共同培养 90 秒钟。以浓度依赖性方式，测定钙离子阻断化合物阻断由细胞外 Ca^{2+} 引起的细胞内 Ca^{2+} 浓度增加的能力。

15 通常，在钙受体拮抗抑制剂试验中具有较低的 IC_{50} 值的化合物是更优选的化合物。认为 IC_{50} 值大于 50uM 的化合物是没有活性的， IC_{50} 值为 10uM 或更小的化合物是优选的，更优选的是 IC_{50} 值为 1uM，最优选的是 IC_{50} 值为 0.1uM 或更小的化合物。

(II)钙受体结合作用试验

20 被人甲状旁腺钙受体(“HuPCaR”)稳定转染的 HEK293 4.0-7 细胞在 T180 组织培养烧瓶中成倍放大。在缓冲液(50mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 3mM 氯化镁)中，在包含 $1\mu\text{M}$ Leupeptin、 $0.04\mu\text{M}$ Pepstatin 和 1mM PMSF 的蛋白酶抑制剂混合物(cocktail)的存在下，通过多元均浆作用(polytron homogenization)或玻璃杜恩斯匀浆作用(glass douncing)获得血浆

25 薄膜。等份的薄膜被速冻，在 -80℃ 保存。 ^3H 标记的化合物经放射性同位素示踪为 44Ci/mmol 的放射性活性(radiospecific activity)，为了维持放射化学的稳定性，将其等分并储存在液氮中。

在 0.5mL 的反应容器中，在含有 0.1% 明胶和 10% 乙醇的均浆缓冲液中，典型的反应混合物含有 2nM ^3H 化合物((R,R)-N-4'-甲氧基-t-3-3'-甲基-1'-乙基苯基-1-(1-萘基)乙胺)，或 ^3H 化合物(R)-N-[2-羟基-3-(3-氯-2-氰基苯氧基)丙基]-1,1-二甲基-2-(4-甲氧基苯基)乙胺 4-10ug 薄膜。培养在冰水浴中进行，

30

采用 12 x 75 聚乙烯试管。向每个试管中加入 25 μ L 的测试样品的 100 % 乙醇溶液，接着加入 400 μ L 冷的培养缓冲液和 25 μ L 的 40nM 3 H-化合物的 100 % 乙醇溶液，最终浓度为 2nM。结合反应通过加入 50 μ L 的用培养缓冲液稀释的 80-200 μ g/mL HEK 293 4.0-7 薄膜而启动，在 4 $^{\circ}$ C 培养 30min。洗涤用缓冲液是含有 0.1 % PEI 的 50mM Tris-HCl。通过加入 100 倍过量的未标记的同族的配体(homologous ligand)产生非特异性结合，通常其是总结合量的 20 %。结合反应使用 Brandel Harvester, 通过快速过滤到 1 % PEI 预处理的 GF/C 过滤器(filter)中而终止反应。。将过滤器放在闪烁液体中，并通过液态闪烁计数器来评估其放射性。

10

实施例

核磁共振波谱采用 Bruker AM 250 或 Bruker AM 400 波谱仪，相应地在 250 或 400MHz 频率下测得。CDCl₃ 是氘代氯仿，DMSO-d₆ 是六氘代二甲基亚砜，CD₃OD 是四氘代甲醇。化学位移以四甲基硅烷为内标物，以每百万分之一(*)来定义。NMR 数据中的缩写采用如下方式：s = 单峰，d = 二重峰，t = 三重峰，q = 四重峰，m = 多重峰，dd = 双二重峰，dt = 双三重峰，app = 锐峰(apparent)，br = 宽峰。J 代表 NMR 中采用 Hertz 测得的偶合常数。连续红外波谱(IR)通过 Perkin-Elmer 683 红外分光光度计测定，傅里叶转换红外波谱(FTIR)在 Nicolet Impact 400 D 红外分光光度计中测定。IR 和 FTIR 波谱测得的是发射模式，波段位置以波长的导数为单位标记。质谱是使用快速原子轰击(FAB)或电子喷雾(ES)离子化技术在 VG 70 FE, PE Syx API III 或 VG ZAB HF 仪器上测定。元素分析在 Perkin-Elmer 240C 元素分析仪上测定。熔点在 Thomas-Hoover 熔点仪上测定，并且没有经过校正。所有的温度指的是摄氏温度。

Analtech Silica Gel GF 和 E. Merck Silica Gel 60 F-254 薄层板用于薄层色谱分析。在 E. Merck Kieselgel 60 (230-400 目)的硅胶上进行快速和重力色谱(flash and gravity chromatograph)。在 Rainin 或 Gilson 色谱仪上进行分析性和制备性的 HPLC。ODS 指的是十八烷基甲硅烷基衍生的硅胶色谱载体。5 μ Apex-ODS 指的是标称粒径为 5 μ 的十八烷基甲硅烷基衍生的硅胶色谱载体(Jones Chromatography, Littleton, Colorado 制备)。YMC ODS-AQ $\text{\textcircled{R}}$ 是一种 ODS 色谱载体(support)，是 YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan 的注册商标。PRP-1 $\text{\textcircled{R}}$

是一种聚(苯乙烯-二乙烯基苯)色谱载体, 是 Hamilton Co., Reno, Nevada 的注册商标。Celite®是一种由酸洗硅藻土硅胶(acid-washed diatomaceous silica)构成的过滤助剂, 是 Manville Corp., Denver, Colorado 的注册商标。

根据上述一般的合成方法, 合成了下列化合物:

5 实施例 1

3-(5-羟基-6-氟基-吡啶-2-基)丙酸乙酯的制备

a)2-溴-3-叔丁氧基吡啶

在-78℃, 硫酸的存在下, 用异丁烯的二氯甲烷溶液处理 2-溴-吡啶-3-酚, 然后回流条件下搅拌 18h。浓缩反应混合物, 在乙酸乙酯中的残余物用
10 5%的碳酸钠(水)洗涤, 干燥, 浓缩得到上述标题化合物。

b)3-叔丁氧基-吡啶-2-腈

采用 Maligres 等(四面体快报》40, 8193, 2000)记载的方法, 将在 DMF 中的实施例 1(a)化合物与氰化锌 $Zn(CN)_2$ 、 $Pd_2(dba)_3$ 和 DPPF 在 120℃反应 20 小时。浓缩反应混合物, 在乙酸乙酯中的残余物用 5%的碳酸钠(水)洗涤,
15 干燥, 浓缩, 通过快速色谱纯化得到上述标题化合物。

c)6-溴-3-叔丁氧基-吡啶-2-腈

将在醋酸中的实施例 1(b)化合物与 1 当量的溴(Br_2)在 0℃反应。在消耗掉所有的起始原料后, 通过加入硫代硫酸钠淬灭反应。浓缩反应混合物, 在乙酸乙酯中的残余物用 5%的碳酸钠(水)洗涤, 干燥, 浓缩, 通过快速色
20 谱纯化得到上述标题化合物。

d)3-(5-叔丁氧基-6-氟基-吡啶-2-基)-丙烯酸乙酯

将实施例 1(c)化合物、丙烯酸乙酯、醋酸钯($Pd(OAc)_2$)、 P (邻甲苯基)₃和 DIEA 在 DMF 中的混合物脱气并在 100℃加热 2h。冷却反应混合物, 用水稀释, 用二氯甲烷提取。干燥有机部分, 浓缩得到上述标题化合物。

25 e)3-(5-叔丁氧基-6-氟基-吡啶-2-基)-丙酸乙酯

将实施例 1(d)化合物和 10% Pd/C 的乙醇溶液在 60psi 压力下加 H_2 反应 2h。滤除催化剂, 浓缩滤液得到上述标题化合物。

f)3-(6-氟基-5-羟基-吡啶-2-基)-丙酸乙酯盐酸盐

实施例 1(e)的化合物的二氧六环(dioxane)溶液与 4N 的 HCl 的二氧六环
30 溶液在室温下反应 1h。浓缩反应液, 得到上述标题化合物, 为其盐酸盐。

实施例 2

3-[6-氟基-5-((R)-1-环氧乙烷基甲氧基)-吡啶-2-基]-丙酸乙酯

- 在干丙酮中的实施例 1(f)的化合物与(2R)-脱水甘油基 3-硝基苯磺酸酯的 1: 1 的混合物溶液, 用碳酸钾(3 当量)处理, 并在氩气保护下, 加热回流 18 h。冷却反应混合物, 过滤, 真空浓缩滤液, 通过快速柱层析纯化残余物
- 5 得到上述标题化合物。

实施例 3

2-茚满-2-基-1,1-二甲基-乙胺的制备

a) 茚满-2-基-乙酸甲酯

- 在冰浴中, 将茚满-2-基-乙酸(Lancaster, 20g, 0.11mol)的甲醇(200mL)溶液搅拌, 并冷却到 0-10°C, 通过滴加亚硫酸(二)氯(14.8g, 0.125mol)而进行反应。将混合物在室温搅拌 16h, 真空浓缩, 用乙酸乙酯溶解油状残余物,
- 10 用 2.5N 氢氧化钠, 水和盐水洗涤, 干燥(硫酸镁), 真空浓缩得到固化的标题化合物(21g, 97%)。

b) 1-茚满-2-基-2-甲基-丙-2-醇

- 在冰浴中, 将实施例 3(a)化合物(6.3g, 33mmol)的乙醚(ether)(150mL)溶液搅拌下滴加到 1.4 M 甲基锂的乙醚(100mL, 4.25eq)中。将混合物温热至室温, 搅拌 2h, 通过滴加饱和氯化铵溶液(150mL)来小心地终止反应。分离出水相, 用乙醚提取, 合并乙醚层, 用盐水洗涤, 干燥(硫酸镁), 真空浓缩,
- 15 得到油状的标题化合物, 静置可结晶(~89%)。

c) N-(2-茚满-2-基-1,1-二甲基-乙基)-乙酰胺

- 在冰浴中, 搅拌下, 向浓硫酸(1.7mL)和乙腈(6mL)的混合液中, 在 45min 内, 滴加实施例 3(b)化合物(3.3g, 17.3mmol)的冰醋酸(5mL)溶液。将混合物放至室温, 搅拌 16h, 倾倒进冰水中, 用乙酸乙酯提取。合并有机相, 用 2.5N 氢氧化钠、水和盐水洗涤, 干燥(硫酸镁), 真空浓缩, 得到油状残余物,
- 25 用己烷和几滴乙酸乙酯将其研磨(triturate), 加入晶种, 冷却得到固体, 过滤分离出固体, 得到棕褐色固体标题化合物(1.9g, 47%)。MS(ES) m/e 231.9 [M+H]⁺。将滤液真空浓缩, 另外得到油状标题化合物(1.5g, 37%)。

d) 2-茚满-2-基-1,1-二甲基-乙胺

- 将实施例 3(c)的化合物(6.5g, 28mmol)在乙二醇(170mL)中的混合物用
- 30 压碎的氢氧化钾球(pellets)(13g)处理, 搅拌、加热到 190°C, 持续 24h。将混合物倾倒进水中, 用乙酸乙酯提取。合并有机相, 用盐水洗涤, 用 1N 盐酸

提取。合并酸性提取液，用乙酸乙酯洗涤，用 2.5N 氢氧化钠碱化，用乙酸乙酯提取。合并有机提取物，用盐水洗涤，干燥(硫酸镁)，真空浓缩，得到上述标题化合物(3.2g, 60%)。MS(ES) m/e 190.6 $[M+H]^+$ 。

实施例 4

5 3-{6-氰基-5-[(R)-2-羟基-3-(2-茚满-2-基-1,1-二甲基-乙基氨基)-丙氧基]-吡啶-3-基}-丙酸乙酯盐酸盐的制备

将在无水乙醇中的 1: 1 的实施例 2 化合物和实施例 3(d)化合物的混合物搅拌，加热至回流进行 8h，冷却，真空浓缩。用二氯甲烷溶解残余物，并用 1.0N 的 HCl 的乙醚溶液酸化，得到上述标题化合物。

10 实施例 5

3-{6-氰基-5-[(R)-2-羟基-3-(2-茚满-2-基-1,1-二甲基-乙基氨基)-丙氧基]-吡啶-3-基}-丙酸的制备

在室温、氩气保护下，将实施例 4 化合物在乙醇和水(3: 1)中的溶液与 2.5N 氢氧化钠(1.1 当量)反应，搅拌过夜。真空除去乙醇，搅拌下，用 1N 盐酸调节 pH 到等电点。过滤收集沉淀出的固体，用水洗涤，真空干燥，得到上述标题化合物。