



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109748836 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201910083246.2

A61P 15/00(2006.01)

(22)申请日 2014.07.25

A61P 25/18(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 9/00(2006.01)

13183723.9 2013.09.10 EP

A61P 13/08(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61P 15/10(2006.01)

201480049927.2 2014.07.25

A61P 15/06(2006.01)

(71)申请人 奥布赛瓦股份公司

地址 瑞士布朗雷瓦特市

(72)发明人 A·乔列特

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 曲蕾

(51)Int.Cl.

C07D 207/22(2006.01)

A61K 31/40(2006.01)

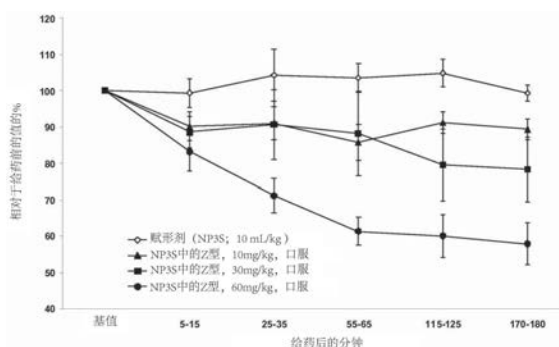
权利要求书1页 说明书24页 附图1页

(54)发明名称

作为催产素/加压素V1a受体拮抗剂的吡咯烷衍生物

(57)摘要

本发明涉及对催产素受体和/或加压素V1a受体具有拮抗作用的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物和/或其活性代谢物,涉及它们的制备方法、包含它们的药物组合物以及它们的用途。



1. 式 (3Z, 5S) -5- (羟基甲基) -1- [(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基) 羰基] 吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物。

2. 权利要求1的化合物, 其中所述化合物以基本上纯的形式提供。

3. 权利要求2的化合物, 其中基本上纯的形式的纯度为至少在85%至99.9%范围内。

4. 前述权利要求中任一项的化合物, 其中所述化合物是催产素受体拮抗剂。

5. 前述权利要求中任一项的化合物, 其中所述化合物是加压素V1a受体拮抗剂。

6. 前述权利要求中任一项的化合物, 其中所述化合物抑制子宫收缩。

7. 前述权利要求中任一项的化合物, 其中所述化合物以50mg至900mg的单一剂量给予需要其的受试者。

8. 权利要求7的化合物, 其中所述单一剂量优选为100mg至600mg。

9. 前述权利要求中任一项的化合物, 其中所述化合物与至少一种选自以下的化合物伴随地给药或分开的给药: 钙通道阻滞剂、硫酸镁、选择性前列腺素调节剂、 β -2-肾上腺素能激动剂、 β -3-肾上腺素受体激动剂、和/或皮质类固醇。

10. 前述权利要求中任一项的化合物, 其中所述化合物在血浆中是稳定的。

11. 前述权利要求中任一项的化合物, 其中需要其的受试者是哺乳动物, 优选是人类。

12. 权利要求1-11的化合物, 其用作药剂。

13. 权利要求1-11的化合物, 其用于在需要其的受试者中治疗和/或预防与催产素受体活性和/或加压素V1a受体活性相关的疾病。

14. 权利要求13的化合物, 其中与催产素受体活性相关的疾病选自未足月分娩、早产、痛经、早泄、性功能障碍、子宫内膜异位、由于子宫收缩造成的胚胎着床失败、不孕症、良性前列腺增生、神经性-精神疾病、自闭症、社会行为障碍、心理-社会应激、和/或心血管疾病。

15. 一种药物组合物, 其包含权利要求1-11的化合物和可药用的载体、稀释剂或赋形剂。

16. 权利要求15的药物组合物, 其中通过口服、阴道或静脉内途径进行给药。

17. 制备和分离以基本上纯的形式的权利要求1-11的化合物的方法, 包括以下步骤:

a) 将含式 (3Z, 5S) -5- (羟基甲基) -1- [(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基) 羰基] 吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物的粗同分异构混合物装载在硅胶层析柱上;

b) 用溶于有机溶剂的1%的乙醇纯化; 以及

c) 用溶于有机溶剂的2%的乙醇纯化。

18. 权利要求1-11的化合物, 其用于辅助生殖技术。

19. 权利要求1-11的化合物, 其用于通过体外受精-胚胎移植 (IVF-ET) 方法治疗不孕症。

20. 权利要求1-11的化合物, 其用于减少由于子宫收缩造成的胚胎着床失败。

21. 权利要求1-11的化合物, 其用于减少在胚胎移植期间收缩的发生。

22. 权利要求1-11的化合物, 其用于治疗 and/或预防与催产素诱导的血管收缩、加压素诱导的血管收缩、催产素诱导的肌肉收缩、加压素诱导的肌肉收缩有关的疾病。

作为催产素/加压素V1a受体拮抗剂的吡咯烷衍生物

[0001] 本申请是申请日为2014年7月25日、申请号为201480049927.2、发明名称为“作为催产素/加压素V1a受体拮抗剂的吡咯烷衍生物”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及对催产素受体和/或加压素V1a受体具有拮抗作用的式 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,涉及它们的制备方法、包含它们的药物组合物以及它们在医学中的用途。

背景技术

[0003] 催产素 (OT) 是一种通过激活催产素受体 (OT-R) 来介导其生理学作用的环状九肽,所述催产素受体是一种属于类似于精氨酸加压素受体的G蛋白-偶联受体类的细胞膜受体。催产素 (OT) 的一个重要作用是在分娩过程中引起哺乳动物的子宫收缩。子宫的重复、一致且规律的收缩会造成子宫颈扩张、胎膜破裂并且导致胎儿分娩。提前分娩 (premature labor) 是当这些收缩在足月妊娠前发生的时候。子宫活动度在早产时的增加是未足月分娩 (preterm labor) 的最常见表现。

[0004] 提前分娩导致不想要的早产 (premature birth), 这是一个严重的健康问题——其仍是围产期死亡率和严重发病率的主要原因,特别是在早产婴儿中比在足月婴儿中更常见的呼吸窘迫综合征、脑室内出血、支气管肺发育不良和坏死性小肠结肠炎的主要原因。长期损伤如大脑性麻痹、视觉缺陷和听力损失在早产婴儿中也更为常见。目前,尽管产科医学上有显著改进,早产 (preterm birth) 仍是工业化国家中婴儿死亡率和发病率的主要原因,其造成用于早产儿的新生儿重症监护的高成本。当考虑到早产分娩相关疾病 (如呼吸窘迫综合征、心脏病、大脑性麻痹、癫痫症、和严重的学习障碍) 的健康护理提供时,其实际的社会成本甚至更高。未足月分娩的管理代表产科领域中的一个重要问题。

[0005] OT/OT-R系统在哺乳动物——特别是人类——中启动分娩时发挥重要作用。在分娩开始前和分娩期间,OT-R密度在子宫肌层中显著增加。还认为在人类分娩前局部的OT肽类激素浓度显著增加。当子宫获得收缩能力时,孕酮的高循环浓度诱导子宫静止。足月前不久,血浆孕酮浓度降低,OT-R在子宫中的表达显著增加,OT被释放并且子宫收缩活性增加。足月时,收缩上升到顶点,导致由两个相互作用的正反馈回路引起的分娩。第一个回路为局部子宫回路:在子宫自身内,收缩性的前列腺素产生并且释放以响应OT和子宫收缩。这些前列腺素可在胎膜的宫颈成熟和弱化中发挥进一步的作用。第二个回路涉及下丘脑:在响应子宫收缩以及阴道和宫颈的扩张时,下丘脑中的大细胞性催产素神经元提高它们的活性,导致OT从其位于脑垂体后叶中的轴突终末中释放。所释放的OT对子宫起作用,既刺激前列腺素的进一步产生,还进一步帮助子宫收缩。

[0006] 因此,通过拮抗OT-R来阻断OT的作用可能代表用于治疗与OT-R 活性相关的疾病——特别是未足月分娩——的很有吸引力的模式。

[0007] 宫缩抑制剂,即子宫松弛剂,已在临床研究中用于未足月分娩的药物治疗。大部分

的这些试剂未经药物核准而使用。它们在延长妊娠期方面(如果有的话)显示出非常有限的功效,并且没有明确证明可改善新生儿结果。当前的宫缩抑制剂非常频繁地与不想要的对女性、胎儿或新生儿的副作用相关。这类宫缩抑制剂包括 β -2-肾上腺素能激动剂、前列腺素合成抑制剂、硫酸镁、硝酸供体和钙离子通道阻滞剂。 β -2-肾上腺素能激动剂(如利托君或特布他林)造成心血管和新陈代谢的许多副作用(包括母体心动过速、心悸、低血压、甲状腺功能的改变和胎儿与新生儿低血糖、心动过速)。利托君不再被FDA批准。钙离子通道阻滞剂硝苯地平也是用于试图终止收缩的药物。可发生的一些副作用包括面部潮红、头疼、恶心、心悸和头晕。已使用全前列腺素合成抑制剂(NSAID) 吲哚美辛。其对胎儿也有如下严重的影响:动脉导管收缩、肺动脉高血压、羊水过少的肾功能降低、脑室内出血、高胆红素血症、坏死性小肠结肠炎。母体的副作用包括母亲的腹部不适、恶心、呕吐、抑郁和阵发性眩晕。另一NSAID是舒林酸,其具有与吲哚美辛类似的副作用特性。对于硫酸镁,荟萃分析未能支持其作为一种宫缩抑制剂。女性报告了重要的副作用如潮红、嗜睡、头疼、肌无力、肺水肿和心搏停止。已暴露于硫酸镁的新生儿可能出现嗜睡、张力减退、呼吸抑制、骨骼问题、骨质减少和骨折。最近,FDA劝告健康护理专业人员不要使用硫酸镁超过5-7天以停止妇女的未足月分娩。

[0008] 阿托西班,一种双重加压素V1a受体与OT-R拮抗剂,其在EU上市并用于停止宫缩和延迟未足月分娩若干天。阿托西班是一种不可经口服生物利用的并且必须经肠胃外给药的肽。其在循环中被酶快速降解,并且其使用限于最多48小时。

[0009] 另外,开发了非肽的OT-R拮抗剂如吡咯烷衍生物(WO 01/72705、WO 02/102799、WO 2002/074741、WO 2004/005249)作为异构体的混合物。

[0010] 仍然存在对用于治疗与OT-R活性相关的疾病——特别是未足月分娩——的有效且经口服的选择性的OT-R拮抗剂的显著未满足的需要。

发明内容

[0011] 本发明提供了式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物,和/或其活性代谢物。

[0012] 本发明还提供了式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物,和/或其活性代谢物,用作含所述化合物的药剂和药物组合物。

[0013] 还提供了式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物,和/或活性代谢物,用于治疗和/或预防与催产素受体活性和/或加压素V1a受体活性相关的疾病。

[0014] 本发明还提供了制备和分离以基本上纯的形式的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物,和/或其活性代谢物。

附图说明

图1A和1B描述了通过口服途径给药的Z-异构体和E-异构体对接近足月(妊娠天数为19-21)的麻醉的妊娠大鼠的自发性子宫收缩的抑制的剂量-响应作用。

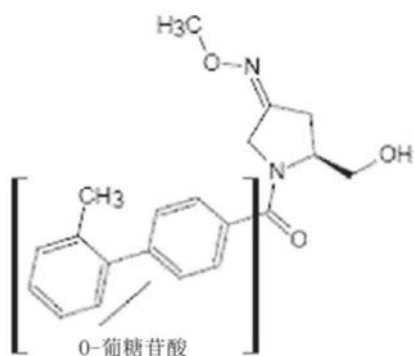
具体实施方式

[0015] 本发明涉及式 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物、和/或其活性代谢物,所述化合物的O-甲基肼的官能团为Z同分异构的构型。

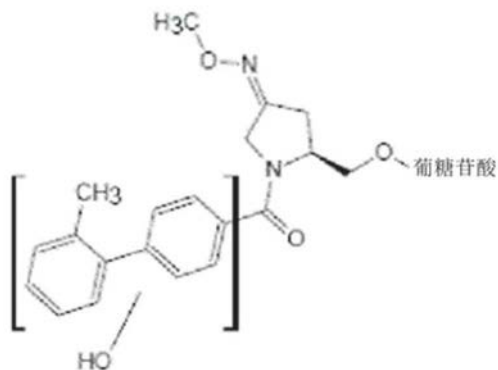
[0016] 式 (3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物与本发明化合物的区别在于O-甲基肼官能团为E 同分异构的构型。

[0017] 本文使用的术语“其活性代谢物”是指具体指定的化合物——在本文情况下为 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼——经体内或体外代谢产生的产物,并且该产物表现出与 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮 O-甲基肼相同的生物学活性。

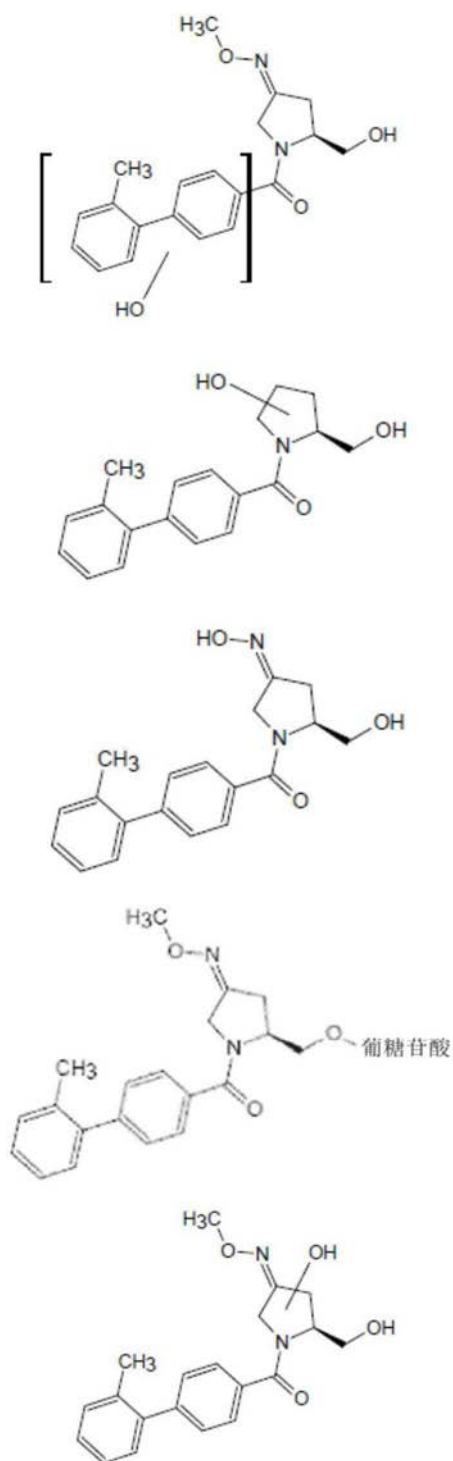
[0018] 使用本领域已知的常规技术可鉴定 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的活性代谢物,并且使用如本文所述的那些测试测定它们的活性。例如,这类代谢物可由所给予的Z型的氧化、葡萄糖苷酸化或其他结合、水解、还原等得到。因此,本发明包括 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的活性代谢物,包括通过包含将本发明的化合物与哺乳动物接触一段足以产生其代谢产物的时间的方法产生的化合物。这类代谢物也可在体外通过相应的 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的氧化、还原、水解、葡萄糖苷酸化或其它结合转换而产生。(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的活性代谢物的实例包括如下所示结构的化合物:



[0019]



[0020]



[0021] 在给药至接受者时能够转化为如上所述的 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物和/或其活性代谢物的化合物被称为“前药”。例如,前药可以在体内,例如,通过血液中的水解作用,转化为其具有药学作用的活性形式。可药用的前药记载于T.Higuchi and V.Stella,Prodrugs as Novel Delivery Systems,Vol.14 of the A.C.S.Symposium Series(1976);“Design of Prodrugs” ed.H.Bundgaard,Elsevier,1985;和记载于Edward B. Roche,ed.,Bioreversible Carriers in Drug Design,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987,其以引用的方式纳入本文。

[0022] 通过如在例如W02004/005249和W02005/082848中公开的那些方法产生本发明的化合物。但是,所述化合物以包含(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼和(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的同分异构混合物(3Z/E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的形式合成和获得。

[0023] 因此,本发明涉及式(3Z/E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,其包含至少85%至100%的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其代谢物,优选85%至99.9%、更优选90%至99.9%、甚至更优选95%至99.9%的所述化合物。

[0024] 或者,本发明涉及以基本上纯的形式提供的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物。

[0025] 本文使用的术语“基本上纯的”是指以基本上不含其他化合物的形式提供的化合物。所述“其他化合物”的实例包括(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼、(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮、(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮肼、(3R,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]-3-甲氧基氨基-吡咯烷、(3S,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]-3-甲氧基氨基-吡咯烷、(3Z,5S)-5-(O-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼和(3E,5S)-5-(O-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼。

[0026] 最优选地,基本上不含式(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物、和/或其活性代谢物。

[0027] 甚至更优选地,基本上纯的形式的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物的纯度为至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或至少100%,并且因此基本上不含式(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物,即少于45%、少于35%、少于25%、少于15%、少于10%、少于5%、少于3%、更优选少于2%、甚至更优选少于1%。

[0028] 甚至更优选地,基本上纯的形式的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物的纯度的范围为至少85%至100%、优选85%至99.9%、更优选90%至99.9%、甚至更优选范围为95%至99.9%。

[0029] 根据所用的命名法,本发明的化合物“(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼”还可被定义为“(4Z,2S)-2-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-4-酮O-甲基肼。

[0030] 通常,式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-

酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,是一种催产素受体拮抗剂。

[0031] 本文使用的术语“催产素受体拮抗剂”是指通过(部分或完全地)抑制或阻断催产素受体(OT-R)来发挥功能,从而防止受体被催产素激活的化合物。

[0032] 本发明提供了式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,其中所述化合物是部分或完全的催产素受体拮抗剂并且其中抑制常数 K_i 小于约1 μM 。优选地,所述抑制常数 K_i 小于约0.1 μM ,更优选小于约0.06 μM 。

[0033] 本发明还提供了式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,其中所述化合物是催产素受体拮抗剂并且其中半数最大抑制浓度 IC_{50} 小于约1 μM 。优选地,所述 IC_{50} 小于约0.1 μM ,更优选小于约0.09 μM 。

[0034] 同样地,通常,式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物是加压素V1a受体拮抗剂。

[0035] 本文使用的术语“加压素V1a受体拮抗剂”是指通过(部分或完全地)抑制或阻断加压素V1a受体(也称为精氨酸加压素受体1A)来发挥功能,从而防止受体被加压素激活的化合物。加压素V1a受体是肽激素精氨酸加压素的三种主要受体类型之一,其它的是V1b和V2受体。

[0036] 优选地,式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物是加压素V1a受体拮抗剂,其中抑制常数 K_i 小于约1 μM 。最优选地,所述抑制常数 K_i 小于约0.5 μM ,甚至更优选小于约0.15 μM 。

[0037] 本发明还涉及式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,其为催产素受体拮抗剂和加压素V1a受体拮抗剂。

[0038] 通常,式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物抑制子宫收缩。有利地,在其给药后,所述化合物在2-30分钟、优选5-20分钟的时间内快速抑制子宫收缩。

[0039] 出人意料地,申请人已证明抑制活性是式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的基本上纯的Z型和/或其代谢物所特有的。如实施例所示,式(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的基本上纯的E型不显示功效,因为其不抑制子宫收缩。

[0040] 关于本发明化合物和/或其活性代谢物的剂量方案根据多种因素进行选择,包括患者的类型、种属、年龄、重量、性别和身体状况;待治疗的病症的严重性;给药途径;患者的肾功能和肝功能;所用的具体化合物或其活性代谢物。普通技术医师可很容易地确定和指定用于预防、抵抗或阻止病症进展所需的药物的有效量。

[0041] 有利地,本发明的化合物和/或其活性代谢物可以单一剂量给予,或者总剂量可以每日两次、三次或四次的分剂量给予。

[0042] 优选地,本发明提供了式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,其中所述化合物以50mg至900mg的单一剂量、更优选以100mg至600mg的单一剂量给予受试者。

[0043] 在本发明的化合物和/或其活性代谢物可被用作药剂中唯一的活性成分时,所述化合物也可与至少一种或多种其他活性化合物结合使用。这样的其他活性化合物可为本发明的其他化合物,或选自钙通道阻滞剂、硫酸镁、选择性前列腺素调节剂、 β -2-肾上腺素能激动剂、 β -3-肾上腺素受体激动剂、和/或皮质类固醇的其他活性化合物。

[0044] 或者,可将本发明的化合物和/或其活性代谢物与至少一种选自以下的化合物伴随地给药或者分开地给药:钙通道阻滞剂(如硝苯地平)、硫酸镁、前列腺素受体调节剂(如EP1或EP2或EP3或EP4或FP受体的激动剂或拮抗剂)、前列腺素合成抑制剂(如吲哚美辛、尼美舒利、苏灵大、罗非考昔、塞来昔布)、 β -2-肾上腺素能激动剂(如利托君、特布他林、柳丁氨醇)、 β -3-肾上腺素受体激动剂、硝酸供体(如三硝酸甘油酯)和/或皮质类固醇(如地塞米松、倍他米松)。

[0045] 本文使用的术语“伴随地”是指给予式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物和/或其活性代谢物后,立即给予至少一种选自以上公开的化合物。

[0046] 本文使用的术语“分开地(包括顺序的或随后的给予)”是指给予式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮 O-甲基肟的化合物和/或其活性代谢物后,中止一段时间,然后给予至少一种以上公开的化合物。

[0047] 通常,本发明的化合物在血浆中是稳定的。本文使用的术语“稳定的”是指式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物和/或其活性代谢物在给予后存在于受试者的血浆中,其中所述化合物的同分异构互变现象基本上被阻止。

[0048] 通常,在本发明中,需要其的受试者优选是哺乳动物,最优选是人类,更优选是妇女,并且最优选是育龄期人类女性。

[0049] 本发明还涉及式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物和/或其活性代谢物,用作药剂。

[0050] 本发明中还可预期的是式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的化合物和/或其活性代谢物,用于治疗 and/或预防与催产素受体活性和/或加压素V1a受体活性相关的疾病。

[0051] 与催产素受体活性和/或加压素V1a受体活性相关的疾病选自包含以下的非限制性组:未足月分娩、早产、痛经、早泄、性功能障碍、子宫内膜异位、由于子宫收缩造成的胚胎着床失败、不孕症、良性前列腺增生、神经性-精神疾病、自闭症、社会行为障碍、心理-社会应激(psycho-social stress)、和/或心血管疾病。

[0052] 术语“未足月分娩”也称为提前分娩,应意指妊娠的正常结束之前可存活的婴儿从子宫中娩出,或更具体地,在妊娠的第37周之前伴随子宫颈管的消失和扩张的分娩的发生。这可伴随有或可不伴随有阴道出血或膜破裂。

[0053] 术语“痛经”是指在以排卵周期期间与月经相关的周期疼痛为特征的病症。该疼痛被认为是由于子宫收缩和局部缺血引起的。

[0054] 术语“性功能障碍”是指在以下四个人类性反应为特征的阶段——兴奋期、平台期、性高潮期和性消退期——中的任何干扰或变化。

[0055] 本文使用的术语“神经性-精神疾病”是指归因于神经系统疾病(例如抑郁症、强迫

症和其他疾病)的精神障碍。

[0056] 本文使用的术语“社会行为障碍”是指情绪困扰、行为或感觉的不恰当类型、苦恼或沮丧的普遍性情绪、以及建立或维持满意的人际关系的一系列知觉困难。

[0057] 本文使用的术语“心理-社会应激”是指由感知到的对社会地位、社会尊重、自我价值、在团队中受到的尊重或认可的威胁引起的,并且导致体内的应激反应和身体症状发生的状况。

[0058] 辅助生殖技术是应用于人类以治疗不孕症和应用于动物以产生妊娠的方法。不孕症,在世界范围内影响约10%的人类夫妻,可通过体外受精和胚胎移植(IVF-ET)进行治疗,或者在不太复杂的情况下通过人工受精进行治疗。通常,胚胎移植的成功取决于子宫容受性——其被定义为子宫提供适当着床和胚胎发育所需要的最佳条件的能力。子宫容受性的基本要素是子宫收缩活性和子宫内膜的状态。

[0059] 在胚胎移植期间发生的子宫收缩可将胚胎从子宫中推出至阴道或输卵管中,这可能造成治疗失败,或在后面的情况中造成宫外孕——一种严重的、可能威胁生命的并发症。

[0060] 通常,本发明涉及式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,用于辅助生殖技术。

[0061] 例如,本发明涉及式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,用于通过体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的方法治疗不孕症。

[0062] 本发明还涉及式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,用于减少由于子宫收缩导致的胚胎着床失败。

[0063] 本发明中还可预期的是式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,用于减少在胚胎移植期间收缩的发生。

[0064] 此外,本发明涉及式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,用于治疗和/或预防与催产素诱导的血管收缩、加压素诱导的血管收缩、催产素诱导的肌肉收缩、加压素诱导的肌肉收缩有关的疾病。

[0065] 本发明还涉及一种药物组合物,其包含式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物,以及可药用的载体、稀释剂或赋形剂。

[0066] 本文使用的“可药用的载体、稀释剂或赋形剂”是在本领域中通常被接受的用于向患者递送生物活性剂的介质。本领域技术人员知道多种适于配制药物组合物的所述载体、稀释剂或赋形剂(参见,例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Publishing Company, 1990, pp. 1289-1329)。所述载体、稀释剂或赋形剂必须与制剂的其他成分相容,能够成为药物制剂,并且对其接受者无害。

[0067] 可将本发明的化合物和/或其活性代谢物,与常用的载体、稀释剂或赋形剂一起配制成药物组合物及其单位剂量,并且以这样的形式,可用作:固体,如片剂或填充的胶囊剂,液体,如溶液剂、悬浮剂、乳剂、酏剂或用其填充的胶囊剂,全部用于口服使用;或以用于肠

胃外(包括皮下)使用的无菌注射溶液的形式。这类药物组合物和其单位剂型可包含常见比例的成分,含有或不含有额外的活性化合物或成分,并且,这类单位剂型可包含与待使用的计划每日剂量范围相称的任何合适的有效量的活性成分(即,本发明的化合物)。

[0068] 本发明的药物组合物可通过多种途径给予,所述途径包括口服、直肠、阴道、经皮、皮下、静脉内、肌肉内、和鼻内。取决于所选的递送途径,化合物优选被配制成可注射组合物或口服组合物。用于口服给药的组合物可采用散装液体溶液或悬浮液、或散装粉末的形式。然而,更常见地,所述组合物以单位剂型呈现以促进精确的剂量给药。术语“单位剂型”是指物理上分离的单位,其适合作为用于人类受试者和其他哺乳动物的单位剂量,每个单位包含经计算以产生所需的治疗效果的预定量的活性材料,以及合适的药物赋形剂。典型的单位剂型包括液体组合物的预填充的、预测量的安瓿或注射器或固体组合物情况下的丸剂、片剂、胶囊等。在这些组合物中,本发明的化合物通常是微量成分(约 0.1重量%至约50重量%或优选地约1重量%至约40重量%),其余为有助于形成所需剂型的各种赋形剂或载体和加工助剂。

[0069] 优选地,含式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物以及可药用的载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物通过口服、阴道或静脉内途径给予。

[0070] 适于口服给药的液体形式可包括含有缓冲剂、悬浮剂和分散剂、着色剂、增味剂等合适的水性或非水性赋形剂。固体形式可包括,例如,以下成分或具有相似性质的化合物的任何一种:粘合剂如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂如淀粉或乳糖,崩解剂如藻酸、凝胶(Primogel)、或玉米淀粉;润滑剂如硬脂酸镁;助流剂如胶体二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;或增味剂如薄荷、水杨酸甲酯、或橙香精。

[0071] 可注射的组合物通常基于可注射的无菌盐水或磷酸盐缓冲盐水或本领域已知的其他可注射载体。

[0072] 本发明的化合物也可以缓释形式给药或从缓释药物递送系统给药。对代表性的缓释材料的描述还可见于Gennaro, A.R. et al, Remington's Pharmaceutical Sciences. 18th ed. Easton: The Mack Publishing Company, 1995。

[0073] 本发明还涉及制备和分离以基本上纯的形式的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物的方法,所述方法包括如下步骤:

[0074] a) 将含式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物的粗同分异构混合物装载在凝胶色谱柱上;

[0075] b) 用溶于有机溶剂的1%乙醇纯化;以及

[0076] c) 用溶于有机溶剂的2%乙醇纯化。

[0077] 本文使用的术语“粗同分异构混合物”是指从如本文所述的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物的合成中得到的并且包含式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物以及式(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物的混合物。

[0078] 优选地,本发明涉及制备和分离以基本上纯的形式的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-

1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0079] a) 将含式 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的化合物和/或其活性代谢物的粗同分异构混合物装载在硅胶色谱柱上;

[0080] b) 用溶于甲苯的1%甲醇纯化;

[0081] c) 用溶于甲苯的2%甲醇纯化。

[0082] 优选地,所述硅胶色谱柱选自 **Biotage®** Flash 150快速色谱系统、Biotage KP-SIL、Biotage KP-C18-HS、Biotage KP-C18-WP、Biotage KP-C-WP、Biotage FLASH-WAC 400 (Biotage AB, 751 03 Uppsala, Sweden)。其他凝胶色谱柱包括装载有Mitsubishi Diaion™ HP20或 HP20SS SDVB树脂 (Mitsubishi Chemical Corporation, Tokyo 100-8251, Japan) 的柱。

[0083] 实施例

[0084] 实施例1: (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的纯化

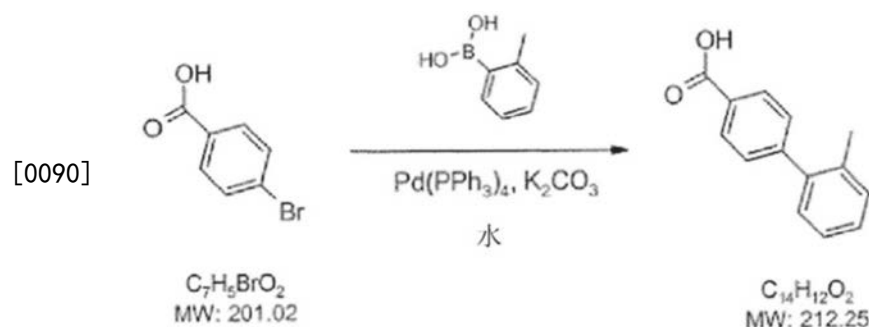
[0085] 1.1 (3Z/E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的合成

[0086] 本发明涉及作为包含 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼和 (3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的粗同分异构混合物得到的 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的合成和纯化。

[0087] 本发明化合物的合成途径为例如在W02004005249和 W02005082848中记载的那些。

[0088] 例如,本发明的化合物 (3Z/E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼也可根据以下所述的1至7阶段来制备:

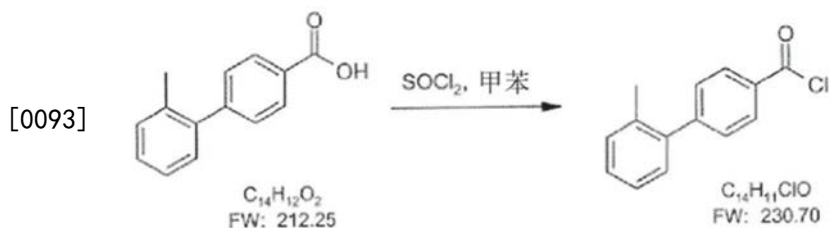
[0089] 阶段1: 4-(2-甲基苯基)苯甲酸的制备



[0091] 在15至25℃下,将溶于水 (2.20L, 5.0vol) 的碳酸钾 (0.908Kg, 6.57mol, 2.06wt) 的溶液加入到溶于水 (4.41L, 15.0vol) 的4-溴代苯甲酸 (0.441Kg, 2.19mol, 1.0wt) 的浆液中。在15至25℃下搅拌所得浆液,并使用真空-氮气吹扫循环脱气三次。加入四(三苯基膦)钯 (0) (0.022Kg, 0.019mol, 0.05wt) 并重复进行所述真空-氮气吹扫循环。使用真空-氮气吹扫循环将溶于甲醇 (3.53L, 8.0vol) 的邻甲基苯硼酸 (0.313Kg, 2.30mol, 0.707wt) 的溶液脱气三次,然后在15至25℃下加入到4-溴代苯甲酸浆液中。将反应混合物加热至回流并保持在回流下 (71至78℃) 直到反应完成 (转化率为95%时可认为反应完成), 如 ¹H NMR分

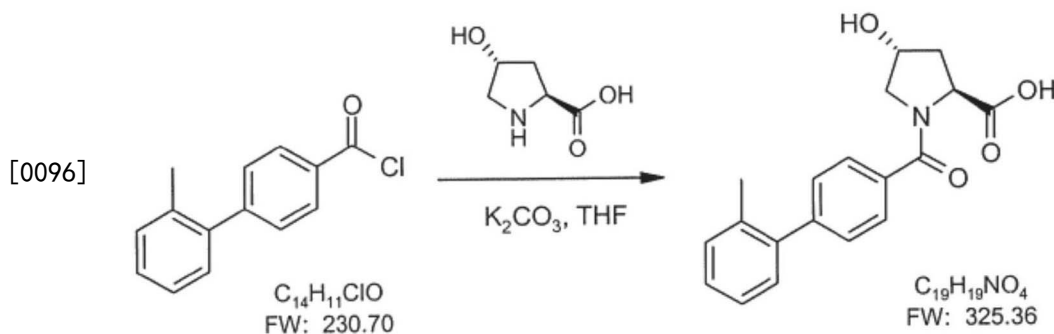
析 (d6-DMSO) 所测定的, 通常为1.5至2.5小时。将反应混合物在真空下于40至45℃浓缩到15vol。将甲苯 (4.41L, 10.0vol) 和四氢呋喃 (4.41L, 10.0vol) 加入到残余物中, 剧烈搅拌所得混合物, 用盐酸 (6M, 2.00L, 4.5vol) 酸化至pH 1。将内容物剧烈搅拌30至 60分钟, 然后分离各层。将甲苯 (2.20L, 5.0vol) 和四氢呋喃 (2.20L, 5.0vol) 加入到水相中, 搅拌混合物5至10分钟。分离各层, 将合并的有机相过滤并在真空下于35至40℃浓缩到10.0vol。将甲苯 (4.41L, 10.0vol) 加入到残余物中, 在真空下于35至40℃浓缩生成物。通过 ^1H NMR分析 (d6-DMSO) 测定所得浆液中四氢呋喃的含量 (通过水平: $\leq 1.0\%$ w/w 四氢呋喃, 相对于甲苯计)。将浆液冷却到0至5℃, 并在0 至5℃下陈化30-60分钟, 通过过滤收集固体, 用甲苯 (2.20L, 5.0vol) 洗涤滤饼。将固体于35至40℃在真空烘箱中干燥, 得到为淡黄色固体的4-(2-甲基苯基) 苯甲酸 [0.438Kg, 94.1% th, 99.3% w/w, ^1H NMR (d6-DMSO) 和结构一致]。

[0092] 阶段2: 4-(2-甲基苯基) 苯甲酰氯的制备



[0094] 在10至25℃下, 将亚硫酸氯 (0.300L, 4.11mol, 0.685vol) 加入到溶于甲苯 (4.35L, 10.0vol) 的4-(2-甲基苯基) 苯甲酸 (0.435Kg, 2.05mol, 1.0wt) 的浆液中, 将混合物加热75至80℃至并保持在75 至80℃直到通过 ^1H NMR分析 (d6-苯) 反应完成, 通常为4至5小时。反应完成伴随着混浊液的形成。通过在减压下于35-45℃去除甲苯将生成物浓缩到5.0vol。将甲苯 (2.18L, 5.0vol) 加入到浓缩物中, 通过在减压下于35-45℃去除甲苯将混合物浓缩到4.0vol。通过玻璃微纤维纸过滤生成物, 用甲苯 (0.44L, 1.0vol) 洗涤滤饼。在阶段3直接使用4-(2-甲基苯基) 苯甲酰氯 [0.439Kg, 92.8% th, 100.9% w/w, ^1H NMR (d6-苯) 和结构一致] 的甲苯溶液。

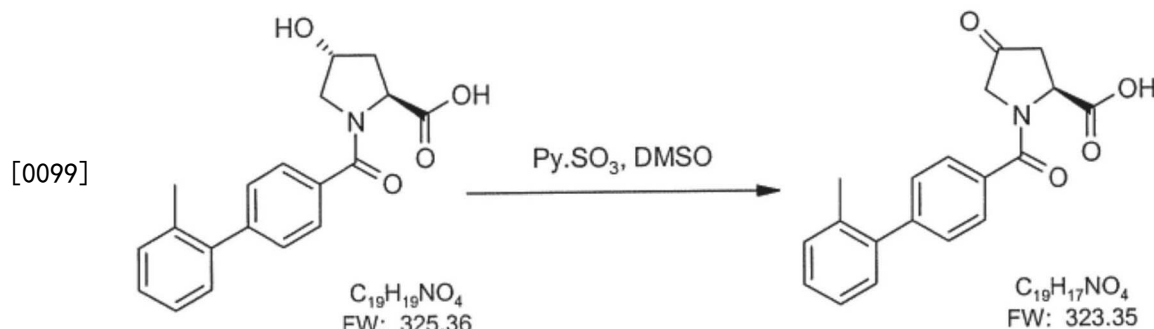
[0095] 阶段3: (4R)-4-羟基-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)-羰基]-L-脯氨酸的制备



[0097] 在15至25℃下, 将溶于水 (0.57L, 1.3vol) 的碳酸钾 (0.526Kg, 3.81mol, 1.2wt) 的溶液加入到溶于四氢呋喃 (2.20L, 5.0vol) 和水 (0.44L, 1.0vol) 的4-羟基-L-脯氨酸 (0.274Kg, 2.09mol, 0.625wt) 的溶液中, 随后用水 (0.44L, 1.0vol) 冲洗。在快速搅拌下将混合物冷却到0至5℃, 在该温度下加入溶于甲苯 (2.19L, 5.0vol) 的4-(2-甲基苯基) 苯甲酰氯 (0.438Kg, 1.90mol, 1.0wt) 的溶液, 随后用甲苯 (0.44L, 1.0vol) 冲洗。在1-2小时内将反应混合物温热到15至25℃, 在此温度下搅拌直到通过TLC分析判断反应完成。在15至25℃下, 将水 (2.20L, 5.0vol) 加入到反应混合物中, 并分离各层。在15 至25℃下, 用氯化氨水

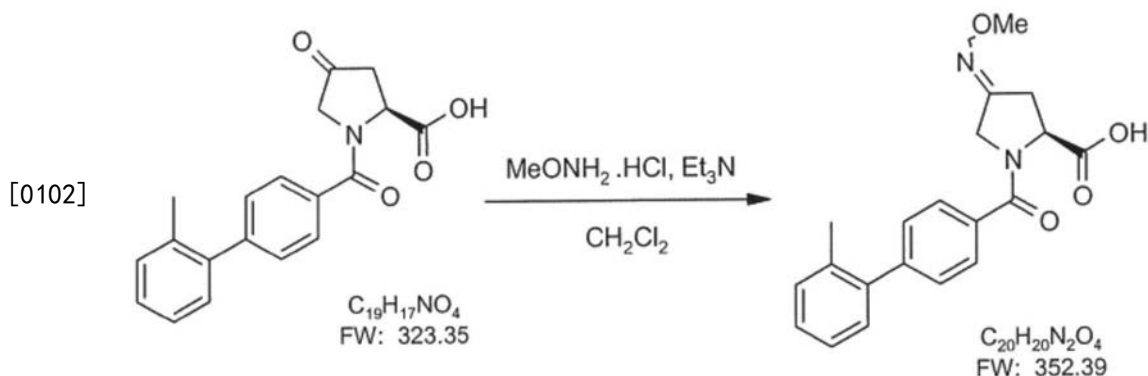
溶液 (6M, 0.66L, 1.5vol) 将水相酸化至 pH 5 至 6, 然后用氯化氢水溶液 (2M, 0.88L, 2.0vol) 酸化至 pH 1。将混合物冷却至 0 至 5℃, 并在 0 至 5℃ 下陈化 30-60 分钟, 通过过滤收集沉淀的固体, 用水 (2x 1.75L, 2x 4.0vol) 和甲苯 (0.88L, 2.0vol) 洗涤滤饼, 在过滤器上抽干持续 12-24 小时。在真空中于 40 至 45℃ 干燥所收集的固体直到通过 KF 测定的水含量为 $\leq 0.2\%$ w/w, 得到为灰白色固体的 (4R)-4-羟基-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]-L-脯氨酸 [0.599 Kg, 97.0% th, 136.8% w/w, ^1H NMR (d_6 -DMSO) 和结构一致]。

[0098] 阶段4: 1-(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基-4-氧代-L-脯氨酸的制备



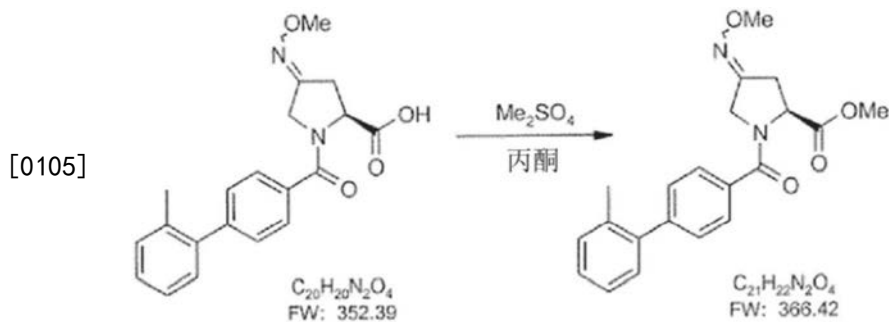
[0100] 在 15 至 20℃ 下, 将三乙胺 (1.80L, 13.56mol, 3.0vol) 加入到溶于二甲亚砜 (4.42L, 7.4vol) 的 (4R)-4-羟基-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]-L-脯氨酸 (0.598Kg, 1.84mol, 1.0wt) 的溶液中。在 15℃ 和 25℃ 下, 分批加入吡啶-三氧化硫复合物 (0.879Kg, 5.52mol, 1.47wt), 并在该温度下搅拌反应混合物直到反应完成, 如通过 TLC 分析所测定的 (通常为 1 至 3 个小时)。在 0 至 30℃ 下, 用氯化氢水溶液 (3M, 4.80L, 8.0vol) 终止反应, 加入四氢呋喃 (3.00L, 5.0vol) 和庚烷 (0.60 L, 1.0vol), 分离各层, 并用四氢呋喃 (2x 3.00L, 2x 5.0vol) 萃取水相。用氯化氢水溶液 (1M, 2x 1.20L, 2x 2.0vol) 和饱和的氯化钠溶液 (2x 1.20L, 2x 2.0vol) 洗涤合并的有机相, 将水相洗涤液合并并用四氢呋喃 (2x 0.60L, 2x 1.0vol) 反萃取。将合并的有机相用硫酸镁 (1.794 Kg, 3.0wt) 干燥, 过滤, 用四氢呋喃 (0.60L, 1.0vol) 洗涤滤饼, 并在真空中于 40 至 45℃ 浓缩滤液, 得到淡棕色泡沫。将乙酸乙酯 (6.00 L, 10.0vol) 加入到泡沫中, 搅拌内容物 5-10 分钟以实现溶解, 在真空中于 40-45℃ 去除溶剂。使用乙酸乙酯 (6.00L, 5.0vol) 这样重复, 直到通过 ^1H NMR 分析 (d_6 -DMSO) 检测不到四氢呋喃。将残余物在乙酸乙酯 (4.80L, 8.0vol) 中浆化, 加入活性炭 (0.084Kg, 0.14wt) 后用乙酸乙酯 (3.00L, 5.0vol) 冲洗, 将生成物加热至 70 至 80℃ 并保持在 70 至 80℃ 持续 20-30 分钟, 冷却至 40-55℃, 并通过玻璃微纤维纸过滤。用乙酸乙酯 (1.50L, 2.5vol) 洗涤滤饼, 在真空中于 40 至 45℃ 将合并的滤液和洗涤液浓缩至 2.5 至 3.5vol。结晶在浓缩期间开始。将浓缩物转移到合适容器中, 同时用乙酸乙酯 (0.30L, 0.5vol) 冲洗, 并加热到 70 至 80℃。根据需要加入额外的乙酸乙酯 (0.30L, 0.5vol) 以达到溶解。在 70 至 80℃ 下加入庚烷 (1.80L, 3.0vol), 使内容物在 1 至 2 个小时内冷却至 15 至 25℃。将浆液进一步冷却至 0 至 5℃, 并在 0 至 5℃ 下陈化 2 至 3 个小时, 过滤, 在 0 至 5℃ 下用乙酸乙酯: 庚烷 (1:1, 0.60L, 1.0vol) 以及随后用庚烷 (3.0L, 2.5vol) 洗涤滤饼。在真空中于 40 至 45℃ 干燥收集的固体, 得到为灰白色固体的 1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]-4-氧代-L-脯氨酸 [0.444Kg, 74.7% th, 74.2% w/w, ^1H NMR (d_6 -DMSO) 和结构一致]。

[0101] 阶段5: (4Z/E)-4-甲氧基亚氨基-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]-L-脯氨酸的制备



[0103] 在10至25℃下,将三乙胺(0.40L,2.85mol,0.92vol)加入到溶于二氯甲烷(4.40L,10.0vol)的1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]-4-氧代-L-脯氨酸(0.434Kg,1.34mol,1.0wt)的溶液中,随后用二氯甲烷(0.43L,1.0vol)冲洗。在10至25℃下,分批加入甲氧基胺盐酸盐(0.130Kg,1.56mol,0.30wt),然后用二氯甲烷(0.43L,1.0vol)冲洗,在10至25℃下搅拌反应混合物直到反应完成,如通过TLC分析所测定的(通常为3至5小时,TLC洗脱液:二氯甲烷:甲醇:乙酸(90:10:1);uv显色)。在真空中于35至40℃去除溶剂,将生成物溶于乙酸乙酯(4.40L,10.0vol),用氯化氢水溶液(1M,2x 2.20L,2x 5.0vol)洗涤。用乙酸乙酯(2.20L,5.0vol)反萃取酸性洗涤液,用饱和的氯化钠水溶液(3.10L,7.0vol)洗涤合并的有机相,用硫酸镁(0.300Kg,0.69wt)干燥,过滤,用乙酸乙酯(2.20L,5.0vol)洗涤滤饼。合并滤液和洗涤液,并在真空中于35至40℃浓缩,得到为灰白色固体的4-甲氧基亚氨基-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]-L-脯氨酸[0.476Kg,100.6%th,109.6%w/w,¹H NMR(CDC1₃)和结构一致]。

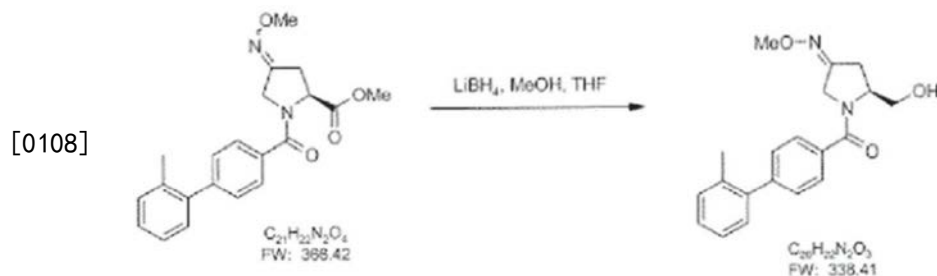
[0104] 阶段6:(4Z/E,2S)-甲基-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)-羰基]-4-甲氧基亚氨基吡咯烷-2-羧酸酯的制备



[0106] 将碳酸钾(0.476Kg,3.44mol,1.0wt)加入到溶于丙酮(4.75L,10.0vol)的4-甲氧基亚氨基-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]-L-脯氨酸(0.475Kg,1.35mol,1.0wt)的溶液中,并将混合物冷却到0至10℃。在0至15℃下,加入硫酸二甲酯(0.128L,1.35mol,0.27vol),在15至25℃下搅拌混合物直到反应完成,如通过TLC分析所测定的,通常为3至16个小时。在真空中于40至45℃去除溶剂,生成物在乙酸乙酯(3.80L,8.0vol)和水(3.80L,8.0vol)之间分配。分离各层,用饱和氯化钠水溶液(2.85L,6.0vol)洗涤有机相,用硫酸钠(0.953Kg,2.0wt)干燥,并过滤。用乙酸乙酯(0.48L,1.0vol)洗涤滤饼,在真空中于40至45℃浓缩合并的滤液和洗涤液。在真空中于40至45℃,通过与四氢呋喃(2x 0.95L,2x 2.0vol)共沸蒸馏去除过量的乙酸乙酯,得到为褐色粘性油状物的(4Z/E,2S)-甲基-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)-羰基]-4-甲氧基亚氨基吡咯烷-2-羧酸酯[0.492Kg,99.6%

th, 103.6%w/w, ^1H NMR (CDCl_3) 和结构一致]。

[0107] 阶段7: (3Z/E, 5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的制备



[0109] 于0至30℃,在氮气下,将硼氢化锂(0.049Kg, 2.26mol, 0.1wt) 分批加入到溶于四氢呋喃(2.31L, 4.7vol) 和甲醇(2.31L, 4.7vol) 的(4Z/E, 2S)-甲基-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)-羰基]-4-甲氧基亚氨基吡咯烷-2-羧酸酯(0.492Kg, 1.34mol, 1.0wt) 的搅拌溶液中。在15至25℃下,搅拌混合物至反应完成,如通过TLC分析所测定的(洗脱液:乙酸乙酯;显色:茚三酮),通常为2至6小时。在15至25℃下用水(0.40 L, 0.8vol) 终止反应混合物,并在15至25℃下搅拌16至20小时。在真空下于40至45℃浓缩生成物,使残余物在水(2.46L, 5.0vol) 和乙酸乙酯(4.92L, 10.0vol) 之间分配。分离各层,随后用氯化氢水溶液(1M, 2.46L, 5.0vol)、饱和的碳酸氢钠水溶液(2.46L, 5.0vol) 和饱和的氯化钠水溶液(2.46L, 5.0vol) 洗涤有机相。用硫酸镁(0.985Kg, 2.0wt) 干燥有机相,过滤,并用乙酸乙酯(0.50L, 1.0vol) 洗涤滤饼。在真空下浓缩合并的滤液和洗涤液,得到为棕色粘性油状物的含(3Z, 5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼和(3E, 5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的粗同分异构混合物[0.395Kg, 86.9%th, 80.3%w/w, ^1H NMR (CDCl_3) 和结构一致;HPLC的面积为82.0%, Z/E比例为 71.4:28.6]。将油状物溶于甲苯(0.40L, 1.0vol, 相对于产物的重量而言) 中并储存直至需要用时。

[0110] 1.2粗(3Z/E, 5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的干柱快速色谱法

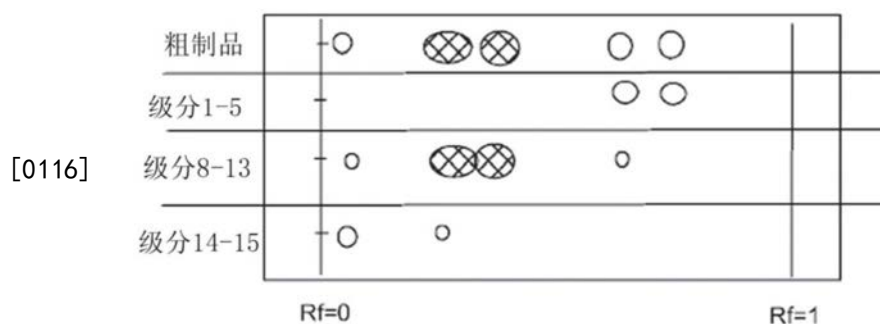
[0111] 使用不同的洗脱条件,尝试对根据上述方案获得的粗同分异构混合物进行干柱快速色谱法纯化。将浓缩至干燥的(3Z/E, 5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的粗混合物重新溶解在2体积的甲苯中,并在25体积的洗脱液级分洗脱之前装载到 SiO_2 (5wt) 垫上。

[0112] 级分1-5:用纯甲苯洗脱

[0113] 级分6-10:用1%vol/vol的甲苯/MeOH洗脱

[0114] 级分10至15:用2%vol/vol的甲苯/MeOH洗脱

[0115] 所收集的级分的TLC示意图谱



[0117] Z和E型由阴影斑点示出。将级分8至13合并并浓缩至干燥。结果显示回收率为75%。E/Z比例没有改进。在干柱快速色谱法之前和之后观察到同分异构混合物的纯度有约4%面积的少许增加(表I)。

[0118] 表I:干柱快速色谱法之前和之后对比的杂质分布特征

	%面积			
	RRT 为 0.7 时的杂质	E+Z- 同分异构体	RRT 为 1.08 时的杂质	RRT 1.12 (Ar-Ar-CH ₂ OH)
[0119] 干柱快速色谱法之前	4.6	91.3	<0.5	4.1
干柱快速色谱法之后	2.5	95.6	<0.5	0.7

[0120] RRT: 相对保留时间

[0121] 粗同分异构混合物的干柱快速色谱法不能实现(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的纯化。干柱快速色谱法之前和之后的E/Z比例保持在30/70至40/60范围内。

[0122] 此外,应基于所述操作必须要进行时的规模来考虑这样的方法。对于20L的规模,此操作不是一个节约时间的方法。

[0123] 1.3对来自粗同分异构混合物的纯Z型的结晶的评估

[0124] 对来自粗混合物(3Z/E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的纯(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的结晶的评估的第一部分一直在研究纯(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的溶解度和可能的结晶条件。下表II报告了在15mg规模上进行的溶解度/结晶测试的结果

[0125] 表II: (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的定性溶解度数据

[0126]

溶剂	溶于:	注释
庚烷	--	20vol中不溶
甲苯	2vol冷	
DIPE	40vol热	
THF	4vol冷	
tBuOH	6vol热	

MIBK	4vol 热	
IPA	4vol 热	

[0127] 起始的溶解度筛选显示纯 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟异构体在一些溶剂中可溶。

[0128] 基于上述结果,检测通过加入反溶剂进行的结晶,结果报告在表III 中。将反溶剂加到约40-50℃的温热溶液中,并使其冷却至室温。

[0129] 具体地,将水(反溶剂)加到溶于IPA的(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的温热(40-50℃)溶液中直到出现浑浊,使混合物冷却至室温。

[0130] 表III:通过添加反溶剂的结晶

溶剂	反溶剂	注释
20 vol 甲苯	39 vol 庚烷	油状物析出
10 vol THF	40 vol 庚烷	油状物析出
10 vol tBuOH	20 vol 水	油状物析出
10 vol MIBK	40 vol 庚烷	油状物析出

20 vol IPA	160 vol 水	非常细小的固体, 静置后析出油状物
8 vol IPA	18 vol 水	非常细小的固体, 静置后析出油状物
10 vol DMSO	12 vol 水	凝胶状物
10 vol NMP	28 vol 水	油状物析出
10 vol MeOH	10 vol 水	油状物析出
20 vol DMSO	16 vol 水	油状物析出
10 vol 丙酮	10 vol 水	油状物析出
10 vol DCM	50 vol 庚烷	油状物析出

[0133] 将IPA/水结晶条件应用于粗同分异构混合物。在溶解于IPA(8vol) 和加入水(18vol) 之前,首先将甲苯溶液浓缩至干燥。不幸地是,这样得到分层为油状物的材料。

[0134] 在另一实验中,在室温下将反溶剂加入到粗(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟(90.4%面积的纯度,含0.5%w/w甲苯和3.7%w/w THF)的溶液中,直到出现浑浊,将混合物静置在室温中(表IV)。

[0135] 表IV:通过在18-22℃下添加水的结晶

[0136]

溶剂	反溶剂	注释
5vol MeOH	3vol 水	油状物析出
5vol DMSO	3vol 水	油状物析出

[0137] 在该研究点上,还未鉴定出纯 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的结晶的合适条件,或允许分离含 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的固体的合适条件。

[0138] 使用 (3Z/E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肟的粗同分异构混合物进行进一步的结晶尝试。在所有情况下,溶剂的体积小于之前所使用的体积并且仅基于单一溶剂。将用于此结晶的粗材料 (E/Z 比例为 33:67 和纯度 (E+Z) 为 79.52% 面积) 浓缩至泡沫 (表V)。

[0139] 表V:来自更低体积的单一溶剂的结晶

[0140]

材料	溶剂	在冰箱中陈化	在冰箱中陈化
'纯 Z'	1.8 vol 乙酸乙酯	随着升温, 结晶物重新溶解	2 天后, 进行和不进行接种的情况下都保留在溶液中
粗品		进行或不进行接种的情况下都不结晶。	n/a
'纯 Z'	2.3 vol 二乙醚	在 18-22°C 加入乙醚时开始溶解, 然后再次析出。回收率为 70% 用于接种。	n/a
粗品		随着升温, 油状物重新溶解	结晶物, 回收率为 41%, E/Z 比例为 40/60, 纯度为 85.4% 面积。(母液, E/Z 比例为 20/80, 纯度为 62.1% 面积)。没有使用晶种。
'纯 Z'	2.3 vol TBME	随着升温, 油状物重新溶解	2 天后, 进行和不进行接种的情况下都保留在溶液中。
粗品		随着升温, 油状物重新溶解	2 天后, 进行和不进行接种的情况下都保留在溶液中。

[0141] 使用乙酸乙酯结晶之后在冰箱中陈化过夜,得到使用纯 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼材料的结晶,但是其随着样品升温很快重新溶解。即使加入晶种,使用溶于乙酸乙酯的粗材料也观察不到晶体。

[0142] 使用二乙醚结晶之后在冰箱中陈化,得到使用粗 (3Z/E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼材料的结晶。收集固体,回收率为41%。不幸的是,所收集到的固体与投入的材料相比具有稍差的E/Z比例和稍高的化学纯度。

[0143] TBME作为纯Z和粗品的溶剂时,在冰箱中陈化后都得到油状物,并且在有或没有晶种的情况下在冰箱中陈化后都保留在溶液中。

[0144] 仍未找到使Z/E比例和同分异构混合物(E+Z)纯度改进的粗同分异构混合物的合适结晶条件。

[0145] 1.4 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的基本上纯的形式

[0146] 1.4.1小规模纯化

[0147] 通过肼酯还原后分离的粗同分异构混合物(实施例1的阶段7)的色谱法进行基本上纯的形式的(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼的分离过程,所述色谱法使用 Biotage系统(Biotage AB,SE-751 03 Uppsala, Sweden)。

[0148] 通过Biotage色谱法纯化五个不同批次(No.020、180、062、068、076)的粗同分异构混合物。此外,对于批次No.068和076使用不同的条件。用添加的5%w/w尖峰的肼甲基酯(No.068)和过载的Biotage柱(No.076)进行纯化。

[0149] 使用已经用甲苯预冲洗的Biotage 40M筒(40g二氧化硅)进行各色谱法。然后用甲苯:MeOH(99:1v/v)洗脱并以100ml的级分收集(总体积为4L),随后用甲苯:MeOH(96:4v/v)冲洗。

[0150] 通过TLC(洗脱液:乙酸乙酯)分析级分以确定哪个级分可被丢弃以及哪个级分含有Z异构体。然后通过HPLC分析这些Z级分。级分的通过标准是Z异构体>96%和E异构体<1.2%。

[0151] 出人意料地,通过Biotage色谱法对多个批次进行的纯化非常有效,因为基本上纯的形式的(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基肼被纯化到99.4%(批次No.020、No.062、No.068)和99.2%(批次No.180、No.076)。特别地,在肼酯的存在下,Biotage色谱法去除了5%w/w肼酯(批次No.068),而对回收率或质量没有损害,Biotage柱的25%的过载没有造成产率或质量的减少(批次No.076)。

[0152] 表VI:Biotage色谱法的效率

[0153]

批 次 No.	输入% E/Z	输出% E/Z	Z 异构体的产率
020	3.0 g 85.7%面积的纯度 % E/Z: 30.5/69.5	纯 Z-级分: 1.0 g 98.8%面积的纯度 % E/Z: 0.6/99.4	33%
180	2.0 g 92.0%面积的纯度 % E/Z: 32.8/67.2	纯 Z-级分 0.9 g 99.6%面积的纯度 % E/Z: 0.8/99.2	45%
062	3.0 g 83.5%面积的纯度 % E/Z: 32.7/67.3	纯 Z-级分 1.3 g 99.8%面积的纯度 % E/Z: 0.6/99.4 混合物: 1.2 g 91.0%面积的纯度 % E/Z: 69.6/30.4	43% 11%
068	3.0g, 掺有~5%的酯 ~78%面积的纯度 % E/Z: 32.7/67.3	纯 Z 级分: 1.2 g 99.8%面积的纯度 % E/Z: 0.6/99.4 混合物: 0.6 g 98.8%面积的纯度 % E/Z: 27.9/72.1 纯 E 级分: 1.1 g 70.7%面积的纯度 % E/Z: 98.7/1.3 (19.3%的酯)	40% 14% N/A
076	3.8g 83.5%面积的纯度 % E/Z: 32.7/67.3	纯 Z 级分 1.4 g 99.8%面积的纯度 % E/Z: 0.8/99.2	37%

[0154]

		混合物: 1.8 g 95.0%面积的纯度 % E/Z: 63.6/36.4	17%
--	--	---	-----

[0155] 1.4.2大规模纯化

[0156] 将多批次的粗 (3Z/E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮-0-甲基肟 (0.392kg, 1.16mol, 1.0wt) 作为溶于甲苯的约50%w/w溶液加入到 Biotage 150L SIM单元中,用溶于甲苯 (150 L) 的1%甲醇以及随后用溶于甲苯 (50L) 的2%甲醇纯化,级分大小为5.0L。视情况而定,通过TLC¹⁵和HPLC分析法来分析所收集的级分。将被认为含干净的 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮-0-甲基肟 (标准:Z-异构体≥96.00%面积,E-异构体≤1.20%面积) 的级分合并并在真空下于40至45℃浓缩。在残余物中加入无水乙醇 (2x2L),并在真空下于40至45℃浓缩溶液直到泡沫状固体可被操作。得到为浅白色至淡褐色固体的所需产品,即 (3Z,5S)-1-[(联苯-4-基-羰基)-5-羟基-甲基]吡咯烷-3-酮-0-甲基肟 (0.089Kg, 22.7% w/w, ¹H NMR (CDCl₃) 和结构一致,HPLC的面积为99.3%,Z/E比例为98,4:0.9)。

[0157] 表VII:对不同批次的基本上纯的形式的 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮-0-甲基肟的纯化的概括

[0158]

批次 No.	输入 (kg)	输出 (kg)	产率(%w/w)	Z 型% (%面积)	E 型% (%面积)
12	0.392	0.089	22.8	98.65	0.85
116	0.392	0.114	29	98.34	0.89
120	0.441	0.081	18.4	97.90	1.81
122	0.380	0.094	24.3	98.52	1.14
124	0.387	0.096	25.3	98.89	0.73
126	0.390	0.132	33.8	98.40	0.95
128	0.526	0.010	2	98.20	0.83
130	0.453	0.086	19	98.46	1.23
132	0.440	0.082	19.3	98.86	0.85

[0159]

134	0.39	0.144	36.9	98.73	0.96
138	0.273	0.098	35.9	98.92	0.66
140	0.463	0.059	13.1	98.52	1.13
142	0.462	0.084	18.4	99.37	0.48
144	0.442	0.126	29	99.1	0.68
146	0.409	0.135	33.5	99.21	0.46
148	0.460	0.107	23.8	99.13	0.65
150	0.409	0.071	18	98.92	0.66
152	0.392	0.054	14.3	98.82	0.76
156	0.445	0.039	8.8	98.64	0.87
158	0.392	0.06	15.3	98.73	0.63
162	0.435	0.150	34.5	98.94	0.79
164	0.434	0.192	44.2	99.21	0.58
166	0.415	0.074	17.8	98.79	0.73
174	0.518	0.108	20.8	99.11	0.64
176	0.342	0.072	21	98.88	0.77
178	0.415	0.074	17.8	99.07	0.71
180	0.353	0.174	49.3	99.03	0.82
182	0.270	0.178	65.9	99.10	0.53

[0160] 将从Biotage色谱法分离的合适批次的(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼(2.713kg,1.0wt)合并,并在15至25℃下溶于无水乙醇(5.16L,2.0vol),通过玻璃微纤维纸过滤得以澄清,并用无水乙醇(0.50L,0.2vol)洗涤过滤器。在真空下于40至45℃分批浓缩合并的滤液。将生成物转移到干燥盘中,并在真空下于30℃干燥24小时。然后在80小时内将烘箱温度从30逐步增加到40℃。通过¹H NMR分析(CDCI₃)测定残余溶剂的水平,并且当发现其<1.0%w/w时,将固体通过500μm孔径的筛。将固体放回烘箱,在40至42℃下干燥直到溶剂水平≤0.40%w/w,得到(3Z,5S)-1-[(联苯-4-基-羰基)-5-羟基-甲基]-吡咯烷-3-酮-0-甲基肼(2.633Kg,97.1% w/w,1H NMR(CDCI₃)和结构一致,HPLC的面积为98.65%)。

[0161] 合并过程概括如下:

[0162] 输入:2.713kg

[0163] 输出:2.633kg

[0164] 产率:97.1%w/w

[0165] 实施例2:(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼与OT-R和加压素V1a受体的结合

[0166] 与OT-R和加压素V1a受体结合

[0167] 使用闪烁邻近测定法体外测量对人类催产素受体的竞争性结合。

[0168] 该测定法允许测定测试化合物对OT-R的亲合力。将来自 HEK293EBNA (表达OT-R的细胞)的膜悬浮在含50mM Tris-HCl、pH 7.4、5mM MgCl₂和0.1%BSA (w/v)的缓冲液中。将膜(2-4μg)与0.1mg包被有小麦胚芽凝集素的SPA珠(来自Amersham的 WGA-PVT-聚乙烯亚胺珠)和0.2 nM的¹²⁵I-OVTA (OVTA为鸟氨酸血管活性的,用于竞争性结合实验的OT类似物)混合。在1μM催产素存在下测定非特异性结合。总的测定体积是100μl。将板(**Corning**® NBS板)在室温下孵育30分钟,并在**Mibrobeta**®板闪烁计数器上计数。在以下浓度的本发明化合物的存在下进行竞争性结合:30μM、10μM、1μM、300nM、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM。使用迭代、非线性曲线拟合程序"Prism"(GraphPad Software, Inc)分析竞争性结合数据。

[0169] 使用上述体外生物学测定来评估本发明化合物抑制I-OVTA与OT-受体结合的能力。上述实施例中测试化合物的结合亲合力由抑制常数(K_i;nM)表示。从这些值中,可以得出本发明的所述测试化合物确实表现出显著的对催产素受体的结合。

[0170] (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮 0-甲基胍对催产素受体的抑制常数K_i是K_i(nM)=52nM,对加压素 V1a受体是K_i(nM)=120nM。因此,(3Z,SS)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基胍对催产素受体具有选择性。

[0171] 实施例3: (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基胍是OT-R拮抗剂

[0172] 通过FLIPR(荧光成像平板读数器)测量对OT-R转染的 HEK293EBNA细胞中的催产素诱导的Ca²⁺迁移的抑制。

[0173] 该测定允许通过化合物(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基胍测量对OT/OT-R介导的钙迁移的抑制。

[0174] **FLIPR**®是一种荧光成像装置,其使用激光(氩离子激光)用于同时照射并阅读(冷却的CCD照相机)96-孔板的每个孔,因此能快速测量大量样品。

[0175] 制备板:FLIPR-板用PLL(聚-L-赖氨酸)10μg/ml+0.1%明胶预先包被以附着HEK293EBNA细胞(表达OT-R的人胚胎肾脏细胞),在37℃下孵育30分钟至多达2天。将细胞移植(plate out)到96-孔板中(60000细胞/孔)。

[0176] 用氟-4标记:将50μg的氟-4(Ca²⁺敏感的荧光染料)溶解在20μl 普流尼克酸(pluronic acid)中(20%在DMSO中)。然后将溶解的氟-4稀释在10ml DMEM(Dubecco's Minimal Essential Medium)-F12培养基中。用DMEM-F12培养基将板洗涤一次。将100μl的含氟-4的 DMEM-F12培养基加入到HEK-细胞中,后者在该荧光培养基中孵育 1.5-2h。氟-4被细胞的细胞质摄取。

[0177] 缓冲液:145mM NaCl、5mM KCl、1mM MgCl₂、10mM Hepes、10mM葡萄糖、EGTA(乙二醇-二(氨基乙醚)四乙酸)。调节pH至7.4。

[0178] 进行测定:制备溶于上述缓冲液(1x)的最小量的80μl/孔的化合物 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基胍(5x)(96-孔板)。将化合物(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲

基胍以不同浓度 (30 μ M、10 μ M、1 μ M、300nM、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM) 加入到96-孔板中。以40nM的浓度加入催产素 (OT)。

[0179] 然后,在化合物 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基胍存在或不存在下用FLIPR测量氟-4的相对荧光 ($\lambda_{ex}=488\text{nm}$, $\lambda_{em}=590\text{nm}$)。标记物的荧光对Ca²⁺的量敏感,因此可检测到Ca²⁺移动。然后,可测定化合物 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基胍拮抗由催产素受体介导的催产素诱导的细胞内Ca²⁺迁移的能力。

[0180] 式 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基胍的化合物抑制催产素对OT-R的活性,IC₅₀=81nM。

[0181] 实施例4:对麻醉的晚期妊娠的大鼠的自发性子宫收缩的抑制

[0182] 4.1实验方案

[0183] 将重350-400g、晚期妊娠(确认妊娠19-21天)的Sprague Dawley CD (SD) BR雌性大鼠(Charles River,Calco,Italy)用氨基甲酸甲酯(1.05g/kg,腹腔内注射)麻醉,放在恒温手术台上。在下腹水平做一个中线切口,暴露出一个妊娠子宫角,用具有手术丝线的结扎线缝合其输卵管终端(接近卵巢)。

[0184] 对应于接近卵巢的胎儿,切开子宫-角壁,小心不要损伤邻近的胎盘,将在顶部具有乳胶气球(空时长为9mm,容量为0.1mL;Radnoti, Monrovia,CA,USA)的PE240管插入内腔并用手术丝线固定于子宫壁。在用0.1mL的无菌生理盐水溶液填充乳胶气球的内腔后,通过P23ID Gould-Statham压力传感器将导管连接至放大/记录系统(MacLab,ADInstruments Pty Ltd,Castle Hill,Australia)。分离出一根颈静脉,插入用于静脉内给药的PE60聚乙烯插管。术前准备后,观察到30分钟的稳定期,然后通过测量所产生的子宫收缩来评估增加本发明化合物的剂量的效果(给予方式为10分钟的静脉内输注、静脉内推注或口服(p.o.))。

[0185] 对于静脉内给药(输注或推注),通过计算10分钟注射期间的AUC 来定量子宫的收缩活性。计算与第一次剂量给药前所记录的值(基值)相比的在各化合物给予后所观察到的自发性子宫响应有关的AUC值的百分比变化。通过比较治疗前和治疗后的子宫腔压力值来评估本发明测试化合物的效果。

[0186] 对于口服给药,在治疗后的不同时间点使用相同的计算程序。通过使用单因素ANOVA然后使用Tukey检验,测定各时间点的治疗组之间的统计学差异。

[0187] 4.2结果

[0188] 图1A和B描述了通过口服途径给药的Z-异构体和E-异构体对接近足月(妊娠天数为19-21)的麻醉的妊娠大鼠的自发性子宫收缩的抑制的剂量-响应作用。数据表示为n=6-8只动物/组的平均值 $\pm$ S.E.。y轴表示与100%的给药前设置值相比的以%值计的子宫收缩。x轴表示以分钟计的给药后时间。连续记录收缩,整合10分钟时间间隔内的曲线下面积(AUC)。

[0189] 图1A所示的结果证明与对照赋形剂NP3S(5%N-甲基吡咯烷酮、25%聚乙二醇200、30%聚乙二醇400、20%丙二醇、20%生理盐水)相比,(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮O-甲基胍(Z型)能够以不同剂量(10、30或60mg/kg)快速抑制麻醉的晚期妊娠的大鼠的自发性子宫收缩。在给予基本上纯的Z型后5

至15分钟,可观察到15%的子宫收缩抑制。在给予所述化合物后 170-180分钟,观察到42%的有效抑制。

[0190] 相比之下,使用不同剂量(10、30或60mg/kg,E型)的(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼在 170-180分钟观察期期间的任何时间都未观察到对子宫收缩的抑制作用(图1B)。

[0191] 令人惊讶地,本发明表明,具有式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的基本上纯的Z型抑制子宫收缩,而基本上纯的E型没有功效。因此,本发明有利地涉及以基本上纯的形式的式(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的生物学活性化合物和/或其代谢物,与以同分异构混合物形式提供的所述化合物相比,其可以较低剂量给药。

[0192] 实施例5: (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的体内稳定性

[0193] 在以单一口服剂量和静脉内剂量(额定的30mg/kg,25μCi/大鼠)给予八只健康的雌性大鼠(对于各给药途径,n=4)后,研究了 [¹⁴C]-(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮 0-甲基肼的同分异构互变。

[0194] 在该研究中使用的动物是Sprague-Dawley,Crl: **CD®BR** 大白鼠。所有动物都由 Charles River UK Ltd (Margate,Kent,UK) 提供。动物的重量范围为200-260g并且约为2个月大。给予大鼠唯一的标识号,并通过唯一的尾部标记和笼子位置来鉴定。

[0195] 剂量组如下:4只雌性被给予一次口服剂量,另4只雌性被给予一次静脉内剂量。

[0196] 在目标剂量水平为30mg/kg和放射性浓度约为25μCi/大鼠的各剂量阶段分别制备 [¹⁴C]-(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼口服和静脉内剂量给药制剂。在合适的基质中制备剂量制剂;在NP3S中制备静脉内剂量,在辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯:水(1:1v/v)中制备口服剂量。

[0197] 使用HPLC的色谱分析表明,在剂量给药之前或之后在口服或静脉内剂量制剂中都不存在显示与式(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的E-同分异构体共色谱层析的放射性成分。因此,在剂量制备或给药期间,没有可检测到的 (3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼至(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的互变。没有证据表明,在口服或静脉内给予 [¹⁴C]-(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮 0-甲基肼高达6个小时后收集的血浆中存在式(3E,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼的 [¹⁴C]-E-同分异构体。

[0198] 因此,使用所述的方法,[¹⁴C]-(3Z,5S)-5-(羟基甲基)-1-[(2'-甲基-1,1'-联苯-4-基)羰基]吡咯烷-3-酮0-甲基肼在口服或静脉内剂量给药后在体内不发生可检测到的同分异构互变。

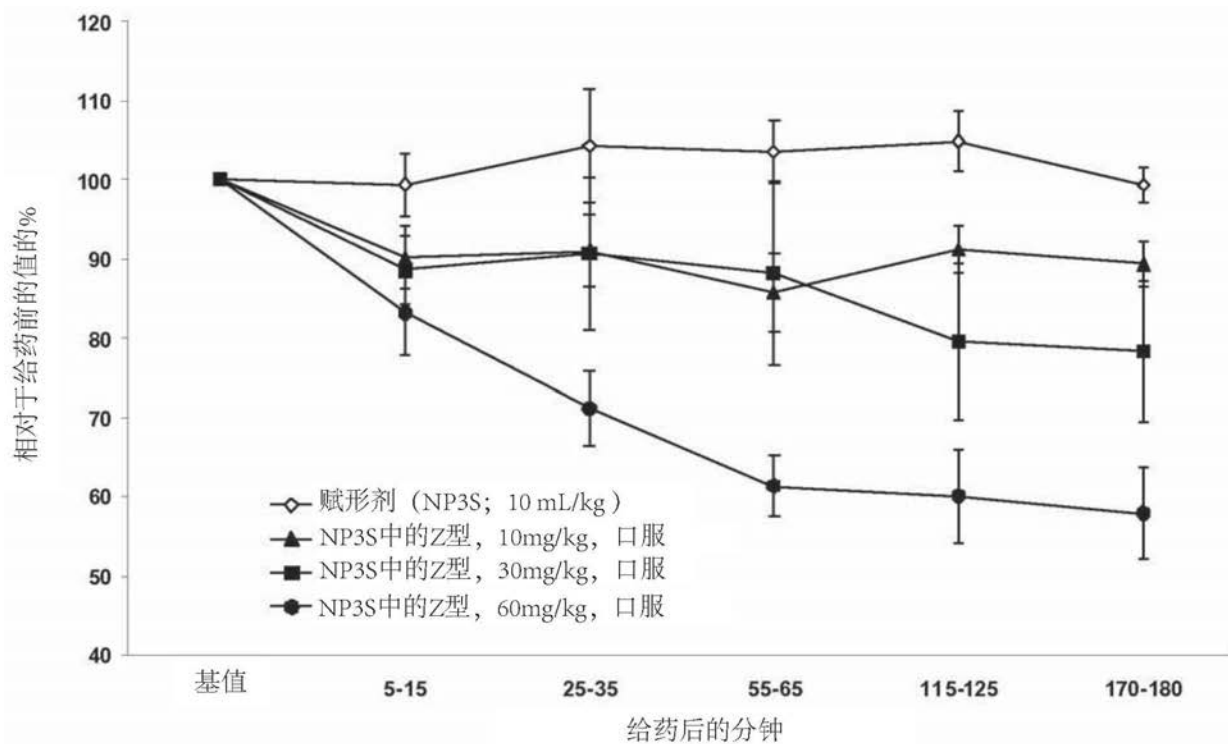


图1A

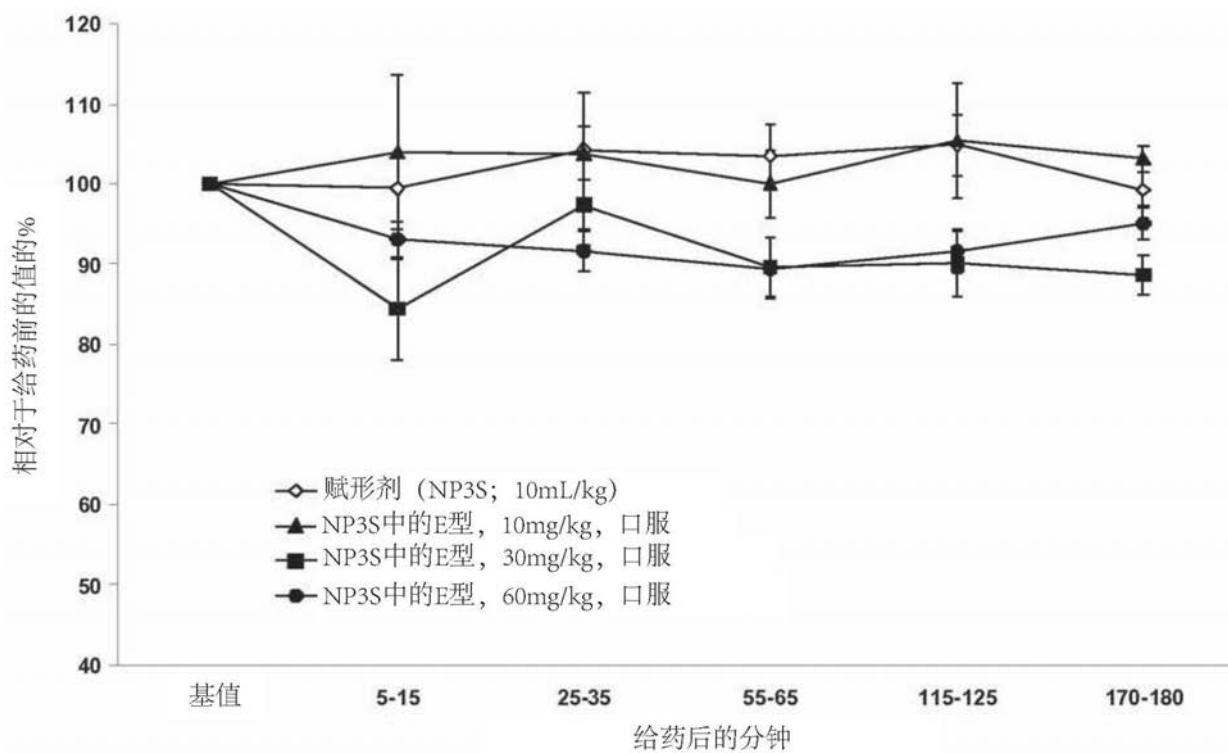


图1B