

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200580013391. X

[51] Int. Cl.

C07D 451/04 (2006.01)

A61K 31/46 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 12 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100569771C

[22] 申请日 2005.4.6

[21] 申请号 200580013391. X

[30] 优先权

[32] 2004. 4. 7 [33] US [31] 60/560,076

[86] 国际申请 PCT/US2005/011393 2005.4.6

[87] 国际公布 WO2005/100350 英 2005.10.27

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.27

[73] 专利权人 施万制药

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 D·马克斯 P·R·法瑟里

D·S·特纳 D·D·龙 崔锡基

A·A·戈德布拉姆 D·吉诺夫

[56] 参考文献

WO03057688A2 2003.7.17

5-HT₄ Receptor Ligands: Applications and New Prospects. Michel Langlois, Rodolphe Fischmeister. JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, Vol. 46 No. 3. 2003

Synthesis and Evaluation of Novel 2-Oxo-1,2-dihydro-3-quinolinecarboxamide Derivatives as Potent and Selective Serotonin 5-HT₄ Receptor Agonists. Masaji SUZUKI, Yutaka OHUCHI, ET. AL. CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, Vol. 49 No. 1. 2001

审查员 毛 丹

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司

代理人 王允方 刘国伟

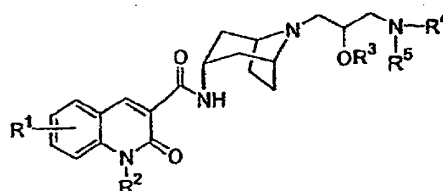
权利要求书 9 页 说明书 66 页

[54] 发明名称

作为 5-HT₄ 受体激动剂的喹啉酮—甲酰胺化合物

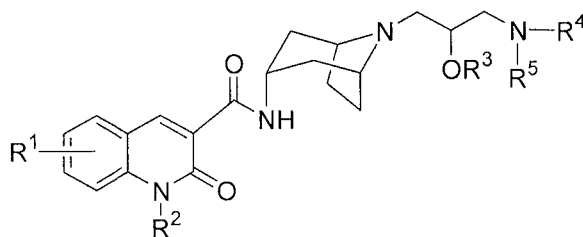
[57] 摘要

本发明提供了式(I)的新的喹啉酮—甲酰胺 5-HT₄ 受体激动剂化合物。本发明还提供了包含该化合物的药物组合物,使用该化合物治疗与 5-HT₄ 受体活性相关疾病的应用,和用于制备该化合物的方法和中间体。(见右式)其中: R¹ 是氢、卤素、羟基、C₁₋₄ 烷基或 C₁₋₄ 烷氧基; R² 是 C₃₋₄ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基; R³ 是氢或 C₁₋₃ 烷基; R⁴ 是 -S(O)₂R⁶ 或 -C(O)R⁷; R⁵ 是氢、C₁₋₃ 烷基、被 -OH 或 C₁₋₃ 烷氧基取代的 C₂₋₃ 烷基、或 -CH₂-吡啶基; R⁶ 是 C₁₋₃ 烷基; 或, R⁵ 和 R⁶ 一起形成 C₃₋₄ 亚烷基; 和 R⁷ 是氢、C₁₋₃ 烷基或吡啶基; 或其药学可接受的盐或溶剂化物或立体异构体。



(I)

1. 式(I)化合物:



(I)

其中:

R^1 是氢、卤素、羟基、 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基;

R^2 是 C_{3-4} 烷基或 C_{3-6} 环烷基;

R^3 是氢或 C_{1-3} 烷基;

R^4 是 $-S(O)_2R^6$ 或 $-C(O)R^7$;

R^5 是氢、 C_{1-3} 烷基、被 $-OH$ 或 C_{1-3} 烷氧基取代的 C_{2-3} 烷基、或 $-CH_2-$ 吡啶基;

R^6 是 C_{1-3} 烷基;

或, R^5 和 R^6 一起形成 C_{3-4} 亚烷基; 和

R^7 是氢、 C_{1-3} 烷基或吡啶基;

或其药学可接受的盐。

2. 权利要求 1 的化合物或其药学可接受的盐, 其中,

R^5 是氢、 C_{1-3} 烷基、被 $-OH$ 或 C_{1-3} 烷氧基取代的 C_{2-3} 烷基、或 $-CH_2-$ 吡啶基; 和

R^6 是 C_{1-3} 烷基。

3. 权利要求 2 的化合物或其药学可接受的盐, 其中, R^1 是氢或卤素。4. 权利要求 2 的化合物或其药学可接受的盐, 其中, R^2 是 C_{3-4}

烷基。

5. 权利要求 2 的化合物或其药学可接受的盐，其中， R^4 是 $—S(O)_2R^6$ 。

6. 权利要求 5 的化合物或其药学可接受的盐，其中， R^4 是 $—S(O)_2CH_3$ 。

7. 权利要求 2 的化合物或其药学可接受的盐，其中， R^4 是 $—C(O)R^7$ 。

8. 权利要求 7 的化合物或其药学可接受的盐，其中， R^7 是氢或甲基。

9. 权利要求 2 的化合物或其药学可接受的盐，其中， R^5 是氢或甲基。

10. 权利要求 2 的化合物或其药学可接受的盐，其中：

R^1 是氢；

R^2 是 C_{3-4} 烷基或 C_{4-5} 环烷基；

R^3 是氢；

R^4 是 $—S(O)_2R^6$ 或 $—C(O)R^7$ ；

R^5 是氢或 C_{1-3} 烷基；

R^6 是 C_{1-3} 烷基；和

R^7 是氢或 C_{1-3} 烷基。

11. 权利要求 1 的化合物，其中，该化合物选自：

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰

胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-甲氧基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(甲磺酰基-吡啶-3-基甲基-氨基)-2-甲氧基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(甲磺酰基-吡啶-3-基甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-[甲基-(吡啶-4-羰基)氨基]丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-[(吡啶-4-羰基)氨基]丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-甲氧基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-甲氧基-3-[甲基-(吡啶-4-羰基)氨基]丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(乙酰基-吡啶-3-基甲基-氨基)-2-甲氧基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-乙酰基氨基-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(甲酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-甲酰基氨基-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-3-(甲酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

5-溴代-1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-乙基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺; 和

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-

羟基-3-(1,1-二氧化-2-异噻唑烷基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

及其药学可接受的盐。

12. 权利要求 2 的化合物, 其中, 该化合物选自:

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(甲酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-3-(甲酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

及其药学可接受的盐。

13. 权利要求 12 的化合物, 其中, 该化合物选自:

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺;

及其药学可接受的盐。

14. 包含治疗有效量的权利要求 1 到 13 任一项的化合物和药学可接受载体的药物组合物。

15. 权利要求 1 到 13 任一项的化合物在制造用于治疗哺乳动物与 5-HT₄受体活性有关的医学病况的药物中的应用。

16. 权利要求 15 的应用, 其中所述医学病况选自由过敏性肠综合征、长期便秘、机能性消化不良、胃排空延迟、胃食管返流疾病、胃轻瘫、手术后肠梗阻、假性肠梗塞和药物造成的运输延迟组成的群组。

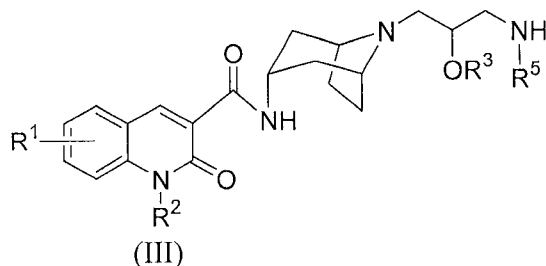
17. 权利要求 15 的应用, 其中所述医学病况是胃肠道动力减弱

的病症。

18. 权利要求 17 的应用, 其中所述动力减弱病症选自由长期便秘、便秘为主的过敏性肠综合征、糖尿病性和自发性胃轻瘫以及机能性消化不良组成的群组。

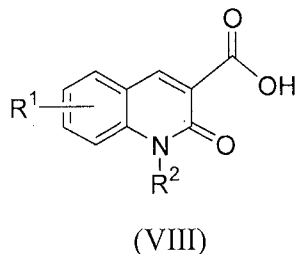
19. 制备权利要求 1 到 13 任一项的化合物的方法, 该方法包括:

(a) 将式 (III) 化合物:

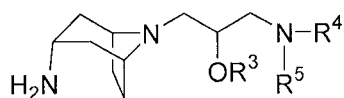


与式 L—R⁴ 化合物反应, 其中, L 是离去基团, 其中 R¹、R²、R³、R⁴ 和 R⁵ 如权利要求 1 到 10 中任一项所定义; 或

(b) 将式 (VIII) 化合物:



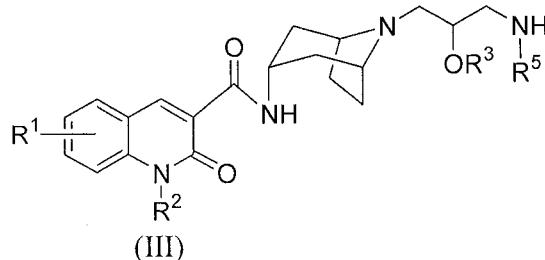
与式 (IX) 化合物:



反应, 其中 R¹、R²、R³、R⁴ 和 R⁵ 如权利要求 1 到 10 中任一项所定义, 以得到式 (I) 化合物, 或其药学可接受的盐。

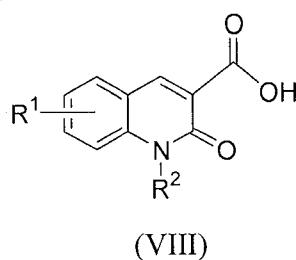
20. 制备权利要求 1 到 13 任一项的化合物的方法, 该方法包括:

(a) 将式(III)化合物:

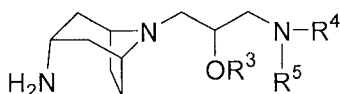


与式 L—R⁴ 化合物反应, 其中, L—R⁴ 代表 HO—C(O)R⁷, 其中 R¹、R²、R³、R⁵ 和 R⁷ 如权利要求 1 到 10 中任一项所定义; 或

(b) 将式(VIII)化合物:



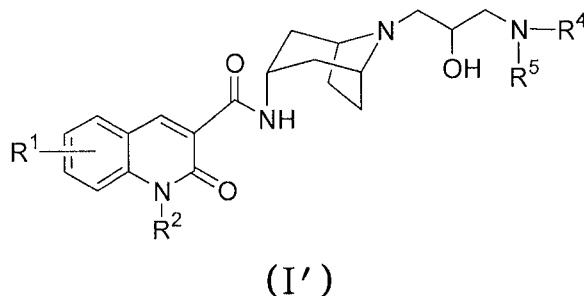
与式(IX)化合物:



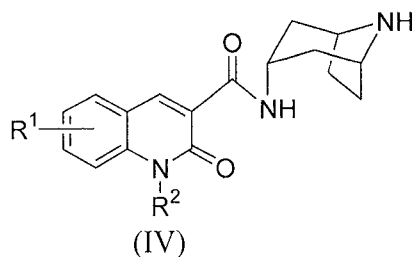
(IX) 反应, 其中 R¹、R²、R³、R⁴ 和 R⁵ 如权利要求 1 到 10 中任一项所定义,

以得到式(I)化合物, 或其药学可接受的盐。

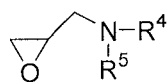
21. 制备式(I')化合物的方法,



其中, R¹、R²、R⁴ 和 R⁵ 如权利要求 1 到 10 中任一项所定义; 或其药学可接受的盐, 该方法包括将式(IV)化合物:



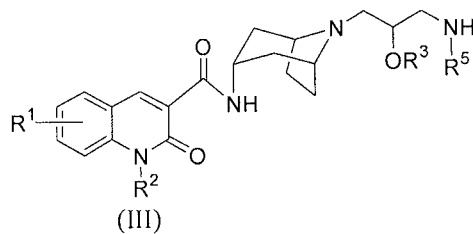
或其盐与式 (XI) 化合物:



(XI)

反应, 得到式 (I') 化合物, 或其药学可接受的盐。

22. 式 (III) 化合物:



其中:

R^1 是氢、卤素、羟基、 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基;

R^2 是 C_{3-4} 烷基或 C_{3-6} 环烷基;

R^3 是氢或 C_{1-3} 烷基; 和

R^5 是氢、 C_{1-3} 烷基、被 -OH 或 C_{1-3} 烷氧基取代的 C_{2-3} 烷基、或 $-\text{CH}_2-$ 吡啶基;

或其盐。

作为 5-HT₄ 受体激动剂的喹啉酮-甲酰胺化合物

发明背景

发明领域

本发明涉及用作 5-HT₄ 受体激动剂的喹啉酮-甲酰胺化合物。本发明还涉及包含该化合物的药物组合物, 使用该化合物治疗或预防由 5-HT₄ 受体活性介导的医学病况的方法, 和用于制备该化合物的方法和中间体。

现有技术发展水平

5-羟色胺(5-羟基色胺, 5-HT)是广泛分布在身体中、既在中枢神经系统又在周围神经系统的神经递质。已经鉴定了至少 7 个 5-羟色胺受体亚型, 5-羟色胺和这些不同受体之间的相互作用与多种生理功能有关。因此, 很有兴趣开发靶向特定 5-HT 受体亚型的治疗剂。

特别地, 5-HT₄ 受体的表征和与该受体相互作用的药剂的鉴定已经成为重大的新近研究活动的焦点(参见例如 Langlois 和 Fischmeister 的综述, *J. Med. Chem.* 2003, 46, 319-344.)。5-HT₄ 受体激动剂对于治疗胃肠道动力降低的疾病是有用的。这些疾病包括过敏性肠综合征(IBS)、长期便秘、机能性消化不良、胃排空延迟、胃食管返流疾病(GERD)、胃轻瘫、手术后肠梗阻、假性肠梗塞和药物造成的运输延迟。另外, 已经建议一些 5-HT₄ 受体激动剂化合物可用于治疗中枢神经系统病症, 包括认知障碍、行为障碍、心境障碍和自主功能控制障碍。

虽然调节 5-HT₄ 受体活性的药剂有很多效用, 然而目前只有极少数 5-HT₄ 受体激动剂化合物在临床上应用。一种广泛用于治疗胃肠道动力障碍的药物, 西沙必利, 已经从市场上召回, 据报道是由于对心脏的副作用。另一种药物普卢卡必利的晚期临床试验已经被悬置。

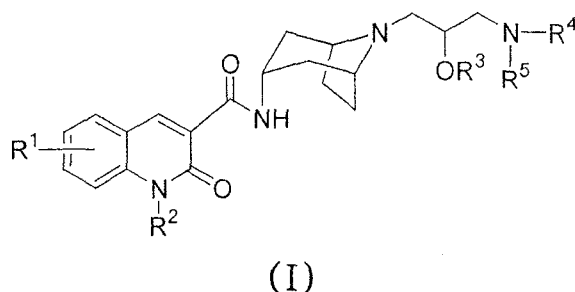
相应地, 对于能达到其预期效应而又具有最小副作用的新 5-HT₄

受体激动剂存在需求。在其它性质当中，优选药物可具有改进的选择性、效力、药代动力学性质和/或作用的持续时间。

发明概述

本发明提供了具有 5-HT₄ 受体激动活性的新化合物。在其它性质当中，已经发现本发明化合物是强有力的并且选择性的 5-HT₄ 受体激动剂。另外，已经发现本发明化合物显示出良好的药代动力学性质，预期它经口服给药有良好的生物利用度。

相应地，本发明提供了式 (I) 化合物：



其中：

R¹ 是氢、卤素、羟基、C₁₋₄ 烷基或 C₁₋₄ 烷氧基；

R² 是 C₃₋₄ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基；

R³ 是氢或 C₁₋₃ 烷基；

R⁴ 是—S(O)₂R⁶ 或—C(O)R⁷；

R⁵ 是氢、C₁₋₃ 烷基、被—OH 或 C₁₋₃ 烷氧基取代的 C₂₋₃ 烷基、或—CH₂—吡啶基；

R⁶ 是 C₁₋₃ 烷基；

或，R⁵ 和 R⁶ 一起形成 C₃₋₄ 亚烷基；和

R⁷ 是氢、C₁₋₃ 烷基或吡啶基；

或其药学可接受的盐或溶剂化物或立体异构体。

本发明还提供了包含本发明化合物和药学可接受载体的药物组合物。

本发明还提供了治疗与 5-HT₄ 受体活性相关的疾病或病症的方法，例如胃肠道动力减弱疾病，该方法包括给哺乳动物施用治疗有效量的

本发明化合物。

进一步地，本发明提供了治疗哺乳动物与 5-HT₄ 受体活性相关的疾病或病症的方法，该方法包括给哺乳动物施用治疗有效量的本发明的药物组合物。

本发明化合物也可以用作研究工具，即，用于研究生物系统或样品，或用于研究其它化合物的活性。相应地，在另一方法方面中，本发明提供了使用式 (I) 化合物或其药学可接受的盐或溶剂化物或立体异构体作为研究工具，研究生物系统或样品，或发现新的 5-HT₄ 受体激动剂的方法，该方法包括将生物系统或样品与本发明化合物接触，并测定由该化合物引起的对于生物系统或样品的作用。

在单独不同的方面中，本发明还提供了本文所述的合成方法和中间体，所述中间体对于制备本发明化合物是有用的。

本发明还提供了本文所述的用于医学治疗的本发明化合物，以及本发明化合物在制备治疗哺乳动物与 5-HT₄ 受体活性相关的疾病或病症的制剂或药物中的应用，例如，胃肠道动力减弱疾病。

发明的详细描述

本发明提供了新的式 (I) 喹啉酮-甲酰胺 5-HT₄ 受体激动剂，或其药学可接受的盐或溶剂化物或立体异构体。下列取代基和值旨在提供本发明各个方面有代表性的实例。这些有代表性的值旨在进一步定义这些方面，并不旨在排除其它值或限制本发明范围。

在本发明具体方面中，R¹ 是氢、卤素、C₁₋₄ 烷基或 C₁₋₄ 烷氧基。

在其它具体方面中，R¹ 是氢、卤素或 C₁₋₄ 烷基；或 R¹ 是氢或卤素；或 R¹ 是氟；或 R¹ 是溴。

在又一个具体方面中，R¹ 是氢。

在具体方面中，R² 是 C₃₋₄ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基。

在另一个具体方面中，R² 是 C₃₋₄ 烷基。典型的 R² 基团包括正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基和叔丁基。

在另一个具体方面中，R² 是异丙基。

在更其它具体方面中, R^2 是 C_{3-4} 烷基或 C_{4-5} 环烷基; 或 R^2 是异丙基或 C_{4-5} 环烷基。

在具体方面中, R^3 是氢或 C_{1-3} 烷基。

在其它具体方面中, R^3 是氢或 R^3 是甲基。

在具体方面中, R^4 是 $-S(O)_2R^6$, 其中, R^6 是 C_{1-3} 烷基。

在另一个具体方面中, R^4 是 $-S(O)_2CH_3$ 。

在具体方面中, R^4 是 $-C(O)R^7$, 其中, R^7 是氢、 C_{1-3} 烷基或吡啶基。

在其它具体方面中, R^4 是 $-C(O)R^7$, 其中, R^7 是氢或 C_{1-3} 烷基; 或 R^4 是 $-C(O)R^7$, 其中, R^7 是氢或甲基; 或 R^4 是 $-C(O)R^7$, 其中, R^7 是氢; 或 R^4 是 $-C(O)R^7$, 其中, R^7 是甲基。

在又一个具体方面中, R^4 是 $-C(O)R^7$, 其中, R^7 是 3-吡啶基或 4-吡啶基。

在具体方面中, R^5 是氢; C_{1-3} 烷基; 被 $-OH$ 或 C_{1-3} 烷氧基取代的 C_{2-3} 烷基; 或 $-CH_2-$ 吡啶基。

在其它具体方面中, R^5 是氢、 C_{1-3} 烷基或 $-CH_2-$ 吡啶基; 或 R^5 是氢或 C_{1-3} 烷基。

在更其它具体方面中, R^5 是 $-CH_2-3-$ 吡啶基; 或 R^5 是氢或甲基; 或 R^5 是氢; 或 R^5 是甲基。

在更其它具体方面中, R^5 和 R^6 一起形成 $-(CH_2)_3-$ 或 $-(CH_2)_4$; 或 R^5 和 R^6 一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。

在一个方面中, 本发明提供了式 (I) 化合物, 其中, R^3 是氢。

在另一个方面中, 本发明提供了式 (I) 化合物, 其中, R^4 是 $-S(O)_2R^6$ 。

在另一个方面中, 本发明提供了式 (I) 化合物, 其中, R^4 是 $-C(O)R^7$ 。

本发明进一步提供了式 (I) 化合物, 其中, R^1 是氢或卤素; R^2 是异丙基或 C_{4-5} 环烷基; 而 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 如式 (I) 中定义。

在又一个方面中, 本发明提供了式 (I) 化合物, 其中:

R^1 是氢;

R^2 是 C_{3-4} 烷基或 C_{4-5} 环烷基;

R^3 是氢;

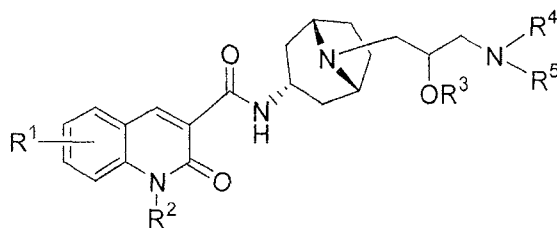
R^4 是 $-S(O)_2R^6$ 或 $-C(O)R^7$;

R^5 是氢或 C_{1-3} 烷基;

R^6 是 C_{1-3} 烷基; 和

R^7 是氢或 C_{1-3} 烷基。

在又一个方面中, 本发明提供了一组式 (II) 化合物:



(II)

其中, R^1 是氢, R^2 是异丙基, 而 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 , 或 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^7 分别取表 I 和表 II 中所示的值。

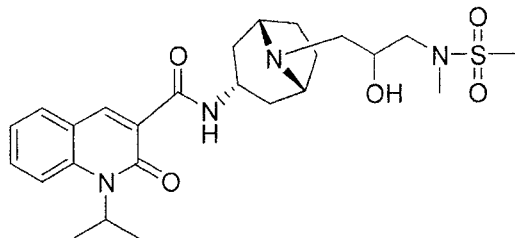
表 I

$R^4 = -S(O)_2R^6$			
实施例编号	R^3	R^5	R^6
1	H	CH_3	CH_3
2	CH_3	CH_3	CH_3
3	CH_3	$-CH_2-3-吡啶基$	CH_3
4	H	H	CH_3
5	H	$-CH_2-3-吡啶基$	CH_3
6	H	CH_3	CH_3
7	H	CH_3	CH_3
21	H	C_2H_5	CH_3
22	H	H	CH_3
23	H	$-(CH_2)_3-$	

表 II

$R^4 = -C(O)R^7$			
实施例编号	R^3	R^5	R^7
8	H	CH ₃	4-吡啶基
9	H	H	4-吡啶基
10	CH ₃	CH ₃	CH ₃
11	CH ₃	CH ₃	4-吡啶基
12	CH ₃	-CH ₂ -3-吡啶基	CH ₃
13	H	H	CH ₃
14	H	CH ₃	CH ₃
15	H	CH ₃	H
16	H	H	H
17	H	CH ₃	CH ₃
18	H	CH ₃	H

本文所用的化学命名协议用实施例 1 化合物进行举例说明：



根据由 MDL Information Systems, GmbH (法兰克福, 德国) 提供的 AutoNom 软件, 该化合物被命名为 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基} 酰胺。该指定 (1*S*, 3*R*, 5*R*) 描述了与二环系统有关的键的相对取向, 它们用实楔形和虚楔形表示。该化合物可选择地表示成 *N*[(3-内)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基]-1-(1-甲基乙基)-2-氧代-1,2-二氢-3-喹啉甲酰胺。在所有上述本发明化合物中, 喹啉酮-甲酰胺处于

氮杂二环辛烷基的内位。

可特别提及下列化合物：

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺；

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺；

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺；

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺；

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺；

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(甲酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺；

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺；

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-3-(甲酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺；和

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺。

如以上所列的特定化合物所举例说明的，本发明化合物可包含手性中心，特别地，在式(I)或(II)中携带—OR³取代基的碳原子处。相应地，除非特别说明，本发明包括外消旋混合物、纯立体异构体和这

类异构体中立体异构体富集的混合物。当说明特定立体异构体时，本领域技术人员应当知道，除非另外说明，少量其它立体异构体可存在于本发明组合物中，条件是该组合物作为一个整体的任何效用不被这些其它异构体的存在所消除。

定义

当描述本发明化合物、组合物和方法时，除非另外说明，下列术语具有下列含义。

术语“烷基”指的是可为直链、支链或其组合的单价饱和烃基。除非另外说明，该烷基通常包含 1 到 10 个碳原子。例如，典型的烷基包括甲基、乙基、正丙基 (n-Pr)、异丙基 (i-Pr)、正丁基 (n-Bu)、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基和正癸基等。

术语“亚烷基”指的是可为直链、支链或其组合的二价饱和烃基。除非另外说明，该亚烷基通常包含 1 到 10 个碳原子。例如，典型的亚烷基包括亚甲基、亚乙基、亚正丙基、亚正丁基、丙烷-1,2-二基 (1-甲基亚乙基)、和 2-甲基丙烷-1,2-二基 (1,1-二甲基亚乙基) 等。

术语“烷氧基”指的是单价基团-O-烷基，其中，烷基如上定义。例如，典型的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基等。

术语“环烷基”指的是可为单环或多环的单价饱和碳环基团。除非另外说明，该环烷基通常包含 3 到 10 个碳原子。例如，典型的环烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基等。

术语“卤素”指的是氟、氯、溴或碘。

术语“化合物”指的是合成制备或以任何其它途径如通过代谢制备的化合物。

术语“治疗有效量”指的是当给需要治疗的患者施用时，足以实现治疗的量。

本文所用的术语“治疗”指的是治疗患者如哺乳动物 (尤其是人) 的疾病、病症或医学病况，它包括：

- (a) 预防疾病、病症或医学病况发生，即，对患者的预防性治疗；
- (b) 改善疾病、病症或医学病况，即，消除患者的疾病、病症或医学病况或引起其消退；
- (c) 遏制疾病、病症或医学病况，即，减缓或阻止患者疾病、病症或医学病况的发展；或
- (d) 减轻患者疾病、病症或医学病况的症状。

术语“药学可接受的盐”指的是从酸或碱制备的盐，它对于给患者例如哺乳动物施用是可接受的。该盐可以衍生自药学可接受的无机酸或有机酸，和衍生自药学可接受的碱。典型地，本发明化合物药学可接受的盐是从酸制备的。

衍生自药学可接受的酸的盐包括但不限于乙酸、己二酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、富马酸、葡糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸、xinafoic (1-羟基-2-萘甲酸)和萘-1,5-二磺酸等。

术语“溶剂化物”指的是由一个或多个溶质(即本发明化合物或其药学可接受的盐)分子和一个或多个溶剂分子形成的复合物或聚集物。该溶剂化物通常是具有基本上固定的溶质和溶剂摩尔比的结晶固体。例如，典型的溶剂包括水、甲醇、乙醇、异丙醇和乙酸等。当溶剂是水时，所形成的溶剂化物是水合物。

可以理解的是，术语“或其药学可接受的盐或溶剂化物或立体异构体”旨在包括盐、溶剂化物和立体异构体的所有排列，例如式(I)化合物的立体异构体的药学可接受的盐的溶剂化物。

术语“氨基-保护基”指的是适合于阻止氨基氮处发生不希望的反应的保护基。典型的氨基-保护基包括但不限于甲酰基；酰基，例如烷酰基，如乙酰基；烷氧羰基，如叔丁氧羰基(Boc)；芳基甲氧羰基，如苄氧羰基(Cbz)和 9-苄基甲氧羰基(Fmoc)；芳甲基，如苄基(Bn)、三苯甲基(Tr)和 1,1-二-(4'-甲氧基苯基)甲基；甲硅烷基，如三甲基甲

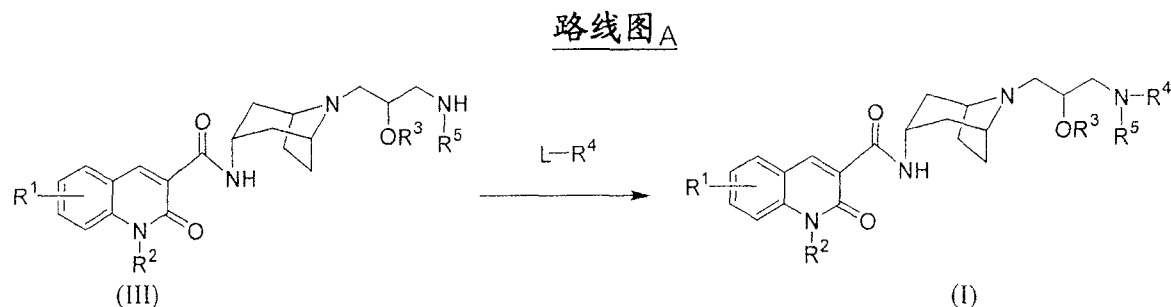
硅烷基 (TMS) 和叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBDMS); 和诸如此类。

一般合成过程

本发明化合物可以使用下列一般方法和程序, 从容易获得的原料制备。虽然本发明的特定方面在下列路线图中详细说明了, 然而本领域技术人员可以理解的是, 本发明的所有方面可以使用本文所述的方法或使用本领域技术人员已知的其它方法、试剂和原料制备。也可以理解的是, 虽然给出了典型或优选的工艺条件 (即反应温度、时间、反应物的摩尔比、溶剂、压力等), 但是其它操作条件也可以使用, 除非另外说明。最佳反应条件可根据所用的特定试剂或溶剂而改变, 但这种反应条件可以由本领域技术人员通过常规优化程序确定。

另外, 对本领域技术人员显而易见的是, 常规保护基对于防止某些官能团经历不希望的反应来说可能是必需的。为特定官能团选择适当的保护基以及保护和去保护的适当条件都是现有技术公知的。例如, 大量保护基和它们的引入和去除都描述在 T. W. Greene 和 G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York, 1999, 和其中引用的参考文献中。

在一种合成方法中, 式 (I) 化合物如路线图 A 中所述制备。(除非另外说明, 在下列路线图中所示的取代基和变量具有以上提供的定义)。



在路线图 A 中, L 代表离去基团, 例如氯、溴、碘或乙氧基, 或试剂 $L-R^4$ 是羧酸 $HO-C(O)R^7$, 即, L 在形式上代表羟基。

路线图 A 反应的最佳反应条件可根据试剂 $L-R^4$ 的化学性质而改变, 这对于本领域技术人员来说是公知的。

例如, 当 L 是卤素离去基团如氯时, 反应通常如下进行: 在惰性稀释剂如二氯甲烷中, 在过量碱例如约 3 - 约 6 当量的碱如 *N,N*-二异丙基乙基胺或 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯 (DBU) 的存在下, 将中间体 (III) 与约 1 - 约 4 当量的式 $L-R^4$ 化合物接触。适当的惰性稀释剂也包括 *N,N*-二甲基甲酰胺、三氯甲烷、1,1,2,2-四氯乙烷和四氢呋喃等。反应通常在约 $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 到约 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内进行约一刻钟 - 约 2 小时, 或直至反应基本完成。其中 L 是氯的试剂 $L-R^4$ 实例包括甲磺酰氯和乙酰氯。

当试剂 $L-R^4$ 是羧酸时, 路线图 A 代表酰胺偶合反应, 它通常如下进行: 在惰性稀释剂例如 *N,N*-二甲基甲酰胺中, 在偶联剂例如苯并三唑-1-基氧三吡咯烷-六氟磷酸磷 (PyBop) 的存在下, 将中间体 (III) 与约 1 - 约 4 当量的羧酸 $L-R^4$ 化合物接触。反应通常在环境温度下进行约一刻钟 - 约 2 小时, 或直至反应基本完成。适当的可供选择的偶联剂包括 1,3-二环己基碳二亚胺 (DCC)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC)、和与 1-羟基-7-氮杂苯并三唑 (HOAt) 联合的 PyBop。

可选地, 中间体 (III) 与羧酸 $L-R^4$ 的酰胺偶合可以如下进行: 将 $L-R^4$ 转变成活化的酯, 例如 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯, 或对硝基苯基酯, 或酸咪唑 (acid imidazole), 然后将它与中间体 (III) 反应。

可选地, 当试剂 $L-R^4$ 是液体例如甲酸乙酯时, 反应可以如下进行: 将 (III) 溶于极大过量的试剂 $L-R^4$, 并加热至约 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ - 约 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 约 12 - 约 24 小时。

用常规方法分离和纯化式 (I) 产物。例如, 可以将产物减压浓缩至干, 溶于弱酸水溶液, 并用 HPLC 色谱纯化。

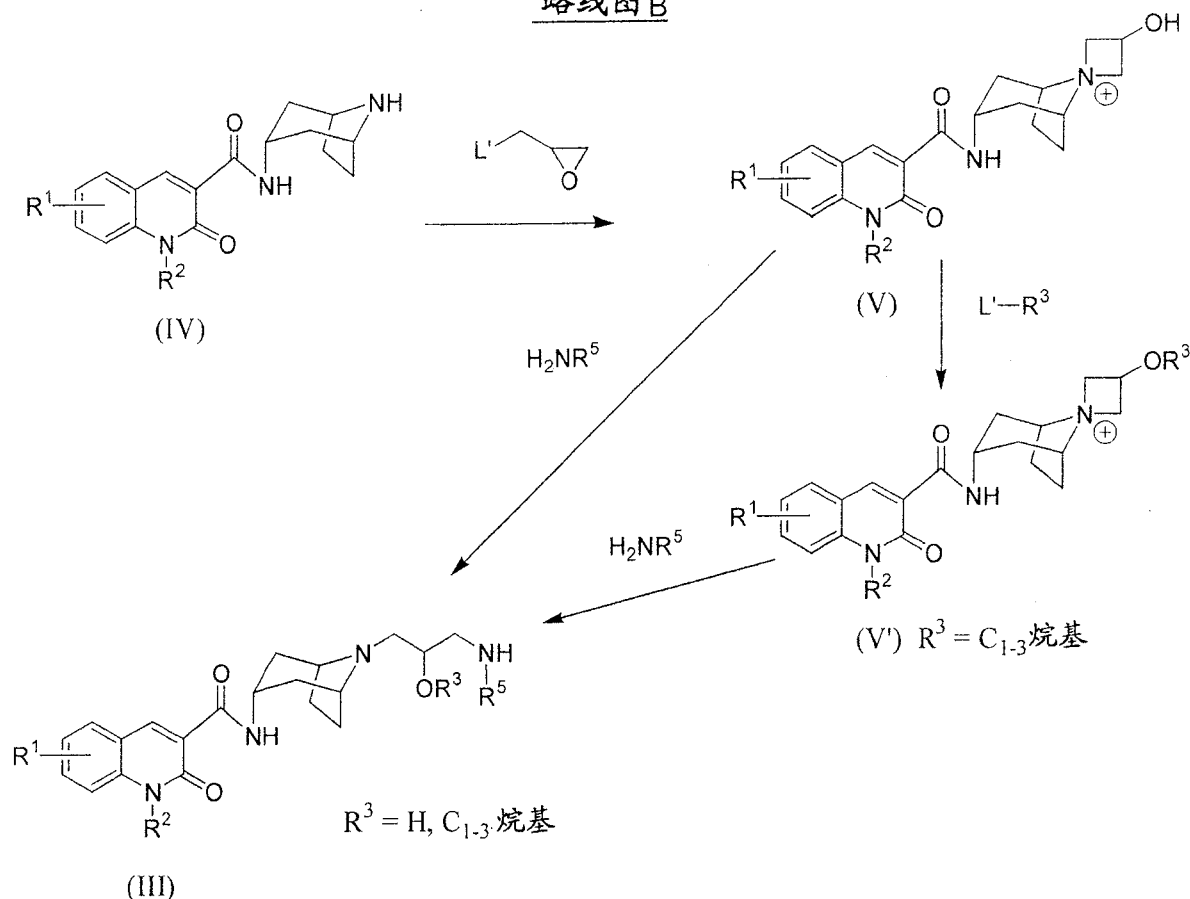
可选地, 可以将根据路线图 A 制备的其中 R^2 是氢的式 (I) 化合物 *N*-烷基化而制备式 (I) 化合物。通常通过将其中 R^2 是氢的式 (I) 化合物与约 1 - 约 4 当量的其中 L' 是离去基团如碘或溴的式 $L'-R^2$ 化合物接触, 进行 *N*-烷基化反应。通常在极性非质子溶剂如二甲基甲酰胺中, 在约 2 - 约 4 当量强碱如叔丁醇钾的存在下进行该反应。典型地, 反应在约 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ - 约 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度下进行约 6 - 约 24 小时, 或直至反应

基本完成。

在又一个可选的实施方案中，从其中 R^1 是氢的式(I)化合物通过常规方法制备其中 R^1 不是氢的式(I)化合物。

从容易获得的原料制备式(III)中间体。例如，当携带取代基— OR^3 的碳非手性时，通过路线图 B 中图解说明的过程制备式(III)中间体。

路线图 B



其中， L' 独立地代表卤素离去基团，例如溴、氯或碘。荷负电荷的抗衡离子也与荷正电荷的中间体(V)或(V')相伴存在。

首先，将式(IV)中间体与环氧乙烷化合物例如 2-溴甲基环氧乙烷(通常称为表溴醇)反应，形成式(V)的吡啶盐。通常在极性稀释剂如乙醇中，通过将(IV)与约 2 - 约 4 当量的 2-溴甲基环氧乙烷接触，进行该反应。通常在环境温度下反应约 24 - 约 48 小时或直至反应基本完成来进行该反应。

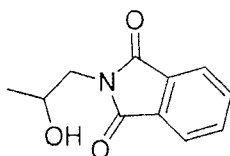
可以理解的是，在路线图 B 的过程中和使用中间体(IV)的下述其它过程中，中间体(IV)可以以游离碱的形式或以盐的形式提供，如果需要的话，用本领域技术人员已知的知识适当调节反应条件。

可以在惰性稀释剂中，在约 1 - 约 3 当量强碱如叔丁醇钾或氢化钠的存在下，通过将中间体 (V) 与略少于 1 当量 - 约 1 当量的其中 R^3 是 C_{1-3} 烷基的式 $L'-R^3$ 化合物接触，来制备其中 R^3 是 C_{1-3} 烷基的式 (V') 中间体。该反应通常在环境温度下进行约一刻钟 - 1 小时，或直至反应基本完成。适当的惰性稀释剂包括二氯甲烷、三氯甲烷和 1, 1, 2, 2-四氯乙烷等。

接下来，将吡啶中间体 (V) 或 (V') 与式 H_2NR^5 胺反应，得到中间体 (III)。典型地，将吡啶中间体溶于惰性稀释剂如乙醇，并与约 1 - 约 8 当量胺 H_2NR^5 接触。例如，当胺 H_2NR^5 是挥发性试剂如甲胺时，优选使用约 5 - 约 7 当量的该胺。反应通常在约 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ - 约 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度下进行约 12 - 约 24 小时，或直至反应基本完成。

可以用甲酸铵代替氨，即代替路线图 B 中所示的试剂 H_2NR^5 ，从吡啶中间体 (V) 或 (V') 制备其中 R^5 是氢的式 (III) 中间体。可选地，为了制备其中 R^5 是氢的中间体 (III)，可以通过与叠氮化物如叠氮化钠反应打开 (V) 或 (V') 的吡啶环，然后接着通过还原反应得到中间体 (III)，或可以通过与氢氧化铵反应打开该环。

如实施例 4a 中详细所述，当 R^3 和 R^5 是氢，并且携带取代基 $-OR^3$ 的碳非手性时，可以通过将中间体 (IV) 与含有受保护氮原子的环氧乙烷基甲基化合物反应，然后去保护，制备式 (III) 中间体。一种有用的试剂是 2-环氧乙烷基甲基-异吲哚-1, 3-二酮，通常称为环氧丙基邻苯二甲酰亚胺，它与中间体 (IV) 反应，形成其中邻苯二甲酰亚氨基取代的 2-羟基丙基：

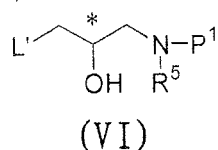


与式 (IV) 的氮杂二环辛烷环的氮相连的中间体。然后在腈中回流除去邻苯二甲酰亚氨基，形成其中 R^3 和 R^5 是氢的式 (III) 中间体。

其中 R^3 和 R^5 是氢的式 (III) 中间体也可以通过将吡啶 (V) 与邻苯二甲酰亚胺的阴离子反应，随后用腈处理来制备。

在可供选择的合成方法中，其中 R^3 是氢的式 (III) 中间体可以通

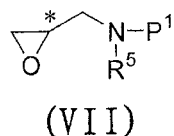
过将中间体(IV)与受保护的中间体(VI)反应:



接着去保护来制备。在式(VI)中, P^1 是氨基-保护基, L' 是卤素离去基团, 星号表示手性中心。利用式(VI)中间体的过程对于制备其中用星号标记的中心的立体化学尤其是 (*R*) 或 (*S*) 的形式中间体(III), 以及对于制备非手性形式的中间体(III)是有用的。

典型地, 在极性稀释剂如甲醇中, 在多于 1 当量的碱如 *N,N*-二异丙基乙基胺的存在下, 将中间体(IV)与约 1 - 约 2 当量的中间体(VI)接触。反应通常在约 60 °C - 约 100 °C 的温度下进行约 12 - 约 24 小时, 或直至反应基本完成。用标准程序除去保护基 P^1 , 得到式(III)中间体。有用的保护基 P^1 是 Boc, 它通常通过用酸如三氟乙酸处理除去。

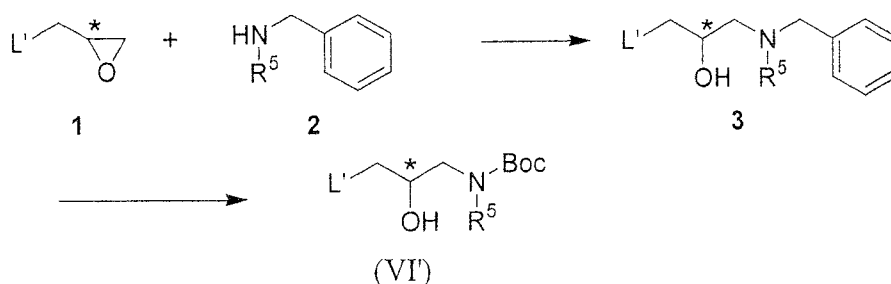
在制备中间体(III)的又一个可选方法中, 在与中间体(IV)反应生成中间体(III)以前, 中间体(VI)可以首先转变成环化形式(VII):



通常是在碱例如氢氧化钠的存在下, 通过将中间体(VI)溶于惰性稀释剂例如四氢呋喃, 制备中间体(VII)。通常在极性稀释剂如甲醇中, 通过将中间体(IV)与约 1 - 约 4 当量中间体(VII)接触, 进行(VII)与(IV)的反应, 得到中间体(III)。该反应通常在约 60 °C - 约 100 °C 的温度下进行约 1 - 约 4 小时, 或直至反应基本完成。用标准程序除去保护基 P^1 得到式(III)中间体。

可以从环氧乙烷制备受保护的中间体(VI), 如路线图 C 中对使用手性环氧乙烷形成 Boc-保护的手性中间体(VI')的特定实例所阐明的。该反应同样可用于制备非手性式(VI)化合物。

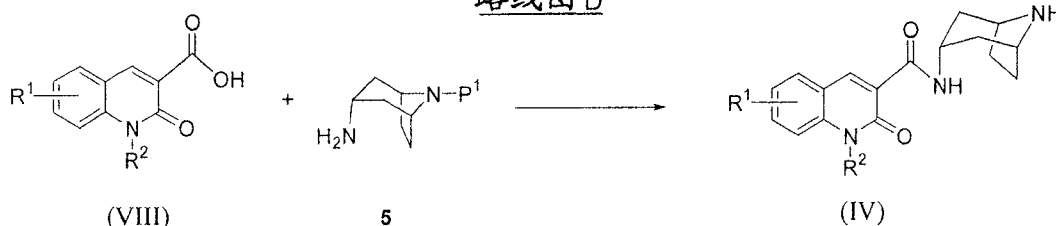
路线图 C



如路线图 C 中所示, 苄胺 2 在非极性稀释剂如己烷或甲苯中与至少 1 当量的手性环氧乙烷 1 接触, 形成 2-羟基丙胺 3。反应通常在室温下进行约 12 - 约 24 小时, 或直至反应基本完成。中间体 3 通常是在氢气氛下, 在过渡金属催化剂的存在下, 与稍过量例如约 1.1 当量的二碳酸二叔丁酯(通常称为 $(Boc)_2O$) 反应, 生成 Boc 保护的中间体 (VI')。反应通常是在环境温度下进行约 8 - 约 24 小时。

制备式 (IV) 中间体的过程显示在路线图 D 中。

路线图 D



受保护的氨基氮杂二环辛烷, 或通常称为氨基托烷 5, 首先与取代的喹啉酮羧酸 (VIII) 反应。典型地, 该反应如下进行, 首先将 (VIII) 转变成酰基氯, 通过将 (VIII) 与至少 1 当量、优选约 1 - 约 2 当量的活化剂如亚硫酸氯或草酰氯, 在芳族稀释剂如甲苯、苯、二甲苯等中接触。该反应通常在约 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ - 约 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内进行约 15 分钟 - 约 4 小时, 或直至反应基本完成。

酰基氯溶液通常加到约 1 当量的氨基托烷 5 的二相混合物中形成受保护的中间体, 它通过标准程序萃取。5 的二相混合物一般是通过将 5 溶于如上面所用的芳族稀释剂中, 并加入包含过量碱如氢氧化钠或氢氧化钾优选约 2 - 5 当量碱的水溶液而制备的。

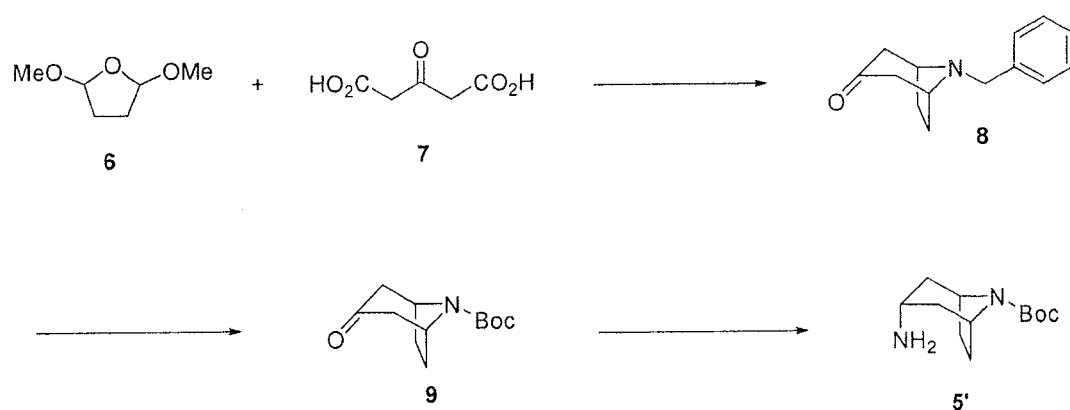
可选地, 中间体 5 与羧酸 (VIII) 的酰胺偶合可以在偶联剂如 1, 3-二环己基碳二亚胺 (DCC)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC)

或苯并三唑-1-基氧三吡咯烷-六氟磷酸磷 (PyBop) (任选与 1-羟基-7-氮杂苯并三唑 (HOAt) 联合) 的存在下进行, 如以上所述的中间体 (III) 与羧酸的酰胺偶合。在又一个可选方案中, 中间体 5 与羧酸 (VIII) 的酰胺偶合可以通过将 (VIII) 转变成活化的酯 (也如上所述) 而进行。

通过标准程序除去保护基 P^1 , 得到式 (IV) 中间体。例如, 当保护基是 Boc 时, 通常是用酸如三氟乙酸处理, 得到中间体的酸性盐而进行去除。如果需要, 通过用碱常规处理, 中间体 (IV) 的酸性盐可以转变成游离碱。在另一个实例中, 通过在适当的金属催化剂如钨碳上氢解, 常规去除保护基 Cbz。

在本申请所述反应中采用的受保护的氨基托烷 5 是从很容易获得的原料制备的。例如, 当保护基 P^1 是 Boc 时, 通过路线图 E 中所述操作制备受保护的氨基托烷 5'。

路线图 E



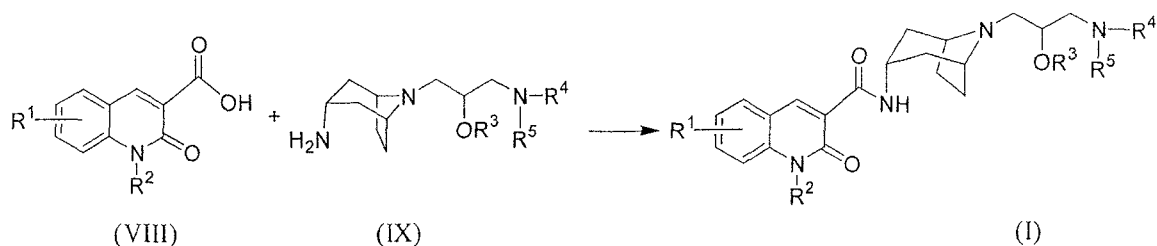
如下面实施例 1a 中的详细描述, 为了制备受保护的中间体 5', 首先, 在缓冲剂如磷酸氢二钠的存在下, 在酸性水溶液中, 将 2,5-二甲氧基四氢呋喃 6 与约 1-2 当量、优选约 1.5 当量的苄胺和稍过量例如约 1.1 当量的 1,3-丙酮二羧酸 7 接触。将反应混合物加热至约 60-约 100 °C, 以确保产物 8-苄基-8-氮杂二环 [3.2.1] 辛-3-酮 8 (通常称为 *N*-苄基托烷酮) 中任何羧化中间体的脱羧。

通常是在氢气氛下, 在过渡金属催化剂的存在下, 将中间体 8 与稍过量例如约 1.1 当量的二碳酸二叔丁酯 (通常称为 $(\text{Boc})_2\text{O}$) 反应, 生成 Boc 保护的中间体 9, 3-氧代-8-氮杂二环 [3.2.1] 辛烷-8-羧酸叔丁酯。反应通常在环境温度下进行约 12-约 72 小时。最终, 在过渡金

属催化剂的存在下,在惰性稀释剂如甲醇中,中间体 9 与极大过量例如至少约 25 当量的甲酸铵接触,以高立体特异性生成内构型的产物 5',例如内型与外型之比>99:1。反应通常在环境温度下进行约 12-约 72 小时,或直至反应基本完成。分份加入甲酸铵试剂是有利的。例如,中间体 9 与最初份量为约 15-约 25 当量的甲酸铵接触。间隔约 12-约 36 小时以后,加入另一份约 5-约 10 当量的甲酸铵。在类似的间隔之后可以重复随后的添加。可以用常规操作如碱萃取来纯化产物 5'。

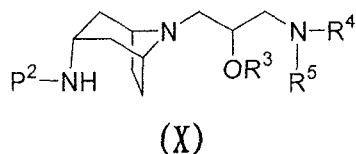
在可选的合成方法中,如路线图 F 所说明的,通过将取代的喹啉酮羧酸 (VIII) 与式 (IX) 中间体偶联制备式 (I) 化合物。

路线图 F



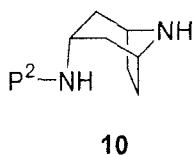
路线图 F 的反应通常是在上述羧酸 (VIII) 与中间体 5 反应的酰胺偶合条件下进行的。

可以通过对式 (X) 中间体脱保护制备式 (IX) 中间体:



其中, P² 代表氨基-保护基。

式 (X) 中间体可以从很容易获得的原料,使用类似于上述烷化作用和其它反应的操作和/或使用本领域技术人员公知的可替代反应制备。例如,可以使用中间体 10 制备中间体 (X):



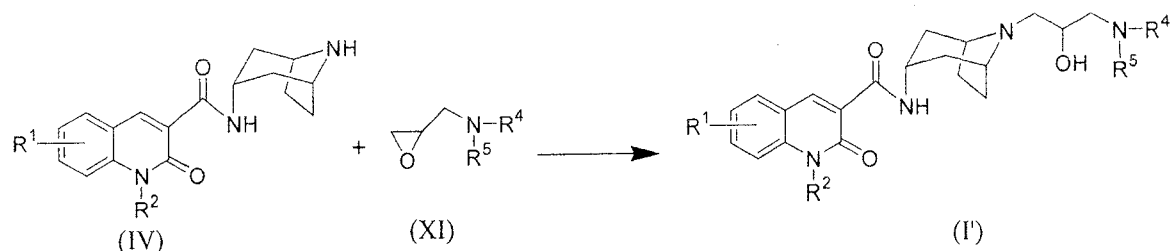
10

可通过用氨基-保护基 P² 保护氨基氮杂二环辛烷 5 的氨基氮,然后从氮杂二环辛烷基团的氮上除去 P¹,形成中间体 10。选择保护基 P¹

和 P^2 ，使得它们在不同条件下被除去。例如，当选择 P^1 为 Boc 时，那么 Cbz 可以用作 P^2 。在上述制备中间体 (III) 的反应中，用受保护的氨基托烷 10 替代中间体 (IV)，得到式 (X) 中间体。

在又一个合成方法中，在下面用式 (I') 表示的其中 R^3 是氢的式 (I) 化合物可以如路线图 G 中所说明的进行制备。

路线图 G



中间体 (XI) 可包含手性中心，如受保护的环氧乙烷中间体 (VII) 所明确显示。

典型地，中间体 (IV) 在极性稀释剂如乙醇中与约 1 - 约 2 当量的环氧乙烷中间体 (XI) 接触，形成产物 (I')。中间体 (IV) 可以以盐的形式提供，在这种情况下，在加入环氧乙烷以前，将摩尔稍过量的碱性碱包括在反应混合物中。反应通常在约 60 °C - 约 100 °C 的温度下进行约 1 - 约 3 小时，或直至反应基本完成。可以从惰性稀释剂中通过结晶分离作为游离碱或作为酸性盐的产物。

可以通过将路线图 C 中说明的环氧乙烷中间体 1 与仲胺 HNR^4R^5 反应，制备式 (XI) 中间体。典型地，含约 1 当量碱如氢氧化钠、氢氧化锂、氢氧化铯或氢氧化钾的胺 HNR^4R^5 的水溶液与约 1.5 - 约 2.5 当量的环氧乙烷中间体 1 接触。反应通常在约 0 °C - 约 10 °C 的温度下进行约 12 - 约 30 小时，或直至反应基本完成。

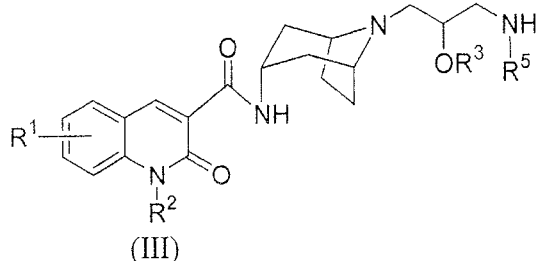
通过类似于文献 Suzuki 等人，*Heterocycles*, 2000, 53, 2471-2485 中报道的和下列实施例中所述的方法，很容易地制备喹啉酮羧酸 (VIII)。

试剂 $\text{L}'-\text{R}^2$ 、 $\text{L}'-\text{R}^3$ 、 $\text{L}-\text{R}^4$ 、 H_2NR^5 和 HNR^4R^5 是可商购的，或通过标准程序从常用原料很容易制备。

关于制备本发明典型化合物或其中间体的特定反应条件和其它方法的进一步细节在下列实施例中描述。

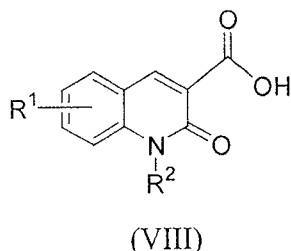
相应地，在方法方面中，本发明提供了制备式(I)化合物、或其盐或立体异构体的方法，该方法包括：

(a) 将式(III)化合物：

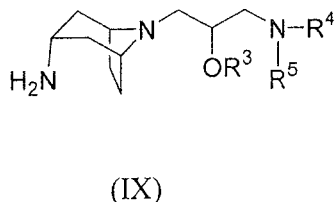


与式 $L-R^4$ 化合物反应，其中，L 是离去基团，或 $L-R^4$ 代表 $HO-C(O)R^7$ ；或

(b) 将式(VIII)化合物：



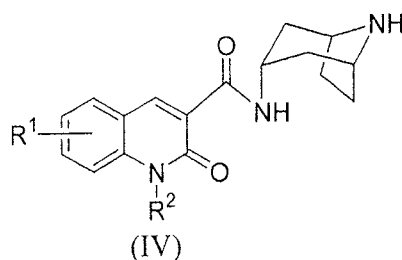
与式(IX)化合物：



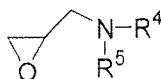
反应，得到式(I)化合物或其盐或立体异构体。

本发明进一步提供了式(III)化合物、或其盐或立体异构体或受保护的衍生物，其中， R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^5 如式(I)中所定义。

在其它方法方面中，本发明提供了制备式(I')化合物(其中， R^1 、 R^2 、 R^4 和 R^5 如式(I)中所定义)或其盐或立体异构体的方法，该方法包括将式(IV)化合物：



或其盐与式(XI)化合物：



(XI)

反应, 得到式 (I') 化合物或其盐或立体异构体。

药物组合物

本发明的喹啉酮-甲酰胺化合物通常以药物组合物的形式给患者施用。可通过任何可接受的给药途径给患者施用该药物组合物, 包括但不限于, 口服、直肠、阴道、鼻腔、吸入、局部(包括经皮)和胃肠外给药模式。

相应地, 在其组合物的一个方面中, 本发明涉及包含药学可接受的载体或赋形剂以及治疗有效量的式 (I) 化合物或其药学可接受的盐的药物组合物。任选地, 该药物组合物可包含其它治疗剂和/或制剂辅料, 如果需要的话。

本发明的药物组合物通常包含治疗有效量的本发明化合物或其药学可接受的盐。典型地, 该药物组合物将包含约 0.1 - 约 95% 重量的活性剂; 优选地, 约 5 - 约 70% 重量; 更优选地, 约 10 - 约 60% 重量的活性剂。

任何常规载体或赋形剂可用于本发明药物组合物。特定载体或赋形剂或载体或赋形剂的组合的选择将取决于用于治疗特定患者的给药模式, 或医学病况或疾病状态的类型。在这方面, 用于特定给药模式的适当药物组合物的制备在药学领域技术人员公知的范围内。另外, 用于该组合物的成分可商购自例如 Sigma, 邮政信箱 14508, 圣路易斯, MO 63178。作为进一步的阐述, 常规制剂技术描述在 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 第 20 版, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); 和 H.C. Ansel 等人, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 第 7 版, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999) 中。

可以用作药学可接受载体的典型材料的实例包括但不限于下列：

(1)糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2)淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3)纤维素，例如微晶纤维素，及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4)西黄蓍胶粉；(5)麦芽；(6)明胶；(7)滑石粉；(8)赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡类；(9)油，例如花生油、棉子油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10)二醇，例如丙二醇；(11)多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12)酯类，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13)琼脂；(14)缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15)海藻酸；(16)无热原水；(17)等渗盐水；(18)林格溶液；(19)乙醇；(20)磷酸盐缓冲溶液；和(21)在药物组合中采用的其它无毒可相容的物质。

本发明的药物组合物通常是通过将本发明化合物与药学可接受的载体和一种或多种任选成分充分密切混合或掺和而制备的。如果需要或希望的话，然后可以使用常规方法和设备将所得的均一掺和混合物成形或填装成片剂、胶囊和药丸等。

本发明的药物组合物优选包装成单位剂型。术语"单位剂型"指的是适合于给患者定量给药的物理分离单位，即，各个单位包含预定量活性剂，经计算可单独或与一个或多个附加单位联合产生所需的治疗效果。例如，该单位剂型可为胶囊、片剂和药丸等。

在优选实施方案中，本发明的药物组合物适合于口服给药。用于口服给药的适当药物组合物可为胶囊、片剂、药丸、锭剂、扁胶囊、糖锭剂、粉剂、颗粒剂的形式；或作为含水液体或非含水液体中的溶液或混悬液；或作为水包油或油包水液体乳剂；或作为酏剂或糖浆剂等；各自包含预定量作为有效成分的本发明化合物。

当意欲以固体剂型(即作为胶囊、片剂、药丸等)口服给药时，本发明药物组合物通常包含作为有效成分的本发明化合物和一种或多种药学可接受的载体，例如柠檬酸钠或磷酸二钙。任选地或可选地，该固体剂型还可包含：(1)填充剂或增量剂，例如淀粉、微晶纤维素、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸；(2)粘合剂，例如羧甲基纤维

素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶；(3)保湿剂，例如甘油；(4)崩解剂，例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐、和/或碳酸钠；(5)溶解阻滞剂，例如石蜡；(6)吸收促进剂，例如季铵化合物；(7)润湿剂，例如鲸蜡醇和/或单硬脂酸甘油酯；(8)吸收剂，例如高岭土和/或膨润土粘土；(9)润滑剂，例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠和/或其混合物；(10)着色剂；和(11)缓冲剂。

释放剂(Release agent)、润湿剂、包衣衣料、甜味剂、调味剂和香料、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于本发明药物组合物中。药学可接受的抗氧化剂的实例包括：(1)水溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏硫酸氢钠和亚硫酸钠等；(2)油溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟基茴香醚(BHA)、丁羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯和 α -生育酚等；和(3)金属螯合剂，例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸和磷酸等。片剂、胶囊和药丸等的包衣衣料包括用于肠溶包衣的那些，例如醋酸纤维素(CAP)、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯(PVAP)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基丙烯酸-甲基丙烯酸酯共聚物、醋酸纤维素苯三酸酯(CAT)、羧甲基乙基纤维素(CMEC)和羟丙甲基纤维素乙酸琥珀酸酯(HPMCAS)等。

如果需要的话，也可使用例如不同比例的羟丙甲基纤维素，或其它聚合物基质，脂质体和/或微球，配制本发明药物组合物，以提供有效成分的缓释或控释。

另外，本发明的药物组合物可任选包含遮光剂，并且可配制成只在或优先在胃肠道的某些部位释放有效成分，任选地以延迟的方式。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物和蜡。有效成分也可以与一种或多种上述赋形剂制成微囊形式，如果适当的话。

适当的口服给药液体剂型包括，例如，药学可接受的乳剂，微乳，溶液，混悬剂，糖浆剂和酏剂。该液体剂型通常包含有效成分和惰性稀释剂，例如水或其它溶剂，增溶剂和乳化剂，例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇，油(尤

其是棉子、落花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油), 甘油, 四氢呋喃甲醇, 聚乙二醇和脱水山梨醇脂肪酸酯, 及其混合物。除了有效成分以外, 混悬剂可包含助悬剂, 例如, 乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和西黄蓍胶, 以及其混合物。

可选地, 本发明的药物组合物可制成通过吸入给药。适当的吸入给药药物组合物通常将是气雾剂或粉末的形式。该组合物一般使用公知递送装置给药, 例如压力定量吸入器、干粉吸入器、喷雾器或类似的递药装置。

当使用加压容器吸入给药时, 本发明的药物组合物通常将包含有效成分和适当的抛射剂, 例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适当的气体。

另外, 药物组合物可为包含本发明化合物和适用于粉末吸入器的粉末的胶囊或药筒(例如用明胶制成)形式。适当的粉末基质包括, 例如, 乳糖或淀粉。

本发明化合物也可以使用已知的透皮递药系统和赋形剂经皮给药。例如, 本发明化合物可以与渗透促进剂混合, 例如丙二醇、聚乙二醇单月桂酸酯、氮杂环烷-2-酮类(azacycloalkan-2-ones)等, 并掺入到贴剂或类似的递药系统中。其它赋形剂包括胶凝剂、乳化剂和缓冲剂, 如果需要的话, 可用于该透皮组合物。

下列制剂举例说明了本发明的典型药物组合物:

制剂实施例 A

如下制备用于口服给药的硬明胶胶囊:

成分	量
本发明化合物	50 mg
乳糖 (喷雾干燥)	200 mg

硬脂酸镁	10 mg
------	-------

典型程序：将各成分充分混合，然后装载到硬明胶胶囊中 (260 mg 组合物/胶囊)。

制剂实施例 B

如下制备用于口服给药的硬明胶胶囊：

成分	量
本发明化合物	20 mg
淀粉	89 mg
微晶纤维素	89 mg
硬脂酸镁	2 mg

典型程序：将各成分充分混合，然后通过 45 目 U.S. 筛，并装载到硬明胶胶囊中 (200 mg 组合物/胶囊)。

制剂实施例 C

如下制备用于口服给药的胶囊：

成分	量
本发明化合物	10 mg
聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯	50 mg
淀粉粉末	250 mg

典型程序：将各成分充分混合，然后装载到明胶胶囊中 (310 mg 组合物/胶囊)。

制剂实施例 D

如下制备用于口服给药的片剂：

成分	量
本发明化合物	5 mg
淀粉	50 mg
微晶纤维素	35 mg
聚乙烯吡咯烷酮 (10 wt.%水溶液)	4 mg
羧甲基淀粉钠	4.5 mg
硬脂酸镁	0.5 mg
滑石粉	1 mg

典型程序：将有效成分、淀粉和纤维素通过 45 目 U.S. 筛并充分混合，将聚乙烯吡咯烷酮溶液与所得粉末混合，然后将该混合物通过 14 目 U.S. 筛。如此制备的颗粒剂在 50-60°C 下干燥，并通过 18 目 U.S. 筛。然后将羧甲基淀粉钠、硬脂酸镁和滑石粉 (之前已经通过了 60 目 U.S. 筛) 加到颗粒中。混合以后，将混合物在压片机上压片，得到重 100 mg 的片剂。

制剂实施例 E

如下制备用于口服给药的片剂：

成分	量
----	---

本发明化合物	25 mg
微晶纤维素	400 mg
热解法二氧化硅(Silicon dioxide fumed)	10 mg
硬脂酸	5 mg

典型程序：将各成分充分混合，然后压制形成片剂（每片 440 mg 组合物）。

制剂实施例 F

如下制备用于口服给药的单刻痕片剂：

成分	量
本发明化合物	15 mg
玉米淀粉	50 mg
交联羧甲基纤维素钠	25 mg
乳糖	120 mg
硬脂酸镁	5 mg

典型程序：将各成分充分混合，然后压制形成单刻痕片剂（每片 215 mg 组合物）。

制剂实施例 G

如下制备用于口服给药的混悬剂：

成分	量
----	---

本发明化合物	0.1 g
富马酸	0.5 g
氯化钠	2.0 g
对羟苯甲酸甲酯	0.15 g
对羟苯甲酸丙酯	0.05 g
砂糖	25.5 g
山梨醇 (70%溶液)	12.85 g
Veegum k (Vanderbilt Co.)	1.0 g
调味剂	0.035 mL
着色剂	0.5 mg
蒸馏水	适量至 100 mL

典型程序：将各成分混合形成每 10 mL 混悬剂含 10 mg 有效成分的混悬剂。

制剂实施例 H

如下制备用于吸入给药的干粉：

成分	量
本发明化合物	1.0 mg
乳糖	25 mg

典型程序：将有效成分微粉化，然后与乳糖混合。然后将该混合的混合物装载到明胶吸入药筒中。使用粉末吸入器施用药筒内容物。

制剂实施例 I

如下制备用于在压力定量吸入器中吸入给药的干粉：

典型程序：通过将 10 g 平均粒径小于 10 μm 的微粉化颗粒状活性化合物分散在由 0.2 g 卵磷脂溶于 200 mL 脱矿质水形成的溶液中，制备含 5 wt.% 本发明化合物和 0.1 wt.% 卵磷脂的混悬剂。将该混悬剂喷雾干燥，将所得物质微粉化成平均直径小于 1.5 μm 的颗粒。将颗粒装载到含有加压 1,1,1,2-四氟乙烷的药筒中。

制剂实施例 J

如下制备注射剂：

成分	量
本发明化合物	0.2 g
醋酸钠缓冲液 (0.4 M)	40 mL
HCl (0.5 N) 或 NaOH (0.5 N)	适量至 pH 4
水 (蒸馏过，无菌)	适量至 20 mL

典型程序：混合以上成分，并用 0.5 N HCl 或 0.5 N NaOH 将 pH 调节至 4 ± 0.5 。

制剂实施例 K

如下制备用于口服给药的胶囊：

成分	量
本发明化合物	4.05 mg
微晶纤维素 (Avicel PH 103)	259.2 mg
硬脂酸镁	0.75 mg

典型程序：将各成分充分混合，然后装载到明胶胶囊中 (#1 大小，白色，不透明) (每胶囊 264 mg 组合物)。

制剂实施例 L

如下制备用于口服给药的胶囊:

成分	量
本发明化合物	8.2 mg
微晶纤维素 (Avicel PH 103)	139.05 mg
硬脂酸镁	0.75 mg

典型程序: 将各成分充分混合, 然后装载到明胶胶囊中 (#1 大小, 白色, 不透明) (每胶囊 148 mg 组合物)。

可以理解的是, 适合于特定给药模式的任何形式的本发明化合物 (即游离碱、药用盐或溶剂化物) 都可以用于上述药物组合物。

效用

本发明的喹啉酮-甲酰胺化合物是 5-HT₄ 受体激动剂, 因此预期可用于治疗由 5-HT₄ 受体介导的或与 5-HT₄ 受体活性有关的医学病况, 即, 用 5-HT₄ 受体激动剂治疗可改善的医学病况。该医学病况包括但不限于过敏性肠综合征 (IBS)、长期便秘、机能性消化不良、胃排空延迟、胃食管返流疾病 (GERD)、胃轻瘫、手术后肠梗阻、假性肠梗塞和药物造成的运输 (transit) 延迟。另外, 已经提出一些 5-HT₄ 受体激动剂化合物可用于治疗中枢神经系统病症, 包括认知障碍、行为障碍、心境障碍和自主功能控制障碍。

特别地, 本发明化合物增强胃肠 (GI) 道动力, 从而预期可用于治疗哺乳动物包括人由动力减弱引起的 GI 道病症。该 GI 动力病症包括, 例如, 长期便秘、便秘-为主的过敏性肠综合征 (C-IBS)、糖尿病性和自发性胃轻瘫、和机能性消化不良。

因此, 在一个方面中, 本发明提供了增强哺乳动物胃肠道动力的

方法，该方法包括给哺乳动物施用治疗有效量的包含药学可接受载体和本发明化合物的药物组合物。

当用于治疗 GI 道动力减弱病症或由 5-HT₄ 受体介导的其它病况时，本发明化合物通常以单个日剂量或每天多个剂量口服给药，尽管也可使用其它给药形式。每剂量施用的活性剂的量或每天施用的总量通常由医师考虑到有关的情况，包括要治疗的病况、所选的给药途径、所施用的实际化合物及其相对活性、个体患者的年龄、体重和反应、患者症状的严重性等等来决定。

用于治疗 GI 道动力减弱病症或由 5-HT₄ 受体介导的其它病症的适当的剂量为约 0.0007 - 约 20 mg/kg/天的活性剂，包括约 0.0007 - 约 1 mg/kg/天。对于平均 70 kg 的人来说，总计为每天约 0.05 - 约 70 mg 的活性剂。

在本发明一方面中，本发明化合物用于治疗长期便秘。当用于治疗长期便秘时，本发明化合物通常以单个日剂量或每天多个剂量口服给药。优选地，治疗长期便秘的剂量为每天约 0.05 - 约 70 mg。

在本发明另一方面中，本发明化合物用于治疗过敏性肠综合征。当用于治疗便秘-为主的过敏性肠综合征时，本发明化合物通常以单个日剂量或每天多个剂量口服给药。优选地，治疗便秘-为主的过敏性肠综合征的剂量为每天约 0.05 - 约 70 mg。

在本发明另一方面中，本发明化合物用于治疗糖尿病性胃轻瘫。当用于治疗糖尿病性胃轻瘫时，本发明化合物通常以单个日剂量或每天多个剂量口服给药。优选地，治疗糖尿病性胃轻瘫的剂量为每天约 0.05 - 约 70 mg。

在本发明又一方面中，本发明化合物用于治疗机能性消化不良。当用于治疗机能性消化不良时，本发明化合物通常以单个日剂量或每天多个剂量口服给药。优选地，治疗机能性消化不良的剂量为每天约 0.05 - 约 70 mg。

本发明还提供了治疗患有与 5-HT₄ 受体活性有关的疾病或病况的哺乳动物的方法，该方法包括给哺乳动物施用治疗有效量的本发明化

合物，或包含本发明化合物的药物组合物。

如上所述，本发明化合物是 5-HT₄ 受体激动剂。因此，本发明进一步提供了在哺乳动物中激动 5-HT₄ 受体的方法，该方法包括给哺乳动物施用本发明化合物。另外，本发明化合物也可用作研究工具，用于调查或研究有 5-HT₄ 受体的生物系统或样品，或用于发现新的 5-HT₄ 受体激动剂。此外，由于相对于结合其它 5-HT 亚型受体，尤其是 5-HT₃ 受体，本发明化合物对 5-HT₄ 受体表现出结合选择性，因此该化合物尤其能用于研究生物系统或样品中 5-HT₄ 受体选择性激动作用的效应。任何具有 5-HT₄ 受体的适当的生物系统或样品可用于该项研究，它可在体外或体内进行。适合于该项研究的典型的生物系统或样品包括但不限于细胞、细胞提取物、质膜、组织样品和哺乳动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、狗、猪等)等。

在本发明这个方面中，包含 5-HT₄ 受体的生物系统或样品与 5-HT₄ 受体-激动量的本发明化合物接触。然后用常规方法和装置如放射配体结合试验和功能试验测定激动 5-HT₄ 受体的效果。这些功能试验包括配体介导的细胞内环磷酸腺苷(cAMP)的改变，配体介导的腺苷酸环化酶(它合成 cAMP)活性的改变，配体介导的三磷酸鸟苷(GTP)类似物例如 [³⁵S]GTPγS (鸟苷 5'-O-(γ-硫代)三磷酸酯)或 GTP-Bu 经由受体催化的 GTP 类似物对 GDP 类似物的交换而掺入离体膜的改变，配体介导的游离胞内钙离子的改变(例如，用购自 Molecular Devices, Inc. 的荧光-结合成像读板器(fluorescence-linked imaging plate reader)或 FLIPR[®]测量)，和测量促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)活化。本发明化合物可在以上所列的任何功能试验或类似性质的试验中激动 5-HT₄ 受体或增强 5-HT₄ 受体的激活。5-HT₄ 受体-激动量的本发明化合物通常为约 1nM - 约 500nM。

另外，本发明化合物可以用作研究工具来发现新的 5-HT₄ 受体激动剂。在该实施方案中，试验化合物或一组试验化合物的 5-HT₄ 受体结合数据或功能数据与本发明化合物的 5-HT₄ 受体结合数据或功能数据相比较，以鉴定具有优异结合活性或功能活性的试验化合物，如果

有的话。作为单独实施方案，本发明的这个方面包括生成比较数据(使用适当的试验)，和分析试验数据，以鉴定令人感兴趣的试验化合物。

在其它性质中，已经发现本发明化合物是 5-HT₄ 受体的有效激动剂，并且在放射配体结合试验中，相对于 5-HT₃ 受体亚型，本发明化合物对 5-HT₄ 受体亚型显示出了明显的选择性。进一步地，已经在大鼠模型中证明了本发明化合物优秀的药代动力学性质。因此预期本发明化合物通过口服给药有很好的生物利用度。另外，在体外电压钳模型中使用表达 hERG 心脏钾通道的离体完整细胞，已经显示了这些化合物不表现出不能接受的钾离子流抑制水平。电压钳试验是评价药剂改变心脏复极化模式，尤其是引起与心律失常相关的所谓 QT 延长的潜能的公认的临床前方法(Cavero 等人, *Opinion on Pharmacotherapy*, 2000, 1, 947-73, Fermini 等人, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2, 439-447)。相应地，包含本发明化合物的药物组合物预期具有可接受的心脏性能。

可以使用本领域技术人员公知的各种体外和体内试验证明本发明化合物的这些性质和效用。典型试验在下列实施例中进一步详细描述。

实施例

下列合成实施例和生物学实施例是用于阐明本发明，不能解释成以任何方式限制本发明的范围。在下列实施例中，除非另外说明，下列缩略语具有下列含义。没有在下面定义的缩略语具有它们一般接受的含义。

Boc	=	叔丁氧基羰基
(Boc) ₂ O	=	二碳酸二叔丁酯
DCM	=	二氯甲烷
DMF	=	N,N-二甲基甲酰胺
DMSO	=	二甲亚砜
EtOAc	=	乙酸乙酯
mCPBA	=	间氯苯甲酸

MeCN	=	乙腈
MTBE	=	叔丁基甲基醚
PyBop	=	苯并三唑-1-基氧三吡咯烷-六氟磷酸盐
R _f	=	保留因子
RT	=	室温
TFA	=	三氟乙酸
THF	=	四氢呋喃

试剂(包括仲胺)和溶剂都购自商品供应商(Aldrich、Fluka、Sigma等),使用时不经进一步纯化。除非另外注明,否则反应都在氮气氛下进行。用薄层色谱法(TLC)、分析型高效液相色谱法(anal. HPLC)和质谱法监测反应混合物的进程,其细节分别在下面具体反应实施例中给出。如各个反应中的具体描述处理反应混合物;它们通常是用萃取和其它纯化方法如温度-和溶剂-依赖性结晶以及沉淀进行纯化。另外,反应混合物常规地用制备型 HPLC 进行纯化:通用方案在下面描述。用质谱和 ¹H-NMR 波谱法常规地进行反应产物的表征。对于 NMR 测量来说,将样品溶于氘代溶剂(CD₃OD、CDCl₃或 DMSO-*d*₆),在标准观测条件下,用 Varian Gemini 2000 仪器(300 MHz)获得 ¹H-NMR 谱。通过电喷雾电离法(ESMS),用 Applied Biosystems (Foster City, CA) API 150 EX 型仪器或 Agilent (Palo Alto, CA) 1100 LC/MSD 型仪器进行化合物的质谱鉴定。通过卡尔·费歇尔滴定,用 Brinkmann (Westbury, NY) Metrohm Karl Fischer 813 型库仑计测定水含量。

实施例 1: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

a. 制备 8-苄基-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-酮

边搅拌边将浓盐酸(30 mL)加到 2,5-二甲氧基四氢呋喃(82.2 g, 0.622 mol)在水(170 mL)中的非均质溶液中。在冷却至 0°C (冰浴)的

单独烧瓶中，将浓盐酸(92 mL)缓慢加入苄胺(100 g, 0.933 mol)的水(350 mL)溶液。搅拌 2,5-二甲氧基四氢呋喃溶液约 20 分钟，用水(250 mL)稀释，然后加入苄胺溶液，接着加入 1,3-丙酮二羧酸(100 g, 0.684 mol)的水(400 mL)溶液，然后加入磷酸氢二钠(44 g, 0.31 mol)的水(200 mL)溶液。用 40% NaOH 将 pH 调节至 pH 1 到 pH ~ 4.5。将所得的浑浊淡黄色溶液搅拌过夜。然后用 50% 盐酸将溶液从 pH 7.5 酸化至 pH 3，加热至 85 °C 并搅拌 2 小时。将溶液冷却至室温，用 40% NaOH 碱化至 pH 12，并用 DCM (3 × 500 mL) 萃取。用盐水洗涤合并的有机层，干燥(MgSO₄)，过滤并减压浓缩，得到标题中间体粗产品的粘稠褐色的油(52 g)。

在 0 °C，向中间体粗产品的甲醇(1000 mL)溶液中加入二碳酸二叔丁酯(74.6 g, 0.342 mol)。让溶液温热至室温并搅拌过夜。减压除去甲醇，将所得的油溶于二氯甲烷(1000 mL)。将中间体萃取到 1 M H₃PO₄ (1000 mL) 中，并用二氯甲烷(3 × 250 mL)洗涤。用 NaOH 水溶液将水层碱化至 pH 12，并用二氯甲烷(3 × 500 mL)萃取。干燥合并的有机层(MgSO₄)，过滤并减压浓缩，得到标题中间体的粘稠、淡褐色的油。¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm) 7.5-7.2 (m, 5H, C₆H₅), 3.7 (s, 2H, CH₂Ph), 3.45 (宽 s, 2H, CH-NBn), 2.7-2.6 (dd, 2H, CH₂CO), 2.2-2.1 (dd, 2H, CH₂CO), 2.1-2.0 (m, 2H, CH₂CH₂), 1.6 (m, 2H, CH₂CH₂)。 (m/z): [M+H]⁺ C₁₄H₁₇NO 的计算值 216.14; 实测值 216.0。

b. 制备 3-氧代-8-氮杂二环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯

向 8-苄基-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-酮 (75 g, 0.348 mol) 的 EtOAc (300 mL) 溶液中加入二碳酸二叔丁酯 (83.6 g, 0.383 mol, 1.1 eq) 的 EtOAc (300 mL) 溶液。在氮气流下，将所得溶液和冲洗液(100 mL EtOAc)加到含 23 g 氢氧化钯(20 wt.% Pd(基于干燥量基准)吸附于碳，~50%被水润湿，例如 Pearlman's 催化剂)的 1 L Parr 氢化容器中。将反应容器除气(交替真空和 N₂ 五次)，并加压至 60 psi 的 H₂ 气。搅动反应溶液两天，如果需要的话，再次充入 H₂，保持 H₂ 压在 60 psi，直至用硅石薄层色谱法监测到反应完成。然后将黑色溶液通

过 Celite® 衬垫过滤, 并减压浓缩定量得到标题中间体的粘稠、黄色至橙色的油。它不经进一步处理就用于下一个步骤。¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 4.5 (宽, 2H, CH-NBoc), 2.7 (宽, 2H, CH₂CO), 2.4-2.3 (dd, 2H, CH₂CH₂), 2.1 (宽 m, 2H, CH₂CO), 1.7-1.6 (dd, 2H, CH₂CH₂), 1.5 (s, 9H, (CH₃)₃COCON)。

c. 制备 (1*S*, 3*R*, 5*R*)-3-氨基-8-氮杂二环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯

在 N₂ 流下, 边经由机械搅拌器搅拌, 边向前步产物 (75.4 g, 0.335 mol) 的甲醇 (1 L) 溶液中加入甲酸铵 (422.5 g, 6.7 mol)、水 (115 mL) 和 65 g 吸附于活性炭的钯 (10% 基于干燥量基准, ~50% 被水润湿, Degussa type E101NE/W)。在 24 和 48 小时以后, 每次加入另一份甲酸铵 (132g, 2.1 mol)。如分析型 HPLC 所监测, 一旦反应进程停止, 就加入 Celite® (>500g), 过滤所得的浓稠混悬液, 然后用甲醇 (~500 mL) 冲洗收集到的固体。合并滤液, 减压浓缩, 直至所有甲醇都已经被除去。然后用 1M 磷酸将所得的混浊二相溶液稀释至最终体积 ~1.5 到 2.0 L, pH2, 并用二氯甲烷 (3 × 700 mL) 洗涤。用 40% NaOH 水溶液将水层碱化至 pH 12, 并用二氯甲烷 (3 × 700 mL) 萃取。用 MgSO₄ 干燥合并的有机层, 过滤, 并通过旋转蒸发浓缩, 然后高真空得到 52 g (70%) 标题中间体, 通常被称为 *N*-Boc-内-3-氨基托烷, 作为白色到淡黄色固体。根据 ¹H-NMR 分析 (通过分析型 HPLC, 纯度 >96%), 产物中内型胺 (*endo* amine) 和外型胺 (*exo* amine) 的异构体比例 >99:1。¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 4.2-4.0 (宽 d, 2H, CHNBoc), 3.25 (t, 1H, CHNH₂), 2.1-2.05 (m, 4H), 1.9 (m, 2H), 1.4 (s, 9H, (CH₃)₃OCON), 1.2-1.1 (宽, 2H)。(m/z): [M+H]⁺ C₁₂H₂₂N₂O₂) 计算值 227.18; 实测值 227.2。分析 HPLC (恒溶剂法 (isocratic method); 经过 5 分钟, 2:98 (A:B) 到 90:10 (A:B)): 保留时间 = 3.68 min。

d. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸

首先, 在室温下, 将丙酮 (228.2 mL, 3.11 mol) 加入 2-氨基苯甲醇 (255.2 g, 2.07 mol) 和乙酸 (3.56 mL, 62 mmol) 在水 (2 L) 中的

搅拌混悬液中。4 h 后, 将混悬液冷却至 0 °C, 并再搅拌 2.5 h, 然后过滤。收集固体, 用水洗涤, 用冷冻干燥法冷却并干燥湿固体, 得到 2,2,-二甲基-1,4-二氢-2*H*-苯并[1,3]噁嗪 (332.2 g, 98 %) 的灰白色固体。¹H NMR (CDCl₃; 300MHz): 1.48 (s, 6H, C(CH₃)₂), 4.00 (bs, 1H, NH), 4.86 (s, 2H, CH₂), 6.66 (d, 1H, ArH), 6.81 (t, 1H, ArH), 6.96 (d, 1H, ArH), 7.10 (t, 1H, ArH)。

通过闪烁漏斗(scintillation funnel)过滤 2,2,-二甲基-1,4-二氢-2*H*-苯并[1,3]噁嗪 (125 g, 0.77 mol) 的 THF (1 L) 溶液, 然后在 0 °C 下, 经过 2.5 h, 经由另外的漏斗将其逐滴加到 1.0 M LiAlH₄ 在 THF (800 mL) 中的搅拌溶液中。在 0 °C 下, 经过 1.5 h, 通过缓慢逐份加入 Na₂SO₄·10H₂O (110 g) 而使反应淬灭。将反应混合物搅拌过夜, 过滤, 并用 THF 充分洗涤固体盐。减压浓缩滤液, 得到 2-异丙基氨基苯甲醇 (120 g, 95 %) 的黄色的油。¹H NMR (CDCl₃; 300MHz): 1.24 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 3.15 (bs, 1H, OH), 3.61 (sept, 1H, CH(CH₃)₂), 4.57 (s, 2H, CH₂), 6.59 (t, 1H, ArH), 6.65 (d, 1H, ArH), 6.99 (d, 1H, ArH), 7.15 (t, 1H, ArH)。

将二氧化锰 (85 % 182.6 g, 1.79 mol) 加到 2-异丙基氨基苯甲醇 (118 g, 0.71 mol) 在甲苯 (800 mL) 中的搅拌溶液中, 并将反应混合物加热至 117 °C 4 h。让反应混合物冷却至室温过夜, 然后通过用甲苯洗提过的 Celite 衬垫过滤。减压浓缩滤液, 得到 2-异丙基氨基苯甲醛 (105 g, 90 %) 的橙色的油。¹H NMR (CDCl₃; 300MHz): 1.28 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 3.76 (sept, 1H, CH(CH₃)₂), 6.65 (t, 1H, ArH), 6.69 (d, 1H, ArH), 7.37 (d, 1H, ArH), 7.44 (t, 1H, ArH), 9.79 (s, 1H, CHO)。

在 0 °C 下, 将 2,2-二甲基-[1,3]二噁烷-4,6-二酮(通常也称为 Meldrum's 酸) (166.9 g, 1.16 mol) 加到 2-异丙基氨基苯甲醛 (105 g, 0.64 mol)、乙酸 (73.6 mL, 1.29 mol) 和 乙二胺 (43.0 mL, 0.64 mol) 在甲醇 (1 L) 中的搅拌溶液中。在 0 °C 下搅拌反应混合物 1 h, 然后在室温下搅拌过夜。过滤所得的混悬液, 用甲醇洗涤该固体, 收集得

到标题中间体 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 (146 g, 98 %) 的灰白色固体。¹H NMR (CDCl₃; 300MHz): 1.72 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 5.50 (bs, 1H, CH(CH₃)₂), 7.44 (t, 1H, ArH), 7.75-7.77 (m, 2H, ArH), 7.82 (d, 1H, ArH), 8.89 (s, 1H, CH)。

e. 制备 (1*S*, 3*R*, 5*R*)-3-[1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧基)氨基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯

在 85 °C, 将亚硫酸氯 (36.6 mL, 0.52 mol) 加到 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 (80 g, 0.35 mol) 在甲苯 (600 mL) 中的搅拌混悬液中, 然后将反应混合物加热至 95 °C 2 h。将反应混合物冷却至室温, 然后在 °C 下经 25 分钟加到剧烈搅拌的 (1*S*, 3*R*, 5*R*)-3-氨基-8-氮杂二环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯 (78.2 g, 0.35 mol) 和氢氧化钠 (69.2 g, 1.73 mol) 在甲苯/水 (1:1) (1L) 中的二相溶液中。1 h 以后, 分离各层, 减压浓缩有机相。用 EtOAc (1 L), 然后 (500 mL) 洗涤水相, 合并的有机萃取物用于溶解浓缩的有机剩余物。用 1M H₃PO₄ (500 mL)、饱和 NaHCO₃ 水溶液 (500 mL) 和盐水 (500 mL) 洗涤该溶液, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩, 得到标题中间体 (127.9 g, 大约 84 %) 的黄色固体。¹H NMR (CDCl₃): 1.47 (s, 9H), 1.67 (d, 6H), 1.78-1.84 (m, 2H), 2.04-2.18 (m, 6H), 4.20-4.39 (m, 3H), 5.65 (bs, 1H), 7.26 (dd, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.75 (dd, 1H), 8.83 (s, 1H), 10.63 (d, 1H)。

f. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

在 0 °C 下, 将 TFA (300 mL) 加到前步产物 (127.9 g) 在 CH₂Cl₂ (600 mL) 中的搅拌溶液中。将反应混合物温热至室温, 并搅拌 1 h, 然后减压浓缩。然后将油状褐色剩余物倒入剧烈搅拌的乙醚 (3 L) 溶液中, 立即形成了固体沉淀。混悬液搅拌过夜, 然后过滤收集固体, 用乙醚洗涤得到标题中间体的三氟乙酸盐 (131.7 g, 86% 经过 2 步) 的淡黄色固体。¹H NMR (CDCl₃): 1.68 (d, 6H), 2.10 (d, 2H), 2.33-2.39 (m, 4H), 2.44-2.61 (m, 2H), 4.08 (bs, 2H), 4.41 (m, 1H), 5.57

(bs, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.66 (m, 2H), 7.77 (d, 1H), 8.83 (s, 1H), 9.38 (bd, 2H), 10.78 (d, 1H)。

g. 制备 3-羟基-3'-{[1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-基]羰基}氨基}螺[吡啶啉-1,8'-(1*S*,3*R*,5*R*)-8-氮杂二环[3.2.1]辛烷(其中 $R^1 = H$, $R^2 =$ 异丙基的中间体(V))

在室温下,将 2-溴甲基环氧乙烷(10.72 mL, 129.5 mmol)加到 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*,3*R*,5*R*)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺三氟乙酸盐(14.65 g, 43.2 mmol)在乙醇(150 mL)中的搅拌溶液中。搅拌反应混合物 36 h,这时形成了固体沉淀。过滤收集固体,用乙醇(70 mL)洗涤,得到标题中间体的溴盐(8.4 g)。(m/z): $[M]^+ C_{23}H_{30}N_3O_3$ 计算值 396.23;实测值 396.5。保留时间(分析 HPLC: 2-50% MeCN/H₂O, 经过 5 分钟) = 4.13 min。

h. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[2-羟基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 3-羟基-3'-{[1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-基]羰基}氨基}螺[吡啶啉-1,8'-(1*S*,3*R*,5*R*)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷溴化物(678 mg, 1.4 mmol)溶于乙醇(10 mL),然后加入甲胺(41%水溶液)(510 μ L, 8.0 mmol)。混合物于 80 °C 加热 16 h,然后减压浓缩得到标题中间体的粗油,它直接用于下一个步骤。

i. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将前步产物溶于二氯甲烷(10 mL),然后加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(763 μ L, 5.1 mmol),在氮气下搅拌混合物,并冷却至 0 °C。加入甲磺酰氯(132 μ L, 1.7 mmol),将混合物在 0 °C 下搅拌 30 min。通过加入水使反应淬灭,并减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水(1:1)(10 mL),并用 HPLC 色谱法纯化。使纯化级分冻干,得到标题化合物的三氟乙酸盐(340 mg)。(m/z): $[M+H]^+ C_{25}H_{36}N_4O_5S$

计算值 505.25; 实测值 505.4。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/H₂O, 经过 5 分钟) = 4.17 min。

实施例 2: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-甲氧基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

a. 制备 3-甲氧基-3'-{[1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-基)羧基]氨基}螺[吡啶-1,8'-(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷(其中 R¹ = H, R² = 异丙基, R³ = 甲基的中间体(V'))

在室温下,将叔丁醇钾 (1.63 g, 14.5 mmol)加到 3-羟基-3'-{[1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-基)羧基]氨基}螺[吡啶-1,8'-(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷溴化物 (3.45 g, 7.25 mmol)在二氯甲烷(100 mL)中的搅拌混悬液中。2 分钟以后,将碘甲烷(0.477 mL, 7.61 mmol)加到反应混合物中。30 分钟以后,加入水(2 mL)使反应淬灭,减压浓缩反应混合物。将剩余物溶于最小体积的乙酸/水 (1:1)中,并用制备型 HPLC 纯化得到标题中间体的三氟乙酸盐 (2.1 g)。(m/z): [M]⁺ C₂₄H₃₂N₃O₃ 计算值 410.24; 实测值 410.5。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/H₂O, 经过 5 分钟) = 4.36 min。

b. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-甲氧基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 3-甲氧基-3'-{[1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-基)羧基]氨基}螺[吡啶-1,8'-(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷三氟乙酸盐 (410 mg, 0.84 mmol)溶于乙醇 (10 mL), 然后加入甲胺 (41% 水溶液, 320 μL, 5 mmol)。将混合物于 80 °C 加热 16 h, 然后减压浓缩得到产物的粗油, 它直接用于下一个步骤。

c. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-甲氧基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将前步产物 (53.6 mg, 0.12 mmol) 溶于二氯甲烷 (1.0 mL), 然后加入 1,8-二氮杂二环 [5.4.0] 十一碳-7-烯 (89.7 μ L, 0.6 mmol), 在氮气下搅拌混合物, 并冷却至 0°C。加入甲磺酰氯 (18.6 μ L, 0.24 mmol), 在 0°C 下搅拌混合物 30 分钟。通过加入水使混合物淬灭, 并减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题化合物的三氟乙酸盐 (45.8 mg)。(m/z): $[M+H]^+$ C₂₆H₃₈N₄O₅S 计算值 519.27; 实测值 519.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 分钟) = 2.72 min。

实施例 3: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 $\{(1S, 3R, 5R)-8-[3-(\text{甲磺酰基}-\text{吡啶}-3\text{-基甲基}-\text{氨基})-2\text{-甲氧基丙基}]-8\text{-氮杂二环}[3.2.1]\text{辛}-3\text{-基}\}$ 酰胺

a. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 $\{(1S, 3R, 5R)-8-\{2\text{-甲氧基}-3-[(\text{吡啶}-3\text{-基甲基})\text{氨基}]\text{丙基}\}-8\text{-氮杂二环}[3.2.1]\text{辛}-3\text{-基}\}$ 酰胺

将 3-甲氧基-3'- $\{[1\text{-异丙基}-2\text{-氧代}-1,2\text{-二氢喹啉}-3\text{-基})\text{羧基}\}$ 氨基} 螺 [吡啶-1,8'-(1S, 3R, 5R)-8-氮杂-二环 [3.2.1] 辛烷 (410 mg, 0.84 mmol) 溶于乙醇 (10 mL), 然后加入 3-氨基甲基吡啶 (153 μ L, 1.5 mmol)。将混合物于 60 °C 加热 16 h, 然后减压浓缩得到标题中间体的粗油, 它直接用于下一个步骤。

b. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 $\{(1S, 3R, 5R)-8-[3-(\text{甲磺酰基}-\text{吡啶}-3\text{-基甲基}-\text{氨基})-2\text{-甲氧基丙基}]-8\text{-氮杂二环}[3.2.1]\text{辛}-3\text{-基}\}$ 酰胺

将前步产物 (102.6 mg, 0.2 mmol) 溶于二氯甲烷 (1.0 mL), 然后加入 1,8-二氮杂二环 [5.4.0] 十一碳-7-烯 (119.6 μ L, 0.8 mmol), 在氮气下搅拌混合物并冷却至 0°C。加入甲磺酰氯 (30.1 μ L, 0.4 mmol), 混合物在 0°C 下搅拌 30 min。通过加入水使反应淬灭, 混合物减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题化合物的三氟乙酸盐 (63.5 mg)。(m/z): $[M+H]^+$ C₃₁H₄₁N₅O₅S 计算值 596.29; 实测值 596.2。保留

时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.35 min。

实施例 4: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]
辛-3-基}酰胺

a. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(1,3-二氧代-1,3-二氢异吲哚-2-基)-2-羟丙
基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂
-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (3.39 g, 10 mmol) 溶于乙醇 (40 mL),
然后加入 2-环氧乙烷基甲基异吲哚-1,3-二酮 (通常也称为环氧丙基
邻苯二甲酰亚胺) (3.05 g, 15 mmol)。将混合物于 80 °C 加热 36 h,
冷却, 然后减压浓缩。将所得的油进行快速色谱 (SiO₂, 用 9:1 的二
氯甲烷/甲醇溶液洗脱), 得到标题中间体 (4.95 g) 的白色固体, 它直
接用于下一个步骤。

b. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}
酰胺

将前步产物 (4.95 g, 9.13 mmol) 溶于乙醇 (40 mL), 然后加入胍
(860 μL, 27.4 mmol)。混合物回流 16 h, 然后冷却至室温。过滤混
合物, 并将滤液浓缩得到标题中间体的粗油, 它不经进一步纯化就直
接使用。

c. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]
辛-3-基}酰胺

将前步产物 (82 mg, 0.2 mmol) 溶于二氯甲烷 (1.0 mL), 然后加入
1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯 (60 μL, 0.4 mmol), 混合物在
氮气下搅拌, 并冷却至 -78 °C。加入甲磺酰氯 (15.5 μL, 0.2 mmol),
搅拌混合物, 经 30 分钟时间让其温热至室温。通过加入水使反应淬灭,
减压浓缩混合物至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 用 HPLC

色谱法纯化。冻干纯化级分得到标题化合物的三氟乙酸盐 (70.7 mg)。
(m/z): $[M+H]^+ C_{24}H_{34}N_4O_5S$ 计算值 491.23; 实测值 491.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.43 min。

实施例 5: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(甲磺酰基-吡啶-3-基甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

a. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-{2-羟基-3-[(吡啶-3-基甲基)氨基]丙基}-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 3-羟基-3'-{[1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-基]羰基}氨基螺[吡啶-1,8'-(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷溴化物 (505 mg, 1.27 mmol) 溶于乙醇 (10 mL), 然后加入 3-(氨基甲基)-吡啶 (193 μ L, 1.9 mmol)。混合物于 80 °C 加热 16 h, 然后减压浓缩得到标题中间体的粗油, 它直接用于下步反应中。

b. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(甲磺酰基-吡啶-3-基甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将前步产物 (42.5 mg, 0.08 mmol) 溶于二氯甲烷 (1.0 mL), 加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯 (74.8 μ L, 0.5 mmol), 在氮气下搅拌混合物并冷却至 0 °C。加入甲磺酰氯 (6.1 μ L, 0.08 mmol), 在 0 °C 下搅拌混合物 30 min。加入水使反应淬灭, 减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题化合物的三氟乙酸盐 (22.8 mg)。(m/z): $[M+H]^+ C_{30}H_{39}N_5O_5S$ 计算值 582.28; 实测值 582.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.78 min。

实施例 6: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

a. 制备 (*S*)-1-(苄基-甲基-氨基)-3-氯丙-2-醇

将 *N*-苄基甲胺 (13.95 mL, 108.1 mmol) 和 (*S*)-2-氯甲基环氧乙烷 (通常被称为 (*S*)-表氯醇) (8.48 mL, 108.1 mmol) 溶于己烷 (40 mL), 并搅拌 16 h。然后使溶液过快速色谱 (SiO_2 , 用 10 % 甲醇/90 % 二氯甲烷洗脱)。将包含产物的级分浓缩, 得到标题中间体的油 (19.7 g)。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO } d_6$, 299.96 MHz): δ (ppm) 2.01 (s, 3H), 2.2–2.4 (m, 2H), 3.21–3.5 (m, 3H), 3.53–3.6 (m, 1H), 3.65–3.75 (m, 1H), 4.95 (d, 1H), 7.0–7.25 (m, 5H)。(m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{ClNO}$ 计算值 214.10; 实测值 214.1。

b. 制备 ((*S*)-3-氯-2-羟基丙基) 甲基氨基甲酸叔丁酯

将 (*S*)-1-(苄基-甲基-氨基)-3-氯丙-2-醇 (8.4 g, 39.3 mmol) 溶于乙酸乙酯 (75 mL), 然后加入二碳酸二叔丁酯 (9.3 g, 43.23 mmol) 和氢氧化钡 (2.5 g)。在氢气 (60 atm) 下振摇混合物 12 h。通过 Celite® 滤床过滤混合物, 并减压浓缩至干。将所得的油通过硅石过滤, 用己烷, 接着用二氯甲烷, 接着用二乙醚洗脱。浓缩醚层, 得到标题中间体的油 (7.1 g)。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO } d_6$, 299.96 MHz): δ (ppm) 1.35–1.46 (s, 9H), 2.81–2.85 (s, 3H), 2.95–3.1 (m, 1H), 3.3–3.6 (m, 3H), 3.67–3.85 (m, 1H), 5.25–5.4 (m, 1H)。(m/z): $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{ClNO}_3$ 计算值 123.10; 实测值 123.1。

c. 制备 ((*R*)-2-羟基-3-{3-[(1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧基)氨基]-(1*S*,3*R*,5*R*)-8-氮杂二环[3.2.1]辛-8-基}丙基) 甲基氨基甲酸叔丁酯

将 ((*S*)-3-氯-2-羟基丙基) 甲基氨基甲酸叔丁酯 (335 mg, 1.5 mmol) 和 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基} 酰胺 (339 mg, 1.0 mmol) 溶于甲醇 (5 mL), 然后加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (523 μL , 3.0 mmol)。混合物于 80 °C 加热 16h, 然后减压浓缩。将所得的油进行快速色谱 (SiO_2 , 用 10 % 甲醇/90 % 二氯甲烷洗脱)。浓缩包含产物的级分得到标题中间体的白色固体 (0.5 g)。(m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_5$ 计算值 527.33; 实测值 527.6。保留时间 (分析 HPLC: 2–50% MeCN/ H_2O , 经过 5 min) =

4.75 min.

d. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将((*R*)-2-羟基-3-{3-[(1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧基)氨基]-(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂二环[3.2.1]辛-8-基}丙基)甲基氨基甲酸叔丁酯 (575 mg, 1.09 mmol)溶于二氯甲烷(5 mL), 然后缓慢加入三氟乙酸(5 mL)。搅拌混合物 30 min, 然后减压浓缩。用二乙醚研磨所得的油, 然后过滤。真空干燥沉淀物, 得到标题中间体的三氟乙酸盐 (0.68 g)。(*m/z*): [M+H]⁺ C₂₄H₃₄N₄O₃ 计算值 427.27; 实测值 427.2。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/H₂O, 经过 5 min) = 3.40 min。

e. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (1.03 g, 1.57 mmol)溶于二氯甲烷(6.0 mL), 加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(747 μ L, 5.0 mmol), 在氮气下搅拌混合物, 并冷却至 0 °C。加入甲磺酰氯 (124.4 μ L, 1.6 mmol), 在 0 °C 下搅拌混合物 30 min。加入水使反应淬灭, 减压浓缩混合物至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题化合物的三氟乙酸盐 (0.38 g)。

(*m/z*): [M+H]⁺ C₂₅H₃₆N₄O₅S 计算值 505.25; 实测值 505.4。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/H₂O, 经过 5 min) = 4.17 min。游离碱:
¹H-NMR (DMSO *d*₆, 299.96 MHz): δ (ppm) 1.40-1.68 (d, 6H), 1.81-2.02 (br s, 4H), 2.02-2.18 (br m, 2H), 2.22-2.36 (d, 2H), 2.78-2.90 (2 s, 6H), 2.91-3.04 (m, 1H), 3.10-3.30 (m, 4H), 3.61-3.78 (br s, 1H), 4.02-4.17 (m, 1H), 4.71-4.79 (br s, 1H), 5.2-5.8 (br s, 1H), 7.3-7.4 (t, 1H), 7.67-7.78 (t, 1H),

7-82-7.94 (d, 1H), 7.98-8.02 (d, 1H), 8.80 (s, 1H), 10.37-10.40 (d, NH)。

实施例 7: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

按照实施例 6 的方法, 用 (*R*)-2-氯甲基环氧乙烷替代步骤 a 中的 (*S*)-2-氯甲基环氧乙烷, 制备下列中间体和标题化合物。

(*R*)-1-(苄基-甲基-氨基)-3-氯丙-2-醇: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6 , 299.96 MHz): δ (ppm) 2.01 (s, 3H), 2.2-2.4 (m, 2H), 3.21-3.5 (m, 3H), 3.53-3.6 (m, 1H), 3.65-3.75 (m, 1H), 4.95 (d, 1H), 7.0-7.25 (m, 5H)。(m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{ClNO}$ 计算值 214.10; 实测值 214.1。

((*R*)-3-氯-2-羟基-丙基)甲基氨基甲酸叔丁酯: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6 , 299.96 MHz): δ (ppm) 1.35-1.46 (s, 9H), 2.81-2.85 (s, 3H), 2.95-3.1 (m, 1H), 3.3-3.6 (m, 3H), 3.67-3.85 (m, 1H), 5.25-5.4 (m, 1H)。(m/z): $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{ClNO}_3$ 计算值 123.10; 实测值 123.1。

((*S*)-2-羟基-3-{3-[(1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧基)氨基]-(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂二环[3.2.1]辛-8-基}丙基)甲基氨基甲酸叔丁酯: (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_5$ 计算值 527.33; 实测值 527.6。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/ H_2O , 经过 5 min) = 4.75 min。

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺: (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_3$ 计算值 427.27; 实测值 427.2。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/ H_2O , 经过 5 min) = 3.40 min。

1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺: (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ 计算值 505.25; 实测值 505.4。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/ H_2O , 经过 5 min) = 4.17 min。

实施例 8: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-[甲基-(吡啶-4-羧基)氨基]丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (71 mg, 0.17 mmol) 溶于 DMF (0.5 mL), 然后加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (88.9 μ L, 0.51 mmol)。接下来, 加入异烟酸 (41.8 mg, 0.34 mmol) 和 PyBOP (177 mg, 0.34 mmol) 的 DMF 溶液。在室温下振摇所得混合物 30 分钟, 然后减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题化合物的三氟乙酸盐 (30.8 mg)。(*m/z*): $[M+H]^+$ $C_{30}H_{37}N_5O_4$ 计算值 532.29; 实测值 532.7。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.11 min。

实施例 9: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-[(吡啶-4-羧基)氨基]丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (82.4 mg, 0.2 mmol) 溶于 DMF (0.5 mL), 然后加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (69.7 μ L, 0.4 mmol)。接下来, 加入异烟酸 (49.2 mg, 0.4 mmol) 和 PyBOP (208.2 mg, 0.4 mmol) 的 DMF 溶液。将所得混合物在室温下振摇 30 分钟, 然后减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题化合物的三氟乙酸盐 (82.1 mg)。(*m/z*): $[M+H]^+$ $C_{29}H_{35}N_5O_4$ 计算值 518.28; 实测值 518.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.20 min。

实施例 10: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-甲氧基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-甲氧基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (53.6 mg, 0.12 mmol) 溶于 DMF (1.0 mL), 然后加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (104. μ L, 0.6 mmol)。在氮气下搅拌混合物, 并冷却至 0°C。加入乙酰氯 (17.1 μ L, 0.24 mmol), 并在 0°C 下搅拌混合物 30 min, 然后减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题化合物的三氟乙酸盐 (40.4 mg)。(m/z): [M+H]⁺ C₂₇H₃₈N₄O₄ 计算值 483.30; 实测值 483.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.54 min。

实施例 11. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-甲氧基-3-[甲基-(吡啶-4-羰基)氨基]丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-甲氧基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (53.6 mg, 0.12 mmol) 溶于 DMF (1.0 mL), 然后加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (104.5 μ L, 0.6 mmol)。在氮气下搅拌混合物, 并冷却至 0°C。加入异烟酰氯 (42.7 mg, 0.24 mmol), 并在 0°C 下搅拌混合物 30 min, 然后减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题化合物的三氟乙酸盐 (54.4 mg)。(m/z): [M+H]⁺ C₃₁H₃₉N₅O₄ 计算值 546.31; 实测值 546.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.29 min。

实施例 12. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(乙酰基-吡啶-3-基甲基-氨基)-2-甲氧基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸(8-{2-甲氧基-3-[(吡啶-3-基甲基)氨基]丙基}-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基)酰胺 (102.6 mg, 0.2 mmol) 溶于 DMF (1.0 mL), 然后加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (139.4 μ L, 0.8 mmol)。在氮气下搅拌混合物, 并冷却至 0°C。加入乙酰氯 (28.5 μ L, 0.4 mmol), 在 0°C 搅拌混合物 30 min, 然后减

压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL)，并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分，得到标题化合物的三氟乙酸盐 (33.2 mg)。(m/z): $[M+H]^+ C_{32}H_{41}N_5O_4$ 计算值 560.33; 实测值 560.4。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.27 min。

实施例 13. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-乙酰基氨基-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (82.4 mg, 0.2 mmol) 溶于 DMF (0.5 mL)，然后加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (69.7 μ L, 0.4 mmol)。接着，加入乙酸 (22.7 μ L, 0.4 mmol) 和 PyBOP (208.2 mg, 0.4 mmol) 的 DMF 溶液。在室温振摇所得混合物 30 分钟，然后减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL)，并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分，得到标题化合物的三氟乙酸盐 (79.2 mg)。(m/z): $[M+H]^+ C_{25}H_{34}N_4O_4$ 计算值 455.27; 实测值 455.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.33 min。

实施例 14. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (43 mg, 0.1 mmol) 溶于 DMF (1.0 mL)，然后加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (87.1 μ L, 0.5 mmol)。在氮气下搅拌混合物，并冷却至 0 °C。加入乙酰氯 (17.8 μ L, 0.25 mmol)，在 0 °C 搅拌混合物 30 min。减压浓缩混合物至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL)，并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分，得到标题中间体的三氟乙酸盐 (17.1 mg)。(m/z): $[M+H]^+ C_{26}H_{36}N_4O_4$ 计算值 469.28; 实测值 469.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.49 min。

实施例 15. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸

{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-(甲酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (43 mg, 0.1 mmol) 溶于甲酸乙酯 (1.0 mL)。将混合物于 65 °C 加热 16 h, 然后减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题中间体的三氟乙酸盐 (22.7 mg)。(*m/z*): [M+H]⁺ C₂₅H₃₄N₄O₄ 计算值 455.27; 实测值 455.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.37 min。

实施例 16. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[3-甲酰基氨基-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (41.2 mg, 0.1 mmol) 溶于甲酸乙酯 (1.0 mL)。将混合物于 65 °C 加热 16 h, 然后减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题中间体的三氟乙酸盐 (37.5 mg)。(*m/z*): [M+H]⁺ C₂₄H₃₂N₄O₄ 计算值 441.25; 实测值 441.2。保留时间 (分析 HPLC: 5-40% MeCN/H₂O, 经过 4 min) = 2.89 min。

实施例 17. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-3-(乙酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (200 mg, 0.3 mmol) 溶于 DMF (1.0 mL), 然后加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (160.3 μL, 0.92 mmol)。接着, 加入乙酸 (17.3 μL, 0.3 mmol) 和 PyBOP (159 mg, 0.3 mmol) 的 DMF 溶液。在室温下振摇所得混合物 30 分钟, 然后减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5

mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题中间体的三氟乙酸盐 (130 mg)。(*m/z*): $[M+H]^+ C_{26}H_{36}N_4O_4$ 计算值 469.28; 实测值 469.5。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/H₂O, 经过 5 min) = 3.94 min。

实施例 18. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-3-(甲酰基-甲基-氨基)-2-羟基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*S*)-2-羟基-3-甲氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (235mg, 0.36mmol) 溶于甲酸乙酯 (5.0 mL)。将混合物于 65 °C 加热 16 h, 然后减压浓缩至干。将产物溶于乙酸/水 (1:1) (1.5 mL), 并用 HPLC 色谱法纯化。冻干纯化级分, 得到标题中间体的三氟乙酸盐 (97.5 mg)。(*m/z*): $[M+H]^+ C_{25}H_{34}N_4O_4$ 计算值 455.27; 实测值 455.2。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/H₂O, 经过 5 min) = 3.87 min。

实施例 19: 合成 5-溴代-1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

向溶于乙腈 (5 mL) 和乙酸 (10 mL) 混合物的 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (500 mg, 0.99 mmol) 溶液加入溴 (0.30 mL, 5.9 mmol)。在环境温度下搅拌混合物 12 h, 减压浓缩, 得到淡黄色油状剩余物。将剩余物溶于 20% 乙腈的水溶液 (0.5% TFA) (5 mL), 并用 HPLC 纯化。得到标题化合物作为主要产物, 并分离成三氟乙酸盐 (200 mg)。¹H-NMR (CD₃OD): δ (ppm) 8.64 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.72-7.70 (m, 2H), 4.18 (br m, 2H), 4.0 (br s, 1H), 3.2-3.0 (m), 2.88 (s, 3H), 2.79 (s, 3H), 2.5-2.2 (m, 2H), 1.56 (d, 6H)。(*m/z*): $[M+H]^+ C_{25}H_{35}BrN_4O_5S$ 计算值 583.16; 实测值 583.4。保留时间 (分析 HPLC: 10-50% MeCN/H₂O, 经过 6 min)

= 3.90 min。

实施例 20: 替代方案合成 ((*R*)-2-羟基-3-{3-[(1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羰基)氨基]-(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂二环[3.2.1]辛-8-基}丙基)甲基氨基甲酸叔丁酯

a. 制备甲基-(*S*)-1-环氧乙烷基甲基氨基甲酸叔丁酯

将 ((*S*)-3-氯-2-羟基丙基)-甲基氨基甲酸叔丁酯 (2.23 g, 10 mmol) 溶于 THF (30 mL), 然后加入氢氧化钠水溶液 (0.48 g 溶于 10 mL 水)。搅拌混合物 2 h。然后减压浓缩混合物, 除去大部分 THF, 将剩余水溶液萃取到乙酸乙酯中, 用水洗涤。用硫酸钠干燥产物, 过滤并减压浓缩, 得到标题中间体的油 (1.6 g)。(m/z): $[M+Na]^+$ C₉H₁₇NO₃ 计算值 210.10; 实测值 210.1。¹H-NMR (DMSO *d*₆, 299.96 MHz): δ (ppm) 1.32-1.42 (s, 9H), 2.69-2.73 (m, 1H), 2.75-2.85 (s, 3H), 2.95-3.05 (br s, 1H), 3.10-3.15 (dm, 1H), 3.16-3.21 (d, 1H), 3.37-3.51 (m, 2H)。

b. 合成 ((*R*)-2-羟基-3-{3-[(1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羰基)氨基]-(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂二环[3.2.1]辛-8-基}丙基)甲基氨基甲酸叔丁酯

将甲基-(*S*)-1-环氧乙烷基甲基氨基甲酸叔丁酯 (9.53 g, 51.1 mmol) 和 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (8.7 g, 25.6 mmol) 溶于甲醇 (100 mL)。将混合物于 80 °C 加热 2h, 然后减压浓缩。将所得的油溶于乙酸乙酯, 并用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤, 接着用饱和氯化钠水溶液洗涤。有机层用硫酸钠干燥, 过滤, 并减压浓缩。将所得的油进行快速色谱 (SiO₂, 用 10% 甲醇/90% 二氯甲烷洗脱)。包含产物的级分浓缩得到标题中间体的白色固体 (13.5 g)。(m/z): $[M+H]^+$ C₂₉H₄₂N₄O₅ 计算值 527.33; 实测值 527.6。保留时间 (分析 HPLC: 2-50% MeCN/H₂O, 经过 5 min) = 4.75 min。

实施例 21: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(甲磺酰基-乙基氨基)丙基]-8-氮杂二环

[3.2.1] 辛-3-基} 酰胺

按照实施例 1 的方法, 用乙胺代替步骤 h 中的甲胺, 制备标题化合物。(m/z): $[M+H]^+$ $C_{26}H_{38}N_4O_5S$ 计算值 519.28; 实测值 519.2。保留时间 (分析 HPLC: 10-70% MeCN/ H_2O , 经过 6 min) = 2.91 min。

实施例 22: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基氨基)-丙基]-8-氮杂二环 [3.2.1] 辛-3-基} 酰胺

a1. 制备 (*S*)-2-环氧乙烷基甲基异吲哚-1,3-二酮

向在冰浴中的 (*S*)-1-环氧乙烷基甲醇 (5 g, 67.5 mmol) 和邻苯二甲酰亚胺 (9.9 g, 67.3 mmol) 在四氢呋喃 (200 mL) 中的冷溶液中加入三苯基膦 (17.9 g, 68.2 mmol) 和二乙基偶氮二羧酸酯 (12.3 g, 70.6 mmol)。在 0°C 下搅拌混合物 2 h, 并在环境温度下搅拌 48 h。真空浓缩混合物, 用快速硅石柱色谱法纯化油状剩余物, 得到所需的产物 (10.1 g) 的淡黄色固体: 在 1:1 EtOAc/己烷中, R_f = 0.51。 1H -NMR ($CDCl_3$, 300MHz): δ (ppm) 7.76-7.64 (m, 2H), 7.63-7.60 (m, 2H), 3.9-3.8 (dd, 1H), 3.70-3.65 (dd, 1H), 3.15 (m, 1H), 2.70-2.67 (dd, 1H), 2.58-2.55 (dd, 1H)。

b1. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-甲磺酰基氨基) 丙基]-8-氮杂二环 [3.2.1] 辛-3-基} 酰胺

按照实施例 4 的方法, 用先前步骤的手性中间体替代外消旋 2-环氧乙烷基甲基-异吲哚-1,3-二酮, 制备标题化合物的三氟乙酸盐。(m/z): $[M+H]^+$ $C_{24}H_{34}N_4O_5S$ 计算值 491.24; 实测值 491.4。保留时间 (分析 HPLC: 10-50% MeCN/ H_2O , 经过 6 min) = 3.69 min。 1H -NMR (CD_3OD , 300MHz): δ (ppm) 8.67 (s, 1H), 7.74-7.73 (m, 3H), 7.7-7.6 (dt, 1H), 7.3-7.2 (t, 1H), 4.2 (br s, 2H), 4.0 (br m, 2H), 3.2-2.9 (m, 4H), 2.8 (s, 3H), 2.6-2.3 (br m, 6H), 2.2-2.1 (br m, 2H), 1.57-1.55 (d, 6H)。

也用下列方法制备标题化合物。

a2. 制备 *N*-((*S*)-环氧乙烷基甲基)甲磺酰胺

向冰浴中的甲磺酰胺 (10 g, 0.105 mol) 的冷水 (100 mL) 溶液加入粒状氢氧化钠 (8.4 g, 0.21 mol), 然后加入 (*S*)-2-氯甲基环氧乙烷 (12.4 g, 0.158 mol)。在相同温度下搅拌混合物 2 h, 并在室温下搅拌 12 h, 然后加入浓盐酸 (18 mL)。用二氯甲烷 (2 × 300 mL) 萃取水层, 分离产物。用 MgSO_4 干燥有机层, 然后蒸发至干, 得到无色液体 (2.5 g), 它直接用于下一个步骤。

b2. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基} 酰胺

向 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基} 酰胺 (TFA 盐; 4 g, 8.8 mmol) 的甲醇 (150 mL) 溶液中加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (1.7 mL, 9.5 mmol) 和前步产物 (2.5 g, 18.2 mmol)。在 80 °C 下搅拌混合物 2 天。真空浓缩后, 用制备型 HPLC 纯化剩余物, 得到标题化合物的三氟乙酸盐 (1.3 g)。(*m/z*): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ 计算值 491.24; 实测值 491.4。保留时间 (分析 HPLC: 10-50% MeCN/ H_2O , 经过 6 min) = 3.69 min。

实施例 23: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(1,1-二氧代-2-异噻唑烷基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基} 酰胺

a. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(3-氯丙磺酰氨基)丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基} 酰胺

向冰浴中的 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-氨基丙基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基} 酰胺 TFA 盐 (0.125 g, 0.195 mmol) 的二氯甲烷 (2 mL) 冷溶液中加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (0.119 mL, 0.683 mmol) 和 3-氯丙磺酰氯 (0.025 mL, 0.205 mmol)。在 0 °C 下搅拌 2 h 后, 混合物在室温下搅拌过夜。用二氯甲烷 (50 mL) 稀释, 并用盐水和饱和 NaHCO_3 溶液洗涤。用 MgSO_4

干燥后，将有机溶液蒸发至干，得到油状剩余物。将粗产物直接用于下一个步骤。

b. 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(1,1-二氧代-2-异噻唑烷基)丙基]-8-氮
杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

向 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉酮-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[2-羟基-3-(3-氯丙磺酰氨基)丙基]-8-氮杂二环
[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (100 mg, 0.18 mmol) 的无水 DMF (3 mL) 溶液
中加入碳酸钾 (75 mg, 0.56 mmol)。在 85 °C 下振摇反应混合物 12 h，
并真空浓缩。将剩余物溶于二氯甲烷 (50 mL)，并用饱和 NaHCO₃ 洗涤。
用 MgSO₄ 干燥以后，蒸发滤液至干，用制备 HPLC 纯化剩余物得到标题
化合物。(m/z): [M+H]⁺ C₂₆H₃₆N₄O₅S 计算值 517.26; 实测值 517.3。

实施例 24: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮
杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

a. 制备 (1*S*, 3*R*, 5*R*)-3-[1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧
基]氨基]-8-氮杂二环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯

在 3 L 烧瓶中，将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 (112.4 g, 0.486 mol, 1.1 eq) 混悬在甲苯 (1 L) 中。将混合物加热至 85 °C，
经 70 分钟逐滴加入亚硫酸氯 (86.74 g, 0.729 mol)。边搅拌边将混
合物于 95 °C 加热 1.5 h，然后冷却至室温。

在单独的 12 L 烧瓶中，将 (1*S*, 3*R*, 5*R*)-3-氨基-8-氮杂二环[3.2.1]
辛烷-8-羧酸叔丁酯 (100.0 g, 0.442 mol, 1 eq) 混悬在甲苯 (1 L)
中，并加入 3 M NaOH (4 eq)。室温搅拌混合物 10 分钟，然后冷却至
约 5 °C。经 40 分钟缓慢加入酰基氯溶液，同时搅拌，保持内部温度
低于 10 °C。在 3-5 °C 下搅拌混合物 30 min，让各层分离过夜。收集
甲苯层 (~2.5 L)，通过旋转蒸发浓缩至约一半 (~1.2 L)，直接用于
下一个步骤。

b. 制备 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

经 20 分钟, 在 20 °C 下, 边搅拌边向先前步骤中制备的甲苯溶液 (~1.2 L) 中加入三氟乙酸 (200 mL)。在 20 °C 下搅拌混合物 2 h。加入水 (1.55 L), 在 20 °C 下搅拌混合物 30 分钟。30 分钟以后, 混合物分成三层。底层 (~350 mL) 粘稠褐色的油含中间体粗品。

在 1-2 °C 下, 经 1 小时边搅拌边向装有 MTBE (2.8 L) 的 12 L 烧瓶内加入褐色的粗油。在相同温度下搅拌混合物 1 h, 然后过滤。用 MTBE (2 × 300 mL) 洗涤滤液, 在室温下真空干燥 4 天, 得到标题中间体的三氟乙酸盐 (163.3 g) 的淡黄色粉末。

c. 制备 *N*-甲基-*N*-[(*S*)-2-环氧乙烷-2-基甲基]甲磺酰胺

在 12 L 烧瓶中装入水 (1 L), 接着加入 NaOH (50 % 的水溶液, 146.81 g, 1.835 mol)。用水 (2 × 500 mL) 洗涤装 NaOH 的烧杯, 并将洗液加入烧瓶。室温搅拌混合物 10 min, 并将其冷却至 ~8 °C。经 5 分钟的时间加入 (*N*-甲基) 甲磺酰胺 (200.2 g, 1.835 mol) 的水 (500 mL) 溶液。在 ~4 °C 下搅拌混合物 1 h, 并加入 (*S*)-2-氯甲基环氧乙烷 (339.6 g, 3.67 mol)。在 3-4 °C 下搅拌混合物 20 h。加入二氯甲烷 (2 L), 在 5-10 °C 下搅拌混合物 30 min。经过 10 分钟让两层分离, 并收集。将有机层 (~2.5 L) 加回到 12 L 烧瓶中, 并用 1 M H₃PO₄ (800 mL) 和盐水 (800 mL) 洗涤。通过旋转蒸发除去二氯甲烷。向粗产物中加入甲苯 (400 mL), 并通过旋转蒸发除去。再经过 3 个甲苯处理循环以后, 得到标题中间体 (228.2 g), 它不经进一步纯化就用于下一个步骤。

d. 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸
{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮
杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺

在 3 L 烧瓶中, 将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺三氟乙酸盐 (105.0 g, 0.232 mol) 混悬在无水乙醇 (400 mL) 中。在室温下, 向该混悬液中

加入溶于无水乙醇(100 mL)的 NaOH (50 %的水溶液, 0.243 mol, 1.05 eq)。用乙醇 (2 × 50 mL) 洗涤装 NaOH 的烧杯, 并将洗液加到反应混合物中。搅拌 30 min 以后, 加入 *N*-甲基-*N*-[(*S*)-2-环氧乙烷-2-基甲基]甲磺酰胺 (62.0 g, 1.5 eq) 的无水乙醇 (100 mL) 溶液。混合物回流 2 h, 冷却至室温, 并加入标题化合物的晶种。约 5 min 搅拌以后, 形成白色固体。将混合物冷却至 3-5 °C, 并搅拌 2 h。过滤白色固体, 用冷的无水乙醇 (3 × 50 mL) 洗涤潮湿的滤饼。在 30 °C 下真空干燥固体 60 h, 得到标题化合物 (93.8 g, 用卡尔·费歇尔滴定法测得含水量 2.03 %)。¹H NMR (CDCl₃) δ ppm 10.52 (d, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.75 (d, 2H), 7.64-7.60 (m, 2H), 7.28-7.26 m, 1H), 4.33-4.26 (m, 2H), 3.78-3.75 (m, 1H), 3.27-3.20 (m, 4H), 3.01 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.58-2.53 (m, 1H), 2.30-1.81 (m, 11H), 1.68 (d, 6H)。

从先前以较小规模用该实施例的方法进行的标题化合物制备中得到晶种, 其中结晶是自发发生的。

实施例 25: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺盐酸盐

在 1 L 烧瓶中, 将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (34.7 g, 0.069 mol) 混悬在无水乙醇 (210 mL) 中。在室温下边搅拌边加入浓 HCl (1.1 eq)。回流搅拌混合物 30 min, 冷却至室温, 并搅拌 2 h。过滤固体, 用冷无水乙醇 (3 × 50 mL) 洗涤潮湿的滤饼。在 30 °C 下真空干燥固体 48 h, 得到标题化合物 (34.5 g, 93.7 % 产率, 用卡尔·费歇尔滴定法测得含水量 0.13 %)。

实施例 26: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺的柠檬酸盐

将 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸

{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (0.1 g, 0.2 mmol) 混悬在乙醇 (1 mL) 中。向该混悬液中加入 1M 柠檬酸的乙醇溶液 (0.072 mL, 0.072 mmol, 0.33 eq)。对混合物进行简单的声处理, 直至澄清, 盖上盖子, 然后让其放置过夜。然后除去盖子, 让混合物在环境条件下蒸发, 直至观察到固体。然后给混合物重新盖上盖子, 放置 72 h。过滤所得固体, 用冷乙醇洗涤, 得到标题化合物的固体 (74.3 mg)。

实施例 27: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺的酸性盐

按照实施例 26 的方法, 使用所标明当量的酸, 制备固体形式的下表 III 中所列的 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺的酸性盐。

表 III: 酸性盐

酸	酸的当量数	产物重量(mg)
己二酸	0.5	48.5
磷酸	0.5	86.6
硫酸	0.5	27.0
酒石酸	0.5	66.3
苹果酸	0.5	25.3
氢溴酸	1	62.9

实施例 28: 合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺的甲磺酸盐

向 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸 {(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺 (0.1 g, 0.2 mmol) 的 50 % 乙腈/水 (1 mL) 溶液中加入 1M 甲磺酸的乙醇溶液 (0.2 mL, 0.2 mmol, 1 eq)。然

后冷冻混合物，并冻干至干过夜。将所得固体溶于异丙醇（1 mL），同时略微温热并允许冷却。过滤收集所得固体，并用冷异丙醇洗涤，得到标题化合物的固体（90 mg）。

实施例 29：合成 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺的酸性盐

按照实施例 28 的方法，使用所标明当量的酸，制备固体形式的下表 IV 中所列的 1-异丙基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-羧酸{(1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-羟基-3-(甲磺酰基-甲基-氨基)丙基]-8-氮杂-二环[3.2.1]辛-3-基}酰胺的酸性盐。

表 IV：酸性盐

酸	酸的当量数	产物重量(mg)
富马酸	1	107.2
苯甲酸	1	105.0
(<i>R</i>)-扁桃酸	1	96.1

试验 1：对人 5-HT_{4(c)} 受体的放射配体结合试验

a. 膜制备 5-HT_{4(c)}

稳定转染人 5-HT_{4(c)} 受体 cDNA 的 HEK-293 (人胚肾) 细胞 (Bmax = ~ 6.0 pmol/mg 蛋白，如使用 [³H]-GR113808 膜放射配体结合试验所测定的) 在 T-225 烧瓶中，在含 4,500 mg/L D-葡萄糖和盐酸吡哆醇 (GIBCO-Invitrogen Corp., Carlsbad CA: Cat #11965)，补充了 10% 胎牛血清 (FBS) (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #10437)、2 mM L-谷氨酰胺和 (100 单位) 青霉素-(100 μg) 链霉素 /ml (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #15140) 的 Dulbecco's 改进的 Eagle 培养基 (DMEM) 中，在 5% CO₂ 增湿培养箱中在 37 °C 下生长。通过加入 800 μg/mL 遗传霉素 (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #10131) 到培养基中，使细胞在连续选择压力下生长。

细胞生长至差不多 60-80% 融合 (<35 次培养传代)。在收获细胞前

20-22 小时, 用不含血清的 DMEM 洗涤细胞两次, 并给细胞补料。膜制备的所有步骤都在冰上进行。通过温和的机械搅动和用 25 mL 吸量管研磨而扬起单层细胞。通过以 1000 rpm 离心 (5 min) 收集细胞。

为了膜制备, 将细胞沉淀团块再悬浮于冰冷的 50 mM 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES), pH 7.4 (膜制备缓冲液) (40 mL/来自 30-40 个 T225 烧瓶的全部细胞收获量) 中, 并用 polytron 破裂器 (设置 19, 2×10 s) 在冰上进行匀浆处理。在 4°C 下, 将所得的匀浆以 1200 g 离心分离 5 分钟。弃去沉淀物, 在 40,000 g 下对上清液离心 (20 min)。通过用膜制备缓冲液再悬浮并在 40,000 g 下离心分离 (20 min) 而洗涤沉淀物一次。将最终的沉淀物再悬浮于 50 mM HEPES, pH 7.4 (试验缓冲液) (相当于 1 个 T225 烧瓶/1 mL) 中。用 Bradford 法 (Bradford, 1976) 测定膜混悬液的蛋白浓度。在 -80 °C 下分份冷冻保存膜。

b. 放射配体结合试验

在 1.1 mL 96-深孔聚丙烯分析板 (Axygen) 中进行放射配体结合试验, 总分析体积为 400 μ L, 在包含 0.025% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 50 mM HEPES pH 7.4 中含 2 μ g 膜蛋白。在 0.001 nM - 5.0 nM 范围内的 8-12 个不同浓度下, 使用 [3 H]-GR113808 (Amersham Inc., Bucks, UK: Cat #TRK944; 比活 ~ 82 Ci/mmol) 进行饱和结合研究, 用于测定放射性配体的 K_d 值。用 0.15 nM 的 [3 H]-GR113808, 和在 10 pM - 100 μ M 范围内的 11 个不同化合物浓度, 进行置换分析, 用于测定化合物的 pK_i 值。

收到的试验化合物为在 DMSO 中的 10 mM 储备液, 并在 25°C 下, 在含 0.1% BSA 的 50 mM HEPES pH 7.4 中稀释至 400 μ M, 然后在相同缓冲液中进行连续稀释 (1:5)。在 1 μ M 未标记的 GR113808 的存在下测定非特异性结合。在室温下温育该试验 60 min, 然后通过经在 0.3% 聚乙烯亚胺中预浸渍的 96-孔 GF/B 玻璃纤维滤板 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 快速过滤终止结合反应。用过滤缓冲液 (冰冷的 50 mM HEPES, pH 7.4) 洗涤滤板三次, 除去非结合的放射性。干燥滤板, 将 35 μ L Microscint-20 液体闪烁液 (Packard BioScience Co.,

Meriden, CT)加到各个孔内,在 Packard Topcount 液体闪烁计数器 (Packard BioScience Co., Meriden, CT)中对板进行计数。

用 GraphPad Prism 软件包 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), 使用单位点竞争的 3-参数模型, 通过非线性回归分析分析结合数据。将 BOTTOM (曲线最小值) 定为非特异性结合的值, 如在 1 μM GR113808 的存在下测定的。在 Prism 中, 从最佳拟合 IC_{50} 值和放射性配体的 K_d 值, 使用 Cheng-Prusoff 方程式 (Cheng and Prusoff, *Biochemical Pharmacology*, 1973, 22, 3099-108), 计算试验化合物的 K_i 值: $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [L]/K_d)$, 其中, $[L] = [^3\text{H}]\text{-GR113808}$ 浓度。结果表示为 K_i 值的负的十的对数, $\text{p}K_i$ 。

在该试验中具有较高 $\text{p}K_i$ 值的试验化合物对 5-HT₄ 受体具有较高的结合亲和力。在该试验中测试的本发明化合物具有约 6.3 - 约 9.0 的 $\text{p}K_i$ 值, 通常为约 6.5 - 约 8.5。

试验 2: 对人 5-HT_{3A} 受体的放射配体结合试验: 受体亚型选择性的测定

a. 膜制备 5-HT_{3A}

从 Dr. Michael Bruess (University of Bonn, GDR) 获得稳定转染人 5-HT_{3A} 受体 cDNA 的 HEK-293 (人胚肾) 细胞 ($B_{\text{max}} = \sim 9.0$ pmol/mg 蛋白, 如使用 [³H]-GR65630 膜放射配体结合试验所测定的)。细胞在 T-225 烧瓶或细胞工厂中补充了 10% 热灭活的胎牛血清 (FBS) (Hyclone, Logan, UT: Cat #SH30070.03) 和 (50 单位) 青霉素-(50 μg) 链霉素/ml (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #15140) 的 50% Dulbecco's 改进的 Eagle 培养基 (DMEM) (GIBCO-Invitrogen Corp., Carlsbad, CA: Cat #11965) 和 50% Ham's F12 (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #11765) 中, 在 5% CO₂ 增湿培养箱中, 在 37 °C 下生长。

细胞生长至差不多 70-80% 融合 (< 35 次培养传代)。膜制备的所有步骤都在冰上进行。为了收获细胞, 吸取培养基, 细胞用不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水 (dPBS) 冲洗。通过温和的机械搅动扬起单层细胞。在 1000 rpm 下离心分离 (5 min) 收集细胞。膜制备的

随后步骤按照表达 5-HT_{4(c)}受体膜的上述实验设计。

b. 放射配体结合试验

在 96-孔聚丙烯试验板中进行放射配体结合试验，总试验体积为 200 μ L，在含 0.025% BSA 的 50 mM HEPES pH 7.4 试验缓冲液中包含 1.5-2 μ g 膜蛋白。使用 [³H]-GR65630 (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA: Cat #NET1011, 比活 ~ 85 Ci/mmol)，以 0.005 nM 到 20 nM 范围内的 12 个不同浓度，进行测定放射性配体 K_d 值的饱和结合研究。用 0.50 nM 的 [³H]-GR65630 和 10 pM 到 100 μ M 范围内的 11 个不同的化合物浓度进行测定化合物 pK_i 值的置换试验。收到的化合物为 DMSO 中的 10 mM 储备液 (参见第 3.1 节)，在 25°C 下，在含 0.1% BSA 的 50 mM HEPES pH 7.4 中稀释至 400 μ M，然后在相同缓冲液中进行连续 (1:5) 稀释。在 10 μ M 未标记的 MDL72222 的存在下测定非特异性结合。在室温下温育该试验 60 min，然后通过经在 0.3% 聚乙烯亚胺中预浸渍的 96-孔 GF/B 玻璃纤维滤板 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 快速过滤而终止结合反应。用过滤缓冲液 (冰冷的 50 mM HEPES, pH 7.4) 洗涤滤板三次，除去非结合的放射性。干燥滤板，将 35 μ L Microscint-20 液体闪烁液 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 加到各个孔内，在 Packard Topcount 液体闪烁计数器 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 中对板进行计数。

使用上述测定 K_i 值的非线性回归法分析分析结合数据。将 BOTTOM (曲线最小值) 定为非特异性结合的值，如在 10 μ M MDL72222 的存在下测定的。将 Cheng-Prusoff 方程式中的量 [L] 定义为 [³H]-GR65630 浓度。

将对 5-HT₄ 受体亚型相对于 5-HT₃ 受体亚型的选择性计算成 K_i (5-HT_{3A}) / K_i (5-HT_{4(c)}) 之比。在该试验中测试的本发明化合物具有约 50 - 约 8000 的 5-HT₄/5-HT₃ 受体亚型选择性，通常为约 100 - 约 4000。

试验 3: 用表达人 5-HT_{4(c)}受体的 HEK-293 细胞进行完整细胞 cAMP 蓄积 Flashplate 试验

在该试验中，通过测定当表达 5-HT₄受体的 HEK-293 细胞与不同

浓度的试验化合物接触时所产生的环 AMP 的量,测定试验化合物的功能效力。

a. 细胞培养

以克隆的人 5-HT_{4(c)} 受体 cDNA 稳定转染的 HEK-293 (人胚肾) 细胞被制备成以两种不同密度表达受体: (1) 密度为约 0.5-0.6 pmol/mg 蛋白,如使用 [³H]-GR113808 膜放射配体结合试验所测定的,和 (2) 密度为约 6.0 pmol/mg 蛋白。细胞在 T-225 烧瓶中,在补充了 10% 胎牛血清 (FBS) (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #10437) 和 (100 单位) 青霉素-(100 µg) 链霉素/ml (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #15140) 的含 4,500 mg/L D-葡萄糖 (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #11965) 的 Dulbecco's 改进的 Eagle 培养基 (DMEM) 中,在 5% CO₂ 增湿培养箱内在 37°C 生长。通过向培养基中加入遗传霉素 (800 µg/mL: GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #10131), 细胞在连续选择压力下生长。

b. 细胞制备

细胞生长至差不多 60-80% 融合。在试验前 20-22 小时,用含 4,500 mg/L D-葡萄糖 (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #11965) 的无血清 DMEM 洗涤细胞两次并补料。为了收获细胞,吸取培养基,将 10 mL Versene (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #15040) 加到各个 T-225 烧瓶中。在 RT 下培养细胞 5 min, 然后通过机械振荡从烧瓶中取出。将细胞混悬液转移到含等体积预热 (37°C) dPBS 的离心管内,并在 1000 rpm 下离心分离 5 min。丢弃上清液,将沉淀物重新混悬在预热 (37°C) 的刺激缓冲液中 (每 2-3 个 T-225 烧瓶 10mL 当量)。记录该时间,并标记为 0 时。用库尔特计数器对细胞进行计数 (计数 8 µm 以上,烧瓶收率是 1-2 × 10⁷ 细胞/瓶)。以 5 × 10⁵ 细胞/ml 的浓度将细胞再混悬在预热 (37°C) 的刺激缓冲液中 (如 flashplate 试剂盒中提供的),并在 37°C 下预温育 10 min。

根据制造商的说明,使用 Flashplate 腺苷酸环化酶激活试验系统,用 ¹²⁵I-cAMP (SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA)

以放射免疫测定形式进行 cAMP 测定。

如上所述生长并制备细胞。在试验中的最终细胞浓度为 25×10^3 细胞/孔，最终试验体积为 100 μL 。收到的试验化合物为 DMSO 中的 10 mM 储备液，在 25°C 下，在含 0.1% BSA 的 50 mM HEPES pH 7.4 中稀释至 400 μM ，然后在相同缓冲液中进行连续 (1:5) 稀释。用 10 pM 到 100 μM (最终试验浓度) 范围内的 11 个不同的化合物浓度进行环 AMP 的蓄积试验。5-HT 浓度-反应曲线 (10 pM 到 100 μM) 被包括在每个板上。在 37°C 下振摇培养细胞 15 min，通过向各个孔内加入 100 μl 冰冷的检测缓冲液 (如 flashplate 试剂盒中提供的) 终止反应。将板密封，并在 4°C 下培养过夜。通过闪烁近似光谱法，使用 Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 对结合放射性进行定量。

根据制造商的用户手册中提供的说明，从 cAMP 标准曲线推出每 mL 反应所产生的 cAMP 的量。用 GraphPad Prism 软件包，使用 3-参数 S 形剂量反应模型 (限制于统一的斜率 (slope constrained to unity))，通过非线性回归分析分析数据。效力数据报道成 pEC_{50} 值 (EC_{50} 值的负的十的对数)，其中， EC_{50} 是 50 % 最大响应的有效浓度。

在该试验中显示出较高 pEC_{50} 值的试验化合物对于激动 5-HT₄ 受体具有较高的效力。在该试验中测试的本发明化合物，例如，在密度为约 0.5-0.6 pmol/mg 蛋白的细胞系 (1) 中，具有约 7.0 - 约 9.0 的 pEC_{50} 值，通常为约 7.5 - 约 8.5。

试验 4: 在表达 hERG 心脏钾通道的完整细胞中抑制钾离子流的体外电压钳试验

稳定转染 hERG cDNA 的 CHO-K1 细胞获得自 Wisconsin 大学的 Gail Robertson。将细胞保存在低温储藏条件下直至需要使用。细胞在补充了 10 % 胎牛血清和 200 $\mu\text{g/mL}$ 遗传霉素的 Dulbecco's 改进的 Eagle 培养基/F12 中扩充并传代。将细胞以能够为完整细胞电压钳研究选择分离细胞的密度在 35 mm^2 的平皿中 (包含 2 mL 培养基) 接种到聚-D-赖氨酸 (100 $\mu\text{g/mL}$) 涂覆的盖玻片上。平皿保持在 37°C 下的增湿的 5% CO_2 环境中。

至少每 7 天制备细胞外溶液，并且当不用时保存在 4°C 下。细胞外溶液包含 (mM)：NaCl (137)、KCl (4)、CaCl₂ (1.8)、MgCl₂ (1)、葡萄糖 (10)、4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) (10)，用 NaOH 调节至 pH 7.4。在不含或包含试验化合物的情况下，将细胞外溶液保存在贮器中，它可从该贮器以约 0.5 mL/min 的速率流入记录室。制备细胞内溶液，分份并保存在 -20°C 下直至使用那天。细胞内溶液包含 (mM)：KCl (130)、MgCl₂ (1)、乙二醇-双(β-氨基乙醚) *N,N,N',N'*-四乙酸盐 (EGTA) (5)、MgATP (5)、4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) (10)，用 KOH 调节至 pH 7.2。所有试验都在室温 (20-22°C) 下进行。

将接种细胞的盖玻片转移到记录室，并连续灌注。在细胞和膜片电极之间形成了 Gigaohm 密封。一旦达成稳定膜片，就在电压钳模型中开始记录，最初的控制电位是 -80 mV。实现稳定的完整细胞电流以后，就将细胞暴露于试验化合物。标准电压实验方案是：在 4.8 秒期间从 -80 mV 的控制电位逐步变为 +20 mV，在 5 秒期间复极化至 -50 mV，然后回复到最初的控制电位 (-80 mV)。每 15 秒 (0.067 Hz) 运行一次该电压方案。使用 pClamp 软件测定复极相期间的峰电流幅度。将浓度 3 μM 的试验化合物灌注在细胞上 5 分钟，接着是不含化合物的 5 分钟的清除期。最后将阳性对照 (西沙必利, 20 nM) 加到灌注液中，以测试细胞功能。从 -80 mV 到 +20 mV 的步骤激活了 hERG 通道，导致外向电流。返回 -50 mV 的步骤导致了外向尾电流，如通道从失活恢复并灭活。

使用 pCLAMP 软件测定复极相期间的峰电流幅度。将对照数据和检品数据输出到 Origin® (OriginLab Corp., Northampton MA)，其中，将各电流幅度相对于不含化合物的最初电流幅度标准化。计算各个条件下的标准化电流的均值和标准误，并相对于实验的时间过程绘图。

在暴露于检品或赋形剂对照 (通常是 0.3 % DMSO) 5 分钟后观察到的 K⁺流抑制之间进行比较。使用两个群体独立的 t-检验 (Microcal Origin v. 6.0) 进行实验组之间的统计学比较。p < 0.05 时，认为差异显著。

在该试验中, 钾离子流抑制百分数越小, 试验化合物当用作治疗剂时改变心脏复极模式的可能性就越小。在该试验中以 $3\ \mu\text{M}$ 浓度测试的本发明化合物显示出抑制钾离子流小于约 20%, 通常小于约 15%。

试验 5: 口服生物利用度的体外模型: Caco-2 渗透试验

进行 Caco-2 渗透试验, 模仿试验化合物口服后通过肠进入血流的能力。测定溶液中试验化合物渗透细胞单层的速率, 该细胞单层设计成模拟人小肠单层的紧密连接。

从 ATCC (美国模式培养物保藏所; Rockville, MD) 获得 Caco-2 (结肠, 腺癌; 人) 细胞。为了进行渗透研究, 将细胞以 $63,000\ \text{细胞}/\text{cm}^2$ 的密度接种在预浸湿的跨孔聚碳酸酯过滤器 (transwells polycarbonate filters) 上 (Costar; Cambridge, MA)。培养 21 天后形成了细胞单层。在跨孔板内细胞培养以后, 从跨孔板分离含细胞单层的膜, 并插入扩散盒 (Costar; Cambridge, MA)。将扩散盒插入加热块, 该加热块配备有用于控制温度的循环外部恒温调节于 $37\ ^\circ\text{C}$ 的水。气体多支管递送 95% O_2 /5% CO_2 到扩散盒每一半内, 并制造出跨越细胞单层的层流模式, 它有效减少了没有被搅动过的边界层。

用浓度 $100\ \mu\text{M}$ 的试验化合物进行渗透研究, 并用 ^{14}C -甘露醇监测单层的完整性。所有实验都在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下进行 60 min。在 0、30 和 60 min 时, 从盒子的供给侧和接收侧取样。用 HPLC 或液体闪烁计数分析样品中的试验化合物和甘露醇浓度。计算以 cm/sec 表示的渗透系数 (K_p)。

在该试验中, 大于约 $10 \times 10^{-6}\ \text{cm}/\text{sec}$ 的 K_p 值被认为表示良好的生物利用度。在该试验中测试的本发明化合物显示出约 $10 \times 10^{-6}\ \text{cm}/\text{sec}$ - 约 $50 \times 10^{-6}\ \text{cm}/\text{sec}$ 的 K_p 值, 通常为约 $20 \times 10^{-6}\ \text{cm}/\text{sec}$ - 约 $40 \times 10^{-6}\ \text{cm}/\text{sec}$ 。

试验 6: 大鼠中的药代动力学研究

在 pH 约 5 - 约 6 的 0.1 % 乳酸中制备试验化合物的水溶液制剂。用试验化合物以 $2.5\ \text{mg}/\text{kg}$ 的剂量经由静脉内给药 (IV) 或以 $5\ \text{mg}/\text{kg}$ 的剂量通过经口管饲法 (PO) 给雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (CD 品系, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) 服药。给药体积是

IV 为 1 mL/kg, PO 给药为 2 mL/kg。在给药前和给药后 2 (只有 IV)、5、15 和 30 分钟和 1、2、4、8 和 24 小时从动物采集系列血样。用液相色谱-质谱分析 (LC-MS/MS) (MDS SCIEX, API 4000, Applied Biosystems, Foster City, CA), 测定血浆中试验化合物的浓度, 检测低限为 1 ng/mL。

使用 WinNonlin (Version 4.0.1, Pharsight, Mountain View, CA), 通过非房室分析 (Model 201 用于 IV 和 Model 200 用于 PO) 评价标准药代动力学参数。试验化合物血浆浓度对时间曲线中的最大值表示为 C_{max} 。通过线性梯形法则计算从给药时到最后可测量浓度的浓度对时间曲线下面积 (AUC (0-t))。口服生物利用度 (F(%)), 即 PO 给药的 AUC (0-t) 与 IV 给药的 AUC (0-t) 的剂量标准化比例计算成:

$$F(\%) = AUC_{PO}/AUC_{IV} \times \text{剂量}_{IV}/\text{剂量}_{PO} \times 100\%$$

在该试验中参数 C_{max} 、AUC (0-t) 和 F(%) 值较大的试验化合物预期口服给药时具有较大的生物利用度。在该试验中测试的本发明化合物的 C_{max} 值通常为约 0.1 - 约 0.25 $\mu\text{g/mL}$, AUC (0-t) 值通常为约 0.4 - 约 0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ 。例如, 在大鼠模型中, 实施例 1 化合物的 C_{max} 值为 0.17 $\mu\text{g/mL}$, AUC (0-t) 值为 0.66 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$, 口服生物利用度 (F(%)) 为约 35 %。

虽然参考具体实施方案已经描述了本发明, 本领域技术人员应当理解的是, 可进行各种改变, 可替代等同方案, 而不背离本发明的精神和范围。另外, 可进行很多修改, 以使特定情况、材料、物质组成、过程、一个或多个过程步骤适应本发明的目的、精神和范围。所有这些修改都意欲包括在所附权利要求的范围之内。另外, 本文上面引用的所有出版物、专利和专利文件都全文引入本文作为参考, 就好像它们被单独引入作为参考一样。