



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101405003 B

(45) 授权公告日 2011. 05. 11

(21) 申请号 200780009507. 1

(22) 申请日 2007. 03. 16

(30) 优先权数据

60/783, 575 2006. 03. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 09. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/064182 2007. 03. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02007/109547 EN 2007. 09. 27

(73) 专利权人 吉利德帕洛阿尔托股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 曾德婉 钟鸿雁

路易斯·贝拉尔迪内利

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 章社杲 李丙林

(51) Int. Cl.

A61K 31/522 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 0242298 A1, 2002. 05. 30, 参见说明书第

9 页第 4-8 行, 第 24-31 行.

W0 0242298 A1, 2002. 05. 30, 参见说明书第
9 页第 4-8 行, 第 24-31 行.

US 20040176399 A1, 2004. 09. 09, 参见摘要,
权利要求 1, 13.

hongyang zhong. et al.. Synergy between
A2B Adenosine Receptors and Hypoxia in
Activating human lung fibroblasts. <CURRENT
OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS>. 2003, 第 4
卷 (第 4 期), p421-429, P426 第 2 栏第 2 段 -P427
第 1 栏第 1 段.

审查员 曾振文

权利要求书 1 页 说明书 45 页 附图 5 页

(54) 发明名称

利用 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂预防和治疗肝病的方法

(57) 摘要

本发明涉及利用 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂预防和
治疗肝纤维化的方法, 以及在治疗和预防由于酒
精滥用、外科手术、病毒性肝炎、肝毒性药物的摄
取或其他肝病造成的肝损伤中的应用。本发明还
涉及该方法中所用的药物组合物。

1. A_{2B} 腺苷受体拮抗剂在制备用于治疗或预防哺乳动物肝病的药物中的应用,其中,所述 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂为:

3-乙基-1-丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

其中,所述肝病是肝纤维化。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述肝病是外科手术的结果。

3. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述肝病是肝毒性治疗的结果。

4. 根据权利要求3所述的应用,其中,所述肝毒性治疗包括给予肝毒性药物。

5. 根据权利要求4所述的应用,其中,所述肝毒性药物是剂量依赖性的肝毒性药物。

6. 根据权利要求4所述的应用,其中,所述肝毒性药物选自以下药物组成的组:醋丁洛尔、醋氨酚、放线菌素 d、肾上腺皮质类固醇、阿霉素、别嘌呤醇、阿莫西林/克拉维酸钾、蛋白同化甾类、抗炎药、抗甲状腺药物、阿司匹林、阿替洛尔、硫唑嘌呤、卡托普利、卡马西平、卡比马唑、卡莫司汀、头孢菌素、氯氮卓、氯丙嗪、氯磺丙脲、西咪替丁、氯唑西林氟卡胺、环磷酰胺、环磷酰胺/环孢霉素、环孢霉素、达卡巴嗪、达那唑、丹曲林、地西泮、双氯芬酸、地尔硫卓、丙吡胺、依那普利、恩氟烷、红霉素、乙胺丁醇、乙硫异烟胺、氟西洋、氟他胺、格列本脲、金、灰黄霉素、氟哌啶醇、氟烷、胍屈嗪、布洛芬、丙咪嗪、吲哚美辛、异烟肼、酮康唑、拉贝洛尔、马普替林、巯基嘌呤、甲氨喋呤、甲基多巴、甲睾酮、美托洛尔、米安色林、丝裂霉素、萘普生、烟酸、硝苯地平、呋喃妥因、非类固醇物质、诺乙龙、口服避孕药、苯唑西林、对氨基水杨酸、青霉素、盘尼西林、青霉素类、苯乙肼、苯茚二酮、苯巴比妥、酚噻嗪类、保泰松、苯妥英、苯妥英醋竹桃霉素、比洛昔康、丙磺舒、普鲁卡因胺、丙氧芬、吡嗪酰胺、奎尼丁、奎宁、雷尼替丁、水杨酸盐、磺胺类药、舒林酸、他莫西芬、盐酸特比萘芬(疗霉舒、伊曲康唑)、睾酮、四环素类、噻苯达唑、硫代鸟嘌呤、二氧化钍、甲苯磺丁脲、三环抗抑郁药、丙戊酸、维拉帕米、长春新碱和维生素 A 及它们的组合。

7. 根据权利要求3所述的应用,其中,所述肝毒性治疗包括放射疗法。

利用 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂预防和治疗肝病的方法

[0001] 本申请要求 2006 年 3 月 17 日提交的美国临时专利申请第 60/783,575 号的优先权,其全文以引用的方式结合于此。

技术领域

[0002] 本发明涉及利用 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂预防和治疗肝病的方法。本发明发现了在治疗和预防由于酒精滥用、外科手术、病毒性肝炎、肝毒性药物的摄取或其他肝病造成的肝损伤中的效用(应用, utility)。本发明还涉及用于该方法中的药物组合物。

背景技术

[0003] 肝病具有各种各样的形式,包括但不限于,肝坏死、肝皮脂腺病、肝纤维化和肝阻塞性黄疸(cholestasis)。其他形式的肝病可能是由于服用肝毒素药物所致,例如化疗和抗癌药物、抗生素、镇痛剂、止吐剂和其他药物。而且,酒精和药物滥用也是人们熟知的肝病诱因。典型的肝病诱因包括但不限于,病毒性和酒精性肝炎、威尔逊氏病(Wilson's disease)、血色素沉积症、皮脂腺病和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

[0004] 尽管不是所有肝病都如此,但肝纤维化是许多肝病最常见的一个方面,其定义为肝中瘢痕组织(scar tissue)的形成。瘢痕的产生是由于肝为了尽力修复由于肝毒性物质(hepatotoxins)的摄取所诱导的细胞损伤、慢性肝炎的后遗症或体内损伤(physical insult)所致。肝纤维化也可以是由于外科手术和肝毒性药物治疗的结果,即肝移植或修复或化疗。在许多情况下,肝纤维化会产生肝组织的永久性瘢痕,也就是常称为肝硬化的病症(condition)。

[0005] 近来的研究已经揭示了,腺苷在肝纤维化的产生和发展中起重要作用。Chunn 等(2006)Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol, 290(3):L579-87,检测到在腺苷脱氨酶缺乏(ADA)小鼠中肝纤维化的增加。Chunn 等使用的小鼠经过遗传工程培养而具有部分 ADA 酶活性,且由此累积了延长的一段时期的腺苷。

[0006] 腺苷是天然存在的核苷,其通过与已知为 A₁、A_{2A}、A_{2B} 和 A₃ 的腺苷受体家族相互作用而发挥其生物学作用,所有的这几种腺苷受体都调节重要的生理过程。在各种受体之中,已经证实 A_{2B} 腺苷受体调节血管生成因子和炎性细胞因子以及趋化因子的合成和释放,人们相信 A_{2B} 腺苷受体通过与肥大细胞激活、血管舒张和细胞生长的调节的关联而显著地参与到炎性状态中(参见 Adenosine A_{2B} Receptors as Therapeutic Targets, Drug Dev Res 45:198; Feoktistov et al., Trends Pharmacol Sci 19:148-153)。

[0007] 令人惊讶的是,现在人们已经发现 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂也可用于预防和治疗肝病。因此,人们期望提供一种通过给予有效的、完全或部分选择性 A_{2B} 拮抗剂化合物,即抑制 A_{2B} 腺苷受体的化合物来治疗和/或预防肝病的方法。

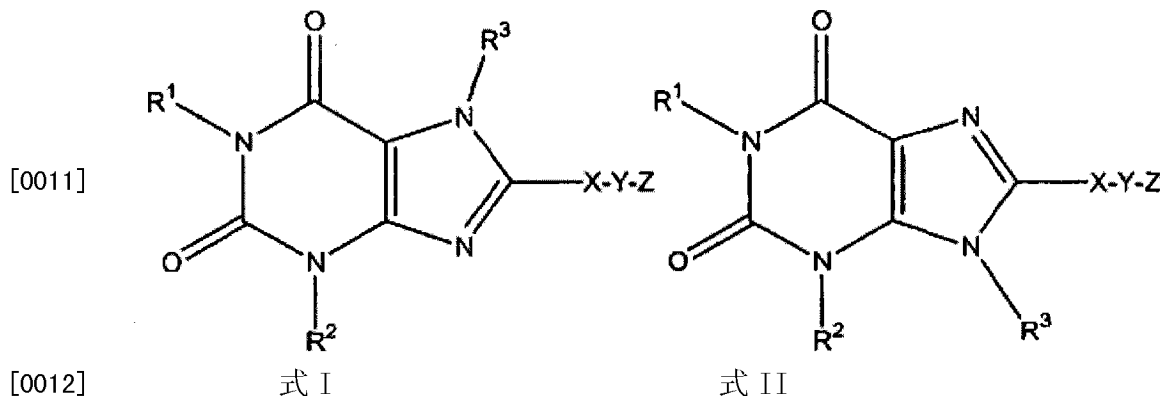
发明内容

[0008] 在本发明的一种实施方式中,提供了一种通过向对其有需要的哺乳动物给予治疗

有效量的 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂来治疗和预防肝病的方法。肝病可以具有的形式是肝坏死、肝纤维化、肝阻塞性黄疸（胆汁淤滞）、肝硬化、肝病毒性和酒精性肝炎、威尔逊氏病、血色素沉积症、皮脂腺病和非酒精性脂肪性肝炎（NASH），或者肝病可以是外科手术或使用肝毒性试剂的药物疗法的结果，即肝移植或修复或化疗。

[0009] 在本发明的第二种实施方式中，提供了一种通过向正在接受化学治疗或放射性治疗的哺乳动物给予治疗有效量的 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂来降低化学治疗或放射性治疗的肝毒素副作用的方法。

[0010] 在本发明的另一种实施方式中，提供了一种向需要其的哺乳动物给予治疗有效量的具有式 I 或式 II 结构的 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂来治疗和预防肝病的方法：



[0012] 其中：

[0014] R^1 和 R^2 独立地选自氢、可选取代的烷基，或基团 $-D-E$ ，其中 D 是共价键或亚烷基 (alkylene)，而 E 是可选取代烷氧基、可选取代的环烷基、可选取代的芳基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的烯基或可选取代的炔基，条件是当 D 是共价键时 E 不是烷氧基；

[0015] R^3 是氢、可选取代的烷基或可选取代的环烷基；

[0016] X 是可选取代的亚芳基或可选取代的杂亚芳基 (heteroarylene)；

[0017] Y 是共价键或亚烷基，其中一个碳原子能够可选地被 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NH-$ 替代并可选地被羟基、烷氧基、可选取代的氨基或 $-COR$ 取代，其中 R 是羟基、烷氧基或氨基；并且

[0018] Z 是可选取代的单环芳基或可选取代的单环杂芳基；或者

[0019] 当 X 是可选取代的亚芳基且 Y 是共价键时，则 Z 是氢。

[0020] 在本发明的另一实施方式中，提供了一种药物制剂，其含有治疗有效量的 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂，以及至少一种药用载体。该制剂优选口服给药。

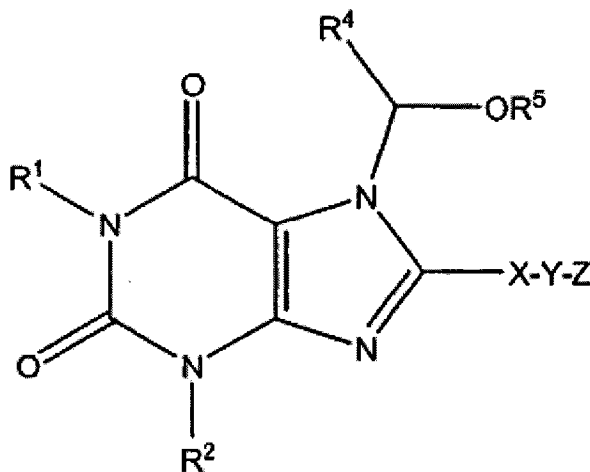
[0021] 一组优选的式 I 和 II 的化合物是那些化合物，即其中 R^1 和 R^2 独立地是氢、可选取代的低级烷基或基团 $-D-E$ ，其中 D 是共价键或亚烷基，而 E 是可选取代的苯基、可选取代的环烷基、可选取代的烯基，或者可选取代的炔基，尤其是其中 R^3 是氢。

[0022] 在这个组中，第一类优选的化合物包括那些化合物，即其中 R^1 和 R^2 独立地是被环烷基可选取代的低级烷基（优选正丙基），并且 X 是可选取代的亚苯基。在该类化合物中，优选的一子类化合物是那些化合物，即其中 Y 是亚烷基，包括其中碳原子被氧取代，优选被 $-O-CH_2-$ 所代替，尤其是其中的氧是连接亚苯基的连接点的亚烷基。在该子类中，优选 Z 是可选取代的噁二唑，尤其是可选取代的 [1,2,4]-噁二唑-3-基，特别是被可选取代的苯基或可选取代的吡啶基所取代的 [1,2,4]-噁二唑-3-基。

[0023] 第二类优选的化合物包括其中 X 是可取代的 1,4- 亚吡唑基 (1,4-pyrazolene) 的那些化合物。在这类中, 优选的一子类化合物是那些化合物, 即其中 Y 是共价键或亚烷基, 尤其是低级亚烷基, 而 Z 是氢、可取代的苯基、可取代的吡啶基, 或者可取代的噁二唑。在该子类中, 一种优选的实施方式包括其中 R^1 是被环烷基可取代的低级烷基而 R^2 是氢的化合物。一种更优选的实施方式包括那些化合物, 即其中 Y 是 $-(CH_2)-$ 或 $-CH(CH_3)-$ 而 Z 是可取代的苯基, 或者 Y 是 $-(CH_2)-$ 或 $-CH(CH_3)-$ 而 Z 是可取代的噁二唑, 尤其是 3,5-[1,2,4]- 噁二唑, 或者 Y 是 $-(CH_2)-$ 或 $-CH(CH_3)-$ 而 Z 是可取代的吡啶基。在该子类中, 其中 R^1 和 R^2 独立地是被环烷基可取代的低级烷基, 尤其是正丙基的那些化合物也是优选的。更优选的是那些化合物, 即其中 Y 是共价键、 $-(CH_2)-$ 或 $-CH(CH_3)-$ 而 Z 是氢、可取代的苯基, 或者可取代的吡啶基, 尤其是其中 Y 是共价键而 Z 是氢的那些化合物。

[0024] 另一优选的子类化合物是其中 R^3 为式 $-CHR^4OR^5$ 的取代烷基的那些化合物, 从而该化合物具有式 III 的结构:

[0025]



[0026] 其中:

[0027] R^4 是氢或甲基; 并且

[0028] R^5 是 $-C(O)R$, 其中 R 是独立地可取代的低级烷基、可取代的芳基, 或可取代的杂芳基; 或者

[0029] R^5 是 $-P(O)(OR^6)_2$, 其中 R^6 是氢或被苯基或杂芳基可取代的低级烷基;

[0030] 及其药用盐。

[0031] 目前, 用于本发明的优选化合物包括, 但不限于:

[0032] 1-丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基)苯基]-甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0033] 1-丙基-8-[1-苄基吡唑-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0034] 1-丁基-8-(1-{[3-氟苯基]-甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0035] 1-丙基-8-[1-(苯基乙基)吡唑-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0036] 8-(1-{[5-(4-氯苯基)(1,2,4-噁二唑-3-基)]-甲基}吡唑-4-基)-1-丙基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0037] 8-(1-{[5-(4-氯苯基)(1,2,4-噁二唑-3-基)]-甲基}吡唑-4-基)-1-丁基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

- [0038] 1,3-二丙基-8-吡啶-4-基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0039] 1-甲基-3-仲丁基-8-吡啶-4-基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0040] 1-环丙基甲基-3-甲基-8-{1-[(3-三氟甲基苯基)甲基]吡啶-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0041] 1,3-二甲基-8-{1-[(3-氟苯基)甲基]吡啶-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0042] 3-甲基-1-丙基-8-{1-[(3-三氟甲基苯基)甲基]吡啶-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0043] 3-乙基-1-丙基-8-{1-[(3-三氟甲基苯基)甲基]吡啶-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0044] 1,3-二丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡啶-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0045] 1,3-二丙基-8-{1-[(3-氟苯基)甲基]吡啶-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0046] 1-乙基-3-甲基-8-{1-[(3-氟苯基)甲基]吡啶-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0047] 1,3-二丙基-8-{1-[(2-甲氧基苯基)甲基]吡啶-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0048] 1,3-二丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基)-苯基]乙基}-吡啶-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0049] 1,3-二丙基-8-{1-[(4-羧基苯基)甲基]吡啶-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0050] 2-[4-(2,6-二氧代-1,3-二丙基(1,3,7-三氢嘌呤-8-基))吡啶基]-2-苯乙酸；
- [0051] 8-{4-[5-(2-甲氧基苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基甲氧基]苯基}-1,3-二丙基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0052] 8-{4-[5-(3-甲氧基苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基甲氧基]苯基}-1,3-二丙基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0053] 8-{4-[5-(4-氟苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基甲氧基]苯基}-1,3-二丙基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0054] 1-(环丙基甲基)-8-[1-(2-吡啶基甲基)吡啶-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0055] 1-正丁基-8-[1-(6-三氟甲基吡啶-3-基甲基)吡啶-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0056] 8-(1-{[3-(4-氯苯基)(1,2,4-噁二唑-5-基)]甲基}吡啶-4-基)-1,3-二丙基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0057] 1,3-二丙基-8-[1-({5-[4-(三氟甲基)苯基]异噁唑-3-基}甲基)吡啶-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；
- [0058] 1,3-二丙基-8-[1-(2-吡啶基甲基)吡啶-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮；

- [0059] 3-{[4-(2,6-二氧代-1,3-二丙基-1,3,7-三氢嘌呤-8-基)吡唑基]甲基}苯甲酸;
- [0060] 1,3-二丙基-8-(1-{[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;
- [0061] 1,3-二丙基-8-{1-[3-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)苯基]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;
- [0062] 6-{[4-(2,6-二氧代-1,3-二丙基-1,3,7-三氢嘌呤-8-基)吡唑基]甲基}吡啶-2-羧酸;
- [0063] 3-乙基-1-丙基-8-[1-(2-吡啶基甲基)吡唑-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;
- [0064] 8-(1-{[5-(4-氯苯基)异噁唑-3-基]甲基}吡唑-4-基)-3-乙基-1-丙基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;
- [0065] 8-(1-{[3-(4-氯苯基)(1,2,4-噁二唑-5-基)]甲基}吡唑-4-基)-3-乙基-1-丙基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;
- [0066] 3-乙基-1-丙基-8-(1-{[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;
- [0067] 1-(环丙基甲基)-3-乙基-8-(1-{[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;
- [0068] 3-乙基-1-(2-甲基丙基)-8-(1-{[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;
- [0069] [3-乙基-2,6-二氧代-1-丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-7-基]甲基乙酸酯;
- [0070] [3-乙基-2,6-二氧代-1-丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-7-基]甲基-2,2-二甲基丙酸酯(dimethylpropanoate);
- [0071] [3-乙基-2,6-二氧代-1-丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-7-基]甲基丁酸酯;和
- [0072] [3-乙基-2,6-二氧代-1-丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}-吡唑-4-基)(1,3,7-三氢嘌呤-7-基)]甲基二氢磷酸酯。

附图说明

[0073] 图1图示说明了HHSCs中AdoR亚类的mRNA水平。从HHSCs中分离出来的总RNA进行了实时RT-PCR分析。AdoR转录本的相对水平是以 β -肌动蛋白转录本的百分数表示的。所示数据为平均 $\pm$ SEM($n=4$)。nd表示未检出。

[0074] 图2示出了AdoR激动剂和拮抗剂对HHSCs中的细胞cAMP累积的影响。(A)不存在(方块)或存在(三角) A_{2B} 受体拮抗剂8-(1-{[5-(4-氯苯基)(1,2,4-噁二唑-3-基)]甲基}吡唑-4-基)-1-丙基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮(化合物(1))(1 μ M)的情况下,CGS-21680(CGS,圆圈)以及NECA的浓度-响应曲线。(B)CPA(1 μ M)和IB-MECA(IM,1 μ M)缺乏对福司柯林(Fsk,10 μ M)诱导的细胞cAMP累积的影响。所示数据为平均 $\pm$ SEM(在A中 $n=4$,而在B中 $n=5$)。

[0075] 图3图示出了腺苷(A)和NECA(B)对通过HHSCs的IL-6释放上的影响。化合物(1)存在或不存在下,用赋形剂(vehicle)、腺苷和NECA处理细胞24h。收集来自所处理细胞的培养基,采用ELISA测定IL-6的浓度。所示数据是平均 $\pm$ SEM($n=3$)。*: $p<0.05$,同对照相比;#: $p<0.05$,与B中的NECA($10\mu\text{M}$)-处理的细胞对比。

[0076] 图4示出了采用实时RT-PCR测定的NECA对 α -平滑肌肌动蛋白(A)和 α -1前胶原(B)mRNA水平上的影响。用NECA($10\mu\text{M}$)培养HHSCs1h。用赋形剂培养的细胞作为对照。将靶mRNA的表达水平标准化成 β -肌动蛋白的表达水平。所示数据是平均 $\pm$ SEM(在A中 $n=4$ 而在B中 $n=5$)。*: $p<0.05$,与对照相比较。

[0077] 图5示出了NECA对通过HHSCs的胶原产生上的影响。在存在或不存在化合物(1)或抗-IL-6抗体的情况下,将细胞用赋形剂、NECA处理24h。收集来自所处理细胞的培养基,采用Sircol胶原分析测定胶原的浓度。所示数据是平均 $\pm$ SEM($n=4-6$)。*: $p<0.05$,同对照相比;#: $p<0.05$,与NECA($10\mu\text{M}$)-处理的细胞对比。

[0078] 图6示出了在ADA^{-/-}小鼠中A_{2B}受体拮抗剂对血浆AST水平的影响。将小鼠血浆收集于EDTA中,采用Infinity™ AST分析测定AST活性。所示数据是平均 $\pm$ SEM($n=6-8$)。*: $p<0.05$,与用赋形剂(ADA+V)处理的ADA⁺对比;#: $p<0.05$,与用赋形剂(ADA^{-/-}-V)处理的ADA^{-/-}小鼠对比。

具体实施方式

[0079] 定义和一般参数

[0080] 正如本说明书中所使用的,以下单词和短语一般倾向于具有如以下所提出的意义,除了在上下文中另外指出所用的其他意义。

[0081] 术语“烷基”是指含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个碳原子的支化或未支化饱和烃链单自由基(monoradical)。用以下的基团来举例说明该术语:例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正己基、正癸基、十四烷基等。

[0082] 术语“取代的烷基”是指:

[0083] 1) 具有1、2、3、4或5个取代基,优选1至3个取代基的以上定义的烷基,这些取代基选自以下基团组成的组:烯基、炔基、烷氧基、环烷基、环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、氨羰基、烷氧基羰基氨基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫代羰基、羧基、羧基烷基、硫代芳基、硫代杂芳基、硫代杂环基、巯基、硫代烷基、芳基、芳氧基、杂芳基、氨基磺酰基、氨基羰基氨基、杂芳氧基、杂环基、杂环烷氧基(heterocyclooxy)、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO₂-烷基、SO₂-芳基和-SO₂-杂芳基。除非另外通过定义限定,所有的取代基都可以可选地进一步被选自烷基、羧基、羧基烷基、氨羰基、羟基、烷氧基、卤素、CF₃、氨基、取代的氨基、氰基和-S(O)_nR,其中R是烷基、芳基或杂芳基,并且n是0、1或2的1、2或3个取代基所取代;或者

[0084] 2) 被独立地选自于氧、硫和NR_a-的1至10个原子中断的如上定义的烷基,其中R_a选自氢、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基和杂环基(heterocyclyl)。所有取代基进一步可选地被烷基、烷氧基、卤素、CF₃、氨基、取代的氨基、氰基,或-S(O)_nR取代,其中R为烷基、芳基和杂芳基,而n为0、1或2的如上所定义的烷基;或者

[0085] 3) 具有以上定义的1、2、3、4或5个取代基,且被如上所定义的1~10个原子中断的如上定义的烷基。

[0086] 术语“低级烷基”是指具有1、2、3、4、5或6个碳原子的支化或未支化的饱和烃链单自由基。通过以下基团来举例说明该术语:例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正己基等。

[0087] 术语“取代的低级烷基”是指具有1至5个取代基,优选具有如上定义的1、2或3个取代基的低级烷基,如对取代烷基的定义,或者被用于取代烷基的如上定义的1、2、3、4或5个原子中断的如上定义的低级烷基,或同时具有如上定义的1、2、3、4或5个取代基并且被如上所定义的1、2、3、4或5个原子中断的如上定义的低级烷基。

[0088] 术语“亚烃基”是指具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个碳原子,优选1~10个碳原子,更优选1、2、3、4、5或6个碳原子的支化或未支化饱和烃链的双自由基。通过以下基团来举例说明该术语:例如亚甲基($-\text{CH}_2-$)、亚乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、亚丙基异构体(如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$)等。

[0089] 术语“低级亚烃基”是指优选具有1、2、3、4、5或6个碳原子的支化或未支化饱和烃链的双自由基。

[0090] 术语“低级亚烃基”是指优选具有1、2、3、4、5或6个碳原子的支化或未支化饱和烃链的双自由基。

[0091] 术语“取代的亚烃基”是指:

[0092] (1) 具有1、2、3、4或5个取代基的如上所定义的亚烃基基团,所述取代基选自以下基团:烷基、烯基、炔基、烷氧基、环烷基、环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、氨羰基、烷氧基羰基、氨基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫代羰基、羧基、羧基烷基、硫代芳基、硫代杂芳基、硫代杂环基、巯基、硫代烷基、芳基、芳氧基、杂芳基、氨基磺酰基、氨基羰基氨基、杂芳氧基、杂环基、杂环烷氧基、羟基氨基、烷氧基氨基(alkoxyamino)、硝基、 $-\text{SO}-$ 烷基、 $-\text{SO}-$ 芳基、 $-\text{SO}-$ 杂芳基、 $-\text{SO}_2-$ 烷基、 SO_2- 芳基和 $-\text{SO}_2-$ 杂芳基。除非另外通过定义限定,所有的取代基可以可选地进一步被1、2或3个选自以下基团的取代基所取代:烷基、羧基、羧基烷基(carboxyalkyl)、氨羰基、羟基、烷氧基、卤素、 CF_3 、氨基、取代的氨基、氰基,以及 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$,其中R是烷基、芳基或杂芳基,而n为0、1或2;或者

[0093] (2) 被独立地选自氧、硫和 NR_a- 的1~20个原子中断的如上定义亚烃基,其中 R_a 选自氢、可选取代的烷基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基和杂环基,或选自羰基、羧酸酯基(carboxyester)、甲酰胺(carboxyamide)和磺酰基;或者

[0094] (3) 既具有1、2、3、4或5个如上定义的取代基又被1-20个如上定义的原子所中断的如上定义的亚烃基。取代亚烃基的实例有氯亚甲基($-\text{CH}(\text{Cl})-$)、氨基亚乙基($-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2-$)、甲氨基亚乙基($-\text{CH}(\text{NHMe})\text{CH}_2-$)、2-羧基亚丙基异构体($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2-$)、乙氧基乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、乙基甲氨基乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、1-乙氧基-2-(2-乙氧基-乙氧基)乙烷($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$)等。

[0095] 术语“芳烷基”是指共价键键连至亚烃基基团的芳基,其中芳基和亚烃基如本文所定义的。“可选取代的芳烷基”是指共价键键连至可选取代的亚烃基基团的可选取代的芳基。这种芳烷基的实例为苄基、苯乙基、3-(4-甲氧基苯基)丙基等。

[0096] 术语“烷氧基”是指基团 $\text{R}-\text{O}-$,其中R是可选取代的烷基或可选取代的环烷基,或

R 是基团 $-Y-Z$, 其中 Y 是可选取代的亚烃基, 而 Z 是可选取代的烯基、可选取代的炔基; 或可选取代的环烯基, 其中烷基、烯基、炔基、环烷基和环烯基如本文所定义的。优选的烷氧基是可选取代的烷基 $-O-$, 并以举例的方式包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基、正己氧基、1,2-二甲基丁氧基、三氟甲氧基等。

[0097] 术语“烷硫基”是指基团 $R-S-$, 其中 R 如对烷氧基的定义。

[0098] 术语“烯基”是指优选具有 2 至 20 个碳原子, 更优选具有 2 至 10 个碳原子, 更加优选具有 2 至 6 个碳原子且具有 1~6 个, 优选具有 1 个双键 (乙烯基) 的支化或未支化不饱和烃基的单自由基。优选的烯基包括乙烯基 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、1-丙烯基或烯丙基 ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、异丙烯基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$)、二环 [2.2.1] 庚烯基等。在烯基连接到氮的情况, 双键不能是在氮的 α 位。

[0099] 术语“低级烯基”是指如上定义具有 2 至 6 个碳原子的烯基。

[0100] 术语“取代的烯基”是指具有 1、2、3、4 或 5 个, 优选具有 1、2 或 3 个取代基的如上定义的烯基, 所述取代基选自以下基团: 烷基、烯基、炔基、烷氧基、环烷基、环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、氨羰基、烷氧基羰基氨基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫代羰基、羧基、羧基烷基、硫代芳基、硫代杂芳基、硫代杂环基、巯基、硫代烷基、芳基、芳氧基、杂芳基、氨基磺酰基、氨基羰基氨基、杂芳氧基、杂环基、杂环烷氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、 $-\text{SO}-$ 烷基、 $-\text{SO}-$ 芳基、 $-\text{SO}-$ 杂芳基、 $-\text{SO}_2-$ 烷基、 SO_2- 芳基和 $-\text{SO}_2-$ 杂芳基。除非通过另外定义限定, 所有取代基可以可选地被 1、2 或 3 个选自以下基团的取代基进一步取代: 烷基、羧基、羧基烷基、氨羰基、羟基、烷氧基、卤素、 CF_3 、氨基、取代的氨基、氰基和 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$, 其中 R 是烷基、芳基, 或杂芳基, 而 n 为 0、1 或 2。

[0101] 术语“炔基”是指优选具有 2 至 20 个碳原子, 更优选具有 2 至 10 个碳原子, 更加优选具有 2 至 6 个碳原子且具有至少 1 个并且优选来自 1-6 个碳位置中的乙炔 (三键) 不饱和度 (unsaturation) 的不饱和烃的单自由基。优选的炔基包括乙炔基 ($-\text{C}\equiv\text{CH}$)、丙-2-炔基 (或丙-1-炔-3-基, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) 等。如果炔基连接到氮, 则三键不能在氮的 α 位。

[0102] 术语“取代的炔基”是指具有 1、2、3、4 或 5 个, 优选 1、2 或 3 个取代基的如上定义的炔基, 所述取代基选自以下基团: 烷基、烯基、炔基、烷氧基、环烷基、环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、氨羰基、烷氧基羰基氨基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫代羰基、羧基、羧基烷基、硫代芳基、硫代杂芳基、硫代杂环基、巯基、硫代烷基、芳基、芳氧基、杂芳基、氨基磺酰基、氨基羰基氨基、杂芳氧基、杂环基、杂环烷氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、 $-\text{SO}-$ 烷基、 $-\text{SO}-$ 芳基、 $\text{SO}-$ 杂芳基、 $-\text{SO}_2-$ 烷基、 SO_2- 芳基和 $-\text{SO}_2-$ 杂芳基。除非通过另外定义限定, 所有取代基可以可选地被 1、2 或 3 个选自以下基团的取代基进一步取代: 烷基、羧基、羧基烷基、氨羰基、羟基、烷氧基、卤素、 CF_3 、氨基、取代的氨基、氰基, 和 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$, 其中 R 是烷基、芳基、或杂芳基, 而 n 为 0、1 或 2。

[0103] 术语“氨羰基”是指基团 $-\text{C}(\text{O})\text{NRR}$, 其中每一个 R 独立地是氢、烷基、芳基、杂芳基、杂环或其中两个 R 基团连接到一起形成杂环基团 (例如, 吗啉代)。除非通过另外定义限定, 所有取代基可以可选地被 1-3 个选自以下基团的取代基进一步取代: 烷基、羧基、羧基烷基、氨羰基、羟基、烷氧基、卤素、 CF_3 、氨基、取代的氨基、氰基和 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$, 其中 R 为烷基、芳基或杂芳基, 而 n 为 0、1 或 2。

[0104] 术语“酰氨基”是指基团 $-\text{NRC}(\text{O})\text{R}$, 其中每个 R 独立地是氢、烷基、芳基、杂芳基或

杂环基。除非通过另外定义限定,所有取代基可以可选地被 1-3 个选自以下基团的取代基进一步取代:烷基、羧基、羧基烷基、氨基羰基、羟基、烷氧基、卤素、 CF_3 、氨基、取代的氨基、氰基和 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$,其中 R 为烷基、芳基或杂芳基,而 n 为 0、1 或 2。

[0105] 术语“酰氧基”是指基团 $-\text{O}(\text{O})\text{C}-$ 烷基、 $-\text{O}(\text{O})\text{C}-$ 环烷基、 $-\text{O}(\text{O})\text{C}-$ 芳基、 $-\text{O}(\text{O})\text{C}-$ 杂芳基和 $-\text{O}(\text{O})\text{C}-$ 杂环基。除非通过另外定义限定,所有取代基可以可选地被以下取代基进一步取代:烷基、羧基、羧基烷基、氨基羰基、羟基、烷氧基、卤素、 CF_3 、氨基、取代的氨基、氰基和 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$,其中 R 为烷基、芳基或杂芳基,而 n 为 0、1 或 2。

[0106] 术语“芳基”是指具有单环(例如苯基)或多环(例如联苯基),或多个稠(稠合)环(例如萘基或蒽基)的 6 至 20 个碳原子的芳香碳环基团(carbocyclic group)。优选的芳基包括苯基、萘基等。

[0107] 术语“亚芳基”是指如上定义芳基的双自由基。通过以下基团举例说明该术语:例如 1,4-亚苯基、1,3-亚苯基、1,2-亚苯基、1,4'-亚联苯基(biphenylene)等。

[0108] 除非通过对芳基或亚芳基取代基的定义另外进行限定,这种芳基或亚芳基能够可选地用 1 至 5 个,优选 1 至 3 个选自以下基团的取代基进一步取代:烷基、烯基、炔基、烷氧基、环烷基、环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、氨基羰基、烷氧基羰基氨基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫代羰基、羧基、羧基烷基、硫代芳基、硫代杂芳基、硫代杂环基、巯基、硫代烷基、芳基、芳氧基、杂芳基、氨基磺酰基、氨基羰基氨基、杂芳氧基、杂环基、杂环烷氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、 $-\text{SO}-$ 烷基、 $-\text{SO}-$ 芳基、 $-\text{SO}-$ 杂芳基、 $-\text{SO}_2-$ 烷基、 SO_2- 芳基和 $-\text{SO}_2-$ 杂芳基。除非通过另外定义限定,所有取代基可以可选地被 1 至 3 个以下取代基进一步取代:烷基、羧基、羧基烷基、氨基羰基、羟基、烷氧基、卤素、 CF_3 、氨基、取代的氨基、氰基和 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$,其中 R 为烷基、芳基或杂芳基,而 n 为 0、1 或 2。

[0109] 术语“芳氧基”是指基团芳基 $-\text{O}-$,其中芳基是如上定义的,并包括如上定义的可选取代的芳基。术语“硫代芳基”是指基团 $\text{R}-\text{S}-$,其中 R 如所定义的芳基。

[0110] 术语“氨基”是指基团 $-\text{NH}_2$ 。

[0111] 术语“取代的氨基”是指基团 $-\text{NRR}$,其中 R 独立地选自以下基团组成的组:氢、烷基、环烷基、羧基烷基(例如,苄氧基羰基)、芳基、杂芳基和杂环基,条件是两个 R 基团都不是氢或基团 $-\text{Y}-\text{Z}$,其中 Y 为可选取代的亚烷基,而 Z 为烯基、环烯基或炔基。除非通过另外定义限定,所有取代基可以可选地被 1-3 个以下取代基进一步可选取代:烷基、羧基、羧基烷基、氨基羰基、羟基、烷氧基、卤素、 CF_3 、氨基、取代的氨基、氰基和 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$,其中 R 为烷基、芳基或杂芳基,而 n 为 0、1 或 2。

[0112] 术语“羧基烷基”是指基团 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 烷基或 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 环烷基,其中烷基和环烷基如本文中所定义的,可以可选地被以下取代基进一步取代:烷基、烯基、炔基、烷氧基、卤素、 CF_3 、氨基、取代的氨基、氰基或 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$,其中 R 是烷基、芳基或杂芳基,而 n 为 0、1 或 2。

[0113] 术语“环烷基”是指具有单环或多个稠环的 3 至 20 碳原子的碳环基团。这种环烷基包括,例如,单环结构如环丙基、环丁基、环戊基、环辛基等,或多环结构如金刚烷基、二环[2.2.1]庚烷、1,3,3-三甲基二环[2.2.1]庚-2-基、(2,3,3-三甲基二环[2.2.1]庚-2-基),或与芳基(例如茚满)稠合的碳环基团等。

[0114] 术语“取代的环烷基”是指具有 1、2、3、4 或 5 个,优选具有 1、2 或 3 个取代基的环烷基,所述取代基选自以下基团:烷基、烯基、炔基、烷氧基、环烷基、环烯基、酰基、酰氨基、

酰氧基、氨基、氨羰基、烷氧基羰基氨基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫代羰基、羧基、羧基烷基、硫代芳基、硫代杂芳基、硫代杂环、巯基、硫代烷基、芳基、芳氧基、杂芳基、氨基磺酰基、氨基羰基氨基、杂芳氧基、杂环基、杂环烷氧基、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO- 烷基、-SO- 芳基、-SO- 杂芳基、-SO₂- 烷基、SO₂- 芳基和 -SO₂- 杂芳基。除非通过另外定义限定,所有取代基可以可选地被 1、2 或 3 个以下取代基进一步取代:烷基、羧基、羧基烷基、氨羰基、羟基、烷氧基、卤素、CF₃、氨基、取代的氨基、氰基和 -S(O)_nR,其中 R 为烷基、芳基或杂芳基,而 n 为 0、1 或 2。

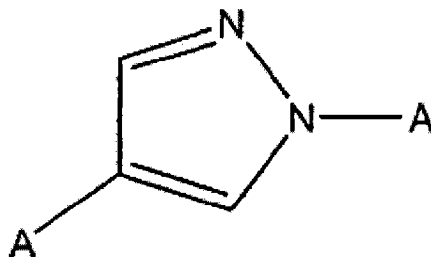
[0115] 术语“卤素”或“卤代”是指氟、溴、氯和碘。

[0116] 术语“酰基”是指基团 -C(O)R,其中 R 是氢,可选取代的烷基,可选取代的环烷基、可选取代的杂环基、可选取代的芳基和可选取代的杂芳基。

[0117] 术语“杂芳基”是指衍生自具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或 15 个碳原子且在至少一个环中具有 1、2、3 或 4 个选自氧、氮和硫的杂原子的芳香碳环基团的基团。这种杂芳基可具有一个单环(例如吡啶基或呋喃基)或多个稠环(例如,氮茛基,苯并噻唑基或苯并噻吩基(benzothieryl))。杂芳基的实例包括但不限于 [1,2,4] 噁二唑、[1,3,4] 噁二唑、[1,2,4] 噻二唑、[1,3,4] 噻二唑、吡咯、咪唑、吡唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、吲哚(indolizine)、异吲哚、吲哚、吲唑、嘌呤、喹啉、异喹啉、喹啉、酞嗪、萘基吡啶、喹啉、喹唑啉、噌啉、蝶啶、呋唑、呋啉、菲啶、吡啶、菲咯啉、异噻唑、吩嗪、异噻唑、吩噻唑、吩噻嗪、咪唑啉(imidazolidine)、咪唑啉等以及含杂芳基化合物的氮的 N-氧化物和 N-烷氧化物衍生物,例如吡啶-N-氧化物衍生物。

[0118] 术语“杂亚芳基”是指如上定义的杂芳基的双自由基。该术语的典型实例有例如 2,5-亚咪唑、3,5-[1,2,4] 亚噁二唑、2,4-亚噁唑、1,4-亚吡唑基等。例如,1,4-亚吡唑基为:

[0119]



[0120] 其中 A 表示连接点。

[0121] 除非通过对杂芳基或杂亚芳基取代物的定义进行另外限定,这种杂芳基或杂亚芳基能够可选地用 1 至 5 个取代基,优选 1 至 3 个取代基取代,所述取代物选自以下基团:烷基、烯基、炔基、烷氧基、环烷基、环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、氨羰基、烷氧基羰基氨基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫代羰基、羧基、羧基烷基、硫代芳基、硫代杂芳基、硫代杂环基、巯基、硫代烷基、芳基、芳氧基、杂芳基、氨基磺酰基、氨基羰基氨基、杂芳氧基、杂环基、杂环烷氧基、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO- 烷基、-SO- 芳基、-SO- 杂芳基、-SO₂- 烷基、SO₂- 芳基和 -SO₂- 杂芳基。除非通过另外定义限定,所有取代基可以可选地被 1~3 个以下取代基进一步取代:烷基、羧基、羧基烷基、氨羰基、羟基、烷氧基、卤素、CF₃、氨基、取代的氨基、氰基和 -S(O)_nR,其中 R 为烷基、芳基或杂芳基,而 n 为 0、1 或 2。

[0122] 术语“杂芳烷基”是指共价键结合至亚烃基的杂芳基,其中杂芳基和亚烃基是本文

所定义的。“可选取代的杂芳烷基”是指共价键结合至可选取代的亚烷基的可选取代的杂芳基。这种杂芳烷基的实例为例如 3-吡啶基甲基、喹啉-8-基乙基、4-甲氧基噻唑-2-基丙基等。

[0123] 术语“杂芳氧基”是指基团杂芳基-O-。

[0124] 术语“杂环基”是指具有 1 至 40 个碳原子且环中具有 1 至 10 个,优选 1、2、3 或 4 个选自氮、硫、磷和 / 或氧的杂原子的单环或多个稠环的饱和或部分不饱和基团的单自由基。杂环基团可具有单环或多个稠环,并包括四氢呋喃、吗啉基、哌啶、哌嗪、二氢吡啶等。

[0125] 除非通过对杂环取代基另外定义限定,这种杂环基能够可选地用 1、2、3、4 或 5 个,优选 1、2 或 3 个取代基取代,所述取代基选自以下基团:烷基、烯基、炔基、烷氧基、环烷基、环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、氨羰基、烷氧基羰基氨基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫代羰基、羧基、羧基烷基、硫代芳基、硫代杂芳基、硫代杂环基、巯基、硫代烷基、芳基、芳氧基、杂芳基、氨基磺酰基、氨基羰基氨基、杂芳氧基、杂环基、杂环烷氧基、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO₂-烷基、SO₂-芳基和 -SO₂-杂芳基。除非通过另外定义限定,所有取代基可以可选地被 1 ~ 3 个以下取代基进一步取代:烷基、羧基、羧基烷基、氨羰基、羟基、烷氧基、卤素、CF₃、氨基、取代的氨基、氰基和 -S(O)_nR,其中 R 为烷基、芳基或杂芳基,而 n 为 0、1 或 2。

[0126] 术语“硫醇”是指基团 -SH。

[0127] 术语“取代的硫代烷基”是指基团 -S- 取代的烷基。

[0128] 术语“硫代杂芳基”是指基团 -S- 杂芳基,其中杂芳基如上定义包括也如上定义的可选取代的杂芳基。

[0129] 术语“亚砷”是指基团 -S(O)R,其中 R 是烷基、芳基或杂芳基。“取代的亚砷”是指基团 -S(O)R,其中 R 是如本文所定义的取代的烷基、取代的芳基或取代的杂芳基。

[0130] 术语“砷”是指基团 -S(O)₂R,其中 R 是烷基、芳基或杂芳基。“取代的砷”是指基团 -S(O)₂R,其中 R 是如本文所定义的取代的烷基、取代的芳基或取代的杂芳基。

[0131] 术语“酮基”是指基团 -C(O)-。

[0132] 术语“硫代羰基”是指基团 -C(S)-。

[0133] 术语“羧基”是指基团 -C(O)-OH。

[0134] “可选的”或“可选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或可以不发生,以及描述内容包括所述事件或情况发生和其不发生的例子。

[0135] 术语“式 I 和式 II 的化合物”倾向于涵盖本发明公开的化合物,以及这些化合物的药用盐、药用酯、前药、水合物和多晶型物 (polymorph)。另外,本发明的化合物可以具有一个或多个不对称中心,可以被制备为消旋混合物或作为单个对映异构体或非对映异构体。在式 I 所给出的任意化合物中存在的立体异构体数目取决于其存在的不对称中心数目 (如果具有 n 个不对称中心,就有 2n 个可能的立体异构体)。单个立体异构体可以通过在某些合适的合成阶段解析中间体化合物的消旋或非消旋混合物或通过传统的方式解析式 I 的化合物而获得。单个立体异构体 (包括单个对映异构体和非对映异构体) 以及立体异构体的消旋和非消旋混合物都包括在本发明的范围之内,其中所有的都倾向于通过本说明书的结构物 (structures) 而被描述,除非另外明确指出。

[0136] “异构体”是具有相同分子式的不同化合物。

[0137] “立体异构体”是仅在原子的空间排列方式上不同的异构体。

[0138] “对映异构体”是彼此为不可重叠的镜像的一对立体异构体。一对对映异构体的 1 : 1 的混合物就是“外消旋”混合物。术语“(±)”用于表示其中合适的外消旋混合物。

[0139] “非对映异构体”是具有至少两个不对称原子但彼此不为镜像的立体异构体。

[0140] 绝对立体化学是根据 Cahn-Ingold-Prelog R-S 系统来详细说明的。当化合物是纯对映异构体时,每一个手性碳原子的立体化学可以被指定为 R 或 S。绝对构型未知的解析出来的化合物根据其在钠 D 线波长处对偏振光平面旋转的方向(右旋或左旋)而指定为 (+) 或 (-)。

[0141] “局部给药”应该被定义为向伤口和邻近上皮的表面递送治疗剂。

[0142] “肠胃外给药”是经由注射方式向病人全身递送治疗剂。

[0143] 术语“治疗有效量”是指当向需要治疗的哺乳动物给药时,如以下定义的足以发挥治疗疗效的式 I 的化合物的量。治疗有效量将会根据所用治疗剂的特殊的活性、病人的年龄、身体条件、其他疾病状态的存在和营养状态而不同。另外,患者接受的其他药物治疗也会影响给药者确定治疗剂的治疗有效量。

[0144] 术语“治疗”或“进行治疗”是指对哺乳动物的疾病的任何治疗,包括:

[0145] (i) 预防疾病,即,使疾病的临床症状不发生;

[0146] (ii) 抑制疾病,即,抑制临床症状的发展;和/或

[0147] (iii) 消除疾病,即,使临床症状消退。

[0148] 在许多情况下,本发明的化合物由于存在氨基和/或羧基或其类似基团能够形成酸式和/或碱式盐。术语“药用盐”是指保持式 I 的化合物的生物有效性和特性的盐,其并非是非生物学上或其他不需要的。药用碱加成盐可由无机碱和有机碱来制备。衍生自无机碱的盐仅以举例的方式包括钠、钾、锂、铵、钙和镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于伯、仲和叔胺盐,如烷基胺、二烷基胺、三烷基胺、取代的烷基胺、二(取代的烷基)胺、三(取代的烷基)胺、烯基胺(alkenyl amine)、二烯基胺、三烯基胺、取代的烯基胺、二(取代的烯基)胺、三(取代的烯基)胺、环烷基胺、二(环烷基)胺、三(环烷基)胺、取代的环烷基胺、二取代的环烷基胺、三取代的环烷基胺、环烯基胺、二(环烯基)胺、三(环烯基)胺、取代的环烯基胺、二取代的环烯基胺、三取代的环烯基胺、芳基胺、二芳基胺、三芳基胺、杂芳基胺、二杂芳基胺、三杂芳基胺、杂环胺、二杂环胺、三杂环胺;混合的二胺和三胺,其中胺上的取代基至少有两个是不同的且选自以下基团:烷基、取代的烷基、烯基、取代烯基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、杂芳基、杂环基等。也包括胺类,其中两个或三个取代基与氨基氮一起形成杂环或杂芳基。

[0149] 合适的胺的具体实例仅以举例的方式包括异丙基胺、三甲基胺、二乙基胺、三(异丙基)胺、三(正丙基)胺、乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、氨基丁三醇、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海葱次苕(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡糖胺、N-烷基葡糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、吗啉、N-乙基哌啶等。

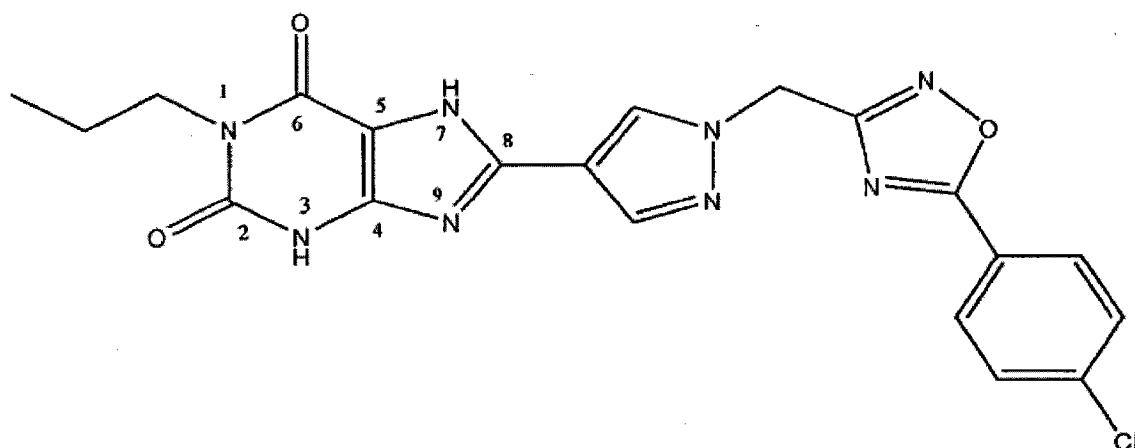
[0150] 药用酸加成盐可以由无机酸和有机酸制备,衍生自无机酸的盐包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。衍生自有机酸衍生的盐包括乙酸、丙酸、羟基乙酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等的盐。

[0151] 正如本文所使用的,“药用载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂 (asorptiondelaying agent) 等。这种介质和试剂用于药用活性物质的应用在本技术领域是众所周知的。除了传统范围内的与活性成分不相容介质或试剂以外,也可将介质或试剂用于治疗组合中。也可将补充的活性成分引入到组合中。

[0152] 命名法

[0153] 以式 I 的代表性化合物来举例说明本发明化合物的命名和编号,其中 R¹ 是正丙基, R² 和 R³ 是氢, X 是吡唑-4-亚基 (pyrazol-4-ylene), Y 是亚甲基,而 Z 是 5-(4-氯苯基) (1,2,4-噁二唑-3-基),

[0154]



[0155] 其被命名为:

[0156] 8-(1-[[5-(4-氯苯基)(1,2,4-噁二唑-3-基)]甲基]吡唑-4-基)-1-丙基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮。

[0157] 本发明的方法

[0158] 本发明涉及通过向需要其的哺乳动物给药治疗有效量的 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂预防和/或治疗肝病的方法。尽管并不想受理论的限制,但人们相信 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂预防纤维化的能力为这些化合物提供了预防和治疗肝病的能力。

[0159] 由于肝纤维化是病毒性和酒精性肝炎、威尔逊氏病、血色素沉着症、皮脂腺病和非酒精性脂肪肝的重要部分,其可以是外科手术损伤的结果,即肝移植或修复,或肝毒性医学疗法,即放射性治疗、化疗药物、抗生素等,本发明的方法通常涉及向患有前面提及的病症或正进行肝毒性疗法的患者给予 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂。

[0160] 在癌症的治疗中化学疗法和放射性疗法是肝毒性疗法的两种最常见类型。用于治疗癌症的肝毒性药物包括但不限于阿霉素、甲氨喋呤、6-巯基嘌呤、卡波铂、DTIC(达卡巴嗪)、BiCNU、L-天门冬酰胺酶,和喷司他丁。

[0161] 其他已知的具有肝毒素副作用的药物包括但不限于:醋丁洛尔、扑热息痛、放线菌素 d、肾上腺皮质类固醇、阿霉素、别嘌呤醇、阿莫西林/克拉维酸钾、蛋白同化甾类、抗炎药、抗甲状腺药物、阿司匹林、阿替洛尔、硫唑嘌呤、卡托普利、卡马西平、卡比马唑、卡莫司汀、头孢菌素、氯氮卓、氯丙嗪、氯丙嗪/丙戊酸、氯磺丙脲、氯磺丙脲/红霉素(组合)、西咪替丁、氯唑西林氟卡胺、环磷酰胺、环磷酰胺/环孢霉素、环孢霉素、达卡巴嗪、达那唑、丹曲林、地西洋、双氯芬酸、地尔硫卓、丙吡胺、依那普利、恩氟烷、红霉素、乙胺丁醇、乙硫异

烟胺、氟西洋、氟他胺、格列本脲、金、灰黄霉素、氟哌啶醇、氟烷、胍屈嗪、布洛芬、丙咪嗪、吲哚美辛、异烟肼、酮康唑、拉贝洛尔、马普替林、巯基嘌呤、甲氨喋呤、甲基多巴、甲睾酮、美托洛尔、米安色林、丝裂霉素、萘普生、烟酸、硝苯地平、呋喃妥因、非类固醇物质、诺乙龙、口服避孕药、苯唑西林、对氨基水杨酸、青霉素、盘尼西林、青霉素类、苯乙肼、苯茛二酮、苯巴比妥、酚噻嗪类、保泰松、苯妥英、苯妥英醋竹桃霉素、比洛昔康、丙磺舒、普鲁卡因胺、丙氧芬、吡嗪酰胺、奎尼丁、奎宁、雷尼替丁、水杨酸盐、磺胺类药、舒林酸、他莫西芬、盐酸特比萘芬（疗霉舒、伊曲康唑）、睾酮、四环素类、噻苯达唑、硫代鸟嘌呤（thioquanine）、二氧化钍（thorotrast）、甲苯磺丁脲、三环抗抑郁药、丙戊酸、维拉帕米、长春新碱和维生素 A。

[0162] 肝纤维化的开始是从人类肝星状细胞（HHSC）的激活开始的。一旦被激活，HHSCs 就开始合成在 I 型胶原中富含的纤维化基质。这种纤维化基质最终会产生传统上称为肝纤维化的疤痕。申请人已经令人惊讶地发现，由于在 HHSCs 中的 A_{2B} 受体的活化诱导了 IL-6 的释放和 α -平滑肌肌动蛋白的表达（作为 HHSC 激活的标记），因此 A_{2B} 腺苷受体参与到肝纤维化的产生和发展中。已经证实 IL-6 的释放刺激胶原的产生。已经发现， A_{2B} 受体的抑制降低了 NECA- 诱导的 IL-6 释放和胶原的产生。

[0163] A_{2B} 受体拮抗剂可以通过口服或者 IV 制剂进行全身给药，但也可以直接经由注射进行肝组织给药。这种给药可作为单剂量或以多个指定时间间隔的重复剂量实施。这对本领域的技术人员而言将是很容易理解的，优选的给药方案将随患者和所治疗病症的严重性而改变。

[0164] 药物组合物

[0165] 当选择作为腺苷 A_{2B} 受体拮抗剂时，式 I 的化合物通常是以药物组合物的形式给药。因此本发明提供的药物组合物包括作为活性成分的式 I 或式 II 的一种或多种化合物，或其药用盐或酯，以及一种或多种药用赋形剂、载体，包括惰性固体稀释剂和填料、稀释剂，包括无菌含水溶液和各种有机溶剂、增溶剂和佐剂。式 I 和 / 或式 II 的化合物可以单独给药或与其他治疗性药剂（agent）组合给药。这种组合物是以制药行业中众所周知的方式制备的（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Co., Philadelphia, PA 17th Ed. (1985) 和 "Modern Pharmaceutics", Marcel Dekker, Inc. 3rd Ed. (G. S. Banker & C.T. Rhodes, Eds.))。

[0166] A_{2B} 腺苷受体拮抗剂

[0167] 任何 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂可以用于本发明的方法中。许多拮抗 A_{2B} 腺苷受体的化合物在本领域是已知的，确定具体的化合物是否具有这种活性的方法也是已知的。例如，Feoktistov 和 Baggioni 的综述性论文（(1997) Pharmacological Reviews 49 :381-402）报道了八种腺苷受体激动剂和八种拮抗剂对腺苷受体的所有四种亚型的结合亲和力。本文中引用的参考文献提供了对于所使用的程序的详细描述。（Robeva 等，(1996) J. Drug Dev. Res 39 :243-252 ; Jacobson et al (1996) Drug Dev. Res. 39 :289-300 ; Feoktistov 和 Baggioni (1993) Molecular Pharmacology 43 :909-914）。用于测定化合物对受体的结合亲和力的有效方法是利用放射标记的激动剂或拮抗剂，以及化合物结合到已知含有那种受体的膜部分的相关性；例如，为了确定化合物是否是 A_{2B} 拮抗剂，该膜部分将会含有 A_{2B} 腺苷受体。美国专利第 5,854,081 号报道了测定化合物是否是 A_{2B} 拮抗剂的另一种特别有效的方法。

[0168] 因此,对于 A_{2B} 受体亚型具有选择性的化合物对于本方法是优选的。这种化合物的一个实例,但并非是限制性的,是 3-正丙基黄嘌呤(恩丙茶碱)。美国专利第 6,545,002 号也公开了合适的化合物。除了 A_{2B} 受体之外,还拮抗其他受体的化合物也适合用于本发明。这种化合物的一个实例是 1,3-二丙基-8-(对-丙烯酸)苯基黄嘌呤。

[0169] 特别优选的一类 A_{2B} 腺苷受体拮抗剂公开于共同未决的并普通转让的美国专利申请 6,825,349、共同未决并普通转让的美国专利申请 10/719,102(作为美国专利申请公开物 20040176399 公开)和共同未决并普通转让的美国专利申请 11/453,414(作为美国专利申请公开物 20060293283 公开)。在这些专利申请中公开的化合物具有在本发明的概述中提出的式 I、II 和 III 的结构,能够按照参考文献描述或以下的详细描述进行合成。

[0170] 合成反应参数

[0171] 术语“溶剂”、“惰性有机溶剂”或“惰性溶剂”是指在与本文描述的反应相关的反应条件下呈惰性的溶剂[包括例如,苯、甲苯、乙腈、四氢呋喃(“THF”)、二甲基甲酰胺(“DMF”)、氯仿、亚甲基二氯(或二氯甲烷)、乙醚、甲醇、吡啶等]。除非明确地指出是相反的,本发明的反应中使用的溶剂都是惰性有机溶剂,且反应都在惰性气体(优选氮气)中进行。

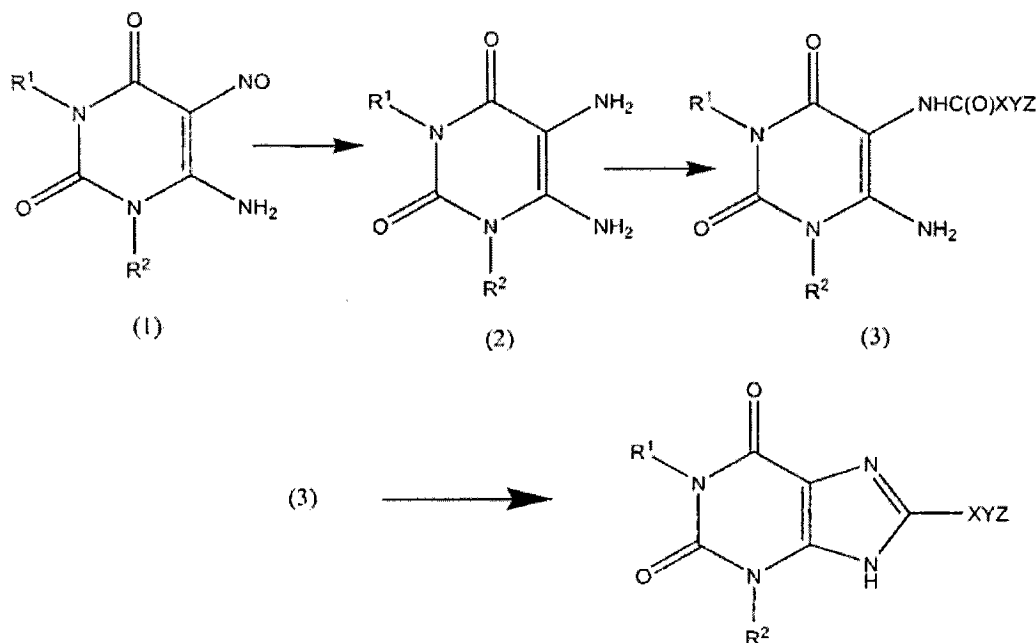
[0172] 术语“q. s.”是指足量添加以达到一个状态函数,例如使溶液达到所需的体积(即 100%)。

[0173] 式 I 和 II 的化合物的合成

[0174] 制备式 I 或 II(其中 R^3 是氢)的化合物的一个优选的方法如反应方程式 I 所示。

[0175] 反应方程式 I

[0176]



[0177] 式 I

[0178] 步骤 1- 式 (2) 的制备

[0179] 式 (2) 的化合物是由式 (1) 的化合物通过还原步骤制备的。可以使用传统的还原技术,例如在氨水溶液中使用连二亚硫酸钠;优选用氢气和金属催化剂进行还原。在催化剂(例如 10% 的碳载钯催化剂)的存在下,在氢气氛下,优选在例如约 30psi 的压力下,反应

在惰性溶剂（例如甲醇）中进行约 2h。当反应基本完成时，通过传统的方法分离式 (2) 的产物而得到式 (2) 化合物。

[0180] 步骤 2- 式 (3) 的制备

[0181] 然后在碳二酰亚胺，例如 1-(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳二酰亚胺盐酸盐的存在下，式 (2) 的化合物与式为 $Z-Y-X-CO_2H$ 的羧酸进行反应。反应在质子溶剂例如甲醇、乙醇、丙醇等（优选甲醇）中，在约 20 ~ 30℃ 的温度下优选在约室温下进行约 12 ~ 48h，优选进行约 16h。当反应基本完成时，通过常规方法，例如减压除去溶剂来分离式 (3) 的产物，并清洗产物。可替代地，可不进行任何进一步的纯化就进行下一步骤。

[0182] 式 (3) 的化合物的可替代的制备方法

[0183] 可替代地，首先将式为 $Z-Y-X-CO_2H$ 的羧酸通过与卤化试剂（例如亚硫酸二氯或亚硫酸二溴优选亚硫酸二氯）反应而转化成式为 $Z-Y-X-C(O)L$ 的酰卤，其中 L 是氯或溴。可替代地，也可以使用草酰氯、五氯化磷或三氯氧磷。反应优选在无溶剂条件下采用过量的卤化试剂在例如约 60 ~ 80℃ 的温度下优选约 70℃ 下进行约 1 ~ 8h，优选进行约 4h。当反应基本完成时，通过传统的方法，例如减压下除去过量卤化试剂来分离式为 $Z-Y-X-C(O)L$ 的产物。

[0184] 然后使该产物与式 (2) 的化合物在惰性溶剂（例如乙腈）中，在叔碱如三乙胺存在下反应。反应在约 0℃ 的初始温度下进行，然后升温到 20 ~ 30℃，优选升温到室温左右，反应 12 ~ 48h，优选 16h。当反应基本完成时，通过传统的方法，例如用水稀释反应混合物并滤出产品，用水冲洗后再用醚冲洗来分离式 (3) 的产物。

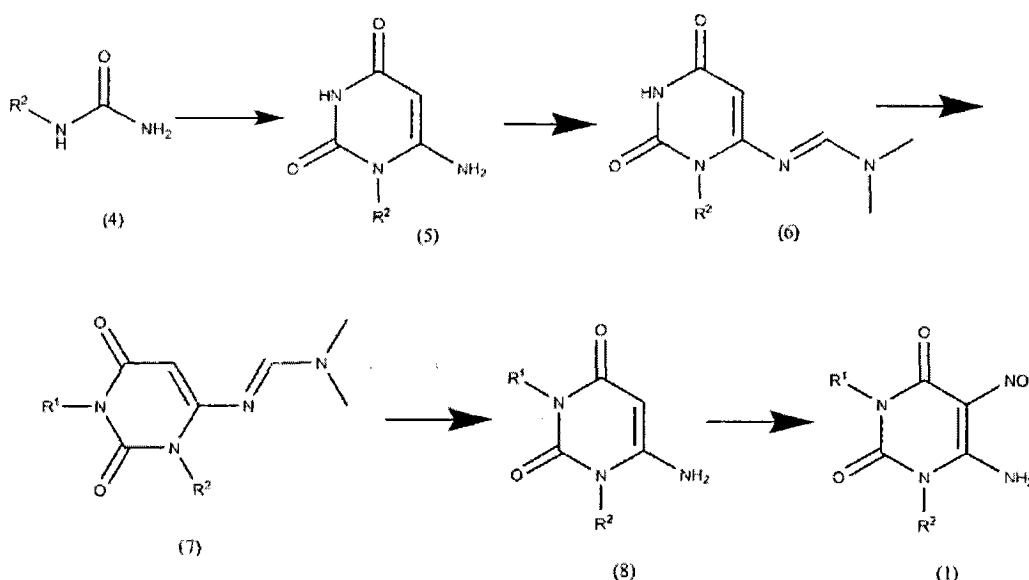
[0185] 步骤 3- 式 I 的制备

[0186] 然后通过环化反应将式 (3) 的化合物转化成式 I 的化合物。反应在质子溶剂例如甲醇、乙醇、丙醇等（优选甲醇）中，在碱（例如氢氧化钾、氢氧化钠、甲醇钠、乙醇钠、叔丁醇钾 (potassium t-butoxide)，优选氢氧化钠水溶液）的存在下，在约 50-80℃，优选约 80℃ 下进行约 1 ~ 8h，优选进行约 3h。当反应基本完成时，通过传统的方法，例如减压除去溶剂，用含水的酸酸化残余并滤出产品，然后冲洗并干燥产品，来分离式 I 的产物。

[0187] 式 (1) 的化合物可以通过各种方法制备。一种优选的方法如反应方程式 II 所示。

[0188] 反应方程式 II

[0189]



[0190] 步骤 1- 式 (5) 的制备

[0191] 式 (4) 的化合物可商购获得, 或通过本领域众所周知的技术制备。其与氰基乙酸乙酯在质子溶剂 (例如乙醇) 中, 在强碱 (例如乙醇钠) 的存在下进行反应。反应在回流温度下进行约 4 ~ 约 24h。当反应基本完成时, 通过传统的方法分离由此生成的式 (5) 的化合物。

[0192] 步骤 2 和 3- 式 (7) 的制备

[0193] 式 (5) 的化合物与 N,N- 二甲基甲酰胺的二甲基乙缩醛在极性溶剂例如 N,N- 二甲基甲酰胺中反应。反应在约 40℃ 下进行约 1h。当反应基本完成时, 由此生成的式 (6) 的化合物与式为 R^1HaI 的化合物在碱 (例如碳酸钾) 的存在下反应, 其中 HaI 是氯、溴或碘。反应在约 80℃ 下进行约 4 ~ 24h。当反应基本完成时, 通过传统的方法, 例如通过减压蒸发掉溶剂来分离式 (7) 产物, 残余物直接用于下一步反应而不用进一步纯化。

[0194] 步骤 4- 式 (8) 的制备

[0195] 使式 (7) 的化合物与氨水在极性溶剂中 (例如悬浮于甲醇中) 进行反应。反应在室温下进行约 1 ~ 3 天。当反应基本完成时, 通过传统的方法, 例如硅胶柱色谱 (例如用二氯甲烷 / 甲醇的混合物洗脱) 来分离式 (8) 的产物。

[0196] 步骤 5- 式 (1) 的制备

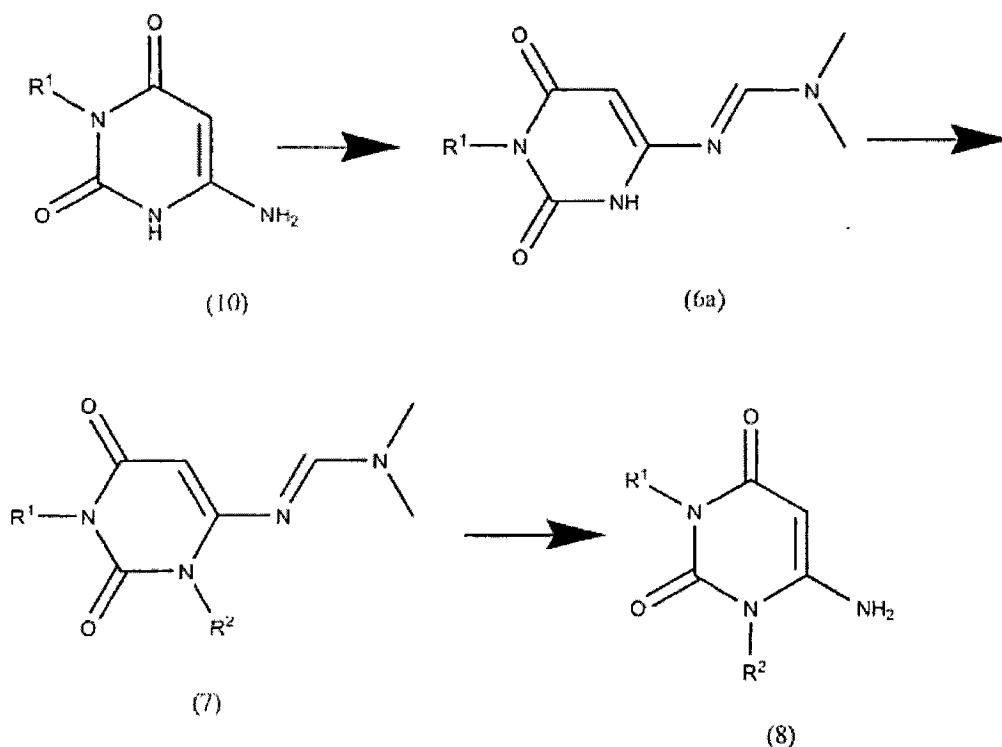
[0197] 然后式 (8) 的化合物与亚硝酸钠在酸性含水溶剂中进行混合, 优选在乙酸和水 (例如 50% 的乙酸 / 水) 中进行。反应在约 50 ~ 90℃ 的温度下进行约 1h, 优选在约 70℃ 下进行。当反应基本完成时, 通过传统的方法分离式 (1) 的产品。

[0198] 可替代地, 反应可以在含水溶剂 (例如二甲基甲酰胺和水) 中进行, 并与强酸 (例如盐酸) 进行反应。

[0199] 式 (8) 的化合物利用相似的方法由式 (10) 的化合物制备得到, 如反应方程式 IIA 所示。

[0200] 反应方程式 IIA

[0201]



[0202] 步骤 2 和 3- 式 (7) 的制备

[0203] 使式 (10) 的化合物与 N, N- 二甲基甲酰胺的二甲基乙缩醛在极性溶剂 (例如 N, N- 二甲基甲酰胺) 中反应。反应在约 40°C 下进行约 1 小时。当反应基本完成时, 由此生成的式 (6a) 的化合物与式 R₂Ha₁ 的化合物在碱 (例如碳酸钾) 的存在下反应, 其中 Ha₁ 是氯、溴或碘。反应在约 80°C 下进行约 4 至 24 小时。当反应基本完成时, 通过传统的方法, 例如通过减压蒸发掉溶剂来分离式 (7) 产物, 残余物可直接用于下步反应而不用进一步纯化。

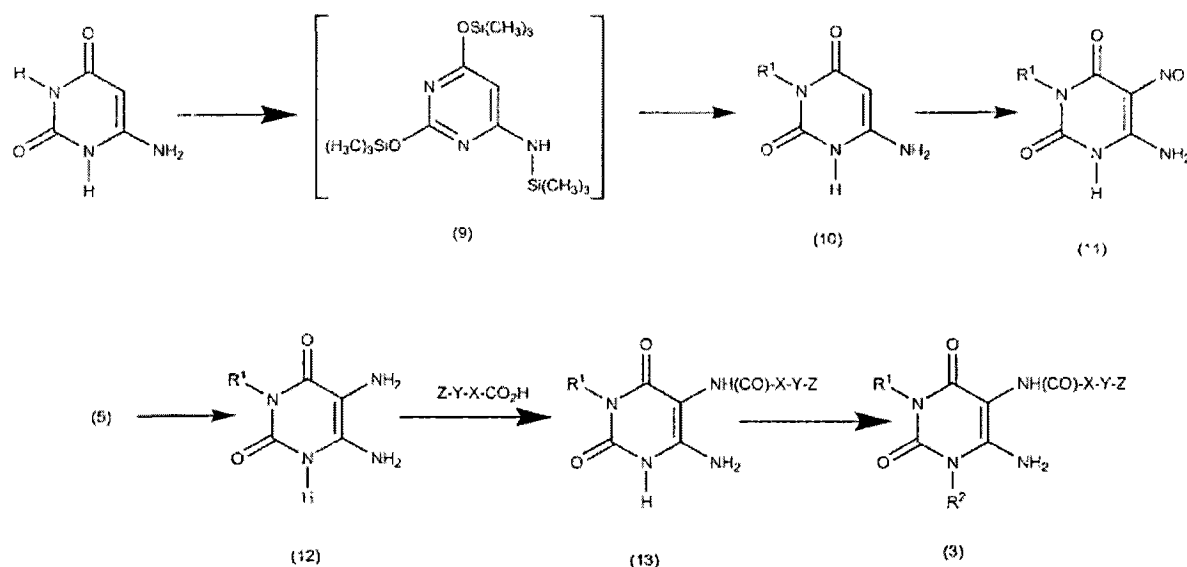
[0204] 步骤 4- 式 (8) 的制备

[0205] 式 (7) 的化合物与氨水在极性溶剂中 (例如悬浮于甲醇中) 进行反应。反应在室温下进行约 1 ~ 3 天。当反应基本完成时, 通过传统的方法, 通过硅胶柱色谱 (例如用二氯甲烷 / 甲醇的混合物洗脱) 来分离式 (8) 的产物。

[0206] 式 (3) 的化合物也可以通过各种方法进行制备。一种优选的方法如反应方程式 III 所示。

[0207] 反应方程式 III

[0208]



[0209] 步骤 1- 式 (10) 的制备

[0210] 首先将商购的化合物 6-氨基尿嘧啶硅烷化, 例如在诸如硫酸铵的催化剂的存在下, 与作为溶剂的过量六甲基二硅氮烷反应。反应在回流温度下进行约 1 至 10 小时。当反应基本完成时, 通过常规方法, 分离由此生成的硅烷化化合物, 然后与式 $R^1\text{H}a\text{l}$ 的化合物优选在无溶剂存在下进行反应, 其中 $Ha\text{l}$ 是氯、溴或碘。反应在约回流下进行约 4 至 48 小时, 优选约 12 至 16 小时。当反应基本完成时, 通过常规方法, 分离式 (10) 的产品常规方法。

[0211] 步骤 2- 式 (11) 的制备

[0212] 然后将式 (10) 的化合物溶解于含水的酸 (酸性含水溶液, aqueous acid) 中 (如乙酸水溶液) 中并与亚硝酸钠进行反应。反应在约 $20 \sim 50^\circ\text{C}$, 优选 30°C 的温度下进行超过 30 分钟。当反应基本完成时, 通过常规方法 (例如过滤) 来分离式 (11) 的产物。

[0213] 步骤 3- 式 (12) 的制备

[0214] 然后将式 (11) 的化合物还原成二氨基衍生物。通常, 将式 (11) 的化合物溶解于氨水中, 然后加入例如连二亚硫酸钠的还原剂。反应在约 70°C 的温度下进行。当反应基本完成时, 通过常规方法, 例如过滤冷却的反应混合物来分离式 (12) 的产物。

[0215] 步骤 4- 式 (13) 的制备

[0216] 然后在碳二酰亚胺例如 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二酰亚胺盐酸盐的存在下, 式 (12) 的化合物与式为 $Z\text{-Y-X-CO}_2\text{H}$ 的羧酸进行反应。反应在约 $20 \sim 30^\circ\text{C}$ 的温度下进行约 12 至 48 小时。当反应基本完成时, 通过常规方法, 例如过滤冷却的反应混合物来分离式 (13) 的产物。

[0217] 可替代地, 将式为 $Z\text{-Y-X-CO}_2\text{H}$ 的羧酸通过与卤化试剂例如亚硫酸二氯或亚硫酸二溴反应而转化成式 $Z\text{-Y-X-C(O)L}$ 的酰卤, 其中 L 是氯或溴; 可替代地, 也可以使用五氯化磷或三氯氧磷。反应优选在无溶剂条件下采用过量的卤化试剂, 例如在约 $60 \sim 80^\circ\text{C}$ 下优选约 70°C 下进行约 1 ~ 8 小时, 优选进行约 4 小时。当反应基本完成时, 通过常规的方法, 例如减压下除去过量卤化试剂来分离式 $Z\text{-Y-X-C(O)L}$ 的产物。

[0218] 然后在叔碱 (如三乙胺) 的存在下, 式为 $Z\text{-Y-X-C(O)L}$ 的产物与式 (12) 的化合物在惰性溶剂中 (例如乙腈中) 进行反应。反应在约 0°C 的初始温度下进行, 然后升温到 $20 \sim 30^\circ\text{C}$, 优选升温至室温左右, 反应约 12 至 48 小时, 优选 16 小时。当反应基本完成时, 通过

常规的方法,例如用水稀释反应混合物,滤出产物,并用水冲洗后再用醚冲洗来分离式 (13) 的产物。

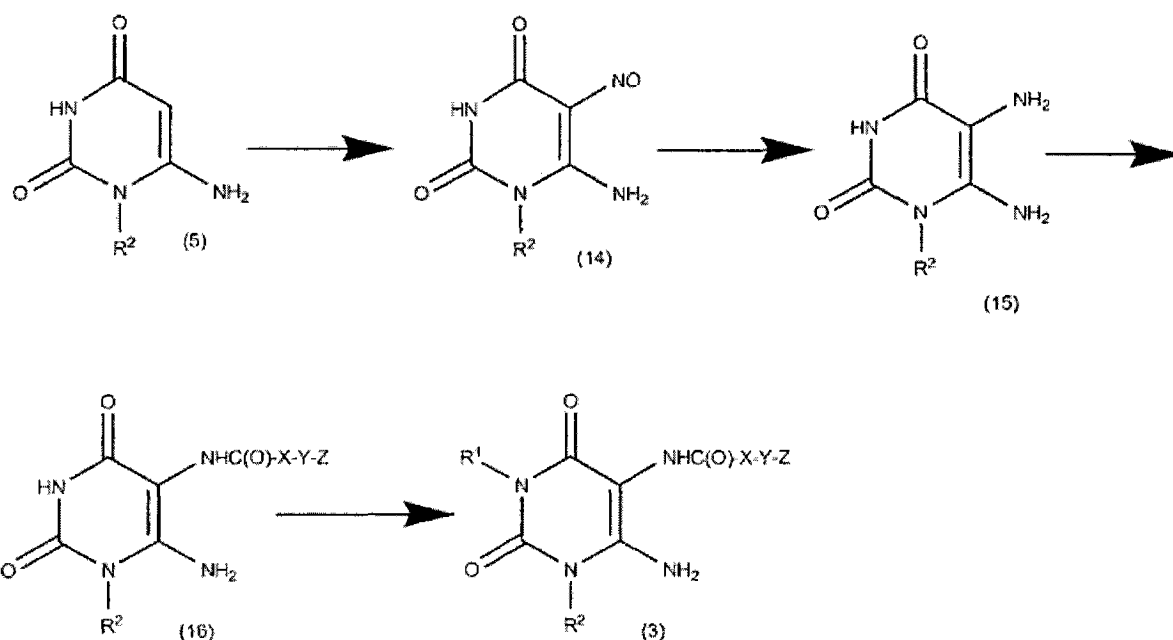
[0219] 步骤 5- 式 (3) 的制备

[0220] 在碱 (例如碳酸钾) 的存在下,式 (13) 的化合物与式 $R^2\text{Hal}$ 的化合物进行反应,其中 Hal 是氯、溴或碘。反应在室温左右进行约 4 至 24 小时,优选约 16 小时。当反应基本完成时,通过常规的方法,例如减压蒸发掉溶剂来分离式 (3) 产物,残余物可以通过常规方法纯化,或可以不需要进一步纯化而直接用于下一步反应中。

[0221] 式 (3) 化合物的另一制备方法如反应方程式 IV 所示。

[0222] 反应方程式 IV

[0223]



[0224] 步骤 1- 式 (14) 的制备

[0225] 然后式 (5) 的化合物与亚硝酸钠在酸性含水溶剂中混合,优选在乙酸和水 (例如 50% 的乙酸 / 水)。反应在约 50 ~ 90℃ 的温度下优选在约 70℃ 下进行约 1 小时。当反应基本完成时,通过常规方法分离式 (14) 的产物。

[0226] 可替代地,反应可以在含水溶剂例如二甲基甲酰胺和水中进行,并与强酸 (例如盐酸) 进行反应。

[0227] 步骤 3- 式 (15) 的制备

[0228] 然后式 (14) 的化合物还原成二氨基衍生物。通常,将式 (14) 的化合物溶解于氨水中,然后加入例如连二亚硫酸钠的还原剂。反应在约 70℃ 的温度下进行。当反应基本完成时,通过常规的方法,例如过滤冷却的反应混合物来分离式 (15) 的产物。

[0229] 步骤 4- 式 (16) 的制备

[0230] 然后在碳二酰亚胺例如 1-(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳二酰亚胺盐酸盐的存在下,式 (15) 的化合物与式为 $Z-Y-X-\text{CO}_2\text{H}$ 的羧酸反应。反应在惰性溶剂 (例如甲醇) 中在约 20 ~ 30℃ 的温度下进行约 12 至 48 小时。当反应基本完成时,通过常规方法,例如过滤冷却的反应混合物来分离式 (16) 的产物。

[0231] 可替代地,将式为 $Z-Y-X-\text{CO}_2\text{H}$ 的羧酸通过与卤化试剂例如亚硫酰二氯或亚硫酰二

溴反应而转化成式 Z-Y-X-C(O)L 的酰卤, 其中 L 是氯或溴; 可替代地, 也可以使用五氯化磷或三氯氧磷。反应优选在无溶剂条件下采用过量的卤化试剂, 例如在约 60 ~ 80℃ 下, 优选约 70℃ 下进行约 1 至 8 小时, 优选进行约 4 小时。当反应基本完成时, 通过常规的方法, 例如减压下除去过量卤化试剂来分离式 Z-Y-X-C(O)L 的产物。

[0232] 然后在叔碱 (如三乙胺) 的存在下, 式为 Z-Y-X-C(O)L 的产物与式 (15) 的化合物在诸如乙腈的惰性溶剂中进行反应。反应在约 0℃ 的初始温度下进行, 然后升温到 20 ~ 30℃, 优选升温至约室温, 反应约 12 至 48 小时, 优选 16 小时。当反应基本完成时, 通过常规的方法, 例如通过用水稀释反应混合物, 并滤出产品, 用水冲洗后再用醚冲洗来分离式 (13) 的产物。

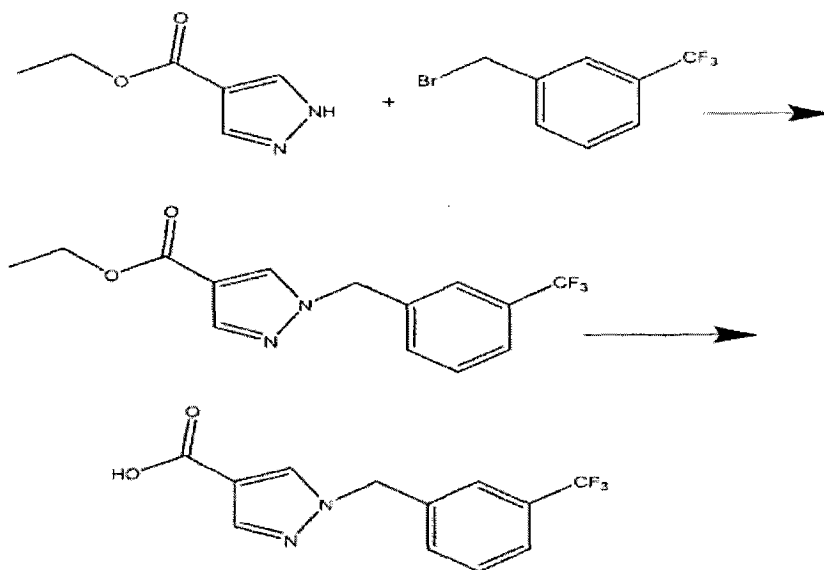
[0233] 步骤 5- 式 (3) 的制备

[0234] 在诸如碳酸钾的碱存在下, 式 (16) 的化合物与式 R¹Hal 的化合物反应, 其中 Hal 是氯、溴或碘。反应在约 80℃ 下进行约 4 至 24 小时, 优选进行约 16 小时。当反应基本完成时, 通过常规的方法, 例如减压蒸发掉溶剂来分离式 (3) 的产物, 可以对残余物进行常规纯化, 或不需要进一步纯化而直接用于下步反应中。

[0235] Z-Y-X-CO₂H 的化合物的合成实例如反应方程式 V 所示, 其中 X 是吡唑 -1,4- 基, Y 是亚甲基, 且 Z 是 3- 三氟甲基苯基。

[0236] 反应方程式 V

[0237]



[0238] 在碳酸钾的存在下, 吡唑 -4- 甲酸乙酯 (ethylpyrazole-4-carboxylate) 与 1-(溴代甲基)-3-(三氟甲基) 苯在丙酮中反应。产物为 1- { [3-(三氟甲基) 苯基] 甲基 } 吡唑 -4- 甲酸乙酯, 然后在甲醇中用氢氧化钾水解而得到 1- { [3-(三氟甲基) 苯基] 甲基 } 吡唑 -4- 羧酸。

[0239] 功效 (utility) 测试和给药

[0240] 一般功效

[0241] 本发明的方法和药物组合物在预防和治疗哺乳动物肝病 (如肝纤维化和 / 或肝炎) 中是有效的。肝病的典型病因包括但不限于, 病毒性和酒精性肝炎、威尔逊氏病、血色素沉积症、皮脂腺病和非酒精性脂肪肝 (NASH)。肝病也可以是外科手术的结果所致, 即肝移

植或修复,或是药物诱导肝损伤的结果所致。

[0242] 测试

[0243] 活性测试是按照以上参考的那些专利和专利申请和以下实施例中描述的内容,以及本领域技术员所显而易见的方法进行的。

[0244] 给药

[0245] 式 I 的化合物可以具有类似功效的药剂的任何可接受的给药模式单剂量或多剂量 (multiple dose) 给药,例如,在引用作为参考的那些专利和专利申请中描述的内容,包括含服、鼻内、动脉内注射、静脉、腹膜内、非肠胃、肌肉内、皮下、口服或作为吸入剂给药。

[0246] 口服给药是式 I 化合物优选的给药途径。可以经由胶囊或肠溶衣涂层的片剂等给药。在制备包含至少一种式 I 的化合物的药物组合物时,活性成分通常是通过赋形剂而被稀释和 / 或封闭于这种能够形成胶囊、药囊 (sachet)、纸袋 (paper) 或其他容器的载体之内。当赋形剂作为稀释剂时,其可以是固体、半固体或液体物质 (如上所述),其作为活性成分的赋形剂 (vehicle)、载体或介质。因此,该组合物可以是片剂、丸剂、散剂、锭剂、囊剂、扁囊剂、酏剂、混悬剂、乳液剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂 (作为固体或在液体介质中)、含有例如高达 10wt% 的活性化合物的乳膏剂、软的和硬的胶囊、无菌的可注射溶液和无菌的包装了的粉末。

[0247] 合适的赋形剂的一些实例包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、海藻酸盐、黄芪胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、无菌水、糖浆和甲基纤维素。配方中可另外包括:润滑剂,如滑石、硬脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化和悬浮剂;防腐剂,如羟苯甲酯和羟苯丙酯;甜味剂;和调味剂。

[0248] 本发明的组合物可以被配制 (formulate) 成这样,即通过采用本领域中已知的方法对患者给药之后,能够提供活性成分的快释、延释或缓释。对于口服给药的控释给药系统包括渗透泵系统和含有聚合物涂层的储存池或药物-聚合物基质制剂的溶出 (dissolutional) 系统。控释系统的实例在美国专利 3,845,770、4,326,525、4,902,514 和 5,616,345 中给出。本发明方法中使用的另一种制剂采用了透皮递药装置 (“药贴, patch”)。这种透皮的药贴可用于以可控的剂量提供本发明化合物的连续的或间断的注入。用于药物递送的透皮药贴的结构和用法在本领域是众所周知的。参见例如美国专利 5,023,252、4,992,445 和 5,001,139。这种药贴可以构建用于连续的、脉冲式 (pulsatile) 的或按需递送药物。

[0249] 诸如式 I 的化合物的腺苷 A_{2B} 受体拮抗剂在很宽的剂量范围内都是有效的,并一般是以药物有效量进行给药。一般来说,对于口服给药,每一剂量单位含有 1mg 至 2g 的腺苷 A_{2B} 受体拮抗剂,更常见的是 1 至 700mg,对于非肠胃给药,一般为 1 至 700mg 的腺苷 A_{2B} 受体拮抗剂,更常见的是 2 至 200mg。然而,应该理解,实际给药的腺苷 A_{2B} 受体拮抗剂的剂量是由内科医师根据相关情况决定的,这些情况包括所治疗的病症、所选的给药途径、实际所给予的化合物和其相对活性、每个患者的年龄、体重和响应、患者症状的严重程度等。

[0250] 为了制备诸如片剂的固体组合物,将主要活性成分与药用赋形剂混合而形成含有本发明化合物的均质混合物的固体处方 (perforulation) 组合物。当指出这些处方组合物为均质的时,其是指活性成分均匀地分散在全部组合物中,以至于可以很容易地将组合物均分成等效的单位剂量形式如片剂、丸剂和胶囊。

[0251] 本发明的片剂或丸剂可以进行涂层或者另外进行复合 (compounded), 以提供具有长效优势的剂量形式, 或避免胃的酸性环境。例如, 片剂或丸剂可含有内层配料和外层配料组分, 后者是在前者之上的包封形式。两种组分可通过肠道层 (enteric layer) 分开, 该肠道层可抵抗胃内抗崩解并且保证里面的组分完好地通过进入十二指肠或延迟释放。许多种材料都可用于这种肠道层或涂层, 这种材料包括许多聚合物酸和聚合物酸与诸如虫漆、十六醇和醋酸纤维素的材料的混合物。

[0252] 吸入剂或吹入剂的组合物包括溶液和药用的含水或有机溶剂、或其混合物的混悬液, 以及粉末。液体或固体组合物可以含有如前文所描述的合适的药用赋形剂。优选组合物通过口服或鼻内吸入途径给药以对局部或全身起效。在优选的药用溶剂中的组合物可通过使用惰性气体进行雾化。雾化的溶液可以直接从雾化装置吸入或可将雾化装置连接到面罩或间歇性正压呼吸机。溶液、混悬液或粉末组合物可以由递送制剂的设备以合适的方式给药, 优选口服或鼻吸入的方式。

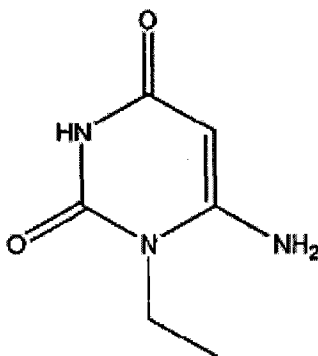
[0253] 以下实施例被包括在内, 以举例说明本发明的优选实施方式。本技术领域的技术员应该理解, 在以下实施例中公开的技术代表本发明人发现的技术, 而在本发明的实践中工作良好, 因此可考虑用于构建用于实践的优选模式。然而, 本领域的技术人员应该理解, 根据本发明的公开内容, 在不脱离本发明的精神和范围的前提下, 可做出在具体的实施方式中已经被公开, 但仍可获得相似或类似的结果的许多变化。

[0254] 实施例 1

[0255] 式 (5) 化合物的制备

[0256] A. 式 (5) 中 R^2 是乙基的化合物的制备

[0257]



[0258] 由金属钠 (4.8g, 226mmol) 和干燥乙醇 (150ml) 制备乙醇钠溶液。向该溶液中加入氨基 -N- 乙基酰胺 (amino-N-ethylamide) (10g, 113mmol) 和氰基乙酸乙酯 (12.8g, 113mmol)。将该反应混合物在回流下搅拌 6h, 冷却, 在减压下除去反应混合物中的溶剂。将残余物溶解于水中 (50ml), 并用盐酸调节 pH 值至 7。将该混合物在 0°C 静置过夜, 滤出沉淀, 用水冲洗并进行风干, 得到式 (5) 的化合物 6-氨基 -1- 乙基 -1,3- 二氢嘧啶 -2,4- 二酮。

[0259] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 10.29 (s, 1H), 6.79 (s, 2H), 4.51 (s, 1H), 3.74 ~ 3.79 (m, 2H), 1.07 (t, 3H, $J = 7.03\text{Hz}$); MS m/z 155.98 (M^+), 177.99 ($M^+ + \text{Na}$)。

[0260] B. 式 (5) 中 R^2 是甲基的化合物的制备

[0261] 类似地, 按照实施例 1A 的步骤进行, 但是用氨基 -N- 甲基酰胺代替氨基 -N- 乙基酰胺, 制得 6-氨基 -1- 甲基 -1,3- 二氢嘧啶 -2,4- 二酮。

[0262] C. 变化 R^2 的式 (5) 化合物的制备

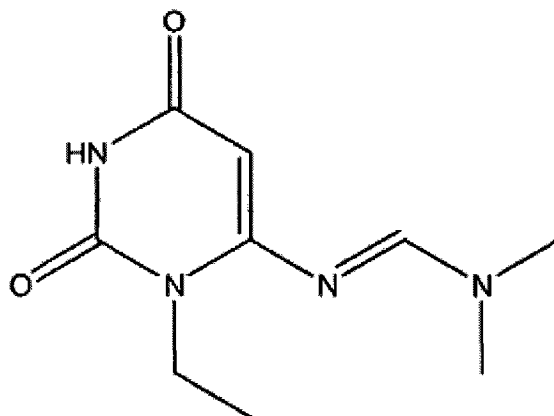
[0263] 类似地,按照实施例 1A 的步骤进行,但是用式 (4) 的其他化合物代替氨基 -N- 乙基酰胺,制备式 (5) 的其他化合物。

[0264] 实施例 2

[0265] 式 (6) 化合物的制备

[0266] A. 式 (6) 中 R^2 是乙基的化合物的制备

[0267]



[0268] 将 6-氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (0.77g, 5mmol) 在无水 N,N-二甲基乙酰胺 (25ml) 和 N,N-二甲基乙缩醛 (2.7ml, 20mmol) 中的混悬液在 40℃ 下加热 90min。然后,在减压下除去溶剂,将残余物与乙醇一起研磨,过滤并用乙醇冲洗,得到式 (6) 的化合物 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙炔基]-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0269] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 10.62 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 4.99 (s, 1H), 3.88-3.95 (m, 2H), 3.13 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 1.07 (t, 3H, $J = 7.03\text{Hz}$); MS m/z 210.86 (M^+), 232.87 ($M^+ + \text{Na}$)

[0270] B. 式 (6) 中 R^2 是甲基的化合物的制备

[0271] 类似地,按照实施例 2A 的步骤进行,但是用 6-氨基-1-甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮代替 6-氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,就制备出 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙炔基]-1-甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0272] C. 改变 R^2 的式 (6) 化合物的制备

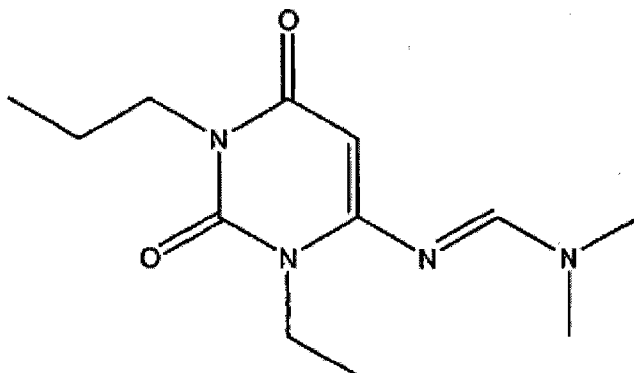
[0273] 类似地,按照实施例 2A 的步骤进行,但是用式 (5) 的其他化合物代替 6-氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,制得式 (6) 的其他化合物。

[0274] 实施例 3

[0275] 式 (7) 化合物的制备

[0276] A. 式 (7) 中 R^1 是正丙基且 R^2 是乙基的化合物的制备

[0277]



[0278] 将 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (1.5g, 7.1mmol) 的二甲基甲酰胺 (25ml) 溶液、碳酸钾 (1.5g, 11mmol) 和碘代正丙烷 (1.54g, 11mmol) 的混合物在 80℃ 下搅拌 5 小时。将反应混合物冷却至室温, 过滤, 蒸发掉溶剂, 并将式 (7) 的产品, 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮如此用于下一反应中。

[0279] B. 改变 R^1 和 R^2 的式 (7) 中化合物的制备

[0280] 类似地, 按照实施例 3A 的步骤, 但是用式 (6) 的其他化合物代替 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备式 (7) 的以下化合物:

[0281] 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-甲基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0282] 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-甲基-3-环丙基甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0283] 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-乙基-3-环丙基甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0284] 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-甲基-3-(2-甲基丙基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮; 和

[0285] 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-乙基-3-(2-甲基丙基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0286] C. 改变 R^1 和 R^2 的式 (7) 中化合物的制备

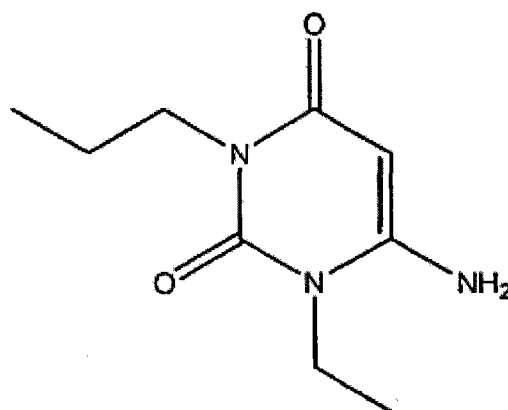
[0287] 类似地, 按照实施例 3A 的步骤, 但是用式 (6) 的其他化合物代替 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制得式 (7) 的其他化合物。

[0288] 实施例 4

[0289] 式 (8) 的化合物的制备

[0290] A. 式 (8) 中 R^1 为正丙基且 R^2 为乙基的化合物的制备

[0291]



[0292] 将 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (2.1g) 的溶液溶解于甲醇 (10ml) 和 28% 的氨水溶液 (20ml) 的混合物中, 在室温下搅拌 72 小时。然后, 在减压下除去溶剂, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 用二氯甲烷/甲醇 (15/1) 的混合物洗脱后, 得到式 (8) 的化合物 6-氨基-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0293] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 6.80 (s, 2H), 4.64 (s, 1H), 3.79-3.84 (m, 2H), 3.63-3.67 (m, 2H), 1.41-1.51 (m, 2H), 1.09 (t, 3H, $J = 7.03\text{Hz}$), 0.80 (t, 3H, $J = 7.42\text{Hz}$); MSm/z 197.82 (M^+)

[0294] B. 改变 R^1 和 R^2 的式 (8) 化合物的制备

[0295] 类似地, 按照实施例 4A 的步骤, 但是用式 (7) 的其他化合物代替 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备式 (8) 的以下化合物:

[0296] 6-氨基-1-甲基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0297] 6-氨基-1-甲基-3-环丙基甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0298] 6-氨基-1-乙基-3-环丙基甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0299] 6-氨基-1-甲基-3-(2-甲基丙基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮; 和

[0300] 6-氨基-1-乙基-3-(2-甲基丙基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0301] C. 改变 R^1 和 R^2 的式 (7) 化合物的制备

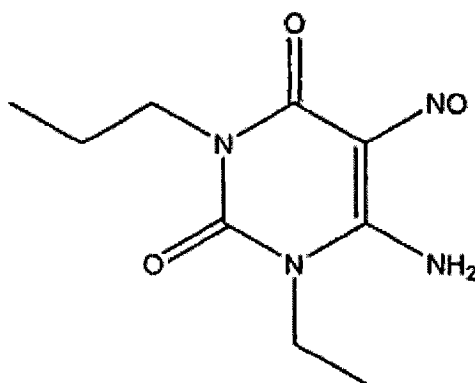
[0302] 类似地, 按照实施例 4A 的步骤, 但是用式 (7) 的其他化合物代替 6-[2-(二甲基氨基)-1-氮杂乙烯基]-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备式 (8) 的其他化合物。

[0303] 实施例 5

[0304] 式 (1) 的化合物的制备

[0305] A. 式 (1) 中 R^1 是正丙基且 R^2 是乙基的化合物的制备

[0306]



[0307] 在超过 10 分钟的时间,向 6-氨基-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (1.4g, 7.1mmol) 在 50% 乙酸/水 (35ml) 混合物的溶液中按份 (in portion) 加入亚硝酸钠 (2g, 28.4mmol)。混合物在 70°C 下搅拌 1 小时,然后在减压下将反应混合物浓缩至较小的体积。滤出固体并用水冲洗,得到式 (1) 的化合物 6-氨基-1-乙基-5-亚硝基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0308] MS m/z 227.05 (M^+), 249.08 ($M^+ + Na$)

[0309] B. 改变 R^1 和 R^2 的式 (1) 化合物的制备

[0310] 类似地,按照实施例 5A 的步骤,但是用式 (8) 的其他化合物代替 6-氨基-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,制备式 (1) 的以下化合物:

[0311] 6-氨基-1-甲基-5-亚硝基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0312] 6-氨基-1-甲基-3-环丙基甲基-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0313] 6-氨基-1-乙基-3-环丙基甲基-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0314] 6-氨基-1-甲基-3-(2-甲基丙基)-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;和

[0315] 6-氨基-1-乙基-3-(2-甲基丙基)-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0316] C. 改变 R^1 和 R^2 的式 (1) 的化合物的制备

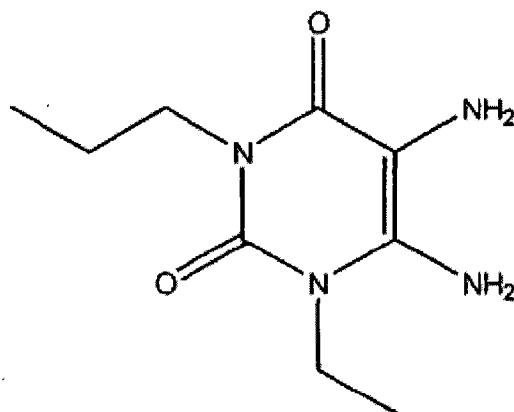
[0317] 类似地,按照实施例 5A 的步骤,但是用式 (8) 的其他化合物代替 6-氨基-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,制备式 (1) 的其他化合物:

[0318] 实施例 6

[0319] 式 (2) 的化合物的制备

[0320] A. 式 (2) 中 R^1 是正丙基且 R^2 是乙基的化合物的制备

[0321]



[0322] 向 6-氨基-1-乙基-5-亚硝基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (300mg) 的甲

醇 (10ml) 溶液中加入 10% 碳载钯催化剂 (50mg), 将混合物在 30psi 氢气下氢化 2 小时。将混合物通过沸石过滤, 在减压下除去溶剂, 得到式 (2) 的化合物 5,6-二氨基-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0323] MS m/z 213.03 (M^+), 235.06 ($M^+ + Na$)

[0324] B. 改变 R^1 和 R^2 的式 (2) 的化合物的制备

[0325] 类似地, 按照实施例 6A 的步骤, 但是用式 (1) 的其他化合物代替 6-氨基-1-乙基-5-亚硝基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备式 (2) 的以下化合物:

[0326] 5,6-二氨基-1-甲基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0327] 5,6-二氨基-1-甲基-3-环丙基甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0328] 5,6-二氨基-1-乙基-3-环丙基甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮;

[0329] 5,6-二氨基-1-甲基-3-(2-甲基丙基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮; 和

[0330] 5,6-二氨基-1-乙基-3-(2-甲基丙基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0331] C. 改变 R^1 和 R^2 的式 (2) 的化合物的制备

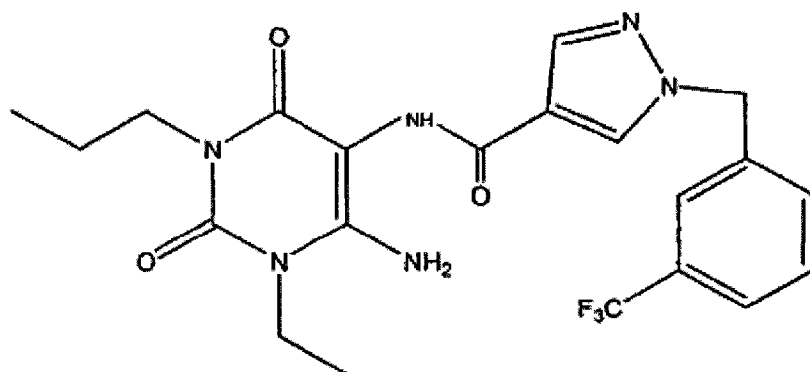
[0332] 类似地, 按照实施例 6A 的步骤, 但是用式 (1) 的其他化合物代替 6-氨基-1-乙基-5-亚硝基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备式 (2) 的其他化合物。

[0333] 实施例 7

[0334] 式 (3) 的化合物的制备

[0335] A. 式 (3) 中 R^1 是正丙基、 R^2 是乙基、X 是 1,4-吡唑基、Y 是亚甲基而 Z 是 3-三氟甲基苯基的化合物的制备

[0336]



[0337] 向 5,6-二氨基-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (100mg, 0.47mmol) 和 1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-4-羧酸 (carboxylic acid) (0.151g, 0.56mmol) 在甲醇 (10ml) 中的混合物加入 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二酰亚胺盐酸盐 (0.135g, 0.7mmol), 将反应混合物在室温下搅拌过夜。在减压下除去溶剂, 将残余物用 Bistag 纯化, 用 10% 的甲醇 / 二氯甲烷洗脱, 得到 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-丙基 (1,3-二氢嘧啶-5-基)) (1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]-吡唑-4-基) 羧酰胺。

[0338] 1H -NMR (DMSO- d_6) δ 8.59 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.59-7.71 (m, 4H), 6.71 (s, 2H), 5.51 (s, 2H), 3.91-3.96 (m, 2H), 3.70-3.75 (m, 2H), 1.47-1.55 (m, 2H), 1.14 (t, 3H, $J = 7.03$ Hz), 0.85 (t, 3H, $J = 7.42$ Hz)

[0339] B. 改变 R^1 , R^2 , X, Y 和 Z 的式 (3) 的化合物的制备

[0340] 类似地, 按照实施例 7A 或 7B 的步骤, 但是用式 (2) 的其他化合物代替 5,6-二氨

基-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,可选地用式 Z-Y-X-CO₂H 的其他化合物代替 1-{{3-(三氟甲基)苯基}甲基}吡唑-4-羧酸,制备式 (3) 的以下化合物:

[0341] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{{3-(三氟甲基)苯基}甲基}-吡唑-4-基)羧酰胺;

[0342] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{{3-(三氟甲基)苯基}甲基}-吡唑-4-基)羧酰胺;

[0343] N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{{3-(三氟甲基)苯基}甲基}-吡唑-4-基)羧酰胺;

[0344] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-乙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{{3-氟苯基}甲基}-吡唑-4-基)羧酰胺;

[0345] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{{3-氟苯基}甲基}-吡唑-4-基)羧酰胺;

[0346] N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{{3-氟苯基}甲基}-吡唑-4-基)羧酰胺;

[0347] N-[6-氨基-3-(环丙基甲基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)][1-苄基吡唑-4-基]羧酰胺;

[0348] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{{3-氰基苯基}甲基}-吡唑-4-基)羧酰胺;

[0349] [1-(2-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)乙基)吡唑-4-基]-N-[6-氨基-3-(环丙基甲基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)]羧酰胺;

[0350] N-[6-氨基-3-(环丙基甲基)-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)](1-{{6-(三氟甲基)(3-吡啶基)}甲基}吡唑-4-基)羧酰胺;

[0351] N-[6-氨基-3-丙基)-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)](1-{{2-吡啶基)}甲基}吡唑-4-基)羧酰胺;

[0352] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)][1-苄基吡唑-4-基]羧酰胺;

[0353] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)][1-{{3-氟苯基}甲基}吡唑-4-基]羧酰胺;

[0354] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)][1-{{3-氟苯基}甲基}吡唑-4-基]羧酰胺;

[0355] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)][1-{{3-(三氟甲基)苯基}甲基}吡唑-4-基]羧酰胺;和

[0356] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)](1-{{6-(三氟甲基)(3-吡啶基)}甲基}吡唑-4-基)羧酰胺。

[0357] C. 改变 R¹ 和 R² 的式 (2) 中的化合物的制备

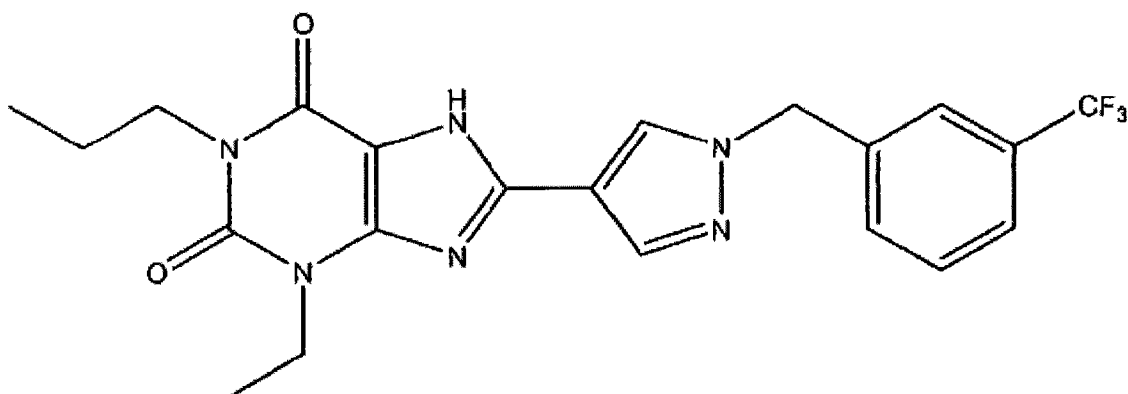
[0358] 类似地,按照实施例 7A 的步骤,但是可选地用式 (2) 的其他化合物代替 5,6-二氨基-1-乙基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,且可选地用式 Z-Y-X-CO₂H 的其他化合物代替 1-{{3-(三氟甲基)苯基}甲基}吡唑-4-甲酸,制备式 (3) 的其他化合物。

[0359] 实施例 8

[0360] 式 I 的化合物的制备

[0361] A. 式 I 中 R^1 是正丙基、 R^2 是乙基、X 是 1,4-吡唑基、Y 是亚甲基而 Z 是 3-三氟甲基苯基的化合物的制备

[0362]



[0363] 将 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-3-基)羧酰胺 (80mg, 0.17mmol)、10% 氢氧化钠水溶液 (5ml) 和甲醇 (5ml) 的混合物在 100℃ 下搅拌 2 小时。将混合物冷却后在减压下除去甲醇, 将残余物用水稀释并用盐酸酸化。滤出沉淀并用水冲洗后再用甲醇冲洗, 得到式 I 的化合物 3-乙基-1-丙基-8-(1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮。

[0364] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8.57 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.60-7.75 (m, 4H), 5.54 (s, 2H), 4.05-4.50 (m, 2H), 3.87-3.91 (m, 2H), 1.55-1.64 (m, 2H), 1.25 (t, 3H, $J = 7.03\text{Hz}$), 0.90 (t, 3H, $J = 7.42\text{Hz}$); MS m/z 447.2 (M^+)。

[0365] B. 改变 R^1 , R^2 , X, Y 和 Z 的式 I 的化合物的制备

[0366] 类似地, 按照实施例 8A 的步骤, 但是用式 (3) 的其他化合物代替 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-3-基)羧酰胺, 制备式 I 的以下化合物:

[0367] 1-环丙基甲基-3-甲基-8-[1-(苯基甲基)吡唑-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0368] 1-环丙基甲基-3-甲基-8-{1-[(3-三氟甲基苯基)甲基]吡唑-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0369] 1-环丙基甲基-3-乙基-8-{1-[(3-三氟甲基苯基)甲基]吡唑-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0370] 1-环丙基甲基-3-甲基-8-{1-[(3-氟苯基)甲基]吡唑-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0371] 1-环丙基甲基-3-乙基-8-{1-[(3-氟苯基)甲基]吡唑-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0372] 1-环丙基甲基-3-乙基-8-(1-[[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基]吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0373] 3-({4-[1-(环丙基甲基)-3-甲基-2,6-氧-1,3,7-三氢嘌呤-8-基]吡唑基}甲基)苯甲腈;

[0374] 8-[1-(2-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)乙基)吡唑-4-基]-3-甲基-1-环丙基甲基-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0375] 1-(2-甲基丙基)-3-甲基-8-[1-苄基吡唑-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0376] 1-(2-甲基丙基)-3-乙基-8-{1-[(3-氟苯基)甲基]吡唑-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0377] 1-(2-甲基丙基)-3-甲基-8-{1-[(3-三氟甲基苯基)甲基]吡唑-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0378] 1-(2-甲基丙基)-3-甲基-8-{1-[(3-氟苯基)甲基]吡唑-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0379] 3-乙基-1-(2-甲基丙基)-8-(1-{[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;

[0380] 1-乙基-3-甲基-8-{1-[(3-氟苯基)甲基]吡唑-4-基}-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮;和

[0381] 3-乙基-1-丙基-8-[1-(2-吡啶基甲基)吡唑-4-基]-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮。

[0382] C. 改变 R^1 , R^2 , X, Y 和 Z 的式 I 的化合物的制备

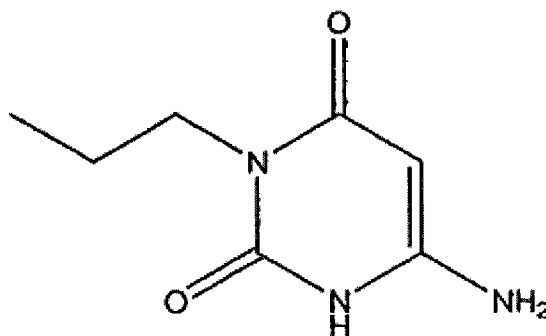
[0383] 类似地,按照实施例 8A 的步骤,但是用式 (3) 的其他化合物代替 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]-甲基}吡唑-3-基)羧酰胺,制备式 I 的其他化合物。

[0384] 实施例 9

[0385] 式 (10) 的化合物的制备

[0386] A. 式 (10) 中 R^1 是正丙基的化合物的制备

[0387]



[0388] 将 6-氨基尿嘧啶 (5.08g, 40mmol)、六甲基二硅氮烷 (50ml) 和硫酸铵 (260mg, 1.96mmol) 的混合物回流 12 小时。冷却后,滤出固体,在减压下从滤液中除去溶剂,得到 6-氨基尿嘧啶的三甲基硅烷化衍生物。

[0389] 将产物溶解于甲苯 (1.5ml)、碘丙烷 (7.8ml, 80mmol) 中,并在 120°C 油浴加热 2 小时。然后将反应混合物冷却至 0°C,缓慢加入饱和碳酸氢钠水溶液。滤出生成的沉淀,依次用水、甲苯和乙醚冲洗,得到式 (10) 的化合物 6-氨基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,其无需进一步纯化直接用于下一反应中。

[0390] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 10.34 (s, 1H), 6.16 (s, 2H), 4.54 (s, 1H), 3.57-3.62 (m, 2H),

1.41-1.51 (m, 2H), 0.80 (t, 3H, $J = 7.43\text{Hz}$)

[0391] B. 改变 R^1 的式 (10) 的化合物的制备

[0392] 类似地, 按照实施例 9A 的步骤, 但是用式 $R^1\text{Ha1}$ 的其他卤代烷代替碘丙烷, 制备式 (10) 的其他化合物, 包括:

[0393] 6-氨基-3-环丙基甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮; 和

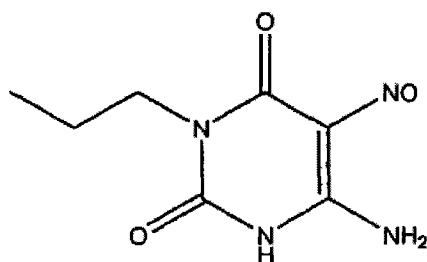
[0394] 6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0395] 实施例 10

[0396] 式 (11) 的化合物的制备

[0397] A. 式 (10) 中 R^1 是正丙基的化合物的制备

[0398]



[0399] 向 6-氨基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (5.6g) 在 50% 乙酸 / 水 (160ml) 中的 70°C 的混合物中在 15 分钟的时间段内按份加入亚硝酸钠 (4.5g)。将混合物在 70°C 下搅拌 45 分钟, 然后将混合物在减压下浓缩至较小的体积。滤出固体并用水冲洗, 得到式 (11) 的化合物 6-氨基-5-亚硝基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0400] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 11.42 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 3.77-3.81 (m, 2H), 3.33 (s, 1H), 1.55-1.64 (m, 2H), 0.89 (t, 3H, $J = 7.43\text{Hz}$); MS m/z 198.78 (M^+), 220.78 ($M^+ + \text{Na}$)。

[0401] B. 改变 R^1 的式 (11) 的化合物的制备

[0402] 类似地, 按照实施例 10A 的步骤, 但是用式 (10) 的其他化合物代替 6-氨基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备式 (11) 的其他化合物, 包括:

[0403] 6-氨基-5-亚硝基-3-环丙基甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮; 和

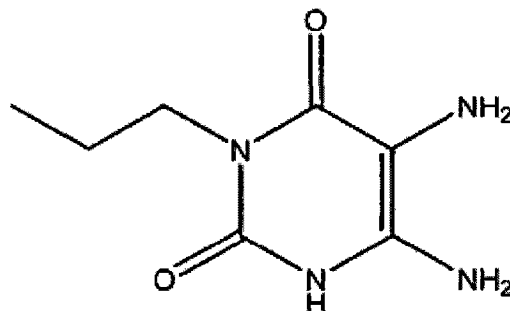
[0404] 6-氨基-5-亚硝基-3-(2-甲基丙基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0405] 实施例 11

[0406] 式 (12) 化合物的制备

[0407] A. 式 (12) 中 R^1 为正丙基的化合物的制备

[0408]



[0409] 在 70°C 下向 6-氨基-5-亚硝基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (5.4g, 27mmol) 在 12.5% 氨水 (135ml) 中的溶液在超过 15 分钟的时间内按份加入连二亚硫酸钠

($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 9.45g, 54mmol), 将混合物搅拌 20 分钟。在减压下浓缩溶液, 冷却至 5°C , 滤出沉淀, 并用冷水冲洗, 得到式 (12) 的化合物 5,6-二氨基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0410] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 0.81 (t, 3H, $J = 7.43\text{Hz}$), 1.43-1.52 (m, 2H), 3.63-3.67 (m, 2H), 5.56 (s, 2H); MS m/z 184.95 (M^+), 206.96 ($\text{M}^+ + \text{Na}$)

[0411] B. 改变 R^1 的式 (12) 的化合物的制备

[0412] 类似地, 按照实施例 11A 的步骤, 但是用式 (11) 的其他化合物代替 6-氨基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备式 (11) 的其他化合物, 包括:

[0413] 5,6-二氨基-3-环丙基甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮; 和

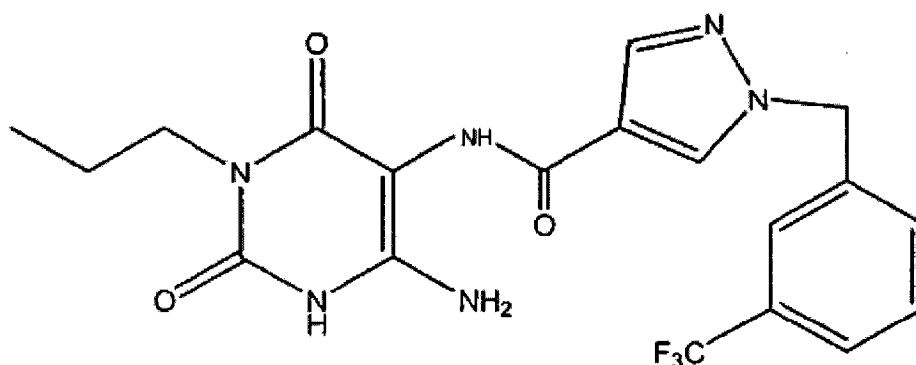
[0414] 5,6-二氨基-3-(2-甲基丙基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0415] 实施例 12

[0416] 式 (13) 的化合物的制备

[0417] A. 式 (13) 中 R^1 是正丙基、X 是 1,4-吡唑基、Y 是亚甲基而 Z 是 3-三氟甲基苯基的化合物的制备

[0418]



[0419] 向 5,6-二氨基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (2.3g, 126mmol) 和 1-([3-(三氟甲基)苯基]甲基)吡唑-4-甲酸 (3.79g, 14mmol) 在甲醇 (50ml) 中的混合物加入 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二酰亚胺盐酸盐 (2.67g, 14mmol), 反应混合物在室温下搅拌 3 天 (尽管少于这个时间也是可接受的)。滤出沉淀, 并依次用水和甲醇冲洗。将产物进行真空干燥, 获得式 (13) 的化合物 N-(6-氨基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基)) (1-([3-(三氟甲基)苯基]甲基)吡唑-4-基) 羧酰胺。

[0420] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 10.44 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.56-7.71 (m, 3H), 6.02 (s, 1H), 5.49 (s, 2H), 3.62-3.66 (m, 2H), 1.44-1.53 (m, 2H), 0.82 (t, 3H, $J = 7.43\text{Hz}$); MS m/z 458.92 ($\text{M}^+ + \text{Na}$)

[0421] B. 式 (3) 中 R^1 是正丙基、X 是 1,4-吡唑基、Y 是亚甲基而 Z 是 3-三氟甲基苯基的化合物的另一种制备方法

[0422] 1-([3-(三氟甲基)苯基]甲基)吡唑-4-甲酸 (1g, 3.7mmol) 的亚硫酸二氯 (1ml) 溶液在 70°C 加热 4 小时。滤出过量的亚硫酸二氯, 残余物用二氯甲烷/己烷处理。减压下除去溶剂, 残余物溶解于乙腈中。该溶液加入到 5,6-二氨基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (2.3g, 126mmol) 和三乙胺 (1ml) 在乙腈 (20ml) 中的 0°C 悬浮液中, 并搅拌 16 小时。将反应混合物用水 (5ml) 进行淬火 (quench), 用盐酸酸化, 搅拌 30 分钟, 并滤出沉淀。将产物用乙醚冲洗而获得式 (13) 的化合物 N-6-氨基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧

啉-5-基)) (1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺。

[0423] C. 改变 R^1 、X、Y 和 Z 的式 (13) 的化合物的制备

[0424] 类似地,按照实施例 12A 或 12B 的步骤,但是用式 (12) 的其他化合物可选地代替 6-氨基-3-丙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,且用式 $Z-Y-X-CO_2H$ 的其他化合物可选地代替 1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡啶-4-甲酸,制备式 (13) 的其他化合物,包括:

[0425] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;

[0426] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-(2-甲基丙基)(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;

[0427] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-氟苯基]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;

[0428] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-氟苯基]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;

[0429] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-(2-甲基丙基)(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-氟苯基]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;

[0430] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[1-苄基]吡啶-4-基)羧酰胺;

[0431] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[1-苄基]吡啶-4-基)羧酰胺;

[0432] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-(2-甲基丙基)(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[1-苄基]吡啶-4-基)羧酰胺;

[0433] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-氰基苯基]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;

[0434] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-氰基苯基]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;

[0435] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-(2-甲基丙基)(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-氰基苯基]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;

[0436] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[1-(2-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)乙基)吡啶-4-基]羧酰胺};

[0437] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[1-(2-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)乙基)吡啶-4-基]羧酰胺};

[0438] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-(2-甲基丙基)(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[1-(2-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)乙基)吡啶-4-基]羧酰胺};

[0439] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;

[0440] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺;和

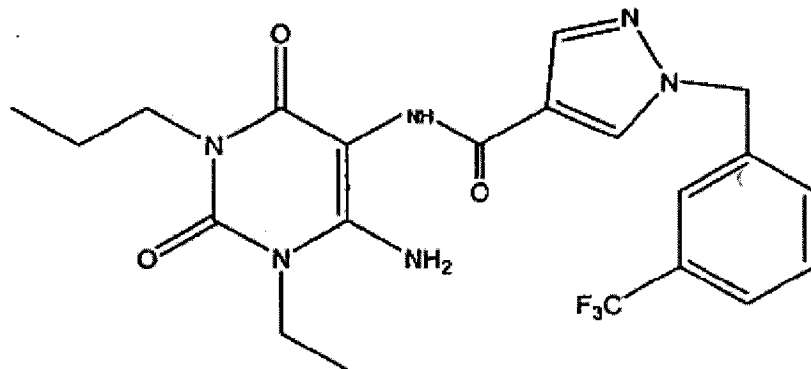
[0441] N-(6-氨基-2,4-二氧-3-(2-甲基丙基)(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基}吡啶-4-基)羧酰胺。

[0442] 实施例 13

[0443] 式 (3) 的化合物的制备

[0444] A. 式 (3) 中 R^1 是正丙基、 R^2 是乙基、X 为 1,4-吡唑基、Y 是亚甲基而 Z 为 3-三氟甲基苯基的化合物的制备

[0445]



[0446] 将 N-(6-氨基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-(三氟甲基)-苯基]甲基]吡唑-3-基)羧酰胺 (872mg, 2mmol) 的二甲基甲酰胺 (10ml) 溶液、碳酸钾 (552mg, 4mmol) 和碘乙烷 (0.24ml, 3mmol) 的混合物在室温下搅拌过夜。反应混合物经过过滤, 在减压下从滤液中除去溶剂。将残余物与水一起在室温下搅拌 2 小时, 滤出沉淀, 用水冲洗, 然后溶于甲醇中。然后在减压下除去溶剂得到式 (3) 的化合物 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺。

[0447] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 8.58 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.72-7.50 (m, 4H), 6.71 (s, 2H), 5.51 (s, 2H), 4.0-3.82 (m, 2H), 3.77-3.65 (m, 2H), 1.60-1.50 (m, 2H), 1.13 (t, 3H, $J = 6.8\text{Hz}$), 0.84 (t, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$) ; MS m/z 462.9 (M^+)

[0448] B. 改变 R^1 、X、Y 和 Z 的式 (13) 的化合物的制备

[0449] 类似地, 按照实施例 13A 的步骤, 但是用式 (13) 的其他化合物代替 N-(6-氨基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-(三氟甲基)-苯基]甲基]吡唑-3-基)羧酰胺, 制备式 (3) 的其他化合物, 包括:

[0450] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺;

[0451] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺;

[0452] N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺;

[0453] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-乙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-氟苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺;

[0454] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-氟苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺;

[0455] N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-氟苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺;

[0456] N-[6-氨基-3-(环丙基甲基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)][1-苄基吡唑-4-基]羧酰胺；

[0457] N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-环丙基甲基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-氰基苯基]甲基]-吡唑-4-基)羧酰胺；

[0458] [1-(2-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)乙基)吡唑-4-基]-N-[6-氨基-3-(环丙基甲基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)]羧酰胺；

[0459] N-[6-氨基-3-(环丙基甲基)-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)](1-[[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺；

[0460] N-[6-氨基-3-丙基)-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)](1-[(2-吡啶基)]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺；

[0461] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)][1-苄基吡唑-4-基]羧酰胺；

[0462] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)](1-[[3-氟苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺；

[0463] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)](1-[[3-氟苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺；

[0464] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)](1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺；和

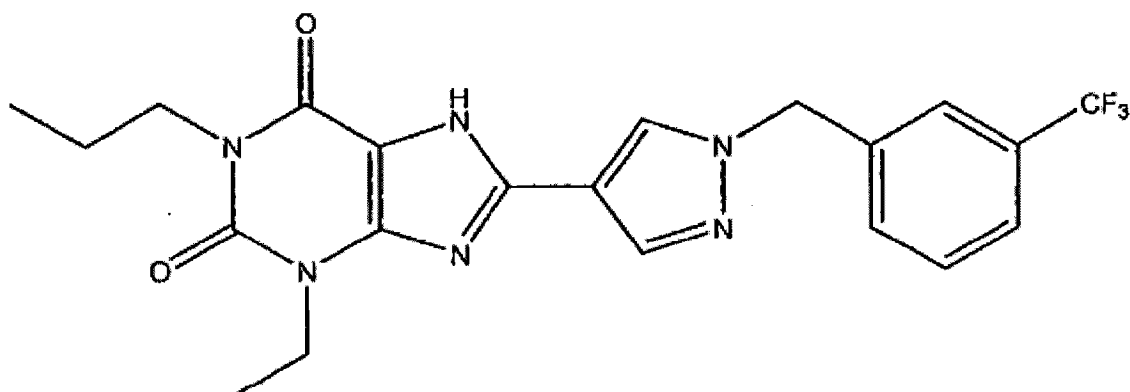
[0465] N-[6-氨基-3-(2-甲基丙基)-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基)](1-[[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]甲基]吡唑-4-基)羧酰胺。

[0466] 实施例 14

[0467] 式 I 的化合物的制备

[0468] A. 式 (3) 中 R^1 是正丙基、 R^2 是乙基、X 为 1,4-吡唑基、Y 是亚甲基而 Z 为 3-三氟甲基苯基的化合物的制备

[0469]



[0470] 将 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-3-基)羧酰胺(850mg, 2.34mmol)、10%氢氧化钠水溶液(10ml)和甲醇(10ml)的混合物在 100℃ 下搅拌 18 小时。将混合物冷却后,减压除去甲醇,将残余混合物用盐酸酸化至 pH 为 2。滤出沉淀,用水/甲醇冲洗混合物,得到式 I 的化合物 3-乙基-1-丙基-8-(1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮。

[0471] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8.57 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.60–7.75 (m, 4H), 5.54 (s, 2H), 4.05–4.50 (m, 2H), 3.87 ~ 3.91 (m, 2H), 1.55–1.64 (m, 2H), 1.25 (t, 3H, $J = 7.03\text{Hz}$), 0.90 (t, 3H, $J = 7.42\text{Hz}$); MS m/z 447.2 (M^+)

[0472] B. 式 I 中改变 R^1 、 R^2 、X、Y 和 Z 的化合物的制备

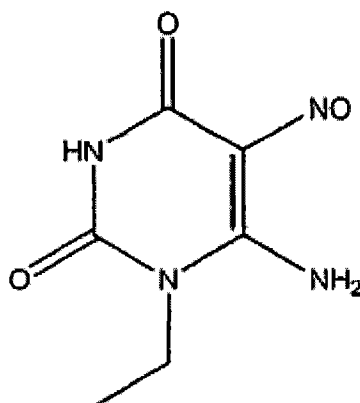
[0473] 类似地, 按照实施例 14A 的步骤, 但是用式 (13) 的其他化合物代替 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-3-基)羧酰胺, 制备式 I 的其他化合物, 包括实施例 8 中所列的那些。

[0474] 实施例 15

[0475] 式 (14) 的化合物的制备

[0476] A. 式 (14) 中 R^2 是乙基的化合物的制备

[0477]



[0478] 70℃下, 向 6-氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮 (5.0g, 32.3mmol) 的 50% 乙酸 / 水 (50ml) 混合物的溶液, 在 30 分钟的时间段内按份加入亚硝酸钠 (4.45g, 64.5mmol)。混合物在 70℃下再搅拌 30 分钟。将反应混合物冷却, 滤出沉淀, 用水冲洗, 然后用水冲洗后再用甲醇冲洗, 得到式 (14) 的化合物 6-氨基-1-乙基-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0479] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 11.52 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 3.83 (q, 2H, $J = 7.0\text{Hz}$), 1.11 (t, 3H, $J = 7.0\text{Hz}$). MS m/z 184.8 (M^+), 206.80 ($M^+ + \text{Na}$)。

[0480] B. 改变 R^2 的式 (14) 的化合物的制备

[0481] 类似地, 按照实施例 15A 的步骤, 但是用 6-氨基-1-甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮代替 6-氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备 6-氨基-1-甲基-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0482] C. 改变 R^2 的式 (14) 的化合物的制备

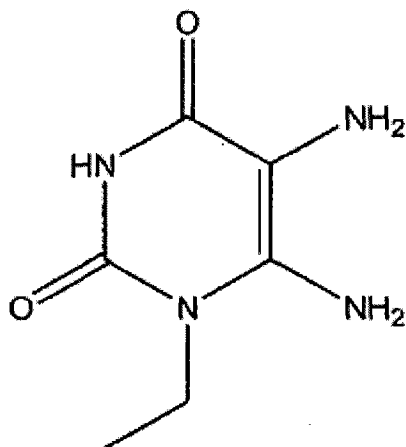
[0483] 类似地, 按照实施例 15A 的步骤, 但是用式 (5) 的其他化合物代替 6-氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备式 (14) 的其他化合物。

[0484] 实施例 16

[0485] 式 (15) 的化合物的制备

[0486] A. 式 (15) 中 R^2 是乙基的化合物的制备

[0487]



[0488] 50℃下,向6-氨基-1-乙基-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮(3.9g, 21.2mmol)的14.5%氨水(50ml)的溶液,在超过15分钟的时间按份加入连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 7.37g, 42.4mmol),将混合物搅拌20分钟。减压下浓缩至30mL的体积,冷却至50℃,滤出沉淀,用冷水冲洗,就获得式(15)的化合物5,6-二氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0489] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) : δ 10.58 (s, 1H), 6.18 (s, 2H), 3.83 (q, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 2.82 (s, 2H), 1.10 (t, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$)。

[0490] B. 式(15)中改变 R^2 的化合物的制备

[0491] 类似地,按照实施例16A的步骤,但是用6-氨基-1-甲基-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮代替6-氨基-1-乙基-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,制备5,6-二氨基-1-甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮。

[0492] C. 式(15)中改变 R^2 的化合物的制备

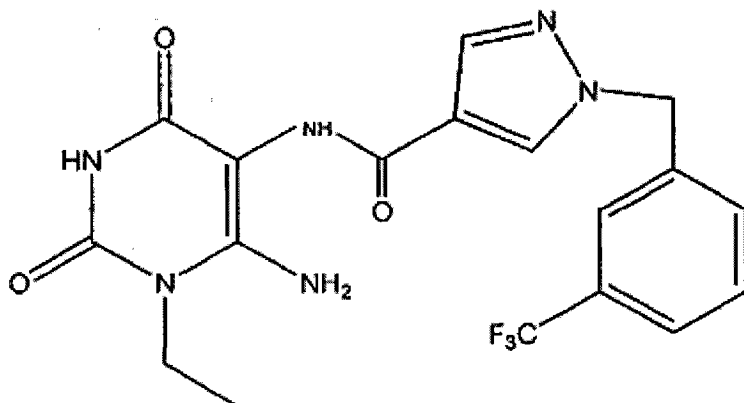
[0493] 类似地,按照实施例16A的步骤,但是用式(14)的其他化合物代替6-氨基-1-乙基-5-亚硝基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮,制备式(15)的其他化合物。

[0494] 实施例17

[0495] 式(16)的化合物的制备

[0496] A. 式(16)中 R^2 是乙基、X为1,4-吡唑基、Y是亚甲基而Z为3-三氟甲基苯基的化合物的制备

[0497]



[0498] 向5,6-二氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮(2g, 11.76mmol)和1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]吡唑-4-甲酸(3.5g, 12.94mmol)在甲醇(50ml)中的混合物加入

1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二酰亚胺盐酸盐 (2.47g, 12.94mmol), 反应混合物在室温下搅拌 16h。减压下除去溶剂, 残余物用水和甲醇冲洗。产品真空干燥, 获得式 (16) 的化合物 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-4-基)羧酰胺。

[0499] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 10.60 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.72-7.50 (m, 4H), 6.69 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 3.87 (q, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.11 (t, 3H, 7.2Hz); MS m/z 421 (M^+)。

[0500] B. 式 (16) 中改变 R^2 、X、Y 和 Z 的化合物的制备

[0501] 类似地, 按照实施例 17A 的步骤, 但是用 5,6-二氨基-1-甲基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮代替 5,6-二氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备 N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-4-基)羧酰胺。

[0502] C. 式 (16) 中改变 R^2 、X、Y 和 Z 的化合物的制备

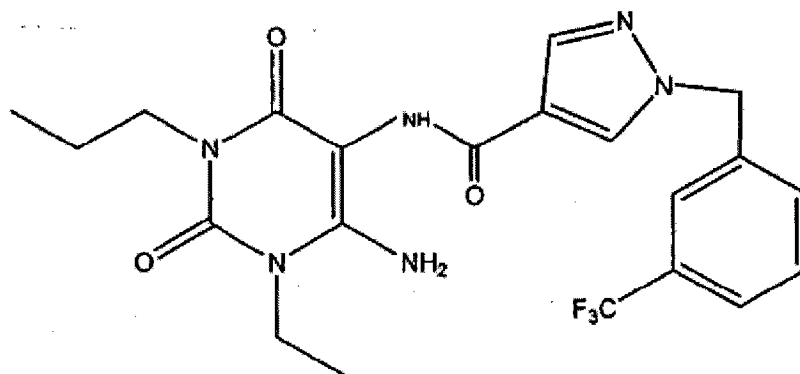
[0503] 类似地, 按照实施例 16A 的步骤, 但是用式 (14) 的其他化合物代替 5,6-二氨基-1-乙基-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮, 制备式 (15) 的其他化合物。

[0504] 实施例 18

[0505] 式 (3) 的化合物的制备

[0506] A. 式 (3) 中 R^1 是正丙基、 R^2 是乙基、X 为 1,4-吡唑基、Y 是亚甲基而 Z 为 3-三氟甲基苯基的化合物的制备

[0507]



[0508] 将 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-3-基)羧酰胺 (1.5g, 3.55mmol) 的二甲基甲酰胺 (30ml) 溶液、碳酸钾 (980mg, 7.1mmol) 和碘丙烷 (724mg, 4.26mmol) 的混合物在室温下搅拌过夜。加入水后, 滤出沉淀, 得到式 (3) 的化合物 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-4-基)羧酰胺, 其不需要进一步纯化就可以用于下一步反应。

[0509] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 8.58 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.72-7.50 (m, 4H), 6.71 (s, 2H), 5.51 (s, 2H), 4.0---3.82 (m, 2H), 3.77-3.65 (m, 2H), 1.60-1.50 (m, 2H), 1.13 (t, 3H, $J = 6.8\text{Hz}$), 0.84 (t, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$); MS m/z 462.9 (M^+)

[0510] B. 式 (3) 中改变 R^1 、 R^2 、X、Y 和 Z 的化合物的制备

[0511] 类似地, 按照实施例 18A 的步骤, 但是用 N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基))代替 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三

氟甲基)苯基]-甲基}吡唑-3-基)羧酰胺,制备 N-(6-氨基-1-甲基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-4-基)羧酰胺。

[0512] C. 改变 R^1 、 R^2 、X、Y 和 Z 到式 (3) 的化合物的制备

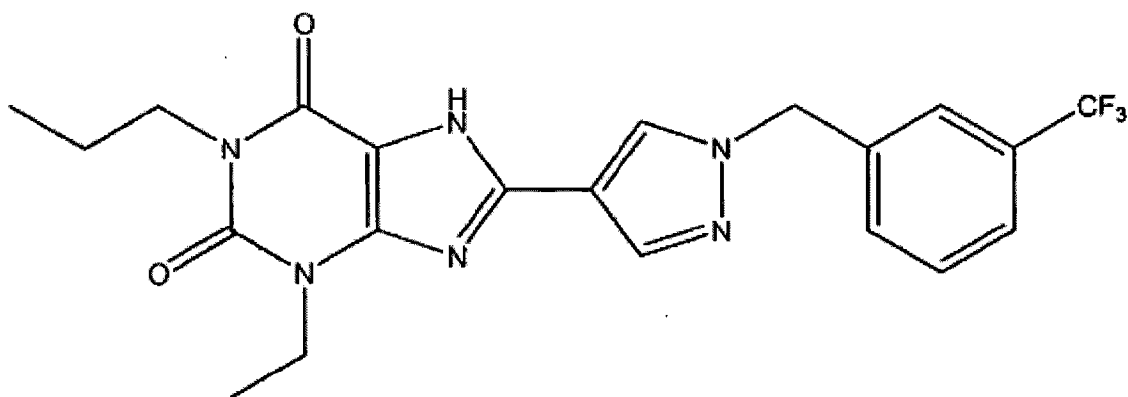
[0513] 类似地,按照实施例 18A 的步骤,但是用式 (15) 的其他化合物代替 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]-甲基}吡唑-3-基)羧酰胺,且可选地用式 R^1Ha1 的其他化合物代替碘丙烷,制备式 (3) 的其他化合物。

[0514] 实施例 19

[0515] 式 I 的化合物的制备

[0516] A. 式 I 中 R^1 是正丙基、 R^2 是乙基、X 为 1,4-吡唑基、Y 是亚甲基而 Z 为 3-三氟甲基苯基的化合物的制备

[0517]



[0518] 将 N-(6-氨基-1-乙基-2,4-二氧-3-丙基(1,3-二氢嘧啶-5-基))(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-3-基)羧酰胺(300mg, 464 μ mol)、20%氢氧化钠水溶液(5ml)和甲醇(10ml)的混合物在 80℃ 下搅拌 3 小时。混合物冷却后,减压除去甲醇。剩余混合物用盐酸酸化至 pH 等于 2。滤出沉淀,用水和甲醇冲洗,获得式 I 的化合物 3-乙基-1-丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基)苯基]甲基}吡唑-4-基)-1,3,7-三氢嘌呤-2,6-二酮。

[0519] 1H -NMR(DMSO- d_6) δ 8.57(s, 1H), 8.15(s, 1H), 7.60-7.75(m, 4H), 5.54(s, 2H), 4.05-4.50(m, 2H), 3.87-3.91(m, 2H), 1.55-1.64(m, 2H), 1.25(t, 3H, $J = 7.03$ Hz), 0.90(t, 3H, $J = 7.42$ Hz); MS m/z 447.2(M^+)

[0520] 实施例 20

[0521] A_{2B} 拮抗剂的表征

[0522] A_{2B} 腺苷受体的放射性配体结合

[0523] 将人类 A_{2B} 腺苷受体 cDNA 稳定转染入 HEK-293 细胞(称之为 HEK- A_{2B} 细胞)内。单层 HEK- A_{2B} 细胞用 PBS 冲洗一次,并在含有 10mM HEPES(pH7.4)、10mM EDTA 和蛋白酶抑制剂的缓冲液中收集。将这些细胞在 Polytron 在设置 4 上均质化 1 分钟,并在 4℃ 以 29000g 离心 15 分钟。细胞的片状沉淀(pellet)用含有 10mM HEPES(pH7.4)、1mM EDTA 和蛋白酶抑制剂的缓冲液冲洗一次,在补充了 10%蔗糖的相同缓冲液中再次悬浮。冷冻的等份试样在 -80℃ 下保存。

[0524] 通过将各种浓度的测试化合物和在补充了 1 单位/mL 腺苷脱氨酶的 TE 缓冲液(50mM Tris 和 1mM EDTA)中的 50 μ g 膜蛋白与 10nM 3H -ZM241385(Tocris Cookson)混合来

启动竞争测试。将该测试试样培养 90 分钟,通过使用 Packard Harvester 过滤停止培养,用冰冷的 TM 缓冲液 (10mM Tris, 1mM MgCl_2 , pH7.4) 冲洗 4 次。在 $10\ \mu\text{M}$ 的 ZM241385 存在下测定非特异性结合。化合物的亲和性 (即 K_i 值) 采用 GraphPad 软件计算。

[0525] 其他腺苷受体放射性配体结合

[0526] 将人类 A_1 、 A_{2A} 、 A_3 腺苷受体 cDNAs 稳定转染进入 CHO 或 HEK-293 细胞 (称之为 CHO- A_1 , HEK- A_{2A} , CHO- A_3)。采用如上述相同的方案由这些细胞制备细胞膜。通过把各种浓度的测试化合物和在补充了 1 单位 /mL 腺苷脱氨酶的 TE 缓冲液 (CHO- A_1 和 HEK- A_{2A} 的 50mM Tris 和 1mM EDTA) 或 TEM 缓冲液 (对于 CHO = A_3 的 50mM Tris, 1mM EDTA 和 10mM MgCl_2) 中的该观察的膜与 $0.5\text{nM}^3\text{H-CPX}$ (对于 CHO- A_1)、 $2\text{nM}^3\text{H-ZM241385}$ (HEK- A_{2A}) 或 $0.1\text{nM}^{125}\text{I-AB-MECA}$ (CHO- A_3) 混合开始竞争测试。将该测试试样培养 90 分钟,通过使用 Packard Harvester 过滤停止培养,用冰冷的 TM 缓冲液 (10mM Tris, 1mM MgCl_2 , pH7.4) 冲洗 4 次。在 $1\ \mu\text{M}$ CPX (CHO- A_1)、 $1\ \mu\text{M}$ ZM241385 (HEK- A_{2A}) 和 $1\ \mu\text{M}$ IB-MECA (CHO- A_3) 存在下测定非特异性结合。化合物的亲和性 (即 K_i 值) 采用 GraphPad™ 软件计算。

[0527] cAMP 检测

[0528] 在含 5mM EDTA 的 PBS 中收集单层转染细胞。用 DMEM 冲洗细胞一次,以 100,000 ~ 500,000 细胞 /mL 的密度再悬浮于含 1 单位 /mL 腺苷脱氨酶的 DMEM 中。将 100 μL 的细胞悬浮液与 25 μL 含各种激动剂和 / 或拮抗剂混合,反应在 37°C 下进行 15 分钟。在 15 分钟结束之时,加入 125 μL 的 0.2N HCl 停止反应。将细胞在 1000rpm 下离心 10 分钟。除去 100 μL 的上清液,并进行乙酰化。采用来自于 Assay Design 的 cAMP 直接测试法来测定上清液中 cAMP 的浓度。将 A_{2A} 和 A_{2B} 腺苷受体耦联 (couple) 于 Gs 蛋白,由此 A_{2A} 腺苷受体 (如 CGS21680) 或 A_{2B} 腺苷受体 (如 NECA) 的激动剂使得 cAMP 累积增加,而这些受体的拮抗剂则阻止由激动剂诱导的 cAMP 累积的增加。将 A_1 和 A_3 腺苷受体耦联于 Gi 蛋白,由此 A_1 腺苷受体 (如 CPA) 或 A_3 腺苷受体 (如 IB-MECA) 的激动剂抑制由福司柯林诱导的 cAMP 累积的增加。 A_1 和 A_3 受体的拮抗剂阻止对 cAMP 累积的抑制。

[0529] 采用实时 RT-PCR 来测定腺苷受体 (AdoR) 亚型在原始培养的人类肝星状细胞 (HHSCs) 上的表达水平。在 AdoRs 的四个亚型中, A_{2B} AdoR 表达水平最高。另外,用细胞 cAMP 浓度作为功能示值读数 (functional readout), 我们的结果示出,在 HHSCs 上, A_{2B} AdoRs 功能性地表达,而 A_1 、 A_{2A} , 或 A_3 AdoRs 没有功能性地表达。用 ELISA 来测定腺苷或 NECA、腺苷的稳定类似物对炎症细胞因子表达上的影响。腺苷和 NECA 以浓度依赖性的模式增加 IL-6 的释放,其最大增加为基准水平的 11.9 ± 3.1 倍。另外, NECA 使 α -平滑肌肌动蛋白和 α -1 前胶原的表达以及由 HHSCs 产生的胶原增加。NECA 的作用完全被 A_{2B} AdoR 拮抗剂抵消,并被 IL-6 中性化抗体部分阻断。

[0530] 实施例 21

[0531] A_{2B} 拮抗剂对人类肝星状细胞的影响

[0532] 缩写

[0533]	Ab	抗体
[0534]	AdoR	腺苷受体
[0535]	ADA	腺苷脱氨酶
[0536]	ANOVA	方差分析

- [0537] AST 天门冬氨酸酯氨基转移酶
[0538] CPA N6- 环戊基腺苷
[0539] DMEM Dulbecco 改性的 Eagle 介质
[0540] DMSO 二甲亚砜
[0541] DNase 脱氧核糖核酸酶
[0542] HEPES 4-(2- 羟基乙基)-1- 哌嗪乙磺酸
[0543] HHSCs 人类肝星状细胞
[0544] NECA 5' -(N- 乙基甲酰胺)- 腺苷

[0545] 材料及方法:

[0546] 材料

[0547] A_{2B} 受体的选择性拮抗剂 (8-(1-{[5-(4- 氯苯基)(1,2,4- 噁二唑-3- 基)] 甲基} 吡唑-4- 基)-1- 丙基-1,3,7- 三氢嘌呤-2,6- 二酮 (化合物 (1)) 和 3- 乙基-1- 丙基-8-(1-{[3-(三氟甲基) 苯基] 甲基} 吡唑-4- 基)-1,3,7- 三氢嘌呤-2,6- 二酮 (化合物 (2))) 由 CV Therapeutics Inc. (Palo Alto, CA) 的生物有机化学部门 (Department of Bio-Organic Chemistry) 合成, 该合成方法描述于我们早期的出版物 Zhong 等 (2004) Am J Respir Cell Mol Biol ;30(1):118~125。所有的其他试剂, 如咯利普兰、福司柯林、NECA 和腺苷脱氨酶 (ADA) 等, 如果不另外指出, 都是商购于 Sigma (St. Louis, MO)。

[0548] 细胞培养

[0549] 原始培养的正常人肝星状细胞 (HHSCs) 由 ScienCell Research Laboratories (San Diego, CA) 获得并采用星状细胞生长培养基 (ScienCell Research Laboratories) 进行培养。HHSCs 按常规在人工增湿培养器中以 5% 的 CO₂ 和 37°C 的条件进行生长, 当其达到 80~90% 的细胞覆盖时再重新接种。每次重新接种称为一次传代。用第 2~5 代的细胞来进行接下来的研究。

[0550] HHSCs 的刺激作用

[0551] 向 12- 孔组织培养板中以在星状细胞生长培养基中 1×10⁵ 个细胞 / 孔的密度接种 HHSCs, 使其附着 (adhere) 过夜并达到 ~90% 的融合。将细胞用 HEPES 缓冲的盐水冲洗 2 次, 并在含各种 AdoRs 激动剂或拮抗剂的 DMEM 中培养 1 或 24 小时。

[0552] RNA 提取和实时 RT-PCR

[0553] 采用 Stratagene Absolutely RNA™ RT-PCR Miniprep 试剂盒从 HHSCs 中提取总 RNA, 接着用 DNase 处理以消除潜在的基因组 DNA 的污染。腺苷受体的实时 RT-PCR 检测操作按照前述的文献 Zhong 等 (2004) Am J Respir Cell Mol Biol, 30(1):118-125 描述的内容来进行。

[0554] 所用的 α- 平滑肌肌动蛋白的特异性引物是:

[0555] 正向: 5' TGGGAATGGGACAAAAAGACA3' (SEQ ID NO. :1); 和

[0556] 逆向: 5' CGGTACTTCAGGGTCAGGAT3' (SEQ ID NO. :2),

[0557] 而 α-1 前胶原的引物是:

[0558] 正向: 5' CACCAATCACCTGCGTACAGA3' (SEQ ID NO. :3); 和

[0559] 逆向: 5' CAGATCACGTCATCGCACAAC3' (SEQ ID NO. :4),

[0560] 这些引物的每一种都按照基于来自 Genbank 的序列的推荐准则采用 Primer

Express2.0(Applied Biosystems) 进行设计。在 PCR 循环结束时,生成解离曲线(dissociation curve),以确保单个产物的放大,检测每一基因的循环阈值时间(Ct 值)。基于 Ct 值计算相对 mRNA 水平,在相同的样品中标准化成 β -肌动蛋白,并以 β -肌动蛋白 mRNA 的百分数表示。

[0561] cAMP 累积的测量

[0562] 采用 0.0025%胰蛋白酶和 2mM 的 EDTA 的 PBS 收集细胞,冲洗后在无苯酚 DMEM 中再悬浮至 1×10^6 个细胞/ml 的浓度,然后用 1U/ml 的 ADA 在室温下培养 30 分钟。然后用 AdoR 激动剂、拮抗剂和福司柯林在 50 μ M 的磷酸二酯酶 IV 抑制剂,咯利普兰(rolipram)的存在下进行处理。在 37°C 下培养 15 分钟之后,细胞被溶解,用 cAMP-Screen Direct™ System(Applied Biosystems) 根据制造商的说明书来测定 cAMP 浓度。

[0563] IL-6、胶原和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的测定

[0564] 在细胞培养基中采用从 Biosource(Camarillo, CA) 获得的 ELISA 试剂盒根据厂商说明书进行 IL-6 浓度的测定。用这些试剂盒进行 IL-6 检测的最低检测水平是 2pg/mL。采用 Sircol 胶原分析(Biobcolor Ltd., Belfast N. Ireland) 根据厂商说明书来测定可溶胶原在细胞介质中的浓度。采用 Infinity™ AST 分析(Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) 来测定 AST 在小鼠血浆中的活性。

[0565] 小鼠

[0566] 腺苷脱氨酶(ADA)-缺陷型小鼠按照文献 Blackburn 等(1998), J Biol Chem, 273(9):5093-5100 描述的内容产生和被基因型化。无 Ada 等位基因的纯合小鼠被称为 ADA-缺陷($ADA^{-/-}$),而无 Ada 等位基因的杂合小鼠称为 ADA 对照小鼠(ADA^{+})。所有的小鼠都处于混合的 129sv/C57BL/6J 背景上,所有的基因型比较都是在同窝出生的小鼠中进行。动物的护理按照规定的 NIH 准则实施。将小鼠安放于装有微型隔离盖(microisolator lid)的通风笼中,并在严格的防护实验方案下保持。没有发现细菌、寄生或真菌感染,笼中同窝小鼠的血清特征对于 12 种最常见的鼠科病毒呈阴性。

[0567] 拮抗剂治疗

[0568] 按照文献 Young 等(2004) J Immunol, 173(2):1380-1389 描述的内容通过筛选血液中的 ADA 酶活性在 $ADA^{-/-}$ 小鼠出生时,就将 $ADA^{-/-}$ 小鼠确定了。也按照文献 Young 等(2004) 描述的内容从产后 2 天按照 ADA 酶疗法对 $ADA^{-/-}$ 小鼠进行保持直至产后 21 天。在这个阶段,开始用化合物(2)(每次注射 1mg/kg)或赋形剂(玉米油/乙醇/DMSO)进行治疗。治疗过程包括在早上和傍晚进行内腹膜 i.p. 注射 17 天。治疗组群包括接受化合物(2)、赋形剂或没有进行治疗的 $ADA^{-/-}$ 和 ADA^{+} 小鼠。所有的小鼠都是同窝的,雄性和雌性都包含在这些试验中。

[0569] 统计学分析

[0570] 数据以至少 3 次单独试验的平均 $\pm$ SEM 表示。采用双测学生 t-测试(two-tailed Student's t-test),或对于多个对照的 ANOVA 之后接着 Newman-Keuls 检验来进行统计分析。 $p < 0.05$ 被认为是有意义的。

[0571] 结果

[0572] AdoR 亚型在 HHSCs 中的表达

[0573] 实施实时 RT-PCR 以量化 AdoRs 转染的水平。在四种亚型中, A_{2B} 受体具有最高的

转染水平（图 1）。也检测到 A_1 和 A_{2A} 受体转染的水平较低，而 A_3 受体的转染低于检测水平。因此，AdoR mRNA 水平的排序为 $A_{2B} > A_{2A} > A_1 > A_3$ 。

[0574] 在许多细胞类型中， A_{2A} 或 A_{2B} 受体的乙酰化导致细胞 cAMP 累积的增加，而 A_1 或 A_3 受体的激活降低了由腺苷酸环化酶活化子（activator），福司柯林引起的细胞 cAMP 的累积。为了识别功能性地表达于 HHSCs 的 AdoR 亚型，检测了非选择性激动剂 NECA 和几种其他的选择性激动剂在细胞 cAMP 累积上的作用。NECA 是腺苷的一种稳定的类似物，其激活包括 A_{2B} 受体在内的全部四种 AdoR 亚型。如图 2A 中所示，NECA 以浓度依赖性的方式增加了细胞 cAMP 累积。相反， A_{2A} 选择性激动剂 CGS-21680 ($\leq 10 \mu M$) 并未导致细胞 cAMP 浓度的显著增加。另外， A_1 选择性激动剂，CPA ($1 \mu M$)，和 A_3 选择性激动剂，IB-MECA ($1 \mu M$)，不能抑制由福司柯林 ($10 \mu M$ ，图 2B) 导致的细胞 cAMP 累积。

[0575] 因为没有 A_{2B} 受体选择性激动剂，所以测定了 A_{2B} 受体的选择性拮抗剂，化合物 (1) 对 NECA- 诱导的细胞 cAMP 累积的作用。化合物 (1) 对于 A_{2B} 受体具有高亲和力 ($K_i = 7nM$) 而对三种其他 AdoR 亚型具有非常低的亲和力 (K_i 值超过 A_1 、 A_{2A} 和 A_3 受体 $5 \mu M$) (Zhong 等 (2004) 以及 Zhong 等 (2005) Am J Respir Cell Mol Biol, 32(1):2-8)。如图 2A 中所示，化合物 (1) ($1 \mu M$) 显著地削弱了 NECA- 诱导的细胞 cAMP 累积。因此，采用细胞 cAMP 浓度作为 AdoR 功能性表达的示值读数，结果表明， A_{2B} 受体功能性地表达于 HHSC 中，而 A_1 、 A_{2A} 或 A_3 受体则没有。

[0576] A_{2B} 受体的激活增加了来自 HHSC 的 IL-6 释放

[0577] 用 ELISA 测定用腺苷和 NECA 处理的细胞的培养基中 IL-6 的浓度。如图 3 所示，腺苷和 NECA 以浓度依赖性的方式增加 IL-6 的释放。相对于赋形剂处理的细胞，NECA ($100 \mu M$) 会导致 IL-6 释放增加 11.9 ± 3.1 倍。为了确定 A_{2B} 受体在 NECA- 诱导的 IL-6 产生中的作用，用化合物 (1) ($1 \mu M$) 与 NECA ($10 \mu M$) 一起培养细胞。 A_{2B} 受体拮抗剂，化合物 (1) ($1 \mu M$) 降低了 NECA- 增加的 IL-6 释放的 $90.7 \pm 0.1\%$ (图 3B)。这些结果证实了 NECA- 诱导的 IL-6 释放是由 A_{2B} 受体亚型介导的。

[0578] NECA 对 α -平滑肌肌动蛋白和 α -1 前胶原表达的作用

[0579] 具有间质胶原累积的 HHSC 的激活是肝纤维化的标志， α -平滑肌肌动蛋白是肌成纤维细胞的标识，因此，增加的 α -平滑肌肌动蛋白表达是 HHSC 分化成肌成纤维细胞的指征。用实时 RT-PCR 测定 NECA 对 α -平滑肌肌动蛋白和 α -1 前胶原表达的作用。如图 4 所示，NECA 显著增加 α -平滑肌肌动蛋白 (图 4A) 和 α -1 前胶原 (图 4B) 的表达。这些结果暗示了 NECA 可以促进 HHSC 激化和胶原的生产。

[0580] 通过 A_{2B} 受体激活引起的逐渐增加的胶原产生部分由 IL-6 介导

[0581] 为了确认 NECA 在胶原产生中的作用，在用 NECA 处理的细胞的培养基中测定了可溶胶原的浓度。NECA 导致胶原释放的显著增加 (图 5)。NECA 的这种影响可通过 A_{2B} 拮抗剂，化合物 (1) 来抵消。为了确定 NECA 对胶原产生的影响是否依赖于 IL-6 的释放，可在 NECA 处理期间将中性化 Ab 的 IL-6 加入到细胞培养基中。中性化 Ab 的 IL-6 部分地且显著地减少了 NECA 的影响。这些结果说明 A_{2B} 受体的激活导致了胶原产生的增加，这种影响部分是由 HHSCs 释放的 IL-6 所介导的。

[0582] 在 ADA- 缺陷型小鼠中 A_{2B} 受体拮抗剂对 AST 水平的影响

[0583] ADA 代谢腺苷；因此腺苷水平的升高遍布于组织中，包括缺乏 ADA 的小鼠的肝，参

见 Blackburn 等 (1998), J Biol Chem, 273(9):5093-5100。在用载体或化合物 (2) 治疗的 ADA⁺ 和 ADA^{-/-} 小鼠中检测血浆 AST 水平。相比较于 ADA⁺ 小鼠, 在 ADA^{-/-} 小鼠中 AST 水平升高。用化合物 (2) 治疗 ADA^{-/-} 小鼠导致 AST 水平显著下降 (图 6)。这些结果暗示了, A_{2B} 受体拮抗剂能够阻止 ADA^{-/-} 小鼠中 AST 的升高。

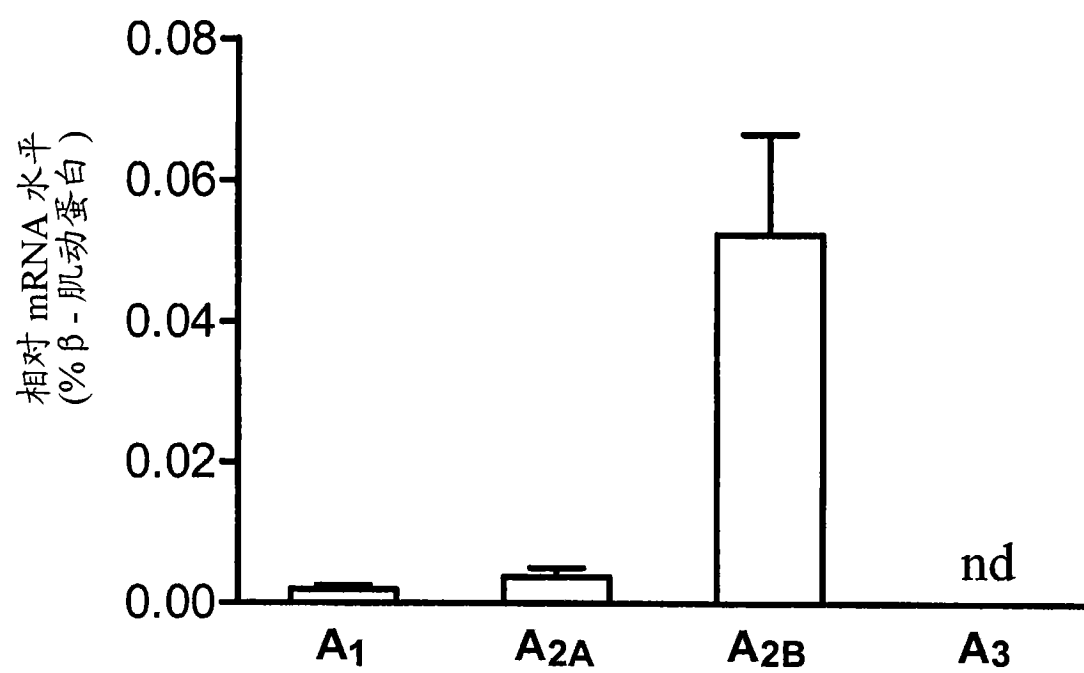


图 1

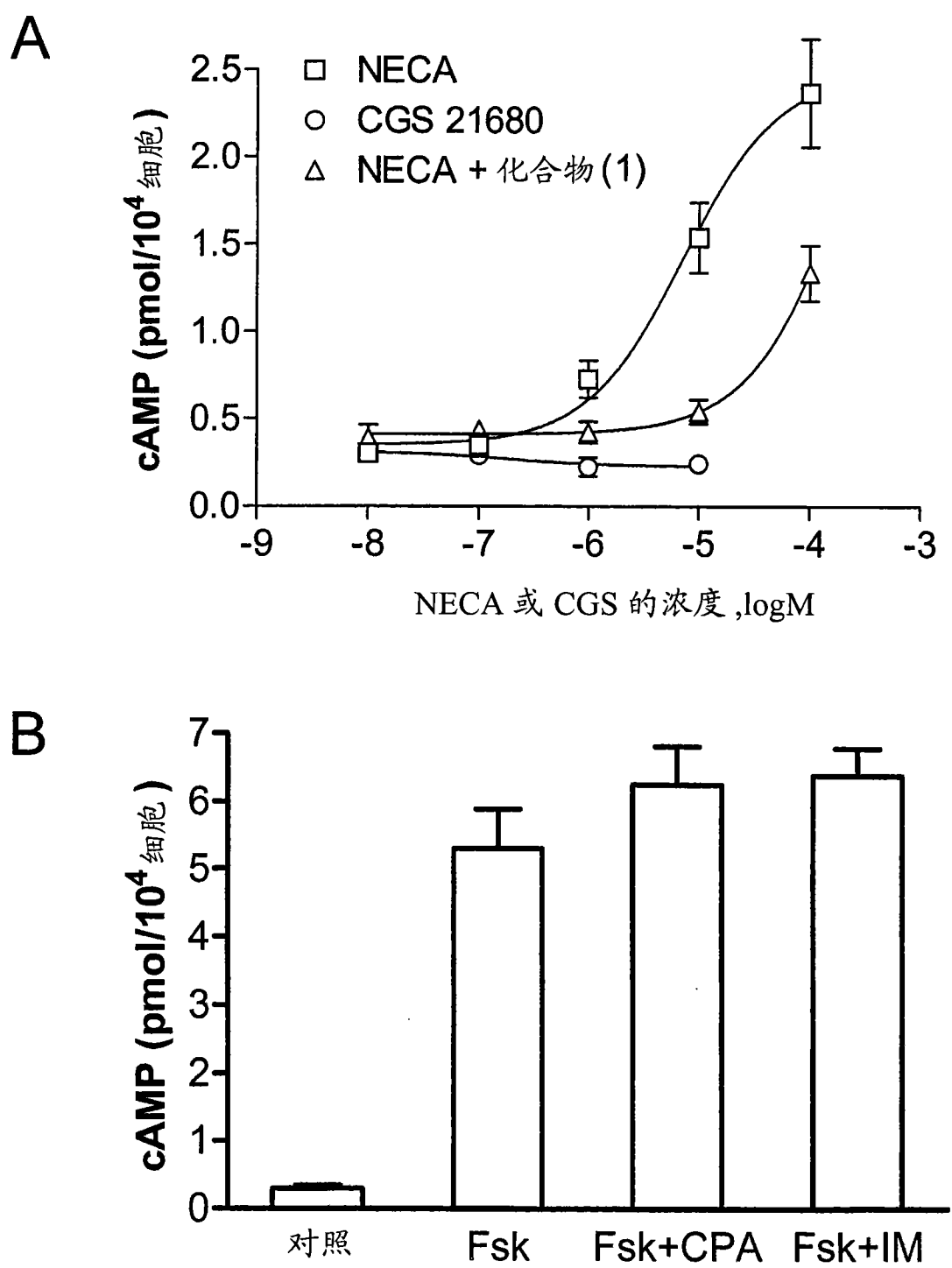


图 2

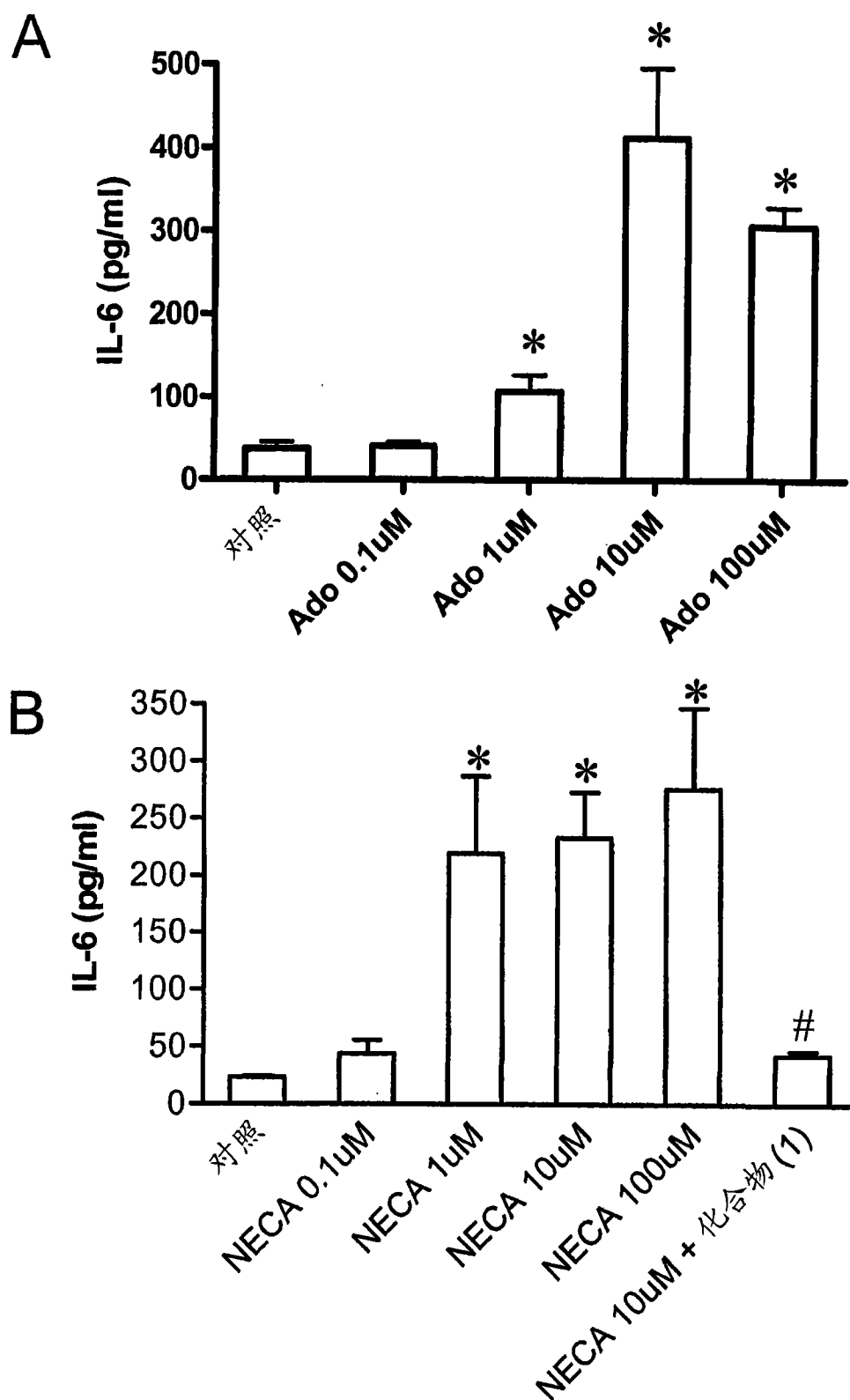


图 3

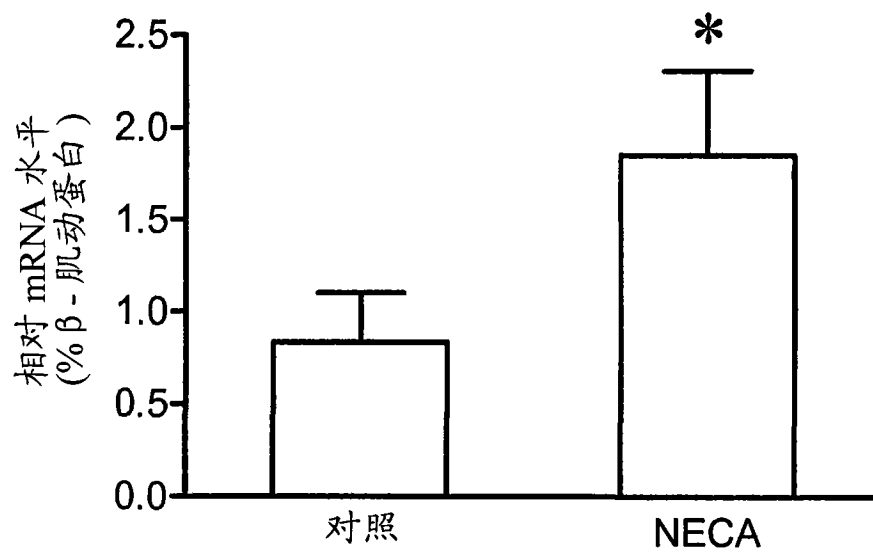
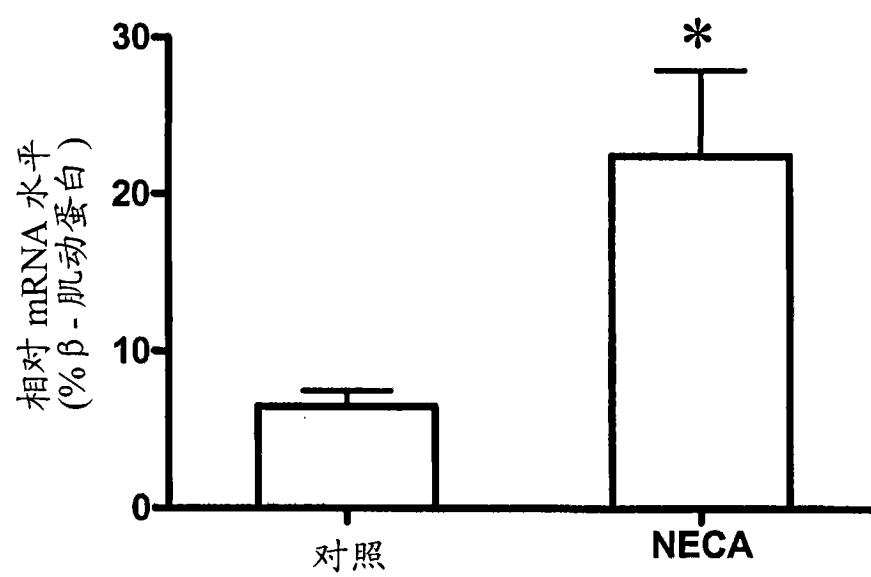
A**B**

图 4

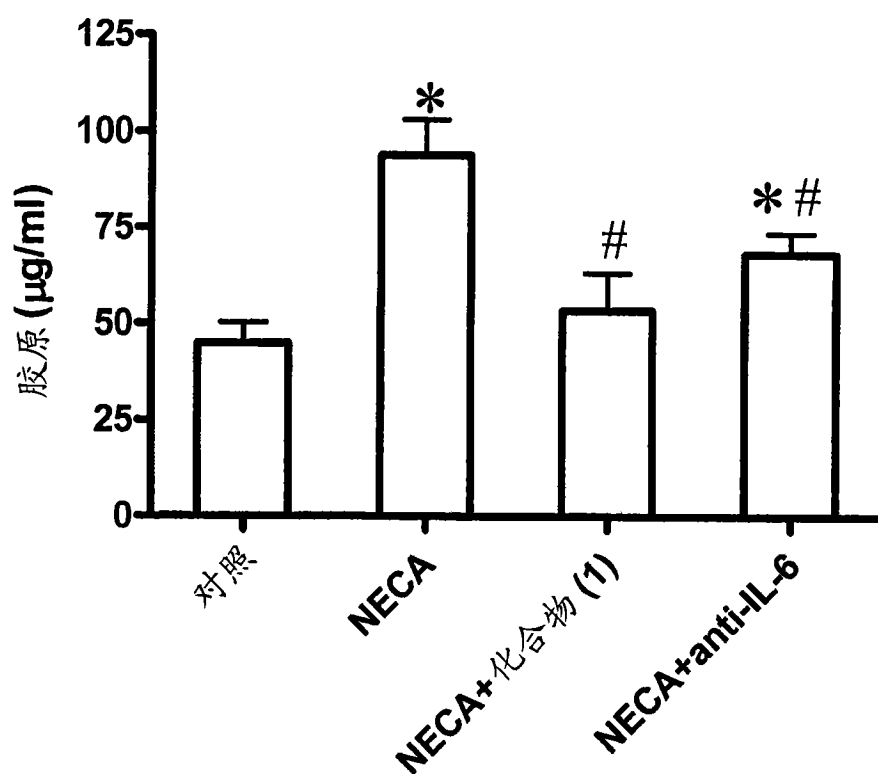


图 5

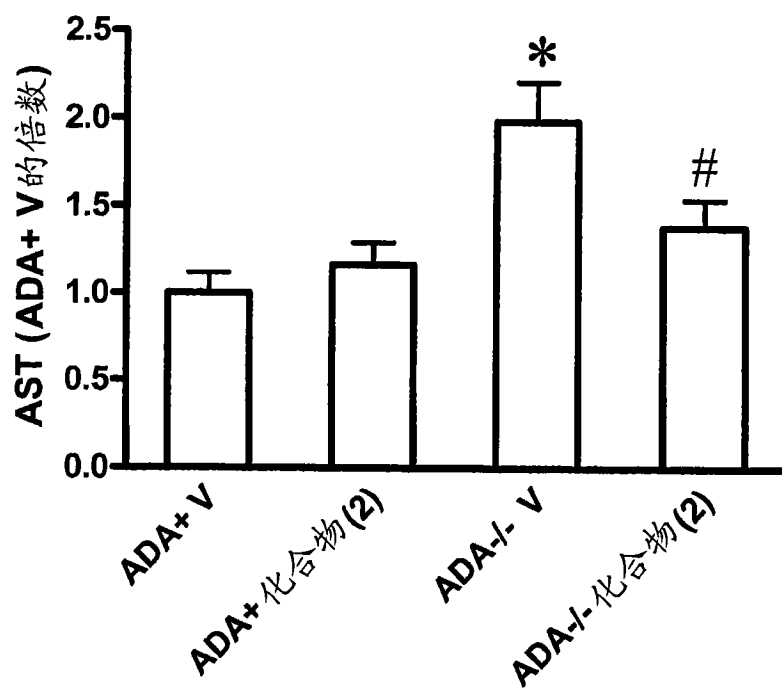


图 6