

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D471/16



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02813591.1

A61K 31/505 A61K 31/435

/(C07D471/16,

C07D239 : 00,

C07D211 : 00, C07D209 : 00),

(C07D471/16, C07D211 : 00,

C07D211 : 00, C07D209 : 00),

[11] 公开号 CN 1529705A

[43] 公开日 2004 年 9 月 15 日

[22] 申请日 2002.5.21 [21] 申请号 02813591.1

[30] 优先权

[32] 2001. 5. 21 [33] US [31] 60/292,660

[86] 国际申请 PCT/GB2002/002377 2002. 5. 21

[87] 国际公布 WO2002/094826 英 2002. 11. 28

[85] 进入国家阶段日期 2004. 1. 5

[71] 申请人 纽罗克里恩生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 SB 药物波多黎各公司

[72] 发明人 罗马诺·迪法比奥

加布里埃拉·金泰尔

穆斯塔法·哈达克

伊维斯·圣丹尼斯

约翰·P·威廉斯

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 赵仁临 张平元

(C07D471/16, C07D239 : 00,

C07D239 : 00, C07D211 : 00),

(C07D471/16, C07D239 : 00,

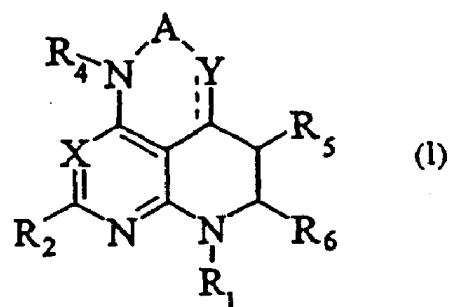
C07D211 : 00, C07D211 : 00)

权利要求书 4 页 说明书 36 页

[54] 发明名称 作为 CRF 受体拮抗剂的三 - 与四 - 氮杂茚衍生物

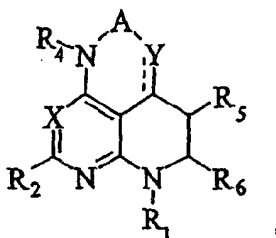
[57] 摘要

本发明公开了 CRF 受体拮抗剂, 它们具有治疗各种病症的应用, 包括治疗温血动物表现为 CRF 过度分泌的病症, 例如中风。 本发明的 CRF 受体拮抗剂具有下列式 (I) 结构: 包括其立体异构体、前体药物和药学上可接受的盐, 其中 R₁、R₂、R₄、R₅、R₆、A、X 和 Y 是如说明书中所定义的。 也公开了含有 CRF 受体拮抗剂与药学上可接受的载体的组合物, 以及它们的使用方法。



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

1、具有下列结构的化合物:



5 或其立体异构体、前体药物或药学上可接受的盐，
其中：

A 是键或 C=(Z);

X 是氮或 CR₃;

Y 是 -N=、-N(R₇)-、-C(R₈)=或 -O-;

10 Z 是 O、S 或 NR₉;

R₁ 是烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基;

R₂ 是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基、烷硫基、卤素、氰基、卤代烷基;

15 R₃ 是氢、烷基、取代的烷基、卤素或卤代烷基;

R₄ 是氢、烷基、取代的烷基、C(O)R₁、芳基、取代的芳基、杂环或取代的杂环;

R₅ 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷硫基、C(O)R₁、NR₁₀R₁₁ 或氰基;

20 R₆ 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷硫基、C(O)R₁、NR₁₀R₁₁ 或氰基;

R₇ 是氢、烷基、取代的烷基、C(O)R₁、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基;

25 R₈ 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷硫基、C(O)R₁、NR₁₀R₁₁ 或氰基;

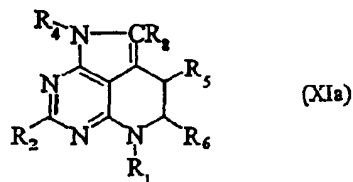
R₉ 是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基;

R_{10} 、 R_{11} 是相同或不同的，独立地是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基。

2、权利要求1的化合物，其中X是 CR_3 。

3、权利要求1的化合物，其中X是氮。

5 4、权利要求1的化合物，具有下列结构：



其中：

R_1 是烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基；

10 R_2 是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基、烷基硫基、卤素、氰基、卤代烷基；

R_3 是氢、烷基、取代的烷基、卤素或卤代烷基；

R_4 是氢、烷基、取代的烷基、 $C(O)R_1$ 、芳基、取代的芳基、杂环或取代的杂环；

15 R_5 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷基硫基、 $C(O)R_1$ 、 $NR_{10}R_{11}$ 或氰基；

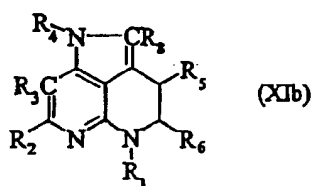
R_6 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷基硫基、 $C(O)R_1$ 、 $NR_{10}R_{11}$ 或氰基；

20 R_7 是氢、烷基、取代的烷基、 $C(O)R_1$ 、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基；

R_8 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷基硫基、 $C(O)R_1$ 、 $NR_{10}R_{11}$ 或氰基；

R_{10} 、 R_{11} 是相同或不同的，独立地是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基。

25 5、权利要求1的化合物，具有下列结构：



其中:

R_1 是烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基;

R_2 是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基、烷硫基、卤素、氰基、卤代
5 烷基;

R_3 是氢、烷基、取代的烷基、卤素或卤代烷基;

R_4 是氢、烷基、取代的烷基、 $C(O)R_1$ 、芳基、取代的芳基、杂环或取代的杂环;

R_5 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、
10 取代的杂芳基、烷氧基、烷硫基、 $C(O)R_1$ 、 $NR_{10}R_{11}$ 或氰基;

R_6 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷硫基、 $C(O)R_1$ 、 $NR_{10}R_{11}$ 或氰基;

R_8 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷硫基、 $C(O)$ 烷基、 $NR_{10}R_{11}$ 或氰基;

15 R_{10} 、 R_{11} 是相同或不同的, 独立地是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基。

6、权利要求 1 的化合物, 选自由下列化合物组成的组:

7-甲基-1-(1-丙基丁基)-5-[4-(1,1,2-三氟乙基)-2-三氟甲基苯基]-1,2,2a,3,4,5-六氢-1,5,6,8-四氮杂茚;

20 3-甲基-4-[7-甲基-1-(1-丙基丁基)-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苄腈;

4-[1-(1-乙基丙基)-7-甲基-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]-3-甲基苄腈;

25 3-氟-4-[7-甲基-1-(1-丙基丁基)-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苄腈;

3-氟-4-[1-(1-乙基丙基)-7-甲基-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苄腈;

5-(2,4-双三氟甲基苯基)-1-(1-乙基丙基)-7-甲基-1,3,4,5-四氢-1,5,6,8-四氮杂茚;

30 5-(2,4-双三氟甲基苯基)-7-甲基-1-(1-丙基丁基)-7-甲基-1,3,4,5-四氢-1,5,6-三氮杂茚。

7、组合物，包含权利要求 1 的化合物与药学上可接受的载体或稀释剂。

8、治疗温血动物表现为 CRF 过度分泌的病症的方法，包含对该动物给药有效量的权利要求 4 的药物组合物。

- 5 9、权利要求 5 的方法，其中该病症是中风。
- 10、权利要求 5 的方法，其中该病症是抑郁。
- 11、权利要求 5 的方法，其中该病症是焦虑。
- 12、权利要求 5 的方法，其中该病症是肠应激综合征(IRS)。
- 13、权利要求 5 的方法，其中该病症是炎性肠疾病(IRD)。

作为 CRF 受体拮抗剂的三-与四-氮杂萘衍生物

5 技术领域

本发明一般涉及 CRF 受体拮抗剂和通过对需要的温血动物给药这类拮抗剂治疗病症的方法。

发明背景

- 10 第一种促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)是从羊下丘脑中分离的,被鉴别为一种 41 个氨基酸的肽(Vale 等, Science 213: 1394-1397, 1981)。随后,分离了人和大鼠的 CRF 序列,经测定是相同的,但是在 41 个氨基酸残基中有 7 个不同于羊的 CRF (Rivier 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4851, 1983; Shibahara 等, EMBO J. 2: 775, 1983)。
- 15 已经发现 CRF 引起内分泌、神经和免疫系统功能发生意义深远的改变。据信 CRF 是垂体前叶基础性与应激性释放促肾上腺皮质激素(ACTH)、 β -内啡肽和其他源自阿黑皮素原(POMC)的肽的主要生理调节剂(Vale 等, Science 213: 1394-1397, 1981)。简而言之,据信 CRF 通过与一种血浆膜受体结合引发它的生物学效应,已经发现该受体遍布脑(DeSouza
- 20 等, Science 224: 1449-1451, 1984)、垂体(DeSouza 等, Methods Enzymol. 124: 560, 1986; Wynn 等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 110: 602-608, 1983)、肾上腺(Udelsman 等, Nature 319: 147-150, 1986)和脾(Webster, E. L., and E. B. DeSouza, Endocrinology 122: 609-617, 1988)。CRF 受体与一种 GTP-结合性蛋白质偶联(Perrin 等, Endocrinology 118: 1171-1179,
- 25 1986),后者介导 CRF-刺激的细胞内 cAMP 产生的增加(Bilezikjian, L. M., and W. W. Vale, Endocrinology 113: 657-662, 1983)。现已从大鼠(Perrin 等, Endo 133(6): 3058-3061, 1993)和人脑(Chen 等, PNAS 90(19): 8967-8971, 1993; Vita 等, FEBS 335(1): 1-5, 1993)克隆了 CRF 的受体。这种受体是一种 415 个氨基酸的蛋白质,包含七个跨膜结构域。大鼠与人序列之间的
- 30 同一性比较显示在氨基酸水平上具有高度的同源性(97%)。

除了在刺激 ACTH 和 POMC 产生中的作用以外,据信 CRF 也协调很

多对应激的内分泌、自主与行为反应,可能参与情感性精神病症的病理生理学。而且,据信 CRF 在免疫、中枢神经、内分泌与心血管系统之间的通讯上是一种关键的媒介(Crofford 等, *J. Clin. Invest.* 90: 2555-2564, 1992; Sapolsky 等, *Science* 238: 522-524, 1987; Tilders 等, *Regul. Peptides* 5: 77-84, 1982)。总之, CRF 似乎是关键性的中枢神经系统神经递质之一, 在整合机体对应激的总体反应上起到决定性作用。

CRF 直接对脑给药所引起的行为、生理与内分泌反应等同于对暴露于应激性环境中的动物所观察到的那些。例如, CRF 的脑室内注射导致行为活化(Sutton 等, *Nature* 297: 331, 1982)、脑电图的持续性活化(Ehlers 等, *Brain Res.* 278: 332, 1983)、交感肾上腺髓质途径的刺激(Brown 等, *Endocrinology* 110: 928, 1982)、心率与血压的增加(Fisher 等, *Endocrinology* 110: 2222, 1982)、耗氧量的增加(Brown 等, *Life Sciences* 30: 207, 1982)、胃肠活动的改变(Williams 等, *Am. J. Physiol.* 253: G582, 1987)、食物消耗的抑制(Levine 等, *Neuropharmacology* 22: 337, 1983)、性行为的变化(Sirinathsinghji 等, *Nature* 305: 232, 1983)和免疫功能丧失(Irwin 等, *Am. J. Physiol.* 255: R744, 1988)。

此外,临床数据提示在抑郁、焦虑相关性精神病症和神经性食欲缺乏中, CRF 可能在脑中过度分泌(DeSouza, *Ann. Reports in Med. Chem.*, 25: 215-223, 1990)。因此,临床数据提示 CRF 受体拮抗剂可能代表新颖的抗抑郁和/或抗焦虑药物,可以用于治疗表现为 CRF 过度分泌的神经精神样病症。

第一代 CRF 受体拮抗剂是肽类(例如参见 Rivier 等, 美国专利 No. 4,605,642; Rivier 等, *Science* 224: 889, 1984)。尽管这些肽类 CRF 受体拮抗剂确实能够削弱对 CRF 的药理反应,不过肽类 CRF 受体拮抗剂具有肽治疗剂的普遍缺点,包括缺乏稳定性和有限的口服活性。最近,已经报道了小分子 CRF 受体拮抗剂。例如,取代的 4-硫代-5-氧代-3-吡唑啉衍生物(Abreu 等, 美国专利 No. 5,063,245)和取代的 2-氨基噻唑衍生物(Courtemanche 等, 澳大利亚专利 No. AU-A-41399/93)已被报道作为 CRF 受体拮抗剂。发现这些特定的衍生物分别在 1 - 10 μ M 范围和 0.1 - 10 μ M 范围内有效抑制 CRF 与其受体的结合。

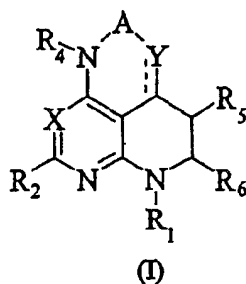
由于 CRF 的生理学意义,具有显著的 CRF 受体结合活性并且能够拮

抗 CRF 受体的生物活性小分子仍然是期望的目标。这类 CRF 受体拮抗剂将可用于治疗内分泌、精神病样与神经病样病症或疾病，一般包括应激相关病症。

- 5 尽管通过 CRF 受体拮抗剂的给药已经在实现 CRF 调节上取得了显著的进步，不过本领域仍然需要有效的小分子 CRF 受体拮抗剂。也需要含有这类 CRF 受体拮抗剂的药物组合物，以及涉及其使用的方法，例如治疗应激相关的病症。本发明满足了这些需要，提供了其他有关的优点。

发明概述

- 10 简而言之，本发明一般涉及 CRF 受体拮抗剂，更具体涉及具有下列一般结构(I)的 CRF 受体拮抗剂：



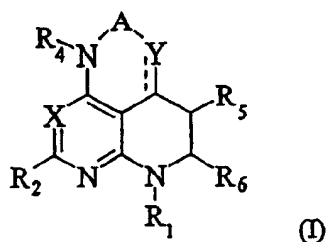
包括其立体异构体、前体药物和药学上可接受的盐，其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、A、X 和 Y 是如下所定义的。

- 15 本发明的 CRF 受体拮抗剂具有广泛的治疗应用，可以用于治疗各种病症或疾病，包括应激相关病症。这类方法包括对需要的动物给药有效量的本发明 CRF 受体拮抗剂，优选为药物组合物的形式。因此，在另一种实施方案中，公开了药物组合物，含有一种或多种本发明 CRF 受体拮抗剂与药学上可接受的载体和/或稀释剂。
- 20 参照下列详细说明，本发明的这些和其他方面将更加清楚。为此，本说明书列举多份参考文献，它们更详细地描述某些方法、化合物和/或组合物，在此全文引用作为参考。

发明的详细说明

- 25 本发明一般涉及可用作促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)受体拮抗剂的化合物。

在第一实施方案中，本发明的 CRF 受体拮抗剂具有下列结构(I)：



包括其立体异构体、前体药物和药学上可接受的盐，
其中：

- A 是键或 C=(Z);
- 5 X 是氮或 CR₃;
- Y 是 -N=、-N(R₇)-、-C(R₈)=或 -O-;
- Z 是 O、S 或 NR₉;
- R₁ 是烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基;
- 10 R₂ 是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基、烷硫基、卤素、氰基、卤代烷基;
- R₃ 是氢、烷基、取代的烷基、卤素或卤代烷基;
- R₄ 是氢、烷基、取代的烷基、C(O)R₁、芳基、取代的芳基、杂环或取代的杂环;
- 15 R₅ 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷硫基、C(O)R₁、NR₁₀R₁₁ 或氰基;
- R₆ 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷硫基、C(O)R₁、NR₁₀R₁₁ 或氰基;
- R₇ 是氢、烷基、取代的烷基、C(O)R₁、芳基、取代的芳基、杂芳基
- 20 或取代的杂芳基;
- R₈ 是氢、卤素、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烷氧基、烷硫基、C(O)烷基、NR₁₀R₁₁ 或氰基;
- R₉ 是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基;
- 25 R₁₀、R₁₁ 是相同或不同的，独立地是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基。

本文所用的上述术语具有下列含义。

“烷基”(“alkyl”)表示含有 1 至 10 个碳原子的直链或支链、无环或

环状、不饱和或饱和的脂族烃基，而术语“低级烃基”具有与烃基相同的含义，但是含有 1 至 6 个碳原子。代表性饱和直链烃基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等；饱和支链烃基包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性饱和环状烃基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、-CH₂ 环丙基、-CH₂ 环丁基、-CH₂ 环戊基、-CH₂ 环己基等；不饱和环状烃基包括环戊烯基和环己烯基等。环状烃基也被称为“碳环”，包括二-与多-碳环，例如十氢萘和金刚烷基。不饱和的烃基在相邻的碳原子之间含有至少一条双键或叁键(分别被称为“烯基”或“炔基”)。代表性直链与支链烯基包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基等；代表性直链与支链炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。

“芳基”表示芳族碳环部分，例如苯基或萘基。

“芳基烃基”(“arylalkyl”)表示这样一种烃基，至少一个烃基氢原子被芳基部分代替，例如苄基、-CH₂-(1-或 2-萘基)、-(CH₂)₂ 苯基、-(CH₂)₃ 苯基、-CH(苯基)₂ 等。

“杂芳基”表示 5 至 10 元的芳族杂环，具有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子，含有至少 1 个碳原子，包括单环的和二环的环系。代表性杂芳基包括(但不限于)呋喃基、苯并呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、吡咯基、吲哚基、异吲哚基、吡啶基、喹啉基、异喹啉基、咪唑基、异咪唑基、苯并咪唑基、吡唑基、咪唑基、苯并咪唑基、噻唑基、苯并噻唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、噌啉基、酞嗪基和喹唑啉基。

“杂芳基烃基”表示这样一种烃基，至少一个烃基氢原子被杂芳基部分代替，例如-CH₂ 吡啶基、-CH₂ 嘧啶基等。

“杂环”(本文也称为“杂环的环”)表示 5 至 7 元单环的或 7 至 14 元多环的杂环，它是饱和的、不饱和的或芳族的，含有 1 至 4 个独立选自氮、氧和硫的杂原子，其中氮和硫杂原子可以是任选被氧化的，氮杂原子可以是任选被季铵化的，也包括二环的环，其中任意上述杂环是与苯环稠合的，以及三环的(和更高级的)杂环的环。杂环可以是经由任意杂原子或碳原子连接的。杂环包括如上所定义的杂芳基。因而，除了上面列举的

芳族杂芳基以外,杂环还包括(但不限于)吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、乙内酰脲基、戊内酰胺基、氧杂环丙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基等。

- 5 “杂环烷基”表示这样一种烷基,至少一个烷基氢原子被杂环代替,例如-CH₂吗啉基等。

“环烷基”(“cycloalkyl”)表示含有3-8个碳原子的饱和或不饱和(但不是芳族)碳环,例如环戊烷、环己烷、环庚烷、环己烯等。

“环烷基环烷基”表示与环烷基环稠合的环烷基环,例如十氢萘。

- 10 “环烷基芳基”表示与芳基稠合的环烷基环,例如四氢萘。

“环烷基杂环”表示与杂环的环稠合的环烷基环。

本文所用的术语“取代”表示任意上述基团(例如烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环、杂环烷基等),其中至少一个氢原子被取代基代替。在酮基取代基(-C(=O)-)的情况下,两个氢原子被代替。当

- 15 被取代时,本发明上下文中的“取代基”包括卤素、羟基、氰基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基、烷氧基、烷硫基、卤代烷基、芳基、取代的芳基、芳基烷基、取代的芳基烷基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳基烷基、取代的杂芳基烷基、杂环、取代的杂环、杂环烷基、取代的杂环烷基、-NR_aR_b、-NR_aC(=O)R_b、-NR_aC(=O)NR_aR_b、-NR_aC(=O)OR_b、
20 -NR_aSO₂R_b、-OR_a、-C(=O)R_a、-C(=O)OR_a、-C(=O)NR_aR_b、-OC(=O)NR_aR_b、-SH、-SR_a、-SOR_a、-S(=O)₂R_a、-OS(=O)₂R_a、-S(=O)₂OR_a,其中R_a和R_b是相同或不同的,独立地是氢、烷基、卤代烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、芳基烷基、取代的芳基烷基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳基烷基、取代的杂芳基烷基、杂环、取代的杂环、杂环烷基或取代的
25 杂环烷基。

“卤素”表示氟、氯、溴和碘。

“卤代烷基”(“haloalkyl”)表示这样一种烷基,至少一个氢原子被卤素代替,例如三氟甲基等。

- 30 “烷氧基”表示通过氧桥连接的烷基部分(即-O-烷基),例如甲氧基、乙氧基等。

“烷硫基”表示通过硫桥连接的烷基部分(即-S-烷基),例如甲硫基、乙

硫基等。

“烷基磺酰基”(“alkylsulfonyl”)表示通过磺酰基桥连接的烷基部分(即-SO₂-烷基), 例如甲磺酰基、乙磺酰基等。

- 5 “烷基氨基”和“二烷基氨基”表示通过氮桥连接的一个或两个烷基部分(即-N-烷基), 例如甲氨基、乙氨基、二甲氨基、二乙氨基等。

“羟基烷基”表示被至少一个羟基取代的烷基。“单-或二-(环烷基)甲基”代表被一个或两个环烷基取代的甲基, 例如环丙基甲基、二环丙基甲基等。

“烷基羰基烷基”代表被-C(=O)烷基取代的烷基。

- 10 “烷基碳酸氧基烷基”代表被-C(=O)O 烷基或-OC(=O)烷基取代的烷基。

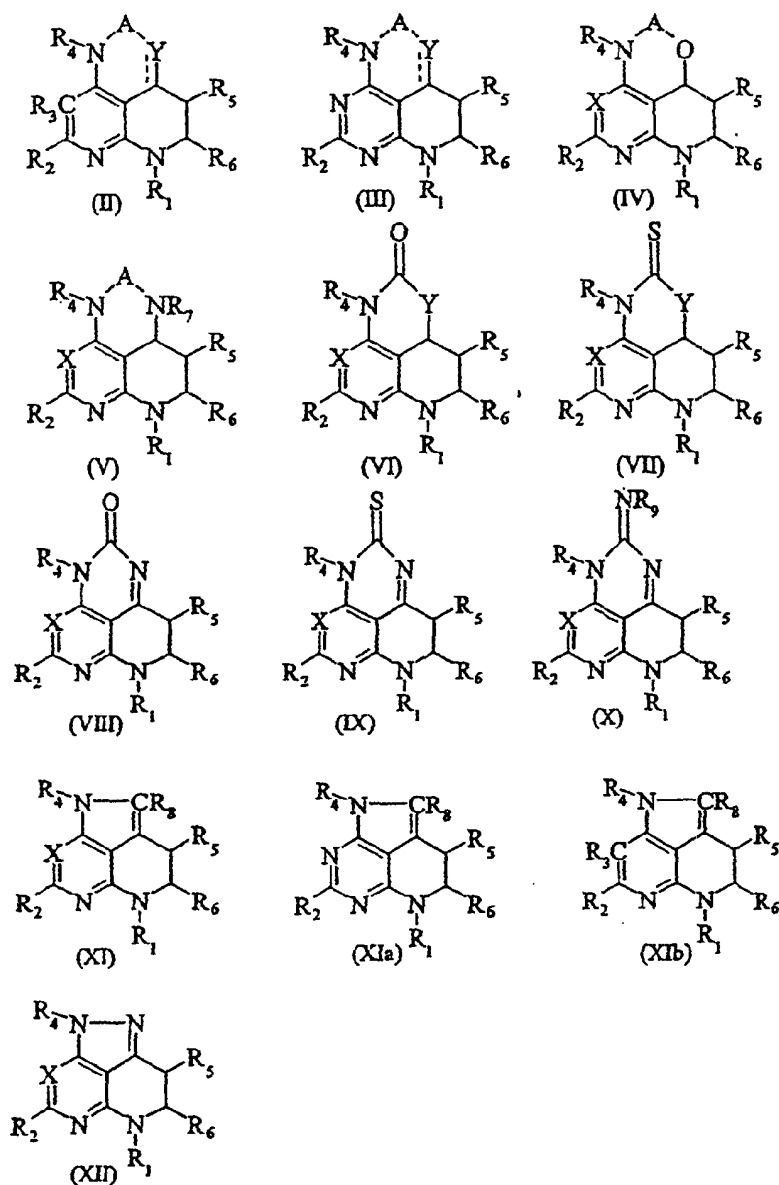
“羟基烷基”代表被-O-烷基取代的烷基。

“烷基硫基烷基”代表被-S-烷基取代的烷基。

“单-或二-(烷基)氨基”分别代表被一个烷基或两个烷基取代的氨基。

- 15 “单-或二-(烷基)氨基烷基”代表被单-或二-(烷基)氨基取代的烷基。

根据 A、X、Y 取代基, 本发明的代表性化合物包括下列结构(II)至(XII):



在本发明更具体的实施方案中，本发明的代表性 R₁ 基团包括(但不限于)2,4-二氯苯基、2,4-二甲基苯基、2-氯-4-甲基苯基、2-甲基-4-氯苯基、2,4,6-三甲基苯基、2-氯-4-甲氧基苯基、2-甲基-4-甲氧基苯基、2,4-二甲氧基苯基、2-三氟甲基-4-氯苯基、3-甲氧基-4-氯苯基、2,5-二甲氧基-4-氯苯基、2-甲氧基-4-三氟甲基苯基、2-甲氧基-4-异丙基苯基、2-甲氧基-4-三氟甲基苯基、2-甲氧基-4-异丙基苯基、2-甲氧基-4-甲基苯基、4-甲基-6-二甲氨基吡啶-3-基、4-二甲氨基-6-甲基吡啶-3-基、6-二甲氨基吡啶-3-基和 4-二甲氨基吡啶-3-基。

10 类似地，代表性 R₂ 基团包括氢和烃基(例如甲基和乙基)，代表性 R₃ 基团包括氢、卤素(例如氯、氟和溴)、烃基(例如甲基和乙基)或卤素烃基(例

如三氟甲基)。

根据本发明的优选化合物是：

7-甲基-1-(1-丙基丁基)-5-[4-(1,1,2-三氟乙基)-2-三氟甲基苯基]-1,2,2a,3,4,5-六氢-1,5,6,8-四氮杂茚(5-1-1)；

5 3-甲基-4-[7-甲基-1-(1-丙基丁基)-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苄腈(5-1-2)；

4-[1-(1-乙基丙基)-7-甲基-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]-3-甲基苄腈(5-1-3)；

10 3-氟-4-[7-甲基-1-(1-丙基丁基)-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苄腈(5-1-4)；

3-氟-4-[1-(1-乙基丙基)-7-甲基-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苄腈(5-1-5)；

5-(2,4-双三氟甲基苯基)-1-(1-乙基丙基)-7-甲基-1,3,4,5-四氢-1,5,6,8-四氮杂茚(5-1-6)；

15 5-(2,4-双三氟甲基苯基)-7-甲基-1-(1-丙基丁基)-7-甲基-1,3,4,5-四氢-1,5,6-三氮杂茚(6-1-1)。

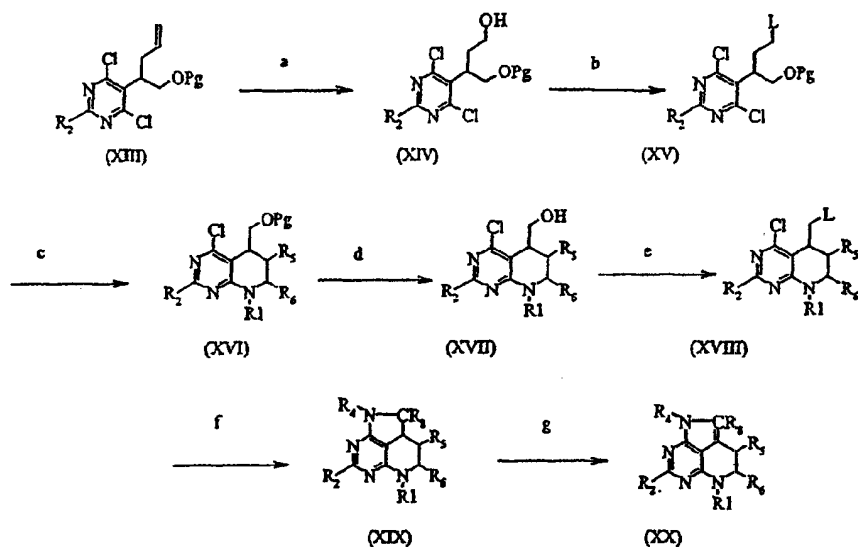
本发明的化合物一般可以其游离碱形式使用。作为替代选择，本发明的化合物可以酸加成盐的形式使用。本发明游离碱氨基化合物的酸加成盐可以通过本领域熟知的方法制备，可以从有机酸和无机酸生成。

20 适合的有机酸包括马来酸、苹果酸、富马酸、苯甲酸、抗坏血酸、琥珀酸、甲磺酸、对-甲苯磺酸、乙酸、草酸、丙酸、酒石酸、水杨酸、枸橼酸、葡萄糖酸、乳酸、扁桃酸、肉桂酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、乙醇酸、谷氨酸和苯磺酸。适合的无机酸包括盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和硝酸。因而，结构(I)的“药学上可接受的盐”用于涵盖任何和所有可接受的盐形式。

25 一般而言，结构(I)化合物可以按照本领域技术人员已知的有机合成方法以及实施例所述代表性方法加以制备。

确切而言，式(XIa)化合物可以按照下列方案1制备，从化合物(XIII)开始，其中羟基适宜被适合的保护基团(Pg)保护起来，它的制备如下实施例所述。

方案 1



其中:

- 5 步骤 a 代表双键的氧化性裂解,例如通过臭氧化;继之以还原性处理;
 步骤 b 代表羟基向离去基团的转化,例如甲磺酸酯;

步骤 c 代表在强碱性条件下被适合的苯胺衍生物 R_1NH_2 烷基化,继之以“就地”分子内环化;

- 10 步骤 d 代表羟基保护基团的去保护(例如 Et_3N-3HF , 在 DMF 中, 在室温下, 过夜);

步骤 e 代表羟基向离去基团的转化,例如甲磺酸酯;

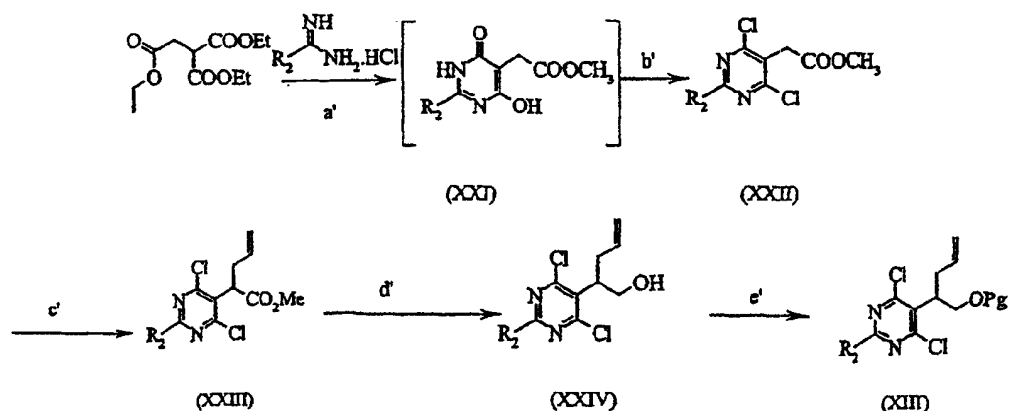
步骤 f 代表通过加热与适合的胺 R_4NH_2 反应;

步骤 g 代表通过被适合的氧化剂(例如 DDQ)氧化脱氢。

起始化合物(XIII)可以按照下列方案 2 方便地制备。

15

方案 2



其中:

步骤 a' 代表在碱性条件下(即 MeONa, 回流的甲苯)与适合的脒反应和分子内环化;

步骤 b' 代表氯化(方法类似于 Wayne G. C. 等, J. Prakt. Chem., (2000), 5 342(5), 504-7 所述方法);

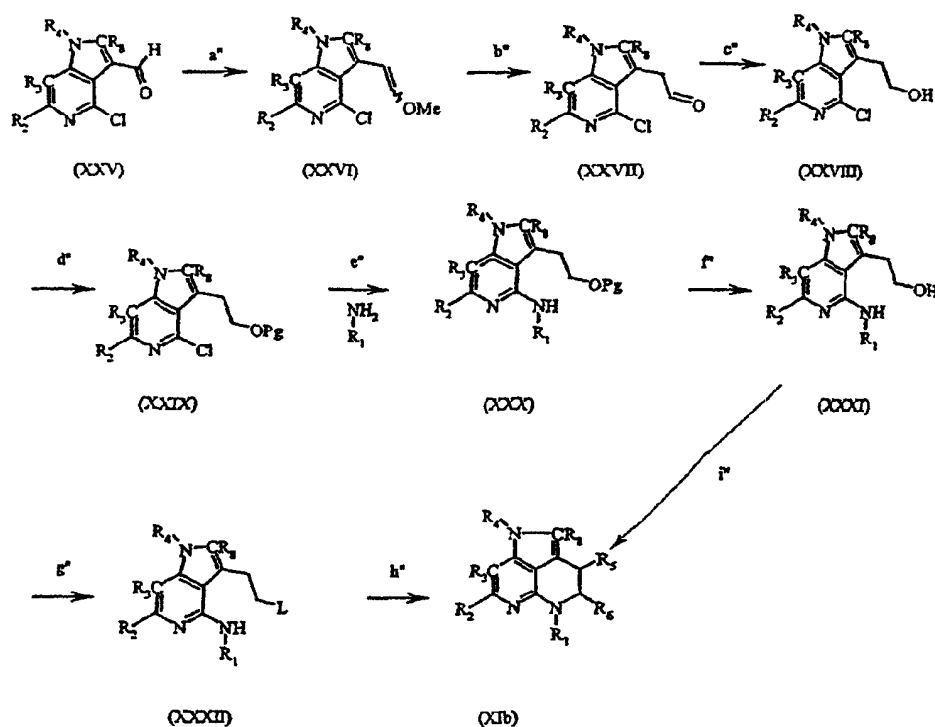
步骤 c' 代表在 0°C 碱性条件下(例如 LiHMDS)用烯丙基碘烯丙基化;

步骤 d' 代表在通常的条件下(CH₂Cl₂, 0°C 至室温)酯基用适合的还原剂, 例如 DIBAL-H 还原;

步骤 e' 代表羟基的保护, 优选用 t-BuPh₂SiCl (TBP), 在 DMF 中, 以 10 DMAP 作为催化剂(0°C 至室温)。

式(XIb)化合物可以按照下列方案 3 方便地制备, 从式(XXV)化合物开始。

方案 3



15 其中:

步骤 a'' 代表碳原子通过, 在适合的有机碱如 n-BuLi 的存在下与适合的內鎓盐进行 Wittig 反应而同系化。该反应是在质子惰性溶剂中进行的, 例如在乙腈或醚, 例如四氢呋喃中进行;

步骤 b'' 代表烯醇醚(XXVI)在酸性条件下(例如 HCl, 在 THF 中)的普

通水解;

步骤 c''代表醛基被适合的还原剂(例如 NaBH_4)还原;

步骤 d''代表羟基的保护, 优选用 $\text{t-BuMe}_2\text{SiCl}$ (TBS), 在 DMF 中, 以咪唑和 DMAP 作为催化剂(0°C 至室温);

- 5 步骤 e''代表在微波的帮助下与适合的苯胺衍生物 R_1NH_2 的 Buchwald 反应;

步骤 f''代表脱去羟基保护基(例如 $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$, 在 DMF 中, 在室温下, 过夜);

步骤 g''代表羟基向离去基团的转化, 例如甲磺酸酯;

- 10 步骤 h''代表在碱性条件下的分子内环化。

作为替代选择, 最终的化合物(XIb)可以通过分子内环化而从化合物(XXXI)得到, 例如通过在碱性条件(即 Et_3N)下羟基的甲磺酰化, 继之以就地环化(步骤 i'')。

- 在关于化合物(XIa)和(XIb)的本发明优选实施方案中, R_3 、 R_5 、 R_6 和
15 R_8 是氢。

- 适合的羟基保护基团的实例包括三烷基甲硅烷基醚, 例如三甲基甲硅烷基或叔丁基二甲基甲硅烷基醚。羟基保护基团可以通过熟知的标准方法除去(例如 *Protective Groups in Organic Chemistry*, p. 46-119, J F W McOmie 编辑(Plenum Press, 1973)所述那些)。例如, 当 R_b 是叔丁基二甲基甲硅烷基时, 用三乙胺三氢氟酸盐处理可以除去之。
20

- 本发明还包括同位素标记的化合物, 若非一个或多个原子被原子质量或质量数不同于自然界常见的原子质量或质量数的原子代替, 它们等同于式 I 和下文所引用的那些。可以结合在本发明化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、磷、氟、碘和氯的同位素, 例如 ^3H 、 ^{11}C 、
25 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{123}I 和 ^{125}I 。含有上述同位素和/或其他原子的其他同位素的本发明化合物和所述化合物的药学上可接受的盐都属于本发明的范围。同位素标记的本发明化合物, 例如结合有放射性同位素(例如 ^3H 和 ^{14}C)的那些可用于药物和/或底物组织分布测定法。氟、即 ^3H 和碳-14、即 ^{14}C 同位素是特别优选的, 因为它们容易制备和检测。 ^{11}C 和 ^{18}F 同位素特别可用于 PET(正电子发射断层显象法), ^{125}I 特别可用于 SPECT(单光子发射计算机断层显象法), 这都可用于脑部造影。进而, 被更重的同位素, 例如
30

氘、即 ^2H 取代，由于代谢稳定性可以提供一些治疗上的益处，例如延长体内半衰期或减少剂量需求，因而在有些情况下可能是优选的。同位素标记的本发明式 I 及下列化合物一般可以这样制备，实行下述方案和/或实施例所公开的方法，用容易得到的同位素标记的试剂代替非同位素标记的试剂。

化合物作为 CRF 受体拮抗剂的有效性可以通过各种测定方法加以测定。适合的本发明 CRF 拮抗剂能够抑制 CRF 与其受体的特异性结合，拮抗与 CRF 有关的活性。通过一种或多种公认用于此目的的测定法，可以评估结构(I)化合物作为 CRF 拮抗剂的活性，包括(但不限于)由 DeSouza 等(J. Neuroscience 7: 88, 1987)和 Battaglia 等(Synapse 1: 572, 1987)所公开的测定法。如上所述，适合的 CRF 拮抗剂包括证实有 CRF 受体亲合性的化合物。CRF 受体亲合性可以通过结合性研究测定，测量化合物抑制放射性标记的 CRF(例如 $[125\text{I}]$ 酪氨酸-CRF)与其受体(例如从大鼠脑皮质膜制备的受体)结合的能力。DeSouza 等(出处同上, 1987)所述放射性配体结合测定法提供了用于测定化合物对 CRF 受体的亲合性的测定法。这种活性通常是从 IC_{50} 计算的，后者是化合物从受体中代替 50%放射性标记的配体所需的浓度，以“ K_i ”值表示，利用下列方程计算：

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + L/K_D}$$

其中 L = 放射性配体, K_D = 放射性配体对受体的亲合性(Cheng and Prusoff, Biochem. Pharmacol. 22: 3099, 1973)。

除了抑制 CRF 受体结合以外，化合物的 CRF 受体拮抗剂活性可以通过化合物拮抗与 CRF 有关的活性的能力加以确定。例如，已知 CRF 刺激各种生物化学过程，包括腺苷酸环化酶活性。因此，化合物可以因它们拮抗 CRF-刺激的腺苷酸环化酶活性的能力而被评价为 CRF 拮抗剂，例如通过测量 cAMP 水平。Battaglia 等(出处同上, 1987)所述 CRF-刺激的腺苷酸环化酶活性测定法提供了用于测定化合物拮抗 CRF 活性的能力的测定法。因此，CRF 受体拮抗剂活性可以通过这样的测定方法加以测定，一般包括最初的结合测定法(例如由 DeSouza (出处同上, 1987)所公开的)，继之以 cAMP 筛选方案(例如由 Battaglia (出处同上, 1987)所公开的)。

关于 CRF 受体结合亲合性，本发明的 CRF 受体拮抗剂的 K_i 小于

10 μ M。在本发明的优选实施方案中，CRF 受体拮抗剂的 K_i 小于 1 μ M，更优选小于 0.25 μ M(即 250nM)。正如下文详细描述，本发明的代表性化合物的 K_i 值可以通过实施例 7 所述方法测定。

5 本发明的 CRF 受体拮抗剂证实有对 CRF 受体部位的活性，可以用作治疗剂，治疗多种病症或疾病，包括内分泌、精神病样和神经病样病症或疾病。更具体而言，本发明的 CRF 受体拮抗剂可以用于治疗由 CRF 的过度分泌引起的生理学疾病或病症。因为据信 CRF 是一种关键性的神经递质，激活和协调对应激的内分泌、行为与自主反应，所以本发明的 CRF 受体拮抗剂能够用于治疗神经精神病样病症。可以被本发明的 CRF 受体拮抗剂治疗的神经精神病样病症包括情感性精神病症，例如抑郁；焦虑相关性精神病症，例如泛化性焦虑症、恐慌症、强迫观念与行为症、异常的攻击、心血管异常(例如不稳定的绞痛和反应性高血压)；和进食病症，李芮神经性食欲缺乏、食欲过盛和肠应激综合征(IRS)。CRF 拮抗剂也可以用于治疗应激-诱发的与各种疾病状态有关的免疫抑制，以及中风。本
10 发明 CRF 拮抗剂的其他用途包括治疗炎症(例如类风湿性关节炎、眼色素层炎、气喘、炎性肠疾病(IRS)和 G.I.能动性)、库兴氏病、婴儿痉挛、癫痫与其他见于婴儿和成人的癫痫发作、和各种物质滥用与脱瘾(包括酗酒)。

在本发明的另一种实施方案中，公开了含有一种或多种 CRF 受体拮抗剂的药物组合物。出于给药的目的，本发明的化合物可以被配制成药物组合物。本发明的药物组合物包含本发明的 CRF 受体拮抗剂(即结构(I)化合物)和药学上可接受的载体和/或稀释剂。CRF 受体拮抗剂在组合物中的含量可有效治疗特定的病症——也就是说，足以达到 CRF 受体拮抗剂的活性，并且优选地对患者的毒性是可接受的。优选地，本发明的药物
20 组合物可以包括每剂 0.1mg 至 250mg CRF 受体拮抗剂，这取决于给药的途径，更优选为 1mg 至 60mg。本领域技术人员容易确定适当的浓度和剂量。

药学上可接受的载体和/或稀释剂是本领域技术人员所熟悉的。就配制成液体溶液的组合物而言，可接受的载体和/或稀释剂包括盐水和无菌水，并且可以任选地包括抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和其他公共添加剂。
30 组合物也可以被配制成丸剂、胶囊剂、颗粒剂或片剂，除了 CRF 受体拮

抗剂以外还含有稀释剂、分散剂与表面活性剂、粘合剂和润滑剂。本领域技术人员可以进一步按适当方法配制 CRF 受体拮抗剂，按照公认的惯例，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1990 所公开的那些。

- 5 另外，前体药物也包括在本发明的范围内。前体药物是任何共价键合的载体，在将这类前体药物对患者给药时，它们体内释放结构(I)化合物。前体药物一般通过以这样一种方式修饰官能团加以制备，以便该修饰被常规操作或体内裂解，生成母体化合物。

- 10 关于立体异构体，结构(I)化合物可以具有手性中心，因此可以存在外消旋物、外消旋混合物和个别的对映体或非对映体。所有这类异构体都包括在本发明内，包括它们的混合物。此外，有些结晶形式的结构(I)化合物可以存在多晶型，它们也包括在本发明中。另外，有些结构(I)化合物还可以与水或其他有机溶剂生成溶剂化物。这类溶剂化物同样包括在本发明的范围内。

- 15 在另一种实施方案中，本发明提供治疗多种病症或疾病的方法，包括内分泌、精神病样和神经病样病症或疾病。这类方法包括将本发明的化合物对温血动物给药，给药量足以治疗该病症或疾病。这类方法包括本发明 CRF 受体拮抗剂的全身给药，优选为药物组合物的形式。本文所用的全身给药包括口服和肠胃外给药方法。就口服给药而言，适合的 CRF
20 受体拮抗剂药物组合物包括粉剂、颗粒剂、丸剂、片剂和胶囊剂，以及液体、糖浆剂、混悬剂和乳剂。这些组合物还可以包括矫味剂、防腐剂、悬浮剂、增稠剂和乳化剂，和其他药学上可接受的添加剂。就肠胃外给药而言，本发明的化合物可以被制成含水注射溶液，除了 CRF 受体拮抗剂以外还可以含有缓冲剂、抗氧化剂、抗菌剂和其他常用于这类溶液的
25 添加剂。

- 如上所述，本发明化合物的给药能够用于治疗多种病症或疾病。确切而言，可以将本发明的化合物对温血动物给药，用于治疗抑郁、焦虑症、恐慌症、强迫观念与行为症、异常的攻击、不稳定的绞痛、反应性
30 高血压、神经性食欲缺乏、食欲过盛、肠应激综合征(IRS)、炎性肠疾病(IRD)、应激-诱发的免疫抑制、中风、炎症、库兴氏病、婴儿痉挛、癫痫和物质滥用或脱瘾。

出于阐述而非限制的目的, 提供下列实施例。

实施例

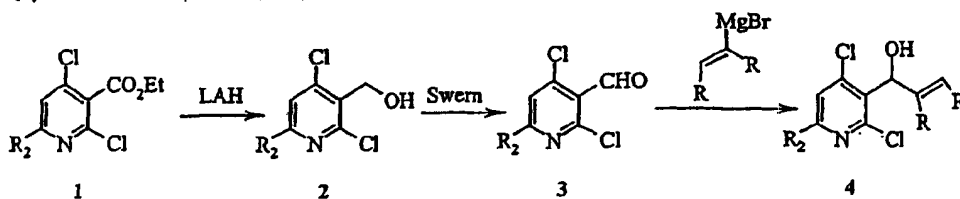
本发明的 CRF 受体拮抗剂可以通过实施例 1 至 6 所公开的方法制备。
 实施例 7 提供用于测定受体结合活性(Ki)的方法, 实施例 8 公开用于就
 5 CRF-刺激的腺苷酸环化酶活性筛选本发明化合物的测定法。

在中间体和实施例中, 除非另有规定:

熔点(m.p.)是在 Gallenkamp 熔点仪上测定的, 是未经校正的。所有的
 温度均以 $^{\circ}\text{C}$ 表示。红外光谱是在 FT-IR 仪上测量的。核磁共振($^1\text{H-NMR}$)
 谱是在 400MHz 下记录的, 化学位移是按照从用作内标的 Me_4Si 低磁场的
 10 ppm 数报告的(δ), 指定为单峰(s)、双峰(d)、双重双峰(dd)、三重峰(t)、
 四重峰(q)或多重峰(m)。柱色谱是在硅胶(Merck AG Darmstadt, Germany)
 上进行的。文中使用下列缩写: EtOAc = 乙酸乙酯, cHex = 环己烷, CH_2Cl_2
 = 二氯甲烷, Et_2O = 二乙醚, DDQ = 2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌, DMF
 = N,N-二甲基甲酰胺, DIPEA = N,N-二异丙基乙胺, MeOH = 甲醇, Et_3N
 15 = 三乙胺, TBS = 叔丁基二甲基甲硅烷基, TBP = 叔丁基二苯基甲硅烷基,
 TFA = 三氟乙酸, THF = 四氢呋喃, DIBAL-H = 氢化二异丁基铝, DMAP
 = 二甲氨基吡啶, LHMDs = 六甲基二硅氮烷基锂, TLC 表示在二氧化硅
 板上的薄层色谱, 干燥表示溶液经无水硫酸钠干燥, r.t. (RT)表示室温。

实施例 1

20 代表性吡啶中间体的合成



化合物 2

将氯代吡啶 1 溶于 THF, 在 -78°C 下加入到搅拌着的 LAH 的 THF 悬
 液中。将混合物在该温度下搅拌 6 小时, 在 -30°C 下搅拌 1 小时。然后将
 25 混合物小心地用水、15%含水 NaOH 和水处理, 并剧烈搅拌。使混合物温
 热至室温, 过滤。白色沉淀用乙酸乙酯充分洗涤。合并有机部分, 干燥
 (MgSO_4), 在真空下浓缩。经由快速色谱纯化, 得到所需产物 2。

化合物 3

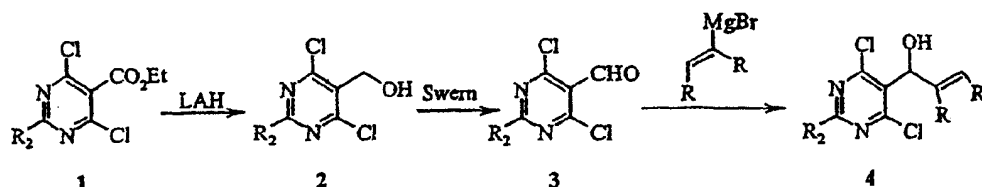
在-70°C下,向搅拌着的草酰氯(3当量)的二氯甲烷溶液加入DMSO(6当量),15分钟后,加入醇2(1当量)的二氯甲烷溶液,然后加入三乙胺。使混合物温热至室温,搅拌1小时。将混合物用含水碳酸氢钠(75ml)洗涤,干燥(MgSO₄),在真空下浓缩。经由快速色谱纯化,得到所需产物3。

5 化合物4

在-78°C下,向搅拌着的醛3(1当量)的THF溶液加入溴化烯基镁的THF溶液(1当量)。将混合物在该温度下搅拌30分钟,温热至室温,用含水碳酸氢钠猝灭。混合物用乙酸乙酯萃取,合并萃取液,干燥(MgSO₄),在真空下浓缩。经由快速色谱纯化,得到所需产物4。

10 实施例2

代表性嘧啶中间体的合成



化合物2

将氯代嘧啶1溶于THF,在-78°C下加入到搅拌着的LAH在THF中的悬液中。将混合物在该温度下搅拌6小时,在-30°C下搅拌1小时。然后将混合物小心地用水、15% NaOH水溶液和水处理,并剧烈搅拌。使混合物温热至室温,过滤。白色沉淀用乙酸乙酯充分洗涤。合并有机部分,干燥(MgSO₄),在真空下浓缩。经由快速色谱纯化,得到所需产物2。

化合物3

在-70°C下,向搅拌着的草酰氯(3当量)的二氯甲烷溶液加入DMSO(6当量)。15分钟后,加入醇2(1当量)的二氯甲烷溶液,然后加入三乙胺。使混合物温热至室温,搅拌1小时。将混合物用碳酸氢钠水溶液(75ml)洗涤,干燥(MgSO₄),在真空下浓缩。经由快速色谱纯化,得到所需产物3。

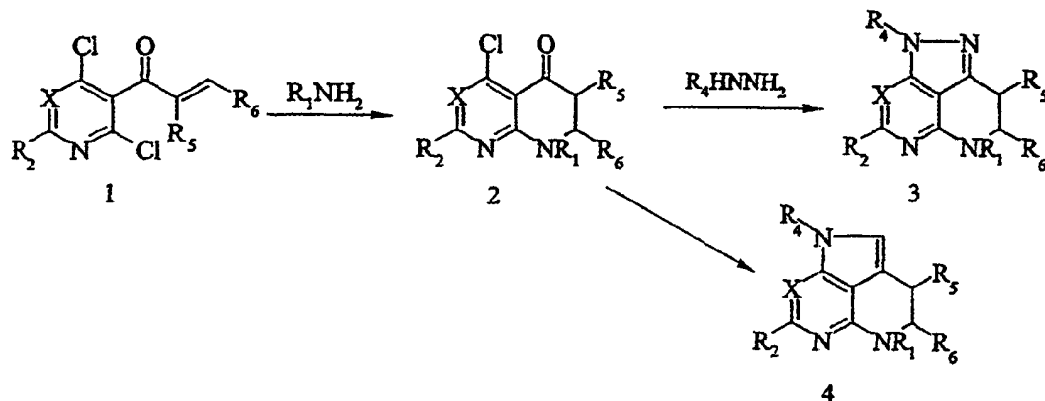
25 化合物4

在-78°C下,向搅拌着的醛3(1当量)的THF溶液加入溴化烯基镁的THF溶液(1当量)。将混合物在该温度下搅拌30分钟,温热至室温,用碳酸氢钠水溶液猝灭。混合物用乙酸乙酯萃取,合并萃取液,干燥

(MgSO₄), 在真空下浓缩。经由快速色谱纯化, 得到所需产物 4。

实施例 3

代表性结构(I)化合物的合成



5 化合物 2

将烯酮 1 (来自上例 1 和 2 的化合物 4, 4.26mmol)、R₁NH₂ (4.3mmol) 与甲苯磺酸一水合物(4.3mmol)的乙醇(20ml)溶液在 60°C 下加热 16 小时。将混合物浓缩, 溶于乙酸乙酯(50ml), 用 NaHCO₃ 水溶液(20ml)洗涤, 干燥(MgSO₄), 在真空下浓缩。残余物经过硅胶柱色谱纯化(用含 25% 乙酸乙酯的己烷溶液洗脱), 得到 2。

化合物 3

在 -25°C 下, 向搅拌着的氧化磷(66mg, 0.27mmol)的 THF (2ml)溶液加入 LDA 的 THF 溶液(0.325M, 0.83ml, 0.27mmol)。15 分钟后, 加入化合物 2 (11mg, 0.034mmol)的 THF (1ml)溶液, 将混合物搅拌 15 分钟。加入 NaH (30mg), 使混合物温热至室温, 搅拌 16 小时。将混合物用水(15ml)稀释, 用 EtOAc 萃取(4 x 10ml)。合并萃取液, 干燥(MgSO₄), 在真空中浓缩, 残余物经过制备型 TLC 纯化(用 30% EtOAc/己烷洗脱), 得到一种油, 然后在 130°C 下用 TsOH·H₂O (4.2mg, 0.022mmol)和 R₄NH₂ (0.085mmol)处理 16 小时。将混合物冷却至室温, 用 NaHCO₃ 水溶液(2ml)稀释, 用 EtOAc 萃取(4 x 2ml)。合并萃取液, 干燥(MgSO₄), 在真空中浓缩, 残余物经过制备型 TLC 纯化, 得到化合物 4。

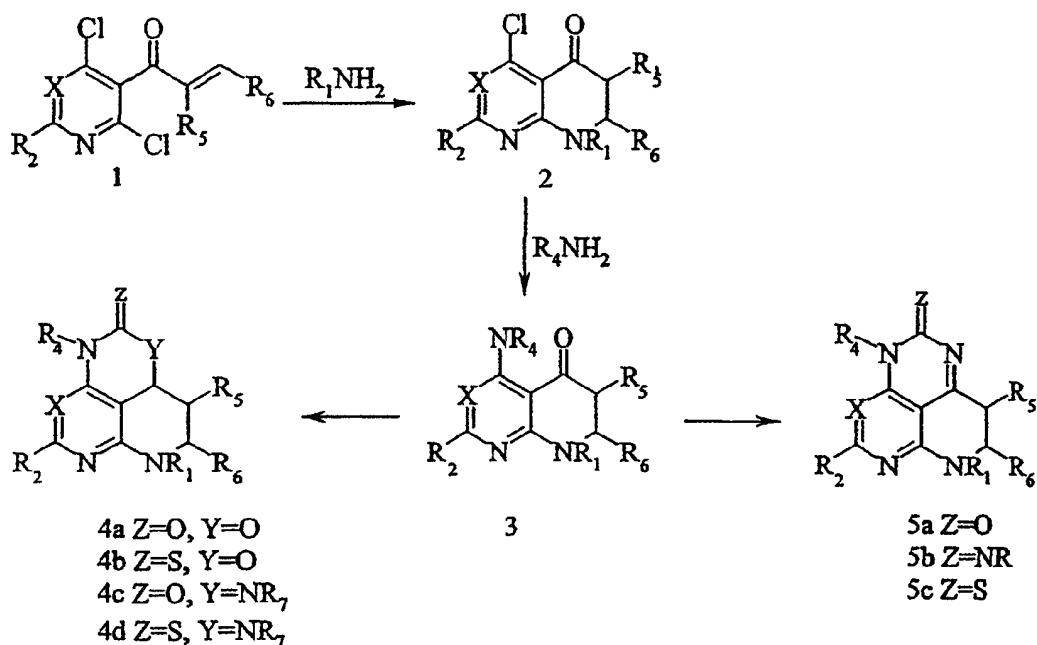
化合物 4

将化合物 2 (68mg, 0.23mmol)和 R₄HNNH₂ (0.35mmol)在 140°C 下加热 5 小时。将混合物冷却至室温, 用 NaHCO₃ 水溶液(2ml)稀释, 用 EtOAc 萃取(4 x 2ml)。合并萃取液, 干燥(MgSO₄), 在真空中浓缩, 残余物经过

制备型 TLC 纯化(用 30% EtOAc/己烷洗脱), 得到化合物 3。

实施例 4

代表性结构(I)化合物的合成



5 化合物 2

将烯酮 1 (来自上例 1 和 2 的化合物 4, 4.26mmol)、R₁NH₂ (4.3mmol) 与甲苯磺酸一水合物(4.3mmol)的乙醇(20ml)溶液在 60°C 下加热 16 小时。将混合物浓缩, 溶于乙酸乙酯(50ml), 用 NaHCO₃ 水溶液(20ml)洗涤, 干燥(MgSO₄), 在真空下浓缩。残余物经过硅胶柱纯化(用 25% 乙酸乙酯的己烷溶液洗脱), 得到 2。

化合物 3

将酮 2 (0.16mmol)、对-甲苯磺酸一水合物(30mg, 0.16mmol)和 R₄NH₂ (0.18mmol)溶于乙醇(0.5ml), 在 80°C 密封的试管内加热 20 小时。将混合物冷却至室温, 用 NaHCO₃ 水溶液(2ml)稀释, 用乙酸乙酯萃取(4 x 2ml)。合并有机萃取液, 干燥(MgSO₄), 在真空下浓缩, 残余物经过制备型 TLC 纯化, 得到 3。

化合物 4a (Z = O, Y = O)

将酮 3 (0.095mmol)溶于甲醇(1ml), 用硼氢化钠(25mg, 0.66mmol)处理。将混合物搅拌 4 小时, 用 NaHCO₃ 水溶液(2ml)稀释, 用乙酸乙酯萃取(4 x 2ml)。合并有机萃取液, 干燥(MgSO₄), 在真空下浓缩, 将残余物

溶于甲苯(1ml), 用光气的甲苯溶液(20%, 0.1ml)处理。16 小时后, 在真空下浓缩溶液, 残余物经过制备型 TLC 纯化, 得到 32mg (75%)碳酸酯 4, 为黄色的油。

化合物 4b ($Z = S, Y = O$)

- 5 将酮 3 (0.095mmol)溶于甲醇(1ml), 用硼氢化钠(25mg, 0.66mmol)处理。将混合物搅拌 4 小时, 用 NaHCO_3 水溶液(2ml)稀释, 用乙酸乙酯萃取(4 x 2ml)。合并有机萃取液, 干燥(MgSO_4), 在真空下浓缩, 将残余物溶于甲苯(1ml), 用硫代光气的甲苯溶液(20%, 0.1ml)处理。16 小时后, 在真空下浓缩溶液, 残余物经过制备型 TLC 纯化, 得到 25mg (55%)4b, 为
- 10 黄色的油。

化合物 4c ($Z = O, Y = \text{NR}_7$)

- 将酮 3 (0.095mmol)和胺(0.20ml)溶于乙腈(1ml), 用氰基硼氢化钠(25mg)处理。加入乙酸(1 滴), 将混合物搅拌 4 小时, 用 NaHCO_3 水溶液(2ml)稀释, 用乙酸乙酯萃取(4 x 2ml)。合并有机萃取液, 干燥(MgSO_4),
- 15 在真空下浓缩, 将残余物溶于甲苯(1ml), 用光气的甲苯溶液(20%, 0.1ml)处理。18 小时后, 在真空下浓缩溶液, 残余物经过制备型 TLC 纯化, 得到脲 4c。

化合物 4d ($Z = S, Y = \text{NR}_7$)

- 将酮 3 (0.095mmol)和胺(0.20ml)溶于乙腈(1ml), 用氰基硼氢化钠
- 20 (25mg)处理。加入乙酸(1 滴), 将混合物搅拌 4 小时, 用 NaHCO_3 水溶液(2ml)稀释, 用乙酸乙酯萃取(4 x 2ml)。合并有机萃取液, 干燥(MgSO_4), 在真空下浓缩, 将残余物溶于甲苯(1ml), 用硫代光气的甲苯溶液(20%, 0.1ml)处理。18 小时后, 在真空下浓缩溶液, 残余物经过制备型 TLC 纯化, 得到硫脲 4d。

- 25 化合物 5a ($Z = O$)

将酮 3 (0.16mmol)、脲(30mg)和 ZnCl_2 (25mg)在 200°C 下加热 5 小时。将混合物冷却至室温, 用 NaHCO_3 水溶液(2ml)稀释, 用乙酸乙酯萃取(4 x 2ml)。合并有机萃取液, 干燥(MgSO_4), 在真空下浓缩, 残余物经过制备型 TLC 纯化, 得到脲 5a。

- 30 化合物 5b ($Z = \text{NR}_9$)

将来自上述工艺的脲(5a, 0.070mmol)和 PCl_5 (15mg, 0.070mmol)在

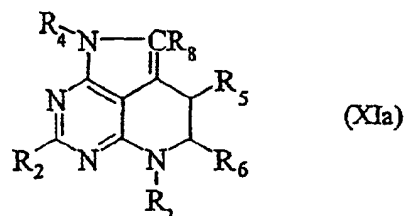
90°C 甲苯中加热 3 小时,在此期间有白色固体生成。将混合物冷却至室温,用胺(0.10ml)处理。继续搅拌 30 分钟。将混合物用 NaHCO₃ 水溶液(2ml)稀释,用乙酸乙酯萃取(4 x 2ml)。合并有机萃取液,干燥(MgSO₄),在真空下浓缩,残余物经过制备型 TLC 纯化,得到脒 5b。

5 化合物 5c (Z = S)

将来自上述工艺的脒(5a, 0.070mmol)和 P₄S₁₀ (50mg)在 90°C 甲苯中加热 20 小时。将混合物用 NaHCO₃ 水溶液(2ml)稀释,用乙酸乙酯萃取(4 x 2ml)。合并有机萃取液,干燥(MgSO₄),在真空下浓缩,残余物经过制备型 TLC 纯化,得到硫脒 5c。

10 实施例 5

代表性结构(XIa)化合物的合成



中间体 1

(4,6-二氯-2-甲基嘧啶-5-基)乙酸甲基酯

- 15 在 0°C N₂ 下,向无水 MeOH (60ml)分批加入钠(1.74g, 3eq)。金属钠耗尽后,加入盐酸乙脒(7.06g, 3eq)。搅拌 20 分钟后,滤出所沉淀的 NaCl。向游离乙脒的溶液加入 2-乙氧羰基琥珀酸二乙酯(6.04g, 24.5mmol)的无水 MeOH (20ml)溶液,将混合物在室温下搅拌 2 天。将反应混合物在真空中浓缩至干,然后将所得黄色泡沫(8.69g)与 POCl₃ (70ml)混合,在回流
- 20 下加热 3.5 小时。将所得溶液冷却至室温,缓慢倒入冰/水(600ml)和 NH₄OH (50ml)中,并剧烈搅拌。产物用 EtOAc (3 x 50ml)和 Et₂O (3 x 20ml)萃取。合并有机萃取液,用 H₂O (60ml)和盐水(40ml)洗涤,经 Na₂SO₄ 干燥,过滤,在真空中浓缩。粗油经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 9:1)。得到中间体 1, 为黄色固体(4.27g, 73%)。

- 25 NMR (¹H, CDCl₃): δ 5.85 (m, 1H), 5.15 (dq, 1H), 5.11 (dq, 1H), 3.61 (dt, 2H), 2.67 (s, 3H).
MS (m/z): 202 [M]⁺.2Cl; 167 [MH-Cl]⁺.1Cl.

中间体 2

2-(4,6-二氯-2-甲基嘧啶-5-基)戊-4-烯酸甲基酯

在-78°C N₂ 下,向中间体 1 (3g, 1eq)的 THF (60ml)溶液滴加 LiHMDS (1M THF 溶液) (16.03ml, 1.25eq)。将反应混合物冷却至 0°C, 搅拌 30 分钟。将反应混合物冷却至-78°C, 在 1.5 小时内滴加烯丙基碘(1.58ml, 1.35eq)。将反应混合物在室温下搅拌 3 小时。然后加入水(30ml), 反应混合物用 EtOAc 萃取(3 x 60ml)。收集有机层, 用饱和 NaCl 水溶液(1 x 20ml)洗涤, 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 5% EtOAc/环己烷)。得到中间体 2, 为白色固体(2.4g, 8.76mmol, 68%)。

NMR (¹H, CDCl₃): δ 5.77 (m, 1H), 5.03 (m, 2H), 4.43 (dd, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.12 (m, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.73 (s, 3H).

MS (m/z): 275 [MH]⁺

10

中间体 3

2-(4,6-二氯-2-甲基嘧啶-5-基)戊-4-烯-1-醇

在-78°C N₂ 下,向中间体 2 (257mg, 0.937mmol)的无水 CH₂Cl₂ (9.3ml)溶液加入 DIBAL-H (1M 己烷溶液, 5.6ml, 6eq)。加入 DIBAL-H 后, 将反应混合物在-78°C 下搅拌 1 小时, 在 0°C 下搅拌 2 小时。将反应混合物倒入 0.5N HCl 的冰溶液(20ml), 用 CH₂Cl₂ 萃取(3 x 10ml)。合并有机萃取液, 经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 在真空中浓缩。得到 200mg 中间体 3, 为无色的油(收率 86%)。

NMR (¹H, CDCl₃): δ 5.76 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 5.01 (m, 1H), 4.16 (m, 1H), 4.06 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 2.8-2.6 (m, 2H), 2.70 (s, 3H), 1.50 (t, 1H).

MS (m/z): 247 [M]⁺, 2Cl

20

中间体 4

5-[1-(叔丁基二苯基甲硅烷氧基甲基)丁-3-烯基]-4,6-二氯-2-甲基嘧啶

在 0°C N₂ 下,向中间体 3 (152mg, 0.61mmol)的无水 DMF (4ml)溶液加入 4-DMAP (3.8mg, 0.05eq)、咪唑(420mg, 10eq)和 Ph₂tBuSiCl (0.32ml, 2eq)。将反应混合物在室温下搅拌 2 小时。向该溶液加入 5ml 饱和 NH₄Cl 的水溶液, 混合物用 Et₂O 萃取(2 x 15ml)。合并有机萃取液, 用水洗涤一次、用盐水洗涤一次, 经 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 粗的黄色的油经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 95:5)。得到中间体 4, 为无

25

23

0mg, 0.55mmol, 90%).

NMR (^1H , CDCl_3): δ 7.65 (dd, 2H), 7.56 (dd, 2H), 7.49-7.36 (m, 6H), 5.67 (m, 1H), 5.03 (dd, 1H), 4.94 (dd, 1H), 4.17 (m, 1H), 4.00 (m, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.69 (m, 1H), 2.55 (m, 1H), 0.98 (s, 9H).

MS (m/z): 485 $[\text{MH}]^+$, 2Cl.

中间体 5

5 4-(叔丁基二苯基甲硅烷氧基)-3-(4,6-二氯-2-甲基嘧啶-5-基)-1-醇

在 -78°C 下, 向中间体 4 (1.52g, 3.14mmol) 的无水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (4/1 v/v, 50ml) 溶液通入 O_3 达 15 分钟, 同时搅拌。反应混合物用无水 MeOH (10ml) 稀释, 在 -78°C 下加入 NaBH_4 (475mg, 4eq)。将反应混合物在室温下搅拌 3 小时, 然后用饱和 NH_4Cl 水溶液 (15ml) 猝灭, 产物用 EtOAc 萃取 (3 x 60ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤 (1 x 20ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化 (硅胶, 环己烷/EtOAc 8:2)。得到中间体 5, 为黄色的油 (1.14g, 2.34mmol, 74%)。

NMR (^1H , DMSO): δ 7.55-7.33 (m, 10H), 4.46 (t, 1H), 4.09, 3.97, 2.92 (m, 3H), 3.40-3.20 (m, 2H), 2.00-1.76 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 0.84 (s, 9H).

MS (m/z): 489 $[\text{MH}]^+$.

15 中间体 6

甲磺酸 4-(叔丁基二苯基甲硅烷氧基)-3-(4,6-二氯-2-甲基嘧啶-5-基) 丁基酯

在 0°C 下, 向中间体 5 (1.14g, 2.33mmol) 的无水 CH_2Cl_2 (46ml) 溶液加入 Et_3N (1.6ml, 5eq) 和 MsCl (378 μl , 2.1eq)。将反应混合物在室温下搅拌 30 分钟。然后加入水 (15ml), 反应混合物用 CH_2Cl_2 萃取 (3 x 60ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤 (1 x 20ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化 (硅胶, 环己烷/EtOAc 8:2)。得到中间体 6, 为黄色的油 (1.28g, 2.26mmol, 97%)。

NMR (^1H , DMSO): δ 7.60-7.30 (m, 10H), 4.20, 4.10-3.90 (m, 5H), 3.07 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.34-2.06 (m, 2H), 0.84 (s, 9H).

MS (m/z): 567 $[\text{MH}]^+$.

25

中间体 7

5-(叔丁基二苯基甲硅烷氧基甲基)-4-氯-2-甲基-8-[4-(1,1,2-三氟乙基)-2-三氟甲基苯基]-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶

在 0°C 下, 向 2,4-双(三氟甲基)苯胺(15.6mg, 1eq)的无水 DMF (1ml) 溶液加入 80% NaH/油(4.5mg, 2.2eq)。将反应混合物在 0°C 下搅拌 15 分钟, 然后在室温下搅拌 15 分钟。将反应混合物冷却至 0°C, 加入中间体 6 (38.7mg, 0.068mmol)的无水 DMF (0.3ml)溶液。将反应混合物在室温下
5 搅拌 1.5 小时。然后加入水(2ml), 反应混合物用 EtOAc 萃取(3 x 7ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 10ml), 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 9:1)。得到中间体 7, 为黄色的油(19.4mg, 0.029mmol, 43%)。

NMR (¹H, CDCl₃): δ 7.98, 7.94 (d, d, 1H), 7.88, 7.80 (dd, dd, 1H), 7.77-7.58, 7.44-7.32 (m, m, 3H), 7.35, 7.14 (d, d, 1H), 3.98, 3.94 (dd, dd, 1H), 3.73, 3.55 (t, m, 1H), 3.63, 3.59 (m, m, 1H), 3.44-3.36 (m, 2H), 3.38-3.30 (m, 2H), 2.55, 2.40 (m, m, 1H), 2.17, 2.15 (s, s 1H), 2.04, 1.90 (m, m, 1H), 0.98 (s, 9H).

MS (m/z): 664 [MH]⁺.

10

中间体 8

{4-氯-2-甲基-8-[4-(1,1,2-三氟乙基)-2-三氟甲基苯基]-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-5-基} 甲醇

在室温 N₂ 下, 向中间体 7 (52mg, 0.078mmol)的无水 DMF (1ml)溶液
15 加入 Et₃N·3HF (102μl, 8eq), 将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后用水 (2ml)稀释, 用 Et₂O 萃取(3 x 5ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 7ml), 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 6:4)。得到中间体 8, 为澄清的油(27mg, 0.063mmol, 81%)。

NMR (¹H, DMSO): δ 8.26-8.12 (m, 2H), 7.90-7.80 (d, 1H), 5.08-4.98 (t, 1H), 3.90-3.60 (2H), 3.70-3.30 (2H), 3.24-3.10 (1H), 2.30 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.00-1.80 (m, 1H).

20

MS (m/z): 425 [MH]⁺.

中间体 9

甲磺酸 4-氯-2-甲基-8-[4-(1,1,2-三氟乙基)-2-三氟甲基苯基]-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-5-基甲基酯

在 0°C 下, 向中间体 8 (130mg, 0.306mmol)的无水 CH₂Cl₂ (4ml)溶液
25 加入 Et₃N (213μl, 5eq)和 MsCl (50μl, 2.1eq)。将反应混合物在室温下搅拌 3 小时。然后加入水(8ml), 反应混合物用 CH₂Cl₂ 萃取(3 x 20ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 10ml), 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固

体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 65/35)。得到中间体 9, 为澄清的油(138mg, 0.274mmol, 90%)。

NMR (^1H , DMSO): δ 8.30-8.14 (m, 2H), 7.95-7.80 (d,d, 1H), 4.56-4.20 (2H), 3.9-3.4 (m, 3H), 3.25 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.2-1.9 (m, 2H).

MS (m/z): 425 $[\text{MH}]^+$.

5 中间体 10

7-甲基-1-(1-丙基丁基)-5-[4-(1,1,2-三氟乙基)-2-三氟甲基苯基]-1,2,2a,3,4,5-六氢-1,5,6,8-四氮杂茚

将中间体 9 (135mg, 0.27mmol)与庚-4-胺(0.5ml, 12eq)的混合物在 130°C 下(螺帽小瓶, 沙浴)加热 3 小时。然后将反应混合物冷却至室温,

10 用 CH_2Cl_2 (3ml)稀释。蒸发溶剂, 粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 9:1)。得到中间体 10, 为黄色固体(29.4mg, 0.06mmol, 23%)。

NMR (^1H , CDCl_3): δ 7.99 (s, 1H), 7.83 (d, 1H), 7.48 (d, 1H), 4.06-3.24 (bm, 5H), 2.23-2.2 (bm, 4H), 1.74-1.1 (bm, 10H), 0.97 (t, 3H), 0.91 (t, 3H).

MS (m/z): 487 $[\text{MH}]^+$.

中间体 11

15 4-[5-(叔丁基二苯基甲硅烷氧基甲基)-4-氯-2-甲基-6,7-二氢-5H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-8-基]-3-甲基苄腈

在 0°C N_2 下, 向 4-氯基-3-甲基苄腈(14mg, 0.106mmol)的 DMF (3.5ml) 溶液加入 80% NaH/油(4.5mg, 0.112mmol), 30 分钟后加入中间体 6 (60mg, 0.106mmol), 将反应混合物在室温下搅拌 2 小时。然后冷却至室温, 用水 (20ml)稀释。产物用 EtOAc 萃取(3 x 25ml)。合并有机萃取液, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(2 x 20ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂。粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 80%)。得到中间体 11, 为澄清的油(28mg, 0.52mmol, y = 47%)。

NMR (^1H , CDCl_3): δ 7.65 (s, 1H), 7.55 (m, 4H), 7.35 (m, 6H), 7.10 (d, 1H), 6.95 (d, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.8 (m, 2H), 3.5-3.3 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.61 (m, 1H), 1.10 (s, 9H).

MS (m/z): 567 $[\text{MH}]^+$.

25

中间体 12

4-(4-氯-5-羟甲基-2-甲基-6,7-二氢-5H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-8-基)-3-甲基苄腈

在室温 N_2 下, 向中间体 11 (28mg, 0.05mmol) 的无水 DMF (2.5ml) 溶液加入 $Et_3N \cdot 3HF$ (44 μ l, 0.290mmol), 将反应混合物在室温下搅拌 12 小时。用水(20ml)稀释, 产物用 EtOAc 萃取(3 x 25ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(2 x 20ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂。粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 6:4)。得到中间体 11, 为澄清的油(22mg, 0.08mmol, 75%)。

NMR (1H , $CDCl_3$): δ 7.61-7.58 (m, 2H), 7.27 (m, 1H), 3.92-3.81 (m, 3H), 3.50-3.35 (m, 2H), 2.4 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.8 (m, 1H).
MS (m/z): 329[MH] $^+$.

中间体 13

4-[1-(1-乙基丙基)-7-甲基-2,2a,3,4-四氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]-3-甲基苄腈

在 0°C N_2 下, 向中间体 12 (43mg, 0.131mmol) 的无水 CH_2Cl_2 (2.5ml) 溶液加入 MsCl (13 μ l, 0.328mmol) 和 Et_3N (87 μ l, 0.655mmol), 将反应混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后用水(20ml)稀释。产物用 EtOAc 萃取(3 x 25ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(2 x 20ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂。将粗产物溶于 3-氨基戊烷(143 μ l, 1.23mmol), 将反应混合物在 100°C 下(螺帽小瓶, 沙浴)加热 16 小时。然后冷却至室温, 反应混合物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 75:25)。得到中间体 13, 为白色固体(23mg, 0.074mmol, 50%)。

NMR (1H , $CDCl_3$): δ 7.50 (d, 1H), 7.30 (dd, 1H), 7.55 (d, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.70-3.23 (t+t, 2H), 3.43 (m, 1H), 3.63 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.18 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.59-1.45 (m, 4H), 0.99-0.78 (t+t, 6H).
MS (m/z): 362[MH] $^+$.

中间体 14

3-甲基-4-[7-甲基-1-(1-丙基丁基)-2,2a,3,4-四氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苄腈

在 0°C N_2 下, 向中间体 12 (12mg, 0.043mmol) 的无水 CH_2Cl_2 (1.5ml) 溶液加入 MsCl (4 μ l, 0.109mmol) 和 Et_3N (28 μ l, 0.216mmol), 将反应混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后用水(20ml)稀释。产物用 EtOAc 萃取(3 x 25ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(2 x 20ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂。将粗产物溶于 4-庚基胺(50 μ l, 0.349mmol), 将反应

混合物在 100°C 下(螺帽小瓶, 沙浴)加热 16 小时。然后冷却至室温, 反应混合物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 75:25)。得到中间体 14, 为白色固体(5.0mg, 0.020mmol, 40%)。

NMR (^1H , CDCl_3): δ 7.73 (s, 1H), 7.65 (dd, 1H), 7.41 (d, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.78-3.6 (m, 2H), 3.5-3.24 (t, 2H), 2.27 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.65 (m, 1H), 1.55-1.40 (m, 4H), 1.38-1.10 (m, 4H), 0.95-0.88 (t+t, 6H).
MS (m/z): 389 $[\text{MH}]^+$.

5

中间体 15

4-[5-(叔丁基二苯基甲硅烷氧基甲基)-4-氯-2-甲基-6,7-二氢-5H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-8-基]-3-氯苄腈

在 0°C N_2 下, 向 4-氨基-3-甲基苄腈(86mg, 0.566mmol)的 DMF (3.5ml) 溶液加入 80% NaH/油(17mg, 0.566mmol), 30 分钟后加入中间体 6 (308mg, 0.546mmol), 将反应混合物在室温下搅拌 2 小时。然后冷却至室温, 用水(30ml)稀释。产物用 EtOAc 萃取(3 x 45ml)。合并有机萃取液, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(2 x 20ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂。粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 8:2)。得到中间体 15, 为澄清的油(110mg, 0.184mmol, 35%)。

NMR (^1H , CDCl_3): δ 7.65 (s, 1H), 7.55 (m, 4H), 7.35 (m, 6H), 7.10(d, 1H), 6.95 (d, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.8 (m, 2H), 3.5-3.3 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.61 (m, 1H), 1.10 (s, 9H).
MS (m/z): 587 $[\text{MH}]^+$.

中间体 16

3-氯-4-(4-氯-5-羟甲基-2-甲基-6,7-二氢-5H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-8-基)苄腈

在室温 N_2 下, 向中间体 15 (110mg, 0.19mmol)的无水 DMF (2.5ml) 溶液加入 $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (260 μl , 1.91mmol), 将反应混合物在室温下搅拌 12 小时。用水(20ml)稀释, 产物用 EtOAc 萃取(3 x 20ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(2 x 20ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂。粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 6:4)。得到中间体 16, 为澄清的油(53mg, 0.15mmol, 81%)。

NMR (^1H , CDCl_3): δ 7.95-8.8(m, 2H), 7.3(d, 1H), 3.9(m, 1H), 3.(m, 2H), 3.5-3.3 (m, 2H), 2.2 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.8 (m, 1H).
MS (m/z): 349 $[\text{MH}]^+$.

中间体 17

3-氯-4-[7-甲基-1-(1-丙基丁基)-2,2a,3,4-四氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苜蓿

在 0°C N₂ 下, 向中间体 16 (52mg, 0.149mmol) 的无水 CH₂Cl₂ (1.5ml) 溶液加入 MsCl (16μl, 0.373mmol) 和 Et₃N (90μl, 0.745mmol), 将反应混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后用水(20ml)稀释。产物用 EtOAc 萃取(3 x 25ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(2 x 20ml), 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂。将粗产物溶于 4-庚基胺(188μl, 1.49mmol), 将反应混合物在 100°C 下(螺帽小瓶, 沙浴)加热 16 小时。然后冷却至室温, 反应混合物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 8:2)。得到中间体 17, 为白色固体(36.0mg, 0.084mmol, 60%)。

NMR (¹H, CDCl₃): δ 7.74 (d, 1H), 7.56 (dd, 1H), 7.49 (d, 1H) 4.05 (m, 1H), 3.78-3.6 (m, 2H), 3.5-3.24 (t, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.18 (m, 1H), 1.55-1.40 (m, 4H), 1.38-1.10 (m, 4H), 0.95-0.88 (t+t, 6H).

MS (m/z): 410[MH]⁺.

中间体 18

3-氯-4-[1-(1-乙基丙基)-7-甲基-2,2a,3,4-四氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苜蓿

在 0°C N₂ 下, 向中间体 16 (35mg, 0.112mmol) 的无水 CH₂Cl₂ (1.5ml) 溶液加入 MsCl (12μl, 0.277mmol) 和 Et₃N (68μl, 0.560mmol), 将反应混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后用水(20ml)稀释。产物用 EtOAc 萃取(3 x 25ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(2 x 20ml), 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂。将粗产物溶于 3-氨基戊烷(158μl, 1.12mmol), 将反应混合物在 100°C 下(螺帽小瓶, 沙浴)加热 16 小时。然后冷却至室温, 反应混合物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 75:25)。得到中间体 18, 为白色固体(18.0mg, 0.084mmol, 53%)。

NMR (¹H, CDCl₃): δ 7.74 (d, 1H), 7.55 (dd, 1H), 7.50 (d, 1H) 3.95 (m, 1H), 3.78-3.65 (m, 2H), 3.45 (m, 1H), 3.69-3.23 (t+t, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.18 (m, 1H), 1.55-1.46 (m, 4H), 0.97-0.78 (t+t, 6H).

MS (m/z): 382[MH]⁺.

中间体 19

5-(2,4-双三氟甲基苯基)-1-(1-乙基丙基)-7-甲基-1,2,2a,3,4,5-六氢

-1,5,6,8-四氮杂茚

在 0°C N₂ 下, 向中间体 8 (45mg, 0.106mmol) 的无水 CH₂Cl₂ (2.5ml) 溶液加入 MsCl (10μl, 0.265mmol) 和 Et₃N (70μl, 0.530mmol), 将反应混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后用水(20ml)稀释。产物用 EtOAc 萃取(3 x 25ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(2 x 20ml), 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂。将粗产物溶于 3-氨基戊烷(184μl, 0.992mmol), 将反应混合物在 100°C 下(螺帽小瓶, 沙浴)加热 16 小时。然后冷却至室温, 反应混合物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 75:25)。得到中间体 19, 为白色固体(28.0mg, 0.064mmol, 60%)。

NMR (¹H, CDCl₃): δ 7.98 (d, 1H), 7.83 (dd, 1H), 7.49 (d, 1H) 3.87 (m, 1H), 3.70-3.23 (t+t, 2H), 3.44 (m, 1H), 3.63 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.18 (m, 1H), 1.55-1.47 (m, 4H), 0.99-0.88 (t+t, 6H).

MS(m/z): 458[MH]⁺。

实施例 5-1-1

7-甲基-1-(1-丙基丁基)-5-[4-(1,1,2-三氟乙基)-2-三氟甲基苯基]-1,2,2a,3,4,5-六氢-1,5,6,8-四氮杂茚

向中间体 10 (21mg, 0.043mmol) 的无水 CH₂Cl₂ (1.0ml) 溶液加入 DDQ (9.7mg, 1eq)。将反应混合物在室温下搅拌 3.5 小时。蒸发溶剂, 粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 9:1)。得到实施例 5-1-1 化合物, 为澄清的油(14mg, 0.028mmol, 67%)。

实施例 5-1-2

3-甲基-4-[7-甲基-1-(1-丙基丁基)-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基] 苺腈

向中间体 14 (15mg, 0.038mmol) 的 CH₂Cl₂ (1.5ml) 溶液加入 DDQ (9.6mg, 0.042mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 3 小时。蒸发溶剂, 粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 7:3)。得到实施例 5-1-2 化合物, 为白色固体(8mg, 0.021mmol, 56%)。

实施例 5-1-3

4-[1-(1-乙基丙基)-7-甲基-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]-3-甲基 苺腈

向中间体 13 (18mg, 0.049mmol) 的 CH₂Cl₂ (1.5ml) 溶液加入 DDQ

(14.5mg, 0.064mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 3 小时。蒸发溶剂, 粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 7:3)。得到实施例 5-1-3 化合物, 为白色固体(10mg, 0.029mmol, 60%)。

实施例 5-1-4

- 5 3-氯-4-[7-甲基-1-(1-丙基丁基)-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苄腈

向中间体 17 (15mg, 0.04mmol)的无水 CH_2Cl_2 (1.0ml)溶液加入 DDQ (14.5mg, 0.064mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 3 小时。蒸发溶剂, 粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 7:3)。得到实施例 5-1-4 化合物, 为白色固体(8.1mg, 0.02mmol, 56%)。

实施例 5-1-5

3-氯-4-[1-(1-乙基丙基)-7-甲基-3,4-二氢-1H-1,5,6,8-四氮杂茚-5-基]苄腈

向中间体 18 (12mg, 0.032mmol)的无水 CH_2Cl_2 (1.0ml)溶液加入 DDQ (10.5mg, 0.042mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 3 小时。蒸发溶剂, 粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 7:3)。得到实施例 5-1-5 化合物, 为白色固体(8.0mg, 0.02mmol, 60%)。

实施例 5-1-6

5-(2,4-双三氟甲基苯基)-1-(1-乙基丙基)-7-甲基-1,3,4,5-四氢-1,5,6,8-四氮杂茚

向中间体 19 (20mg, 0.044mmol)的无水 CH_2Cl_2 (1.5ml)溶液加入 DDQ (12.5mg, 0.053mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 3 小时。蒸发溶剂, 粗产物经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 7:3)。得到实施例 5-1-6 化合物, 为白色固体(11mg, 0.024mmol, 60%)。

25 所有分析数据列在下表 1 中。

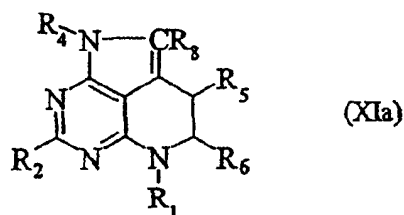
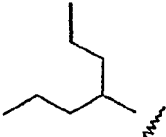
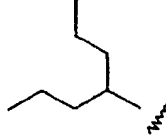
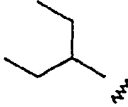
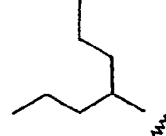
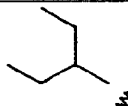
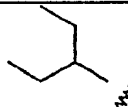
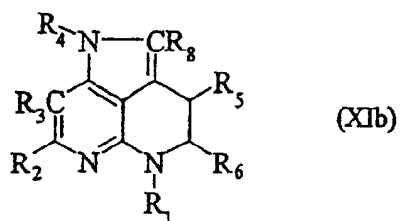


表 1

相关号码	R ₁	R ₂	R ₄	R ₈ ,R ₅ ,R ₆	分析数据
5-1-1	2,4-双三氟甲基苯基	CH ₃		H	NMR (¹ H, CDCl ₃): δ 8.05 (s, 1H), 7.89 (d, 1H), 7.65 (d, 1H), 6.58 (s, 1H), 4.62 (m, 1H), 3.78 (m, 2H), 3.40-3.00 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 1.80 (m, 8H), 1.30-1.10, 0.88 (m, 8H). MS (m/z): 485 [MH] ⁺ .
5-1-2	2-甲基-4-氟基苯基	CH ₃		H	NMR (¹ H, CDCl ₃): δ 7.59 (d, 1H), 7.56 (d, 1H), 7.40 (dd, 1H), 6.59 (s, 1H), 4.65 (m, 1H), 3.84 (t, 2H), 3.14 (t, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 1.79 (m, 4H), 1.25 (m, 4H), 0.84 (t, 6H). MS (m/z): 388 [MH] ⁺ .
5-1-3	2-甲基-4-氟基苯基	CH ₃		H	NMR (¹ H, CDCl ₃): δ 7.70 (d, 1H), 7.56 (d, 1H), 7.43 (dd, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.54 (m, 1H), 3.91 (t, 2H), 3.16 (t, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 1.79 (m, 4H), 0.84 (t, 6H). MS (m/z): 360 [MH] ⁺ .
5-1-4	2-氟-4-氟基苯基	CH ₃		H	NMR (¹ H, CDCl ₃): δ 7.80 (d, 1H), 7.73 (d, 1H), 7.63 (dd, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.51 (m, 1H), 3.92 (t, 2H), 3.18 (t, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.79 (m, 4H), 1.25 (m, 4H), 0.88 (t, 6H). MS (m/z): 408 [MH] ⁺ .
5-1-5	2-氟-4-氟基苯基	CH ₃		H	NMR (¹ H, CDCl ₃): δ 7.80 (d, 1H), 7.73 (d, 1H), 7.63 (dd, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.51 (m, 1H), 3.92 (t, 2H), 3.18 (t, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.79 (m, 4H), 0.88 (t, 6H). MS (m/z): 380 [MH] ⁺ .
5-1-6	2,4-双三氟甲基苯基	CH ₃		H	NMR (¹ H, CDCl ₃): δ 9.92 (d, 1H), 8.03 (d, 1H), 7.69 (dd, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.58 (m, 1H), 3.81 (t, 2H), 3.18 (t, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.92 (m, 4H), 0.83 (t, 6H). MS (m/z): 457 [MH] ⁺ .

实施例 6

代表性结构(XIb)化合物的合成



中间体 20

4-氯-3-(2-甲氧基乙烯基)-6-甲基-1-(1-丙基丁基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶

在 0°C N₂ 下, 向氯化(甲氧基甲基)三苯基磷(70mg, 3eq)的无水 THF (1ml)溶液滴加 1.6M BuLi 的 THF 溶液(128μl, 3eq)。将所得红色反应混合物在 0°C 下搅拌 10 分钟, 进一步在室温下搅拌 20 分钟。然后将反应混合物冷却至 0°C, 滴加 4-氯-6-甲基-1-(1-丙基丁基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-醛(按照文献所报道的方法制备: J. Heterocyclic Chem.; 1996, 33, 303; J. Heterocyclic Chem.; 1992, 29, 359; Heterocycles; 2000, 53, 11, 2415; Tetrahedron; 1985, 41, 10, 1945。分析数据: NMR (¹H, DMSO): δ 8.49 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 10.4 (s, 1H), 2.53 (s, 3H), 4.57 (m, 1H), 1.92/1.79 (m/m, 4H), 1.70/0.90 (m/m, 4H), 0.77 (t, 6H); MS(m/z): 293[MH]⁺) (20mg, 0.068mmol)的无水 THF (1ml)溶液。将反应混合物在室温下搅拌 1 小时。然后加入水(3ml), 产物用 EtOAc 萃取(3 x 5ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 5ml), 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 95:5)。得到中间体 20, 为黄色的油 (15mg, 0.046mmol, 70%)。

NMR (¹H, CDCl₃): δ (反式) 6.98 (s, 1H), 2.59 (s, 3H), 6.69 (s, 1H), 6.81 (d, 1H), 6.40 (d, 1H), 4.21 (m, 1H), 1.82 (m, 4H), 1.53 (m, 4H), 0.85 (dt, 6H), 3.83 (s, 3H); (顺式) 6.94 (s, 1H), 2.59 (s, 3H), 7.62 (s, 1H), 4.21 (m, 1H), 1.82 (m, 4H), 1.53 (m, 4H), 0.85 (dt, 6H), 6.19 (d, 1H), 6.30 (d, 1H), 3.72 (s, 3H)。

MS (m/z): 321 [MH]⁺。

25 中间体 21

[4-氯-6-甲基-1-(1-丙基丁基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-基]乙醛

在 0°C N₂ 下, 向中间体 20 (85mg, 0.26mmol)的无水 THF (2ml)溶液滴加 2N HCl (2ml)。将所得黄色反应混合物在 70°C 下搅拌 1.5 小时。然后加入饱和 NaHCO₃ 水溶液(1ml), 产物用 EtOAc 萃取(3 x 5ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 5ml), 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 8:2)。

得到中间体 21, 为黄色的油(55mg, 0.179mmol, 70%)。

NMR (^1H , CDCl_3): δ 9.85 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.04 (s, 2H), 2.60 (s, 3H), 1.82 (m, 4H), 1.16 (m, 4H), 0.85 (dt, 6H).

MS (m/z): 307 $[\text{MH}]^+$.

5

中间体 22

[4-氯-6-甲基-1-(1-丙基丁基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-基]乙醇

在 0°C N_2 下, 向中间体 21 (53mg, 0.173mmol) 的无水 MeOH (4ml) 溶液加入 NaBH_4 (13.1mg, 2eq)。将反应混合物在 0°C 下搅拌 1 小时。然后加入水(1ml), 产物用 EtOAc 萃取(3 x 5ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 5ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 7:3)。得到中间体 22, 为黄色的油(49.8mg, 0.161mmol, 93%)。

15 NMR (^1H , CDCl_3): δ 7.37 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 4.63 (t, 1H), 3.64 (t, 2H), 3.01 (t, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.77 (m, 4H), 0.89-1.79 (m, 4H), 0.77 (t, 6H).

MS (m/z): 309 $[\text{MH}]^+$.

中间体 23

3-[2-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)乙基]-4-氯-6-甲基-1-(1-丙基丁基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶

20 在 0°C N_2 下, 向中间体 22 (49.8mg, 0.173mmol) 的无水 DMF (2ml) 溶液加入咪唑(110mg, 10eq)、TBSCl (67mg, 2.8eq)、DMAP (2mg, 0.1eq)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后加入水(1ml), 产物用 Et_2O 萃取(3 x 5ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 5ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 9:1)。得到中间体 23, 为黄色的油(65mg, 0.154mmol, 95%)。

25 NMR (^1H , DMSO): δ 6.95 (s/s, 1/1H), 4.17 (m, 1H), 3.91 (t, 2H), 3.16 (t, 2H), 2.58 (s, 3H), 1.80 (m, 4H), 1.14-1.05 (m/m, 4H), 0.88 (s, 9H), 0.85 (t, 6H), 0.00 (s, 6H).

MS (m/z): 423 $[\text{MH}]^+$.

中间体 24

30 (2,4-双三氟甲基苯基)-[3-[2-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)乙基]-6-甲基-1-(1-丙基丁基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-4-基]胺

在室温 N_2 下, 向三(二亚苄基丙酮)铯(0) (3.7mg, 0.1eq)、2-(二环己基膦基)-2'-甲基联苯(4.4mg, 0.3eq)、 K_3PO_4 (23mg, 2.8eq)的混合物加入中间体 23 (17mg, 0.04mmol)与 2,4-双(三氟甲基)苯胺(18mg, 2eq)的无水 DME (1ml)溶液(卷帽微波小瓶)。在 $100^\circ C$ 、150W、60psi 下将反应混合物在 CEM 聚焦微波合成系统(Discovery 型)中照射 20 分钟(冷却)。然后加入水(1ml), 产物用 Et_2O 萃取(3 x 5ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 5ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/ $EtOAc$ 95:5)。得到中间体 24, 为黄色的油(21.5mg, 0.035mmol, 88%)。

NMR (1H , DMSO): δ 7.83 (d, 1H), 7.79 (dd, 1H), 8.16 (d, 1H), 8.23 (s, 1), 7.22 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 2.43 (s, 3H), 4.35 (m, 1H), 3.77 (t, 2H), 2.94 (t, 2H), 1.8 (m, 4H), 1.15, 0.95(m/m, 4H), 0.79 (t; 6H), 0.68 (s, 9H), -0.31 (s, 6H).

MS (m/z): 616 $[MH]^+$.

中间体 25

2-[4-(2,4-双三氟甲基苯基)-6-甲基-1-(1-丙基丁基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-基]乙醇

在室温下, 向中间体 24 (60mg, 0.097mmol)的无水 DMF (5ml)溶液加入 $Et_3N \cdot 3HF$ (133.6 μ l, 8.4eq)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后加入水(2ml), 产物用 $EtOAc$ 萃取(3 x 5ml)。合并有机层, 用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 5ml), 经无水 Na_2SO_4 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/ $EtOAc$ 9:1)。得到中间体 25, 为白色固体(24.4mg, 0.048mmol, 50%)。

NMR (1H , DMSO): δ 9.01 (sa, 1H), 8.07 (d, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.76 (dd, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 5.19 (sa, 1H), 4.35 (m, 1H), 3.63 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.85-1.65 (m, 4H), 1.20, 0.90 (m, 4H), 0.80 (m, 6H).

MS (m/z): 502 $[MH]^+$.

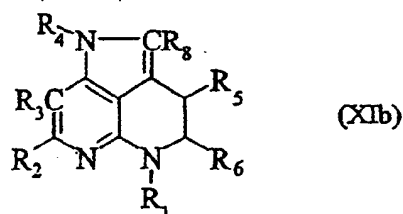
实施例 6-1-1

5-(2,4-双三氟甲基苯基)-7-甲基-1-(1-丙基丁基)-1,3,4,5-四氢-1,5,6-三氮杂茚

在室温下, 向中间体 25 (23.4mg, 0.04mmol)的无水 CH_2Cl_2 (2ml)溶液加入 Et_3N (13.5 μ l, 2eq)和 $MsCl$ (6.16 μ l, 2eq)。将反应混合物在室温下搅拌 2 小时。然后加入水(2ml), 产物用 CH_2Cl_2 萃取(3 x 5ml)。合并有机层,

用饱和 NaCl 水溶液洗涤(1 x 5ml), 经无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤固体, 蒸发溶剂, 得到粗产物, 经过快速色谱纯化(硅胶, 环己烷/EtOAc 9:1)。得到实施例 6-1-1 化合物, 为黄色的油(6mg, 0.012mmol, 31%)。

所有分析数据列在下表 1 中。



5

表 1

相关号码	R1	R2	R4	R8, R3, R5, R6	分析数据
6-1-1	2,4-双三氟 甲基苯基	CH ₃		H	NMR (1H, DMSO): δ 8.08 (dd, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.81 (d, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.72 (t, 2H), 3.02 (t, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.80-1.70 (m, 4H), 1.30-1.10 (m, 4H), 0.79 (m, 6H). MS (m/z): 483 [M+H] ⁺ .

实施例 7

CRF 受体结合活性

10 通过标准的放射性配体结合测定法可以评价本发明化合物对 CRF 受体的结合活性, 如 DeSouza 等所述(J. Neurosci. 7: 88-100, 1987)。利用各种放射性标记的 CRF 配体, 该测定法可以用于评价本发明化合物对任何 CRF 受体亚型的结合活性。简而言之, 结合测定法涉及从 CRF 受体置换放射性标记的 CRF 配体。

15 更具体而言, 结合测定是这样进行的, 在 1.5ml Eppendorf 试管内, 每管使用大约 1×10^6 个细胞, 这些细胞被人 CRF 受体稳定地转染。每管接受约 0.1ml 测定缓冲液(例如 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水, 10mM 氯化镁, 20 μ M 杆菌肽), 其中含有或不含未标记的蛙皮降压肽、硬骨鱼紧张肽 I 或 CRF(最终浓度 1 μ M)以测定特异性结合, 0.1ml [¹²⁵I]酪氨酸-羊 CRF(最终浓度~200pM 或根据 Scatchard 分析法测定的大约 K_D)和 0.1ml 含有 CRF 受体的细胞膜悬液。将混合物在 22°C 下培养 2 小时, 然后离心分离所结合的与游离的放射性配体。洗涤两次粒状沉淀后, 拿去粒状沉淀上面的试管, 在 γ 计数器中监测放射性, 效率大约 80%。可以利用 Munson 和 Rodbard 的非线性最小平方曲线拟合程序 LIGAND 分析所有放射性配体

20

结合数据(Anal. Biochem. 107: 220, 1990)。

实施例 8

CRF-刺激的腺苷酸环化酶活性

也可以通过各种功能测试评价本发明的化合物。例如,可以根据 CRF-
5 刺激的腺苷酸环化酶活性筛选本发明的化合物。用于测定 CRF-刺激的腺
苷酸环化酶活性的测定法可以 Battaglia 等所述进行(Synapse 1: 572,
1987), 并作修饰使该测定法适用于全细胞制备物。

更具体而言, 标准的测定混合物可以含有下列组分, 最终体积为
0.5ml: 2mM L-谷氨酰胺、20mM HEPES 和 1mM IMBX 的 DMEM 缓冲液。
10 在刺激研究中, 将转染有 CRF 受体的全细胞平板接种在 24 孔平板内, 在
37°C 下培养 1 小时, 其中各种浓度的 CRF 相关性和不相关性肽, 目的是
建立特定受体亚型的药理级别-顺序曲线。培养后, 抽吸培养基, 将小孔
用新鲜培养基小心地冲洗一次, 抽吸培养基。为了测定细胞内 cAMP 的
量, 向每孔加入 300 μ l 95%乙醇与 20mM 盐酸水溶液, 将所得悬液在-20°C
15 下培养 16 至 18 小时。将溶液移至 1.5ml Eppendorf 试管内, 将小孔用另
外 200 μ l 乙醇/盐酸水溶液洗涤, 汇集第一部分。将样本冷冻干燥, 然后
重新悬浮在 500 μ l 乙酸钠缓冲液中。利用来自 Biomedical Technologies Inc.
(Stoughton, MA)的单抗体试剂盒进行样本中 cAMP 的测量。关于化合物的
功能评估, 将导致 cAMP 产生的 80%刺激的单一浓度 CRF 或相关性肽
20 与各种浓度的竞争性化合物(10^{-12} 至 10^{-6} M)一起培养。

不言而喻, 尽管出于说明的目的本说明书已经描述了本发明的具体
实施方案, 在不背离发明的精神和范围情况下可以进行各种修改。

因此, 本发明仅受权利要求书的限制。