



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102014898 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 23

(21) 申请号 200980115547. 3

地址 美国马里兰州

(22) 申请日 2009. 04. 30

(72) 发明人 詹姆斯·邓恩·奥尼尔

(30) 优先权数据

61/049, 167 2008. 04. 30 US

61/093, 743 2008. 09. 03 US

沙林·夏尔马

拉马钱德兰·阿鲁德钱德兰

(85) PCT申请进入国家阶段日

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

2010. 10. 29

代理人 丁香兰 庞东成

(86) PCT申请的申请数据

(51) Int. Cl.

PCT/US2009/042298 2009. 04. 30

A61K 31/41 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

A01N 43/64 (2006. 01)

W02009/134995 EN 2009. 11. 05

审查员 卞志家

(73) 专利权人 维尔斯达医疗公司

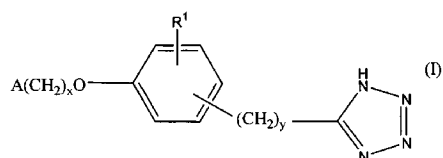
权利要求书 7 页 说明书 44 页 附图 9 页

(54) 发明名称

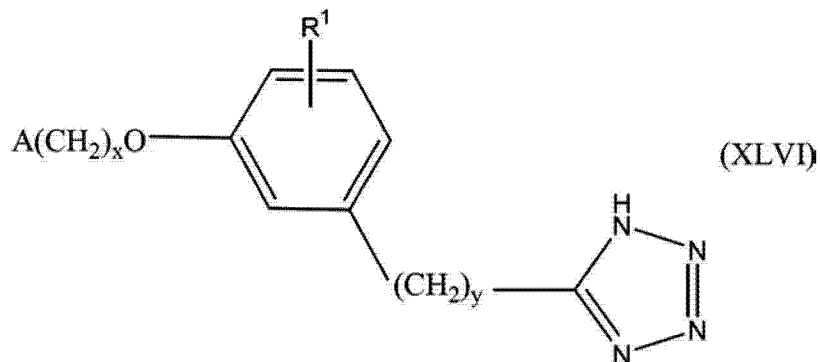
用于减少尿酸的四唑化合物

(57) 摘要

通过施用式 I 的化合物可减少哺乳动物对象的尿酸并增加尿酸的排泄。本发明化合物的尿酸降低效果用于治疗或预防多种病症,包括痛风、高尿酸血症、未达到通常确诊为高尿酸血症的水平的高尿酸水平、肾功能障碍、肾结石、心血管疾病、发展心血管疾病的风险、肿瘤溶解综合征、认知障碍、早发型原发性高血压和恶性疟原虫导致的炎症。在式 I 中, x 是 1 或 2 ; y 是 0、1、2 或 3 ; R¹选自自由氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基、羟基、具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基、氟、氯、溴和氨基组成的组。A 是不具取代基或取代有一个、两个或三个下述基团的苯基,所述基团选自自由卤素、具有 1 或 2 个碳原子的烷基、全氟甲基、具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基和全氟甲氧基组成的组 ;或者具有 3 ~ 6 个环原子的环烷基,其中所述环烷基不具取代基,或者一个或两个环碳独立地单取代有甲基或乙基 ;或者具有 1 个或 2 个选自 N、S 和 O 的环杂原子的 5 元或 6 元杂芳环,并且所述杂芳环通过环碳与所述化合物的其余部分共价连接。



1. 一种化合物,所述化合物由式 XLVI 表示,



其中

x 是 1;

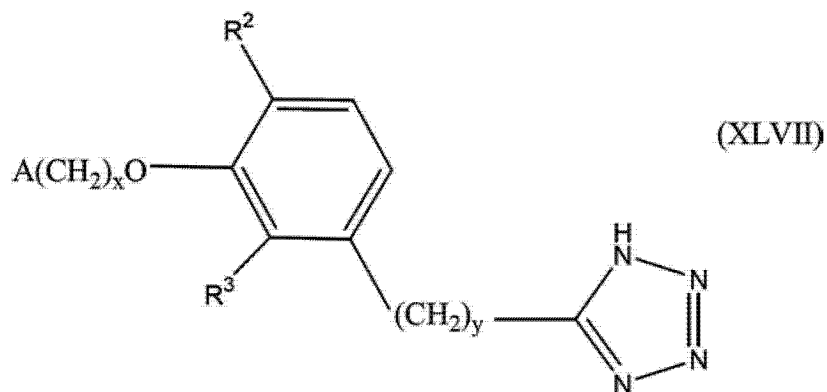
y 是 0、1、2 或 3;

R¹ 选自由氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组;并

且

A 是 2,6-二甲基苯基。

2. 如权利要求 1 所述的化合物,所述化合物由式 XLVII 表示,



其中

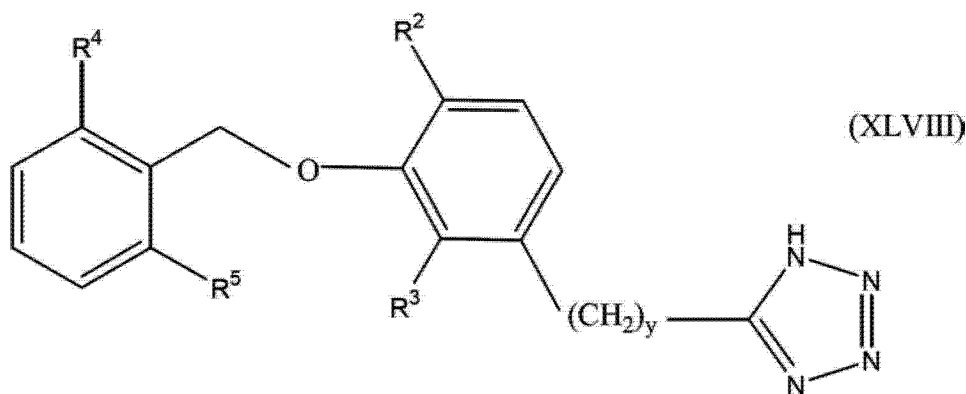
x 是 1;

y 是 0、1、2 或 3;

R² 和 R³ 中的一个为氢,另一个选自由氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组;并且

A 是 2,6-二甲基苯基。

3. 如权利要求 2 所述的化合物,所述化合物由式 XLVIII 表示,



其中

y 是 0、1 或 2；

R² 和 R³ 中的一个为氢，另一个选自氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组；并且

R⁴ 和 R⁵ 均为甲基。

4. 如权利要求 3 所述的化合物，其中，R³ 是氢；并且 R² 选自氢、甲基和甲氧基组成的组。

5. 如权利要求 4 所述的化合物，所述化合物选自下述化合物组成的组：

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苄基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苄基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯乙基)-1H-四唑；和

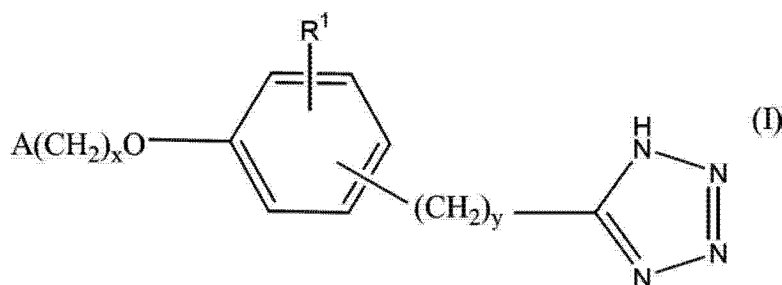
5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲基苄基)-1H-四唑。

6. 如权利要求 3 所述的化合物，所述化合物选自下述化合物组成的组：

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)-1H-四唑；和

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)-1H-四唑。

7. 式 I 表示的化合物在制备用于降低哺乳动物对象血液中的尿酸浓度或增加哺乳动物对象的尿酸排泄的药物中的应用，



其中，

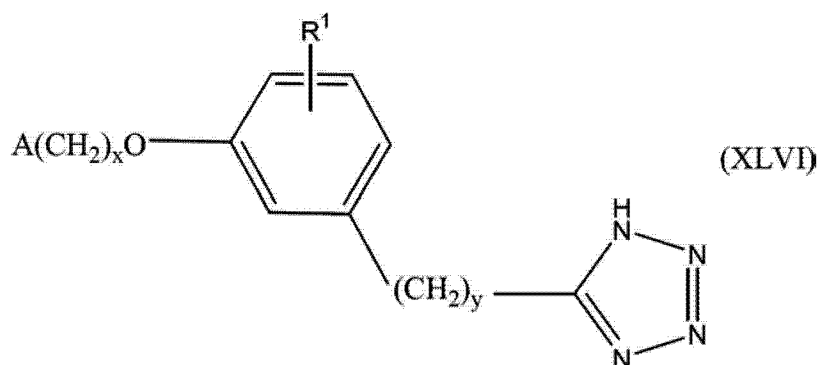
x 是 1；

y 是 0、1、2 或 3；

R¹ 选自氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组；

A 是不具取代基或取代有一个、两个或三个下述基团的苯基，所述基团选自卤素和具有 1 或 2 个碳原子的烷基组成的组。

8. 如权利要求 7 所述的应用，其中，所述化合物由式 XLVI 表示，



其中

x 是 1；

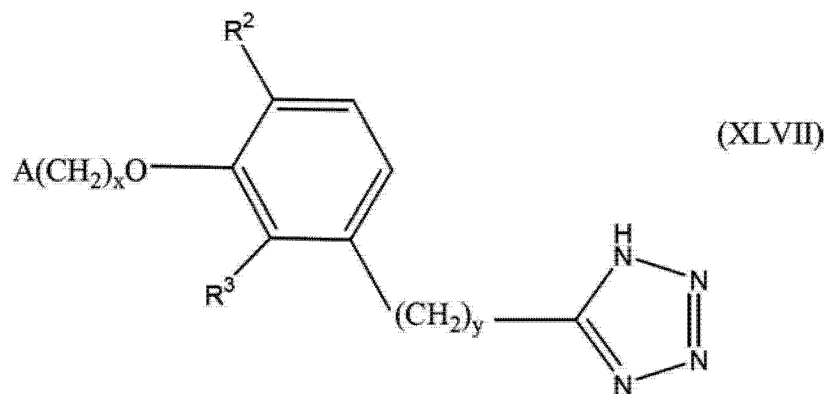
y 是 0、1、2 或 3；

R¹ 选自由氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组；并

且

A 是不具取代基或取代有一个、两个或三个下述基团的苯基，所述基团选自由卤素和具有 1 或 2 个碳原子的烷基组成的组。

9. 如权利要求 8 所述的应用，其中，所述化合物由式 XLVII 表示，



其中

x 是 1；

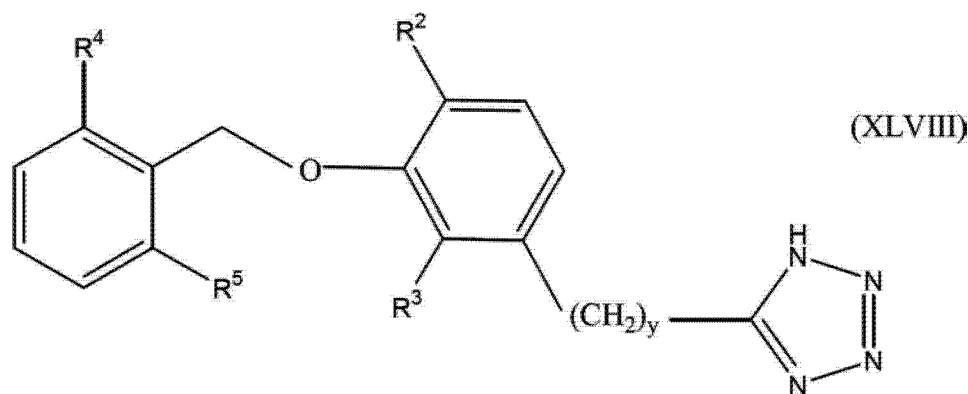
y 是 0、1、2 或 3；

R² 和 R³ 中的一个为氢，另一个选自由氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组；并且

A 是不具取代基或取代有一个、两个或三个下述基团的苯基，所述基团选自由卤素和具有 1 或 2 个碳原子的烷基组成的组。

10. 如权利要求 9 所述的应用，其中，A 是 2,6-二甲基苯基或 2,6-二氟苯基。

11. 如权利要求 9 所述的应用，其中，所述化合物由式 XLVIII 表示，



其中

y 是 0、1 或 2；

R² 和 R³ 中的一个为氢，另一个选自氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组；并且

R⁴ 和 R⁵ 独立地选自甲基、氟和氯组成的组。

12. 如权利要求 9 或 11 所述的应用，其中，R³ 为氢；R² 选自氢、甲基和甲氧基组成的组；R⁴ 为甲基；并且 R⁵ 为甲基。

13. 如权利要求 12 所述的应用，其中，所述化合物选自下述化合物组成的组：

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苄基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苄基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯乙基)-1H-四唑；和

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲基苄基)-1H-四唑。

14. 如权利要求 7 所述的应用，其中，所述化合物选自下述化合物组成的组：

5-(4-(2,6-二氟苄氧基)苄基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)-1H-四唑；和

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)-1H-四唑。

15. 如权利要求 7 所述的应用，其中，将所述药物配制成用于口服。

16. 如权利要求 7 所述的应用，其中，选择施用量以使对哺乳动物对象施用所述药物能使下述病症得到治疗或预防，所述病症选自痛风、高尿酸血症、未达到通常确诊为高尿酸血症的水平的高尿酸水平、肾功能障碍、肾结石、心血管疾病、发展心血管疾病的风险、肿瘤溶解综合征、认知障碍、早发型原发性高血压和恶性疟原虫导致的炎症组成的组。

17. 如权利要求 7 所述的应用，其中，将所述药物配制成与一种或多种其他尿酸降低药以能有效降低所述对象血液中的尿酸浓度或增加所述对象的尿酸排泄的组合量组合施用。

18. 如权利要求 17 所述的应用，其中，所述其他尿酸降低药选自黄嘌呤氧化酶抑制剂、排尿酸剂、尿酸盐转运子-1 抑制剂、尿酸酶和他汀组成的组。

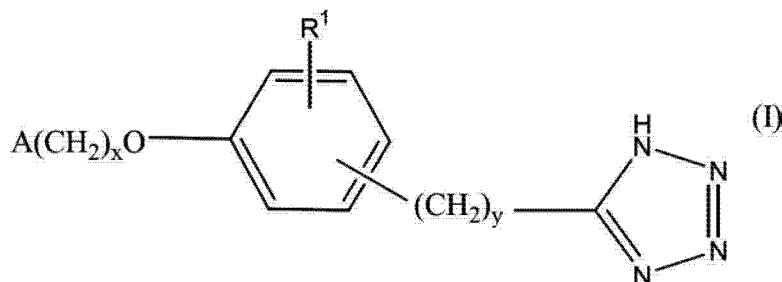
19. 如权利要求 17 所述的应用，其中，所述其他尿酸降低药的施用量小于其单独施用时的常规治疗剂量。

20. 如权利要求 17 所述的应用，其中，所述药物包含以共混物形式混合在一起的所述化合物和所述一种或多种其他尿酸降低药。

21. 如权利要求 17 所述的应用，其中，所述化合物和所述一种或多种其他尿酸降低药

并不混合在一起形成共混物。

22. 一种用于降低哺乳动物对象血液中的尿酸浓度或增加哺乳动物对象的尿酸排泄的药物组合物,所述药物组合物包含药用载体和式 I 表示的化合物,式 I 表示的化合物的量为能有效降低所述对象血液中的尿酸浓度或增加所述对象的尿酸排泄,



其中,

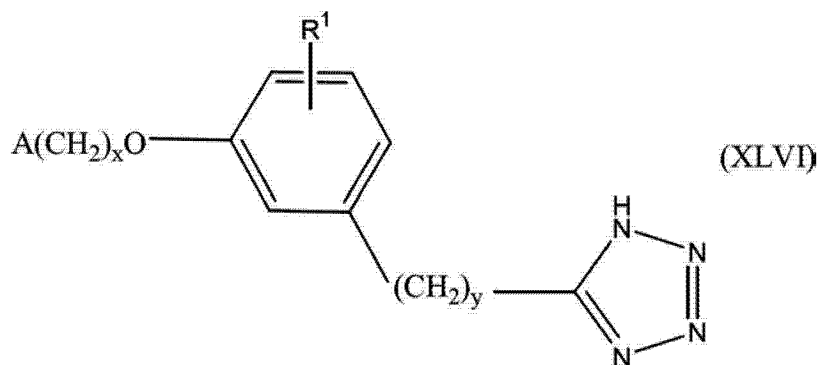
x 是 1 ;

y 是 0、1、2 或 3 ;

R¹ 选自由氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组 ;

A 是不具取代基或取代有一个、两个或三个下述基团的苯基,所述基团选自由卤素和具有 1 或 2 个碳原子的烷基组成的组。

23. 如权利要求 22 所述的药物组合物,其中,所述化合物由式 XLVI 表示,



其中

x 是 1 ;

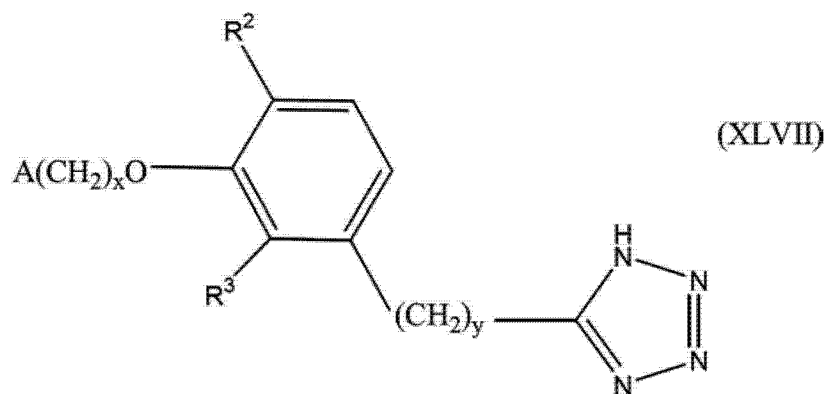
y 是 0、1、2 或 3 ;

R¹ 选自由氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组 ;并

且

A 是不具取代基或取代有一个、两个或三个下述基团的苯基,所述基团选自由卤素和具有 1 或 2 个碳原子的烷基组成的组。

24. 如权利要求 23 所述的药物组合物,其中,所述化合物由式 XLVII 表示,



其中

x 是 1；

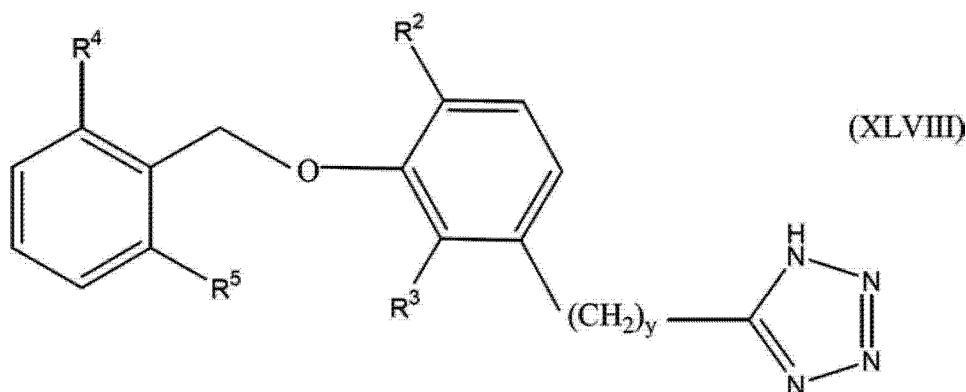
y 是 0、1、2 或 3；

R² 和 R³ 中的一个为氢，另一个选自氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组；并且

A 是不具取代基或取代有一个、两个或三个下述基团的苯基，所述基团选自自由卤素和具有 1 或 2 个碳原子的烷基组成的组。

25. 如权利要求 24 所述的药物组合物，其中，A 是 2,6-二甲基苯基或 2,6-二氟苯基。

26. 如权利要求 24 所述的药物组合物，其中，所述化合物由式 XLVIII 表示，



其中

y 是 0、1 或 2；

R² 和 R³ 中的一个为氢，另一个选自氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基和具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基组成的组；并且

R⁴ 和 R⁵ 独立地选自甲基、氟和氯组成的组。

27. 如权利要求 24 或 26 所述的药物组合物，其中，R³ 是氢；R² 选自氢、甲基和甲氧基组成的组；R⁴ 是甲基；并且 R⁵ 是甲基。

28. 如权利要求 27 所述的药物组合物，其中，所述化合物选自下述化合物组成的组：

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苄基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苄基)-1H-四唑；

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苄基)-1H-四唑；和

5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲基苄基)-1H-四唑。

29. 如权利要求 22 所述的药物组合物,其中,所述化合物选自由下述化合物组成的组:
5-(4-(2,6-二氟苄氧基)苄基)-1H-四唑;
5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)-1H-四唑;和
5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)-1H-四唑。

30. 如权利要求 22 所述的药物组合物,所述药物组合物用于治疗或预防下述病症,所述病症选自由痛风、高尿酸血症、未达到通常确诊为高尿酸血症的水平的高尿酸水平、肾功能障碍、肾结石、心血管疾病、发展心血管疾病的风险、肿瘤溶解综合征、认知障碍、早发型原发性高血压和恶性疟原虫导致的炎症组成的组。

31. 如权利要求 22 所述的药物组合物,其中,所述药物组合物配制成与一种或多种其他尿酸降低药以能有效降低所述对象血液中的尿酸浓度或增加所述对象的尿酸排泄的组合物组合施用。

32. 如权利要求 31 所述的药物组合物,其中,所述其他尿酸降低药选自由黄嘌呤氧化酶抑制剂、排尿酸剂、尿酸盐转运子-1 抑制剂、尿酸酶和他汀组成的组。

33. 如权利要求 31 所述的药物组合物,其中,所述其他尿酸降低药的施用量小于其单独施用时的常规治疗剂量。

34. 如权利要求 31 所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含以共混物形式混合在一起的所述化合物和所述一种或多种其他尿酸降低药。

35. 如权利要求 31 所述的药物组合物,其中,所述化合物和所述一种或多种其他尿酸降低药并不混合在一起形成共混物。

36. 如权利要求 22 所述的药物组合物,所述药物组合物被配制成用于口服。

用于减少尿酸的四唑化合物

背景技术

[0001] 尿酸水平升高引发的疾病分为两种主要类型：尿酸晶体析出引发的紊乱和与溶解性尿酸的病理作用有关的疾病。痛风性关节炎是前一类型的常见实例。尿酸盐晶体在肾脏中的沉积也是肾功能障碍的常见原因。溶解性尿酸水平的升高与包括心血管疾病和肾病在内的多种紊乱有关。

[0002] 痛风最常见地表现为造成轻度疼痛至剧痛的体内一个或多个关节的炎症。这些事件可以是阵发性的和/或慢性的。随着时间推移，痛风可造成软骨和硬骨的破坏、尿酸晶体沉积物的累积、肾脏疼痛和功能障碍，以及肾结石。痛风还会影响其他器官。

[0003] 痛风是由高尿酸血症和继而尿酸晶体在组织、关节、肾脏和其他器官中的形成和沉积所引发的。尿酸来自正常的细胞代谢以及来自某些类型的食物和饮料。过高水平的尿酸是过量尿酸生成、肾脏的清除受损（或是过量生成与清除受损的组合）的结果，也可能是为了其他健康状况而服用某些形式的药物的结果（实例包括利尿剂、吡嗪酰胺、环孢菌素、低剂量阿司匹林、烟酸和左旋多巴）。多种健康状况也可能加剧高尿酸血症和痛风，包括酒精中毒、白血病、淋巴瘤、肺癌、肿瘤溶解综合征、吸烟、银屑病、肥胖、肾功能障碍、充血性心力衰竭、饥饿、贫血、高血压、糖尿病、不动（immobility）、雷-纳（二氏）综合征、唐氏综合征，以及甲状腺和甲状旁腺功能障碍。

[0004] 按照逐渐严重的症状，痛风一般分成四种类型：

[0005] 1) 无症状。血液中的尿酸水平升高，但是没有明显症状。

[0006] 2) 急性痛风性关节炎：通常在一个关节（一般是大脚趾）中突发症状，并随后牵连其他关节。症状包括疼痛、肿胀、发红、发热。

[0007] 3) 发作间期痛风：痛风发作之间的无症状阶段。

[0008] 4) 慢性痛风石性痛风：一种慢性疾病，可能包括频繁发作、持续关节轻度疼痛和发炎、软骨和硬骨的破坏、尿酸晶体沉积物的累积、肾功能障碍和肾结石。

[0009] 目前用于治疗痛风急性症状的药物包括非甾体抗炎药、秋水仙素和皮质类固醇。所有这些药物均会产生轻度至严重的副作用。用于这些急性症状的其他治疗方法正处于研究当中，包括针对诸如白细胞介素-1 等炎症细胞因子的抗体和拮抗剂。

[0010] 为了尝试通过降低尿酸的水平来降低将来发作的发生率或严重程度，使用了其他类型的药物。主要的三类药物是：黄嘌呤氧化酶抑制剂（例如别嘌呤醇），所述抑制剂减少由黄嘌呤产生尿酸；排尿酸剂（例如磺吡酮、丙磺舒、苯溴马隆和氯沙坦），所述排尿酸剂用于通过抑制尿酸转运子 1 (URAT1)（也参见美国专利申请公报第 2007/0010670 号，2007 年 1 月 11 日公布 (Japan Tobacco Inc.)）或尿酸重摄取的其他要素来抑制分泌的尿酸在肾小管中的重摄取从而改善尿酸的排泄；和尿酸酶，如 PURICASE (Savient 的聚乙二醇化重组哺乳动物尿酸酶) 等聚乙二醇化尿酸酶。这些药物也常常导致显著的、不利的副作用。例如，已报道别嘌呤醇每年在欧洲导致至少 100 例重症多形红斑 (Stevens-Johnson)/ 中毒性表皮坏死松解症和大约 30 例死亡 (Halevy 等, Allopurinol is the most common cause of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Europe and Israel.

J Am Acad Dermatol. 58(1):25 ~ 32, 2008)。丙磺舒和苯溴马隆由于其不利的副作用（例如苯溴马隆情况中的肝功能衰竭）而已经在很多国家的市场上被取缔。据报道，患者服用这些药物的顺从性极差（A. A. Reidel 等，“Compliance with Allopurinol Therapy among Managed Care Enrollees with Gout: A Retrospective Analysis of Administrative Claims.” *Journal of Rheumatology* 2004;31:1575 ~ 1581），这大概是因为副作用和 / 或缺乏成效。

[0011] 在美国有超过五百万人患有痛风（National Health and Nutrition Examination Survey 111, 1988 ~ 1994）。据报道，1999 年在美国高尿酸血症和痛风的患病率为每 1000 人中有 41 例，在英国则是每 1000 人中有 14 例（T. R. Mikuls 等，“Gout Epidemiology: Results for the UK General Practice Research Database, 1990 ~ 1999.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005;64:267 ~ 272）。随后的报道表明在美国、英国和其他国家的患病率在稳步攀升（K. L. Wallace 等，“Increasing Prevalence of Gout and Hyperuricemia over 10 Years Among Older Adults in a Managed Care Population.” *Journal of Rheumatology* 2004;31:1582 ~ 1587）。最近的数据表明远远超过五百万美国人现在患有可确诊的痛风（E. Krishnan 等，“Gout in Ambulatory Care Settings in the United States.” *Journal of Rheumatology* 2008;35(3):498 ~ 501）。

[0012] 高尿酸血症和痛风在器官移植接受者中是特别重要的问题（Stamp, L. 等，“Gout in solid organ transplantation: a challenging clinical problem”, *Drugs* (2005) 65(18):2593 ~ 2611）。肾移植患者的尿酸水平通常较高，而常见的免疫抑制药物（如环孢菌素）会导致特别严重的高尿酸血症。在移植患者中，别嘌呤醇是禁用的，这是因为其与诸如硫唑嘌呤等一些免疫抑制剂的相互作用，还因为联用所导致的骨髓衰竭。此外，较高的尿酸可能造成移植失败（Armstrong, K. A. 等，“Does Uric Acid Have a Pathogenetic Role in Graft Dysfunction and Hypertension in Renal Transplant Patients?” *Transplantation* (2005) 80(11):1565 ~ 1571）。因此，特别迫切地需要可减少移植接受者的高尿酸血症的安全药剂。

[0013] 与高水平的溶解性尿酸有关的疾病常常涉及血管问题：高血压（Sundstrom 等，Relations of serum uric acid to longitudinal blood pressure tracking and hypertension incidence. *Hypertension*. 45(1):28 ~ 33, 2005）、高血压前期（Syamela, S. 等，Association between serum uric acid and prehypertension among US adults. *J Hypertens*. 25(8):1583 ~ 1589, (2007))、动脉粥样硬化（Ishizaka 等，Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (5):1038 ~ 44, 2005）、外周动脉病变（Shankar, A. 等，Association between serum uric acid level and peripheral artery disease. *Atherosclerosis* doi 10:1016, 2007）、血管炎（Zoccali 等，Uric acid and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 17(5):1466 ~ 71, 2006）、心力衰竭（Strasak, A. M. 等，Serum uric acid and risk of cardiovascular mortality: A prospective, long-term study of 83,683 Austrian men, *Clin Chem*. 54(2):273 ~ 284, 2008; Pascual-Figal, Hyperuricaemia and long-term outcome after hospital discharge in acute heart failure patients. *Eur J Heart*

Fail. 2006 Oct 23; [Epub ahead of print]; Cengel, A. 等, “Serum uric Acid Levels as a Predictor of In-hospital Death in Patients Hospitalized for Decompensated Heart Failure.” *Acta Cardiol.* (Oct. 2005) 60(5): 489 ~ 492)、心肌梗塞 (Strasak, A.M. 等; Bos 等, Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke: the Rotterdam study. *Stroke.* 2006 Jun; 37(6): 1503 ~ 1507)、肾功能障碍 (Cirillo 等, Uric Acid, the metabolic syndrome, and renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 17(12 Suppl 3): S165 ~ 8, 2006; Z. Avram and E. Krishnan, Hyperuricemia—where nephrology meets rheumatology. *Rheumatology* (Oxford), 47(7): 960 ~ 964, 2008) 以及中风 (Bos 等, 2006)。尿酸直接引发内皮功能障碍 (Kanellis 等, Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease. *Semin Nephrol.* 25(1): 39 ~ 42, 2005; Khosla 等, Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int.* 67(5): 1739 ~ 42, 2005)。在儿童和青少年中, 早发型原发性高血压与升高的血清尿酸水平有关, 使用别嘌呤醇降低尿酸会使这些患者的血压降低 (Feig 和 Johnson, The role of uric acid in pediatric hypertension. *J Ren Nutrition* 17(1): 79 ~ 83, 2007; D. I. Feig 等, Effect of allopurinol on blood pressure of adolescents with newly diagnosed essential hypertension. *JAMA* 300(8): 924 ~ 932, 2008)。Feig 等也声称, 虽然这是一种新型治疗方法, 但是用于降低尿酸的现有药物的副作用可能会限制或阻碍它们的使用。高尿酸血症在所有这些病症中是独立的风险因素。

[0014] 高水平的溶解性尿酸也与炎症反应有关, 或直接诱发炎症反应。例如, 尿酸经由有机酸转运子, 尤其是尿酸盐转运子 URAT1 而被转运至血管平滑肌细胞中, 随后刺激血管平滑肌细胞产生 C 反应蛋白、MCP-1 和其他细胞因子, 由此刺激与动脉粥样硬化有关的增生和其他变化 (Price 等, Human vascular smooth muscle cells express a urate transporter. *J Am Soc Nephrol.* 17(7): 1791 ~ 5, 2006; Kang 等, Uric acid causes vascular smooth muscle cell proliferation by entering cells via a functional urate transporter. *Am J Nephrol.* 2005; 25(5): 425 ~ 33 (2005); Yamamoto 等, Allopurinol reduces neointimal hyperplasia in the carotid artery ligation model in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 29(11): 915 ~ 921, 2006), 刺激人类单核细胞产生 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α , 在输注给小鼠时造成 TNF- α 的显著增多, 激活内皮细胞和血小板并提高血小板粘附 (Coutinho 等, “Associations of Serum Uric Acid with Markers of Inflammation, Metabolic Syndrome, and Subclinical Coronary Atherosclerosis”, *Amer. J. Hypertens.* (2007) 20: 83 ~ 89; Levya, F. 等, “Uric Acid in Chronic Heart Failure: A Marker of Chronic Inflammation”, *Eur. Heart J.* (1998) 19(12): 1814 ~ 1822.)。尿酸也显示出抑制内皮一氧化氮的生物利用度并激活肾素-血管紧张素系统 (T. S. Perlstein 等, Uric acid and the state of the intrarenal renin-angiotensin system in humans. *Kidney International.* 66: 1465 ~ 1470, 2004)。Inokuchi 等指出白细胞介素 18 (IL-18) 和其他炎性剂反映了与痛风有关的局部炎症, 并指出尿酸盐晶体加快了 IL-18 的激活 (T. Inokuchi 等, Plasma IL-18 and other inflammatory cytokines in patients with gouty arthritis and monosodium urate monohydrate crystal-induced secretion of IL-18. *Cytokine.* 33(1): 21 ~ 27, 2006), 这似乎在肾衰竭中

起的是病因作用。在本身并未患有痛风而仅仅具有较高的尿酸水平的人群中, IL-18 和其他细胞因子也明显升高 (C. Ruggiero 等, Uric acid and inflammatory markers. *European Heart Journal*. 27 :1174 ~ 1181, 2006)。

[0015] 高尿酸血症也与认知障碍以及其他形式中枢神经系统功能障碍有关 (Schretlen, D. J. 等, “Serum Uric Acid and Cognitive Function in Community-Dwelling Older Adults”, *Neuropsychology* (Jan. 2007) 21(1) :136 ~ 140 ;Watanabe, S. 等, “Cerebral Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Oxonate-Induced Hyperuricemic Mice”, *J. Health Science* (2006) 52 :730 ~ 737)。

[0016] 升高的血清尿酸水平也与增大的癌症和癌症死亡率的风险有关。(Strasak, AM 等, (2007) Serum uric acid and risk of cancer mortality in a large prospective male cohort. *Cancer Causes Control* 18(9) 1021 ~ 1029 ;Strasak, AM 等, (2007) The role of serum uric acid as an antioxidant protecting against cancer :prospective study in more than 28,000 older Austrian women. *Annals Oncol* 18(11) 1893 ~ 1897 ;Jee, SA 等, (2004) Serum uric acid and risk of death from cancer, cardiovascular disease or all causes in men *Eur. J. Cardiovascular Prev. Rehab.* 11(3) 185 ~ 191)。

[0017] 升高的尿酸水平也与糖尿病前期、胰岛素抵抗、II 型糖尿病的发展以及患有糖尿病的人群中的多种不利病症 (例如外周动脉病变、中风和较高的死亡率风险) 的增加的可能性有关 (Ioachimescu, A. G. 等, (2007) Serum uric acid, mortality and glucose control in patients with Type 2 diabetes mellitus :a PreCIS database study *Diabet. Med.* 24(12) 1369 ~ 1374 ;Perry, I. J. 等, (1995) Prospective study of risk factors for development of non-insulin dependent diabetes in middle aged British men *BMJ* 310(6979) 560 ~ 564 ;Chien, K-L 等, (2008) Plasma uric acid and the risk of Type 2 diabetes in a Chinese community *Clin. Chem.* 54(2) 310 ~ 316 ;Sautin, Y. Y. 等, (2007) Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes :NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293 :C584 ~ C596 ;Tseng, C. H. (2004) Independent association of uric acid levels with peripheral artery disease in Taiwanese patients with Type 2 diabetes *Diabet. Med.* 21(7) 724 ~ 729 ;Lehto, S. 等, (1998) Serum uric acid is a strong predictor of stroke in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus *Stroke* 29 :635 ~ 639)。

[0018] 升高的尿酸水平是雷 - 纳 (二氏) 综合征的限定特征。患有睡眠呼吸暂停或睡眠呼吸紊乱的人群也具有升高的尿酸水平 (Saito, H. 等, Tissue hypoxia in sleep apnea syndrome assessed by uric acid and adenosine. *Chest* 122 :1686 ~ 1694, 2002 ;Verhulst, S. L. 等, Sleep-disordered breathing and uric acid in overweight and obese children and adolescents. *Chest* 132 :76 ~ 80, 2007)。

[0019] 升高的尿酸水平与先兆子痫有关 (Bainbridge, S. A. & Roberts, J. M., Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta*, 2007 年 12 月 17 日, epub ahead of print)。

[0020] “尿酸是人类外周血单核细胞中恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 引发的炎症反应的主

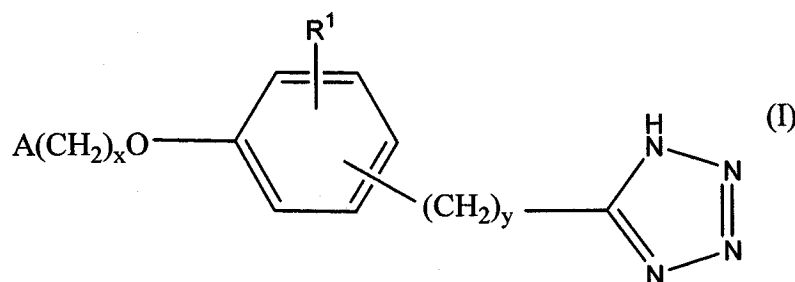
要病因…… [T] 恶性疟原虫引起的炎症反应被认为是疟疾发病机制的主要原因……” PLoS ONE 2009 ;4(4) :e5194. Epub 2009Apr 17。

[0021] 在医疗上非常需要这样的新型药物 :该药物能够安全、方便且有效地治疗和预防与血液尿酸的升高有关的紊乱,而无论这些疾病是由于尿酸结晶所致的,还是由于溶解性尿酸的超常水平(无论是基于个体还是基于人群的标准)的影响所致的。

发明内容

[0022] 本发明提供一种式 I 表示的化合物,

[0023]



[0024] 在式 I 中, x 是 1 或 2 ; y 是 0、1、2 或 3 ; R¹ 选自由氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基、羟基、具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基、氟、氯、溴和氨基组成的组。A 是不具取代基或取代有一个、两个或三个下述基团的苯基,所述基团选自由卤素、具有 1 或 2 个碳原子的烷基、全氟甲基、具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基和全氟甲氧基组成的组 ;或者具有 3 ~ 6 个环原子的环烷基,其中所述环烷基不具取代基,或者一个或两个环碳独立地单取代有甲基或乙基 ;或者具有 1 个或 2 个选自 N、S 和 O 的环杂原子的 5 元或 6 元杂芳环,并且所述杂芳环通过环碳与所述化合物的其余部分共价连接。

[0025] 本发明提供一种降低哺乳动物对象血液中的尿酸浓度或增加哺乳动物对象的尿酸排泄的方法,所述方法包括对所述对象施用本发明的化合物,施用量为能有效降低所述对象血液中的尿酸浓度或有效增加所述对象的尿酸排泄。本发明提供用于降低哺乳动物血液中的尿酸浓度或增加哺乳动物的尿酸排泄的本发明的化合物。本发明提供本发明的化合物在制备用于降低哺乳动物血液中的尿酸浓度或增加哺乳动物的尿酸排泄的药物中的应用。本发明提供一种用于降低哺乳动物对象血液中的尿酸浓度或增加哺乳动物对象的尿酸排泄的药物组合物,所述药物组合物包含能有效降低所述对象血液中的尿酸浓度或增加所述对象的尿酸排泄的量的本发明的化合物。本发明提供一种试剂盒,所述试剂盒包含一个或多个单位口服剂量的本发明的化合物,以及施用所述化合物以降低哺乳动物对象血液中的尿酸浓度和增加哺乳动物对象的尿酸排泄的说明书。

[0026] 本文所述的降低尿酸可用于治疗或预防包括痛风(下列任一项或全部 :无症状痛风、急性痛风性关节炎、发作间期痛风和慢性痛风石性痛风)、高尿酸血症、未达到通常确证为高尿酸血症的水平的高尿酸水平、肾功能障碍、肾结石、心血管疾病、发展心血管疾病和高尿酸血症的其他引发症的风险、认知障碍、早发型原发性高血压和恶性疟原虫导致的炎症在内的多种病症。

[0027] 本发明以下述观察为基础 :如实施例 7 所示,本发明的化合物在体外抑制 URAT1。URAT1 的抑制是确立的在体内降低尿酸的体外模型。

附图说明

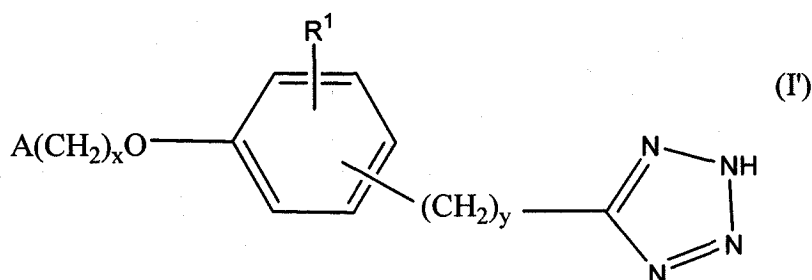
- [0028] 图 1 : 化合物 EB 对 hURAT1-HEK 细胞中 ^{14}C - 尿酸盐摄取的浓度相关抑制效果。
 [0029] 图 2 : 化合物 EC 对 hURAT1-HEK 细胞中 ^{14}C - 尿酸盐摄取的浓度相关抑制效果。
 [0030] 图 3 : 小鼠血浆中的化合物 EB 的浓度。
 [0031] 图 4 : 大鼠血浆中的化合物 EB 校准曲线, LC-MS。
 [0032] 图 5 : 大鼠血浆中的化合物 EB 的浓度。
 [0033] 图 6 : 大鼠血浆中的化合物 EC 校准曲线, LC-MS。
 [0034] 图 7 : 大鼠血浆中的化合物 EC 的浓度。
 [0035] 图 8 : 大鼠血浆中的化合物 EG 校准曲线, LC-MS。
 [0036] 图 9 : 大鼠血浆中的化合物 EG 的浓度。

具体实施方式

[0037] 定义

[0038] 1H- 四唑 -5- 基部分和相应的 2H- 四唑 -5- 基部分可作为互变异构体存在。在本文件中, 参照 1H- 互变异构体命名化合物并书写结构式。所有此类指代都应理解为包括这两种互变异构形式。因而, 例如“5-(3-(2,6- 二甲基苄氧基)- 苄基)-1H- 四唑”包括 5-(3-(2,6- 二甲基苄氧基)- 苄基)-1H- 四唑和 5-(3-(2,6- 二甲基苄氧基)- 苄基)-2H- 四唑。并且式 I 包括上述式 I 及下式 I' 表示的其 2H- 四唑 -5- 基互变异构形式。

[0039]



[0040] 本文所用的术语“烷基”指直链或支链的烷基基团。被称为具有一定数目碳原子的烷基基团指具有该指定数目的碳的任何烷基基团。例如, 具有三个碳原子的烷基可以是丙基或异丙基; 具有四个碳原子的烷基可以是正丁基、1- 甲基丙基、2- 甲基丙基或叔丁基。

[0041] 本文所用的术语“卤素”指氟、氯、溴和碘中的一种或多种。

[0042] 本文在如全氟甲基或全氟甲氧基中所用的术语“全氟”指所述基团的所有的氢原子均被氟原子代替。

[0043] 本文中某些化合物用其化学名或如下所示的双字母代码来表示。化合物 EB ~ 化合物 EI 和化合物 BD 包括在上文所示的式 I 的范围内。

- [0044] EB 5-(3-(2,6- 二甲基苄氧基)- 苄基)-1H- 四唑
 [0045] EC 5-(3-(2,6- 二甲基苄氧基)- 苄基)-1H- 四唑
 [0046] ED 5-(3-(2,6- 二甲基苄氧基)-4- 甲氧基苄基)-1H- 四唑
 [0047] EF 5-(3-(2,6- 二甲基苄氧基)- 苄乙基)-1H- 四唑
 [0048] EG 5-(3-(2,6- 二甲基苄氧基)-4- 甲基苄基)-1H- 四唑

[0049] BD 5-(4-(2,6-二氟苄氧基)-苄基)-1H-四唑

[0050] EH 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)-1H-四唑

[0051] EI 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)-1H-四唑

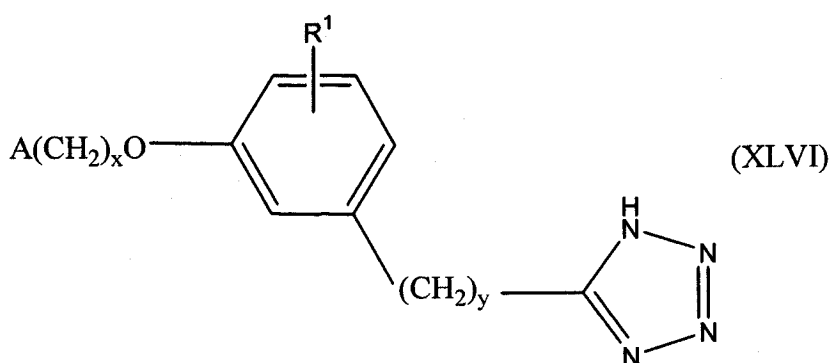
[0052] 本文所用的过渡术语“包含”是开放式的。使用该术语的权利要求可含有除该权利要求中所述的那些要素以外的要素。

[0053] 权利要求中使用的词语“或”是指“和 / 或”，除非该解读在上下文中无意义。因此，例如短语“降低哺乳动物对象血液中的尿酸浓度或增加哺乳动物对象的尿酸排泄”等同于“降低哺乳动物对象血液中的尿酸浓度和 / 或增加哺乳动物对象的尿酸排泄”。

[0054] 本发明的化合物

[0055] 在上述“发明内容”中所述的化合物、方法、应用或药物组合物中的一个实施方式中，所述化合物由式 XLVI 表示：

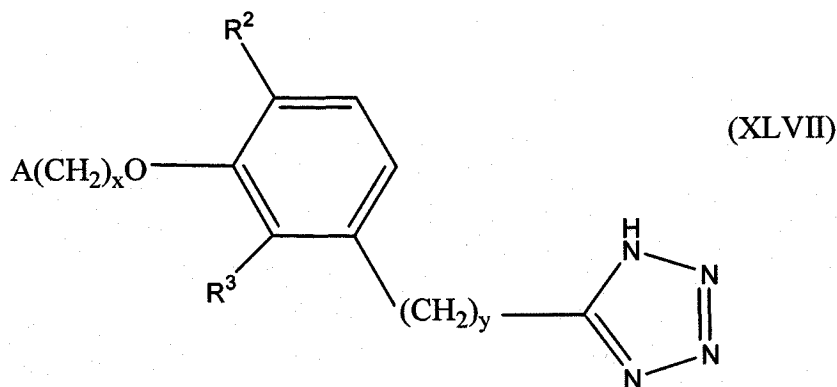
[0056]



[0057] 其中 x、y、R¹ 和 A 如上述式 I 所述。

[0058] 在本发明的另一个实施方式中，所述化合物由式 XLVII 表示：

[0059]

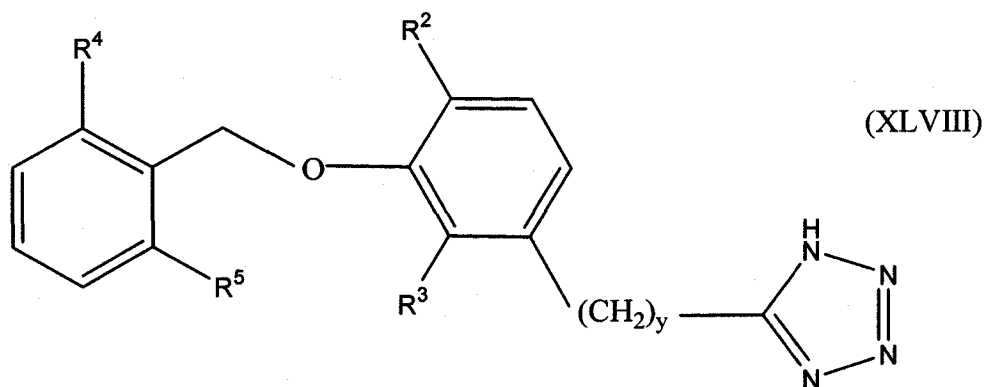


[0060] 其中 x、y 和 A 如上述式 I 所述；R² 和 R³ 中的一个为氢，另一个选自氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基、羟基、具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基、氟、氯、溴和氨基组成的组。

[0061] 在本发明的一个实施方式中，在式 I、XLVI 或 XLVII 中，x 是 1。在另一个实施方式中，A 是不具取代基或取代有一个、两个或三个下述基团的苯基，所述基团选自卤素、具有 1 或 2 个碳原子的烷基、全氟甲基、具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基和全氟甲氧基组成的组。在更具体的实施方式中，A 是 2,6-二甲基苯基或 2,6-二氟苯基。优选的是，A 为 2,6-二甲基苯基。

[0062] 在本发明的一个实施方式中，所述化合物由式 XLVIII 表示：

[0063]



[0064] 其中 y 是 0、1、2 或 3； R^2 和 R^3 中的一个为氢，另一个选自氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基、羟基、具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基、氟、氯、溴和氨基组成的组；并且 R^4 和 R^5 独立地选自甲基、氟和氯组成的组。

[0065] 在本发明的一个实施方式中，在式 I、XLVI、XLVII 或 XLVIII 中， y 是 0、1 或 2。在本发明的一个实施方式中，在式 XLVII 或 XLVIII 中， R^3 是氢； R^2 选自氢、具有 1 或 2 个碳原子的烷基、羟基、具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基、氟、氯、溴和氨基组成的组。在更具体的实施方式中， R^3 是氢； R^2 选自氢、甲基和甲氧基组成的组。在本发明的另一实施方式中，在式 XLVII 或 XLVIII 中， R^2 是氢； R^3 选自具有 1 或 2 个碳原子的烷基、羟基、具有 1 或 2 个碳原子的烷氧基、氟、氯、溴和氨基组成的组。在更具体的实施方式中， R^2 是氢； R^3 选自甲基和甲氧基组成的组。在式 XLVIII 的另一个实施方式中， R^4 和 R^5 都是甲基或都是氟。优选的是两者均为甲基。

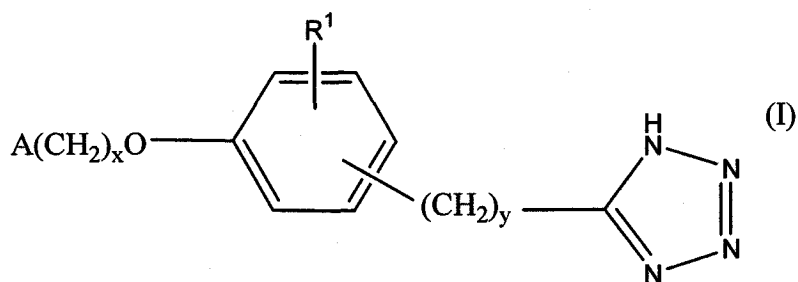
[0066] 在本发明的具体实施方式中，所述化合物选自下述化合物组成的组：5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯基)-1H-四唑；5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苄基)-1H-四唑；5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苄基)-1H-四唑；5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯乙基)-1H-四唑；5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲基苄基)-1H-四唑；5-(4-(2,6-二氟苄氧基)苄基)-1H-四唑；5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)-1H-四唑；和 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)-1H-四唑。

[0067] 在本发明的化合物的一个实施方式中，所述化合物是基本上（至少 98%）纯品形式。

[0068] 反应流程图

[0069] 可经由流程图 1 的反应制备式 I 化合物：其中 x 是 1 或 2； y 是 0 ~ 3； R^1 是氢、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基，即下式化合物：

[0070]



[0071] 其中 A 如上所述。在流程图 1 的反应中，A、 x 、 y 和 R^1 如上所述，L 是离去基团。

[0072] 可经由步骤 (a) 的反应, 使用三苯基膦和偶氮二甲酸二乙酯或偶氮二甲酸二异丙基酯, 利用 II 与 III 的 Mitsunobu (三信) 缩合将式 II 的化合物转化为式 V 的化合物。该反应在适当的溶剂中进行, 例如四氢呋喃。通常用于 Mitsunobu 反应的任何条件都可用于进行步骤 (a) 的该反应。

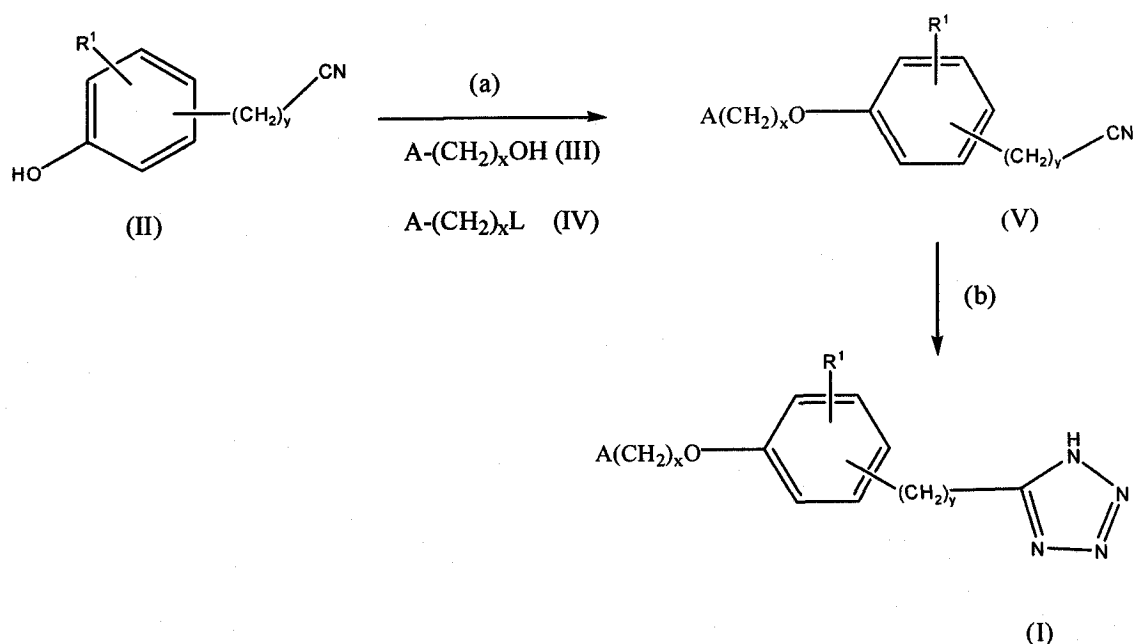
[0073] 也可以如步骤 (a) 中的反应, 通过使用适当的碱 (例如碳酸钾、三乙胺和吡啶等) 以式 IV 化合物将式 II 化合物醚化或烷基化来制备式 V 化合物。该反应在非质子溶剂中进行, 例如 N, N-二甲基甲酰胺、乙腈和二氯甲烷等。在式 IV 的化合物中, L 包括但不限于甲磺酰氧基、甲苯磺酰氧基、氯、溴和碘等。通过与卤离子或离去基团反应而使羟基醚化的任何常规方法均可用于进行步骤 (a) 的反应。

[0074] 可经由步骤 (b) 的反应, 在路易斯酸 (例如氯化锌、氯化镁、氯化铝和四氯化锡等) 的存在下通过使腈与叠氮化物 (例如叠氮基三甲基硅烷) 或金属叠氮化物 (例如叠氮化钠、叠氮化钾、叠氮化锂, 优选的叠氮化物是叠氮化钠) 反应将式 V 的化合物转化为式 I 的化合物。该反应在如 N, N-二甲基甲酰胺等溶剂中于 $80^{\circ}\text{C} \sim 145^{\circ}\text{C}$ 的温度进行 6 小时 $\sim$ 60 小时。理想的反应采用使腈与叠氮化钠 / 氯化铵 / N, N-二甲基甲酰胺在 120°C 反应 24 小时。可通过诸如萃取、蒸发、层析和重结晶等技术分离和纯化产物。

[0075] 如果 A 是取代有 1 个或 2 个羟基基团的苯基, 则通常优选保护羟基。适当的保护基可以是 T. Greene 在 “Protective Groups in Organic Synthesis” 中所描述的。在步骤 (b) 的反应后可利用适当的脱保护剂 (例如 T. Greene 在 “Protective Groups in Organic Synthesis” 中所描述的那些) 将保护基脱除。

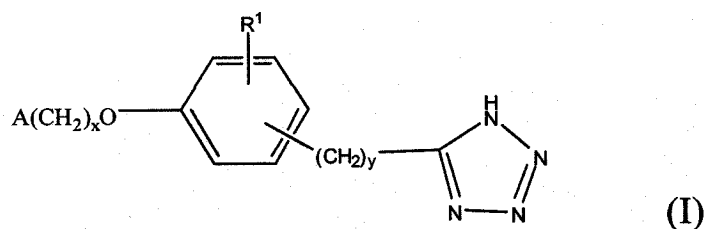
[0076] 反应流程图 1

[0077]



[0078] 可经由流程图 2 的反应制备式 I 的化合物, 其中 x 是 1 或 2, y 是 0 $\sim$ 3, R^1 是羟基, 即下式化合物:

[0079]



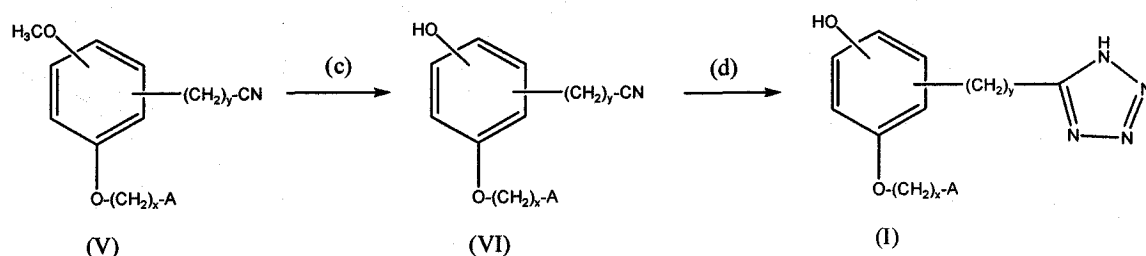
[0080] 其中 A 如上所述。在流程图 2 的反应中, A、x 和 y 如上所述。

[0081] 可经由步骤 (c) 的反应, 使用例如二氯甲烷等溶剂通过于 $-72^{\circ}\text{C} \sim 0^{\circ}\text{C}$ 的温度范围用三溴化硼或三氯化硼处理式 V 化合物 4 小时 $\sim$ 48 小时而将式 V 的化合物转化为式 VI 的化合物。通常用于这类脱甲基化反应的任何条件均可用于进行步骤 (c) 的反应。

[0082] 可经由步骤 (d) 的反应, 以与之前在步骤 (b) 的反应中所述同样的方式将式 VI 的化合物转化为式 I 的化合物, 其中式 I 中的 R^1 是羟基。可以通过诸如萃取、蒸发、层析和重结晶等技术分离和纯化产物。

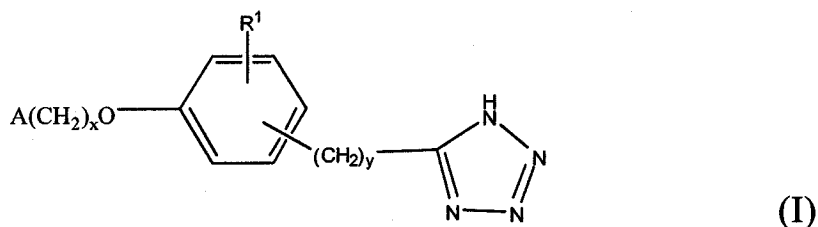
[0083] 反应流程图 2

[0084]



[0085] 可经由流程图 3 的反应制备式 I 的化合物, 其中 x 是 1 或 2, y 是 $0 \sim 3$, R^1 是氨基, 即下式化合物:

[0086]



[0087] 其中 A 如上所述。在流程图 3 的反应中, A、x 和 y 如上所述。P 是保护基。

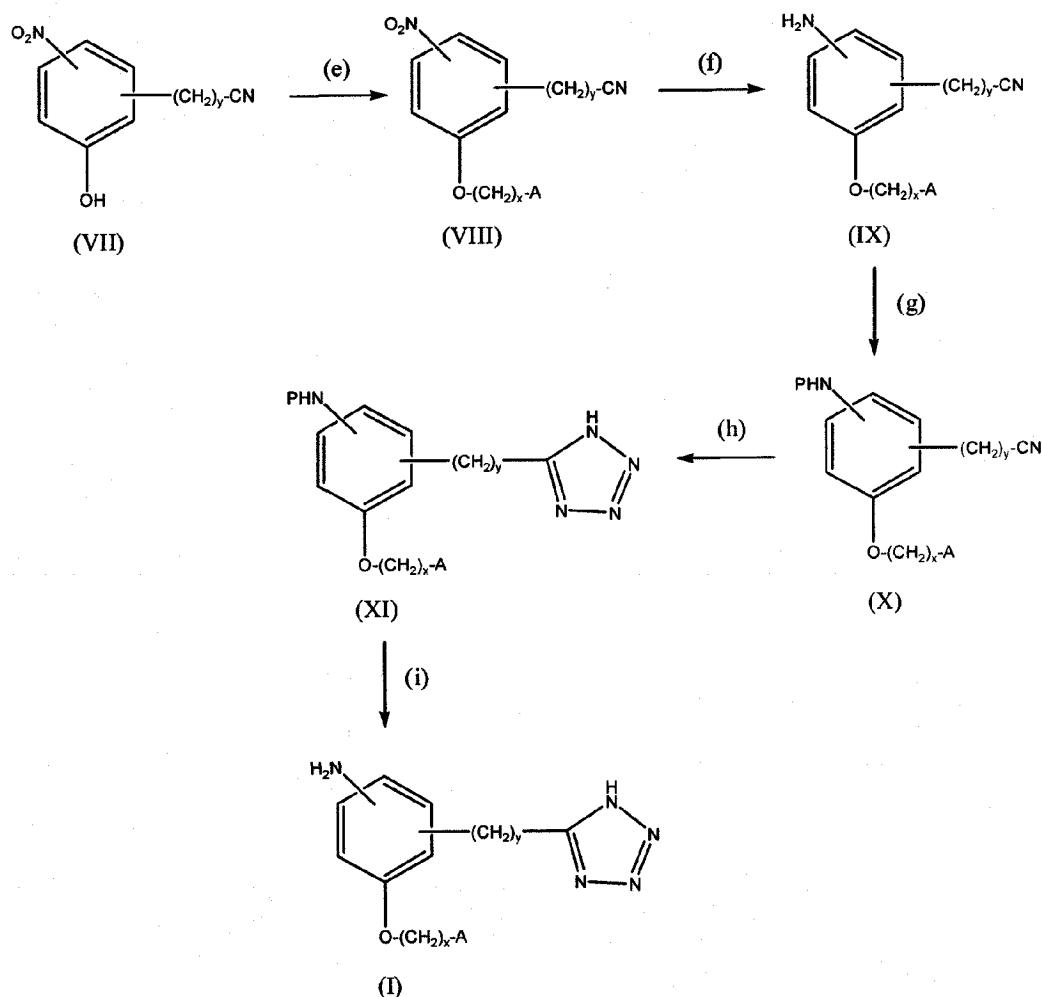
[0088] 可经由步骤 (e) 的反应, 以与之前在步骤 (a) 的反应中所述相同的方式将式 VII 的化合物转化为式 VIII 的化合物。可经由步骤 (f) 的反应, 通过将硝基还原成胺而将式 VIII 的化合物转化为式 IX 的化合物。还原剂可以是例如 Zn、Sn 或 Fe 等金属和酸。也可以通过催化氢化将硝基还原得到胺。优选的还原方法是催化氢化。通常用于这类还原反应的任何条件均可用于进行步骤 (f) 的反应。

[0089] 可经由步骤 (g) 的反应, 通过保护氨基而将式 IX 的化合物转化为式 X 的化合物。适当的保护基可以是 T. Greene 在“Protective Groups in Organic Synthesis”中所描述的。可经由步骤 (h) 的反应, 以与之前在步骤 (b) 的反应中所述相同的方式将式 X 的化合物转化为式 XI 的化合物。可经由步骤 (i) 的反应, 通过脱除氨基保护基而将式 XI 的化合物转化为式 I 的化合物, 在式 I 中 R^1 是氨基。适当的脱保护剂可以是 T. Greene 在“Protective

Groups in Organic Synthesis”中所描述的。可以通过诸如萃取、蒸发、层析和重结晶等技术分离和纯化产物。

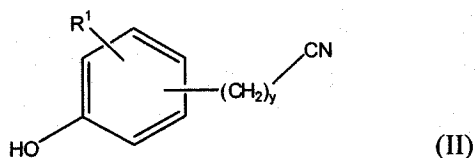
[0090] 反应流程图 3

[0091]



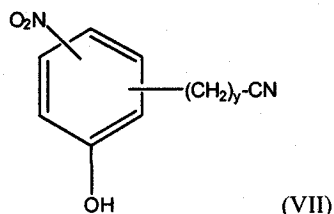
[0092] 可经由流程图 4 的反应制备式 II 的化合物和式 VII 的化合物,在所述式 II 的化合物中, y 是 1 ~ 3, R^1 是氢、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基,即下式化合物:

[0093]



[0094] 在所述式 VII 的化合物中, y 是 1 ~ 3, 即下式化合物:

[0095]



[0096] 在流程图 4 的反应中, R^3 是氢、氟、溴、氯、硝基、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基。P 是羟基保护基。 R^2 是具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基。Y 是卤素。

[0097] 可经由步骤 (j) 的反应, 通过利用适当的保护基 (例如, T. Greene 在“Protective Groups in Organic Synthesis”中所描述的那些保护基) 先保护羧基和羟基而将式 XII 的化合物转化为式 XIII 的化合物。

[0098] 可经由步骤 (k) 的反应, 通过利用将酯基转化为醇的常规还原剂将式 XIII 的化合物还原为式 XIV 的化合物, 其中 R^3 是氢、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基。进行反应时, 通常优选但不限于使用氢化锂铝。在如四氢呋喃等适当的溶剂中进行该反应。这类还原反应中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (k) 的反应。

[0099] 可通过使用能将酯转化为醇而不还原硝基的还原剂 (例如 BH_3 -THF 和 $NaBH_4-AlCl_3$ 等) 将式 XIII 的化合物还原为式 XIV 的化合物, 其中 R^3 是硝基。这类还原反应中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (k) 的反应。可通过将羟基置换为卤素 (优选的卤素是溴或氯) 而将式 XIV 的化合物转化为式 XV 的化合物。合适的卤化试剂包括但不限于亚硫酸氯、草酰氯、溴、三溴化磷、四溴化碳等。这类卤化反应中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (l) 的反应。

[0100] 可通过使 XV 与碱金属氰化物 (例如氰化钠或氰化钾) 或氰化铜反应而将式 XV 的化合物转化为式 XVI 的化合物。该反应可在如二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺等适当的溶剂中进行。通常用于由卤化物制备腈的任何反应条件均可用于进行步骤 (m) 的反应。

[0101] 可经由步骤 (n) 的反应, 通过利用适当的脱保护剂 (例如, T. Greene 在“Protective Groups in Organic Synthesis”中所描述的那些) 脱除羟基保护基而将式 XVI 的化合物转化为式 XVII 的化合物。式 XVII 的化合物就是下述式 II 的化合物, 其中 y 是 1, R^1 是氢、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基。式 XVII 的化合物也是下述式 VII 的化合物, 其中 y 是 1, R^3 是硝基。可经由步骤 (o) 的反应通过酸性水解或碱性水解将式 XVI 的化合物转化为式 XVIII 的化合物。进行该反应时, 通常优选利用碱性水解, 例如氢氧化钠乙醇溶液等。将腈水解为羧酸中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (o) 的反应。

[0102] 可经由步骤 (p) 的反应将式 XVIII 的化合物还原为式 XIX 的化合物。该反应可以以与之前在步骤 (k) 的反应中所述相同的方式进行。可经由步骤 (q) 的反应以与之前在步骤 (l) 的反应中所述相同的方式将式 XIX 的化合物转化为式 XX 的化合物。可经由步骤 (r) 的反应以与之前在步骤 (m) 的反应中所述相同的方式将式 XX 的化合物转化为式 XXI 的化合物。可经由步骤 (s) 的反应以与之前在步骤 (n) 的反应中所述相同的方式将式 XXI 的化合物转化为式 XXII 的化合物。

[0103] 式 XXII 的化合物就是下述式 II 的化合物, 其中 y 是 2, R^1 是氢、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基。式 XVII 的化合物也是下述式 VII 的化合物, 其中 y 是 2, R^3 是硝基。

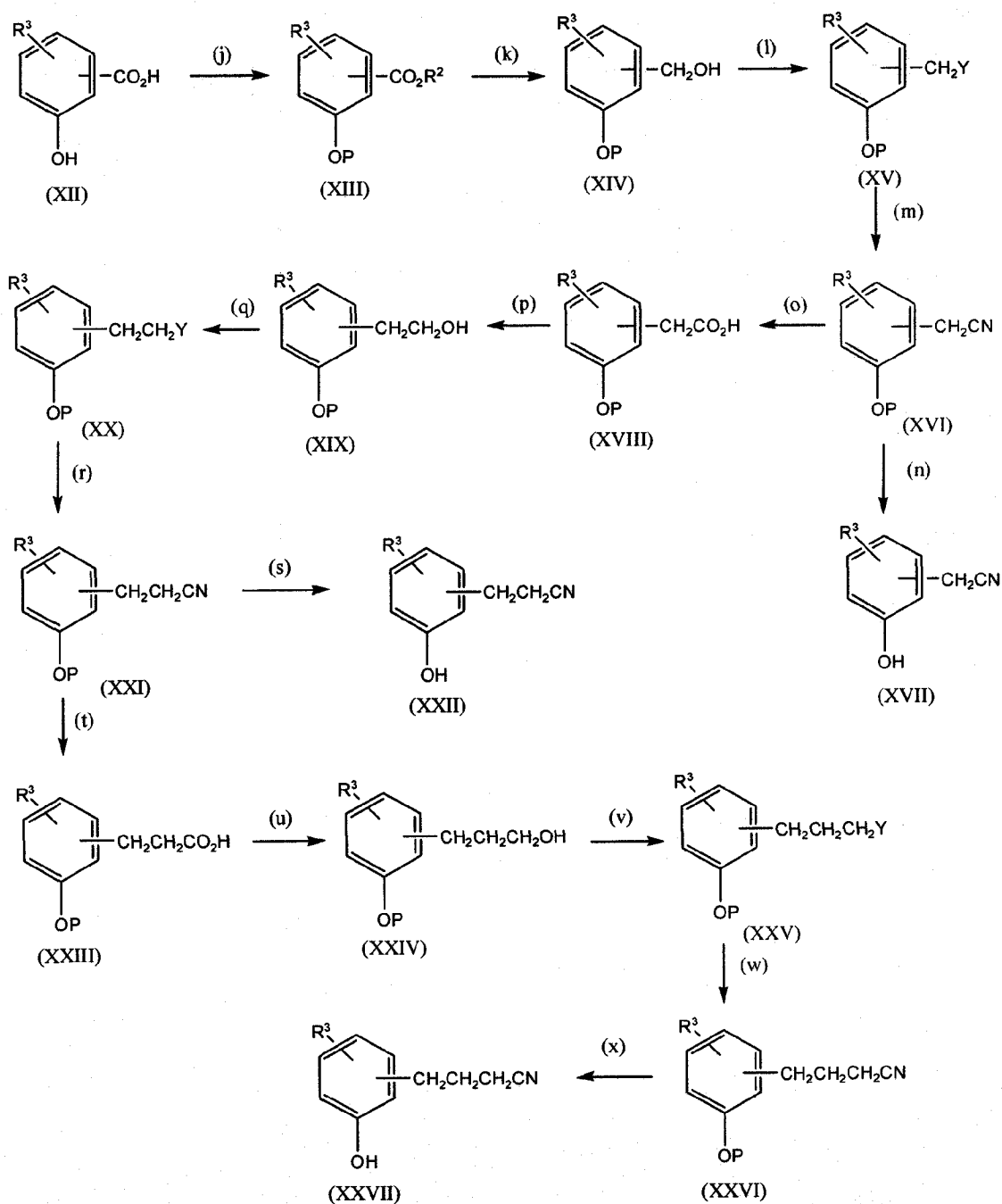
[0104] 可通过步骤 (t) 的反应, 以与之前在步骤 (o) 的反应中所述相同的方式将式 XXI 的化合物水解得到式 XXIII 的化合物。

[0105] 可经由步骤 (u) 的反应, 将式 XXIII 的化合物还原得到式 XXIV 的化合物。该反应可以以与之前在步骤 (k) 的反应中所述相同的方式进行。可经由步骤 (v) 的反应以与之前步骤 (l) 的反应中所述相同的方式将式 XXIV 的化合物转化为式 XXV 的化合物。可经由步骤 (w) 的反应以与之前在步骤 (m) 的反应中所述相同的方式将式 XXV 的化合物转化为式 XXVI 的化合物。可经由步骤 (x) 的反应以与之前在步骤 (n) 的反应中所述相同的方式将式 XXVI 的化合物转化为式 XXVII 的化合物。式 XXVII 的化合物就是下述式 II 的化合物, 其中 y 是 3, R^1 是氢、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基。式 XXVII 的化合物也是下述式 VII 的化合物, 其中 y 是 3, R^3 是硝基。

[0106] 可以通过诸如萃取、蒸发、层析和重结晶等技术分离和纯化产物。

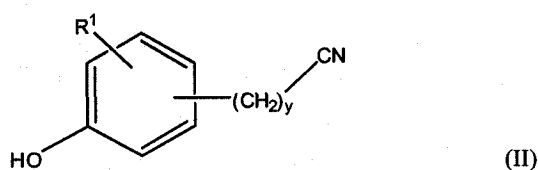
[0107] 反应流程图 4

[0108]



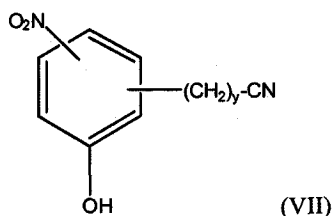
[0109] 可经由流程图 5 的反应制备式 II 的化合物和式 VII 的化合物, 在所述式 II 的化合物中, y 是 0, R^1 是氢、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基, 即下式化合物:

[0110]



[0111] 在所述式 VII 的化合物中, y 是 0, 即下式化合物:

[0112]



[0113] 在流程图 5 的反应中, R^3 是氢、硝基、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基。P 是羟基保护基。 R^2 是具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基。 R^4 是 H、氯或溴。

[0114] 可经由步骤 (y) 的反应, 通过利用适当的保护基 (例如, T. Greene 在“Protective Groups in Organic Synthesis”中所描述的那些保护基) 首先保护羟基然后将酯水解得到式 XXIX 的化合物 (其中 R^4 是 H), 而将式 XXVIII 的化合物转化为式 XXIX 的化合物。

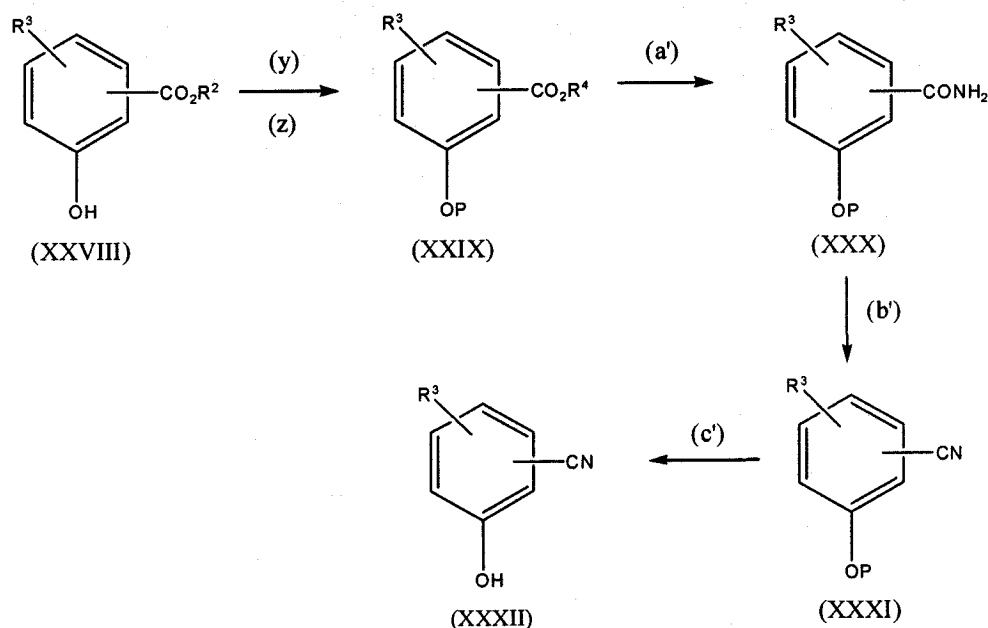
[0115] 可通过使步骤 (y) 的化合物与卤化试剂 (例如亚硫酰氯、五氯化磷、三氯化磷、溴、四溴化碳等) 反应而将式 XXVIII 的化合物转化为式 XXIX 的化合物, 其中 R^4 是氯或溴。这类羧酸的卤化反应中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (z) 的反应。

[0116] 可经由 (a') 的反应, 通过与氨直接反应或者通过首先使式 XXIX 的化合物与偶联剂 (例如二环己基碳二亚胺、苯并三唑基氧基三 (二甲基氨基) 六氟磷酸磷) 反应, 然后与氨等反应而将式 XXIX 的化合物转化为式 XXX 的化合物。氨的酰化中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (a') 的反应。可经由步骤 (b') 的反应, 通过利用如亚硫酰氯、五氯化磷、五氯化磷、氯化氧磷、四氯化碳 - 三苯基磷、氰尿酸氯等试剂进行脱水而将式 XXX 的化合物转化为式 XXXI 的化合物。不加溶剂或在适当的溶剂 (例如 N,N-二甲基甲酰胺等) 中进行该反应。这类脱水反应中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (b') 的反应。

[0117] 可经由步骤 (c') 的反应, 通过利用适当的脱保护剂 (例如, T. Greene 在“Protective Groups in Organic Synthesis”中所描述的那些脱保护剂) 脱除羟基保护基而将式 XXXI 的化合物转化为式 XXXII 的化合物。式 XXXII 的化合物就是下述式 II 的化合物, 其中 y 是 0, R^1 是氢、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基。式 XXXII 的化合物也是下述式 VII 的化合物, 其中 y 是 0, R^3 是硝基。可以通过诸如萃取、蒸发、层析和重结晶等技术分离和纯化产物。

[0118] 反应流程图 5

[0119]



[0120] 可经由流程图 6 的反应制备式 III 的化合物和式 IV 的化合物,在所述式 III 的化合物中 x 是 1 或 2,即下式化合物:

[0121] $A-(CH_2)_xOH$

[0122] 在所述式 IV 的化合物中 x 是 1 或 2,即下式化合物:

[0123] $A-(CH_2)_xL$

[0124] 在流程图 6 的反应中,A 如上所述。L 是离去基团或卤素。可经由步骤 (d') 的反应将式 XXXIII 的化合物还原为式 XXXIV 的化合物。该反应可利用常规的还原剂如碱金属氢化物(如氢化锂铝)等进行。在适当的溶剂如四氢呋喃中进行该反应。这类还原反应中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (d') 的反应。

[0125] 式 XXXIV 的化合物就是其中 x 为 1 的式 III 的化合物。

[0126] 可通过将羟基置换为离去基团或卤素(优选的基团是溴或氯)而将式 XXXIV 的化合物转化为式 XXXV 的化合物。合适的卤化用试剂包括但不限于亚硫酰氯、草酰氯、溴、三溴化磷、四溴化碳等。离去基团包括甲苯磺酰基、甲磺酰基等。这类反应中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (e') 的反应。式 XXXV 的化合物就是其中 x 为 1 的式 IV 的化合物。

[0127] 可通过使 XXXV 与碱金属氰化物(例如氰化钠或氰化钾)反应而将式 XXXV 的化合物转化为式 XXXVI 的化合物。在适当的溶剂(如乙醇、二甲基亚砷、N,N-二甲基甲酰胺等)中进行该反应。通常用于制备腈的任何条件均可用于进行步骤 (f') 的反应。

[0128] 可经由步骤 (g') 的反应通过酸性水解或者碱性水解将式 XXXVI 的化合物转化为式 XXXVII 的化合物。进行该反应时,通常优选利用碱性水解,例如氢氧化钠水溶液。通常用于腈水解的任何条件均可用于进行步骤 (g') 的反应。

[0129] 可经由步骤 (h') 的反应将式 XXXVII 的化合物还原得到式 XXXVIII 的化合物。该反应可以以与之前在步骤 (d') 的反应中所述相同的方式进行。式 XXXVIII 的化合物就是其中 x 为 2 的式 III 的化合物。

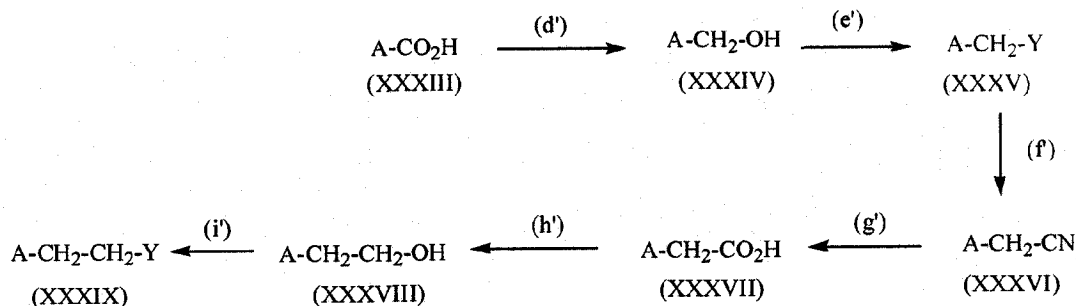
[0130] 可经由步骤 (i') 的反应,以与之前在步骤 (e') 的反应中所述相同的方式将式 XXXVIII 的化合物转化为式 XXXIX 的化合物。式 XXXIX 的化合物就是其中 x 为 2 的式 IV 的

化合物。

[0131] 可以通过诸如萃取、蒸发、层析和重结晶等技术分离和纯化产物。如果 A 是取代有 1 个或 2 个羟基基团的苯基, 则通常优选保护式 XXXIII 的化合物的羟基。适当的保护基可以是 T. Greene 在“Protective Groups in Organic Synthesis”中所描述的那些。

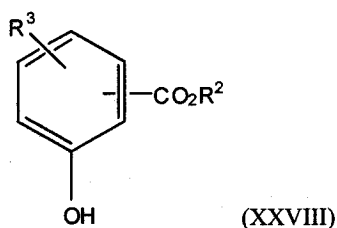
[0132] 反应流程图 6

[0133]



[0134] 可经由流程图 7 的反应制备式 XXVIII 的化合物, 其中 R^3 是氢、硝基、氟、溴、氯、具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基或具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基, R^2 是具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基, 即下式化合物:

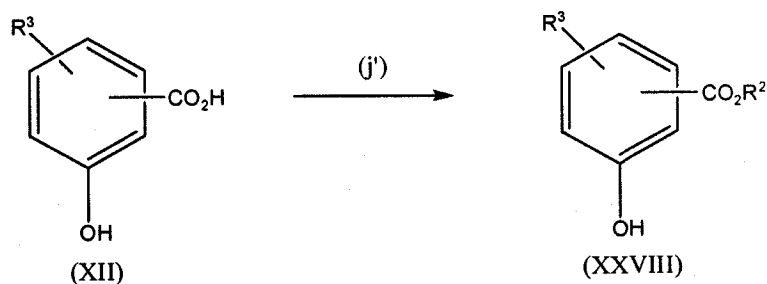
[0135]



[0136] 在流程图 7 的反应中, R^2 和 R^3 如上所述。

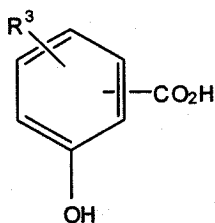
[0137] 可经由步骤 (j') 的反应通过式 XII 的化合物与甲醇或乙醇的酯化而将式 XII 的化合物转化为式 XXVIII 的化合物。该反应可通过使用如 H_2SO_4 、TsOH 等催化剂而进行, 也可以通过使用如二环己基碳二亚胺等脱水剂而进行。这类酯化反应中通常所用的任何条件均可用于进行步骤 (j') 的反应。可以通过诸如萃取、蒸发、层析和重结晶等技术分离和纯化产物。

[0138]



[0139] 其中 R^3 是氯、溴或氟的式 XII 的化合物, 即下式化合物

[0140]



(XII)

[0141] 可商购获得或根据下述文献所记载的方法制得：

[0142] 1. 3-Br 或 F-2-OHC₆H₃CO₂H

[0143] Canadian Journal of Chemistry (2001), 79 (11) 1541-1545.

[0144] 2. 4-Br-2-OHC₆H₃CO₂H

[0145] WO 9916747 或 JP 04154773.

[0146] 3. 2-Br-6-OHC₆H₃CO₂H

[0147] JP 47039101.

[0148] 4. 2-Br-3-OHC₆H₃CO₂H

[0149] WO 9628423.

[0150] 5. 4-Br-3-OHC₆H₃CO₂H

[0151] WO 2001002388.

[0152] 6. 3-Br-5-OHC₆H₃CO₂H

[0153] Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals (1992), 31 (3), 175-82.

[0154] 7. 2-Br-5-OHC₆H₃CO₂H 和 3-Cl-4-OHC₆H₃CO₂H

[0155] WO 9405153 和 US 5519133.

[0156] 8. 2-Br-4-OHC₆H₃CO₂H 和 3-Br-4-OHC₆H₃CO₂H

[0157] WO 20022018323

[0158] 9. 2-Cl-6-OHC₆H₃CO₂H

[0159] JP 06293700

[0160] 10. 2-Cl-3-OHC₆H₃CO₂H

[0161] Proceedings of the Indiana Academy of Science (1983), Volume date 1982, 92, 145-51.

[0162] 11. 3-Cl-5-OHC₆H₃CO₂H

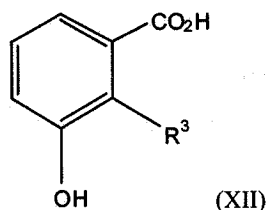
[0163] WO 2002000633 和 WO 2002044145.

[0164] 12. 2-Cl-5-OHC₆H₃CO₂H

[0165] WO 9745400.

[0166] 可经由流程图 8 的反应制备式 XII 的化合物, 其中 R³ 是具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基, 即下式化合物：

[0167]



[0168] 在流程图 8 的反应中, R^2 是具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基, P 是羟基保护基。可经由步骤 (k') 的反应, 通过以适当的保护基保护酚基而将式 XL 的化合物转化为式 XLI 的化合物。用于保护基的适当的条件可以是 T. Greene 在“Protective Groups in Organic Synthesis”中所描述的。

[0169] 可通过将醛氧化成羧酸而将式 XLI 的化合物转化为式 XLII 的化合物。可通过使用适当的氧化剂如氯铬酸吡啶盐、高锰酸钾、高锰酸钠等来进行该反应。适用于这类氧化反应的任何条件均可用于进行步骤 (l') 的反应。

[0170] 可经由步骤 (m') 的反应, 通过脱除保护基而将式 XLII 的化合物转化为式 XII 的化合物, 其中 R^3 是具有 1 个碳原子的烷氧基。适当的脱保护基的条件可以是 T. Greene 在“Protective Groups in Organic Synthesis”中所描述的。

[0171] 可通过使用例如二氯甲烷等溶剂于 $-72^{\circ}\text{C} \sim 0^{\circ}\text{C}$ 的温度用三溴化硼或三氯化硼处理式 XLII 的化合物 4 小时 ~ 48 小时而将式 XLII 的化合物转化为式 XLIII 的化合物。这类脱甲基化反应所常用的任何条件均可用于进行步骤 (n') 的反应。

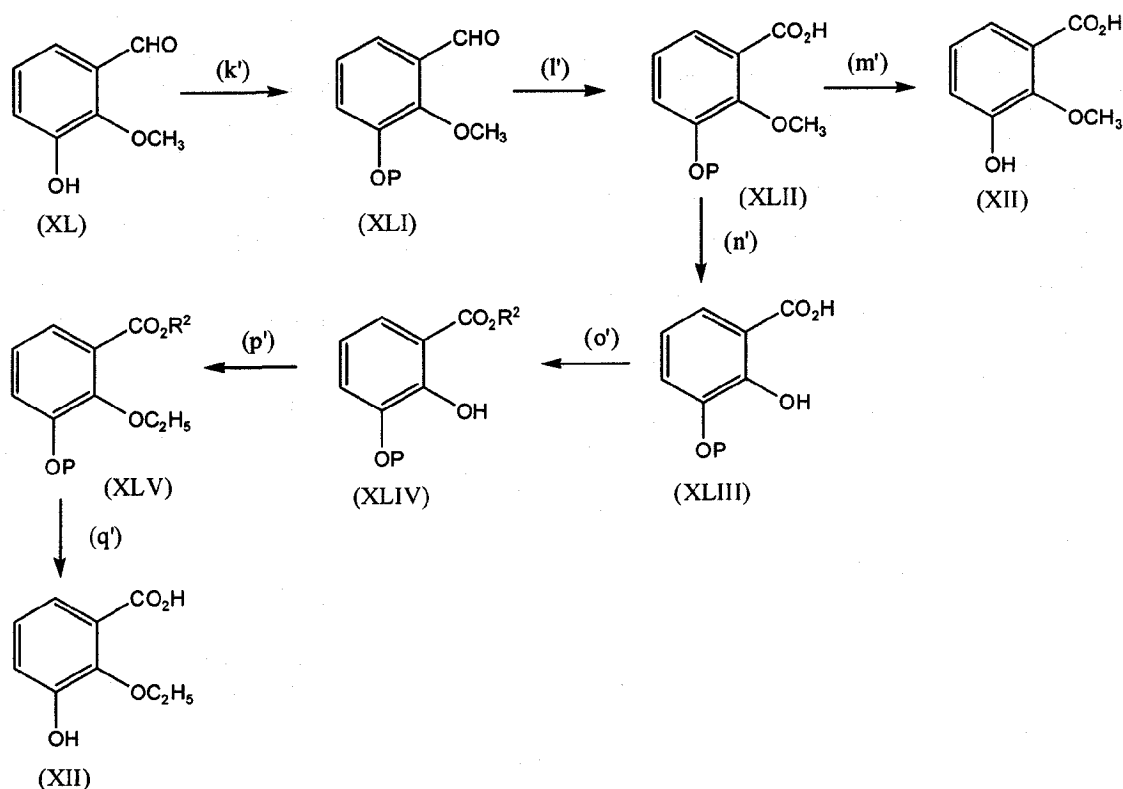
[0172] 可通过式 XLIII 的化合物与甲醇或乙醇的酯化而将式 XLIII 的化合物转化为式 XLIV 的化合物。该反应可通过使用如 H_2SO_4 、TsOH 等催化剂而进行, 也可以通过使用如二环己基碳二亚胺等脱水剂而进行。这类酯化反应所常用的任何条件均可用于进行步骤 (o') 的反应。

[0173] 可通过利用如碳酸钾、氢氧化钠、吡啶等适当的碱, 以乙基卤将式 XLIV 的化合物醚化或烷基化而将式 XLIV 的化合物转化为式 XLV 的化合物。该反应可在如四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、二氯甲烷等常规溶剂中进行。该反应通常在 $0^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 的温度进行。适用于这类烷基化反应的任何条件均可用于进行步骤 (p') 的反应。

[0174] 可经由步骤 (q') 的反应通过脱除保护基而将式 XLV 的化合物转化为式 XII 的化合物, 其中 R^3 是具有 2 个碳原子的烷氧基。适当的脱保护基的条件可以是 T. Greene 在“Protective Groups in Organic Synthesis”中所描述的。可以通过诸如萃取、蒸发、层析和重结晶等技术分离和纯化产物。

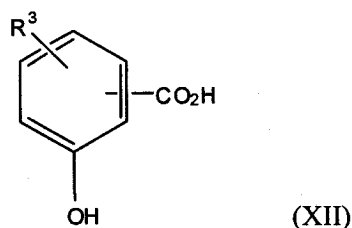
[0175] 反应流程图 8

[0176]



[0177] 其中 R^3 是具有 1 ~ 2 个碳原子的烷氧基的式 XII 的化合物, 即下式化合物

[0178]



[0179] 可商购获得或根据下述文献所记载的方法制得:

[0180] 1. 2-OMe-4-OHC₆H₃CO₂H

[0181] US 2001034343 或 WO 9725992.

[0182] 2. 5-OMe-3-OHC₆H₃CO₂H

[0183] J. O. C (2001), 66 (23), 7883-88.

[0184] 3. 2-OMe-5-OHC₆H₃CO₂H

[0185] US 6194406 (Page 96) 和 Journal of the American Chemical Society (1985), 107 (8), 2571-3.

[0186] 4. 3-OEt-5-OHC₆H₃CO₂H

[0187] 台湾科学 (1996), 49 (1), 51-56.

[0188] 5. 4-OEt-3-OHC₆H₃CO₂H

[0189] WO 9626176

[0190] 6. 2-OEt-4-OHC₆H₃CO₂H

[0191] Takeda Kenkyusho Nempo (1965), 24, 221-8.

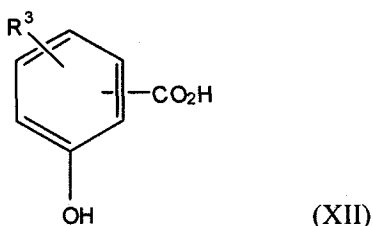
[0192] JP 07070025.

[0193] 7. 3-OEt-4-OHC₆H₃CO₂H

[0194] WO 9626176.

[0195] 其中 R³ 是具有 1 ~ 2 个碳原子的烷基的式 XII 的化合物, 即下式化合物

[0196]



[0197] 可商购获得或根据下述文献所记载的方法制得：

[0198] 1. 5-Me-3-OHC₆H₃CO₂H 和 2-Me-5-OHC₆H₃CO₂H

[0199] WO 9619437.

[0200] J. O. C. 2001, 66, 7883-88.

[0201] 2. 2-Me-4-OHC₆H₃CO₂H

[0202] WO 8503701.

[0203] 3. 3-Et-2-OHC₆H₃CO₂H 和 5-Et-2-OHC₆H₃CO₂H

[0204] J. Med. Chem. (1971), 14 (3), 265.

[0205] 4. 4-Et-2-OHC₆H₃CO₂H

[0206] 药学报 (1998), 33 (1), 67-71.

[0207] 5. 2-Et-6-OHC₆H₃CO₂H 和 2-n-Pr-6-OHC₆H₃CO₂H

[0208] J. Chem. Soc., Perkin Trans 1 (1979), (8), 2069-78.

[0209] 6. 2-Et-3-OHC₆H₃CO₂H

[0210] JP 10087489 和 WO 9628423.

[0211] 7. 4-Et-3-OHC₆H₃CO₂H

[0212] J. O. C. 2001, 66, 7883-88.

[0213] WO 9504046.

[0214] 8. 2-Et-5-OHC₆H₃CO₂H

[0215] J. A. C. S (1974), 96 (7), 2121-9.

[0216] 9. 2-Et-4-OHC₆H₃CO₂H 和 3-Et-4-OHC₆H₃CO₂H

[0217] JP 04282345.

[0218] 10. 1. 3-Et-5-OHC₆H₃CO₂H

[0219] 根据 J. O. C. 2001, 66, 7883-88 通过使用 2- 乙基丙烯醛适当合成。

[0220] 在治疗方法中的应用

[0221] 本发明提供一种用于降低哺乳动物对象的尿酸水平或增加哺乳动物对象的尿酸排泄的方法。可通过任何常规测定方法测定哺乳动物的尿酸水平。一般测定血液中的尿酸水平。尿酸还可以在组织中沉积或析出, 生成可受到血液尿酸浓度升高或降低的影响的沉积物 (例如痛风石), 而且该沉积物反过来还会对尿酸的循环起作用。本发明用于降低尿酸的方法可用于治疗或预防多种疾病, 所述疾病包括痛风、高尿酸血症、未达到通常确诊为高尿酸血症的水平的高尿酸水平、肾结石、肾功能障碍、心血管疾病、心血管风险

因子和认知障碍。本发明的化合物的施用可通过降低尿酸水平,从而减缓肾脏疾病的进展。已证实高尿酸水平是心血管疾病的风险因子。在老年人中高尿酸和认知障碍之间显示出明显的关联 (Schretlen, D. J. 等, “Serum Uric Acid and Cognitive Function in Community-Dwelling Older Adults”, *Neuropsychology* (Jan. 2007) 21(1):136 ~ 140)。因此,本发明降低尿酸的方法可用于治疗或预防认知障碍,包括老年人的认知障碍。众所周知,患有雷-纳(二氏)综合征的人群具有高尿酸水平,并且遭受这种高尿酸血症的许多引发症,包括痛风。因此,用于降低血尿酸水平和增加尿酸排泄的本发明可用于治疗患有雷-纳(二氏)综合征的人群。

[0222] 血液中尿酸的正常范围在男性中为 3.4mg/dL ~ 7.0mg/dL,在停经前女性中为 2.4mg/dL ~ 6.0mg/dL,在儿童中为 2.5mg/dL ~ 5.5mg/dL。尿酸盐晶体的形成/析出通常出现在水平为 6.6mg/dL 以上的男性中,和水平为 6.0mg/dL 以上的女性中。这表明,所谓正常范围内的尿酸水平可能有不利的健康结果,甚至产生痛风。此外,在整体上对于人群来说可能是正常范围的尿酸水平对于个体而言可能偏高。血液水平正好在这些“正常”范围内时可能出现心血管疾病和尿酸升高的其他引发症。因此,高尿酸血症的确诊并不一定是本发明的化合物的有益效果的先决条件。

[0223] 本发明包括与痛风、高血压、血管炎、心力衰竭、动脉-静脉紊乱、心肌梗死、中风、先兆子痫、子痫、睡眠呼吸暂停、肾功能障碍(包括肾衰竭、终末期肾病 [ESRD])、器官移植、利尿剂、噻嗪化物、环孢菌素、阿斯匹林、维生素 C、烟酸、左旋多巴 (L-DOPA)、细胞毒类药物和某些抗菌剂(例如吡嗪酰胺)、肝硬化、甲状腺功能障碍、甲状旁腺功能障碍、肺癌、贫血、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肿瘤溶解综合征、甲状腺或甲状旁腺功能障碍、雷-纳(二氏)综合征、吸烟、饮酒和银屑病有关的高尿酸血症的治疗。本发明包括可导致痛风、形成尿酸盐晶体、肾功能障碍、移植后的移植物衰竭或器官衰竭、内皮紊乱(例如炎症)、慢性心力衰竭、动脉-静脉功能紊乱、先兆子痫、子痫、高血压和认知障碍的高尿酸血症的治疗。在本发明用于治疗痛风的方法的实施方式中,减少了尿酸的组织沉积物(包括但不限于痛风石),也降低了痛风突发的发生率和严重程度。

[0224] 可以通过全身性施用的任何常规途径来施用本发明的化合物。所述化合物优选以口服方式施用。因此,优选将所述药物配制成药用于口服施用。本发明可使用的其他施用途径包括直肠式、肠道外式、注射式(例如静脉内注射、皮下注射、肌肉注射或腹腔内注射)或鼻腔式。

[0225] 本发明的各种治疗应用和治疗方法的进一步的实施方式包括施用上述化合物的任何一种实施方式。为了避免不必要的冗余,对各所述化合物和化合物组不再重复,但将其并入所述治疗应用和治疗方法的描述中,如同对其进行重复一样。

[0226] 人类和非人类哺乳动物对象都可根据本发明的治疗方法进行治疗。用于特定对象的本发明的特定化合物的最佳剂量可由熟练的临床医师在临床应用中加以确定。在口服施用的情况中,通常以 1mg ~ 2500mg,更优选以 1mg ~ 1200mg 的日剂量对成人施用本发明的化合物。在本发明的其他实施方式中,以 400mg ~ 1000mg、600mg ~ 800mg、600mg ~ 1000mg 或 100mg ~ 300mg 的剂量施用本发明的化合物,每天施用一次或两次。典型的成人的平均体重为 60 至 70 千克,因此以 mg/kg 表示的适宜的剂量范围约为 0.015mg/kg ~ 42mg/kg、0.015mg/kg ~ 20mg/kg、6.6mg/kg ~ 13mg/kg、10mg/kg ~ 13mg/kg、10mg/kg ~ 16mg/kg 或

1.67mg/kg ~ 4.3mg/kg, 每天施用一次或两次。在治疗儿童时, 所述最佳剂量由患者的医师确定。在对小鼠口服施用的情况下, 本发明的化合物通常以 1mg ~ 300mg 化合物 / 千克体重的日剂量施用。

[0227] 本发明的化合物可以与其他降尿酸药组合施用。在这样的情况中, 本发明的化合物的剂量如上所述。任何常规性或试验性降尿酸药均可以与本发明的化合物联合施用。此类药物的实例包括黄嘌呤氧化酶抑制剂, 如别嘌呤醇 (100mg/ 天 ~ 1000mg/ 天; 更常见为 100mg/ 天 ~ 300mg/ 天)、非布索坦 (40mg/ 天 ~ 120mg/ 天; 更具体为 60mg/ 天 ~ 80mg/ 天) 和奥昔嘌醇; 普瑞凯希 / PEG- 尿酸酶 (每两周输注 4mg ~ 12mg); 排尿酸药剂, 如磺吡酮 (100mg/ 天 ~ 800mg/ 天)、丙磺舒 (500mg/ 天)、氯沙坦 (25mg/ 天 ~ 200mg/ 天, 更常见为 50mg/ 天 ~ 100mg/ 天)、非诺贝特、JTT-552 (URAT-1 抑制剂)、苯溴马隆 (70mg/ 天 ~ 150mg/ 天), 以及他汀类药物如阿伐他汀 (**LIPITOR®**)。所述其他降尿酸药可以以其常用量施用或者以低于其常用量的量施用, 通过施用较低剂量的此类其他药物或通过以较低频率与此类其他药物一同施用。

[0228] 本发明的化合物可以与用于降低与痛风发作有关的疼痛的其他药物一起施用, 所述其他药物例如非甾体抗炎药 (NSAID)、秋水仙素、皮质类固醇和其他镇痛药。

[0229] 在降低血液中尿酸水平的过程中, 可预期本发明的化合物将增加尿液中的尿酸水平。为增加尿液的 pH 并由此改善尿酸的溶解度, 可以将例如柠檬酸盐或碳酸氢盐与本发明的化合物联合施用。

[0230] 可以对对象施用本发明的化合物或盐与一种或多种的其他降尿酸药、镇痛药和 pH 增加剂的混合物。作为替代, 本发明的化合物或盐与一种或多种的其他降尿酸药、镇痛药和 pH 增加剂不混合在一起形成共混物, 而是单独地施用给所述对象。当活性成分未混合在一起形成单一共混物或组合物时, 便利的是以试剂盒的形式提供所述活性成分, 所述试剂盒包括一个或多个单位口服剂量的本发明的化合物、一个或多个单位口服剂量的一种或多种其他降尿酸药、镇痛药和 pH 增加剂, 以及用于联合施用本发明的化合物与其他活性成分的说明书。优选的是, 将试剂盒的各成分包装在一起, 例如装在盒中或薄膜包装体中。

[0231] 药物组合物

[0232] 本发明提供一种药物组合物, 所述药物组合物包含本发明的化合物, 并可选地包含药用载体。本发明的药物组合物的进一步的实施方式包括以上所述的化合物的任何一个实施方式。为了避免不必要的冗余, 对各所述化合物和化合物组不再重复, 但将其并入所述药物组合物的描述中, 如同对其进行重复一样。

[0233] 优选的是所述组合物适于口服施用, 例如以片剂、包衣片剂、糖衣丸、硬胶囊或软胶囊、溶液、乳剂或混悬剂形式。所述口服组合物通常包含 1mg ~ 2500mg, 更优选 1mg ~ 1200mg 的本发明的化合物。在本发明的更具体的实施方式中, 所述口服组合物将包含 400mg ~ 1000mg、600mg ~ 800mg、600mg ~ 1000mg 或 100mg ~ 300mg 的本发明的化合物。这样便于对象每天吞服一个或两个片剂、包衣片剂、糖衣丸或胶囊。然而, 也可使所述组合物适于通过全身施用的任何其他常规方式进行施用, 包括直肠式 (例如栓剂形式)、肠道外式 (例如注射溶液形式) 或鼻腔式。

[0234] 可将所述活性成分与药学上惰性的无机或有机载体一起进行加工以制备药物组合物。例如, 乳糖、玉米淀粉或其衍生物、滑石、硬脂酸或其盐等可用作片剂、包衣片剂、糖衣

丸和硬胶囊用的此类载体。合适的软胶囊用载体例如有植物油、蜡、脂肪、半固体和液体多元醇等。然而,取决于活性成分的性质,在软胶囊的情况下除了软明胶本身之外通常不需要载体。合适的溶液和糖浆制备用载体例如有水、多元醇、甘油、植物油等。合适的栓剂用载体例如有天然油或硬化油、蜡、脂肪、半液体或液体多元醇等。

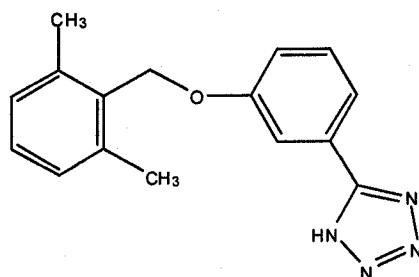
[0235] 此外,所述药物组合物可包含防腐剂、增溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、香味剂、用于改变渗透压的盐、缓冲剂、包衣剂或抗氧化剂。

[0236] 通过参考下述实施例将更好地理解本发明,此处所述的实施例对本发明进行描述而非限制本发明。

实施例

[0237] 实施例 1

[0238]



[0239] 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯基)-1H-四唑

[0240] 步骤 A :3-(2,6-二甲基苄氧基)苯甲腈的制备

[0241] 在 0℃ 将 2,6-二甲基苄醇 (6.27g, 46.1mmol) 和偶氮二甲酸二异丙基酯 (DIAD, 9.24g, 45.7mmol) 在干燥 THF (30ml) 中的溶液逐滴添加至 3-羟基苯甲腈 (5g, 37mmol) 和三苯基膦 (TPP, 11.99g, 45.7mmol) 在 THF (100ml) 的溶液中。将反应混合物升温至室温并保持 4 小时,或者直到所有原料耗尽,以乙醚稀释,并用水洗涤 (2X)。以 Na₂SO₄ 干燥有机层,过滤,浓缩,并通过硅胶柱快速层析 (己烷:乙酸乙酯 2:1) 纯化,得到白色固体状标题化合物。

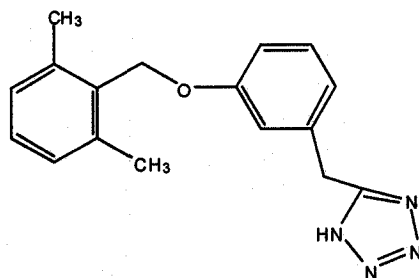
[0242] 步骤 B :5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯基)-1H-四唑的制备

[0243] 在氩气下将 3-(2,6-二甲基苄氧基)苯甲腈 (步骤 A, 3g, 11.8mmol)、叠氮化钠 (0.847g, 13mmol) 和氯化铵 (0.697g, 13mmol) 在干燥二甲基甲酰胺 (30ml) 中的混合物于 110℃ 加热 14 小时或直到原料耗尽。向该反应混合物中添加水以溶解所有固体;将该溶液放入盐水中,并以乙酸乙酯萃取 (2X)。将合并的有机层用盐水洗涤,以 Na₂SO₄ 干燥,过滤,浓缩并通过硅胶柱快速层析 (氯仿:甲醇 95:5) 纯化,得到白色固体状标题化合物。

[0244] ¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) :2.4 (s, 6H) ;5.15 (s, 2H) ;7.1 (d, 2H) ;7.15 (m, 1H) ;7.3 (dd, 1H) ;7.5 (t, 1H) ;7.65 (m, 1H) ;7.7 (m, 1H) .

[0245] 实施例 2

[0246]



[0247] 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苄基)-1H-四唑

[0248] 步骤 A :2-(3-羟基苯基)乙腈的制备：

[0249] 在氩气氛围下于 -78°C 向 2-(3-甲氧基苯基)乙腈 (3.6g, 25.4mmol) 在干燥二氯甲烷 (20ml) 中的溶液添加 BBr_3 (55ml, CH_2Cl_2 中 1M, 55mmol)。将反应混合物升温至室温并保持 48 小时, 添加碎冰淬灭反应, 并以二氯甲烷萃取。以 Na_2SO_4 干燥有机层, 过滤, 浓缩并通过硅胶柱快速层析 (CH_2Cl_2 : 乙酸乙酯 4 : 1) 纯化, 从而得到油状标题化合物。

[0250] 步骤 B :2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苄基)乙腈的制备：

[0251] 在氩气下于 0°C 将 2-(3-羟基苯基)乙腈 (步骤 A, 5g, 37mmol) 和偶氮二甲酸二异丙基酯 (DIAD, 3.38g, 16.7mmol) 在干燥 THF (20ml) 中的溶液逐滴添加至 2,6-二甲基苄醇 (2.25g, 16.5mmol) 和三苯基膦 (TPP, 4.3g, 16.4mmol) 在 THF (30ml) 的溶液中。将反应混合物于室温搅拌 16 小时, 或者直至所有原料耗尽。向该混合物中添加硅胶 (25g), 减压除去溶剂, 装填在硅胶柱上并以二氯甲烷: 己烷 (1 : 1) 洗脱, 得到浅黄色结晶状固体。

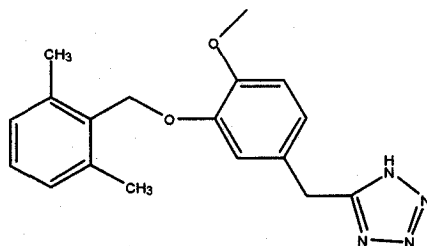
[0252] 步骤 C :5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苄基)-1H-四唑的制备：

[0253] 在氩气下将 2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苄基)乙腈 (步骤 B, 3.2g, 12.7mmol)、叠氮化钠 (1.28g, 16.7mmol) 和氯化铵 (1.08g, 20.2mmol) 在干燥二甲基甲酰胺 (30ml) 中的混合物于 90°C 加热 9 小时, 或者直至所有原料耗尽。将该反应混合物减压浓缩。将该反应混合物放入乙酸乙酯中, 并以水洗涤 (2X), 以 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 浓缩并通过硅胶柱快速层析 (二氯甲烷: 甲醇 9 : 1) 纯化, 得到油状产物。将该油状物与 1 : 2 的乙酸乙酯: 己烷搅拌 10 分钟, 过滤出固体, 得到白色固体状产物。

[0254] ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) : 2.3 (s, 6H) ; 4.25 (s, 2H) ; 5.15 (s, 2H) ; 6.84 (d, 1H) ; 6.96 (m, 2H) ; 7.08 (d, 2H) ; 7.18 (m, 1H) ; 7.28 (m, 1H) .

[0255] 实施例 3

[0256]



[0257] 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苄基)-1H-四唑

[0258] 步骤 A :3-羟基-4-甲氧基苯甲酸乙酯的制备：

[0259] 将 3-羟基-4-甲氧基苯甲酸 (25g, 148.67mmol) 和对甲苯磺酸一水合物 (3.17g, 16.66mmol) 在无水乙醇 (300ml) 中的溶液回流 6 小时, 或者直至所有原料耗尽。将该反应混合物浓缩, 以 EtOAc (60ml) 稀释并以水 (20ml) 洗涤。以 Na₂SO₄ 干燥有机层, 过滤, 浓缩, 并经硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 2: 1) 纯化, 从而得到标题化合物。

[0260] 步骤 B: 3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苯甲酸乙酯的制备

[0261] 在氩气下于 0℃ 将 3-羟基-4-甲氧基苯甲酸乙酯 (步骤 A, 9.10g, 46.4mmol) 和偶氮二甲酸二异丙基酯 (DIAD, 10.23g, 50mmol) 在干燥 THF (20ml) 中的溶液逐滴添加至 2,6-二甲基苄醇 (6.94g, 51mmol) 和三苯基膦 (TPP, 13.27g, 50mmol) 在干燥 THF (60ml) 的溶液中。将该反应混合物升温至室温并保持 4 小时, 或者直至所有原料耗尽。以乙醚稀释并以水洗涤 (2X)。以 Na₂SO₄ 干燥有机层, 过滤, 浓缩, 并经硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 2: 1) 纯化, 从而得到标题化合物。

[0262] 步骤 C: (3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苯基) 甲醇的制备

[0263] 在氩气下于 0℃ 向 3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苯甲酸乙酯 (步骤 B, 6.04g, 19.23mmol) 在干燥 THF (30ml) 中的溶液逐滴添加 LiAlH₄ (THF 中 1M, 0.803g, 21.16mmol)。将该反应混合物搅拌 4 小时或者直至所有原料耗尽。然后以 0.1N HCl 缓慢淬灭反应, 将 EtOAc (20ml) 添加至反应混合物。将该反应混合物过滤, 并以 EtOAc (25ml × 2) 洗涤沉淀。合并的有机层以 0.1N HCl 和盐水洗涤, 以 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩, 并经硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 4: 1) 纯化, 从而得到标题化合物。

[0264] 步骤 D: 2-((5-(溴甲基)-2-甲氧基苯氧基)甲基)-1,3-二甲基苯的制备

[0265] 在 0℃ 向 (3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苯基) 甲醇 (步骤 C, 5.23g, 20.4mmol) 和 CBr₄ (10.16g, 30.6mmol) 在干燥 CH₂Cl₂ (20ml) 中的溶液分批添加三苯基膦 (8.03g, 30.64mmol)。将该反应混合物搅拌 1.5 小时, 过滤, 浓缩并通过硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 2: 1) 纯化, 从而得到标题化合物。

[0266] ¹H NMR (400MHz, (CDCl₃): 2.43 (s, 6H); 3.83 (s, 3H); 4.53 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 6.84 (d, 1H); 7.0-7.03 (dd, 1H); 7.06-7.09 (m, 3H); 7.14-7.18 (m, 1H)。

[0267] 步骤 E: 2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苯基) 乙腈的制备

[0268] 将 2-((5-(溴甲基)-2-甲氧基苯氧基)甲基)-1,3-二甲基苯 (步骤 D, 3.28g, 9.7mmol) 和 NaCN (0.624g, 12.7mmol) 在干燥 DMF (20ml) 中的溶液于 120℃ 加热 2.5 小时, 然后冷却并以 EtOAc (50ml) 稀释。将有机层用水 (30ml) 和盐水洗涤, 以 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩, 并经硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 2: 1) 纯化, 从而得到标题化合物。

[0269] 步骤 F: 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苄基)-1H-四唑的制备

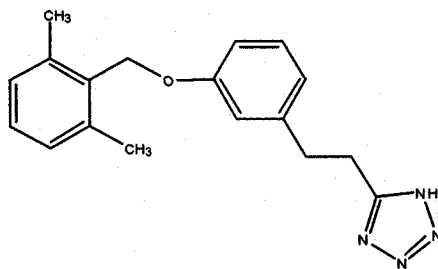
[0270] 在氩气下将 2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲氧基苯基) 乙腈 (步骤 E, 2.17g, 7.5mmol)、叠氮化钠 (0.590g, 9.1mmol) 和氯化铵 (0.486g, 9.1mmol) 在干燥 DMF (20ml) 中的混合物于 90℃ 加热 16 小时, 或者直至所有原料耗尽。将该反应混合物冷却, 以水稀释并以 EtOAc (30ml × 4) 萃取。合并的有机层以盐水洗涤, 以 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩并通过硅胶柱快速层析 (氯仿: 甲醇 95: 5), 得到半固体产物。将该半固体与 1: 2 的乙酸乙酯: 己烷 (15ml) 搅拌 10 分钟, 过滤, 得到白色固体状产物。

[0271] ¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO): 2.3 (s, 6H); 3.68 (s, 3H); 4.22 (s, 2H); 4.98 (s, 2H); 6.78-6.81 (dd, 1H); 6.91-6.93 (d, 1H); 7.05-7.07 (d, 2H); 7.13-7.16 (m, 2H). MS: m/z

325.2[M+H]⁺.

[0272] 实施例 4

[0273]



[0274] 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯乙基)-1H-四唑

[0275] 步骤 A:3-(3-甲氧基苯基)丙腈的制备

[0276] 将 1-(2-溴乙基)-3-甲氧基苯 (10g, 46.4mmol)、NaCN(2.73g, 55.8mmol) 在干燥 DMF(20ml) 中的溶液于 90℃ 加热 6 小时, 或者直至所有原料耗尽。将该反应液冷却, 以 EtOAc(60ml) 稀释并以水 (20ml×3) 和盐水洗涤, 以 Na₂SO₄ 干燥有机层, 过滤, 浓缩, 并经硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 2: 1) 纯化, 从而得到油状标题化合物。

[0277] 步骤 B:3-(3-羟基苯基)丙腈的制备

[0278] 在氩气下于 -78℃ 向 3-(3-甲氧基苯基)丙腈 (步骤 A, 1.71g, 10.6mmol) 在干燥 CH₂Cl₂(20ml) 中的搅拌溶液添加 BBr₃(CH₂Cl₂ 中 1M, 5.32g, 21.2mmol)。该反应混合物于相同温度搅拌 2 小时然后于 0℃ 搅拌 4 小时, 或者直至所有原料耗尽, 以冰淬灭反应, 以 EtOAc(30ml×3) 提取, 合并的有机层以饱和 NaHCO₃ 和盐水仔细洗涤, 以 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩, 并经硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 2: 1) 纯化, 从而得到标题化合物。

[0279] 步骤 C:3-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯基)丙腈的制备

[0280] 在氩气下于 0℃ 将 3-(3-羟基苯基)丙腈 (步骤 B, 1.25g, 8.5mmol) 和偶氮二甲酸二异丙基酯 (DIAD, 1.87g, 9.26mmol) 在干燥 THF(10ml) 中的溶液逐滴添加至 2,6-二甲基苄醇 (1.27g, 9.3mmol) 和三苯基膦 (TPP, 2.43g, 9.26mmol) 在干燥 THF(30ml) 中的溶液中。将该反应混合物升温至室温并保持 4 小时, 或者直至所有原料耗尽, 以乙醚稀释并以水洗涤 (2X)。以 Na₂SO₄ 干燥有机层, 过滤, 浓缩, 并经硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 2: 1) 纯化, 从而得到标题化合物。

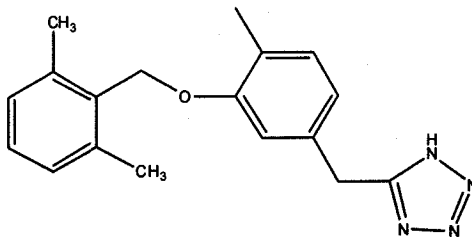
[0281] 步骤 D:5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯乙基)-1H-四唑的制备

[0282] 在氩气下将 3-(3-(2,6-二甲基苄氧基)苯基)丙腈 (步骤 C, 2.62g, 9.9mmol)、叠氮化钠 (0.899g, 13.8mmol) 和氯化铵 (0.740g, 13.8mmol) 在干燥 DMF(20ml) 中的混合物于 90℃ 加热 16 小时, 或者直至所有原料耗尽。将该反应混合物冷却, 以水稀释并以 EtOAc(30ml×4) 萃取。合并的有机层以盐水洗涤, 以 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩并通过硅胶柱快速层析 (氯仿: 甲醇 95: 5 → 92.5: 7.5) 纯化, 得到半固体状产物。将该半固体与 1: 2 乙酸乙酯: 己烷 (15ml) 搅拌 10 分钟并过滤, 得到白色固体状产物。

[0283] ¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO): 2.48(s, 6H); 3.02(t, 2H); 3.19(t, 2H); 4.98(s, 2H); 6.80-6.81(d, 1H); 6.86-6.89(m, 2H); 7.05-7.07(d, 2H); 7.14-7.23(m, 2H). MS: m/z 309.2[M+H]⁺.

[0284] 实施例 5

[0285]



[0286] 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲基苄基)-1H-四唑

[0287] 步骤 A :2-(3-羟基-4-甲基苄基)乙腈的制备

[0288] 在氩气下于 -78°C 向 2-(3-甲氧基-4-甲基苄基)乙腈 (5g, 31mmol) 在干燥 CH_2Cl_2 (20ml) 中的搅拌溶液逐滴添加 BBr_3 (CH_2Cl_2 中, 1M, 10.02g, 40mmol)。将该反应混合物于相同温度搅拌 2 小时, 然后于 0°C 搅拌 5 小时, 或者直至所有原料耗尽, 以冰淬灭反应, 以 EtOAc (30ml $\times$ 3) 萃取, 合并的有机层以饱和 NaHCO_3 和盐水仔细洗涤, 并以 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 浓缩, 并经硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 4 : 1 $\rightarrow$ CH_2Cl_2 : 己烷 1 : 1) 纯化, 从而得到灰白色固体状标题化合物。

[0289] 步骤 B :2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲基苄基)乙腈的制备

[0290] 在氩气下于室温向 2-(3-羟基-4-甲基苄基)乙腈 (步骤 A, 2.18g, 14.8mmol)、 K_2CO_3 (2.66g, 19.2mmol) 在干燥 DMF (20ml) 中的搅拌溶液添加 2,6-二甲基苄基氯 (2.97g, 19.2mmol)。将该反应混合物搅拌 16 小时, 以 EtOAc (40ml) 稀释, 以水 (20ml) 和盐水洗涤。以 Na_2SO_4 干燥有机层, 过滤, 浓缩, 并经硅胶柱快速层析 (己烷: 乙酸乙酯 2 : 1) 纯化, 从而得到白色固体状标题化合物。

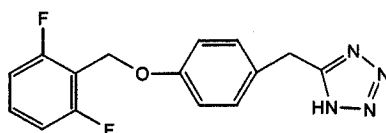
[0291] 步骤 C :5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲基苄基)-1H-四唑的制备

[0292] 在氩气下将 2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-4-甲基苄基)乙腈 (步骤 B, 1.12g, 4.2mmol)、叠氮化钠 (0.400g, 6.1mmol) 和氯化铵 (0.350g, 6.5mmol) 在干燥 DMF (15ml) 中的混合物于 90°C 加热 16 小时, 或者直至所有原料耗尽, 将该反应混合物冷却, 以水稀释, 并以 EtOAc (30ml $\times$ 4) 萃取。合并的有机层以盐水洗涤, 以 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 浓缩并通过硅胶柱快速层析 (氯仿: 甲醇 95 : 5 $\rightarrow$ 92.5 : 7.5) 纯化, 得到半固体状产物。将该半固体与 1 : 2 乙酸乙酯: 己烷 (15ml) 搅拌 10 分钟并过滤, 得到白色固体状产物。

[0293] ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) : 2.0 (s, 3H) ; 2.35 (s, 6H) ; 4.27 (s, 2H) ; 5.0 (s, 2H) ; 6.73-6.75 (dd, 1H) ; 7.08-7.1 (m, 3H) ; 7.15-7.19 (m, 2H). MS : m/z 309.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0294] 实施例 6

[0295]



[0296] 5-(4-(2,6-二氟苄氧基)苄基)-1H-四唑

[0297] 步骤 A :2-(4-(2,6-二氟苄氧基)苄基)乙腈的制备

[0298] 向 2-(4-羟基苄基)乙腈 (5g, 37.5mmol) 和 K_2CO_3 (6.74g, 48.8mmol) 在干燥 DMF (20ml) 中的溶液添加 2,6-二氟苄基溴 (7.77g, 37.5mmol)。将该反应混合物于室温搅拌 4 小时, 并真空浓缩。将粗品残余物放入 EtOAc 中并以水和盐水洗涤。以 EtOAc 洗涤水

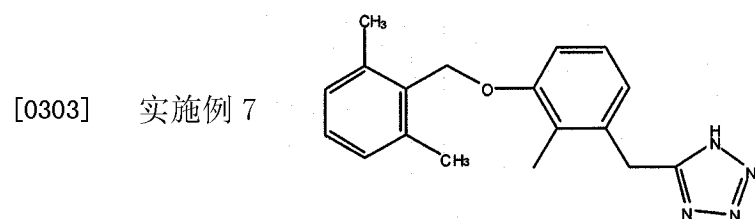
层一次以上。合并的有机层以 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩,得到白色固体状标题化合物。

[0299] ^1H NMR (270MHz, CDCl_3) :3.65 (s, 2H) ;5.1 (s, 2H) ;6.9-7.0 (m, 4H) ;7.2-7.4 (m, 3H).

[0300] 步骤 B :5-(4-(2,6-二氟苄氧基)苄基)-1H-四唑的制备

[0301] 将 2-(4-(2,6-二氟苄氧基)苄基)乙腈(步骤 A, 5g, 19.3mmol)、叠氮化钠 (1.3g, 20mmol) 和氯化铵 (1.06g, 20mmol) 在干燥 DMF (60ml) 中的混合物于 90℃ 加热 16 小时。真空除去溶剂,并在 EtOAc 和水(以浓 HCl 酸化至 pH 1)之间分配油状残余物。将有机层以水洗涤,以 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩,得到棕色半固体。在硅胶柱上通过快速层析(氯仿:甲醇, 9 : 1)进行纯化,得到浅乳白色固体状标题化合物。

[0302] ^1H NMR (270MHz, CDCl_3) :4.0 (s, 2H) ;5.1 (s, 2H) ;6.7-6.9 (m, 4H) ;7.0 (d, 2H) ;7.2 (m, 1H).



[0304] 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)-1H-四唑

[0305] 步骤 A :3-羟基-2-甲基苯甲酸乙酯的制备

[0306] 将 3-羟基-2-甲基苯甲酸 (5.04g, 33.12mmol) 和对甲苯磺酸一水合物 (0.741g, 3.89mmol) 在无水乙醇 (150ml) 中的溶液回流 16 小时,或者直至所有原料耗尽。将反应混合物浓缩,以 EtOAc (30ml) 稀释并以水 (20ml) 洗涤。以 Na_2SO_4 干燥有机层,过滤,浓缩,并经硅胶柱快速层析(己烷:乙酸乙酯 2 : 1)纯化,从而得到标题化合物。

[0307] 步骤 B :3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苯甲酸乙酯的制备

[0308] 在氩气下于室温向 3-羟基-2-甲基苯甲酸乙酯(步骤 A, 3.1g, 17.22mmol)、 K_2CO_3 (3.09g, 22.38mmol) 在干燥 DMF (15ml) 中的搅拌溶液添加 2,6-二甲基苄基氯 (3.19g, 20.66mmol)。将反应混合物搅拌 16 小时,以 EtOAc (40ml) 稀释,以水 (20ml) 和盐水洗涤。以 Na_2SO_4 干燥有机层,过滤,浓缩,并经硅胶柱快速层析(己烷:乙酸乙酯 4 : 1)纯化,从而得到白色固体状标题化合物。

[0309] 步骤 C : (3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)甲醇的制备

[0310] 在氩气下于 0℃ 向 3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苯甲酸乙酯(步骤 B, 5.94g, 19.93mmol) 在干燥 THF (35ml) 中的溶液逐滴添加 LiAlH_4 (THF 中, 1M, 0.832g, 21.92mmol)。将反应混合物搅拌 4 小时或者直至所有原料耗尽,然后于 0℃ 以 0.1N HCl 缓慢淬灭反应,并将 EtOAc (20ml) 添加至反应混合物中。将反应混合物过滤,并以 EtOAc (25ml × 2) 洗涤沉淀。合并的有机层以 0.1N HCl 和盐水洗涤,以 Na_2SO_4 干燥,过滤,浓缩,并经硅胶柱快速层析(己烷:乙酸乙酯 2 : 1)纯化,从而得到标题化合物。

[0311] 步骤 D :1-(溴甲基)-3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苯的制备

[0312] 于 0℃ 向 (3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)甲醇(步骤 C, 3.68g, 14.37mmol) 和 CBr_4 (5.25g, 15.8mmol) 在干燥 CH_2Cl_2 (20ml) 中的溶液分批添加三苯基膦 (4.14g, 15.8mmol)。将该反应混合物搅拌 4 小时,过滤,浓缩并通过硅胶柱快速层析(己

烷：乙酸乙酯 4 : 1) 纯化,从而得到标题化合物。该固体继续于真空中保持 6 小时以进行干燥。

[0313] 步骤 E :2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)乙腈的制备

[0314] 将 1-(溴甲基)-3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基 (步骤 D, 4.28g, 13.41mmol) 和 NaCN (0.789g, 16.10mmol) 在干燥 DMF (20ml) 中的溶液于 120℃ 加热 3 小时,然后冷却,并以 EtOAc (50ml) 稀释。将有机层以水 (30ml) 和盐水洗涤,以 Na₂SO₄ 干燥,过滤,浓缩,并经硅胶柱快速层析 (己烷:乙酸乙酯 4 : 1) 纯化,从而得到标题化合物。

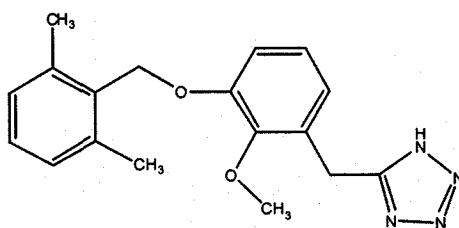
[0315] 步骤 F :5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)-1H-四唑的制备

[0316] 在氩气下将 2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲基苄基)乙腈 (步骤 E, 2.70g, 10.19mmol)、叠氮化钠 (0.795g, 12.23mmol) 和氯化铵 (0.653g, 12.22mmol) 在干燥 DMF (20ml) 中的混合物于 90℃ 加热 16 小时或者直至所有原料耗尽。冷却该反应混合物,以水稀释,并以 EtOAc (30ml × 4) 萃取。合并的有机层以盐水洗涤,以 Na₂SO₄ 干燥,过滤,浓缩并通过硅胶柱快速层析 (氯仿:甲醇 92.5 : 7.5) 纯化,得到半固体状产物。将该半固体与 1 : 2 乙酸乙酯:己烷 (15ml) 搅拌 10 分钟,过滤,得到白色固体状产物。

[0317] ¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) :2.01 (s, 3H) ;2.32 (s, 6H) ;4.24 (s, 2H) ;5.01 (s, 2H) ;6.78-6.79 (dd, 1H) ;7.06-7.08 (d, 2H) ;7.12-7.19 (m, 3H).

[0318] 实施例 8

[0319]



[0320] 5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)-1H-四唑

[0321] 步骤 A :3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基甲醛的制备

[0322] 在氩气下将 3-羟基-2-甲氧基苄基甲醛 (5.06g, 32.7mmol)、2,6-二甲基苄基氯 (5.04g, 33.1mmol) 和 K₂CO₃ (4.78g, 34.6mmol) 在干燥 DMF (15ml) 中的溶液于室温搅拌 16 小时,然后以 EtOAc (40ml) 稀释,并以水 (20ml) 洗涤。浓缩有机层,并经硅胶柱快速层析 (己烷:乙酸乙酯 4 : 1) 纯化,从而得到灰白色固体状标题化合物。

[0323] 步骤 B : (3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)甲醇的制备

[0324] 在氩气下于 0℃ 向 3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基甲醛 (步骤 B, 10.6g, 32.7mmol) 在干燥 THF (40ml) 中的溶液逐滴添加 LiAlH₄ (THF 中, 1M, 0.95g, 23.7mmol)。将反应混合物搅拌 1 小时,或者直至所有原料耗尽。然后通过缓慢添加水来淬灭反应,而后添加 1N HCl (5ml),并向反应混合物添加水 (10ml) 和 EtOAc (20ml)。将反应混合物浓缩,使用乙酸乙酯使其通过短硅胶柱,从而得到灰白色固体状标题化合物。

[0325] 步骤 C :3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基甲磺酸酯的制备

[0326] 在氩气下于 0℃ 向 (3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)甲醇 (步骤 B, 9.5g, 32.7mmol) 和三乙基胺 (5.80g, 57.4mmol) 在干燥 CH₂Cl₂ (100ml) 中的溶液逐滴添加甲磺酰氯 (3.5ml, 45mmol)。将该反应混合物升温至室温并保持 6 小时,或者直至所有原料耗尽,

以冷的 10% Na_2CO_3 中和,并以 CH_2Cl_2 萃取。浓缩有机层,并经硅胶柱快速层析(己烷:二氯甲烷 2 : 1)纯化,从而得到浅黄色油状标题化合物。

[0327] 步骤 D :2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)乙腈的制备

[0328] 将 3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基甲烷磺酸酯(步骤 C, 8.8g, 30.26mmol) 和 NaCN (1.60g, 32.6mmol) 在干燥 DMF (40ml) 中的溶液于 85℃ 加热 18 小时,然后冷却,并以 EtOAc (50ml) 稀释。将有机层以水洗涤 (30ml), 浓缩,并使用二氯甲烷使其通过短硅胶柱,从而得到黄色固体状标题化合物。

[0329] 步骤 E :5-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)-1H-四唑的制备

[0330] 在氩气下将 2-(3-(2,6-二甲基苄氧基)-2-甲氧基苄基)乙腈(步骤 D, 3.2g, 12.7mmol)、叠氮化钠 (0.86g, 13.2mmol) 和氯化铵 (0.696g, 13.0mmol) 在干燥 DMF (10ml) 中的混合物于 90℃ 加热 16 小时,或者直至所有原料耗尽,将反应混合物冷却,减压浓缩,并经硅胶柱快速层析(氯仿:甲醇 9 : 1)纯化,得到半固体产物。将该半固体与 1 : 2 乙酸乙酯:己烷 (15ml) 搅拌 10 分钟,过滤,得到白色固体状产物。

[0331] ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) :2.33(s, 6H) ;3.5(s, 3H) ;4.21(s, 2H) ;5.04(s, 2H) ;6.83-6.85(dd, 1H) ;7.05-7.09(m, 3H) ;7.15-7.23(m, 2H) .

[0332] 实施例 9 :URAT1 抑制试验

[0333] URAT1(尿酸转运子-1)表达在肾小管的顶端膜上。URAT1 介导尿酸由尿液进入血液的重摄取。抑制 URAT1 能够增加尿液中的尿酸的排泄,因而是降低血清尿酸浓度的药物的潜在作用模式。例如,丙磺舒和苯溴马隆已经在临床上用于治疗痛风和高尿酸血症,二者均作用于 URAT1,从而降低尿酸的重摄取。然而,苯溴马隆因与 URAT1 无关的机制的肝毒性所致已经从市场撤下,而丙磺舒作用于众多的转运蛋白,导致与许多其他药物发生相互作用。

[0334] 体外的 URAT1 试验可用于鉴别对降低血清尿酸具有潜在活性的化合物。适宜的试验包括以编码人类 URAT1 的载体对细胞(例如,人类胚胎肾细胞;"HEK")的转染,随后测定转染细胞摄取放射性同位素标记的尿酸的能力。以其阻止转染细胞摄取尿酸的能力来评估化合物作为 URAT1 抑制剂的活性。

[0335] 测试化合物和化学物:

[0336] 苯溴马隆 (Sigma, Cat. No. B5774)、丙磺舒 (Sigma, Cat. No. P8761)、DMSO (Sigma, Cat. No. D-2650)、 $[8-^{14}\text{C}]$ 尿酸盐 (50-60mCi/mmol; American Radio Chemicals, Cat. No. ARC0513)。

[0337] 将 hURAT1 亚克隆到表达载体中:

[0338] 从 OriGene Technologies, Inc. 获得包含 hURAT1cDNA 的质粒载体 pCMV6-XL5 (Cat. No. SC 125624) 和表达载体 pCMV6-Neo (Cat. No. pCMVNEO)。全长 hURAT1cDNA 由载体 pCMV6-XL5 获得,并亚克隆到表达载体 pCMV6-Neo 中以产生 hURAT 1 表达质粒 pCMV6-hURAT1。通过 DNA 自动测序核定序列。

[0339] 细胞培养、URAT1 表达质粒的转染和稳定表达 hURAT1 的 HEK 细胞的建立:

[0340] 在加有 10% FBS 和 2mM 的 L-谷酰胺的 EMEM 中培养人类胚胎肾 293 (HEK) 细胞 (ATCC, Cat No. CRL-1573), 并于 37℃ 和 5% CO_2 的条件下温育。对于转染实验,将细胞铺种于 60mm 的培养皿,其中每个培养皿 1ml 培养基。温育 18 至 24 小时后,按照制造商的说

明 (Invitrogen, Cat. No. 18292), 使用 Lipofectin 转染剂使细胞转染上质粒 pCMV6-hURAT1 或表达载体 pCMV6-Neo。转染后, 细胞在 EMEM 培养基中生长 72 小时后, 通过加入 1mg/ml 的 Geneticin (GIBCO, Cat. No. 10131) 选择稳定转染子。使用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法检验表达 hURAT1 的稳定转染子 (下文称为 hURAT1-HEK 细胞) 或仅具有表达载体 pCMV6-Neo 的细胞 (下文称为假性 HEK 细胞)。

[0341] [8-¹⁴C] 尿酸盐摄取试验

[0342] hURAT1-HEK 细胞和假性 HEK 细胞铺种在处于 EMEM 培养基中的浓度为 3×10^5 的聚 D-赖氨酸细胞培养 24 孔板 (Becton Dickinson, Cat. No. 354414) 中, 并温育过夜。在汉克斯平衡盐溶液 (HBSS) 中使用或不使用测试化合物来制备含有终浓度为 50 μ M 的 [8-¹⁴C] 尿酸盐 (55mCi/mmol) 的反应溶液, 所述汉克斯平衡盐溶液 (HBSS) 包含 125mM 葡萄糖酸钠、4.8mM 葡萄糖酸钾、1.3mM 钙、5.6mM 葡萄糖、1.2mM 硫酸镁、1.2mM MKH_2PO_4 和 25mM HEPES (pH7.4)。在摄取试验开始之前, 移除培养基, 并将细胞在 0.6ml 的 HBSS 中温育 5 分钟。移除 HBSS 之后, 将制备的反应溶液添加至各孔中, 并在室温温育 5 分钟。然后移除反应溶液, 以 0.6ml 的冷 HBSS 洗涤细胞两次, 并用 0.2ml 的 0.1M NaOH 溶解细胞 20 分钟。将细胞溶解产物转移至包含 1ml 闪烁液 (OptiPhase SuperMIX, PerkinElmer, Cat No. 1200-439) 的闪烁瓶中, 并在 Microbeta 计数器 (1450, Wallac Jet, PerkinElmer) 中计数放射性。将测试化合物溶解在 DMSO 中, 然后将相同浓度的 DMSO 加入不包含测试化合物的假性 HEK 细胞和 hURAT1-HEK 细胞的孔中。对各测试化合物进行 2 次摄取试验, 并以 3 份进行。将各测试条件下的细胞的尿酸盐摄取表示为相对于 DMSO 对照的平均百分比抑制率。将对包含 DMSO 的孔得到的放射性值视为细胞的 100% 摄取。将观测到的浓度 - 百分比抑制率数据拟合为 Σ 形浓度 - 效应模型, 其中:

[0343] 抑制率% = $(100 \times \text{浓度}^{\wedge} \text{斜率}) / (\text{IC}_{50}^{\wedge} \text{斜率} + \text{浓度}^{\wedge} \text{斜率})$

[0344] 通过使用 Data Analysis Toolbox™ (MDL Information Systems, San Leandro, 加州, 美国) 以非线性最小二乘回归分析确定其 95% 置信界限的 IC_{50} 和斜率估值。

[0345] 对于作为 URAT1 抑制剂的化合物的活性的评估, 尿酸摄取的百分抑制率通常在药物浓度为 10 微摩尔时进行评价 (表 1)。测试了一些化合物的其他药物浓度以确定 IC_{50} 值 (表 2)。在该实施例中, 不必同时对所有化合物进行测试。

[0346] 表 1. 测试化合物在 10 μ m 的浓度时对 hURAT1-HEK 细胞中 ¹⁴C 尿酸盐摄取的抑制效果

	测试化合物	抑制率%	S.D.
[0347]	EB	90.0	0.29
	EC	95.2	0.67
	ED	96	0.7
	EF	92	0.6
	EG	95.57	0.39
	BD	56.57	2.64
	EH	80.00	1.29
	EI	44.00	1.53

[0348] 表 2

[0349]

化合物	IC50 值 (μ M)
EB	0.93
EC	0.24
ED	0.25
EF	0.74
EG	0.13
苯溴马隆	0.75
丙磺舒	174

[0350] 实施例 10 :用化合物 EB 进行的小鼠口服单剂量药代动力学研究

[0351] 对雄性小鼠单次经口管饲施用后化合物 EB 的血浆概况的确定

[0352] 使用组织均质器将测试化合物悬浮在 1% 的 HPMC 中,从而使颗粒最小化并使悬浮液的均匀性最大化,并保存于 4℃。施用前即刻将该制剂彻底混合。通过单次经口管饲将 100mg/kg 剂量的化合物 EB 或介质 (1% HPMC) 施用于雄性小鼠。给药后将小鼠置于尿液收集器中 5 小时,并收集 5 个小时的总尿排出。将样品于 -80℃ 冷冻,直至用 LC/MS-MS 进行分析。

[0353] 在给药后 0、0.5、1、2、4、6、8 和 24 小时时间点,通过眶窦取血将血液样品 (0.4mL) 收集在 K₃EDTA 管中。收集后的 30 分钟内在冷藏下 (2℃~8℃) 以 6000rpm 对血液样品离心 7 分钟。离心后,将每只动物每个时间点的血浆收集在单独的管中,并于 -80℃ 急冻,直至用 LC/MS-MS 进行分析。

[0354] 使用 WinNonlin Standard (v2.1, Pharsight Corporation) 和 Microsoft EXCEL 对数据进行药代动力学分析。

[0355] 方案:

[0356] A. 血浆。

[0357] 1. 小鼠接受化合物 EB (100mg/kg) 的单次经口管饲,并在一定时间收集血浆。

[0358] 2. 在 -80℃ 保存血浆直至分析日。

[0359] 3. 样品在 37℃ 浴中解冻 5 分钟,并以最高速度涡旋 10 秒。

[0360] 4. 将 0.1mL 小鼠血浆与 0.2mL 乙腈混合,涡旋 1 分钟,在 4℃ 以 14000rpm,17000g 离心 25 分钟。

[0361] 5. 将上清液经 0.45 微米、4mm 的 PTFE 膜针头式过滤器 (Phenomenex#AF0-3102-52) 进行过滤,将 13 微升该清液注射到 Luna 3 微米,100A 孔, C8 (2), 150×3mm 的反相柱 (Phenomenex#00F-4248-YO, SN#259151-7) 中并进行解析:从 40% 到 69% 的 50 分钟线性梯度 (0.1% 甲酸, 89.9% 乙腈, 10% 甲醇), 0.25mL/分钟, 100 巴, 柱温为 37℃, 方法为 406975M1, 序列 1029-08A, Agilent 1100LC-MS。

[0362] 所有样品均做两组测试,并记录 210nm 和 230nm 吸光度和正负离子化谱图。

[0363] B. 校准曲线。

[0364] 步骤 1. 将 0.095mL 来自“介质”动物的血浆（混合的）与 0.005mL 的化合物 EB 在甲醇中的 20x 贮备液（stock）混合，由此在血浆中得到浓度为 500 μ M、250 μ M、125 μ M..... 的化合物 EB。

[0365] 例如，95 微升的血浆 +5 微升的 10mM 化合物 EB 的甲醇溶液 = 具有 500 μ M 化合物 EB 的 0.1mL 血浆。

[0366] 步骤 2. 将步骤 1 的样品以最高速度涡旋 10 秒。

[0367] 步骤 3. 向步骤 2 的所有样品中加入 0.2mL 乙腈，然后所有的小瓶以最高速度涡旋 1 分钟。

[0368] 步骤 4. 在 4℃将步骤 3 的所有样品以 14000rpm, 17000g 离心 25 分钟。

[0369] 步骤 5. 将上清液经 0.45 微米、4mm 的 PTFE 膜针头式过滤器（Phenomenex#AF0-3102-52）进行过滤，将 13 微升该清液注射到 Luna 3 微米，100A 孔，C8(2)，150×3mm 的反相柱（Phenomenex#00F-4248-YO，SN#259151-7）中并进行解析：从 40%到 69%的 50 分钟线性梯度（0.1%甲酸，89.9%乙腈，10%甲醇），0.25ml/分钟，100 巴，柱温为 37℃，方法为 406975M1，Agilent1100LC-MS。

[0370] 所有样品均做两组测试，并记录 210nm 和 230nm 吸光度和正负离子化谱图。

[0371] HPLC 条件：

[0372]

表 3，HLPC 梯度

时间 分钟	溶剂 C %	溶剂 D %
0	60	40
2	60	40
52	31	69
58	31	69
60	60	40
75	60	40
溶剂 C: 0.1%甲酸水溶液		
溶剂 D: 0.1%甲酸，89.9%乙腈，10%甲醇		

[0373] 结果：

[0374] 在 小鼠血浆中易于检测到化合物 EB。保留时间和质量在正负离子化模式中予以确认。AGILENT LC-MS 序列 1029-08A。

[0375] " M- " = 279.2 100%，

[0376] " M+ " = 281.2 100%

[0377] 式量 280，平均保留时间 = 26.5 分钟

[0378] 表 4 各动物血浆中的化合物 EB 浓度

[0379]

小鼠血浆样品号 #	采血时间 小时	化合物 EB 的浓度 $\mu\text{g/mL}$
1	0	0
2	0	0
3	0	0
6	0.5	206.5
7	0.5	207.5
8	0.5	134.2
9	1	210
10	1	139.7
11	1	157.6
12	2	139.9
13	2	187.6
14	2	82.4
15	4	74.9
16	4	92.1
17	4	39.6
18	6	58.7
19	6	79.9
20	6	48
21	8	18.2
22	8	10.7
23	8	0
24	24	0
25	24	0
26	24	0

[0380] 表 5 血浆中化合物 EB 的浓度, 平均值 (另参见图 3)

[0381]

时间, 小时	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)
0	0
0.5	183
1	169
2	137
4	69
6	62
8	10
24	3

[0382] AUC_{0-24} : 796 $\mu\text{g/mL}$

[0383] C_{max} : 210 $\mu\text{g/mL}$

[0384] 半对数图中的线性成分：

[0385] $t_{1/2}$ (1 ~ 4 小时) :2. 27

[0386] $t_{1/2}$ (6 ~ 8 小时) :0. 74

[0387] $t_{1/2}$ (8 ~ 24 小时) :9. 39

[0388] 实施例 11 :用化合物 EB 进行的大鼠试验性单剂量口服药代动力学研究

[0389] 对雄性大鼠单次经口管饲施用后化合物 EB 的血浆概况的确定

[0390] 使用组织均质器将测试化合物悬浮在 1% 的 HPMC 中,从而使颗粒最小化并使悬浮液的均匀性最大化,并保存于 4℃。施用前即刻将该制剂彻底混合。通过单次经口管饲将 100mg/kg 剂量的测试化合物或介质(1% HPMC)施用于雄性 Sprague-Dawley 大鼠。在给药后 0、1、2、4、6、8 和 24 小时时间点,通过眶窦取血将血液样品(0. 4mL)收集在 K3EDTA 管中。收集后的 30 分钟内在冷藏下(2℃~ 8℃)以 6000rpm 对血液样品离心 7 分钟。离心后,将每只动物每个时间点的血浆收集在单独的管中,并于 -80℃ 急冻,直至用 LC/MS-MS 进行分析。使用 WinNonlin Standard(v2.1, Pharsight Corporation) 和 Microsoft EXCEL 对系列血浆浓度时间数据进行药代动力学分析。

[0391] 方案：

[0392] A. 血浆。

[0393] 1. 大鼠接受化合物 EB(100mg/kg) 的单次经口管饲,并在一定时间收集血浆。

[0394] 2. 在 -80℃ 保存血浆直至分析日。

[0395] 3. 样品在 37℃ 浴中解冻 5 分钟,并以最高速度涡旋 10 秒。

[0396] 4. 将 0. 1mL 大鼠血浆与 0. 2mL 乙腈混合,涡旋 1 分钟,在 4℃ 以 14000rpm,17000g 离心 25 分钟。

[0397] 5. 将上清液经 0. 45 微米、4mm 的 PTFE 膜针头式过滤器(Phenomenex#AF0-3102-52)进行过滤,将 13 微升该清液注射到 Luna 3 微米,100A 孔, C8(2),150×3mm 的反相柱(Phenomenex#00F-4248-YO, SN#259151-7)中并进行解析:从 40% 到 69% 的 50 分钟线性梯度(0. 1% 甲酸,89. 9% 乙腈,10% 甲醇),0. 25ml/ 分钟,100 巴,柱温为 37℃,方法为 406975M1,AGILENT 序列 1015-08A,Agilent 1100LC-MS。

[0398] 所有样品均做两组测试,并记录 210nm 和 230nm 吸光度和正负离子化谱图。

[0399] B. 校准曲线。

[0400] 步骤 1. 将 0. 19mL 来自“介质”动物的血浆(混合的)与 0. 01mL 的 PN2107 在甲醇中的 20x 贮备液混合,由此在血浆中得到浓度为 500 μ M、250 μ M、125 μ M..... 的化合物 EB。

[0401] 例如,190 微升的血浆+10 微升的 10mM 化合物 EB 的甲醇溶液=具有 500 μ M 化合物 EB 的 0. 2mL 血浆。

[0402] 步骤 2. 将步骤 1 的样品以最高速度涡旋 10 秒。

[0403] 步骤 3. 向步骤 2 的所有样品中加入 0. 4mL 乙腈,然后所有的小瓶以最高速度涡旋 1 分钟。

[0404] 步骤 4. 在 4℃ 将步骤 3 的所有样品以 14000rpm,17000g 离心 25 分钟。

[0405] 步骤 5. 将上清液经 0. 45 微米、4mm 的 PTFE 膜针头式过滤器(Phenomenex#AF0-3102-52)进行过滤,将 13 微升该清液注射到 Luna 3 微米,100A 孔,

C8(2), 150×3mm 的反相柱 (Phenomenex#00F-4248-Y0, SN#259151-7) 中并进行解析: 从 40% 到 69% 的 50 分钟线性梯度 (0.1% 甲酸, 89.9% 乙腈, 10% 甲醇), 0.25ml/ 分钟, 100 巴, 柱温为 37°C。

[0406] 所有样品均做两组测试, 并记录 210nm 和 230nm 吸光度和正负离子化谱图。

[0407] 表 6 :HPLC 条件

[0408]

HLPC 梯度		
时间 分钟	溶剂 C %	溶剂 D %
0	60	40
2	60	40
52	31	69
58	31	69
60	60	40
75	60	40

[0409] 溶剂 C :0.1% 甲酸水溶液

[0410] 溶剂 D :0.1% 甲酸, 89.9% 乙腈, 10% 甲醇

[0411] 结果 :

[0412] 1. 建立校准曲线, R^2 拟合至线性度 = 0.9994 (图 4)。

[0413] 2. 在大鼠血浆中易于检测到化合物 EB。保留时间和质量在正负离子化模式中予以确认。

[0414] " M- " = 279.2 100%,

[0415] " M+ " = 281.2 100%

[0416] 式量 280, 平均保留时间 = 26.5 分钟

[0417] 原始数据和计算结果列于表 7。

[0418] 血浆中的化合物浓度列于表 8。

[0419]

表 7.

动物编号##	采血时间	化合物 EB			血浆中的浓度 μM
		210 nm 处的峰面积			
		测试 1	测试 2	平均值	
大鼠 1 A	15 分钟	5588	5530	5559	159
大鼠 1 B	2 小时	7110	7168	7139	206
大鼠 1 C	8 小时	7040	6968	7004	202
大鼠 2 A	15 分钟	6446	6363	6404.5	184
大鼠 2 B	2 小时	2699	2710	2704.5	75
大鼠 2 C	8 小时	2581	2563	2572	72
大鼠 3 A	30 分钟	1382	1413	1397.5	37
大鼠 3 B	4 小时	923	960	941.5	24
大鼠 3 C	24 小时	153	103	128	0
大鼠 4 A	30 分钟	4433	4328	4380.5	125
大鼠 4 B	4 小时	3944	3980	3962	112
大鼠 4 C	24 小时	715	723	719	17
大鼠 5 A	1 小时	13094	13441	13267.5	386
大鼠 5 B	6 小时	1028	1022	1025	26
大鼠 6 A	1 小时	3636	3633	3634.5	103
大鼠 6 B	6 小时	3243	3298	3270.5	92

[0420]

表 8.

大鼠, 雄性, Sprague-Dowley, 单次经口管饲, 化合物 EB 100 mg/kg.		
动物编号#	血液收集时间	化合物 EB, 式量 280
		血浆中的浓度, μM
大鼠 1	15 分钟	159
大鼠 1	2 小时	206
大鼠 1	8 小时	202
大鼠 2	15 分钟	184
大鼠 2	2 小时	75
大鼠 2	8 小时	72
大鼠 3	30 分钟	37
大鼠 3	4 小时	24
大鼠 3	24 小时	0
大鼠 4	30 分钟	125
大鼠 4	4 小时	112
大鼠 4	24 小时	17
大鼠 5	1 小时	386
大鼠 5	6 小时	26
大鼠 6	1 小时	103
大鼠 6	6 小时	92

[0421] 表 9 :化合物 EB 浓度,平均值 (另参见图 5)

[0422]

时间	化合物 EB μ M	化合物 EB μ g/mL
0	0	0
0.25	171.5	48.02
0.5	81.0	22.68
1	244.5	68.46
2	140.5	39.34
4	68.0	19.04
6	59.0	16.52
8	137.0	38.36
24	8.5	2.38

[0423] 化合物 EB 的 $T^1/2 = 3.99$ 小时

[0424] 化合物 EB 的 $AUC_{0-24} = 566 \mu$ g/mL* 小时

[0425] 化合物 EB 的 $C_{max} = 108.08 \mu$ g/mL

[0426] 实施例 12 :用化合物 EC 进行的大鼠试验性单剂量口服药代动力学研究

[0427] 对雄性大鼠单次经口管饲施用后化合物 EC 的血浆概况的确定

[0428] 使用组织均质器将测试化合物悬浮在 1% 的 HPMC 中,从而使颗粒最小化并使悬浮液的均匀性最大化,并保存于 4℃。施用前即刻将该制剂彻底混合。通过单次经口管饲将 100mg/kg 剂量的测试化合物或介质 (1% HPMC) 施用于雄性 Sprague-Dawley 大鼠。在给药后 0、1、2、4、6、8 和 24 小时的时间点,通过眶窦取血将血液样品 (0.4mL) 收集在 K3EDTA 管中。收集后的 30 分钟内在冷藏下 (2℃ ~ 8℃) 以 6000rpm 对血液样品离心 7 分钟。离心后,将每只动物每个时间点的血浆收集在单独的管中,并于 -80℃ 急冻,直至用 LC/MS-MS 进行分析。使用 WinNonlin Standard (v2.1, Pharsight Corporation) 和 Microsoft EXCEL 对系列血浆浓度时间数据进行药代动力学分析。

[0429] 方案 :

[0430] A. 血浆。

[0431] 1. 大鼠接受化合物 EC (100mg/kg) 的单次经口管饲,并在一定时间收集血浆。

[0432] 2. 在 -80℃ 保存血浆直至分析日。

[0433] 3. 样品在 37℃ 浴中解冻 5 分钟,并以最高速度涡旋 10 秒。

[0434] 4. 将 0.1mL 大鼠血浆与 0.2mL 乙腈混合,涡旋 1 分钟,在 4℃ 以 14000rpm,17000g 离心 25 分钟。

[0435] 5. 将上清液经 0.45 微米、4mm 的 PTFE 膜针头式过滤器

(Phenomenex#AF0-3102-52) 进行过滤, 将 15 微升该清液注射到 Luna 3 微米, 100A 孔, C8(2), 150×3mm 的反相柱 (Phenomenex#00F-4248-Y0, SN#259151-7) 中并进行解析: 从 40% 到 69% 的 50 分钟线性梯度 (0.1% 甲酸, 89.9% 乙腈, 10% 甲醇), 0.25ml/ 分钟, 107 巴, 柱温为 37℃, 方法为 406975M1, AGILENT 序列 0226-09A, Agilent 1100LC-MS。

[0436] 所有样品均做两组测试, 并记录 210nm 和 230nm 吸光度和正负离子化谱图。

[0437] B. 校准曲线。

[0438] 步骤 1. 将 0.19mL 来自“介质”动物的血浆 (混合的) 与 0.01mL 的化合物 EC 在甲醇中的 20x 贮备液混合, 由此在血浆中得到浓度为 500 μ M、250 μ M、125 μ M..... 的化合物 EC。

[0439] 例如, 190 微升的血浆 +10 微升的 10mM 化合物 EC 的甲醇溶液 = 具有 500 μ M 化合物 EC 的 0.2mL 血浆。

[0440] 步骤 2. 将步骤 1 的样品以最高速度涡旋 10 秒。

[0441] 步骤 3. 向步骤 2 的所有样品中加入 0.4mL 乙腈, 然后所有的小瓶以最高速度涡旋 1 分钟。

[0442] 步骤 4. 在 4℃ 将步骤 3 的所有样品以 14000rpm, 17000g 离心 25 分钟。

[0443] 步骤 5. 将上清液经 0.45 微米、4mm 的 PTFE 膜针头式过滤器 (Phenomenex#AF0-3102-52) 进行过滤, 将 15 微升该清液注射到 Luna 3 微米, 100A 孔, C8(2), 150×3mm 的反相柱 (Phenomenex#00F-4248-Y0, SN#259151-7) 中并进行解析: 从 40% 到 69% 的 50 分钟线性梯度 (0.1% 甲酸, 89.9% 乙腈, 10% 甲醇), 0.25ml/ 分钟, 107 巴, 柱温为 37℃。

[0444] 所有样品均做两组测试, 并记录 210nm 和 230nm 吸光度和正负离子化谱图。

[0445] 表 10 :HPLC 条件

HPLC 梯度		
时间 分钟	溶剂 C %	溶剂 D %
0	60	40
2	60	40
52	31	69
58	31	69
60	60	40
75	60	40

[0446] 溶剂 C :0.1% 甲酸水溶液

[0447] 溶剂 D :0.1% 甲酸, 89.9% 乙腈, 10% 甲醇

[0448] 结果 :

[0449] 1. 建立校准曲线, R^2 拟合至线性度 = 0.9984 (参见图 6)。

[0450] 2. 在血浆中易于检测到化合物 EC。保留时间和质量在正负离子化模式中予以确认。(参见图 7)

[0451] " M⁻" = 293.2 100% ; 527.2 65%

[0452] " M⁺" = 295.2 100% ; 式量 294, 平均保留时间 = 23 分钟

[0453]

表 11. AGILENT LC-MS 序列 0226-09A					
大鼠血浆编号 #	采血时间 小时	化合物 EC 式量 294 210 nm 处的峰面积			血浆中的浓度 μM
		测试 1	测试 2	平均值	
7-a	0.25	2012	1993	2002.5	67
7-b	2	979	963	971	29
7-c	8	3059	3061	3060	107
8-a	0.25	3263	3252	3257.5	114
8-b	2	10470	10416	10443	384
8-c	8	7201	7180	7190.5	262
9-a	0.5	1401	1405	1403	45
9-b	4	1156	1134	1145	35
9-c	24	0	0	0	0
10-a	0.5	864	862	863	25
10-b	4	495	509	502	11
10-c	24	147	170	158.5	0
11-a	1	661	650	655.5	17
11-b	6	2479	2471	2475	85
12-a	1	6137	6119	6128	222
12-b	6	2119	2167	2143	73
12-c	6	1846	1865	1855.5	62

[0455]

表 12: 化合物 EC 在大鼠血浆中的浓度

收集时间 小时	第 1 次采血	第 2 次采血	第 3 次采血	平均值 μM	平均值 $\mu\text{g/mL}$
0.25	67	114		90.5	27
0.5	45	25		35	10
1	17	222		119.5	35
2	29	384		206.5	61
4	35	11		23	7
6	85	73	62	73.33333	22
8	107	262		184.5	54
24	0	0		0	0

C max

[0456] 表 13 : 化合物 EC 在大鼠血浆中的浓度

收集时间 小时	平均值 $\mu\text{g/mL}$
0	0
0.25	27
0.5	10
1	35
2	61
4	7
6	22
8	54
24	0

[0457]

[0458] 化合物 EC 的 $C_{\text{max}} = 61 \mu\text{g/mL}$ [0459] 化合物 EC 的 $AUC_{0-24} = 672.3 (\mu\text{g} \cdot \text{小时} / \text{mL})$

[0460] 实施例 13 :用化合物 EG 进行的大鼠试验性单剂量口服药代动力学研究

[0461] 对雄性大鼠单次经口管饲施用后化合物 EG 的血浆概况的确定

[0462] 使用组织均质器将测试化合物悬浮在 1% 的 HPMC 中,从而使颗粒最小化并使悬浮液的均匀性最大化,并保存于 4℃。施用前即刻将该制剂彻底混合。通过单次经口管饲将 100mg/kg 剂量的测试化合物或介质 (1% HPMC) 施用于雄性 Sprague-Dawley 大鼠。在给药后 0、1、2、4、6、8 和 24 小时的时间点,通过眶窦取血将血液样品 (0.4mL) 收集在 K₃EDTA 管中。收集后的 30 分钟内在冷藏下 (2℃~8℃) 以 6000rpm 对血液样品离心 7 分钟。离心后,将每只动物每个时间点的血浆收集在单独的管中,并于 -80℃ 急冻,直至用 LC/MS-MS 进行分析。使用 WinNonlin Standard(v2.1, Pharsight Corporation) 和 Microsoft EXCEL 对系列血浆浓度时间数据进行药代动力学分析。

[0463] 方案:

[0464] A. 血浆。

[0465] 1. 大鼠接受化合物 EG (100mg/kg) 的单次经口管饲,并在一定时间收集血浆。

[0466] 2. 在 -80℃ 保存血浆直至分析日。

[0467] 3. 样品在 37℃ 浴中解冻 5 分钟,并以最高速度涡旋 10 秒。

[0468] 4. 将 0.1mL 大鼠血浆与 0.2mL 乙腈混合,涡旋 1 分钟,在 4℃ 以 14000rpm,17000g 离心 25 分钟。

[0469] 5. 将上清液经 0.45 微米、4mm 的 PTFE 膜针头式过滤器 (Phenomenex#AF0-3102-52) 进行过滤,将 15 微升该清液注射到 Luna 3 微米,100A 孔, C8(2),150×3mm 的反相柱 (Phenomenex#00F-4248-Y0, SN#259151-7) 中并进行解析:从 40% 到 69% 的 50 分钟线性梯度 (0.1% 甲酸,89.9% 乙腈,10% 甲醇),0.25mL/分钟,107 巴,柱温为 37℃,方法为 406975M1,AGILENT 序列 0226-09A,Agilent 1100LC-MS。

[0470] 所有样品均做两组测试,并记录 210nm 和 230nm 吸光度和正负离子化谱图。

[0471] B. 校准曲线。

[0472] 步骤 1. 将 0.19mL 来自“介质”动物的血浆 (混合的) 与 0.01mL 的化合物 EG 在甲醇中的 20x 贮备液混合,由此在血浆中得到浓度为 500 μM、250 μM、125 μM..... 的化合物 EG。

[0473] 例如,190 微升的血浆 +10 微升的 10mM 化合物 EG 的甲醇溶液 = 具有 500 μM 化合物 EG 的 0.2mL 血浆。

[0474] 步骤 2. 将步骤 1 的样品以最高速度涡旋 10 秒。

[0475] 步骤 3. 向步骤 2 的所有样品中加入 0.4mL 乙腈,然后所有的小瓶以最高速度涡旋 1 分钟。

[0476] 步骤 4. 在 4℃ 将步骤 3 的所有样品以 14000rpm,17000g 离心 25 分钟。

[0477] 步骤 5. 将上清液经 0.45 微米、4mm 的 PTFE 膜针头式过滤器 (Phenomenex#AF0-3102-52) 进行过滤,将 15 微升该清液注射到 Luna 3 微米,100A 孔, C8(2),150×3mm 的反相柱 (Phenomenex#00F-4248-Y0, SN#259151-7) 中并进行解析:从 40% 到 69% 的 50 分钟线性梯度 (0.1% 甲酸,89.9% 乙腈,10% 甲醇),0.25mL/分钟,107 巴,柱温为 37℃。

[0478] 所有样品均做两组测试,并记录 210nm 和 230nm 吸光度和正负离子化谱图。

[0479] 表 14 :HPLC 条件

[0480]

HPLC 梯度		
时间 分钟	溶剂 C %	溶剂 D %
0	60	40
2	60	40
52	31	69
58	31	69
60	60	40
75	60	40

[0481] 溶剂 C :0.1% 甲酸水溶液

[0482] 溶剂 D :0.1% 甲酸, 89.9% 乙腈, 10% 甲醇

[0483] 结果 :

[0484] 1. 建立校准曲线, R^2 拟合至线性度 = 0.9997 (参见图 8)。

[0485] 2. 在血浆中易于检测到化合物 EG。保留时间和质量在正负离子化模式中予以确认。(参见图 9)

[0486] " M- " = 307.2 100%

[0487] " M+ " = 309.2 100%; 式量 308, 平均保留时间 = 30 分钟

[0488] 原始数据和计算结果

[0489]

表 15: 化合物 EG 在大鼠血浆中的浓度					
大鼠血浆编号	采血时间 小时	化合物 EG, 式量 308 210 nm 处的峰面积			血浆中的浓度 μM
		测试 1	测试 2	平均值	
13-a	0.25	1484	1410	1447	27
13-b	2	2799	2739	2769	50
13-c	8	172	191	181.5	5
14-a	0.25	1023	992	1007.5	19
14-b	2	1390	1362	1376	25
14-c	8	989	1029	1009	19
15-a	0.5	1533	1596	1564.5	29
15-b	4	702	764	733	14
15-c	24	0	0	0	2
16-a	0.5	966	979	972.5	18
16-b	4	1234	1206	1220	23
16-c	24	0	0	0	0
17-a	1	5424	5478	5451	101
17-b	6	520	472	496	10
18-a	1	2364	2322	2343	42
18-b	6	887	937	912	17

[0490]

表 16: 化合物 EG 在大鼠血浆中的浓度

收集时间 小时	第 1 次采血	第 2 次采血	平均值 μM	平均值 $\mu\text{g/mL}$
0.25	27	19	23	7
0.5	29	18	24	7
1	101	42	72	22
2	25	50	38	12
4	14	23	19	6
6	10	17	14	4
8	5	19	12	4
24	2	0	1	0

C max

[0491] 表 17 : 化合物 EG 在大鼠血浆中的浓度

收集时间 小时	平均值 $\mu\text{g/mL}$
0	0
0.25	7
0.5	7
1	22
2	12
4	6
6	4
8	4
24	0

[0492]

[0493] 化合物 EG (式量 308) 的 $C_{\text{max}} = 22 \mu\text{g/mL}$ [0494] 化合物 EG (式量 308) 的 $AUC_{0-24} = 94.9 (\mu\text{g} \cdot \text{小时} / \text{mL})$

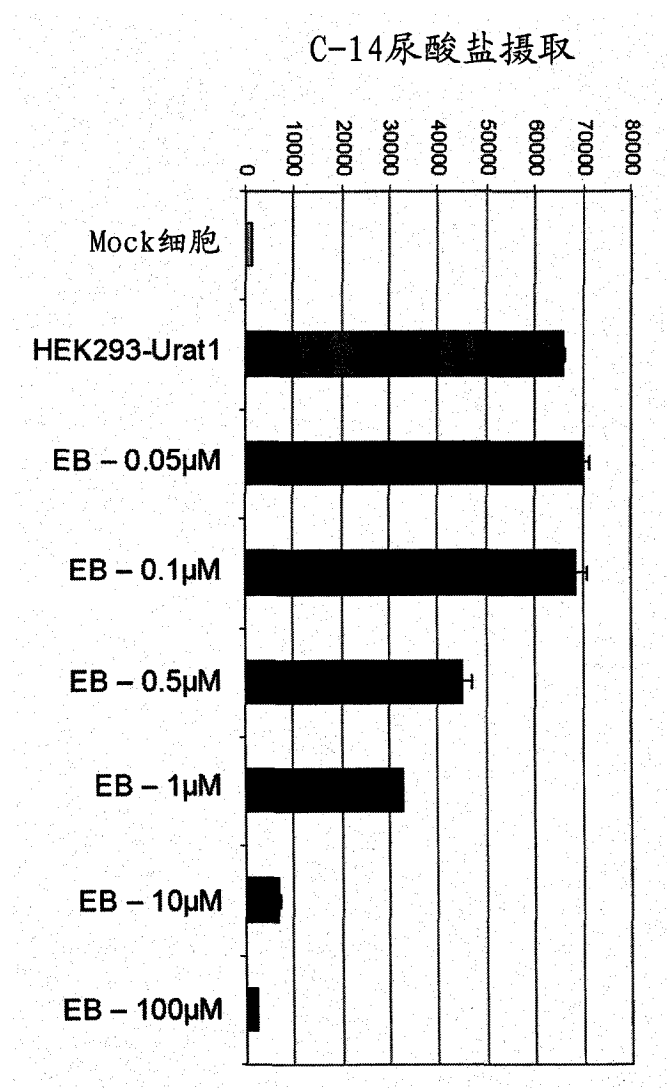


图 1

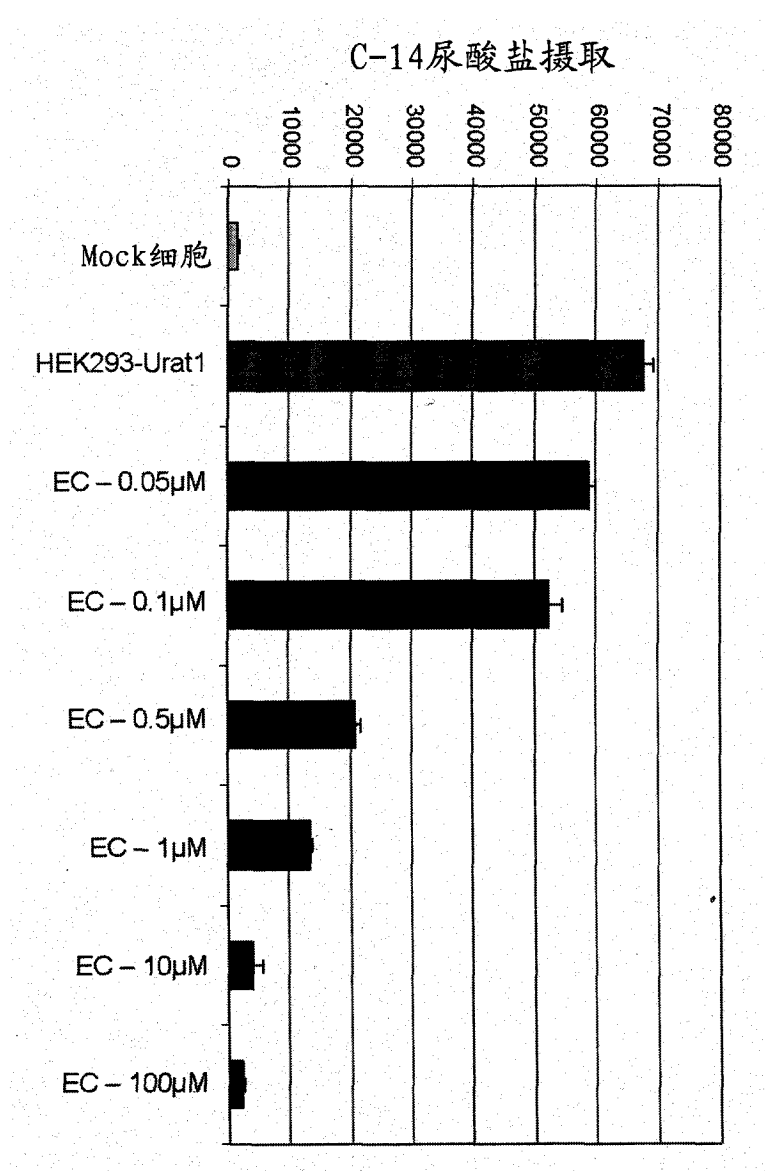


图 2

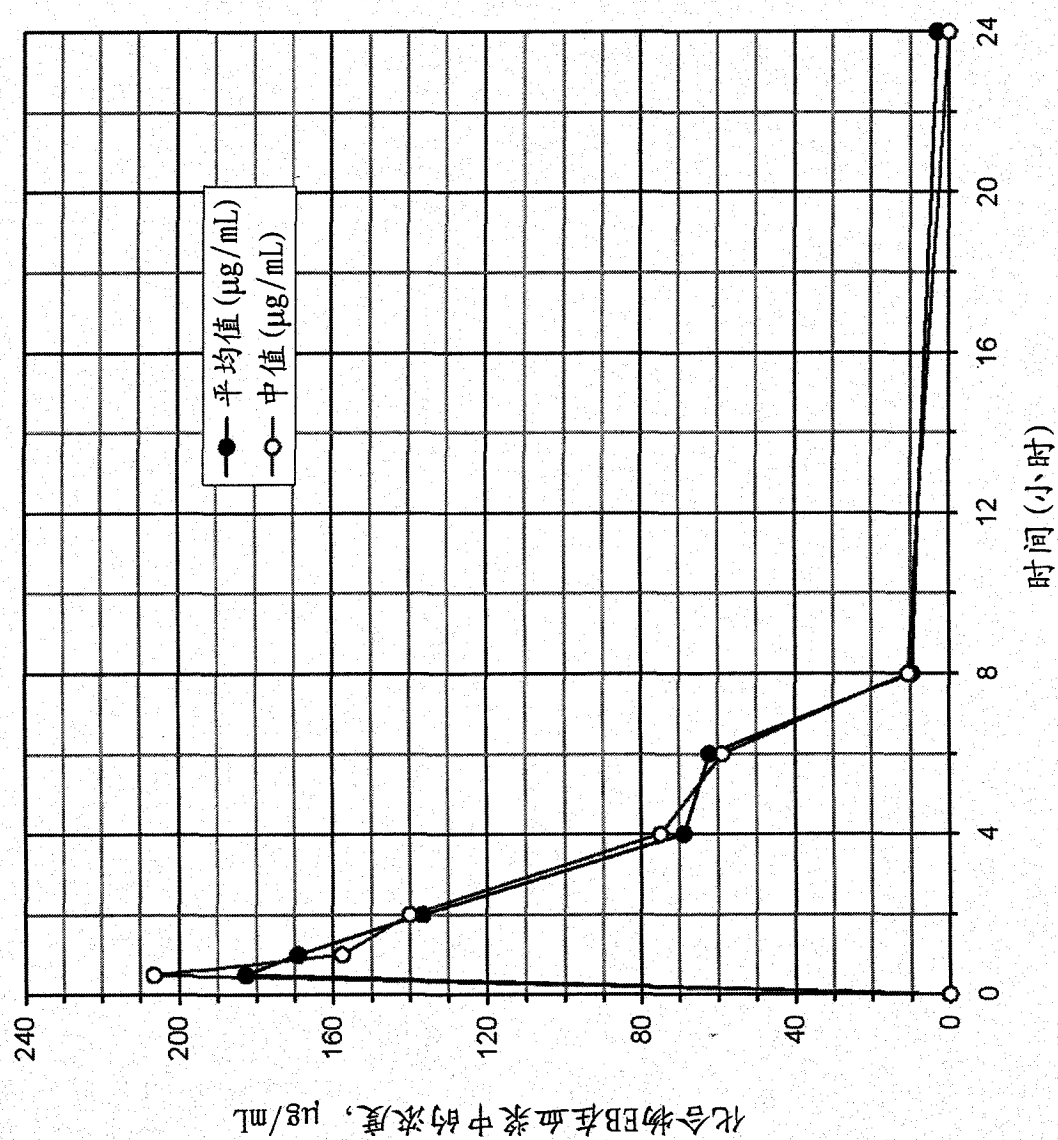


图 3

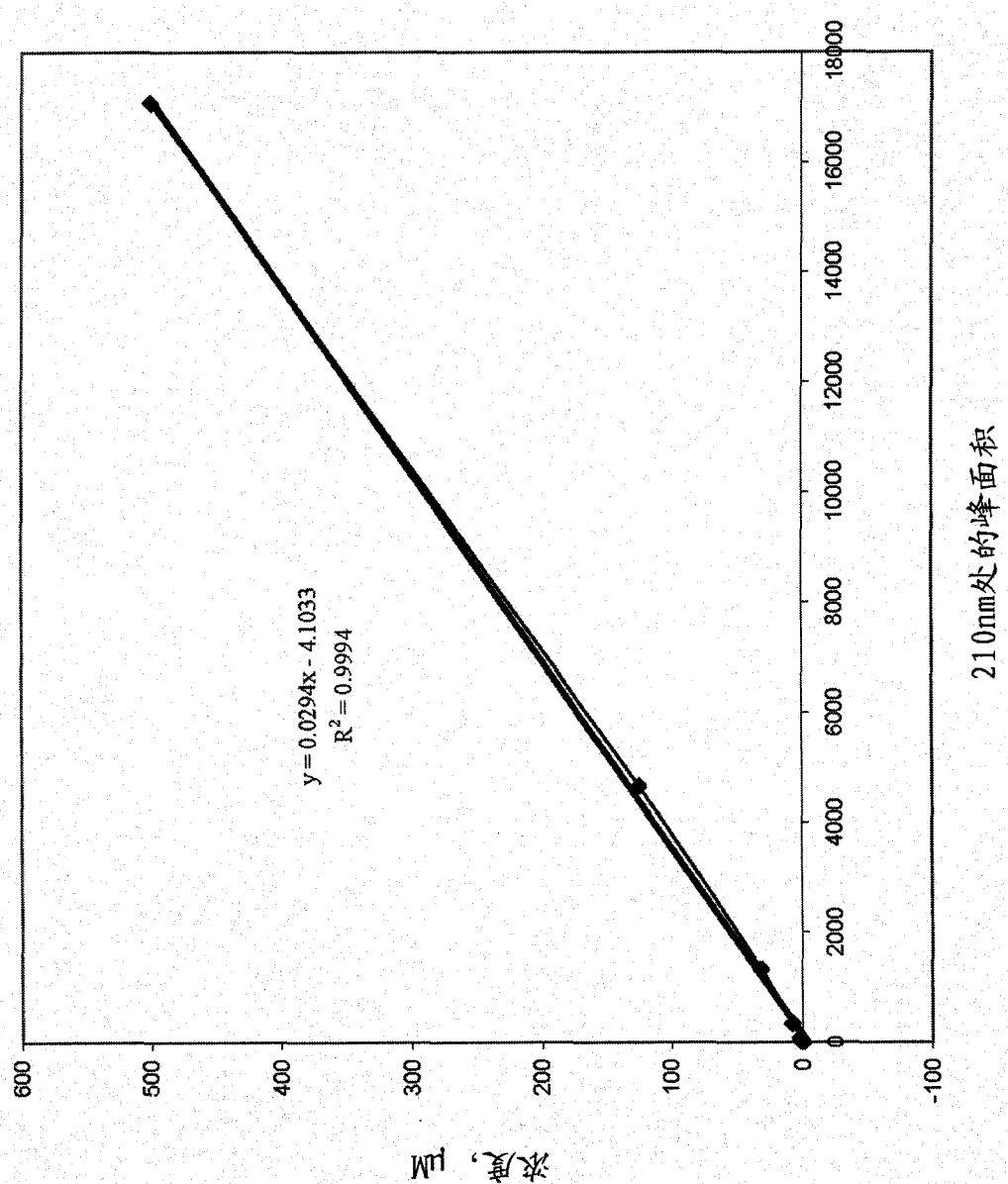


图 4

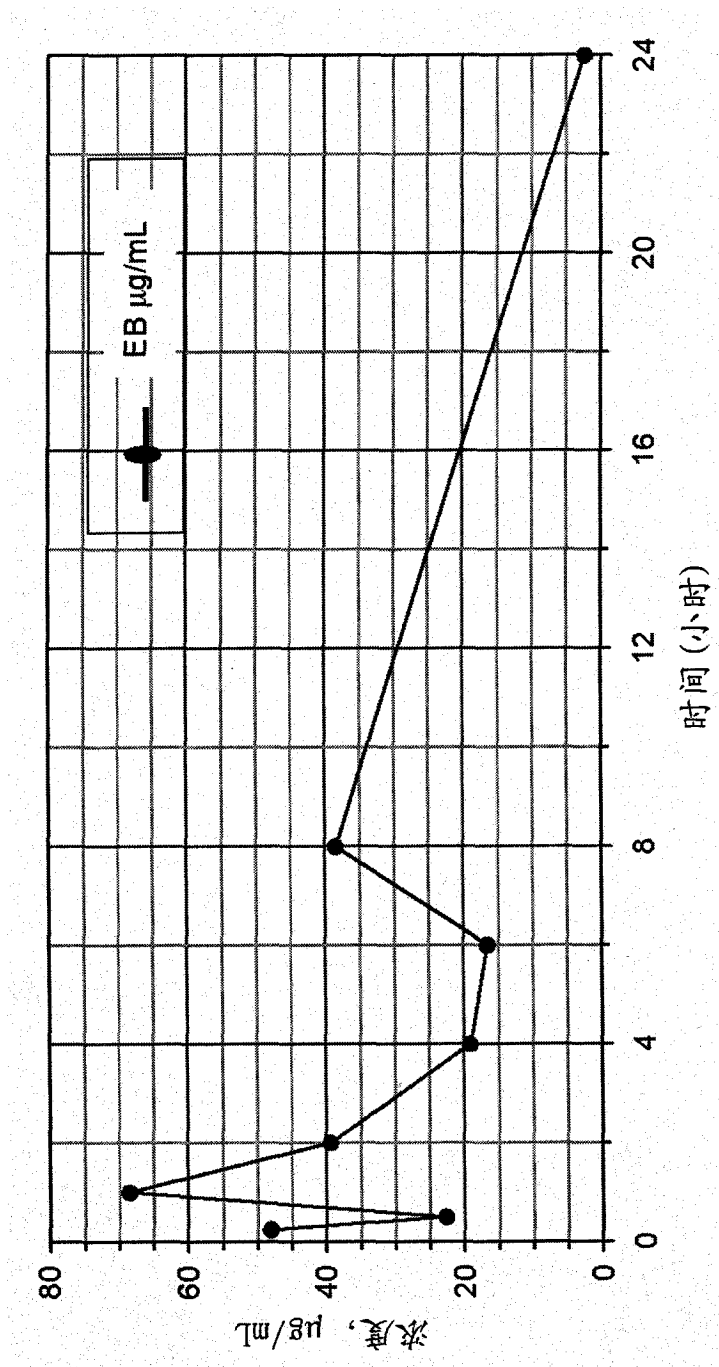


图 5

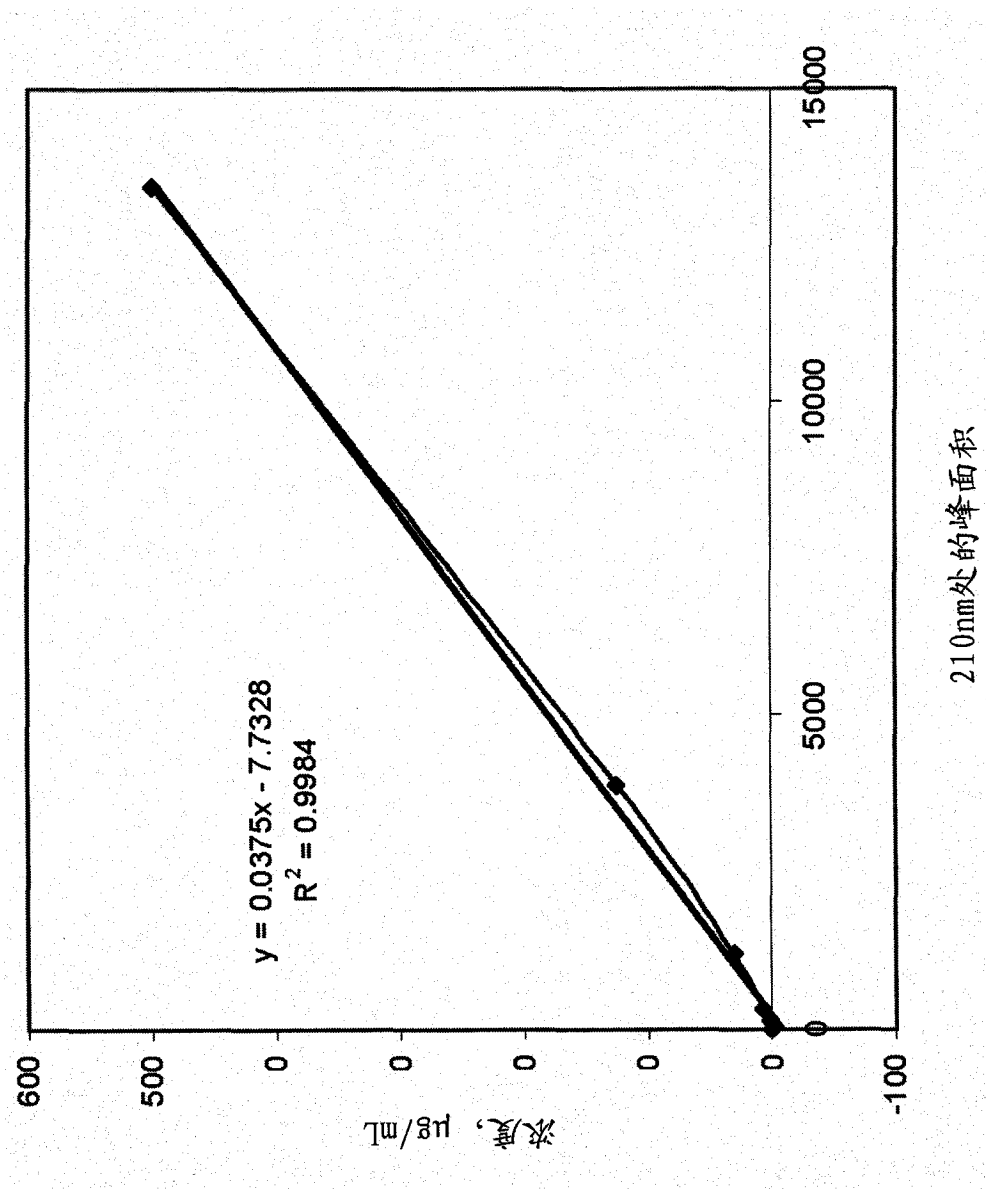


图 6

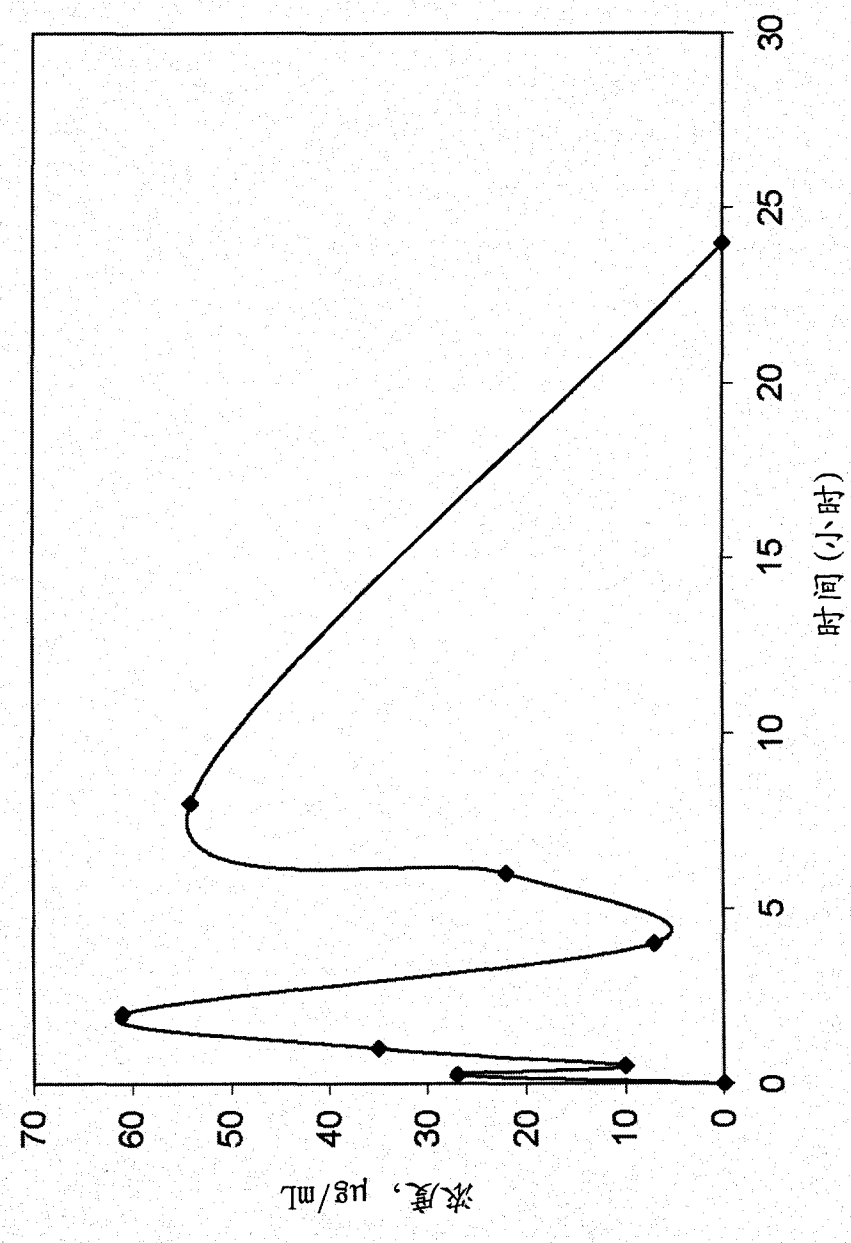


图 7

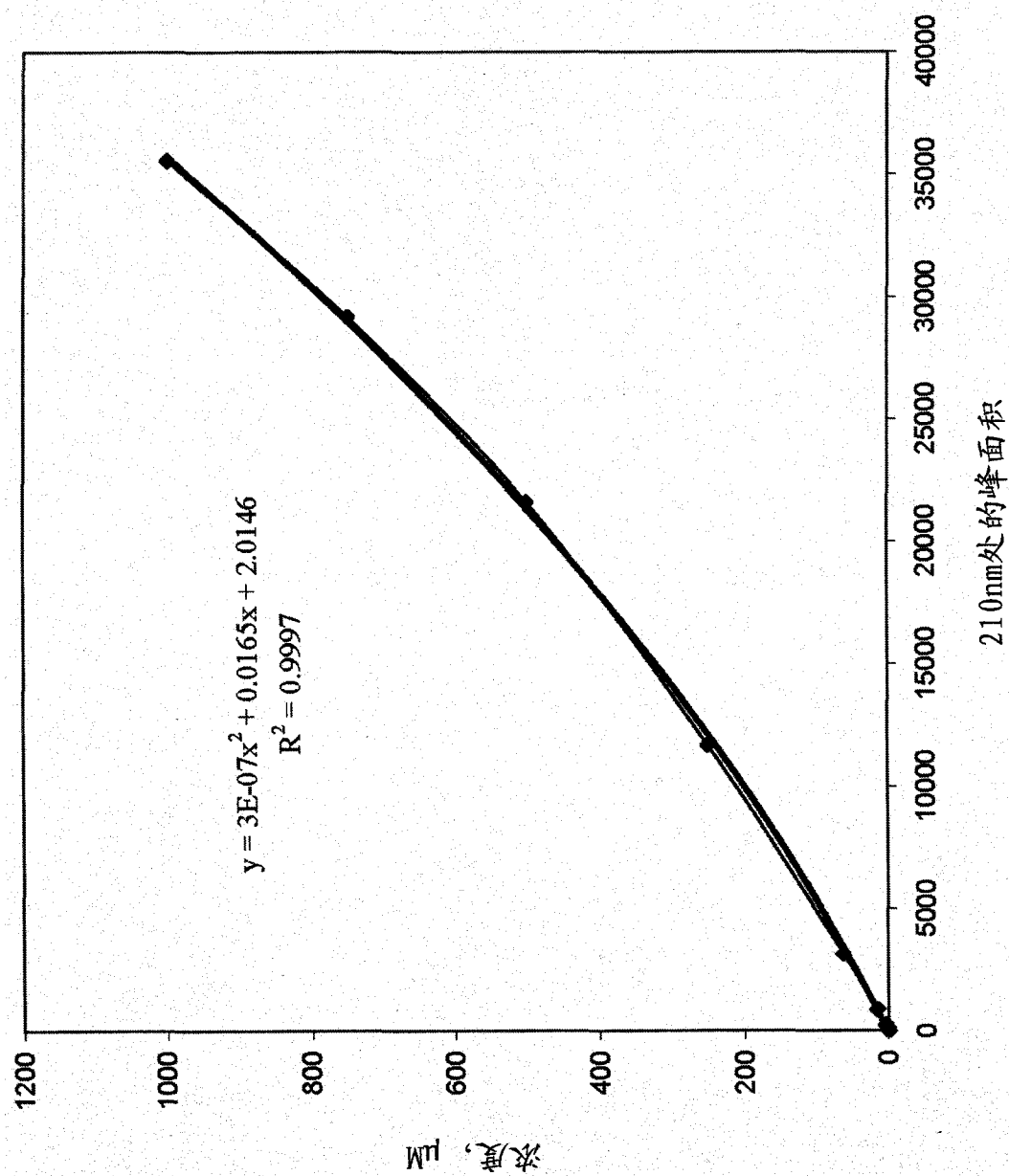


图 8

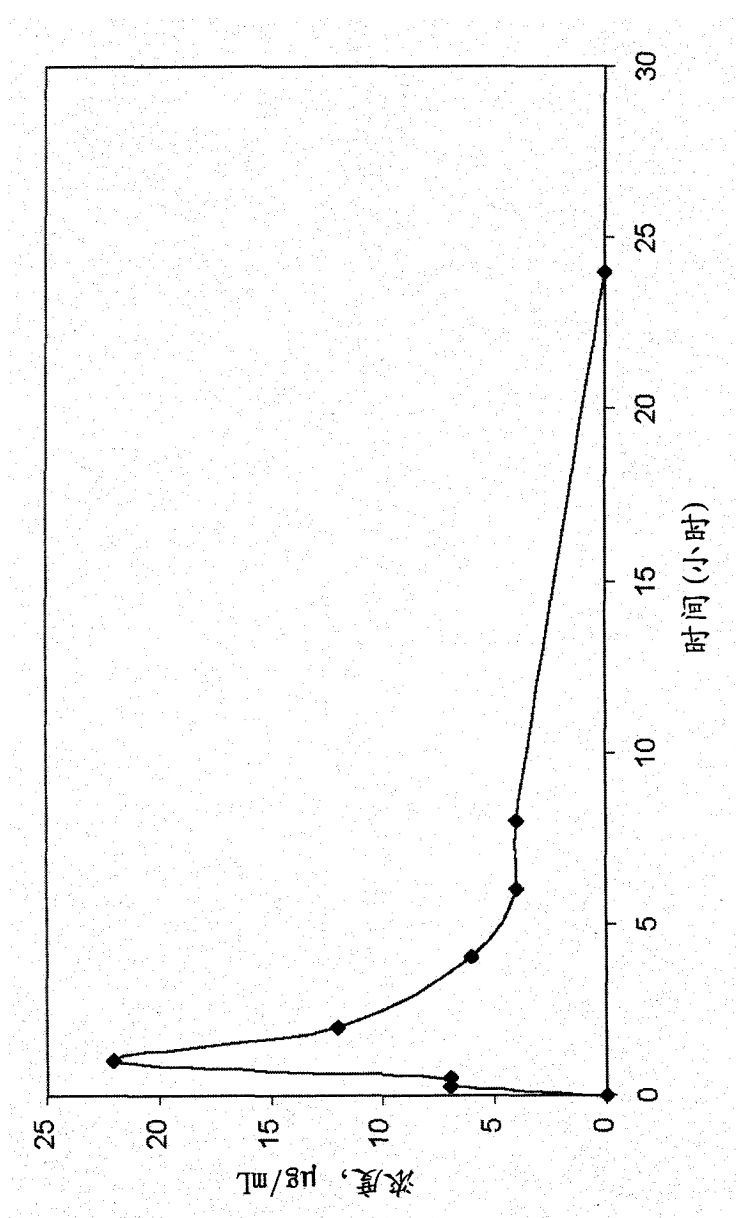


图 9