



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101820881 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 01

(21) 申请号 200880107771. 3

(22) 申请日 2008. 07. 11

(30) 优先权数据

60/949328 2007. 07. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 03. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/069813 2008. 07. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02009/009740 EN 2009. 01. 15

(73) 专利权人 坎莫森特里克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A · 克拉辛斯基 S · 潘纳

S · 昂加舍 Q · 王 Y · 曾

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 林毅斌 李连涛

(51) Int. Cl.

A61K 31/519 (2006. 01)

C07D 473/00 (2006. 01)

C07D 487/04 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2004046092 A2, 2004. 06. 03, 参见全文.

US 2004171654 A1, 2004. 09. 02, 参见全文.

WO 03099773 A1, 2003. 12. 04, 参见全文.

US 2007037794 A, 2007. 02. 15, 参见全文.

审查员 韩征

权利要求书3页 说明书52页 附图1页

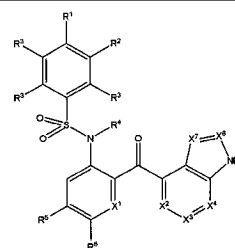
(54) 发明名称

作为 CCR2 调节剂用于治疗炎症的稠合杂芳基吡啶基和苯基苯磺酰胺

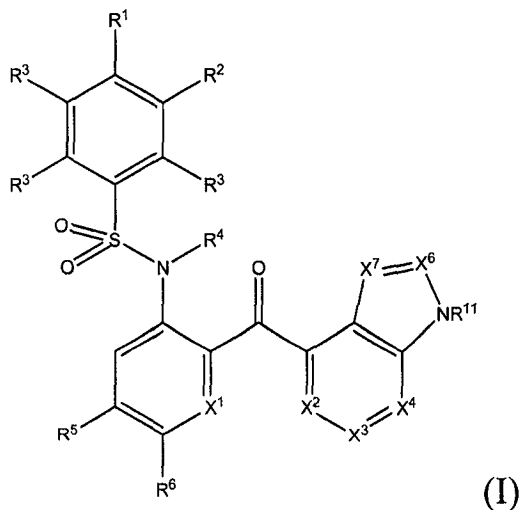
(57) 摘要

本发明提供了作为有效 CCR2 受体拮抗剂的化合物。该化合物通常为芳基磺酰胺衍生物并用于药物组合物、用于治疗 CCR2- 介导疾病的方法和用作在用于确定 CCR2 拮抗剂分析中的对照物。式 (I) 化合物或其盐, 其中: R^1 和 R^2 各自独立为氢、卤素、 C_{1-6} 烷基、 $-CN$ 或 C_{1-8} 卤代烷基, 条件是 R^1 或 R^2 中至少一个不为氢; 各 R^3 独立为氢; R^4 为氢; R^5 为卤素或 C_{1-8} 烷基; R^6 为氢; X^1 为 CR^7 、N 或 NO; X^2 和 X^4 为 N 或 NO; X^3 为 CR^7 ; X^6 和 X^7 各自独立选自 CR^7 、N 和 NO; 各 R^7 独立选自氢、卤素、取代或未取代的 C_{2-8} 烷基、取代或未取代的 C_{2-8} 烯基、取代或未取代的 C_{2-8} 炔基、 $-CN$ 、 $=O$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR^6$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(O)NR^9R^8$ 、 $-OC(O)NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}C(O)R^8$ 、 $-NR^{10}C(O)NR^9R^8$ 、 $-NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}CO_2R^8$ 、 $-SR^8$ 、 $-S(O)R^8$ 、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)_2NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}S(O)_2R^8$ 、取代或未取代的 C_{6-10} 芳基、取代或未取代的 5- 至 10- 元杂芳基和取代或未取代的

3- 至 10- 元杂环基。



1. 式 (I) 化合物或其盐：



其中：

R^1 为卤素或 C_{1-8} 烷基；

R^2 为卤素或 C_{1-8} 卤代烷基；

各 R^3 独立为氢；

R^4 为氢；

R^5 为卤素或 C_{1-8} 烷基；

R^6 为氢；

X^1 为 CH 或 N；

X^2 和 X^4 为 N；

X^3 为 CR^7 ；

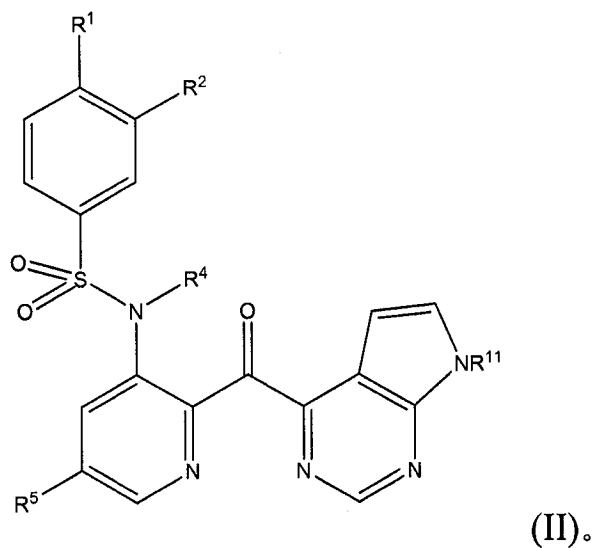
R^7 为氢或 C_{1-8} 烷基；

X^6 为 $-CH-$ ；

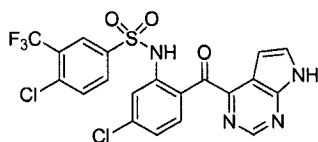
X^7 为 $-CH-$ 或 N；

R^{11} 为氢或 C_{1-8} 烷基。

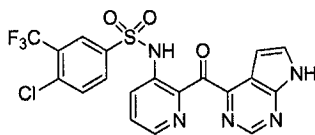
2. 权利要求 1 的化合物或其盐, 其为式 (II) 化合物：



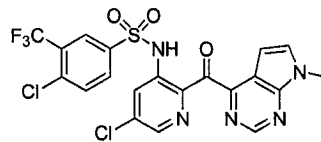
3. 权利要求 1 的化合物或其盐, 其中 X^1 为 N。
4. 权利要求 3 的化合物或其盐, 其中 X^6 和 X^7 为 $-\text{CH}-$ 。
5. 权利要求 4 的化合物或其盐, 其中 R^1 为 Cl。
6. 权利要求 5 的化合物或其盐, 其中 R^2 为 $-\text{CF}_3$ 。
7. 权利要求 6 的化合物或其盐, 其中 R^5 为 Cl 或甲基。
8. 权利要求 7 的化合物或其盐, 其中 R^5 为甲基。
9. 权利要求 4 的化合物或其盐, 其中 R^1 为 Cl, R^2 为 CF_3 , 且 R^5 为 Cl。
10. 选自以下的化合物:



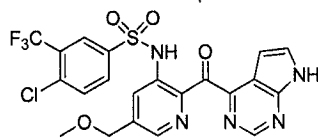
1



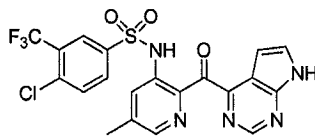
2



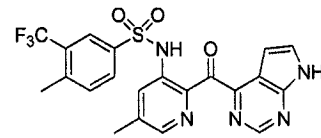
3



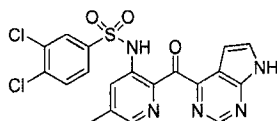
4



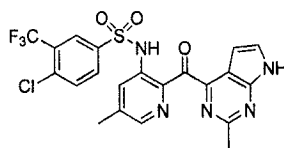
5



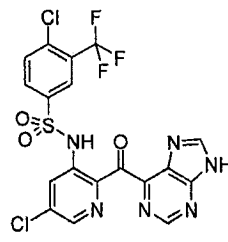
6



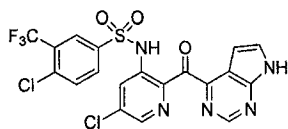
7



8

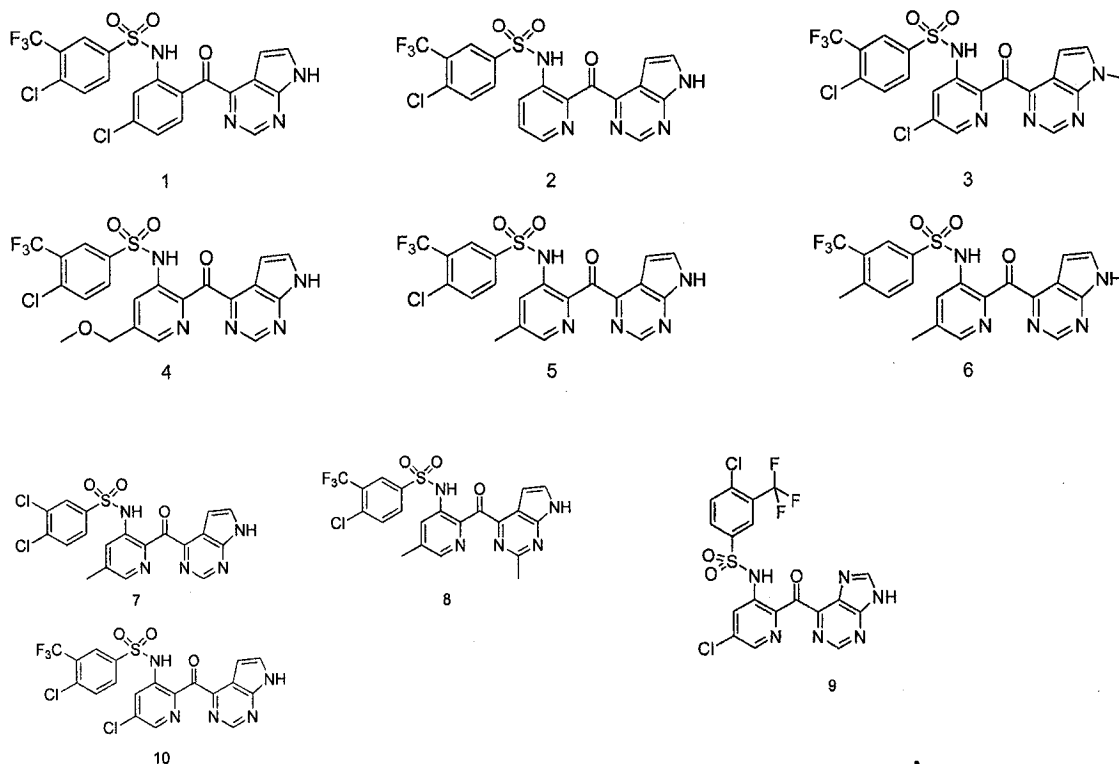


9



10

11. 选自以下的化合物:



或其药学上可接受的盐。

12. 一种组合物,所述组合物包含药学上可接受的载体和权利要求 1-11 中任一项的化合物或其盐。

13. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗 CCR2- 介导的病症或疾病的药物中的用途,其中所述 CCR2- 介导的病症或疾病选自动脉粥样硬化、再狭窄、多发性硬化、炎性肠病、肾纤维变性、类风湿性关节炎、肥胖症、非胰岛素依赖型糖尿病、II 型糖尿病、慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维变性和特发性肺炎综合征。

14. 4-氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺钠盐的晶型,其中使用铜 K_α 射线测得所述晶型的 X-射线粉末衍射包含以下 2θ 值 ±0.2: 6.9、7.7、10.6、11.3、11.8、12.5、13.7、15.1、15.3、16.1、16.9、17.3、18.2、18.5、19.5、20.0、21.6、21.8、22.6、24.3、24.7、25.1、25.6、26.3、27.5、28.5、28.8、29.3、31.4 和 32.4。

作为 CCR2 调节剂用于治疗炎症的稠合杂芳基吡啶基和苯基苯磺酰胺

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据 35 U. S. C. § 119(e) 本专利文件要求 2007 年 7 月 12 日提交的临时美国专利申请第 60/949, 328 号的申请日的权益, 其通过引用结合至此。联邦政府资助的研究或开发

[0003] 文中所述本发明至少部分受 NIH(U19-AI056690-01) 支持。政府在本发明中享有某些权利。

发明背景

[0004] 本发明提供有效抑制各种趋化因子对趋化因子受体结合或功能的化合物、含有一种或多种这类化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物。所述化合物和组合物作为趋化因子受体的拮抗剂或调节剂, 可用于治疗各种免疫病症和疾病。

[0005] 趋化因子, 亦称趋化细胞因子, 是一类由多种类型细胞释放并且具有各种生物活性的小分子量蛋白质。趋化因子吸引免疫系统多种类型的细胞, 例如巨噬细胞、T 细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜中性粒细胞, 使它们从血液迁移到各种淋巴和非淋巴组织。它们介导炎性细胞浸润到炎症部位, 是多种炎症疾病引发和持续的原因 (有关综述参见 Schall, Cytokine, 3:165-183(1991), Schall 等, Curr. Opin. Immunol., 6: 865-873(1994))。

[0006] 除了刺激趋化性外, 趋化因子还可引起响应细胞的其他变化, 包括以下方面的变化: 细胞形状、颗粒体胞吐作用、整联蛋白上调、生物活性脂质 (例如白三烯) 的形成、与白细胞活化有关的呼吸爆发、细胞增殖、抵抗诱导细胞凋亡和血管生成。因此, 趋化因子是炎症反应的早期引发剂, 引起炎性介质释放、趋化和外渗到感染或炎症部位。它们还是具有重要生理功能和病理后果的许多细胞过程的刺激物。

[0007] 趋化因子通过激活由响应细胞表达的趋化因子受体而发挥其作用。趋化因子受体是一类 G 蛋白偶联受体, 亦称七跨膜受体, 存在于白细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和肿瘤细胞等多种细胞类型的表面。

[0008] 趋化因子和趋化因子受体在肾炎期间由肾脏固有细胞和浸润细胞表达 (Seegerer 等, J. Am. Soc. Nephrol., 11:152-76(2000); Morii 等, J. Diabetes Complications, 17: 11-5(2003); Lloyd 等, J. Exp. Med., 185:1371-80(1997); Gonzalez-Cuadrado 等, Clin. Exp. Immunol., 106:518-22(1996); Eddy 和 Giachelli, Kidney Int., 47:1546-57(1995); Diamond 等, Am. J. Physiol., 266:F926-33(1994))。人体 CCR2 和配体 MCP-1 是在肾纤维变性中表达的蛋白质之一, 并且与巨噬细胞浸润到间质组织的程度有关 (Yang 等, Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 81:73-7(2001); Stephan 等, J. Urol., 167:1497-502(2002); Amann 等, Diabetes Care, 26:2421-5(2003); Dai 等, Chin. Med. J. (Engl), 114:864-8(2001))。在肾纤维变性动物模型中, 阻断 CCR2 或 MCP-1 导致肾炎的严重程度显著减轻 (Kitagawa 等, Am. J. Pathol., 165:237-46(2004); Wada 等, Am. J. Pathol., 165:237-46(2004); Shimizu 等, J. Am. Soc. Nephrol., 14:1496-505(2003))。

[0009] 类风湿性关节炎是一种慢性关节疾病,以导致软骨和骨破坏的滑膜炎症为特征。尽管尚不清楚根本病因,但是一般认为巨噬细胞和 Th-1 型 T 细胞在慢性炎症过程的引发和持续中起着关键作用 (Vervordeldonk 等, Curr. Rheumatol. Rep., 4 :208-17 (2002))。

[0010] MCP-1 是在类风湿滑膜中鉴定出来的若干趋化因子之一,包括 MIP-1 α 和 IL-8 (Villiger 等, J. Immunol., 149 :722-7 (1992) ;Scaife 等, Rheumatology (Oxford), 43 :1346-52 (2004) ;Shadidi 等, Scand. J. Immunol., 57 :192-8 (2003) ;Taylor 等, Arthritis Rheum., 43 :38-47 (2000) ;Tucci 等, Biomed. Sci. Instrum., 34 :169-74 (1997))。趋化因子受体 CCR1、CCR2、CCR3 和 CCR5 在关节炎小鼠的关节中上调 (Plater-Zyberk 等, Immunol. Lett., 57 :117-20 (1997))。研究表明,使用 CCR2 拮抗剂或抗 MCP-1 抗体阻断 MCP-1 活性有效地减轻类风湿性关节炎实验模型的关节炎症 (Gong 等, J. Exp. Med., 186 :131-7 (1997) ;Ogata 等, J. Pathol., 182 :106-14 (1997))。

[0011] 脂肪组织中趋化因子受体介导的巨噬细胞浸润还是造成由肥胖症引起的并发症的原因之一,肥胖症是一种由于体内脂肪过量贮存而引起的疾病。肥胖症易使受累个体患上多种疾病,例如非胰岛素依赖型糖尿病、高血压、中风和冠状动脉疾病。在肥胖症中,脂肪组织改变了代谢和内分泌功能,导致脂肪酸、激素和促炎分子的释放增加。据信,脂肪组织巨噬细胞是包括 TNF- α 、iNOS 和 IL-6 在内的促炎细胞因子的关键来源 (Weisberg 等, J. Clin. Invest., 112 :1796-808 (2003))。巨噬细胞募集到脂肪组织很有可能是由脂肪细胞产生的 MCP-1 介导的 (Christiansen T 等, Int. J. Obes. (Lond). 2005 年 1 月 ;29 (1) :146-50 ;Sartipy 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100 :7265-70 (2003))。

[0012] MCP-1 升高可引起脂肪细胞分化和胰岛素抵抗,并且是高胰岛素血症和肥胖症相关病理的原因。与瘦型对照相比,MCP-1 在肥胖小鼠血浆中过量表达,且白脂肪是主要的来源。研究还表明,MCP-1 加快伤口愈合,对上皮细胞具有直接的血管生成作用,在肥胖症脂肪组织重塑中发挥直接作用 (Sartipy P, Loskutoff DJ., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100 :7265 (2003))。

[0013] MCP-1 血浆水平在饮食诱导肥胖 (Diet Induce Obesity, DIO) 小鼠中明显升高,已经证实血浆 MCP-1 水平与体重密切相关。此外,高脂肪饮食诱发的 MCP-1 升高引起 DIO 小鼠中 CD11b 阳性单核细胞群体发生改变 (Takahashi K, 等, J. Biol. Chem., 46654 (2003))。

[0014] 此外,研究认为,脂肪组织中的慢性炎症在肥胖症相关胰岛素抵抗的发展中发挥至关重要的作用 (Xu H 等, J Clin Invest. 2003 年 12 月 ;112 (12) :1821-30)。研究指出,肥胖症相关胰岛素抵抗至少是部分始于脂肪组织中的慢性炎性疾病。多种炎症和巨噬细胞特异性基因在遗传性肥胖症和高脂肪饮食诱导肥胖症 (DIO) 小鼠模型的白脂肪组织中显著上调,这种上调先于循环胰岛素的显著增加。

[0015] 在涉及糖尿病患者的研究中发现,糖尿病患者体内单核细胞 CCR2 和单核细胞化学引诱物蛋白-1 的表达水平升高 (Biochemical and Biophysical Research Communications, 344 (3) :780-5 (2006))。糖尿病患者中,血清 MCP-1 浓度和 CCR2 在单核细胞的表面表达明显比非糖尿病患者的,并且血清 MCP-1 水平与 HbA1c、甘油三酯、BMI、hs-CRP 相关。CD36 和 CD68 在单核细胞的表面表达水平在糖尿病患者中显著升高,而且在糖尿病患者中更加不受 MCP-1 调节,这都增大了 ox-LDL 的摄取,因此也增大了潜在的泡沫细胞 (foam cell) 转化。血清 MCP-1 升高和单核细胞 CCR2、CD36、CD68 表达增加与血糖控

制不良相关,并可能与血管壁单核细胞募集增加有关。

[0016] MCP-1 可能是脂肪组织与骨骼肌之间消极相互影响 (negative cross talk) 的参与者 (Bianco JJ 等, *Endocrinology*, 2458 (2006))。MCP-1 可显著降低胰岛素刺激的葡萄糖摄取,是人骨骼肌细胞中胰岛素抵抗的重要诱导物。脂肪组织是产生调节能量代谢和胰岛素敏感性的生物活性蛋白的重要分泌和内分泌活性器官。

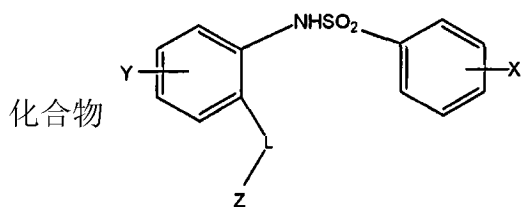
[0017] CCR2 调节炎症和高脂肪摄入的代谢作用 (Weisberg SP 等, *J. Clin. Invest.*, 115 (2006))。在饲喂高脂肪饮食的小鼠中,CCR2 遗传性缺乏小鼠减少了食物摄取,因此减缓了肥胖症的发生。在相应肥胖症的肥胖小鼠中,CCR2 缺乏降低了巨噬细胞含量,减轻了脂肪组织的炎性特征,增加了脂连蛋白表达,改善了葡萄糖稳态和胰岛素敏感性。在瘦型动物中,没有观察到 CCR2 基因型对代谢性状的影响。在高脂肪饮食小鼠中,CCR2 基因型调节食物摄取、肥胖症和脂肪组织炎症的发生。短期拮抗作用一旦确立,则表现出减少巨噬细胞在脂肪组织中的积聚并削弱胰岛素抵抗。

[0018] 趋化因子和趋化因子受体是免疫细胞运输的关键调节因子。MCP-1 是单核细胞和 T 细胞的有效化学引诱物;其表达是在包括促炎细胞因子刺激和缺氧在内的炎症条件下诱导的。MCP-1 和 CCR2 之间的相互作用介导单核细胞、巨噬细胞以及活化 T 细胞的迁移,并在多种炎症疾病的发病机制中起关键作用。使用本发明所述小分子拮抗剂抑制 CCR2 功能是治疗炎症性疾病的一种新方法。

[0019] 银屑病是一种以角质形成细胞过度增殖和显著白细胞浸润为特征的慢性炎症性疾病。已知银屑病病灶的角质形成细胞表达大量的 CCR2 配体 MCP-1,特别是当受到促炎细胞因子 (例如 $\text{TNF-}\alpha$) 刺激时 (Vestergaard 等, *Acta. Derm. Venereol.*, 84 (5) :353-8 (2004); Gillitzer 等, *J. Invest. Dermatol.*, 101 (2) :127-31 (1993); Deleuran 等, *J. Dermatol. Sci.*, 13 (3) :228-36 (1996))。由于 MCP-1 可以吸引表达 CCR2 的巨噬细胞和树突细胞两者迁移至皮肤,所以认为在银屑病发生期间,该受体和配体对在调节增殖角质形成细胞和皮肤巨噬细胞之间的相互作用中十分重要。因此,小分子拮抗剂可用于治疗银屑病。

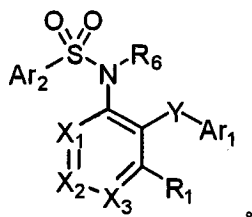
[0020] 除了炎症性疾病以外,趋化因子和趋化因子受体还涉及癌症 (Broek 等, *Br. J. Cancer*, 88 (6) :855-62 (2003))。肿瘤细胞刺激基质的形成,该基质分泌对肿瘤生长十分关键的各种介质,包括生长因子、细胞因子和蛋白酶。现已知道, MCP-1 水平与肿瘤相关的巨噬细胞积聚显著相关,预后分析表明, MCP-1 的高表达是乳腺癌早期复发的明显标志 (Ueno 等, *Clin. Cancer Res.*, 6 (8) :3282-9 (2001))。因此,趋化因子的小分子拮抗剂能够通过阻断巨噬细胞在肿瘤形成部位积聚而减少刺激生长的细胞因子的释放。

[0021] US 6,939,885 (ChemoCentryx, Inc.) 公开了用于调节 CCR9 趋化因子活性的下式

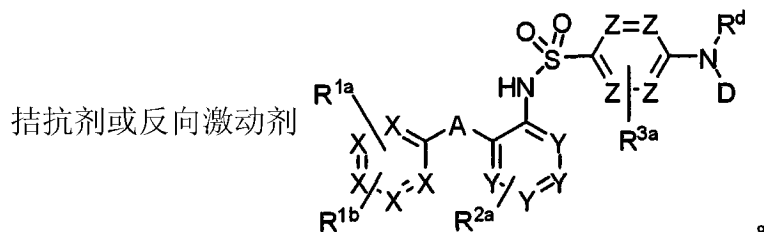


[0022] PCT 公开申请 W0 2003/099773 (Millennium Pharmaceuticals, Inc.) 公开了可结

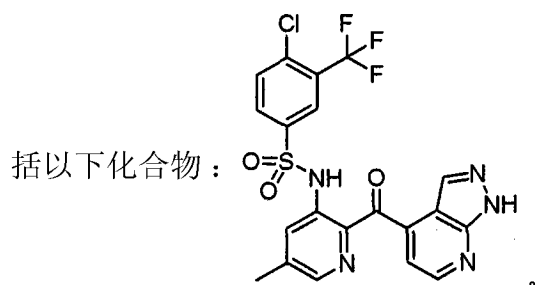
合 CCR9 受体的下式化合物：



[0023] PCT 公开申请 WO 2005/004810 (Merek & Co., Inc.) 公开了下式 bradykinin B1



[0024] US 公开专利申请 2007/0037794 A1 (ChemoCentryx, Inc.) 公开了 CCR2 调节剂, 包



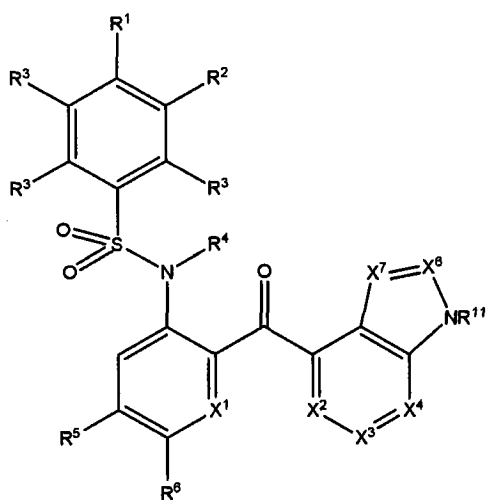
[0025] 遗憾的是, 以上化合物在体内快速消除。这些药物经常需要多次给予来在较长时间得到治疗有效血浆水平。还可使用其他方法包括缓释制剂或装置。

发明概述

[0026] 本发明涉及用于调节趋化因子活性的化合物及其药学上可接受的盐、组合和方法。本文所述化合物及其盐、组合和方法用于治疗或预防趋化因子介导的病症或疾病, 包括某些炎性和免疫调节性病症和疾病。

[0027] 经证实, 本发明的化合物调节一种或多种以下趋化因子受体: CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR3、CXCR4、CXCR5 和 CX3CR1。特别是, 本发明的各种化合物调节 CCR2, 这点可从实施例中看出。

[0028] 在某些实施方案中, 本发明涉及式 (I) 化合物或其盐:



[0029] 其中:R¹和R²各自独立为氢、卤素、C₁₋₈烷基、-CN或C₁₋₈卤代烷基,条件是R¹或R²中至少一个不为氢;

[0030] 各R³独立为氢;

[0031] R⁴为氢;

[0032] R⁵为卤素或C₁₋₈烷基;

[0033] R⁶为氢;

[0034] X¹为CR⁷、N或NO;

[0035] X²和X⁴为N或NO;

[0036] X³为CR⁷;

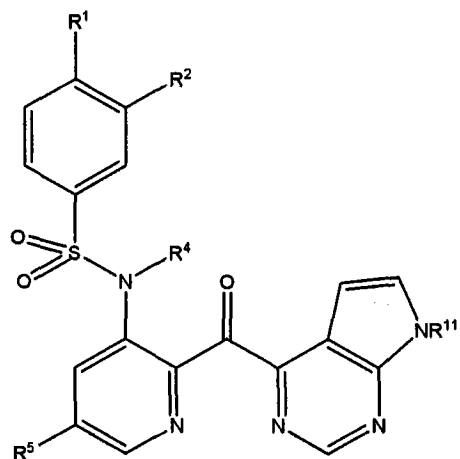
[0037] X⁶和X⁷各自独立选自CR⁷、N和NO;

[0038] 各R⁷独立选自氢、卤素、取代或未取代的C₁₋₈烷基、取代或未取代的C₂₋₈烯基、取代或未取代的C₂₋₈炔基、-CN、=O、-NO₂、-OR⁸、-OC(O)R⁸、-CO₂R⁸、-C(O)R⁸、-C(O)NR⁹R⁸、-OC(O)NR⁹R⁸、-NR¹⁰C(O)R⁸、-NR¹⁰C(O)NR⁹R⁸、-NR⁹R⁸、-NR¹⁰CO₂R⁸、-SR⁸、-S(O)R⁸、-S(O)₂R⁸、-S(O)₂NR⁹R⁸、-NR¹⁰S(O)₂R⁸、取代或未取代的C₆₋₁₀芳基、取代或未取代的5-至10-元杂芳基和取代或未取代的3-至10-元杂环基;

[0039] R⁸、R⁹和R¹⁰每次出现时独立选自氢、C₁₋₈烷基、C₂₋₈烯基、C₂₋₈炔基、芳基或杂芳基;或R⁹和R⁸或R¹⁰和R⁸与它们连接的原子一起形成取代或未取代的5-、6-或7-元环;

[0040] R¹¹选自氢、C₁₋₈烷基、C₂₋₈烯基、C₂₋₈炔基、取代或未取代的C₆₋₁₀芳基、取代或未取代的5-至10-元杂芳基和取代或未取代的3-至10-元杂环。

[0041] 在式I化合物或其盐的特别的实施方案中,所述化合物为式(II)化合物或其盐:



[0042] 在某些实施方案中,对于式 I 化合物,各 R^3 、 R^4 和 R^6 为氢。

[0043] 在某些实施方案中,对于式 I 化合物, X^1 为 N。

[0044] 在某些实施方案中,对于式 I 化合物, X^2 和 X^4 为 N, X^6 和 X^7 为 CR^7 。

[0045] 在某些实施方案中,对于式 I 化合物, R^1 为 Cl。

[0046] 在某些实施方案中,对于式 I 化合物, R^2 为 $-CF_3$ 。

[0047] 在某些实施方案中,对于式 I 化合物, R^4 为 H。

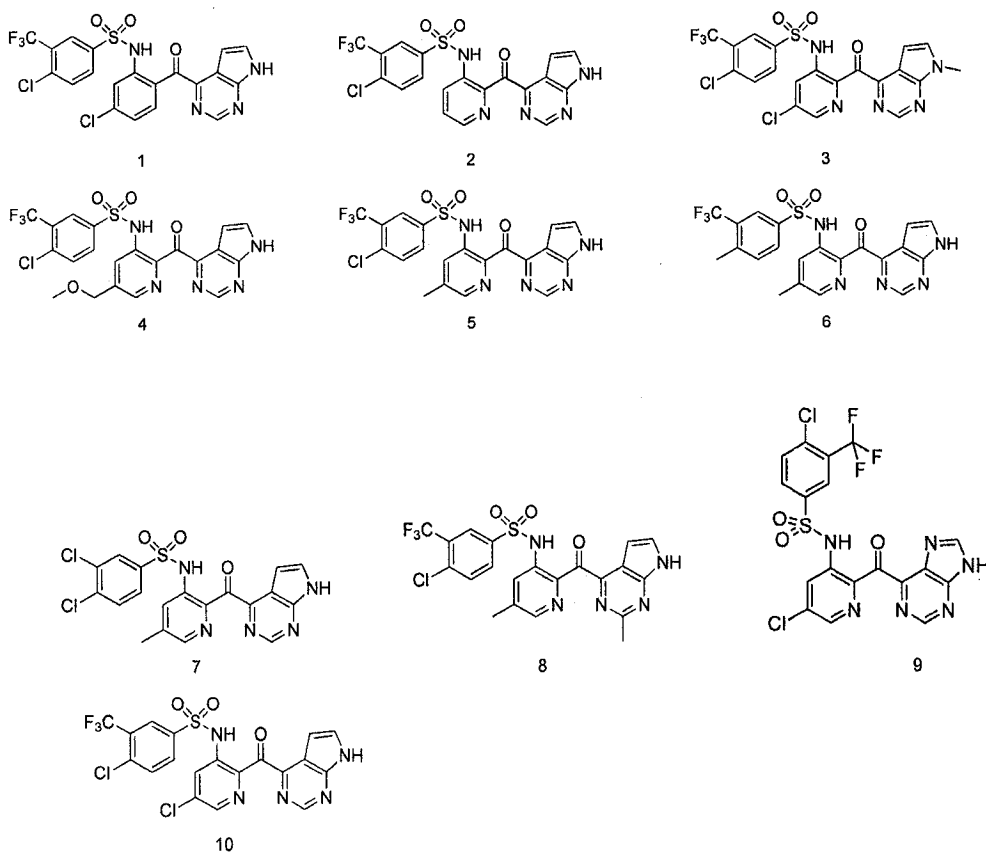
[0048] 在某些实施方案中,对于式 I 化合物, R^5 为 Cl 或甲基。

[0049] 在某些实施方案中,对于式 I 化合物, R^5 为甲基。

[0050] 在某些实施方案中,对于式 I 化合物, R^1 为 Cl, R^2 为 CF_3 , 各 R^3 为 H, R^5 为 Cl, 且 R^6 为 H。

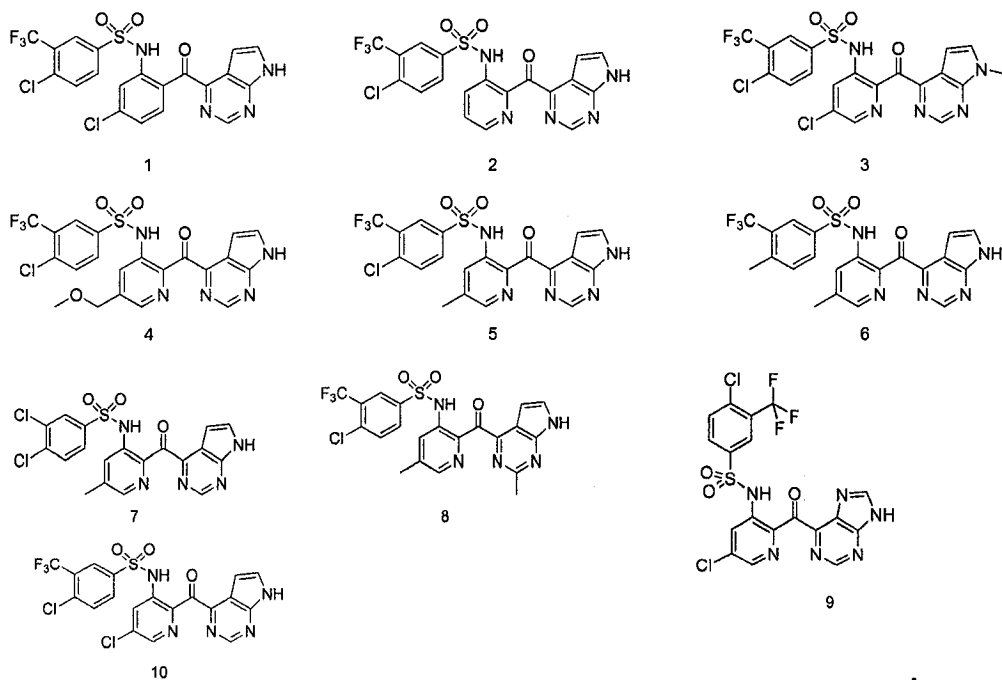
[0051] 在一个特别的方面,本发明涉及选自以下的化合物:

[0052]



[0053] 在另一个特别的方面,本发明涉及选自以下的化合物:

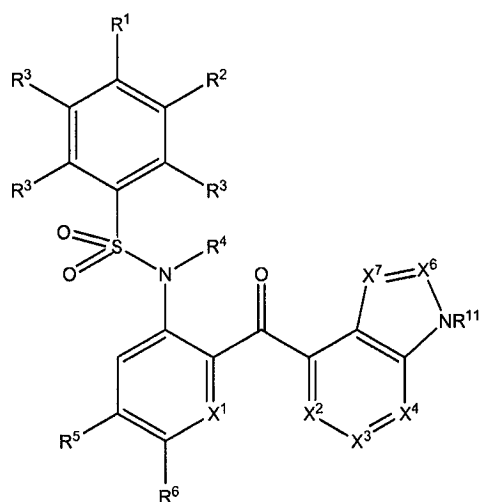
[0054]



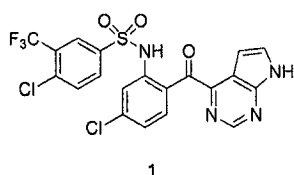
[0055] 或其药学上可接受的盐。

[0056] 在一个实施方案中,本发明化合物可由式 (I) 或 (III) 或其盐表示:

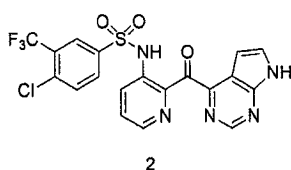
[0057]



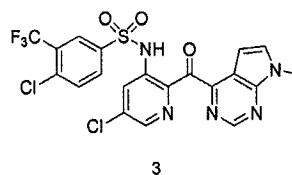
[0058]



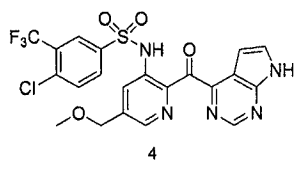
1



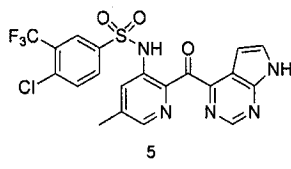
2



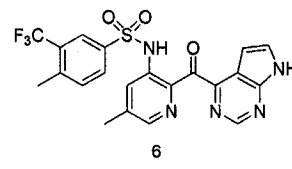
3



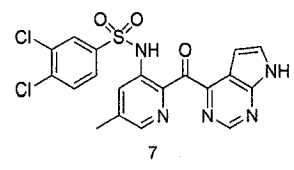
4



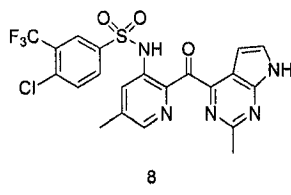
5



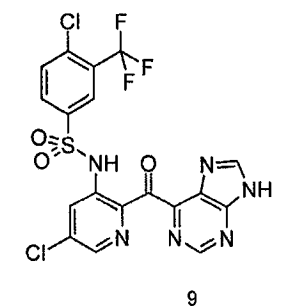
6



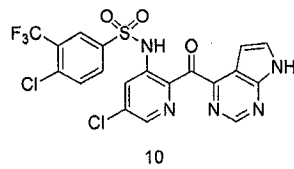
7



8



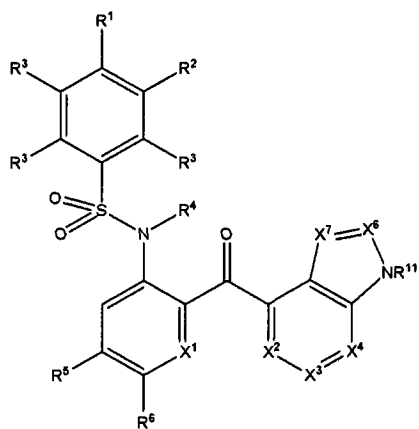
9



10

[0059] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^{11} 、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^6 和 X^7 如下定义。

[0060] 在某些实施方案中, 本发明涉及式 (III) 化合物或其盐:



[0061] 其中:

[0062] R^1 和 R^2 各自独立为氢、卤素、 C_{1-8} 烷基、 $-CN$ 或 C_{1-8} 卤代烷基,条件是 R^1 或 R^2 中至少一个不为氢;

[0063] 各 R^3 独立为氢、卤素或 C_{1-4} 烷基;

[0064] R^4 为氢或 C_{1-8} 烷基;

[0065] R^5 为卤素或 C_{1-8} 烷基;

[0066] R^6 为氢或 C_{1-4} 烷基;

[0067] X^1 为 CR^7 、 N 或 NO ;

[0068] X^3 为 N 或 NO ;

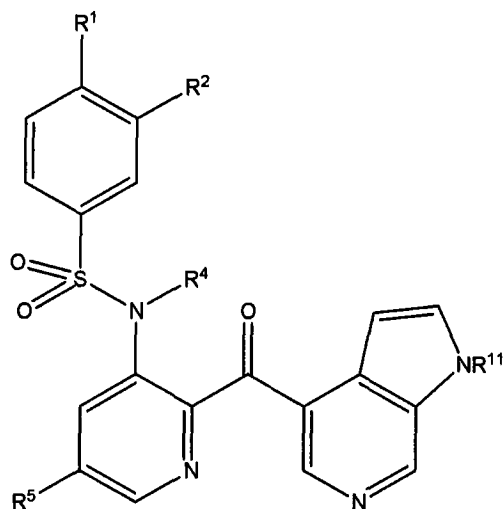
[0069] X^2 、 X^4 、 X^6 和 X^7 各自独立为 CR^7 ,其中各 R^7 独立选自氢、卤素、取代或未取代的 C_{1-8} 烷基、取代或未取代的 C_{2-8} 烯基、取代或未取代的 C_{2-8} 炔基、 $-CN$ 、 $=O$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR^8$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(O)NR^9R^8$ 、 $-OC(O)NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}C(O)R^8$ 、 $-NR^{10}C(O)NR^9R^8$ 、 $-NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}CO_2R^8$ 、 $-SR^8$ 、 $-S(O)R^8$ 、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)_2NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}S(O)_2R^8$ 、取代或未取代的 C_{6-10} 芳基、取代或未取代的 5- 至 10- 元杂芳基和取代或未取代的 3- 至 10- 元杂环基;

[0070] R^8 、 R^9 和 R^{10} 每次出现时独立选自氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基、芳基或杂芳基;或 R^9 和 R^8 或 R^{10} 和 R^8 与它们连接的原子一起形成取代或未取代的 5-、6- 或 7- 元环;

[0071] X^5 为 O 、 S 或 NR^{11} ,

[0072] 其中 R^{11} 选自氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基、取代或未取代的 C_{6-10} 芳基、取代或未取代的 5- 至 10- 元杂芳基和取代或未取代的 3- 至 10- 元杂环。

[0073] 在一个特别的实施方案中,式 III 化合物具有式 (IV):



[0074] 在另一方面中,本发明提供了用于调节趋化因子活性的组合物。在一个实施方案中,本发明的组合物包含本发明的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0075] 在又一方面中,本发明提供了调节细胞中趋化因子功能的方法,所述方法包括将治疗有效量的本发明化合物或组合物与细胞接触。

[0076] 在再一方面中,本发明提供了调节趋化因子功能的方法,所述方法包括将治疗有效量的本发明化合物或组合物与趋化因子受体接触。

[0077] 在再另一方面中,本发明提供了治疗趋化因子介导病症或疾病的方法,所述方法包括给予受试者安全和有效量的本发明化合物或组合物。

[0078] 在一个具体方面,本发明涉及治疗 CCR2- 介导病症或疾病的方法,所述方法包括

给予受试者治疗有效量的式 I 化合物的化合物或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,CCR2-介导的病症或疾病为动脉粥样硬化。在某些实施方案中,CCR2-介导的病症或疾病为再狭窄。在某些实施方案中,CCR2-介导的病症或疾病为多发性硬化。在某些实施方案中,CCR2-介导的病症或疾病选自炎症肠病、肾纤维变性、类风湿性关节炎、肥胖症和非胰岛素依赖型糖尿病。在某些实施方案中,CCR2-介导的病症或疾病为 II 型糖尿病。在某些实施方案中,CCR2-介导的病症或疾病选自慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维变性和特发性肺炎综合征。

[0079] 除文中提供的化合物外,本发明进一步提供包含一种或多种这些化合物的药物组合物,以及这些化合物在治疗方法中使用的方法,主要是治疗与趋化因子信号传导活性有关的疾病。

[0080] 在另一方面中,本发明提供了 4-氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺·钠盐的晶型。在某些实施方案中,晶型使用铜 K α 射线测得 4-氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺钠盐的晶型的 X-射线粉末衍射包含以下 2θ 值 ± 0.2 : 6.9、7.7、20.0、24.3、24.7 和 25.1。在其他实施方案中,使用铜 K α 射线测得权利要求 23 化合物的晶型的 X-射线粉末衍射包含以下 2θ 值 ± 0.2 : 6.9、7.7、10.6、11.3、11.8、12.5、13.7、15.1、15.3、16.1、16.9、17.3、18.2、18.5、19.5、20.0、21.6、21.8、22.6、24.3、24.7、25.1、25.6、26.3、27.5、28.5、28.8、29.3、31.4 和 32.4。

附图简述

[0081] 图 1 描述了如实施例 14 中所述的 4-氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺钠盐的 XPRD(X-射线粉末衍射法)谱。

发明详述

[0082] 概要

[0083] 本发明涉及用于调节趋化因子受体功能、特别是 CCR2 功能的化合物及其盐、组合物和方法。本文所用的以其各种方式对趋化因子受体活性的调节,包括与特定趋化因子受体(优选 CCR2 受体)相关活性的拮抗作用、激动作用、部分拮抗作用、反向激动作用和/或部分激动作用。因此,本发明的化合物是调节哺乳动物 CCR2(例如人 CCR2)蛋白的至少一种功能或性质的化合物。可在以下试验中证实化合物调节 CCR2 功能的能力:结合试验(例如配体结合或激动剂结合)、迁移试验(migration assay)、信号转导试验(例如哺乳动物 G 蛋白的激活、胞质游离钙浓度快速瞬时升高的诱导)和/或细胞反应试验(例如刺激趋化性、胞吐作用或白细胞释放的炎性介质)。

[0084] 缩写和定义

[0085] 在描述本发明的化合物、组合物、方法和步骤时,下列术语具有以下含义,除非另有说明。

[0086] “烷基”本身或作为另一取代基的组成部分是指可以是直链、环状或支链或其组合的烃基,具有指定的碳原子数(即 C₁₋₈ 是指 1 至 8 个碳原子)。烷基的实例包括甲基、乙基、

正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、环戊基、(环己基)甲基、环丙基甲基、二环[2.2.1]庚烷、二环[2.2.2]辛烷等。烷基可以是取代或未取代的,除非另有说明。取代烷基的实例包括卤代烷基、硫代烷基(thioalkyl)、氨基烷基等。

[0087] “烷氧基”是指-O-烷基。烷氧基的实例包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基等。

[0088] “烯基”是指可以是直链、环状或支链或其组合的不饱和烃基。优选烯基具有2-8个碳原子。烯基可含有1、2或3个碳-碳双键。烯基的实例包括乙烯基、正丙烯基、异丙烯基、正丁-2-烯基、正己-3-烯基、环己烯基、环戊烯基等。烯基可以是取代或未取代的,除非另有说明。

[0089] “炔基”是指可以是直链、环状或支链或其组合的不饱和烃基。优选炔基具有2-8个碳原子。炔基可含有1、2或3个碳-碳三键。炔基的实例包括乙炔基、正丙炔基、正丁-2-炔基、正己-3-炔基等。炔基可以是取代或未取代的,除非另有说明。

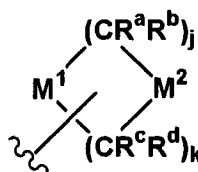
[0090] “芳基”是指可以稠合在一起或共价连接的多不饱和芳烃基,具有单个环(单环)或多个环(双环)。优选芳基具有6-10个碳原子,其中该碳原子数可由例如C₆₋₁₀指定。芳基的实例包括苯基和萘-1-基、萘-2-基、联苯基等。芳基可以是取代或未取代的,除非另有说明。

[0091] “卤代”或“卤素”本身或作为取代基的组成部分是指氯、溴、碘或氟原子。

[0092] “卤代烷基”作为取代烷基是指单卤代烷基或多卤代烷基,最典型是被1-3个卤原子取代。实例包括1-氯乙基、3-溴丙基、三氟甲基等。

[0093] “杂环基”是指含有至少一个选自氮、氧或硫杂原子(通常1-5个杂原子)的饱和或不饱和的非芳族环。杂环基环可以是单环或双环。优选这些基团含有0-5个氮原子、0-2个硫原子和0-2个氧原子。更优选这些基团含有0-3个氮原子、0-1个硫原子和0-1个氧原子。杂环基的实例包括吡咯烷、哌啶、咪唑烷、吡唑烷、丁内酰胺、戊内酰胺、咪唑烷酮、乙内酰脲、二氧杂环戊烷、邻苯二甲酰亚胺、哌啶、1,4-二噁烷、吗啉、硫代吗啉、硫代吗啉-S-氧化物、硫代吗啉-S, S-二氧化物、哌嗪、吡喃、吡啶酮、3-吡咯啉、噻喃、吡喃酮、四氢呋喃、四氢噻吩、奎宁环等。优选的杂环基为单环,尽管它们可与芳基环系或杂芳环系稠合或共价连接。

[0094] 在一个优选的实施方案中,杂环基可用下式(AA)表示:



AA

[0095] 其中式(AA)通过M¹或M²上的自由价键连接;M¹表示O、NR^e或S(O)₁;M²表示CR^fR^g、O、S(O)₁或NR^e;l为0、1或2;j为1、2或3,k为1、2或3,前提条件是j+k为3、4或5;R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f和R^g独立选自氢、卤素、未取代或取代的C₁₋₈烷基、未取代或取代的C₂₋₈烯基、未取代或取代的C₂₋₈炔基、-COR^h、-CO₂R^h、-CONR^hRⁱ、-NR^hCORⁱ、-SO₂R^h、-SO₂NR^hRⁱ、-NSO₂R^hRⁱ、-NR^hRⁱ、-OR^h、-Q¹COR^h、-Q¹CO₂R^h、-Q¹CONR^hRⁱ、-Q¹NR^hCORⁱ、-Q¹SO₂R^h、-Q¹SO₂NR^hRⁱ、-Q¹NSO₂R^hRⁱ、-Q¹NR^hRⁱ、-Q¹OR^h,其中Q¹选自C₁₋₄亚烷基、C₂₋₄亚烯基和C₂₋₄亚炔基,R^h和Rⁱ独立选自氢和C₁₋₈烷基,且其中R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f、R^g、R^h和Rⁱ取代基每一个的脂肪族部分任选被1-3个选自以下的基团取代:卤素、-OH、-ORⁿ、-OC(O)NHRⁿ、-OC(O)NRⁿR^o、-SH、-SRⁿ、-S(O)Rⁿ、-S(

$O)_2R^n$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-S(O)_2NHR^n$ 、 $-S(O)_2NR^nR^o$ 、 $-NHS(O)_2R^n$ 、 $-NR^nS(O)_2R^o$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR^n$ 、 $-C(O)NR^nR^o$ 、 $-C(O)R^n$ 、 $-NHC(O)R^o$ 、 $-NR^nC(O)R^o$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NR^nC(O)NH_2$ 、 $-NR^nC(O)NHR^o$ 、 $-NHC(O)NHR^n$ 、 $-NR^nC(O)NR^oR^p$ 、 $-NHC(O)NR^nR^o$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R^n$ 、 $-NHCO_2R^n$ 、 $-NR^nCO_2R^o$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^n$ 、 $-NR^nR^o$ 、 $-NR^nS(O)NH_2$ 和 $-NR^nS(O)_2NHR^o$ ，其中 R^n 、 R^o 和 R^p 独立地为未取代的 C_{1-8} 烷基。另外， R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 和 R^g 中的任两个可结合在一起形成桥环体系或螺环体系。

[0096] 在一个优选的实施方案中， $R^a+R^b+R^c+R^d$ 基团中除氢以外的数目为 0、1 或 2 个。在一个更优选的实施方案中， R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 和 R^g 独立选自氢、卤素、未取代或取代的 C_{1-8} 烷基、 $-COR^h$ 、 $-CO_2R^h$ 、 $-CONR^hR^h$ 、 $-NR^hCOR^h$ 、 $-SO_2R^h$ 、 $-SO_2NR^hR^i$ 、 $-NSO_2R^hR^i$ 、 $-NR^hR^i$ 和 $-OR^h$ ，其中 R^h 和 R^i 独立选自氢和未取代的 C_{1-8} 烷基，且其中 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 和 R^g 取代基每一个的脂肪族部分任选被 1-3 个选自以下的基团取代：卤素、 $-OH$ 、 $-OR^n$ 、 $-OC(O)NHR^n$ 、 $-OC(O)NR^nR^o$ 、 $-SH$ 、 $-SR^n$ 、 $-S(O)R^o$ 、 $-S(O)_2R^n$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-S(O)_2NHR^n$ 、 $-S(O)_2NR^nR^o$ 、 $-NHS(O)_2R^n$ 、 $-NR^nS(O)_2R^o$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR^n$ 、 $-C(O)NR^nR^o$ 、 $-C(O)R^n$ 、 $-NHC(O)R^n$ 、 $-NR^nC(O)R^o$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NR^nC(O)NH_2$ 、 $-NR^nC(O)NHR^o$ 、 $-NHC(O)NHR^n$ 、 $-NR^nC(O)NR^oR^p$ 、 $-NHC(O)NR^nR^o$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R^n$ 、 $-NHCO_2R^n$ 、 $-NR^nCO_2R^o$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^n$ 、 $-NR^nR^o$ 、 $-NR^nS(O)NH_2$ 和 $-NR^nS(O)_2NHR^o$ ，其中 R^n 、 R^o 和 R^p 独立地为未取代的 C_{1-8} 烷基。

[0097] 在一个更优选的实施方案中， R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 和 R^g 独立地为氢或 C_{1-4} 烷基。在另一个优选的实施方案中， R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 和 R^g 中的至少 3 个为氢。

[0098] “杂芳基”是指含有至少一个杂原子的芳基，其中杂芳基可为单环或双环。实例包括吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基、三嗪基、喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、酞嗪基、苯并三嗪基、嘌呤基、苯并咪唑基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并异噻唑基、异苯并呋喃基、异吲哚基、吲哚基、苯并三嗪基、噻吩并吡啶基、噻吩并嘧啶基、吡唑并嘧啶基、咪唑并吡啶基、苯并噻唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、氮杂吲哚基、氮杂吲唑基、喹啉基、异喹啉基、异噻唑基、吡唑基、吲唑基、蝶啶基、咪唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、吡咯基、噻唑基、呋喃基或噻吩基。优选的杂芳基为具有至少一个芳环氮原子的杂芳基，例如喹啉基、喹喔啉基、嘌呤基、苯并咪唑基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并噻唑基、吲哚基、喹啉基、异喹啉基等。优选的 6 元环杂芳基体系包括吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基、三嗪基等。优选的 5 元环杂芳基体系包括异噻唑基、吡唑基、咪唑基、噻吩基、呋喃基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、吡咯基、噻唑基等。

[0099] 杂环基和杂芳基可连接在任何可利用的环碳或杂原子上。杂环基和杂芳基各自可具有一个或多个环。当存在多个环时，它们可以稠合在一起或者共价连接。杂环基和杂芳基各自必须含有至少一个选自氮、氧或硫的杂原子（通常 1-5 个杂原子）。优选这些基团含有 0-5 个氮原子、0-2 个硫原子和 0-2 个氧原子。更优选这些基团含有 0-3 个氮原子、0-1 个硫原子和 0-1 个氧原子。杂环基和杂芳基可以是取代或未取代的，除非另有说明。对于取代的基团，取代可在碳或杂原子上。例如，当取代基为氧代（ $=O$ 或 $-O^-$ ）时，所得基团可具有羰基（ $-C(O)-$ ）或 N-氧化物（ $-N^+-O^-$ ）。

[0100] 取代烷基、取代烯基和取代炔基合适的取代基包括卤素、 $-CN$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'R''$ 、氧代（ oxo ）（ $=O$ 或 $-O^-$ ）、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR' C(O)R''$ 、 $-NR' C(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NR' CO_2R''$ 、 $-NR' S(O)R''$ 、 $-NR' S(O)_2R''$ 、 $-NR' S(O)NP'R''$ 、 $-NR' S(O)_2NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NR' -C(NHR'') =$

NR'、-SiR'R'R'、-N₃、取代或未取代的 C₆₋₁₀ 芳基、取代或未取代的 5-10 元杂芳基和取代或未取代的 3-10 元杂环基。可能的取代基数目的范围为零至 (2m' + 1), 其中 m' 为这类基团中碳原子的总数。

[0101] 取代芳基、取代杂芳基和取代杂环基合适的取代基包括卤素、-CN、-CO₂R'、-C(O)R'、-C(O)NR'R'、氧代 (= O 或 -O⁻)、-OR'、-OC(O)R'、-OC(O)NR'R'、-NO₂、-NR'C(O)R'、-NR'C(O)NR'R'、-NR'R'、-NR'CO₂R'、-NR'S(O)R'、-NR'S(O)₂R'、-NR'S(O)NR'R'、-NR'S(O)₂NR'R'、-SR'、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R'、-NR'-C(NHR') = NR'、-SiR'R'R'、-N₃、取代或未取代的 C₁₋₈ 烷基、取代或未取代的 C₂₋₈ 烯基、取代或未取代的 C₂₋₈ 炔基、取代或未取代的 C₆₋₁₀ 芳基、取代或未取代的 5-10 元杂芳基和取代或未取代的 3-10 元杂环基。可能的取代基数目的范围为零至芳族环系可用化合价 (open valence) 的总数。

[0102] 如上使用的 R'、R'' 和 R''' 各自独立地表示各种基团, 包括氢、取代或未取代的 C₁₋₈ 烷基、取代或未取代的 C₂₋₈ 烯基、取代或未取代的 C₂₋₈ 炔基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的芳基烷基、取代或未取代的芳氧基烷基。如果 R' 和 R'' 连接在同一氮原子上, 则它们可与该氮原子结合形成 3 元、4 元、5 元、6 元或 7 元环 (例如 -NR'R'' 包括 1- 吡咯烷基和 4- 吗啉基)。此外, R' 和 R'', R'' 和 R''' 或者 R' 和 R''' 可与它们所连接的原子一起形成取代或未取代的 5 元、6 元或 7 元环。

[0103] 芳环或杂芳环相邻原子上的两个取代基可任选被式 -T-C(O)-(CH₂)_q-U- 的取代基置换, 其中 T 和 U 独立地为 -NR'''、-O-、-CH₂- 或单键, q 为 0-2 的整数。或者, 芳环或杂芳环相邻原子上的两个取代基可任选被式 -A'-(CH₂)_r-B'- 的取代基置换, 其中 A' 和 B' 独立地为 -CH₂-、-O-、-NR'''、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂NR''' 或单键, r 为 1-3 的整数。这样形成的新环的单键之一可任选被双键置换。或者, 芳环或杂芳环相邻原子上的两个取代基可任选被式 -(CH₂)_s-X-(CH₂)_t- 的取代基置换, 其中 s 和 t 独立地为 0-3 的整数, X 为 -O-、-NR'''、-S-、-S(O)-、-S(O)₂- 或 -S(O)₂NR'。R''' 选自氢或未取代的 C₁₋₈ 烷基。

[0104] “杂原子”包括氧 (O)、氮 (N)、硫 (S) 和硅 (Si)。

[0105] “药学上可接受的”载体、稀释剂或赋形剂是与制剂其他成分相容且对其接受者无害的载体、稀释剂或赋形剂。

[0106] “药学上可接受的盐”是指可用于患者 (如哺乳动物) 给药的盐 (例如对给定剂量方案而言, 是对哺乳动物安全的可接受的盐)。这类盐可衍生自药学上可接受的无机碱或有机碱和药学上可接受的无机酸或有机酸, 这取决于本文所述化合物中所存在的具体取代基。当本发明化合物含有相对酸性的官能团时, 可在净溶剂或在合适惰性溶剂中, 使这类化合物的中性形式与足量的所需碱接触以得到碱加成盐。衍生自药学上可接受的无机碱的盐包括铝盐、铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、亚铁盐、锂盐、镁盐、锰盐、亚锰盐、钾盐、钠盐、锌盐等。衍生自药学上可接受的有机碱的盐包括伯胺盐、仲胺盐、叔胺盐和季铵盐, 这些包括取代的胺、环胺、天然存在的胺等, 例如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N, N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、葡萄糖胺、氨基葡萄糖、组氨酸、海巴胺 (hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、葡甲胺、吗啉、哌嗪、哌啶、聚胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。当本发明化合物含有相对碱性的官能团时, 在净溶剂或在合适惰性溶剂中, 使这类化合物的中性形式与足

量的所需酸接触以得到酸加成盐。衍生自药学上可接受的酸的盐包括乙酸盐、抗坏血酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、谷氨酸盐、马尿酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、羟乙磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、双羟萘酸盐、泛酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、对甲苯磺酸盐,等等。

[0107] 还包括的有氨基酸的盐(例如精氨酸盐等)和有机酸(例如葡糖醛酸或半乳糖醛酸等)的盐(参见例如 Berge, S.M. 等,“Pharmaceutical Salts”, J. Pharmaceutical Science, 1977, 66 :1-19)。本发明某些特定化合物含有使化合物转变成碱加成盐或酸加成盐的碱性官能团和酸性官能团的任一种。

[0108] 可通过使盐与碱或酸接触,并按常规方式分离母体化合物,从而再生出中性形式的化合物。母体形式的化合物在某些物理性质上不同于各种盐形式,例如在极性溶剂中的溶解性,但是在其他方面,对于本发明的目的,这些盐等同于母体化合物。

[0109] “其盐”指当酸的氢被阳离子(例如金属阳离子或有机阳离子等)置换时所形成的化合物。优选该盐是药学上可接受的盐,尽管这对于不打算给予患者的中间体化合物的盐不是必需的。

[0110] 除了盐形式以外,本发明还提供前药形式的化合物。本文所述化合物的前药是在生理条件下容易发生化学变化以提供本发明化合物的那些化合物。另外,可通过化学或生物化学的方法将前药在离体环境下转成本发明的化合物。例如,当前药与合适的酶或化学试剂一起置于透皮贴剂贮库中时,可以慢慢转化成本发明的化合物。

[0111] 可按这样方式对化合物中存在的官能团进行修饰来制备前药,即该修饰化合物或按常规处理或体内裂解成为母体化合物。前药包括其中羟基、氨基、巯基或羧基与任何基团键合的化合物,当给予哺乳动物受治疗者时,分别裂解形成游离的羟基、氨基、巯基或羧基。前药的实例包括但不限于本发明化合物中醇和胺官能团的乙酸盐、甲酸盐和苯甲酸盐衍生物。前药的制备、选择和使用可参见 T.Higuchi 和 V.Stella,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems(作为新的递药系统的前药)”, A.C.S. 专题研讨会系列丛书第 14 卷;“Design of Prodrugs(前药设计)”, H.Bundgaard 主编, Elsevier, 1985 和 Bioreversible Carriers in Drug Design(药物设计中的生物可逆性载体), Edward B. Roche 主编, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, 所述各文献通过引用全部结合到本文中。

[0112] 本发明化合物可以其药学上可接受的代谢物的形式存在。术语“代谢物”是指药学上可接受的本发明化合物(或其盐)的代谢衍生物形式。在一些方面,代谢物可以是体内容易转化成活性衍生物的化合物的功能衍生物。在其他方面,代谢物可以是活性化合物。

[0113] “治疗有效量”是指当给予需要治疗的患者时足以有效治疗的量。

[0114] 本文所用“治疗”是指治疗哺乳动物(特别是人或陪伴动物)等患者的疾病或病症(例如病毒、细菌或真菌感染或其他感染性疾病以及自身免疫性疾病或炎症性疾病),包括改善疾病或病症,即消除患者的疾病或病症或使患者的疾病或病症消退;抑制疾病或病症,即延缓或阻止患者的疾病或病症发展;或者减轻患者的疾病或病症症状。

[0115] 本发明中某些化合物可以非溶剂化形式及溶剂化形式(包括水合形式)存在。一般而言,溶剂化形式和非溶剂化形式都包括在本发明的范围内。本发明的某些化合物可以

多晶型形式或无定形形式（即呈多晶型物）存在。一般而言，所有物理形式对于本发明的预期用途都是等同的，并都落入本发明的范围之内。

[0116] 对于本领域技术人员显而易见的是，本发明某些化合物可以互变异构体存在，所有这些化合物的互变异构体都落入本发明的范围内。本发明某些化合物具有不对称碳原子（光学中心）或双键；外消旋体、非对映体、几何异构体和各个异构体（例如单独的对映体）均包括在本发明的范围内。本发明的化合物也可以在构成这类化合物的一个或多个原子上含有非天然比例的原子同位素。例如，化合物可用氚（ ^3H ）、碘-125（ ^{125}I ）或碳-14（ ^{14}C ）等放射性同位素进行放射性标记。本发明化合物的所有同位素变体，无论是否有放射性，都包括在本发明范围内。

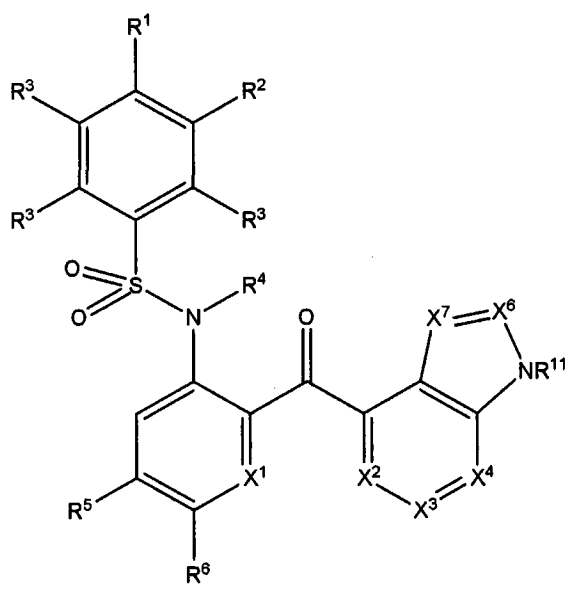
[0117] 本发明的化合物可包括可检测标记。可检测标记是在通常微摩尔以下、可能纳摩尔以下的低浓度下可检出的基团，且由于分子性质（例如分子量、质荷比、放射性、氧化还原电位、发光、荧光、电磁性质、结合性质等），所以可容易地与其他分子区分开来。可检测标记可用分光镜、光化学、生物化学、免疫化学、电、磁、电磁、光学或化学等方法检测。

[0118] 各种各样的可检测标记都落入本发明的范围内，包括半抗原标记（例如生物素或用于与辣根过氧化物酶抗体等可检测抗体结合的标记）；质量标签标记（mass tag label）（例如稳定同位素标记）；放射性同位素标记（包括 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P ）；金属螯合物标记；发光标记，包括荧光标记（例如荧光素、异硫氰酸酯、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白等）、磷光标记和化学发光标记，通常量子产额大于 0.1；电活性和电子转移标记（electroactive and electron transfer label）；酶调节剂标记（enzyme modulator label），包括辅酶、有机金属 催化剂辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和通常用于 ELISA 中的其他酶；光敏剂标记；磁珠标记，包括 Dynabeads；比色标记，例如胶体金、银、硒或其他金属和金属胶溶标记（metal sol label）（参见美国专利第 5,120,643 号，该专利通过引用全部结合到本文并用于所有目的）或有色玻璃或塑料（例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等）小珠标记；和炭黑标记。使用可检测标记的专利文献包括美国专利 3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149、4,366,241、6,312,914、5,990,479、6,207,392、6,423,551、6,251,303、6,306,610、6,322,901、6,319,426、6,326,144 和 6,444,143，所述专利通过引用全部结合到本文并用于所有目的。

[0119] 可检测标记是市售的，或者可通过本领域技术人员已知方法制备。可使用能定位在任何适当位置的反应官能团使可检测标记与化合物共价连接。用于连接可检测标记的方法为本领域技术人员所知。当反应基与结合芳核的烷基或取代烷基链连接时，反应基可位于烷基链的末端位置。

[0120] 化合物

[0121] 在某些实施方案中，本发明化合物为由式 (I) 表示的化合物或其盐



(I)

[0122] 其中 R^1 和 R^2 各自独立为氢、卤素、 C_{1-8} 烷基、 $-CN$ 或 C_{1-8} 卤代烷基,条件是 R^1 或 R^2 中至少一个不为氢;

[0123] 各 R^3 独立为氢、卤素或 C_{1-4} 烷基;

[0124] R^4 为氢或 C_{1-8} 烷基;

[0125] R^5 为卤素或 C_{1-8} 烷基;

[0126] R^6 为氢或 C_{1-4} 烷基;

[0127] R^{11} 选自氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基、取代或未取代的 C_{6-10} 芳基、取代或未取代的 5- 至 10- 元杂芳基和取代或未取代的 3- 至 10- 元杂环;

[0128] X^1 为 CR^7 、N 或 NO;

[0129] X^2 和 X^4 各自独立为 N 或 NO;

[0130] X^3 为 CR^7 ;

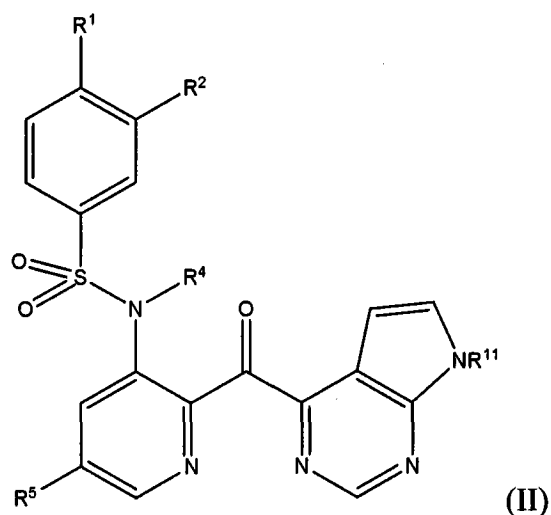
[0131] X^6 和 X^7 各自独立选自 CR^7 、N 和 NO;

[0132] 各 R^7 独立选自氢、卤素、取代或未取代的 C_{1-8} 烷基、取代或未取代的 C_{2-8} 烯基、取代或未取代的 C_{2-8} 炔基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR^8$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(O)NR^9R^8$ 、 $-OC(O)NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}C(O)R^8$ 、 $-NR^{10}C(O)NR^9R^8$ 、 $-NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}CO_2R^8$ 、 $-SR^8$ 、 $-S(O)R^8$ 、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)_2NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}S(O)_2R^8$ 、取代或未取代的 C_{6-10} 芳基、取代或未取代的 5- 至 10- 元杂芳基和取代或未取代的 3- 至 10- 元杂环基;

[0133] R^8 、 R^9 和 R^{10} 每次出现时独立选自氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基、芳基或杂芳基;或 R^8 和 R^9 或 R^8 和 R^{10} 与它们连接的原子一起形成取代或未取代的 5-、6- 或 7- 元环。

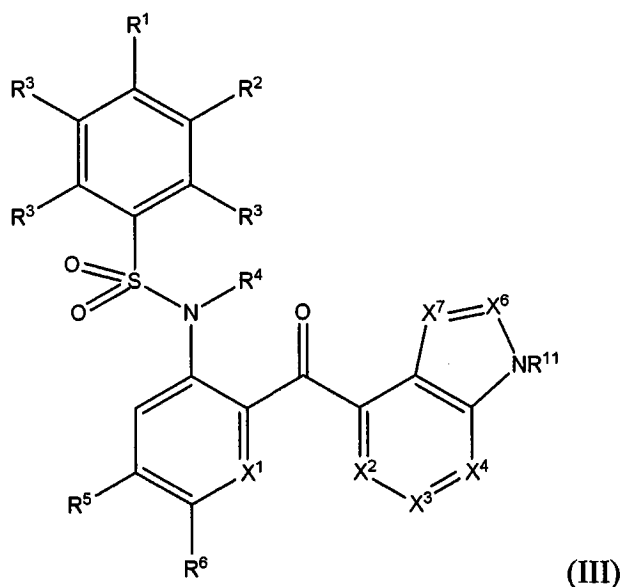
[0134] 优选地,各 R^3 、 R^4 和 R^6 各自为氢。

[0135] 在另一实施方案中,本发明化合物为由式 (II) 表示的化合物或其盐:



[0136] 其中 R^1 、 R^2 、 R^4 、 R^5 和 R^{11} 如以上对于式 (I) 的定义。

[0137] 在另一实施方案中, 本发明化合物为由式 (III) 表示的化合物或其盐:



[0138] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^{11} 如以上对于式 (I) 的定义; 和

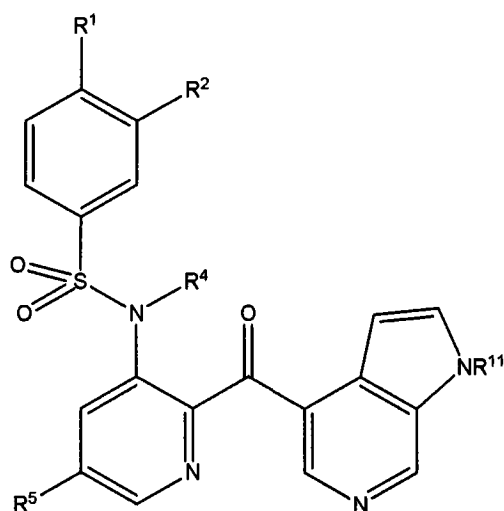
[0139] X^1 为 CR^7 、N 或 NO;

[0140] X^3 为 N 或 NO;

[0141] X^2 、 X^4 、 X^6 和 X^7 各自独立为 CR^7 , 其中各 R^7 独立选自氢、卤素、取代或未取代的 C_{1-8} 烷基、取代或未取代的 C_{2-8} 烯基、取代或未取代的 C_{2-8} 炔基、 $-CN$ 、 $=O$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR^8$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(O)NR^9R^8$ 、 $-OC(O)NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}C(O)R^8$ 、 $-NR^{10}C(O)NR^9R^8$ 、 $-NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}CO_2R^8$ 、 $-SR^8$ 、 $-S(O)R^8$ 、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)_2NR^9R^8$ 、 $-NR^{10}S(O)_2R^8$ 、取代或未取代的 C_{6-10} 芳基、取代或未取代的 5- 至 10- 元杂芳基和取代或未取代的 3- 至 10- 元杂环基;

[0142] R^8 、 R^9 和 R^{10} 每次出现时独立选自氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基、芳基或杂芳基; 或 R^9 和 R^8 或 R^{10} 和 R^8 与它们连接的原子一起形成取代或未取代的 5-、6- 或 7- 元环。

[0143] 在另一实施方案中, 本发明化合物为由式 (IV) 表示的化合物或其盐:



[0144] 其中 R^1 、 R^2 、 R^4 、 R^5 和 R^{11} 如以上对于式 (III) 的定义。

[0145] 优选的实施方案

[0146] 在式 I、II、III 或 IV 任一个中, R^1 为卤素。

[0147] 在式 I、II、III 或 IV 任一个中, R^2 为 C_{1-8} 卤代烷基。

[0148] 在式 I、II、III 或 IV 的一些实施方案中, R^1 为 Cl 和 R^2 为 CF_3 。

[0149] 在式 I、II、III 或 IV 的一些实施方案中, R^1 为甲基, R^2 为 CF_3 。

[0150] 在式 I 或 III 任一个中, R^3 为氢。

[0151] 在式 I、II、III 或 IV 任一个中, R^5 为卤素。

[0152] 在式 I、II、III 或 IV 任一个中, R^5 为氯。

[0153] 在式 I、II、III 或 IV 任一个中, R^5 为 C_{1-8} 烷基。

[0154] 在式 I、II、III 或 IV 任一个中, R^5 为甲基。

[0155] 在式 I 或 III 任一个中, R^6 为氢。

[0156] 在式 I 或 III 任一个中, X^1 为 N。

[0157] 在式 I 或 III 任一个中, X^1 为 NO。

[0158] 在式 I 或 III 任一个中, X^1 为 CR^7 。

[0159] 在式 I 或 III 的一些实施方案中, 当 X^1 为 CR^7 时, R^7 为 H。

[0160] 在式 I 的一些实施方案中, X^2 为 N。

[0161] 在式 I 的一些实施方案中, X^2 为 NO。

[0162] 在式 I 的一些实施方案中, X^3 为 CR^7 , 其中 R^7 为 H 或 C_{1-4} 烷基。

[0163] 在式 I 的一些实施方案中, X^4 为 N。

[0164] 在式 I 的一些实施方案中, X^4 为 NO。

[0165] 在式 III 的一些实施方案中, X^2 为 CR^7 , 其中 R^7 为 H 或 C_{1-4} 烷氧基。

[0166] 在式 III 的一些实施方案中, X^3 为 N。

[0167] 在式 III 的一些实施方案中, X^3 为 NO。

[0168] 在式 I 的一些实施方案中, X^4 为 CR^7 , 其中 R^7 为 H 或 C_{1-4} 烷基。

[0169] 在式 I、II、III 或 IV 的一些实施方案中, R^{11} 为 H 或 C_{1-4} 烷基, 最优选 H。

[0170] 在式 I 或 III 的一些实施方案中, X^6 为 CR^7 。

[0171] 在式 I 或 III 的一些实施方案中, X^6 为 CR^7 , 其中 R^7 为 H 或 C_{1-4} 烷基, 最优选 H。

[0172] 在式 I 或 III 的一些实施方案中, X^6 为 N。

[0173] 在式 I 或 III 的一些实施方案中, X^6 为 NO。

[0174] 在式 I 或 III 的一些实施方案中, X^7 为 CR^7 。

[0175] 在式 I 或 III 的一些实施方案中, X^7 为 CR^7 , 其中 R^7 为 H 或 C_{1-4} 烷基, 最优选 H。

[0176] 在式 I 或 III 的一些实施方案中, X^7 为 N。

[0177] 在式 I 或 III 的一些实施方案中, X^7 为 NO。

[0178] 调节 CCR2 活性的化合物

[0179] 本发明提供调节至少一种 CCR2 活性的化合物。趋化因子受体是膜内在蛋白, 它与趋化因子等胞外配体相互作用, 介导细胞对配体的应答, 例如趋化性、增加胞内钙离子浓度等。因此, 调节趋化因子受体功能 (例如干预趋化因子受体配体的相互作用), 可调节趋化因子受体介导的反应, 因此治疗或预防趋化因子受体介导的病症或疾病。调节趋化因子受体功能包括功能诱导和功能抑制两方面。所实现的调节类型将取决于化合物的性质, 即拮抗剂或完全、部分或反向激动剂的性质。

[0180] 虽然并不受任何特定理论的束缚, 但是我们认为, 本文所提供的化合物干预趋化因子受体与一种或多种关联配体之间的相互作用。我们尤其认为所述化合物干预 CCR2 与 CCR2 配体 (例如 MCP-1) 之间的相互作用。本发明提供的化合物包括但不限于本文提供的示例性化合物及其盐。

[0181] 例如, 本发明的化合物可用作有效的 CCR2 拮抗剂, 这种拮抗活性在炎症 (CCR2 疾病状态的一个标志) 动物试验中进一步得到证实。因此, 本文所提供的化合物可用于治疗 CCR2 介导的疾病的药物组合物和方法并且作为鉴定竞争性 CCR2 拮抗剂的试验中的对照。

[0182] 调节趋化因子活性的组合物

[0183] 另一方面, 本发明提供调节趋化因子活性、特别是调节 CCR2 活性的组合物。一般而言, 用于调节人和动物的趋化因子受体活性的组合物可包含药学上可接受的赋形剂或稀释剂和具有如上述式 (I) 所提供结构式的化合物。

[0184] 本文所用术语“组合物”意欲包括含有规定剂量的规定成分的产品, 以及直接或间接由规定剂量的规定成分组合生产的任何产品。所谓“药学上可接受的”是指必须与制剂中的其他成分相容且对其接受者无害的载体、稀释剂或赋形剂。

[0185] 用于本发明化合物给药的药物组合物可以方便地以单位剂型存在, 并且可以通过药剂学领域众所周知的任何方法制备。所有方法都包括将活性成分与组成一种或多种助剂成分的载体相混合的步骤。一般而言, 通过将活性成分与液体载体或微细固体载体或它们两者充分均匀地混合, 从而制备所述组合物。然后必要时, 将产品制成所需的剂型。药物组合物中所包括的活性目标化合物的量足以对疾病过程或病况产生所需要的效果。

[0186] 含有活性成分的药物组合物可为适于口服使用的形式, 例如为片剂、含片、糖锭剂、水性或油性混悬剂、可分散粉剂或颗粒剂、乳剂和自乳化剂 (参见美国专利第 6, 451, 339 号)、硬质胶囊剂、软质胶囊剂、糖浆剂或酏剂。供口服使用的组合物可依照本领域已知的药物组合物的任何制备方法制备。为了提供药学上美观和适口的制剂, 这些组合物可含有一种或多种选自以下的助剂: 甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂。片剂含有与其他药学上可接受的无毒赋形剂混合的活性成分, 所述赋形剂适于制备片剂。这些赋形剂可为例如惰性稀释剂 (例如纤维素、二氧化硅、氧化铝、碳酸钙、碳酸钠、葡萄糖、甘露醇、山梨

醇、乳糖、磷酸钙或磷酸钠)、制粒剂和崩解剂(如玉米淀粉或海藻酸)、粘合剂(例如 PVP、纤维素、PEG、淀粉、明胶或阿拉伯树胶)和润滑剂(例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉)。片剂可不包衣,或者可以包肠溶衣或通过其他已知技术来延迟在胃肠道内的崩解和吸收,从而在较长时间内提供持续作用。例如,可以采用单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯等延时材料。也可用美国专利第 4,256,108、4,166,452 和 4,265,874 号中所述技术进行包衣以制备用于控释的渗透性治疗片剂(osmotic therapeutic tablet)。

[0187] 适于口服用的剂型也可呈硬质明胶胶囊剂,其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合;或者为软质明胶胶囊剂,其中活性成分与水或油介质(如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。另外,乳剂可以用不是水的混溶成分(例如油)制备,并可用表面活性剂(例如单甘油酯、PEG 酯等)使之稳定。

[0188] 水性混悬剂含有活性物质和与之相混合的适于制备水性混悬剂的赋形剂。这些赋形剂为悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、西黄蓍胶和阿拉伯树胶;可为天然存在的磷脂的分散剂或润湿剂,例如卵磷脂、或环氧烷与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯)、或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(例如十七氧乙烷基十六醇)、或环氧乙烷与脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯)、或环氧乙烷与脂肪酸和己糖醇酐衍生的偏酯的缩合产物(例如聚乙烯失水山梨醇单油酸酯)。水性混悬剂也可含有一种或多种防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯;一种或多种着色剂;一种或多种矫味剂和一种或多种甜味剂,例如蔗糖或糖精。

[0189] 油性混悬剂可通过将活性成分悬浮于植物油(例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(如液体石蜡)中配制。油性混悬剂可以含有增稠剂,如蜂蜡、石蜡或十六醇。可以加入上述甜味剂和矫味剂以提供适口的口服剂型。可以加入抗氧化剂(例如抗坏血酸)来保存这些组合物。

[0190] 适于制备水性混悬剂的可分散粉剂和颗粒剂通过加水以使活性成分与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂的示例如上所述。也可使用其他赋形剂,例如甜味剂、矫味剂和着色剂。

[0191] 本发明的药用组合物也可以是水包油乳剂的形式。油相可以为植物油(例如橄榄油或花生油)或矿物油(如液体石蜡)或这些油的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶(例如阿拉伯胶或西黄蓍胶)、天然存在的磷脂(如大豆磷脂、卵磷脂)以及衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯(例如失水山梨醇单油酸酯)和所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物(例如聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯)。乳剂也可有含甜味剂和矫味剂。

[0192] 糖浆剂和酏剂可以用甜味剂(例如甘油、丙二醇、山梨醇或蔗糖)配制。这些剂型也可含有缓和剂、防腐剂、矫味剂和着色剂。口服溶液剂可与例如环糊精、PEG 和表面活性剂混合而制备。

[0193] 药物组合物可以是无菌注射用水性或油性混悬剂的形式。这种混悬剂可以根据已知技术用上述合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌注射制剂也可以是在胃肠外可接受的无毒稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液剂或混悬剂,例如 1,3-丁二醇溶液剂。可以采用的可接受的溶媒和溶剂有水、林格液和等渗氯化钠溶液。另外,通常采用无菌的不挥发油为溶剂或悬浮介质。对于此目的,可以采用的任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘

油二酯。另外,在制备注射剂时可使用油酸等脂肪酸。

[0194] 也可以用于药物直肠给药的栓剂形式给予本发明的化合物。可通过将药物与合适的无刺激性的赋形剂混合以制备这些组合物,该赋形剂在常温下为固体而在直肠温度下为液体,因此在直肠内融化释放出药物。这类材料为可可脂和聚乙二醇。另外,化合物可以溶液剂或软膏剂的方式经眼递送给予。此外,可以通过离子导入贴剂等方式实现主题化合物的经皮递送。

[0195] 对于局部使用,可采用含有本发明化合物的乳膏剂、软膏剂、胶冻剂、溶液剂或混悬剂。本文所用的局部使用还包括使用漱口剂和含漱剂。

[0196] 本发明的药物组合物和方法还可包括本文所述的其他治疗活性化合物,例如用于治疗上述病理病症的化合物。

[0197] 在一个实施方案中,本发明提供由药学上可接受的载体和本发明的化合物组成的组合物。

[0198] 测定趋化因子调节剂的功效

[0199] 体外试验

[0200] 可采用多种试验来评价本文所提供的化合物,包括信号转导试验、迁移试验、配体结合试验和细胞反应的其他试验。可以采用趋化因子受体信号转导试验来测定化合物(例如潜在的 CCR2 拮抗剂)阻断 CCR2 配体(例如 MCP-1)诱导的信号转导。可以采用迁移试验来测定目标化合物(例如可能的趋化因子拮抗剂)体外阻断趋化因子介导的细胞迁移的能力。一般认为后者类似于体内趋化因子诱导的细胞迁移。可以采用配体结合试验来测定化合物(例如潜在的 CCR2 拮抗剂)阻断 MCP-1 与其受体相互作用的能力。

[0201] 合适的试验中,可以采用具有哺乳动物趋化因子蛋白的至少一种性质、活性或功能特征的趋化因子蛋白(不论是分离的还是重组的)。该性质可以是结合性质(例如与配体或抑制剂结合)、信号转导活性(例如哺乳动物 G 蛋白活化,诱导胞质游离钙离子浓度快速瞬时增加)、细胞反应功能(例如刺激白细胞释放趋化性或炎性介质),等等。

[0202] 试验可以是基于细胞的试验,利用用载体或表达盒稳定或瞬时转染的细胞,所述载体或表达盒具有编码趋化因子受体的核酸序列。还可以使用天然表达趋化因子的细胞系。使细胞维持在适于受体表达的条件下,并且在适于结合发生的条件下与推定调节剂(agent)接触。可用标准技术检测结合情况。例如,可相对于合适的对照(例如相对于推定调节剂不存在时的背景或者相对于已知配体)来确定结合的程度。任选含有受体的细胞组分(例如膜组分)可用来代替整个细胞。

[0203] 可以对结合检测或复合物形成进行直接或间接地检测。例如,推定调节剂可以用合适的标记(例如荧光标记、化学发光标记、同位素标记、酶标记等)进行标记,可通过检测标记来测定结合。可以通过竞争或替代研究,用未标记的调节剂或配体(例如 MCP-1)作为竞争剂评价特异性结合和/或竞争性结合。

[0204] 可以采用结合抑制试验来评价本发明的化合物。在这些试验中,使用例如 MCP-1,对化合物作为配体结合抑制剂进行评价。在一个实施方案中,使 CCR2 受体与配体(例如 MCP-1)接触,对配体结合进行测定。然后在配体(例如 MCP-1)存在下使受体与试验调节剂接触,进行第二次结合测定。配体结合程度的减弱可表示试验调节剂对结合的抑制。可以用表达趋化因子的完整细胞或表达趋化因子细胞的膜组分进行结合抑制试验。

[0205] G 蛋白偶联受体与例如激动剂结合可由受体产生信号转导事件。因此,信号转导试验也可用来评价本发明的化合物,由调节剂诱导的信号转导功能可以用任何合适的方法监测。例如 G 蛋白活性,例如水解 GTP 成为 GDP,或者由受体结合触发的稍后的信号转导可通过已知方法测定(参见例如 PCT/US97/15915;Neote 等, Cell, 72:415425(1993);Van Riper 等, J. Exp. Med., 177:851-856(1993) 和 Dahinden 等 J. Exp. Med., 179:751-756(1994))。

[0206] 趋化性试验也可用来评价受体功能和评价本文所提供的化合物。这些试验基于体外或体内由调节剂诱导的细胞功能性迁移,可用于评价结合和 / 或对配体、抑制剂或激动剂的趋化性作用。各种趋化性试验为本领域所知,任何合适的试验都可用来评价本发明的化合物。合适试验的实例包括以下文献所记载的实例:PCT/US97/15915;Springer 等, WO 94/20142;Berman 等, Immunol. Invest., 17:625-677(1988) 和 Kavanaugh 等, J. Immunol., 146:4149-4156(1991)。

[0207] 钙信号转导试验测定随时间变化的钙浓度,优选受体结合之前和之后的钙浓度。这些试验可用来定量测定受体结合(或其不存在)后受体-信号转导介质即 Ca^{++} 的产生。这些试验用于测定化合物(例如本发明的化合物)通过与目标受体结合而产生受体信号转导介质的能力。同样,这些试验用于测定化合物(例如本发明的化合物)通过干预目标受体与配体间的结合从而抑制受体信号转导介质产生的能力。

[0208] 在用来测定化合物干预趋化因子受体和已知趋化因子配体间结合能力的钙信号转导试验中,首先将趋化因子受体表达细胞(CCR2 表达细胞例如 THP-1 细胞)与浓度递增的目标化合物(例如潜在的趋化因子拮抗剂)一起温育。96 孔微量滴定板中细胞数可为 10^5 至 5×10^5 个细胞 / 孔。待测试化合物的浓度范围可为 0-100 μM 。温育一段时间后(其范围可为 5-60 分钟),按照生产商的说明书,将经处理的细胞放到荧光成像读板仪 (**FLIPR[®]**)(可获自 Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) 中。**FLIPR[®]** 系统是本领域技术人员所熟知的进行试验的标准方法。然后按 5-100nM 终浓度,用适量的趋化因子配体(对于 CCR2 为 MCP-1)刺激细胞,记录胞内钙增加的信号(亦称钙流量(calcium flux))。可以 IC_{50} (引起 50% 信号转导抑制所需浓度)或 IC_{90} (90% 抑制)计算得出化合物作为趋化因子和配体间结合抑制剂的功效。

[0209] 可用 96 孔微室(称为 ChemoTX[™])(但不限于此形式)进行体外细胞迁移试验。ChemoTX[™] 系统是本领域技术人员所熟知的一类趋化性 / 细胞迁移仪器。在本项试验中,首先分别将 CCR2 表达细胞(例如 THP-1),与浓度递增的目标化合物(例如可能的 CCR2 拮抗剂)一起温育。通常,采用 5×10^4 个细胞 / 孔,但是量的范围可为 10^3 - 10^6 细胞 / 孔。将趋化因子配体(例如 CCR2 配体 MCP-1,通常为 0.1nM(但范围也可 5-100nM))放入下室,装上迁移装置。然后将 20 微升试验化合物-处理细胞放到膜上。在 37°C 下使迁移进行一段时间,CCR2 通常为 1.5 小时。温育结束时,定量测定跨膜迁移到下室的细胞数。以 IC_{50} (细胞迁移减少 50% 所需浓度)或 IC_{90} (90% 抑制)计算得出化合物作为趋化因子介导的细胞迁移抑制剂的功效。BiRAM 试验

[0210] 用初筛以鉴定趋化因子拮抗剂的实例包括 BiRAM 试验(WO 02101350、US2004023286),该试验在抑制性趋化因子浓度下通过其激活细胞迁移的能力来检测潜在受体拮抗剂。开始该试验时,细胞悬液用 GS-6R Beckman 离心机以 1000RPM 离心,收获趋化因子表达细胞(例如 CCR2 试验为 THP-1 细胞)。对于 CCR2 试验按 10×10^6 个细胞 / ml

将细胞沉淀重新悬浮于趋化性缓冲液 (HBSS/0.1% BSA) 中。将 25 微升细胞与等体积的同一缓冲液稀释至 20 μ M 的试验化合物混合。将 20 微升混合物转移至趋化室上室的滤器上,另将 29 μ l 含有趋化因子配体的趋化因子溶液 (CCR2 试验为 100nM 趋化因子 MCP-1 和 MIP-1 α 蛋白) 放入下室。接着,在 37°C 下温育 (CCR2 为 90 分钟),通过除去过滤器顶上的细胞液滴终止试验。为了定量测定跨膜迁移的细胞量,将 5 μ L 7X **CyQUANT**[®] 溶液加到下室各孔中,在 SpectrafluorPlus 荧光读板仪 (TECAN, Durham, NC) 中测定荧光信号。

[0211] 为选出潜在目标,以 RAM 指数计算出迁移活化水平,该指数是以具体孔的信号和整块板信号中位值之间的比率。对于 CCR2 试验,RAM 指数大于 1.5 的化合物被视为 RAM 阳性,并且选出用于常规功能试验的 IC₅₀ 测定。 钙流量试验

[0212] 钙流量试验测量配体诱导的受体活化后胞内钙的增加且可用作初筛后的第二个试验。例如在 **FLIPR**[®] 仪 (Molecular Devices, Mountain View, CA) 上可进行该试验。开始该试验时,将细胞悬液离心以收获趋化因子表达细胞 (例如 CCR2 试验为 THP-1 细胞),并且按 1.5×10^6 个细胞 /ml 重新悬浮在 HBSS (含 0.1% 胎牛血清) 中。然后在 37°C 下缓缓摇动 45 分钟,将细胞用钙指示染料 Fluo-4 AM 进行标记。温育后,细胞沉淀下来,用 HBSS 洗涤一次,按 1.6×10^6 个细胞 /ml 的密度重新悬浮在相同的缓冲液中。将 100 微升经标记的细胞与 10 μ l 适当浓度的试验化合物在试验板上混合。加入趋化因子蛋白 (CCR2 试验的 MCP-1 终浓度为 0.1nM) 以激活受体。通过比较化合物处理细胞与未处理细胞之间的钙信号以确定抑制程度。用 Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego, CA) 通过非线性平方回归分析进一步计算出 IC₅₀。 配体结合试验

[0213] 配体结合试验用来测定潜在的 CCR2 拮抗剂阻断 CCR2 及其配体 MCP-1 间相互作用的能力。将表达 CCR2 的 THP-1 细胞离心,并重新悬浮于试验缓冲液 (20mM HEPES (pH 7.1)、140mM NaCl、1mM CaCl₂、5mM MgCl₂, 并且含 0.2% 牛血清白蛋白) 至浓度为 2.2×10^5 个细胞 /ml。结合试验如下进行。首先,将 0.09ml 细胞 (1×10^5 个 THP-1 细胞 / 孔) 加到含有化合物的试验板中,使用于筛选 (或部分剂量反应用于测定化合物 IC₅₀) 的各化合物的终浓度为 ~ 2 -10 μ M。然后,加入 0.09ml 稀释于试验缓冲液至终浓度 ~ 50 pM 的 ¹²⁵I 标记的 MCP-1 (获自 Amersham ;Piscataway, NJ),得到 $\sim 30,000$ cpm/ 孔,将板密封,在摇床 (shaker platform) 上于 4°C 温育 3 小时左右。在真空细胞收集器上 (Packard Instruments ;Meriden, CT),将反应物抽吸在预浸在 0.3% 聚乙烯亚胺 (PEI) 溶液中 GF/B 玻璃滤器上。将闪烁液 (50 μ l ; Microscint20, Packard Instruments) 加到各孔中,将板密封,用 Top Count 闪烁计数器 (Packard Instruments) 测定放射性。使用对照孔 (仅装有稀释剂 (用于总计数) 或者装有过量 MCP-1 (1 μ g/ml, 用于非特异性结合)) 来计算化合物总抑制的百分比。用得自 GraphPad, Inc. (San Diego, Ca) 的计算机程序 Prism 计算出 IC₅₀ 值。IC₅₀ 值为标记的 MCP-1 与受体结合减少 50% 所需要的浓度。 治疗方法

[0214] 根据待治疗疾病和受治疗者的状况,可通过口服、胃肠外 (例如肌内、腹膜内、静脉内、ICV、脑池内注射或输注、皮下注射或植入)、吸入、鼻、阴道、直肠、舌下或局部给药途径给予本发明的化合物和组合物,并且可以单独或一起配制成含有常规无毒的药学上可接受的载体、助剂和溶媒的合适剂量单位的剂型,以适于各种给药途径。本发明还包括以贮库剂型给予本发明的化合物和组合物。

[0215] 在治疗或预防需要调节趋化因子受体的病症中,合适的剂量水平通常约为

0.001-100mg/kg 患者体重 / 天,可以单剂量或多剂量给药。优选剂量水平可约为 0.01mg/kg/ 天至约 25mg/kg/ 天;更优选为约 0.05mg/kg/ 天至 10mg/kg/ 天。合适的剂量水平可约为 0.01-25mg/kg/ 天、约 0.05-10mg/kg/ 天或约 0.1-5mg/kg/ 天。在该范围内,剂量可为 0.005-0.05mg/kg/ 天、0.05-0.5mg/kg/ 天、0.5-5.0mg/kg/ 天或 5.0-50mg/kg/ 天。对于口服给药,优选以片剂形式提供组合物,片剂含有 1.0-1000 毫克活性成分,特别含 1.0mg、5.0mg、10.0mg、15.0mg、20.0mg、25.0mg、50.0mg、75.0mg、100.0mg、150.0mg、200.0mg、250.0mg、300.0mg、400.0mg、500.0mg、600.0mg、750.0mg、800.0mg、900.0mg 和 1000.0mg 活性成分,用于根据症状调整待治疗患者的剂量。可以按每天 1-4 次的方案给予化合物,优选每天一次或者每天两次。

[0216] 然而,应当了解的是,任何特定患者的具体剂量水平和剂量频率可以变化,并取决于各种因素,包括所用的具体化合物的活性、该化合物的代谢稳定性和作用时间长度、年龄、体重、遗传特征、一般健康状况、性别、饮食、给药模式和时间、排泄率、药物组合、具体病症的严重程度和患者治疗经历。与 CCR2 化合物联用的药物

[0217] 可与本发明的 CCR2 拮抗剂联用的药物包括用于治疗以下疾病的药物:动脉粥样硬化、再狭窄、多发性硬化、肺纤维变性、炎性肠病、类风湿性关节炎、移植物抗宿主病、肾纤维变性、银屑病、移植排斥反应、肥胖症、糖尿病、高胆固醇血症和癌症。

[0218] 在另一些实施方案中,本发明的方法涉及治疗变应性疾病,其中本发明的化合物或组合物可单独给药或与第二治疗药联合给药,其中所述第二治疗药是抗组胺药。当联用时,从业人员可给予本发明化合物或组合物与第二治疗药的组合。而且,可以任何顺序序贯给予所述化合物或组合物和第二治疗药。

[0219] 本发明的化合物和组合物可与具有预防和治疗目标病症或疾病相关效用的其他化合物和组合物组合,目标病症或疾病例如炎性病症或疾病,包括炎性肠病、变应性疾病、银屑病、特应性皮炎和哮喘和上述病理。本领域普通技术人员可对用于联合疗法的合适药物作出选择。各治疗药联用时可以协同作用以达到治疗或预防各种疾病的效果。采用该方法,能够以较低剂量的各种药物达到治疗功效,从而降低不良副作用的可能性。

[0220] 在治疗、预防、改善、控制或降低炎症风险方面,本发明的化合物可与以下药物联用:抗炎药或镇痛药(例如阿片激动剂)、脂加氧酶抑制剂(例如 5-脂加氧酶抑制剂)、环加氧酶抑制剂(例如环加氧酶-2 抑制剂)、白介素抑制剂(例如白介素-1 抑制剂)、NMDA 拮抗剂、一氧化氮抑制剂或一氧化氮合成抑制剂、非类固醇抗炎药或抑制细胞因子的抗炎药,例如与以下化合物联用:对乙酰氨基酚(acetaminophen)、阿司匹林、可待因、生物 TNF 螯合剂(biological TNF sequestrant)、芬太尼(fentanyl)、布洛芬(ibuprofen)、吲哚美辛(indomethacin)、酮咯酸(ketorolac)、吗啡、奈普生(naproxen)、非那西丁(phenacetin)、吡罗昔康(piroxicam)、类固醇镇痛药、舒芬太尼(sufentanyl)、苏林酸(sunlindac)、替尼达普(tenidap)等。

[0221] 同样,本发明的化合物还与以下药物一起给药:止痛药;增效药,例如咖啡因、H₂-拮抗剂、西甲硅油、氢氧化铝、氢氧化镁;减充血药,例如伪麻黄碱(pseudophedrine);镇咳药,例如可待因;利尿药;镇静性或非镇静性抗组胺药;极迟抗原(VLA-4)拮抗剂;免疫抑制药,例如环孢菌素(cyclosporin)、他克莫司(tacrolimus)、雷帕霉素(rapamycin)、EDG 受体激动剂或其他 FK-506 型免疫抑制药;类固醇;非类固醇平喘药,例如 β 2-激动剂、

白三烯拮抗剂或白三烯生物合成抑制剂；磷酸二酯酶 IV 型 (PDE-IV) 抑制剂；降胆固醇药，例如 HMG 辅酶 A 还原酶抑制剂、螯合剂或胆固醇吸收抑制剂；以及抗糖尿病药，例如胰岛素、 α -葡萄糖苷酶抑制剂或格列酮类 (glitazones)。

[0222] 本发明化合物与第二活性成分的重量比可以改变，这将取决于各种成分的有效剂量。一般而言，可以采用各自的有效剂量。因此，例如当本发明的化合物与 NSAID 组合时，本发明化合物与 NSAID 的重量比的范围一般将为约 1000 : 1 至约 1 : 1000，优选约 200 : 1 至约 1 : 200。本发明化合物与其他活性成分的组合一般也将上述范围内，但在所有情况下，应当使用每种活性成分的有效剂量。 CCR2 介导的病症或疾病的治疗或预防方法

[0223] 在又一方面，本发明提供通过给予患有 CCR2 介导的病症或疾病的受治疗者治疗有效量的上式 (I) 的任何化合物来治疗或预防 CCR2 介导的病症或疾病的方法。用于本发明方法的化合物包括式 (I) 化合物、上述实施方案提供的化合物、以下实施例中具体列举的化合物以及本文提供具体结构的化合物。“受治疗者”在本文中包括动物，例如哺乳动物，包括但不限于灵长类（例如人）、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠等。在优选的实施方案中，受治疗者是人。

[0224] 本文所用表述“CCR2 介导的病症或疾病”以及相关表述和术语是指以 CCR2 功能活性异常（即比正常值小或大）为特征的病症或疾病。CCR2 功能活性异常可能是由以下情况引起的：在正常时不表达 CCR2 的细胞表达 CCR2、CCR2 表达增加（导致例如炎症病症或疾病和免疫调节性病症或疾病）或 CCR2 表达降低。CCR2 功能活性异常还可能由以下情况引起的：在正常时不分泌 MCP-1 的细胞分泌 MCP-1、MCP-1 表达增加（导致例如炎症病症或疾病和免疫调节性病症或疾病）或 MCP-1 表达降低。CCR2 介导的病症或疾病可由 CCR2 功能活性异常完全或部分地介导。然而，CCR2 介导的病症或疾病是这样的一种病症或疾病，其中调节 CCR2 导致对所患的病症或疾病产生一些影响（例如至少在某些患者中，CCR2 拮抗剂对患者状况有一定改善）。此外，MCP-2、MCP-3 和 MCP-4 亦为 CCR2 配体。

[0225] 在一个实施方案中，本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法，该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物。

[0226] 在一个实施方案中，本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法，该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物，其中 CCR2 介导的病症或疾病是动脉粥样硬化。

[0227] 在一个实施方案中，本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法，该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物，其中 CCR2 介导的病症或疾病是再狭窄。

[0228] 在一个实施方案中，本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法，该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物，其中 CCR2 介导的病症或疾病是多发性硬化。

[0229] 在一个实施方案中，本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法，该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物，其中 CCR2 介导的病症或疾病选自炎症性肠病、肾纤维变性、类风湿性关节炎、肥胖症和非胰岛素依赖型糖尿病。

[0230] 在一个实施方案中，本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法，该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物，其中 CCR2 介导的病症或疾病是 2 型糖

尿病。

[0231] 在一个实施方案中,本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法,该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物,其中 CCR2 介导的病症或疾病选自慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维变性和特发性肺炎综合征。

[0232] 在一个实施方案中,本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法,该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物,其中给药为口服、胃肠外、直肠、经皮、舌下、经鼻或局部给药。

[0233] 在一个实施方案中,本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法,该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物,其中该化合物与抗炎药或镇痛药联合给予。

[0234] 在一个实施方案中,本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法,该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物,其中还给予抗炎药或镇痛药。

[0235] 在一个实施方案中,本发明提供调节细胞的 CCR2 功能的方法,其中通过使细胞与 CCR2 调节量的本发明化合物接触来调节细胞的 CCR2 功能。

[0236] 在一个实施方案中,本发明提供治疗 CCR2 介导的病症或疾病的方法,该方法包括给予受治疗者安全有效量的本发明化合物或组合物,其中所述疾病选自肺纤维变性、移植排斥反应、移植物抗宿主病和癌症。

[0237] 在另外其他的实施方案中,本发明的方法涉及治疗银屑病,其中本发明的化合物或组合物单用或与第二治疗药联用,第二治疗药例如皮质类固醇、润滑剂、角质层分离剂、维生素 D3 衍生物、PUVA 和地蒽酚 (anthralin)。

[0238] 在其他实施方案中,本发明的方法涉及本发明的化合物或组合物单用或与第二治疗药联用来治疗特应性皮炎,第二治疗药例如润滑剂和皮质类固醇。

[0239] 在又一些实施方案中,本发明的方法涉及本发明的化合物或组合物单用或与第二治疗药联用来治疗哮喘,第二治疗药例如 β 2- 激动剂和皮质类固醇。 调节剂的制备

[0240] 以下实施例供举例说明,但不是对所要求保护的发明的限制。

[0241] 另外,本领域技术人员应当了解的是,本专利要求保护的分子可采用多种标准有机化学转化法合成。

[0242] 在实施例中概述了本发明中广泛用于合成目标化合物的某些通用反应类型。准确地讲,给出了由 Friedel-Crafts 型方法用于形成磺酰胺、形成吡啶 N- 氧化物和合成 2- 氨基苯基 - 芳基甲酮的通用方法,但在本文中也描述了许多其他的标准化学方法,并且按常规予以采用。

[0243] 下面包括可用于制备本发明化合物的代表性合成有机转化法,虽然这些方法不是穷尽性的。

[0244] 这些代表性转化法包括:标准官能团处理;还原,例如硝基还原为氨基;包括醇和吡啶在内的官能团氧化;经由 IPSO 或其他机制用于引入多种基团(包括腈、甲基和卤素)的芳基取代;保护基团的引入和脱去;Grignard 形成和与亲电子试剂的反应;金属介导的交叉偶联反应,包括但不限于 Buchwald、Suzuki 和 Sonigashira 反应;卤化和其他亲电芳族取代反应;重氮盐的形成和这一类的反应;醚化;环化缩合、脱水、氧化和还原(形成杂芳基);芳基金属化与金属转移作用和芳基 - 金属类化合物与亲电子试剂(例如酰氯或

Weinreb 酰胺) 反应之后的反应; 酰胺化; 酯化; 亲核取代反应; 烷基化; 酰化; 磺酰胺形成; 氯磺酰化; 酯水解和相关的水解等。

[0245] 本专利要求保护的某些分子以不同的对映体和非对映体存在, 这些化合物的所有这类变体都落入本发明的范围内。

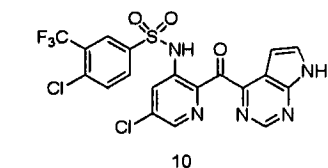
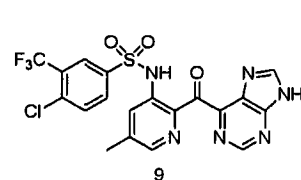
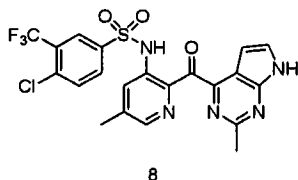
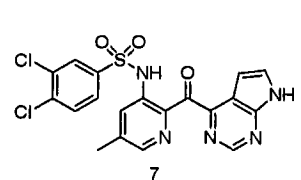
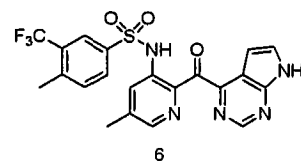
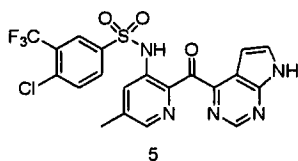
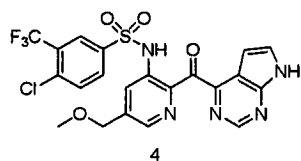
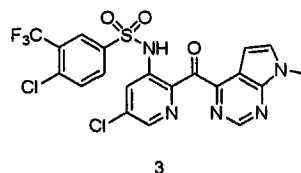
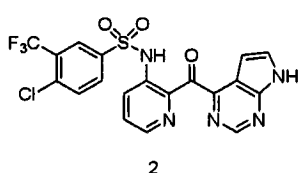
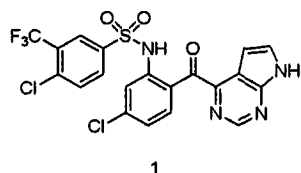
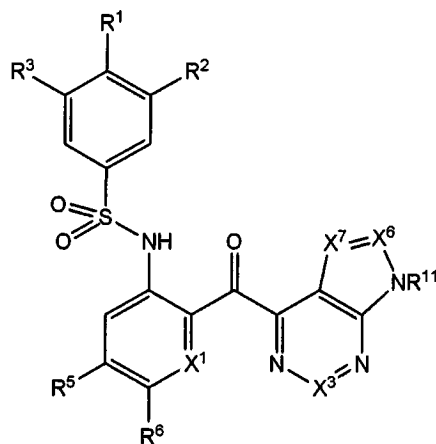
[0246] 在下面的合成法描述中, 一些前体可从商业来源获得。这些商业来源包括奥尔德里奇化学公司 (Aldrich Chemical Co.)、AcrosOrganics、Ryan Scientific Incorporated、Oakwood Products Incorporated、Lancaster Chemicals、西格玛化学公司 (Sigma Chemical Co.)、兰卡斯 特化学公司 (Lancaster Chemical Co.)、TCI-America、阿法埃莎公司 (Alfa Aesar)、Davos Chemicals 和 GFS Chemicals。

[0247] 本发明的化合物, 包括活性表中列举的化合物, 可通过下列实验部分中所述方法和步骤以及通过采用本领域技术人员所熟知的标准有机化学转化法来制备。

[0248] 实施例

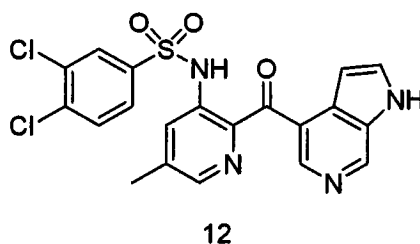
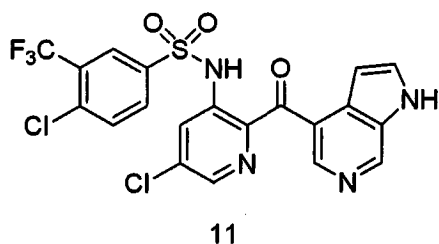
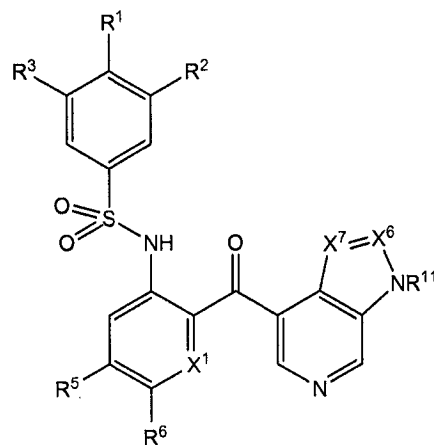
[0249] 以下化合物在本发明范围内:

[0250] 表 1. 根据下式的化合物:



[0251] 化合物 1-10 在 CCR2 趋化因子测定中具有小于 1000nM 的 IC_{50} 。

[0252] 表 2. 根据下式的化合物:



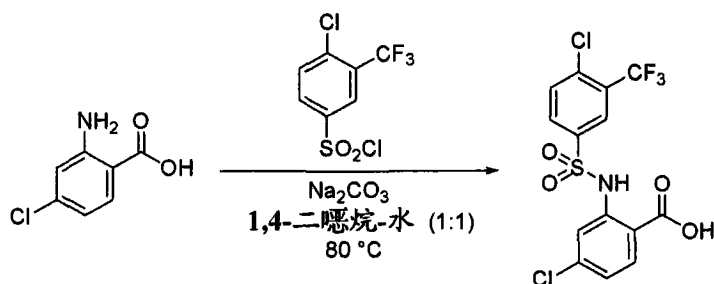
[0253] 化合物 11 和 12 在 CCR2 趋化因子测定中具有小于 1000nM 的 IC_{50} 。

[0254] 使用以下方法制备以上化合物和本发明范围内的其他化合物并发现这些化合物为活性 CCR2 拮抗剂。

[0255] 下面使用的试剂和溶剂可以获自奥尔德里奇化学公司 (Aldrich Chemical Co.) (Milwaukee, Wisconsin, USA) 等公司。 1H -NMR 用 Varian Mercury 400MHz NMR 分光计记录。有效峰按顺序在表中列出:峰裂数 (br, 宽峰; s, 单峰; d, 双峰; t, 三重峰; q, 四重峰; m, 多重峰) 和质子数。质谱结果依次以质荷比、各离子相对丰度 (在括号内) 报告。在表格中, 单个 m/e 值用来报告包含最普通原子同位素的 M+H (或标注为 M-H) 离子。在所有情况下, 同位素谱图对应于预期结构式。用 HP1100 HPLC 递送样品, 在 Hewlett-Packard MSD 电喷雾质谱仪上进行电喷雾电离 (ESI) 质谱分析。通常将分析物按 0.1mg/ml 溶于甲醇, 用输送溶剂 1 微升注入到质谱仪中, 自 100 道尔顿至 1500 道尔顿进行扫描。所有化合物都可用乙腈/水 (含有 1% 甲酸) 作为输送溶剂, 以 (+)ESI 模式进行分析。下文提供的化合物也可用 2mM NH_4OAc 的乙腈/水溶液作为输送系统, 以 (-)ESI 模式进行分析。

[0256] 中间体的制备

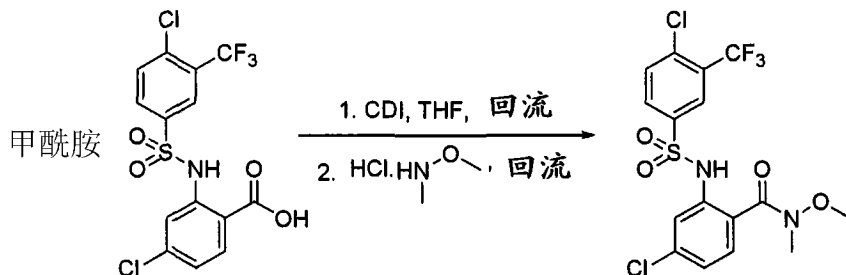
[0257] 中间体 1: 4-氯-2-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-苯甲酸



[0258] 在 60°C 下, 往 Na_2CO_3 (11.7g, 110.7mmol) 在水 (50mL) 和 1,4-二噁烷 (50mL) 中的

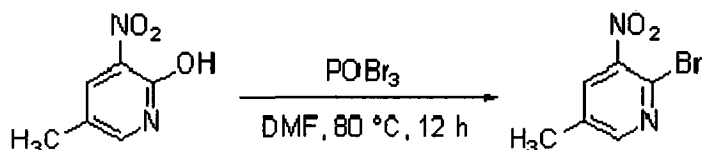
溶液中加入 2-氨基-4-氯-苯甲酸 (5.0g, 29.14mmol), 随后分三批加入 4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰氯 (20.15g, 72.48mmol) 并在 80℃ 下将得到的反应混合物加热 4 小时。加入 2N HCl 直至反应混合物呈酸性 (pH = ~ 2), 将得到的白色固体过滤, 用水洗涤, 经高度真空干燥, 得到标题化合物 (7.8g), 产率为 65%。MS (ES) M+Na 理论值 436.0, 实测值 435.8。

[0259] 中间体 2: 4-氯-2-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-N-甲氧基-N-甲基-苯



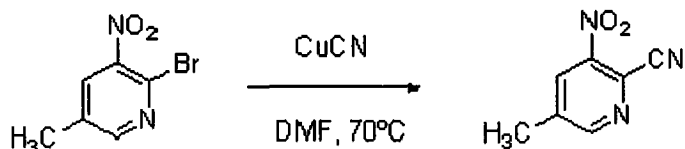
[0260] 往 4-氯-2-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-苯甲酸 (5.0g, 12.1mmol) 在 THF (20mL) 中的溶液中分批加入 N, N'-羰基二咪唑 (CDI, 2.45g, 15.13mmol) (小心! : 有 CO₂ 生成)。随后在回流下将得到的反应混合物加热。在 4 小时后, 将反应混合物冷却至室温并加入 N, O-二甲基羟胺·盐酸盐 (1.3g, 13.31mmol), 在回流下加热 1 小时。加入水 (100mL), 随后加入 EtOAc (100mL) 并搅拌。将 EtOAc 层分离, 水层进一步用 EtOAc (2×50mL) 萃取。合并的 EtOAc 层用 2N HCl 水溶液 (50mL)、饱和 NaHCO₃ 溶液 (50mL)、盐水 (50mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄) 并蒸发。得到的粗品经自动化正相色谱纯化 (50% EtOAc/ 己烷), 得到标题化合物 (4.0g), 产率为 73%。MS (ES) M+H 理论值 457.0, 实测值 456.9。

[0261] 中间体 3: 2-溴-5-甲基-3-硝基吡啶:



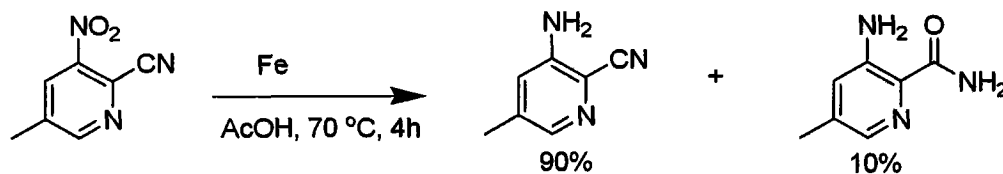
[0262] 在 0-10℃ 下, 往在 DMF (500mL) 中的 2-羟基-5-甲基-3-硝基吡啶 (100g, 0.65mol) 中分批加入 POBr₃ (222.8g, 0.78mol) 并搅拌, 随后在 80℃、氮气下将反应混合物搅拌 12 小时。使反应混合物冷却并将其倾入碎冰 (1Kg) 中, 将得到的固体过滤, 用冰冷却的水 (2×500mL) 充分洗涤, 在干燥器中高度真空干燥 1 天, 得到黄色固体状的 2-溴-5-甲基-3-硝基吡啶 (121g), 产率为 86%。(M+H) 理论值: 217, 实测值 216.9。

[0263] 中间体 4: 2-氰基-5-甲基-3-硝基吡啶:



[0264] 往圆底烧瓶中装入 2-溴-5-甲基-3-硝基吡啶 (60.53g, 278.9mmol) 和 CuCN (27.52g, 307.3mmol)。将该烧瓶抽真空, 随后用氮气回填。经插管加入 DMF (150mL)。将该溶液加热至 70℃ 并保持 1.5 小时。在冷却至室温后, 将反应混合物倾入 EtOAc (500mL) 和水 (250mL) 中。两相均经 1cm celite 硅藻土床过滤。将各层分离, 有机相用水 (2×100mL) 洗涤, 随后用 1:1 饱和 NH₄Cl/NH₄OH 水溶液 (2×100mL) 洗涤。合并的水层用 EtOAc (2×200mL) 萃取。合并的有机层经 MgSO₄ 干燥并真空浓缩, 得到标题化合物 (36.10g, 产率为 79%)。

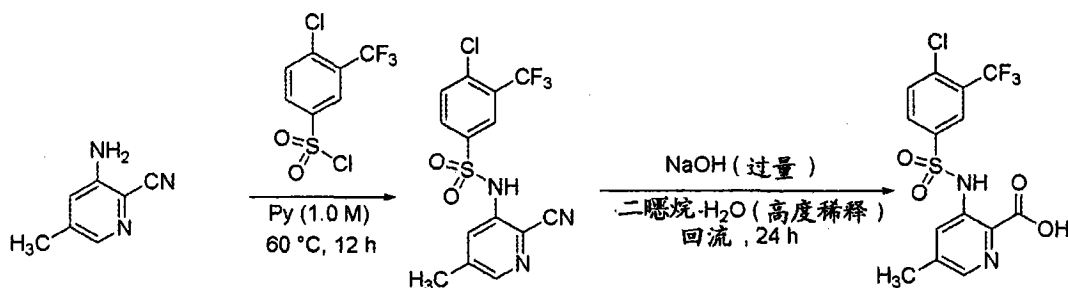
[0265] 中间体 5 : 3-氨基-2-氰基-5-甲基吡啶 :



[0266] 在装有机机械搅拌器和温度计的 2L 三颈圆底烧瓶中的乙酸 (300mL) 中加入 Fe 粉 (99.6g, 1.78mol) 并在 60℃ 下搅拌。将 2-氰基-5-甲基-3-硝基吡啶 (97g, 0.59mol) 溶解在乙酸 (400mL) 中并微微加热, 并将其滴加至以上反应混合物中, 以使反应温度保持低于 80℃ 搅拌 3.5 小时。将反应混合物继续搅拌 30 分钟, 冷却, 用 EtOAc (750mL) 稀释, 经 celite 硅藻土过滤并用 EtOAc (1×500mL, 3×250mL) 洗涤。将合并的 EtOAc 层蒸发至干, 得到深褐色固体, 将其用饱和 NaHCO₃ 溶液 (850mL) 中和, 在加入水 (250mL) 后得到均相物, 该水溶液用 EtOAc (1×750mL, 2×500mL) 萃取。合并的 EtOAc 层经短硅胶垫 (烧结漏斗中砂-SiO₂-砂) 过滤, 干燥 (Na₂SO₄) 并蒸发, 得到黄色固体状的 3-氨基-2-氰基-5-甲基吡啶 (60g), 产率为 76% (包括 ~10% 相应的酰胺)。

[0267] 往粗制的 3-氨基-2-氰基-5-甲基吡啶 (含 ~10% 甲酰胺) (49g) 中加入 EtOAc (441mL, 与苯胺的体积比为 9 : 1), 将得到的悬浮液加热至回流形成澄清的溶液。在冷却至室温后, 通过过滤收集得到的晶体, 用少量的冷 EtOAc (44mL (最初体积 1/10) × 2) 洗涤, 随后真空干燥, 得到纯的 3-氨基-2-氰基-5-甲基吡啶 (35g), 为浅黄色针状物。将母液减压浓缩, 往得到的黄色固体中加入 EtOAc (136mL) 并重复以上操作, 得到另 4g 纯的 3-氨基-2-氰基-5-甲基吡啶; 总回收产率 79.5%。¹HNMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.89 (1H, s), 6.90 (1H, s), 4.39 (2H, br), 2.30 (3H, s). MS (ES) M+H 理论值 134.0, 实测值 134.0。

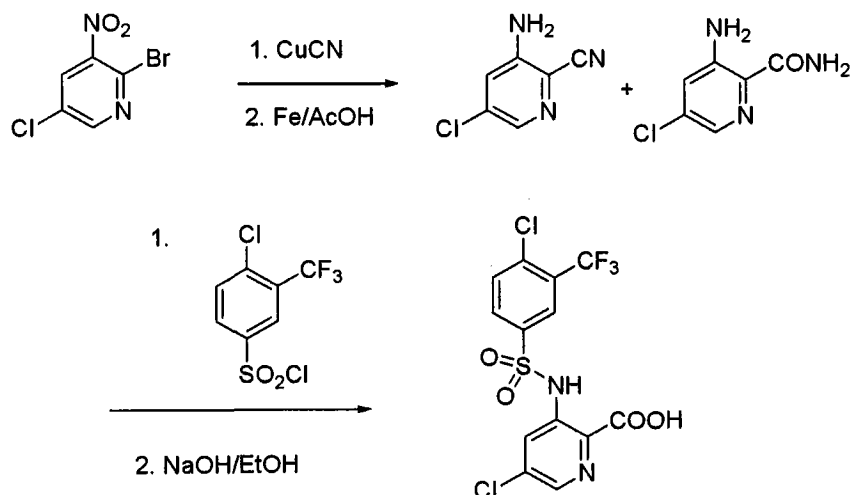
[0268] 中间体 6 : 3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-5-甲基-吡啶-2 甲酸 :



[0269] 往在吡啶 (63mL) 中的 3-氨基-5-甲基-2-氰基-吡啶 (9.6g, 72mmol) 中一次性加入 4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰氯 (19.6g, 80mmol) 并在 60℃ 下将得到的反应混合物搅拌过夜。真空除去吡啶, 加入 2N HCl (100mL), 用 EtOAc (3×300mL; 注意: 由于酰胺的存在, 在 EtOAc 中的溶解性低) 萃取。将合并的 EtOAc 层干燥 (Na₂SO₄), 蒸发, 得到 26.3g 含少量双-磺酰胺的粗品, 其在室温下在 THF (200mL) 中用 2N NaOH (100mL) 水解 2 小时。加入 2N HCl (100mL), 用 EtOAc (1×700mL, 1×250mL) 萃取, 合并的 EtOAc 层用饱和 NaHCO₃ 溶液 (2×250mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄) 并蒸发, 得到 22g 单磺酰胺。往该二噁烷 (350mL) 中加入水 (450mL) (注意: 对于快速反应需要高度稀释), 随后加入 NaOH (30g, 0.75mol) 并在回流下搅拌 24 小时。将二噁烷真空除去并在冷却下缓慢加入浓 HCl (75mL)。将得到的固体过滤, 用

水洗涤并真空干燥,得到浅黄色固体状的标题化合物 (22g,对于两个步骤为 88%)。(M+H) 理论值 :395.0 ;实测值 394.9。

[0270] 中间体 7 :5-氯-3-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基-磺酰氨基)-吡啶-2-甲酸

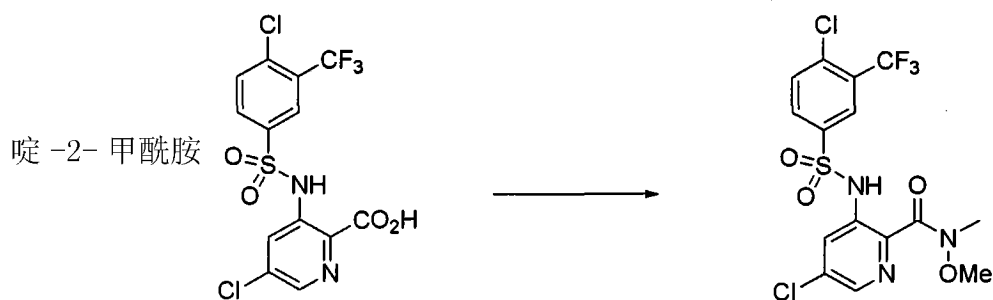


[0271] 步骤 1 :往干燥的 250mL 烧瓶中装入 2-溴-5-氯-3-硝基吡啶 (24g, 101mmol)、CuCN (19g, 212mmol) 和 DMF (100mL)。在 110℃ 下将得到的混合物搅拌 2 小时。将该混合物减压浓缩。加入水 (100mL) 并用 EtOAc (3×250mL) 萃取。合并的有机层用盐水洗涤,干燥 (MgSO₄) 并过滤。将溶剂真空蒸发,得到浅黄色固体 (15g),将其直接用于下一步骤。

[0272] 步骤 2 :往装有磁力搅拌棒的 250mL 圆底烧瓶中加入在乙酸 (80mL) 中的铁粉 (15.6g, 0.3mol) 并在 N₂ 下加热至 80℃ (油浴)。经滴液漏斗经 15 分钟往该混合物中缓慢加入以上得自步骤 1 的在乙酸 (80mL) 中的硝基氨基吡啶 (10g, 55mmol)。在加入后,将该混合物于 80℃ 下再搅拌 30 分钟。在冷却后,反应混合物用 EtOAc 稀释,经 celite 硅藻土过滤并将溶剂真空蒸发。将残余物溶解在 EtOAc 中并用 3N NaOH、盐水洗涤,经 MgSO₄ 干燥并真空浓缩,得到 3-氨基-2-氰基-5-氯吡啶 (主要) 与 2-酰胺的 4 : 1 混合物 (7.7g)。将该混合物直接用于下一步骤 :MS (ES) (M+H)⁺ 理论值 154.0, 实测值 154.0。

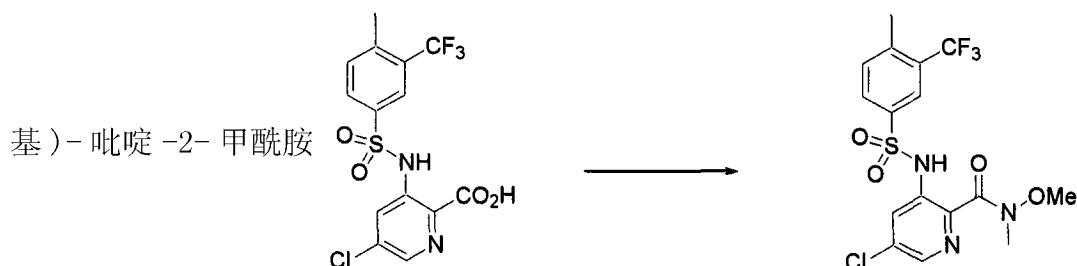
[0273] 步骤 3 :往 100mL 圆底烧瓶中装入以上 3-氨基-2-氰基-5-氯吡啶混合物 (7.7g, 50mmol)、4-氯-3-三氟甲基苯磺酰氯 (28g, 100mmol) 和吡啶 (50mL)。将得到的溶液加热至 70℃ 并搅拌 5 小时。将吡啶真空除去并加入 80% EtOH 水溶液 (260mL), 随后加入 NaOH (30g, 0.75mol)。在回流下将该混合物搅拌 12 小时。随后将溶剂真空除去并加入冰 (100g)。pH 用浓 HCl 调节至 2-3。得到的水溶液用 EtOAc 萃取,用盐水洗涤,经 MgSO₄ 干燥,随后真空浓缩。得到的浅黄色固体用 EtOAc/ 己烷 (1 : 1) 重结晶,得到白色针状的所需酸 (10g, 总产率为 44%) :¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 10.80 (s, 1H), 8.23 (m, 3H), 8.00 (d, 1H), 7.63 (d, 1H) ; MS (ES) (M+H)⁺ 理论值 415.0, 实测值 415.0。

[0274] 中间体 8 :N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡



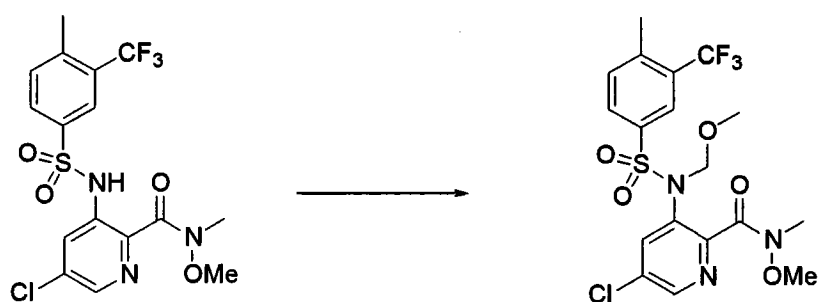
[0275] 将 5-氯-3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡啶-2-甲酸 (15.8g, 38mmol)、N,N-二甲基羟基胺·盐酸盐 (11.1g, 114mmol)、DIEA (41mL, 228mmol) 和 BOP (69g, 156mmol) 悬浮在 80mL DMF 中并在室温下搅拌过夜。反应混合物用 1 (M) HCl (100mL) 稀释, 用 EtOAc 萃取, 随后有机部分用 1 (M) HCl 水溶液、NaHCO₃ 和盐水洗涤。将合并的有机萃取液干燥 (Na₂SO₄), 过滤并减压浓缩。得到的残余物经快速柱色谱纯化, 得到 N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡啶-2-甲酰胺; MS m/z : (H) 458.0。

[0276] 中间体 9 : N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-(4-甲基-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡啶-2-甲酰胺



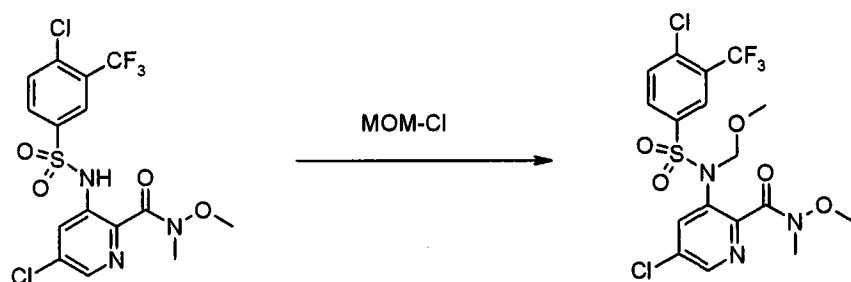
[0277] 中间体 10 : 采用先前实施例中所述方法, 由 5-氯-3-(4-甲基-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡啶-2-甲酸制备 N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-(4-甲基-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡啶-2-甲酰胺。

[0278] 中间体 11 : N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-[甲氧基甲基-(4-甲基-3-三氟甲基-苯磺酰基)-氨基]-吡啶-2-甲酰胺



[0279] 往氢化钠 (164mg, 4.10mmol) 在 5mL THF 中的混合物中加入 N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-(4-甲基-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡啶-2-甲酰胺 (1.50g, 3.42mmol) 和氯甲基甲基醚 (0.388mL, 5.13mmol) 在 5mL THF 中的混合物。在室温下将该混合物搅拌过夜。在除去溶剂后, 残余物经快速柱纯化 (20% 乙酸乙酯 / 己烷), 得到 1.50g 白色固体状的标题化合物 : (M⁺+H) 理论值 482.0, 实测值 482.0。

[0280] 中间体 12 : N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-[甲氧基甲基-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基)-氨基]-吡啶-2-甲酰胺



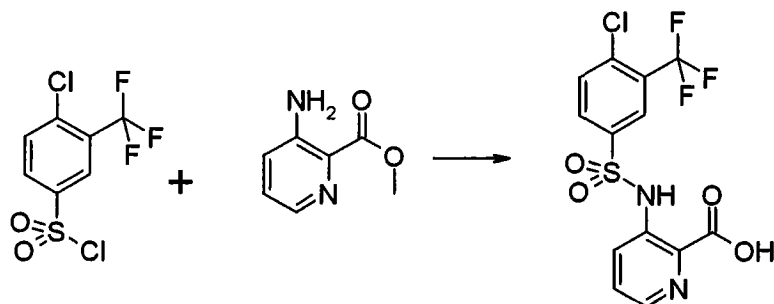
[0281] 往氢化钠 (314mg, 7.86mmol) 在 8mL THF 中的悬浮液中加入 N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡啶-2-甲酰胺 (3.0g, 6.55mmol) 和氯甲基甲基醚 (0.741mL, 9.825mmol) 在 8mL THF 中的混合物。在室温下将该混合物搅拌过夜。在除去溶剂后, 残余物经快速柱纯化 (20% 乙酸乙酯 / 己烷), 得到 2.70g 白色固体状的标题化合物。($M+H$)⁺ 理论值 502.0, 实测值 502.0。

[0282] 中间体 13: 3-氨基-吡啶-2-甲酸甲酯



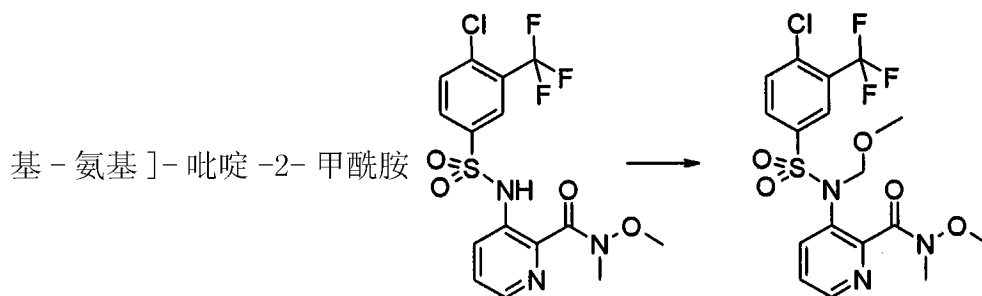
[0283] 将 400mg (2.9mmol) 3-氨基-吡啶-2-甲酸溶解在 3mL 甲醇中。在 0℃ 下, 往该溶液中滴加 1.6mL 2M (三甲基甲硅烷基) 重氮甲烷在乙醚中的溶液, 随后在室温下将该混合物搅拌 2 小时。该溶液用乙酸乙酯稀释并用碳酸氢钠水溶液洗涤。快速色谱纯化, 得到酯产物。C₇H₈N₂O₂, LC-MSD m/z [$M+H$]⁺ = 153.0; HPLC 保留时间: 0.2 分钟。

[0284] 中间体 14: 3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡啶-2-甲酸



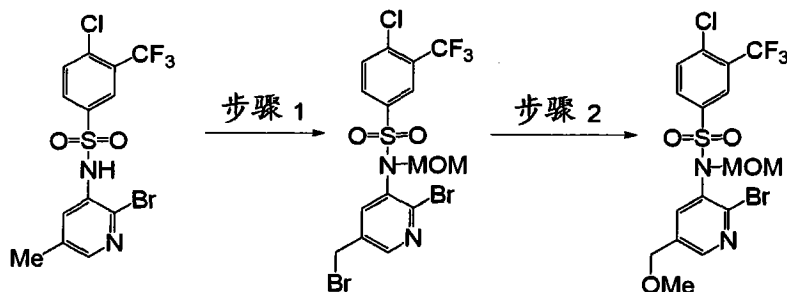
[0285] 采用在制备中间体 6 中用于制备 4-氯-N-(2-氰基-5-甲基吡啶-3-基)-3-(三氟甲基)苯磺酰胺的方法, 由在 3mL 吡啶中的 0.60g (2.17mmol) 4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰氯和 0.30g (1.97mmol) 3-氨基-吡啶-2-甲酸甲酯制备。将溶剂转为 THF, 随后加入 1M LiOH 水溶液并将该混合物搅拌 1 小时。将该混合物的 pH 调节至中性, 产物用乙酸乙酯萃取。C₁₃H₈ClF₃N₂O₄S, LC-MSD m/z [$M+H$]⁺ = 380.9, 383.0; HPLC 保留时间: 1.8 分钟。

[0286] 中间体 15: N-甲氧基-N-甲基-3-[(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基)-甲氧基甲



[0287] 采用制备中间体 12 中使用的方法,由在 7mL THF 中的 1.05g(2.48mmol)N-甲氧基-N-甲基-3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-吡啶-2-甲酰胺、1.71g 碳酸钾和 566 μ L 甲氧基甲基氯制备。得到 420mg 的白色固体。 $C_{17}H_{17}ClF_3N_3O_5S$, LC-MSD m/z [M+Na] $^+$ = 490.0, 491.9; HPLC 保留时间: 2.5 分钟。

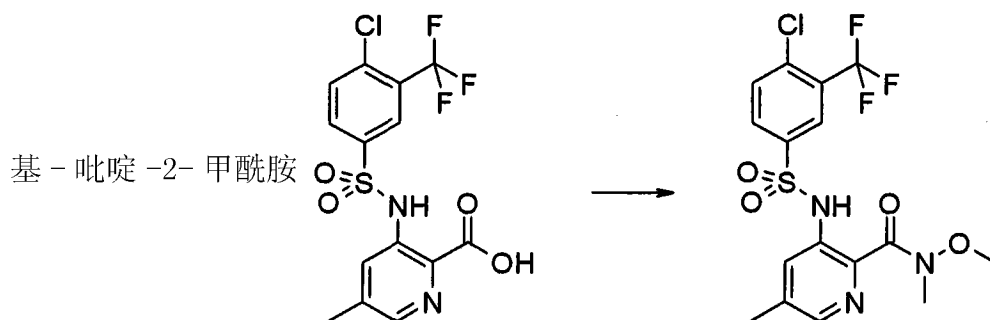
[0288] 中间体 16: 4-氯-N-(2-(5-甲氧基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-羰基)-5-(甲氧基甲基)吡啶-3-基)-3-(三氟甲基)苯磺酰胺



[0289] 步骤 1: 往溴吡啶 (132mg, 0.28mmol) 在四氯化碳 (4mL) 中的溶液中加入 N-溴代琥珀酰亚胺 (60mg, 1.2 当量), 随后加入 2,2'-偶氮二异丁腈 (AIBN, 4.6mg, 0.1 当量)。60℃ 下, 在将反应混合物加热过夜。在冷却至室温后, 除去过量的四氯化碳, 残余物经快速硅胶色谱纯化 (33% EtOAc/ 己烷)。得到白色固体状的所需产物 (107mg, 70%)。MS: (M+H)/z = 551.

[0290] 步骤 2: 将得自以上步骤 1 的产物 (51mg, 0.093mmol) 溶解在 3mL 甲醇中。往得到的溶液中加入甲醇钠 (10mg, 2.0 当量)。在 50℃ 下将反应混合物加热过夜。在冷却至室温后, 该反应用饱和氯化铵溶液猝灭, 该混合物用乙酸乙酯萃取。该萃取液用盐水洗涤, 经 $MgSO_4$ 干燥并真空浓缩。粗品经快速硅胶色谱纯化 (33% EtOAc/ 己烷)。得到白色固体状的所需产物 (42mg, 90%)。MS: (M+H)/z = 503.

[0291] 中间体 17: N-甲氧基-N-甲基-3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-5-甲

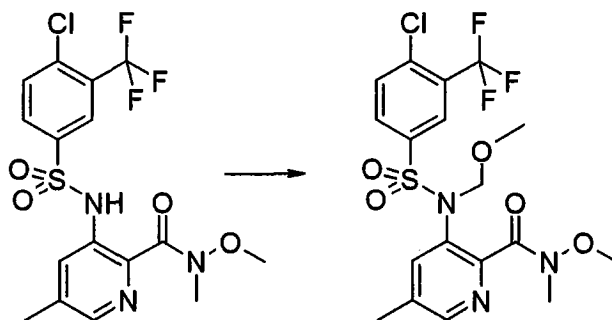


[0292] 将在 40mL 回流 THF 中的 10.49g(26.6mmol) 3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-5-甲基-吡啶-2-甲酸与 5.40g(33.2mmol) N,N'-羰基二咪唑反应 3 小时。将温度

降至 50℃, 加入 2.86g (29.3mmol) 0,N-二甲基-羟基胺·盐酸盐并在 50℃下将该反应搅拌过夜。减压除去一半的溶剂, 反应混合物用 200mL 冷水稀释。将固体滤出, 用 100mL 水洗涤并干燥, 得到 9.8g (84%) 棕褐色粉末状的产物。

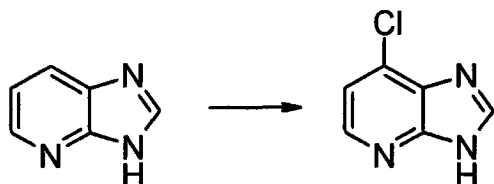
[0293] 中间体 18 : N-甲氧基-N-甲基-3-[(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基)-甲氧基甲

基-氨基]-5-甲基-吡啶-2-甲酰胺

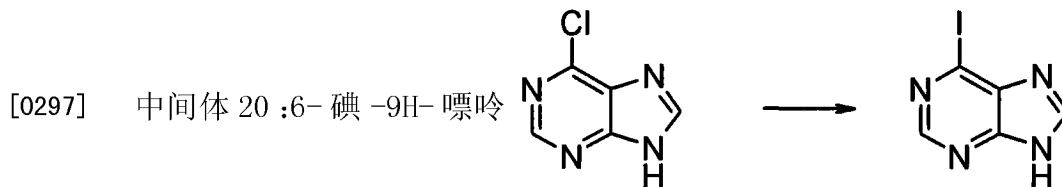


[0294] 采用用于制备中间体 12 的方法, 由在 1mL THF 中的 223mg (0.51mmol) N-甲氧基-N-甲基-3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-5-甲基-吡啶-2-甲酰胺、352mg 碳酸钾和 116 μ L 甲氧基甲基氯制备, 得到 200mg 的白色固体。C₁₈H₁₉ClF₃N₃O₅S, LC-MSD m/z [M+H]⁺ = 482.0, 484.0; HPLC 保留时间: 2.5 分钟。

[0295] 中间体 19 : 7-氯-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶



[0296] 产物采用 Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 3165-3168 的方法制备。



[0297] 中间体 20 : 6-碘-9H-嘌呤

[0298] 在 0℃下将 6-氯-9H-嘌呤 (684mg, 4.46mmol) 和 6mL 57% 氢碘酸的混合物搅拌 1.5 小时。反应得到 840mg 白色粉末状的产物。将固体滤出, 悬浮在 5mL 水中并用氨水溶液使 pH = 8。将悬浮液冷却至 0℃并将该固体滤出, 用冷水洗涤并干燥, 得到产物。

[0299] 中间体 21 : 4-碘-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



[0300] 在室温下, 将 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (673mg, 4.41mmol) 和 7mL 57% 氢碘酸的混合物搅拌 16 小时。将固体滤出, 悬浮在 5mL 水中, 用氨水溶液使 pH = 8。将该悬浮液冷却至 0℃, 将该固体滤出, 用冷水洗涤并干燥, 得到 970mg 白色粉末状的产物。该产物含约 10% 起始原料。

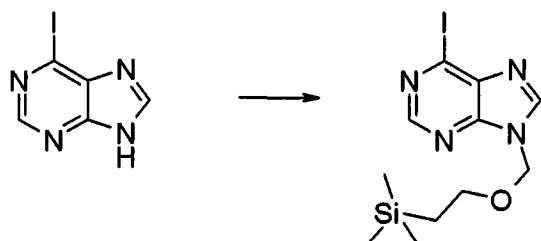
[0301] 中间体 22 : 7-碘-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶



[0302] 在 80℃ 下, 将 7-氯-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶 (1.47g, 9.64mmol) 和 15mL 57% 氢碘酸的混合物反应 4 小时。在将固体滤出后, 将其重新与 10mL 新鲜 57% 氢碘酸反应。该反应得到 1.3g 黑色粉末状的产物, 纯度为 90%。碘代杂环的 N- 保护的一般方法

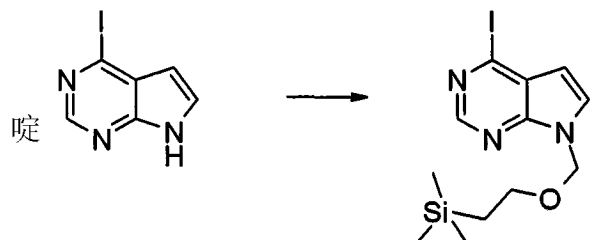
[0303] 将 1.65mmol 碘代杂环溶解在 2mL DMF 中并冷却至 0℃。往该溶液中加入 1.81mmol 60% 氢化钠, 随后经 5 分钟滴加 1.81mmol 三甲基甲硅烷基乙氧基甲基氯。在 0℃ 下将该溶液搅拌 0.5 小时, 随后在室温下搅拌 0.5 小时。往该溶液中加入 10mL 水, 该混合物用 10mL 乙醚萃取两次。有机层用 10mL 水洗涤, 随后经无水硫酸镁干燥, 减压蒸发并经硅胶纯化, 使用乙酸乙酯/己烷洗脱。

[0304] 中间体 23: 6-碘-9-(2-三甲基甲硅烷基-乙氧基甲基)-9H-嘌呤



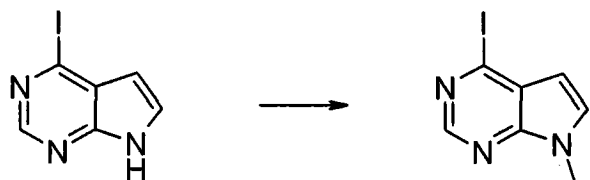
[0305] 将 405mg (1.65mmol) 6-碘-9H-嘌呤溶解在 2mL DMF 中。加入 72mg (1.81mmol) 60% 氢化钠, 随后加入 320 μL (1.81mmol) 三甲基甲硅烷基乙氧基甲基氯。得到: 343mg 油状产物。

[0306] 中间体 24: 4-碘-7-(2-三甲基甲硅烷基-乙氧基甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



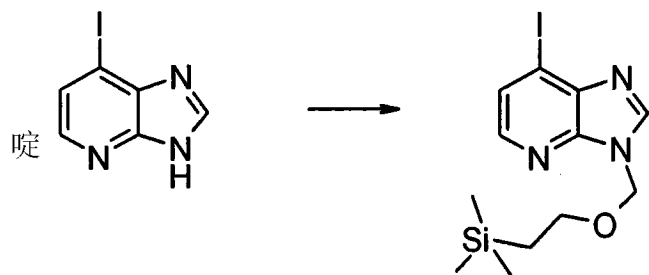
[0307] 将 610mg (2.49mmol) 4-碘-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶溶解在 2.5mL DMF 中。加入 110mg (2.74mmol) 60% 氢化钠, 随后加入 480 μL (2.74mmol) 三甲基甲硅烷基乙氧基甲基氯。得到: 750mg 油状产物, 90% 纯度。

[0308] 中间体 25: 4-碘-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



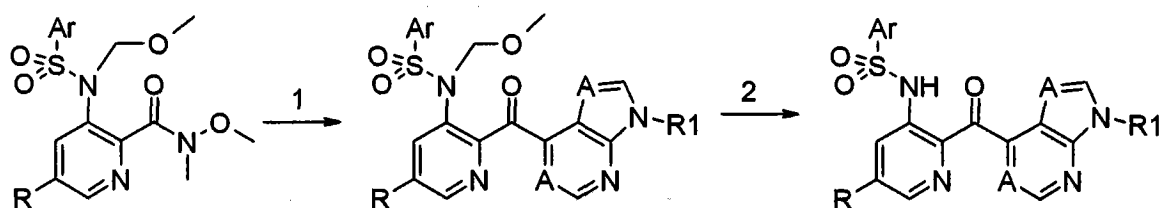
[0309] 将 206mg (0.84mmol) 4-碘-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶溶解在 1mL DMF 中, 加入 0.37mg (0.92mmol) 60% 氢化钠, 随后加入 58 μL (0.92mmol) 碘甲烷。该反应通过加入 10mL 水猝灭, 将固体滤出, 用 10mL 水洗涤, 随后用 10mL 己烷洗涤并干燥。得到: 142mg 棕褐色粉末, 90% 纯度。

[0310] 中间体 26 :7- 碘 -3-(2- 三甲基甲硅烷基 - 乙氧基甲基)-3H- 咪唑并 [4,5-b] 吡



[0311] 将 850mg (3.47mmol) 7- 碘 -3H- 咪唑并 [4,5-b] 吡啶溶解在 3.5mL DMF 中。加入 153mg (3.82mmol) 60% 氢化钠, 随后加入 670 μ L (3.82mmol) 三甲基甲硅烷基乙氧基甲基氯。得到 :424mg 油状产物, 90% 纯度。

[0312] 一般方法 A : 由 Weinreb 酰胺制备酮



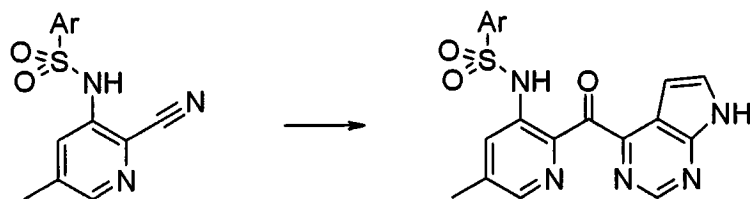
[0313] 步骤 1 : Grignard 试剂的加入

[0314] 在氮气气氛下, 将 1mmol 碘代杂环溶解在 4mL THF 中并冷却至 -30°C 。滴加 0.50mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液。将该混合物升至 -10°C 并搅拌 10 分钟, 使得碘 - 镁离子交换完全。随后 将该溶液冷却至 -20°C 并加入 1.0mmol 固体 Weinreb 酰胺。在 5 分钟后, 让该混合物升至室温并在室温下搅拌 1 小时。加入氯化铵水溶液, 该混合物用 DCM 萃取。将有机层减压蒸发。经快速硅胶色谱, 使用乙酸乙酯 / 己烷洗脱, 得到产物。

[0315] 步骤 2 : 脱保护

[0316] 将 1mmol 受保护的酮中间体溶解在 20mL 甲醇和 20mL 6N 盐酸的混合物中。在 95°C 下, 将该溶液在密封管中加热 8 小时, 随后冷却并蒸发。将残余物溶解在氨 / 甲醇中并在硅胶上减压蒸发。经快速硅胶色谱纯化, 使用乙酸乙酯 / 己烷洗脱, 得到黄色固体状的产物。在一些情况中, 为得到纯的产物增加反相 HPLC 纯化步骤是必要的。

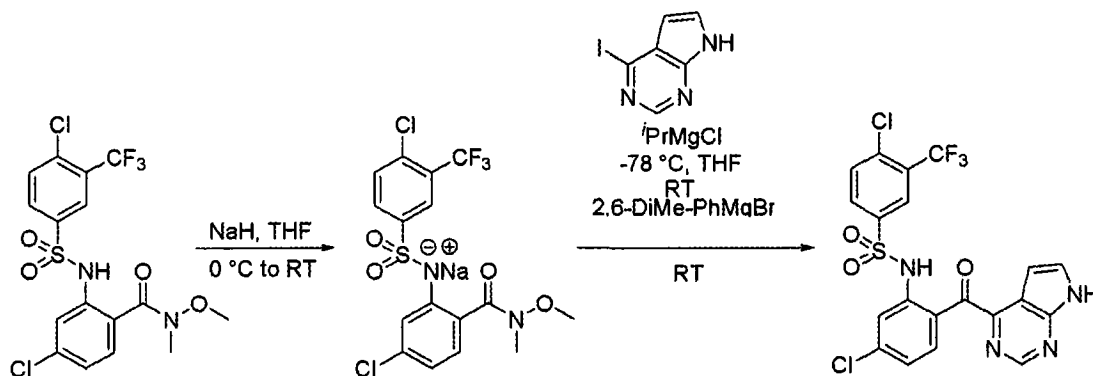
[0317] 一般方法 B : 由腈制备酮的一般方法



[0318] 在氮气气氛下, 将 1mmol 4- 碘 -7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶溶解在 2.8mL THF 中并冷却至 -10°C 。滴加 0.50mL 2M 苯基氯化镁在 THF 中的溶液, 随后加入 0.50mL 2M 异丙基氯化镁溶液在 THF 中的溶液。将该混合物升至室温并搅拌 1 小时, 使得碘 - 镁离子交换完全。制备 0.77mmol 相应的腈在 1mL THF 中的单独溶液并往其中加入 0.96mmol 60% 氢化钠。将溶液合并, 在 45°C 下将该混合物搅拌 8 小时。将反应混合物冷却至室温, 加入 0.52mL 浓盐酸, 在 50°C 下将该混合物搅拌 0.5 小时。将该固体滤出并用三份 10mL THF 洗涤, 随后用 10mL 乙醚和四份 1N 盐酸洗涤。将该固体溶解在碳酸氢钠水溶液和乙酸乙酯的混合物中。

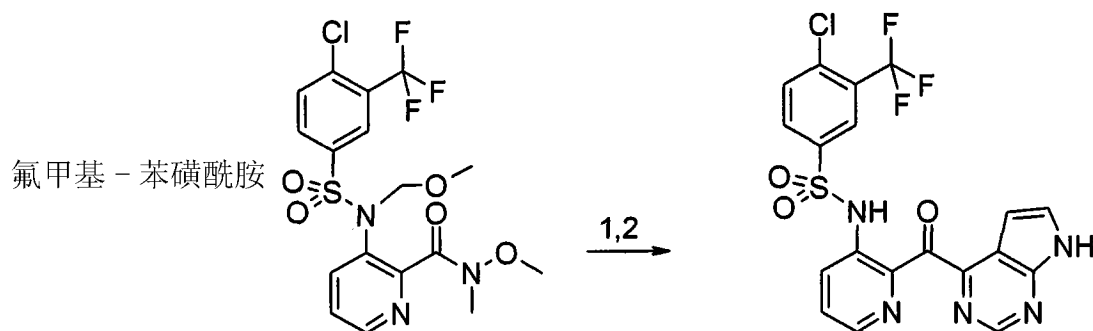
有机层通过硅胶垫并减压蒸发,得到产物。

[0319] 实施例 1: 4-氯-N-[5-氯-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-苯基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺



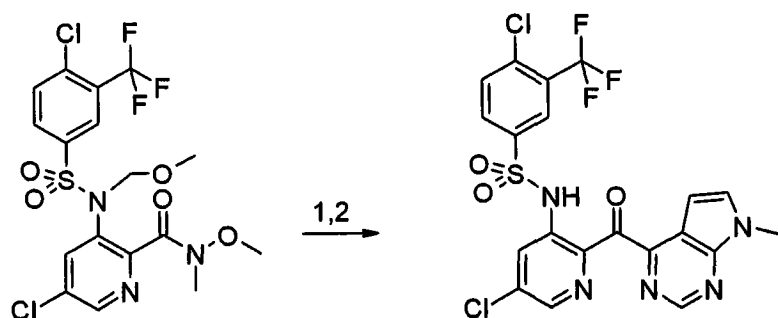
[0320] 在 -78°C 下往在 THF (5mL) 中的碘-吡咯并嘧啶 (0.882g, 3.6mmol) 中加入 $i\text{PrMgCl}$ (3.84mL, 7.56mmol; 1.97M 溶液, 在 THF 中)。在 15 分钟后, 将其升至室温并加入 2,6-二甲基苯基溴化镁 (2.4mL, 2.4mmol; 1.0M 溶液, 在乙醚中)。在室温下往反应混合物中加入 4-氯-2-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-N-甲氧基-N-甲基-苯甲酰胺钠盐的 THF 溶液 [通过在 THF (5mL) 中加入 60% NaH (0.144g, 3.6mmol) 单独制备] 并搅拌过夜。加入饱和 NH_4Cl 溶液 (5mL) 并用 EtOAc ($2 \times 50\text{mL}$) 萃取。EtOAc 层用盐水 (25mL) 洗涤, 干燥 (Na_2SO_4) 并蒸发。粗品经柱色谱纯化 (硅胶, 60% EtOAc/己烷), 随后用 CH_3CN 重结晶, 得到标题化合物 (1g), 其为黄色晶状固体, 产率为 67%。MS (ES) $\text{M}+\text{H}$ 理论值 515.0, 实测值 514.9。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 10.75 (s, 1H), 9.92 (brs., 1H), 8.92 (d, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.92 (dd, 1H), 7.81 (m, 2H), 7.58 (m, 1H), 7.45 (dd, 1H), 7.3 (d, 1H), 6.9 (m, 1H)。

[0321] 实施例 2: 4-氯-N-[2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三



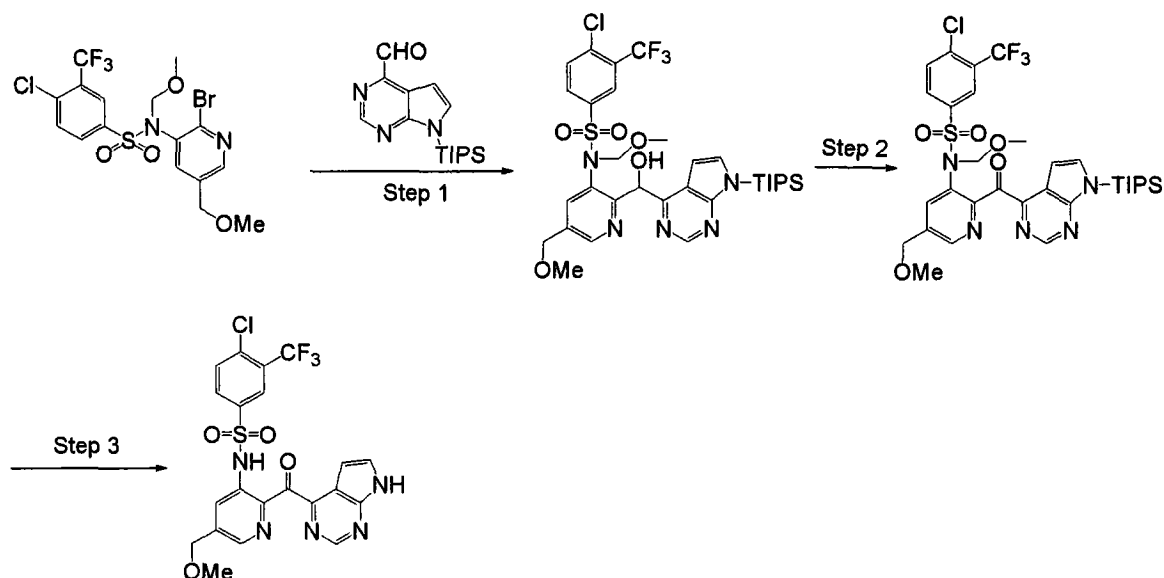
[0322] 由 248mg (0.53mmol) N-甲氧基-N-甲基-3-[(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基)-甲氧基甲基-氨基]-吡啶-2-甲酰胺、239mg (0.58mmol) 溶解在 2mL THF 中的 90% 4-碘-7-(2-三甲基甲硅烷基-乙氧基甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶并加入 0.32mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液制备。在第二步中使用所有得到的中间体酮与 4mL 甲醇和 4mL 6N 盐酸混合物, 在纯化后得到 29mg 黄色固体状最终产物。

[0323] 实施例 3: 4-氯-N-[5-氯-2-(7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺



[0324] 由 227mg (0.45mmol) N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-[(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基)-甲氧基甲基-氨基]-吡啶-2-甲酰胺、129mg (0.45mmol) 溶解在 2mL THF 中的 90% 4-碘-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶并加入 0.23mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液制备。在第二步中使用所有得到的中间体酮 (80mg) 与 2mL 甲醇和 2mL 6N 盐酸的混合物，在纯化后得到 45mg 黄色固体状的最终产物。

[0325] 实施例 4: 4-氯-N-(5-(甲氧基甲基)-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)吡啶-3-基)-3-(三氟甲基)苯磺酰胺的制备



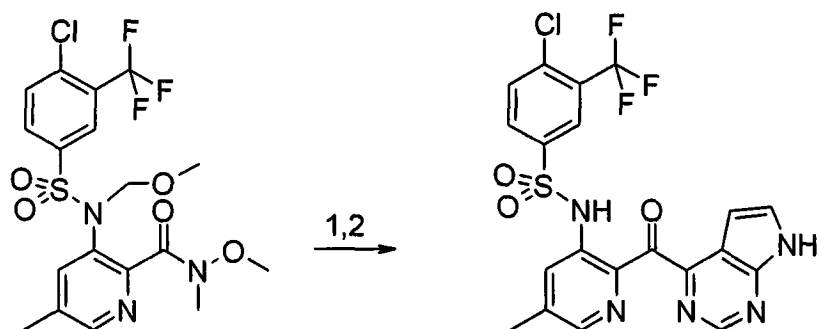
[0326] 步骤 1: 在 0℃ 下, 往由实施例 13 (步骤 2) (74mg, 0.15mmol) 得到的溴吡啶在 THF (1mL) 中的溶液中滴加异丙基氯化镁 (147 μ L, 2.0M, 在 THF 中)。在 45 分钟后, 加入 7-(三异丙基甲硅烷基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-甲醛 (67mg, 0.22mmol) 在 THF 中的溶液。将反应混合物升至室温并搅拌过夜。该反应用饱和氯化铵溶液猝灭, 该混合物用乙酸乙酯萃取。萃取液用盐水洗涤, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。粗品经快速硅胶色谱纯化 (33% EtOAc/己烷)。得到所需产物, 为泡沫状黄色固体 (45mg, 42%)。MS: (M+H)/z = 728.

[0327] 步骤 2: 将由以上步骤 1 得到的产物 (45mg, 0.062mmol) 溶解在 3mL 二氯甲烷中。往得到的溶液中加入戴斯-马丁高价碘化物 (Dess-Martin periodinane) (42mg, 1.6 当量) 并在室温下搅拌过夜。该反应用 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 猝灭, 该混合物用乙酸乙酯萃取。萃取液用饱和 NaHCO_3 、盐水洗涤, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。粗品经快速硅胶色谱纯化 (33% EtOAc/己烷)。得到所需产物, 为泡沫状黄色固体 (35mg, 78%)。MS: (M+H)/z = 726.

[0328] 步骤 3: 将由以上步骤 2 得到的产物 (35mg, 0.048mmol) 溶解在 4mL HCl-二噁烷 (4.0M) 和 1mL 水中。在 85℃ 下将该混合物加热 30 分钟并用饱和 NaHCO_3 猝灭。该混合物

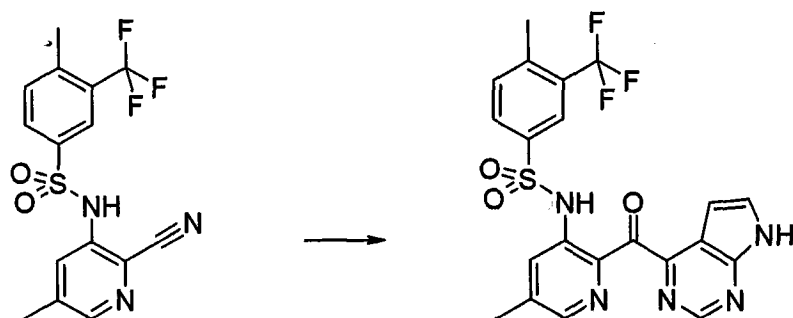
用乙酸乙酯洗涤。萃取液用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥并真空浓缩,粗品经快速硅胶色谱纯化(10% 甲醇 /DCM)。得到黄色固体状的所需产物(15mg,60%)。MS:(M+H)/z = 526.

[0329] 实施例 5:4-氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺



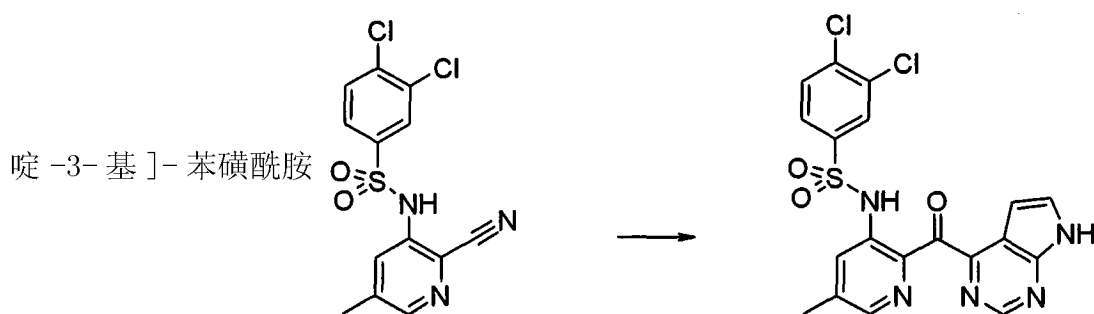
[0330] 由 200mg (0.42mmol) N-甲氧基-N-甲基-3-[(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基)-甲氧基甲基-氨基]-5-甲基-吡啶-2-甲酰胺、202mg (0.50mmol) 溶解在 2mL THF 中的 90% 4-碘-7-(2-三甲基甲硅烷基-乙氧基甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶并加入 0.25mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液制备。在第二步中使用所有得到的中间体酮与 2mL 甲醇和 2mL 6N 盐酸的混合物,在纯化后得到 29mg 黄色固体状的最终产物。

[0331] 实施例 6:4-甲基-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺



[0332] 由 496mg (1.40mmol) N-(2-氰基-5-甲基-吡啶-3-基)-4-甲基-3-三氟甲基-苯磺酰胺和 70mg (1.75mmol) 60% 氢化钠在 2mL THF 中制备。Grignard 溶液由 467mg (1.82mmol) 溶解在 5mL THF 中的 95% 4-碘-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶并加入 0.98mL 2M 苯基氯化镁在 THF 中溶液和 0.98mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液制备。该反应得到 340mg 黄色固体状的最终产物。

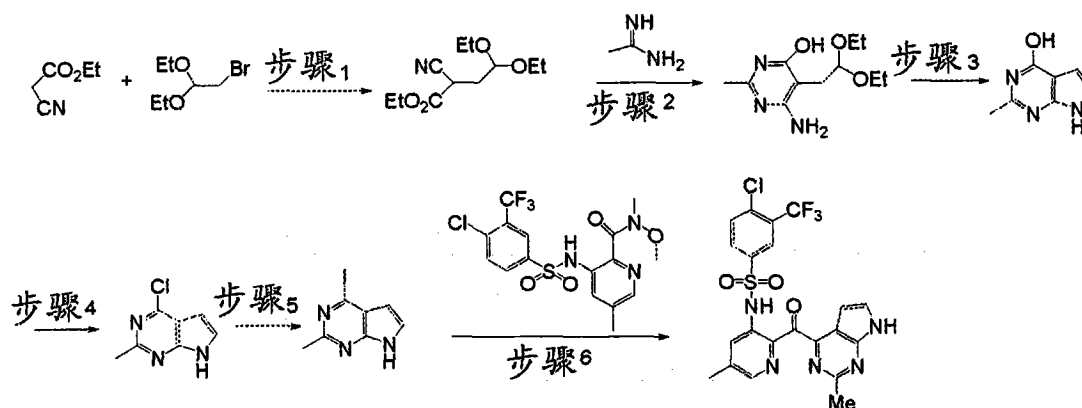
[0333] 实施例 7:3,4-二氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡



[0334] 由 563mg (1.55mmol) 3,4-二氯-N-(2-氰基-5-甲基-吡啶-3-基)-苯磺酰胺钠盐、506mg (2.01mmol) 溶解在 6mL THF 中的 97% 4-碘-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶并加入

1. 16mL 1.8M 苯基氯化镁在 THF 中的溶液和 1.06mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液制备。该反应得到 471mg 黄色固体状的最终产物。

[0335] 实施例 8: 4-氯-N-(5-甲基-2-(2-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)吡啶-3-基)-3-(三氟甲基)苯磺酰胺的制备



[0336] 步骤 1: 在 -10°C 下往 NaH(60%, 分散在矿物油中, 1.62g, 40.5mmol) 在 DMF (35mL) 和苯 (12mL) 中的悬浮液中滴加氰基乙酸乙酯 (4.7mL, 44.2mmol)。在室温下搅拌 1 小时后, 加入 2-溴-1,1-二乙氧基乙烷 (5.6mL, 0.82 当量) 并在 100°C 下将反应混合物加热 2 小时。随后将反应混合物冷却至室温并过滤。将滤液浓缩, 加入水。该混合物用乙醚萃取。该萃取液用盐水洗涤, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。粗品经快速硅胶色谱纯化 (20% EtOAc/己烷)。得到无色油状的所需产物 (5g, 60%)。MS: $(\text{M}+\text{Na})/z = 252$ 。

[0337] 步骤 2: 往乙醇钠 (594mg, 2.0 当量) 在乙醇 (8mL) 中的溶液中加入盐酸乙脒 (413mg, 4.4mmol)。在室温下搅拌半小时后, 通过过滤除去得到的氯化钠。往 2-氨基-4,4-二乙氧基丁酸乙酯 (1.0g, 4.4mmol) 中加入滤液, 将该混合物回流 5 小时。除去大多溶剂, 将得到的浆状物溶解在冰水中并用乙酸乙酯萃取。萃取液用盐水洗涤, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。粗品经快速硅胶色谱纯化 (100% 甲醇)。所需产物为红色固体 (421mg, 40%)。MS: $(\text{M}+\text{H})/z = 242$ 。

[0338] 步骤 3: 往硫酸 (0.9mL) 在 50mL 乙醇中的溶液中加入以上嘧啶 (2.0g, 8.30mmol) 并回流 2 小时。在冷却至室温后, 将该混合物真空浓缩。粗品 (溶于水) 直接用于下一步骤。MS: $(\text{M}+\text{H})/z = 150$ 。

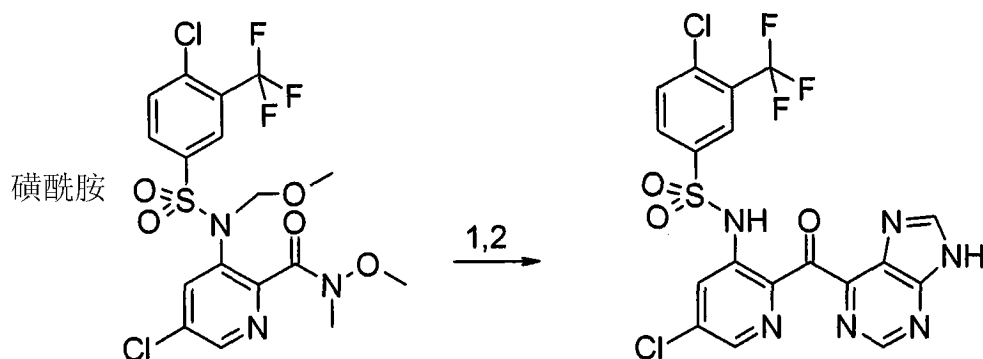
[0339] 步骤 4: 将 90mg (0.60mmol) 以上羟基吡咯并嘧啶在 2mL 磷酰氯中的悬浮液回流 2 小时。除去过量的磷酰氯, 残余物小心地用冰猝灭。该混合物用乙酸乙酯萃取。该萃取液用盐水洗涤, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。粗品经快速硅胶色谱纯化 (10% 甲醇/DCM)。得到无色固体状的所需产物 (86mg, 85%)。MS: $(\text{M}+\text{H})/z = 168$ 。

[0340] 步骤 5: 往氢碘酸水溶液 (57 重量%, 在水中, 1.5mL) 中加入以上氯吡咯并嘧啶 (40mg, 0.24mmol) 并在 35°C 下将该混合物加热过夜。在冷却至室温后, 加入羟胺溶液, 该混合物用乙酸乙酯萃取。该萃取液用盐水洗涤, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。得到褐色固体状的所需产物 (50mg, 80%)。MS: $(\text{M}+\text{H})/z = 260$ 。

[0341] 步骤 6: 在 0°C 下往 3-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基磺酰氨基)-N-甲氧基-N,5-二甲基吡啶甲酰胺 (56mg, 0.13mmol) 在 THF (1mL) 中的溶液中加入 NaH(60%, 在矿物油中的分散体, 6mg, 1.2 当量)。随后将该反应升至室温并搅拌 0.5 小时。

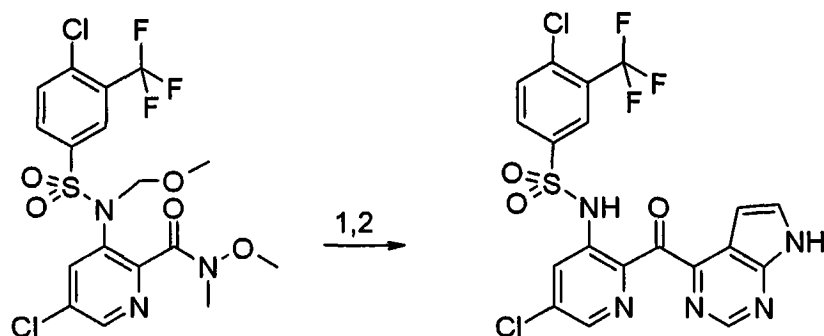
[0342] 往单独的烧瓶中装入在 0.5mL THF 中的上述碘吡咯并嘧啶 (40mg, 1.2 当量)。将该溶液冷却至 -78°C , 滴加异丙基氯化镁在 THF 中的溶液 (2.0M, 167 μL)。随后将反应混合物升至室温并加入 2,6-二甲基苯基溴化镁在 THF 中的溶液 (1.0M, 167 μL , 1.3 当量)。在搅拌半小时后, 往以上 Weinreb 酰胺溶液中加入该混合物并将该反应继续搅拌 1 小时, 随后用饱和氯化铵溶液猝灭。该混合物用乙酸乙酯萃取。该萃取液用盐水洗涤, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。粗品经快速硅胶色谱纯化 (33% EtOAc/ 己烷)。得到黄色固体状的所需产物 (31mg, 40%)。MS: (M+H)/z = 510。

[0343] 实施例 9: 4-氯-N-[5-氯-2-(9H-嘌呤-6-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺



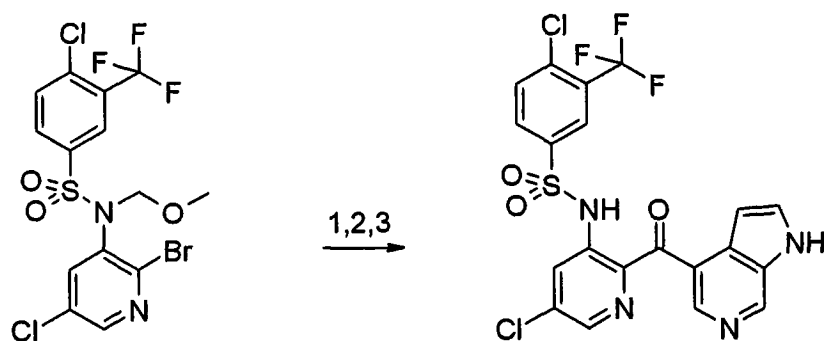
[0344] 由 256mg (0.51mmol) N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-[(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基)-甲氧基甲基-氨基]-吡啶-2-甲酰胺、191mg (0.51mmol)、溶解在 2mL THF 中的 6-碘-9-(2-三甲基甲硅烷基-乙氧基甲基)-9H-嘌呤并加入 0.25mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液制备。将所有得到的中间体酮与 1mL 甲醇和 1mL 6N 盐酸的混合物用于第二步, 在纯化后得到 2.05g 黄色固体状的最终产物。

[0345] 实施例 10: 4-氯-N-[5-氯-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺



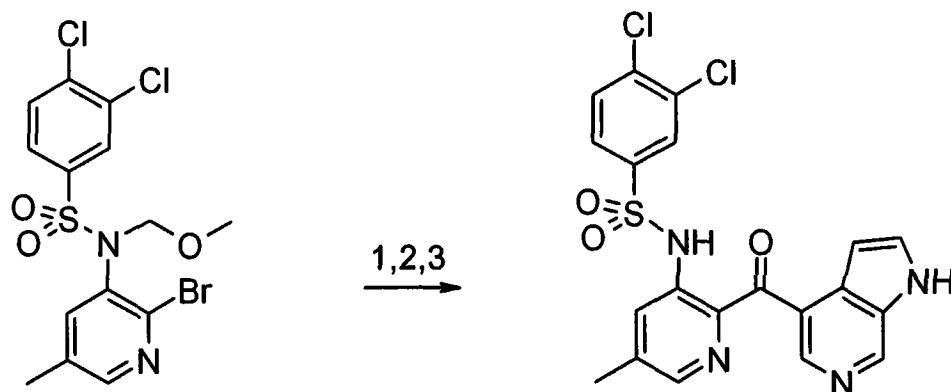
[0346] 由 259mg (0.52mmol) N-甲氧基-N-甲基-5-氯-3-[(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基)-甲氧基甲基-氨基]-吡啶)-2-甲酰胺、213mg (0.52mmol)、溶解在 2mL THF 中的 90% 4-碘-7-(2-三甲基甲硅烷基-乙氧基甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶并加入 0.26mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液制备。将所有得到的中间体酮与 2mL 甲醇和 2mL 6N 盐酸的混合物用于第二步, 在纯化后得到 40mg 黄色固体状的最终产物。

[0347] 实施例 11: 4-氯-N-[5-氯-2-(1H-吡咯并[2,3-c]吡啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺



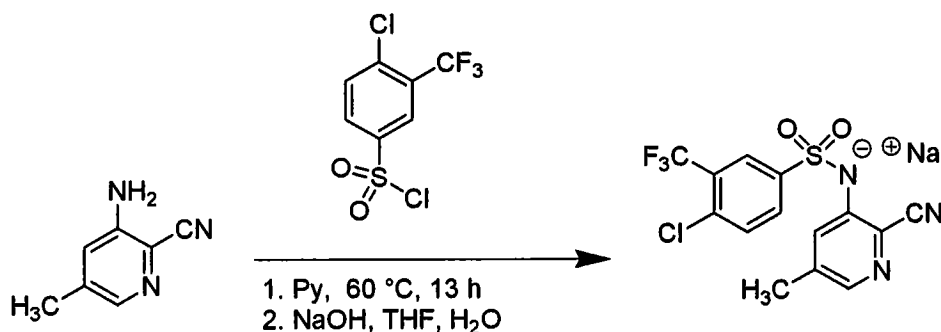
[0348] 由 494mg (1.00mmol) 溶解在 2mL THF 中的 N-(2-溴-5-氯-吡啶-3-基)-4-氯-N-甲氧基甲基-3-三氟甲基-苯磺酰胺、1.05mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液制备。将 146mg (1.00mmol) 1H-吡咯并 [2,3-c] 吡啶-4-甲醛溶解在 1mL THF 中，在室温下依次用 44mg (1.1mmol) 60% 氢化钠和 177 μ L (1mmol) 三甲基甲硅烷基乙氧基甲基氯处理，随后加入 Grignard 试剂溶液。得到 40mg 中间体醇。将所有这些与 74mg 溶解在 1mL DCM 中的戴斯-马丁高价碘化物 (Dess-Martin periodinane) 用于第二步。在 100℃ 下、2mL 甲醇和 2mL 6N 盐酸混合物中，使 31mg 得到的被保护的酮进行步骤 3，在纯化后得到 17mg 黄色固体状的最终产物。C₂₀H₁₁Cl₂F₃N₄O₃S, LC-MSD m/z [M+H]⁺ = 514.9, 516.9; HPLC 保留时间: 2.3 分钟。

[0349] 实施例 12:3, 4-二氯-N-[5-甲基-2-(1H-吡咯并 [2,3-c] 吡啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-苯磺酰胺



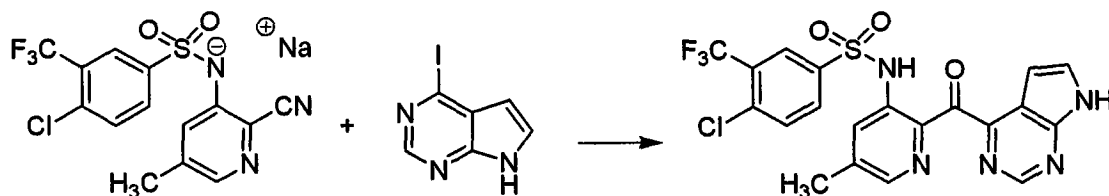
[0350] 由 204mg (0.464mmol) 溶解在 1mL THF 中的 N-(2-溴-5-甲基-吡啶-3-基)-3,4-二氯-N-甲氧基甲基-苯磺酰胺、0.49mL 2M 异丙基氯化镁在 THF 中的溶液制备。将 75mg (0.510mmol) 1H-吡咯并 [2,3-c] 吡啶-4-甲醛溶解在 1mL THF 中，在室温下用 22mg (0.557mmol) 60% 氢化钠处理，随后加入 Grignard 试剂溶液。将所有中间体醇与 300mg 溶解在 2mL DCM 中的戴斯-马丁高价碘化物 (Dess-Martin periodinane) 用于第二步。在 90℃ 下、6mL 甲醇和 6mL 6N 盐酸混合物中，使得到的被保护的酮进行步骤 3，在纯化后得到 22mg 黄色固体状的最终产物。C₂₀H₁₄Cl₂N₄O₃S, LC-MSD m/z [M+H]⁺ = 460.9, 462.9; HPLC 保留时间: 2.3 分钟。

[0351] 实施例 13:4-氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺钠盐 (a) 3-(4-氯-3-三氟甲基-苯磺酰基氨基)-5-甲基-吡啶-2-甲腈钠盐的合成:



[0352] 往 3-氨基-2-氰基-5-甲基吡啶 (83g, 0.619mol) 在吡啶 (625mL) 中的溶液中一次性加入 4-氯-3-三氟甲基苯磺酰氯 (207g, 0.742mol), 在 60℃ 下将得到的反应混合物搅拌过夜 (13 小时)。将吡啶真空除去, 加入 THF (350mL) 并真空除去。在 0℃ 下经 20 分钟往得到的深褐色固体中缓慢加入 (分 5 次) THF (650mL)、H₂O (550mL)、随后加入 NaOH (75g, 1.88mol)。在 0℃ 下将得到的溶液继续搅拌 30 分钟。在真空除去 THF (~650mL) 后, 加入 H₂O (50mL) 并将该悬浮液加热至所有固体溶解。在冰浴中冷却 2 小时后, 通过过滤收集得到的固体, 用冰水 (100mL×3) 洗涤并在 110℃ 下、真空箱中干燥 24 小时, 得到白色针状的标题化合物 (190g, 77%) : mp. 287.0–288.5℃。¹H NMR (400MHz, d₆-DMSO) δ 8.05 (1H, s), 7.96 (d, 1H), 7.76 (dd, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 2.12 (s, 3H)。MS (ES) M+H 理论值 375.9, 实测值 375.9。将母液真空浓缩 (~2/3 体积), 在洗涤和干燥后得到另外 30g 标题化合物, 总产率为 89%。

[0353] (b) 4-氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺



[0354] 在氮气气氛下、2L 装有机机械搅拌器和温度计的三颈圆底烧瓶中, 将 4-碘吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 (2b, 50.3g, 95.5% 纯度, 196mmol) 溶解 / 悬浮在 0.64L 无水 THF 中。将该溶液在干冰-丙酮浴中冷却至 -15℃ 并缓慢加入 206mL 1.0M 邻甲苯基氯化镁在 THF 中的溶液 (1.05 当量), 这样使得内部温度不超过 -10℃。在加入期间使所有的固体溶解。除去冷浴并经 3 分钟加入 104mL 1.95M 异丙基氯化镁的 THF 溶液 (1.03 当量)。在加入期间沉淀出棕褐色固体; 搅拌应剧烈以避免结块。使用温水浴将得到的溶液快速升至室温。往该悬浮液中加入 59.9g 在 120mL 无水 THF 中的脒的钠盐 (19, 0.77 当量) 并在 45℃ 下将得到的混合物搅拌 16 小时。将该混合物在冰浴中冷却并在剧烈搅拌下滴加 101mL 36% HCl 水溶液, 这样使得内部温度不超过 30℃。沉淀出黄色固体, 在 50℃ 下将整个粘稠的悬浮液机械搅拌 30 分钟 (黄色固体变为橙色), 冷却至室温随后过滤。该固体用 700mL THF 洗涤, 随后 700mL 乙醚洗涤, 再用每次 1L 1M HCl 水溶液洗涤两次。将得到的湿橙色固体置于 0.9L 乙酸乙酯、0.5L 水和 50g 碳酸氢钠的混合物中并搅拌直至完全溶解。该溶液经 **CELITE®** 硅藻土垫过滤, 将各层分离。水层用 50mL 乙酸乙酯萃取。合并的有机层经 200g 硅胶垫过

滤,随后用另 0.8L 乙酸乙酯洗涤。将该溶液真空浓缩,得到 56.5g 黄色固体状的化合物(含 2 重量%乙酸乙酯,产率为 74%)。

[0355] (c) 4-氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺钠盐

[0356] 将 4-氯-N-[5-甲基-2-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-羰基)-吡啶-3-基]-3-三氟甲基-苯磺酰胺(6.85g, 13.8mmol) 悬浮在 103mL 异丙醇中,在氮气气氛下将其回流。该悬浮液通过用 1.30mL 10.6N 氢氧化钠水溶液(1 当量)滴加并搅拌处理,直至所有固体溶解。让该混合物冷却至室温并加入晶种,随后在冰浴中进一步冷却。将该固体滤出并用 35mL 异丙醇洗涤,随后在 80℃下真空干燥过夜。产率:6.12g(86%)。IPA 含量为 800ppm(由 ^1H NMR 测定)。

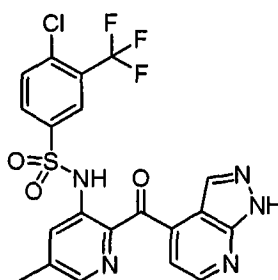
[0357] 实施例 14——实施例 13 化合物的 XPRD 对得自实施例 13 的物质进行 X-射线粉末衍射(XRPD)分析。使用铜 K α 射线用 Shimadzu XRD-6000X-射线粉末衍射仪进行该分析。该仪器装有细长聚焦 X-射线管。将该管电压和电流强度分别设定为 40kV 和 40mA。将发散狭缝和散射狭缝设定为 1° 和接受狭缝设定为 0.15mm。由 NaI 闪烁探测器检测衍射射线。以 3° / 分钟(0.02° / 0.4 秒的步幅) 2θ 值由 2.5 至 40° 进行 $\theta-2\theta$ 连续扫描。分析硅标准物来校准仪器。收集数据并使用 XRD-6100/7000v. 5.0 进行分析。在图 1 中描绘了 XPRD 扫描图。表 3 中记录了 2θ 值。实施例 13 化合物的晶型被指定为 A 型。

[0358] 在实施例 13 化合物的晶体中观察到以下所列峰值($2\theta^\circ$)和强度(CPS)。峰强度可根据粒径和形态而变化。表 3。

角度 $2\theta^\circ$	强度(CPS)
6.9	635
7.7	1555
10.6	340
11.3	250
11.8	125
12.5	165
13.7	255
15.1	300
15.3	305
16.1	490
16.9	290
17.3	485
18.2	195
18.5	190
19.5	250
20.0	1485
21.6	510
21.8	340
22.6	680
24.3	635
24.7	615
25.1	630
25.6	255
26.3	255
27.5	490
28.5	605
28.8	345
29.3	240
31.4	315
32.4	465

[0359] 比较实施例 1 :4- 氯 -N-(5- 甲基 -2-(1H- 吡唑并 [3,4-b] 吡啶 -4- 羰基) 吡

啉-3-基)-3-(三氟甲基)苯磺酰胺



[0360] 该化合物如 US 公开号 2007-0037794A1 中所述制备。

[0361] 在以下 CCR2 趋化因子测定中实施例 1-12 各化合物的 IC_{50} 小于 1000nM。在该测定中化合物 5 的平均 IC_{50} 为大约 5nM。

[0362] 体外试验的实例

[0363] 试剂

[0364] THP-1 细胞获自美国典型培养物保藏中心 (AmericanType Culture Collection, Manassas, VA), 并在湿润的 5% CO_2 培育箱于 37℃ 下, 在补充了 10% 胎牛血清 (FCS) 的 RPMI 组织培养基中培养。重组人趋化因子蛋白 MCP-1 获自 R&D Systems (Minneapolis, MN)。 ^{125}I 标记的 MCP-1 蛋白获自 Amersham (Piscataway, NJ)。ChemoTX[®] 趋化性微室购自 Neuro Probe (Gaithersburg, MD)。CyQUANT[®] 细胞增殖试剂盒购自 Molecular Probes (Eugene, Oregon)。钙指示染料 Fluo-4 AM 购自 Molecular Devices (Mountain View, CA)。

[0365] 常规迁移试验

[0366] 常规迁移试验用来测定潜在受体拮抗剂在阻断通过趋化因子 (例如 CCR2) 介导的迁移中的功效。该试验通常用具有 5 μm 孔径聚碳酸酯膜的 ChemoTX[®] 微室系统进行。开始该试验时, 细胞悬液用 GS-6R Beekman 离心机以 1000PRM 离心, 来收获趋化因子表达细胞 (例如 CCR2 试验为 THP-1 细胞)。对于 CCR2 试验按 10×10^6 个细胞 / ml 将细胞沉淀重新悬浮于趋化性缓冲液 (含 0.1% BSA 的 HBSS) 中。用趋化性缓冲液通过连续稀释, 由 10mM 贮备溶液制备所需浓度的试验化合物。将等体积的细胞与化合物混合, 在室温下温育 15 分钟。然后, 将 20 μl 混合物转移至迁移微室的多孔膜上, 另将 29 μl 趋化因子配体 (CCR2 试验为 0.1nM 趋化因子 MCP-1 蛋白) 放到下室。接着在 37℃ 下温育 (CCR2 为 90 分钟), 在此期间细胞逆趋化因子梯度移动, 通过除去过滤器顶部的细胞液滴来终止试验。为了定量测定跨膜迁移的细胞量, 将 5 μL 7×CyQUANT[®] 溶液加到下室各孔中, 在 SpectrafluorPlus 荧光读板仪 (TECAN, Durham, NC) 中测定荧光信号。通过对化合物处理细胞和未处理细胞之间迁移信号进行比较以确定抑制程度。用 Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego, CA) 通过非线性平方回归分析进一步计算出 IC_{50} 。

[0367] 药代动力学

[0368] 在比格犬 (beagle dog) 中测定实施例 5 化合物的药代动力学 (PK) 和口服生物利用度。

[0369] 在静脉推注给予雄性比格犬 ($n = 2$) 在 31.6% N, N-二甲基乙酰胺 / 36.8% 水 / 31.6% 丙二醇中的 1mg/kg 化合物 5 (游离碱) 后, 在以下时间收集血样: 给药前、给药后 2 分钟、5 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、8 小时、12 小时和 24 小时。在口服给

予雄性比格犬 ($n = 2$) 5mg/kg 在 1% 甲基纤维素 (methocel) 中的实施例 5 化合物后, 在以下时间收集血样: 给药前、给药后 5 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、8 小时、12 小时和 24 小时。

[0370] 使用 3% 甲酸 / 乙腈从血浆样品中萃取未受损实施例 5 化合物并使用 LC-MS/MS 方法测定。由非室性分析测定 PK 参数。观察动物不健康征兆和死亡。比格犬对于实施例 5 化合物耐受性良好未见不健康征兆或死亡。

[0371] 在静脉给予实施例 5 化合物后, 完整化合物 5 的血浆浓度以平均终消除半衰期 $t_{1/2}$ (4.7 小时) 以一次幂方式 (mono-exponentially) 降低。实施例 5 化合物以 0.2mL/ 分钟 / kg ($< 1\%$ 狗肝血流速) 从血浆中非常缓慢清除并表现出非常低的 0.1L/kg 分布体积 (V_{ss})。平均停留时间 (MRT_{iv}) 估计为 7.2 小时。在口服给予后, 实施例 5 化合物在 1.5 小时 (T_{max}) 后快速吸收达到 44.4 μ g/mL (约 59.5 μ M) 平均血浆峰值 (C_{max})。该化合物吸收良好, 口服生物利用度为约 100%。

[0372] 实施例 5 化合物表现出优异的静脉和口服 PK 分布。在静脉给予后, 其在比格犬中表现出非常低的清除率 (小于 1% 肝血流) 和长的平均停留时间 (约 7 小时)。同样化合物 5 口服吸收快速、良好, 生物利用度为约 100%。CYP2C9 和 CYP3A4 抑制测定

[0373] 在 37 °C 下、在 NADPH 和适宜浓度的 CYP2C9 和 3A4 的特异性底物存在下, 将试验化合物与收集的人肝微粒体温育。表 4 中概括了人肝微粒体和底物的最终测定浓度、DMSO 中起始底物储备液浓度和各种同工酶温育所用的时间。表 5 中列出了各同工酶测定中阳性抑制剂对照的最终测定浓度。表 4. 温育浓度

CYP450	蛋白浓度 [mg/mL]	底物	底物浓度 [μ M]	温育时间 [分钟]
2C9	0.05	双氯芬酸	10	10
3A4	0.05	咪达唑仑	3	10
	0.05	睾酮	100	30

表 5. 对照条件

CYP450	底物	对照	最终温育对照浓度 [μ M]						
			[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]
2C9	双氯芬酸	磺胺苯吡唑	50	17	5.6	1.9	0.62	0.2	0.069
3A4	咪达唑仑	酮康唑	1	0.33	0.11	0.037	0.012	0.0041	0.0014
	睾酮	酮康唑	1	0.33	0.11	0.037	0.012	0.0041	0.0014

温育

[0374] 往 96 孔板 A 列的所有孔中加入 120 μ L 人肝微粒体 (HLM) 在 50mM 磷酸钾 / 5mM $MgCl_2$ 缓冲液的混合物。微粒体蛋白的浓度为表 4 中记录的特定同工酶测定的预期蛋白浓度的两倍。此外, 将 80 μ L 掺入 1% DMSO 的该人肝微粒体制剂分配在 B 至 H 行的所有孔中。

[0375] 往 A 行的最开始 10 个孔中加入 1.2 μ L 在 DMSO 中的各试验化合物 (10mM) (5 种不同试验化合物, 一式两份)。另外, 往 A 行最后两个孔中加入 1.2 μ L 所研究的同工酶对照抑制剂的 DMSO 储备液, 得到以上最高最终浓度的两倍浓度。(见对于最终对照抑制剂浓度的

表 5)

[0376] 从 A 行的孔 (孔 1-12, 化合物和对照物两者) 中的各溶液中取 40 μ L 进行三倍系列稀释并稀释在 B 行的孔中。在充分混合后, 用多通道移液管 (12 个通道) 将 40 μ L B 行孔中的各溶液分配至 C 行的孔中并由此进一步稀释对照物和试验化合物。对于行 D 到 G 重复该操作。在混合后, 从 G 行的孔中移出并弃去 40 μ L。

[0377] 该方法的结果是在所有行 A 至 H 的所有孔中存在 80 μ L 溶液, 且在行中所有孔中蛋白质浓度为最终预期浓度的两倍, 在 A 至 G 行中试验化合物和对照物浓度为最终预期浓度的两倍。H 行不掺有试验化合物或阳性对照物。

[0378] 将该板覆盖并在 37°C 培养器中预温育 10 分钟。该反应通过加入 80 μ L 所研究同工酶的底物的溶液启动, 在存在 4mM NADPH 的 50mM 磷酸钾 / 5mM $MgCl_2$ 缓冲溶液中, 使用多通道移液管底物浓度为预期最终底物浓度的两倍。往 A 至 H 行的所有孔 (不包括孔 95 和 96 (微粒体空白)) 中加入底物溶液。底物溶液由各种 DMSO 底物储备液以表 4 中所注明的浓度制备。

[0379] 该方法得到表 4 所列的最终蛋白和底物浓度, 表 5 所列的最终对照物浓度, 和对于各试验化合物 50 μ M、16.7 μ M、5.6 μ M、1.9 μ M、618nM、206nM 和 69nM 的试验化合物浓度。

[0380] 将该板覆盖并在 37°C 下温育, 对于研究的同工型 (isoform) 温育时间如表 4 中所列。通过往所有孔中加入 120 μ L 在乙腈中的内标物 (200ng/mL CCX915-6A) 使反应停止。在停止反应后, 往孔 95 和 96 中加入上述 80 μ L 特异性底物 / NADPH 溶液, 以提供空白。将该板涡旋 10 分钟并在 4°C 下在离心机中以 4,450rpm 旋转 10 分钟。用多通道移液管将 80 μ L 上清液转移至含 80 μ L 0.1% 甲酸 / 水的样品板的孔中并充分混合以用于在如 E 和 F 部分所述的 LC-MS/MS 分析。分析方法 [003760] 由 LC-MS/MS 方法分析样品。监测由各个不同 CYP450 的同工型 (isoform) 的特定底物得到的各代谢物 (表 6)。对于底物的 HPLC 条件

[0381] 仪器: Shimadzu, 装有液相色谱系统 LC-10AD VP。 CYP2C9 和 CYP3A4 (咪达唑仑) 抑制

[0382] 柱: Waters, Sunfire C18, 3 μ , 2.1 $\times$ 50mm

[0383] 流动相: A: 0.1% 甲酸 / 水 B: 0.1% 甲酸 / 乙腈 梯度程序: 对于 CYP2C9 和 CYP3A4 (咪达唑仑)

时间 [分钟]	溶剂 A	溶剂 B
0.0-0.2	95	5
0.3-1.0	5	95
1.0-3.0	95	5

[0384] [0380] 流速: 300 μ L / 分钟

[0385] 注射体积: 10 μ L

[0386] 运行时间: 对于 CYP2C9, 3A4 (咪达唑仑) 3 分钟。对于分析物, 对于 2C9 (4'-羟基-双氯芬酸) 保留时间为 1.03 分钟和对于 3A4 (1'-羟基咪达唑仑) 保留时间为 0.87 分钟

[0387] CYP3A4 抑制 (睾酮)

[0388] 柱: Waters, Sunfire C18, 3 μ , 2.1 $\times$ 50mm

[0389] 流动相: A: 0.1% 甲酸 / 水

[0390] B: 0.1% 甲酸 / 乙腈

[0391] 梯度程序:对于 CYP3A4(睾酮)

时间 [分钟]	溶剂 A	溶剂 B
0.0-1.5	95	5
1.5-3.0	5	95
3.0-4.0	95	5

[0392] 流速 :300 μ L/ 分钟

[0393] 注射体积 :20 μ L

[0394] 运行时间 :对于 CYP3A4(睾酮) 为 4.0 分钟。对于分析物 (6-B- 羟基睾酮), 保留时间为, 对于 3A4(睾酮), 保留时间为 1.35 分钟。质谱条件

[0395] [00391 仪器 :Applied Biosystems(Foster City, CA) API 3000 和 4000Q-TRAP 质谱仪

[0396] 接口 :电喷射 (“TurboIon Spray”), 正离子化

[0397] 模式 :多反应监测法 (MRM) 表 6. 代谢物的质量跃迁和 HPLC 保留时间

CYP450 同工型	底物	代谢物	跃迁	底物保留 时间[分钟]
2C9	双氯芬酸	4'-羟基-双氯芬酸	312.10/230.97	2.2
3A4	咪达唑仑	1'-羟基咪达唑仑	341.98/323.92	2.23
	睾酮	6- β -羟基睾酮	305.13/269.28	2.1

* 在 API 4000QTRAP 质谱仪上分析 IC_{50} 的计算

[0398] 使用 **Analyst®** 1.4.1 software(Applied Biosystems, FosterCity, CA) 通过色谱自动积分得到代谢物的峰面积。抑制 = $100 - ((AUC_{\text{试验}} - AUC_{\text{空白}}) / (AUC_{\text{对照}} - AUC_{\text{空白}})) \times 100$
方程式 1

[0399] $AUC_{\text{试验}}$ 、 $AUC_{\text{对照}}$ 和 $AUC_{\text{空白}}$ 分别为在试验物或阳性抑制剂存在下对照物的代谢物的峰面积计数、无试验物的对照物的代谢物的峰面积计数和在微粒体空白中观察到的峰面积计数。使用 Excel(Microsoft) 用抑制百分率与试验物浓度作图。在 XLFit™(IDBSLid, Guildford, UK) 中使用 4- 参数拟合计算 IC_{50} 值。以下列出所选化合物的 IC_{50} 值。所选化合物在 SPRAGUE-DAWLEY 大鼠中的药代动力学评价

[0400] 用所选化合物在 0.24-0.36kg 体重的雄性 Sprague-Dawley 大鼠中进行静脉 / 口服药代动力学研究。在预先确定的时间点收集血样并使用 LC-MS/MS 方法分析动物相应血浆样品中的试验化合物浓度。由血浆浓度与时间的曲线得到药代动力学参数。

[0401] 对于 LC-MS/MS 分析, 制备 1mg/mL 在乙腈中的试验化合物的储备液, 并将在 50% 甲醇 / 水中制备的工作储备液用于制备分析用标准品和 QC 样品。

[0402] 从 Bioreclamation, Inc. (East Meadow, NY) 得到含抗凝剂 EDTA-Na 的乏血小板的雄性 Sprague-Dawley 大鼠血浆并将其用于制备分析用标准物以及用于制备所选样品的系列稀释液。动物

[0403] 该研究使用 8 只体重在 0.24-0.36kg 之间的动物。两只动物被用于静脉给药, 而后六只用于口服给药。给药和抽血

[0404] 对于静脉给药, 在丙二醇 /N,N- 二甲基乙酰胺 /EtOH(31.6/31.6/36.8) 中以 1mg/

mL 制备试验化合物的溶液制剂并以 1mL/kg 给予每个动物。对于口服给药,将试验化合物以 0.5mg/mL 悬浮在 1% HPMC 中并以 10mL/kg 给予每个动物。

[0405] 将动物禁食过夜并在给药前和在研究结束时检查。对于静脉给药,在给药前和在给药后 2 分钟、5 分钟、10 分钟、15 分钟和 30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、6 小时和 8 小时抽血 (0.2mL)。对于口服给药,在给药前和在给药后 5 分钟、15 分钟和 30 分钟、1 小时、1.5 小时、2 小时、4 小时、6 小时、8 小时和 24 小时抽血 (0.2mL)。从插管动物采集血样,随后将其置于已冷却的含抗凝剂 EDTA-Na 的聚丙烯管中并保持在冰上直至离心。通过 12000rpm 离心收集血浆 (Eppendorf Centrifuge 5417R),在 4℃ 下离心 6 分钟并在 -20℃ 下保存直至分析。分析方法

[0406] 在直线振动器上,将血浆样品 (50 μ L) 用 150 μ L 含内标的乙腈萃取 10 分钟。在 4℃ 下以 4450RPM 将样品离心 10 分钟 (AllegraX-15R 离心机, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)。将 80 μ L 得到的上清液转移到含 80 μ L 0.1% 甲酸 / 水的新板的孔中并充分混合。

[0407] 在以下条件下通过高效液相色谱分离用以上方法制备的萃取样品:使用装有两个 LC-10AD 泵和 C-18 柱 (Waters Sunfire, 2 $\times$ 30mm, 3.5 μ m; 10 μ L 注射进样) 的 Shimadzu (Kyoto, Japan) 系统;使用由 (A) 0.1% 甲酸 / 水和 (B) 0.1% 甲酸 / 乙腈构成的流动相;流速 0.35mL/分钟,梯度为 0-1.5 分钟 5% B, 1.5-2.5 分钟 5-95% B, 2.5-2.7 分钟 95% -5% B, 和 2.7-4.0 分钟 5% B。HPLC 洗脱按照 Applied Biosystems (Foster City, CA) Sciex API 3000 三重四极杆质谱仪中设定程序进行,该质谱仪在分析用 Turbo Ionspray positive ionization MS/MS 模式下操作。使用 Applied Biosystems-Sciex Analyst software (版本 1.4.1) 进行采集和积分。通过二次 (静脉) 或线性 (口服) 回归得到校正曲线且对于静脉和对于口服研究的校正范围分别为 4-5000ng/mL 和 2-5000ng/mL。LC-MS/MS 校正标准物的制备

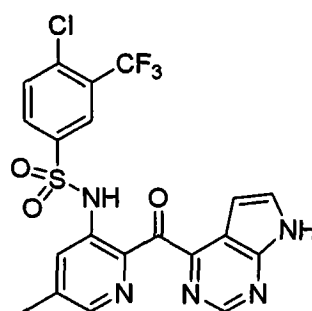
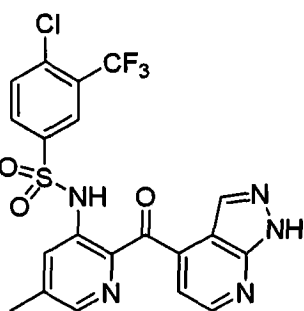
[0408] 为测定大鼠血浆样品中试验化合物的浓度,用得自 Bioreclamation Inc. (Lot#RATBREC. 47491M) 的大鼠血浆制备含 5000、1000、500、100、50、20、10、4、2 和 1ng/mL 化合物的标准物。以相同方法制备与血浆样品平行的血浆标准物。将三个浓度水平的标准储备液 (1000、100 和 10ng/mL) 分别掺入雄性 Sprague-Dawley 大鼠血浆并用作 QC 样品。

[0409] 药物代谢动力学分析

[0410] 在血液收集期间对于各给药途径得到总共 11 个时间点。通过标准非室性分析 (Wagner, 1993) 由各个动物和给药途径的血浆浓度 - 时间曲线测定描述性的药代动力学参数。半衰期 ($T_{1/2}$): 终半衰期 C_{max} : 最大血浆浓度 $AUC_{0-\infty}$: 给药时间延伸至无穷大时血浆浓度 - 时间曲线下面积 CL: 总体清除率 $MRT_{0-\infty}$: 给药时间延伸至无穷大时平均停留时间 Vd_{ss} : 稳态分布体积 F: 生物利用度

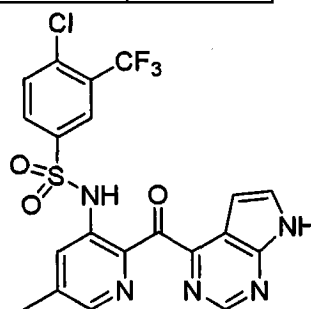
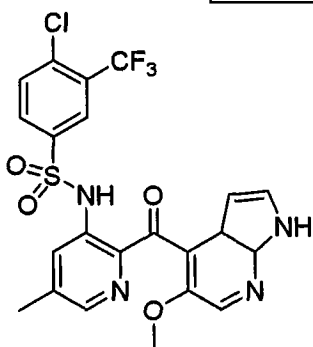
[0411] 使用 **XLFit®v.4.1** (ID Business Solutions Inc., Alameda, CA) 进行药物代谢

动力学分析



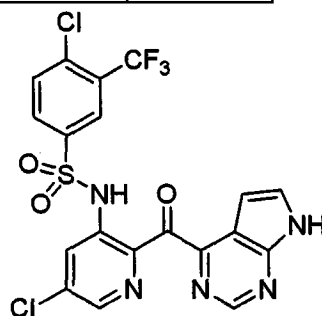
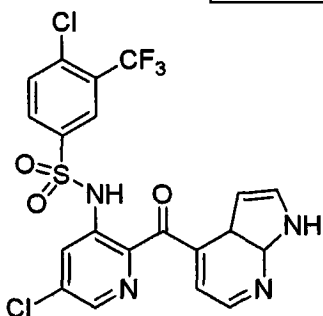
大鼠 PK MRT	35 分钟	135 分钟
CYP 3A4 抑制 IC ₅₀	3 μ M	20 μ M

[0412]



大鼠 PK MRT	22 分钟	135 分钟
大鼠 PK T _{1/2}	19 分钟	161 分钟
CYP 3A4 抑制 IC ₅₀	3 μ M	20 μ M

[0413]



大鼠 PK MRT	21 分钟	68 分钟
大鼠 PK T _{1/2}	42 分钟	127 分钟
CYP 2C9 抑制 IC ₅₀	3 μ M	15 μ M

[0414] 因此,本文的意图是以上详述应视作示例性的而不是限制性的,并且还要了解的是本申请所附权利要求书,包括所有等同内容,都旨在限定本发明的精神和范围。

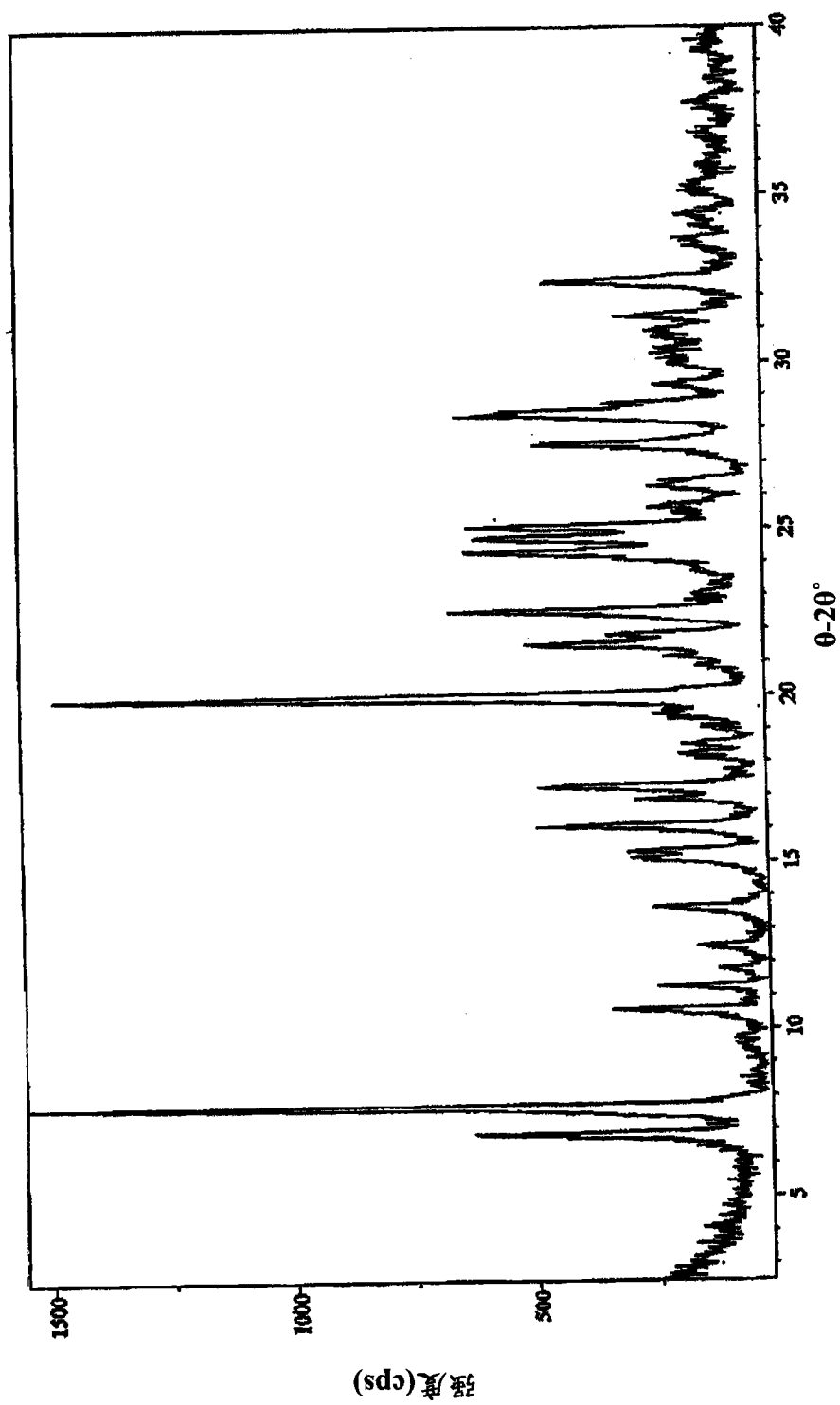


图 1