

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 45/00



[12] 发明专利申请公开说明书

C07D263/32 A61K 31/421
A61K 31/195 A61K 31/235
A61P 31/10 A61P 3/04

[21] 申请号 00818288.4

[43] 公开日 2003 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 1423566A

[22] 申请日 2000.11.9 [21] 申请号 00818288.4
[30] 优先权
[32] 1999.11.10 [33] JP [31] 320319/1999
[86] 国际申请 PCT/JP00/07879 2000.11.9
[87] 国际公布 WO01/34200 日 2001.5.17
[85] 进入国家阶段日期 2002.7.9
[71] 申请人 武田药品工业株式会社
地址 日本大阪府
[72] 发明人 杉山泰雄 小高裕之 木村宏之

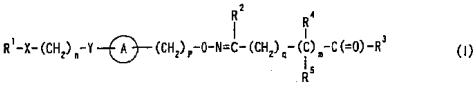
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 贾静环 宋 莉

权利要求书 2 页 说明书 40 页 序列表 3 页

[54] 发明名称 体重增加抑制剂

[57] 摘要

体重增加抑制剂，包括 PPAR γ 激动剂样物质，且包含 PPAR δ 激动剂样物质，如由通式(I)代表的化合物，其中 R¹代表任选取代的烃基等；X 代表键等；Y 代表氧等；环 A 代表杂环等；R²代表氢等；R³代表 -OR⁹等；并且 R⁴和 R⁵每个代表氢等，该抑制剂可用于治疗糖尿病等疾病。

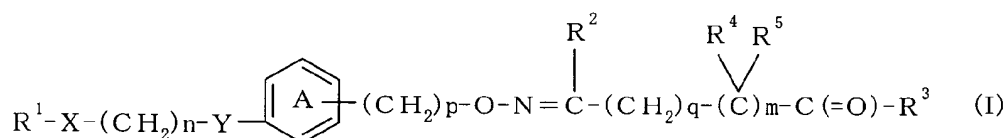


I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 抑制由 PPAR γ 激动剂样物质引起的体重增加的制剂, 其中含有 PPAR δ 激动剂样物质。

5 2. 权利要求 1 的制剂, 其中 PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 激动剂样物质是相同的物质。

3. 权利要求 1 的制剂, 其中该相同的物质为下式代表的化合物或其盐:



其中

10 R^1 为任选取代的烃基或任选取代的杂环基;

X 为键或下式基团: $-\text{CO}-$, $-\text{CH}(\text{OH})-$ 或 NR^6- (R^6 为氢原子或任选取代的烷基);

n 为整数 1-3;

15 y 为氧原子、硫原子、基团 $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$ 或 NR^7- (R^7 为氢原子或任选取代的烷基);

环 A 为苯环, 其任选地含有 1-3 个附加取代基;

p 为整数 1-8;

R^2 为氢原子, 任选取代的烃基或任选取代的杂环基;

q 为整数 0-6;

20 m 为 0 或 1 ;

R^3 为羟基, $-\text{OR}^8$ (R^8 为任选取代的烃基)或 $-\text{NR}^9\text{R}^{10}$ (R^9 和 R^{10} 相同或不同, 各自为氢原子, 任选取代的烃基, 任选取代的杂环基或任选取代的酰基, 并且 R^9 和 R^{10} 任选地键合形成环); 并且

25 R^4 和 R^5 相同或不同, 各自为氢原子, 任选取代的烃基, 并且 R^4 和 R^2 任选地键合形成环。

4. 权利要求 1 的制剂, 其中相同的物质为 E-4-[4-(5-甲基-2 苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]-4-苯基丁酸。

5. 权利要求 2 的制剂, 其是用于治疗糖尿病的制剂。

6. 权利要求 2 的制剂, 其是用于治疗糖尿病并发症的制剂。

7. 抑制由 PPAR γ 激动剂样物质引起的体重增加的方法, 包括: 对哺乳动物给予有效量的 PPAR δ 激动剂样物质。

8. PPAR δ 激动剂样物质在制备由 PPAR γ 激动剂样物质引起的体重增加的抑制剂中的用途。

5 9. 含有 PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 激动剂样物质的糖尿病治疗剂, 其抑制由 PPAR γ 激动剂类引起的体重增加至不高于约 80 %。

10. 权利要求 9 的制剂, 其中 PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 激动剂样物质为相同的物质。

体重增加抑制剂

5

技术领域

本发明涉及用来抑制由 PPAR γ 激动剂样物质引起的体重增加的制剂(agent), 该制剂可用于治疗糖尿病等疾病。

背景技术

10 近年来各种关于糖尿病的研究已经阐明类视黄醇相关受体(retinoid-related receptor)受体与血糖、血脂等物质之间的关系。

具体地说, 过氧化物酶体增殖物活性受体 γ (在本说明书中有时缩写为 PPAR γ)是类视黄醇相关受体配体中的一种, 并且是由类固醇激素受体和甲状腺激素受体所代表的细胞核激素受体超家族中的一员, 其在脂肪细胞分化开始时显示具有诱导表达, 并在脂肪细胞分化中起重要的主调节剂作用。

15 PPAR γ 结合到配体上, 与类视黄素 X 受体(RXR)结合形成二聚体, 该二聚体与细胞核内的靶基因的应答元件结合, 从而直接调节(活化)转录效率。而且, 近年来, 已经清楚前列腺素 D2 的一种代谢产物: 15-脱氧- $\Delta^{12,14}$ 前列腺素 J2 是 PPAR γ 的内源性配体, 并且已经清楚: 以噻唑烷二酮衍生物为代表的某些胰岛素致敏物具有 PPAR γ 配体活性, 并且该活性的强度与降血糖作用或脂肪细胞分化促进作用相当[Cell, 第 83 卷, 第 803 页(1995); The Journal of Biological Chemistry, 第 270 卷, 第 12953 页, (1995); Journal of Medicinal Chemistry, 第 39 卷, 第 655 页(1996)]。最近, 有研究表明: (1)

20 PPAR γ 表达在来源于人脂肪肉瘤的培养细胞中, 并且加入 PPAR γ 配体终止了其生长[Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, 第 94 卷, 第 237 页 (1997)], (2)以吲哚美辛(indomethacin)和苯普罗吩(phenoprofen)为代表的非类固醇抗炎药具有 PPAR γ 配体活性[The Journal of Biological Chemistry, 第 272 卷, 第 3406 页 (1997)], (3) PPAR γ 高度表达在活化后的巨噬细胞中, 并且加入其配体起到抑制与炎症有关的基

25 因的转录作用[Nature, 第 391 卷, 第 79 页(1998)], 和 4) PPAR γ 配体抑制单核细胞产生炎性细胞因子(TNF α , IL-1 β , IL-6)[Nature, 第 391 卷, 第 82 页

30

(1998)]等等。

作为这样的 PPAR γ 激动剂,已经报道了在 4-位具有取代的羟基的苯基烷酸衍生物(例如 WO 97/31907 和 WO97/25042)。

5 另一方面,过氧化物酶体增植物活性受体 δ (在本说明书中有时被缩写为 PPAR δ)是相同的类视黄醇相关受体中的一类,并且是过氧化物酶体增殖活性受体(PPAR)如 PPAR γ 中的一种亚型。其在表达部位不显示组织特异性,而是一般表达。迄今为止,PPAR δ 的生理学作用几乎没有被阐明过。

WO 97/28149 描述了这种 PPAR δ 的激动剂。在该公开文献中讲述了:该化合物用作 PPAR δ 激动剂,增加了血浆中 HDL 的量,有效用于治疗 and 预防冠状动脉粥样硬化,当与 HMG-CoA 还原酶抑制剂等物质联合用药时,能够有效治疗和预防冠状动脉粥样硬化。

WO 99/04815 描述了同时具有上述 PPAR γ 和 PPAR δ 激动剂活性的化合物。这些化合物具有降低血清胆固醇的作用,并且该文献还描述了其药物组合物。

15 这些 PPAR δ 和 PPAR γ 的激动剂已被报道能够调节(上调)UCP-2 蛋白的基因表达,所述 UCP-2 蛋白基因参与能量平衡、体重控制和前脂肪细胞(其中 PPAR δ 被高度表达)和脂肪细胞(其中 PPAR δ 和 PPAR γ 2 两者均被高度表达)中的热量控制[Biochemical and Biophysical Research Communications, 238, 606-611 (1997)]。

20 另外,已知胰岛素增敏剂(例如曲格列酮(troglitazone),皮欧格列酮(pioglitazone),罗格列酮(rosiglitazone)等)为非常好的糖尿病治疗剂,具有 PPAR γ 激动剂活性 [例如, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 284, 751-759 (1998)]。尽管这些药物制剂可有效用于治疗糖尿病,但是有文献报道了例如曲格列酮对于 2 型糖尿病患者具有体重增加活性(Diabetes, 47, 增刊 1, A18, No. 69, 1998),其中在治疗期间给药后导致患者体重增加。这样的体重增加是糖尿病患者尽可能需要避免的,因为就糖尿病患者而言,肥胖症能够引起糖尿病的恶化。

25 因此,本发明的目的是开发治疗糖尿病和其它疾病的药物制剂(pharmaceutical agent),其不使患者的体重增加,即使在给服具有 PPAR γ 激动剂活性的有效用于治疗的物质时也是如此。

发明内容

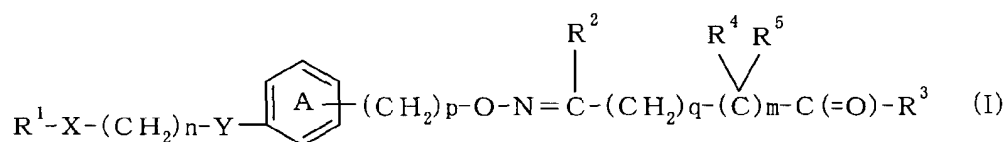
本发明的发明者首次发现：在给药具有 PPAR γ 激动剂作用的物质期间，通过给药具有 PPAR δ 激动剂作用的物质可以抑制糖尿病患者的体重增加，在此基础上完成了本发明。

5 因此，本发明涉及

(1)用于抑制由 PPAR γ 激动剂样物质(PPAR γ agonist-like substance)引起的体重增加的制剂(agent)，该制剂中包含 PPAR δ 激动剂样物质；

(2)根据上述(1)的制剂，其中 PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 类激动剂样物质为相同的物质；

10 (3)根据上述(1)的制剂，其中所述相同的物质为下式化合物或其盐：



其中

15 R^1 为任选取代的烃基或任选取代的杂环基；

X 为键、下式基团：-CO-、-CH(OH)-或-NR⁶- (R^6 为氢原子或任选取代的烷基)；

n 为整数 1-3；

Y 为氧原子、硫原子、下式基团：-SO-、-SO₂-或-NR⁷- (R^7 为氢原子或
20 任选取代的烷基)；

环 A 为苯环，可任选地具有 1-3 个其它取代基；

p 为整数 1-8；

R^2 为氢原子、任选取代的烃基或任选取代的杂环基；

q 为整数 0-6；

25 m 为 0 或 1；

R^3 为羟基、-OR⁸ (R^8 为任选取代的烃基)或-NR⁹R¹⁰ (R^9 和 R^{10} 相同或不同，各自为氢原子、任选取代的烃基、任选取代的杂环基或任选取代的酰基， R^9 和 R^{10} 任选地键合形成环)；并且

R^4 和 R^5 相同或不同，各自为氢原子、任选取代的烃基，并且 R^4 和 R^2

任选地键合以形成环;

(4)根据上述(1)的制剂,其中相同的物质为 E-4-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄基氧亚氨基]-4-苯基丁酸;

(5)根据上述(2)的制剂,其是用于治疗糖尿病的制剂;

5 (6)根据上述(2)的制剂,其是用于治疗糖尿病并发症的制剂;

(7)抑制由于 PPAR γ 激动剂样物质引起的体重增加的方法,该方法包括:给予哺乳动物有效量的 PPAR δ 激动剂样物质;

(8)PPAR δ 激动剂样物质在制备由 PPAR γ 激动剂样物质引起的体重增加抑制剂中的用途;

10 (9)包含 PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 激动剂样物质的治疗剂,其抑制由于 PPAR γ 类激动剂物质引起的体重增加至不高于约 80%;以及

(10)根据上述(9)的制剂,其中 PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 激动剂样物质为相同的物质。

本发明所用的 PPAR δ 激动剂样物质仅仅需要其为 PPAR δ 的激动剂。

15 PPAR δ 激动剂样物质可以是任意的物质,即使其不是 PPAR δ 的直接激动剂,但是只要其通过调节 UCP-2 蛋白的基因表达来表达 PPAR δ 相关作用即可,其中所述 UCP-2 蛋白涉及生物能量平衡、体重控制和热量控制等(the like)。

例如,PPAR δ 激动剂样物质为这样的物质:在体外不高于 10 μ M 的浓度下明显显示具有其作用,具体地优选为在下列试验实施例 1 中显示不高于
20 10 μ M 的 EC₅₀ 值的物质和类似物质。

优选的 PPAR δ 激动剂样物质包括 carbaprostacyclin (cPGI), L-165041 [Journal Biological Chemistry, 274, 6718-6728 (1999, Merck)]和类似物质。除此之外,在 GB-2, 292, 885-A 中描述的物质也可激活 PPAR δ ,能够用作本发明的 PPAR δ 激动剂样物质。在这些物质中,已知 cPGI 为 PPAR δ 和 PPAR α
25 两者的激动剂。下列提到的同时为 PPAR δ 和 PPAR γ 激动剂的物质也是能够用于本发明中的 PPAR δ 激动剂样物质。

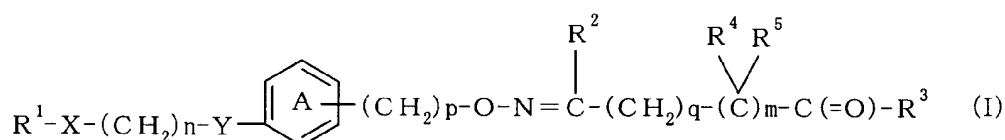
本发明所用的 PPAR γ 激动剂样物质仅仅需要其是 PPAR γ 的激动剂性,并且可以是任何物质,只要其表达这个作用即可。

例如,PPAR γ 激动剂样物质为这样的一些物质:在体外不高于 10 μ M 的
30 浓度下明显显示具有其作用,具体地优选为下列试验实施例 3 中 EC₅₀ 值不高于 10 μ M 的物质和类似物质。

PPAR γ 激动剂样物质的优选实例包括胰岛素增敏剂例如曲格列酮, 罗格列酮, englitazone, ciglitazone, 皮欧格列酮, PGJ₂, GI-262570, JTT-501, MCC-555, YM-440, KRP-297, CS-011 和 FK-614 等物质。毫无疑问, 下列提到的可同时作为 PPAR δ 和 PPAR γ 激动剂的物质也可以用作本发明的 PPAR γ 激动剂样物质。

在本发明中, PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 激动剂样物质可以相同或不同。这样的相同物质的实例包括被称作 PPAR δ 和 PPAR γ 两者的激动剂的那些物质, 如 YM-16638 (JP-B-63-35626), p-[3-(4-乙酰基-3-羟基-2-丙基苯氧基)丙氧基]苯基丁酸 (CZ 281, 130 和 WO 99/04815), L-165461, L-783483, L-796449 [*Journal Biological Chemistry*, 274, 6718-6728 (1999, Merck)]和类似物质。

上述相同物质的实例包括下列式(I)代表的化合物或其盐:



15

其中

R¹ 为任选取代的烃基或任选取代的杂环基;

X 为键、下式基团-CO-, -CH(OH)-或-NR⁶- (R⁶ 为氢原子或任选取代的烷基);

20 n 为整数 1-3;

Y 为氧原子、硫原子、下式基团: -SO-, -SO₂-或-NR⁷- (R⁷ 为氢原子或任选取代的烷基);

环 A 为苯环, 可任选地具有 1-3 个其它取代基;

p 为整数 1-8;

25 R² 为氢原子、任选取代的烃基或任选取代的杂环基;

q 为整数 0-6;

m 为 0 或 1;

R³ 为羟基, -OR⁸ (R⁸ 为任选取代的烃基)或-NR⁹R¹⁰ (R⁹ 和 R¹⁰ 相同或不同, 各自为氢原子、任选取代的烃基、任选取代的杂环基或任选取代的酰

基, R^9 和 R^{10} 任选地键合形成环); 以及

R^4 和 R^5 相同或不同, 各自为氢原子、任选取代的烃基, R^4 和 R^2 任选地键合形成环;

在 EP-A612743 和 EP-A629624 等中描述的化合物(例如 5-[3-[4-[(5-甲基-2-苯基-1,3-噻唑-4-基)甲氧基]苯基]丙基]-1,3-噁唑烷-2,4-二酮和类似物质)等。

下面将详细描述式(I)。

(1) R^1 的定义

在式(I)中, 由 R^1 代表的“任选取代的烃基”中的烃基的实例包括脂肪烃基、脂环烃基、脂环-脂肪烃基、芳香-脂肪烃基和芳香烃基。这些烃基优选具有 1-14 个碳原子。

(1-1) R^1 中烃基的定义

脂肪烃基优选为具有 1-8 个碳原子的脂肪烃基。脂肪烃基的实例包括具有 1-8 个碳原子的饱和脂肪烃基(例如烷基等), 如甲基, 乙基, 丙基, 异丙基, 丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 异戊基, 新戊基, 己基, 异己基, 庚基和辛基等; 和具有 2-8 个碳原子的不饱和脂肪烃基(例如: 具有 2-8 个碳原子的烯基、具有 4-8 个碳原子的二烯基、具有 2-8 个碳原子的烯基炔基、具有 4-8 个碳原子的链二炔基等), 例如乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、3-甲基-2-丁烯基、1-己烯基、3-己烯基、2, 4-己二烯基、5-己烯基、1-庚烯基、1-辛烯基, 乙炔基, 1-丙炔基, 2-丙炔基, 1-丁炔基, 2-丁炔基, 3-丁炔基, 1-戊炔基, 2-戊炔基, 3-戊炔基, 4-戊炔基, 1-己炔基, 3-己炔基, 2, 4-己二炔基, 5-己炔基, 1-庚炔基和 1-辛炔基等。

脂环烃基优选为具有 3-7 个碳原子的脂环烃基。脂环烃基的实例包括具有 3-7 个碳原子的饱和脂环烃(例如环烷基等), 如环丙基, 环丁基, 环戊基, 环己基和环庚基等; 具有 5-7 个碳原子的不饱和脂环烃基(例如环烯基和环二烯基等), 如 1-环戊烯基, 2-环戊烯基, 3-环戊烯基, 1-环己烯基, 2-环己烯基, 3-环己烯基, 1-环庚烯基, 2-环庚烯基, 3-环庚烯基和 2,4-环庚二烯基等。

脂环-脂肪烃基的实例包括其中上述脂环烃基和脂肪烃基键合的基团(例如环烷基-烷基, 环烯基-烷基等)。在这些基团中, 优选具有 4-9 个碳原子的脂环-脂肪烃基。脂环-脂肪烃基的实例包括环丙基甲基, 环丙基乙基, 环

丁基甲基, 环戊基甲基, 2-环戊烯基甲基, 3-环戊烯基甲基, 环己基甲基, 2-环己烯基甲基, 3-环己烯基甲基, 环己基乙基, 环己基丙基, 环庚基甲基和环庚基乙基等。

- 5 芳香-脂肪烃基优选具有 7-13 个碳原子的芳香-脂肪烃基 (例如具有 7-13 个碳原子的芳烷基, 具有 8-13 个碳原子的芳烯基等)。芳香-脂肪烃基的实例包括: 具有 7-9 个碳原子的苯基烷基例如苄基, 苯乙基, 1-苯基乙基, 1-苯基丙基, 2-苯基丙基和 3-苯基丙基等; 具有 11-13 个碳原子的萘烷基例如 α -萘甲基, α -萘乙基, β -萘甲基和 β -萘乙基等; 具有 8-10 个碳原子的苯基烯基例如苯乙烯基等; 具有 12-13 个碳原子的萘烯基例如 2-(2-萘乙烯基)等等物质。
- 10

芳烃基优选是具有 6-14 个碳原子的芳烃基(例如芳香基等)。芳烃基的实例包括苯基, 萘基, 蒽基, 菲基, 芘基和联苯基等, 特别优选苯基, 1-萘基和 2-萘基等。

(1-2) R^1 中杂环基的定义

- 15 在式(I)中, R^1 所代表的“任选取代的杂环基”中杂环基的实例包括: 5 至 7-元单环杂环基或稠合杂环基, 其中除了含有碳原子外, 还含有 1-4 个杂原子作为环组成原子, 所述杂原子选自氧原子、硫原子和氮原子。稠合杂环的实例包括 5-7 元单环杂环和含有 1 或 2 个氮原子的 6-元环、苯环或含有一个硫原子的 5-元环的稠合环。
- 20 杂环基的实例包括芳香杂环基如 2-吡啶基, 3-吡啶基, 4-吡啶基, 2-嘧啶基, 4-嘧啶基, 5-嘧啶基, 6-嘧啶基, 3-哒嗪基, 4-哒嗪基, 2-吡嗪基, 1-吡咯基, 2-吡咯基, 3-吡咯基, 1-咪唑基, 2-咪唑基, 4-咪唑基, 5-咪唑基, 1-吡唑基, 3-吡唑基, 4-吡唑基, 异噁唑基, 异噻唑基, 2-噻唑基, 4-噻唑基, 5-噻唑基, 2-噁唑基, 4-噁唑基, 5-噁唑基, 1, 2, 4-噁二唑-5-基, 1, 3, 4-噁二唑-2-基, 1, 3, 4-噻二唑-2-基, 1, 2, 4-三唑-1-基, 1, 2, 4-三唑-3-基, 1, 2, 3-三唑-1-基, 1, 2, 3-三唑-2-基, 1, 2, 3-三唑-4-基, 四唑-1-基, 四唑-5-基, 2-喹啉基, 3-喹啉基, 4-喹啉基, 2-喹唑啉基, 4-喹唑啉基, 2-喹喔啉基, 2-苯并噁唑基, 2-苯并噻唑基, 苯并咪唑-1-基, 苯并咪唑-2-基, 吲哚-1-基, 吲哚-3-基, 1H-吲唑-3-基, 1H-吡咯并[2, 3-b]吡嗪-2-基, 1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-6-基, 1H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基, 1H-咪唑并[4, 5-c]吡啶-2-基和 1H-咪唑并[4,5-b]吡嗪-2-基等; 非芳香杂环基如 1-吡咯烷基, 哌啶子基, 吗啉代, 硫代吗啉代, 1-哌嗪基, 六亚甲基亚氨基-1-
- 25
- 30

基, 噁唑烷-3-基, 噻唑烷-3-基, 咪唑啉-3-基, 2-氧代(OXO)咪唑啉-1-基, 2, 4-二氧代咪唑啉-3-基, 2,4-二氧代噁唑烷-3-基和 2,4-二氧代噻唑烷-3-基等; 及等等物质。

所述杂环基优选吡啶基, 噁唑基, 噻唑基, 苯并噁唑基或苯并噻唑基。

5 (1-3) R^1 中烃基和/或杂环基的取代基的定义

在式(I)中, R^1 所代表的烃基和杂环基各自在可取代位置任选地具有 1-5 个、优选 1-3 个取代基。取代基的实例包括: 任选取代的脂肪烃基、任选取代的脂环烃基、任选取代的芳香烃基、任选取代的芳香杂环基、任选取代的非芳香杂环基、卤原子、硝基、任选取代的氨基、任选取代的酰基、任选取代的羟基、任选取代的硫醇基(thiol)和任选酯化或酰胺化的羧基。

“任选取代的脂肪烃基、任选取代的脂环烃基、任选取代的芳香烃基、任选取代的芳香杂环基、任选取代的非芳香杂环基”中取代基的实例包括: C_{1-6} 烷基, C_{1-6} 烷氧基, 卤素原子(例如氟、氯、溴和碘等), 硝基, C_{1-6} 卤代烷基和 C_{1-6} 卤代烷氧基。取代基的数目例如是 1 至 3。

15 脂肪烃基的实例包括: 具有 1-15 个碳原子的直链或支链烃基, 例如烷基, 烯基和炔基等。

烷基的优选实例包括: 具有 1-10 个碳原子的烷基, 如甲基, 乙基, 丙基, 异丙基, 丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 异戊基, 新戊基, 1-乙基丙基, 己基, 异己基, 1, 1-二甲基丁基, 2, 2-二甲基丁基, 3, 3-二甲基丁基, 2-乙基丁基, 庚基, 辛基, 壬基和癸基等。

20 烯基的优选实例包括: 具有 2-10 个碳原子的烯基, 如乙烯基, 1-丙烯基, 2-丙烯基, 2-甲基-1-丙烯基, 1-丁烯基, 2-丁烯基, 3-丁烯基, 3-甲基-2-丁烯基, 1-戊烯基, 2-戊烯基, 3-戊烯基, 4-戊烯基, 4-甲基-3-戊烯基, 1-己烯基, 3-己烯基, 5-己烯基, 1-庚烯基和 1-辛烯基等。

25 炔基的优选实例包括: 具有 2-10 个碳原子的炔基, 如乙炔基, 1-丙炔基, 2-丙炔基, 1-丁炔基, 2-丁炔基, 3-丁炔基, 1-戊炔基, 2-戊炔基, 3-戊炔基, 4-戊炔基, 1-己炔基, 2-己炔基, 3-己炔基, 4-己炔基, 5-己炔基, 1-庚炔基和 1-辛炔基等。

30 脂环烃基的实例包括: 具有 3-12 个碳原子的饱和或不饱和脂环烃基, 如环烷基, 环烯基和环二烯基等。

环烷基的优选实例包括: 具有 3-10 个碳原子的环烷基, 如环丙基, 环

丁基, 环戊基, 环己基, 环庚基, 环辛基, 双环[2.2.1]庚基, 双环[2.2.2]辛基, 双环[3.2.1]辛基, 双环[3.2.2]壬基, 双环[3.3.1]壬基, 双环[4.2.1]壬基和双环[4.3.1]癸基等。

环烯基的优选实例包括: 具有 3-10 个碳原子的环烯基, 如 2-环戊烯-1-基, 3-环戊烯-1-基, 2-环己烯-1-基和 3-环己烯-1-基等。

环二烯基的优选实例包括: 具有 4-10 个碳原子的环二烯基, 如 2, 4-环戊二烯-1-基, 2, 4-环己二烯-1-基和 2, 5-环己二烯-1-基等。

芳烃基团的优选实例包括: 具有 6-14 个碳原子的芳烃基(例如芳基等), 如苯基, 萘基, 蒽基, 菲基, 芘基(acenaphthylenyl)和双苯基等。在这些基团中, 苯基, 1-萘基和 2-萘基等是优选的。

芳香杂环基的优选实例包括: 5-7 元芳香单环杂环, 其除了含有碳原子外, 还含有 1-4 个选自氧原子、硫原子和氮原子的杂原子作为环组成原子, 如: 呋喃基, 噻吩基, 吡咯基, 咪唑基, 异咪唑基, 噻唑基, 异噻唑基, 咪唑基, 吡唑基, 1, 2, 3-噁二唑基, 1, 2, 4-噁二唑基, 1, 3, 4-噁二唑基, 呋咱基, 1, 2, 3-噻二唑基, 1, 2, 4-噻二唑基, 1, 3, 4-噻二唑基, 1, 2, 3-三唑基, 1, 2, 4-三唑基, 四唑基, 吡啶基, 嘧啶基, 哒嗪基, 吡嗪基和三嗪基等; 双环或三环芳香稠合杂环, 其具有 3-13 个碳原子, 并且除了含有碳原子外, 还含有 1-5 个选自氧原子、硫原子和氮原子的杂原子作为环组成原子, 如苯并呋喃基, 异苯并呋喃基, 苯并[b]噻吩基, 吲哚基, 异吲哚基, 1H-吲唑基, 苯并咪唑基, 苯并噁唑基, 苯并噻唑基, 1H-苯并三唑基, 喹啉基, 异喹啉基, 噌啉基(cinnolyl), 喹唑啉基(quinazolyl), 喹喔啉基, 2,3-二氮杂萘基, 氢化萘基(naphthylidiny), 嘌呤基, 蝶啶基, 卟啉基, α -羰基(carbonyl), β -羰基, γ -羰基, 吡啶基, 吩噻嗪基, 吩噻嗪基, 吩嗪基, phenoxathiinyl, 噻蒽基, 中氮茛基, 吡咯并[1,2-b]哒嗪基, 吡唑并[1,5-a]吡啶基, 咪唑并[1,2-a]吡啶基, 咪唑并[1,5-a]吡啶基, 咪唑并[1,2-b]哒嗪基, 咪唑并[1,2-a]嘧啶基, 1,2,4-三唑并[4,3-a]吡啶基和 1,2,4-三唑并[4,3-b]哒嗪基等物质, 等等。

非芳香杂环基的优选实例包括: 具有 2-10 个碳原子的那些非芳香杂环基, 其除了含有碳原子外, 还含有 1-3 个选自氧原子、硫原子和氮原子的杂原子作为环组成原子, 如环氧乙烷基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基(thietanyl), 吡咯烷基, 四氢呋喃基、四氢吡喃基、吗啉基、硫代吗啉基、哌嗪基、吡咯烷基, 哌啶子基, 吗啉代和硫代吗啉代。

卤原子的实例包括氟、氯、溴和碘，其中优选氟和氯。

任选取代的氨基的实例包括被下列基团任选单或双取代的氨基：具有 1-10 个碳原子的烷基、具有 3-10 个碳原子的环烷基、具有 2-10 个碳原子的烯基、具有 3-10 个碳原子的环烯基、具有 1-13 个碳原子的酰基(例如具有 2-10 个碳原子的烷酰基、具有 7-13 个碳原子的芳基羰基等)或具有 6-12 个碳原子的芳基等等。此处所用的术语中，酰基被定义为下文提到的被任选取代的酰基。

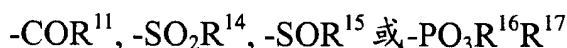
取代氨基的实例包括：甲基氨基，二甲基氨基，乙基氨基，二乙基氨基，丙基氨基，二丁基氨基，二烯丙基氨基，环己基氨基，乙酰基氨基，丙酰基氨基，苯甲酰基氨基，苯基氨基和 N-甲基-N-苯基氨基等。

任选取代的酰基中的酰基的实例包括：具有 1-13 个碳原子的酰基，具体的是甲酰基和其中羰基与下列基团键合的基团：具有 1-10 个碳原子的烷基、具有 3-10 个碳原子的环烷基、具有 2-10 个碳原子的烯基、具有 3-10 个碳原子的环烯基和具有 6-12 个碳原子的芳基或芳香杂环基(例如噻吩基，呋喃基，吡啶基等)等。

酰基的优选实例包括：乙酰基，丙酰基，丁酰基，异丁酰基，戊酰基，异戊酰基，新戊酰基，己酰基，庚酰基，辛酰基，环丁烷羰基、环戊烷羰基，环己烷羰基，环庚烷羰基，巴豆酰基，2-环己烯羰基，苯甲酰基，烟酰基和异炎酰基等。

所述酰基在可取代位置可以具有 1-3 个取代基。这样的取代基的实例包括：具有 1-3 个碳原子的烷基，具有 1-3 个碳原子的烷氧基(alkoxy)、卤素(例如氟、氯、溴和碘等)、硝基，羟基和羧基等。

各种不同形式的酰基通过下式表示：



其中 R^{11} , R^{14} , R^{15} , R^{16} 和 R^{17} 相同或不同，各自是任选取代的烃基。

由 R^{11} , R^{14} , R^{15} , R^{16} 和 R^{17} 所代表的“任选取代的烃基”中的烃基的实例包括：具有 1-10 个碳原子的烷基、具有 3-10 个碳原子的环烷基，具有 2-10 个碳原子的烯基，具有 3-10 个碳原子的环烯基和具有 6-12 个碳原子的芳基。上述“任选取代的烃基”中的取代基团包括： C_{1-6} 烷基(如果烃基为烷基时除外)， C_{1-6} 烷氧基，卤原子(例如氟、氯、溴和碘等)，硝基， C_{1-6} 卤代烷基， C_{1-6} 卤代烷氧基。取代基的数目例如为 1-3。

在任选取代的羟基中,取代羟基的实例包括:各个任选取代的烷氧基、烯氧基、芳烷基氧基、酰氧基和芳氧基等。

- 烷氧基的优选实例包括:具有 1-10 个碳原子的烷氧基,如甲氧基,乙氧基,丙氧基,异丙氧基,丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基,异戊氧基,新戊氧基,己氧基,庚氧基,壬氧基,环丁氧基、环戊氧基和环己氧基等。

烯氧基的优选实例包括:具有 2-10 个碳原子的烯氧基,如烯丙基氧基,巴豆基氧基,2-戊烯基氧基,3-己烯基氧基,2-环戊烯基甲氧基和 2-环己烯基甲氧基等。

- 芳烷基氧基的优选实例包括:具有 7-10 个碳原子的芳烷基氧基,如苯基- C_{1-4} 烷基氧基(例如苄氧基,苯乙基氧基等)等。

酰氧基的优选实例包括:具有 2-13 个碳原子的酰氧基,更优选具有 2-4 个碳原子的烷酰氧基(例如乙酰氧基,丙酰氧基,丁酰氧基和异丁酰氧基等)等。

- 芳氧基的优选实例包括:具有 6-14 个碳原子的芳氧基,如苯氧基和萘氧基等。

- 上述烷氧基,烯氧基,芳烷基氧基,酰氧基和芳氧基可以在可取代位置具有 1 或 2 个取代基。取代基的实例包括卤素(例如氟、氯和溴等),具有 1-3 个碳原子的烷氧基等。取代的芳氧基的实例包括 4-氯苯氧基和 2-甲氧基苯氧基等。

在任选取代的硫基中,取代硫基的实例包括:烷硫基,环烷硫基,芳烷基硫基,酰硫基,芳硫基和杂芳硫基等。

- 烷硫基的优选实例包括:具有 1-10 个碳原子的烷硫基,如甲硫基,乙硫基,丙硫基,异丙硫基,丁硫基,异丁硫基,仲丁硫基,叔丁硫基,戊硫基,异戊硫基,新戊硫基,己硫基,庚硫基和壬硫基等。

环烷基硫基的优选实例包括:具有 3-10 个碳原子的环烷基硫基,如环丁基硫基,环戊基硫基,环己基硫基等。

芳烷基硫基的优选实例包括:具有 7-10 个碳原子的芳烷基硫基,如苯基- C_{1-4} 烷基硫基(例如苄硫基,苯乙硫基等)等。

- 酰基硫基的优选实例包括:具有 2-13 个碳原子的酰基硫基,更优选具有 2-4 个碳原子的烷酰基硫基(例如乙酰硫基,丙酰硫基,丁酰硫基和异丁酰

硫基等)等。

芳基硫基的优选实例包括：具有 6-14 个碳原子的芳硫基，如苯硫基和萘硫基等。

杂芳基硫基的优选实例包括：2-吡啶硫基和 3-吡啶硫基等，以及 2-咪唑硫基，1,2,4-三唑-5-基硫基等。

上述烷基硫基，环烷基硫基，芳烷基硫基，酰基硫基，芳基硫基和杂芳基硫基可以在可取代位置具有 1 或 2 个取代基。这样的取代基的实例包括：卤素(例如氟、氯和溴等)和具有 1-3 个碳原子的烷氧基等。

在任选酯化的羧基中，酯化羧基的实例包括：具有 2-5 个碳原子的烷氧羰基 (例如甲氧羰基，乙氧羰基，丙氧羰基，丁氧羰基等)，具有 8-10 个碳原子的芳烷基氧羰基(例如苄基氧羰基等)，具有 7-15 个碳原子的芳氧羰基(例如苯氧羰基，对甲苯氧羰基等)等，其任选被 1 或 2 个烷基(所述烷基具有 1-3 个碳原子)取代。

在任选酰胺化的羧基中，酰胺化羧基的实例包括：式： $-\text{CON}(\text{R}^{12})(\text{R}^{13})$ 代表的基团，其中 R^{12} 和 R^{13} 相同或不同，各自为氢原子，任选取代的烃基或任选取代的杂环基。

在本文中，由 R^{12} 和 R^{13} 代表的“任选取代的烃基”中的烃基和“任选取代的杂环基”中的杂环基的实例包括：上述“由 R^1 所代表的“任选取代的烃基”中的烃基”和“由 R^1 所代表的“任选取代的杂环基”中的杂环基”所例举的脂肪烃基，脂环烃基，芳香烃基和杂环基。所述烃基和杂环基可以在可取代位置具有 1-3 个取代基，这些取代基的实例包括：卤素(例如氟、氯、溴和碘等)，具有 1-4 个碳原子的烷基，具有 1-4 个碳原子的烷氧基。

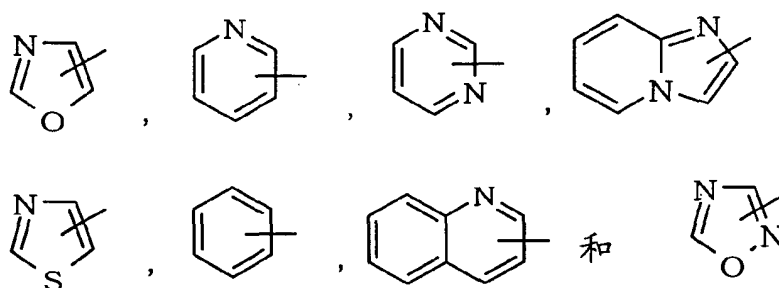
在式(I)中，由 R^1 所代表的烃基和杂环基的取代基优选为具有 1-10 个碳原子的烷基、具有 6-14 个碳原子的芳香杂环基和芳基，更优选具有 1-3 个碳原子的烷基、呋喃基，噻吩基，苯基和萘基。

当由 R^1 所代表的烃基和杂环基的取代基为脂环烃基，芳香烃基，芳香杂环基或非芳香杂环基时，它们可以各自具有一个或多个、优选 1-3 个合适的取代基。这些取代基的实例包括：具有 1-6 个碳原子的烷基、具有 2-6 个碳原子的烯基、具有 3-10 个碳原子的环烷基、具有 6-14 个碳原子的芳基 (例如苯基，萘基等)，芳香杂环基(例如噻吩基，呋喃基，吡啶基，咪唑基，噻唑基等)，非芳香杂环基(例如四氢呋喃基，吗啉代，硫代吗啉代，哌啶子基，吡

- 咯烷基, 哌嗪基等), 具有 7-9 个碳原子的芳烷基, 氨基, 被 C_1 - C_4 烷基或 C_2 - C_8 酰基(例如烷酰基)单或双取代的氨基, 脒基, 具有 2-8 个碳原子的酰基(例如烷酰基等), 氨基甲酰基, 被 C_1 - C_4 烷基单或双取代的氨基甲酰基, 氨磺酰基, 被 C_1 - C_4 烷基单或双取代的氨磺酰基, 羧基, 具有 2-8 个碳原子的烷氧羰基, 羟基, 具有 1-6 个碳原子的烷氧基, 具有 2-5 个碳原子的烯氧基, 具有 3-7 个碳原子的环烷氧基, 具有 7-9 个碳原子的芳烷氧基, 具有 6-14 个碳原子的芳氧基(例如苯氧基, 萘氧基等), 巯基, 具有 1-6 个碳原子的烷硫基, 具有 7-9 个碳原子的芳烷硫基, 具有 6-14 个碳原子芳硫基(例如苯硫基, 萘硫基等), 磺基, 氰基, 叠氮基, 硝基, 亚硝基和卤原子(例如氟、氯、溴和碘等)等。

(1-4) R^1 的优选实例

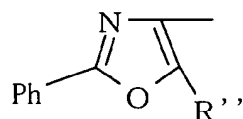
- 在式(I)中, R^1 优选是任选取代的杂环基, 更优选是任选取代的吡啶基, 任选取代的噁唑基, 任选取代的噻唑基或任选取代的三唑基。 R^1 特别优选是吡啶基, 噁唑基, 噻唑基或三唑基, 各自任选的具有 1 或 2 个取代基, 所述取代基选自具有 1-3 个碳原子的烷基, 具有 3-7 个碳原子的环烷基, 呋喃基, 噻吩基, 苯基和萘基。 其中, 呋喃基, 噻吩基, 苯基和萘基可以具有 1 或 2 个取代基, 这些取代基选自: 具有 1-3 个碳原子的烷基, 具有 1-3 个碳原子的烷氧基, 卤素(例如氟、氯、溴和碘等)和具有 1-3 个碳原子的卤代烷基。
- R^1 的优选实例包括: 任选取代的杂环基和任选取代的环烃基, 其化学式如下:



- 这些基团任选具有 1 或 2 个取代基, 所述取代基选自苯基, 呋喃基, 噻吩基和具有 1-4 个碳原子的烷基。其中苯基, 呋喃基和噻吩基可以具有 1 或

2 个取代基, 它们选自: 具有 1-6 个碳原子的烷基, 具有 1-6 个碳原子的烷
 氧基、卤素 (例如氟、氯、溴和碘等), 硝基, 具有 1-6 个碳原子的卤代烷基
 和具有 1-6 个碳原子的卤代烷氧基。具有 1-4 个碳原子的烷基可以具有 1 或
 2 个取代基, 它们选自具有 1-6 个碳原子的烷氧基, 卤素 (例如氟、氯、溴和
 5 碘等), 硝基, 具有 1-6 个碳原子的卤代烷基和具有 1-6 个碳原子的卤代烷氧
 基。

R^1 更优选是下式代表的基团:



其中 Ph 为任选取代的苯基, R'' 为氢原子或具有 1-6 个碳原子的任选取代的
 10 烷基。

由 Ph 代表的苯基和由 R'' 代表的具有 1-6 个碳原子的烷基的取代基的实
 例包括具有 1-6 个碳原子的烷氧基、卤素 (例如氟、氯、溴和碘等), 硝基, 具
 有 1-6 个碳原子的卤代烷基和具有 1-6 个碳原子的卤代烷氧基。取代基的数
 目例如为 1-3。

15 (2) X 的定义

在式(I)中, X 为键或基团 $-CO-$, $-CH(OH)-$ 或 $-NR^6-$ (R^6 为氢原子或任选取
 代的烷基), 优选键, $-CH(OH)-$ 或 $-NR^6-$, 更优选键或 $-NR^6-$ 。

本文中, 由 R^6 代表的“任选取代的烷基”中的烷基的实例包括: 具有
 1-4 个碳原子的烷基, 如甲基, 乙基, 丙基, 异丙基, 丁基, 异丁基, 仲丁基
 20 和叔丁基等。所述烷基可以在可取代位置具有 1-3 个取代基。取代基的实例
 包括: 卤素 (例如氟、氯、溴和碘), 具有 1-4 个碳原子的烷氧基 (例如甲氧基,
 乙氧基, 丙氧基, 异丙氧基, 丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基等), 羟
 基, 硝基, 具有 1-4 个碳原子的酰基 (例如具有 1-4 个碳原子的烷酰基, 如
 甲酰基, 乙酰基和丙酰基等)。

25 (3) n 和 Y 的定义

在式(I)中, n 为整数 1-3, 优选 1 或 2。

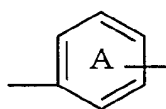
在式(I)中, Y 为 $-O-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$ 或 $-NR^7-$ (R^7 为氢原子或任选取代的
 烷基), 优选为 $-O-$, $-S-$ 或 $-NR^7-$ 。其中, 由 R^7 所代表的“任选取代的烷基”的
 实例包括类似于上述由 R^6 代表的“任选取代的烷基”中的那些。

(4) A 环的定义

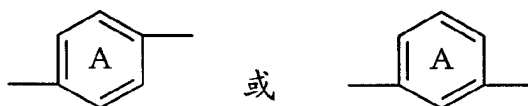
在式(I)中, A 环为苯环, 其中该苯环在可取代位置任选具有 1-3 个附加取代基。取代基的实例包括: 烷基, 任选取代的羟基, 卤素原子, 任选取代的酰基, 硝基和任选取代的氨基。作为这些基团, 可以应用对 R^1 代表的烃基和杂环基的取代基所列举的那些。

所述取代基优选为具有 1-4 个碳原子的烷基, 具有 1-4 个碳原子的烷氧基或卤素原子。

在式(I)中, 部分结构式



10 优选为



(5) p 的定义

在式(I)中, p 为整数 1-8, 优选整数 1-3.

(6) R^2 的定义

15 在式(I)中, 由 R^2 代表的“任选取代的烃基”的实例包括: 对由 R^1 代表的“任选取代的烃基”所列举的那些。

由 R^2 代表的“任选取代的杂环基”的实例包括: 那些对 R^1 代表的“任选取代的杂环基”所列举的那些。

20 在式(I)中, R^2 优选为任选取代的烃基。 R^2 更优选是脂肪烃基, 脂环烃基, 芳香-脂肪烃基或芳香烃基, 所有这些基团可以被取代, 特别优选为具有 1-4 个碳原子的烷基、具有 8-10 个碳原子的苯基烯基或具有 6-14 个碳原子的芳基, 所有这些基团可以被取代。

25 这些烃基可以具有的取代基优选为卤素原子, 具有 1-4 个碳原子的烷氧基, 具有 6-14 个碳原子的芳氧基或芳香杂环基(例如呋喃基, 噻吩基)。取代基的数目例如为 1-3。

(7) q 和 m 的定义

在式(I)中, q 为整数 0-6, 优选 0-4. m 为 0 或 1.

(8) R^3 的定义

R^3 为羟基, $-OR^8$ (R^8 为任选取代的烃基)或 $-NR^9R^{10}$ (R^9 和 R^{10} 相同或不同, 各自为氢原子, 任选取代的烃基, 任选取代的杂环基或任选取代的酰基, 并且 R^9 和 R^{10} 可以键合形成一个环)。

5 在式(I)中, 由 R^8 所代表的“任选取代的烃基”的实例包括: 对 R^1 所代表的“任选取代的烃基”所列举的那些。优选地, R^8 为“具有 1-4 个碳原子的烷基”或“任选地被具有 1-4 个碳原子的烷基或卤素原子所取代的具有 6-10 个碳原子的芳基”。其中, 上述具有 1-4 个碳原子的烷基的实例包括: 甲基, 乙基, 丙基, 丁基, 异丁基, 仲丁基和叔丁基, 特别优选甲基和乙基。

10 “被 C_1 - C_4 烷基或卤素原子任选取代的 C_6 - C_{10} 芳基”中的卤素的实例包括: 氟、氯、溴和碘, 特别优选氯。 C_6 - C_{10} 芳基的实例包括 苯基和萘基, 特别优选苯基。

由 R^9 和 R^{10} 所代表的“任选取代的烃基”和“任选取代的杂环基”的实例包括: 类似于由 R^1 所代表的“任选取代的烃基”和“任选取代的杂环基”的那些。

15 由 R^9 和 R^{10} 所代表的“任选取代的酰基”的实例包括类似于由 R^1 所代表的“任选取代的烃基”所具有的取代基中举例的“任选取代的酰基”的那些。

R^9 和 R^{10} 可以键合形成 5-7 元环氨基。具体的环氨基的实例包括: 1-吡咯烷基, 1-哌啶基, 1-六亚甲基亚氨基, 4-吗啉代和 4-硫代吗啉代等。

20 (9) R^4 和 R^5 的定义

在式(I)中, R^4 和 R^5 相同或不同, 各自为氢原子或任选取代的烃基, 并且 R^4 和 R^5 可以键合形成一个环。

25 在式(I)中, 由 R^4 和 R^5 所代表的“任选取代的烃基”的实例包括类似于前述的由 R^1 代表的“任选取代的烃基”的那些, 优选类似于前述由 R^6 代表的“任选取代的烷基”的那些等。

在式(I)中, R^4 可以与 R^2 键合形成环。 由 R^4 和 R^2 键合形成的环的实例包括具有 5-11 个碳原子的环烷烃和具有 5-11 个碳原子的环烯烃等, 具体的是环戊烷, 环戊烯, 环己烷, 环己烯, 环庚烷, 环庚烯, 环辛烷, 环辛烯, 环壬烷, 环壬烯, 环癸烷, 环癸烯, 环十一烷和环十一烯等。

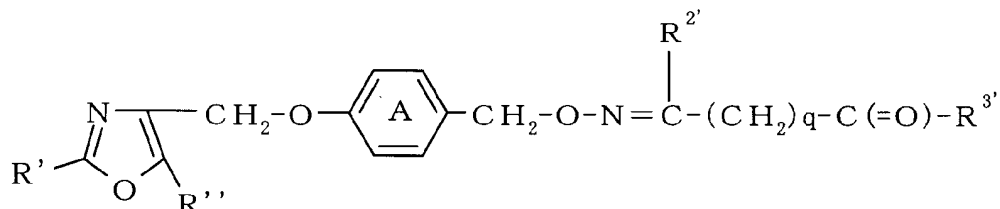
30 (10) (E)型和/(或)(Z)型化合物

式(I)化合物包括在亚氨基键周围的(E)型和(Z)型化合物。这些化合物包括

作为单一的化合物的那些(E)型和(Z)型化合物和它们的混合物。

(11) 优选实例

式(I)化合物的优选实例包括下式化合物或其盐:



5 其中

R'为苯基, 呋喃基或噻吩基, 各自任选被1或2个取代基所取代, 这些取代基选自: 具有1-6个碳原子的烷基、具有1-6个碳原子的烷氧基、卤素(例如氟、氯、溴和碘等), 硝基, 具有1-6个碳原子的卤代烷基和具有1-6个碳原子的卤代烷氧基;

10 R''为氢原子或任选取代的具有1-6个碳原子的烷基(更优选氢原子, 甲基或乙基);

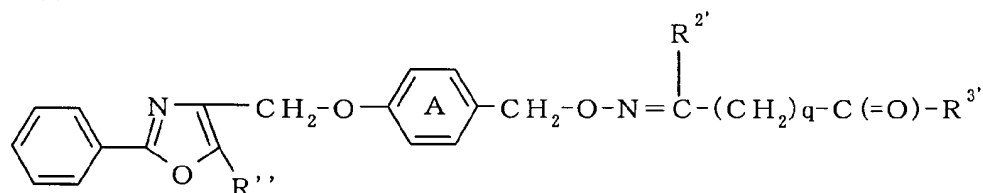
R^{2'}为氢原子, 任选被至少一个取代基取代的苯基, 所述取代基选自具有1-6个碳原子的烷基, 具有1-6个碳原子的烷氧基和卤素;

q为整数1-6;

15 R^{3'}为羟基, 具有1-6个碳原子的烷氧基, 或基团-NR⁹R¹⁰ (R⁹和R¹⁰相同或不同, 各自为氢原子, 任选取代的烷基, 任选取代的杂环基, 任选取代的酰基, 或R⁹和R¹⁰可以键合形成一个环); 和

A环为任选取代的苯环。

式(I)化合物的优选实例还包括下式化合物或其盐:



20

其中各个符号如上定义。

式(I)化合物的优选实例为下列化合物(1)-(10)等。

(1) Z-2-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]-2-苯基乙酸;

(2) Z-4-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]-4-苯基丁酸;

25 (3) Z-2-(4-溴代苯基)-2-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]

基]乙酸;

(4) Z-2-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]-2-(4-苯氧基苯基)乙酸;

5 (5) Z-4-(4-氟代苯基)-4-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]丁酸;

(6) Z-3-甲基-2-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]丁酸;

(7) E-4-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]-4-苯基丁酸;

(8) E-4-(4-氟代苯基)-4-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]丁酸;

10 (9) E-4-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]-4-苯基丁酰胺;

(10) E-8-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]-8-苯基辛酸。

这些化合物在下文中有时缩写为化合物(1)、化合物(2)等。

15 式(I)所代表的化合物(下文中有时简单地写作式(I)化合物)的盐优选为可药用盐,例如为与无机碱、有机碱、无机酸、有机酸,碱性氨基酸或酸性氨基酸等形成的盐。

无机碱盐的优选实例包括:碱金属盐,如钠盐,钾盐等;碱土金属盐,如钙盐,镁盐等;铝盐和铵盐等。

20 有机碱盐的优选实例包括:三甲胺盐、三乙胺盐、吡啶盐、甲基吡啶盐、乙醇胺盐、二乙醇胺盐、三乙醇胺盐、二环己基胺盐和N,N-二苄基乙二胺盐等。

无机酸盐的优选实例包括与下列酸形成的盐:盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸和磷酸等。

25 有机酸盐的优选实例包括与下列酸形成的盐:甲酸、乙酸、三氟乙酸,富马酸,草酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、甲磺酸、苯磺酸和对甲苯磺酸等。

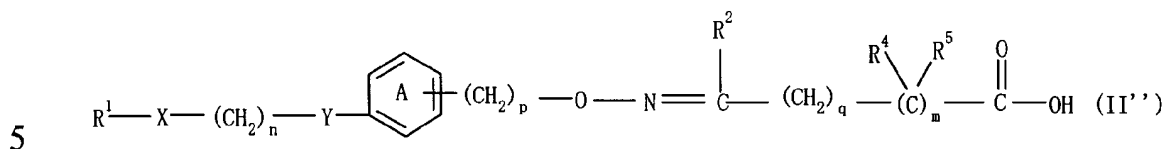
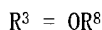
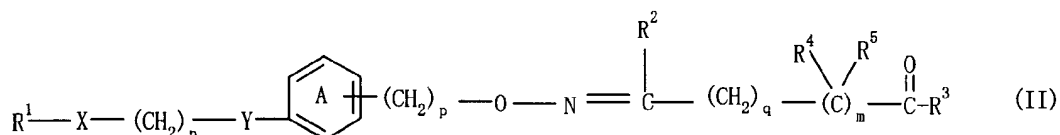
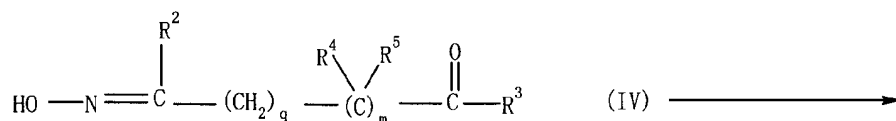
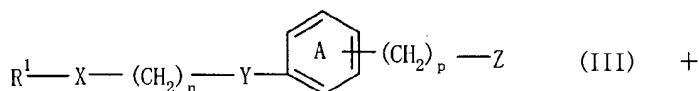
碱性氨基酸盐的优选实例包括与下列氨基酸形成的盐:精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸等。酸性氨基酸盐的优选实例包括与天门冬氨酸或谷氨酸形成的盐。

30

在上述盐中,优选钠盐、钾盐和盐酸盐等。

(12) 制备方法

例如, 可以按照 JP-A-2000-34266 (JP 申请号: 11-130543, WO99/58510) 中记载的方法制备式(I)化合物。例如作为这样的方法, 提到了下列制备方法。



其中 Z 为羟基, 卤原子或基团 OSO_2R^{18} (R^{18} 为具有 1-4 个碳原子的烷基, 任选被具有 1-4 个碳原子的烷基所取代的具有 6-10 个碳原子芳基), 其它符号的定义如上文所述。

本文中, 由 R^{18} 所代表的“具有 1-4 个碳原子的烷基”和“任选被 1-4 个碳原子的烷基所取代的具有 6-10 个碳原子的芳基”中具有 1-4 个碳原子的烷基的实例包括: 甲基, 乙基, 丙基, 异丙基, 丁基, 异丁基, 仲丁基和叔丁基, 特别优选甲基。

由 R^{18} 所代表的“任选被具有 1-4 个碳原子的烷基所取代的具有 6-10 个碳原子的芳基”中具有 6-10 个碳原子的芳基的实例包括: 苯基和萘基, 特别优选苯基。

根据此方法, 化合物(III)和化合物(IV)反应制备得到化合物(II)。

当 Z 为羟基时, 按照本领域技术人员已知的方法进行上述反应, 例如

按照 Synthesis, (第 1 页 (1981))中记载的方法或类似方法进行。也就是说, 通常在不对反应产生有害影响的溶剂中, 在有机磷化合物和亲电试剂存在下进行该反应。

有机磷化合物的实例包括: 三苯基膦和三丁基膦等。

- 5 亲电试剂的实例包括: 偶氮二甲酸二乙酯, 偶氮二甲酸二异丙基酯和偶氮羰基二哌嗪等。

有机磷化合物和亲电试剂的用量优选为化合物(IV)的 1-5 摩尔当量。

- 10 不对反应产生有害影响的药剂的实例包括: 醚类, 如乙醚、四氢呋喃和二氧六环等; 卤代烃, 如氯仿、二氯甲烷等; 芳烃, 如苯、甲苯和二甲苯等; 酰胺类, 如 N, N-二甲基甲酰胺等; 亚砷类, 如二甲亚砷等。这些溶剂可以按照适合的比例混合应用。

反应温度通常为-50°C 至 150°C, 优选-10°C 至 100°C。

反应时间为 0.5-20 小时。

- 15 当 Z 为卤原子或基团 $\text{OSO}_2\text{R}^{18}$ 时, 则按照常规方法, 在不对反应产生有害影响的溶剂中在碱的存在下进行反应。

碱的实例包括: 碱金属盐如氢氧化钾、氢氧化钠、碳酸氢钠和碳酸钾等; 胺类如吡啶、三乙胺、N, N-二甲基苯胺、1, 8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯等; 金属氢化物如氢化钾、氢化钠等; 碱金属醇盐如甲醇钠、乙醇钠和叔丁醇钾等。

- 20 这些的碱的用量优选为相对于化合物(IV)的 1-5 摩尔当量。

不对反应产生有害影响的溶剂的实例包括: 芳烃如苯、甲苯和二甲苯等; 醚类如四氢呋喃和二氧六环等; 酮类如丙酮、2-丁酮等; 卤代烃如氯仿、二氯甲烷等; 酰胺类例如 N, N-二甲基甲酰胺等; 以及类似物质。这些溶剂可以按照适合的比例混合应用。

- 25 反应温度通常为-50 至 150°C, 优选-10°C 至 100°C。

反应时间通常为 0.5-20 小时。

当需要时, 化合物(II, $\text{R}^3 = \text{OR}^8$)进行水解反应产生化合物(II')。

水解反应是按照常规方法, 在水性溶剂中, 在酸或碱的存在下进行。

酸的实例包括: 盐酸、硫酸、乙酸和氢溴酸等。

- 30 碱的实例包括: 碱金属碳酸盐如碳酸钾、碳酸钠等; 碱金属醇盐如甲醇钠等; 碱金属氢氧化物如氢氧化钾、氢氧化钠和氢氧化锂等; 以及类似

物质。

相对于化合物(II)来说,酸或碱的量通常需要过量些。优选地,酸的用量为相对于化合物(II)的 2-50 当量;碱的用量为相对于化合物(II)的 1.2-5 当量。

- 5 水性溶剂的实例包括水与选自下列的一种或多种溶剂相混合的溶剂:醇类如甲醇和乙醇等;醚类如四氢呋喃和二氧六环等;二甲亚砜、丙酮等以及类似物质。

反应温度通常为 -20°C 至 150°C ,优选 -10°C 至 100°C 。

反应时间通常为 0.1-20 小时。

- 10 可以按照已知的分离和纯化方法对所得到的化合物(II)和(II'')进行分离和纯化。所述分离和纯化方法例如浓缩、减压浓缩、溶剂提取、结晶、重结晶、相转移和层析技术等。

- 在上述制备方法中用作起始原料的化合物(III)和化合物(IV)是已知的化合物,例如,在 EP-A-710659 中记载了 Z 为羟基的化合物(III)。在
15 EP-A-629624 (JP-A-7-53555)和 WO 98/03505 等文献中记载了化合物(III)。化合物(III)也可以按照类似于上述文献中的方法制备得到。

- 例如,在 Journal fur Praktische Chemie, vol. 311, 370 (1969); Canadian Journal of Chemistry, vol. 48, 1948 (1970)和 Journal of Heterocyclic Chemistry, vol. 25, 1283 (1988)等文献中记载了化合物(IV)。化合物(IV)还可以按照类似
20 于上述文献中记载的方法制备。

在本发明中,PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 激动剂样物质不限于上述例举的内容。只要能够达到类似的效果,则能够应用任意物质。另外,这些物质还可以具有 PPAR α 功能调节作用(激动剂或拮抗剂活性)。

- 考虑到给药对象患者的负担(burden)、制药的麻烦等因素,在本发明中,
25 需要同时具有 PPAR δ 激动剂类作用和 PPAR γ 激动剂类作用的单一物质。这样的物质的例如为上述化合物(I), YM-16638 (见上文), p-[3-(4-乙酰基-3-羟基-2-丙基苯氧基)丙氧基]苯基丁酸 (见上文), 5-[3-[4-[(5-甲基-2-苯基-1,3-噻唑-4-基)甲氧基]苯基]丙基]-1,3-噁唑烷-2,4-二酮(见上文)以及类似物质。

- 含有 PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 激动剂样物质的药物制剂也是本发
30 明的一个实施方案。这样的优选组合的实例包括:PPAR γ 激动剂如上述胰岛素增敏剂(如曲格列酮,罗格列酮,englitazone,酪里达唑(ciglitazone),皮欧

格列酮等)和上述 carbaprostacyclin (cPGI), L-165041 或化合物(I)等。

由于化合物(I)本身同时具有 PPAR δ 激动剂样作用和 PPAR γ 激动剂样作用,其也可以与胰岛素增敏剂组合使用。

当 PPAR γ 激动剂样物质和 PPAR δ 激动剂样物质为不同物质时,本发明制剂的剂量需要在各自物质的有效量范围内,当 PPAR γ 激动剂样物质和 PPAR δ 激动剂样物质相同时,其剂量在该物质的有效量范围之内。

例如,当把本发明制剂口服给药至成年糖尿病患者(体重 60kg)时,对于 PPAR γ 激动剂样物质或 PPAR δ 激动剂样物质,其剂量例如为约 0.1-约 600 mg/天,优选约 12-约 240 mg/天。该剂量可以每天给药一次或分次给药,并且分两次或 3 次给药。

本发明制剂的毒性低,可以用作预防和治疗哺乳动物类下面所述的各种疾病的制剂(其中所述哺乳动物的实例为:人、小鼠、大鼠、兔、犬、猫、牛、马、猪和猴等)。

本发明制剂可以含有药用载体。作为这些载体,使用通常用作制备药物的起始原料的各种有机或无机载体物质,使用形式为:用于固体制剂的赋形剂、润滑剂、粘合剂或崩解剂;用于液体制剂的溶剂、离解助剂、悬浮剂、等渗剂、缓冲剂或安抚剂等。当必要时,还可以应用制剂添加剂例如防腐剂、抗氧化剂、着色剂和甜味剂等。

赋形剂的优选实例包括:乳糖、蔗糖、D-甘露糖醇、D-山梨糖醇、淀粉、预胶化淀粉、糊精、结晶纤维素、低取代羟丙基纤维素、羧甲基纤维素钠、阿拉伯胶、糊精、支链淀粉(pullulan)、轻质二氧化硅(light silicic anhydride)、合成硅酸铝和硅酸铝镁等。

润滑剂的优选实例包括:硬脂酸镁、硬脂酸钙、滑石和胶体二氧化硅等。

粘合剂的优选实例包括:预胶化淀粉、蔗糖(saccharose)、明胶、阿拉伯胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、结晶纤维素、蔗糖(sucrose)、D-甘露糖醇、海藻糖、糊精、支链淀粉、羟丙基纤维素、羟丙甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮等。

崩解剂的优选实例包括:乳糖、蔗糖、淀粉、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙、交联羧甲基纤维素钠(crosscarmellose sodium)、羧甲基淀粉钠、轻质二氧化硅和低取代羟丙基纤维素等。

溶剂的优选实例包括：注射用水、生理盐水、Ringer 溶液，醇，丙二醇、聚乙二醇、芝麻油、玉米油、橄榄油和棉油等。

- 5 离解助剂的优选实例包括：聚乙二醇、丙二醇、D-甘露糖醇、海藻糖、苯甲酸苄酯、乙醇、三氨基甲烷、胆固醇、三乙醇胺、碳酸钠、柠檬酸钠、水杨酸钠和乙酸钠等。

- 10 悬浮剂的优选实例包括：表面活性剂，如硬脂酰三乙醇胺、十二烷基硫酸钠、十二烷基氨基丙酸、卵磷脂、苯扎氯铵、氯化苄乙氧铵和甘油单硬脂酸酯等；亲水性聚合物如聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素等；聚山梨醇酯和聚氧乙烯氢化蓖麻油等。

等渗剂的优选实例包括：氯化钠、甘油、D-甘露糖醇、D-山梨糖醇和葡萄糖等。

缓冲剂的优选实例包括：磷酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、碳酸盐缓冲剂和柠檬酸缓冲剂等。

- 15 安抚剂的优选实例包括：苯甲醇等。

防腐剂的优选实例包括：对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯甲醇、苯乙醇、脱氢醋酸和山梨酸等。

抗氧化剂的优选实例包括：亚硫酸盐和抗坏血酸盐等。

- 20 着色剂的优选实例包括：水溶性食用焦油色素(食用色素如食用红色色素 2 号和 3 号、食用黄色色素 4 号和 5 号、食用蓝色色素 1 号和 2 号)。水不溶性沉淀色料(lake)(例如上述水溶性食用焦油色素的铝盐等)、天然色素(例如 β -胡萝卜素、叶绿素、红氧化铁等)等。

甜味剂的优选实例包括：糖精钠、甘草酸二钾、阿司帕坦(aspartame)和甜叶菊甙(stevia)等。

- 25 当 PPAR δ 激动剂样物质和 PPAR γ 激动剂样物质是不同物质时，本发明制剂可以是含有两种物质的单一制剂或含有每一物质的两种不同制剂。如果是两种不同制剂，则并不要求制剂的剂型相同。根据这些制剂的活性成分，合适地选择医学治疗所通常应用的剂型。

- 30 本发明制剂剂型的实例包括：口服制剂例如片剂、胶囊(包括软胶囊和微胶囊)、粒剂、粉剂、糖浆剂、乳剂、悬浮剂等；胃肠外制剂例如注射剂(如皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射、腹膜内注射剂等)、外用制剂(例如鼻

内给药制剂、经皮制剂、软膏等), 栓剂(例如直肠用栓剂、阴道用栓剂等), 小丸、滴剂和缓释制剂, 所有这些制剂可以安全地口服或胃肠外给药。

可以按照制药技术领域的常规方法制备本发明制剂, 例如按照日本药典中记载的方法制备。在下面将详细描述制剂的具体制备方法。

- 5 例如, 口服制剂可以通过往活性成分中加入下列物质而制备: 例如赋形剂(例如乳糖、蔗糖、淀粉、D-甘露糖醇等)、崩解剂(例如羧甲基纤维素钙等), 粘合剂(例如预胶化淀粉、阿拉伯胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮等)或润滑剂(例如滑石、硬脂酸镁和聚乙二醇 6000 等)以及类似物质, 将得到的混合物模压成型, 并且按照本领域已知的方法, 为了达到掩蔽味道、肠溶性或缓释的目的, 用包衣材料将其包衣。

包衣材料的实例包括: 糖包衣材料、水溶性膜包衣材料、肠溶性膜包衣材料和缓释膜包衣材料等。

作为糖包衣材料, 应用蔗糖, 并且可以联合应用下列一种或两种物质: 滑石、沉淀碳酸钙、明胶、阿拉伯胶、支链淀粉和巴西棕榈蜡等。

- 15 水溶性膜包衣材料的实例包括: 纤维素聚合物, 例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素, 羟乙基纤维素和甲基羟乙基纤维素等; 合成聚合物, 例如聚乙烯乙缩醛二乙基氨基乙酸酯、氨基烷基甲基丙烯酸酯共聚物 E[Eudragit E (商品名), Röhm Pharma], 聚乙烯吡咯烷酮等; 多糖, 例如支链淀粉等以及类似物质。
- 20 肠溶性膜包衣材料的实例包括: 纤维素聚合物例如邻苯二甲酸羟丙甲基纤维素, 乙酸琥珀酸羟丙甲基纤维素, 羧甲基乙基纤维素和乙酸邻苯二甲酸纤维素等; 丙烯酸聚合物例如甲基丙烯酸共聚物 L[Eudragit L (商品名), Röhm Pharma], 甲基丙烯酸共聚物 LD [Eudragit L-30D55 (商品名), Röhm Pharma], 甲基丙烯酸共聚物 S [Eudragit S (商品名), Röhm Pharma]等; 天然物质例如紫(虫)胶等以及类似物质。

- 25 缓释膜包衣材料的实例包括: 纤维素聚合物例如乙基纤维素等; 丙烯酸聚合物例如氨基烷基甲基丙烯酸酯共聚物 RS [Eudragit RS (商品名), Röhm Pharma], 丙烯酸乙酯·甲基丙烯酸甲酯共聚物悬浮液[Eudragit NE (商品名), Röhm Pharma]等以及类似物质。

- 30 上述包衣材料可以按照合适的比例以两种或多种物质相混合的形式联合应用。对于包衣来说, 例如可以应用遮蔽剂例如二氧化钛和三氧化二铁

等。

注射剂可以制备如下：把活性成分和分散剂(例如吐温 80, 聚氧乙烯基氢化蓖麻油 60 等), 聚乙二醇, 羧甲基纤维素和藻酸钠等), 防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲醇、氯代丁醇和苯酚等), 等渗剂(例如氯化钠, 甘油、D-甘露糖醇、D-山梨糖醇和葡萄糖等)以及类似物质溶解、悬浮或乳化于水性溶剂(例如蒸馏水、生理盐水、Ringer 溶液等)或油性溶剂(例如植物油如橄榄油、芝麻油、棉油和玉米油等、丙二醇等)等溶剂中。根据需要, 可以应用添加剂例如离解助剂(例如水杨酸钠和乙酸钠等), 稳定剂(例如人血清白蛋白等)和安抚剂(例如苺醇等)等物质。

10 在上述各种剂型中, 口服剂型例如片剂、胶囊等由于其服用方便因此是特别优选的。

本发明制剂能够有效地抑制患有各种疾病(例如糖尿病)的患者的体重增加, 所述患者是进行 PPAR γ 激动剂样物质(例如胰岛素增敏剂)药物治疗的患者, 并且可用于治疗或预防 PPAR δ -相关疾病(例如高胆固醇血症、低-高密度脂蛋白血症)等。

本发明制剂能够抑制由 PPAR γ 激动剂样物质引起的体重增加, 其可以在例如接受 PPAR γ 激动剂样物质药物治疗的患者(如糖尿病患者)中观察到不高于约 80%。

可以有效地把本发明制剂用作下列疾病的治疗或预防剂：糖尿病(例如 20 1 型、2 型糖尿病、妊娠糖尿病等)、高脂血症(例如高甘油三酯血症、高胆固醇血症、低-高密度-脂蛋白血症、饭后高脂血症等), 糖尿病并发症(例如神经病、肾病、视网膜病、白内障、大血管症(macroangiopathy)和骨质减少(osteopenia)等), 葡萄糖耐受性降低(IGT), 肥胖、骨质疏松、恶病质(例如癌性恶病质、结核性恶病质、糖尿病恶病质、血液疾病恶病质、内分泌疾病恶病质、感染性疾病恶病质或由获得性免疫缺陷综合征引起的恶病质), 脂肪肝、高血压、多囊性卵巢综合征、妊娠糖尿病和肾病等(例如糖尿病肾病、肾小球性肾炎、肾小球硬化症、肾病综合征(nephrotic syndrome)、高血压性肾硬化症、终期肾疾病(terminal renal disorder)等), 肌肉萎缩症(muscular dystrophy)、心肌梗塞、咽峡炎(angina)、脑血管疾病(例如脑梗塞形成、中 25 风), 胰岛素抵抗综合征、综合征 X、高胰岛素血症、高胰岛素血症中的感觉疾病、肿瘤(例如白血病, 乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌等)、过敏性肠综合 30

征(irritable intestine syndrome)、急性或慢性腹泻和内脏脂肪综合征(visceral fat syndrome)等。另外,本发明制剂还可以用于辅助性治疗以提高胰岛素抵抗、增强胰岛素敏感性或防止葡萄糖耐受性降低发展成糖尿病。另外,还可以在糖尿病治疗期间,把本发明制剂用于控制食欲和食物摄取。

- 5 对于糖尿病的诊断标准,日本糖尿病协会(Japan Diabetes Society)在1999年报道了新的诊断标准。

根据该报道,糖尿病为下述状态:空腹血糖含量(静脉血中的葡萄糖浓度)不低于126 mg/dl,75 g口服葡萄糖耐受性测试(75 g OGTT) 2 小时含量(静脉血中的葡萄糖浓度)不低于200 mg/dl,非空腹血糖含量(静脉血中的葡萄糖浓度)不低于200 mg/dl。如果状态不落入上述糖尿病范围内,并且也不是“空腹血糖含量(静脉血中的葡萄糖浓度)低于110 mg/dl或75g口服葡萄糖耐受性测试(75 g OGTT) 2 小时含量(静脉血中的葡萄糖浓度)低于140 mg/dl的状态(正常型)”,则该状态称为“边界型(borderline type)”。

10

- 另外,ADA (American Diabetes Association,美国糖尿病协会)在1997年、WHO在1998年报道了新的诊断标准。
- 15

根据这些报道,糖尿病为这样的状态:空腹血糖含量(静脉血中的葡萄糖浓度)不低于126 mg/dl,并且75 g口服葡萄糖耐受性测试的2小时含量(静脉血中的葡萄糖浓度)不低于200 mg/dl。

- 根据上述报道,葡萄糖耐受性降低为这样的状态:禁食状态下的血糖含量(静脉血中的葡萄糖浓度)低于126 mg/dl和75 g口服葡萄糖耐受性测试2小时含量(静脉血中的葡萄糖浓度)不低于140 mg/dl但低于200 mg/dl。根据ADA的报道,空腹血糖含量(静脉血中的葡萄糖浓度)不低于110 mg/dl但低于126 mg/dl的状况被称为IFG (Impaired Fasting Glucose)。根据WHO的报道,在IFG(Impaired Fasting Glucose)中,75g口服葡萄糖耐受性测试2小时含量(静脉血中的葡萄糖浓度)低于140 mg/dl的状况被称为IFG (Impaired Fasting Glycemia)。
- 20
- 25

- 根据上述新诊断标准所确定的标准,本发明制剂还可以用作糖尿病、边界型、葡萄糖耐受降低、IFG (Impaired Fasting Glucose)和IFG (Impaired Fasting Glycemia)的治疗和预防制剂。而且,本发明制剂能够预防边界型、葡萄糖耐受性降低、IFG (Impaired Fasting Glucose)或IFG (Impaired Fasting Glycemia)发展成糖尿病。
- 30

而且,本发明制剂与药物制剂(下文中简称为联用剂)联合使用,例如可以联合应用糖尿病治疗剂、糖尿病并发症治疗剂、抗高脂血症剂、抗高血压剂、利尿剂、化疗剂和免疫治疗剂等。本发明制剂本身能够含有这样的联用制剂。除非本文中另有说明,单独“联用”表示应用独立的药物制剂
5 给药方式和单个、组合的药物制剂给药方式。当把单个的药物制剂联合应用时,本发明制剂和联用剂对给药时间没有限制。这些物质可以同时给药至给药对象,或者可以在交错时间给药。两种或多种联用剂可以按照合适的的应用比例联合给药。

联用剂的剂量可以以各个制剂临床应用的剂量作为标准适当进行确定。本发明制剂和联用剂的混合比例可以由下列因素确定:给药对象、给
10 药途径、目标疾病、状态和联用等因素。

糖尿病治疗剂的实例包括:胰岛素制剂(例如由牛或猪胰腺中提取的动物胰岛素制剂;应用大肠杆菌或酵母等通过基因工程技术合成的人胰岛素制剂), α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如 voglibose, 阿卡波糖, miglitol, emiglitate 等),
15 双胍药剂(例如苯乙双胍,二甲双胍,丁二胍等),胰岛素促分泌剂[例如磺酰脲类(例如甲苯磺丁脲(tolbutamide)、格列本脲(glibenclamide)、格列齐特(gliclazide)、氯磺丙脲(chlorpropamide)、妥拉磺脲(tolazamide)、醋磺己脲(acetohexamide)、格列吡脲(glyclopamide)、格列美脲(glimepiride)、格列吡嗪(glipizide)和格列丁唑(glybuzo)等),瑞格列奈(repaglinide), senaglinide,
20 nateglinide, mitiglinide 或其钙盐水合物, GLP-1 等], 糊精(amylin)激动剂(例如 pramlintide 等), 磷酸酪氨酸磷酸酯酶抑制剂(例如钒酸等)等。

糖尿病并发症的治疗剂的实例包括:醛糖还原酶抑制剂(例如托瑞司他(tolrestat), 依帕司他(epalrestat)、zenarestat, zopolrestat, minalrestat, fidarestat, SNK-860, CT-112 等)、神经营养因子(例如 NGF, NT-3 和 BDNF 等)、神经营
25 养因子生成促进剂、PKC 抑制剂(例如 LY-333531 等), AGE 抑制剂(例如 ALT946, pimagedine, pyratoxathine, N-苯乙酰噻唑鎓溴化物(ALT766), EXO-226 等), 活性氧清除剂(例如硫辛酸等)和脑血管舒张药(例如硫必利(tiapride)、美西律(mexiletine)等)。

抗高脂血症剂的实例包括:司他类(statin)化合物(例如帕伐他丁
30 (pravastatin), 西伐司他(simvastatin), 洛伐司他(lovastatin)、氟伐他停(atorvastatin)、cerivastatin, itavastatin, 它们的盐(例如钠盐)等), 它们是胆固

醇合成抑制剂、角鲨烯合成酶抑制剂、具有降低甘油三酯作用的贝特类(fibrate)化合物(例如苯扎贝特、氯贝丁酯、双贝特、克利贝特等)等。

抗高血压剂的实例包括: 增血压素转化酶抑制剂(例如卡托普利、依那普利和地拉普利等), 血管紧张素 II 拮抗剂(例如氯沙坦(losartan), candesartan
5 cilexetil, eprosartan, valsartan, termisartan, irbesartan, tasosartan 等), 钙拮抗剂(例如马尼地平(manidipine), 硝苯地平(nifedipine), 氨氯地平(amlonidipine), efonidipine, 硝苯乙吡啶(nicardipine))等。

抗肥胖剂的实例包括: 中枢作用抗肥胖剂(例如右芬氟拉明(dexfenfluramine), 芬氟拉明(fenfluramine)、苯叔丁胺(fentermine), 西布茶明
10 (sibutramine), 安非拉酮(amfepramone), 右旋苯丙胺(dexamphetamine)、马咧啉(mazindol)、苯丙醇胺(phenylpropanolamine)、氯苄雷司(clobenzorex)等), 胰腺脂肪酶抑制剂(例如 orlistat 等), β_3 激动剂(例如 CL-316243, SR-58611-A, UL-TG-307, SB-226552, AJ-9677, BMS-196085, AZ40140 等), 减食欲的肽类(anorectic peptides)(例如 leptin, CNTF (睫状神经营养因子)等), 缩胆囊素激
15 动剂(cholecystikinin agonists)(例如 lintitript, FPL-15849 等)等。

利尿剂的实例包括: 黄嘌呤衍生物(例如水杨酸钠和可可碱, 水杨酸钙和可可碱等), 噻嗪类制剂(例如乙噻嗪(ethiazide)、环戊噻嗪(cyclopenthiazide)、三氯噻嗪(trichlormethiazide)、氢氯噻嗪(hydrochlorothiazide)、氢氟噻嗪(hydroflumethiazide), 苄基氢氯噻嗪
20 (benzylhydrochlorothiazide), 戊氟噻嗪(penflutizide), 泊利噻嗪(polythiazide), 甲氯噻嗪(methyclothiazide)等), 抗醛固酮制剂(例如安体舒通(spironolactone), 氯苯蝶啶(triamterene)等), 碳酸盐脱水酶抑制剂(例如乙酰唑胺(acetazolamide)等), 氯苯磺酰胺制剂(例如氯噻酮(chlorthalidone), 美夫西特(mefruside), 吲达帕胺(indapamide)等), 阿佐塞米(azosemide), 异山梨糖
25 醇酐(isosorbide), 依他尼酸(ethacrynic acid), 吡咯他尼(piretanide)、布美他尼(bumetanide)、速尿(furosemide)等。

化疗剂的实例包括: 烷基化试剂(例如环磷酰胺, 异环磷酰胺等), 新陈代谢拮抗剂(例如甲氧蝶呤, 5-氟尿嘧啶等), 抗肿瘤抗生素类(例如丝裂霉素, 阿霉素等), 来源于植物的抗肿瘤剂(例如长春新碱, 长春地辛和紫杉醇等),
30 顺铂, 卡铂, 依托泊甙等。其中, 5-氟尿嘧啶的衍生物例如氧氟尿苷(furtulon)和新氧氟尿苷(neofurtulon)等是优选的。

免疫治疗制剂的实例包括:微生物或细菌成分(例如胞壁酰基二肽衍生物(muramyl dipeptide derivatives), 溶链菌(picibanil)等), 具有免疫调节活性的多糖类(例如香菇多糖(lentinan), 裂裯多糖(schizophyllan), 云芝多糖(krestin)等), 经基因工程技术获得的细胞因子(例如干扰素, 白介素(IL)等), 5 集落刺激因子(例如粒细胞集落刺激因子, 红细胞生成素等)等。其中, IL-1, IL-2 和 IL-12 等是优选的。

而且, 对于已知在动物模型和临床研究中具有恶病质改善活性的药物制剂, 例如环氧合酶抑制剂(例如吲哚美辛等) [Cancer Research, 第 49 卷, 第 5935-5939 页, 1989], 孕酮衍生物(例如乙酸甲地孕酮) [Journal of Clinical 10 Oncology, 第 12 卷, 第 213-225 页, 1994 年], 糖甾类化合物(例如地塞米松等), 胃复安药剂, 四氢大麻酚药剂(参见上面同样的文献), 改善脂芳新陈代谢的药剂(例如二十碳五烯酸等) [British Journal of Cancer, 第 68 卷, 第 314-318 页, 1993], 生长激素 IGF-1, 和抗 TNF- α 抗体, LIF, IL-6 和制瘤素 M, 包括恶病质等也可以与本发明的药物制剂联合应用。

15 联用剂的优选实施例包括下列:

- 1) 胰岛素制剂;
- 2) 双胍类药剂;
- 3) 胰岛素促分泌剂例如磺酰脲药剂等;
- 4) 双胍类药剂;
- 20 5) α -葡萄糖苷酶抑制剂;
- 6) 胰岛素制剂和双胍类药剂;
- 7) 胰岛素制剂和 α -葡萄糖苷酶抑制剂;
- 8) 胰岛素促分泌剂例如磺酰脲类药剂等和双胍类药剂;
- 9) 胰岛素促分泌剂例如磺酰脲类药剂等和 α -葡萄糖苷酶抑制剂;
- 25 10) 双胍类药剂和 α -葡萄糖苷酶抑制剂;
- 11) 胰岛素增敏剂(例如 PPAR γ 激动剂样物质);
- 12) 胰岛素增敏剂和上述 1)-10) 制剂的组合;
- 13) 降血糖药剂和糖尿病并发症的其它治疗剂;
- 14) 上述其它药剂和它们中的两种或多种药剂的组合。

30 当本发明药剂与联用剂组合使用时, 考虑到这些药剂的副作用, 其剂量可以降低到安全范围内。具体地说, 胰岛素制剂, 胰岛素促分泌剂如磺酰

脲类药剂等和双胍类药剂的剂量可以降低到比通常剂量低的含量。因此，能够安全地防止可能由这些药剂引起的副作用。另外，对于治疗糖尿病并发症的药剂，抗高脂血症药剂和抗高血压药剂来说，可以降低其剂量，从而有效地防止可能由这些药剂引起的副作用。

5

本发明的最佳实施方式

通过下列制造实施例、制备实施例、试验实施例和配制实施例将更详细地说明本发明，但是不能将它们看作对本发明的限制。在下列描述中，除非另有说明，%表示重量百分比，室温表示 1°C-30°C。

10 当碱、氨基酸以及类似物质在本发明中使用缩写表示时，它们是基于 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 规定的缩写，或者为相关领域的常规缩写，下文中各示出了一些实例。当氨基酸具有旋光异构体时，除非另有说明，一般指 L 型。

在本说明书的序列表中，SEQ ID 号表示下列序列。

15 [SEQ ID No: 1] 描述的是制备实施例 1 中所用的引物 PARD-U 的碱基序列。

[SEQ ID No: 2] 描述的是制备实施例 1 中所用的引物 PARD-L 的碱基序列。

20 [SEQ ID No: 3] 描述的是制备实施例 2 中所用的引物 XRA-U 的碱基序列。

[SEQ ID No: 4] 描述的是制备实施例 2 中所用的引物 XRA-L 的碱基序列。

[SEQ ID No: 5] 描述的是制备实施例 4 中所用的引物 PPRE-U 的碱基序列。

25 [SEQ ID No: 6] 描述的是制备实施例 4 中所用的引物 PPRE-L 的碱基序列。

[SEQ ID No: 7] 描述的是制备实施例 4 中所用的引物 TK-U 的碱基序列。

30 [SEQ ID No: 8] 描述的是制备实施例 4 中所用的引物 TK-L 的碱基序列。

[SEQ ID No: 9] 描述的是制备实施例 6 中所用的引物 PAG-U 的碱基序

列。

[SEQ ID No: 10] 描述的是制备实施例 6 中所用的引物 PAG-L 的碱基序列。

5

实施例

制造实施例 1: 4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄醇的制造

在 0℃ 下, 把硼氢化钠(4.31g)缓缓地加入到溶解于甲醇(150ml)-四氢呋喃(30ml)的 4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苯甲醛(33.42 g)溶液中。室温下搅拌该混合物 30 分钟后, 往反应混合物中加入水, 将混合物搅拌 1 小时。
10 经过滤收集沉淀出的 4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄醇的晶体(32.85 g, 产率 98%)。用乙酸乙酯-乙醚重结晶得到浅黄色晶体, 熔点: 128-129℃。

制造实施例 2: 4-(4-氯甲基苯氧基甲基)-5-甲基-2-苯基噁唑的制造

把亚硫酸氯(1.85ml)加入到 4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄醇(5.00 g)的甲苯(40 ml)溶液中, 在室温下将混合物搅拌 30 分钟。往反应混合物中
15 加入冰水, 用乙酸乙酯提取混合物。用水洗涤乙酸乙酯层, 用 MgSO₄ 干燥, 浓缩得到 4-(4-氯甲基苯氧基甲基)-5-甲基-2-苯基噁唑晶体(5.23 g, 产率 99%)。用乙酸乙酯-己烷重结晶得到无色晶体, 熔点: 108-109℃。

制造实施例 3: E-4-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基亚氨基]-4-苯基丁酸的制备

20 在室温和氮气氛围下, 把氢氧化钠(60%油溶液, 127mg)加入 E-4-羟基亚氨基-4-苯基丁酸甲酯(661 mg)和 4-(4-氯甲基苯氧基甲基)-5-甲基-2-苯并噁唑(1.00 g)的 N,N-二甲基甲酰胺(10ml)溶液中。将混合物搅拌 1 小时。加入 1N 盐酸(5 ml), 再加入碳酸氢钠水溶液, 然后用乙酸乙酯提取混合物。该乙酸乙酯层用饱和盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 浓缩。将残余物进行硅胶柱层析,
25 从乙酸乙酯-己烷(1:3 体积比)洗脱部分得到油状物质。将其溶解于四氢呋喃(10 ml)-甲醇(5 ml)中, 加入 1N 氢氧化钠水溶液(5 ml), 将混合物在室温下搅拌 1.5 小时。将 1N 盐酸(5.5 ml)加入到反应混合物中, 然后用乙酸乙酯提取混合物。乙酸乙酯层用饱和盐水洗涤, 用硫酸镁干燥, 浓缩, 剩下的晶体用乙酸乙酯-己烷重结晶得到 E-4-[4-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基甲氧基)苄氧基
30 亚氨基]-4-苯基丁酸, 其为无色晶体(907 mg, 产率 60%), 熔点: 126-127℃ (分解)。

制备实施例 1: 人 PPAR δ 基因的克隆

应用引物对:

PAR δ -U: 5'-AAC GGT ACC TCA GCC ATG GAG CAG CCT CAG GAG
G-3' (SEQ ID No: 1)

5 PAR δ -L: 5'-TAA GTC GAC CCG TTA GTA C AT G TC C TT G TA G AT
C-3' (SEQ ID No: 2)

通过 PCR 方法克隆人 PPAR δ 基因, 其中所述的引物对是通过参照 Schmidt, A. 等(Mol Endocrinol 1992; 6: 1634-1641)等报道的 PPAR δ 基因的碱基序列并应用胰腺 cDNA(Toyobo, QUICK-Clone cDNA)作为模板制备得到的。

10 应用 AmpliWax PCR Gem 100 (Takara Shuzo Co., Ltd.)按照 Hot Start 方法进行 PCR 反应。将 10 $\times$ LA PCR Buffer (2 μ l), 2.5 mM dNTP 溶液(3 μ l), 12.5 μ M 引物溶液(各 2.5 μ l)和无菌蒸馏水(10 μ l)混合, 作为下层混合物。把作为模板的人心脏 cDNA(1 ng/ml, 1 μ l), 10 $\times$ LA PCR Buffer (3 μ l), 2.5 mM dNTP 溶液(1 μ l), TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶(0.5 μ l, Takara Shuzo Co., Ltd.)和无菌
15 蒸馏水(24.5 μ l)混合, 作为上层混合物。把一个 Ampliwax PCR Gem 100(Takara Shuzo CO.Ltd.)加入到所制备的下层混合物中, 将该混合物在 70 $^{\circ}$ C 下处理 5 分钟, 然后将其置于冰中 5 分钟, 然后往其中加入上层混合物得到 PCR 反应混合物。把含有反应混合物的小管置于热循环控制装置 (Thermal Cycler) (Perkin Elmer)中, 在 95 $^{\circ}$ C 下处理 2 分钟。将该在 95 $^{\circ}$ C 下
20 15 秒钟和在 68 $^{\circ}$ C 下 2 分钟的循环重复 45 次。将反应混合物在 72 $^{\circ}$ C 下处理 8 分钟。将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶(1%)电泳, 从凝胶中回收含有 PPAR δ 基因的 1.4 kb DNA 片断, 将其插入到 pT7Blue-T 载体(Takara Shuzo Co., Ltd.)中从而得到质粒 pTBT-hPPAR δ 。

制备实施例 2:人 RXR α 基因的克隆

25 人 RXR α 基因的克隆

应用引物对:

XRA-U: 5'-TTA GAA TTC GAC ATG GAC ACC AAA CAT TTC CTG-3'
(SEQ ID No: 3)

XRA-L: 5'-CCC CTC GAG CTA AGT CAT TTG GTG CGG CGC CTC-3'
30 (SEQ ID No: 4)

通过 PCR 方法克隆人 RXR α 基因, 其中所述的引物对是通过参照

Mangelsdorf, D. J.等.在[Nature, vol. 345 (6272), pp. 224-229 (1990)]报道的 RXR α 基因碱基序列, 应用肾 cDNA(Toyobo, 商品名: QUICK-Clone cDNA) 作为模板制备得到的。

- 应用 AmpliWax PCR Gem 100(由 Takara Shuzo Co.Ltd.制备), 按照 Hot
- 5 Start 方法进行 PCR 反应。将 10 $\times$ LA PCR Buffer (2 μ l), 2.5 mM dNTP 溶液(3 μ l), 12.5 μ M 引物溶液(各 2.5 μ l)和无菌蒸馏水(10 μ l)混合, 作为下层混合物。把作为模板的人肾 cDNA(1 ng/ml, 1 μ l), 10 $\times$ LA PCR Buffer (3 μ l), 2.5 mM dNTP 溶液(1 μ l), TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶(0.5 μ l, Takara Shuzo Co., Ltd.) 和无菌蒸馏水(24.5 μ l)混合, 作为上层混合物。
- 10 把一个 Ampliwax PCR Gem 100(Takara Shuzo CO.Ltd.生产)加入到上述的下层混合物中, 将该混合物在 70 $^{\circ}$ C 下处理 5 分钟, 然后将其置于冰中 5 分钟, 然后往其中加入上层混合物得到 PCR 反应混合物。把含有反应混合物的小管置于热循环控制装置(Thermal Cycler) (Perkin Elmer)中, 在 95 $^{\circ}$ C 下处理 2 分钟。将该在 95 $^{\circ}$ C 下 15 秒钟和在 68 $^{\circ}$ C 下 2 分钟的循环重复 35 次。
- 15 将反应混合物在 72 $^{\circ}$ C 下处理 8 分钟。

将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶(1%)电泳, 从凝胶中回收含有 PPAR δ 基因的 1.4 kb DNA 片段, 将其插入到 pT7Blue-T 载体(Takara Shuzo Co., Ltd.生产)中从而得到质粒 pTBT-hRXR α 。

制备实施例 3: 人 PPAR δ , RXR α 表达质粒的制备

- 20 把质粒 pVgRXR(Invitrogen)中的 7.8 kb FspI-NotI 片段和含有制备实施例 2 中所述质粒 pTBT-hRXR α 的 RXR α 基因的 0.9 kb FspI-NotI 片段进行连接(ligate)得到质粒 pVgRXR2。用 BstXI 剪切该 pVgRXR2, 然后用 T4 DNA 聚合酶(Takara Shuzo Co., Ltd.)处理在末端补平, 并用 KpnI 剪切得到 6.5 kb DNA 片段。分别地, 用 SalI 剪切制备实施例 1 所述的质粒 pTBT-hPPAR δ ,
- 25 在末端用 T4 DNA 聚合酶(Takara Shuzo Co., Ltd.)处理而补平, 并用 KpnI 剪切得到含有 PPAR δ 基因的 1.4kb DNA 片段。通过连接两个 DNA 片段, 构造出 pVgRXR2-hPPAR δ 质粒。

制备实施例 4: 报道质粒的制备

报道质粒的制备

- 30 含有酰基 CoA 氧化酶的 PPAR 响应元件 (PPRE) 的 DNA 片段通过应用下列 5'-末端磷酸化合成 DNA 来制备:

PPRE-U:

5'-pTCGACAGGGGACCAGGACAAAGGTCACGTTCGGGAG-3' (SEQ ID No: 5)

PPRE-L:

5 5'-pTCGACTCCCGAACGTGACCTTTGTCCTGGTCCCCTG-3' (SEQ ID No: 6)。

首先, 把 PPRE-U 和 PPRE-L 退火, 然后插入到质粒 pBlueScript SK+ 的 Sall 区域。确定插入片段的碱基序列, 基于该碱基序列, 选择含有 4 个串联 PPREs 的质粒 pBSS-PPRE4。

10 应用 pRL-TK 载体 (由美国 Promega 制造) 作为模板和下列引物对, 通过 PCR 方法克隆(HSV Thymidine)激酶最小启动子(TK 启动子)区域。

TK-U: 5'-CCCAGATCTCCCCAGCGTCTTGTCATTG-3' (SEQ ID No: 7)

TK-L: 5'-TCACCATGGTCAAGCTTTTAAGCGGGTC-3' (SEQ ID No: 8)

其中引物对是通过参照 Luckow.B 等.在[Nucleic Acids Res., vol. 15(13), p.5490(1987)]报道的胸腺嘧啶核苷激酶基因启动子区域的碱基序列制备得到的。

应用 AmpliWax PCR Gem 100(Takara Shuzo Co.Ltd.), 按照 Hot Start 方法进行 PCR 反应。将 10×LA PCR Buffer (2 μl), 2.5 mM dNTP 溶液(3 μl), 12.5 μM 引物溶液(各 2.5 μl)和无菌蒸馏水(10 μl)混合, 作为下层混合物。把作为
20 模板的 pRL-TK 载体(由美国 Promega 制备, 1 μl), 把 10×LA PCR Buffer (3 μl), 2.5 mM dNTP 溶液(1 μl), TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶(0.5 μl, 由 Takara Shuzo Co., Ltd.制备)和无菌蒸馏水(24.5 μl)混合, 作为上层混合物。

把 Ampliwax PCR Gem 100(由 Takara Shuzo CO.Ltd.制备)加入到所制备的下层混合物中, 将该混合物在 70℃下处理 5 分钟, 然后将其置于冰中 5
25 分钟, 然后往其中加入上层混合物得到 PCR 反应混合物。把含有反应混合物的小管置于热循环控制装置(由(Perkin Elmer, USA)制备)中, 在 95℃下处理 2 分钟。将该在 95℃下 15 秒钟和在 68℃下 2 分钟的循环重复 35 次。将反应混合物在 72℃下处理 8 分钟。

将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶(1%)电泳, 从凝胶中回收含有 TK
30 启动子的 140b DNA 片断, 将其插入到 pT7Blue-T 载体(由 Takara Shuzo Co., Ltd.制备)中。把此含有 TK 启动子的片段 (通过用 BgIII 和 NcoI 限制酶剪

切该质粒得到)与质粒 pGL3-碱基载体的 BglII-NcoI 片段[由美国 Promega 制备]相连接得到质粒 pGL3-TK。

将所获得的质粒 pGL3-TK 的 NheI-XhoI 片段(4.9 kb)和质粒 pBSS-PPRE4 的 NheI-XhoI 片段(200 b)相连接得到质粒 pGL3-4ERPP-TK。

- 5 用 BamHI(由 Takara Shuzo Co. Ltd 制备)剪切质粒 pGL3-4ERPP-TK, 并在末端用 T4 DNA 聚合酶(由 Takara Shuzo 有限公司制备)处理补平, 得到 DNA 片段。

用 Bsu36I(NEB)剪切 pGFP-C1(由 Toyobo 制备), 在末端用 T4DNA 聚合酶(由 Takara Shuzo Co. Ltd 制备)处理补平, 得到 1.6kb DNA 片段。

- 10 通过连接这两个 DNA 片段, 得到报道质粒 pGL3-4ERPP-TK neo。

制备实施例 5: 用于把人 PPAR δ , RXR α 表达质粒和报道质粒引入到 CHO-K1 细胞中和获得的表达细胞

- 应用含有 10%胎牛血清(Life oriental)的 Ham's F12 培养基 (Nissui Pharmaceutical Co.Ltd)在组织培养瓶(750ml, Corning)中培养 CHO-K1 细胞, 15 用 0.5g/L trypsin-0.2g/L EDTA(Lifetech oriental)处理使之剥脱。用 PBS(Lifetech Oriental)洗涤这些细胞, 离心(1000 rpm, 5 分钟), 在 PBS 中悬浮。应用基因脉冲装置(Bio-Rad Laboratories), 在下列条件下把 DNA 引入到细胞中。具体地, 把 8×10^6 细胞, 10 μ g 制备实施例 3 中制备得到的表达质粒 pVgRXR2-hPPAR δ 和 10 μ g 制备实施例 4 中制备得到的报道质粒 20 pGL3-4ERPP-TK neo 置于比色杯中, 其中所述比色杯具有 0.4 cm 间距, 在 0.25 kV 电压和 960mF 电容下进行电穿孔。然后, 将细胞置于含 10%胎牛血清的 Ham's F12 培养基中培养 24 小时, 再次剥脱和离心, 悬浮于含有 10%胎牛血清的 Ham's F12 培养基中, 所述培养基补加了基因霉素(500 μ g/ml, Lifetech Oriental)和 zeocin (250 μ g/ml, Invitrogen), 稀释至 10^4 细胞/ml, 接种 25 至 96 孔板(Becton Dickinson), 在二氧化碳气体温育箱中在 37 $^{\circ}$ C 下培养得到抗基因霉素, zeocin 的转化株。

将获得的转化株在 24 孔板(corning)中培养。往其中加入 10 mM Iloprost, 选出 PPAR δ :RXR α :4ERPP/CHO-K1 株, 其中已经诱导出萤光素酶表达。

- 30 制备实施例 6:人 PPAR γ 基因的克隆

通过 PCR 方法应用下列引物对克隆人 PPAR γ 基因

PAG-U: 5'-GTG GGT ACC GAA ATG ACC ATG GTT GAC ACA GAG-3'
(SEQ ID No: 9)

PAG-L: 5'-GGG GTC GAC CAG GAC TCT CTG CTA GTA CAA GTC-3'
(SEQ ID No: 10)

- 5 其中所述的引物对是通过参照 Greene 等在[Gene Expr., vol. 4 (4-5), pp. 281-299 (1995)]报道的 PPAR γ 基因的碱基序列, 应用心脏 cDNA(由 Toyobo 制备, 商品名: QUICK-Clone cDNA)作为模板制备得到的。

应用 AmpliWax PCR Gem 100(由 Takara Shuzo Co., Ltd.制备), 按照 Hot Start 方法进行 PCR 反应。将 10 $\times$ LA PCR Buffer (2 μ l), 2.5 mM dNTP 溶液(3 μ l), 12.5 μ M 引物溶液(各 2.5 μ l)和无菌蒸馏水(10 μ l)混合, 作为下层混合物。把作为模板的人心脏 cDNA(1 ng/ml, 1 μ l), 10 $\times$ LA PCR Buffer (3 μ l), 2.5 mM dNTP 溶液(1 μ l), TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶(0.5 μ l, Takara Shuzo Co., Ltd.制备)和无菌蒸馏水(24.5 μ l)混合, 作为上层混合物。

把一个 Ampliwax PCR Gem 100(Takara Shuzo CO.Ltd.制备)加入到所制备的下层混合物中, 将该混合物在 70 $^{\circ}$ C 下处理 5 分钟, 然后将其置于冰中 5 分钟, 然后往其中加入上层混合物得到 PCR 反应混合物。把含有反应混合物的小管置于热循环控制装置(由美国 Perkin Elmer 制备)中, 在 95 $^{\circ}$ C 下处理 2 分钟。将该在 95 $^{\circ}$ C 下 15 秒钟和在 68 $^{\circ}$ C 下 2 分钟的循环重复 35 次。将反应混合物在 72 $^{\circ}$ C 下处理 8 分钟。

- 20 将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶(1%)电泳, 从凝胶中回收含有 PPAR γ 基因的 1.4 kb DNA 片断, 将其插入到 pT7Blue-T 载体(由 Takara Shuzo Co., Ltd.制备)中得到质粒 pTBT-hPPAR γ 。

制备实施例 7: 人 PPAR γ 、RXR α 表达质粒的制备

把质粒 pVgRXR(由 Invitrogen(美国)制备)的 7.8 kb FspI-NotI 片断和含有制备实施例 2 中所得到的质粒 pTBT-hRXR α 的 RXR α 基因的 0.9 kb FspI-NotI 片断相连接得到质粒 pVgRXR2。用 BstXI 剪切该 pVgRXR2, 用 T4DNA 聚合酶(由 Takara Shuzo Co., Ltd.制备)处理在末端补平, 用 KpnI 剪切得到 6.5 kb DNA 片断。

独立地, 把制备实施例 6 中获得的质粒 pTBT-hPPAR γ 用 SalI 剪切, 在末端用 T4 DNA 聚合酶(由 Takara Shuzo Co.Ltd 公司制备)处理补平, 用 KpnI 剪切得到含有人 PPAR γ 基因的 1.4 kb DNA 片断。

通过连接这两个 DNA 片断, 构建质粒 pVgRXR2-hPPAR γ 。

制备实施例 8: 把人 PPAR γ 、RXR α 表达质粒和报道质粒引入到 CHO-K1 细胞中以及得到的表达细胞

应用含有 10%胎牛血清(由美国 Life Technologies, Inc 制备)的 Ham's F12
5 培养基(由 Nissui Pharmaceutical Co.Ltd 制备)在组织培养瓶(750ml, 由 Corning Coaster Corporation, USA 制备)中培养 CHO-K1 细胞, 用 0.5g/L trypsin-0.2g/L EDTA(乙二胺四乙酸, 由美国 Life Technologies, Inc., 制备)处理使之剥脱。细胞用 PBS 洗涤, 离心(1000 rpm, 5 分钟), 并在 PBS 中悬浮。
应用基因脉冲装置(由美国 Bio-Rad Laboratories 制备), 在下列条件下把
10 DNA 导入到细胞中。

具体地, 把 8×10^6 细胞, 10 μ g 由制备实施例 7 中制备得到的质粒 pVgRXR2-hPPAR γ 和 10 μ g 制备实施例 4 中制备得到的报道质粒 pGL3-4ERPP-TK neo 置于比色杯中, 其中所述比色杯具有 0.4 cm 间距, 在 0.25 kV 电压和 960mF 电容下进行电穿孔。然后, 将细胞置于含 10%胎牛血
15 清的 Ham's F12 培养基中培养 24 小时, 再次剥脱和离心, 悬浮于含有 10%胎牛血清的 Ham's F12 培养基中, 所述培养基补加了基因霉素(500 μ g/ml, 由美国 Life Technologies, Inc 制备)和 zeocin (250 μ g/ml, 由美国 Invitrogen 制备), 稀释至 10^4 细胞/ml, 接种至 96 孔板(由美国 Corning Costar 公司制备)中, 在二氧化碳气体温育箱中在 37 $^{\circ}$ C 下培养得到具有基因霉素、zeocin 抗
20 性转换株。

将获得的转换株在 24 孔板(由美国 Corning Costar 公司制备)中培养。往其中加入 10 μ M 盐酸 Pioglitazone, 选出 PPAR γ : RXR α : 4ERPP/CHO-K1 株, 其中已经诱导出萤虫素酶表达。

试验实施例 1: 制造实施例 3 化合物的 PPAR δ -RXR α 杂二聚体配体
25 活性

把制备实施例 5 中获得的 PPAR δ -RXR α : 4ERPP/CHO-K1 细胞在含有 10%胎牛血清(由美国 Life Technologies, Inc. 制备)的 Ham's F12 培养基(由 Nissui Pharmaceutical Co. Ltd 制备)中培养, 将其以 2×10^4 细胞/孔的浓度接种至 96 孔白色板[由美国 Corning Coster Corporation 制备]上, 在二氧化碳气
30 体温育箱中在 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜。

用 PBS(磷酸缓冲盐)洗涤该 96 孔白色板后, 加入含有 90 μ L 0.1% 不含

脂肪酸的胎牛血清的 Ham's F12 培养基和测试化合物(制造实施例 3 化合物, 10 μ L), 将该板在 37 $^{\circ}$ C 下的二氧化碳气体培养箱中培养 48 小时。除去培养基后, 加入 PicaGene 7.5(由 Waco Pure Chemicals Industries, Ltd., 制备, 40 μ L), 搅拌后, 用 Lusmistar[由德国 BMG Labtechnologies GmbH 制备]测定荧光素酶活性。

把非给药组化合物的荧光素酶活性作为 1, 从相对于该活性的各个测试化合物的荧光素酶活性计算出诱导率。用 PRISM 2.01(由美国 GraphPad software, Inc. 制备)分析测试化合物的浓度和诱导率, 根据其数值计算出测试化合物的 EC₅₀ 值(显示最大值的 50% 诱导率时的化合物浓度), 结果该值为 4.4 μ M。

试验实施例 2: rosiglitazone 的 PPAR δ -RXR α 杂二聚体配体活性

按照与上述试验实施例 1 同样的方式, 计算出罗格列酮的 EC₅₀ 值(诱导率数值为最大值 50% 时的化合物浓度)。结果, 该值为 146 μ M。

试验实施例 3: 制造实施例 3 化合物的 PPAR γ -RXR α 杂二聚体配体活性

把制备实施例 8 中获得的 PPAR γ : RXR α : 4ERPP/CHO-K1 细胞在含有 10% 胎牛血清(由美国 Life Technologies, Inc. 制备)的 Ham's F12 培养基(由 Nissui Pharmaceutical Co., Ltd 制备)中培养, 将其以 2×10^4 细胞/孔的浓度接种至 96 孔白色板[由美国 Corning Coster Corporation 制备], 在二氧化碳气体温育箱中在 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜。

用 PBS(磷酸缓冲盐水)洗涤该 96 孔白色板后, 加入含有 90 μ L 0.1% 不含脂肪酸的胎牛血清的 Ham's F12 培养基和测试化合物(制造实施例 3 化合物, 10 μ L), 将该板在 37 $^{\circ}$ C 下的二氧化碳气体培养箱中培养 48 小时。除去培养基后, 加入 PicaGene 7.5(由 Waco Pure Chemicals Industries, Ltd. 制备, 40 μ L), 搅拌后, 用 Lusmistar[由德国 BMG Labtechnologies GmbH 制备]测定荧光素酶活性。

把非给药组化合物的荧光素酶活性作为 1, 从相对于该活性的各个测试化合物的荧光素酶活性计算出诱导率。用 PRISM 2.01(由美国 GraphPad software, Inc. 制备)分析测试化合物的浓度和诱导率, 根据其数值计算出测试化合物的 EC₅₀ 值(显示 50% 最大值诱导率时的化合物浓度), 结果该值为 0.024 μ M。制造实施例 3 的化合物显示具有优越的 PPAR γ -RXR α 杂二聚体

配体活性。

试验实施例 4: 罗格列酮的 PPAR γ -RXR α 杂二聚体配体活性

按照与上述实施例 3 同样的方式, 计算出罗格列酮的 EC₅₀ 值(诱导率数值为最大值 50 % 时的化合物浓度)。结果, 该值为 0.028 μ M。

5 试验实施例 5: 体重增加的降低作用

把相同血糖降低剂量的罗格列酮或制造实施例 3 化合物与食物掺和在一起给予 11 或 12-周龄雌性 KKAy 小鼠, 共给予 4 天。

在降低目标小鼠血糖至 50-58 % 的剂量(对于罗格列酮来说为 16.2mg/kg 体重/天; 对于制造实施例 3 化合物来说为 4.4 mg/kg 体重/天)下, 罗格列酮
10 显著增加了体重, 但制造实施例 3 化合物(其被确证为 PPAR δ 和 PPAR γ 两者的激动剂), 没有显示任何显著的体重增加。结果如表 1 所示。

表 1

	起始体重 (g)	4 天后的 体重(g)	体重增加 (g/4 天)	% 对照组	血糖含量 (mg/dl)
对照值	46.0 $\pm$ 1.3	46.3 $\pm$ 1.9	0.4 $\pm$ 0.7	100	435 $\pm$ 77
罗格列酮	45.9 $\pm$ 1.8	49.9 $\pm$ 2.8	3.9 $\pm$ 1.2*	58	253 $\pm$ 36
对照值	48.4 $\pm$ 2.1	49.5 $\pm$ 2.1	1.1 $\pm$ 0.7	100	540 $\pm$ 79
制造实施例 3 化合物	48.9 $\pm$ 1.8	51.5 $\pm$ 2.6	2.1 $\pm$ 1.1	50	272 $\pm$ 55

表中数字: 平均值 $\pm$ 标准偏差(各个组中有 4 或 5 只)

*: 与对照组有显著差异(p<0.05)

15 制剂实施例 1: (胶囊的制备)

1) 制备实施例 3 化合物	30	mg
2) 纤维素细粉	10	mg
3) 乳糖	19	mg
4) 硬脂酸镁	1	mg
总量		60 mg

把 1), 2), 3)和 4)混合, 填充至明胶胶囊。

制剂实施例 2(片剂的制备)

1) 制造实施例 3 化合物	30g
2) 乳糖	50 g

3) 玉米淀粉	15 g
4) 羧甲基纤维素钙	44 g
5) 硬脂酸镁	1 g

1000 片片剂总重 140 g

- 5 把整个量的 1), 2)和 3)和 30g 4)与水揉合, 真空干燥, 并研磨。研磨后的粉剂与 14g 4)和 1g 5)共同掺混, 用压片机将混合物压片, 其中, 得到 1000 个片剂, 各个片剂含有 30mg 制造实施例 3 化合物。

工业实用性

- 10 在糖尿病和其它疾病的治疗中, 当给予具有 PPAR γ 激动剂作用并且能有效治疗等的药物时, 容易使患者的体重增加, 虽然那样也能够使患者的目标疾病被进行性治愈。然而, 本发明的药剂能够抑制这些患者的体重增加。同时具有 PPAR δ 激动剂类作用和 PPAR γ 激动剂类作用的药剂能显著地抑制患者体重增加, 同时治疗糖尿病等类似疾病。

序列表

<110> 武田药品工业株式会社 (Takeda Chemical Industries, Ltd.)

<120> 体重增加抑制剂

<130> 2668WO0P

<150> JP 11-320319

<151> 1999-11-10

<160> 10

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

aacggtacct cagccatggag cagcctcag gagg 34

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

taagtcgacc cgtagtagta tgccttgta gatc 34

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3	
ttagaattcg acatggacac caaacatttc ctg	33
<210> 4	
<211> 33	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 4	
ccccctcgagc taagtcattt ggtgcggcgc ctc	33
<210> 5	
<211> 36	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 5	
tcgacaggggg accaggacaa aggtcacgtt cgggag	36
<210> 6	
<211> 36	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 6	
tcgactcccg aacgtgacct ttgtcctggt cccctg	36
<210> 7	
<211> 28	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	

<400> 7
cccagatctc cccagcgtct tgcattg 28

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>

<400> 8
tcaccatggt caagcttta agcgggtc 28

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>

<400> 9
gtgggtaccg aaatgaccat ggtgacaca gag 33

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>

<400> 10
ggggtcgacc aggactctct gctagtacaa gtc 33