

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D209/42

A61K 31/404 A61P 29/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01803645.7

[43] 公开日 2003 年 2 月 5 日

[11] 公开号 CN 1395565A

[22] 申请日 2001.1.11 [21] 申请号 01803645.7

[30] 优先权

[32] 2000.1.13 [33] GB [31] 0000626.2

[86] 国际申请 PCT/GB01/00069 2001.1.11

[87] 国际公布 WO01/51466 英 2001.7.19

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.11

[71] 申请人 阿斯特拉曾尼卡有限公司

地址 瑞典南泰利耶

[72] 发明人 A·W·福尔 J·G·凯特尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

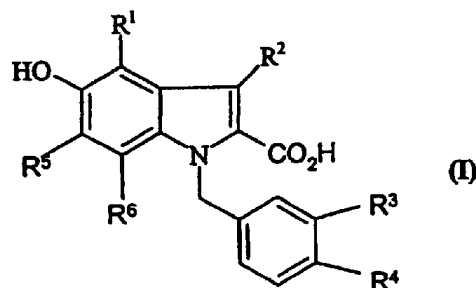
代理人 张元忠 罗才希

权利要求书 4 页 说明书 41 页

[54] 发明名称 作为 MCP-1 受体拮抗剂的吲哚类衍生物

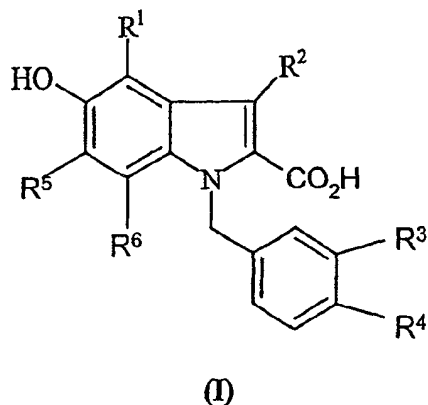
[57] 摘要

本发明涉及式(I)的化合物或其药学可接受盐或前药,其中: R¹是氢、卤素或甲氧基; R²是氢、卤素、甲基、乙基或甲氧基; R³是卤素或三氟甲基; R⁴是卤素或三氟甲基; R⁵是氢或卤素; R⁶是氢或卤素;条件是当 R⁵和 R⁶同时为氢,和 R³或 R⁴之一是氯或氟时,则其它的不是氯或氟。这些化合物对炎性疾病的治疗具有有效活性,尤其是拮抗温血动物如人体中的 MCP-1 介导的效应。



ISSN 1008-4274

1. 式(I)的化合物或其药学可接受盐或前药:



5 其中:

R^1 是氢、卤素或甲氧基;

R^2 是氢、卤素、甲基、乙基或甲氧基;

R^3 是卤素或三氟甲基;

R^4 是卤素或三氟甲基;

10 R^5 是氢或卤素;

R^6 是氢或卤素;

条件是当 R^5 和 R^6 同时为氢, 和 R^3 或 R^4 之一是氯或氟时, 则其它的
不是氯或氟。

2. 按照权利要求 1 的化合物, 其中在式(I)中:

15 R^1 是氢、氟或氯;

R^2 是氢、氯、溴、碘或甲氧基;

R^3 是氟、氯、溴或碘;

R^4 是三氟甲基;

R^5 和 R^6 是氢。

20 3. 按照权利要求 1 的化合物, 其中在式(I)中:

R^1 是氢、氟或氯;

R^2 是氢、氯、溴、碘或甲氧基;

R^3 是三氟甲基;

R^4 是氟、氯、溴或碘;

R^5 和 R^6 是氢。

4. 按照权利要求 1 的化合物, 其中在式 (1) 中:

R^1 是氢、氟或氯;

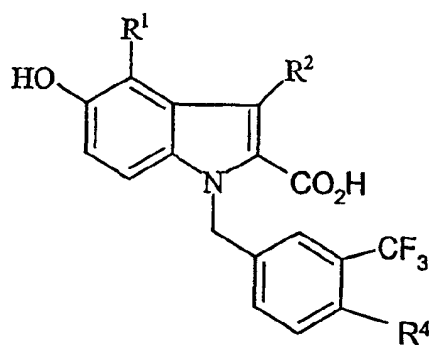
R^2 是氢、氯、溴、碘或甲氧基;

5 R^3 和 R^4 同时为卤素, 尤其是氟、氯或溴, 或 R^3 和 R^4 之一是氯且 R^3 和 R^4 中的另一个是氟;

R^5 和 R^6 之一或两者为卤素。

5. 按照权利要求 1 的化合物, 其是式 (IA) 的化合物或其药学可接受盐或前药:

10



(IA)

其中 R^1 、 R^2 和 R^4 如权利要求 1 中定义。

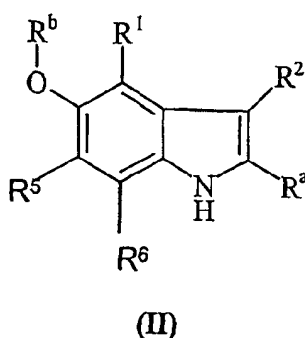
6. 按照权利要求 1 的化合物, 其是下列任一化合物:

- 15 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-氯-4-三氟甲基苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-溴-4-氯苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-氟-4-溴苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-溴-4-氟苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 20 N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4-氟-5-羟基吲哚-2-甲酸
 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-4-氟-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4,6-二氟-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3,4-氯苄基)-4,6-二氟-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-3-溴-5-羟基吲哚-2-甲酸;

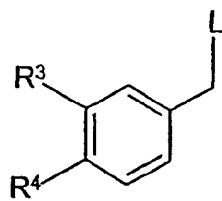
- N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-3-溴-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-氯-4-三氟甲基苄基)-3-溴-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-3-氯-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-3-碘-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 5 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-3-甲氧基-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氯吲哚-2-甲酸;
 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氯吲哚-2-甲酸;
 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-7-氟吲哚-2-甲酸;
 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-溴吲哚-2-甲酸;
 10 N-(3,4-二氯苄基)-5-羟基-6-溴吲哚-2-甲酸;
 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氟吲哚-2-甲酸;
 N-(3,4-二氯苄基)-5-羟基-6-氟吲哚-2-甲酸;
 N-(3,4-二氯苄基)-5-羟基-6-氯吲哚-2-甲酸;
 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-4-氯-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 15 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-4,6-二氯-5-羟基吲哚-2-甲酸;
 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸 (N-(3-三氟
 甲基-4-氯苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸的前药)。

7. 一种制备权利要求 1 所述化合物或其药学可接受盐或前药的方法, 该方法包括:

- 20 (a) 式 (II) 的化合物:



其中 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 如权利要求 1 中定义, R^a 是羧基或其被保护形式, 和 R^b 是氢或适当的羟基保护基, 与式 (III) 的化合物反应:



(III)

其中 R³ 和 R⁴ 如权利要求 1 中定义和 L 是可替换基团；和此后任选地：

(b) (i) 使所得的式 (I) 化合物转化为另一种式 (I) 的化合物；

5 (ii) 脱去任何保护基；或

(iii) 形成其药学可接受盐或前药。

8. 按照权利要求 1-6 任一项所述的化合物或其药学可接受盐或前药，通过治疗应用于人体或动物体的治疗方法中。

10 9. 按照权利要求 1-6 任一项所述的化合物或其药学可接受盐或前药，用作药物。

10. 按照权利要求 9 的化合物，其在温血动物中用作拮抗 MCP-1 介导效应的药物。

11. 一种药物组合物，其中含有与药学可接受赋形剂或载体联合的权利要求 1-6 任一项所述的化合物或其药学可接受盐或前药。

15 12. 权利要求 1-6 任一项所述的化合物或其药学可接受盐或前药，在制备用来拮抗温血动物中 MCP-1 介导效应的药物中的应用。

13. 一种治疗炎性疾病的方法，其包括给需要这种治疗的宿主施用权利要求 1-6 任一项所述的化合物或其药学可接受盐或前药，或权利要求 11 所述的药物组合物。

20 14. 一种在需要所述治疗的温血动物中拮抗 MCP-1 介导效应的方法，其包括给该动物施用有效量的权利要求 1-6 任一项所述的化合物或其药学可接受盐或前药，或权利要求 11 所述的药物组合物。

作为 MCP-1 受体拮抗剂的吲哚类衍生物

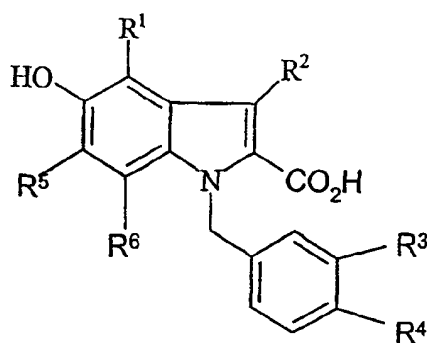
5 本发明涉及通过 CCR2 受体(也称作 MCP-1 受体)的拮抗作用起效的抗炎化合物,尤其导致对单核细胞化学引诱物蛋白-1(MCP-1)的抑制作用。这些化合物含有吲哚部分。本发明进一步涉及含有它们的药物组合物、其制备方法、其制备中所用的中间体和其作为治疗剂的应用。

MCP-1 是促炎蛋白的趋化因子家族的一员,其介导白细胞趋化性和激活作用。MCP-1 是 C-C 趋化因子,其是最有效和选择性 T 细胞和单核细胞的化学引诱物和公认激活剂的一种。MCP-1 与许多炎症疾病的病理生理学有关,包括类风湿关节炎、肾小球肾炎、肺纤维化、再狭窄(国际专利申请 WO 94/09128)、牙槽炎(Jones 等, 1992, J. Immunol., 149, 2147)和哮喘。认为 MCP-1 在其病理学中发挥一定作用的其它疾病领域是动脉粥样硬化(例如 Koch 等, 1992, J Clin. Invest., 90, 772-779)、牛皮癣(Deleuran 等, 1996, J. Dermatological Science, 13, . 228-236)、皮肤的延迟型过敏反应、炎性肠病(Grimm 等, 1996, J Leukocyte Biol., 59, . 804-812)、多发性硬化和脑创伤(Berman 等, 1996, J. Immunol., 156, . 3017-3023)。MCP-1 抑制剂也可以有效治疗中风、再灌注损伤、局部缺血、心肌梗塞和移植排异。

20 MCP-1 通过 CCR2 受体起作用。MCP-2 和 MCP-3 也可以,至少部分,通过这种受体起作用。所以在本说明书中,当引用"MCP-1 的抑制或拮抗作用"或"MCP-1 介导的效应"时,这包括当 MCP-2 和/或 MCP-3 通过 CCR2 受体起作用时 MCP-2 和/或 MCP-3 介导的效应的抑制或拮抗。

25 申请人发现一类含有吲哚部分的化合物,其具有抗 MCP-1 的有效抑制活性。国际专利申请,公开号 WO 99/07351 公开了一类具有 MCP-1 抑制作用的吲哚类化合物。这篇申请基于特定取代的 5-羟基吲哚类化合物是 MCP-1 抑制剂的惊奇发现,此类化合物在效价和/或血液水平和/或生物利用度和/或溶解度方面具有意外和有益的特性。

所以,本发明提供式(I)的化合物或其药学可接受盐或前药:



(I)

其中:

- R^1 是氢、卤素或甲氧基;
 5 R^2 是氢、卤素、甲基、乙基或甲氧基;
 R^3 是卤素基团或三氟甲基;
 R^4 是卤素基团或三氟甲基;
 R^5 是氢或卤素;
 R^6 是氢或卤素;
 10 条件是当 R^5 和 R^6 同时为氢时, 和 R^3 或 R^4 之一是氯或氟时, 则其它不是氯或氟。

在本说明书中术语"烷基"包括直链和支链烷基, 但对于个别的烷基如"丙基"仅仅是指直链形式。术语"卤素"是指氟、氯、溴和碘。

- R^1 的适当实例是氢、氟、氯、溴、碘或甲氧基。
 15 优选 R^1 是氢、氟或氯, 和最优选 R^1 是氢。

R^2 的具体实例是氢、氟、氯、溴、碘、甲基、乙基或甲氧基。适当的 R^2 是氢、氯、溴、碘或甲氧基, 并且优选 R^2 是氢。

- 在一种实施方式中, R^5 和 R^6 同时为氢。在这种情况下, 当 R^4 是三氟甲基时, R^3 适合为氯、氟、溴或碘, 优选氯、氟或溴, 和最优选氯或氟。
 20

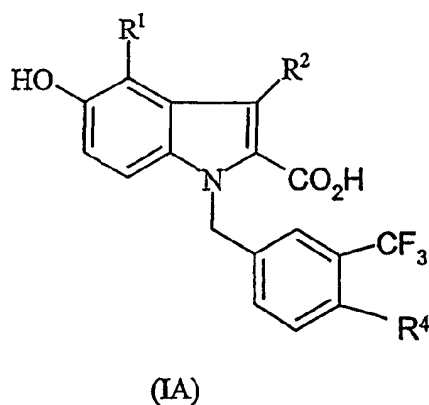
或者, 当 R^5 和 R^6 同时为氢时, R^3 是三氟甲基, 且 R^4 是卤素如氟、氯、溴或碘, 优选氯或氟并且最优选氯。

R^3 和 R^4 的相似联合形式可以适用至少 R^5 和 R^6 之一不是氢, 但在这种情况中, R^3 和 R^4 适宜同时为卤素, 例如氟、氯、溴和碘, 优选氟、

氯或溴，和最优选氟或氯。具体实例是其中 R^3 和 R^4 同时为氯的情况，或 R^3 和 R^4 同时为氟的情况。另一方案是其中 R^3 或 R^4 之一是氯且另一个是氟的一种情况。

适宜的 R^5 是氢、氟、氯或溴，并且优选 R^5 是氢。 R^5 的进一步优选是，例如氟。

适宜的 R^6 是氢、氟、氯或溴。优选 R^6 是氢或氟，而且最优选氢。在本发明的一个优选方面提供式 (IA) 的化合物：



10 或其药学可接受盐或前药，其中 R^1 、 R^2 和 R^4 定义如上。优选 R^1 和 R^2 是氢。优选 R^4 是氯或氟。

在本发明的另一优选方面中提供式 I 化合物或其药学可接受盐或前药，其中 R^1 、 R^2 和 R^4 定义如上， R^3 是三氟甲基， R^5 是卤素和 R^6 是氢。优选 R^1 和 R^2 是氢。优选 R^4 是氯或氟，尤其是氯。优选 R^5 是氟。

15 本发明的优选化合物包括任何一个按照实施例制备的化合物，其概括在表 1 中。

表 1

实施例	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	H	H	CF ₃	Cl	H	H
2	H	H	F	CF ₃	H	H
3	H	H	Cl	CF ₃	H	H
4	H	H	Br	Cl	H	H
5	H	H	F	Br	H	H
6	H	H	Br	F	H	H
7	F	H	CF ₃	F	H	H
8	F	H	CF ₃	Cl	H	H
9	F	H	CF ₃	F	F	H
10	Cl	H	Cl	Cl	Cl	H
11	H	Br	CF ₃	F	H	H
12	H	Br	CF ₃	Cl	H	H
13	H	Br	Cl	CF ₃	H	H
14	H	Cl	F	CF ₃	H	H
15	H	I	F	CF ₃	H	H
16	H	CH ₃ O	CF ₃	Cl	H	H
17	H	H	CF ₃	F	Cl	H
18	H	H	CF ₃	Cl	Cl	H
19	H	H	CF ₃	Cl	H	F
20	H	H	CF ₃	Cl	Br	H
21	H	H	Cl	Cl	Br	H
22	H	H	CF ₃	Cl	F	H
23	H	H	Cl	Cl	F	H
24	H	H	Cl	Cl	Cl	H
25	Cl	H	CF ₃	Cl	H	H
26	Cl	H	CF ₃	Cl	Cl	H

本发明进一步涉及式(I)的化合物的所有互变异构形式。

还应理解某些式(I)的化合物可以存在溶剂化和非溶剂化形式,例如水合形式。可以理解本发明包括所有这些溶剂化形式。

式(I)的化合物是单核细胞化学引诱物蛋白-1的抑制剂。此外,它们似乎抑制 RANTES 诱导的趋化性。RANTES(活化后可调节的、正常 T
5 细胞表达并可逆分泌的)是来自与 MCP-1 同一家族的另一种趋化因子,具有相似的生物性能,但通过 CCR1 受体起作用。所以与本发明有关的另一优越性在于,通过抑制 MCP-1 和 RANTES 两者的活性,本发明提供了具有特别有用特性的化合物。因此,这些化合物可以用来治疗这些试剂介导的疾病,尤其是炎症疾病。

10 适宜的式(I)化合物的药学可接受盐包括碱性盐,例如碱金属盐,如钠盐;碱土金属盐,如钙或镁盐;有机胺盐,如三乙胺、吗啉、N-甲基哌啶、N-乙基哌啶、普鲁卡因、二苄胺、N,N-二苄基乙胺;或氨基酸,如赖氨酸。在另一方面中,当所述化合物碱性足够时,适当的盐包括酸加成盐,如甲磺酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、柠檬
15 酸盐、马来酸盐和与磷酸和硫酸形成的盐。它们可以是不止一个阳离子或阴离子,这取决于带电官能团的数目和阳离子或阴离子的化合价。优选的药学可接受盐是钠盐。

所属领域已知多种形式的前药。此类前药衍生物的实例,参见:

a) Design of Prodrugs, H. Bundgaard 编辑(Elsevier, 1985)
20 和方法 in Enzymology, Vol. 42, p. 309-396, K. Widder 等编辑(Academic Press, 1985);

b) A Textbook of Drug Design and Development, Krogsgaard-Larsen 和 H. Bundgaard 编辑,第5章"Design and Application of Prodrugs", H. Bundgaard 撰写 p. 113-191(1991);

25 c) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38(1992);

d) H. Bundgaard, 等, Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285(1988); 和

e) N. Kakeya, 等, Chem Pharm Bull, 32, 692(1984)。

30 此类前药的实例是本发明化合物的体内可裂解酯。含有羧基的本发明化合物的体内可裂解酯是,例如药学可接受酯,其在人体或动物机体中裂解产生母体酸。适合羧基的药学可接受酯包括例如 C₁₋₆ 烷基

酯, 例如甲基或乙基; C_{1-6} 烷氧基甲基酯类, 例如甲氧基甲基; C_{1-6} 烷酰氧基甲基酯类, 例如新戊酰氧基甲基; 苯并[c]呋喃酮基酯类; C_{3-8} 环烷氧基羰氧基 C_{1-6} 烷基酯类, 例如 1-环己基羰氧基乙基; 1,3-二氧杂环戊烷-2-基甲基酯类, 例如 5-甲基-1,3-二氧杂环戊烷-2-基甲基; C_{1-6} 烷氧基羰氧基乙基酯类, 例如 1-甲氧基羰氧基乙基; 氨基羰基甲基酯类及其一-或二-N-(C_{1-6} 烷基)形式, 例如 N,N-二甲基氨基羰基甲基酯类和 N-乙基氨基羰基甲基酯类; 和可以在本发明化合物中的任何羧基处形成。含羟基的本发明化合物的体内可裂解酯是, 例如药

5 学可接受酯, 其在人体或动物机体内裂解产生母体羟基。适合的羟基药

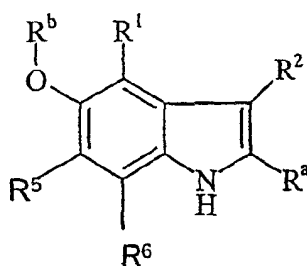
10 学可接受酯包括 C_{1-6} 烷酰基酯类, 例如乙酰基酯类; 和苯甲酰基酯类, 其中苯基可以被氨基甲基或 N-取代的一-或二- C_{1-6} 烷基氨基甲基取代, 例如 4-氨基甲基苯甲酰基酯类和 4-N,N-二甲基氨基甲基苯甲酰基酯类。

此类前药的其它实例是本发明化合物的体内可裂解酰胺类化合物。所述体内可裂解酰胺的实例包括 N- C_{1-6} 烷基酰胺和 N,N-二-(C_{1-6} 烷基)酰胺, 如 N-甲基、N-乙基、N-丙基、N,N-二甲基、N-乙基-N-甲

15 基或 N,N-二乙基酰胺。

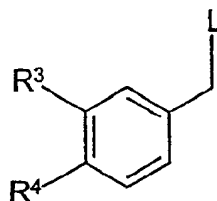
本发明的另一方面提供一种制备式 (I) 化合物或其药学可接受盐或前药的方法, 该方法包括:

20 a) 式 (II) 的化合物:



(II)

其中 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 如式 (I) 中有关定义, R^4 是羧基或其被保护形式, 和 R^b 是氢或适当的羟基保护基, 与式 (III) 的化合物反应:



(III)

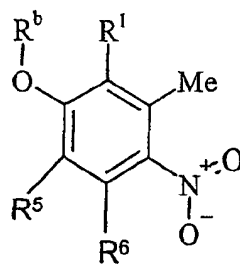
其中 R^3 和 R^4 如式 (I) 有关定义且 L 是可替换基团；和此后如果必要：

- i) 使式 (I) 的化合物转化为另一种式 (I) 的化合物；
- 5 ii) 脱去任何保护基；或
- iii) 形成其药学可接受盐或前药。

适合的 L 是，例如卤素或磺酰氧基，例如氯、溴、甲磺酰氧基或
甲苯-4-磺酰氧基。

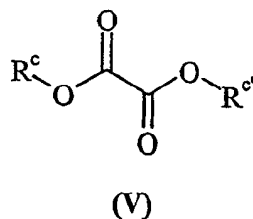
- 10 式 (II) 和 (III) 的化合物适当地一起在惰性有机溶剂 (如 N, N-二
 甲基甲酰胺，二氯甲烷或乙腈) 中在碱 (如氢氧化钠、氢化钠或碳酸钾)
 的存在下反应。该反应适合在相转移催化剂如四-正丁基硫酸氢铵的存在
 下完成。反应时间可以在 1-6 小时内，优选 1-3 小时。采用适度的
 温度，例如 15-30℃，优选 20-25℃。

- 15 式 (II) 的化合物可以购得，或者可以通过利用已知方法修饰购得
 的式 (II) 的化合物来制成。具体地，它们可以通过式 (IV) 的化合物：



(IV)

其中 R^1 、 R^5 、 R^6 和 R^b 定义如上，与式 (V) 的化合物反应来制备

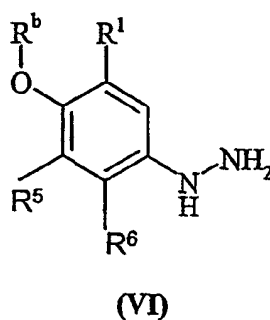


其中 R^{c} 和 $\text{R}^{\text{c}'}$ 独立地选自 C_{1-4} 烷基。

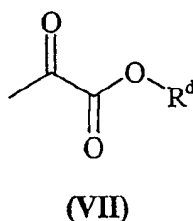
- 式 (IV) 和 (V) 的化合物适宜一起在 Reissert 反应条件下如在惰性溶剂 (例如四氢呋喃) 中, 在碱 (例如乙醇钾) 的存在下, 于 $15-30^{\circ}\text{C}$ 的温度内, 优选 $20-25^{\circ}\text{C}$, 反应 10-20 小时, 优选 15-17 小时。分离所得的化合物并溶于醇如乙醇和有机酸 (例如乙酸), 并且加入过渡金属催化剂 (例如 10% Pd/C) 和环己烯。该化合物可以在 $60-120^{\circ}\text{C}$ 的温度下, 优选 $70-90^{\circ}\text{C}$ 下加热 15-25 小时, 优选 16-20 小时, 得到式 (II) 的化合物, 其中 R^{a} 是 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{c}}$ 。

R 和 R^{c} 适宜为 C_{1-4} 烷基, 优选甲基或乙基。

或者, 式 (II) 的化合物可以通过式 (VI) 的化合物:



- 15 其中 R^1 、 R^5 、 R^6 和 R^{b} 定义如上, 与式 (VII) 的化合物反应来制备:



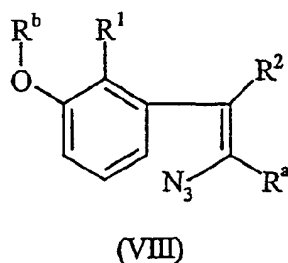
其中 R^{d} 是 C_{1-4} 烷基。

适宜的 R^d 是 C_{1-4} 烷基, 优选甲基或乙基。

式 (VI) 和 (VII) 的化合物适合一起在 Fischer 条件下如与有机酸 (如乙酸), 在醇 (例如乙醇) 中, 于 $60-90^\circ\text{C}$ 的温度下, 优选 $75-85^\circ\text{C}$ 下反应 1-5 小时, 优选 1-3 小时。所得的化合物与强酸 (例如多磷酸) 混合且在 $90-150^\circ\text{C}$, 优选 $100-120^\circ\text{C}$ 下加热 0.5-4 小时, 优选 0.5-2 小时得到式 (II) 的化合物, 其中 R^a 是氢。随后, 如果希望, 可以利用文献中的已知技术把 R^2 任选地转化为式 (I) 中定义 R^a 的另一个值。

在一个优选方案中, 式 (II) 的化合物是通过式 (VIII) 化合物的环化来制得

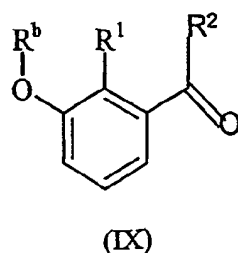
10



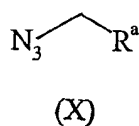
其中 R^1 、 R^a 、 R^b 和 R^2 定义如上。

环化作用可以通过在有机溶剂如二甲苯中回流该化合物来完成。式 (VIII) 的化合物适宜通过式 (IX) 的化合物:

15



其中 R^1 、 R^2 和 R^b 定义如上, 与式 (X) 的化合物反应来制备



20 其中 R^a 定义如上。该反应适宜在有机溶剂如醇中, 具体如甲醇中, 在

- 剂或酞剂)、适合局部使用的形式(例如霜剂、凝胶,或水或油性溶液或混悬液)、通过吸入给药的形式(例如成为细分的粉末或液体气溶胶)、通过吹入给药的形式(例如成为细分的粉末)或非肠道给药的形式(例如作为灭菌水或油性溶液用于静脉内、皮下、肌肉内或肌肉内给药,或作为栓剂直肠给药)。

本发明的组合物可以通过所属领域熟知的常规方法利用常规药物赋形剂制备。所以,口服用的组合物可以含有,例如,一种或多种着色剂、甜味剂、矫味剂和/或防腐剂。

- 用于片剂制剂的适当药学可接受赋形剂包括,例如,惰性稀释剂如乳糖、碳酸钠、磷酸钙或碳酸钙;制粒或崩解剂如玉米淀粉或藻酸;粘合剂如淀粉;润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石;防腐剂如对羟基苯甲酸乙酯或丙酯;和抗氧化剂,如抗坏血酸。片剂制剂可以是未包衣或者被包衣以改进在胃肠道内其崩解作用和活性成分的后续吸收作用,或改善其稳定性和/或外观,在这些情况中,使用所属领域熟知的常规包衣剂和方法。

口服使用的组合物可以是硬明胶胶囊的形式,其中活性成分与惰性固体稀释剂,例如,碳酸钙、磷酸钙和高岭土混合;或成为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

- 水混悬液一般含有微粉形式的活性成分以及一种或多种悬浮剂,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧基丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶和阿拉伯胶;分散或湿润剂,如卵磷脂或氧化烯与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧化乙烯硬脂酸酯),或氧化乙烯与长链脂族醇的缩合产物,例如十七碳乙烯氧基十六烷醇(heptadecaethyleneoxycetanol),或氧化乙烯与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物,例如聚氧化乙烯山梨糖醇一油酸酯,氧化乙烯与长链脂族醇的缩合产物,例如十七碳乙烯氧基十六烷醇,或氧化乙烯与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物,例如聚氧化乙烯山梨糖醇一油酸酯,或氧化乙烯与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物,例如聚乙烯脱水山梨糖醇一油酸酯。水混悬液还含有一种或多种防腐剂(例如对羟基苯甲酸乙酯或丙酯),抗氧化剂(如抗坏血酸),着色剂,矫味剂,和/或甜味剂(如蔗糖、糖精或阿司帕坦)。

油性混悬液可以通过把活性成分悬浮在植物油(例如花生油、橄榄

如 1.5N HCl 中在亚硝酸盐如亚硝酸钠的存在下在-30—0℃的适度低温下, 优选-5℃下反应。

随后该溶液与式(XIII)的化合物在有机溶剂如乙醇中的溶液, 在碱如碱金属氢氧化物溶液, 例如氢氧化钠水溶液存在下混合。

5 式(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、(IX)、(X)和(XII)的化合物已知或者可以购得, 或者通过所属领域的已知方法经过市售或已知原料的标准处理制备。

10 还应理解在上述一些反应中, 可能需要/期望保护所述化合物中的任何敏感基团。所属领域技术人员懂得需要或希望进行保护的情形以及适当的保护方法。所以, 如果反应物包括基团如羧基或羟基, 可能希望在上述一些反应中将该基团保护起来。

15 适合羟基的保护基是, 譬如, 酰基, 例如烷酰基, 如乙酰基, 芳酰基, 如苯甲酰基; 或芳基甲基, 例如苄基。上述保护基的脱保护条件必须随选择的保护基而改变。所以, 例如酰基, 如烷酰基或芳酰基可以通过, 譬如用适当的碱如碱金属氢氧化物(如氢氧化锂或氢氧化钠)来脱除。或者, 例如通过用催化剂如碳载钯氢化, 来脱除芳基甲基如苄基。

20 适合羧基的保护基是, 例如酯化基团, 如甲基或乙基, 它们可以通过例如用碱(如氢氧化钠)水解来脱除; 或者, 可以通过譬如用酸, 例如有机酸, 如三氟乙酸处理来脱除叔丁基; 或者, 譬如可以通过, 例如用催化剂如碳载钯氢化来脱除苄基。

保护基可以在合成中的任何适当阶段, 利用化学领域熟知的常规技术来脱去。一些在此描述的中间体可以是新的化合物, 例如式(II)的中间体, 因此它们是本发明的另一特征。

25 当需要式(I)化合物的药学可接受盐时, 通过例如该化合物与适当酸(其提供生理可接受阴离子)的反应, 或与适当碱(其提供生理可接受阳离子)的反应, 或通过其它常规成盐方法来获得。

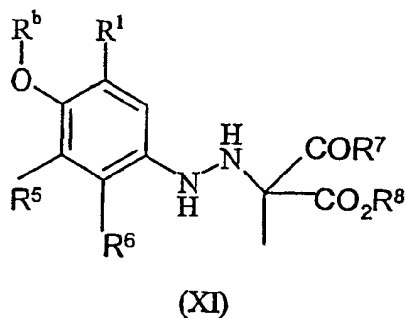
30 按照本发明的另一方面提供一种药物组合物, 其含有定义如上的式(I)的化合物或其药学可接受盐或前药, 以及药学可接受赋形剂或载体。

本发明的组合物可以是适合口服使用的形式(例如成为片剂、锭剂、硬或软胶囊、水或油性混悬液、乳液、可分散粉末或颗粒、糖浆

碱如碱金属醇盐的存在下，特别是甲醇钠的存在下完成。适宜采用-30-20℃的适度温度。

在另一改进方案中，式(II)的化合物是通过式(XI)的化合物的环化来制备

5

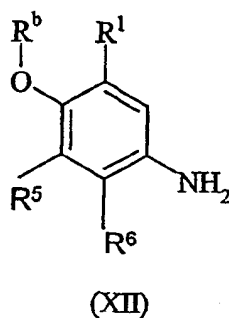


其中 R¹ 和 R^b 定义如上，R⁷ 是烷基，例如甲基，和 R⁸ 是羧基保护基，如烷基，特别是甲基。

环化作用适宜在 Japp Klingemann 条件下进行，通过加热该化合物在有机溶剂如甲苯和适当酸如对甲苯磺酸中的溶液。

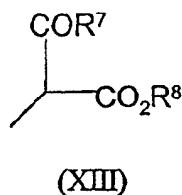
10

式(XI)的化合物适宜通过式(XII)的化合物



其中 R¹、R^b、R⁵ 和 R⁶ 定义如上，与式(XIII)的化合物反应来制备

15



其中 R⁷ 和 R⁸ 如式(XI)中有关定义。将式(XII)的化合物适当溶于稀酸

油、芝麻油或椰油)中或矿物油(例如液体石蜡)中来制成。油性混悬液也可以含有增稠剂如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂(如上文所述的那些)和矫味剂来提供可口的口服制剂。通过加入抗氧剂如抗坏血酸可以使这些组合物防腐。

- 5 适合通过加入水制备水混悬液的可分散粉末和颗粒一般含有活性成分以及分散或湿润剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂。适当的分散或湿润剂和悬浮剂例如是上文提及的那些。附加的赋形剂如甜味剂、矫味剂和着色剂也可以存在。

10 本发明的药物组合物还可以是水包油乳液。油相可以是植物油,如橄榄油或花生油,或是矿物油,如液体石蜡,或这些油的混合物。适用的乳化剂可以是,例如,天然树胶如阿拉伯树胶或黄芪胶,天然磷脂如大豆、卵磷脂、从脂肪酸和己糖醇酐衍生的酯或偏酯(如脱水山梨糖醇一油酸酯)和所述偏酯与氧化乙烯的缩合产物如聚氧化乙烯脱水山梨糖醇一油酸酯。乳液也可以含有甜味剂、矫味剂和防腐剂。

- 15 糖浆剂或酏剂可以用甜味剂配制,如甘油、丙二醇、山梨糖醇、阿司帕坦或蔗糖,并且还可以含有湿润剂、防腐剂、矫味剂和/或着色剂。

所述的药物组合物还可以是灭菌可注射水或油性混悬液的形式,其可以按照已知方法利用一种或多种适当的分散剂或湿润剂和悬浮剂来配制,这些试剂如上所述。灭菌可注射制剂还可以是存在于无毒非肠道可接受稀释剂或溶剂中的灭菌可注射溶液或混悬液,例如存在于1,3-丁二醇中的溶液。

25 通过把活性成分与适当的无刺激赋形剂混合来制备栓剂制剂,所述赋形剂在常温下为固体但在直肠温度下为液体并因此在直肠中融化释放出药物。适当的赋形剂包括,例如,可可脂和聚乙二醇类。

局部制剂,如霜剂、软膏、凝胶和水或油性溶液或混悬液,一般可以通过把活性成分与常规局部可接受载体或稀释剂利用所属领域熟知的常规方法混合来获得。

30 通过吹入给药的组合物可以是细分粉末的形式,该粉末含有例如30 μ 或更小的平均粒径的微粒,粉末本身含有单独的活性成分或用一种或多种生理可接受载体(如乳糖)稀释的活性成分。吸入用的粉末一般保留在含有例如1-50mg活性成分的胶囊中,用于涡轮增压器吸入装

置,例如用于已知药物色苷酸钠的吸入。

通过吸入给药的组合物可以是常规加压气溶胶的形式,使活性成分分配为含有细分固体或液滴的气雾。可以使用常规气溶胶抛射剂,如挥发性氟代烃类化合物或烃类化合物,气溶胶装置一般装配为分散
5 计量量的活性成分。

对于有关制剂的其它信息,读者可以参考 Comprehensive Medicinal Chemistry(Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board)的第5卷第25.2章, Pergamon Press 1990。

活性成分与一种或多种赋形剂混合制成单剂量形式的量必需根据
10 被治疗宿主和具体给药途径而变化。例如,用于口服给予人体的制剂一般含有,例如,0.5mg-2g的活性成分与适当和常规量的赋形剂,其可以在该组合物总重量的约5-约98%(重量)内变化。剂量单位形式通常含有约1mg-约500mg的活性成分。对于有关给药途径和剂量方案的信息,读者可参考 Comprehensive Medicinal Chemistry(Corwin
15 Hansch; Chairman of Editorial Board)的第5卷第25.3章, Pergamon Press 1990。

式I的化合物的治疗或预防目的的剂量大小自然将按照病症的本质和严重性、动物或患者的年龄和性别与给药途径,根据熟知的医学原理来变化。如上所述,式I的化合物可以有效治疗单独或部分归因
20 于MCP-1和/或RANTES的作用的疾病或医学病症,例如,类风湿关节炎。

在为了治疗或预防目的使用式I的化合物中,通常给药应使,例如0.5mg-75mg/kg体重的日剂量是可接受的,如果需要可以分次给药。一般地当采用非肠道途径时应该给予较低剂量。所以,例如,对于
25 静脉内给药,一般采用如0.5mg-30mg/kg体重的剂量范围。同样地,对于吸入给药,采用如0.5mg-25mg/kg体重的剂量。然而优选口服给药。

按照本发明的另一方面提供定义如上的式(I)化合物或其药学可接受盐或前药,通过疗法应用于人体或动物的治疗方法中。因此,本
30 发明提供一种通过施用定义如上的式(I)化合物或其药学可接受盐或前药或药物组合物治疗炎症性疾病的方法。

本发明的另一特征是式(I)的化合物及其药学可接受盐或前药,用

作药物。

因此，式(I)的化合物或其药学可接受盐或前药，用作拮抗温血动物如人体中 MCP-1 介导的效应(和/或 RANTES 介导的效应)的药物。

按照本发明的另一方面提供式(I)的化合物或其药学可接受盐或前药，在制备用来拮抗温血动物如人体中 MCP-1 介导的效应(和/或 RANTES 介导的效应)的药物中的应用。

按照本发明的另一特征提供一种拮抗需要所述治疗的温血动物如人体中 MCP-1 介导的效应的方法，其包括给该动物施用有效量的定义如上的式(I)化合物或其药学可接受盐或前药。

10

生物学试验

下列生物试验方法、数据和实施例用于说明本发明。

缩写：

- | | |
|--------------|--|
| ATCC | 美国模式培养物保藏所, Rockville, USA. |
| 15 BCA | Bicinchroninic acid, (与硫酸铜一起用来测定蛋白质) |
| BSA | 牛血清白蛋白 |
| DMEM | Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 |
| EGTA | 亚乙基双(氧乙烯基次氨基)四乙酸 |
| FCS | 胎牛血清 |
| 20 HEPES | (N-[2-羟乙基]哌嗪-N'-[2-乙烷磺酸]) |
| HBSS | Hanks 平衡盐溶液 |
| hMCP-1 | 人单核细胞化学引诱物蛋白-1 |
| PBS | 磷酸盐缓冲盐水 |
| PCR | 聚合酶链式反应 |
| 25 AMPLITAQ™ | 购自 Perkin-Elmer Cetus, 用作热稳定 DNA 聚合酶的来源。 |

结合缓冲液是 50 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.5% 胎牛血清, 用 1 M NaOH 调至 pH 7.2。

非必需氨基酸(100X 浓度)是: L-丙氨酸, 890 mg/l; L-天门冬酰胺, 1320 mg/l; L-天门冬氨酸, 1330 mg/l; L-谷氨酸, 1470 mg/l; 甘氨酸, 750 mg/l; L-脯氨酸, 1150 mg/l 和; L-丝氨酸, 1050 mg/l。

次黄嘌呤和胸苷补充物(50x 浓度)是: 次黄嘌呤, 680 mg/l 和;

胸苷, 194 mg/l。

青霉素-链霉素是: 青霉素 G(钠盐); 5000 单位/ml; 硫酸链霉素, 5000(g/ml。

人单核细胞细胞系 THP-1 细胞购自 ATCC, 登记号 ATCC TIB-202.

- 5 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 得自 Gibco; 参见 Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1949, 71, 196。

- 合成细胞培养基, RPMI 1640 得自 Gibco; 它含有无机盐 $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/l; KCl 400 mg/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/l; NaCl 6000 mg/l; NaHCO_3 2000 mg/l & Na_2HPO_4 (无水) 800 mg/l], D-葡萄糖 2000
10 mg/l, 还原型谷胱甘肽 1 mg/l, 氨基酸和维生素。

FURA-2/AM is 1- [2-(5-羧基噻唑-2-基)-6-氨基苯并呋喃-5-氧基]-2-(2'-氨基-5'-甲基苯氧基)-乙烷-N, N, N', N'-四乙酸五乙酰氧基甲酯和得自 Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.

血液沉降缓冲液含有 8.5g/l NaCl 和 10g/l 羟乙基纤维素。

- 15 溶胞缓冲液是 0. 15M NH_4Cl^- , 10mM KHCO_3 , 1mM EDTA 。

全细胞结合缓冲液是 50 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0. 5% BSA, 0. 01% NaN_3 , 用 1M NaOH 调至 pH 7.2。

洗涤缓冲液是 50mM HEPES, 1mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 0.5% 热灭活的 FCS, 0.5M NaCl , 用 1M NaOH 调至 pH 7.2。

- 20 通用分子生物学方法可以按照下列著作中所述的任何方法:
"Molecular Cloning-A Laboratory Manual" 第 2 版, Sambrook, Fritsch & Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)。

i) hMCP-1 受体的克隆和表达

- 25 MCP-1 受体 B (CCR2B) cDNA 是通过 PCR 从 THP-1 细胞 RNA 利用适当的低聚核苷酸引物基于已公开的 MCP-1 受体序列 (Charo 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2752) 来克隆。所得的 PCR 产物克隆在运载体 PCR-IITM (InVitrogen, San Diego, CA.) 中。无差错 CCR2B cDNA 作为 Hind M-Not I 片段亚克隆化在真核表达运载体 pCDNA3 (InVitrogen) 中 分 别 生 成 pCDNA3/CC-CKR²A 和
30 pCDNA3/CCR2B。

通过磷酸钙沉淀法使线性化 pCDNA3/CCR2B DNA 转染到 CHO-K1 细胞中 (Wigler 等, 1979, Cell, 16, 777)。利用加入 1mg/ml 的硫酸

Geneticin(G418, Gibco BRL)挑选转染的细胞, 24 小时后细胞业已转染。RNA 的制备和 RNA 印迹法按照现有公开方法进行(Needham 等, 1995, Prot. Express. Purific., 6, 134)。CHO-KL 克隆 7(CHO-CCR2B)被鉴定为最高 MCP-1 受体 B 表达子。

5 ii) 膜片段的制备

令 CHO-CCR2B 细胞在 DMEM 中生长, 其中补充有 10% 胎牛血清, 2 mM 谷酰胺, 1 x 非必需氨基酸, 1 x 次黄嘌呤和胸苷补充物与青霉素-链霉素(50 μ g 链霉素/ml, Gibco BRL)。利用细胞溶胞/差速离心法按照现有技术所述(Siciliano 等, 1990, J. Biol. Chem., 265, 10 19658)制备膜片段。通过 BCA 蛋白测定法(Pierce, Rockford, Illinois)按照制造商的说明估计蛋白浓度。

iii) 测定

利用 Bolton & Hunter 偶联法(Bolton 等, 1973, Biochem. J., 133, 529; Amersham International plc]制备 125 I MCP-1。利用 Ernst 等, 1994, J. Immunol., 152, 3541 的方法进行平衡结合试验。简单而言, 将不同量的 125 I-标记 MCP-1 加入到含 7 μ g 的纯化 CHO-CCR2B 细胞膜的 100 μ l 结合缓冲液中。室温下孵育 1 小时后过滤结合反应混合物且通过平板洗涤器(Brandel MLR-96T Cell Harvester)用冰冷的结合缓冲液洗涤 5 次。使用之前过滤垫(Brandel GF/B)在 0.3%聚乙烯亚胺中预浸湿 60 分钟。过滤后将各个滤液分开置于 3.5ml 管(Sarstedt 15 No. 55. 484)内且测定结合的 125 I-标记的 MCP-1(LKB 1277 Gammamaster)。按照上述方法利用 100 pM 125 I-标记的 MCP-1 在不同浓度的未标记 MCP-1 的存在下进行冷竞争研究。通过在该反应中包含 200 倍摩尔过量的未标记 MCP-1 测定非特异结合作用。

25 以由 CHO-CCR2B 细胞制成的膜片段的配体结合研究显示, CCR2B 受体是以 0.2 pmoles/mg 膜蛋白的浓度存在, 并且选择性结合 MCP-1 且具有高亲和力(IC₅₀ =110 pM, K_d=120 pM)。与这些膜的结合作用是完全可逆的且在室温下 45 分钟后达到平衡, 而且当 MCP-1 使用的浓度介于 100 pM-500 pM 内时, 在 MCP-1 结合作用与 CHO-CCR2B 细胞膜浓 30 度之间存在线性关系。

溶解在 DMSO(5 μ l)的试验化合物与 100 pM 标记的 MCP-1 在一定浓度范围内(0.01-50 μ M)一式两份利用 8 点剂量-反应曲线进行竞争性试

验并计算 IC_{50} 浓度。

本发明的被测化合物在所述的 hMCP-1 受体结合试验中具有等于或小于 $50\mu\text{M}$ 的 IC_{50} 值。

b) THP-1 细胞中 MCP-1 介导的钙流出

- 5 令人单核细胞细胞系 THP-1 在合成细胞培养基 RPMI 1640 中生长, 其中补充有 10 %胎牛血清, 6mM 谷酰胺和青霉素-链霉素($50\mu\text{g}$ 链霉素/ml, Gibco BRL)。THP-1 细胞在 HBSS(无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) + 1 mg/ml BSA 中洗涤, 并且以 3×10^6 细胞/ml 的密度重新悬浮在相同的缓冲液内。37℃下 30 分钟内向该细胞加入 1mM FURA-2/AM, 用 HBSS 洗涤 2
10 次, 和重新悬浮为 1×10^6 细胞/ml。把 THP-1 细胞悬浮液(0.9 ml)加入到含有磁搅棒和 2.1ml 预热(37℃)HBSS 的 5ml 一次性杯中, 该 HBSS 含有 1mg/ml BSA, 1 mM MgCl_2 和 2 mM CaCl_2 。将小杯置于荧光分光光度计 (Perkin Elmer, Norwalk, CT) 中且在 37℃下搅拌的同时预孵育 4 分钟。记录 70 秒内的荧光, 通过在 10 秒后向该小杯中加入
15 hMCP-1 来刺激细胞。通过在 340 nm 和 380 nm 激发且随后在 510 nm 下测量荧光发射的强度来测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。计算出在 340 nm 和 380 nm 下激发后发射荧光的强度的比例, (R), 并且按照下列公式给出和评价胞质 $[\text{Ca}^{2+}]$:

$$20 \quad [\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \left(\frac{Sf2}{Sb2} \right)$$

其中 37℃下 FURA-2 Ca^{2+} 复合物的 K_d 是 224nm。Rmax 是加入 10 mM 伊苋诺霉素后测定的最大荧光比值, Rmin 是随后加入含 5 mM EGTA 的无 Ca^{2+} 溶液后测定的最小比值, 并且 Sf2/Sb2 是分别在 Rmin 和 Rmax 时在 380nm 激发下测定的荧光值的比例。

- 25 用 hMCP-1 对 THP-1 细胞的刺激引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 以特异性和剂量依赖的方式快速、瞬时性升高。剂量反应曲线显示 EC_{50} 约为 2 nm。测定溶于 DMSO($10\mu\text{l}$) 中的试验化合物对钙释放的抑制作用, 这是通过在加入配体之前 10 秒时将它们加入到细胞混悬液中并测量 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的瞬时升高的减弱。通过替换加入 hMCP-1 还可以检测试验化合物没有激动活
30 性。

c) hMCP-1 和 RANTES 介导的趋化性

利用人单核细胞细胞系 THP-1 进行体内趋化试验。通过计算那些

穿过的细胞来测量透过聚碳酸酯膜的细胞迁移作用，这可以通过 Coulter 计数直接进行，或者通过比色生存力试验测量通过线粒体呼吸链的四唑盐的裂解 (Scudiero D. A. 等 1988, Cancer Res., 48, 4827-4833) 来间接完成。

- 5 按照制造商的说明把化学引诱物引入到 96 孔微量滴定平板中，其构成趋化室的下部孔，趋化室带有无 PVP 的 5 μ m 孔形聚碳酸酯粘合框架滤膜 (NeuroProbe MB series, Cabin John, MD 20818, USA)。化学引诱物适当地在合成细胞培养基，RPMI 1640 (Gibco) 或补充有 2 mM 谷酰胺和 0.5% BSA 的该培养基中稀释，或者用含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 、无酚红的 HBSS (Gibco) 加 0.1% BSA 稀释。各稀释液在真空下脱气 30 分钟且置于 (400 μ l) 所述室的下部孔中，THP-1 细胞 (5×10^5 存在于 100 μ l RPMI 1640 中 + 0.5% BSA) 在室上部的各孔中孵育。对于趋化性的抑制作用，令化学引诱物保持在预先测定的次最大浓度 (1nM MCP-1) 下并与不同浓度的溶于 DMSO (最终的 DMSO 浓度 < 0.05% v/v) 的试验化合物一起加入 10 15 加入到下部孔中。所述的室在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 下孵育 2 小时。从上部孔除去培养基，随后在打开该室之前用 200 μ l 生理盐水洗涤，擦干膜表面并且将该 96 孔平板在 600 g 下离心 5 分钟以收获细胞。抽吸上清液 (150 μ l)，并且 10 μ l 下部增殖试剂，WST-I，{4-[3-(4-碘苯基)-2-(4-硝基苯基)-2H-5-四唑]-1,3-苯基二磺酸盐} 加电子耦合试剂 20 (Boehringer Mannheim, Cat. no. 1644 807) 加回至孔中。该平板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 3 小时，在 450 nm 下读取微量滴定平板上可溶甲臞产物的吸光度。将数据输入电子数据表，校正化学引诱物不存在下任何随机迁移，并且计算平均吸光度值，平均值的标准误差，和显著性试验。hMCP-1 诱导的浓度依赖性细胞迁移具有特有的二相性反应，最大为 25 0.5-1.0 nm。

- 在上述试验的另一种形式中，可以使用荧光标记的细胞，从而辅助终点检测。在这种情况下，所用的 THP-1 细胞通过在 5mM 钙黄绿素 (Calcein) AM (甘氨酸，N,N'-[[3',6'-二(乙酰氧基)-3-氧代螺[异苯并呋喃-1(3H),9'-[9H]吡啶]-2',7'-二基]二(亚甲基)]二[N-[2- 30 [(乙酰氧基)甲氧基]-2-氧代乙基]]-二[(乙酰氧基)甲基]酯；Molecular Probes) 的存在下在黑暗中孵育 45 分钟来荧光标记。通过离心收获细胞并重新悬浮在含 Ca^{2+} ， Mg^{2+} 和 0.1% BSA 的 HBSS (无酚

红)。将 50 μ l (2×10^5 细胞)的细胞混悬液置于位于各孔上方的滤膜上, 如上所述, 该单位在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 下孵育 2 小时。在孵育结束时, 用磷酸盐缓冲盐水洗掉滤膜上面的细胞, 从平板取下滤膜, 通过在 485nm 激发, 538nm 发射波长(finax, Molecular Devices)下读取荧光来计算吸在滤膜下侧或下部孔的下部的数目。将数据输入电子数据表, 校正化学引诱物不存在下任何随机迁移, 并且计算平均吸光度值, 平均值的标准误差, 百分抑制率和被测化合物的 IC₅₀ 以及显著性试验。除了 MCP-1 诱导的趋化性以外, 这种试验的另一种形式也可以用来测量对 RANTES (2nM) 诱导趋化性的抑制作用。

10 d) 与人外周血单核细胞(PBMCs)结合

i) 人 PBMCs 的制备

新鲜人血液(200ml)得自志愿献血者, 收集在柠檬酸钠抗凝剂中使终浓度为 0.38%。血液与沉降缓冲液混合并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 分钟。收集上清液和在 1700rpm 下离心 5 分钟(Sorvall RT6000D)。所得的沉淀团重新悬浮在 20 ml RPMI/BSA(1mg/ml)中, 并且在 15ml 离心管内小心地使 4 x 5mls of 细胞分层堆积在 4 x 5mls 的 LymphoprepTM(Nycomed)中。离心管在 1700rpm 下旋转 30 分钟(Sorvall RT6000D), 取出所得的下部层且转移到 50ml Falcon 管中。细胞用溶胞缓冲液洗涤 2 次除去所有残留的血红细胞, 随后在 RPMI/BSA 中洗涤 2 次。细胞重新悬浮在 5ml 的结合缓冲液中。在 Coulter 计数器上测量细胞数目并加入附加的结合缓冲液使终浓度为 1.25×10^7 PBMCs/ml。

ii) 试验

利用 Bolton & Hunter 偶联法(Bolton 等, 1973, Biochem. J, 133, 529; Amersham International plc]制备 [¹²⁵I]MCP-1。利用 Ernst 等, 1994, J Immunol, 152, 3541 的方法进行平衡结合试验。简单而言, 把所有 ¹²⁵I-标记的 MCP-1(终浓度 100pM)加入到 96 孔平板中的 40 μ l (5×10^5 细胞)的细胞混悬液。化合物, 由在 DMSO 中 10mM 的储备溶液在全细胞结合缓冲液稀释, 将其加入至 5 μ l 的终体积以使该试验中 DMSO 浓度保持在 5%。在化合物不存在下测定总的结合。通过加入 5 μ l 冷 MCP-1 使最终的试验浓度为 100nM 来确定非特异结合。用全细胞结合缓冲液使试验孔达到 100 μ l 的终体积且密封该平板。37 $^{\circ}$ C 下孵育 60

分钟后, 过滤该结合反应混合物且用冰冷的洗涤缓冲液使用平板洗涤器 (Brandel MLR-96T 细胞收获器) 洗涤 10 秒。使用之前过滤垫 (Brandel GF/B) 在 0.3% 聚乙烯亚胺中预浸湿 60 分钟。过滤后将各个滤液分开置于 3.5ml 管 (Sarstedt No. 55. 484) 内且测定结合的 ^{125}I -
5 标记的 MCP-1 (LKB 1277 Gammamaster)。

通过试验一式两份利用 6 点剂量-反应曲线测定试验化合物的效价并且测定 IC_{50} 浓度。

在本发明被测化合物的有效剂量下没有观察到生理不可接受的毒性。

10 本发明进一步通过下列实施例举例说明, 但不受其限定, 其中采用下述通用方法除非另外说明。

i) N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 用 $4\text{\AA}$ 分子筛中干燥。无水四氢呋喃 (THF) 得自 Aldrich SURESEAL™ 瓶。其它市售试剂和溶剂在使用时无需进一步纯化, 除非另外说明。有机溶剂提取物用无水 MgSO_4 干燥。

15 ii) ^1H , ^{13}C 和 ^{19}F NMR 在 Bruker WM200, WM250, WM300 或 WM400 仪上记录, 利用具有 Me_4Si 或 CCl_3F 的 $\text{DMSO}-d_6$ 作为适当内标, 除非另外说明。化学位移表示为 δ (ppm), 并且峰裂数表示如下: s, 单重峰; d, 双重峰; dd, 成对的双重峰; t, 三重峰; dt, 成对的三重峰; q, 四重峰; m, 多重峰; br, 宽峰。

20 iii) 质谱记录在 VG 12-12 quadrupole, VG 70-250 SE, VG ZAB 2-SE 或 VG 改进的 AEI/Kratos MS9 光谱仪上。

iv) 对于 TLC 分析, 使用 Merck 预涂的 TLC 平板 (硅胶 60 P254, $d = 0.25\text{ mm}$)。

v) 快速色谱在硅胶 (Merck Kieselgel: Art. 9385) 上进行。

25

实施例 1

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸

把氢氧化钠 (1M, 100 ml) 加入到 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯 (11.82 g) 在水 (50 ml) 和甲醇 (150 ml) 中的搅拌溶液内。该反应于 55°C 搅拌 6 小时。真空下除去甲醇, 残留溶液通过加入的盐酸水溶液 (2M, 50ml) 来酸化, 沉淀出产物, 其为白色固体。过滤产物, 用水洗涤并真空干燥, 得到乳油固体 (9.53 g), 其
30

通过柱色谱纯化用乙酸乙酯作为洗脱剂。从甲醇/水结晶,得到该标题化合物,其为乳油固体(7.08 g, 71%) NMR: (CD_3SOCD_3) δ 5.84 (s, 2H), 6.83 (dd, 1H), 6.95 (d, 1H), 7.11–7.19 (m, 2H), 7.36 (d, 1H), 7.55–7.64 (m, 2H), 9.03 (s, 1H); m/z 368 ($\text{M}-\text{H}^+$)。

- 5 重复上述实施例中所述的方法利用适当的吲哚酯作为起始原料。由此得到下列化合物。

实施例 2

N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸

- 10 收率 50%。NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.87 (s, 2H), 6.85 (m, 2H), 6.99 (dd, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.67 (t, 1H); m/z 352 ($\text{M}-\text{H}^+$)。

实施例 3

- 15 N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸

(收率 55%)。NMR (CD_3SOCD_3) δ : 5.9 (s, 2H), 6.9 (m, 1H), 7.1 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.8 (d, 1H), 9.1 (s, 1H); m/z 368/370 ($\text{M}-\text{H}^+$)。

- 20 实施例 4

N-(3-溴-4-氯苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸

收率 71%。NMR (CD_3SOCD_3) δ : 5.76 (s, 2H), 6.80 (d, 1H), 6.95 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 9.00 (s, 1H); m/z 380 ($\text{M}-\text{H}^+$)。

25

实施例 5

N-(3-氟-4-溴苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸

- 30 收率 53%。NMR (CD_3SOCD_3) δ : 5.77 (s, 1H), 6.70 (d, 1H), 6.80 (dd, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.00 (d, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.57 (t, 1H), 9.00 (s, 1H), 12.82 (s, 1H); m/z 362 ($\text{M}-\text{H}^+$)。

实施例 6

N-(3-溴-4-氟苄基)-5-羟基吡啶-2-甲酸

收率 55%。NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.77 (s, 2H), 6.80 (dd, 1H), 6.97 (d, 1H), 6.99 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.23 (t, 1H), 7.38 (m, 2H), 9.00 (s, 1H); m/z 362 (M-H⁺).

5

实施例 7N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4-氟-5-羟基吡啶-2-甲酸

(收率 58%)。NMR (CD₃SOCD₃) δ: 5.85 (s, 2H), 7.0 (t, 1H), 7.1 (m, 2H), 7.2-7.3 (m, 3H), 7.4 (t, 1H), 7.95 (dd, 1H), 9.3 (s, 1H) 13.1 (s, 1H); m/z 370 (M-H⁺).

10

实施例 8N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-4-氟-5-羟基吡啶-2-甲酸

收率 97%。NMR (CD₃SOCD₃) δ: 5.80 (s, 2H), 7.00 (t, 1H), 7.16 (dd, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 9.30 (s, 1H); m/z 386 (MH⁺).

15

实施例 9N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4,6-二氟-5-羟基吡啶-2-甲酸

收率 83%。NMR (CD₃SOCD₃) δ: 5.80 (s, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.30-7.50 (m, 2H), 7.58 (m, 1H), 9.60 (s, 1H); M/z (-) 388.2 (M-H⁺)

20

实施例 10N-(3,4-氯苄基)-4,6-二氟-5-羟基吡啶-2-甲酸

收率 82%。NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.92 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.99 (dd, 1H), 7.37 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.55 (s, 1H); m/z 406, 404, 402 (M-H⁺)

25

实施例 11N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-3-溴-5-羟基吡啶-2-甲酸

(收率 92%)。NMR (CD₃SOCD₃) δ: 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.25 (dd, 1H), 7.35-7.55 (m, 2 H), 7.6 (dd, 1H), 9.4 (s, 1H); m/z

30

430/432 (M-H⁺)。

实施例 12

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-3-溴-5-羟基吲哚-2-甲酸

- 5 (309mg, 87%). NMR (CD₃SOCD₃) δ: : 5.85 (s, 2H), 6.8-7.0 (m, 3H), 7.4 (d, 1H), 7.75 (d, 1H), 9.4 (s, 1H); m/z 446/448 (M-H⁺).

实施例 13

N-(3-氯-4-三氟甲基苄基)-3-溴-5-羟基吲哚-2-甲酸

- 10 (收率 82%). NMR (CD₃SOCD₃) δ: : 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.1 (dd, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.6 (m, 2H), 9.4 (s, 1H); m/z 447 (M-H⁺).

实施例 14

N-(3-氯-4-三氟甲基苄基)-3-氯-5-羟基吲哚-2-甲酸

- 15 NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.6 (d, 1H), 9.4 (s, 1H); m/z 386.0 (M-H⁺).

实施例 15

N-(3-氯-4-三氟甲基苄基)-3-碘-5-羟基吲哚-2-甲酸

- 20 NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.8 (s, 1H), 6.9 (d, 1H), 7.2 (m, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.6 (d, 1H), 9.3 (s, 1H); m/z 478 (M-H).

实施例 16

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-3-甲氧基-5-羟基吲哚-2-甲酸

- 25 (成为水合物, 收率 108%) NMR: 3.9 (s, 3H) 5.7 (s, 2H), 6.8 (dd, 1H), 6.9 (d, 1H), 7.2 (d, 1H) 7.4 (d, 1H), 7.6 (m, 2H), 9.1 (s, 1H); m/z 398 (M-H⁺).

实施例 17

- 30 N(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氯吲哚-2-甲酸

(收率 68%). NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 7.1-7.2 (m, 3H), 7.4-7.55 (m, 2H), 7.7 (s, 1H), 9.8 (s, 1H); m/z 386 (M-H⁺).

实施例 18N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氟吲哚-2-甲酸

收率 71%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.74 (s, 2H), 7.04-7.21 (m, 3H),
5 7.53-7.63 (m, 2H), 7.7 (s, 1H), 9.72 (bs, 1H); m/z
402.1/404.5 (M-H-)

实施例 19N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-7-氟吲哚-2-甲酸

10 收率 55%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.90 (s, 2H), 6.60 (m, 1H), 6.80 (m, 1H),
7.15 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.60 (d, 1H); M/z (-) 385.85 (M-H⁺)

实施例 20N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-溴吲哚-2-甲酸

15 收率 90%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.82 (s, 2H), 7.10 (m, 1H), 7.18 (d, 2H),
7.60 (m, 2H), 7.82 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 13.0 (s, 1H); m/z
446.18 (M-H)

实施例 2120 N-(3,4-二氯苄基)-5-羟基-6-溴吲哚-2-甲酸

收率 92%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.80 (s, 2H), 6.85 (m, 1H), 7.15 (s, 2H),
7.25 (m, 1H), 7.50 (d, 1H), 7.80 (s, 1H), 9.80 (s, 1H); m/z
412.1 (M-H⁺)

25 实施例 22N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氟吲哚-2-甲酸

收率 97%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 7.1-7.2 (m, 3H), 7.49 (d,
1H), 7.55-7.63 (m, 2H), 9.49 (s, 1H), 12.86 (bs, 1H); m/z 386,
388 (M-H⁺)

30

实施例 23N-(3,4-二氯苄基)-5-羟基-6-氟吲哚-2-甲酸

收率 97%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.75 (s, 2H), 6.9 (dd, 1H), 7.1–7.2 (m, 2H), 7. (d, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 9.5 (bs, 1H); m/z 353 (M-H⁺)

5 实施例 24

N-(3,4-二氯苄基)-5-羟基-6-氯吲哚-2-甲酸

收率 41%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.9 (dd, 1H), 7.2 (s, 2H), 7.3 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.65 (s, 1H), 9.75 (s, 1H); m/z 398, 396 (M-H⁺)

10

实施例 25

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-4-氯-5-羟基吲哚-2-甲酸

收率 93%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.86 (s, 2H), 7.01 (d, 1H), 7.09–7.13 (m, 2H), 7.4 (d, 1H), 7.58–7.68 (m, 2H), 9.66 (bs, 1H); m/z 402, 404 (M-H⁺).

15

实施例 26

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-4,6-二氯-5-羟基吲哚-2-甲酸

收率 76%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.86 (s, 2H), 7.09 (dd, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.59 (d, 1H), 7.64 (d, 1H), 7.81 (s, 1H), 9.64 (bs, 1H); m/z 392, 394 (M-H⁺).

20

实施例 27

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸(实施例 1 的 1 号

25 化合物的前药)

向 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基吲哚-2-甲酸(1.01g)在热的乙酸乙酯(80ml)中的溶液内加入 4-二甲基氨基吡啶(30mg)和乙酸酐(0.64ml),将所得的混合物搅拌 18 小时。有机物用 1N HCl 洗涤并干燥。浓缩有机物且通过柱色谱纯化,用乙酸乙酯洗脱得到所需产物(808 mg, 72%). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H), 5.9 (s, 2H), 7.05 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.43 (d, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.65 (d, 1H); m/z 410 (M-H⁺).

30

起始原料的制备

上述实施例的起始原料或者购得，或者很容易通过标准方法从已知物质来制备。譬如，下列反应(方法 A-E)举例说明但不限定上述反应中所用起始原料的制备。

5

方法 A

5-乙酰氧基-N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)吲哚-2-甲酸乙酯

i) 5-羟基吲哚-2-甲酸乙酯

-78℃氩气氛下把三溴化硼(64.58 g)滴加至 5-甲氧基吲哚-2-甲酸乙酯(20g)在二氯甲烷(1000ml)中的搅拌溶液内。令该反应升至室温并继续搅拌 2 小时。将该反应物倾入冰/饱和碳酸氢钠水溶液同时搅拌，用乙酸乙酯搅拌并提取。合并的有机提取物用饱和碳酸氢钠水溶液、水、饱和氯化钠水溶液洗涤和干燥。真空浓缩该溶液，残余物通过柱色谱纯化用 0-60%乙醚:异己烷作为洗脱剂得到产物，其为白色固体(9.02 g, 48%). NMR(CD₃SOCD₃): δ 1.31 (t, 3H), 4.29 (q, 2H), 6.79 (dd, 1H), 6.90 (dd, 1H), 7.22 (d, 1H), 8.84 (s, 1H), 11.52 (brs, 1H); m/z 206 (MH⁺).

ii) 5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯

5-羟基吲哚-2-甲酸乙酯(7.79 g)和 4-二甲基氨基吡啶(20 mg)在乙酸酐(80 ml)中的搅拌溶液在 80℃下加热 4 小时。真空浓缩该反应，将残余物溶于乙酸乙酯。合并的有机提取物用盐酸(2 M)、饱和碳酸氢钠水溶液、水、饱和氯化钠水溶液洗涤并干燥。真空浓缩该溶液得到产物，其为黄色固体(9.39 g, 100 %). NMR(CD₃SOCD₃): δ 1.20 (t, 3H), 2.10 (s, 3H), 4.19 (q, 2H), 6.86 (dd, 1H), 6.97 (d, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.29 (d, 1H); m/z 248 (MH⁺).

iii) 5-乙酰氧基-N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)吲哚-2-甲酸乙酯

在氩气氛下把氢化钠(1.78 g)加入到 5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯(10 g)和 3-三氟甲基-4-氯苄基溴化物(11.64 g)在 DMF(200 ml)中的搅拌溶液内。室温下搅拌该反应 16 小时，随后真空浓缩且令残余物在乙酸乙酯和水之间分配。干燥合并的有机提取物，真空下浓缩，

通过柱色谱纯化,用异己烷-15%乙酸乙酯/异己烷作为洗脱剂,得到乳油固体。从乙酸乙酯/异己烷结晶得到产物,其为乳油固体。(13.26 g, 74%). NMR (CD₃SOCD₃): δ 1.37 (t, 3H), 2.31 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 5.82 (s, 2H), 7.0-7.09 (m, 2H), 7.22-7.29 (m, 1H), 7.31-7.4 (m, 2H) 7.43 (d, 1H), 7.51 (s, 1H).

重复方法 A i)-iii) 中所述的过程利用适当的苄基卤化物。由此得到下列化合物。

N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯

860mg, 96% NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 2.36 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.83 (s, 2H), 6.83 (d, 1H), 6.90 (d, 1H), 7.08 dd, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.50 (t, 1H); m/z 424 (MH⁺)

N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯

收率 55%. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H) 2.3 (s, 3H) 4.3 (q, 2H) 5.8 (s, 2H), 6.95 (d, 1H), 7.1 (dd, 2H), 7.2 (m, 2H), 7.4 (s, 1H), 7.45 (d, 1H) 7.55 (d, 1H); m/z 440/422 (M+H⁺).

N-(3-溴-4-氟苄基)-5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯

收率 15%. NMR (CDCl₃) δ 1.37 (t, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.74 (s, 2H), 6.83 (d, 1H), 7.03 (dd, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.40 (d, 1H). m/z 449 (MH⁺)

N-(3-氟-4-溴苄基)-5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯

收率 77%. NMR (CDCl₃) δ 1.37 (t, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.77 (s, 2H), 6.72 (d, 1H), 6.74 (d, 1H), 7.03 (dd, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.40 (t, 1H).

N-(3-溴-4-氟苄基)-5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯

收率 41%. NMR (CDCl₃) δ 1.40 (t, 3H), 2.34 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.72 (s, 2H), 6.95 (dd, 1H), 7.05 (dd, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.40 (d, 1H), 7.62 (d, 1H); m/z 433 (MH⁺).

方法 B

N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4-氟-5-羟基吡啶-2-甲酸甲酯

(i) 2-氟-3-苄氧基苯甲醛

2-氟-3-羟基苯甲醛 (16.49g) 溶于二甲基甲酰胺 (200ml) 且在氩
5 气氛下搅拌。加入氢化钠 (在矿物油中 60%, 5.18g), 搅拌该混合物 30
分钟。加入苄基溴 (16.8ml), 搅拌该混合物过夜。真空浓缩该反应混
合物, 所得的残余物在乙醚 (200ml) 和水 (200ml) 之间分配。合并的有
机提取物用水 (400ml) 洗涤, 干燥 (MgSO_4) 和真空浓缩。残余物通过快
速柱色谱纯化, 利用 0-10% 乙酸乙酯/异己烷梯度洗脱, 得到所需产
10 物, 其为黄色固体 (18.41g, 68%): $^1\text{H NMR}$ (CD_3SOCD_3) δ 5.20 (s, 2H),
7.2-7.6 (m, 8H), 10.21 (s, 1H)

(ii) 2-叠氮基-3-(2-氟-3-苄氧基苯基)丙酸甲酯

-25℃氩气流下, 将叠氮基乙酸甲酯 (36.64g) 和 2-氟-3-苄氧基苯
15 甲醛 (18.32g) 在甲醇 (250ml) 中的混合物在搅拌的同时在 1 小时内滴
加到甲醇钠 (17.20g) 在甲醇 (100ml) 中的混合物内。搅拌该混合物 20
分钟, 升温至 5℃且搅拌过夜。过滤所得的沉淀, 依次用冷甲醇、乙酸
在水中的稀释溶液和水洗涤。所得的固体在真空下干燥得到产物, 其
为浅褐色固体 (16.70g), 其无需纯化就可使用。

20

(iii) 4-氟-5-苄氧基吡啶-2-甲酸甲酯

将 2-叠氮基-3-(2-氟-3-苄氧基苯基)丙酸甲酯 (16.7g) 在二甲苯
(600ml) 中的溶液在搅拌的同时在 1 小时内滴加到回流的二甲苯 (2.4L)
中, 随后继续搅拌 20 分钟。将反应混合物真空浓缩且通过快速柱色谱
25 纯化, 利用 0-100% 乙酸乙酯/异己烷梯度洗脱得到产物, 其为黄色固
体 (12.93g, 54%). $^1\text{H NMR}$ (CD_3SOCD_3) δ 3.85 (s, 3H), 5.15 (s, 2H),
7.05-7.45 (m, 8H), 12.06 (s, 1H); m/z 300.4 (MH^+)

以相似方式, 重复步骤 (ii) 和 (iii), 但使用 2-氟-3-甲氧基苯甲
醛和叠氮基乙酸乙酯制备:

30 4-氟-5-甲氧基吡啶-2-甲酸乙酯

$^1\text{H NMR}$ (CD_3SOCD_3) δ 1.31 (t, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 7.0 (d,
1H), 7.22 (d, 1H), 7.39 (d, 1H), 12.2 (bs, 1H).

(iv) N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4-氟-5-苄氧基吡啶-2-甲酸甲酯

氢化钠(在矿物油中 60%, 75mg)加入到冷却至 5℃ 的 4-氟-5-苄氧基吡啶-2-甲酸甲酯(257mg)在二甲基甲酰胺(10ml)的溶液内, 该混合物在氩气氛下搅拌 30 分钟。加入 3-三氟甲基-4 氟苄基氯(280mg), 令该混合物升至室温, 随后搅拌 4 小时。反应混合物在乙酸乙酯和水之间分配。有机提取物用水洗涤, 干燥(MgSO₄), 真空浓缩和通过快速柱色谱纯化, 用异己烷、随后用 5%乙酸乙酯/异己烷作为洗脱剂, 得到所需产物(140mg, 34%). ¹H NMR(CDCl₃) δ 3.9(s, 3H), 5.15(s, 2H), 5.75(s, 2H), 6.9-7.2(m, 4H), 7.3-7.5(m, 7H); m/z 476(M+H⁺)

以类似方式但用适当的吡啶和苄基卤化物制备:

N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4-氟-5-甲氧基吡啶-2-甲酸乙酯

收率 82%. NMR(CDCl₃) δ 1.4(t, 3H), 3.95(s, 3H), 4.35-4.9q, 2H), 5.8(s, 2H), 7.0-7.2(m, 3H), 7.3-7.5(m, 3H)。

(v) N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4-氟-5-羟基吡啶-2-甲酸甲酯

N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4-氟-5-苄氧基吡啶-2-甲酸甲酯(140mg)和 5%Pd/C(50mg)在乙酸乙酯(10ml)中的混合物在氩气氛下搅拌 5 小时, 经硅藻土过滤, 真空浓缩和通过快速柱色谱纯化用 10-25%乙酸乙酯/异己烷 梯度洗脱, 得到所需产物(60mg, 53%). ¹H NMR(CDCl₃) δ 3.9(s, 3H), 4.9(d, 1H), 5.8(s, 2H), 6.9-7.2(m, 4H), 7.4(m, 2H); m/z 384(M-H⁺)

25 以类似方式但使用适当的苄基卤化物制备:

N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4-氟-5-羟基吡啶-2-甲酸甲酯

收率 89%. NMR(CD₃SOCD₃) δ 3.80(s, 3H), 5.92(s, 2H), 7.05(t, 1H), 7.11(dd, 1H), 7.22(m, 2H), 7.60(m, 2H), 9.37(s, 1H); m/z 401(MH⁺)

30

以类似方式但从 2,4-二氟-3-羟基苯甲醛起始制备

N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-4,6-二氟-5-羟基吡啶-2-甲酸乙酯

^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 3.80 (s, 3H), 5.80 (s, 2H), 7.20-7.60 (m, 5H), 9.70 (s, 1H); m/z 402.2 ($\text{M}-\text{H}^+$)

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-4-氯-5-羟基吡啶-2-甲酸乙酯

从 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-4-氯-5-甲氧基吡啶-2-甲酸乙酯
5 通过 E(iv) 所述的方法制备。收率 42%。 ^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.39 (t, 3H), 4.32 (q, 2H), 5.37 (s, 1H), 5.79 (s, 2H), 6.99-7.11 (m, 3H), 7.31-7.39 (m, 2H), 7.47 (d, 1H); m/z 430, 432 ($\text{M}-\text{H}^+$)

方法 C

10 5-乙酰氧基-3-溴吡啶-2-甲酸乙酯

N-溴琥珀酰亚胺 (0.14 g) 加入到 5-乙酰氧基吡啶-2-甲酸乙酯 (0.2 g) 在 DMF (3.0 ml) 中的搅拌溶液内。将该反应搅拌 4 小时，随后倾入水中。过滤所得的沉淀并真空干燥得到该标题化合物，其为白色粉末 (0.23 g, 87%)。NMR 1.38 (t, 3H), 2.23 (s, 3H), 4.38 (q, 2H),
15 7.10 (dd, 1H), 7.23 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 12.28 (bs, 1H); m/z 326 (M^+)

方法 C2

5-乙酰氧基-3-氯吡啶-2-甲酸乙酯

20 5-乙酰氧基吡啶-2-甲酸乙酯 (500mg) 在二氯甲烷 (10ml) 中的溶液在室温下于 N-氯琥珀酰亚胺 (297mg) 和碳酸钾 (279mg) 的存在下搅拌过夜。通过过滤收集所得的沉淀，用冷二氯甲烷、随后用水洗涤并真空下干燥过夜得到所需产物，其为白色粉末 (425mg, 75%)。NMR: 1.35 (t, 3H), 2.25 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.1 (d, 1H), 7.3 (s, 1H),
25 7.5 (d, 1H), 12.2 (s, 1H); m/z 281.9 (MH^+)

方法 C3

5-乙酰氧基-3-碘吡啶-2-甲酸乙酯

5-乙酰氧基吡啶-2-甲酸乙酯 (1g) 在二甲基甲酰胺 (2ml) 中的溶液
30 在室温下于碳酸钾 (1.12g) 和碘 (1.029g) 的存在下搅拌 18 小时。该反应用水 (30ml) 稀释，过滤所得的固体，用水洗涤并干燥，得到所需产物 1.32g, 87%)。NMR: δ (CD_3SOCD_3) 1.4 (t, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.1 (d,

1H), 7.15 (s, 1H), 7.45 (d, 1H), 12.3 (s, 1H): m/z 372 (M-H⁺)

N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-5-乙酰氧基-3-碘吲哚-2-甲酸乙酯

向 5-乙酰氧基-3-碘吲哚-2-甲酸乙酯 (400mg) 在二甲基甲酰胺
5 (15ml) 中的溶液内加入碳酸钾 (340mg), 四丁基碘化铵 (10mg) 和 4-氟-3-三氟甲基苄基溴 (330mg)。将该混合物搅拌 18 小时。该混合物用水 (10ml) 稀释并用乙酸乙酯提取。使有机提取物干燥, 浓缩和通过柱色谱纯化用 5% 乙酸乙酯/异己烷作为洗脱剂, 得到所需产物 (520mg, 89%)。NMR (CD₃SOCD₃): δ 1.3 (t, 3H), 2.25 (s, 3H), 4.3 (q, 2H),
10 5.85 (s, 2H), 7.2 (m, 3H), 7.4 (m, 1H), 7.8 (m, 2H): m/z 550 (MH⁺)

以类似方式但使用适当的 5-乙酰氧基-3-卤代吲哚-2-甲酸乙酯和苄基卤化物制备:

N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-5-乙酰氧基-3-氯吲哚-2-甲酸乙酯

收率 70% . 458.1 (MH⁺)

15

N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-5-乙酰氧基-3-溴吲哚-2-甲酸乙酯

收率 96% . NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.3 (s, 3H), 4.4 (q, 2H),
5.75 (s, 2H), 7.0-7.2 (m, 3H), 7.3 (m, 1H), 7.4 (m, 2H); m/z
502/504 (MH⁺) .

20

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-乙酰氧基-3-溴吲哚-2-甲酸乙酯

收率 79%. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.8 (s,
2H), 7.05 (d, 1H), 7.1 (dd, 1H), 7.3 (m, 1H), 7.4 (d, 1H), 7.5 (m,
1H), 7.6 (s, 1H); m/z 518/520 (MH⁺)

25

N-(3-氟-4-三氟甲基苄基)-5-乙酰氧基-3-溴吲哚-2-甲酸乙酯

收率 63%. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.8 (s,
2H), 6.95 (d, 1H), 7.1 (dd, 1H), 7.25 (m, 2H), 7.5 (m, 1H), 7.6 (d,
1H); m/z 518/520 (MH⁺) .

30

方法 D

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-3-甲氧基-5-羟基吲哚-2-甲酸乙酯

(i) 5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯

将 3-苄氧基吲哚-2-甲酸乙酯 (10g)、环己烯 (50ml) 和 10% 碳载钨 (2g) 在乙酸乙酯 (500ml) 中的混合物回流 4 小时。冷却该混合物并经硅藻土过滤。加入乙酸酐 (5ml) 和 N-二甲基氨基吡啶 (0.1g)，将该混合物回流 15 分钟。冷却该混合物且加入乙醇破坏过量的乙酸酐。浓缩该混合物，残余物从乙酸乙酯/异己烷中重结晶得到所需产物，其为白色针状 (6.44g, 77%) NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.33 (t, 3H), 2.23 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.42 (d, 1H), 11.93 (bs, 1H); m/z (M-H⁺)

10

(ii) 5-乙酰氧基重氮基吲哚-2-甲酸乙酯

向 5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯 (5g) 的溶液内加入亚硝酸钠 (20g)，随后滴加冰醋酸 (20ml)。加料约半数后，出现褐色烟。将该混合物冷却至 -10℃，加入剩余的乙酸。将该混合物搅拌 18 小时。加入附加量的亚硝酸钠 (10g) 和乙酸 (10ml)，所得的混合物搅拌 18 小时。该混合物在乙酸乙酯和水之间分配。分离有机提取物，干燥和浓缩至小体积。加入己烷，过滤所得的固体，得到所需产物 (5.2g, 94%)。NMR (CDCl₃) δ 0.8 (t, 3H), 4.5 (q, 2H), 7.1 (dd, 1H), 7.4 (d, 1H), 8.0 (d, 1H); m/z 273 (M+H⁺)

20

(iii) 3-甲氧基-5-乙酰氧基吲哚-2-甲酸乙酯

向 5-乙酰氧基重氮基吲哚-2-甲酸乙酯 (4.6g) 在 1, 2-二氯乙烷中的溶液内加入甲醇 (10ml)，随后加入催化量的乙酸铈(II) 二聚体，将所得的混合物回流 18 小时。浓缩该混合物，所得的残余物通过柱色谱纯化用 20% 乙酸乙酯/异己烷作为洗脱剂得到所需产物，其通过乙醚研制进一步纯化 (2.34g, 50%)。NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.3 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.05 (dd, 1H), 7.2-7.25 (m, 2H), 7.45 (d, 1H), 8.4 (bs, 1H); m/z 278.4 (M+H⁺)

30 方法 EN-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氯吲哚-2-甲酸乙酯(i) 2-乙酰基-2-(N'-(3-氯-4-甲氧基苄基)胍基)丙酸乙酯

把 HCl 醚溶液 (60 ml) 加入到 3-氯-对茴香胺在乙酸乙酯 (300ml) 中的溶液内沉淀出盐, 通过过滤分离并且风干。-5℃ 氩气氛下把该盐 (18.5 g) 悬浮在 1.5 N HCl (230 ml) 中。在 15 分钟内加入亚硝酸钠 (6.9 g) 的水 (50 ml) 溶液生成溶液/浆液, 其在 -5℃ 下继续搅拌 1 小时。(溶液 A)

5℃ 下把氢氧化钠 (5.36 g) 在水 (10 ml) 中的溶液加入到 2-甲基乙酰乙酸乙酯 (13.5 ml) 在乙醇 (80 ml) 中的溶液内。该反应在 5℃ 下继续搅拌 1 小时且通过加入乙酸钠 (20g) 调节 pH 至 4。(溶液 B)

-5℃ 下把溶液 B 加入到溶液 A 中, 令该混合物在 3 小时内升至室温, 随后在水 (250 ml) 和乙酸乙酯 (250 ml) 之间分配。将有机相干燥 (MgSO_4), 真空浓缩和通过柱色谱纯化用 15% 乙酸乙酯/异己烷作为洗脱剂, 生成所需的产物 (7 g, 21%); NMR (CDCl_3) δ 1.24 (t, 3H), 1.63 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 4.22-4.35 (m, 2H), 7.02 (d, 1H), 7.72 (dd, 1H), 7.83 (d, 1H) m/z 270 ($\text{M}-\text{CH}_3\text{COH}$)⁺

15 以类似方式但从 3-氯-4-甲氧基苯胺开始制备:

2-乙酰基-2-(N'-(3-氯-4-甲氧基苯基)胍基)丙酸乙酯

NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.25 (t, 3H), 1.55 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.0 (s, 3H), 4.2 (q, 2H), 7.4 (t, 1H), 7.5 (dd, 1H), 7.6 (d, 1H); m/z 255 (MH^+)

20 以类似方式但从 3, 5-二氯-4-甲氧基苯胺起始制备:

2-(N'-(3, 5-二氯-4-甲氧基苯基)胍基)丙酸乙酯

NMR (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 2.05 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 7.13 (s, 2H), 7.52 (bs, 1H); m/z 307 (MH^+)

25 (ii) 5-甲氧基-6-氯吡啶-2-甲酸乙酯

2-乙酰基-2-(N'-(3-氯-4-甲氧基苯基)胍基)丙酸乙酯 (1g) 和对甲苯磺酸 (1g) 在甲苯 (30 ml) 中的溶液在 100℃ 下搅拌 18 小时。随后浓缩该混合物, 通过柱色谱纯化用 15% 乙酸乙酯/异己烷作为洗脱剂得到所需产物 (70 mg, 8%); NMR (CDCl_3) δ 1.42 (t, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.42 (q, 2H), 7.11 (s, 2H), 7.46 (s, 1H), 8.86 (bs, 1H)

以类似方式但从 2-乙酰基-2-(N'-(3-氯-4-甲氧基苯基)胍基)丙酸乙酯起始制备:

5-甲氧基-6-氟吡啶-2-甲酸乙酯 NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.3 (t, 3H), 3.8 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 7.1 (s, 1H), 7.2 (d, 1H), 7.3 (d, 1H); m/z 237 (MH⁺)

- 5 以类似方式通过从 2-(N'-(3,5-二氯-4-甲氧基苄基)胍基)丙酸乙酯起始制备:

5-甲氧基-4,6-二氯吡啶-2-甲酸乙酯 NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.38 (t, 3H), 2.08 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 7.23 (s, 2H), 7.5 (bs, 1H); m/z 307 (MH)

10

(iii) N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-甲氧基-6-氟吡啶-2-甲酸乙酯

- 5-甲氧基-6-氟吡啶-2-甲酸乙酯用 3-三氟甲基-4-氯苄基溴利用方法 A(iii) 所述的方法烷基化得到所需产物 (650 mg, 64%); NMR (CDCl₃) δ 1.36 (t, 3H), 3.93 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.01 (dd, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.43 (d, 1H)
- 15

以类似方式利用适当的吡啶和苄基卤化物制备:

N-(3-三氟甲基-4-氟苄基)-5-甲氧基-6-氟吡啶-2-甲酸乙酯

- 20 NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 3.9 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.1-7.4 (m, 4H), 7.55 (d, 1H), 7.9 (s, 1H)。

N-(3,4-二氯苄基)-5-甲氧基-6-氟吡啶-2-甲酸乙酯

- NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 3.8 (s, 3H), 4.2 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 6.9 (d, 1H), 7.3-7.4 (m, 3H), 7.5 (d, 1H), 7.6 (d, 1H)
- 25

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-甲氧基-6-氟吡啶-2-甲酸乙酯

- NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.36 (t, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.72 (s, 2H), 6.95-7.05 (m, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.43 (s, 1H)。
- 30

N-(3,4-二氯苄基)-5-甲氧基-4,6-二氯吡啶-2-甲酸乙酯

NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.33 (q, 2H), 5.7 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.34 (d; 1H), 7.42 (s, 1H)

- 5 N-(3-三氟甲基-4-二氯苄基)-5-甲氧基-4,6-二氯吡啶-2-甲酸乙酯
NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.35 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.0-7.5 (m, 4H).

N-(3,4-二氯苄基)-5-甲氧基-6-氯吡啶-2-甲酸乙酯

- 10 NMR (CDCl₃) δ 1.36 (t, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.69 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.09 (d, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.24-7.35 (m, 3H);
m/z 414 (MH⁺)

(iv) N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氯吡啶-2-甲酸乙酯

- 15 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-甲氧基-6-氯吡啶-2-甲酸乙酯 (650 mgs) 和三甲基甲硅烷基碘化物 (0.8 ml) 在氯仿 (50 ml) 中的混合物于 50℃ 下搅拌 18 小时。加入附加份的三甲基甲硅烷基碘化物直至没有残留起始原料为止，随后把反应物倾入甲醇 (100 ml)。真空浓缩该混合物且通过柱色谱纯化用 15% 乙酸乙酯/异己烷作为洗脱剂，得到所需产物，其为白色固体 (276 mg, 44%); NMR (CDCl₃) δ 1.36 (t, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.24-7.51 (m, 3H), 7.38 (d, 1H), 7.44 (d, 1H)

- 25 以类似方式，但使用 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-甲氧基-6-氯吡啶-2-甲酸乙酯或 N-(3,4-二氯苄基)-5-甲氧基-6-氯吡啶-2-甲酸乙酯或 N-(3,4-二氯苄基)-5-甲氧基-4,6-二氯吡啶-2-甲酸乙酯或 N-(3,4-二氯苄基)-5-甲氧基-6-氯吡啶-2-甲酸乙酯或 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-甲氧基-6-氯吡啶-2-甲酸乙酯或 N-(3-三氟甲基-4-二氯苄基)-5-甲氧基-4,6-二氯吡啶-2-甲酸乙酯制备:

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氯吡啶-2-甲酸乙酯

- 30 收率 53%. NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 4.25 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.1-7.25 (m, 3H), 7.4 (t, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.8 (s, 1H), 9.8 (s, 1H); m/z 414 (M-H⁺)

N-(3,4-二氯苄基)-5-羟基-6-氟吡啶-2-甲酸乙酯

收率 31%. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.7 (s, 2H), 6.8 (dd, 1H), 7.0 (d, 1H), 7.1-7.3 (m, 2H); m/z 380 (M-H⁺)

5 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-6-氟吡啶-2-甲酸乙酯

收率 26%. NMR (CDCl₃) δ 1.35 (t, 3H), 4.31 (q, 2H), 4.98 (bd, 1H), 5.72 (s, 2H), 6.96 (d, 1H), 7.01 (dd, 1H), 7.23-7.3 (m, 2H), 7.37 (d, 1H), 7.44 (s, 1H); m/z 414, 416 (M-H⁺).

10 (3,4-二氯苄基)-5-羟基-4,6-二氯吡啶-2-甲酸乙酯

收率 69%. NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 4.34 (q, 2H), 5.65 (bs, 1H), 7.7 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.1 (d, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.35 (s, 1H); m/z 436, 434, 432, 430 (M-H⁺)

15 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-4,6-二氯吡啶-2-甲酸乙酯

收率 80%. NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 4.36 (q, 2H), 5.66 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.35-7.41 (m, 2H), 7.43 (d, 1H); 466, 468 (M-H)

20 N-(3,4-二氯苄基)-5-羟基-6-氟吡啶-2-甲酸乙酯

收率 37%. m/z 398 (M-H⁺)

方法 E2N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-乙酰氧基-6-溴吡啶-2-甲酸乙酯25 (i) 5-甲氧基-6-溴吡啶-2-甲酸乙酯

重复方法 E(i)-(ii) 中所述的过程利用 3-溴-4-甲氧基苯胺得到所需产物 (收率 24%): ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1.30 (t, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.30 (q, 2H), 7.05 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 11.79 (s, 1H); m/z 296.3 (M-H⁺).

30

(ii) N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-乙酰氧基-6-溴吡啶-2-甲酸乙酯

重复方法 A(i)-(iii) 中所述的过程利用适当的苄基卤化物得到所

需产物: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.22 (t, 3H), 2.32 (s, 3H), 4.25 (q, 2H), 5.90 (s, 2H), 7.10 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.60 (d, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.68 (m, 1H), 8.10 (s, 1H)

以类似方式但使用 3,4-二氯苄基氯制备:

- 5 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-乙酰氧基-6-溴吡啶-2-甲酸乙酯
m/z 486.2 ($\text{M}-\text{H}^+$)

方法 E3

N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-7-氟吡啶-2-甲酸乙酯

- 10 (i) N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-苄氧基-7-氟吡啶-2-甲酸乙酯

重复方法 E(i)-(iii) 所述的过程利用 2-氟-4-苄氧基苯胺作为起始原料得到所需产物(收率 71%): ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.22 (t, 3H), 4.25 (q, 2H), 5.10 (s, 2H), 5.90 (s, 2H), 6.95 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.30-7.50 (m, 6H), 7.60 (m, 2H)

15

(ii) N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-羟基-7-氟吡啶-2-甲酸乙酯

向 N-(3-三氟甲基-4-氯苄基)-5-苄氧基-7-氟吡啶-2-甲酸乙酯 (50mg) 在乙酸乙酯 (5ml) 中的溶液内加入催化量的 5% 碳载钯, 所得的物质在氢气氛下搅拌 72 小时。过滤该混合物并真空浓缩得到所需产物 (59mg): m/z 414.25 ($\text{M}-\text{H}^+$)

20

实施例 27

药物组合物

- 25 本实施例举例说明, 但不限于, 在此定义的本发明的代表性药物剂型(活性成分被称作"化合物 X"), 为了治疗或预防而应用于人体:

(a)

<u>片剂 I</u>	<u>mg/片</u>
化合物 X.	100
乳糖欧洲药典 (Ph. Eur)	182.75
交联羧甲基纤维素钠	12.0
玉米淀粉糊 (5%w/v 糊)	2.25
硬脂酸镁	3.0

(b)

<u>片剂 II</u>	<u>mg/片</u>
化合物 X	50
乳糖 Ph. Eur	223.75
交联羧甲基纤维素钠	6.0
玉米淀粉	15.0
聚乙烯吡咯烷酮 (5%w/v 糊)	2.25
硬脂酸镁	3.0

(c)

<u>片剂 III</u>	<u>mg/片</u>
化合物 X	1.0
乳糖 Ph. Eur	93.25
交联羧甲基纤维素钠	4.0
玉米淀粉糊 (5%w/v 糊)	0.75
硬脂酸镁	1.0

(d)

<u>胶囊</u>	<u>mg/个胶囊</u>
化合物 X	10
乳糖 Ph. Eur	488.5
镁	1.5

(e)

<u>注射剂 I</u>	<u>(50mg/ml)</u>
化合物 X	5.0%w/v
1M 氢氧化钠溶液	15.0%v/v
0.1M 盐酸	调至 pH 7.6
聚乙二醇 400	4.5%w/v
注射用水	至 100%

(f)

注射剂 II	(10mg/ml)
化合物 X	1.0%w/v
磷酸钠 BP	3.6%w/v
0.1M 氢氧化钠溶液	15.0%v/v
注射用水	至 100%

(g)

注射剂 III	(1mg/ml, 缓冲至 pH 6)
化合物 X	0.1%w/v
磷酸钠 BP	2.26%w/v
柠檬酸	0.38%w/v
聚乙二醇 400	3.5%w/v
注射用水	至 100%

(h)

气溶胶 I	mg/ml
化合物 X	10.0
脱水山梨糖醇三油酸酯	13.5
三氯氟甲烷	910.0
二氯二氟甲烷	490.0

(i)

气溶胶 II	mg/ml
化合物 X	0.2
脱水山梨糖醇三油酸酯	0.27
三氯氟甲烷	70.0
二氯二氟甲烷	280.0
二氯四氟乙烷	1094.0

(j)

气溶胶 III	mg/ml
化合物 X	2.5
脱水山梨糖醇三油酸酯	3.38
三氯氟甲烷	67.5
二氯二氟甲烷	1086.0
二氯四氟乙烷	191.6

(k)

气溶胶 IV	mg/ml
化合物 X	2.5
大豆卵磷脂	2.7
三氯氟甲烷	67.5
二氯二氟甲烷	1086.0
二氯四氟乙烷	191.6

(l)

软膏	ml
化合物 X	40mg
乙醇	300 μ l
水	300 μ l
1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮	50 μ l
丙二醇	至 1ml

5 注意:

上述制剂中的化合物 X 可以包括本文实施例中所述的化合物。

- 上述制剂可以通过制药领域熟知的常规方法来制得。片剂 (a)-(c) 可以通过常规方式肠溶包衣, 例如提供邻苯二甲酸乙酸钠纤维素的包衣。气溶胶制剂 (h)-(k) 可以与标准、计量给药的气溶胶分配器结合使用, 并且悬浮剂脱水山梨糖醇三油酸酯和大豆卵磷脂可以被其它悬浮剂如脱水山梨糖醇单油酸酯、脱水山梨糖醇倍半油酸酯、吐温 80、聚甘油油酸酯或油酸代替。