



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101910179 B

(45) 授权公告日 2013. 06. 19

(21) 申请号 200980101974. 6

(22) 申请日 2009. 01. 08

(30) 优先权数据

61/020, 520 2008. 01. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/030374 2009. 01. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02009/089312 EN 2009. 07. 16

(73) 专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 M·W·卡森 M·J·科兰

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 周铁 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07D 491/04 (2006. 01)

A61K 31/4353 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

A61P 11/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1918151 A, 2007. 02. 21, 说明书第 1 页第 5 行 - 第 65 页表 II.

W0 2004/052847 A2, 2004. 06. 24, 说明书第 114-144 页, 表 1, 实施例化合物 811、836, 权利要求 113-115.

审查员 薛建强

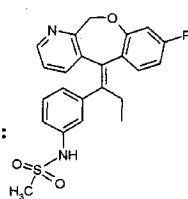
权利要求书1页 说明书15页

(54) 发明名称

糖皮质激素受体调节剂及使用方法

(57) 摘要

本发明提供化合物 (I) :



或它

(I)

的药物学上可接受的盐;包含化合物 (I) 与一种或多种的药物学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物;以及治疗炎症和免疫病症的方法,该方法包括对需要该治疗的患者施用有效量的化合物 (I) 或它的药物学上可接受的盐。

1. 化合物,它是 (E)-N-{3-[1-(8-氟-11H-10-氧杂-1-氮杂-二苯并[a,d]环庚烯-5-亚基)-丙基]-苯基}-甲烷磺酰胺,或它的药物学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1的化合物,它是 (E)-N-{3-[1-(8-氟-11H-10-氧杂-1-氮杂-二苯并[a,d]环庚烯-5-亚基)-丙基]-苯基}-甲烷磺酰胺。

3. 根据权利要求1或2中任何一项的化合物或盐在制备用于治疗类风湿性关节炎,骨关节炎,风湿热,哮喘,过敏性鼻炎,系统性红斑狼疮,慢性阻塞性肺病,克劳恩氏病,炎症性肠病,或溃疡性结肠炎的药物中的用途。

4. 根据权利要求3的用途,其中该药物用于治疗类风湿性关节炎。

5. 药物组合物,它包括根据权利要求1或2中任何一项的化合物或盐与一种或多种药物学上可接受的载体或赋形剂。

6. 用于治疗类风湿性关节炎的药物组合物,它包括根据权利要求1或2中任何一项的化合物或盐与一种或多种药物学上可接受的载体或赋形剂。

糖皮质激素受体调节剂及使用方法

[0001] 本发明涉及用于治疗或防止对甾族糖皮质激素 (glucocorticoids) 有反应的炎症和免疫病症的治疗剂, 涉及包括该药剂的药物组合物, 涉及治疗或防止病人炎症和免疫疾病的方法, 以及涉及用于合成该治疗剂的中间体和方案。

[0002] 天然和合成甾族糖皮质激素已经在超过五十年的时间中广泛地用于治疗急性和慢性炎症和免疫病症, 如类风湿性关节炎, 骨关节炎, 风湿热, 哮喘, 过敏性鼻炎, 系统性红斑狼疮, 慢性阻塞性肺病, 克劳恩氏 (Crohn) 病, 炎症性肠病, 和溃疡性结肠炎。然而, 糖皮质激素的使用常常与严重的和有时不可逆的副作用相关联, 如骨损失 / 骨质疏松症, 高血糖症, 糖尿病, 高血压, 青光眼, 肌肉萎缩, 库辛氏 (Cushing) 综合症, 和精神病。因此, 仍然需要备选的治疗方案, 它具有甾族糖皮质激素的有益效果, 但是减少了伴随性的副作用的可能性或发病率。

[0003] 糖皮质激素在与糖皮质激素受体 (GR) 形成复合物之后调节基因转录。在糖皮质激素结合之后, GR- 肾上腺糖皮质激素复合物迁移到细胞核中, 在这里它在特定基因的启动区中结合于糖皮质激素敏感元素 (GRE)。GR- 糖皮质激素 / GRE 复合物然后随即启动 (转录活化) 或抑制邻位基因的转录。或者, 该 GR- 糖皮质激素复合物可通过不涉及 DNA 结合的过程来负面调节基因转录。在称作转录抑制的该过程中, GR- 糖皮质激素复合物进入细胞核中并且与其它转录因子直接相互作用 (经由蛋白质-蛋白质相互作用), 抑制它们诱导基因转录和因此蛋白质表达的能力。

[0004] 对适合作为甾族糖皮质激素的替代品的 GR 配体的探求受到以下事实所妨碍: 媒介其它生理学过程的其它类固醇激素受体例如雄激素受体 (AR)、矿物类皮质激素受体 (MR) 和孕酮受体 (PR) 具有与 GR 相似的配体结合域。结果, GR 配体具有与这些其它受体之间的交叉反应性的潜在性。因此, 甾族糖皮质激素的替代物的所需属性是它能够以比其它类固醇激素受体更高的亲合性结合于 GR。

[0005] 新近的观察表明, 在结合于 DNA 上的 GR 不存在的情况下能够维持糖皮质激素的抗炎效果。因此, 主要由 GR 蛋白质-蛋白质相互作用 (例如转录抑制) 媒介的糖皮质激素作用的机理被认为足以诱导该抗炎响应。此外, 糖皮质激素治疗的许多副作用 (例如高血糖症, 糖尿病, 青光眼, 和肌肉萎缩) 现在被认为主要由在 GR 结合于 DNA 上之后的转录活化机理所媒介。因此, 能够将 GR 媒介的转录抑制与 GR 媒介的转录活化之间分化的药剂是特别令人想望的。此外, 显示出有限的调节 (即激动, 部分地激动, 部分地拮抗, 或拮抗) 其它类固醇激素受体的转录活性的能力的药剂也是特别令人想望的。

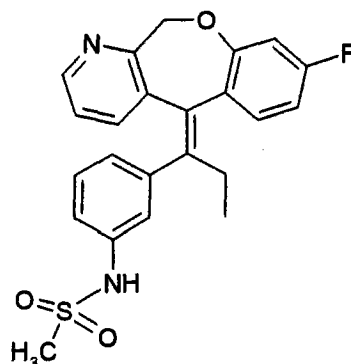
[0006] 本发明的目的是提供以比其它类固醇激素受体更高的亲合性结合于 GR 的药剂。更具体地说, 本发明的目的是提供以超过 10 倍于 AR、MR 和 PR 的亲合性结合于 GR 上的药剂。本发明的另一目的是提供相对于其诱导与糖皮质激素治疗有关的副作用的倾向而言具有更有效的抗炎性能的药剂。更具体地说, 本发明的目的是提供相对于其诱导骨损失或骨质疏松症的倾向而言具有更有效的抗炎性能的药剂。本发明的另一目的是提供显示出有限的调节其它类固醇激素受体 (Ar、MR 和 PR) 活性的能力的药剂。

[0007] GR 调节剂是现有技术中已知的。例如 WO 04/052847 公开了一类三环类固醇激素

受体调节剂,其可用于治疗对矿物类皮质激素受体或糖皮质激素受体调节敏感的病症。令人吃惊地,现在已发现通过从 W004/052847 的范围内选择下面作为化合物 (I) 提供的化合物而确认了一种新型治疗剂,该治疗剂具有出乎预料的活性谱,这提示它特别可用于治疗对甾族糖皮质激素有反应的炎症和免疫疾病。

[0008] 因此,本发明提供化合物 (I) :

[0009]



[0010] 化合物 (I)

[0011] (E)-N-{3-[1-(8-氟-11H-10-氧杂-1-氮杂-二苯并[a,d]环庚烯-5-亚基)-丙基]-苯基}-甲磺酰胺)

[0012] 或它的药物学上可接受的盐。

[0013] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗或防止炎症或免疫病症(特别是类风湿性关节炎)的方法,包括对于需要治疗或防止的患者施用有效量的化合物 (I),或它的药物学上可接受的盐。另外,本发明提供用于治疗的化合物 (I),或它的药物学上可接受的盐。本发明还提供用于治疗或防止炎症或免疫疾病(特别是类风湿性关节炎)的化合物 (I),或它的药物学上可接受的盐。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明提供化合物 (I) 或它的药物学上可接受的盐用于制备用于治疗炎症或免疫病症(尤其类风湿性关节炎)的药物的用途。

[0015] 在另一个实施方案中,本发明提供药物组合物,它包括化合物 (I) 或它的药物学上可接受的盐,以及相结合使用的一种或多种药物学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。作为优选的实施方案,本发明提供用于治疗或防止类风湿性关节炎的药物组合物,该组合物包括化合物 (I) 或它的药物学上可接受的盐,以及一种或多种药物学上可接受的载体,赋形剂或稀释剂。另外,本发明还提供用于合成化合物 (I) 的新型中间体和方法。

[0016] 本发明提供化合物 (I) 用于治疗或防止对甾族糖皮质激素起反应的炎症和免疫疾病的用途。此类病症包括,例如类风湿性关节炎,骨关节炎,风湿热,哮喘,过敏性鼻炎,系统性红斑狼疮,慢性阻塞性肺病,克劳恩氏疾病,炎症性肠病,和溃疡性结肠炎。化合物 (I) 特别有用的病症是类风湿性关节炎。类风湿性关节炎(RA)是在30至50岁之间的典型年龄间发生的以持续关节滑液组织炎症为特征的慢性病。RA是炎症性关节炎的最普通形式,其中妇女以男人的两倍可能性产生该疾病。

[0017] 用于治疗或防止炎症和免疫疾病的化合物 (I) 的使用也被认为与典型地与糖皮质激素治疗相关的副作用的减少的倾向、可能性或发病率相关。糖皮质激素治疗的一种此类副作用是骨损失/骨质疏松症或糖皮质激素诱导的骨质疏松症(GIOP)。GIOP是药物诱发

的骨质疏松症的最常见原因,并且据报告在最高达 50% 的经历长期(即持续 6 个月以上)糖皮质激素治疗的患者中发生过。尤其,化合物(I)的使用被认为与骨损失或骨质疏松症的减少的倾向、可能性或发病率相关。

[0018] 除非另外定义,否则,本发明包括化合物(I)的药物学上可接受的盐类,以及化合物(I)的游离碱的溶剂化物及其药物学上可接受的盐类。然而,化合物(I)的游离碱是优选的。在这里使用的术语“药物学上可接受的盐”指对活的生物基本上无毒的化合物(I)的盐。药物学上可接受的盐类的例子和用于制备它们的方法是现有技术中常规的。参见例如 Stahl 等人,“Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use”, VCHA/Wiley-VCH, (2002); Gould, P. L., “Salt selection for basic drugs”, International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); 和 Bastin 等人 “Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities”, Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000)。

[0019] 在这里使用的术语“患者”指人或非人类的哺乳动物如狗,猫,牛,猴子,马,或羊。更具体地说,术语“患者”指人。在这里使用的术语“治疗”包括禁止,防止,限制,减缓,停止,或逆转现有症状或病症的进展或严重性。在这里使用的术语“防止”是指禁止,限制或抑制症状或病症的发作或出现。

[0020] 化合物(I)或它的药物学上可接受的盐可以经过配制作为药物组合物的一部分来给药。因此,包括化合物(I)或它的药物学上可接受的盐以及相结合使用的一种或多种药物学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物是本发明的重要实施方案。药物组合物的例子和制备它们的方法是现有技术中众所周知的。参见,例如, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, A. Gennaro 等人编著,第 19 版, Mack Publishing (1995)。包括化合物(I)的示例性组合物包括,例如,化合物(I)与 1% 羧甲基纤维素钠盐, 0.25% 聚山梨酯 80, 和 0.05% 防沫剂 1510™ (Dow Corning) 的悬浮液; 和化合物(I)与 0.5% 甲基纤维素, 1% 十二烷基硫酸钠, 和 0.1% 防沫剂 1510 在 0.01N HCl 中的悬浮液。本发明的优选组合物包括被配制在胶囊剂或片剂中的化合物(I)或它的药物学上可接受的盐。

[0021] 化合物(I)或包含化合物(I)的组合物能够通过可使化合物(I)被生物利用的任何途径(其中包括口服和胃肠外途径)给药。例如,化合物(I)或包含化合物(I)的组合物能够以口服,皮下,肌内,静脉内,透皮,鼻内,经直肠,经面颊等途径来给药。或者,化合物可以通过连续灌注来给药。然而,可以理解的是口服给药是优选的给药途径。

[0022] 在这里使用的术语“有效量”是指在单剂量或多剂量给药于患者之后在诊断或治疗的患者中提供所需效果的化合物(I)的量或剂量。有效量能够易由作为本领域中技术人员的主治诊断医生通过考虑许多因数来确定,这些因素例如是哺乳动物的种类;其大小,年龄,和一般健康状况;所涉及的具体疾病;疾病的程度或严重性;单个患者的响应;给药的具体化合物;给药的模式;给药的制剂的生物利用率特性;所选择的剂量服用法;和任何伴随药物的使用。

[0023] 生物活性

[0024] 在这里使用的“K_d”指配体-受体复合物的平衡离解常数;“K_i”指药物-受体复合物的平衡离解常数,并且是在平衡状态下将结合于一半的结合部位上的药物浓度的指标;

“ IC_{50} ”指产生为该药剂可能的最高抑制响应的 50% 的药剂浓度或指产生了结合于受体上的配体的 50% 置换的药剂浓度；“ EC_{50} ”指产生该药剂可能的最高响应的 50% 时的药剂浓度；“ ED_{50} ”指产生该药剂的最高响应的 50% 的所给药的治疗剂的剂量。

[0025] 细胞核激素受体结合分析：

[0026] 来自人胚肾 HEK293 细胞过表达人 GR (糖皮质激素受体)、AR (雄激素受体)、MR (矿物类皮质激素受体)、或 PR (孕酮受体) 的细胞溶胞产物用于受体-配体竞争结合分析中以测定 K_i 值。

[0027] 简短地说，甾族受体竞争结合分析是在含有 20mM Hepes 缓冲剂 ($pH = 7.6$)，0.2mM EDTA, 75mM NaCl, 1.5mM $MgCl_2$, 20% 甘油, 20mM 钼酸钠, 0.2mM DTT (二硫苏糖醇)，20 $\mu g/ml$ 抑肽酶和 20 $\mu g/ml$ 亮肽素的缓冲剂中进行的。典型地，甾族受体结合分析包括放射性标记的配体，如用于 GR 结合的 0.3nM [^3H]-地塞米松，用于 AR 结合的 0.36nM [^3H]-美曲勃龙 (methyltrienolone)，用于 MR 结合的 0.25nM [^3H]-醛甾酮，和用于 PR 结合的 0.29nM [^3H]-美曲勃龙，以及 20 μg 293-GR 溶胞产物、22 μg 293-AR 溶胞产物、20 μg 293-MR 溶胞产物或者 40 μg 293-PR 溶胞产物 / 孔。这些分析典型地在 96 孔模式中进行。竞争试验化合物以约 0.01nM 到 10 μM 范围内的各种浓度添加。非特异性的结合是在用于 GR 结合的 500nM 地塞米松，用于 MR 结合的 500nM 醛甾酮或用于 AR 和 PR 结合的 500nM 美曲勃龙存在下测定的。结合反应 (140 μL) 在 4°C 下培养一夜，然后将 70 μl 的冷活性炭-葡聚糖缓冲剂 (每 50mL 的分析缓冲剂含有 0.75g 的活性炭和 0.25g 的葡聚糖) 添加到各反应中。这些板在定轨振荡器上于 4°C 混合 8 分钟。这些板然后在 4°C 和 3000rpm 下离心处理 10 分钟。然后将 120 μl 的结合反应混合物的等分试样转移到另一个 96 孔板中，和将 175 μl 的 Wallac Optiphase Hisafe3™ 闪烁流体添加到各孔中。这些板被密封，然后在定轨振荡器上剧烈振荡。在培养 2 小时后，这些板在 Wallac Microbeta 计数器中读数。

[0028] 该数据用来计算预计的 IC_{50} 和在 10 μM 下的百分抑制率。用于 GR 结合的 [^3H]-地塞米松，用于 AR 结合的 [^3H]-美曲勃龙，用于 MR 结合的 [^3H]-醛甾酮，或用于 PR 结合的 [^3H]-美曲勃龙的 K_d 通过饱和结合来测定。化合物的 IC_{50} 值通过使用 Cheng-Prusoff 方程式被换算为 K_i 。

[0029] 与以上所述的那些类似的结合分析方案能够容易地由本领域中的普通技术人员所设计。按照基本上如上所述的程序，化合物 (I) 显示出约 0.2nM 的在 GR 结合分析中的 K_i ；约 6.7nM 的在 AR 结合分析中的 K_i ；约 9.2nM 的在 MR 结合分析中的 K_i ；和约 32nM 的在 PR 结合分析中的 K_i (这些值报道为 $n = 7$ 次实验的平均值)。因此，化合物 (I) 是人 GR 的有效配体，并且此外能够以大约 15 倍或更多倍于人 MR、AR 和 PR 中的每一种的亲合性结合于 GR。

[0030] 为了说明本发明化合物调节类固醇激素受体的活性的能力 (即激动，部分激动，部分拮抗，或拮抗)，进行生物分析，其可检测在暂时转染了核受体蛋白质和激素响应基元-报告基因结构的细胞中的靶基因表达的功能调节。用于功能分析的溶剂、试剂和配体能够容易地从商业来源获得，或能够由本领域中的普通技术人员制备。

[0031] 核激素受体功能调节分析：

[0032] 人胚肾 HEK293 细胞通过使用 Fugene™ 转染试剂转染了类固醇激素受体和报告基因质粒。简短地说，含有在萤光素酶报告子 cDNA 上游的 probasin ARE 和 TK (胸苷激酶) 启

动子的两个复制品的报告质粒通过使用病毒 CMV (细胞巨化病毒) 启动子被转染到具有在组成上表达人雄激素受体 (AR) 的质粒的 HEK293 细胞中。含有在萤光素酶报告子 cDNA 上游的 GRE 和 TK 启动子的两个复制品的报告质粒通过使用病毒 CMV 启动子被转染了在组成上表达人糖皮质激素受体 (GR)、人矿物类皮质激素受体 (MR) 或人孕酮受体 (PR) 的质粒。细胞在 T150cm 烧瓶中在含有 5% 活性炭 - 抽提的胎牛血清 (FBS) 的 Dulbecco 改进型 Eagle 培养基 (DMEM) 中转染。在一夜培养后, 使转染的细胞胰蛋白酶化, 在 96 孔的盘子中在含有 5% 活性炭 - 抽提的 FBS 的 DMEM 介质中平皿培养, 培养 4 小时和然后暴露于在约 0.01nM 到 10 μ M 范围内的各种浓度的试验化合物中。在用于分析的拮抗剂模式中, 将低浓度的各自受体的激动剂添加到介质 (用于 GR 的 0.25nM 地塞米松, 用于 AR 的 0.3nM 的美曲勃龙, 用于 PR 的 0.05nM 的普美孕酮和用于 MR 的 0.05nM 醛甾酮) 中。在用试验化合物进行 24 小时的培养后, 细胞被溶解和通过使用标准技术测定萤光素酶活性。

[0033] 数据被拟合到四参数拟合的逻辑曲线, 该曲线被拟合来测定 EC_{50} 值。相对于用下列参比激动剂获得的最高刺激来测定百分效力 (具有饱和的最高响应的那些化合物) 或 % 最高刺激 (具有不饱和的最高响应的那些化合物): 用于 AR 分析的 100nM 美曲勃龙, 用于 PR 分析的 30nM 普美孕酮, 用于 MR 分析的 30nM 醛甾酮和用于 GR 分析的 100nM 地塞米松。 IC_{50} 值可以类似地通过使用拮抗剂模式分析数据来测定。% 抑制率也可相对于在单独的激动剂存在下的响应来测定, 如上所述。

[0034] 按照基本上如上所述的程序, 化合物 (I) 在活化转录中显示出下列性能谱: 对于 GR, 约 44% 效力且 EC_{50} 约 1.8nM; 对于 AR, 约 4.4% 效力且 EC_{50} 大于 10 μ M; 对于 MR, 约 11% 效力且 EC_{50} 大于 10 μ M; 对于 PR, 约 54% 效力且 EC_{50} 大于 10 μ M (作为 $n = 4$ 或 5 次实验的平均值报道的值)。

[0035] 糖皮质激素受体媒介的转录抑制分析

[0036] 1. 在人皮肤成纤维细胞 CCD-39SK 细胞中 IL-1 β - 刺激的 IL-6 生产:

[0037] 简短地说, 从 ATCC 获得的人皮肤成纤维细胞 CCD-39SK 细胞 (20000 个细胞 / 孔) 在 96 孔板中在补充有 10% FBS, 100U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素和 2mmol/L L-谷氨酰胺的无血清的生长培养基中接种。细胞在含有 5% CO_2 的加湿室中维持在 37 $^{\circ}C$ 。试验化合物以约 4.65pM 到 4.64 μ M 的最终浓度的范围内的各种浓度被添加到各孔中。0.1 μ M 的地塞米松用作正对照。用试验化合物的 1 小时后处理, IL-1 β 是以 1ng/ml 的最终浓度添加; 且反应混合物培养一夜。从各孔中取出 10 μ l 的上层清液, 通过使用 ELISA 试剂盒测定 IL-6 浓度, 其中 IL-6 浓度是通过读取在 450nm 下的吸光率来定量分析的。

[0038] 2. 在 PMA 分化的 U937 细胞中 LPS 刺激的 TNF- α 生产:

[0039] 从 ATCC 获得的人 U937 前单核细胞型 (pre-monocytic) 细胞在含有 10% FBS 的完全 RPMI 1640 介质中生长。为了让单核细胞分化成粘连的巨噬细胞, U937 细胞在无钙、镁的介质中洗涤并再悬浮在含有 20nM 佛波醇 12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯 (PMA) 的新鲜 RPMI 介质中一夜。在分化后, 试验化合物是以约 4.65pM 到 4.64 μ M 范围内的各种浓度被添加到在 96 孔板中的细胞中。在用试验化合物的 1 小时后处理之后, LPS 是以 100ng/ml 的最终浓度添加; 然后反应混合物培养一夜。25 μ l 无细胞上层清液从各孔中转移到另一个 96 孔板中, 使用 ELISA 试剂盒测量 TNF- α 生产, 其中 TNF- α 通过读取在 450nm 下的吸光率来定量分析。

[0040] 按照基本上如上所述的程序,化合物(I)分别以约8.5和21nM的 IC_{50} 值诱导IL-6和TNF- α 的内源性表达的约90%或更高的最大抑制率(作为 $n = 15$ 次实验(IL-6分析)和 $n = 4$ 次实验(TNF- α 分析)的平均值报道的值)。

[0041] 因此,化合物(I)是前炎症性蛋白质IL-6和TNF- α 的内源性产生的有效和完全的转录抑制剂(最大抑制率的约90%或更高)。另外,化合物(I)在诱导GR/GRE媒介的基因转录中显示出仅仅部分的激动剂活性(最高效力的约50%或更低)。因此,化合物(I)通过诱导完全GR媒介的转录抑制,但仅仅部分地诱导GR/GRE媒介的转录活化来显示出分化分布。此外,在调查对于其它甾类受体的功能调节的影响作用的分析中,化合物(I)在激活由AR、MR和PR媒介的基因表达时显示出仅仅有限的活性。

[0042] 动物模型:

[0043] 1. 角叉菜胶诱导的爪水肿(Paw Edema)(CPE)模型

[0044] 角叉菜胶是能够在动物中诱导急性炎症响应的一组多糖。紧接着在注射之后在注射部位产生了包括水肿、痛觉过敏和红斑在内的炎症性主征。CPE模型是公认的炎症模型并且可用于评价糖皮质激素受体配体的抗炎效果。

[0045] 为了评价化合物(I)的抗炎效果,化合物被配制在包含0.5%羧甲基纤维素和0.25% Tween 80的载体中,然后经由填喂法口服给药于雄性Sprague-Dawley大鼠(180-200g)。为了对比,强的松龙可以在相同的载体中口服给药。两个小时后,在50 μ l的0.9%无热原的盐水中的1%角叉菜胶被注射到右后爪的足底下区域(subplantar regions)。在角叉菜胶注射之后的3小时,大鼠通过CO₂被安乐死。爪被切下,然后使用微量天平称量重量。然后通过爪表面上制造几个切口和立即浸入到液氮中直至冷冻为止,来解剖这些爪。冷冻的爪然后进行离心以抽提该渗出液。然后,根据厂家说明书由ELISA测量在炎症性响应过程中产生的IL-1 β (一种细胞活素)的渗出液量。总的爪蛋白质也通过使用蛋白质分析试剂盒来测量,并且IL-1 β 的绝对水平被标称化以得到ng IL-1 β /mg总蛋白的浓度值。

[0046] 化合物(I)以约2.8mg/kg的 ED_{50} 抑制由角叉菜胶诱导的爪重量增加。化合物(I)也以约3.2mg/kg的 ED_{50} 减少IL-1 β 的爪渗出液水平。相反地,在该模型中强的松龙处理以约6.6mg/kg的 ED_{50} 抑制爪重量增加,和以低于约1mg/kg的 ED_{50} 减少IL-1 β 水平(其中 ED_{50} 值表示5个单独测定值的平均值)。

[0047] 2. 血清骨钙蛋白分析

[0048] 骨损失/骨质疏松症和所导致的增多骨折风险是由于糖皮质激素治疗引起的常见和显著的不利影响。糖皮质激素诱导的骨质疏松症被认为至少部分地由于骨形成的抑制所导致。血清骨钙蛋白(骨合成的生物标志物)的测量值是评价糖皮质激素治疗对于骨的不利影响的公认工具。

[0049] 为了评价化合物(I)对于骨形成的影响,化合物(I)被配制在包含0.5%羧甲基纤维素和0.25% Tween 80的载体中,然后经由填喂法口服给药于十六周龄的雄性Swiss-Webster小鼠(Harlan Industries, Indianapolis)共7天。为了对比,强的松龙在相同的载体中口服给药。在最后的剂量给药之后的第24小时收集血清,通过采用已改进成96孔模式的竞争性放射免疫测定法来测定骨钙蛋白水平。简短地说,含有2.5 μ l小鼠血清,2.5 μ l山羊抗小鼠骨钙蛋白,0.625 μ l正常山羊血清和119.375 μ l RIA缓冲剂(0.1225M

NaCl, 0.01M NaH_2PO_4 , pH 7.4, 0.025M EDTA 四钠, 0.1% (w/v) BSA, 和 0.1% (w/v) Tween-20) 的 Multiscreen™ 板的各个孔在定轨振荡器上在 80rpm 下于 4℃ 培养 18 小时。在将在 25 μl RIA 缓冲剂中的 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{125}I] 小鼠骨钙蛋白添加到各孔中之后, 该板在定轨振荡器上在 80rpm 下于 4℃ 培养 24 小时。通过添加在 0.2M Na_2HPO_4 , pH 7.4, 5% (w/v) 聚乙二醇中的驴抗山羊 IgG (1 : 30) (125 μl /孔), 该复合物在 25℃ 下沉淀 2 小时。沉淀物通过真空过滤被收集, 然后用 100 μl /孔 dH_2O 洗涤一次。该过滤器被穿孔, 然后在 γ 粒子计数管上定量分析放射性。在过滤器上从试验样品检测的放射性与血清骨钙蛋白浓度成反比。提纯小鼠骨钙蛋白的标准曲线用来计算在试验样品中血清骨钙蛋白浓度。

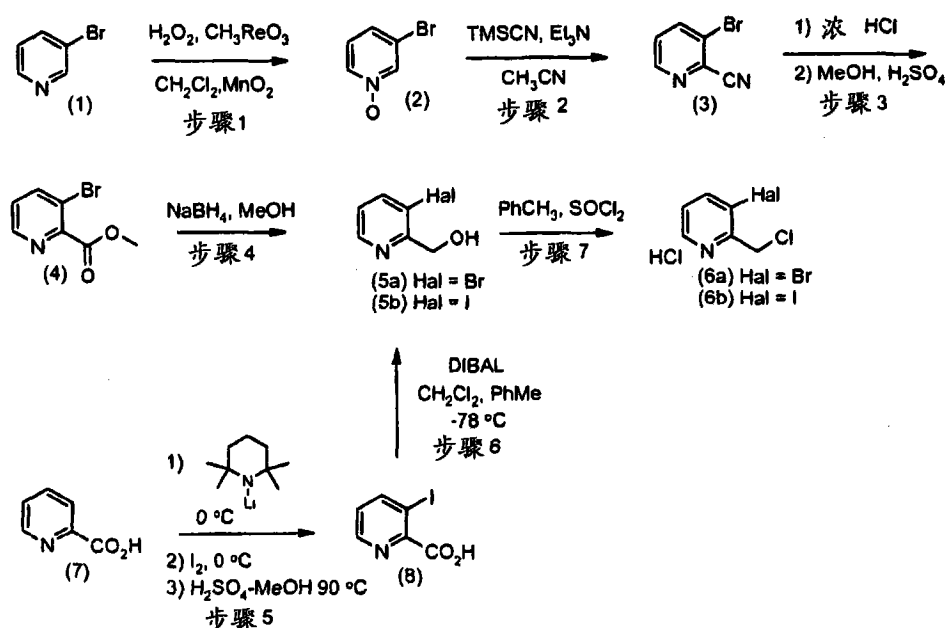
[0050] 通过对比接近在大鼠 CPE 模型中测定的 ED_{50} 值的每日剂量 (对于化合物 (I) 是 3mg/Kg/天和对于强的松龙则是 10mg/Kg/天), 与强的松龙相比化合物 (I) 诱导的血清骨钙蛋白水平的减少更低。

[0051] 制备化合物 (I) 的方法是现有技术中已知的。例如, WO 04/052847 提供可以使用的一般程序。此外, WO 05/066161 提供可以使用的附加一般程序。下面的反应路线, 中间体和实施例进一步举例说明本发明和代表了化合物 (I) 的典型合成方法。试剂和起始原料是本领域中的普通技术人员容易获得的或容易合成的。需要理解的是, 反应路线, 中间体和实施例是仅仅为了举例说明而阐述但没有限制意义, 并且本领域中的普通技术人员可以作改进。本发明的化合物的名称一般从 ChemDrawUltra™, 7.0.1 版本获得。

[0052] 在这里使用的“DMSO”指二甲亚砜; “DIAD”指偶氮二羧酸二异丙酯; “ADDP”指 1, 1'-(偶氮二羰基)二哌啶; “THF”指四氢呋喃; “DMF”指二甲基甲酰胺; “TMSCN”指三甲基甲硅烷基氰化物; “TEA”或“ Et_3N ”指三乙基胺; “DME”指 1,2-二甲氧基乙烷; “AcOEt”指乙酸乙酯; “pyr”指吡啶; “ MsCl ”指甲磺酰氯; “ Et_2NH ”指二乙基胺; “MeOH”指甲醇; “ PhCH_3 ”指甲苯; “PhH”指苯; “ PBU_3 ”指三丁基膦; “ PPh_3 ”指三苯膦; “dppf”指 1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁; “NaO-t-Bu”指叔丁醇钠;

[0053] 反应路线 I

[0054]



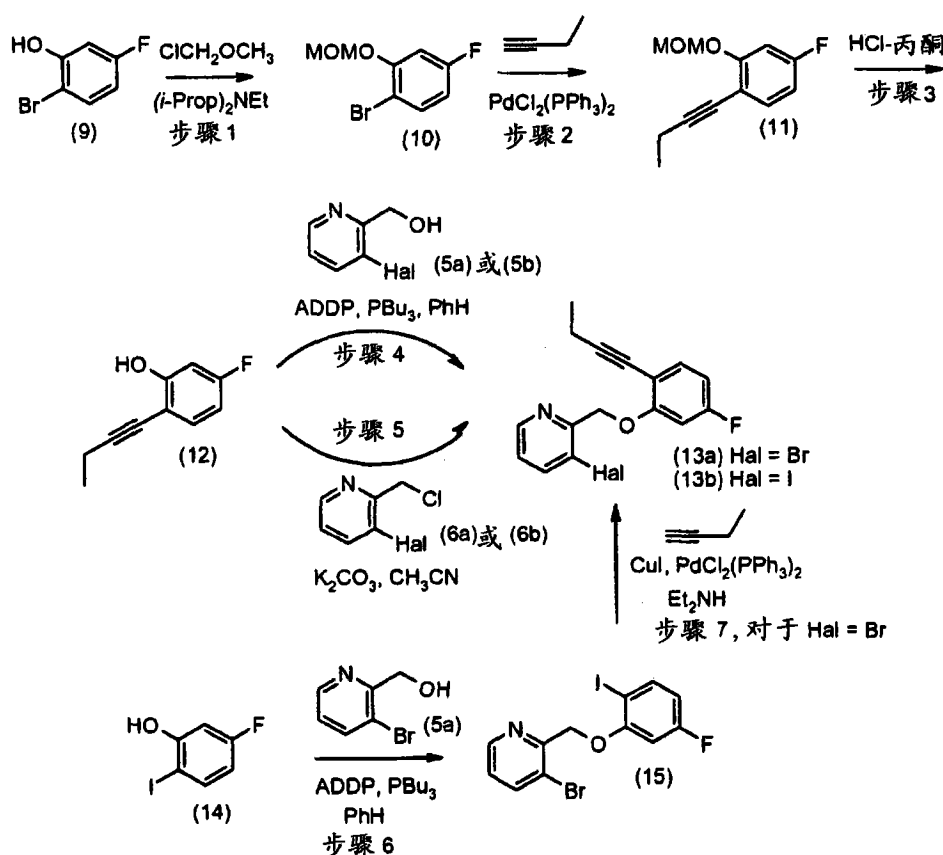
[0055] 在反应路线 I 中描述了吡啶中间体 (5) 和 (6) 的制备方法。在反应路线 I 步骤 1 中, 3- 溴吡啶 (1) 被氧化成 3- 溴 - 吡啶 -N- 氧化物 (2)。在反应路线 I 步骤 2 中, 氰化物加成得到 3- 溴 - 吡啶 -2- 腈 (3)。通式 (3) 的腈被水解成羧酸, 然后用酸催化被酯化成通式 (4) 的酯。在反应路线 I 步骤 4 中, 该酯通过使用硼氢化钠被还原成通式 (5a) 的吡啶基甲醇。

[0056] 按照反应路线 I 步骤 5 中所示, 通过形成吡啶甲酸 (7) 的二阴离子, 随后用碘进行亲电淬灭得到 3- 碘吡啶甲酸 (8), 来获得其中 Hal = I 的通式 (5b) 的吡啶基甲醇。在步骤 6 中, 通式 (8) 的酸通过使用二异丁基氢化铝还原, 得到通式 (5b) 的吡啶基甲醇。

[0057] 在反应路线 I 步骤 7 中, 通式 (5a, b) 的醇通过使用亚硫酸氯被转化成通式 (6a, b) 的吡啶基甲基氯。

[0058] 反应路线 II

[0059]



[0060] 在反应路线 II 中描述了合成关键中间体 (13a, b) 的各种方法。在反应路线 II 步骤 1 中, 5- 氟 -3- 溴 - 苯酚 (9) 被保护, 得到通式 (10) 的甲氧基甲基 (MOM) 醚。在反应路线 II 步骤 2 中, 在通式 (10) 的受保护的溴苯酚与 1- 丁炔之间的 Sonagashira 偶合得到通式 (11) 的芳基炔烃。该反应能够用二乙基胺或三乙胺进行。芳基溴在升高的温度下 (70°C) 下偶合, 芳基碘在室温下偶合。按照在反应路线 I 步骤 3 中所示, 通过使用 HCl - 丙酮将该酚去保护, 得到通式 (12) 的酚。或者, 该酚作为 THP 醚加以保护, 并通过使用在甲醇中的对甲苯磺酸吡啶鎓 (PPTS) 进行去保护, 得到通式 (12) 的酚。

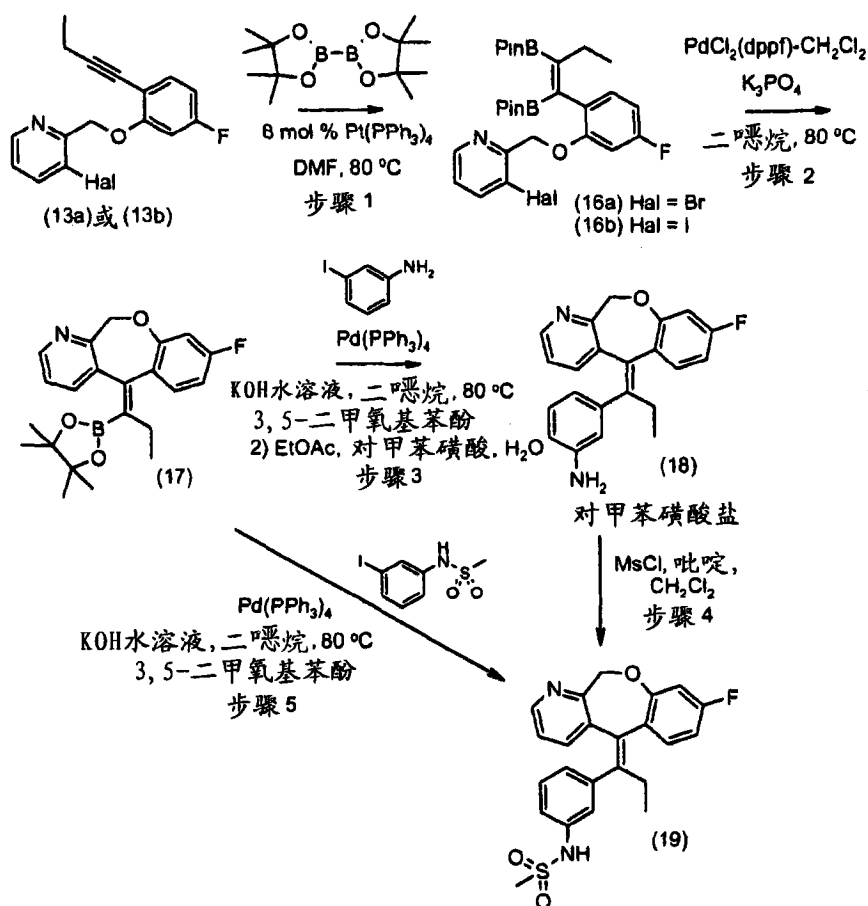
[0061] 在反应路线 II 步骤 4 中, 在通式 (12) 的炔基苯酚与通式 (5) 或 (5b) 的吡啶基甲醇之间的 Mitsunobu 反应得到通式 (13a, b) 的卤吡啶基芳基炔烃。其它合适的试剂包括在

THF 中的 DIAD 和三苯基膦。或者,在步骤 5 中,通过使用在乙腈中的碳酸钾,由通式 (12) 的酚与通式 (6a) 或 (6b) 的吡啶甲基氯的烷基化获得通式 (13a, b) 的卤吡啶基芳基炔烃。

[0062] 获得通式 (13a) 的溴吡啶基芳基炔烃的另一个途径示于步骤 6 和 7 中。在反应路线 II 步骤 6 中,5-氟-2-碘苯酚 (Morice, C. 等人, Tetrahedron Lett. 2001, 42, 6499-6502) 在 Mitsunobu 反应中与通式 (5a) 的吡啶基甲醇偶合,得到通式 (15) 的碘芳基醚。在反应路线 II 步骤 7 中,碘芳基醚与 1-丁炔发生 Sonagashira 偶合,得到通式 (13a) 的卤吡啶基芳基炔烃。

[0063] 反应路线 III

[0064]

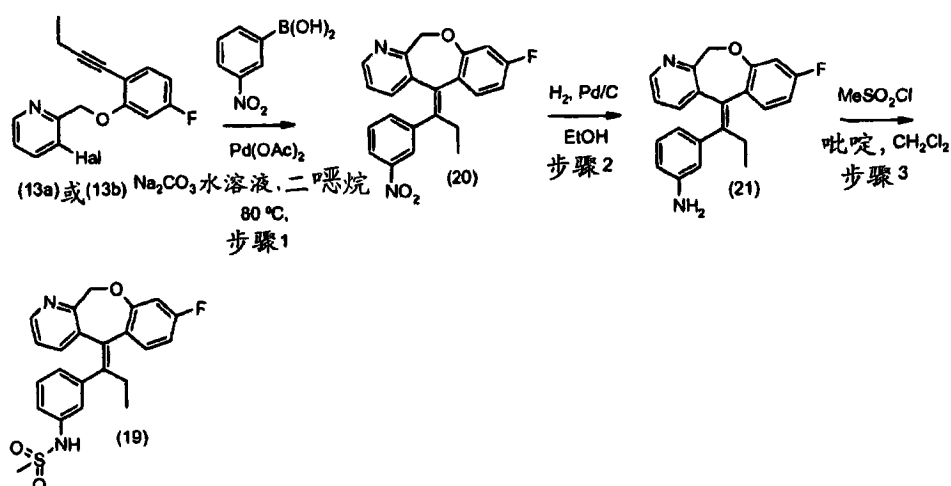


[0065] 在反应路线 III 步骤 1 和 2 中,通式 (13a, b) 的卤吡啶基芳基炔烃的铂催化二溴化产生通式 (16a, b) 的二硼酸,后者在稀释条件 (约 0.01M) 下通过分子内 Suzuki 偶合之后形成通式 (17) 的乙烯基硼酸。需要指出的是,二硼酸化对于其中 Hal = Br 的化合物 (13a) 是最佳的。

[0066] 在反应路线 III 步骤 3 中,在乙烯基硼酸 (17) 与 3-碘苯胺之间的分子间 Suzuki 偶合反应获得通式 (18) 的苯胺苯并吡啶基-10-氧杂 **萘**。在步骤 4 中,通式 (18) 的苯胺用甲烷磺酰氯进行磺酰化,得到通式 (19) 的最终苯并吡啶基-10-氧杂 **萘**。或者,在反应路线 III 步骤 5 中,通式 (19) 的苯并吡啶基-10-氧杂 **萘** 直接通过进行与 N-(3-碘-苯基)-甲烷磺酰胺之间的 Suzuki 偶合来获得。

[0067] 反应路线 IV

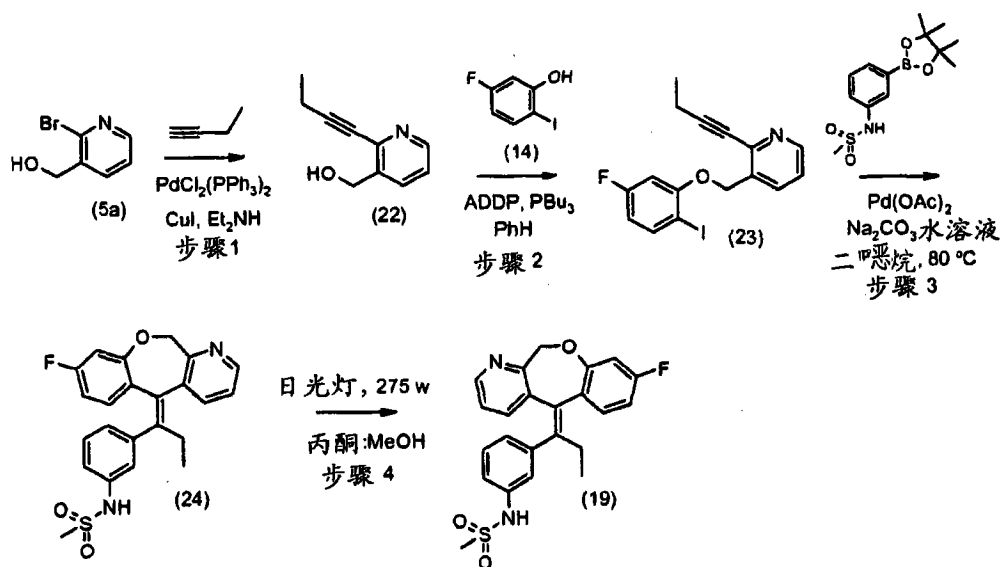
[0068]



[0069] 在反应路线 IV 中示出的是获得通式 (19) 的苯并吡啶基-10-氧杂 **革** 的又一种方法。在反应路线 IV 步骤 1 中, 进行通式 (13a, b) 的卤吡啶基芳基炔烃与 3-硝基苯硼酸的顺序分子内 Heck 和 Suzuki 反应, 得到通式 (20) 的硝基苯基苯并吡啶基氧杂 **革**。当进行硼酸的缓慢加成以得到其中 Hal = I 的芳基炔烃时, 改进了产率。本领域中的那些技术人员可以认识到, 在步骤 2-3 中化合物 (19) 通过如下来衍生: 通式 (20) 的硝基类似物被还原, 得到通式 (21) 的苯胺, 随后磺酰化。

[0070] 反应路线 V

[0071]

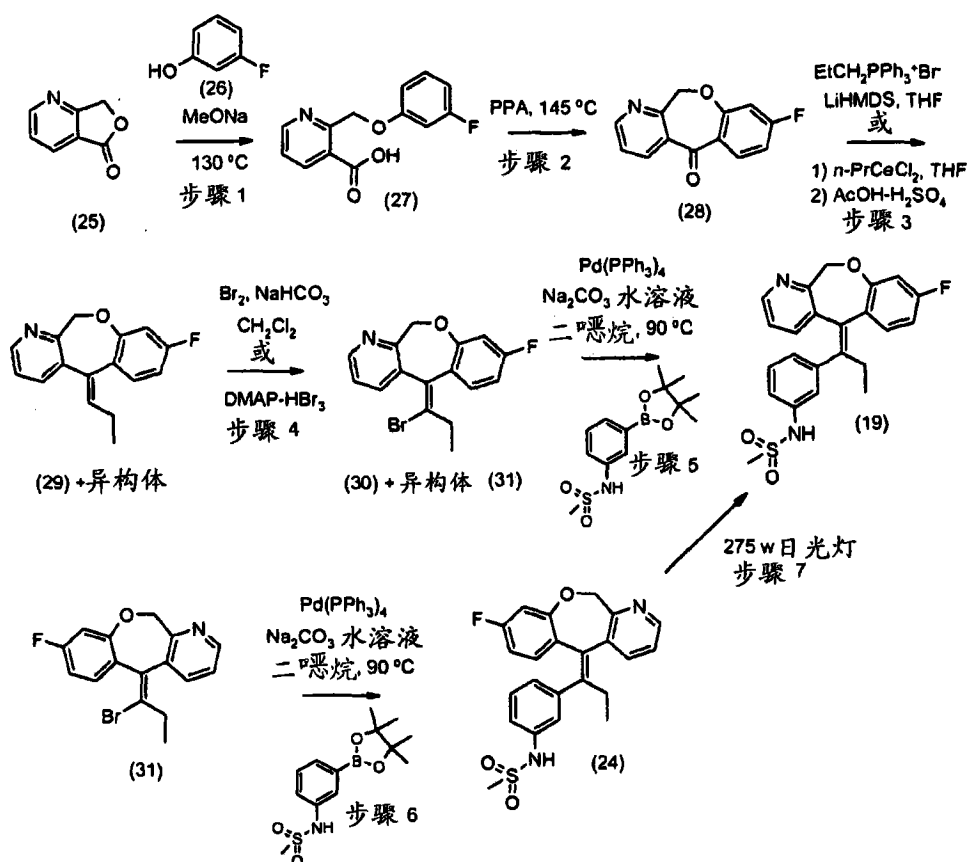


[0072] 在反应路线 V 步骤 1 中, 按照与反应路线 2 步骤 2 中类似的方式, 在通式 (5a) 的 2-溴吡啶和 1-丁炔之间进行 Sonagashira 偶合, 得到通式 (22) 的炔基吡啶基甲基醇。在反应路线 V 步骤 2 中, 在通式 (22) 的吡啶基甲基醇与通式 (14) 的 5-氟-2-碘苯酚之间的 Mitsunobu 反应得到通式 (23) 的吡啶。在步骤 3 中, 进行分子内 Heck 反应, 随后进行与 N-[3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-苯基]-甲烷磺酰胺之间的 Suzuki 交叉偶联, 获得通式 (24) 的苯并吡啶基-11-氧杂 **革**, 它随后光异构化得到通式

(19) 的苯并吡啶基-10-氧杂 **革**。

[0073] 反应路线 VI

[0074]

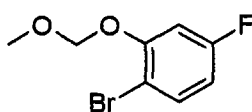


[0075] 在反应路线 VI 步骤 1 中, 通式 (25) 的内酯与通式 (26) 的卤酚的钠盐进行反应, 获得通式 (27) 的酸。在反应路线 VI 步骤 2 中, 与通式 (27) 的苯甲酸进行弗瑞德-克来福特反应, 得到通式 (28) 的苯并吡啶基氧杂环庚烷酮。在反应路线 IV 步骤 3 中, 通式 (28) 的酮经由维蒂希 (Wittig) 烯炔化作用或烷基铈加成 / 脱水序列被转化成为几何异构体的混合物形式的通式 (29) 的链烯基苯并吡啶基氧杂 **革**。在步骤 4 中, 通式 (29) 的链烯基苯并吡啶基氧杂 **革** 和它的异构体与溴或 4-(二甲基氨基) 吡啶鎓三溴化合物进行反应, 得到通式 (30) 和 (31) 的几何异构的乙烯基溴。该乙烯基溴被分离, 和按照在步骤 5 和 6 中所示, 通过在典型的条件下与 N-[3-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2] 二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-苯基]-甲烷磺酰胺进行 Suzuki 交叉偶联, 被转化成它们各自的磺酰胺 (19) 或 (24)。通式 (24) 的磺酰胺在反应路线 VI 步骤 7 中光异构化成通式 (19) 的苯并吡啶基-10-氧杂 **革**。

[0076] 中间体 1

[0077] 1-溴-4-氟-2-甲氧基甲氧基-苯

[0078]



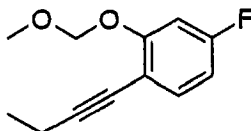
[0079] 将 2-溴-5-氟苯酚 (30g, 0.16mol) 溶于二氯甲烷 (170mL) 中和冷却到 0 °C。利

用注射器向该溶液中添加二异丙基乙胺 (36mL, 0.20mol), 然后经由加料漏斗添加氯甲基甲基醚 (16mL, 0.20mol)。该溶液进行搅拌和升温至室温。在 2 小时后, 混合物用饱和 NH_4Cl 水溶液, 水和盐水洗涤。有机部分在 MgSO_4 上干燥, 过滤, 和在减压下浓缩。所得残留物由快速色层分离法 (**Biotage®** Si65M, 20% AcOEt /己烷) 提纯, 得到 26.1g (71%) 的标题化合物, 为澄明的无色油。 ^1H NMR 400MHz (CDCl_3) 7.46–7.53 (m, 1H), 6.92–6.99 (m, 1H), 6.63–6.70 (m, 1H), 5.26 (s, 2H), 3.55 (s, ^3H)。

[0080] 中间体 2

[0081] 1-丁-1-炔基-4-氟-2-甲氧基甲氧基-苯

[0082]

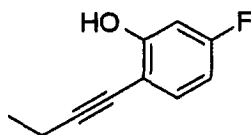


[0083] 将 1-溴-4-氟-2-甲氧基甲氧基-苯 (7.6g, 32mmol) 加入到耐压烧瓶中, 溶于二乙基胺 (65mL) 中, 然后用氮气脱气 15 分钟。过量的丁炔经过鼓泡通入到该溶液中, 添加 CuI (1.9g, 10mmol) 和 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (2.3g, 3.3mmol), 然后该烧瓶被加热至 70°C 保持 44 小时。混合物用乙醚稀释, 然后用饱和 NH_4Cl 水溶液和盐水洗涤。有机部分在 MgSO_4 上干燥, 过滤, 和在减压下浓缩。所得残留物由快速色层分离法提纯 (**Biotage®** Si65M, 3% THF/己烷), 得到 6.12g (91%) 的标题化合物, 为桔黄色固体。GCMS m/e 208 $[\text{M}]^+$ 。

[0084] 中间体 3

[0085] 2-丁-1-炔基-5-氟-苯酚

[0086]

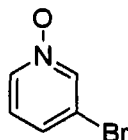


[0087] 将 1-丁-1-炔基-4-氟-2-甲氧基甲氧基-苯 (6.1g, 29mmol) 溶于 250mL 的由浓 HCl 在丙酮中形成的 10% 溶液中。溶液在室温下搅拌 5 小时。反应用乙醚稀释, 然后用饱和 NaHCO_3 水溶液和盐水洗涤。有机部分在 MgSO_4 上干燥, 过滤, 和在减压下浓缩。所得残留物由快速色层分离法 (**Biotage®** Si65M, 5% AcOEt /己烷) 提纯, 得到 3.52g (73%) 的标题化合物, 为橙色油。GCMS m/e 164 $[\text{M}]^+$ 。

[0088] 中间体 4

[0089] 3-溴-吡啶 1-氧化物

[0090]



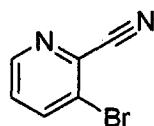
[0091] 将甲基三氧化铈 (100mg, 0.401mmol) 溶于二氯甲烷 (40mL) 中, 添加 3-溴吡啶 (15.8g, 100mmol), 随后添加 30% 的 H_2O_2 水溶液 (22.7mL)。双相混合物在室温下搅拌。在 18 小时之后, 添加 MnO_2 (25mg, 0.29mmol), 混合物在室温下搅拌 2 小时。混合物用二氯甲烷萃取, 合并的萃取液用盐水洗涤, 在 MgSO_4 上干燥, 过滤, 和在减压下浓缩, 得到 9.52g (55%)

的标题化合物,为橙色油。GCMS m/e 174 $[M-H]^-$ 。

[0092] 中间体 5

[0093] 3-溴-吡啶-2-甲腈

[0094]

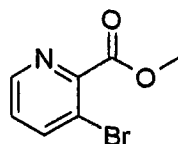


[0095] 将 3-溴-吡啶-1-氧化物 (9.4g, 54mmol) 溶于乙腈 (60mL) 中,添加三乙胺 (15mL), 随后添加三甲基甲硅烷基氰化物 (21.7mL, 163mmol)。混合物被加热至 100℃, 然后搅拌 16 小时。混合物被冷却到 0℃, 倾倒在 250mL 的 5M NaOH 水溶液中, 然后用二氯甲烷萃取。合并的萃取液用盐水洗涤, 在 $MgSO_4$ 上干燥, 过滤, 和在减压下浓缩。所得物质通过使用快速色谱分离法 (**Biotage®** Si65M, 20% AcOEt/ 己烷) 提纯, 得到 7.8g (79%) 的标题化合物, 为黄色固体。GCMS m/e 182 $[M-H]^-$ 。

[0096] 中间体 6

[0097] 3-溴-吡啶-2-甲酸甲酯

[0098]

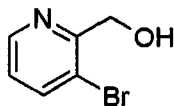


[0099] 将 3-溴-吡啶-2-甲腈 (14.7g, 80.3mmol) 溶于浓 HCl (50mL) 中, 然后被加热到 110℃ 保持 18 小时。混合物被冷却到 0℃, 过滤, 用少量的乙醚漂洗, 和在烘箱中在减压下干燥。将所得棕色固体溶于甲醇 (80mL) 中, 滴加浓 H_2SO_4 (6.6mL), 然后溶液被加热至 90℃ 保持 16 小时。在减压下除去甲醇, 添加饱和碳酸氢钠水溶液获得碱性 pH, 然后混合物用 AcOEt 萃取。合并的萃取液用盐水洗涤, 在 $MgSO_4$ 上干燥, 过滤, 和在减压下浓缩, 得到 12.8g (74%) 的标题化合物, 为白色固体。GCMS m/e 215 $[M-H]^-$ 。

[0100] 中间体 7

[0101] (3-溴-吡啶-2-基)-甲醇

[0102]

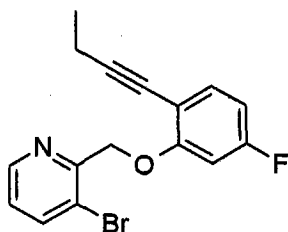


[0103] 将 3-溴-吡啶-2-甲酸甲酯 (12.8g, 59.2mmol) 溶于甲醇 (150mL) 中和冷却到 0℃。将 $NaBH_4$ (11.2g, 296mmol) 以 1.0g 的每份添加到该混合物中。混合物升温至室温, 然后搅拌 3 小时。在减压下除去甲醇, 添加 AcOEt, 溶液用饱和氯化铵水溶液和盐水洗涤。有机部分在 $MgSO_4$ 上干燥, 过滤, 和在减压下浓缩, 得到 6.8g (62%) 的标题化合物, 为白色固体。GCMS m/e 187 $[M-H]^-$ 。

[0104] 中间体 8

[0105] 3-溴-2-(2-(2-丁-1-炔基-5-氟-苯氧基甲基))-吡啶

[0106]



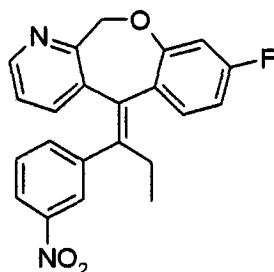
[0107] 将由 (3-溴-吡啶-2-基)-甲醇 (3.09g, 16.43mmol), 2-丁-1-炔基-5-氟-苯酚 (2.70g, 16.43mmol), 和三苯基膦 (6.46g, 24.64mmol) 在二氯甲烷 (162mL) 中形成的溶液冷却到 -5°C 至 0°C 。经过 15 分钟的时间将偶氮二羧酸二异丙酯 (DIAD) (4.85mL, 24.64mmol) 滴加进去。在 1 小时之后, 溶剂被蒸发, 粗物质直接用快速色层分离法 (SiO_2 ; 4% 己烷: AcOEt) 提纯, 得到 3.5g (64%) 的标题化合物。LCMS m/e 334 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0108] 中间体 9

[0109] 8-氟-5-[1-(3-硝基-苯基)-丙亚基]-5,11-二氢-10-

[0110] 氧杂-1-氮杂-二苯并[a,d]环庚烯

[0111]

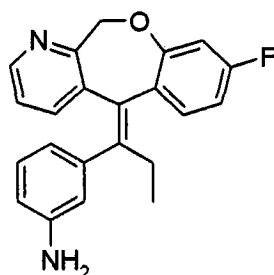


[0112] 将 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.18g, 5%) 和邻甲基膦 (0.32g, 1.05mmol) 添加到由 3-溴-2-(2-(2-丁-1-炔基-5-氟-苯氧基甲基)-吡啶) (3.50g, 10.5mmol), 碳酸钠 (3.39g, 31.5mmol) 和 3-硝基苯硼酸 (2.27g, 13.6mmol) 在 4:1 的二噁烷水 (101mL) 中形成的溶液中。将氮气鼓泡通入到混合物中达 15 分钟, 然后反应在 75°C 下搅拌一夜。混合物被冷却到室温, 固体物经由 **Celite®** 过滤出来。添加水和 AcOEt, 两相被淹析。水层用 AcOEt 萃取, 合并的有机层在硫酸镁上干燥, 过滤和在减压下浓缩。所得残留物由快速色层分离法提纯 (SiO_2 , 20% AcOEt: 己烷), 获得 1.49g (38%) 的标题化合物。LCMS m/e 377 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0113] 中间体 10

[0114] 3-[1-(8-氟-11H-10-氧杂-1-氮杂-二苯并[a,d]环庚烯-5-亚基)-丙基]-苯胺。

[0115]



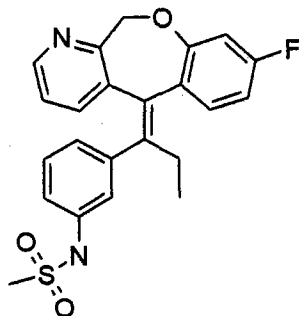
[0116] 将 8-氟-5-[1-(3-硝基-苯基)-丙亚基]-5,11-二氢-10-氧杂-1-氮杂-二苯并[a,d]环庚烯 (1.49g, 3.96mmol) 溶于乙醇 (20mL) 中, 然后用氮气吹扫。添加 Pd/C (0.15g,

10%), 混合物在 1 大气压的氢气中被氢化 2 小时。混合物用氮气吹扫, 经由 **Celite®** 过滤, 固体物用乙醇洗涤。滤液在减压下浓缩, 获得 1.37g (99%) 的标题化合物。LCMS m/e 347 $[M+H]^+$ 。

[0117] 实施例 1

[0118] N-{3-[1-(8-氟-11H-10-氧杂-1-氮杂-二苯并[a, d]环庚烯-5-亚基)-丙基]-苯基}-甲烷磺酰胺

[0119]



[0120] 在 0°C 下将甲烷磺酰氯 (0.34mL, 4.36mmol) 滴加到由 3-[1-(8-氟-11H-10-氧杂-1-氮杂-二苯并[a, d]环庚烯-5-亚基)-丙基]-苯胺 (1.37g, 3.96 mmol) 和吡啶 (0.35mL, 4.36mmol) 在二氯甲烷 (10mL) 中形成的溶液中。在 2 小时后, 添加 7% 碳酸氢钠水溶液 (20mL), 混合物搅拌 30 分钟, 淬析, 和分离两层。水相用二氯甲烷 (2×20mL) 洗涤。有机相被收集和用盐水洗涤, 在硫酸钠上干燥, 过滤和在减压下浓缩, 获得 1.98g 的粗产物。所得物质由快速色层分离法提纯, 其中使用 **Biotage®** 和用己烷: 乙醇 (9 : 1) 洗脱, 从而获得 1.35g (80%) 的标题化合物。LCMS m/e 425 $[M+H]^+$ 。