

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02823976.8

[51] Int. Cl.

C07D 211/18 (2006.01)

A61K 31/4409 (2006.01)

C07D 295/12 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年1月24日

[11] 授权公告号 CN 1296356C

[22] 申请日 2002.11.20 [21] 申请号 02823976.8

[30] 优先权

[32] 2001.11.30 [33] US [31] 60/334,819

[86] 国际申请 PCT/EP2002/012997 2002.11.20

[87] 国际公布 WO2003/045917 英 2003.6.5

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.31

[73] 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 黛西·乔·杜波依斯 王北汉

[56] 参考文献

CN1281438A 2001.1.24 C07D213/74

JP5092921A 1993.4.16 A61K31/40

WO0035452A 2000.6.22 A61K31/445

审查员 田丁丁

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王旭

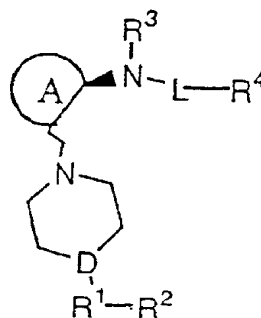
权利要求书 4 页 说明书 44 页

[54] 发明名称

CCR-3 受体拮抗剂 VII

[57] 摘要

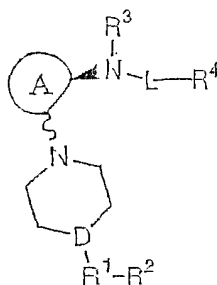
本发明涉及式 (I) 的化合物, 其中 $R^1 - R^4$ 、A、D 和 L 如说明书中所定义。该化合物用作 CCR-3 受体拮抗剂, 因此, 可以用于治疗 CCR-3 介导的疾病。



(I)

1. 式(I)的化合物:

5



10

(I)

其中:

R^1 为(C₁-C₂)亚烷基;

R^2 为被一个、或两个取代基取代的苯环, 所述取代基选自 C₁₋₆ 烷基, C₁₋₆ 烷氧基, 卤代 C₁₋₆ 烷基或卤素;

15

R^3 为氢, C₁₋₆ 烷基, 酰基, 芳基, 或芳基 C₁₋₆ 烷基;

环 A 为环戊基;

D 为 N 或 C-R^b;

L 为 -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=O)N(R^a)-, -C(=S)N(R^a)-, -SO₂N(R^a)-, -C(=O)O-, -C(=S)O-;

20

R^4 为 C₁₋₆ 烷基, C₃₋₇ 环烷基, C₂₋₆ 烯基, C₂₋₆ 炔基, 杂烷基或酰基 C₁₋₆ 烷基;

R^a 为氢, C₁₋₆ 烷基, 酰基, 芳基, 芳基 C₁₋₆ 烷基, C₁₋₆ 烷氧羰基, 或苄氧羰基; 和

R^b 为氢或 C₁₋₆ 烷基;

25

条件是不包括 N-(4-((4-(2-乙酰氨基-4-氟苯基)哌嗪-1-基)甲基)苯基甲基)乙酰胺, N-(3,4-二甲氧基苯基乙基)-N'-(2-乙酰氨基苯基)-哌嗪, N-[2-(4-苯甲基哌嗪-1-基)苯基]甲磺酰胺和 N-苯甲基-N'-(2-乙酰氨基苯基)-哌嗪,

30

及式(I)化合物中羟基官能团的酯类或氨基甲酸酯类、单独立体异构体、立体异构体的外消旋和非-外消旋混合物、和药用盐,

其中:

“酰基”是指-C(O)R 基, 其中 R 是氢, C₁₋₆ 烷基, C₃₋₇ 环烷基, C₃₋₇ 环烷基 C₁₋₆ 烷基, 苯基或苯基 C₁₋₆ 烷基;

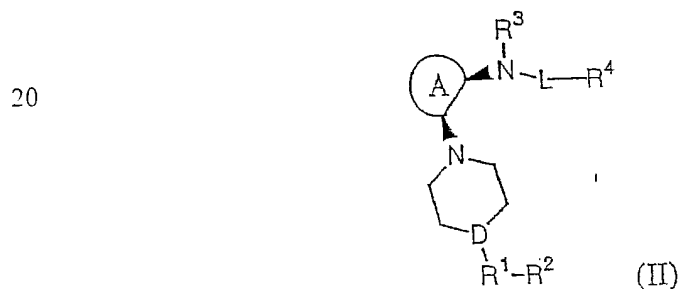
“酰基 C₁₋₆ 烷基”是指 -C₁₋₆ 亚烷基 -C(O)R 基, 其中 R 为氢, C₁₋₆ 烷基, 卤代 C₁₋₆ 烷基, C₃₋₇ 环烷基, C₃₋₇ 环烷基 -C₁₋₆ 烷基, 任选取代的苯基, 苯甲基, 羟基, C₁₋₆ 烷氧基, 氨基, 单 C₁₋₆ 烷基氨基或二 C₁₋₆ 烷基氨基;

“任选取代的苯基”指被一个或多个取代基任选取代的苯基, 所述
5 取代基选自 C₁₋₆ 烷基, 卤代 C₁₋₆ 烷基, 羟基 C₁₋₆ 烷基, 杂烷基, 酰基, 酰氨基, 氨基, C₁₋₆ 烷基氨基, 二 C₁₋₆ 烷基氨基, C₁₋₆ 烷基亚磺酰基, C₁₋₆ 烷氧基, 卤代 C₁₋₆ 烷氧基, C₁₋₆ 烷氧羰基, 氨基甲酰基, 羟基, 卤素, 亚甲二氧基或亚乙二氧基;

“芳基”是指 6-10 个环原子的单环或双环芳香烃基, 其任选地被一个
10 个或多个取代基取代, 这些取代基选自 C₁₋₆ 烷基, 卤代 C₁₋₆ 烷基, 羟基 C₁₋₆ 烷基, 杂烷基, 酰基, 酰氨基, 氨基, C₁₋₆ 烷基氨基, 二 C₁₋₆ 烷基氨基, C₁₋₆ 烷基亚磺酰基, C₁₋₆ 烷氧基, 卤代 C₁₋₆ 烷氧基, C₁₋₆ 烷氧羰基, 氨基甲酰基, 羟基, 卤素, 亚甲二氧基或亚乙二氧基;

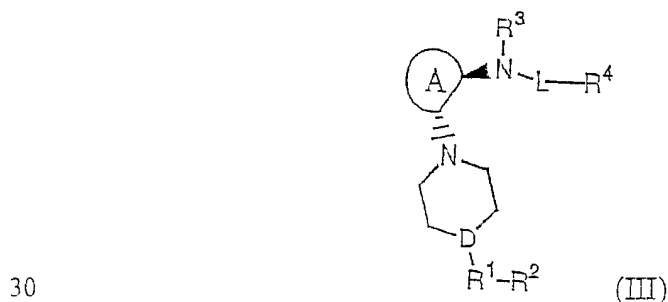
“杂烷基”是指其中一个, 两个或三个氢原子被独立地选自 -OR^a 和
15 NR^bR^c 的取代基取代的烷基, 条件是杂烷基的连接点是通过碳原子, 其中 R^a 是氢, 酰基, C₁₋₆ 烷基, C₃₋₇ 环烷基或 C₃₋₇ 环烷基 C₁₋₆ 烷基; R^b 和 R^c 彼此独立地是氢, 酰基, C₁₋₆ 烷基, C₃₋₇ 环烷基或 C₃₋₇ 环烷基 C₁₋₆ 烷基。

2. 按照权利要求 1 的化合物, 其为式(II)的化合物:



其中 R¹-R⁴, A, D 和 L 如权利要求 1 中所定义。

25 3. 按照权利要求 1 的化合物, 其为式(III)的化合物:



其中 R^1 - R^4 , A, D 和 L 如权利要求 1 中所定义。

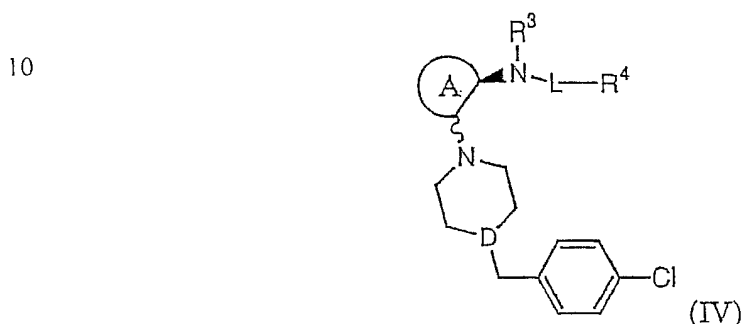
4. 按照权利要求 1-3 中任何一项的化合物, 其中 R^1 为亚甲基。

5. 按照权利要求 1-3 中任何一项的化合物, 其中 R^2 为 4-氯苯基或 3,4-二氯苯基。

6. 按照权利要求 1-3 中任何一项的化合物, 其中 R^3 为氢。

7. 按照权利要求 1-3 中任何一项的化合物, 其中 L 为 $-C(=O)-$, $-C(=O)N(R^a)-$, $-C(=S)N(R^a)-$, 或 $-C(=O)O-$ 。

8. 按照权利要求 1 的化合物, 其是式(IV)的化合物:



15

其中 R^3 - R^4 , A, D 和 L 如权利要求 1 中所定义。

9. 按照权利要求 1-8 中任何一项的化合物, 其中 R^4 为环己基, 烯丙基, 异丙基, n-丁基, 或 2-(乙氧羰基)乙基。

10. 按照权利要求 1 的化合物, 其是:

20 环己烷羧酸{(1R,2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-酰胺;

{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-3-环己基-脲;

1-烯丙基-3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲;

1-{(1R,2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-3-异丙基-脲;

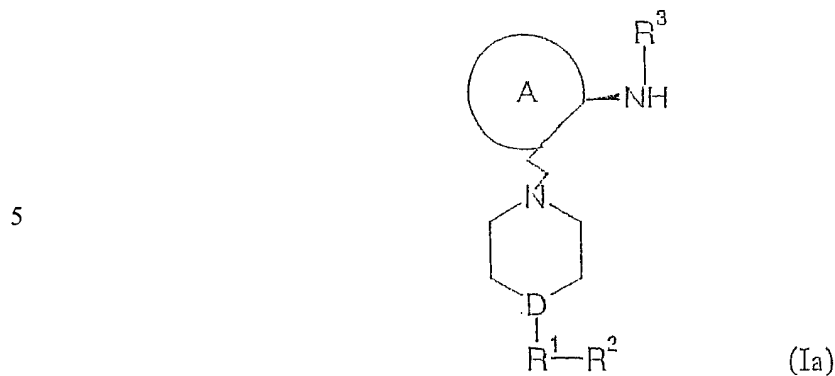
1-丁基-3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲;

25 3-(3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲基)-丙酸乙酯;

或其盐。

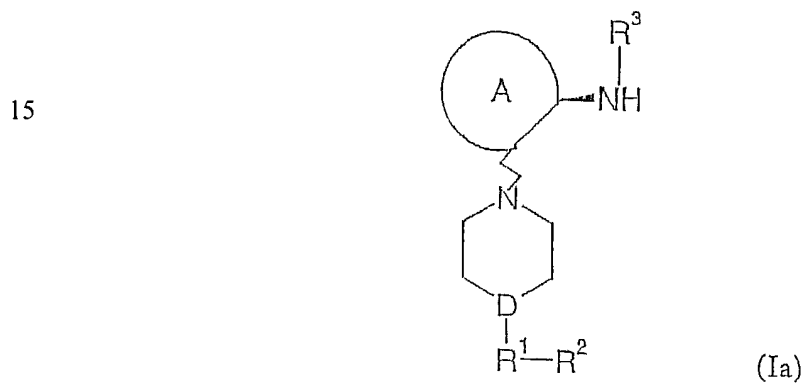
11. 制备按照权利要求 1 的式(I)化合物的方法, 其中 L 为 $-C(=O)NR^a-$, R^a 为氢,

30 包括将式(Ia)的化合物



与式： $R^4-N=C=O$ 的异氰酸酯反应，其中 R^1-R^4 ，A 和 D 如权利要求
10 1 中所定义。

12. 制备按照权利要求 1 的式(I)化合物的方法，其中 L 为 $-C(=O)-$ ，
包括将式(Ia)的化合物



20 与式： $R^4-C(=O)OH$ 的化合物反应，其中 R^1-R^4 ，A 和 D 如权利要求
1 中所定义。

13. 一种组合物，其含有权利要求 1-10 中任何一项的化合物或其盐
以及赋形剂。

25 14. 权利要求 1-10 中任何一项的式(I)化合物或其盐在制备用于治疗
CCR-3 受体拮抗剂可治疗的疾病的 药物中的用途。

15. 按照权利要求 14 的用途，其中所述疾病是哮喘。

CCR-3 受体拮抗剂 VII

5

本发明涉及 CCR-3 受体拮抗剂，含有该拮抗剂的药物组合物，它们用于治疗 CCR-3 介导的疾病，例如哮喘的用途，以及其制备方法。

组织嗜曙红细胞增多是许多病理状态例如哮喘，鼻炎，湿疹和寄生虫传染病的特征(参阅Bousquet, J.等, N. Eng. J. Med. 323: 1033-1039(1990)和Kay, A. B.和Corrigan, C. J., Br. Med. Bull. 48:51-64(1992))。哮喘时，嗜曙红细胞的积聚和活化与支气管上皮损伤及缩肌介体的过度响应有关。已经了解趋化因子如 RANTES, eotaxin 和 MCP-3 活化嗜曙红细胞((参阅Baggiolini, M.和 Dahinden, C.A., Immunol. Today.15:127-133(1994), Rot, A.M.等, J. Exp. Med.176, 1489-1495(1992)和 Ponath, P.D.等, J. Clin. Invest., 97卷, #3, 604-612(1996))。然而，与也诱导其他类型白血球细胞迁移的 RANTES 和 MCP-3 不同，eotaxin 选择性地对嗜曙红细胞有趋化性(参阅Griffith-Johnson, D. A.等, Biochem. Biophy. Res. Commun. 197:1167(1993)和 Jose, P. J.等, Biochem. Biophy. Res. Commun. 207, 788 (1994))。无论通过皮下或腹膜内注射或气雾剂吸入，在 eotaxin 给药位置观察到特异的嗜曙红细胞的积聚。(参阅Griffith-Johnson, D.A.等, Biochem. Biophy. Res. Commun. 197:1167(1993); Jose, P.J.等, J. Exp. Med. 179, 881-887(1994); Rothenberg, M.E.等, J. Exp. Med. 181, 1211(1995)及Ponath, P.D., J. Clin. Invest., 97卷, #3, 604-612(1996))。

已使用糖肾上腺皮质激素如地塞米松，甲脱氢皮甾醇和氢化可的松治疗很多嗜曙红细胞相关的疾病，包括支气管哮喘(R.P.Schleimer 等, Am.Rev.Respir.Dis., 141, 559(1990))。认为糖肾上腺皮质激素抑制这些疾病中生存的 IL-5, IL-3 介导的嗜曙红细胞。然而，延长使用糖肾上腺皮质激素能导致副作用，如患者中的青光眼，骨质疏松症和生长延迟(参阅Hanania, N.A.等, J.Allergy 和 Clin.Immunol., 96 卷, 571-579(1995)和 Saha, M.T.等, Acta Paediatrica, 86 卷, #2, 138-142(1997))。因此，需要有一种备

选的方法来治疗嗜曙红细胞相关的疾病，而不引起那些不受欢迎的副作用。

最近，CCR-3受体被鉴定为嗜曙红细胞用于它们对eotaxin、RANTES和MCP-3的响应的主要趋化因子受体。当被感染鼠前-β淋巴瘤系时，

5 CCR-3与eotaxin, RANTES和MCP-3结合并使得这些细胞对eotaxin, RANTES和MCP-3趋化响应(参阅 Ponath, P.D.等, J. Exp. Med. 183, 2437-2448(1996))。CCR-3受体在嗜曙红细胞, T-细胞(亚型Th-2), 嗜碱细胞和柱状细胞表面上表达并对eotaxin有高选择性。研究已经表明用抗-CCR-3 mAb对嗜曙红细胞预处理能完全抑制嗜曙红细胞对eotaxin,

10 RANTES和MCP-3的趋化现象(参阅Heath, H.等, J. Clin. Invest., 99卷, #2, 178-184(1997))。申请人的已授权的美国专利6,140,344和6,166,015以及公开的EP申请EP903349(其在1999年3月24日公开), 公开了抑制通过趋化因子如eotaxin的嗜曙红细胞募集的CCR-3拮抗剂。

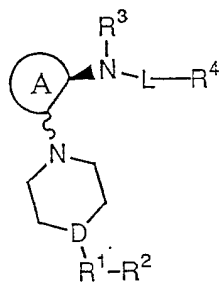
因此, 阻滞CCR-3受体结合RANTES, MCP-3和eotaxin的能力,

15 从而防止嗜曙红细胞的募集, 这将为嗜曙红细胞介导的炎症疾病提供治疗。

本发明涉及能够抑制eotaxin与CCR-3受体结合的化合物, 从而提供一种抗嗜曙红细胞诱导的疾病如哮喘的方法。

在第一方面, 本发明提供式(I)的化合物:

20



25

其中: (I)

R¹为亚甲基或亚乙基;

R²为任选取代的苯基;

R³为氢, 烷基, 酰基, 芳基, 或芳基烷基;

30 环A为环烷基, 杂环基, 或任选取代的苯基;

D 为 N 或 C-R^b;

L 为 -C(=O)-, -C(=S)-, -SO₂-, -C(=O)N(R^a)-, -C(=S)N(R^a)-, -SO₂N(R^a)-, -C(=O)O-, -C(=S)O-, -S(=O)₂O-;

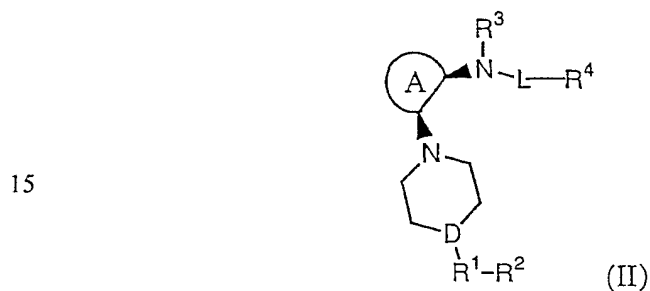
R⁴ 为烷基, 环烷基, 烯基, 炔基, 杂烷基或酰基烷基;

5 R^a 为氢, 烷基, 酰基, 芳基, 芳基烷基, 烷氧羰基, 或苄氧羰基; 和
R^b 为氢或烷基;

及其前药、单独异构体、异构体的外消旋和非-外消旋混合物、和药用盐。

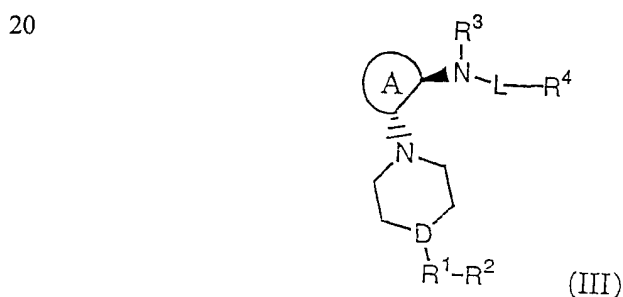
此外, 在如上定义的化合物 (在下面它们将被称为 (i)) 中, 优选下列化合物:

(ii) (i) 的化合物, 其为式 (II) 的化合物:



其中 R¹-R⁴、A、D 和 L 如(i)中所定义。

(iii) (i) 的化合物, 其为式 (III) 的化合物:



25

其中 R¹-R⁴、A、D 和 L 如(i)中所定义。

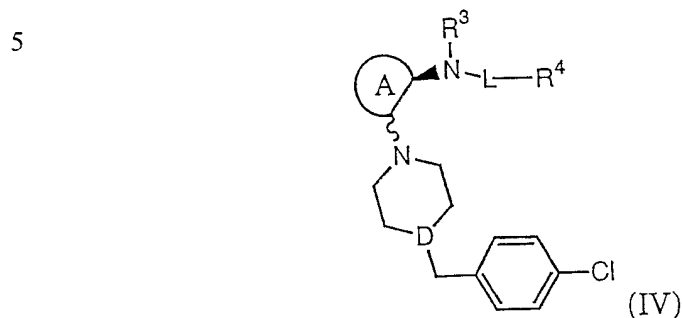
(iv) (i) - (iii) 中任何一项的化合物, 其中 R¹ 为亚甲基。

(v) (i) - (iii) 中任何一项的化合物, 其中 R² 为 4-氯苯基或 3,4-二氯苯基。

30 (vi) (i) - (iii) 中任何一项的化合物, 其中 R³ 为氢。

(vii) (i) - (iii) 中任何一项的化合物, 其中 $-C(=O)-$, $-SO_2-$, $-C(=O)N(R^a)-$, $-C(=S)N(R^a)-$, 或 $-C(=O)O-$ 。

(viii) (i) 的化合物, 其为式(IV)的化合物:



其中 R^3-R^4 、A、D 和 L 如(i)中所定义。

(ix) (i) - (viii) 中任何一项的化合物, 其中 R^4 为环己基, 烯丙基, 异丙基, n-丁基, 或 2-(乙氧羰基)乙基。

(x) (i) 的化合物, 其中 A 为环戊基。

15 (xi) (i) 的化合物, 其为:

环己烷羧酸{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-酰胺;

{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-3-环己基-脲;

1-烯丙基-3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲;

1-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-3-异丙基-脲;

20 1-丁基-3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲;

3-(3-{(1R,2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基]-脲基)-丙酸乙

酯;

或其盐。

25 第二方面, 本发明提供药物组合物, 其包含治疗有效量的式 (I) 化合物或其药用盐, 和药用赋形剂。

第三方面, 本发明提供了本文公开的式 (I) 化合物的制备方法。

第四方面, 本发明提供本文公开的用于制备式 (I) 化合物的新型中间体。

30 第五方面, 本发明提供式 (I) 化合物或其药用盐, 其用于医学治疗或诊断, 特别是用于治疗 CCR-3 介导的疾病, 包括如哮喘等的呼吸疾病。

第六方面，本发明提供式 (I) 化合物或其药用盐用于制备药物的用途，所述药物用于治疗哺乳动物通过给药 CCR-3 受体拮抗剂能治疗的疾病（例如哮喘）。

除非另外说明，在本说明书和权利要求书中使用的下列术语的含义如下：

“酰基”是指-C(O)R 基，其中 R 是氢，烷基，环烷基，环烷基烷基，苯基或苯基烷基，其中烷基，环烷基，环烷基烷基，和苯基烷基如本文所定义。典型的实例包括但不限于甲酰基，乙酰基，环己基羰基，环己基甲基羰基，苯甲酰基，苄基羰基。

“酰基烷基”是指-亚烷基-C(O)R 基，其中 R 为氢，烷基，卤代烷基，环烷基，环烷基-烷基，任选取代的苯基，苯甲基，羟基，烷氧基，氨基，单烷基氨基或二烷基氨基。典型的实例包括甲基羰基-甲基，2-(乙氧羰基)乙基，2-(甲氧羰基)乙基，2-羧基乙基。

“酰氨基”是指-NR'C(O)R 基团，其中 R' 是氢或烷基，并且 R 是氢，烷基，环烷基，环烷基烷基，苯基或苯基烷基，其中烷基，环烷基，环烷基烷基，和苯基烷基如本文所定义。典型的实例包括但不限于甲酰氨基，乙酰氨基，环己基羰基氨基，环己基甲基-羰基氨基，苯甲酰基氨基，苄基羰基氨基。

“烷氧基”是指-OR 基，其中 R 是本文定义的烷基，例如甲氧基，乙氧基，丙氧基，丁氧基。

“烷氧羰基”是指-C(O)-R 基，其中 R 是如本文所定义的烷氧基。

“烯基”是指含有至少一个双键的 2-6 个碳原子的直链一价烃基或 3-6 个碳原子的支链一价烃基，例如乙烯基，丙烯基。

“烷基”是指 1-6 个碳原子的直链饱和一价烃基或 3-6 个碳原子的支链饱和一价烃基，例如甲基，乙基，丙基，2-丙基，正丁基，异丁基，叔丁基，戊基。

“烷基氨基”或“单烷基氨基”是指-NHR 基，其中 R 表示本文定义的烷基，环烷基，或环烷基-烷基。典型的实例包括但不限于甲氨基，乙氨基，异丙基氨基，环己基氨基。

“亚烷基”是指 1-6 个碳原子的直链饱和二价烃基或 3-6 个碳原子的

支链饱和二价烃基，例如亚甲基，亚乙基，2,2-二甲基亚乙基，亚丙基，2-甲基亚丙基，亚丁基，亚戊基。

“炔基”是指含有至少一个三键的2-6个碳原子的直链一价烃基或3-6个碳原子的支链一价烃基，例如乙炔基，丙炔基。

5 “烷基磺酰基”是指-S(O)₂R基，其中R是本文定义的烷基，环烷基，或环烷基烷基，例如甲基磺酰基，乙基磺酰基，丙基磺酰基，丁基磺酰基，环己基磺酰基。

“烷基亚磺酰基”是指-S(O)R基，其中R是本文定义的烷基，环烷基，或环烷基烷基，例如甲基亚磺酰基，乙基亚磺酰基，丙基亚磺酰基，10 丁基亚磺酰基，环己基亚磺酰基。

“烷硫基”是指-SR基，其中R是如上定义的烷基，例如甲硫基，乙硫基，丙硫基，丁硫基。

“芳基”是指6-10个环原子的单环或双环芳香烃基，其任选地被一个或多个取代基，优选一个、二个或三个取代基取代，这些取代基优选选自烷基，卤代烷基，羟烷基，杂烷基，酰基，酰氨基，氨基，烷基氨基，15 二烷基氨基，烷硫基，烷基亚磺酰基，烷基磺酰基，-SO₂NR'R''（其中R'和R''独立地为氢或烷基），烷氧基，卤代烷氧基，烷氧羰基，氨基甲酰基，羟基，卤素，硝基，氰基，巯基，亚甲二氧基或亚乙二氧基。更具体地，术语芳基包括但不限于苯基，氯苯基，氟苯基，甲氧基苯基，1-萘基，2-20 萘基，及其衍生物。

“亚芳基”是指以上定义的二价芳基。

“芳烷基”是指其中烷基的一个氢原子被芳基取代的本文定义的烷基。典型的芳烷基包括但不限于苄基，2-苄基乙-1-基，萘基甲基，2-萘基乙-1-基，萘苄基，2-萘苯乙-1-基。

25 “芳氧基”是指-O-R基，其中R是本文定义的芳基。

“氨基甲酰基”是指-C(=O)NH₂基。

“环烷基”指3-7个环碳的饱和单价环烃基团，例如环丙基，环丁基，环己基，4-甲基环己基。

30 “环烷基烷基”是指-R^xR^y基，其中R^x是亚烷基，R^y是本文定义的环境烷基，例如环己基甲基。

“二烷基氨基”是指-NRR'基，其中 R 和 R'独立地表示本文定义的烷基，环烷基，或环烷基烷基。典型的实例包括但不限于二甲氨基，甲基乙氨基，二(1-甲基乙基)氨基，(环己基)(甲基)氨基，(环己基)(乙基)氨基，(环己基)(丙基)氨基，(环己基甲基)(甲基)氨基，(环己基甲基)(乙基)氨基。

5 “卤素”指氟，氯，溴，或碘，优选氟和氯。

“卤代烷基”是指用一个或多个相同或不同的卤原子取代的烷基，例如-CH₂Cl，-CF₃，-CH₂CF₃，-CH₂CCl₃。

“杂芳基”是指 5-12 个环原子的至少包含一个芳香环的单环或双环基团，其包含一个，两个，或三个选自 N，O，或 S 的环杂原子，其余的环原子是 C，条件是杂芳基的连接点将在芳香环上。该杂芳环任选地被一个或多个取代基，优选一或两个取代基独立地取代，这些取代基选自烷基，卤代烷基，羟烷基，杂烷基，酰基，酰氨基，氨基，烷基氨基，二烷基氨基，烷硫基，烷基亚磺酰基，烷基磺酰基，-SO₂NR'R''（其中 R'和 R''独立地为氢或烷基），烷氧基，卤代烷氧基，烷氧羰基，氨基甲酰基，羟基，卤素，硝基，氰基，巯基，亚甲二氧基或亚乙二氧基。更具体地，术语杂芳基包括但不限于吡啶基，呋喃基，噻吩基，噻唑基，异噻唑基，三唑基，咪唑基，异噁唑基，吡咯基，吡唑基，嘧啶基，苯并呋喃基，四氢苯并呋喃基，异苯并呋喃基，苯并噻唑基，苯并异噻唑基，苯并三唑基，吲哚基，异氮(杂)茛基，苯并噁唑基，喹啉基，四氢喹啉基，异喹啉基，苯并咪唑基，苯并异噁唑基或苯并噻吩基及其衍生物。

20 “杂亚芳基”是指如上定义的二价杂芳基。

“杂芳烷基”是指本文定义的烷基，其中烷基的一个氢原子被本文定义的杂芳基取代。

“杂烷基”是指本文定义的烷基，其中一个，两个或三个氢原子被独立地选自-OR^a，-NR^bR^c，和-S(O)_nR^d（其中 n 是 0-2 的整数）的取代基取代，条件是杂烷基的连接点是通过杂烷基的碳原子。R^a 是氢，酰基，烷基，环烷基或环烷基烷基。R^b 和 R^c 彼此独立地是氢，酰基，烷基，环烷基或环烷基烷基；当 n 为 0 时，R^d 为氢，烷基，环烷基，环烷基烷基；当 n 为 1 或 2 时，R^d 为烷基，环烷基，环烷基烷基，氨基，酰氨基，单烷基氨基或二烷基氨基；典型的实例包括例如 2-羟乙基，3-羟丙基，2-羟基-1-

羟基甲基乙基, 2,3-二羟基丙基, 1-羟基甲基乙基, 3-羟基丁基, 2,3-二羟基丁基, 2-羟基-1-甲基丙基, 2-氨基乙基, 3-氨基丙基, 2-甲基磺酰基乙基, 氨基磺酰基甲基, 氨基磺酰基乙基, 氨基磺酰基丙基, 甲基氨基磺酰基甲基, 甲基氨基磺酰基乙基, 甲基氨基磺酰基丙基。

5 “杂环基”指具有 3-8 个环原子的饱和或不饱和非芳香环基, 其中一个或两个环原子为选自 NR^x {其中每个 R^x 独立地为氢, 烷基, 酰基, 烷基磺酰基, 氨基磺酰基, (烷基氨基)磺酰基, (二烷基氨基)磺酰基, 氨基甲酰基, (烷基氨基)羰基, (二烷基氨基)羰基, (氨基甲酰基)烷基, (烷基氨基)羰基烷基, 或二烷基氨基羰基烷基}, O, 或 $\text{S}(\text{O})_n$ (其中 n 为 0 到 2 的整数)的
10 杂原子, 其余环原子为碳。杂环基环可以任选独立被一个、两个或三个取代基取代, 其中取代基选自烷基, 卤代烷基, 杂烷基, 卤素, 硝基, 氰基烷基, 羟基, 烷氧基, 氨基, 单烷基氨基, 二烷基氨基, 芳烷基, $-(\text{X})_n-\text{C}(\text{O})\text{R}$ (其中 X 为 O 或 NR' , n 为 0 或 1, R 为氢, 烷基, 卤代烷基, 羟基, 烷氧基, 氨基, 单烷基氨基, 二烷基氨基或任选取代的苯基, 和 R' 为
15 氢或烷基), -亚烷基- $\text{C}(\text{O})\text{R}$ (其中 R 为氢, 烷基, 卤代烷基, 羟基, 烷氧基, 氨基, 单烷基氨基, 二烷基氨基或任选取代的苯基)或 $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}^d$ (其中 n 为 0-2 的整数, R^d 为氢(条件是 n 为 0), 烷基, 卤代烷基, 环烷基, 环烷基烷基, 氨基, 单烷基氨基, 二烷基氨基, 或羟烷基)。更具体地, 术语杂环基包括但
20 不限于四氢吡喃基, 哌啶子基, N-甲基哌啶-3-基, 哌嗪子基, N-甲基吡咯烷-3-基, 3-吡咯烷子基, 吗啉代, 硫代吗啉代, 硫代吗啉代-1-氧化物, 硫代吗啉代-1,1-二氧化物, 四氢噻吩-S, S-二氧化物, 吡咯啉基, 咪唑啉基, 及其衍生物。

“羟烷基”是指被一个或多个, 优选一个、两个或三个羟基取代的本文定义的烷基, 条件是相同的碳原子不携带一个以上的羟基。典型的实例
25 包括但不限于 2-羟乙基, 2-羟丙基, 3-羟丙基, 1-(羟甲基)-2-甲基丙基, 2-羟丁基, 3-羟丁基, 4-羟丁基, 2,3-二羟基丙基, 2-羟基-1-羟甲基乙基, 2,3-二羟基丁基, 3,4-二羟基丁基和 2-(羟甲基)-3-羟丙基, 优选 2-羟乙基, 2,3-二羟基丙基和 1-(羟甲基)-2-羟乙基。因此, 本文所用的术语“羟烷基”用于定义杂烷基的子集。

30 “离去基团”具有常规与合成有机化学相关的含义, 即能够被亲核试

剂取代的原子或基团, 包括卤素(如氯, 溴, 和碘), 烷磺酰氧基, 芳磺酰氧基, 烷基羰氧基(例如乙酰氧基), 芳基羰氧基, 甲磺酰氧基, 甲苯磺酰氧基, 三氟甲磺酰氧基, 芳氧基(例如 2,4-二硝基苯氧基), 甲氧基, N,O-二甲基羟基氨基。

5 “任选取代的苯基”指被一个或多个取代基, 优选一个, 两个或三个取代基任选取代的苯基, 所述取代基优选自烷基, 卤代烷基, 羟烷基, 杂烷基, 酰基, 酰基氨基, 氨基, 烷基氨基, 二烷基氨基, 烷硫基, 烷基亚磺酰基, 烷基磺酰基, $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ (其中 R' 和 R'' 独立地为氢或烷基), 烷氧基, 卤代烷氧基, 烷氧羰基, 氨基甲酰基, 羟基, 卤素, 硝基, 氰基, 巯基, 亚
10 甲二氧基或亚乙二氧基。更具体地, 该术语包括但不限于, 苯基, 氯苯基, 氟苯基, 溴苯基, 甲基苯基, 乙基苯基, 甲氧基苯基, 氰基苯基, 4-硝基苯基, 4-三氟甲基苯基, 4-氯苯基, 3,4-二氟苯基, 2,3-二氯苯基, 3-甲基-4-硝基苯基, 3-氯-4-甲基苯基, 3-氯-4-氟苯基或 3,4-二氯苯基及其衍生物。

“任选的”或“任选地”表示其后所描述的事件或情况可以发生, 但
15 不必须发生, 并且该描述包括事件或情况发生的实例和不发生的实例。例如, “任选地被烷基单-或双-取代的芳基”是指该烷基可以但不必须存在, 并且该描述包括芳基被烷基单-或双-取代的情形, 和芳基没有被烷基取代的情形。

“药用赋形剂”是指用于制备药用组合物的赋形剂, 该组合物通常是
20 安全的, 无毒的并且既没有生物学上也没有其他方面的不良反应, 包含的赋形剂对兽医使用和人类制药使用均是合格的。在本说明书和权利要求书中使用的“药用赋形剂”包括一种和多于一种的该赋形剂。

化合物的“药用盐”是指一种盐, 它是药物可接受的并具有该母体化
合物合乎要求的药物活性。这样的盐包括: (1) 与无机酸例如盐酸, 氢
25 溴酸, 硫酸, 硝酸, 磷酸等形成的酸加成盐; 与有机酸如醋酸, 丙酸, 己酸, 环戊烷丙酸, 羟基乙酸, 丙酮酸, 乳酸, 丙二酸, 丁二酸, 苹果酸, 顺丁烯二酸, 反丁烯二酸, 酒石酸, 柠檬酸, 苯甲酸, 3-(4-羟基苯甲酰基)-
苯甲酸, 肉桂酸, 扁桃酸, 甲磺酸, 乙磺酸, 1,2-乙烷-二磺酸, 2-羟基乙
磺酸, 苯磺酸, 4-氯代苯磺酸, 2-萘磺酸, 4-甲苯磺酸, 樟脑磺酸, 4-甲
30 基双环[2.2.2]辛-2-烯-1-羧酸, 葡庚糖酸, 3-苯基丙酸, 三甲基乙酸, 叔丁

基乙酸，月桂基硫酸，葡萄糖酸，谷氨酸，羟基萘甲酸，水杨酸，硬脂酸，粘康酸形成的酸加成盐；或（2）当母体化合物中存在的酸性质子被金属离子，例如碱金属离子，碱土金属离子，或铝离子取代；或与有机碱如乙醇胺，二乙醇胺，三乙醇胺，氨基丁三醇(tromethamine)，N-甲基葡糖胺配位所形成的盐。

“苯基烷基”指本文定义的烷基，其中烷基的一个氢原子被任选取代的苯基取代。

“保护基”指当与分子中的反应基相连时掩蔽（mask）、减少或阻止其反应性的原子的分组。保护基的实例可以在 T. W. Green 和 P. G. Futs, Protective Groups in Organic Chemistry, (Wiley, 第二版, 1991) 以及 Harrison 和 Harrison 等, Compendium of Synthetic Organic Methods, 卷 1-8 (John Wiley & Sons, 1971-1996) 中发现。典型的氨基保护基包括甲酰基，乙酰基，三氟乙酰基，苄基，苄氧羰基(CBZ)，叔丁氧羰基(Boc)，三甲代甲硅烷基(TMS)，2-三甲代甲硅烷基-乙磺酰基(SES)，三苯甲基和取代的三苯甲基，烯丙氧羰基，9-芴基甲氧羰基(FMOC)，硝基-藜芦氧羰基(NVOC)。典型的羟基保护基包括其中羟基为酰化或烷基化的那些，如苄基，和三苯甲基醚以及烷基醚，四氢吡喃基醚，三甲代甲硅烷基醚和烯丙基醚。

疾病的“治疗”或“治疗法”包括：（1）预防疾病，即促使疾病的临床症状不在哺乳动物中发展，这些哺乳动物可能暴露于或易患疾病，但还未经历或显示疾病的症状；（2）抑制疾病，即阻止或减少疾病或其临床症状的发展；或（3）减轻疾病，即促使疾病或其临床症状消退。

“治疗有效量”是指当对哺乳动物给药治疗疾病时足以实现对疾病治疗的化合物的量。“治疗有效量”将依据化合物，疾病及其严重性和待治疗哺乳动物的年龄，体重等而变化。

“前药”指当这些前体药物给药哺乳动物受试者，在体内能释放按照式(I)的活性母体药物的化合物。式(I)化合物的前体药物的制备是通过以某种方式修饰式(I)化合物存在的官能团，以使该修饰在体内裂解，释放母体化合物。前体药物包括式(I)化合物的羟基、氨基或巯基结合到任何基团上的式(I)化合物，其在体内开裂，重新分别生成游离羟基、氨基或巯基。前体药物的例子包括但不限于式(I)化合物中羟基官能团的酯(例如乙酸酯，

甲酸酯, 苯甲酸酯衍生物), 氨基甲酸酯(例如 N,N-二甲基氨基羰基)等。

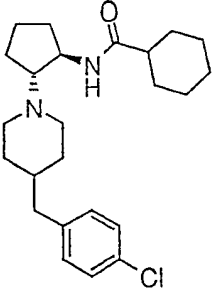
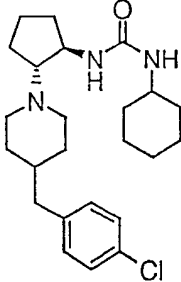
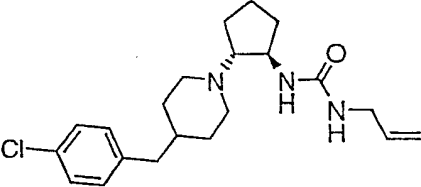
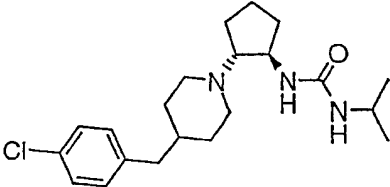
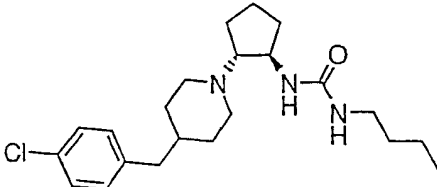
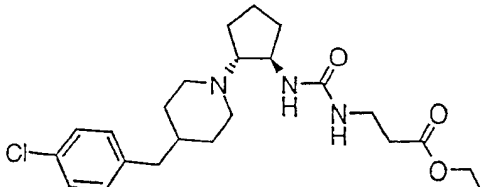
具有相同的分子式但性质或它们原子的键合顺序, 或它们原子的空间排列不同的化合物称作“异构体”。它们原子的空间排列不同的异构体称作“立体异构体”。彼此不成镜像的立体异构体称作“非对映异构体”, 5 和相互成不可重叠镜像的立体异构体称作“对映异构体”。当一种化合物有一个不对称中心, 例如一个碳原子连接四个不同的基团, 可有一对对映异构体。对映异构体可通过其不对称中心的绝对构型来表征, 通过 Cahn 和 Prelog 的 R-和 S-顺序规则, 或通过该分子旋转偏振光平面的方式并标明为右旋或左旋(即分别为(+)-或(-)-异构体)来描述。一种手性化合物可以 10 以单独的对映异构体或其混合物存在。含有相等比例对映异构体的混合物称作“外消旋混合物”。

本发明化合物可具有一个或多个不对称中心; 因此该化合物可以以单独的(R)-或(S)-立体异构体或以它们的混合物来生产这样的化合物。除非 15 另外说明, 在本说明书和权利要求书中, 一个具体化合物的描述或命名意思是同时包括单独的对映异构体和它们的外消旋或其他混合物。立体化学的测定和立体异构体的分离方法在本领域中是众所周知的(参阅“高等有机化学”第 4 章中的讨论, 第 4 版 J. March, John Wiley 和 Sons, 纽约, 1992 年)。

通常, 用于本申请的命名法基于 AUTONOMTM, 一种用于产生 IUPAC 20 系统命名法的 Beilstein 研究所的计算机系统。例如, R₁ 是亚甲基; R₂ 是 4-氯苯基; L 是 C(=O); A 是环戊基; R₃ 是氢; R⁴ 是环己基; 和 D 是-CH-(实施例 1)的式 (I) 的化合物, 被命名为环己烷羧酸{2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-酰胺。

式 (I) 的典型化合物在下表中显示。

25

结构	M.P. (°C)	实施例
		1
		3
		2
		2
		2
		2

上面描述了本发明最宽的定义，式(I)的某些化合物是优选的。

本发明优选的一种化合物是其中 R_1 是亚甲基的式 (I) 的化合物。

本发明另一种优选的化合物是其中环 A 是环戊基的式 (I) 化合物。出乎意料地发现环 A 是环戊基的化合物与 CCR-3 受体强烈结合。本发明的另一种优选化合物是其中环 A 是杂环基(特别是四氢吡喃基, S, S-二氧-四氢噻吩基, 四氢噻吩基(thiophenyl)或吡咯烷基)的式 (I) 化合物或环 A 是苯基的式 (I) 化合物。

本发明的一种优选化合物是其中 R^2 为被一个、或两个取代基取代的苯环的式 (I) 化合物, 所述取代基选自烷基, 烷氧基, 卤代烷基, 卤素, 氰基或硝基; 优选甲基, 乙基, 甲氧基, 三氟甲基, 氯, 氟或溴; 最优选 4-硝基苯基, 4-三氟甲基苯基, 4-氯苯基, 3,4-二氟苯基, 2,3-二氯苯基, 3-甲基-4-硝基苯基, 3-氯-4-甲基苯基, 3-氯-4-氟苯基或3,4-二氯苯基; 特别优选 4-氯苯基或 3,4-二氯苯基。

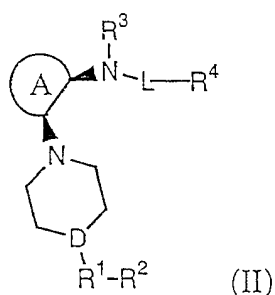
本发明的一种优选化合物是其中 R^3 为氢或甲基, 优选氢的式 (I) 化合物。

本发明的一种优选化合物是其中 L 为 $-C(=O)-$, $-SO_2-$, $-C(=O)N(R^a)-$, $-C(=S)N(R^a)-$ 或 $-C(=O)O-$ 的式 (I) 化合物。更优选的是其中 L 为 $-C(=O)-$, $-C(=O)N(R^a)-$ 的化合物, 最优选的是其中 L 为 $-C(=O)N(R^a)-$ 的化合物。其中 R^a 优选氢或甲基, 最优选氢。

本发明的一种优选化合物是其中 D 为 N 的式 (I) 化合物。当 D 为 $C-R^b$, 优选的化合物是其中 R^b 为氢的化合物。

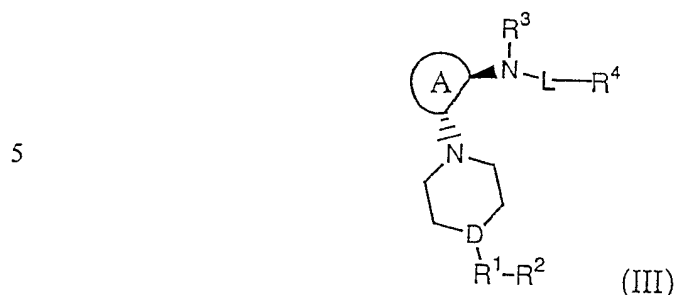
本发明的一种优选化合物是其中 R^4 为烷基, 环烷基, 环烷基烯基或酰基烷基; 更优选环己基, 烯丙基, 异丙基, n-丁基, 或 2-(乙氧羰基)乙基的式 (I) 化合物。

式 (I) 的一种具体化合物是式 (II) 的化合物:



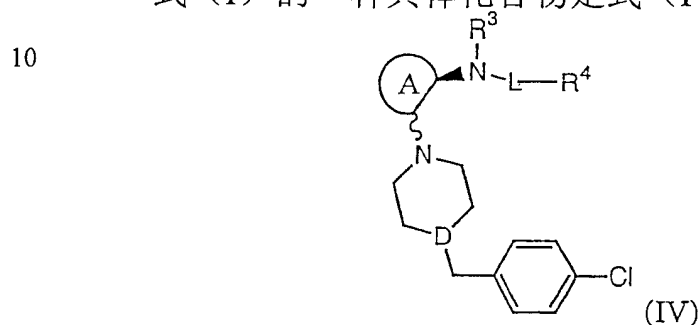
其中 R^1 - R^4 , A, D, 和 L 具有任何本发明所述的定义。

式 (I) 的一种具体化合物是式 (III) 的化合物:



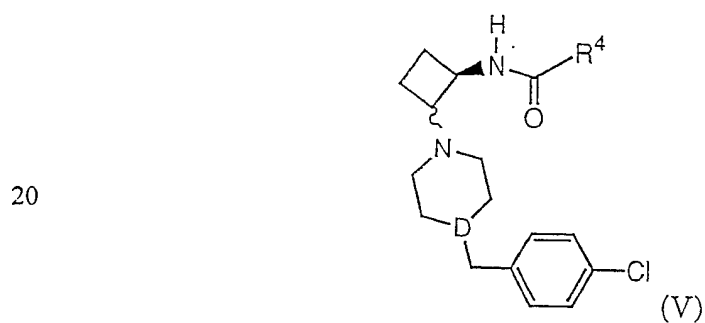
其中 R^1 - R^4 , A, D, 和 L 具有任何本发明所述的定义。

式 (I) 的一种具体化合物是式 (IV) 的化合物:



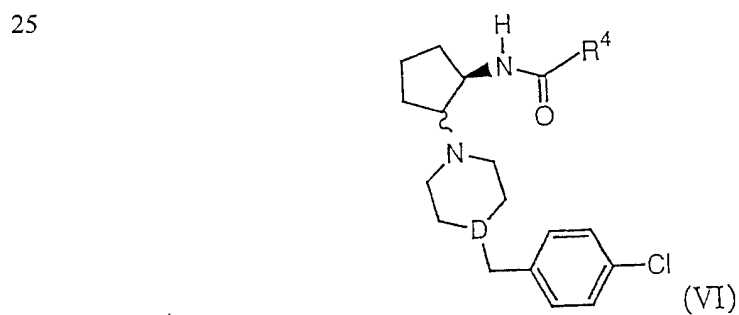
15 其中 R^3 , R^4 , A, D, 和 L 具有任何本发明所述的定义。

式 (I) 的一种具体化合物是式 (V) 的化合物:



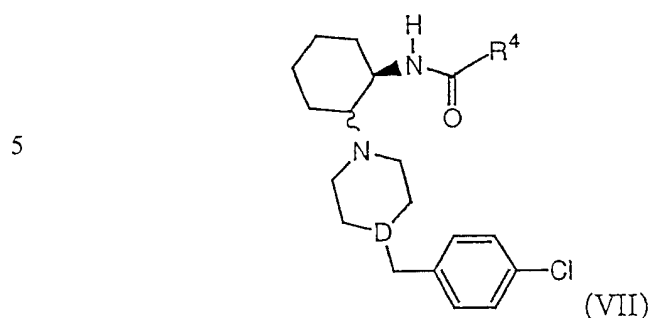
其中 R^4 和 D 具有任何本发明所述的定义。

式 (I) 的一种具体化合物是式 (VI) 的化合物:



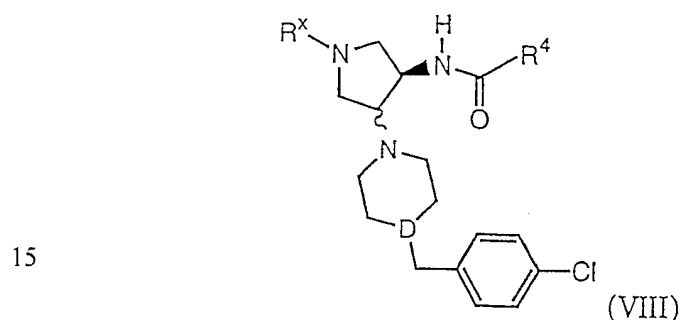
其中 R^4 和 D 具有任何本发明所述的定义。

式 (I) 的一种具体化合物是式 (VII) 的化合物:



其中 R^4 和 D 具有任何本发明所述的定义。

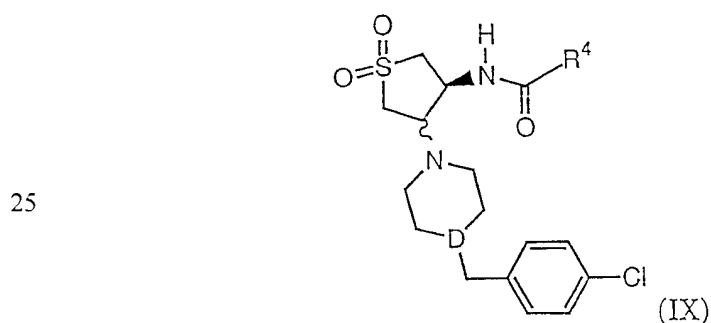
10 式 (I) 的一种具体化合物是式 (VIII) 的化合物:



其中 R^4 和 D 具有任何本发明所述的定义; R^x 为氢, 烷基, 酰基, 烷基磺酰基, 氨基磺酰基, (烷基氨基)磺酰基, (二烷基氨基)磺酰基, 氨基甲酰基, (烷基氨基)羰基, (二烷基氨基)羰基, (氨基甲酰基)烷基, (烷基氨基)羰基烷基, 或二烷基氨基羰基烷基。

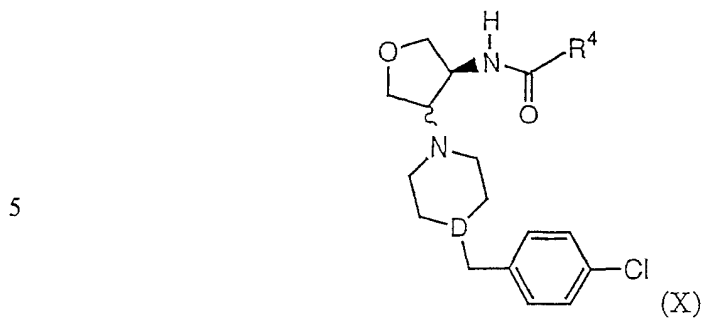
20

式 (I) 的一种具体化合物是式 (IX) 的化合物:



其中 R^4 和 D 具有任何本发明所述的定义。

式 (I) 的一种具体化合物是式 (X) 的化合物:



其中 R⁴ 和 D 具有任何本发明所述的定义。

本发明特别优选的化合物是:

- 10 环己烷羧酸{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-酰胺;
 {(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-3-环己基-脲;
 1-烯丙基-3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲;
 1-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-3-异丙基-脲;
 1-丁基-3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲;
 15 3-(3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲基)-丙酸乙
 酯;
 或其盐。

本发明化合物是 CCR-3 受体拮抗剂, 抑制 CCR-3 的趋化因子如 RANTES, eotaxin, MCP-2, MCP-3 和 MCP-4 引起的嗜嗜红细胞募集。

- 20 本发明化合物和含有它们的组合物在治疗嗜嗜红细胞诱导的疾病中是有用的, 所述疾病如炎性或过敏性疾病, 并且包括呼吸过敏性疾病如哮喘, 过敏性鼻炎, 过敏性肺病, 超敏性肺炎, 嗜酸细胞性肺炎(例如慢性嗜酸细胞性肺炎); 炎性肠疾病(例如局限性回肠炎和溃疡性结肠炎); 和银屑病和炎性皮肤病如皮炎和湿疹。

- 25 本发明化合物的 CCR-3 拮抗活性可通过体外试验测定, 如配体结合试验和趋化性试验, 在实施例 4, 5 和 6 中有更详细的说明。可以通过 Balb/c 小鼠模型中卵清蛋白诱导的哮喘进行体内试验, 在实施例 7 中有更详细的说明。

- 30 通常, 依据任何公认的适于相同应用的药剂的给药方式, 以治疗有效量给药本发明化合物。本发明化合物即活性成分的实际量将取决于诸多因

素如被治疗疾病的严重性, 受试者的年龄和相对健康, 所使用化合物的效力, 给药的途径和形式及其他因素。

式(I)化合物的治疗有效量可以是接受者每千克体重每天大约 0.01-20 mg; 优选大约 0.1-10 mg/kg/天。这样, 给 70kg 的人用药, 最优选剂量
5 范围为每天大约 7 mg-0.7 g。

通常, 本发明化合物作为药用组合物通过下列任何一个途径给药: 口服, 透皮, 吸入(例如鼻内或经口吸入)或肠胃外(例如肌内, 静脉内或皮下)给药。优选给药方式是口服, 使用常规的按日剂量服用, 可根据病情程度调节。组合物可做成片剂, 丸剂, 胶囊, 半固体, 粉剂, 持续释放
10 制剂, 溶液, 混悬液, 脂质体, 酞剂, 或任何其他适当的组合物。用于给药本发明化合物的另一优选方式是吸入。这对于将治疗剂直接传递到呼吸道来治疗疾病如哮喘和其它类似或相关的呼吸道疾病是有效的方式(参阅美国专利 5,607,915)。

剂型的选择根据多种因素如药物的给药方式和药物的生物利用度。对于吸入给药的传递方式, 该化合物可以制成的剂型为液体溶液或混悬液,
15 气溶胶型喷射剂或干粉装入适当的用于口服的分散剂。有三种药物吸入装置: 喷雾器吸入剂, 计量剂量吸入剂(MDI), 和干粉吸入剂(DPI)。喷雾器装置产生一高速气流, 它使治疗药物(其已制成液体剂型)成雾状喷射, 该喷雾进入患者的呼吸道。MDI 通常将制剂用压缩气体包装。刺激后, 该
20 装置通过压缩气体释放一定量的治疗药物, 由此提供了一种给药一定量药物的可靠方法。DPI 给药剂型是将自由流动的粉末剂型的药物在装置吸入时可以将其分散至患者的呼吸道气流。为了获得自由流动的粉末, 治疗药物可以与赋型剂如乳糖制成制剂。可测定量的药物储存在胶囊剂型中, 通过每次激活分配给患者。最近, 已开发出药物制剂特别用于生物利用度差的
25 的药物, 它是根据通过增加表面积即减少粒径可以增加生物利用度的原则。例如, 美国专利号 4,107,288 描述了粒径范围在 10 - 1,000 nm 的药物制剂, 其中活性物质被加载到高分子的交联骨架上。美国专利号 5,145,684 描述了一种药物制剂, 其中药物在表面改性剂存在下被研磨成毫微颗粒
(平均粒径 400 nm), 然后分散到液体介质中, 得到表现出具有相当高的
30 生物利用度的药物剂型。

通常，上述组合物包括式(I)化合物，它与至少一种药用赋形剂组合。可接受的赋形剂是无毒的，它帮助给药并且对式(I)化合物的治疗益处无不利影响。该赋形剂可以是本领域技术人员通常可用的任意固体，液体，半固体或在气雾剂组合物中为气体的赋形剂。

5 固体药物赋型剂包括淀粉、纤维素、滑石粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、白明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸盐、氯化钠、干脱脂乳等。液体和半固体赋型剂可以选自甘油、丙二醇、水、和多种油，包括石油、动物、植物或合成来源的油，例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。优选的液体载体，特别是用于注射溶液的液体载体包括水、盐水、葡萄糖溶液和二醇等。

压缩气体可以在气溶胶剂型中用于分散本发明的化合物。适合用于该目的的气性气体为氮气、二氧化碳等。

对于非胃肠道或口服传递药物的脂质体剂型，脂质被溶解到适当的有机溶剂中，例如叔丁醇、环己烷(1%乙醇)。该溶液被冻干，脂质混合物被分散到允许形成脂质体的缓冲剂溶液中。如果必要，可以通过超声处理减少脂质体的粒径。(参见 Frank Szoka, Jr.和 Demetrios Papahadjopoulos, “脂质泡(脂质体)制剂的比较性质和方法”, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:467-508(1980), 和 D. D. Lasic “脂质体的新应用” *Trends in Biotech.*, 16:467-608,(1998))。

20 其它适合的药物赋型剂和它们的剂型在 Remington's Pharmaceutical Sciences 中描述，由 E.W.Martin 编辑(Mack Publishing Company, 第 18 版, 1990)。

制剂中化合物的量可以在本领域技术人员通常使用的范围内改变。通常，该制剂含有，根据重量百分比 0.01-99.99 重量%的式(I)化合物(基于制剂总重量)，其余用一种或多种适当的药物赋型剂补足。优选地，该化合物存在量为 1-80 wt%。含有式(I)化合物的有代表性的制剂在实施例 4 中描述。

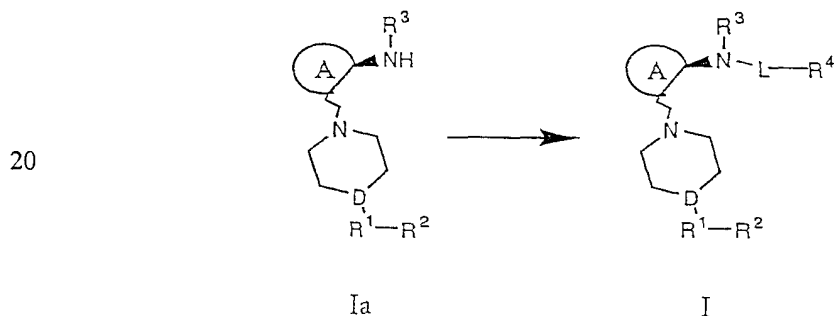
本领域的技术人员了解可用许多方法制备本发明的化合物。优选的方法包括但不限于以下所述的常规合成步骤。

30 用于制备这些化合物的原料和试剂或由商业供应商提供，如 Aldrich

化学公司(美国威斯康星州密尔沃基市), Bachem(美国加利福尼亚州托伦斯市), Enika-Chemie, 或 Sigma(美国密苏里州圣路易斯市), Maybridge(Dist: Ryan Scientific, P.O.Box 6496, Columbia, S.C.92960), Bionet Research Ltd.,(Cornwall PL32 9QZ, UK), Menai Organics Ltd.,(Gwynedd, N.Wales, UK), Butt Park Ltd.,(Dist.Interchim, Montlucon Cedex, France), 或通过本领域技术人员已知的方法按照文献阐述的步骤来制备, 所述参考文献如用于有机合成的 Fieser 和 Fieser' 试剂, 1-17 卷(John Wiley 和 Sons, 1991); 碳化合物的 Rodd's 化学, 1-5 卷和附录(Elsevier Science Publishers, 1989), 有机反应, 1-40 卷(John Wiley 和 Sons, 1991), March's 高等有机化学, (John Wiley 和 Sons, 1992), 和 Larock's 有机转化大全(VCH Publishers Inc., 1989)。这些方案流程仅举例说明了可合成本发明化合物的一些方法, 涉及这一公开内容的本领域技术人员可对这些方案进行修改或提出建议。

如果需要, 原料和反应中间体可使用常规技术来分离和纯化, 常规技术包括但不限于过滤, 蒸馏, 结晶, 层析等。可使用常规方法对这些材料进行表征, 常规方法包括物理常数和光谱数据。

通常, 从下式 (Ia) 的前体胺制备式 (I) 化合物:

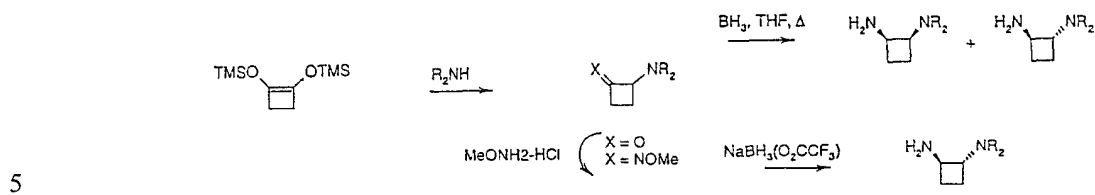


式 (Ia) 化合物的制备以及其向式 (I) 化合物的转化在下述反应路线 1-8 中描述。

反应路线 1-5 显示具有不同环 A 的式 Ia 化合物的制备方法。制备 1-6 中所提供的是 R¹-R² 为 4-氯苯甲基的具体实例。R¹ 和 R² 在本发明范围内发生变化的类似化合物的制备是本领域技术人员按照本说明书和其中的参考文献容易地制备。

30

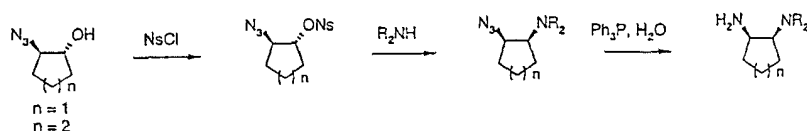
反应路线 1. 环丁胺的合成-环 A = 环丁基



$\text{R}_2\text{N} = 4\text{-(4-氯苯甲基)哌啶}$ 或 1-(4-氯苯甲基)哌嗪



10 反应路线 2. 顺二胺的合成-环 A = 环戊基和环己基.

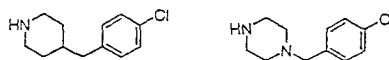
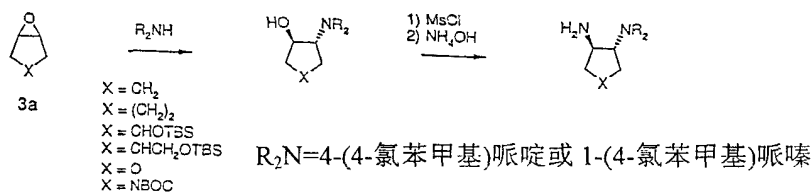


$\text{R}_2\text{N} = 4\text{-(4-氯苯甲基)哌啶}$ 或 1-(4-氯苯甲基)哌嗪



反应路线 3. 反二胺的合成-环 A = 环烷基, 四氢呋喃基, 吡咯烷基或四氢噻吩基

20



25

一般性方法 A:(用环氧化物烷基化胺)

将 0.5-1.5 M 胺溶液, R_2NH (1 当量), 和指定的环氧化物, 3a(1.1-10 当量)置于 EtOH 中, 在 80-95°C 搅拌 2-4.5 天, 冷却到室温, 浓缩。粗氨基醇通过层析或重结晶纯化。

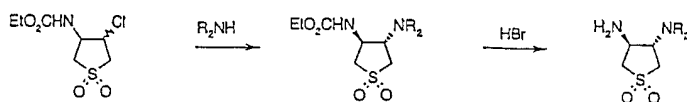
30

一般性方法 B:(用甲磺酰氯和氢氧化铵形成胺)

将 0°C 下, 0.2-0.3 M 氨基醇(1 当量)在 CH_2Cl_2 中的溶液用 Et_3N (2 当量)和 MeSO_2Cl (2 当量)连续处理, 在 0°C 下搅拌 1-2 小时, 在 CH_2Cl_2 和
 5 10-15% NH_4OH 之间分配。用 CH_2Cl_2 萃取水相, 干燥、浓缩萃取物。将 0.13M 残留物在 2.5: 1 二氧杂环己烷: 28-30 wt % NH_4OH 中的溶液在 70-80 °C 下搅拌 2.5-18 小时, 冷却到室温, 浓缩。残留物在 EtOAc 和 1 N NaOH 之间分配, 用 EtOAc 萃取水相, 用盐水洗涤萃取液, 干燥和浓缩。粗产物经层析纯化, 或不经进一步纯化即可使用。

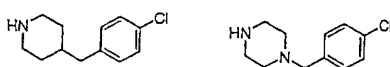
10

反应路线 4. 砒的合成-环 A = 环丁砒(是否正确??)



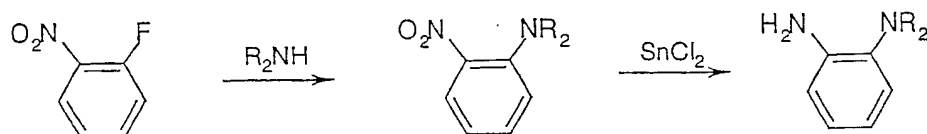
15

$\text{R}_2\text{N}=4$ -(4-氯苯甲基)哌啶或 1-(4-氯苯甲基)哌嗪



反应路线 5. 苯胺的合成-环 A = 苯基

20



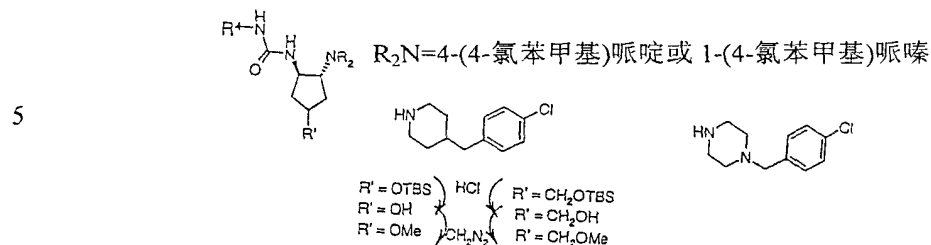
$\text{R}_2\text{NH}=4$ -(4-氯苯甲基)哌啶或 1-(4-氯苯甲基)哌嗪

25

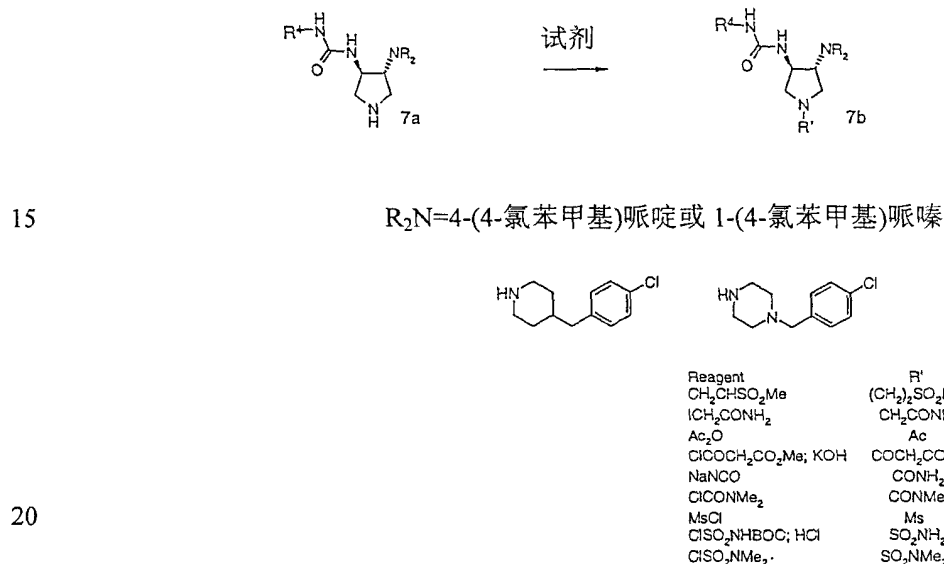
反应路线 6 和 7 显示环 A 被取代的式 Ia 化合物的制备。反应路线 6 显示具有取代的环戊基环 A 的式 Ia 化合物的制备。反应路线 7 显示具有取代的吡咯烷环 A 的式 Ia 化合物的制备, 其中通过用适当的试剂处理未取代的吡咯烷 7a(R=H)制得取代的吡咯烷 7b。

30

反应路线 6. 取代的环烷基环 A 的合成



10 反应路线 7. 取代的吡咯烷环 A 的合成



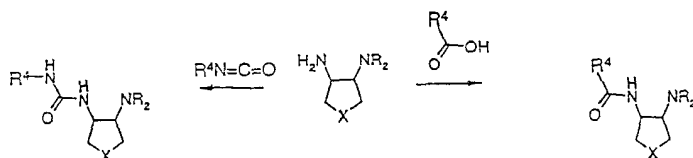
反应路线 8 和 9 显示式(Ia)化合物转化为式(I)化合物的方法, 其中 L 和 A 各不相同。

25

反应路线 8. 伯胺转化为脲和酰胺

L 为 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_a$ 的式(I)化合物如下述反应路线 8 和一般性方法 C 和 D 所示制备。L 为 $-\text{C}(=\text{O})-$ 的式(I)化合物如下述反应路线 8 和一般性方法 E 和 F 所示制备。

30



$R_2N=4-(4\text{-氯苯甲基})\text{哌啶}$ 或 $1-(4\text{-氯苯甲基})\text{哌啶}$ $X = C, O, S(O)_n, NR^x$, 其中 $n=0-2$ 和

5



R^x 如杂环基定义中所限定。

反应路线 8

一般性方法 C: (用异氰酸酯形成脲)

- 10 用指定的异氰酸酯(1.1-2 当量)处理 $0-20^\circ\text{C}$ 下的 $0.1-0.6\text{ M}$ 胺 (1 当量) 在 CH_2Cl_2 或 CH_2Cl_2 和 DMF 中的溶液, 搅拌 $0.5-1.5$ 小时, 在 CH_2Cl_2 和饱和 NaHCO_3 之间分配。用 CH_2Cl_2 萃取水相, 干燥并浓缩萃取液。粗脲经柱层析或制备型 TLC 纯化, 或不经纯化直接用于下一步骤。

- 15 一般性方法 D: (用异氰酸酯形成脲)

- 用指定的异氰酸酯(1.1-2 当量)处理 $0-20^\circ\text{C}$ 下的 $0.1-0.6\text{ M}$ 胺 (1 当量) 在 CH_2Cl_2 或 CH_2Cl_2 和 DMF 中的溶液, 搅拌 $0.5-1.5$ 小时, 在 CH_2Cl_2 和饱和 NaHCO_3 之间分配。用 CH_2Cl_2 萃取水相, 干燥并浓缩萃取液。粗脲经柱层析或制备型 TLC 纯化, 或不经纯化直接用于下一步骤。 CH_2Cl_2 中的游离碱溶液用 1 N HCl 在 Et_2O 中的溶液处理, 浓缩得到盐酸盐。
- 20

一般性方法 E: (用 1-羟基苯并三唑和 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐形成酰胺)

- 将 0°C 下的 $0.1-0.4\text{ M}$ 胺(1 当量)和指定羧酸(1.2-1.5 当量)在 CH_2Cl_2 中的溶液用 1-羟基苯并三唑水合物(HOBT)(0.2-0.5 当量)和 1-[3-(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(DEC)(1.3-2 当量)连续处理, 在 $0-20^\circ\text{C}$ 下搅拌 $2-72$ 小时, 在 CH_2Cl_2 和饱和 NaHCO_3 之间分配, 用 CH_2Cl_2 萃取水相, 干燥并浓缩萃取液。粗酰胺经柱层析和/或制备型 TLC 纯化。
- 25

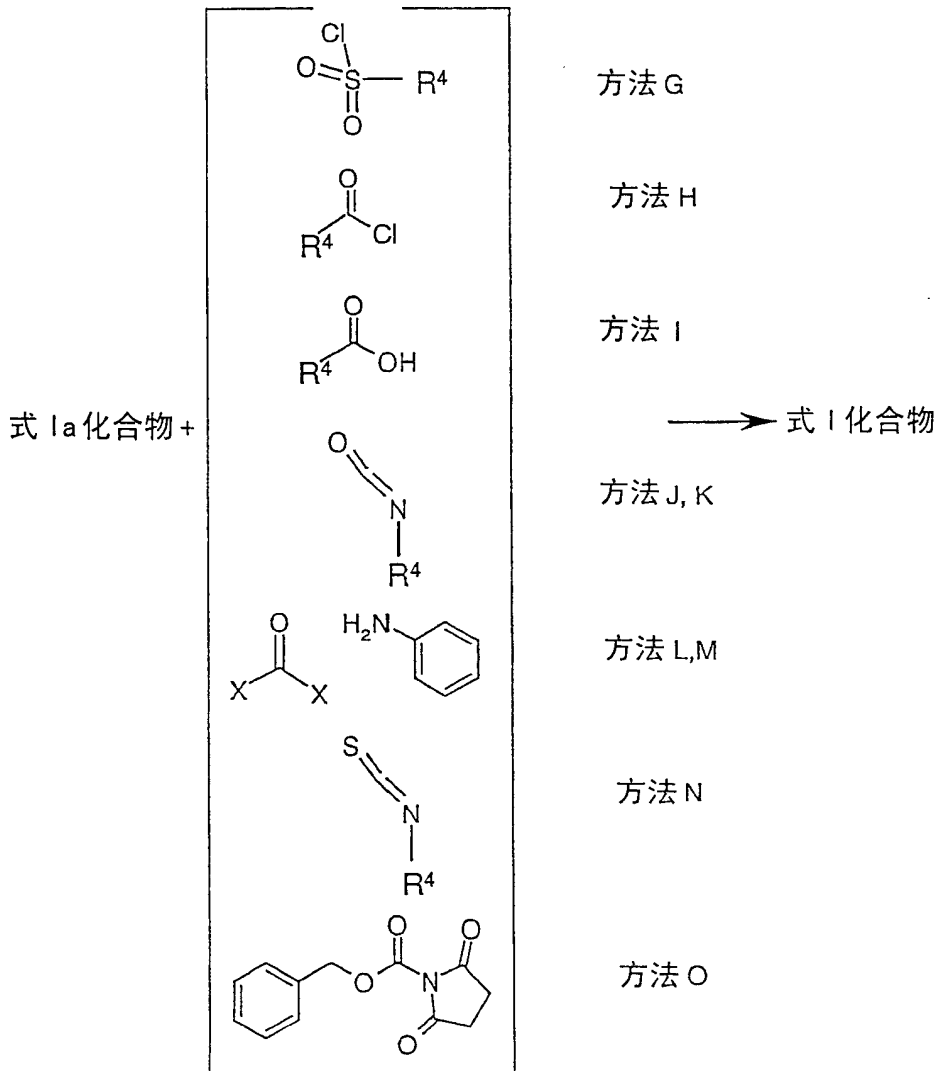
- 30 一般性方法 F: (用 1-羟基苯并三唑和 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚

胺盐酸盐形成酰胺)

将 0°C 下的 0.1-0.4 M 胺(1 当量)和指定羧酸(1.2-1.5 当量)在 CH₂Cl₂ 中的溶液用 1-羟基苯并三唑'水合物(HOBT)(0.2-0.5 当量)和 1-[3-(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐(DEC)(1.3-2 当量)连续处理, 在 0-20°C 下搅拌 2-72 小时, 在 CH₂Cl₂ 和饱和 NaHCO₃ 之间分配, 用 CH₂Cl₂ 萃取水相, 干燥并浓缩萃取液。粗酰胺经柱层析和/或制备型 TLC 纯化。CH₂Cl₂ 中的游离碱溶液用 1 N HCl 在 Et₂O 中的溶液处理, 浓缩得到盐酸盐。

反应路线 9 和下列方法 G-O 描述了用于将式 Ia 转化为式 I 化合物的各种方法, 其中 L 各不相同。

15



一般性方法 G (磺酰胺的平行合成)

将所需的胺 Ia (1 当量), 适当的磺酰氯(1.5 当量), 和 Amberlite IRA67(2 当量)在 CH_2Cl_2 (2 ml)中的混合物旋转过夜。混合物用 PS-三羟甲基氨基甲烷 (trisamine) (1.2 当量)(Argonaut Technologies Inc., San Carlos, CA, USA)处理, 旋转过夜。过滤收集固体, 用 CH_2Cl_2 , MeOH 和 CH_2Cl_2 洗涤。浓缩滤液得到产物。

一般性方法 H (从酰氯平行合成酰胺)

将所需的胺 Ia (1 当量), 适当的酰氯(1.5 当量), 和 Amberlite IRA67(2 当量)在 CH_2Cl_2 (2 ml)中的混合物旋转过夜。混合物用 PS-三羟甲基氨基甲烷 (trisamine) (1.2 当量)和 MP-碳酸盐(2 当量) (Argonaut Technologies, San Carlos, CA)处理, 旋转过夜。过滤收集固体, 用 CH_2Cl_2 , MeOH 和 CH_2Cl_2 洗涤。浓缩滤液得到产物。

一般性方法 I (从羧酸平行合成酰胺)

将所需的胺 Ia (1 当量), 适当的羧酸 (1.5 当量), 和 PS-碳二亚胺 (2 当量) (Argonaut Technologies Inc., San Carlos, CA, USA)在 CH_2Cl_2 (2 ml)中的混合物旋转过夜。混合物用 MP-碳酸盐(2 当量)处理, 旋转过夜。过滤收集固体, 用 CH_2Cl_2 , MeOH 和 CH_2Cl_2 洗涤。浓缩滤液得到产物。

20

一般性方法 J (从异氰酸酯平行合成脲, 并通过平行色谱纯化)

将所需的胺 Ia (1 当量)和适当的异氰酸酯(1.2 当量)在 CH_2Cl_2 (2 ml)中的混合物旋转过夜。浓缩混合物得到粗产物, 其经平行色谱用分步梯度 (2.5% MeOH/ CH_2Cl_2 , 10% MeOH/ CH_2Cl_2)纯化。

25

一般性方法 K (从异氰酸酯平行合成脲, 并通过捕获和释放清除剂(Catch and Release Scavenger)纯化)

将所需的胺 Ia (1 当量)和适当的异氰酸酯(1.2 当量)在 CH_2Cl_2 (2 ml)中的混合物搅拌过夜。混合液用 MP-TsOH 处理, 并旋转 3 小时。过滤收集固体, 用 CH_2Cl_2 , MeOH 和 CH_2Cl_2 洗涤。固体与 2 M NH_3 在 MeOH 中的

溶液旋转 2 小时。过滤收集固体，用 CH_2Cl_2 , MeOH 和 CH_2Cl_2 洗涤。浓缩滤液得到纯产物。

一般性方法 L (用 Phoxime 树脂从苯胺平行合成脲)

- 5 将适当的苯胺(3 当量)和 Phoxime 树脂 (1 当量)在 CH_2Cl_2 (2 ml)中的混合物旋转 3 小时。如果苯胺仍未溶解，则加入三乙胺(3.5 当量)。混合液旋转过夜。过滤收集固体，用 CH_2Cl_2 , MeOH, CH_2Cl_2 , MeOH 和 CH_2Cl_2 洗涤。固体与所需胺 Ia(1.1 当量)在 CH_2Cl_2 (0.5 ml)和甲苯(1.5 ml)中的混合物加热到 80°C 振摇过夜，然后冷却到室温。过滤收集固体，用 CH_2Cl_2 ,
10 MeOH 和 CH_2Cl_2 洗涤。浓缩滤液得到产物。

一般性方法 M (用三光气从苯胺平行合成脲)

- 将适当的苯胺(1.2 当量), 三光气(0.4 当量), 和三乙胺(1.4 当量)在 CH_2Cl_2 中的混合物在 35°C 下加热 1 小时。冷却到室温，加入所需的胺 Ia(1
15 当量)。混合物搅拌过夜，用水和盐水洗涤，通过硫酸钠，浓缩得到粗产物，其经平行色谱纯化。

一般性方法 N (从硫代异氰酸酯平行合成硫脲)

- 将所需的胺 Ia (1 当量)和适当的硫代异氰酸酯 (1.2 当量)在 CH_2Cl_2 (2
20 ml)中的混合液搅拌过夜。用 MP-TsOH 混合液处理，并旋转振摇 3 小时。过滤收集固体，用 CH_2Cl_2 , MeOH 和 CH_2Cl_2 洗涤。将固体与 2 M NH_3 在 MeOH 中一起旋转振荡 2 小时。过滤收集固体，用 CH_2Cl_2 , MeOH 和 CH_2Cl_2 洗涤。浓缩滤液得到纯化产品。

- 25 一般性方法 O (氨基甲酸酯的平行合成)

将所需胺 Ia (1 当量)和适当的琥珀酰亚胺 (1.5 当量)在 CH_2Cl_2 (2 ml) 中的混合液搅拌过夜。如果反应未完全，则在 38°C 加热 1 小时。用水和盐水洗涤混合液，通过硫酸钠，浓缩得到粗产物，其经平行纯化步骤(分步梯度 5% MeOH/ CH_2Cl_2 , 10% MeOH/ CH_2Cl_2)纯化粗产物。

- 30 除非另有说明，所有非-水反应均在氮气氛下进行，硫酸钠被用于干

干燥所有有机层。纯化一般通过在硅胶(230-400 目)上的快速层析或者在来自 Analtech, Inc., Newark, DE 的 Uniplate Silica Gel GF PLC 板上的制备性 TLC 进行。使用的氧化铝是碱性的并具有 6 wt % H₂O(Brockmann III)。在毛细管中进行的熔点测试未校正。在 KBr 中测定 IR 光谱。在 CDCl₃ 中进行 NMR 光谱, 除非另有说明。在 300 MHz 设备上记录 ¹H NMR 光谱, 在 75.5 MHz 记录 ¹³C NMR 光谱。用电子喷射离子化实现质谱分析。在配备有二极管阵列分光计(量程 190-300 nm; Hewlett Packard)的 Shimadzu 系统上进行分析型反相 HPLC。固定相是 Zorbax SB-苯基 Rapid Resolution 柱(4.6 mm x 50 mm; Hewlett Packard), 流动相 A 是 0.1%三氟乙酸, 流动相 B 是 CH₃CN。流速 2.5 ml/min, 使用 5 分钟内 20-55% B 的线性梯度, 然后 5 分钟内 55-20% B 的线性梯度。所有平行分析反应均预先被旋转振荡过夜的封管中进行。连续用 CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂ 洗涤, 用前置于真空下干燥。所有来源于平行合成反应的产品均经 HPLC-MS 鉴定。

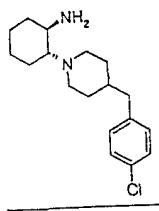
15

实施例

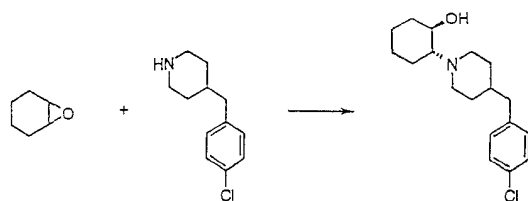
如反应路线和实施例所描述, 下列制备(1-7)用于制备可用于制备本发明化合物合成中间体。

制备 1: 制备(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环己基胺

20



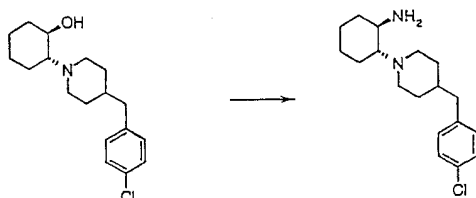
25 步骤 A: 制备(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环己醇



30

按照方法 A, 在 80°C 下, 用在 EtOH(0.5 ml) 中的 7-氧杂-双环[4.1.0]庚烷(0.25 ml, 2.5 mmol) 烷基化 4-(4-氯苯甲基)-哌啶(参见制备 7)(52 mg, 0.25 mmol) 3 天。用 90: 9.5: 0.5-80: 19: 1 CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH 层析粗产物, 得到棕褐色油状产物(68 mg, 88%), 其经放置后固化成乳状固体: mp
 5 100-101.3°C; IR 3379, 2929 cm⁻¹; ¹H NMR δ 1.05-1.76(m, 12H), 2.02(dt, J = 2.4, 11.6 Hz, 1H), 2.06-2.20(m, 2H), 2.49(d, J=7.0 Hz, 2H), 2.51-2.64(m, 2H), 2.79(m, 1H), 3.34(m, 1H), 4.05(m, 1H), 7.06(m, 2H), 7.24(m, 2H); MS m/z 308(M + H)⁺. Anal.(C₁₈H₂₆ClNO) C, H, N.

10 步骤 B: 制备(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环己基胺



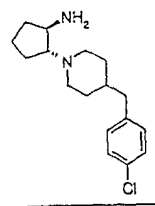
15

在 0°C 下, 连续用 Et₃N(350 μl, 2.53 mmol) 和 MeSO₂Cl(194 μl, 2.53 mmol) 处理(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环己醇(390 mg, 1.27 mmol) 在 CH₂Cl₂(6 ml) 中的溶液, 在 0°C 下搅拌 2 小时, 在 CH₂Cl₂ 和 10% NH₄OH 之间分配。水相用 CH₂Cl₂ 萃取, 萃取液用盐水洗涤, 干燥并浓缩。将残渣在 THF(3 ml) 和 28-30 wt % NH₄OH (1.2 ml) 中的溶液在 70°C 下搅拌 24
 20 小时, 冷却至室温, 在 EtOAc 和 1 N NaOH 之间分配。水相用 EtOAc 萃取, 萃取液用盐水洗涤, 干燥并浓缩。在氧化铝上用 1: 3 EtOAc: MeOH 至 100% MeOH 层析残渣, 随后在氧化铝上用 20: 1 己烷: EtOAc 至 100%
 25 EtOAc, 随后用 3: 1 EtOAc: MeOH 至 100% MeOH 层析, 得到棕褐色油状产物(260 mg, 67%), 其经放置后固化: mp 69.1-70.4°C; ¹H NMR δ 1.03-1.34(m, 6H), 1.37-1.52(m, 1H), 1.57-1.77(m, 5H), 1.92-2.05(m, 3H), 2.48(d, J= 7.0 Hz, 2H), 2.45-2.64(m, 3H), 2.73(m, 1H), 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); MS m/z 307(M + H)⁺.

30

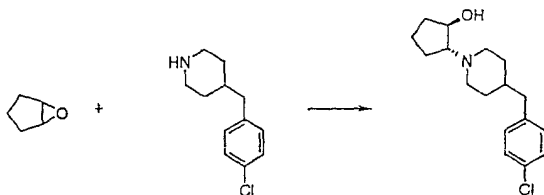
制备 2: 制备(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环戊胺

5



步骤 A: 制备(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环戊醇

10



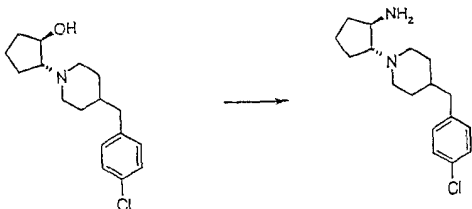
15

按照方法 A, 在 95°C 下搅拌 4-(4-氯苯甲基)-哌啶(17.86 g, 85.05 mmol) 和 6-氧杂-双环[3.1.0]己烷(50 g, 0.6 mol)在 EtOH(170 ml)中的溶液 40 小时, 冷却至室温并浓缩。将残渣在热 CH₂Cl₂(80 ml)中结晶, 将结晶的混合物浓缩至一半体积, 在 0°C 下保持过夜, 过滤, 并用冷的己烷漂洗沉淀, 得到棕褐色固体状产物(18.2 g, 73%)。将母液浓缩至一半体积, 用 CH₂Cl₂ 稀释, 保持在 -10°C 下 1 小时, 并用冷的 CH₂Cl₂ 和己烷漂洗沉淀, 得到另外的棕褐色固体状产物(1.8 g, 7%): mp 104.1-105.5°C; IR 3436, 2928 cm⁻¹; ¹H NMR δ 1.19-1.75(m, 8H), 1.81-1.99(m, 4H), 2.06(dt, J= 2.5, 11.7 Hz, 1H), 2.47(m, 1H), 2.50(d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.90(m, 1H), 3.07(m, 1H), 4.10(m, 1H), 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); ¹³C NMR δ 21.63, 27.35, 32.01, 32.15, 34.31, 37.87, 42.47, 50.47, 52.97, 75.15, 75.22, 128.27, 130.43, 131.55, 139.04; MS m/z 294(M + H)⁺. Anal.(C₁₇H₂₄ClNO·0.1H₂O) C, H, N.

25

步骤 B: 制备(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环戊基胺

30

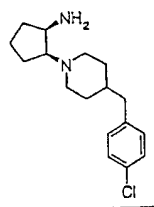


按照一般性方法 B, 在 0°C 下, 连续用 Et₃N(190 μl, 1.4 mmol)和 MeSO₂Cl (110 μl, 1.4 mmol)处理(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环戊醇(205 mg, 0.697 mmol)在 CH₂Cl₂(2.8 ml)中的溶液, 在 0°C 下搅拌 1 小时, 在 CH₂Cl₂ 和 10% NH₄OH 之间分配。水相用 CH₂Cl₂ 萃取, 萃取液用盐水洗涤, 干燥并浓缩, 得到 220 mg 油。将残渣(110 mg)在二氧杂环己烷(2 ml)和 28-30 wt % NH₄OH (0.8 ml)中的溶液在 70-80°C 下搅拌过夜, 冷却至室温, 并浓缩。将残渣在 EtOAc 和 1 N NaOH 之间分配, 水相用 EtOAc 萃取, 萃取液用盐水洗涤, 干燥并浓缩。在氧化铝上用 10: 1 己烷: EtOAc 至 100% EtOAc, 随后用 95: 4.75: 0.25-60: 38: 2 CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH 层析残渣, 得到油状产物(87 mg, 85%): ¹H NMR δ 1.18-1.71(m, 9H), 1.76-2.00(m, 3H), 2.07(dt, J= 2.4, 11.5 Hz, 1H), 2.31(m, 1H), 2.50(d, J= 6.9 Hz, 2H), 2.86-2.99(m, 2H), 3.19(m, 1H), 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); MS m/z 293.2(M + H)⁺.

15

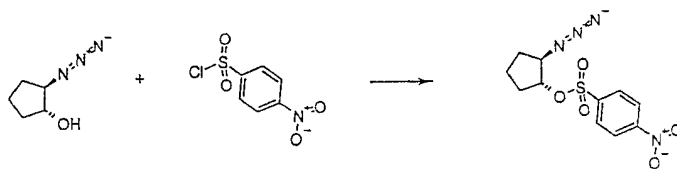
制备 3: 制备(±)-顺-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环戊基胺

20



步骤 A: 制备(±)-反-4-硝基-苯磺酸 2-叠氮基-环戊基酯

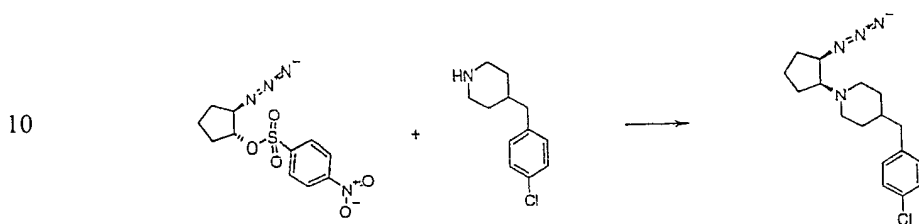
25



在 0°C 下, 连续用吡啶(0.88 ml, 10.9 mmol)和 4-硝基-苯磺酰氯(2.22 g, 10.0 mmol)处理(±)-反-2-叠氮基-环戊醇(1.27 g, 10.0 mmol)(Zhang, Z. da; Scheffold, R. Helv. Chim. Acta 1993, 76, 2602)在 CH₂Cl₂ (14 ml)中的溶液, 缓慢升温至室温。将残渣搅拌 4 天, 在此期间加入另外的吡啶(0.9 ml, 11

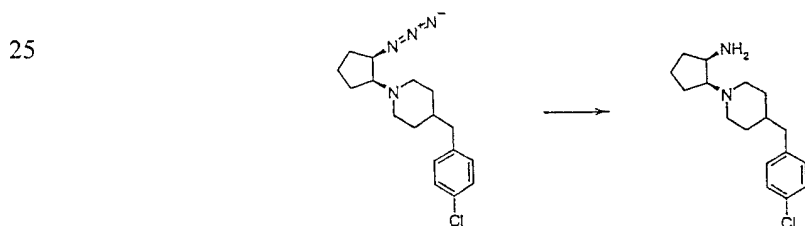
mmol)和 4-硝基-苯磺酸(2.2 g, 10 mmol), 在 CH_2Cl_2 和 1 N HCl 之间分配。水相用 CH_2Cl_2 萃取, 萃取液用饱和 NaHCO_3 洗涤, 干燥并浓缩。用 10:1-4:1 己烷: EtOAc 层析残渣, 得到黄色油状产物(2.63 g, 84%): $^1\text{H NMR } \delta$ 1.61-1.90(m, 4H), 2.00-2.16(m, 2H), 3.96(m, 1H), 4.72(m, 1H), 8.14(m, 2H), 8.43(m, 2H).

步骤 B: 制备(±)-顺-1-(2-叠氮基-环戊基)-4-(4-氯苯甲基)-哌啶



将(±)-反-4-硝基-苯磺酸 2-叠氮基-环戊基酯(630 mg, 2.0 mmol), 4-(4-氯苯甲基)-哌啶(420 mg, 2.0 mmol)和 Et_3N (280 μl , 2.0 mmol)在 CH_3CN (4 ml)中的浑浊溶液在室温下搅拌 10 天, 在 65°C 下 2 天, 冷却至室温, 并浓缩。残渣在 CH_2Cl_2 和 1 N HCl 之间分配, 水相用 CH_2Cl_2 萃取, 干燥并浓缩萃取液。用 20: 1-1: 1 己烷: EtOAc 层析残渣, 随后用 100% CH_2Cl_2 至 95: 4.75: 0.25 CH_2Cl_2 : MeOH: NH_4OH 层析, 得到棕褐色油状产物(145 mg, 22%): $^1\text{H NMR } \delta$ 1.32-1.90(m, 13H), 2.33(m, 1H), 2.49(d, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.96(m, 1H), 3.06(m, 1H), 4.04(t, $J=4.0$ Hz, 1H), 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); MS m/z 319.2(M-H) $^-$.

步骤 C: 制备(±)-顺-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环戊基胺

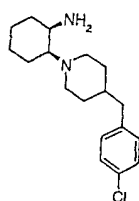


连续用 PPh_3 (514 mg, 1.96 mmol)和水(141 μl , 7.83 mmol)处理(±)-顺-1-(2-叠氮基-环戊基)-4-(4-氯苯甲基)-哌啶(210 mg, 0.65 mmol)在 THF(2.5

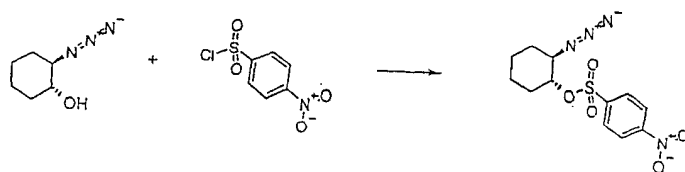
ml)中的溶液,回流 3.5 小时,冷却至室温,并浓缩。用 90: 9.5: 0.5-75: 23.75: 1.25 CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH 层析,得到无色油状产物(183 mg, 95 %), 其经放置后固化成乳状固体: mp 69.6-71.3°C; ¹H NMR δ 1.20-1.35(m, 2H), 1.43-1.93(m, 11H), 2.17(m, 1H), 2.49(d,J= 6.9 Hz, 2H), 2.89-3.02(m, 2H),
 5 3.34(t,J= 4.4 Hz, 1H), 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); ¹³C NMR δ 20.72, 27.08, 32.48, 32.61, 38.32,42.95,52.14, 53.09, 53.61, 71.49, 128.63, 130.80, 131.88, 139.58; MS m/z 293.2(M + H)⁺.

制备 4: 制备(±)-顺-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环己胺

10



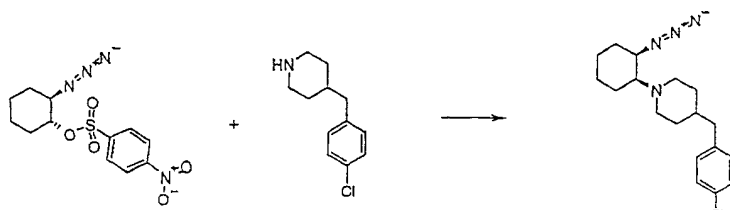
15 步骤 A: 制备(±)-反-4-硝基-苯磺酸 2-叠氨基-环己基酯



20

在 0°C 下,连续用吡啶(14.2 ml, 176 mmol)和 4-硝基-苯磺酰氯(35.6 g, 160 mmol)处理(±)-反-2-叠氨基-环己-1-醇(11.3 g, 80.0 mmol) (Zhang, Z. da; Scheffold, R. Helv. Chim. Acta 1993, 76, 2602)在 CH₂Cl₂ (110 ml)中的溶液,缓慢升温至室温。将残渣搅拌 4 天,在 CH₂Cl₂ 和 1 N HCl 之间分配。
 25 水相用 CH₂Cl₂ 萃取,萃取液用饱和 NaHCO₃ 洗涤,干燥并浓缩。用 10:1-1:1 己烷: EtOAc 层析残渣,得到乳状固体产物(19 g, 72%): ¹H NMR δ 1.19-1.39(m, 3H), 1.53-1.82(m, 3H), 2.00-2.10(m, 1H), 2.26(m, 1H), 3.36(m, 1H), 4.35(ddd, J= 4.7, 9.2, 10.8 Hz, 1H), 8.17(m, 2H), 8.41(m, 2H).

30 步骤 B: 制备(±)-顺-1-(2-叠氨基-环己基)-4-(4-氯-苯甲基)-哌啶

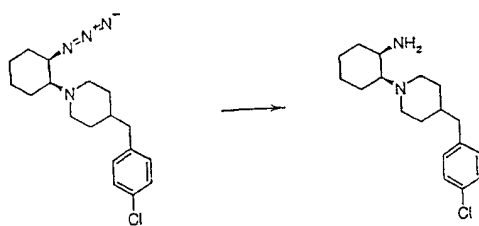


5

将(±)-反-4-硝基-苯磺酸 2-叠氨基-环己基酯(1.77 g, 5.41 mmol), 4-(4-氯苯甲基)-哌啶(1.14 g, 5.43 mmol),和 Et₃N(0.75 ml, 5.4 mmol) 在 CH₃CN (11.2 ml)中的浑浊溶液在室温下搅拌 17 小时, 在 65°C下 31 小时, 和在 80°C下 5 天冷却至室温, 并浓缩。残渣在 CH₂Cl₂ 和 1 N NaOH 之间
10 分配,水相用 CH₂Cl₂ 萃取,干燥并浓缩萃取液。用 98: 1.9: 0.1-95: 4.75: 0.25 CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH 至 100 % MeOH 层析残渣, 随后用 10: 1 己烷: EtOAc 至 100% EtOAc, 随后用 95: 5 EtOAc: MeOH 层析, 得到依次洗脱的起始的(±)-反-4-硝基-苯磺酸 2-叠氨基环己基酯(1.2 g, 68%), 所需产物 (155 mg, 9%), 和起始的 4-(4-氯苯甲基)-哌啶(810 mg, 71%)。产物: ¹H
15 NMR δ 1.19-1.81(m, 12H), 1.92-2.08(m, 3H), 2.22(m, 1H), 2.48(d, J= 7.0 Hz, 2H), 3.02(m, 2H), 4.05(m, 1H), 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); MS m/z 333.2(M+H)⁺.

步骤 C: 制备(±)-顺-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环己胺

20



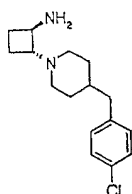
25

连续用 PPh₃(364 mg, 1.39 mmol)和水(141 μl, 5.56 mmol)处理(±)-顺-1-(2-叠氨基-环己基)-4-(4-氯苯甲基)-哌啶(155 mg, 0.463 mmol)在 THF(1.8 ml)中的溶液,回流 3 小时,冷却至室温,并浓缩。用 95: 4.75: 0.25-75: 23.75: 1.25 CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH 层析, 得到乳状固体产物(121 mg, 85 %): ¹H
30 NMR δ 1.14-1.93(m, 15H), 1.96(dt, J= 11.8, 3.5 Hz, 1H), 2.48(d, J= 7.0 Hz, 2H), 3.03-3.13(m, 2H), 3.30(m, 1H), 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); MS m/z

307.2(M + H)⁺.

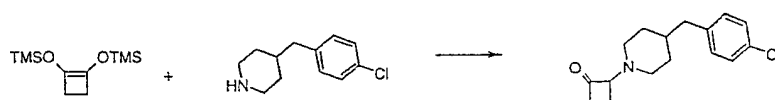
制备 5: 制备(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环丁胺

5



步骤 A: 制备(±)-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环丁酮

10



在 0°C、氩气氛下，在 15 分钟逐滴用 4-(4-氯苯甲基)-哌啶(4.56 g, 21.7
15 mmol)在 MeOH(10.9 ml)中的溶液处理 1,2-双(三甲基甲硅烷氧基)环丁烯
(5.0 g, 22 mmol)，并升温至室温。在 5 小时内搅拌反应，在此期间加入另
外的 1,2-双(三甲基甲硅烷氧基)环丁烯(0.99 g, 4.3 mmol)，并浓缩。用 95:
4.75: 0.25 CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH 层析残渣，得到黄色油状产物(4.8 g, 80
20 %): ¹H NMR δ 1.20-1.35(m, 2H), 1.43-1.64(m, 3H), 1.93-2.18(m, 4H), 2.49(d,
J = 6.9 Hz, 2H), 2.64-2.91(m, 3H), 3.14(m, 1H), 3.90(m, 1H), 7.05(m, 2H),
7.23(m, 2H); MS m/z 278.1(M + H)⁺.

步骤 B: 制备(±)-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环丁酮 O-甲基-肟

25



将(±)-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环丁酮(1.74 g, 6.26 mmol)和
MeONH₂·HCl(2.63 g, 31.3 mmol)在 MeOH(20 ml)中的溶液在 65°C 下搅拌 3
30 小时，冷却至室温，并浓缩。残渣在 CH₂Cl₂ 和饱和 NaHCO₃ 之间分配，

水相用 CH_2Cl_2 萃取, 干燥萃取液, 并浓缩。用 95: 4.75: 0.25 CH_2Cl_2 : MeOH : NH_4OH 层析残渣, 得到一种立体异构体占优势的棕色油状产物(1.5 g, 78 %): $^1\text{H NMR } \delta$ 1.05-1.65(m, 4.5H), 1.92-2.11 (m, 4H), 2.45-2.65(m, 3H), 2.73-2.96(m, 2H), 3.22(m, 1H), 3.73(m, 1H), 3.82(m, 3H), 4.57(m, 0.5H),
5 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); MS m/z 307.1(M + H)⁺.

步骤 C: 制备(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环丁胺

10



15

20

25

在氩气氛下, 逐滴用三氟乙酸(1.23 ml, 16.0 mmol)处理 NaBH_4 (604 mg, 16.0 mmol)在 THF(13 ml)中的混合物, 搅拌 5 分钟, 逐滴用(±)-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环丁酮 O-甲基-肟(985 mg, 3.21 mmol)在 THF(35 ml)中的溶液处理, 并在室温下搅拌 5 小时。小心用 6 N HCl(1.5 ml)处理混合物直到 pH 大约为 2, 搅拌 10 分钟, 用 8 N NaOH 碱化直至 pH 大约为 10, 并在 EtOAc 和 1 N NaOH 之间分配。水相用 EtOAc 萃取, 用盐水洗涤萃取液, 干燥(Na_2SO_4)并浓缩。将残渣在 MeOH (30 ml)和 1 N HCl(3 ml)中的溶液在 50°C 下搅拌 1 小时, 在 75°C 下搅拌 5 小时, 冷却至室温, 并浓缩。
20 将残渣在 CH_2Cl_2 和 1 N NaOH 之间分配, 水相用萃取 CH_2Cl_2 萃取, 干燥并浓缩萃取液。在氧化铝上用 10: 1 己烷: EtOAc 至 100% EtOAc, 随后用 98: 1.9: 0.1-90: 9.5: 0.5 CH_2Cl_2 : MeOH : NH_4OH 层析残渣, 得到黄色油状产物($^1\text{H NMR}$ 80%纯度), 其使用不经过进一步纯化: $^1\text{H NMR } \delta$ 1.19-1.90(m, 9H), 2.11(m, 1H), 2.28(m, 1H), 2.44-2.59(m, 3H), 2.80(m, 1H), 3.05(m, 1H),
25 3.22(m, 1H), 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); MS m/z 279.2(M + H)⁺.

制备 6: 制备(±)-顺-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环丁胺

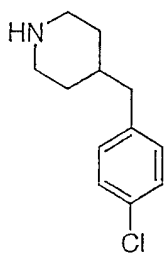
30



将(±)-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环丁酮 O-甲基-肟(438 mg, 1.43 mmol)在 THF(13 ml)中氩气氛下的溶液逐滴用在 THF(8.6 ml, 8.6 mmol)中的 1 M $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ 复合物处理, 在室温下搅拌 3 小时, 在 75°C 下搅拌 20 小时。小心用 6 N HCl(1 ml)处理直到 pH 大约为 2。蒸发 THF, 在 75°C 下搅拌残渣在 EtOH(9 ml)和 6 N HCl(1 ml)中的溶液 1 小时。然后冷却至室温, 用 8 N NaOH(4 ml)碱化直至 pH 大约为 10, 用水(5 ml)稀释直到溶解得到的白色沉淀, 并浓缩。将残渣在 CH_2Cl_2 和 1 N NaOH 之间分配, 水相用萃取 CH_2Cl_2 萃取, 干燥并浓缩萃取液。用 90: 9.5: 0.5-60: 38: 2 CH_2Cl_2 : MeOH: NH_4OH 层析残渣, 得到依次洗脱出 70 mg 无色油状的所需产物(^1H NMR 80%纯度), 其使用不经过进一步纯化, 48 mg(12%)纯的无色油状的所需产物, 和 125 mg 所需产物、立体异构的(±)-反-2-[4-(4-氯苯甲基)哌啶-1-基]-环丁胺和未确定的杂质的混合物。产物: ^1H NMR δ 1.19-1.70(m, 8H), 1.89-2.05(m, 3H), 2.50(d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.56(m, 1H), 2.78(m, 2H), 3.44(m, 1H), 7.06(m, 2H), 7.23(m, 2H); ^{13}C NMR δ 24.39, 25.56, 31.63, 31.76, 38.01, 42.61, 49.17, 49.63, 51.74, 62.51, 128.25, 130.42, 131.50, 139.16; MS m/z 279.2($M + 1$) $^+$ 。

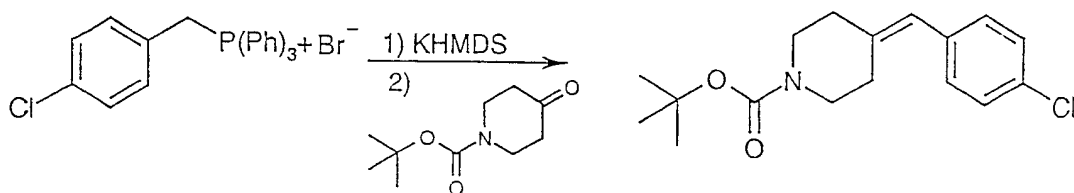
制备 7: 制备 4-(4-氯苯甲基)-哌啶

20



25

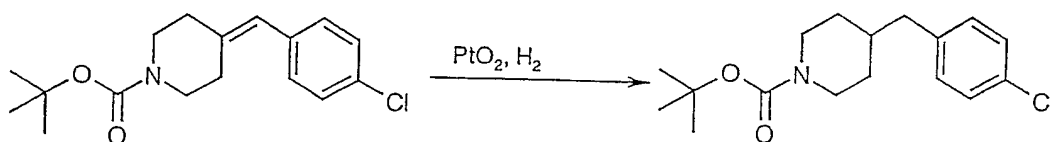
步骤 A: 制备 4-(4-氯-苯亚甲基)-哌啶-1-羧酸叔-丁基酯



3

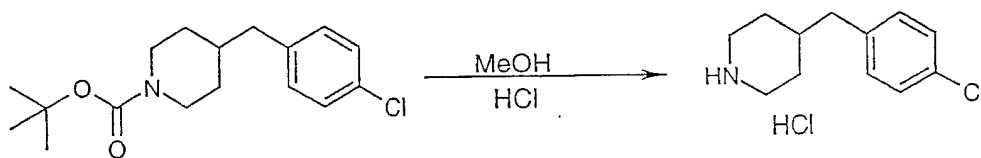
将磷鎓盐(10g)置于 THF 中, 放置于冰浴上。缓慢加入 KHMDS (42ml), 除去冰浴, 在室温下搅拌反应 45 分钟。然后将反应溶液冷却至-78 °C, 缓慢加入酮(4.2g)。搅拌反应 30 分钟, 除去冷却浴, 并在室温下搅拌过夜。将反应溶液倒入饱和 NH₄Cl(100ml)溶液中, 进行层分离, 水层用 EtOAc 洗涤两次, 合并有机层, 干燥(硫酸镁), 并浓缩至大约 40ml。用己烷稀释溶液, 过滤除去主要的 Ph₃PO。用 20: 1-10: 1 己烷: EtOAc 层析粗产物, 得到无色油状产物(4.7g)。

10 步骤 B: 制备 4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-羧酸叔-丁基酯



15 将保护的哌啶(10g)溶解于 EtOAc(100ml)中, 加入 PtO₂, 并在氢气氛下搅拌混合物 3 小时。通过硅藻土过滤混合物, 并浓缩。将粗产物置于热己烷中, 过滤, 并使其结晶。用热己烷重结晶产物得到纯净的产物(8.0g)。从母液分离另外的产物。

20 步骤 C: 制备 4-(4-氯苯甲基)哌啶



25 将甲醇(400ml)置于冰浴中, 加入 AcCl(60ml)。完成加入后, 在室温下搅拌溶液 1 小时。加入保护的哌啶(62.8g), 在室温下搅拌溶液过夜。将反应溶液浓缩至大约 70ml (当产物开始沉淀出来), 用乙醚(500ml)稀释, 通过过滤(44.9g)收集产物。从母液收集另外的 3.1g 产物。

30 实施例 1: 应用一般性方法 E, 使用合适的胺 1a 和羧酸制备下列化合物

环己烷羧酸{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-酰胺

实施例 2: 应用一般性方法 K, 使用合适的胺 1a 和异氰酸酯 $R^4N=C=O$ 制备下列化合物

- 5 1-烯丙基-3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲;
 1-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-3-异丙基-脲;
 1-丁基-3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲; 和
 3-(3-{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-脲基)-丙酸乙
 酯;

10

实施例 3: 应用一般性方法 J, 使用合适的胺 1a 和异氰酸酯 $R^4N=C=O$ 制备下列化合物

{(1R, 2R)-2-[4-(4-氯-苯甲基)-哌啶-1-基]-环戊基}-3-环己基-脲。

15 实施例 4 制剂实施例

下列是包含式 (I) 化合物的有代表性的药物制剂。
片剂制剂

充分混合下列成分, 并将其压成单一刻痕 (scored) 的片剂。

成分	每片数量, mg
本发明化合物	400
玉米淀粉	50
交联羧甲基纤维素钠	25
乳糖	120
硬脂酸镁	5

20 胶囊制剂

充分混合下列成分, 并将其装入硬壳明胶胶囊。

成分	每胶囊数量, mg
本发明化合物	200
乳糖, 喷雾干燥	148

硬脂酸镁

2

混悬液制剂

混合下列成分以形成用于口服给药的混悬液。

成分	量
本发明化合物	1.0 g
反丁烯二酸	0.5 g
氯化钠	2.0 g
对羟基苯甲酸甲酯	0.15 g
对羟基苯甲酸丙酯	0.05 g
粒状糖	25.5 g
山梨醇 (70%溶液)	12.85 g
Veegum K(Vanderbilt 公司)	1.0 g
调味剂	0.035 ml
着色剂	0.5 mg
蒸馏水	补足到100 ml

5

注射剂制剂

混合下列成分形成注射剂制剂。

成分	量
本发明化合物	0.2 g
乙酸钠缓冲溶液,	0.4M 2.0 ml
HCl (1N) 或 NaOH (1N)	补足至适当的pH
水(蒸馏过的, 无菌)	补足到20 ml

10

脂质体制剂

混合下列成分形成脂质体制剂。

成分	量
本发明化合物	10 mg
L- α -磷脂酰胆碱	150 mg
叔丁醇	4 ml

5 冷冻干燥样品，冻干过夜。用 1 ml 0.9% 盐水溶液重新调配样品。通过超声波降解可以减少脂质体的粒径。

实施例 5：体外 CCR-3 受体结合检测

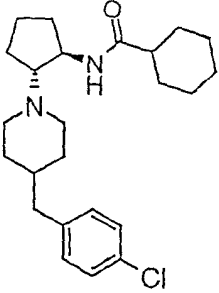
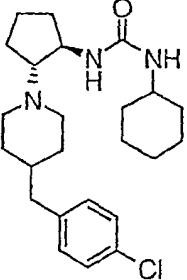
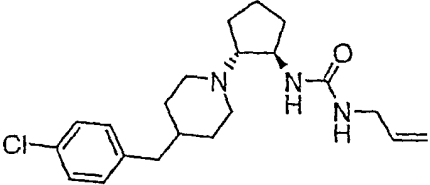
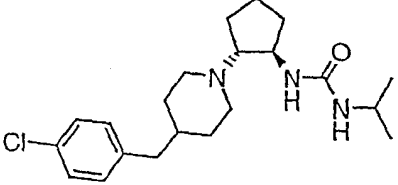
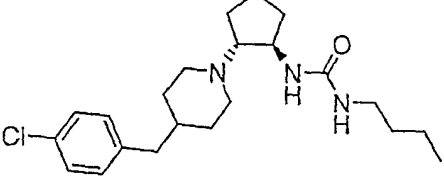
本发明化合物的 CCR-3 拮抗活性可通过它们抑制 ^{125}I eotaxin 与 CCR-3 L1.2 转染细胞结合的能力来测定(参阅 Ponath, P. D.等, J. Exp. Med., 10 183 卷, 2437-2448, (1996))。

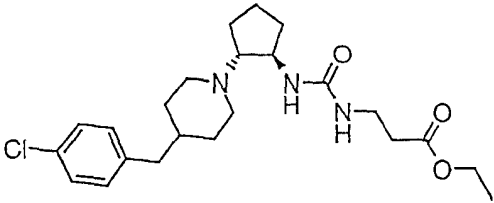
试验在 Costar 96-孔聚丙烯圆底平板中进行。将测试化合物溶解在 DMSO 中，然后用结合缓冲液（50 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0.5% 牛血清清蛋白(BSA), 0.02%叠氮化钠, pH 7.24) 稀释以使 DMSO 的终浓度为 2%。将 25 μl 测试溶液或只含有 DMSO 的缓冲液（对 15 照试样）加至每个孔，接着加入 25 μl ^{125}I -eotaxin (100 pmol) (NEX314, New England Nuclear, Boston, Mass.) 和 25 μl 结合缓冲液中的 1.5×10^5 CCR-3 L1.2 转染细胞。最终反应体积为 75 μl 。

在室温下温育反应混合物 1 小时以后，通过将反应混合物滤过聚氮丙 20 啶处理的 Packard Unifilter GF/C 滤板 (Packard, Chicago, Ill.) 终止反应。用冰冷的包含 10 mM HEPES 和 0.5 M 氯化钠的洗涤缓冲液 (pH 7.2) 洗涤滤器 4 次，并在 65°C 下干燥约 10 分钟。加入 25 μl /孔 Microscint-20[®] 闪烁液 (Packard) 并通过使用 Packard TopCount[®] 测定保留在滤器上的放射性。

本发明的化合物在该测试中具有活性。

25

化合物	IC50 (μM)
	2.9116
	0.3975
	0.4993
	0.8846
	0.5071

化合物	IC ₅₀ (μM)
5 	0.7289

实施例6: 抑制 Eotaxin 介导的 CCR-3 L1.2 转染细胞的趋化性-体外试验

10 本发明化合物的 CCR-3 拮抗活性可通过使用一种少许改进的方法测量抑制 eotaxin 介导的 CCR-3 L1.2 转染细胞的趋化性来测定, 在 Ponath, P.D.等, J. Clin. Invest. 97: 604-612 (1996) 中描述了该方法。试验在 24-孔的化学趋化皿(协作生物学产品)中进行。在培养基中培养 CCR-3 L1.2 转染细胞, 所述培养基含有 RPMI 1640, 10% Hyclone[®]胎牛血清, 55 mM 2-巯基乙醇和遗传霉素 418 (0.8 mg/ml)。测定前 18-24 小时, 用正丁酸以 5 mM/1 x 10⁶ 个细胞/ml 的终浓度处理转染细胞, 分离该细胞并

15 并以 1 x 10⁷ 个细胞/ml 的水平再悬浮在测定介质中, 测定介质含有相等份的 RPMI 1640 和培养基 199 (M199) 及 0.5% 牛血清白蛋白。

将 1 mg/ml 悬浮在磷酸盐缓冲液中的人 eotaxin 加入到底腔中, 使最终浓度为 100 nm。将微孔尺寸为 3 微米的 Transwell 培养插入物 (Costar 公司, Cambridge, Mass.) 插入每个孔, 并将 L1.2 细胞(1 x 10⁶) 以最终体积为 100 μl 加到顶腔中。将 DMSO 中的测试化合物加到顶腔和底腔两腔中使得最终 DMSO 的体积为 0.5%。测定是相对于两组对照进行的。阳性对照在顶腔中包含细胞, 无测试化合物, 并在下腔中仅有 eotaxin。阴性

20 对照在顶腔中包含细胞, 无测试化合物, 而在下腔中既无 eotaxin, 也无测试化合物。平板在 37°C 下温育。4 小时后, 从腔中移去插入物, 迁移到底腔的细胞的计数是用移液管从下腔吸出 500 μl 细胞悬浮液, 移到 1.2 ml Cluster 管(Costar)中并在 FACS 上计数 30 秒来对它们计数。

30 实施例 7: 抑制 Eotaxin 介导的人嗜曙红细胞的趋化性-体外试验

本发明化合物抑制 eotaxin 介导的人嗜曙红细胞趋化性的能力可使用一种稍微改进的方法来评估,该方法在 Carr, M.W.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3652-3656 (1994)中有描述。实验是使用24-孔化学趋化板 (Costar公司, Cambridge, Mass.)进行。嗜曙红细胞使用在 PCT 申请, 公开号 WO 96/22371 中描述的方法从血液中分离。使用的内皮细胞是内皮细胞系 ECV 304, 其从欧洲动物细胞培养物保藏(Porton Down, Salisbury, 英国)处得到。内皮细胞在直径为6.5 mm, 孔径为3.0 μM 的Biocoat. RTM. Transwell组织培养插入物 (Costar 公司, Cambridge MA)上培养。ECV 304 细胞的培养基由 M199, 10% 胎牛血清, L-谷氨酰胺和抗生素组成。测定介质由相等份的 RPMI 1640和 M199 及 0.5% 牛血清白蛋白组成。测定前 24 小时, 将 2×10^5 ECV 304 铺在24-孔化学趋化皿的各插入物上并在 37°C下温育。将在测定介质中稀释的20 nM eotaxin 加入到底腔, 底腔最终体积是 600 μl 。将内皮细胞覆盖的组织培养插入物插入每个孔中。将悬浮在 100 μl 测定缓冲液中的 10^6 个嗜曙红细胞加到顶腔中。将测试化合物溶解在DMSO中, 加到顶腔和底腔两处, 使得各孔中最终DMSO体积是 0.5%。相对于两组对照进行测定。阳性对照在顶腔中含有细胞, 并在下腔中有 eotaxin。阴性对照在顶腔中含有细胞, 而在下腔中仅有测定缓冲液。趋化皿在 5% CO_2 /95% 空气中在 37°C下温育1-1.5小时。

迁移到底腔的细胞用流动细胞计数法计数。从下腔取 500 μl 细胞悬浮液, 移到一个管子中, 通过一组 30 秒钟的时间周期取得的结果得到相对细胞计数。

实施例 8: 通过CCR-3拮抗剂抑制嗜曙红细胞流入卵清蛋白敏化的 Balb/c 小鼠的肺中-体内试验

本发明化合物抑制白血球渗入肺中的能力可以在用气雾剂抗原激发后, 测量嗜曙红细胞在卵清蛋白(OA)-敏化的 balb/c 小鼠的支气管肺泡灌洗 (BAL) 液体中的聚集的抑制来测定。简要地说, 重量为 20-25 g 的雄性 balb/c 小鼠用 OA (10 μg 在 0.2 ml 氢氧化铝溶液中) 在第 1 天和第 14 天腹膜内敏化。1 星期之后, 老鼠被分为 10 组。腹膜内, 皮下或口服给药测试化合物或仅载体 (对照组) 或抗 eotaxin 抗体 (阳性对照)。1 小时

后,老鼠被置于树脂玻璃箱内,被暴露在由 PARISTAR.TM.喷雾器(PARI, Richmond, Va.)产生的 OA 气雾剂中 20 分钟。未被敏化或者激发的老鼠被包括在内作为阴性对照。在 24 或 72 小时后,将老鼠麻醉(氨基甲酸乙酯,大约 1 g/kg, i.p.),插入套管导管(PE 60 管状材料),用 0.3 ml PBS 5 将肺灌洗 4 次。BAL 液体被转移到塑料管中并在冰上保存。20 μ l 的 BAL 液体等分试样中的总白血球用 Coulter Counter.TM.测定。使用一般形态标准通过光学显微镜在 Cytospin.TM.制剂上进行白血球分类计数,该制剂已经用修饰的 Wright 白血球染色剂(DiffQuick.TM.)染色。

为了清楚和理解的目的,通过举例说明和实施例已经详细地描述了前述发明。显然本领域技术人员可以在后附权利要求的范围内进行变化和改
10 进。因此,应当理解上述描述是意欲举例说明而不是限制性的。因此本发明的范围不应参考上述描述限定,而应该参考下列后附的权利要求,以及该权利要求被授权的等效物的全部范围来限定。

本发明引用的所有专利,专利申请和出版物完整的引用作为参考,目
15 的是与单个专利,专利申请或出版物被单独地指明的程度相同。