



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102361868 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 22

(21) 申请号 201080013260. 2

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2010. 01. 22

11105

代理人 陈桢

(30) 优先权数据

61/146, 849 2009. 01. 23 US

(51) Int. Cl.

C07D 413/14 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 31/4245 (2006. 01)

2011. 09. 23

A61P 37/00 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/021696 2010. 01. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02010/085584 EN 2010. 07. 29

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 A. J. 戴克曼 W. J. 皮茨

S. H. 沃特森

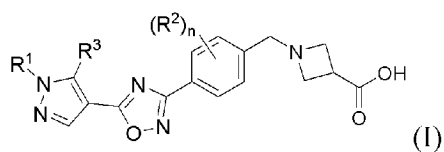
权利要求书 3 页 说明书 49 页

(54) 发明名称

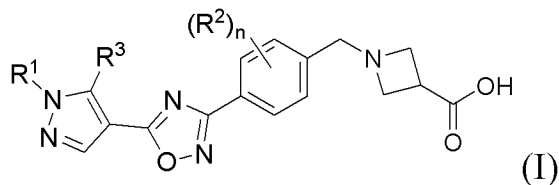
作为 1- 磷酸 - 鞘氨醇激动剂的吡唑 -1, 2,
4- 噁二唑衍生物

(57) 摘要

公开了式 (I) 的化合物或其药用盐, 其中 n 是 0 或选自 1-4 的整数; R¹ 是环烷基、芳基、杂芳基或杂环基, 每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C₁-C₆烷基、C₁-C₄卤代烷基、苄基、-OR⁴和 / 或卤素的取代基所取代; 并且 R²、R³、R⁴和 n 由本申请所定义。还公开了将这样的化合物用作 G 蛋白偶联受体 S1P₁ 的选择性激动剂的方法, 及包括这样的化合物的药物组合物。这些化合物可在许多治疗领域用于治疗、预防或减缓疾病或紊乱的进展, 诸如自身免疫性疾病和血管疾病。



1. 式 (I) 的化合物：



或其药用盐, 其中

n 是 0 或选自 1-4 的整数；

R^1 是环烷基、芳基、杂芳基或杂环基, 每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代；

每个 R^2 独立地选自氢、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素；

R^3 是氢、烷基、卤代烷基、卤素、 $-NR^aR^b$ 、环烷基、芳基、杂芳基或杂环基, 其中所述的环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代；

每个 R^4 独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基和 / 或苄基；及

R^a 和 R^b 中各自独立地为氢、烷基和 / 或苄基。

2. 权利要求 1 的化合物或其药用盐, 其中

R^1 是任选被 1、2 或 3 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的芳基。

3. 权利要求 2 的化合物或其药用盐, 其中

n 是 0；

R^1 是任选被 1、2 或 3 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的苯基；

R^3 是 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、卤素、 $-NR^aR^b$ 、 C_3-C_6 环烷基、苯基或吡啶基；

R^4 是 C_1-C_4 烷基；及

R^a 和 R^b 独立地为氢和 / 或 C_1-C_6 烷基。

4. 权利要求 3 的化合物或其药用盐, 其中

R^3 是甲基、乙基、丙 -1- 基、环戊基、三氟甲基、溴、氯、苯基、吡啶 -2- 基或 $-NHR^a$ ；及

R^a 是甲基、乙基、丙 -1- 基、丙 -2- 基、正丁基或异丁基。

5. 权利要求 1 的化合物或其药用盐, 其中

R^1 是环烷基、杂芳基或杂环基, 每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代。

6. 权利要求 5 的化合物或其药用盐, 其中

n 是 0；

R^3 是烷基、卤代烷基、卤素、 $-NR^aR^b$ 、环烷基、芳基、杂芳基或杂环基, 其中所述的环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代；

每个 R^4 独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基和 / 或苄基；及

R^a 和 R^b 各自独立地为氢、烷基和 / 或苄基。

7. 权利要求 6 的化合物或其药用盐, 其中

R^1 是吡啶基或环己基, 所述吡啶基或环己基任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代。

8. 权利要求 5 的化合物或其药用盐, 其中

R^1 是任选被 1、2 或 3 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的 C_3-C_6 环烷基; 及

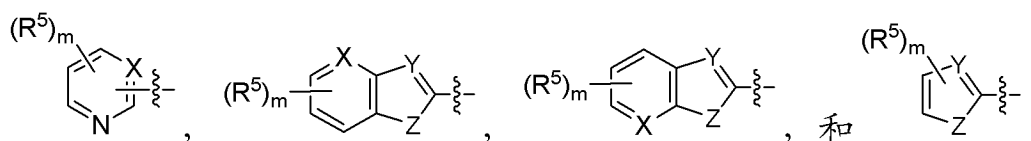
R^4 是 C_1-C_6 烷基。

9. 权利要求 5 的化合物或其药用盐, 其中

R^1 是任选被 1、2 或 3 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的杂芳基。

10. 权利要求 1 的化合物或其药用盐, 其中

R^1 选自:



其中

m 是 0、1、2 或 3;

X 和 Y 各自独立地为 N 和 / 或 CR^5 ;

Z 是 O 、 S 或 $N-R^6$;

每个 R^5 独立地选自 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素;

R^6 是 C_1-C_4 烷基或苄基; 及

每个 R^4 独立地选自 C_1-C_4 烷基。

11. 权利要求 10 的化合物或其药用盐, 其中

R^1 是任选被 1、2 或 3 个独立地选自 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的吡啶-2-基;

R^3 是 C_1-C_4 烷基、 C_3-C_6 环烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、卤素、苄基、吡啶基或 $-NR^aR^b$;

R^4 是 C_1-C_4 烷基; 及

R^a 和 R^b 各自独立地为氢和 / 或 C_1-C_4 烷基。

12. 权利要求 1 的化合物或其药用盐, 所述化合物选自下列所构成的组:

1-(4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(1-苄基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸 (2);

1-(4-(5-(5-(异丙基氨基)-1-苄基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(5-(乙基氨基)-1-苄基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(5-甲基-1-苄基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(5-正丙基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(5-环戊基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(1-(6-乙氧基吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(1-环己基-5-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(5-苯基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(5-氯-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(5-(异丁基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(5-(正丁基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

1-(4-(5-(5-溴-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;及

1-(4-(5-(1-苯基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸。

13. 组合物,包括权利要求1所述的化合物或其药用盐;和药学上可接受的载体。

14. 权利要求1所述的化合物或其药用盐在制备治疗自身免疫疾病或慢性炎症性疾病的药物中的用途。

15. 权利要求1所述的化合物或其药用盐,用于治疗自身免疫疾病或慢性炎症性疾病的疗法中。

作为 1- 磷酸 - 鞘氨醇激动剂的吡唑 -1,2,4- 噁二唑衍生物

技术领域

[0001] 本发明大体上涉及用作 S1P₁ 激动剂的取代的吡唑化合物。本申请提供了取代的吡唑化合物、包含所述化合物的组合物以及它们的使用方法。本发明还涉及包含至少一种本发明化合物的药物组合物,其用于治疗 S1P₁ 激动相关的病症,诸如自身免疫疾病和血管疾病。

背景技术

[0002] 已经证实 1- 磷酸 - 鞘氨醇 (Sphingosine-1-phosphate, S1P) 引起许多细胞效应,包括导致血小板聚集、细胞增殖、细胞形态学、肿瘤细胞侵入、内皮细胞和白细胞趋化作用、内皮细胞体外血管发生以及淋巴细胞运输的细胞效应。因此 S1P 受体为针对各种治疗应用诸如肿瘤生长抑制、血管疾病和自身免疫疾病的良好靶标。经名为 S1P₁ 或者 S1P₁、S1P₂ 或者 S1P₂、S1P₃ 或者 S1P₃、S1P₄ 或者 S1P₄ 以及 S1P₅ 和 S1P₅ (先前分别称为 EDG-1、EDG-5、EDG-3、EDG-6 和 EDG-8) 的一组 G 蛋白偶联受体将 S1P 信号部分传导至细胞。

[0003] S1P 对整个个体来说是重要的,因为其也是血管和免疫系统的主要调节剂。在血管系统中, S1P 调节血管发生、血管稳定性和渗透性。在免疫系统中,认为 S1P 是 T 细胞和 B 细胞运输的主要调节剂。免疫细胞由淋巴样器官 (诸如胸腺和淋巴结) 中流出而进入淋巴管的过程需要 S1P 与其受体 S1P₁ 的相互作用。因此,显示出 S1P 受体的调节对免疫调节来说是重要的,且 S1P 受体调节剂是新的免疫抑制剂。

[0004] S1P₁ 受体在许多组织中表达。S1P₁ 受体为在淋巴细胞中表达的主要家族成员且在淋巴细胞运输中发挥重要作用。S1P₁ 受体的下调扰乱淋巴细胞迁移及向多种组织的归巢 (homing)。这导致淋巴器官内的淋巴细胞的隔离并由此减少了能够迁移至受影响的组织的循环淋巴细胞的数目。因此,开发一种抑制淋巴细胞向与自身免疫和异常炎症过程相关的靶部位迁移的 S1P₁ 受体药物能够在许多自身免疫和炎性病症中有效。

[0005] 在五种 S1P 受体中, S1P₁ 具有广泛的分布且在內皮细胞中非常丰富,在所述內皮细胞中其与 S1P₃ 共同调节细胞迁移、分化和屏障作用。通过非选择性 S1P 受体调节来抑制淋巴细胞的再循环会产生防止移植排斥的临床免疫抑制,但所述调节也导致短暂的心动过缓。研究显示 S1P₁ 活性与循环淋巴细胞的缺失显著相关。相反, S1P₃ 受体激动作用对有效性来说不是必须的。取而代之的是, S1P₃ 活性在观察到的非选择性 S1P 受体激动剂的急性毒性中发挥重要作用,导致不期望的心血管效应,诸如心动过缓 and 高血压 (参见例如 Hale et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 14 :3501 (2004) ;Sanna et al., J. Biol. Chem., 279 :13839 (2004) ;Anliker et al., J. Biol. Chem., 279 :20555 (2004) ;Mandala et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 309 :758 (2004).)。

[0006] S1P₁ 激动剂的一个实例是 FTY720。该免疫抑制化合物 FTY720 (JPI1080026-A) 已经显示减少人和动物的循环淋巴细胞,并在器官排斥和免疫病症的动物模型中具有疾病调节活性。FTY720 在人类中的使用能够有效地减少人肾移植的器官排斥的速率并增加复发性间歇性多发性硬化症的缓解速率 (参见 Brinkman et al., J. Biol. Chem., 277 :

21453(2002);Mandala et al., Science,296:346(2002);Fujino et al., J.Pharmacol. and Exp. Ther.,305:45658(2003);Brinkman et al., Am.J. Transplant.,4:1019(2004); Webb et al., J.Neuroimmunol.,153:108(2004);Morris et al., Eur. J. Immunol.,35:3570(2005);Chiba, Pharmacology & Therapeutics,108:308(2005);Kahan et al., Transplantation,76:1079(2003);和 Kappos et al., N. Engl. J. Med.,335:1124(2006))。在上述发现之后,已经证实FTY720为一种前药,其在体内经鞘氨醇激酶磷酸化成为对S1P₁、S1P₃、S1P₄和S1P₅受体有激动剂活性的更具生物活性的药物。FTY720在动物和人体内的药理作用在很大程度上取决于其对S1P受体家族的活性。

[0007] 临床研究已经显示用FTY720进行治疗在最初的24小时治疗中导致心动过缓(Kappos et al., N. Engl. J. Med.,335:1124(2006))。普遍认为观察到的心动过缓是由于S1P₃受体的激动作用。上述结论基于很多基于细胞和动物的实验得出。这包括使用S1P₃敲除动物,这些动物不同于野生型小鼠,在给予FTY720以及使用S1P₁选择性化合物之后不能显示心动过缓(Hale et al., Bioorg. Med. Chem. Lett.,14:3501(2004);Sanna et al., J. Biol. Chem.,279:13839(2004);和 Koyrakh et al., Am. J. Transplant.,5:529(2005))。

[0008] 下述申请已经描述了作为S1P₁激动剂的化合物:WO 03/061567(美国公开2005/0070506)、WO 03/062248(美国专利7,351,725)、WO 03/062252(美国公开2005/0033055)、WO 03/073986(美国专利7,309,721)、WO 03/105771、WO 05/058848、WO 06/047195、WO 06/100633、WO 06/115188、WO 06/131336、WO 2007/024922、WO 07/116866、WO 08/023783(美国公开2008/0200535)和WO 08/074820。也参见Hale et al., J. Med. Chem.,47:6662(2004)。

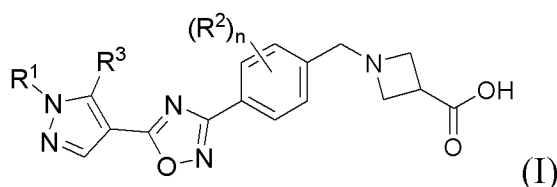
[0009] 仍然需要用作S1P₁激动剂而相对S1P₃更具选择性的化合物。

[0010] 申请人已经发现具有S1P₁激动剂活性的有效化合物。此外,申请人已经发现具有S1P₁激动剂活性并与对于S1P₃的选择性相比更高的化合物。提供这些化合物以用作具有对它们药物性(drugability)来说重要的预期稳定性、生物利用度、治疗指数和毒性值的药物。

发明内容

[0011] 为满足前述需要,本发明提供了式(I)的化合物或其药用盐,其中

[0012]



[0013] n是0或选自1-4的整数;

[0014] R¹是环烷基、芳基、杂芳基或杂环基,每个基团任选被1-5个独立地选自C₁-C₆烷基、C₁-C₄卤代烷基、苄基、-OR⁴和/或卤素的取代基所取代;

[0015] 每个R²独立地选自氢、C₁-C₆烷基、C₁-C₄卤代烷基、-OR⁴和/或卤素;

[0016] R³是氢、烷基、卤代烷基、卤素、-NR^aR^b、环烷基、芳基、杂芳基或杂环基,其中所述的环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每个基团任选被1-5个独立地选自C₁-C₆烷基、C₁-C₄卤

代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代；

[0017] 每个 R^4 独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基和 / 或苄基；及

[0018] R^a 和 R^b 中各自独立地为氢、烷基和 / 或苄基。

[0019] 同样描述的还有包含式 (I) 的化合物或其药用盐和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0020] 进一步描述了治疗与 G 蛋白偶联受体 $S1P_1$ 的活性有关的疾病或紊乱的方法，该方法包括给予哺乳动物患者式 (I) 的化合物或其药用盐。

[0021] 所述式 (I) 的化合物以及包含所述化合物的组合物为 $S1P_1$ 激动剂，其相对于 $S1P_3$ 活性而言对 $S1P_1$ 活性是具有选择性的。所述式 (I) 的化合物以及包含所述化合物的组合物可用于治疗、预防或者治愈各种 $S1P_1$ 受体相关的病症，同时降低或者最小化由于 $S1P_3$ 活性导致的副作用。包含这些化合物的药物组合物用于治疗、预防或者减慢各种治疗领域中的疾病或者病症的进程，诸如自身免疫疾病和血管疾病。

具体实施方式

[0022] 在一个具体实施方案中，提供了式 (I) 的化合物或其药用盐，其中

[0023] n 是 0 或选自 1-4 的整数；

[0024] R^1 是 C_3-C_8 环烷基、芳基、杂芳基或杂环基，每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代；

[0025] 每个 R^2 独立地选自氢、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素；

[0026] R^3 是 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、卤素、 $-NR^aR^b$ 、 C_3-C_8 环烷基、芳基、杂芳基或杂环基，其中所述的环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代；

[0027] 每个 R^4 独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基和 / 或苄基；及

[0028] R^a 和 R^b 各自独立地为氢、 C_1-C_6 烷基和 / 或苄基。

[0029] 在一个具体实施方案中，提供了式 (I) 的化合物或其药用盐，其中 n 是 0 或 1。

[0030] 在一个具体实施方案中，提供了式 (I) 的化合物或其药用盐，其中 n 是 0。

[0031] 在一个具体实施方案中，提供了式 (I) 的化合物的 2,2,2- 三氟乙酸盐。

[0032] 在一个具体实施方案中，提供了式 (I) 的化合物或其药用盐，其中 R^1 是任选被 1、2 或 3 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的芳基。优选地， R^1 是苯基。例如，该具体实施方案提供了其中 n 是 0 或 1 的式 (I) 的化合物。优选地， R^3 是 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_2 卤代烷基、卤素、 $-NH(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 C_3-C_6 环烷基、苯基或吡啶基，其中所述的环烷基、苯基和吡啶基中的每个基团任选被 1-3 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代。该具体实施方案包括以下化合物，其中 R^1 是任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的芳基，优选苯基；及 R^3 是卤代烷基、 $-NR^aR^b$ 、环烷基、杂芳基或杂环基，其中所述的环烷基、杂芳基和杂环基中的每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代。

[0033] 在一个具体实施方案中，提供了式 (I) 的化合物或其药用盐，其中 R^1 是任选被 1、2 或 3 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的苯基； R^3

是 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、卤素、 $-NR^aR^b$ 、 C_3-C_6 环烷基、苯基或吡啶基； R^4 是 C_1-C_4 烷基；及 R^a 和 R^b 独立地为氢和 / 或 C_1-C_6 烷基。例如，该具体实施方案提供了式 (I) 的化合物，其中 n 是 0 或 1；并且优选地， n 是 0。该具体实施方案的其它实例包括其中 R^3 是甲基、乙基、丙 -1- 基、环戊基、三氟甲基、溴、氯、苯基、吡啶 -2- 基或 $-NHR^a$ 的化合物；及其中 R^a 是甲基、乙基、丙 -1- 基、丙 -2- 基、正丁基或异丁基的化合物。

[0034] 在一个具体实施方案中，提供了式 (I) 的化合物或其药用盐，其中 R^1 是环烷基、杂芳基或杂环基，每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代。合适的 R^1 基团包括 C_3-C_8 环烷基、具有 1-2 个独立地选自 N、O 和 S 的杂原子的 1- 环杂芳基；及具有 1-2 个独立地选自 N、O 和 S 的杂原子 1- 环杂芳基。合适的 R^1 基团的实例包括但不限于环戊基、环己基、苯基、吡啶基、嘧啶基、吡唑基和哌啶基。该具体实施方案提供了式 (I) 的化合物，其中 n 是 0 或 1；并且优选地， n 是 0。该具体实施方案的其它实例包括其中 R^3 是甲基、乙基、丙 -1- 基、环戊基、三氟甲基、溴、氯、苯基、吡啶 -2- 基或 $-NHR^a$ 的化合物；及其中 R^a 是甲基、乙基、丙 -1- 基、丙 -2- 基、正丁基或异丁基的化合物。该具体实施方案包括以下化合物，其中 R^1 是环烷基、杂芳基或杂环基，优选为环戊基或吡啶基，每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代；及 R^3 是卤代烷基、 $-NR^aR^b$ 、环烷基、杂芳基或杂环基，其中所述的环烷基、杂芳基和杂环基中的每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代。

[0035] 在一个具体实施方案中，提供了式 (I) 的化合物或其药用盐，其中 R^1 是任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的环烷基。合适的 R^1 基团包括 C_3-C_8 环烷基和 C_3-C_6 环烷基。该具体实施方案提供式 (I) 的化合物，其中 n 是 0 或 1；并且优选地， n 是 0。该具体实施方案的其它实例包括其中 R^3 是甲基、乙基、丙 -1- 基、环戊基、三氟甲基、溴、氯、苯基、吡啶 -2- 基或 $-NHR^a$ 的化合物；及其中 R^a 是甲基、乙基、丙 -1- 基、丙 -2- 基、正丁基或异丁基的化合物。该具体实施方案包括以下化合物：其中 R^1 是环烷基，优选环戊基或环己基，每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代；及 R^3 是卤代烷基、 $-NR^aR^b$ 、环烷基、杂芳基或杂环基，其中所述的环烷基任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代。

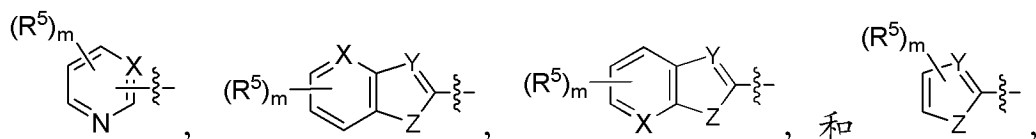
[0036] 在一个具体实施方案中，提供了式 (I) 的化合物或其药用盐，其中 R^1 是任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的杂芳基。合适的 R^1 基团包括具有 1-4 个独立地选自 N、O 和 S 的杂原子的 1- 和 2- 环杂芳基。其它合适的 R^1 基团包括具有 1 个氮杂原子和任选 1-3 个独立地选自 N、O 和 S 的其它杂原子的 1- 和 2- 环杂芳基。合适的杂芳基的实例包括但不限于吡咯基、吡唑基、吡唑啉基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、噻二唑基、异噻唑基、呋喃基、噻吩基、噁二唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、三嗪基、四唑基和𫍇唑基。优选地， R^1 是被 0-3 个取代基所取代的；更优选地，是被 0-2 个取代基所取代的。该具体实施方案的其它实例包括其中 R^3 是甲基、乙基、丙 -1- 基、环戊基、三氟甲基、溴、氯、苯基、吡啶 -2- 基或 $-NHR^a$ 的化合物；及其中 R^a 是甲基、乙基、丙 -1- 基、丙 -2- 基、正丁基或异丁基的化合物。该具体实施方案包括以下化合物：其中 R^1 是任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤

素的取代基所取代的杂芳基,优选 1- 环杂芳基诸如吡啶基;及 R^3 是卤代烷基、 $-NR^aR^b$ 、环烷基、杂芳基或杂环基,其中所述的环烷基、杂芳基和杂环基中的每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代。

[0037] 在一个具体实施方案中,提供了式 (I) 的化合物或其药用盐,其中

[0038] R^1 选自:

[0039]



[0040] 其中

[0041] m 是 0、1、2 或 3;

[0042] X 和 Y 各自独立地为氮 (N) 和 / 或 CR^5 ;

[0043] Z 是氧 (O)、硫 (S) 或 $N-R^6$;

[0044] 每个 R^5 独立地选自 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素;

[0045] R^6 是 C_1-C_4 烷基或苄基;及

[0046] 每个 R^4 独立地选自 C_1-C_4 烷基。

[0047] 该具体实施方案提供式 (I) 的化合物,其中 n 是 0 或 1;并且优选地, n 是 0。

[0048] 在一个具体实施方案中,提供了式 (I) 的化合物或其药用盐,其中

[0049] R^1 是任选被 1、2 或 3 个独立地选自 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的吡啶-2-基;

[0050] R^3 是 C_1-C_4 烷基、 C_3-C_6 环烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、卤素、苄基、吡啶基或 $-NR^aR^b$; R^4 是 C_1-C_4 烷基;及

[0051] R^a 和 R^b 各自独立地为氢和 / 或 C_1-C_4 烷基。

[0052] 该具体实施方案提供式 (I) 的化合物,其中 n 是 0 或 1;并且优选地, n 是 0。

[0053] 在一个具体实施方案中,提供了式 (I) 的化合物或其药用盐,其中 R^1 是任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的杂环基。合适的 R^1 基团包括具有 1-3 个独立地选自 N、O 和 S 的杂原子的 1- 和 2- 环杂环基。其它合适的 R^1 基团包括具有 1 个氮杂原子和任选 1-2 个独立地选自 N、O 和 S 的其它杂原子的 1- 和 2- 环杂环基。合适的杂环基的实例包括但不限于氧杂环丁烷基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、咪唑啉基、噁唑烷基、异噁唑啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、哌嗪基、2- 氧代哌嗪基、2- 氧代哌啶基、2- 氧代吡咯烷基、2- 氧代氮杂茛基、氮杂茛基、4- 哌啶酮基、四氢吡喃基、吗啉基、硫吗啉基、S- 氧代硫吗啉基 (thiamorpholinyl sulfoxide)、S, S- 二氧代硫吗啉基 (thiamorpholinyl sulfone)、1,3- 二氧戊烷基、四氢-1,1- 二氧代噻吩基和奎宁环基。该具体实施方案的其它实例包括其中 R^3 是甲基、乙基、丙-1-基、环戊基、三氟甲基、溴、氯、苄基、吡啶-2-基或 $-NHR^a$ 的化合物;及其中 R^a 是甲基、乙基、丙-1-基、丙-2-基、正丁基或异丁基的化合物。该具体实施方案包括以下化合物,其中 R^1 是任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、苄基、 $-OR^4$ 和 / 或卤素的取代基所取代的杂环基,优选 1- 环杂环基;及 R^3 是卤代烷基、 $-NR^aR^b$ 、环烷基、杂芳基或杂环基,其中所述的环烷基、杂芳基和杂环基中的每个基团任选被 1-5 个独立地选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 $-OR^4$

和 / 或卤素的取代基所取代。

[0054] 在一个具体实施方案中,提供了选自下组的式 (I) 的化合物或其药用盐:

[0055] 1-(4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0056] 1-(4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0057] 1-(4-(5-(5-(异丙基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0058] 1-(4-(5-(5-(乙基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0059] 1-(4-(5-(5-甲基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0060] 1-(4-(5-(5-丙基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0061] 1-(4-(5-(5-环戊基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0062] 1-(4-(5-(1-(6-乙氧基吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0063] 1-(4-(5-(1-环己基-5-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0064] 1-(4-(5-(5-苯基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0065] 1-(4-(5-(5-氯-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0066] 1-(4-(5-(5-(异丁基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0067] 1-(4-(5-(5-(正丁基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;

[0068] 1-(4-(5-(5-溴-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸;和

[0069] 1-(4-(5-(1-苯基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸。该具体实施方案中的化合物可以以 2,2,2-三氟乙酸盐的形式提供。

[0070] 在一个具体实施方案中,提供了包括式 (I) 的化合物或其药用盐和药学上可接受的载体的组合物。

[0071] 在一个具体实施方案中,提供了治疗与 G 蛋白偶联受体 S1P₁ 的活性有关的疾病或紊乱的方法,该方法包括给予哺乳动物患者式 (I) 的化合物或其药用盐。

[0072] 定义

[0073] 本领域的普通技术人员在阅读了下述详细描述后,可更容易地理解本发明的特征

和优点。应当理解的是,为清楚起见,本发明具体实施方案上下文中描述的一些特征也可以组合形成单个的实施方案。相反地,为简洁起见,单个实施方案中描述的本发明的各特征,也可组合形成亚组合。本申请鉴别的作为示例性或者优选的实施方案意在示例说明而不进行限制。

[0074] 除非在本申请中另作具体说明,提及单数形式时,也可包括复数形式。例如,“一个”和“一种”可指一个或一种,也可指一个或多个,或一种或多种。

[0075] 除非另作说明,认为化合价未被满足的任何杂原子具有足以满足所述化合价的氢原子。

[0076] 在本申请中阐述的定义优先于在通过引用方式并入本申请的任何专利、专利申请和/或者专利申请公开中阐述的定义。

[0077] 下面所列的是用于描述本发明的各种术语的定义。这些定义应用于说明书通篇使用的术语(除非在具体情况下对它们另作限制),无论是单独使用还是作为较大基团的部分使用。

[0078] 在整个说明书中,基团及其取代基可由本领域的技术人员进行选择以提供稳定的部分和化合物。

[0079] 根据本领域使用的常规, $\sim$ 在本申请的结构式中使用以描述作为部分或者取代基与核心或者骨架结构的连接点的化学键。

[0080] 本申请使用的术语“卤素(halo)”和“卤素”是指 F、Cl、Br 或者 I。

[0081] 本申请使用的术语“烷基”是指支链和直链的饱和脂族烃基,其含有例如 1 至 12 个碳原子、1 至 6 个碳原子以及 1 至 4 个碳原子。烷基的实例包括但不限于甲基(Me)、乙基(Et)、丙基(例如正丙基和异丙基)、丁基(例如正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基)以及戊基(例如正戊基、异戊基、新戊基)、正己基、2-甲基戊基、2-乙基丁基、3-甲基戊基和 4-甲基戊基。当数字出现在符号“C”后的下标位置时,所述下标更具体地定义特定基团可含有的碳原子的数目。例如,“C₁-C₆ 烷基”表示具有一至六个碳原子的直链和支链烷基。

[0082] 本申请使用的术语“卤代烷基”是指其中一个或者多个氢原子被一个或者多个卤素原子取代的烷基,所述卤素原子的数目可在一至多达可存在于母体烷基上的氢原子的总数的范围内。卤代烷基的代表性实例包括但不限于氯甲基(-CH₂Cl)、三氟甲基(-CF₃)和 2,2,2-三氟乙基(-CH₂CF₃)。当数字出现在符号“C”后的下标位置时,所述下标更具体地定义特定的卤代烷基可含有的碳原子的数目。例如,“C₁-C₄ 卤代烷基”表示具有一至四个碳原子的直链和支链卤代烷基。

[0083] 本申请使用的术语“环烷基”是指通过由饱和环碳原子除去一个氢原子由非芳族单环或者多环烃分子衍生得到的基团。环烷基的代表性实例包括但不限于环丙基、环戊基和环己基。当数字出现在符号“C”后的下标位置时,所述下标更具体地定义特定的环烷基可含有的碳原子的数目。例如,“C₃-C₆ 环烷基”表示具有三至六个碳原子的环烷基。

[0084] 本申请使用的术语“烷氧基”是指经氧原子连接于母体分子部分的烷基,例如,甲氧基(-OCH₃)。

[0085] 本申请使用的术语“芳基”是指通过除去结合于一个或者多个芳环的一个氢由含有所述一个或者多个芳环的分子衍生得到的原子的基团。芳基的代表性实例包括但不限于

苯基、萘基、二氢化茛基、茛基和 1,2,3,4- 四氢萘 -5- 基。

[0086] 本申请使用的术语“苣基”是指其中氢原子中的一个被苯基取代的甲基。

[0087] 本申请所使用的术语“杂原子”是指氧、硫和氮。

[0088] 本申请所使用的术语“杂环基”指的是非芳香性的 3-7 元单环基团、7-11 元二环基团和 10-15 元三环基团,其中至少一个环具有至少一个原子 (O、S 或 N),所述的包含杂原子的环优选地具有 1、2 或 3 个独立地选自 O、S 和 / 或 N 的杂原子。这样的包含杂原子的基团中的每个环可含有 1 个或 2 个氧或硫原子和 / 或 1-4 个氮原子,前提是每个环中的杂原子总数为 4 或更少,并且进一步地前提是环中包含至少一个碳原子。氮和硫原子任选被氧化并且氮原子任选被季铵化。构成二环和三环基团的稠合的环可仅包含一个碳原子并且可以为饱和的、部分饱和的或不饱和的。杂环基团可被连接于任何可用的氮或碳原子。

[0089] 示例性的单环杂环基团包括氧杂环丁烷基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、咪唑啉基、噁唑烷基、异噁唑啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、哌嗪基、2- 氧代哌嗪基、2- 氧代哌啶基、2- 氧代吡咯烷基、2- 氧代氮杂茛基、氮杂茛基、4- 哌啶酮基、四氢吡喃基、吗啉基、硫吗啉基、S- 氧代硫吗啉基、S, S- 二氧代硫吗啉基、1,3- 二氧戊烷基及四氢 -1,1- 二氧代噻吩基。示例性的二环杂环基团包括奎宁环基。

[0090] 本申请所使用的术语“杂芳基”是指芳香性的 5 或 6 元单环基团、9 或 10 元二环基团和 11-14 元三环基团,其中至少一个环中具有至少一个杂原子 (O、S 或 N)、所述的包含杂原子的环优选地具有 1、2 或 3 个独立地选自 O、S 和 / 或 N 的杂原子。包含杂原子的杂芳基基团中的每个环可包含 1 个或 2 个氧或硫原子和 / 或 1-4 个氮原子,前提是每个环中的杂原子总数为 4 或更少并且每个环具有至少一个碳原子。构成二环和三环基团的稠合的环可仅包含一个碳原子并且可以为饱和的、部分饱和的或不饱和的。氮和硫原子任选被氧化并且氮原子任选被季铵化。二环或三环的杂芳基基团必须包括至少一个完全芳香性的环但其它稠合的一个环或多个环可以为芳香性的或非芳香性的。杂芳基基团可被连接于任何环上的任何可用的氮或碳原子。

[0091] 示例性的单环杂芳基基团包括吡咯基、吡唑基、吡唑啉基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、噻二唑基、异噻唑基、呋喃基、噻吩基、噁二唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、三嗪基和四唑基。

[0092] 示例性的二环杂芳基基团包括吲哚基、苯并噻唑基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并噁唑基、苯并噻吩基、喹啉基、四氢异喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、苯并吡喃基、吲哚基、苯并呋喃基、色酮基、香豆素基、苯并吡喃基、噌啉基、喹啉基、吲唑基、吡咯并吡啶基、呋喃并吡啶基、二氢异喹基及四氢喹啉基。

[0093] 示例性的三环杂芳基基团包括咔唑基、苯并吲哚基、菲咯啉基、吖啶基、菲啶基和咕吨基。

[0094] 本申请采用的短语“药用的”是指这样的化合物、物质、组合物和 / 或者剂型,其在合理的医药判断范围内适用于与患者和动物的组织接触而不引起过度的毒性、刺激性、变态反应或者其它问题或者并发症,这与合理的益处 / 风险比例相称。

[0095] 如本申请使用,“药用盐”是指披露的化合物的衍生物,其中将母体化合物通过制备其酸或者碱盐来修饰。药用盐的实例包括但不限于碱性残基诸如胺的无机或者有机酸盐;以及酸性残基诸如羧酸的碱盐或者有机盐。药用盐包括由例如无毒无机酸或者有机酸

形成的母体化合物的常规无毒盐或者季铵盐。本发明的药用盐可由含有碱性或者酸性部分的母体化合物通过常规化学方法合成。一般地,所述盐可通过使这些化合物的游离酸或者碱形式与化学量的适当碱或者酸在水中或者在有机溶剂中或者在两者的混合物中反应来制备;一般地,非水介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或者乙腈为优选的。适当盐的列举出现在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985) 中,将其公开的内容通过引用的方式并入本申请。

[0096] 式(I)的化合物的一种或者多种盐可通过例如使式(I)的化合物与例如等当量的酸或者碱在介质中反应来形成,所述介质允许新形成的盐例如沉淀析出或者经冻干分离。式(I)的化合物可与无机酸和/或者有机酸形成的示例性酸性盐包括但不限于例如乙酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、酸性枸橼酸盐、枸橼酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、龙胆酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐(glucuronate)、谷氨酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、异烟酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐(mesylate)、甲磺酸盐(methanesulfonate)、硝酸盐、泛酸盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、蔗糖酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、对甲苯磺酸盐、三氟乙酸盐、乳酸盐和扑酸盐[即1,1'-亚甲基-2-(2-羟基-3-萘甲酸盐)]。所述盐可根据本领域技术人员已知的方法形成。

[0097] 式(I)的化合物可与无机碱和/或者有机碱形成的示例性碱性盐包括但不限于例如铵盐;碱金属盐,例如,钠盐、锂盐和钾盐;碱土金属盐,例如,钙盐和镁盐;与有机碱形成的盐,所述有机碱例如,N,N-二苄基乙二胺盐(benzathine)、二环己基胺、2-氨基-2-(羟基甲基)丙-1,3-二醇(氨基丁三醇(trisamine或Tris))、哈胺(hydrabamine)(例如N,N-二(脱氢松香基)乙二胺)、N-甲基-D-葡糖胺(N-methyl-D-glucamine)、N-甲基-D-咪唑双酰胺(N-methyl-D-glycamide)和叔丁基胺;与氨基酸(例如精氨酸和赖氨酸)形成的盐;和通过使用以下试剂以对碱性含氮基团进行季铵化而形成的盐,所述试剂为例如低级烷基卤化物(例如甲基氯、甲基溴、甲基碘、乙基氯、乙基溴、乙基碘、丙基氯、丙基溴、丙基碘、丁基氯、丁基溴和丁基碘)、硫酸二烷基酯(例如硫酸二甲酯、硫酸二乙酯、硫酸二丁酯和硫酸二戊酯)、长链卤化物(例如癸基氯、癸基溴、癸基碘、月桂基氯、月桂基溴、月桂基碘、肉豆蔻基氯、肉豆蔻基溴、肉豆蔻基碘、硬脂酰氯、硬脂酰溴和硬脂酰碘)和芳烷基卤化物(例如苄基溴和苄乙基溴)。这样的盐可按照本领域技术人员已知的方法来形成。

[0098] 此外,式(I)的化合物在它们的制备后优选地进行分离和纯化以得到含有按重量计的量等于或者大于99%的式(I)的化合物(“基本纯的”)的组合物,然后将其如本申请所述使用或者配制。所述“基本纯的”式(I)的化合物也构成本发明的一部分。

[0099] 体内可转化得到生物活性药物(即式(I)的化合物)的任意化合物为本发明范围和主旨内的前药。

[0100] 本申请采用的术语“前药”包括通过如下形成的酯和碳酸酯:采用本领域技术人员已知的方法使式(I)的化合物的一个或者多个羟基与烷基、烷氧基或者芳基取代的酰化剂反应产生乙酸酯、特戊酸酯、甲基碳酸酯、苯甲酸酯等。

[0101] 前药的各种形式在本领域中已知且描述于:

[0102] a) Wermuth, C. G. et al., The Practice of Medicinal Chemistry, Chapter 31, Academic Press (1996);

[0103] b) Design of Prodrugs, Bundgaard, H. ed., Elsevier (1985);

[0104] c) Bundgaard, H., Chapter 5, "Design and Application of Prodrugs," A Textbook of Drug Design and Development, pp. 113-191, Krosgaard-Larsen, P. et al., eds., Harwood Academic Publishers (1991); 和

[0105] d) Testa, B. et al., Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism, Wiley-VCH (2003)。

[0106] 此外, 式 (I) 的化合物在它们的制备后优选地进行分离和纯化以得到含有按重量计的量等于或者大于 99% 的式 (I) 的化合物 ("基本纯的" 化合物 I) 的组合物, 然后将其如本申请所述使用或者配制。所述 "基本纯的" 式 (I) 的化合物也构成本发明的一部分。

[0107] "稳定化合物" 和 "稳定结构" 意在表明化合物是足够稳定的以能够经受分离从而由反应混合物得到有用的纯度, 并形成有效的治疗剂。本发明意在涵盖稳定化合物。

[0108] "治疗有效量" 意在包括单独使用的本发明化合物的量或者要求保护的化合物的组合的量或者本发明化合物与有效用作上调 S1P₁ 或者有效治疗或者预防血管疾病或者自身免疫疾病的其它活性成分的组合的量。

[0109] 如本申请使用, "治疗 (treating)" 或者 "治疗 (treatment)" 涵盖治疗哺乳动物特别是人类的病症, 且包括: (a) 预防哺乳动物中出现的病症, 特别是当所述哺乳动物易于引起所述病症而尚未诊断出具有该病症时; (b) 抑制该病症, 即阻碍其发展; 和 / 或者 (c) 缓解该病症, 即引起该病症消退。

[0110] 本发明化合物可含有一个或者多个额外的不对称碳原子, 因此可按两种或者更多种立体异构形式存在。本发明包括所有可能的单一立体异构体、它们的单一互变异构形式及它们的混合物。非对映异构体的分离可通过常规技术来实现, 例如通过对本发明化合物或者其合适的盐或者衍生物的立体异构混合物进行分级结晶、色谱或者 HPLC。视情况而定, 所述化合物的单一对映异构体也可由相应的光学纯的中间体来制备, 或者如下制备: 使用合适的手性载体 (support) 对相应的外消旋体进行拆分 (诸如通过 HPLC), 或者对非对映异构盐进行分级结晶, 所述非对映异构盐通过使相应的外消旋体与合适的光学活性酸或者碱反应来制备。预期了本发明化合物的所有立体异构体, 无论是以混合物还是基本上纯的形式存在。

[0111] 本发明化合物意在包括存在于本发明化合物中的原子的所有同位素。同位素包括具有相同原子数而不同质量数的原子。作为一般实例而非限制, 氢的同位素包括氕与氘。碳的同位素包括 ¹³C 与 ¹⁴C。同位素标记的本发明化合物通常可通过本领域技术人员已知的常规技术或者通过类似于本申请所述的方法使用适当的同位素标记的试剂替代在其它情况下所采用的未经标记的试剂来制备。

[0112] 本发明还包括一类药物组合物, 所述药物组合物包含式 (I) 的化合物或者其药用盐及一种或者多种无毒药用载体和 / 或者稀释剂和 / 或者辅料 (在本申请中统称为 "载体" 物质), 且当期望时, 所述药物组合物包含其它活性成分。式 (I) 的化合物可通过任何合适的途径, 优选以适于所述途径的药物组合物的形式且, 以就所期望的治疗而言有效的剂量来给药。例如, 本发明化合物和组合物可按含常规药用载体、辅料和媒介物的剂量单位制剂的形式来口服给药、粘膜给药或者肠胃外 (包括血管内、静脉内、腹膜内、皮下、肌内、胸骨内和输注技术) 给药。例如, 所述药物载体可含有甘露醇或者乳糖和微晶纤维素的混合物。所述混合物可含有其它组分, 例如润滑剂如硬脂酸镁和崩解剂如交聚维酮。可将所述载体

混合物填充到明胶胶囊中或者压制成片剂。

[0113] 本发明药物活性化合物可按照常规药学方法来加工以生产用于向患者（包括人类和其它哺乳动物）给药的药剂。

[0114] 对于口服给药，所述药物组合物可呈以下形式：例如片剂、胶囊剂、混悬剂或者液体制剂。优选将所述药物组合物制备成含特定量活性成分的剂量单位形式。所述剂量单位的实例为片剂或者胶囊剂。例如，这些片剂或者胶囊剂所含的活性成分量可以是约 1 至 2000mg，优选为约 1 至 500mg，且更优选为约 5 至 150mg。适于人类或者其它哺乳动物的日剂量可基于患者的病症和其它因素而宽泛变化，但同样可使用常规方法来确定。

[0115] 所给药的化合物量和用本发明化合物和 / 或者组合物对病症进行治疗的给药方案取决于各种因素，包括受试者的年龄、体重、性别和医疗状况、疾病的类型、疾病的严重性、给药的途径和频率及所使用的具体化合物。因此，所述给药方案可宽泛变化，但可使用标准方法来常规确定。约 0.01 至 1500mg/kg 体重、优选为约 0.5 至约 50mg/kg 体重且最优选为约 0.1 至 20mg/kg 体重的日剂量可以是合适的。所述日剂量可按 1-4 次 / 日来给药。

[0116] 出于治疗目的，通常将本发明活性化合物与一种或者多种适于所预期给药途径的辅料组合。如果口服给药，则可将所述化合物与乳糖、蔗糖、淀粉粉末、烷酸的纤维素酯、纤维素烷基酯、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、氧化镁、磷酸和硫酸的钠盐和钙盐、明胶、阿拉伯胶、海藻酸钠、聚乙烯基吡咯烷酮和 / 或者聚乙烯基醇混合，然后压片或者包囊以方便给药。这样的胶囊剂或者片剂可包括控释制剂，所述控释制剂可按活性化合物在羟丙基甲基纤维素中的分散体形式来提供。

[0117] 含式 (I) 的化合物的乳剂的油相可由已知成分以已知方式来构成。尽管所述相可仅包含乳化剂，但它可包含至少一种乳化剂与脂肪或者油或者与脂肪和油的混合物。优选地，亲水性乳化剂与作为稳定剂的亲脂性乳化剂包含在一起。同时也优选的是包含油和脂肪。另外，乳化剂（带有或者不带有稳定剂）构成所谓的乳化蜡，且所述蜡与油和脂肪一起构成所谓的乳化软膏基质，所述乳化软膏基质形成乳膏制剂的油分散相。适于在本发明制剂中使用的乳化剂和乳剂稳定剂包括 Tween 60、Span 80、鲸蜡硬脂醇、肉豆蔻醇、单硬脂酸甘油酯、月桂基硫酸钠或二硬脂酸甘油酯，这些物质单独使用或者与蜡或者本领域公知的其它材料一起使用。

[0118] 为所述制剂选择合适的油或者脂肪是基于实现所期望的化妆品性质 (cosmetic property) 来进行的，这是因为所述活性化合物在可能用于药物乳剂的大多数油中的溶解度是非常低的。因此，所述乳膏剂应该优选为非油腻的、非沾污的且可洗涤的产品，并具有合适的稠度以避免从管或者其它容器中泄漏。可使用直链或者支链的且一元或者二元的烷基酯，例如二异己二酸酯 (di-isoadipate)、硬脂酸异鲸蜡酯、椰油脂肪酸丙二醇二酯、肉豆蔻酸异丙酯、油酸癸酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸丁酯、棕榈酸 2-乙基己酯或者支链酯的共混合物。基于所需要的性质，这些物质可单独使用或组合使用。可选择地，可使用高熔点的脂质如白软石蜡和 / 或者液体石蜡或者其它矿物油。

[0119] 用于肠胃外给药的制剂可呈含水或者非含水等渗无菌注射溶液剂或者混悬剂的形式。这些溶液剂和混悬剂可由无菌粉末或者颗粒使用就用于口服给药制剂所述的一种或者多种载体或者稀释剂或者使用其它合适的分散剂或湿润剂和助悬剂来制备。可将所述化合物溶解在水、聚乙二醇、丙二醇、乙醇、玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、苯甲醇、氯化钠、

黄蓍胶和 / 或者各种缓冲液中。其它辅料和给药模式在药物领域中是充分且广泛已知的。所述活性成分也可按包含合适的载体（包括盐水、右旋糖或者水）的组合物或者与环糊精（即Captisol®）、共溶剂增溶物质（即丙二醇）或者胶束增溶物质（即 Tween 80）的组合物形式通过注射来给药。

[0120] 所述无菌注射剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或者溶剂中的无菌注射溶液剂或者混悬剂，例如在 1,3- 丁二醇中的溶液剂。所述可接受的可使用的媒介物和溶剂是水、林格溶液和等渗氯化钠溶液。另外，无菌的不挥发油通常用作溶剂或者混悬介质。就该目的而言，可使用任何温和的不挥发油，包括合成的甘油一酯或者甘油二酯。另外，脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。

[0121] 所述药物组合物可经受常规制药操作，例如灭菌，和 / 或者可含有常规辅料，例如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂和缓冲剂等。片剂和丸剂可额外地用肠溶衣制备。所述组合物还可包含辅料，例如湿润剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂。

[0122] 本发明药物组合物包含式 (I) 的化合物或者其药用盐以及任选包含其它物质，所述其它物质选自任何药用载体、辅料或者媒介物。可选择的本发明组合物包含本申请所述的式 (I) 的化合物或者其药用盐以及药用载体、辅料或者媒介物。

[0123] 可在本发明药物组合物中使用的药用载体、辅料和媒介物包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、自乳化药物递送系统 (SEDDS) 如琥珀酸 D- α -生育酚聚乙二醇 1000 酯 (d-alpha-tocopherol polyethyleneglycol1000succinate)、在药物剂型中使用的表面活性剂如 Tween 或者其它类似的聚合物递送基质、血清蛋白质如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或者电解质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯基吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。也可便利地使用环糊精如 α -、 β - 和 γ - 环糊精或者化学改性衍生物如羟基烷基环糊精（包括 2- 和 3- 羟基丙基-环糊精）或者其它可溶性衍生物以促进本申请所述制剂中的化合物递送。

[0124] 用途

[0125] 人类免疫系统已经进化以防御机体免受可引起感染、疾病或者死亡的微生物、病毒和寄生虫的侵害。复杂的调节机制确保了免疫系统的各种细胞成分以外来物质或者有机体为靶点，而不引起个体的永久性或者显著性损伤。尽管在目前起始事件并未被很好地了解，处于自身免疫病症的免疫系统引发了患病个体中的靶器官中发生炎性应答。不同的自身免疫疾病典型地通过主要的或者初始的受影响的靶器官或者组织来表征；诸如类风湿性关节炎所牵涉的关节、桥本甲状腺炎所牵涉的甲状腺、多发性硬化症所牵涉的中枢神经系统、I 型糖尿病所牵涉的胰腺以及炎性肠病所牵涉的肠。因此已观察到作用于免疫系统或者某些细胞类型的免疫系统（诸如 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞，T 细胞）的治疗剂可能对多于一种自身免疫疾病有效。

[0126] 本领域（包括本申请所引用的参考文献）普遍认为 S1P 受体是包括自身免疫疾病在内的宽范围的一类治疗应用的好的靶点。S1P 受体成为好的药物靶点，这是因为单个受体既是组织特异性的又是应答特异性的。S1P 受体的组织特异性是重要的，这是因为开发针对一种受体选择的激动剂或者拮抗剂使细胞应答集中于含有该受体的组织，从而限制了不期

望的副作用。S1P 受体的应答特异性同样也是重要的,这是因为它允许开发启动或者抑制某些细胞应答而不影响其它过程的激动剂或者拮抗剂。因此,作用于一些 S1P 受体家族成员而对于其它家族成员具有减弱的活性或者无活性的化合物是期望的且期望能够提供具有改善的副作用分布(即,减弱或者消除不期望的副作用)的治疗作用。

[0127] 本申请所使用的涉及 S1P₁ 的术语“激动剂”是指发挥药理活性诸如减弱的 T 细胞的活动力、减弱的 T 细胞的运输或者减弱的 T 细胞由淋巴样组织的流出的试剂(Rosen et al., Trends in Immunology, 28:102(2007))。

[0128] 由于它们作为激动剂的 S1P₁ 活性,本发明化合物为用于治疗或者预防自身免疫疾病或者慢性炎症性疾病的免疫调节剂。本发明化合物可在处于免疫抑制诸如骨髓、器官或者移植排斥、自身免疫疾病和慢性炎症性疾病包括系统性红斑狼疮、慢性类风湿性关节炎、I 型糖尿病、炎症肠病、胆汁性肝硬化、眼葡萄膜炎、多发性硬化症、克罗恩病、溃疡性结肠炎、大疱性类天疱疮、结节病、牛皮癣、自身免疫性肌炎、韦格纳肉芽肿病、鱼鳞病、格雷夫斯眼病和哮喘的情况下用于抑制免疫系统。

[0129] 更具体地,本发明化合物用于治疗或者预防选自下述的疾病或者病症:器官或者组织移植、由移植导致的移植物抗宿主病、自身免疫综合征,包括类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、桥本甲状腺炎、多发性硬化症、重症肌无力、I 型糖尿病、眼葡萄膜炎、后色素层葡萄膜炎、变应性脑脊髓炎、肾小球肾炎、包括风湿热和感染后的肾小球肾炎的感染后的自身免疫疾病、炎性和过度增殖性皮肤疾病、牛皮癣、特应性皮炎、接触性皮炎、湿疹性皮炎、脂溢性皮炎、扁平苔癣、天疱疮、大疱性类天疱疮、大疱性表皮松解、荨麻疹、血管性水肿、血管炎、红斑、表皮嗜酸粒细胞增多、红斑狼疮、痤疮、局限性脱发、角膜结膜炎、春季结膜炎、与贝切特病相关的眼葡萄膜炎、角膜炎、疱疹性角膜炎、圆锥形角膜、角膜上皮营养不良、角膜白斑、眼天疱疮、莫伦溃疡、巩膜炎、格雷夫斯眼病、伏格特-小柳-原田三氏综合征、结节病、花粉变态反应、可逆阻塞性气道疾病、支气管哮喘、过敏性哮喘、内源性哮喘、外源性哮喘、尘埃性哮喘、慢性或者顽固性哮喘(chronic or inveterate asthma)、晚期哮喘(late asthma)和气道高反应性、支气管炎、胃溃疡、局部缺血性疾病和血栓形成引起的血管损伤、局部缺血性肠疾病、炎症肠病、坏死性小肠结肠炎、与热灼伤相关的肠损伤、腹部疾病、直肠炎、嗜酸细胞性胃肠炎、肥大细胞增生症、克罗恩病、溃疡性结肠炎、偏头痛、鼻炎、湿疹、间质性肾炎、古德帕斯丘综合征、溶血性尿毒性综合征、糖尿病肾病、多发性肌炎、格-巴二氏综合征、梅尼埃病、多发性神经炎、多神经炎、单神经炎、神经根病、甲状腺功能亢进、巴泽多病、纯红细胞再生障碍、再生障碍性贫血、再生不良性贫血、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、粒细胞缺乏症、恶性贫血、巨幼红细胞性贫血、红细胞发生不能、骨质疏松症、结节病、纤维化肺、特发性间质性肺炎、皮炎、寻常性白斑病、寻常性鱼鳞病、光过敏性敏感(photoallergic sensitivity)、皮肤 T 细胞淋巴瘤、动脉硬化、动脉粥样硬化、主动脉炎综合征、结节性多动脉炎、心肌病、硬皮病、韦格纳肉芽肿、舍格伦综合征、肥胖症、嗜酸细胞性筋膜炎、牙龈、牙周组织、牙槽骨、牙骨质损伤、肾小球肾炎、通过预防脱发或者提供毛发萌发和/或者促进毛发产生和毛发生长治疗的男性型脱发或者老年性脱发、肌肉萎缩症、脓皮病和塞扎里综合征、艾迪生病、保藏时发生的器官缺血-再灌注损伤、移植或者局部缺血性疾病、内毒素休克、假膜性结肠炎、药物或者辐射引起的结肠炎、局部缺血性急性肾功能不全、慢性肾功能不全、肺部氧气或者药物引起的中毒、肺癌、肺气肿、白内障、铁沉

着病、视网膜色素变性、老年性黄斑变性、玻璃体瘢痕化 (vitreal scarring)、角膜碱烧伤、皮炎、多形性红斑、线性 IgA 大疱性皮炎 (linear IgA bullous dermatitis) 和水泥皮炎 (cement dermatitis)、龈炎、牙周炎、败血病、胰腺炎、环境污染引起的疾病、衰老、致癌作用、癌的转移和低气压病、组胺或者白三烯 $-C_4$ 释放引起的疾病、贝切特病、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬变、硬化性胆管炎、部分肝切除、急性肝坏死、毒素引起的坏死、病毒性肝炎、休克或者缺氧、B- 病毒肝炎、非-A/ 非-B 型肝炎、肝硬变、酒精性肝硬变、肝衰竭、暴发性肝功能衰竭、迟发性肝衰竭、慢加急性肝衰竭 (“acute-on-chronic” liver failure)、化疗效果强化、巨细胞病毒感染、人巨细胞病毒感染、艾滋病、癌症、老年性痴呆、外伤以及慢性细菌性感染。

[0130] 本发明也包括在有此需要的哺乳动物患者中预防或者治疗器官或者组织的移植抵抗或者移植排斥的方法, 包括给予式 (I) 的化合物或者其药用盐。可给予对于预防或者治疗移植抵抗或者移植排斥的治疗有效量。

[0131] 在另一个实施方案中也包括在有此需要的哺乳动物患者中抑制免疫系统的方法, 包括给予患者式 (I) 的化合物或者其药用盐。可给予对于抑制免疫系统的治疗有效量。

[0132] 最具体地, 本申请所述的方法涵盖治疗或者预防骨髓或者器官移植排斥的方法, 包括向需要所述治疗或者预防的哺乳动物患者给予式 (I) 的化合物或者其药用盐。可给予对于治疗或者预防骨髓或者器官移植排斥的治疗有效量。

[0133] 一个实施方案提供了用于治疗自身免疫疾病和 / 或者炎性疾病的方法, 包括向有此需要的哺乳动物给予至少一种式 (I) 的化合物或者其药用盐。另一个实施方案提供了式 (I) 的化合物或者其药用盐, 用在治疗自身免疫疾病和 / 或者炎性疾病中的疗法中。在另一个实施方案中, 提供了式 (I) 的化合物或者其药用盐在制备用于治疗或者预防自身免疫疾病和 / 或者炎性疾病的药物中的用途。可在这些实施方案中采用治疗有效量。优选地, 在这些实施方案中, 自身免疫疾病和炎性疾病选自多发性硬化症、类风湿性关节炎、炎性肠病 (包括克罗恩病和溃疡性结肠炎)、牛皮癣, 并且作为预防移植器官排斥的药物。

[0134] 在另一个实施方案中, 提供了用于治疗血管疾病的方法, 包括向有此需要的哺乳动物给予至少一种式 (I) 的化合物或者其药用盐。另一个实施方案提供了式 (I) 的化合物或者其药用盐, 用在治疗血管疾病的疗法中。在另一个实施方案中, 提供了式 (I) 的化合物或者其药用盐在制备用于治疗血管疾病的药物中的用途。可在这些实施方案中采用治疗有效量。优选地, 在这些实施方案中, 血管疾病选自动脉粥样硬化和局部缺血再灌注损伤。

[0135] 在一个具体实施方案中, 提供了治疗与 G 蛋白偶联受体 $5P_1$ 的活性有关的疾病或紊乱的方法, 该方法包括给予哺乳动物患者式 (I) 的化合物或其药用盐。本具体实施方案的方法包括给予治疗有效量的式 (I) 的化合物或其药学上有效的盐。

[0136] 所述其它治疗剂的示例性实例包括皮质激素或者糖皮质激素诸如地塞米松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙和泼尼松; PDE4 抑制剂诸如咯利普兰、西洛司特、罗氟司特和 oglemilast; 细胞因子抑制性抗炎药 (CSAIDs) 和 p38 激酶抑制剂、美国专利 4, 200, 750 公开的 4- 取代的咪唑并 [1, 2-A] 喹啉; 靶向细胞表面分子诸如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD20 的抗体或者融合蛋白诸如 RITUXAN®、靶向细胞表面分子诸如 CD25、CD30、CD40、CD69、CD80 (B7. 1)、CD86 (B7. 2)、CD90、CTLA 的抗体或者融合蛋白例如阿巴西普 (abatacept, ORENCIA®) 或者靶向它们的配体包括 CD154 (GP39 或者 CD40L) 的抗体或者融合蛋白;

人细胞因子或者生长因子例如肿瘤坏死因子 (TNF) 的抗体、融合蛋白或者可溶性受体, 诸如英夫利昔单抗(REMICADE®)、依那西普(ENBREL®)、阿达木单抗(HUMIRA®)、LT、白细胞介素 (IL)-1 的抗体、融合蛋白或者可溶性受体诸如阿那白滞素(KINERET®) (IL-1 受体拮抗剂)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6 的抗体、融合蛋白或者可溶性受体, 诸如 CNT0328 (嵌合体的抗 IL-6 抗体)、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、IL-17、IL-21、IL-23 的抗体、融合蛋白或者可溶性受体诸如伏特克单抗 (Ustekinumab, 人抗 IL-12/23 单克隆抗体) 以及干扰素类诸如干扰素 β 1a (AVOREX®、REBIF®)、干扰素 β 1b (BETASERON®); 整联蛋白受体拮抗剂诸如TYSABRI®; 多聚体药物诸如格拉默乙酸盐(COPAXONE®); 柳氮磺吡啶、5-氨基水杨酸、羟氯喹、非甾体抗炎药 (NSAIDs) 诸如水杨酸盐包括阿司匹林、双水杨酯和水杨酸镁, 以及非水杨酸盐诸如布洛芬、萘普生、美洛昔康、塞来考昔和罗非考昔; 抗病毒剂诸如阿巴卡韦; 抗增殖剂诸如甲氨喋呤、巯嘌呤、来氟米特、环孢霉素 A、霉酚酸吗啉乙酯 (mycophenololate)、FK506 (他克莫司, PROGRAF®); 细胞毒类药物诸如硫唑嘌呤和环磷酰胺; 核转位抑制剂, 诸如脱氧精胍菌素 (DSG); 含金产品诸如金兰诺芬 (auronofin); 青霉胺 (penicillamine) 和雷帕霉素 (西罗莫司或者RAPAMUNE®) 或者其衍生物。

[0137] 当与本发明的化合物组合使用时, 上述其它治疗剂可例如以 Physicians' Desk Reference (PDR) 指示的或者其它情况下由本领域技术人员确定的那些量来使用。在本发明的方法中, 所述其它治疗剂可以在本发明的化合物给药之前、同时或者之后给予。

[0138] 制备方法

[0139] 本发明的化合物可以有有机合成领域技术人员已知的众多方式来制备。本发明的化合物可使用如下所述的方法与合成有机化学领域已知的合成方法或者本领域技术人员理解的其变化形式一起来合成。优选的方法包括但不限于如下所述的那些。将本申请引用的所有参考的全部内容通过引用的方式并入本申请。

[0140] 本发明的化合物可使用本部分所述的反应和技术来制备。反应在适于所采用的试剂和材料且适于起作用的转化的溶剂中进行。同样, 在描述如下所述的合成方法的过程中, 应该理解的是对所有提出的反应条件 (包括溶剂、反应气氛、反应温度、试验的持续时间和操作方法的选择) 进行选择以作为反应的标准条件, 其应该容易地被本领域技术人员所识别。有机合成领域技术人员应该理解的是存在于分子各部分的官能度必须与提出的试剂和反应相容。对与反应条件相容的取代基的所述限定对于本领域技术人员来说应该是显而易见的, 否则必须使用替代方法。这有时需要对修改合成步骤的顺序或者选择相对于其它方案的一种特定操作方案进行判断以得到期望的本发明化合物。还将认识到对本领域任意合成途径设计的另一个主要考虑是正确选择用于保护本发明所述的化合物中存在的反应官能团的保护基团。对受过训练的从业者描述许多替代方法的权威解释参见 Greene et al. (Protective Groups In Organic Synthesis, Third Edition, Wiley and Sons (1999))。

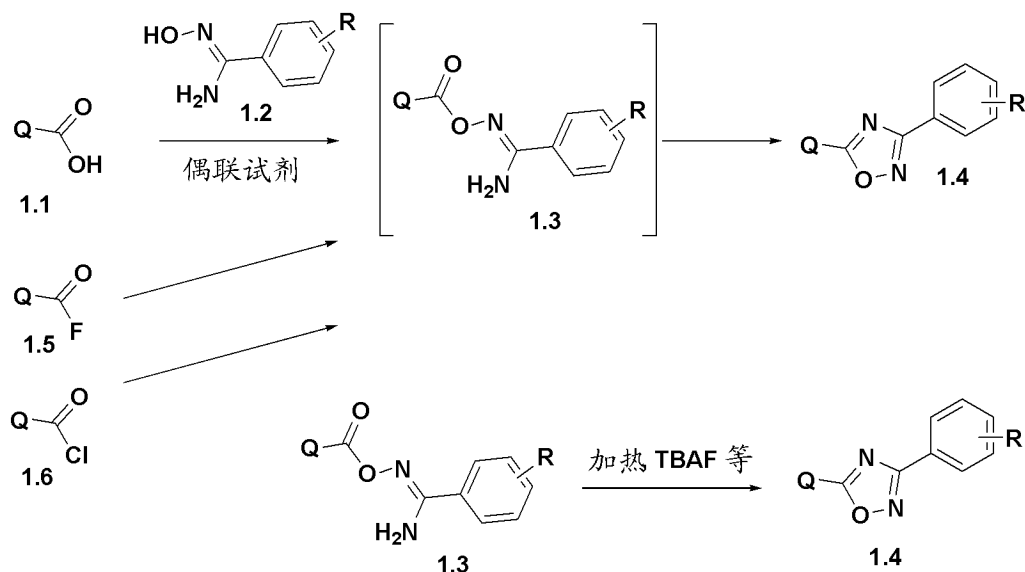
[0141] 式 (I) 的化合物可通过参考下述方案中示例说明的方法来制备。如本申请所示, 终产物为具有与式 (I) 相同的结构式的化合物。应该理解的是任意式 (I) 的化合物可通过适当选择具有适当取代的试剂的方案来产生。溶剂、温度、压力和其它反应条件可由本领域技术人员容易地选择。起始物质为可商购得到的或者由本领域技术人员容易地制备。化合

物的构成如本申请或者说明书中其他地方所定义。

[0142] 如方案 1 所示,本发明的噁二唑化合物 (1.4) 可通过羧酸 (1.1) 与 N' -羟基苯甲脒 (N' -hydroxybenzimidamide) (1.2) 以及多种偶联试剂 (例如 EDC、HOBT、BOP、BOP-Cl) 反应来制备。可替换地, N' -羟基苯甲脒可与酰基氟 (1.5) 或者酰基氯化物 (1.6) 反应。在每种情况下,最初形成的 N' -酰氧基苯甲脒 (1.3) 可在反应条件下自发地转化为噁二唑。在 N' -酰氧基苯甲脒 (1.3) 不能自发环化的情况下,其可被分离且经历反应条件以引起环化脱水为 1.4。所述条件包括加热 (常规加热或者微波加热) 或者用氟化物来源 (诸如四丁基氟化铵) 处理。

[0143] 方案 1

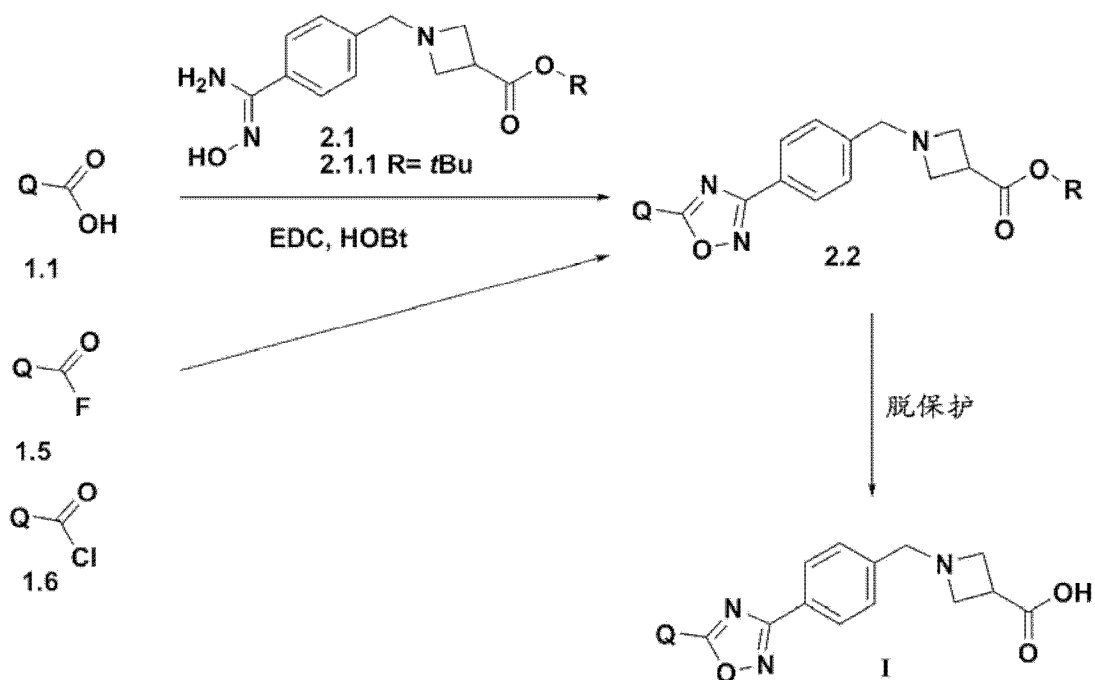
[0144]



[0145] 式 (I) 的化合物可通过酸 (1.1)、酰基氟 (1.5) 或者酰基氯 (1.6) 与 (Z)-1-(4-(N' -羟基苯甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (2.1) 经如上所述的方法反应来制备得到结构 2.2 的化合物。酯衍生物 (2.2) 的脱保护 (通过用酸处理,例如在叔丁酯衍生物的情况下为三氟乙酸) 得到式 (I) 的化合物。

[0146] 方案 2

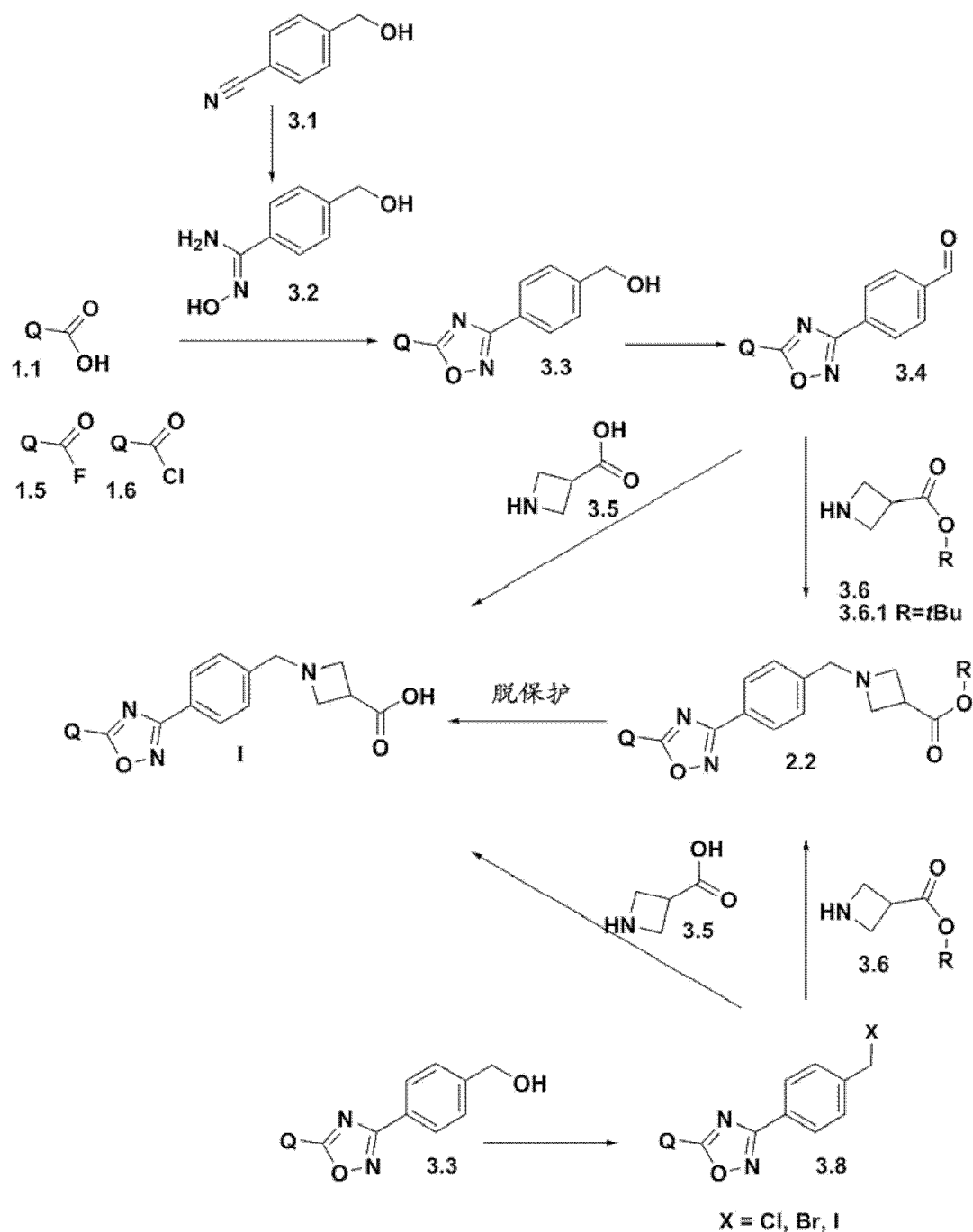
[0147]



[0148] 可替换地, 式 (I) 的化合物也可采用方案 3 描述的方法来制备。通过采用上面描述的方法, 使酸 (1.1)、酰氟 (1.5) 或酰氯 (1.6) 与 (Z)-N'-羟基-4-(羟基甲基) 苯甲脒 (3.2) 反应, 可产生 3.3 结构的化合物, 其在氧化成相应的醛 (3.4) 之后, 可与氮杂环丁烷-3-羧酸 (3.5) 或氮杂环丁烷-3-羧酸酯 (3.6) 进行还原胺化反应从而分别提供式 (I) 或 2.2 的化合物。化合物 2.2 可转化为上面所描述的式 (I) 的化合物。羟基甲基化合物 (3.3) 可转化成苄基卤化物衍生物 (3.8)。3.8 与氮杂环丁烷-3-羧酸 (3.5) 或氮杂环丁烷-3-羧酸酯 (3.6) 之间的反应分别提供了式 (I) 或 2.2 的化合物。

[0149] 方案 3

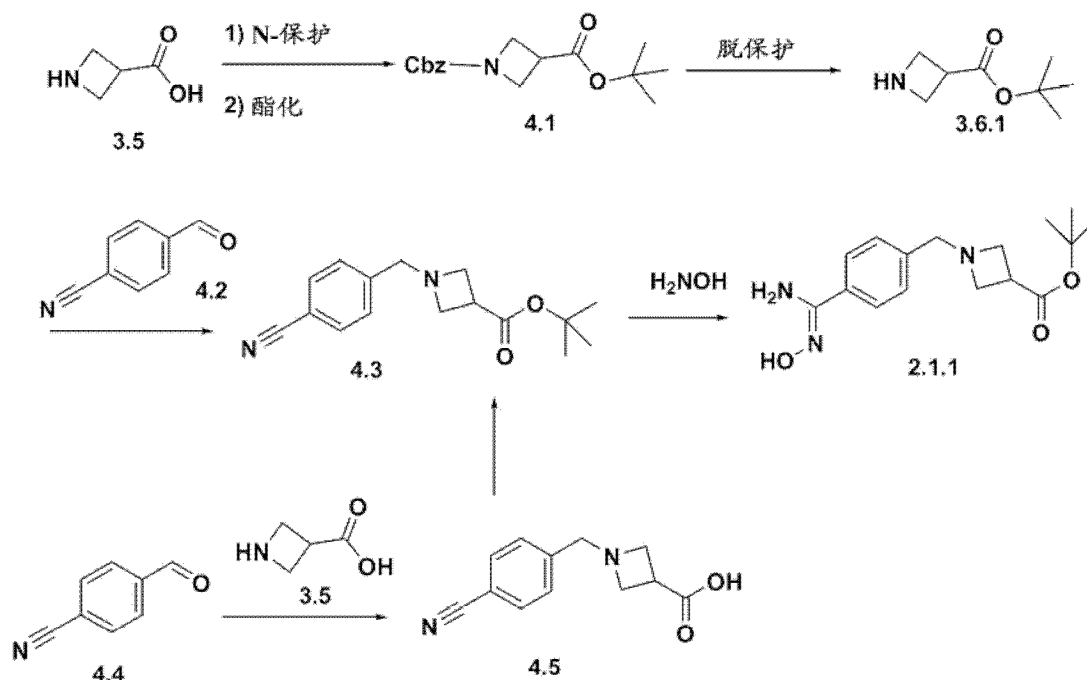
[0150]



[0151] 氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (3.6.1) 可由氮杂环丁烷-3-羧酸 (3.5) 通过对胺 (例如用 CBZ 基团) 进行保护,随后在偶联剂 (例如 CDI) 的存在下将所述酸用叔丁醇酯化及然后除去胺保护基团来制备。(Z)-1-(4-(N'-羟基甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (2.1.1) 是通过在还原条件下使氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (3.6.1) 与 4-甲酰基苄腈 (4.2) 反应产生 4.3,再将其与羟胺反应而获得的。可替换地,化合物 4.3 可通过酯化 4.5 来制备,后者是在还原条件下使氮杂环丁烷-3-羧酸 (3.5) 与 4-甲酰基苄腈 (4.2) 反应而得到的。

[0152] 方案 4

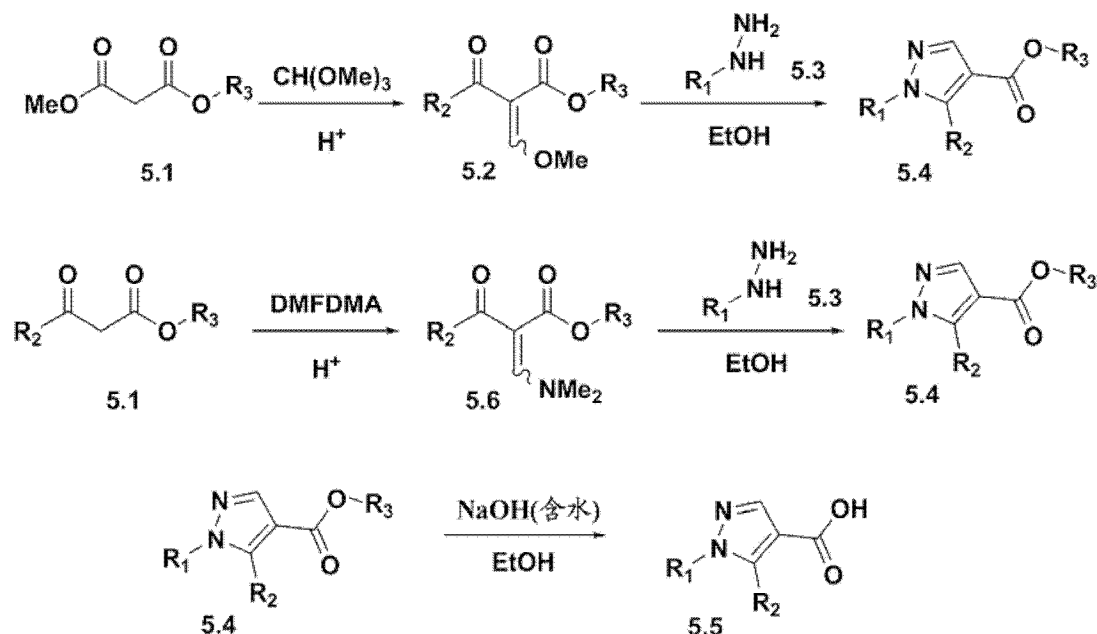
[0153]



[0154] 本发明的羧酸片段 (1.1) 可通过多种方法, 包括方案 5 中描述的那些来制备。乙酰乙酸酯化合物 (5.1) 可例如通过在催化量的酸 (诸如对甲苯磺酸) 的存在下, 分别与原甲酸三乙酯或 N, N-二甲基甲酰胺-二甲基乙缩醛 (DMF-DMA) 反应而转化成活化的亚甲基衍生物 (5.2 或 5.6)。然后可将化合物 5.2 或 5.6 与单取代的肼在存在或缺少所必需的额外的碱的情况下在各种溶剂 (极性的、非极性的、质子性的、非质子性的) 中反应, 产生吡唑酯 (5.4)。化合物 5.4 可以被分离或直接水解成相应的吡唑酸 (5.5)。

[0155] 方案 5

[0156]



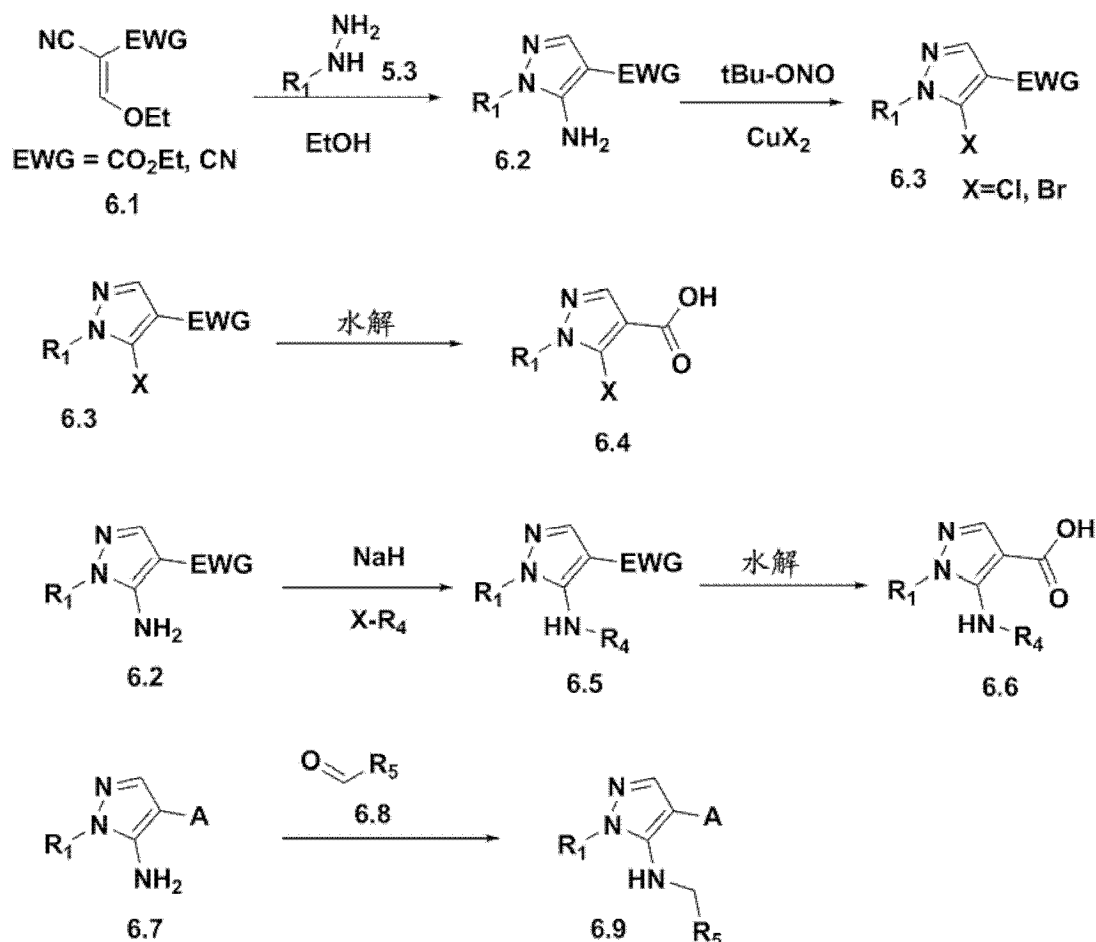
[0157] 在 C5 上具有卤代、氨基或烷基氨基取代基的吡唑可根据方案 5 来制备。化合物 6.1 (诸如 2-乙氧基亚甲基-丙二腈或 2-氰基-3-乙氧基-丙烯酸乙酯) 与单取代的肼反应会得到 6.2 的 C5-氨基-吡唑, 其中 C4 位置被腈或酯所取代。C5-氨基向 C5-卤代的转化可通过使 tBuONO 和溴化铜 (II) 或氯化铜 (II) 反应来实现。酯或腈可在标准条件 (碱

性或酸性)下水解成羧酸(6.4)。

[0158] 6.2的氨基吡唑可通过与卤代烷(诸如溴乙烷)在合适的碱(诸如NaH)的存在下发生反应而被烷基化。酯或腈的水解导致C5-烷基氨基取代的吡唑羧酸(6.6)的生成。氨基吡唑(6.7)也可通过与羰基化合物(6.8)发生还原胺化反应从而被修饰。

[0159] 方案6

[0160]



[0161] 缩写

[0162] Ac 乙酰基

[0163] AcOH 乙酸

[0164] AIBN 偶氮二异丁腈

[0165] aq. 含水

[0166] CDI 羰基二咪唑

[0167] CEM CEM Corp., PO Box 200, 3100 Smith Farm Rd, Matthews NC

[0168] 28106

[0169] Biotage Biotage AB, Kungsgatan 76 SE-753 18 Uppsala, Sweden

[0170] Bn 苄基

[0171] Boc 叔丁氧羰基

[0172] BOP 苯并三唑-1-基-氧基-三-(二甲氨基)-磷-六氟磷酸盐

[0173] BOP-Cl 二(2-氧代噁唑啉-3-基)次磷酰氯

[0174]	Bu	丁基
[0175]	DIPEA	二异丙基乙胺 (Hunig 碱)
[0176]	DCE	1,2- 二氯乙烷
[0177]	DMAP	N,N- 二甲基吡啶 -4- 胺
[0178]	DMA	N,N- 二甲基乙酰胺
[0179]	DMF	二甲基甲酰胺
[0180]	DMF-DMA	N,N- 二甲基甲酰胺二甲基乙缩醛
[0181]	DMSO	二甲亚砜
[0182]	EDC, EDCI	1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐
[0183]	EtOAc	乙酸乙酯
[0184]	Et	乙基
[0185]	Ether	乙醚
[0186]	EtOH	乙醇
[0187]	H	氢
[0188]	H, hr	小时
[0189]	i	异
[0190]	Isco	Teledyne Isco, Inc. 4700 Superior St., Lincoln NE 68504
[0191]	Hex.	己烷
[0192]	HMPA	六甲基磷酰胺
[0193]	HOAc	乙酸
[0194]	HOBT	1H- 苯并 [d] [1,2,3] 三唑 -1- 醇
[0195]	HPLC	高压液相色谱法
[0196]	LC	液相色谱法
[0197]	Me	甲基
[0198]	MeOH	甲醇
[0199]	MeOD	氘代甲醇 (CD ₃ OD)
[0200]	min.	分钟
[0201]	M ⁺	(M+H) ⁺
[0202]	MS	质谱法
[0203]	n	正
[0204]	Pd/C	钯 / 碳
[0205]	pet. 醚	石油醚
[0206]	Ph	苯基
[0207]	Pr	丙基
[0208]	Prep. HPLC	反相制备性 HPLC
[0209]	PSI	磅 / 平方英寸
[0210]	Ret Time	保留时间
[0211]	rt 或 RT	室温
[0212]	sat.	饱和的

- [0213] t 叔
 [0214] TFA 三氟乙酸
 [0215] THF 四氢呋喃
 [0216] TLC 薄层色谱法
 [0217] TMS 三甲基硅烷基
 [0218] Phenomenex Phenomenex, Macclesfield, Cheshire, UK
 [0219] YMC YMC, Inc, Wilmington, NC 20403
 [0220] 实施例

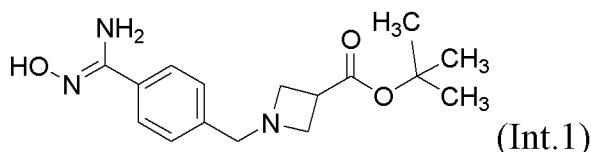
[0221] 下述实施例示例说明了本发明特定且优选的实施方案而不限本本发明。化学缩写和符号以及科学缩写和符号具有它们通常且惯用的含义,除非另作说明。实施例以及本申请其他地方所采用的额外的缩写如上定义。常规中间体通常用于制备多于一种实施例且连续编号 (identify) (例如中间体 1、中间体 2 等缩写为 Int. 1、Int. 2 等)。在一些情况下,常规中间体的制备需要多个步骤来制备。每个步骤由常规中间体和步骤来编号 (例如 Int. 1-A、Int. 1-B 等)。实施例的化合物通过实施例和制备它们的步骤来编号 (例如“1-A”表示实施例 1、步骤 A) 或者当化合物为实施例的标题化合物时仅通过实施例来编号 (例如,“1”表示实施例 1 的标题化合物)。在一些情况下,描述了中间体或者实施例的替代制备方法。通常合成领域的化学家可设计替代制备方法,所述方法可预期地基于一种或者多种考虑,诸如缩短保留时间、减少昂贵的起始物质、减少操作、易于催化、避免毒性试剂、专门仪器操作的可实现性 (accessibility) 以及减少线性步骤的数目等。描述替代制备方法的目的是进一步实现本发明实施例的制备。

[0222] 详细说明在微波烘箱中进行的那些试验在 Personal Chemistry 制造的 SmithSynthesizer 烘箱中或者 CEM 公司制造的 Discover 微波烘箱中进行。所述微波烘箱产生可在 60-250°C 之间选择的温度。所述微波烘箱自动监测在 0-300PSI 之间的压力。报告了反应保持时间和温度设定点。

[0223] 中间体 1 (Int. 1) 的制备

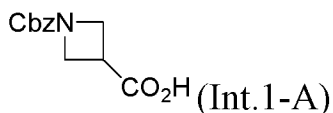
[0224] (Z)-1-(4-(N'-羟基甲脒基)-苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯

[0225]



[0226] Int. 1-A. 1-(苄基氧基羰基)氮杂环丁烷-3-羧酸

[0227]

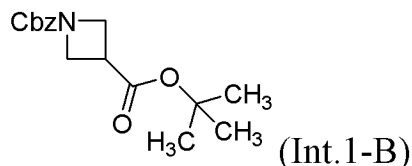


[0228] 在室温向氮杂环丁烷-3-羧酸 (88g, 0.871mol) 和碳酸氢钠 (161g, 1.92mol) 的水溶液 (1.75L) 中加入 2,5-二氧代吡咯烷-1-基碳酸苄酯 (239g, 0.959mol) 的四氢呋喃溶液 (3.5L)。将反应混合物在室温搅拌过夜。减压除去溶剂,并用乙酸乙酯 (2×500mL) 洗涤水层。将水层用 1.0N 盐酸盐水酸化,然后用乙酸乙酯 (3×750mL) 萃取。将有机层用水洗

涤,随后用盐水洗涤,并用无水硫酸钠干燥。减压浓缩得到无色油状的 1-(苄基氧基羰基)氮杂环丁烷-3-羧酸 (202g,产率 99%)。化合物的 HPLC 保留时间 = 2.27min。- 色谱柱: YMC COMBISCREEN® ODS-A 4.6×50mm(4min.); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.1% TFA; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.1% TFA。LC/MS $M^{+1} = 236.15$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm 3.39-3.49(m, 1H), 4.22(d, $J = 7.28\text{Hz}$, 4H), 5.11(s, 2H) 和 7.29-7.39(m, 5H)。

[0229] Int. 1-B. 氮杂环丁烷-1,3-二羧酸 1-苄酯·3-叔丁酯

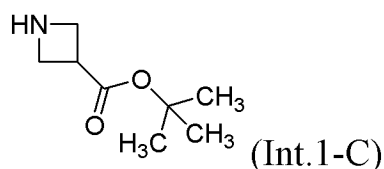
[0230]



[0231] 在 0℃ 向 1-(苄基氧基羰基)氮杂环丁烷-3-羧酸 (200g, 0.851mol) 的二氯甲烷 (6.0L) 溶液中加入叔丁醇 (158g, 2.13mol)、DMAP (52.0g, 0.425mol) 和 EDCI (163g, 0.853mol)。使反应室温搅拌过夜。将反应混合物浓缩并将残余物溶解于乙酸乙酯。将有机层用 10% 柠檬酸、10% 碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤。用无水硫酸钠干燥并减压浓缩得到无色油状的氮杂环丁烷-1,3-二羧酸 1-苄酯·3-叔丁酯 (200g, 产率 81%)。化合物的 HPLC 保留时间 = 3.27min。- 色谱柱: YMC COMBISCREEN® ODS-A 4.6×50mm(4min.); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.1% TFA; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.1% TFA。LC/MS $M^{+1} = 292.15$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm 1.46(s, 9H), 3.24-3.33(m, 1H), 4.14(d, $J = 7.53\text{Hz}$, 4H), 5.10(s, 2H) 和 7.30-7.39(m, 5H)。

[0232] Int. 1-C. 氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯

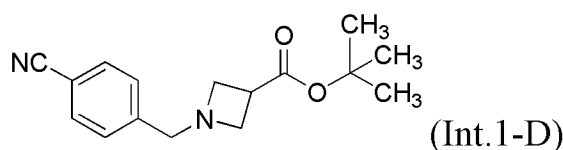
[0233]



[0234] 将氮杂环丁烷-1,3-二羧酸 1-苄酯·3-叔丁酯 (140g, 0.480mol) 和 10% Pd/C (28.0g) 于乙酸乙酯 (1.40L) 中的混合物置于高压釜中在 3.0kg/cm² 的氢气压力下过夜。将反应混合物过滤通过 CELITE®, 并将 CELITE® 垫用乙酸乙酯洗涤。向滤液中加入乙酸 (28.9g, 0.480mol) 并在保持温度低于 50℃ 时减压浓缩从而得到无色油状的氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯乙酸盐 (96g, 产率 92%)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm 1.47(s, 9H), 2.02(s, 3H), 3.52-3.63(m, 1H) 和 4.00-4.10(m, 4H)。

[0235] Int. 1-D. 1-(4-氰基苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯

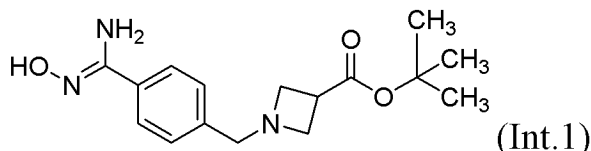
[0236]



[0237] 在室温向氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯乙酸盐 (92.0g, 0.423mol) 于甲醇 (1.0L) 中的溶液中加入 4-甲酰基苄腈 (50.8g, 0.381mol)。将反应混合物冷却至 0℃, 并分次 (portion-wise) (注意: 有氰化物产生的可能性) 加入氰基硼氢化钠 (28.8g, 0.458mol)。

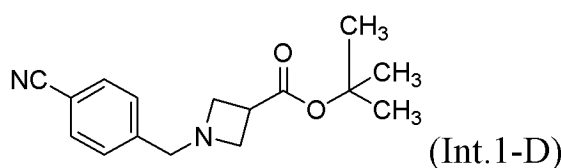
将反应混合物加热至室温并连续搅拌过夜。减压浓缩反应混合物之后,将残余物用 10% 碳酸氢钠水溶液稀释和并用乙酸乙酯萃取。收集有机层,用盐水洗涤并用无水硫酸钠干燥。减压浓缩,随后采用使用 20% 的乙酸乙酯于石油醚中的溶液洗脱的硅胶色谱法纯化,得到 1-(4- 氰基苄基) 氮杂环丁烷-3- 羧酸叔丁酯 (89%) (色谱法处理之后, Int. 1-D 中含有少量的 4- 羟基甲基苄腈,但没有将其进一步纯化而是直接进入下一步骤)。LC/MS⁺ = 273. 18。 ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ ppm 1. 46(s, 9H), 3. 22-3. 31(m, 3H), 3. 48-3. 56(m, 2H), 3. 66(s, 2H), 7. 39(d, J = 8. 28Hz, 2H) 和 7. 60(d, J = 8. 28Hz, 2H)。

[0238] Int. 1. (Z)-1-(4-(N'- 羟基甲脒基) 苄基) 氮杂环丁烷-3- 羧酸叔丁酯的制备
[0239]

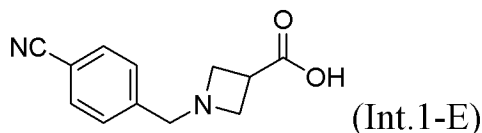


[0240] 向 1-(4- 氰基苄基) 氮杂环丁烷-3- 羧酸叔丁酯 (89. 0g, 0. 326mol) 于叔丁醇 (1. 30L) 中的溶液中加入碳酸氢钠 (109. 8g, 1. 31mol) 和羟胺盐酸盐 (45. 5g, 0. 654mol)。将反应加热回流 7h 然后冷却至室温并搅拌过夜。将反应混合物用水稀释并用乙酸乙酯萃取。收集有机层,用水洗涤,再用盐水洗涤,然后用无水硫酸钠干燥。浓缩,随后采用使用含有 0. 2% 三乙胺的 2. 5% 甲醇于氯仿中的溶液作为洗脱剂的硅胶色谱法纯化,得到 (Z)-1-(4-(N'- 羟基甲脒基) 苄基) 氮杂环丁烷-3- 羧酸叔丁酯 (64g, 0. 210mol, 两步的产率为 55%)。化合物的 HPLC 保留时间 = 7. 03min。 - 色谱柱: XBridge Phenyl 150x4. 6mm 3. 5u, SC/749。 1mL/min。 溶剂 A = 5% MeCN、95% 水、0. 05% TFA; 溶剂 B = 95% MeCN、5% 水、0. 05% TFA。 时间 / % B : 0min/0%, 15min/50%, 18min/100%, 20min/100%。 LC/MS M⁺ = 306. 2。 ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ ppm 1. 45(s, 9H), 3. 23-3. 30(m, 3H), 3. 49-3. 57(m, 2H), 3. 63(s, 2H), 4. 85(s, 2H), 7. 31(d, J = 8. 28Hz, 2H) 和 7. 57(d, J = 8. 28Hz, 2H)。

[0241] Int. 1-D : 1-(4- 氰基苄基) 氮杂环丁烷-3- 羧酸叔丁酯的可替换的制备方法
[0242]



[0243] Int. 1-E. 1-(4- 氰基苄基) 氮杂环丁烷-3- 羧酸
[0244]

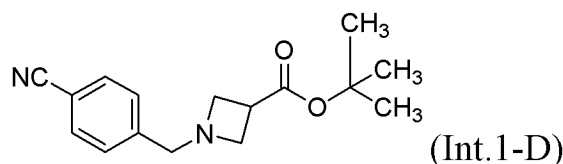


[0245] 将 4- 甲酰基苄腈 (2. 88g, 22. 0mmol)、氮杂环丁烷-3- 羧酸 (2. 02g, 20mmol) 和乙酸 (1. 15mL, 20. 0mmol) 于二氯甲烷 (20mL) 和甲醇 (80mL) 中的混合物在室温搅拌 1h。加入三乙酰氧基硼氢化钠 (6. 78g, 32. 0mmol) 并在室温连续搅拌 18hr。减压除去挥发物,并使残余物在水 (50mL) 和乙醚 (50mL) 中分配。收集水层,用乙醚 (50mL) 洗涤并浓缩。将残余物溶解于水 (20mL) 中并装载于 2. 5×20cm HP-20 色谱柱 [HP-20 凝胶的制备: ~将 400ml 干

干燥、未使用的 MCICHP-20 凝胶 (75-150 微米) 在甲醇中溶胀 24 小时。将凝胶过滤并用 1 升甲醇冲洗。然后将其转移至瓶里在甲醇中储存。即将使用之前, 将需要量的凝胶用 20 倍体积的水彻底冲洗] 上。将色谱柱用 240mL 水和 400mL 甲醇洗脱。将包含级份的产物浓缩并从乙醇和乙酸乙酯/庚烷中共蒸发, 得到白色固体状的 1-(4-氰基苄基) 氮杂环丁烷-3-羧酸 (3.25g, 15.0mmol, 产率 75%)。MS: (M+H) = 217.18。¹H NMR (400MHz, MeOD) δ ppm 3.39(m, 1H), 4.08(m, 4H), 4.32(s, 2H), 7.63(d, J = 8.3Hz, 2H) 和 7.82(d, J = 8.3Hz, 2H)。

[0246] Int. 1-Alt. D2. 1-(4-氰基苄基) 氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯

[0247]

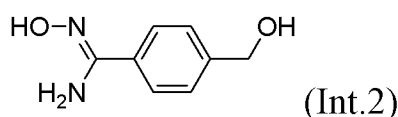


[0248] 向 1-(4-氰基苄基) 氮杂环丁烷-3-羧酸 (3.25g, 15.0mmol)、DMAP (1.84g, 15.0mmol) 和叔丁醇 (14.1mL, 150mmol) 于二氯乙烷 (150mL) 中的混合物中加入 EDCI (4.32g, 22.5mmol), 并使反应混合物搅拌过周末 (over the weekend)。减压除去挥发物, 并使残余物在乙酸乙酯 (250mL) 和饱和碳酸氢钠水溶液 (250mL) 中分配。将有机层用水 (250mL) 洗涤、再用盐水 (100mL) 洗涤, 并用无水硫酸镁干燥。减压浓缩得到淡黄色油状物并将其用 5×15cm 硅胶柱进行色谱分离, 采用 0-40% 乙酸乙酯/己烷梯度洗脱, 得到无色液状的 1-(4-氰基苄基) 氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (3.5g, 12.9mmol, 产率 86%)。HPLC 保留时间 = 1.38 分钟 - 色谱柱: YMC-Combi 4.6×50mm S-50DS 色谱柱, 以 4 分钟的梯度用 10-90% 含水甲醇 + 0.2% 磷酸洗脱。MS: (M+H) = 273.18。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ ppm 1.46(s, 9H), 3.26(m, 3H), 3.52(m, 2H), 3.66(s, 2H), 7.39(d, J = 8.3Hz, 2H) 和 7.60(d, J = 8.3Hz, 2H)。

[0249] 中间体 2 (Int. 2) 的制备

[0250] N'-羟基-4-(羟基甲基) 苯甲脒

[0251]

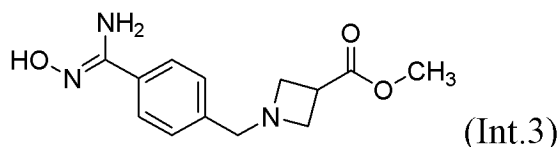


[0252] 将 4-(羟基甲基) 苄腈 (22.43g, 0.1685g)、羟胺盐酸盐 (18.67g, 0.2689mol) 和 NaHCO₃ (45.22g, 0.538mol) 于甲醇 (250mL) 中的溶液加热回流过夜。一旦冷却, 将非均质混合物过滤并将得到的固体用额外的甲醇洗涤。将滤液蒸发至干, 得到灰白色固体。使固体悬浮于 ~75mL 热甲醇中, 然后冷却至室温并过滤。将滤液蒸发, 得到白色固体状的 N'-羟基-4-(羟基甲基) 苯甲脒 (28.5g)。所得物质被直接使用而没有将其进一步纯化。化合物的 HPLC 保留时间 = 0.232min。 - 色谱柱: CHROMOLITH® SpeedROD 4.6×50mm (4min.) ; 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.2% H₃PO₄; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.2% H₃PO₄。LC/MS M⁺¹ = 167.3。

[0253] 中间体 3 (Int. 3) 的制备

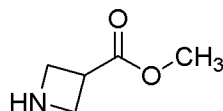
[0254] (Z)-1-(4-(N'-羟基甲脒基) 苄基) 氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯

[0255]



[0256] Int. 3-A. 氮杂环丁烷 -3- 羧酸甲酯盐酸盐

[0257]

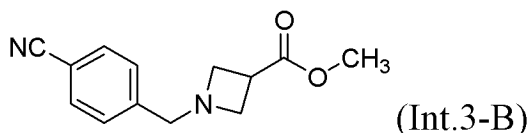


· HCl (Int.3-A)

[0258] 将甲醇 (5mL) 预先冷却至 0℃, 再加入乙酰氯 (0.852mL, 11.99mmol)。在 0℃ 搅拌 5 分钟之后, 将反应混合物温热至室温。此时, 加入氮杂环丁烷 -3- 羧酸 (404mg, 4.00mmol) 并将反应混合物回流 2.5hr。冷却至室温之后, 真空除去挥发物并将残余物干燥, 得到白色固体状的氮杂环丁烷 -3- 羧酸甲酯盐酸盐 (600mg, 3.96mmol)。¹H NMR (400MHz, 甲醇 -d₄) δ ppm 3.77 (m, 1H) 3.81 (s, 3H) 4.22-4.33 (m, 4H)。

[0259] Int. 3-B. 1-(4-氰基苄基)氮杂环丁烷 -3- 羧酸甲酯:

[0260]



[0261] 在室温将 4-甲酰基苄腈 (510mg, 3.89mmol)、氮杂环丁烷 -3- 羧酸甲酯 (590mg, 3.89mmol)、乙酸 (0.245mL, 4.28mmol) 和 ~ 1gm 的粉末状 4 埃分子筛于 DCE (15mL) 中的混合物剧烈搅拌 1hr。此时, 加入三乙酰氧基硼氢化钠 (907mg, 4.28mmol) 并将反应混合物在室温搅拌 2hr。在过滤通过垂熔玻璃漏斗之后, 将滤液浓缩成残余物并在 EtOAc (50mL) 和饱和碳酸氢钠溶液 (50mL) 中分配。用盐水 (50mL) 洗涤有机层, 干燥 (MgSO₄) 并浓缩得到无色油状物, 将其用 12gm Isco 硅胶柱 (silica gel cartridge) 进行色谱分离, 采用 0-100% EtOAc/Hex 梯度洗脱。将基本上纯净的级份浓缩得到 1-(4-氰基苄基)氮杂环丁烷 -3- 羧酸甲酯 (765mg, 3.32mmol)。HPLC 保留时间 = 0.49 分钟 [宽峰] (PHENOMENEX® Luna 4.6×30mm S-50DS 色谱柱), 以 2 分钟的梯度用 10-90% 含水甲醇 + 0.1% TFA 洗脱。MS: (M+H) = 231.23。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ ppm 3.32-3.36 (m, 3H) 3.49-3.58 (m, 2H) 3.67 (s, 2H) 3.72 (s, 3H), 7.39 (d, J = 8.6Hz, 2H) 7.60 (d, J = 8.3Hz, 2H)。

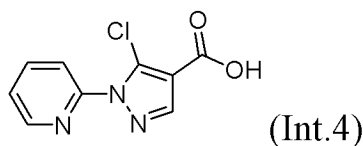
[0262] Int. 3-C. (Z)-1-(4-(N'-羟基甲脒基)苄基)氮杂环丁烷 -3- 羧酸甲酯

[0263] 将 1-(4-氰基苄基)氮杂环丁烷 -3- 羧酸甲酯 (760mg, 3.30mmol)、羟胺盐酸盐 (459mg, 6.60mmol) 和碳酸氢钠 (1109mg, 13.20mmol) 于 MeOH (4.9mL) 中的混合物加热回流 2.5hr。冷却至室温以后, 将反应混合物过滤, 将滤液浓缩成残余物并将其在 EtOAc (75mL) 和水 (50mL) 中分配。用 EtOAc (75mL) 萃取水层并将合并的有机层干燥 (MgSO₄) 和浓缩从而得到无色泡沫状的 (Z)-1-(4-(N'-羟基甲脒基)苄基)氮杂环丁烷 -3- 羧酸甲酯 (470mg, 1.785mmol)。MS: (M+H) = 264.28。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ ppm 3.30-3.39 (m, 3H) 3.54 (m, 2H) 3.64 (s, 2H) 3.71 (s, 3H) 4.86 (brs, 2H) 7.31 (d, J = 8.3Hz, 2H) 7.57 (d, J = 8.3Hz, 2H)。

[0264] 中间体 4 (Int. 4) 的制备

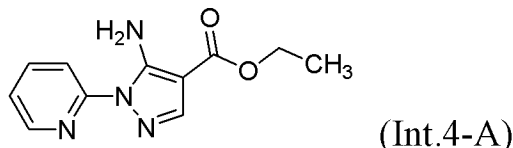
[0265] 5-氯-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸

[0266]



[0267] Int. 4-A. 5-氨基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯

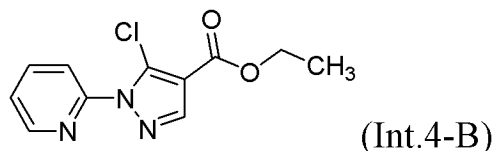
[0268]



[0269] 将 2-胍基吡啶 (4.84g, 44.3mmol)、(乙氧基亚甲基)氰基乙酸乙酯 (5g, 29.6mmol) 和 Et_3N (12.36mL, 89mmol) 的混合物加热至 80℃ 并保持 30 分钟。将反应混合物浓缩并采用使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 的硅胶柱纯化, 得到 5-氨基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯 (5.97g, 25.7mmol) HPLC 室温 = 2.856min。HPLC: 色谱柱: YMC S5 COMBISCREEN® 4.6×50mm; 梯度时间: 4min; 流速 = 4mL/min; 溶剂 A = 10% MeOH-90% 水-0.2% H_3PO_4 ; 溶剂 B = 90% MeOH-10% 水-0.2% H_3PO_4 ; 开始% B = 0; 最终% B = 100。LC-MS: M^+ = 233.1。 ^1H NMR (500MHz, 甲醇- d_3) δ ppm 8.44 (1H, ddd, J = 4.95, 1.92, 0.82Hz), 7.92-7.96 (1H, m), 7.87-7.90 (1H, m), 7.74 (1H, s), 7.27 (1H, ddd, J = 7.22, 5.02, 1.24Hz), 4.29 (2H, q, J = 7.15Hz), 1.35 (3H, t, J = 7.15Hz)。

[0270] Int. 4-B. 5-氯-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯

[0271]



[0272] 方法 1: 向 5-氨基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯 (200mg, 0.861mmol) 和氯化铜 (II) (116mg, 0.861mmol) 于 1,2-二氯乙烷 (8mL) 中的溶液中加入亚硝酸叔丁酯 (0.154mL, 1.292mmol)。将反应混合物在室温搅拌 16 小时。将反应混合物用 30mL 二氯甲烷稀释并用 10mL 2M NH_4OH 溶液、10mL 盐水洗涤及用 Na_2SO_4 干燥。过滤并浓缩得到粗产物, 采用硅胶柱纯化, 用己烷/EtOAc 洗脱得到 5-氯-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯。

[0273] 方法 2: 向 5-氨基-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯 (200mg, 0.861mmol) 和 1-氯吡咯烷-2,5-二酮 (172mg, 1.292mmol) 于二氯甲烷 (8mL) 中的溶液中加入亚硝酸叔丁酯 (0.154mL, 1.292mmol)。将反应混合物在室温搅拌 30 分钟, 之后将其浓缩得到粗产物, 采用硅胶柱纯化, 用己烷/EtOAc 洗脱得到 5-氯-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯。合并得自方法 1 和方法 2 的物质 (106mg, 0.42mmol)。HPLC 保留时间 = 2.50min。HPLC: 色谱柱: YMC S5 COMBISCREEN® 4.6×50mm; 梯度时间: 4min; 流速 = 4mL/min; 溶剂 A = 10% MeOH-90% 水-0.2% H_3PO_4 ; 溶剂 B = 90% MeOH-10% 水-0.2% H_3PO_4 ; 开始% B = 0; 最终% B = 100。LC-MS: M^+ = 252.1。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ ppm 8.61 (1H, dd, J = 4.89, 1.13Hz), 8.16 (1H, s), 8.09 (1H, td, J = 7.78, 1.76Hz), 7.74 (1H, d, J = 8.03Hz), 7.57 (1H,

ddd, $J = 7.53, 4.77, 1.00\text{Hz}$), $4.36 (2\text{H}, \text{q}, J = 7.28\text{Hz})$, $1.38 (3\text{H}, \text{t}, J = 7.15\text{Hz})$ 。

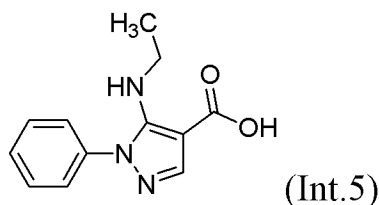
[0274] Int. 4-C. 5-氯-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸

[0275] 将 5-氯-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯 (106mg, 0.421mmol) 和 NaOH 1N 溶液 (0.632mL, 0.632mmol) 于 EtOH (3.5mL) 中的溶液在微波辐射下加热至 100°C 并保持 15 分钟。将反应混合物真空浓缩并将残余物用 5mL 水稀释, 然后将其用 1N HCl 溶液酸化至 pH 大约为 3。搅拌 5 分钟之后, 收集 5-氯-1-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-羧酸 (39.6mg, 0.177mmol) 的固体。HPLC 保留时间 = 1.67min。HPLC: 色谱柱: YMC S5 COMBISCREEN® 4.6X50mm; 梯度时间: 4min; 流速 = 4mL/min; 溶剂 A = 10% MeOH-90% 水-0.2% H_3PO_4 ; 溶剂 B = 90% MeOH-10% 水-0.2% H_3PO_4 ; 开始% B = 0; 最终% B = 100。LC-MS: LCMS: $M^{+1} = 224.1$ 。

[0276] 中间体 5 (Int. 5) 的制备

[0277] 5-(乙基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-羧酸

[0278]

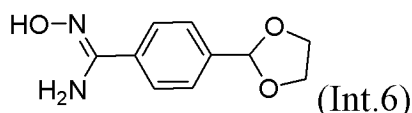


[0279] 在 0°C 向 5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-羧酸乙酯 (10g, 43mmol) 于 DMF (100mL) 中的溶液中缓慢加入氢化钠 (60% 分散体, 1.9g, 47.6mmol)。在停止释放气体之后, 滴加溴乙烷 (3.55mL, 47.6mmol)。使反应混合物在 0°C 搅拌 2 小时, 然后逐渐温热至室温。向反应混合物中加水, 导致沉淀的生成, 过滤收集沉淀并直接用于下一步骤。将这样得到的物质溶解于 EtOH (50mL) 及 3N NaOH (38mL) 中并将所得溶液加热至回流过夜。将反应混合物冷却至 0°C 并用 1N HCl 缓慢调节 pH 至 3-4 之间。过滤收集得到的白色沉淀并在乙腈中重结晶得到 5-(乙基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-羧酸 (6.6g, 28.6mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 2.32min。CHROMOLITH® SpeedROD 4.6X50mm (4min.); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.2% H_3PO_4 ; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.2% H_3PO_4 。LC/MS $M^{+1} = 232.3$ 。 ^1H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0.89 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 2.77 (m, 2H), 6.14 (br. s, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.52 (m, 4H), 7.72 (s, 1H)。

[0280] 中间体 6 (Int. 6) 的制备

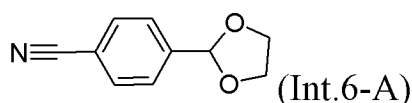
[0281] (Z)-4-(1,3-二氧杂环戊-2-基)-N'-羟基苯甲脒

[0282]



[0283] Int. 6-A. 4-(1,3-二氧杂环戊-2-基)苄腈

[0284]



[0285] 将 4-甲酰基苄腈 (10g, 76.3mmol), 乙二醇 (18.95g, 305mmol) 和对甲苯磺酸

(7mg, 0.003mmol) 于甲苯 (100mL) 中的溶液加热回流 9 小时。在此期间内用 Dean-Stark 分水器来除去反应中生成的水。向反应混合物中加入 Na_2CO_3 水溶液 (150mL)。将有机层用水 (100mL) 洗涤两次, 然后用 Na_2SO_4 干燥。真空除去溶剂从而得到 4-(1,3-二氧杂环戊-2-基) 苄腈 (12g, 68mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 4.24min。- 色谱柱: Hypersil® BDS C18 (4.6×50mm) 流速 = 0.8mL/min。溶剂 A = 0.1% TFA 水溶液; 溶剂 B = 乙腈。5% -100% B (0-6min), 100% B (6-9min), 100% -5% B (9-11min)。

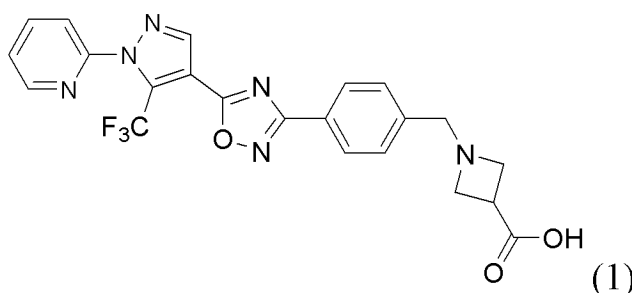
[0286] Int. 6-B. (Z)-4-(1,3-二氧杂环戊-2-基)-N'-羟基苯甲脒

[0287] 将 4-(1,3-二氧杂环戊-2-基) 苄腈 (16.4g, 93.6mmol)、羟胺盐酸盐 (9.76g, 140mmol) 和碳酸氢钠 (15.7g, 187mmol) 于 MeOH (100mL) 中的混合物加热回流 4hr。冷却至室温之后, 将反应混合物过滤, 浓缩滤液从而得到固体, 过滤收集固体并用冷甲醇洗涤, 得到 (Z)-4-(1,3-二氧杂环戊-2-基)-N'-羟基苯甲脒 (16g, 76.8mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 0.38min。-CHROMOLITH® SpeedROD 4.6×30mm。流速 = 5mL/min (2 分钟梯度); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.1% TFA; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.1% TFA。LC/MS $\text{M}^+ = 209.2$

[0288] 实施例 1

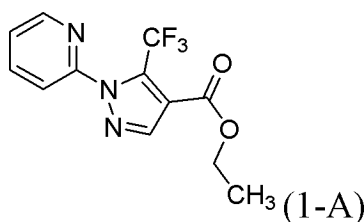
[0289] 1-(4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸

[0290]



[0291] 1-A. 1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯

[0292]

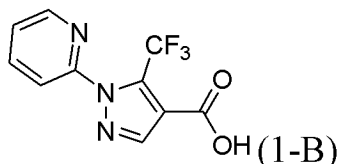


[0293] 在氮气环境下将 2-肼基吡啶 (5g, 45.8mmol) 于 THF (200mL) 中的溶液在干冰/异丙醇浴中冷却至 -34°C 。在 25 分钟内, 以细流状缓慢加入 (Z)-2-(乙氧基亚甲基)-4,4,4-三氟-3-氧代丁酸乙酯 (11g, 45.8mmol) 于 THF (73mL) 中的溶液, 并以氮气冲洗。在加入过程中, 内部反应温度平均为 -34°C , 并且绝对不超过 -31°C 。加入过程完成之后, 在 -33.5°C 连续搅拌 ~ 40min。加入额外的 (Z)-2-(乙氧基亚甲基)-4,4,4-三氟-3-氧代丁酸乙酯 (0.89mL, 0.10 当量) 并在 -30°C 连续搅拌 11min。加入 EtOAc (270mL) 及饱和 NaHCO_3 水溶液 (250mL) 和盐水 (20mL)。分离各层, 将有机层用饱和 NaHCO_3 水溶液、盐水洗涤, 然后干燥 (Na_2SO_4) 和真空浓缩得到橙色粘稠油状物。采用在硅胶上进行的快速色谱法得到黄色

固体状的 1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯 (10.62g)。化合物的 HPLC 保留时间 = 2.5min。- 色谱柱: YMC COMBISCREEN® ODS-A 4.6×50mm(4min.); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.1% TFA; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.1% TFA。LC/MS $M^{+1} = 286.1$ 。

[0294] 1-B. 1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸

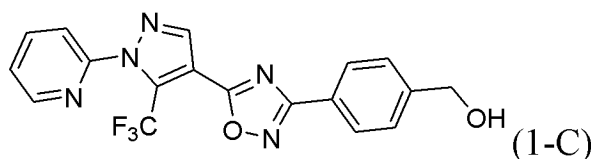
[0295]



[0296] 向 1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸乙酯 (8.7g, 30.5mmol) 于乙醇 (2mL) 中的溶液中加入 3N NaOH (30.5mL, 92mmol)。将反应混合物在室温搅拌 1 小时之后, 蒸发溶剂并加入 3N HCl 水溶液。过滤收集得到的固体得到 1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸 (5.58g, 21.7mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 2.0min。- 色谱柱: PHENOMENEX® Luna 5u C18 4.6×30mm(2min.); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.1% TFA; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.1% TFA。LC/MS $M^{+1} = 258.1$ 。

[0297] 1-C. (4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯基)甲醇

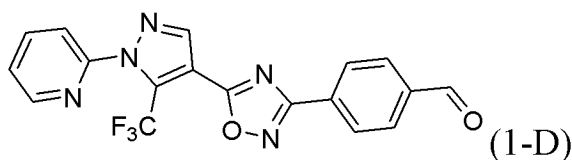
[0298]



[0299] 向 1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸 (2.57g, 9.99mmol) 于 DMF (30mL) 中的溶液中加入 EDC (2.395g, 12.49mmol)、HOBt (1.913g, 12.49mmol) 和 Hunig 碱 (5.24mL, 30.0mmol)。将反应混合物在室温搅拌 40min, 然后加入 N-羟基-4-(羟基甲基)苯甲脒, Int. 2 (2.076g, 12.49mmol)。将反应混合物在室温搅拌 7h, 然后加入额外的 EDC (2.395g, 12.49mmol)、HOBt (1.913g, 12.49mmol) 和 Hunig 碱 (5.24mL, 30.0mmol)。将反应加热至 60°C 并保持 2h, 然后至 110°C 保持 10min。加入 1N HCl 水溶液调节 pH 至 1, 然后加入 30mL 水。过滤收集所得到的沉淀产物并用水洗涤得到淡黄色固体状的 (4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯基)甲醇 (2.28g, 5.83mmol, 58%)。化合物的 HPLC 保留时间 = 3.37min。- 色谱柱: CHROMOLITH® SpeedROD 4.6×50mm(4min.); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.2% H_3PO_4 ; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.2% H_3PO_4 。LC/MS $M^{+1} = 388.0$ 1H NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 4.61 (d, $J = 6$ Hz, 2H), 5.39 (t, $J = 6$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.70 (ddd, $J = 0.9$ Hz, 4.8Hz, 7.5Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.20 (dt, $J = 2.2$ Hz, 7.5Hz, 1H), 8.67 (dd, $J = 1.3$ Hz, 4.8Hz, 1H), 8.73 (s, 1H)。

[0300] 1-D. 4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯甲醛

[0301]



[0302] 将 300mL DCM 冷却至 -78°C , 然后加入草酰氯 (0.475mL, 5.42mmol) 并将混合物在 -78°C 搅拌 10min。加入 DMSO (0.586mL, 8.26mmol) 并将混合物在 -78°C 搅拌 15min。用 10 分钟的时间向反应混合物中滴加 4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯基)甲醇 (1g, 2.58mmol) 于 60mL DCM 中的溶液, 另用 10mL DCM 冲洗 SM 烧瓶并同样将洗液滴加到反应混合物中。将反应混合物在 -78°C 保持 40min, 然后用 10 分钟的时间加入 Hunig 碱 (3.61mL, 20.66mmol)。在 -78°C 连续搅拌 10min, 然后移去干冰浴并将反应烧瓶逐渐温热至室温。加入 0.5N KHSO_4 溶液 (70mL) 并将混合物用 DCM (50mL) 萃取两次。合并有机物, 用 Na_2SO_4 干燥并浓缩。向产物中加入乙醚 (100mL), 并将混合物搅拌过夜, 然后过滤和用乙醚洗涤固体, 得到 4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯甲醛 (700mg, 1.74mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 3.69min。- 色谱柱: CHROMOLITH® SpeedROD 4.6×50mm (4min.); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.2% H_3PO_4 ; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.2% H_3PO_4 。LC/MS $M^{+1} = 386.01$ 。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 7.69 (ddd, $J = 0.8\text{Hz}, 5.0\text{Hz}, 7.4\text{Hz}, 1\text{H}$), 7.90 (d, $J = 8.0\text{Hz}, 1\text{H}$), 8.15 (d, $J = 8.3\text{Hz}, 2\text{H}$), 8.20 (dt, $J = 1.9\text{Hz}, 7.7\text{Hz}, 1\text{H}$), 8.32 (d, $J = 8.3\text{Hz}, 2\text{H}$), 8.67 (dd, $J = 1.9\text{Hz}, 4.7\text{Hz}, 1\text{H}$), 8.76 (s, 1H), 10.13 (s, 1H)。

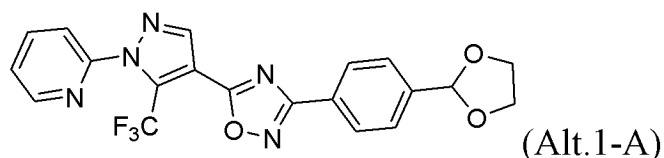
[0303] 1-E. 1-(4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的制备

[0304] 向 4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯甲醛 (1.0g, 2.60mmol) 于 DCM (10mL) 的溶液中加入乙酸 (15mL) 和氮杂环丁烷-3-羧酸 (1.5 当量, 3.90mmol)。将混合物在室温搅拌 40min, 然后用 1.5h 的时间滴加三乙酰氧基硼氢化钠 (1 当量, 2.60mmol) 于 DCM (30mL) 中的混悬液。真空除去挥发物, 加入水 (200mL) 并过滤收集得到的固体。向粗产物中加入乙酸乙酯 (40mL), 超声 30min 之后, 过滤收集固体并用额外的乙酸乙酯洗涤, 得到白色固体状的 1-(4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸 (777mg, 1.65mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 2.55min。色谱柱: CHROMOLITH® SpeedROD 4.6×50mm (4min.); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.2% H_3PO_4 ; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.2% H_3PO_4 。LC/MS $M^{+1} = 471.05$ 。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.21-3.25 (m, 3H), 3.40-3.44 (m, 2H), 3.64 (s, 2H), 7.51 (d, $J = 8.3\text{Hz}, 2\text{H}$), 7.69 (ddd, $J = 0.8\text{Hz}, 4.7\text{Hz}, 8.3\text{Hz}, 1\text{H}$), 7.90 (d, $J = 8.0\text{Hz}, 1\text{H}$), 8.03 (d, $J = 8.3\text{Hz}, 2\text{H}$), 8.20 (dt, $J = 1.9\text{Hz}, 7.7\text{Hz}, 1\text{H}$), 8.66 (dd, $J = 1.1\text{Hz}, 4.1\text{Hz}, 1\text{H}$), 8.73 (s, 1H)。

[0305] 可替换的实施例 1 (Alt. 1) 的制备方法

[0306] Alt. 1-A. 3-(4-(1,3-二氧杂环戊-2-基)苄基)-5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑

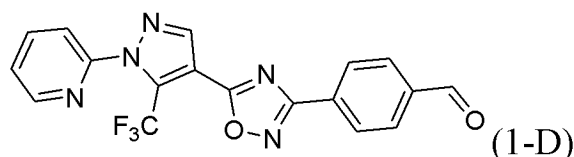
[0307]



[0308] 向 1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸 (31.46g, 122mmol) 于 DMF (200mL) 中的溶液中加入 EDCI (23.34g, 134mmol) 和 HOBt (16.53g, 122mmol)。将反应混合物在室温搅拌 30 分钟之后, 加入 4-(1,3-二氧杂环戊-2-基) 苄腈、Int. 6-A (16.53g, 122mmol)。将反应混合物在 140℃ 搅拌 4hr。减压浓缩反应混合物以除去挥发物。将残余物在水和乙酸乙酯之间分配并且在使用 Na_2SO_4 干燥之前, 用 HCl 水溶液、 NaHCO_3 溶液、水和盐水洗涤有机层, 经浓缩得到 3-(4-(1,3-二氧杂环戊-2-基) 苄基)-5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑 (25g, 58mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 6.15min。- 色谱柱: Hypersil® BDS C18 (4.6×50mm) 流速 = 0.8mL/min。溶剂 A = 0.1% TFA 于水中的溶液; 溶剂 B = 乙腈。5% -100% B (0-6min), 100% B (6-9min), 100% -5% B (9-11min)。LC/MS $M^+ = 430.0$ 。

[0309] 1-D. 4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基) 苯甲醛的可替换的制备方法

[0310]



[0311] 将 3-(4-(1,3-二氧杂环戊-2-基) 苄基)-5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑 (25g, 58.2mmol) 和浓 HCl (con. HCl) (500mL) 于 THF/水 (500mL/500mL) 中的溶液在室温搅拌 3 小时。由 TLC 所监视, 在反应结束之时, 随即用水稀释反应混合物并用乙酸乙酯萃取。用水和盐水洗涤有机层, 然后经干燥和减压浓缩得到 4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基) 苯甲醛 (19g, 49mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 1.90min。-CHROMOLITH® SpeedR0D 4.6×30mm。流速 = 5mL/min (2min. 梯度); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.1% TFA; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.1% TFA。LC/MS $M^+ = 386.2$ 。

[0312] 实施例 1. 1-(4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基) 苄基) 氮杂环丁烷-3-羧酸的可替换的制备方法

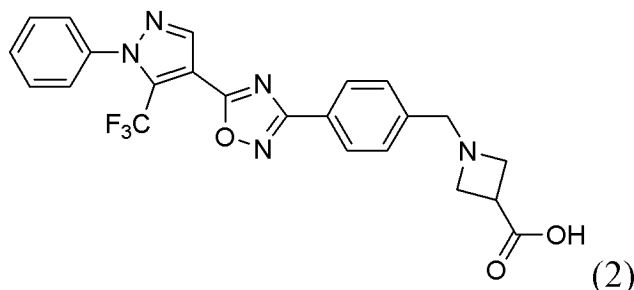
[0313] 将 4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基) 苯甲醛 (21g, 54.5mmol) 和氮杂环丁烷-3-羧酸 (6.61g, 65.4mmol) 于乙醇 (750mL) 和乙酸 (20mL) 中的溶液在室温搅拌 30min。将反应混合物冷却至 0℃ 并缓慢加入氰基硼氢化钠 (注意: 氰化物产生的可能性来源) (1.17g, 27.3mmol) 于乙醇中的溶液。将反应升温至室温并搅拌过夜。减压浓缩反应混合物并用水稀释残余物。过滤收集固体并用水洗涤。通过用 DCM: 甲醇 (98: 2)、DCM: 甲醇 (96: 4) 和乙酸乙酯各研磨一次以纯化产物, 得到 1-(4-(5-(1-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基) 苄基) 氮杂环丁烷-3-羧酸 (16g, 34mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 8.48min。- 色谱柱: XbridgeA 4.6×150mm 流速 = 1.0mL/min。缓冲液 = 0.05% TFA 于水中的溶液, pH2.5。

溶剂 A = 缓冲液 : 乙腈 (95 : 5), 溶剂 B = 乙腈 : 缓冲液 (95 : 5)。0-100% B 共用 12 分钟。LC/MS⁺ = 471.2。

[0314] 实施例 2

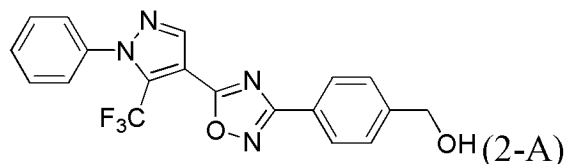
[0315] 1-(4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸

[0316]



[0317] 2-A. (4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)甲醇

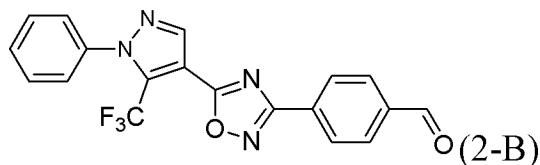
[0318]



[0319] 氮气下, 将 1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸 (2g, 7.81mmol)、HOBT (1.315g, 8.59mmol) 和 EDC (1.646g, 8.59mmol) 在室温溶解于 DMF (18mL) 中。将得到的澄清、淡黄色溶液搅拌 20 分钟, 然后分批加入 N-羟基-4-(羟基甲基)苯甲脒, Int. 2 (1.297g, 7.81mmol)。将反应置于预先加热至 140°C 的油浴中 10 小时。将反应混合物冷却至室温, 注入水 (150mL), 剧烈搅拌并置超声浴中 1 小时。过滤收集固体, 用水洗涤, 空气干燥并置于真空中, 得到非常淡的黄色固体状的 (4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)甲醇 (2.5g, 6.47mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 3.76min。- 色谱柱 : CHROMOLITH® SpeedROD 4.6 × 50mm (4min.) ; 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.2% H₃PO₄; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.2% H₃PO₄。LC/MS M⁺ = 387.1 ¹H NMR (500MHz, MeOD) δ ppm 4.70 (s, 2H), 7.53-7.57 (m, 4H), 7.57-7.62 (m, 1H), 7.61 (d, J = 6.4Hz, 2H), 8.12 (d, J = 8.2Hz, 2H), 8.48 (s, 1H)。

[0320] 2-B. 4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯甲醛

[0321]



[0322] 将 50mL 圆底烧瓶用火焰干燥并在干燥氮气流下冷却。在烧瓶中先后加入 DCM (25mL) 和草酰氯 (6.79mL, 13.59mmol) (2M 于 DCM 中的溶液) 并将其在丙酮 / 干冰浴中冷却。滴加二甲亚砜 (1.47mL, 20.71mmol)。10 分钟后, 用 5-10 分钟的时间分小批次加入

(4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯基)甲醇(2.5g, 6.47mmol), 得到淡黄色浆料。搅拌 5 分钟后, 滴加 DIPEA(9.27mL, 53.1mmol)。浑浊的混合物开始变得澄清, 然后再次变浑浊, 在加入过程中颜色由淡黄色褪变成灰白色。5 分钟后, 移去冷却浴使反应缓慢温热至室温。在室温搅拌 3 小时后, 蒸发溶剂并将残余物在 EtOAc(100mL) 和 0.5N KHSO₄(70mL) 之间分配。将 EtOAc 相用 50mL 的 1N HCl、水、饱和 NaHCO₃ 水溶液、水和盐水各自洗涤, 然后用 MgSO₄ 干燥、过滤和蒸发。超声和加热条件下使固体在己烷(含~5% EtOAc)中浆化, 然后冷却至室温并过滤。将固体用己烷洗涤, 空气干燥并置于真空中, 得到 4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯甲醛(1.55g)。化合物的 HPLC 保留时间 = 2.04min。- 色谱柱: PHENOMENEX® Luna 5u C184.6×30mm(2min.); 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.1% TFA; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.1% TFA。LC/MS M⁺ = 385.17。

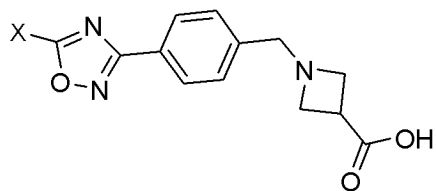
[0323] 2-C. 1-(4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的制备

[0324] 向 4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯甲醛(700mg, 1.821mmol)于 MeOH(12mL)和 1,2-二氯乙烷(3mL)中的溶液中加入 0.1mL 乙酸和氮杂环丁烷-3-羧酸(203mg, 2.0mmol)。将混合物在室温搅拌 40 分钟, 然后加入三乙酰氧基硼氢化钠(618mg, 2.91mmol)。将混合物在室温搅拌 5 小时, 然后过滤得到白色固体, 并将其用水(1mL)和 MeOH(3×1mL)洗涤。真空干燥固体, 得到 1-(4-(5-(1-苯基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(480mg, 1.02mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 6.91min。- 色谱柱: 低 pH Col-1: Sunfire C183.5um, 4.6×150mm; 开始% B = 10; 12min. 100%; 15min. 100%; 流速 = 2mL/min; 波长 1 = 220; 波长 2 = 254; 溶剂对 = TFA-MeCN/水; 溶剂 A = 0.05% TFA 于水中的溶液: MeCN(95 : 5); 溶剂 B = 0.05% TFA 于水中的溶液: MeCN(5 : 95); 色谱柱 1 = 低 pH-平行 HPLC; 在 220nm LC/MS M⁺ = 470.1¹H NMR(500MHz, MeOD) δ ppm 3.41(dt, J = 8.8Hz, 7.7Hz, 1H), 4.12-4.18(m, 4H), 4.38(s, 2H), 7.57-7.66(m, 7H), 8.23(d, J = 8.3Hz, 2H), 8.50(s, 1H)。

[0325] 表 1

[0326] 表 1 中的化合物采用与上述实施例中所描述的相似的方法, 通过使相应的吡唑羧酸与 Int. 2 反应来制备, 并如 1-C 步骤所述来加工(elaborate)。所需的吡唑羧酸是商业上可获得的(对于实施例 5、实施例 6 和实施例 11), 或是类似于 1-A 的制备方法中所描述的那样, 通过从相应的肼(全部是商业上可获得的)及所需的 β 酮酸酯和 DMF 二甲基乙缩醛的缩合产物(对于实施例 7 中的 3-环戊基-3-氧代丙酸叔丁酯, 实施例 9 中的 2-乙酰乙酸乙酯, 实施例 10 中的 3-氧代-3-苯基丙酸乙酯)缩合而制备的。实施例 3 中的吡唑羧酸酯采用与 Int. 5 所描述的类似的方法来制备的, 其中用异丙胺代替乙胺。实施例 8 中的吡唑羧酸酯是通过使 2-氟-6-肼基吡啶与 (Z)-2-(乙氧基亚甲基)-4,4,4-三氟-3-氧代丁酸乙酯缩合来制备的。

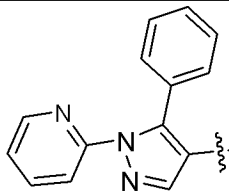
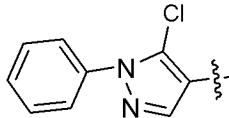
[0327]



[0328]

实施例 编号	X	分子量	HPLC 保留时 间 (min.)	HPLC 方法	质谱(M ⁺)
3		458.51	6.81	C	459.3
4		444.49	7.46	C	445.3
5		415.44	2.81	A	416.2
6		444.49	6.635	C	445.4
7		470.52	2.74	B	471.2
8		514.26	3.21	B	515.2
9		421.49	6.76	C	422.3

[0329]

实施例编号	X	分子量	HPLC 保留时间 (min.)	HPLC 方法	质谱(M ⁺)
10		478.5	1.57	D	478.9
11		435.86	6.51	C	436.2

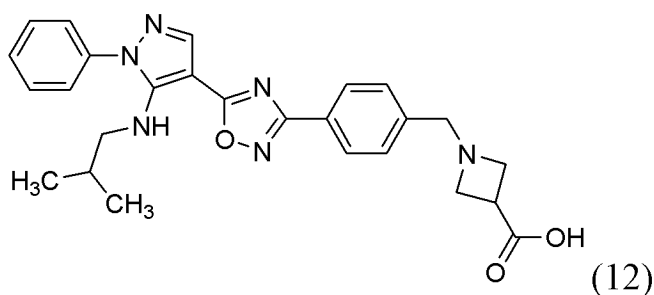
[0330]

HPLC 方法	HPLC 条件
A	CHROMOLITH®SpeedROD 4.6×50mm(4min.); 溶剂 A=10%MeOH、90%水、0.2%H ₃ PO ₄ ; 溶剂 B=90%MeOH、10%水、0.2%H ₃ PO ₄
B	色谱柱: YMC COMBISCREEN®ODS-A 4.6×50mm(4min.); 溶剂 A=10%MeOH、90%水、0.2%H ₃ PO ₄ ; 溶剂 B=90%MeOH、10%水、0.2%H ₃ PO ₄
C	低 pH Col-1: Sunfire C18 3.5um, 4.6×150mm; 开始%B=10; 12min. 100%; 15min. 100%; 流速=2mL/min; 波长 1=220; 波长 2=254; 溶剂对=TFA-MeCN/水; 溶剂 A=0.05%TFA 于水中的溶液:MeCN(95:5); 溶剂 B=0.05%TFA 于水中的溶液:MeCN(5:95); 色谱柱 1=低 pH-平行 HPLC; 在 220nm
D	色谱柱: XbridgeA 4.6×50mm(4min.); 溶剂 A=5%乙腈 95%水, 10mm NH ₄ OAc; 溶剂 B=95%乙腈 5%水, 10mm NH ₄ OAc;

[0331] 实施例 12

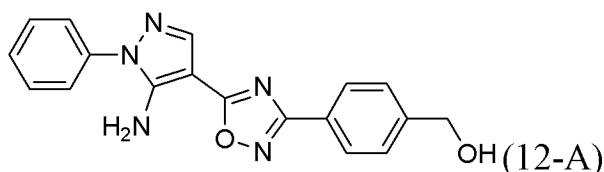
[0332] 1-(4-(5-(5-(异丁基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸

[0333]



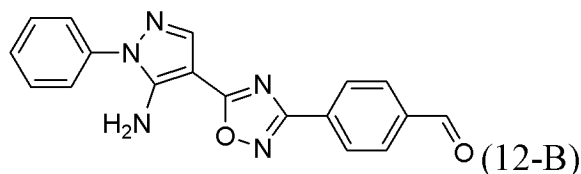
[0334] 12-A. (4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)甲醇

[0335]



[0336] 氮气环境下,在室温将 5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-羧酸 (1.8g, 8.86mmol)、HOBt (1.357g, 8.86mmol) 和 EDCI (1.698g, 8.86mmol) 溶解于 DMF (12mL) 中。将得到的澄清、淡黄色溶液搅拌 30 分钟然后分批加入 N-羟基-4-(羟基甲基)苯甲脒 (1.472g, 8.86mmol)。将反应混合物置于设定在 130℃ 的油浴中。4 小时后,将溶液冷却至室温并加入到快速搅拌的水 (50mL) 中。搅拌和超声初始生成的沉淀,得到黄色固体并将其过滤收集,用水洗涤,空气干燥后进行真空干燥,得到 4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯基)甲醇 (1.5g, 4.05mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 3.19min 色谱柱 CHROMOLITH® SpeedROD 4.6×50mm (4min.) ; 溶剂 A = 10% MeOH、90% 水、0.2% H_3PO_4 ; 溶剂 B = 90% MeOH、10% 水、0.2% H_3PO_4 。LC/MS $M^+ = 334.2$ ^1H NMR (500MHz, MeOD) δ ppm 3.34 (s, 2H), 7.53-7.57 (m, 4H), 7.57-7.62 (m, 1H), 7.61 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 2H), 8.12 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 2H), 8.48 (s, 1H)。

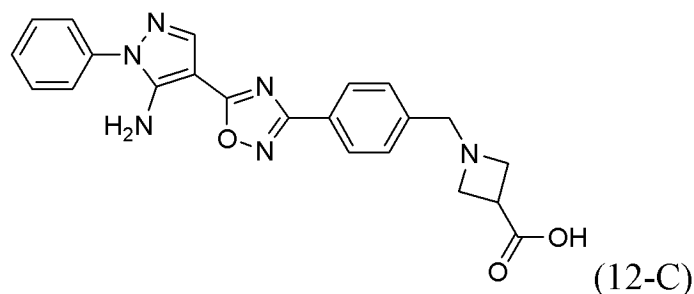
[0337] 12-B. 4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯甲醛
[0338]



[0339] 将 50mL 圆底烧瓶用火焰干燥并在干燥氮气流下冷却。向烧瓶中先后加入 DCM (10mL) 和草酰氯 (2M 于 DCM 中, 0.882mL, 1.764mmol) 并将其在丙酮 / 干冰浴中冷却。滴加 DMSO (0.191mL, 2.69mmol)。10 分钟后,用 1-2 分钟的时间分小批次加入 4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯基)甲醇 (280mg, 0.840mmol), 得到淡黄色浆料。搅拌 2-3 分钟后,滴加 DIPEA (1.203mL, 6.89mmol)。浑浊的混合物开始变得澄清,然后再次变浑浊,在加入过程中颜色由淡黄色褪变成灰白色。5 分钟后,移去冷却浴使反应缓慢温热至室温。在室温搅拌 2 小时后,蒸发溶剂并将残余物在 EtOAc (60mL) 和 0.5N KHSO_4 (25mL) 之间分配。将 EtOAc 相用 25mL 的 1N HCl、水、饱和 NaHCO_3 水溶液、水和盐水中的每种洗涤,然后用 MgSO_4 干燥、过滤和蒸发。超声和加热条件下使固体在己烷 (含 ~10% EtOAc) 中浆化,然后冷却至室温并过滤。将固体用己烷洗涤,空气干燥然后置于真空中,得到 4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯甲醛 (250mg, 0.664mmol), 将其直接使用而不进行进一步的纯化。化合物的 HPLC 保留时间 = 1.77min. - 色谱柱: (PHENOMENEX® Luna 4.6×30mm S-50DS 色谱柱), 以 2 分钟的梯度用 10-90% 含水甲醇 +0.1% TFA 洗脱。LC/MS $M^+ = 334.2$

[0340] 12-C. 1-(4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯基)氮杂环丁烷-3-羧酸

[0341]



[0342] 向 4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯甲醛 (100mg, 0.302mmol) 于 MeOH (6mL) 和 1,2-二氯乙烷 (2mL) 中的溶液中加入 0.1mL 乙酸和氮杂环丁烷-3-羧酸 (45.8mg, 0.453mmol), 将混合物在室温搅拌 40 分钟, 然后分批加入三乙酰氧基硼氢化钠 (64.0mg, 0.302mmol)。将反应混合物在室温搅拌过夜然后真空除去溶剂并采用制备性 HPLC 纯化残余物, 得到 1-(4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的三氟乙酸盐 (95mg, 0.18mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 5.73min。- 色谱柱: 低 pH Col-1; Sunfire C183.5um, 4.6×150mm; 开始 % B = 10; 12min. 100%; 15min. 100%; 流速 = 2mL/min; 波长 1 = 220; 波长 2 = 254; 溶剂对 = TFA-MeCN/水; 溶剂 A = 0.05% TFA 于水中的溶液: MeCN (95 : 5); 溶剂 B = 0.05% TFA 于水中的溶液: MeCN (5 : 95); 色谱柱 1 = 低 pH-平行 HPLC; 在 220nm LC/MS $M^+ = 417.2$ 。 1H NMR (500MHz, MeOD) δ ppm 3.63 (m, 1H), 4.26 (m, 4H), 4.40 (s, 2H), 7.40 (m, 1H), 7.46 (m, 4H), 7.51 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.92 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H)。

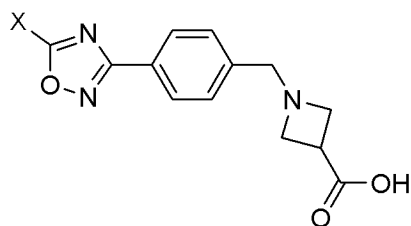
[0343] 12. 1-(4-(5-(5-(异丁基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的 2,2,2-三氟乙酸盐的制备

[0344] 向 1-(4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸 (20mg, 0.048mmol) 于乙腈 (1.5mL) 中的溶液中加入异丁醛 (10.39mg, 0.144mmol)、TFA (0.011mL, 0.144mmol) 和三乙基硅烷 (0.023mL, 0.144mmol)。将反应混合物在 55℃ 搅拌过夜。利用制备性 HPLC 纯化得到 1-(4-(5-(5-(异丁基氨基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的 2,2,2-三氟乙酸盐 (9mg, 0.015mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 7.17min。- 色谱柱: 低 pH Col-1; Sunfire C183.5um, 4.6×150mm; 开始 % B = 10; 12min. 100%; 15min. 100%; 流速 = 2mL/min; 波长 1 = 220; 波长 2 = 254; 溶剂对 = TFA-MeCN/水; 溶剂 A = 0.05% TFA 于水中的溶液: MeCN (95 : 5); 溶剂 B = 0.05% TFA 于水中的溶液: MeCN (5 : 95); 色谱柱 1 = 低 pH-平行 HPLC; 在 220nm LC/MS $M^+ = 473.3$ 。 1H NMR (500MHz, MeOD) δ ppm 0.71 (dt, 6H, $J = 6.6$ Hz), 1.49-1.61 (m, 1H), 2.67 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.63-3.69 (m, 1H), 4.25-4.31 (m, 4H), 4.42 (s, 2H), 7.34-7.41 (m, 1H), 7.44-7.49 (m, 4H), 7.51 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.88 (s, 1H), 8.10 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz)。

[0345] 表 2

[0346] 表 2 中的化合物采用与上述实施例类似的方法来制备。

[0347]

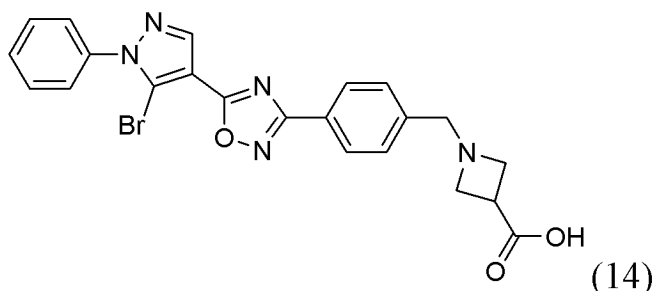


实施例 编号	X	分子 量	HPLC 保留时 间 (min.)	HPLC 方法	质谱(M ⁺)
[0348] 13		472.5	7.2	D	473.3

[0349] 实施例 14

[0350] 1-(4-(5-(5-溴-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的 2,2,2-三氟乙酸盐

[0351]



[0352] 在 0℃向 1-(4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸 (30mg, 0.072mmol) 和 溴化铜 (II) (24.14mg, 0.108mmol) 于乙腈 (2mL) 中的溶液中滴加亚硝酸叔丁酯 (0.013mL, 0.108mmol)。将混合物缓慢温热至室温, 然后在室温搅拌 3 小时。真空除去溶剂, 将残余物用制备性 HPLC 纯化得到 1-(4-(5-(5-溴-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的 2,2,2-三氟乙酸盐 (9.9mg, 0.017mmol)。化合物的 HPLC 保留时间 = 6.52min。- 色谱柱: 低 pH Col-1; Sunfire C183.5um, 4.6×150mm; 开始 % B = 10; 12min. 100 %; 15min. 100 %; 流速 = 2mL/min; 波长 1 = 220; 波长 2 = 254; 溶剂对 = TFA-MeCN/ 水; 溶剂 A = 0.05 % TFA 于水中的溶液: MeCN(95 : 5); 溶剂 B = 0.05 % TFA 于水中的溶液: MeCN(5 : 95); 色谱柱 1 = 低 pH- 平行 HPLC; 在 220nm LC/MS M⁺ = 480.1, 482.1 ¹H NMR (500MHz, MeOD) δ ppm 3.68-3.75 (m, 1H), 4.34-4.40 (m, 4H), 4.61 (s, 2H), 7.57-7.63 (m, 5H), 7.66 (d, 2H, J = 8.3Hz), 8.25 (d, 2H, J = 8.3Hz), 8.45 (s, 1H)

[0353] 实施例 15

[0354] 1-(4-(5-(1-苯基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的 2,2,2-三氟乙酸盐

[0355]

O=C(O)C1CCN1Cc2ccc(cc2)-c3nn(C4=CC=CC=C4)c5cc6c(cc5)ncn6 (15)

[0356] 15-A. (Z)-1-(4-(N'-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-羰基氧基)甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯

[0357]

COC(=O)C1CCN(C1)Cc2ccc(cc2)/N=N/C(=O)c3c(N)n(c3)c4ccccc4 (15-A)

[0358] 将 5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-羧酸 (90mg, 0.441mmol)、(Z)-1-(4-(N'-羟基甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯 (116mg, 0.441mmol)、EDC (84mg, 0.441mmol) 和 HOBt (67.5mg, 0.441mmol) 于 DMF (1mL) 中的混合物在室温搅拌 1hr。此时, 加入 Et₃N (0.061mL, 0.441mmol) 并在室温连续搅拌 3 天。然后将混合物加热至 50℃ 并保持 10 分钟。将反应混合物在 EtOAc (30mL) 和饱和碳酸氢钠溶液 (30mL) 中分配。用饱和碳酸氢钠溶液 (30mL)、水 (30mL) 和盐水 (30mL) 洗涤有机层。干燥 (MgSO₄) 和过滤之后, 浓缩有机层得到白色固体状的 (Z)-1-(4-(N'-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-羧基氧基)甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯 (103mg, 0.230mmol)。HPLC 保留时间 = 1.05 分钟 (PHENOMENEX® Luna 4.6×30mm S-50DS 色谱柱), 以 2 分钟梯度用 10-90% 含水甲醇 + 0.1% TFA 洗脱。MS: (M+H) = 449.3。

[0359] 15-B. 1-(4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯

[0360]

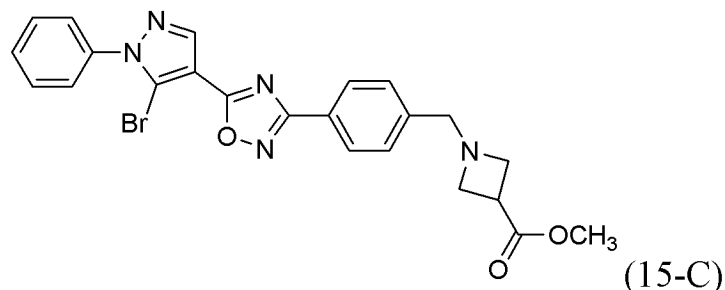
(15-B)

[0361] 向 (Z)-1-(4-(N'-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-羰基氧基)甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯 (102mg, 0.227mmol) 于 EtOH (3mL) 中的混悬液中加入乙酸钠 (37.3mg, 0.455mmol) 于水中的溶液 (1mL)。将混合物加热至 90°C 3hr。将反应混合物转移至微波瓶 (microwave vial) 然后加热至 120°C 30 分钟。将反应混合物在 EtOAc (30mL) 和水 (30mL) 之间分配。用 EtOAc (15mL) 萃取水层并将合并的有机层干燥 (MgSO₄) 和浓缩, 得到油状物, 并将其用 12gm Isco 硅胶柱、0-100% EtOAc/ 己烷梯度洗脱而进行色谱分离。浓缩纯净的级份, 得到无色油状的 1-(4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯 (70mg, 0.163mmol)。HPLC 保留时间 = 1.35 (乙酯-1.42)

分钟 (PHENOMENEX® Luna 4.6×30mm S-50DS 色谱柱), 以 2 分钟梯度用 10-90% 含水甲醇 +0.1% TFA 洗脱。MS : (M+H) = 431.23 (乙酯 -445.25)。(由于在反应过程中的部分酯交换作用, 因此产物是甲基酯和乙酯的混合物。将混合物继续用在下面的步骤中)。

[0362] 15-C. 1-(4-(5-(5-溴-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯的制备:

[0363]



[0364] 在 0°C 向 1-(4-(5-(5-氨基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯 (69mg, 0.160mmol) 和溴化铜 (II) (53.7mg, 0.240mmol) 于乙腈 (3mL) 中的溶液中加入亚硝酸叔丁酯 (0.029mL, 0.240mmol)。将反应混合物温热至室温并搅拌 1hr。然后将反应混合物在 EtOAc (30mL) 和饱和的 NH₄Cl 溶液: 浓 NH₄OH 比例为 1 : 1 (30mL) 的混合溶液之间分配。用饱和的 NH₄Cl 溶液: 浓 NH₄OH 比例为 1 : 1 (30mL) 的混合溶液和饱和的 NH₄Cl 溶液 (30mL) 洗涤有机层。在干燥 (MgSO₄) 和过滤之后, 浓缩有机层, 得到橙色油状的 1-(4-(5-(5-溴-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯 (48mg, 0.097mmol)。HPLC 保留时间 = 1.53 (乙酯 -1.58) 分钟 (PHENOMENEX® Luna 4.6×30mm S-50DS 色谱柱), 以 2 分钟梯度用 10-90% 含水甲醇 +0.1% TFA 洗脱。MS : (M+H) = 494/496.11 (乙酯 -508/510.11)。(注释: 该产物是甲基和乙酯的混合物)。

[0365] 15. 1-(4-(5-(1-苯基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的 2,2,2-三氟乙酸盐的制备

[0366] 在氮气下将 1-(4-(5-(5-溴-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸甲酯 (47mg, 0.095mmol)、吡啶-3-基硼酸 (12.86mg, 0.105mmol)、三环己基膦 (2.67mg, 9.51 μmol)、三(二苄基丙酮)二钯 (0) (3.48mg, 3.80 μmol) 和磷酸三钾 2.0M (0.081mL, 0.162mmol) 于二噁烷 (1mL) 中的混合物加热至 100°C 并保持 8hr。冷却至室温以后, 将反应混合物在 EtOAc (30mL) 和水 (20mL) 之间分配。干燥和浓缩有机层, 得到黄色油状物。将该油状物溶解于 MeOH (1mL) 中并加入 1N NaOH (0.2mL)。在室温搅拌 1hr 以后, 加入 0.2mL 1N HCl 并将反应混合物浓缩至干。将残余物悬浮于水中并调节混悬液的 pH 值为 ~ 4。将混悬液过滤, 滤液经证实含有想要的产物。在浓缩滤液之后, 将残余物溶解于 MeOH 中并应用于制备性 HPLC (YMC20×100mm S-100DS 色谱柱; 10-90% 含水甲醇 +0.1% TFA, 10 分钟梯度) 中。将纯净的级份浓缩和并干燥过夜, 得到白色固体状的 1-(4-(5-(1-苯基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸的 2,2,2-三氟乙酸盐 (5.3mg, 8.94 μmol)。HPLC 保留时间 = 2.31 分钟 (YMC-Combi4.6×50mm S-50DS 色谱柱), 以 4 分钟梯度用 10-90% 含水甲醇 +0.2% 磷酸洗脱。MS : (M+H) = 479.30。¹H NMR (400MHz, MeOD) δ ppm 3.73 (m, 1H) 4.38 (m, 4H) 4.51 (s,

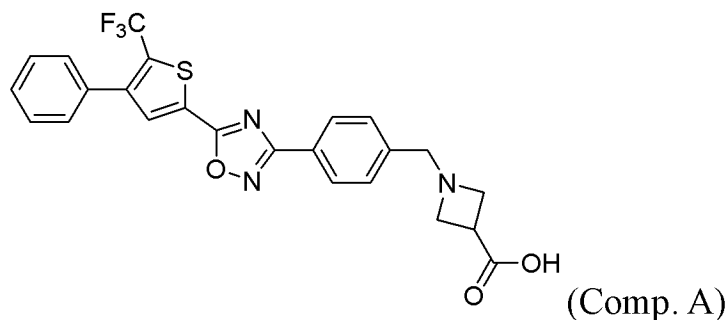
2H) 7.40 (m, 2H) 7.46 (m, 2H) 7.56 (m, 2H) 7.62 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H) 7.96 (m, 1H) 8.12 (d, $J = 8.1\text{Hz}$, 2H) 8.56 (s, 1H), 8.68 (m, 1H) 8.74 (s, 1H)。

[0367] 对照化合物 A (Comp. A)

[0368] Comp. A-1. 1-(4-(5-(4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸

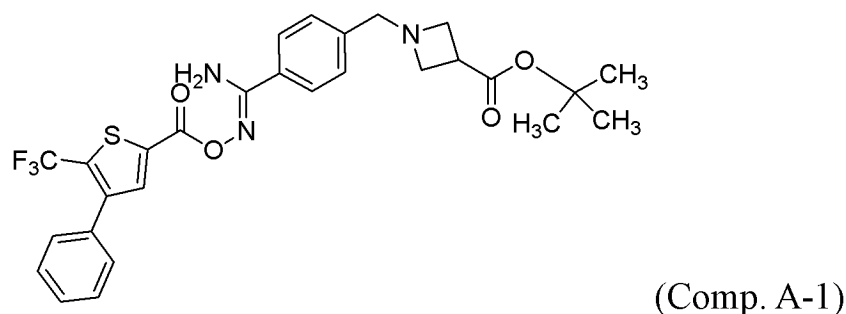
[0369] 制备了用于评价的对照化合物 (Comp. A)。该化合物来自于 W02003/062252 中的实施例 54, 也描述于 Hale 等人, J. Med. Chem., 6662 (2004) 中。

[0370]



[0371] Comp. A-1. (Z)-1-(4-(N'-(4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-羰基氧基)-甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯

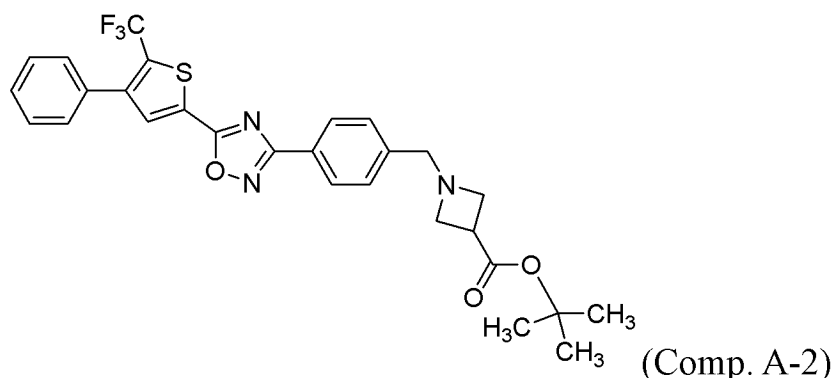
[0372]



[0373] 将 4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-羧酸 (408mg, 1.50mmol)、(Z)-1-(4-(N'-羧基甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (Int. 1, 458mg, 1.50mmol)、HOBT (345mg, 2.250mmol)、Hunig 碱 (1.05mL, 6.00mmol) 和 EDC (431mg, 2.25mmol) 于 N,N-二甲基甲酰胺 (7.5mL) 中的混合物在室温搅拌 18h。将反应混合物在乙酸乙酯 (120mL) 和饱和碳酸氢钠水溶液 (60mL) 之间分配。将有机层用水 (2×120mL) 洗涤、用盐水 (120mL) 洗涤, 并用无水硫酸镁干燥。减压浓缩得到淡粉红色固体状的 (Z)-1-(4-(N'-(4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-羰基氧基)-甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (744mg, 1.33mmol, 产率 89%) 并将其直接用于下一步而不进行进一步的纯化。HPLC: 保留时间 = 3.26 分钟 (YMC Combi S-54.6×50mm ODS 色谱柱), 以 4 分钟梯度用 10-90% 含水甲醇 +0.2% 磷酸洗脱。MS: (M+H) = 560.25。

[0374] Comp. A-2. 1-(4-(5-(4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯

[0375]



[0376] 向 (Z)-1-(4-(N'-(4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-羧基氧基)甲脒基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (744mg, 1.33mmol) 于乙腈 (30mL) 中的溶液中加入 1MTBAF 于四氢呋喃中的溶液 (3.99mL, 3.99mmol), 并将反应混合物在室温搅拌 3 天。减压除去挥发物, 并将残余物用 5×12cm 硅胶柱进行色谱分离, 以 0-50% EtOAc/Hex 梯度洗脱。浓缩基本上纯净的包含产物的级份, 得到无色固体状的 1-(4-(5-(4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (521mg, 0.962mmol, 72.4% 产率)。HPLC 保留时间 = 3.63min。 (YMC Combi S-54.6×50mm ODS 色谱柱), 以 4 分钟梯度用 10-90% 含水甲醇 +0.2% 磷酸洗脱。MS: (M+H) = 542.22。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ ppm 1.46 (s, 9H), 3.25-3.31 (m, 3H), 3.52-3.58 (m, 2H), 3.69 (s, 2H), 7.43 (d, J = 8.25Hz, 2H), 7.47 (m, 5H), 7.91 (s, d, J = 1.65Hz, 1H) 和 8.09 (d, J = 8.25Hz, 2H)。

[0377] Comp. A. 1-(4-(5-(4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)-氮杂环丁烷-3-羧酸的制备

[0378] 将 1-(4-(5-(4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸叔丁酯 (518mg, 0.956mmol) 于三氟乙酸 (15mL) 中的溶液在室温静置 1.5h。减压除去挥发物, 并将残余物从乙酸乙酯/己烷 (2×10mL) 中共蒸发。将残余物混悬于水 (10mL) 中并用 1N 氢氧化钠水溶液调节 pH 值至 ~11。向该溶液中加入足够的 1N 盐酸水溶液以调节 pH 值至 ~4.5。将得到的混悬液在室温搅拌过夜。将所得到的白色混悬液过滤通过中等孔隙度的垂熔玻璃滤器, 并将滤饼用水彻底清洗。干燥固体, 将白色粉末混悬于甲醇中, 超声该混悬液直至形成均一溶液。减压除去甲醇并重复上述操作两次以上, 得到白色固体, 并将其混悬于甲醇 (~30mL) 中搅拌过夜。真空过滤并干燥, 得到白色粉末状的 1-(4-(5-(4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)-氮杂环丁烷-3-羧酸 (345mg, 0.707mmol, 产率 74%)。HPLC 保留时间 = 3.45min。 (YMC Combi S-54.6×50mm ODS 色谱柱), 以 4 分钟梯度用 10-90% 含水甲醇 +0.2% 磷酸洗脱。MS: (M+H) = 486.12。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ ppm 3.23 (s, 3H), 3.39-3.45 (m, 2H), 3.64 (s, 2H), 7.50 (d, J = 8.28Hz, 2H), 7.58 (m, 5H), 8.02 (d, J = 8.28Hz, 2H) 和 8.26 (d, J = 1.25Hz, 1H)。元素分析: C₂₄H₁₈N₃O₃SF₃·0.1H₂O 的计算值: C 59.22、H 3.76、N 8.63、S 6.59、F 11.71; C₂₄H₁₈N₃O₃SF₃·0.1H₂O 的实测值: C 59.06、H 3.45、N 8.60、S 6.61、F 11.42; KF (实测) = 0.25% 水。

[0379] 生物学测定

[0380] S1P₁ 结合测定

[0381] 膜由表达人 S1P₁ 的 CHO 细胞制备。将细胞在缓冲液 (含有 20mM HEPES, pH 7.5,

50mM NaCl, 2mM EDTA 和蛋白酶抑制剂混合物 (cocktail) (Roche)) 中解离, 并在冰上使用 Polytron 匀浆器破裂。将匀浆在 20,000rpm (48,000g) 离心并弃去上清液。将膜沉淀物重新在缓冲液 (含有 50mM HEPES, pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂, 2mM EDTA) 中悬浮并在蛋白浓度确定后以等份的形式在 -80°C 储存。

[0382] 将膜 (2 μg/孔) 和 0.03nM 终浓度的 ³³P-S1P 配体 (1mCi/ml, American Radiolabeled Chemicals) 加入至化合物板中。在室温进行结合 60 分钟, 通过在 GF/B 滤板上收集膜来终止, 并通过 TOPCOUNT® 测量放射性。一定浓度范围内的测试化合物的竞争性数据作为放射性配体特异性结合的抑制百分数来绘图。IC₅₀ 定义为需要减少 50% 特异性结合的竞争性配体的浓度。

[0383] 本发明的化合物和对照化合物 A 在如上所述的 S1P₁ 结合测定中测试且结果四舍五入为两位有效数字, 如在表 A 中显示得到。在一些情况下, 所述值为多个试验的平均值, 其中 N 为实施的提供满意的剂量响应曲线的试验数目。当测试了多于一批的实施例时, 出现的值来自在方法 A 中允许比较 GTP γ S S1P₁ 和 GTP γ S S1P₃ 的批次 (数据在表 B 中显示)。数据未在不同批次的实施例化合物间取平均值。

[0384] 表 A

[0385]

实施例	S1P1 B IC ₅₀ (NM)	N
1	0.40	2
2	0.30	286
3	0.48	2

[0386]

实施例	S1P1 B IC ₅₀ (NM)	N
4	1.1	2
5	30	6
6	0.12	1
7	0.19	1
8	0.85	1
9	ND	0
10	1.1	1
11	ND	0
12	1.7	2
13	3.1	2
14	0.98	1
15	5.4	1
COMP. A	2.5	1

[0387] 方法 A : 受体 [35S]GTP γ S 结合测定

[0388] 将化合物载入至 384Falcon v- 底板 (0.5 μl/孔, 3 倍稀释) 中。将由 S1P₁/CHO 细胞或者 EDG3-Ga15-bla HEK293T 细胞制备的膜加入至具有 MULTIDROP® 的化合物的板 (40 μl/孔, 最终蛋白 3 μg/孔) 中。将 [³⁵S]GTP (1250Ci/mmol, Perkin Elmer) 在测定缓冲液 (含有 20mM HEPES, pH7.5, 10mM MgCl₂, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM DTT, 10 μM GDP, 0.1% 无脂肪酸的 BSA 和 10 μg/ml 皂苷) 中稀释至 0.4nM。将 40 μl 的 [³⁵S]GTP 溶液加入至

终浓度为 0.2nM 的化合物板中。将反应混合物在室温保持 45 分钟。在培养结束时,将在化合物板中的所有混合物经 GPCR 机器人系统转移至 384 孔 FB 滤板中。通过使用改进的复合 Embla 板洗涤器(modified manifold Embla plate washer)将滤板用水洗涤 4 次并在 60℃ 干燥 45 分钟。将 30 μ l MicroScint20 闪烁液加入至每孔中以在 Packard TOPCOUNT® 中计数。EC₅₀ 定义为相应于针对每个单独测试化合物得到的 50% 的 Y_{max} (最大效应) 的激动剂浓度。

[0389] 方法 B :受体 [35S]GTP γ S SPA 结合测定

[0390] 将由 S1P₁ 或者 S1P₃ 转染的 CHO 细胞制备的膜 (2 μ g 蛋白) 在 96-孔白板 (CORNING® 3693) 中在 50 μ l 反应混合物 (含有 7.5 μ l WGA-PVT 珠子 (20mg/ml) 和 5 μ M GDP, 20mM HEPES pH 7.4, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM MgCl₂, 10 μ g/ml 皂苷, 0.1% BSA 和 1 μ M 亮肽素) 中用在 DMSO 中稀释的测试化合物培养。测定开始于将 25 μ l 0.2nM [³⁵S]-GTP γ S (1250Ci/mmol ;NEN) 加入至测定缓冲液中。在室温培养 90 分钟后,将板以 1000rpm 旋转 5 分钟。将结合的放射性核素在 TOPCOUNT® 中测量,表示为相对于 S1P (1 μ M) 激活的响应百分数。在 Excel 中使用四参数逻辑方程分析数据。在等式 $Y = A + ((B-A) / (1 + ((EC_{50}/X)^D)))$ 中的四个参数如下所述 :A 为在底部平台的 Y 值 (激动活性) ; B 为在顶部平台的 Y 值 ;EC₅₀ 为当响应为底部和顶部之间的中间位置时的 X 值 (激动剂浓度) ;D 为希尔系数。曲线不针对具有低于 50% 的 Y_{max} 值的化合物来产生。

[0391] 本发明的化合物和对照化合物 A 在如上所述的受体 [35S]GTP γ S 结合测定 (方法 A) 和受体 [35S]GTP γ S SPA 结合测定 (方法 B) 中测试且结果四舍五入为两位有效数字,如在表 B 中显示得到。在一些情况下,所述值为多个试验的平均值,其中 N 为实施的提供满意的剂量响应曲线的试验数目。当测试了多于一批的实施例时,出现的值来自允许比较 GTP γ S S1P₁ 和 GTP γ S S1P₃ 的批次 (其中进行了最多次数的试验)。优选地,在方法 A 和方法 B 中检测相同批次。数据未在不同批次的实施例化合物间取平均值。

[0392] 表 B

实施例	方法 A				方法 B			
	GTP γ S S1P ₁ EC ₅₀ (nM)	N	GTP γ S S1P ₃ EC ₅₀ (nM)	N	GTP γ S S1P ₁ EC ₅₀ (nM)	N	GTP γ S S1P ₃ EC ₅₀ (nM)	N
1	2.9	2	6,700	2	0.50	31	4,400	9
2	1.9	71	NC	0	0.17	12	2,100	3
3	ND	0	ND	0	0.15	1	1,700	1
4	ND	0	ND	0	0.19	1	400	2
5	260	3	13,000	2	17	6	NC	0
6	4.2	2	2,900	2	NC	0	1,300	1
7	ND	0	ND	0	0.087	1	220	1
8	22	1	5,900	1	NC	0	NC	0
9	ND	0	ND	0	1.3	1	710	2
10	ND	0	ND	0	0.42	1	1,100	1
11	ND	0	ND	0	1.9	2	2,000	1
12	ND	0	ND	0	0.28	3	9,800	1
13	ND	0	ND	0	0.17	2	51	51
14	NC	0	ND	0	2.1	2	7,100	1
15	52	1	3,600	1	2.2	3	4,100	2
COMP. A	84	1	97	1	0.25	10	20	3

[0394] ND = 未测定。

[0395] NC = 没有获得令人满意的剂量响应曲线。

[0396] 根据表 B 中的数据计算的 GTP γ S S1P₃EC₅₀ 值与 GTP γ S S1P₁EC₅₀ 值之比, 呈于表 C 中。

[0397] 表 C

实施例	GTP γ S S1P ₃ /S1P ₁ (方法 A)	GTP γ S S1P ₃ /S1P ₁ (方法 B)
1	2,300	8,800
2	ND	12,000
3	ND	11,000
4	ND	2,100
5	50	ND
6	690	ND
7	ND	2,500
8	268	ND
9	ND	550
10	ND	2,600
11	ND	1,100
12	ND	35,000
13	ND	300
14	ND	3,400
15	69	1,900
COMP. A	1.2	78

[0399] 在表 C 中, 对于 GTP γ S S1P₃EC₅₀ 值与 GTP γ S S1P₁EC₅₀ 值的比例的较大值表明相对 S1P₃ 活性对 S1P₁ 活性更大的选择性。

[0400] 如实施例 1 至 15 所示的本发明的化合物,与对照化合物 A 相比,其作为 $S1P_1$ 激动剂的选择性大于 $S1P_3$ 从而显示出了令人惊奇的优势。按照方法 A 来测量,报道于表 C 中的本发明示例性的化合物的选择性之比在 50 至 2,300 的范围内,相比而言,对照化合物 A 的选择性之比为 1.2。按照方法 B 来测量,报道于表 C 中的本发明示例性的化合物的选择性之比在 300 至 35,000 的范围内,相比而言,对照化合物 A 的选择性之比为 78。

[0401] 本发明的化合物具有作为 $S1P_1$ 激动剂的活性以及相对 $S1P_3$ 更具选择性,且因此可用于治疗、预防或者治愈各种 $S1P_1$ 受体相关的病症,同时降低或者最小化由于 $S1P_3$ 活性导致的副作用。本发明化合物的令人惊讶的选择性表明它们如下的潜在用途:治疗、预防或者治愈自身免疫疾病和炎性疾病诸如多发性硬化、类风湿性关节炎、炎性肠病或者牛皮癣,同时降低或者最小化可能的心血管副作用诸如心动过缓和高血压。本发明化合物的其它潜在用途包括最小化或者降低移植器官的排斥,同时降低或者最小化由于 $S1P_3$ 活性导致的副作用。

[0402] 啮齿动物的血液淋巴细胞降低 (BLR) 测定

[0403] 对路易斯大鼠或者 BALB/c 小鼠口服给予测试物质(作为在媒介物中的溶液或者混悬液)或者单独的媒介物(聚乙二醇 300,“PEG300”)。通过眶后取血(retro-orbital bleeding)在 4 小时和 24 小时抽取血液。血液淋巴细胞计数在 ADVIA® 120 血液学分析器(Siemens Healthcare Diagnostics)上确定。结果作为如下测量:在 4 小时和 24 小时测量中相比于媒介物处理组的循环淋巴细胞百分数的降低。结果表示在每个处理组($n = 3-4$)内的所有动物的平均结果。

[0404] 本发明化合物在如上所述的血液淋巴细胞降低 (BLR) 测定中测试且结果在针对大鼠的表 D 中以及针对小鼠的表 E 中显示。

[0405] 表 D

剂量 (mg/kg)	实施例 1 4 hr.时淋巴细 胞的%降低	实施例 1 24 hr.时淋巴细 胞的%降低	实施例 2 4 hr.时淋巴细 胞的%降低	实施例 2 24 hr.时淋巴细 胞的%降低
0.04	49%	6%	64%	8%
0.2	77%	15%	76%	55%
1.0	86%	61%	76%	79%
3.0	81%	75%	NT	NT

[0407] 表 E

剂量 (mg/kg)	实施例 1 4 hr.时淋巴细 胞的%降低	实施例 1 24 hr.时淋巴细 胞的%降低	实施例 2 4 hr.时淋巴细 胞的%降低	实施例 2 24 hr.时淋巴细 胞的%降低
0.04	NT	NT	68%	5%
0.2	NT	NT	76%	64%
0.3	74%	30%	NT	NT
1.0	85%	68%	80%	82%
3.0	85%	76%	73%	89%
10.0	84%	88%	NT	NT

[0409] 大鼠佐剂诱导的关节炎 (AA) 测定

[0410] 对雄性路易斯大鼠 (150-175g ;Harlan, n = 8 处理组) 在尾部底侧用 100 μ l 于不完全弗氏佐剂 (incomplete Freund's adjuvant) (sigma) 中的 10mg/ml 新鲜研磨的乳酪分枝杆菌 (*Mycobacterium butyricum*) (Difco Laboratories) 进行免疫。由免疫当天开始对动物每日一次给予测试物质 (作为在媒介物中的溶液或者混悬液) 或者单独的媒介物 (聚乙二醇 300, "PEG300")。它们后爪的大小在水置换容积测量器 (water displacement plethysmometer) (Ugo Basile, Italy) 中测量。在疾病发作之前 (第 7 天和第 10 天之间) 进行基线爪部测量。然后一周进行三次该爪部测量直到在第 20 天研究结束。所有涉及动物的操作由实验动物管理及使用委员会 (Institutional Animal Care Use Committee) 检查并许可。

[0411] 在上面所描述的大鼠中佐剂诱导的关节炎的测定中测试了本发明化合物, 其结果示于表 F 和表 G 中。

[0412] 表 F

组	第 20 天的爪部肿胀(mL)	
媒介物	平均值	2.11
	SD	0.44
实施例 1 (1.0 mg/kg)	平均值	2.36
	SD	0.63
实施例 1 (3.0 mg/kg)	平均值	1.45
	SD	0.99
实施例 1 (6.0 mg/kg)	平均值	0.17
	SD	0.29
实施例 1 (10.0 mg/kg)	平均值	0.12
	SD	0.10

[0414] 表 G

组	第 21 天的爪部肿胀(ML)	
媒介物	平均值	1.58
	SD	0.63
实施例 2(0.2MG/KG)	平均值	02.12
	SD	0.33
实施例 2(1.0MG/KG)	平均值	0.91
	SD	0.73
实施例 2(3.0MG/KG)	平均值	0.19
	SD	0.29
实施例 2(10.0MG/KG)	平均值	0.10
	SD	0.20

[0416] 在针对类风湿性关节炎的动物模型 - 大鼠佐剂诱导的关节炎模型中, 如通过路易斯大鼠的爪部肿胀所测量, 使用预防性口服给药方案, 实施例 1 抑制了疾病进展。

[0417] 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 的测定

[0418] 对小鼠 (C57BL/6 雌性, 6-8 周龄, Charles River, n = 10-12 处理组) 用 150 μ g

以 1 : 1 的比例与补充有 150 μ g 结核分支杆菌 H37RA (Difco Laboratories) 的不完全的弗氏佐剂 (sigma) 乳化的 MOG₃₅₋₅₅ 进行皮下免疫。在免疫的当天和两天后腹膜内注射 400ng 百日咳毒素 (CalBiochem)。由免疫后的第 1 天开始, 动物每日给予一次测试品 (以在媒介物中的溶液或者混悬液的形式) 或者单独给予媒介物 (聚乙二醇 300, “PEG300”)。每周进行三次临床评分并记录体重直到第 24 天研究结束。临床评分系统为 : 0.5 : 尾部局部无力 ; 1 : 尾部无力或者伴有尾部张力的步态蹒跚 ; 1.5 : 伴有尾部局部无力的步态蹒跚 ; 2 : 伴有尾部无力的步态蹒跚 (共济失调) ; 2.5 : 伴有肢体局部麻痹的共济失调 ; 3 : 一枝完全麻痹 ; 3.5 : 伴有第二枝局部麻痹的一枝完全麻痹 ; 4 : 两枝完全麻痹 ; 4.5 : 濒死状态 ; 5 : 死亡。在上面所描述的小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎的测定中测试了本发明化合物, 且结果在表 H 中显示。

[0419] 表 H

[0420]

组	第 24 天的临床评分	
媒介物	平均值	2.63
	SD	1.51
实施例 1(1.0MG/kg)	平均值	0.32
	SD	0.51
实施例 1(3.0MG/kg)	平均值	0.77
	SD	1.01
实施例 1(10.0MG/kg)	平均值	0.30
	SD	0.63

[0421] 在针对多发性硬化症的动物模型 - 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 模型中, 如通过 C57Bl/6 小鼠的临床评分所确定, 使用预防性口服给药方案, 实施例 1 抑制了疾病的进展。