[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07D401/04
A61K 31/517
A61P 29/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02828151.9

[43] 公开日 2005 年 5 月 25 日

[11] 公开号 CN 1620448A

[22] 申请日 2002.12.18 [21] 申请号 02828151.9
[30] 优先权
[32] 2001.12.21 [33] DE [31] 10163595.8
[86] 国际申请 PCT/EP2002/014447 2002.12.18
[87] 国际公布 WO2003/053956 德 2003.7.3
[85] 进入国家阶段日期 2004.8.16
[71] 申请人 格吕伦塔尔有限公司
地址 德国阿兴
[72] 发明人 H·H·布施曼 S·弗罗施
T·格尔曼 O·K·齐默
F·泰尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 冬

权利要求书 6 页 说明书 22 页

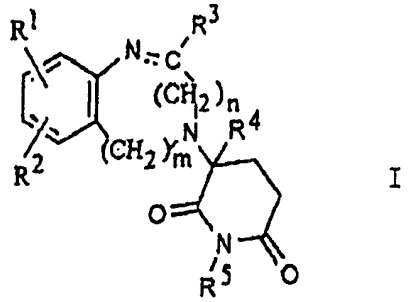
[54] 发明名称 3 位被杂环取代的哌啶 -2,6 - 二酮

[57] 摘要

本发明涉及通式 I 的 3 位被杂环取代的哌啶 -2，6 - 二酮以及它们的制备方法和在药物中的用途，特别是作为免疫调节剂在治疗和/或预防炎症和自身免疫性疾病，还有血液学 - 肿瘤学疾病方面的用途。

ISSN1008-4274

1. 通式I的3位被杂环取代的哌啶-2,6-二酮，和它们的纯对映异构体或非外消旋对映异构体混合物、外消旋物、非对映异构体或非对映异构体混合物、它们的碱或生理学上相容的酸的盐：



I

其中

R^1和R^2相同或不同，代表H、Br、Cl、F、CF_3、OH、NO_2、NH_2、$N(CH_3)_2$、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、苯基，或一起形成苯环的稠合环，其中所述环任选被R^1和/或R^2取代并且R^1和R^2如上定义，

R^3代表H、甲基，或在存在C-N单键的情况下，代表OH、C_{1-3}烷氧基或[$O(CO)C_{1-3}$-烷基]，或和C原子一起形成羰基，

R^4代表H、F、CF_3或C_{1-3}烷基，

R^5代表H、CH_2-OH或CH_2-NR^6R^7，其中R^6和R^7相同或不同并代表1到6个碳原子的烷基(直链或支链)或和N原子一起代表吡咯烷、哌啶、六亚甲基亚胺或吗啉环，

n为0或1

和m为0、1或2。

2. 权利要求1的化合物，其特征在于R^1和R^2相同或不同，代表H、Br、Cl、F、CF_3、NO_2、NH_2、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基，或一起形成苯环的稠合环；R^3代表H或OH；R^4代表H或甲基；R^5代表H或CH_2-NR^6R^7，其中R^6和R^7和N原子一起形成一个哌啶环；并且n=0和m=1或2。

3. 权利要求1或2的化合物，其特征在于R^1和R^2相同或不同，

代表 H、Cl、F、CH_3 或 NO_2；R^3、R^4 和 R^5 代表 H；n = 0 和 m = 1；并存在 C=N 双键。

4. 权利要求 3 的化合物，其特征在于所述基团 R^1 和 R^2 在第 5 位或第 7 位。

5. 权利要求 1 的化合物，所述化合物包括:

3-(7-氯-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其氢溴酸盐，

3-(6-氯-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其氢溴酸盐，

3-(4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其氢溴酸盐或盐酸盐，

3-(2-羟基-1,4-二氢-2H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(6-甲氧基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其盐酸盐，

3-(5-氯-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(8-氯-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(6-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(8-甲氧基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其盐酸盐，

3-(7-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其盐酸盐，

3-(4H-苯并[g]噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(5-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(5-硝基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(7-三氟甲基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(7-硝基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(8-溴-6-甲基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(5-甲基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(6,7-二氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-甲基-3-(4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮，

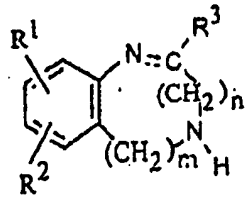
3-(4,5-二氢苯并[d][1,3]二氮杂萜-3-基)哌啶-2,6-二酮，

3-(5-氨基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其二盐酸盐，

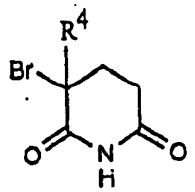
3-(7-氨基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其二盐酸盐，

3-(7-氟-4H-噻唑啉-3-基)-1-哌啶-1-甲基-哌啶-2,6-二酮。

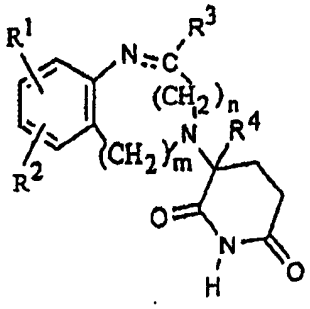
6. 制备权利要求 1 的通式 I 的 3 位被杂环取代的哌啶-2,6-二酮的方法，所述方法包括：首先用通式 III 的 3-溴哌啶-2,6-二酮衍生物将通式 II 的氨基化合物烷基化，形成通式 IA 的化合物：



II



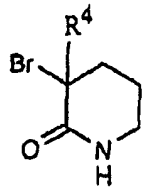
III



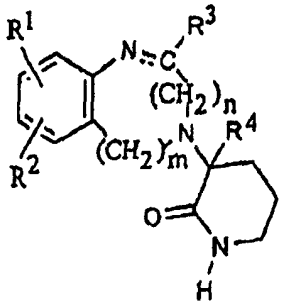
IA

其中在化合物 IA、II 和 III 中，R^1 至 R^4 如上定义，并且，如果 R^5 不代表 H，则通过和甲醛、任选和通式为 HNR^6R^7 的胺一起反应引入该基团，其中 R^6 和 R^7 如上定义；并且如果在式 IA 的化合物中，基团 R^4 代表 H，则为了制备本发明的其中 R^4 = F、CF_3、C_{1-3} 烷基的其它化合物，可以通过本领域已知的烷基化或卤化反应用前述 R^4 取代基替代所述 H。

7. 制备权利要求 1 的通式 I 的 3 位被杂环取代的哌啶-2,6-二酮的方法，所述方法包括：首先用式 IV 的 3-溴哌啶-2-酮衍生物将前述式 II 的氨基化合物烷基化，形成通式 IB 的化合物，



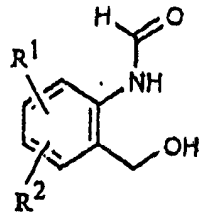
IV



IB

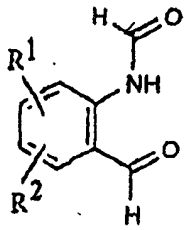
然后将此化合物氧化，优选用间氯过苯甲酸或氧化钌(IV)/高碘酸钠氧化，形成上式 IA 的化合物，并任选用上述方法(权利要求 5)引入其它基团 R^4 和/或 R^5。

8. 制备权利要求 1 的通式 I 的 3 位被杂环取代的哌啶-2,6-二酮的方法，其中 m = 1 和 n = 0 并且 R^3 代表 H 或 OH，所述方法包括：首先用本领域已知的方法将通式 VI 的甲酰胺衍生物氧化形成通式 VII 的苯甲醛，



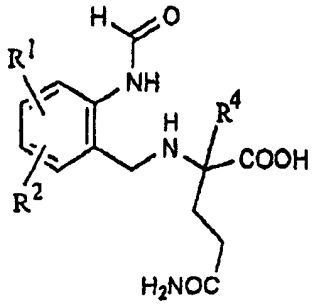
VI

其中 R^1 和 R^2 如上定义，该化合物可通过选择性 N-甲酰化相应的 2-氨基苯甲醇或选择性 O-脱甲酰化 N,O-二甲酰基衍生物得到，



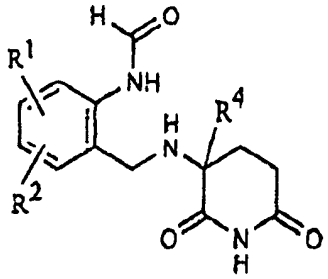
VII

所得的通式 VII 的苯甲醛在氢化硼络合物存在下，用谷氨酰胺还原氨化转化为通式 VIII 的化合物，



VIII

然后可以在活化剂存在下，优选在N,N'-羰基二咪唑存在下，将通式VIII的化合物环化，形成通式IX的戊二酰亚胺，优选先用保护基，优选苄氧基羰基保护胺官能团后进行环化，随后再除去保护基，



IX

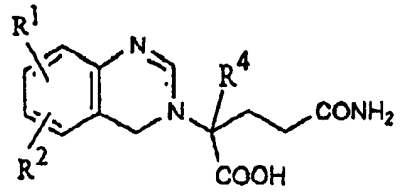
其中

A. 在质子溶剂、酸性催化剂存在下，将通式IX的化合物转化为通式I的化合物，其中R^1、R^2和R^4如上定义，m为1、n为0、存在C=N双键，并且R^3和/或R^5代表H原子，其中当R^5不为H时，可以用本发明的其它取代基如上进行替代，

或

B. 通式IX的化合物，其中通过氢解将受保护基保护的胺官能团除去保护基，形成通式I的化合物，其中R^1、R^2和R^4如上定义，存在C-N单键，和R^3代表羟基；这些化合物任选在有机溶剂中的稀酸中水解进一步转化为具有C=N双键和其中R^3=H的通式I的化合物。

9. 制备权利要求1的通式I的3位被杂环取代的哌啶-2,6-二酮的方法，其中m=1和n=0且R^3代表H，所述方法包括首先按照权利要求7的方法制备前述通式VII的化合物，接着还原氨化，然后用酸处理所得反应混合物，转化为通式X的化合物，其中R^1、R^2、R^4如上定义，



X

将所得通式X的化合物环化转化为通式I的具有C=N双键的化合物，并任选引入如上(权利要求5)定义的其它基团R^4和/或R^5。

10. 权利要求9的方法，其特征在于用相同的方法制备其中m＝2的通式I的相应化合物。

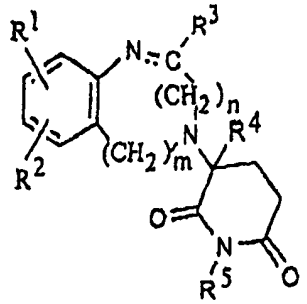
11. 包含至少一种权利要求1的通式I的化合物和/或其对映异构体、非对映异构体、碱或生理学上相容的酸的盐作为活性成分的药物。

12. 权利要求8的药物，所述药物对于治疗和/或预防炎症和自身免疫性疾病和/或血液学疾病和/或肿瘤学疾病有免疫调节作用。

13. 权利要求1的通式I的至少一种化合物和/或其对映异构体、非对映异构体、碱或生理学上相容的酸的盐在制备治疗和/或预防炎症和自身免疫性疾病和/或血液学疾病和/或肿瘤学疾病的药物中的用途。

3 位被杂环取代的哌啶-2,6-二酮

本发明涉及具有通式 I 的 3 位被杂环取代的哌啶-2,6-二酮类物质、它们的制备方法以及它们在药物中的用途。



I

自身免疫性疾病起因于免疫系统对身体自身结构的反应作用。就此而论，这种疾病破坏了正常的身体自身组织的耐受性。除了抗体，特别是 T 淋巴细胞和单核细胞/巨噬细胞在多种自身免疫性疾病的发病机理中起了决定性的作用。活化的单核细胞/巨噬细胞分泌大量不同的促炎介质，这些介质直接或间接地导致引发由自身免疫性疾病引起的组织损伤。单核细胞/巨噬细胞的活化可以在和 T 淋巴细胞的相互作用时或通过细菌性产物(例如脂多糖(LPS))发生。一种通过活化单核细胞/巨噬细胞形成的促炎物质是白细胞介素－12(IL-12)。

IL-12 是一种由共价键合的 P35 和 P40 链组成的含杂二聚分子。它由抗原呈递细胞(单核细胞/巨噬细胞、树突状细胞、B 淋巴细胞)被多种微生物产物(如 LPS、脂酰肽、细菌性 DNA)活化后形成或与活化的 T 淋巴细胞相互作用形成(Trinchieri 1995，Ann. Rev. Immunol. 13：251)。IL-12 具有中心免疫调节重要性，并且导致促炎 TH1 反应的发展。对身体自身抗原的 TH1 免疫反应导致产生多种疾病，许多动物试验和最初临床调查清楚地证明了这点。IL-12 的病理生理学重要性在多种疾病，例如类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病以及肠炎、皮肤和粘膜疾病的动物模型中得到证实(Trembleau 等. 1995，

Immunol. Today 16: 383; Müller 等. 1995 J. Immunol. 155: 4661 Neurath 等. 1995，J. Exp. Med. 182: 1281; Segal 等. 1998. J. Exp. Med. 187: 537; Powrie 等. 1995. Immunity 3: 171; Rudolphi 等. 1996，Eur. J. Immunol. 26: 1156; Bregenholt 等. 1998，Eur. J. Immunol. 28: 379)。通过施予 IL-12 可分别引发这些疾病；中和内源 IL-12 后，病症消除，这些动物最终被治愈。最近正研究在人体中应用 IL-12 的抗体。

白细胞介素 IL-10 抑制由人或鼠科动物的单核细胞/巨噬细胞合成促炎细胞因子 TNFα、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12 和 GM-CSF(Fiorentino 等.,1991. J. Immunol. 146: 3444; De Waal Malefyt 等. 1991. J. Exp. Med. 174: 1209)。这种抑制作用还间接地阻断了由 TH1 淋巴细胞合成 IFN-γ。有趣的是，由单核细胞/巨噬细胞形成 IL-10 略微滞后于促炎细胞因子的合成。用 IL-10 处理抗原呈递细胞导致它们失活。这种细胞不能活化 T 淋巴细胞增殖或合成 IFN-γ。但是，如肠炎的动物模型的实例所示，这些 T 淋巴细胞自身分泌大量 IL-10，能够抑制发炎反应(Groux 等，1997. Nature 389: 737)。IL-10 还可以用来防止皮炎性疾病的发展(Enk 等，1994. J. Exp. Med，179: 1397)。

总之，可以说许多炎性疾病/自身免疫性疾病的病理生理学都归因于 IL-12 过量或 IL-10 缺乏。恢复促炎白细胞介素 IL-12 和抑炎白细胞介素 IL-10 之间的平衡，对于上述疾病有很大的治疗可能性。

IL-10 还参与了细胞生存的调节。尤其是通过编程性细胞死亡来调节非控的细胞生长。在 T 淋巴细胞中 IL-12 具有反编程性细胞死亡作用，延长了 T 细胞的生存(Clerici 等，1994，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11811; Estaquier 等，1995，J. Exp. Med. 182:1759)。IL-12 在局部过量形成导致肿瘤细胞的生存。因此 IL-12 形成的抑制剂在肿瘤的治疗中具有很大的治疗可能性。

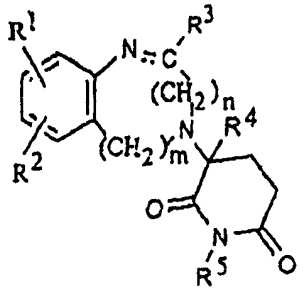
一种具有抑制 IL-12 和增加 IL-10 的免疫调节作用的物质为沙利度胺。最近临床研究表明，沙利度胺在以下疾病中有积极作用：麻风结节性红斑(Sampaio 等，1993，J. Infec. Dis. 168:408)、口疮病

(Jacobson 等，1997，N. Engl. J. Med. 336:1487)、慢性排斥反应(Vogelsang 等，1992，N. Engl. J. Med. 326:1055)、肠炎(Ehrenpreis 等，1999，Gastroenterology 117：1271；Vasitiauskas 等，1999，Gastroenterology，117：1278)和多种皮肤性疾病(Bernal 等，1992，Int. J. Derm. 31:599)。在治疗多种肿瘤疾病的临床研究中也取得了进展(Rajkumar，2001，Oncology，15：867)。在多发性骨髓瘤的治疗中也表现出一定的作用(Singhal，1999，N. Engl. J. Med. 341:1565)。但是，沙利度胺也会引起多种副作用，包括镇静作用、致畸性和神经病。此外，这种物质溶解性较差并且对于水解高度敏感。

因此，本发明的目的是制备具有如上所述的免疫调节性能并对水解敏感性较低以及具有较好的溶解度的新化合物。

特定取代的哌啶-2,6-二酮可以满足需要制备的化合物的这些要求。

因此，本发明提供了具有通式 I 的 3 位被杂环取代的哌啶-2,6-二酮。



I

其中

R^1 和 R^2 相同或不同，代表 H、Br、Cl、F、CF_3、OH、NO_2、NH_2、$N(CH_3)_2$、C_{1-3} 烷基、C_{1-3} 烷氧基、苯基，或一起形成苯环的稠合环，其中所述环任选被 R^1 和/或 R^2 取代并且 R^1 和 R^2 如上定义，

R^3 代表 H、甲基，或在存在 C-N 单键的情况下，代表 OH、C_{1-3} 烷氧基或[$O(CO)C_{1-3}$-烷基]，或和 C 原子一起形成羰基，

R^4 代表 H、F、CF_3 或 C_{1-3} 烷基，

R^5 代表 H、CH_2-OH 或 CH_2-NR^6R^7，其中 R^6 和 R^7 相同或不同并

代表 1 到 6 个碳原子的烷基(直链或支链)或和 N 原子一起代表吡咯烷、哌啶、六亚甲基亚胺或吗啉环，

n 为 0 或 1

和 m 为 0、1 或 2。

本发明的化合物以纯对映异构体或非外消旋对映异构体混合物、外消旋物、非对映异构体或非对映异构体混合物、它们的游离碱和生理学上相容的有机或无机酸的盐形式存在。

优选的化合物为那些其中 R^1 和 R^2 相同或不同，代表 H、Br、Cl、F、CF_3、NO_2、NH_2、C_{1-3} 烷基、C_{1-3} 烷氧基，或一起形成苯环的稠合环；R^3 代表 H 或 OH；R^4 代表 H 或甲基；以及 R^5 代表 H 或 CH_2-NR^6R^7，其中 R^6 和 R^7 和 N 原子一起形成哌啶环；并且 n = 0 和 m = 1 或 2 的化合物。

特别优选为其中 R^1 和 R^2 相同或不同，代表 H、Cl、F、CH_3 或 NO_2；R^3、R^4、R^5 代表 H；n = 0 和 m = 1；并存在 C=N 双键的化合物。

更优选的化合物包括:

1) 3-(7-氟-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其氢溴酸盐

2) 3-(6-氟-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其氢溴酸盐

3) 3-(4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其氢溴酸盐或盐酸盐

4) 3-(2-羟基-1,4-二氢-2H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

5) 3-(6-甲氧基-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其盐酸盐

6) 3-(5-氟-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

7) 3-(8-氟-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

8) 3-(6-氟-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

9) 3-(8-甲氧基-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其盐酸盐

10) 3-(7-氟-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其盐酸盐

11) 3-(4H-苯并[g]喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

12) 3-(5-氟-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

13) 3-(5-硝基-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

14) 3-(7-三氟甲基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

15) 3-(7-硝基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

16) 3-(8-溴-6-甲基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

17) 3-(5-甲基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

18) 3-(6,7-二氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

19) 3-甲基-3-(4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

20) 3-(4,5-二氢苯并[d][1,3]二氮杂䓬-3-基)哌啶-2,6-二酮

21) 3-(5-氨基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其二盐酸盐

22) 3-(7-氨基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其二盐酸盐

23) 3-(7-氟-4H-噻唑啉-3-基)-1-哌啶-1-甲基-哌啶-2,6-二酮

以上化合物中最优选的是:

1)3-(7-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其氢溴酸盐

2)3-(4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其氢溴酸盐

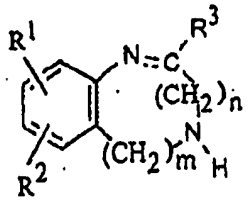
3)3-(5-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

4)3-(7-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮及其盐酸盐

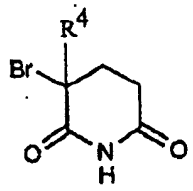
5)3-(5-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

本发明还提供了制备式 I 的本发明化合物的方法。

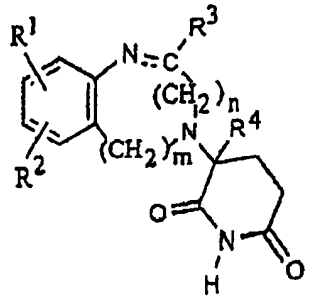
式 I 的化合物通过以下方法得到: 首先用具有通式 III 的 3-溴哌啶-2,6-二酮衍生物将具有通式 II 的氨基化合物烷基化, 形成具有通式 IA 的化合物:



II



III



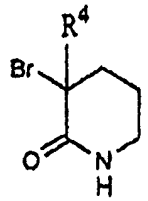
IA

其中在化合物 IA、II 和 III 中，R^1 至 R^4 如上定义，并且如果 R^5 不代表氢，则通过和甲醛、任选还与具有通式 HNR^6R^7 的胺一起反应引入该基团，其中 R^6 和 R^7 如上定义。

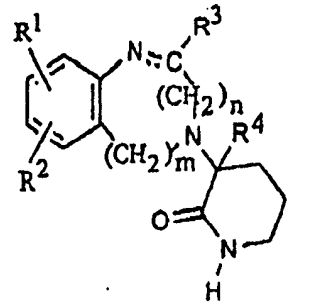
如果在式 IA 的化合物中，基团 R^4 代表氢，则可以通过本领域已知的烷基化或卤化反应，采用如上定义的其它 R^4 取代基替代。

如果在式 IA 的化合物中，R^1 和/或 R^2 代表硝基，那么其中 R^1 和 R^2 代表氨基的化合物 IA 可以通过本领域已知的方法，例如用催化活化氢还原来制备。

式 I 的化合物还可通过首先用式 IV 的 3-溴哌啶-2-酮的衍生物将式 II 的氨基化合物烷基化，形成通式 IB 的化合物，



IV

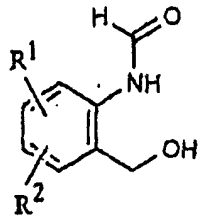


IB

然后将所得化合物氧化，优选用间氯过苯甲酸或氧化钌(IV)/高碘酸钠进行氧化，形成上式 IA 的化合物，并任选引入其它基团 R^4 和/或基团 R^5。

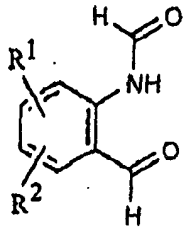
优选的其中 m = 1 和 n = 0 并且 R^3 代表 H 或 OH 的式 I 化合物通过如下方法制备:

首先用本领域已知的方法，在如 CAL-B 的帮助下，用如重铬酸吡啶鎓将通式 VI 的甲酰胺衍生物酶催氧化形成通式 VII 的苯甲醛;



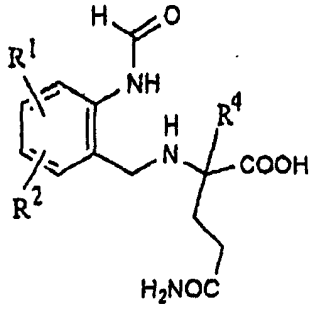
VI

其中 R^1 和 R^2 如上定义，可以通过相应的 2-氨基苯甲醇的选择性 N-甲酰化或通过 N,O-二甲酰化衍生物的选择性 O-脱甲酰化得到，



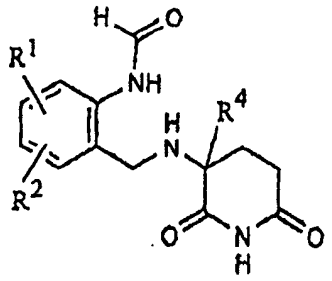
VII

接着在氢化硼络合物(如硼氢化钠)存在下，用谷氨酰胺将所得苯甲醛还原氨化转化为通式 VIII 的化合物。



VIII

然后例如用 N,N'-羰基二咪唑可将通式 VIII 的这些化合物环化形成通式 IX 的戊二酰亚胺，优选在用例如苯甲酸基羰基保护胺官能团(所述官能团例如采用溴化氢的冰醋酸溶液分离)之后进行所述环化;

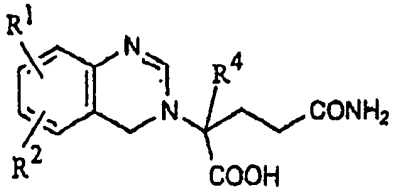


IX

最后在酸性催化剂存在下，在质子溶剂(例如水)中，由通式IX的这些化合物得到通式I的化合物，其中R^1、R^2和R^4如上定义；m＝1；n＝0；存在C＝N双键；并且R^3和/或R^5代表氢原子，如上所述其中的R^5可以被其他定义的取代基替代。

如果在通式IX的化合物中，胺官能团被苄氧基羰基保护，则氢解分离所述基团，得到其中R^1和R^2如上定义，存在C-N单键，并且R^3代表羟基的通式I化合物。这些化合物可用在有机溶剂(例如甲醇)中的稀酸水解转化得到具有C=N双键和其中R^3＝H的通式I的化合物。

如果通式VII的化合物经还原氨化后，将反应混合物用酸处理，则得到通式X的化合物，其中R^1、R^2和R^4如上定义。



X

将该化合物用例如乙酸酐/乙酰氯环化，得到通式I的化合物，其中m＝1和n＝0，存在C＝N双键，R^1、R^2和R^4如上定义，R^3和/或R^5代表氢。据此，根据定义的其它基团R^4和/或R^5可任选用上述的方法引入。

用同样的方法，可以得到通式I中n＝2并且其它基团如上定义的化合物。

本发明的化合物有免疫调节活性，并在LPS活化单核细胞中诱导显著降低了IL-12的形成，同时使IL-10的形成增加。考虑到这种作用原理，这些化合物对于由IL-12形成过量和IL-10相对缺乏诱发

产生的疾病有重大的治疗可能性。换句话说，即这些化合物可用于治疗和/或预防炎症和自身免疫性疾病。考虑到 IL-12 的反编程性细胞死亡作用，本发明的化合物也适用于抑制血液学/肿瘤学疾病中 IL-12 的形成。

这一点使所要求保护的化合物区别于已知的免疫调解剂如皮质类固醇激素(例如地塞米松)，所述皮质类固醇激素抑制单核细胞合成 IL-10 和 IL-12。

和沙利度胺相比，这种新化合物的明显特征在于提高了疗效，具有良好的水溶性以及降低的对水解的敏感性。

上述疾病类型具体包括：皮炎(例如特异性皮炎、牛皮癣、湿疹、麻风结节性红斑)，呼吸道炎症(例如支气管炎、肺炎、支气管哮喘、ARDS(成人呼吸窘迫综合症)、结节病、硅肺病/纤维变性)，胃肠道炎症(例如胃和十二指肠溃疡、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎)和例如肝炎、胰腺炎、阑尾炎、腹膜炎、肾炎、口疮病(aphtosis)、结膜炎、角膜炎、葡萄膜炎和鼻炎等疾病。自身免疫性疾病包括例如关节炎(例如类风湿性关节炎、HLA-B27 相关疾病、类风湿性脊椎炎)和多发性硬化、初期糖尿病或红斑狼疮。可应用的适应症还包括脓血症、脓血性休克、细菌性脑膜炎、真菌感染、AIDS 的机遇性感染、恶性体质、移植排斥反应、移植物抗宿主反应和慢性心脏病、心机能不全、再灌注综合症和动脉硬化。可应用的医学适应症还包括慢性疼痛、fibromyalgia 和 sudeck 病(交感反射性营养不良(RSD))。

所描述的免疫调解剂的临床应用病症还包括血液学疾病，如多发性骨髓瘤、脊髓发育不良(myelodisplastic)综合症和淋巴管炎，以及其它肿瘤学的病症，如恶性胶质瘤、前列腺癌、肾细胞癌、乳腺癌、甲状腺癌、头颈癌、胰腺癌和结肠癌，以及黑素瘤和 kaposi 肉瘤。

本发明的药物除了包含至少一种通式 I 的化合物外，还包含载体材料、填料、溶剂、稀释剂、着色剂和/或粘合剂。这些添加剂的选择和用量取决于所述药物是经口、经直肠、经眼(玻璃状体

(intravitreal)、intracameral)、经鼻、局部(包括口腔和舌下)、阴道还是胃肠外(包括皮下、肌肉、静脉、真皮内、气管内和硬膜外)给药。

口服应用的适合制剂为片剂、咀嚼片剂、糖衣片剂、胶囊、颗粒剂、滴剂、糖汁或糖浆形式；胃肠外、局部和吸入应用的适合制剂包括溶液剂、混悬剂、易于重建的干燥制剂和喷雾剂形式。皮肤的应用形式包括软膏剂、凝胶剂、乳膏剂和糊剂。眼用的应用形式包括滴剂、软膏剂和凝胶剂。本发明的化合物以在溶液中的沉淀形式，以载体膜或贴剂形式，任选加入其它促进皮肤渗透的试剂是适合透皮应用的实例。本发明的化合物可以经口服或透皮使用的制剂形式，以缓释方式释放。

给予患者的活性成分的量根据患者的体重、给药方式、适应症、疾病的严重程度而异。

实施例

下面的实施例将更详细地说明本发明。

使用购自 E. Merck，Darmstadt 的硅胶 60 (0.040-0.063mm)作为色谱分离的固定相。洗脱液的混合比率一般用体积/体积表示。

各种物质通过其熔点和/或 ^{1}H-NMR 波谱来表征。波谱用 Varian Gemini 300 仪器在 300MHz 下记录。化学位移以 ppm(δ)给出。内标物为四甲基硅烷(TMS)。

实施例 1

3-(7-氯-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮；氢溴酸盐

步骤 1:

N-(5-氯-2-羟甲基苯基)甲酰胺

在 20℃下，将 5.00g(2-氨基-4-氯苯基)甲醇、2.73g 甲酸氰基甲酯和 0.04g 4-N,N-二甲基氨基吡啶在 50ml 无水四氢呋喃中的溶液搅拌 72 小时。然后真空蒸发除去溶剂，并将残留物用 50ml 乙酸乙酯溶解。

将溶液依次用 0.01N 的盐酸和饱和氯化钠溶液洗涤两次，每次 100ml，经硫酸钠干燥并随后真空蒸发浓缩。将残留物通过硅胶快速色谱进行纯化，用乙酸乙酯/环己烷(2/1)作为洗脱剂。由此得到 1.41g(理论值的 24%)浅黄色晶体形式的标题化合物。

熔点：120-124℃

步骤 2:

N-(5-氯-2-甲酰基苯基)甲酰胺

在 20℃下，将 1.40g 得自步骤 1 的产物和 3.40g 重铬酸吡啶鎓在 350ml 无水二氯甲烷中的混合物搅拌 24 小时。然后过滤溶液，真空蒸发浓缩滤液。将残留物通过硅胶快速色谱进行纯化，用乙酸乙酯/环己烷(1/1)作为洗脱剂，得到 0.88g(理论值的 64%)晶体形式的标题化合物。

熔点：131-136℃

步骤 3 ：

2-[(苄氧基羰基-4-氯-2-甲酰氨基苯基)氨基]-4-氨基甲酰基丁酸

将 1.02g 得自步骤 2 的产物在 12ml 四氢呋喃中的溶液加入到 0.75g L-谷氨酰胺在 2.8ml 2N 氢氧化钠中的溶液里。在 20℃下，将混合物搅拌 1 小时，冷却到 0℃，分批加入 0.13g 硼氢化钠。在 20℃下搅拌 12 小时后，在 1 小时内滴加 1.47g 二碳酸二苄酯在 5.5ml 四氢呋喃中的溶液，然后加入 2ml 2N 的氢氧化钠溶液。在 20℃下搅拌 12 小时后，真空蒸发除去大部分的四氢呋喃，并将残留物用乙醚萃取三次，每次 20ml。用 2N 的盐酸将水相酸化至 pH 为 1，并用乙酸乙酯萃取三次，每次 20ml。合并的有机相经硫酸钠干燥，并真空蒸发浓缩，得到 0.99g(理论值的 40%)标题化合物，所述化合物无需纯化可进行下一步反应。

步骤 4:

(4-氯-2-甲酰氨基苄基)-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-氨基甲酸苄酯

将 0.98g 得自步骤 3 的产物和 0.97g N,N'-羰基二咪唑在 50ml 无水四氢呋喃中的溶液加热回流 8 小时。冷却后，真空蒸发浓缩混合物，用 40ml 水和 40ml 乙酸乙酯溶解残留物，并分离出有机相。水相用乙酸乙酯萃取 3 次，每次 20ml。合并的有机相用水洗涤三次，每次 20ml，然后用 20ml 饱和氯化钠溶液洗涤，并经硫酸钠干燥，接着真空蒸发浓缩。将残留物通过硅胶快速色谱进行纯化，用乙酸乙酯/环己烷(1/1)作为洗脱剂，得到 0.37g(理论值的 16%，相对于步骤 2 的产物计算)标题化合物。

步骤 5:

N-{5-氯-2-[(2,6-二氧代哌啶-3-基氨基)甲基]-苯基}甲酰胺；氢溴酸盐

将 0.9ml 氢溴酸(33%HBr)在乙酸中的溶液加入到 0.38g 得自步骤 4 的产物在 2ml 乙酸中的溶液里，然后在 20℃下将混合物搅拌 1 小时。再倒入 400ml 乙醚，将混合物冷却到 0℃，然后分离析出的晶体。将所述固体用乙醚洗涤多次，并真空干燥，得到 0.27g(理论值的 83%)无色晶体形式的标题化合物。

熔点：155-180℃(分解)

步骤 6:

3-(7-氯-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮；氢溴酸盐

在 20℃下，将 0.20g 得自步骤 5 的产物在 10ml 蒸馏水中的溶液搅拌 72 小时。然后过滤混合物，真空蒸发浓缩滤液，并干燥残留物。得到 0.13g(理论值的 68%)白色固体形式的标题化合物。

熔点：160-200℃(分解)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 2.57 (m, 2H); 2.82 (m, 2H); 4.80 (m, 1H); 4.95 (m, 1H); 5.10 (m, 1H) 7.30 (m, 2H); 7.45 (m, 1H); 8.68(s, 1H); 11.42(s, 1H)

实施例 2

3-(6-氯-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮; 氢溴酸盐

采用步骤 1-6 描述的方法，并用 5-氯同分异构体替代实施例 1 步骤 1 中所用的苯甲醇，得到浅黄色晶体形式的标题化合物。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 2.19 (m, 1H); 2.43 (m, 1H); 2.75 (m, 2H); 4.78 (m, 2H); 5.02 (m, 1H); 7.18 (d, 1H); 7.38 (d, 1H); 7.45 (q, 1H); 8.59 (s, 1H); 11.35 (s, 1H)

实施例 3

3-(4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮; 氢溴酸盐

步骤 1:

(2-甲酰氨基苄基)-(2,6-二氧代哌啶-3-基)氨基甲酸苄酯

采用在步骤 1-4 中描述的方法，并在实施例 1 步骤 1 中使用(2-氨基苯基)甲醇，得到黄色粉末形式的标题化合物。

步骤 2:

N-{2-[(2,6-二氧代哌啶-3-基氨基)甲基]苯基}甲酰胺

如实施例 1 步骤 5 描述，使 1.00g 得自步骤 1 的产物和 3ml 氢溴酸在乙酸中的溶液(33%HBr)反应。经过相同的后处理，得到 0.79g(理论值的 91%)黄色固体形式的标题化合物，所述化合物无需纯化直接进行下一步反应。

步骤 3:

3-(4-H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮; 氢溴酸盐

在 20℃下，将 0.91g 得自步骤 2 的产物在 5ml 蒸馏水中的溶液

搅拌 24 小时。然后将反应物溶液真空蒸发至干。残留固体在乙醚中研碎成粉，得到 0.85g(理论值的 99%)黄色粉末形式的标题化合物。

熔点：218-222℃(分解)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6)： 2.23 (m, 1H); 2.48 (m, 1H); 2.71 (m, 2H); 4.70 (d, 1H); 4.86 (d, 1H); 4.98 (m, 1H); 7.22 (m, 2H); 7.34 (m, 2H); 8.53 (s, 1H); 11.35 (s, 1H)

实施例 4

3-(2-羟基-1,4-二氢-2H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

在 20℃、常压下，将溶解在 950ml 四氢呋喃中的 15.90g 得自实施例 3 步骤 1 的产物在 15g 披钯碳(10%钯)存在下进行氢化。过滤除去催化剂，真空蒸发浓缩滤液。得到 10.30g(理论值的 98%)标题化合物的非对映异构体混合物，为白色固体。

熔点：185-188℃

实施例 5

3-(4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮；盐酸盐

在 20℃下，将 10.20g 得自实施例 4 的产物在 210ml 甲醇中的溶液和 3.2ml 12N 的盐酸搅拌 24 小时。真空蒸发浓缩大部分混合物，在过滤和干燥分离后，得到 9.00g(理论值的 82%)晶体形式的标题化合物。

熔点：172-178℃

^{1}H-NMR (DMSO-d_6)： 2.22 (m, 1H); 2.48 (m, 1H); 2.71 (m, 2H); 4.70 (d, 1H); 4.86 (d, 1H); 4.98 (m, 1H); 7.22 (m, 2H); 7.35 (m, 2H); 8.53 (s, 1H); 11.35 (s, 1H).

实施例 6

3-(6-甲氧基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮; 盐酸盐

步骤 1:

甲酸(2-甲酰氨基-5-甲氧基苄基)酯

将 7.00g(2-氨基-5-甲氧基苯基)甲醇、9.8ml 甲酸氰基甲酯和 0.05g 4-N,N-(二甲氨基)吡啶在 30ml 无水四氢呋喃中的溶液加热回流 5 小时。然后真空蒸发溶液，将残留物溶解于 100ml 乙酸乙酯中。将溶液冷却到 0℃，析出晶体，将晶体抽滤、经甲醇洗涤并真空干燥。得到 7.20g(理论值的 75%)标题化合物。

熔点：117℃

步骤 2:

N-(2-羟甲基-4-甲氧基苯基)甲酰胺

将 1.70g 南极洲念珠菌脂肪酶 B(Candida antarctica B lipase)(CAL-B)加入到 5.90g 得自步骤 1 的产物在 190ml 无水乙腈和 10.3ml 正丁醇中的溶液里，并在 20℃下搅拌 65 小时。然后过滤混合物，并用乙腈洗涤。真空蒸发浓缩滤液后，得到 5.00g(理论值的 98%)标题化合物。

熔点：97-97℃

步骤 3:

N-(2-甲酰基-4-甲氧基苯基)甲酰胺

用实施例 1 步骤 2 描述的重铬酸吡啶鎓将 5.00g 得自步骤 2 的产物氧化，得到 3.62g(理论值的 72%)标题化合物。

熔点：125-127℃

步骤 4:

4-氨基甲酰基-2-(6-甲氧基-4H-噻唑啉-3-基)丁酸

将 0.79g 得自步骤 3 的产物在 30ml 甲醇中的溶液加入到 0.58g L-

谷氨酰胺在 10ml 甲醇和 2ml 2N 的氢氧化钠溶液中。在 20℃下搅拌 1 小时后，将混合物冷却至 0℃，并在 30 分钟内分批加入 0.103g 硼氢化钠。在 0℃下将混合物搅拌 12 小时，然后将 pH 调节为 2 到 3，在 20℃下继续搅拌 4 小时。用氢氧化钠中和所述溶液，蒸馏除去甲醇。水溶性残留物用乙醚洗涤两次，每次 15ml，然后真空蒸发浓缩。用 25ml 甲醇溶解残留物，并过滤除去不溶性成分。经真空蒸发滤液得到的残留物不需要纯化可以直接用于步骤 5 描述的反应。

步骤 5:

3-(6-甲氧基-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮; 盐酸盐

在 70℃下，将 1.20g 得自步骤 4 的粗产物在 7ml 乙酸酐和 7ml 乙酰氯中的溶液搅拌 5 小时，然后真空蒸发浓缩。用 20ml 甲醇溶解残留物，并和 Amberlyst A-21 离子交换剂搅拌 1 小时。过滤后，将滤液真空蒸发浓缩，将残留物通过硅胶快速色谱进行纯化，用氯仿/甲醇(4/1)作为洗脱剂。将这样得到的标题化合物的自由碱溶解在 4ml 甲醇中，随后往溶液中依次加入 0.5ml 氯化氢气体在乙醚中的饱和溶液和 150ml 乙醚。分离形成的盐并真空干燥，得到 0.29g(理论值的 23%，相对于步骤 4 中的 L-谷氨酰胺计算)标题化合物。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 2.45 (m, 4H); 3.76 (s, 3H); 4.65 (d, 1H); 4.81 (d, 1H); 4.98 (m, 1H) 6.88 (m, 2H); 7.20 (m, 1H); 8.46 (5, 1H); 11.32 (s, 1H)

实施例 7

使用适当取代的离析物并应用实施例 6 描述的方法，同样可得到下列化合物(某些实施例中没有转化为相应的盐酸盐)。

a.) 3-(5-氯-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点: 245-250℃(分解)

b.) 3-(8-氯-4H-喹唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：238-248℃

c.） 3-(6-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：75-79℃

d.） 3-(8-甲氧基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮；盐酸盐

熔点：152-159℃

e.） 3-(7-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：239-241℃(分解)

f.） 3-(7-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮；盐酸盐

熔点：205-207℃

g.） 3-(4H-苯并[g]噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：238-242℃

h.） 3-(5-氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：237-239℃(分解)

i.） 3-(5-硝基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：197-215℃

j.） 3-(7-三氟甲基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：230-234℃

k.） 3-(7-硝基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：>360℃

l.） 3-(8-溴-6-甲基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：258-265℃

m.） 3-(5-甲基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：217-227℃

n.） 3-(6,7-二氟-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

熔点：360℃开始(分解)

o.） 3-甲基-3-(4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮

^{1}H-NMR (DMSO-d_6)： 1.59 (s, 3H); 1.93-2.70 (m, 4H); 4.35 (d, 1H); 4.47 (d, 1H); 6.90-7.15 (m, 4H); 7.36 (s, 1H); 11.04 (s, 1H)

实施例 8

3-(4,5-二氢苯并[d][1,3]二氮杂萆-3-基)哌啶-2,6-二酮

步骤 1:

N-[2-(2-羟乙基)苯基]甲酰胺

在 0℃下，将 12.6ml 甲酸滴加到 15ml 乙酸酐中，然后在 60℃下将混合物搅拌 2 小时。冷却至 20℃后，用 140ml 四氢呋喃稀释混合物，冷却至-4℃，并在该温度下滴加 18.4g 2-(2-氨基苯基)乙醇在 185ml 四氢呋喃中的溶液。在-6℃下搅拌 3 小时后，将混合物用碳酸氢钾水溶液(25%$KHCO_3$)中和，并用乙酸乙酯萃取四次，每次 300ml。合并的萃取液经硫酸钠干燥，并真空蒸发浓缩。得到 18.4g(理论值的 94%)浅黄色晶体形式的标题化合物，熔点为 49-54℃。

步骤 2:

N-[2-(2-氧代乙基)苯基]甲酰胺或 2-羟基-2,3-二氢吲哚-1-甲醛

在 0℃并搅拌下，将 49.4g 重铬酸吡啶鎓加入到 18.2g 得自步骤 1 的产物在 270ml 无水二氯甲烷中的溶液里，然后在 40℃下将混合物搅拌 24 小时。用 Celite 过滤后，将滤液真空蒸发浓缩，将残留物通过硅胶快速色谱进行纯化，用乙酸乙酯/环己烷(1/1)作为洗脱剂。得到 7.5g(理论值的 42%)浅黄色固体形式的标题化合物，熔点为 84-91℃(分解)。

步骤 3:

4-氨基甲酰基-2-(4,5-二氢苯并[d][1,3]二氮杂萆-3-基)丁酸

将 4.6g 得自步骤 2 的产物在 110ml 甲醇中的溶液加入到 4.1g L-谷氨酰胺在 14ml 2N 氢氧化钠和 7ml 乙醇中的溶液里，然后在 20℃下将混合物搅拌 2 小时。接着将混合物冷却至 0℃，分批加入 0.64g 硼氢化钠，在 0℃下将混合物继续搅拌 12 小时。用 2N 的盐酸将反应物溶液的 pH 调节到 3.5，在 20℃下搅拌 20 小时。用氢氧化钠溶

液中和后，经过过滤分离形成的固体，减压除去滤液中的甲醇。从水溶性的残留物中分离出 3.0g(理论值的 39%)标题化合物的粗品，产物无需纯化直接用于下一步反应。

步骤 4:

3-(4,5-二氢苯并[l][1,3]二氮杂萘-3-基)哌啶-2,6-二酮

将 12ml 乙酰氯加入到 3.0g 得自步骤 3 的产物在 12ml 乙酸酐中的溶液内。将混合物在回流下搅拌 32 小时，然后在 50℃下搅拌 66 小时，接着真空蒸发浓缩。将残留物通过硅胶快速色谱进行纯化，用三氯甲烷/甲醇(4/1)作为洗脱剂，得到 0.79g(理论值的 28%)浅黄色固体形式的标题化合物，所述化合物在 250℃下开始熔解并分解。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6/D_2O): 2.10-2.20 (m, 1H); 2.25-2.40 (m, 1H); 2.60-2.75 (m, 2H); 3.10-3.14 (m, 2H); 3.54-3.85 (m, 2H) 4.89 (dd, 1H); 7.10-7.30 (m, 4H); 7.77 (s, 1H)

实施例 9

a) 3-(5-氨基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮; 二盐酸盐

在温度为 20℃下，将 0.315g 得自实施例 7i 的产物在 11ml N,N-二甲基甲酰胺和 1.1ml 2N 的盐酸中的溶液在 0.057g 二氧化铂(80%)存在下，用压力为 3 bar 的氢气催化氢化。然后过滤分离催化剂，再将滤液真空蒸发浓缩。将剩余的固体用甲苯和乙醚处理多次，然后经五氧化二磷干燥。得到 0.32g(理论值的 88%)深色晶体形式的标题化合物，所述化合物在空气中潮解。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 2.10-2.80 (m, 4H); 4.35 (d, 1H); 4.56 (d, 1H); 5.03 (dd, 1H); 6.43 (d, 1H); 6.60 (d, 1H); 7.03 (dd, 1H); 8.44 (d, 1H); 8.90 (s, 2H); 11.34 (s, 1H).

b)3-(7-氨基-4H-噻唑啉-3-基)哌啶-2,6-二酮; 二盐酸盐

采用实施例 9a 中描述的方法，由得自实施例 7k 的产物得到标题化合物，产率为理论值的 81%。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 1.86-1.94 (m, 1H); 2.02-2.33 (m, 2H); 2.40-2.59 (m, 1H); 4.51-4.57 (m, 2H); 5.02-5.08 (m, 1H); 6.68-6.76 (m, 1H); 6.93-7.10 (m, 2H); 8.50-8.56 (m, 1H); 8.96 (s, 2H); 11.27 (s, 1H)

实施例 10

3-(7-氟-4H-噻唑啉-3-基)1-哌啶-1-甲基-哌啶-2,6-二酮

将 1ml 甲醛水溶液(37%)和 0.8ml 哌啶加入到 2.61g 得自实施例 7e 的产物在 50ml 乙醇中的悬浮液内。在 50℃下将混合物搅拌 1 小时，然后真空除去大部分溶剂。在残留物中加入乙醚，过滤分离和真空干燥后，得到 2.83g(理论值的 79%)几乎无色的晶体形式的标题化合物。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 1.36-1.48 (m, 6H); 1.95-2.06 (m, 1H); 2.22-2.82 (m, 7H); 4.25 (d, 1H); 4.46 (d, 1H); 4.52-4.68 (m, 3H); 6.66 (dd, 1H); 6.81 (m, 1H); 6.90-6.95 (m, 1H); 7.11 (s, 1H).

免疫调节作用研究

用脂多糖刺激人体单核细胞分泌 IL-10 和 IL-12:

从人外周血液单核细胞(PBMC)中分离出人体单核细胞，其中 PBMC 通过使用 ficoll 密度梯度离心法，由经过肝素处理的纯血液得到。为此，将 PBMC 与单克隆抗体一起培养，所述单克隆抗体直接对抗单核细胞特异性的表面分子 CD14，并在其上偶合了超顺磁的微滴(Miltenyi Biotech，Bergisch Gladbach)。为了从 PBMC 的细胞混合物中正选择标记的单核细胞，将整个细胞悬浮液加入到一个装有铁

磁性载体基质的柱子里，并置于磁场中。这样，带有微滴的细胞被载体基质所束缚，而未标记的细胞通过柱子并被丢弃。从磁场中移走基质后，通过用缓冲剂冲洗已去除了磁性的柱子，来洗脱带抗体的细胞。用这种方法得到的 CD14-阳性单核细胞群体的纯度为大约 95-98%。这些单核细胞在 37℃、5%CO_2、密度为 10^6 细胞/毫升培养基(RPMI，补充 10%胎儿牛血清)下，用溶解在 DMSO 中的试验物质培养 1 小时。随后加入 20 μg/mL 来自 E. coli(大肠杆菌)的 LPS。24 小时后，取不含细胞的培养上层清液，并测试其中 IL-10 和 IL-12 的含量。

在细胞培养上层清液中 IL-12 和 IL-10 的浓度通过使用两个抗-IL-12 和 IL-10 的单克隆抗体的夹心酶联免疫吸附测定法(ELISAs)来测定(Biosource Europe，Fleurus，Belgium)。包括一条人 IL-10 和 IL-12 的参考标准曲线。IL-12 的 ELISA 检出极限是 10pg/ml，IL-10 的 ELISA 检出极限是 15pg/ml。

表 1：和沙利度胺比较，试验物质对 LPS 活化单核细胞的 IL-12 和 IL-10 形成的影响

实施例序号	IL-12 形成的抑制率		IL-10 形成的增加率
	最大(%)	IC_{50}(ng/ml)	最大(%)
1	99	5	360
3	98	10	230
7a	98	1	365
7h	97	6	316
7f	98	0.8	420
7n	84	42	263
7m	89	50	202
7i	96	36	211
沙利度胺	80	100	180

具有式I描述的基本结构的3位被杂环取代的哌啶-2,6-二酮根据浓度，可有效地抑制LPS活化的单核细胞形成IL-12。有趣的是，IL-10的形成在相同的浓度范围明显增加。IL-12的最大抑制作用以及IC_{50}值明显高于沙利度胺。最有效的化合物为芳环的第五位或第七位包含一个氯或氟取代基的化合物或未取代的化合物。