[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680038745.0

[51] Int. Cl.
C07D 209/12 (2006.01)
C07D 213/90 (2006.01)
C07D 213/79 (2006.01)
C07D 239/28 (2006.01)
C07D 213/55 (2006.01)
C07D 231/12 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 101291908A

[51] Int. Cl. (续)
C07D 213/86 (2006.01)
C07D 277/56 (2006.01)
C07D 213/81 (2006.01)
C07D 241/24 (2006.01)
C07D 213/80 (2006.01)
C07D 401/06 (2006.01)
C07D 213/89 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)
C07D 213/84 (2006.01)

[22] 申请日 2006.8.22

[21] 申请号 200680038745.0

[30] 优先权

[32] 2005. 8.23 [33] US [31] 60/710,781

[86] 国际申请 PCT/US2006/032877 2006.8.22

[87] 国际公布 WO2007/024922 英 2007.3.1

[85] 进入国家阶段日期 2008.4.17

[71] 申请人 IRM 责任有限公司

地址 百慕大群岛(英)哈密尔顿

[72] 发明人 W·高 Y·万 J·江 范 毅 N·S·格雷 S·潘

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 陈润杰

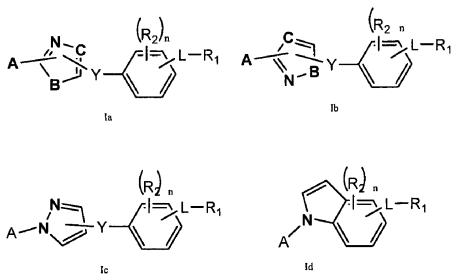
权利要求书 5 页 说明书 36 页

[54] 发明名称

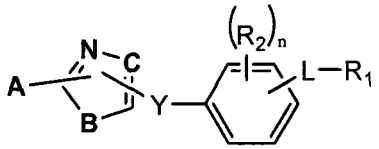
免疫抑制剂化合物和组合物

[57] 摘要

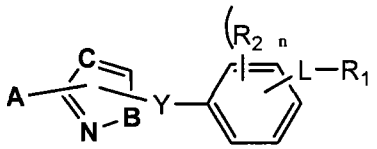
本发明涉及免疫抑制剂、其制备方法、其用途和包含它们的药物组合物。 本发明提供了一类新的可用于治疗或预防由淋巴细胞相互作用介导的疾病或病症、特别是与 EDG 受体介导的信号转导相关疾病的化合物。 本申请涉及选自式(Ia)、(Ib)、(Ic)和(Id)的化合物。



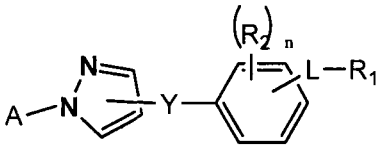
1. 选自式 Ia、Ib、Ic 和 Id 的化合物及其药学上可接受的盐:



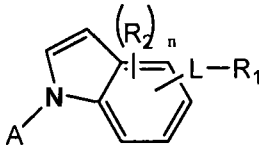
Ia



Ib



Ic



Id

其中:

A 选自氰基、$-X_1C(O)OR_3$、$-X_1OP(O)(OR_3)_2$、$-X_1P(O)(OR_3)_2$、$-X_1P(O)OR_3$、$-X_1S(O)_2OR_3$、$-X_1P(O)(R_3)OR_3$、$-X_1C(O)NR_3R_3$、$-X_1C(O)NR_3X_1OR_3$、$-X_1C(O)NR_3X_1C(O)OR_3$、$-X_1C(O)X_1C(O)OR_3$和 1*H*-四唑-5-基; 其中 X_1 各自独立地选自键、C_{1-3} 亚烷基和 C_{2-3} 亚烯基且 R_3 各自独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基; 其中 R_3 和 A 的任意 NR_3X_1 部分中 X_1 的亚烷基氢可以形成环状基团;

B 选自$-CR_4=CR_5-$、$-CR_4=N-$、$-N=CR_4-$、–S–和$-NR_4-$; 其中 R_4 和 R_5 独立地选自氢、卤素和 C_{1-6} 烷基;

C 选自$=CR_4-$和=N–; 其中 R_4 选自氢、卤素和 C_{1-6} 烷基;

L 选自$-X_2OX_3-$、$-X_2NR_3X_3-$、$-X_2C(O)NR_3X_3-$、$-X_2NR_3C(O)X_3-$和$-X_2S(O)_{0-2}X_3-$; 其中 X_2 和 X_3 各自独立地选自键、C_{1-3} 亚烷基和 C_{2-3} 亚烯基; 且 R_3 选自氢和 C_{1-6} 烷基;

Y 选自键、-O-、-S-、-S(O)-、$-S(O)_2-$、$-NR_3-$、亚甲基和亚乙基; 其中 R_3 选自氢和 C_{1-6} 烷基;

n 选自 0、1、2 和 3;

R_1 选自 C_{6-10} 芳基和 C_{1-10} 杂芳基; 其中 R_1 的任意芳基或杂芳基任选被选自 C_{6-10} 芳基 C_{0-4} 烷基、C_{5-6} 杂芳基 C_{0-4} 烷基、C_{3-8} 环烷基 C_{0-4} 烷基、C_{3-8}

杂环烷基 C_{0-4} 烷基和 C_{1-10} 烷基的基团取代；其中 R_1 或 R_1 取代基的任意芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基可以任选被 1－5 个基团取代，所述基团独立地选自卤素、C_{1-10} 烷基、C_{1-10} 烷氧基、卤素-取代的-C_{1-10} 烷基和卤素-取代的-C_{1-10} 烷氧基；且 R_1 的任意烷基可以任选具有被选自–$S(O)_{0-2}$–、–NR_3–和–O–的原子或基团替代的亚甲基；其中 R_3 选自氢和 C_{1-6} 烷基；

R_2 选自卤素、氰基、硝基、C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 烷基；且式 Ia 和 Ib 的苯基环可以任选具有至多 3 个被氮替代的=C–基团。

2. 权利要求 1 的化合物，其中：

A 选自氰基、–$X_1C(O)OR_3$、–$X_1OP(O)(OR_3)_2$、–$X_1P(O)(OR_3)_2$、–$X_1P(O)OR_3$、–$X_1S(O)_2OR_3$、–$X_1P(O)(R_3)OR_3$、-$X_1C(O)NR_3R_3$、-$X_1C(O)NR_3X_1OR_3$、-$X_1C(O)NR_3X_1C(O)OR_3$、-$X_1C(O)X_1C(O)OR_3$ 和 1*H*-四唑-5-基；其中 X_1 各自独立地选自键、C_{1-3} 亚烷基和 C_{2-3} 亚烯基且 R_3 各自独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基；其中 R_3 和 A 的任意 NR_3X_1 部分中 X_1 的亚烷基氢可以形成环状基团；

n 选自 0 和 1；

R_1 选自 C_{6-10} 芳基和 C_{1-10} 杂芳基；其中 R_1 的任意芳基或杂芳基任选被选自 C_{6-10} 芳基 C_{0-4} 烷基、C_{5-6} 杂芳基 C_{0-4} 烷基、C_{3-8} 环烷基 C_{0-4} 烷基、C_{3-8} 杂环烷基 C_{0-4} 烷基和 C_{1-10} 烷基的基团取代；其中 R_1 或 R_1 取代基的任意芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基可以任选被 1－5 个基团取代，所述基团独立地选自卤素、C_{1-10} 烷基、C_{1-10} 烷氧基、卤素-取代的-C_{1-10} 烷基和卤素-取代的-C_{1-10} 烷氧基；且 R_1 的任意烷基可以任选具有被选自–$S(O)_{0-2}$–、–NR_3–和–O–的原子或基团替代的亚甲基；其中 R_3 选自氢和 C_{1-6} 烷基；且

R_2 选自卤素和 C_{1-6} 烷基。

3. 权利要求 2 的化合物，其中 A 选自氰基、–COOH、–$CH_2C(O)OH$、–$(CH_2)_2C(O)OH$、-$C(O)NH_2$、-$C(O)NH(CH_2)_2OH$、-$C(O)NH(CH_2)_3OH$、-$C(O)NH(CH_2)_2C(O)OH$、-$C(O)(CH_2)_2C(O)OH$、3-羟基氮杂环丁烷-1-羰基和四唑基。

4. 权利要求 3 的化合物，其中 R_1 为任选被 1－2 个基团取代的苯基，

所述基团独立地选自卤素、甲基、三氟甲基、噻唑基和任选被卤素或甲基取代的苯基；且 R_2 为卤素。

5. 权利要求 4 的化合物，选自：5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；2-[4-(3'-甲基-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1H-咪唑-4-甲酸；{5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-2-(1H-四唑-5-基)-吡啶；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酰胺；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1H-咪唑-2-甲酸；5-[4-(3'-甲基-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[2-氯-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-烟酸；5-[2-氟-4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[2-氟-4-(4-噻唑-2-基-3-三氟甲基-苯氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基甲氧基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苯氧基甲基)-2-氟-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-腈；5-[2-氯-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1-氧基-吡啶-2-甲酸；4-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；{6-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸；3-{5-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-基}-丙酸；3-{5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-基}-丙酸；3-{5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-基}-丙酸；3-{5-[2-氯-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-基}-丙酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-2-甲基-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[3-氟-4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[3-氯-4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-3-硝基-苯基]-吡啶-2-甲酸；3-氟-5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；3-溴-5-[4-(2'-氟-2-

三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯氧基]-吡啶-2-甲酸；4-(4-辛氧基-苯基)-吡啶-2-甲酸；3-[4-(4-辛氧基-苯基)-吡啶-2-基]-丙酸；3-(5-{2-[4-(5-苯基-戊氧基)-苯基]-乙基}-吡啶-2-基)-丙酸；3-{4-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡唑-1-基}-丙酸；{4-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡唑-1-基}-乙酸；{4-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡唑-1-基}-乙酸；{4-[2-氟-4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡唑-1-基}-乙酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-噻唑-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-嘧啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡嗪-2-甲酸；5-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；4-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；6-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-烟酸；{5-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸；5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸(2-羟基-乙基)-酰胺；5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸(3-羟基-丙基)-酰胺；3-({5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-羰基}-氨基)-丙酸；{5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-基}-(3-羟基-氮杂环丁烷-1-基)-甲酮；5-[2-(2-三氟甲基-联苯-4-基)-苯并噁唑-6-基]-吡啶-2-甲酸；和 4-[5-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-吲哚-1-基]-4-氧代-丁酸。

6. 药物组合物，包含治疗有效量的权利要求 1 的化合物与药学上可接受的赋形剂。

7. 治疗动物疾病的方法，其中 EDG/S1P 受体介导的信号转导改变可以预防、抑制或改善疾病的病理学和/或症状学，该方法包括对所述动物施用治疗有效量的权利要求 1 的化合物。

8. 在对象中预防或治疗淋巴细胞介导的病症或疾病、治疗急性或慢性移植物排斥或 T-细胞介导的炎症或自身免疫疾病、抑制或控制失调的血管

发生或治疗由新血管生成过程介导或与失调的血管生成相关的疾病的方法，包括对有需要的对象施用有效量的权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐。

9. 权利要求 1 的化合物在制备用于治疗其中 EDG/S1P 受体介导的信号转导的改变促进疾病的病理学和/或症状学的动物疾病的药物中的用途。

免疫抑制剂化合物和组合物

相关申请的交叉参考

本申请请求 2005 年 8 月 23 日提交的美国临时申请号 US 60/710,781 的优先权利益。将该申请披露的全部内容完整地和为所有目的引入本文作为参考。

发明背景

发明领域

本发明提供了一类新的可用于治疗或预防由淋巴细胞相互作用介导的疾病或病症、特别是与 EDG 受体介导的信号转导相关疾病的免疫抑制剂化合物。

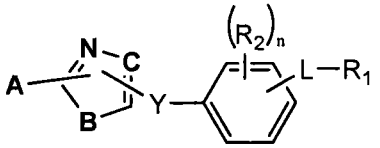
背景

EDG 受体属于一族密切相关的脂质活化的 G-蛋白偶联受体。EDG-1、EDG-3、EDG-5、EDG-6 和 EDG-8(也分别称作 S1P1、S1P3、S1P2、S1P4 和 S1P5)被鉴定为对鞘氨醇-1-磷酸(S1P)具有特异性的受体。EDG2、EDG4 和 EDG7(也分别称作 LPA1、LPA2 和 LPA3)为对溶血磷脂酸(LPA)具有特异性的受体。在 S1P 受体亚型中，EDG-1、EDG-3 和 EDG-5 在各种组织中广泛表达，而 EDG-6 的表达主要限于淋巴组织和血小板，EDG-8 的表达主要限于中枢神经系统。EDG 受体负责信号转导并且被认为在涉及细胞发育、增殖、维持、迁移、分化、可塑性和编程性细胞死亡的细胞过程中起重要作用。某些 EDG 受体与淋巴细胞相互作用介导的疾病、例如移植排斥、自身免疫疾病、炎性疾病、感染性疾病和癌症相关。EDG 受体活性改变促进这些疾病的病理学和/或症状学。因此，自身改变 EDG 受体活性

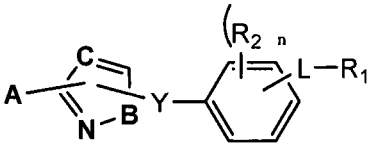
的分子可用作治疗这类疾病的治疗剂。

发明概述

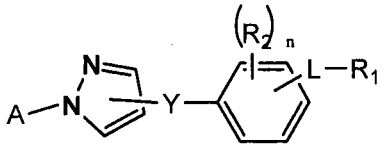
本申请涉及选自式 Ia、Ib、Ic 和 Id 的化合物和其 N-氧化物衍生物、前体药物衍生物、单个异构体和异构体混合物；及这类化合物的药学上可接受的盐和溶剂合物(例如水合物):



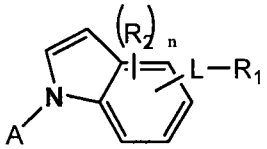
Ia



Ib



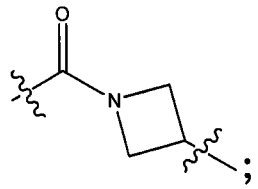
Ic



Id

其中:

A 选自氰基、$-X_1C(O)OR_3$、$-X_1OP(O)(OR_3)_2$、$-X_1P(O)(OR_3)_2$、$-X_1P(O)OR_3$、$-X_1S(O)_2OR_3$、$-X_1P(O)(R_3)OR_3$、$-X_1C(O)NR_3R_3$,$-X_1C(O)NR_3X_1OR_3$、$-X_1C(O)NR_3X_1C(O)OR_3$、$-X_1C(O)X_1C(O)OR_3$和 1*H*-四唑-5-基；其中 X_1 各自独立地选自键、C_{1-3} 亚烷基和 C_{2-3} 亚烯基且 R_3 各自独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基；其中在 A 的任意 NR_3X_1 部分中 R_3 和 X_1 的亚烷基氢可以形成环状基团如:



;

B 选自$-CR_4=CR_5-$、$-CR_4=N-$、$-N=CR_4-$、–S–和$-NR_4-$；其中 R_4 和 R_5 独立地选自氢、卤素和 C_{1-6} 烷基;

C 选自$=CR_4-$和=N–；其中 R_4 选自氢、卤素和 C_{1-6} 烷基;

L 选自$-X_2OX_3-$、$-X_2NR_3X_3-$、$-X_2C(O)NR_3X_3-$、$-X_2NR_3C(O)X_3-$和$-X_2S(O)_{0-2}X_3-$；其中 X_2 和 X_3 各自独立地选自键、C_{1-3} 亚烷基和 C_{2-3} 亚烯

基；且 R_3 选自氢和 C_{1-6} 烷基；

Y 选自键、-O-、-S-、-S(O)-、-$S(O)_2$-、-NR_3-、亚甲基和亚乙基；其中 R_3 选自氢和 C_{1-6} 烷基；

n 选自 0、1、2 和 3；

R_1 选自 C_{6-10} 芳基和 C_{1-10} 杂芳基；其中 R_1 的任意芳基或杂芳基任选被选自 C_{6-10} 芳基 C_{0-4} 烷基、C_{5-6} 杂芳基 C_{0-4} 烷基、C_{3-8} 环烷基 C_{0-4} 烷基、C_{3-8} 杂环烷基 C_{0-4} 烷基和 C_{1-10} 烷基的基团取代；其中 R_1 或 R_1 取代基的任意芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基可以任选被 1－5 个基团取代，所述基团独立地选自卤素、C_{1-10} 烷基、C_{1-10} 烷氧基、卤素-取代的-C_{1-10} 烷基和卤素-取代的-C_{1-10} 烷氧基；且 R_1 的任意烷基可以任选具有被选自–$S(O)_{0-2}$–、–NR_3–和–O–的原子或基团替代的亚甲基；其中 R_3 选自氢和 C_{1-6} 烷基；

R_2 选自卤素、氰基、硝基、C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 烷基；且式 Ia 和 Ib 的苯基环可以任选具有至多 3 个被氮替代的=C–基团。

本发明的第二个方面为药物组合物，其包含式 I 化合物或其 N-氧化物衍生物、单个异构体或其异构体混合物或其药学上可接受的盐与一种或多种合适的赋形剂。

本发明的第三个方面为治疗动物疾病的方法，其中 EDG 受体介导的信号转导的改变可以预防、抑制或缓解疾病的病理学和/或症状学，该方法包括对所述动物给予治疗有效量的式 I 化合物或其 N-氧化物衍生物、单个异构体或其异构体混合物或其药学上可接受的盐。

本发明的第四个方面为式I化合物在制备用于治疗其中EDG受体介导的信号转导的改变促进疾病的病理学和/或症状学的动物疾病的药物中的用途。

本发明的第五个方面为制备式 I 化合物及其 N-氧化物衍生物、前体药物衍生物、被保护的衍生物、单个异构体或其异构体混合物及其药学上可接受盐的方法。

优选实施方案的描述

本发明提供了可用于治疗和/或预防由淋巴细胞相互作用介导的疾病或病症的化合物。还提供了治疗这类疾病或病症的方法。

定义

在本说明书中，除非另作陈述:

“烷基”作为基团和其它基团、例如卤素-取代的-烷基、烷氧基、酰基、烷硫基、烷基磺酰基和烷基亚磺酰基的结构单元，可以为直链或支链的。“链烯基”作为基团和作为其它基团的结构单元包含一个或多个碳-碳双键，并且可以为直链或支链的。任意的双键可以为顺式-或反式-构型。优选的链烯基为乙烯基。“炔基”作为基团和作为其它基团和化合物的结构单元包含至少一个 C≡C 三键，并且还可以包含一个或多个 C=C 双键，且尽可能为直链或支链的。优选的炔基为炔丙基。单独或作为其它基团结构单元的环烷基可以包含 3－8 个碳原子、优选 3－6 个碳原子。“亚烷基”和“亚烯基”为分别衍生自“烷基”和“链烯基”的二价基团。在本申请中，R^1 的任意烷基可以任选被选自–S–、–S(O)–、$–S(O)_2–$、$–NR^3–$和–O–(其中 R^3 为氢或 C_{1-6} 烷基)的基团中的成员打断。这些基团包括$–CH_2–O–CH_2–$、$–CH_2–S(O)_2–CH_2–$、$–(CH_2)_2–NR^3–CH_2–$、$–CH_2–O–(CH_2)_2–$等。

“芳基”意旨包含 6－10 个环碳原子的单环或稠合双环芳族环组合。例如，C_{6-12} 芳基可以为苯基、联苯基或萘基，优选苯基。“亚芳基”意旨衍生自芳基的二价基团。例如，用于本申请中的亚芳基可以为亚苯基、亚联苯基、亚萘基等。

“卤代”或“卤素”意旨 F、Cl、Br 或 I，优选 F 或 Cl。卤素-取代的烷基和化合物可以部分卤化或全卤化，其中就多卤化而言，卤素取代基可以相同或不同。优选的全卤化烷基例如为三氟甲基。

“杂芳基”意旨如本申请中定义的芳基，只要所示环碳原子中的一个或多个被选自 N、O 或 S 的杂原子部分替代，并且每个环由 5－6 个环原子组成，除非另作示出。例如，作为本申请中使用的 C_{1-10} 杂芳基包括噻吩基、吡啶基、呋喃基、异噁唑基、苯并噁唑基或苯并[1,3]间二氧杂环戊烯基，优选噻吩基、呋喃基或吡啶基。“亚杂芳基”意旨如本申请中所定义的杂

芳基，条件是环组合包含二价基团。

作为本发明中使用的 EDG-1 选择性化合物(活性剂或调节剂)具有对 EDG-1 的选择性超过 EDG-3 并且超过 EDG-5、EDG-6 和 EDG-8 中的一种或多种的特异性。本文所用的对 EDG 受体(“选择性受体”)的选择性超过另一种 EDG 受体(“非-选择性受体”)意旨所述化合物在诱导由选择性 EDG 受体(例如 EDG-1)介导的活性中的功效方面远高于对非-选择性 S1P-特异性 EDG 受体介导的活性中的功效。如果在 GTP-γS 结合测定中测定(如下文实施例中所述)，则 EDG-1 选择性化合物一般对选择性受体(EDG-1)具有的 EC50(产生 50%最大响应的有效浓度)较其对非-选择性受体(例如 EDG-3、EDG-5、EDG-6 和 EDG-8 中的一种或多种)的 EC50 至少低 5、10、25、50、100、500 或 1000 倍。

发明详述

本发明提供了可用于治疗或预防由淋巴细胞相互作用介导的疾病或病症的化合物。

在一个实施方案中，就式 Ia、Ib、Ic 和 Id 化合物而言，为这类化合物，其中：A 选自氰基、$-X_1C(O)OR_3$、$-X_1OP(O)(OR_3)_2$、$-X_1P(O)(OR_3)_2$、$-X_1P(O)OR_3$、$-X_1S(O)_2OR_3$、$-X_1P(O)(R_3)OR_3$、$-X_1C(O)NR_3R_3$、$-X_1C(O)NR_3X_1OR_3$、$-X_1C(O)NR_3X_1C(O)OR_3$、$-X_1C(O)X_1C(O)OR_3$和 1*H*-四唑-5-基；其中 X_1 各自独立地选自键、C_{1-3} 亚烷基和 C_{2-3} 亚烯基且 R_3 各自独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基；其中在 A 的任意 NR_3X_1 部分中 R_3 和 X_1 的亚烷基氢可以形成环状基团。

在另一个实施方案中，n 选自 0 和 1；R_1 选自 C_{6-10} 芳基和 C_{1-10} 杂芳基；其中 R_1 的任意芳基或杂芳基任选被选自 C_{6-10} 芳基 C_{0-4} 烷基、C_{5-6} 杂芳基 C_{0-4} 烷基、C_{3-8} 环烷基 C_{0-4} 烷基、C_{3-8} 杂环烷基 C_{0-4} 烷基和 C_{1-10} 烷基的基团取代；其中 R_1 或 R_1 的取代基的任意芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基可以任选被 1－5 个基团取代，所述基团独立地选自卤素、C_{1-10} 烷基、C_{1-10} 烷氧基、卤素-取代的-C_{1-10} 烷基和卤素-取代的-C_{1-10} 烷氧基；且 R_1 的任意

烷基可以任选具有被选自–$S(O)_{0-2}$–、–NR_3–和–O–的原子或基团替代的亚甲基；其中 R_3 选自氢和 C_{1-6} 烷基；且 R_2 选自卤素和 C_{1-6} 烷基。

在另一个实施方案中，A 选自氰基、–COOH、–$CH_2C(O)OH$、–$(CH_2)_2C(O)OH$、-$C(O)NH_2$、-$C(O)NH(CH_2)_2OH$、-$C(O)NH(CH_2)_3OH$、-$C(O)NH(CH_2)_2C(O)OH$、-$C(O)(CH_2)_2C(O)OH$、3-羟基氮杂环丁烷-1-羰基和四唑基。

在另一个实施方案中，R_1 为任选被 1－2 个基团取代的苯基，所述基团独立地选自卤素、甲基、三氟甲基、噻唑基和任选被卤素或甲基取代的苯基；且 R_2 为卤素。

本发明优选的化合物选自：5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；2-[4-(3'-甲基-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1H-咪唑-4-甲酸；{5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-2-(1H-四唑-5-基)-吡啶；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酰胺；5-[4-(2’-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1H-咪唑-2-甲酸；5-[4-(3'-甲基-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[2-氯-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-烟酸；5-[2-氟-4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[2-氟-4-(4-噻唑-2-基-3-三氟甲基-苯氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基甲氧基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苯氧基甲基)-2-氟-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-腈；5-[2-氯-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1-氧基-吡啶-2-甲酸；4-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；{6-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸；3-{5-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-基}-丙酸；3-{5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-

基}-丙酸；3-{5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-基}-丙酸；3-{5-[2-氯-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-基}-丙酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-2-甲基-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[3-氟-4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[3-氯-4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-3-硝基-苯基]-吡啶-2-甲酸；3-氟-5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；3-溴-5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯氧基]-吡啶-2-甲酸；4-(4-辛氧基-苯基)-吡啶-2-甲酸；3-[4-(4-辛氧基-苯基)-吡啶-2-基]-丙酸；3-(5-{2-[4-(5-苯基-戊氧基)-苯基]-乙基}-吡啶-2-基)-丙酸；3-{4-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡唑-1-基}-丙酸；{4-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡唑-1-基}-乙酸；{4-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡唑-1-基}-乙酸；{4-[2-氟-4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡唑-1-基}-乙酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-噻唑-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-嘧啶-2-甲酸；5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡嗪-2-甲酸；5-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；4-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；6-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸；5-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-烟酸；{5-[3-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸；5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸(2-羟基-乙基)-酰胺；5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸(3-羟基-丙基)-酰胺；3-({5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-羰基}-氨基)-丙酸；{5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-基}-(3-羟基-氮杂环丁烷-1-基)-甲酮；5-[2-(2-三氟甲基-联苯-4-基)-苯并噁唑-6-基]-吡啶-2-甲酸；4-[5-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-吲哚-1-基]-4-氧代-丁酸。

其它优选化合物还如下文实施例和表 1 中所示。

本发明提供了具有以被保护形式存在的羟基或胺基的化合物形式；它们作为前体药物起作用。前体药物为在给药后通过一种或多种化学或生化转化而被转化成活性药物形式的化合物。易于在生理条件下转化成请求保护的化合物的本发明化合物形式为请求保护的化合物的前体药物并且属于本发明范围内。前体药物的实例包括其中羟基被酰化成相对不稳定的酯如乙酸酯的形式，和其中胺基被甘氨酸或 L-氨基酸如丝氨酸的羧酸基团酰化从而形成对普通代谢酶水解特别敏感的酰胺键的形式。

式 I 化合物可以以游离形式或盐的形式，例如与无机酸或有机酸的加成盐存在。如果存在羟基，这些基团也可以以盐形式存在，例如铵盐或与金属形成的盐，如锂、钠、钾、钙、锌或镁或其混合物。水合物或溶剂合物形式的式 I 化合物及其盐也为本发明的组成部分。

当式 I 化合物在分子中具有不对称中心时，获得各种光学异构体。本发明还包括对映体、外消旋物、非对映异构体及其混合物。此外，当式 I 化合物包括几何异构体时，本发明包括顺式-化合物、反式-化合物及其混合物。类似的考虑适合于具有不对称碳原子或如上所述不饱和键的原料。

治疗免疫调节病症的方法和药物组合物

游离形式或药学上可接受盐形式的式 I 化合物表现出有价值的药理学特性，例如淋巴细胞再循环调节特性，例如如实施例 31 的体外和体内试验中所示，并且由此适用于治疗。式 I 化合物优选表现出的 EC_{50} 在 1×10^{-11} - 1×10^{-5} M 的范围、优选低于 50nM。这些化合物表现对一种或多种 EDG/S1P 受体、优选 EDG-1/S1P-1 的选择性。可以通过检测化合物与 EDG-1/S1P-1 和其它 EDG/S1P 受体中的一种或多种(例如 EDG-3/S1P-3、EDG-5/S1P-2、EDG-6/S1P-4 和 EDG-8/S1P-5)的结合来鉴定本发明的 EDG-1/S1P-1 选择性调节剂。EDG-1/S1P-1 选择性调节剂通常具有的对 EDG-1/S1P-1 受体的 EC50 在 1×10^{-11} - 1×10^{-5} M 的范围、优选低于 50 nM、更优选低于 5nM。它对其它 EDG/S1P 受体中的一种或多种的 EC50

高于其对 EDG-1/S1P-1 的 EC50 至少 5、10、25、50、100、500 或 1000 倍。因此，某些 EDG-1/S1P-1 调节化合物对 EDG-1/S1P-1 的 EC50 低于 5nM，而其对其它 EDG/S1P 受体中的一种或多种的 EC50 至少为 100nM 或以上。除了测量与 EDG/S1P 受体的结合活性外，EDG-1/S1P-1 选择性活性剂还可以通过检验供试活性剂改变 EDG/S1P 受体介导的细胞过程或活性的能力来鉴定。

因此，式 I 化合物可用于治疗和/或预防淋巴细胞相互作用介导的疾病或病症，例如在移植中，如急性或慢性细胞、组织或器官同种异体移植或异种移植排斥或移植物功能延迟、移植物抗宿主病、自身免疫疾病如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、桥本甲状腺炎(hashimoto's thyroidis)、多发性硬化、重症肌无力、I 或 II 型糖尿病和与之相关的病症、脉管炎、恶性贫血、斯耶格仑综合征、眼色素层炎、银屑病、格雷夫斯眼病、斑秃等、过敏性疾病如过敏性哮喘、特应性皮炎、过敏性鼻炎/结膜炎、变应性接触性皮炎、任选伴有潜在异常反应的炎性疾病如炎性肠病、局限性回肠炎或溃疡性结肠炎、内源性哮喘、炎症性肺损伤、炎症性肝损伤、炎症性肾小球损伤、动脉粥样硬化、骨关节炎、刺激性接触性皮炎和其它湿疹性皮炎、脂溢性皮炎、免疫介导的病症的皮肤表现、炎症性眼病、角膜结膜炎、心肌炎或肝炎、局部缺血/再灌注损伤如心肌梗死、中风、肠局部缺血、肾衰竭或出血性休克、创伤性休克、T 细胞淋巴瘤或 T 细胞白血病、感染性疾病如中毒性休克(例如超抗原诱导的)、脓毒性休克、成人呼吸窘迫综合征或病毒感染如 AIDS、病毒性肝炎、慢性细菌感染或老年性痴呆。细胞、组织或实体器官移植物的实例包括：例如胰岛、干细胞、骨髓、角膜组织、神经元组织、心脏、肺、联合心-肺、肾、肝、肠、胰、气管或食道。就上述用途而言，所需剂量当然根据施用方式、所治疗的具体疾病和所需作用而改变。

此外，式 I 化合物可用于癌症化疗、特别用于实体瘤、例如乳腺癌的癌症化疗或作为抗血管生成剂。

所需剂量当然根据施用方式、所治疗的具体疾病和所需作用而改变。

一般而言，在约 0.03－2.5mg/kg/体重的每日剂量获得全身性的令人满意的效果。较大哺乳动物、例如人的适用每日剂量在约 0.5mg－约 100mg 的范围，方便地例如按照不超过每日 4 次的分剂量或以延长形式给药。口服给药的合适的单位剂型包括约 1－50mg 活性组分。

可以通过任意常规途经施用式 I 化合物，特别是经肠，例如口服，例如以片剂或胶囊形式；或经胃肠外，例如以可注射溶液或混悬液形式；经局部，例如以洗剂、凝胶、软膏剂或霜剂形式；或在鼻中给药或以栓剂形式。可以按照常规方式、通过与药学上可接受的载体或稀释剂混合来制备包含游离形式或药学上可接受盐形式与至少一种药学上可接受的载体或稀释剂的药物组合物。

式 I 化合物可以以游离形式或药学上可接受盐的形式施用，例如如上所述。这类盐可以按照常规方式制备并且它们表现出与游离化合物同样量级的活性。

式 I 化合物可以以游离形式或药学上可接受盐的形式施用，例如如上所述。这类盐可以按照常规方式制备并且它们表现出与游离化合物同样量级的活性。

按照上述，本发明进一步提供了：

1.1 在需要此治疗的对象中预防或治疗例如如上所述由淋巴细胞介导的病症或疾病的方法，该方法包括对所述对象施用有效量的式 I 化合物或其药学上可接受的盐；

1.2 在需要此治疗的对象中预防或治疗例如如如上所述的急性或慢性移植物排斥或 T-细胞介导的炎性或自身免疫疾病的方法，该方法包括对所述对象施用有效量的式 I 化合物或其药学上可接受的盐；

1.3 在有需要的对象中抑制或控制血管生成失调、例如鞘氨醇-1-磷酸(S1P)介导的血管生成的方法，包括对所述对象施用治疗有效量的式 I 化合物或其药学上可接受的盐。

1.4 在有需要的对象中预防或治疗由新血管生成过程介导或与血管生成失调相关的疾病的方法，包括对所述对象施用治疗有效量的式 I 化合物

或其药学上可接受的盐。

2. 游离形式或药学上可接受的盐形式的式 I 化合物，用作药物，例如在上述 1.1－1.4 中所示的任意方法中。

3. 药物组合物，例如用于上述 1.1－1.4 中任意方法中、包含游离形式或其药学上可接受盐形式的式 I 化合物与药学上可接受的稀释剂或载体。

4. 游离形式或药学上可接受盐形式的式 I 化合物在制备用于上述 1.1－1.4 任意方法中的药物组合物中的用途。

式 I 化合物可以作为单一活性组分或与例如作为佐剂的其它药物联合施用，所述其它药物例如免疫抑制剂或免疫调节剂或其它抗炎剂，例如用于治疗或预防同种异体移植物或异种移植物急性或慢性排斥或炎性或自身免疫病症；或化疗剂，例如恶性细胞抗增殖剂。例如，式 I 化合物可以与如下药物联用：钙调磷酸酶抑制剂，例如环孢菌素 A 或 FK 506；mTOR 抑制剂，例如雷帕霉素、40-O-(2-羟乙基)-雷帕霉素、CCI779、ABT578 或 AP23573；具有免疫抑制特性的子囊霉素，例如 ABT-281、ASM981 等；皮质类固醇；环磷酰胺；咪唑硫嘌呤(azathioprene)；甲氨蝶呤；来氟米特；咪唑立宾；霉酚酸；麦考酚酸吗啉乙酯；15-脱氧精胍菌素或免疫抑制剂同系物、其类似物或衍生物；免疫抑制单克隆抗体，例如白细胞受体的单克隆抗体，例如 MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD25、CD28、CD40、CD45、CD58、CD80、CD86 或其配体；其它免疫调节化合物，例如具有至少部分 CTLA4 胞外结构域或其突变体的重组结合分子，例如与非-CTLA4 蛋白序列连接的 CTLA4 的至少胞外部分或其突变体，例如 CTLA4Ig(例如命名为 ATCC 68629)或其突变体，例如 LEA29Y；黏着分子抑制剂，例如 LFA-1 拮抗剂、ICAM-1 或-3 拮抗剂、VCAM-4 拮抗剂或 VLA-4 拮抗剂；或化疗剂。

所谓术语“化疗剂”意旨任意的化疗剂并且包括但不限于：

i. 芳香酶抑制剂；

ii. 抗雌激素药、抗雄激素药(尤其是就前列腺癌而言)或戈那瑞林(gonadorelin)激动剂；

iii. 拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 II 抑制剂；

iv. 微管活性剂、烷化剂、抗肿瘤抗代谢物或铂化合物；

v. 靶向/降低蛋白或脂质激酶活性或蛋白或脂质磷酸酶活性的化合物、其它抗血管生成化合物或诱导细胞分化过程的化合物；

vi. 缓激肽 1 受体或血管紧张素 II 拮抗剂；

vii. 环加氧酶抑制剂、双膦酸类、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、类肝素酶抑制剂(防止硫酸类肝素降解)，例如 PI-88；生物应答改性剂，优选淋巴因子或干扰素，例如干扰素□；遍在蛋白化作用抑制剂，或阻滞抗细胞程序死亡路径的抑制剂；

viii. Ras 致癌同种型抑制剂，例如 H-Ras、K-Ras 或 N-Ras，或法尼基转移酶抑制剂，例如 L-744、832 或 DK8G557；

ix. 端粒酶抑制剂，例如 telomestatin；

x. 蛋白酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、甲硫氨酸氨肽酶抑制剂，例如 bengamide 或其衍生物，或蛋白体抑制剂，例如 PS-341；和/或

xi. mTOR 抑制剂。

本文所用的术语“芳香酶抑制剂”涉及抑制雌激素产生的化合物，也就是抑制底物雄甾烯二酮和睾酮分别向雌酮和雌二醇的转化的化合物。该术语包括但不限于类固醇，尤其是阿他美坦、依西美坦和福美司坦，特别是非类固醇，尤其是氨鲁米特、roglethimide、吡鲁米特、曲洛司坦、睾内酯、酮康唑(ketokonazole)、伏罗唑、法曲唑、阿那曲唑和来曲唑。包含化学治疗剂芳香酶抑制剂的本发明组合特别可用于治疗激素受体阳性肿瘤，例如乳腺肿瘤。

本文所用的术语“抗雌激素药”涉及在雌激素受体水平拮抗雌激素效应的化合物。该术语包括但不限于他莫昔芬、fulvestrant、雷洛昔芬和盐酸雷洛昔芬。包含化学治疗剂抗雌激素药的本发明组合特别可用于治疗雌激素受体阳性肿瘤，例如乳腺肿瘤。

本文所用的术语“抗雄激素药”涉及能够抑制雄性激素生物效应的任意物质，包括但不限于比卡鲁胺。

本文所用的术语“戈那瑞林激动剂”包括但不限于阿巴瑞克(abarelix)、性瑞林和醋酸性瑞林。

本文所用的术语“拓扑异构酶 I 抑制剂”包括但不限于托泊替康、伊立替康、9-硝基喜树碱和大分子喜树碱缀合物 PNU-166148 (WO 99/17804 中的化合物 A1)。

本文所用的术语“拓扑异构酶 II 抑制剂”包括但不限于蒽环素类，例如阿霉素、柔红霉素、表阿霉素、伊达比星和奈莫比星(nemorubicin)，蒽醌类的米托蒽醌和洛索蒽醌(losoxantrone)；和鬼臼毒素(podophillotoxine)依托泊苷和替尼泊苷。

术语“微管活性剂”涉及微管稳定化与微管去稳定化剂，包括但不限于紫杉烷类，例如紫杉醇和多西他赛；长春花属生物碱，例如长春花碱尤其是硫酸长春花碱、长春新碱尤其是硫酸长春新碱，和长春烯碱；海绵内酯(discodermolide)和埃坡霉素及其衍生物，例如埃坡霉素 B 或其衍生物。

本文所用的术语“烷基化剂”包括但不限于白消安、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑或亚硝基脲(BCNU 或 Gliadel^{TM})。

术语“抗肿瘤性抗代谢物”包括但不限于 5-氟尿嘧啶、卡培他滨、吉西他滨、阿糖胞苷、氟达拉滨、硫鸟嘌呤、甲氨蝶呤和依达曲沙。

本文所用的术语“铂化合物”包括但不限于卡铂、顺铂和奥沙利铂。

本文所用的术语“靶向/降低蛋白或脂质激酶活性的化合物或者进一步的抗血管生成化合物”包括但不限于蛋白酪氨酸激酶和/或丝氨酸和/或苏氨酸激酶抑制剂或者脂质激酶抑制剂，例如靶向、降低或抑制下列物质活性的化合物：表皮生长因子受体酪氨酸激酶家族(作为均-或杂二聚物的 EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4)、血管内皮生长因子受体酪氨酸激酶家族(VEGFR)、血小板衍生的生长因子受体(PDGFR)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、胰岛素样生长因子受体 1 (IGF-1R)、Trk 受体酪氨酸激酶家族、Axl 受体酪氨酸激酶家族、Ret 受体酪氨酸激酶、Kit/SCFR 受体酪氨酸激酶、c-Abl 家族成员与它们的基因融合产物(例如 BCR-Abl)、蛋白激酶 C(PKC)与 Raf 家族的丝氨酸/苏氨酸激酶成员、MEK、SRC、JAK、FAK、

PDK 或 PI(3)激酶家族成员或者 PI(3)激酶相关激酶家族的成员，和/或细胞周期蛋白依赖性激酶家族(CDK)成员，和它们的活性具有另一种机理(例如与蛋白或脂质激酶抑制作用无关)的抗血管生成化合物。

靶向、降低或抑制 VEGFR 活性的化合物尤其是抑制 VEGF 受体酪氨酸激酶、抑制 VEGF 受体或与 VEGF 结合的化合物、蛋白质或抗体，特别是一般与具体公开在下列文献中的那些化合物、蛋白质或单克隆抗体：WO 98/35958，例如 1-(4-氯苯胺基)-4-(4-吡啶基甲基)酞嗪或其药学上可接受的盐，例如琥珀酸盐；WO 00/27820，例如 N-芳(硫代)邻氨基苯甲酰胺衍生物，例如 2-[(4-吡啶基)甲基]氨基-N-[3-甲氧基-5-(三氟甲基)苯基]苯甲酰胺或 2-[(1-氧化-4-吡啶基)甲基]氨基-N-[3-三氟甲基苯基]苯甲酰胺；或 WO 00/09495、WO 00/59509、WO 98/11223、WO 00/27819 和 EP 0769947；M. Prewett 等在 Cancer Research 59 (1999) 5209-5218 中、F. Yuan 等在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 卷, 14765-14770 页, 1996 年 12 月中、Z. Zhu 等在 Cancer Res. 58, 1998, 3209-3214 中和 J. Mordenti 等在 Toxicologic Pathology, 27 卷, 第 1 期, 14-21 页, 1999 中所述的那些；WO 00/37502 和 WO 94/10202；Angiostatin™，如 M. S. O'Reilly 等, Cell 79, 1994, 315-328 所述；Endostatin™，如 M. S. O'Reilly 等, Cell 88, 1997, 277-285 所述；邻氨基苯甲酰胺类；ZD4190；ZD6474；SU5416；SU6668；或者抗-VEGF 抗体或抗-VEGF 受体抗体，例如 RhuMab。

抗体表示完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少 2 种完整抗体构成的多特异性抗体，和抗体片段，只要它们表现所需的生物活性即可。

靶向、降低或抑制表皮生长因子受体家族活性的化合物尤其是这样的化合物、蛋白质或抗体，它们抑制 EGF 受体酪氨酸激酶家族的成员，例如 EGF 受体、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4，或者与 EGF 或 EGF 相关配体结合，或者它们对 ErbB 和 VEGF 受体激酶具有双重抑制效果，特别是一般与具体公开在下列文献中的那些化合物、蛋白质或单克隆抗体：WO 97/02266，例如实施例 39 化合物，或者 EP 0564409、WO 99/03854、EP 0520722、EP 0566226、EP 0787722、EP 0837063、US 5,747,498、WO 98/10767、

WO 97/30034、WO 97/49688、WO 97/38983，尤其是 WO 96/30347(例如被称为 CP 358774 的化合物)、WO 96/33980(例如化合物 ZD 1839)和 WO 95/03283(例如化合物 ZM105180)或 PCT/EP02/08780；例如司徒曼布(Herpetin^{R})、cetuximab、Iressa、OSI-774、CI-1033、EKB-569、GW-2016、E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3 或 E7.6.3。

靶向、降低或抑制 PDGFR 活性的化合物尤其是抑制 PDGF 受体的化合物，例如 N-苯基-2-嘧啶-胺衍生物，例如伊马替尼(imatinib)。

靶向、降低或抑制 c-AbI 家族成员和它们基因融合产物的化合物例如有 N-苯基-2-嘧啶-胺衍生物，例如伊马替尼；PD 180970；AG957 或 NSC 680410。

靶向、降低或抑制蛋白激酶 C、Raf、MEK、SRC、JAK、FAK 和 PDK 家族成员或者 PI(3)激酶或 PI(3)激酶相关家族成员和/或细胞周期蛋白依赖性激酶家族(CDK)成员的活性的化合物尤其是公开在 EP 0296110 中的那些星形孢菌素衍生物，例如 midostaurin；进一步的化合物实例例如包括 UCN-01、safingol、BAY 43-9006、苔藓虫素 1、Perifosine；Ilmofosine；RO 318220 与 RO 320432；GO 6976；Isis 3521；或者 LY333531/LY379196。

进一步的抗血管生成化合物例如有沙利度胺(THALOMID)和 TNP-470。

靶向、降低或抑制蛋白或脂质磷酸酶活性的化合物例如有磷酸酶 1、磷酸酶 2A、PTEN 或 CDC25 的抑制剂，例如冈田酸(okadaic acid)或其衍生物。

诱导细胞分化过程的化合物例如有视黄酸、α-、β-或γ-生育酚或α-、β-或γ-生育三烯酚。

本文所用的术语环加氧酶抑制剂包括但不限于例如塞来昔布(Celebrex^{R})、洛芬昔布(Vioxx^{R})、依托考昔(etoricoxib)、伐地考昔(valdecoxib)或者 5-烷基-2-芳基氨基苯基乙酸，例如 5-甲基-2-(2'-氯-6'-氟苯胺基)苯基乙酸。

本文所用的术语“组蛋白脱乙酰酶抑制剂”包括但不限于 MS-27-275、SAHA、pyroxamide、FR-901228 或丙戊酸。

本文所用的术语“双膦酸类”包括但不限于伊曲膦酸、氯膦酸、替鲁膦酸、帕米膦酸、阿仑膦酸、伊班膦酸、利塞膦酸和唑来膦酸。

本文所用的术语“基质金属蛋白酶抑制剂”包括但不限于胶原拟肽(peptidomimetic)与非拟肽抑制剂、四环素衍生物，例如异羟肟酸拟肽抑制剂巴马司他及其口服生物可利用的类似物马马司他、prinomastat、BMS-279251、BAY 12-9566、TAA211 或 AAJ996。

本文所用的术语“mTOR 抑制剂”包括但不限于雷帕霉素(西罗莫司)或其衍生物，例如 32-脱氧雷帕霉素、16-戊-2-炔氧基-32-脱氧雷帕霉素、16-戊-2-炔氧基-32(S)-二氢雷帕霉素、16-戊-2-炔氧基-32(S)-二氢-40-O-(2-羟乙基)雷帕霉素和更优选的 40-O-(2-羟乙基)雷帕霉素。雷帕霉素衍生物的进一步实例例如包括 CCI779 或 40-[3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸酯(propanoate)]雷帕霉素或其药学上可接受的盐，如 USP 5,362,718 中所公开；ABT578 或 40-(四唑基)雷帕霉素，特别是 40-表-(四唑基)雷帕霉素，例如公开在 WO 99/15530 中；或者雷帕霉素类似物(rapalog)，例如公开在 WO 98/02441 和 WO 01/14387 中，例如 AP 23573。

若式 I 化合物与其他免疫抑制性/免疫调控性、抗炎或化学治疗疗法联合施用，则共同施用的免疫抑制性、免疫调控性、抗炎或化学治疗化合物的剂量当然将依赖于所采用的共同药物类型(例如它是类固醇还是钙调磷酸酶抑制剂)、所采用的具体药物、所治疗的病症等而各不相同。

按照上述，本发明在更进一步的方面提供:

5. 如上所定义的方法，包括共同施用、例如同时或相继施用治疗有效无毒量的式 I 化合物与至少一种第二药物物质，例如免疫抑制性、免疫调控性、抗炎或化学治疗药，例如如上所示。

6. 药物组合，例如药盒，包含 a)第一活性剂，它是如本文所公开的游离形式或药学上可接受的盐形式的式 I 化合物，和 b)至少一种活性助剂，例如免疫抑制性、免疫调控性、抗炎或化学治疗药，例如如上所公开。该

药盒可以包含其使用说明书。

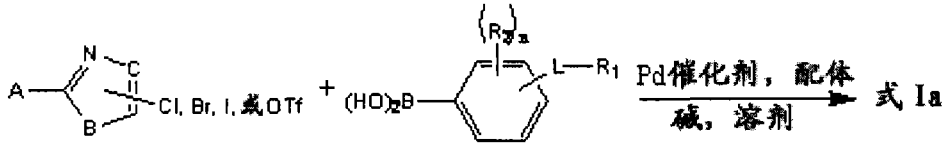
本文所用的术语“共同施用”或“联合施用”等表示涵盖所选择的治疗剂对单一患者的施用，应包括这样的治疗方案，其中各活性剂不必借助相同施用途径或者在相同时间施用。

本文所用的术语“药物组合”表示这样一种产品，它由混合或合并一种以上活性成分而得到，包括活性成分的固定与非固定组合。术语“固定组合”意味着活性成分、例如式 I 化合物和活性助剂都是以单一实体或剂量形式同时对患者施用。术语“非固定组合”意味着活性成分、例如式 I 化合物和活性助剂都是作为独立实体同时、并行或没有特定的时间限制相继对患者施用，其中这类施用在患者体内提供治疗有效水平的 2 种化合物。后者也适用于鸡尾酒疗法，例如施用 3 种或 3 种以上活性成分。

制备本发明化合物的方法

本发明也包括制备本发明免疫调控性化合物的方法。在所述反应中，若反应性官能团是终产物中所需的，可能有必要进行保护，例如羟基、氨基、亚氨基、硫代基或羧基，以避免它们不可取地参与反应。可以按照标准实践使用常规保护基团，例如参见 T.W. Greene 和 P. G. M. Wuts, “有机化学中的保护基”，John Wiley 和 Sons, 1991。

式 Ia 的化合物可以如下列反应方案进行制备:



式 2 式 3

其中 A、B、C、R_1、R_2、L 和 n 如发明概述中所定义。式 Ia 化合物可如下制备：在合适的溶剂(例如四氢呋喃等)、合适的碱(例如氟化钾、碳酸钠等)、合适的催化剂(乙酸钯等)和合适的配体(三苯膦等)存在下使式 2 化合物与式 3 化合物反应。该反应在约 0℃ – 约 150℃的温度进行并且可能需要约 48 小时完成。

式 Ib 化合物可以通过实施类似反应方案制备。

制备本发明化合物的另外方法:

通过使化合物的游离碱形式与药学上可接受的无机或有机酸反应，可以将本发明化合物制成药学上可接受的酸加成盐。作为替代选择，本发明化合物的药学上可接受的碱加成盐可以通过使化合物的游离酸形式与药学上可接受的无机或有机碱反应而制备。作为替代选择，可以使用原料或中间体的盐制备本发明化合物的盐形式。

本发明化合物的游离酸或游离碱形式可以分别从对应的碱加成盐或酸加成盐形式制备。例如，通过用适合的碱(例如氢氧化铵溶液、氢氧化钠等)处理，可以将酸加成盐形式的本发明化合物转化为对应的游离碱。通过用适合的酸(例如盐酸等)处理，可以将碱加成盐形式的本发明化合物转化为对应的游离酸。

未氧化形式的本发明化合物可以由本发明化合物的 N-氧化物通过用还原剂(例如硫、二氧化硫、三苯膦、硼氢化锂、硼氢化钠、三氯化磷、三溴化磷等)在适合的惰性有机溶剂(例如乙腈、乙醇、含水二噁烷等)中在 0 至 80°C 处理而制备。

本发明化合物的前体药物衍生物可以借助本领域普通技术人员已知的方法制备(例如关于进一步的细节，参见 Saulnier 等, (1994), Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 第 4 卷, p. 1985)。例如，适当的前体药物可以通过使本发明的非衍生化合物与适合的氨甲酰化试剂(例如 1,1-酰氧基烷基碳酰氯(carbanochloridate)、对-硝基苯基碳酸酯等)反应而制备。

本发明化合物的被保护衍生物可以借助本领域普通技术人员已知的手段制备。可用于创建保护基团及其除去的技术的详细说明可以参见 T W. Greene, "有机化学中的保护基"，第 3 版, John Wiley 和 Sons, Inc., 1999。

本发明化合物可以适宜地在本发明方法期间被制成或生成溶剂合物(例如水合物)。本发明化合物的水合物可以适宜地通过使用有机溶剂如二氧芑、四氢呋喃或甲醇从水/有机溶剂混合物中重结晶而制备。

通过使化合物的外消旋混合物与旋光活性拆分剂反应，生成一对非对映异构化合物，分离非对映体，回收光学纯的对映体，可以将本发明化合物制成它们的个别立体异构体。尽管对映体的拆分可以使用本发明化合物的共价非对映体衍生物进行，不过可离解的配合物是优选的(例如结晶性非对映体盐)。非对映体具有不同的物理性质(例如熔点、沸点、溶解度、反应性等)，可以利用这些相异性容易地分离。非对映体可以借助色谱法分离，或者优选借助基于溶解度差异的分离/拆分技术分离。然后借助任意不会导致外消旋化的实用手段回收光学纯的对映体以及拆分剂。可用于从其外消旋混合物拆分化合物立体异构体的技术的更详细说明可以参见 **Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, “对映体、外消旋物及拆分”，John Wiley 和 Sons, Inc., 1981。**

总之，式 I 化合物可以借助涉及以下的方法制备:

(a) 使式 2 化合物和式 3 化合物反应；和

(b) 任选地将本发明化合物转化为药学上可接受的盐;

(c) 任选地将本发明化合物的盐形式转化为非盐形式;

(d) 任选地将本发明化合物的未氧化形式转化为药学上可接受的 N-氧化物;

(e) 任选地将本发明化合物的 N-氧化物形式转化为其未氧化形式;

(f) 任选地从异构体混合物拆分本发明化合物的个别异构体;

(g) 任选地将非衍生化的本发明化合物转化为药学上可接受的前体药物衍生物；和

(h) 任选地将本发明化合物的前体药物衍生物转化为其非衍生化形式。

在没有确切描述原料制备的情形中，这些化合物是已知的或者可以类似于本领域已知的方法或如下文实施例所公开加以制备。

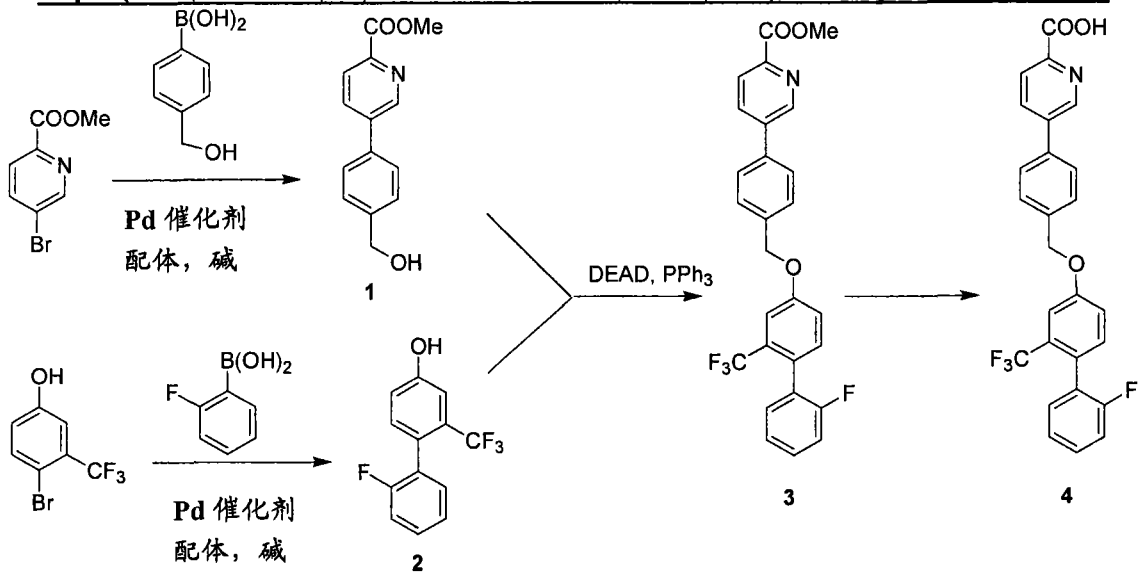
本领域技术人员将领会到，上述转化作用仅仅是本发明化合物制备方法的代表，可以类似地采用其他熟知的方法。

实施例

下列实施例提供制备代表性化合物的详细说明，供阐述但不限制本发明。

实施例 1

5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸



步骤 1: 向包含 5-溴吡啶甲酸甲酯(0.50g, 2.3mmol)、4-(羟甲基)苯基代硼酸(0.53g, 3.5mmol)、乙酸钯(52mg, 0.23mmol)、2-(二环己基膦基)联苯(0.16g, 0.46mmol)和氟化钾(0.40g, 6.9mmol)的圆底烧瓶中加入无水 1,4-二噁烷(10ml)。用氩气净化烧瓶并且密封。将该混合物在 130°C 搅拌 4 小时，冷却至环境温度，然后加入水(20ml)。用 EtOAc(20ml x 2)萃取该混合物，用 $MgSO_4$ 干燥，浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化残余物(EtOAc/己烷，梯度)，得到 5-(4-羟甲基-苯基)-吡啶-2-甲酸甲酯 1: ^{1}H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 9.04(d, 1 H, J=2.4Hz), 8.27(dd, 1H, J_1=2.4Hz, J_2=8.8Hz), 8.13(d, 1H, J=8.8Hz), 7.78(d, 2H, J=8.8Hz), 7.48(d, 2 H, J=8.8Hz), 5.32(t, 1 H, J=6.4Hz), 4.57(d, 2 H, J=6.4Hz), 3.09(s, 3 H); LC-MS *m/z*: 244.1(M+1)。

步骤 2: 向包含 4-溴-3-三氟甲基-苯酚(0.50g, 2.1mmol)、2-氟苯基代硼酸(0.58g, 4.2mmol)和 $PdCl_2(PPh_3)_2$(0.44g, 0.62mmol)的微波管中加入 2N Na_2CO_3 溶液(7.5ml)和 THF(7.5ml)。用氩气净化该管并且密封。将该反应物在 130°C 于 *Personal* Chemistry 微波中加热 1 小时。将该混合物冷却至环境温度，此后加入水(20ml)。用 EtOAc(20ml x 2)萃取该混合物，用 $MgSO_4$

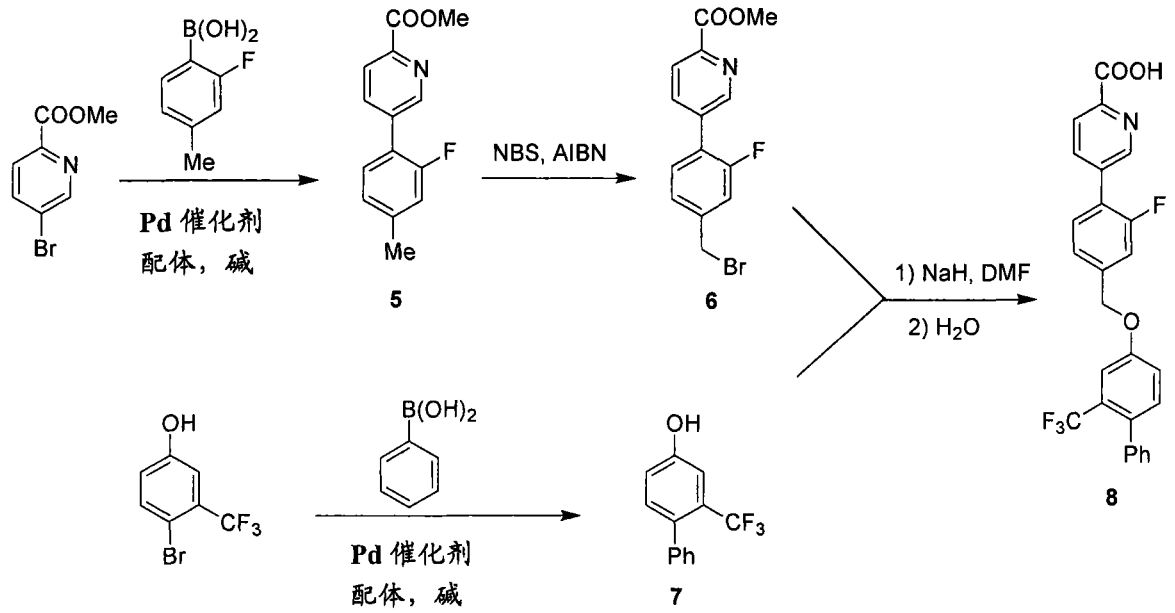
干燥，浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化残余物(EtOAc/己烷，梯度)，得到 2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-醇 2: ^{1}H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 10.3(s, 1 H), 7.45(m, 1 H), 7.23(m, 5 H), 7.08(m, 1 H); GC-MS *m/z*: 256。

步骤 3: 向 0°C、氩气氛下的 5-(4-羟甲基-苯基)-吡啶-2-甲酸甲酯 1(70mg, 0.29mmol)、2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-醇 2(81mg, 0.32mmol)和 PPh_3(113mg, 0.43mmol)在无水 THF(3ml)中的溶液中加入偶氮二甲酸二乙酯(100mg, 0.58mmol)。然后将该混合物温至室温并搅拌 12 小时。除去溶剂，通过硅胶柱色谱法纯化残余物(EtOAc/己烷，梯度)，得到 5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸甲酯 3，其中污染有三苯膦氧化物。其不经进一步纯化用于下一步: LC-MS *m/z*: 482.2(M+1)。

步骤 4: 向上述获得的 5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸甲酯 3 在 THF-H_2O(1:1 混合物，4ml)中的溶液中加入 NaOH(200mg)。将该反应物在室温搅拌 12 小时，然后用三氟乙酸酸化。浓缩该反应物并溶于 DMSO。将其通过制备型质量触发的 HPLC(C_{18}柱，用包含 0.05% TFA 的 CH_3CN-H_2O 洗脱)纯化，得到 5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸 4: ^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 9.06(s, 1 H), 8.32(d, 1 H, J=8.0Hz), 8.14(d, 1 H, J=8.0Hz), 7.88(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.68(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.47(m, 2 H), 7.38(m, 2 H), 7.28(m, 3 H), 5.35(s, 2 H); LC-MS *m/z* 468.2(M+1)。

实施例 2

5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸



步骤 1: 向包含 5-溴吡啶甲酸甲酯(0.50g, 2.3mmol)、(2-氟-4-甲基苯基)代硼酸(0.53g, 3.5mmol)、乙酸钯(52mg, 0.23mmol)、2-(二环己基膦基)联苯(0.16g, 0.46mmol)和氟化钾(0.40g, 6.9mmol)的圆底烧瓶中加入无水 1,4-二噁烷(10ml)。用氩气净化烧瓶并且密封。将该混合物在 130°C 搅拌 4 小时，然后冷却至环境温度，此后加入水(20ml)。用 EtOAc(20ml x 2)萃取该混合物，用 $MgSO_4$ 干燥，浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化残余物(EtOAc/己烷，梯度)，得到 5-(2-氟-4-甲基-苯基)-吡啶-2-甲酸甲酯 5(0.36g, 产率 63%): ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8.88(s, 1 H), 8.15(m, 2 H), 7.57(t, 1 H, J=8.0Hz), 7.24 (d, 1 H, J=11.6Hz), 7.20(d, 1 H, J=8.0Hz), 3.91(s, 3 H), 2.39(s, 3 H); LC-MS *m/z*: 246.0(M+1)。

步骤 2: 将 5-(2-氟-4-甲基-苯基)-吡啶-2-甲酸甲酯 5(0.20g, 0.82mmol)、N-溴琥珀酰亚胺(0.17g, 0.98mmol)和 2,2'-偶氮二异丁腈(40mg, 0.24mmol)在 CCl_4(7ml)中的溶液回流 4 小时。浓缩该反应物，通过硅胶柱色谱法纯化残余物(EtOAc/己烷，梯度)，得到 5-(4-溴甲基-2-氟-苯基)-吡啶-2-甲酸甲酯 6: ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8.92(s, 1 H), 8.17(m, 2 H), 7.69(t, 1 H, J=8.0Hz), 7.53 (d, 1 H, J=12Hz), 7.40(d, 1 H, J=8.0Hz), 4.78(s, 2 H), 3.91(s, 3 H); LC-MS *m/z*: 323.9(M+1)。

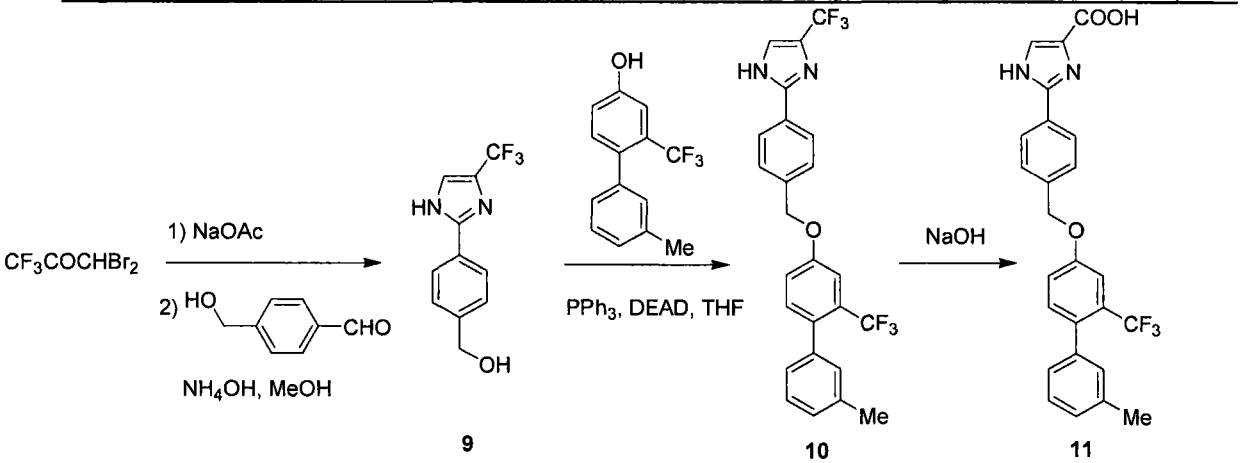
步骤 3: 使用实施例 1 步骤 2 中所述的方法使 4-溴-3-三氟甲基-苯酚、苯基代硼酸反应，通过硅胶柱色谱法纯化(EtOAc/己烷，梯度)后，得到 2-

三氟甲基-联苯-4-醇 7: ^{1}H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 10.2(s, 1 H), 7.38(m, 3 H), 7.25(m, 2 H), 7.19(d, 1 H, J=8.8Hz), 7.14(d, 1 H, J=2.4Hz), 7.06(dd, 1 H, J_1=2.4Hz, J_2=8.8Hz); GC-MS *m/z*: 238。

步骤 4: 向 2-三氟甲基-联苯-4-醇 7(45mg, 0.19mmol)在无水 DMF(2ml)中的溶液中加入 NaH(60%矿物油分散液, 13mg, 0.32mmol)。搅拌 10 分钟后，加入 5-(4-溴甲基-2-氟-苯基)-吡啶-2-甲酸甲酯 6 在 DMF(1ml)中的溶液。将该反应物在室温搅拌 12 小时，然后用三氟乙酸酸化。浓缩该反应物并溶于 DMSO。通过制备型质量触发的 HPLC 纯化(C_{18}柱，用包含 0.05% TFA 的 CH_3CN-H_2O 洗脱)，得到 5-[2-氟-4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸 8(28mg，产率 39%): ^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 8.91(s, 1H), 8.22(d, 1 H, J=7.6Hz), 8.16(d, 1 H, J=8.0Hz), 7.74(t, 1 H, J=8.8Hz), 7.54(d, 1 H, J=10.8Hz), 7.51(d, 1 H, J=7.6Hz), 7.41(m, 6 H), 7.28(d, 2 H, J=7.6Hz), 5.35(s, 2 H); LC-MS *m/z* 468.0(M+1)。

实施例 3

2-[4-(3'-甲基-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1H-咪唑-4-甲酸



步骤 1: 向 NaOAc·3H_2O(0.66g, 2.4mmol)在 H_2O(2.2ml)中的溶液中加入 1,1,1-三氟-3,3-二溴丙酮(0.66g, 4.8mmol)。搅拌该混合物，在 115°C 油浴中加热 30 分钟。冷却至室温后，将该溶液加入到 4-羟甲基-苯甲醛(0.30g, 2.2mmol)在含有浓氢氧化铵(2.8ml)的甲醇(11ml)中的溶液中。将该混合物搅拌 5 小时，然后浓缩。向残余物中加入水，用乙酸乙酯萃取该混合物。

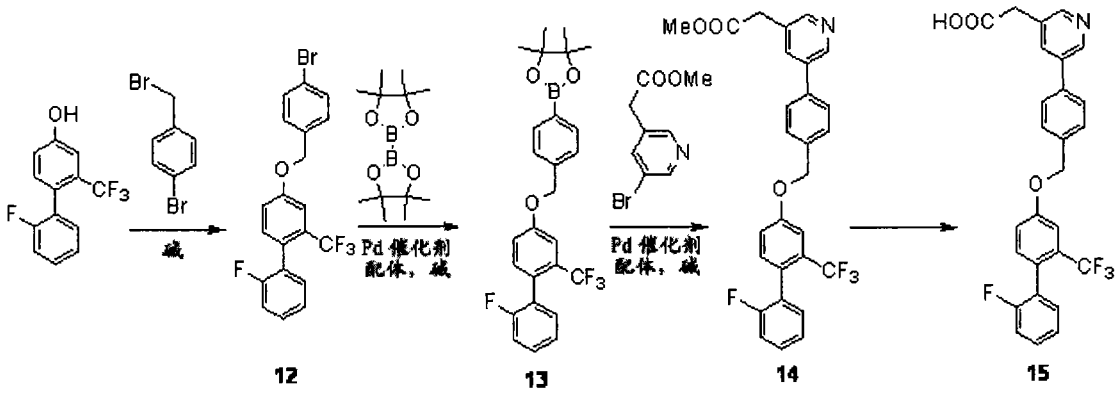
合并乙酸乙酯层并且干燥。除去溶剂后，获得[4-(4-三氟甲基-1H-咪唑-2-基)-苯基]-甲醇 9: ^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 13.1(s, 1 H), 7.92(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.90(s, 1 H), 7.42(d, 2 H, J=8.0Hz), 5.28(t, 1 H, J=6.0Hz), 4.54(d, 2 H, J=6.0Hz); LC-MS *m/z* 243.0(M+1)。

步骤 2: 向 0°C、氩气氛下的[4-(4-三氟甲基-1H-咪唑-2-基)-苯基]-甲醇 9(50mg, 0.21mmol)、3'-甲基-2-三氟甲基-联苯-4-醇(0.10g, 0.41mmol)和 PPh_3(108mg, 0.41mmol)在无水 THF(3ml)中的溶液中加入偶氮二甲酸二乙酯(72mg, 0.41mmol)。然后将该混合物温至室温并搅拌 12 小时。除去溶剂，通过制备型质量触发的 HPLC 纯化残余物(C_{18}柱，用包含 0.05% TFA 的 CH_3CN-H_2O 洗脱)，得到 2-[4-(3'-甲基-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-4-三氟甲基-1H-咪唑 10: ^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 8.02(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.93(s, 1 H), 7.61(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.41(d, 1 H, J=3.6Hz), 7.32(m, 3 H), 7.20(d, 1 H, J=6.8Hz), 7.09(s, 1 H), 7.06(d, 1 H, J=8.0Hz), 5.29(s, 2 H), 2.33(s, 3 H); LC-MS *m/z*: 476.2(M+1)。

步骤 3: 将 2-[4-(3'-甲基-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-4-三氟甲基-1H-咪唑 10(40mg, 0.084mmol)在 1.5 N NaOH 水溶液(2ml)中的混悬液在 95°C 加热 24 小时。将其冷却至室温，用三氟乙酸酸化。浓缩该溶液并溶于 DMSO。通过制备型质量触发的 HPLC 纯化(C_{18}柱，用包含 0.05% TFA 的 CH_3CN-H_2O 洗脱)，得到 2-[4-(3'-甲基-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1H-咪唑-4-甲酸 11(9.2mg,产率 24%): ^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 8.16(s, 1 H), 8.15(d, 2H, J=8.0Hz), 7.68(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.41(d, 1H, J=3.6Hz), 7.33(m, 4H), 7.20(d, 1H, J=8.0Hz), 7.09(s, 1 H), 7.06(d, 1H, J=7.6Hz), 5.33(s, 2H), 2.33(s, 3H); LC-MS *m/z* 453.1(M+1)。

实施例 4

{5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸



步骤 1：将 2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-醇 2(0.40g, 1.6mmol)在无水 DMF(10ml)中的溶液冷却至 0°C。向该溶液中加入 NaH(60%矿物油分散液, 0.19mg, 4.7mmol)。搅拌 10 分钟后，加入 1-溴-4-溴甲基-苯在 DMF(1ml)中的溶液。然后将该反应物温至室温并搅拌 12 小时。用饱和 NH_4Cl(20ml)猝灭，用乙酸乙酯(10ml x 2)萃取。合并乙酸乙酯层，干燥，通过硅胶柱色谱法纯化(EtOAc/己烷, 梯度)，得到 4-(4-溴-苄氧基)-2'-氟-2-三氟甲基-联苯 12: ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ ^1H NMR(DMSO-d_6) δ 7.62(d, 2H, J=8.0Hz), 7.47(s, 1H), 7.46(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.43(m, 1H), 7.19(m, 2H), 7.28(m, 3H), 5.24(s, 2H); LC-MS *m/z* 424.9(M+1)。

步骤 2：用氩气净化 4-(4-溴-苄氧基)-2'-氟-2-三氟甲基-联苯 12(0.10g, 0.24mmol)、双(频哪醇)二硼(66mg, 0.26mmol)、$PdCl_2(dppf)\cdot CH_2Cl_2$(10mg, 0.012mmol)和乙酸钾(69mg, 0.71mmol)在无水 DMSO(1ml)中的溶液并且密封。将其在 80°C 加热 12 小时。冷却至室温后，加入水(10ml)。用乙酸乙酯(10ml x 2)萃取。合并乙酸乙酯层，干燥，通过硅胶柱色谱法(EtOAc/己烷, 梯度)纯化，得到 2-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧硼杂环戊烷 13: ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ ^1H NMR(DMSO-d_6) δ 7.72(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.51(s, 1 H), 7.48(d, 2H, J=8.0Hz), 7.45(m, 1 H), 7.35(m, 2 H), 7.27(m, 3 H), 5.30(s, 2 H), 1.30(s, 6 H); LC-MS *m/z* 473.2(M+1)。

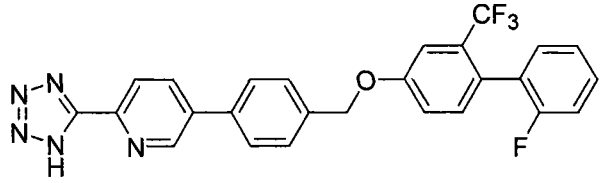
步骤 3：向包含(5-溴-吡啶-3-基)-乙酸甲酯(40mg, 0.17mmol)、2-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧硼杂环戊烷 13(80mg, 0.17mmol)、乙酸钯(6mg, 0.026mmol)、2-(二环己基膦基)联

苯(18mg, 0.051mmol)和氟化钾(30mg, 0.051mmol)的圆底烧瓶中加入无水1,4-二噁烷(2ml)。用氩气净化烧瓶并密封。将该混合物在130°C搅拌12小时，然后冷却至环境温度，此后加入水(5ml)。用EtOAc(10ml x 2)萃取该混合物，用$MgSO_4$干燥，浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化残余物(EtOAc/己烷，梯度)，，得到{5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸甲酯14: LC-MS *m/z*: 496.0(M+1)。

步骤4: 向上述获得的{5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸甲酯14(35mg, 0.070mmol)在THF-H_2O(1:1混合物, 5ml)中的溶液中加入NaOH(40mg, 1.0mmol)。将该反应物在室温搅拌12小时，然后用三氟乙酸酸化。浓缩该反应物并溶于DMSO。通过制备型质量触发的HPLC纯化(C_{18}柱，用包含0.05% TFA的CH_3CN-H_2O洗脱)，得到{5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-3-基}-乙酸15: ^1H NMR(DMSO-d_6) δ 9.11(s, 1 H), 8.78(s, 1H), 8.64(s, 1H), 7.89(d, 2H, J=8.0Hz), 7.69(d, 2H, J=8.0Hz), 7.47(m, 2H), 7.38(m, 2 H), 7.28(m, 3H), 5.36(s, 2H), 3.93(s, 2H); LC-MS *m/z* 482.1(M+1)。

实施例5

5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-2-(1H-四唑-5-基)-吡啶

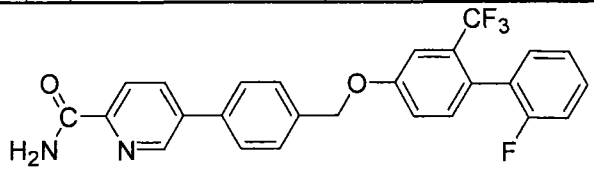


将5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-腈(84mg, 0.19mmol)、NH_4Cl(30mg, 0.56mmol)和NaN_3(18mg, 0.28mmol)在DMF(1ml)中的溶液在120°C搅拌3小时。然后浓缩该溶液，通过制备型质量触发的HPLC纯化(C_{18}柱，用包含0.05% TFA的CH_3CN-H_2O洗脱)，得到5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-2-(1H-四唑-5-基)-吡啶: ^1H NMR(DMSO-d_6) δ 9.14(s, 1 H), 8.41(dd, 1 H, J_1=8.8Hz, J_2=1.6Hz), 8.31(d, 1 H, J=7.6Hz), 7.92(d, 2 H, J=8.4Hz), 7.68(d, 2 H, J=8.4Hz), 7.47(m, 2 H),

7.38(m, 2 H), 7.27(m, 3 H), 5.36(s, 2 H); LC-MS *m/z* 492.0(M+1)。

实施例 6

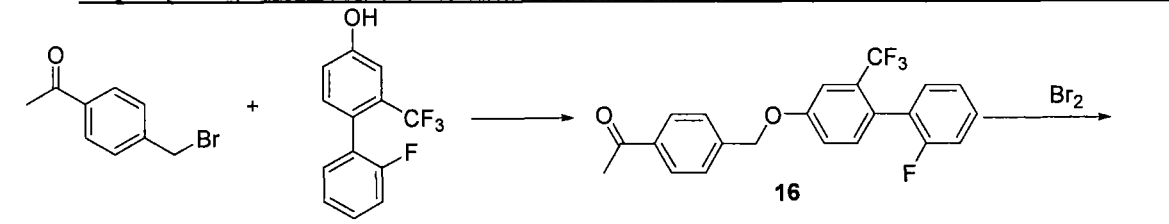
5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酰胺

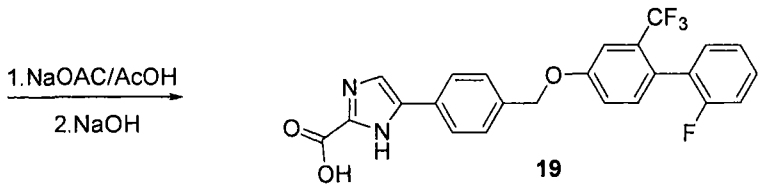


向 0°C、搅拌的 5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-腈(25mg, 0.056mmol)在 DMSO(0.5ml)中的溶液中加入 30% H_2O_2(18μl)和无水 K_2CO_3(10mg)。将该溶液搅拌 4 小时。除去固体，通过制备型质量触发的 HPLC 纯化(C_{18}柱，用包含 0.05% TFA 的 CH_3CN-H_2O 洗脱)后，获得产物：^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 8.96(d, 1 H, J=2.4Hz), 8.29(dd, 1 H, J_1=8.8Hz, J_2=1.6Hz), 8.16(s, 1 H), 8.13(d, 1 H, J=7.2Hz), 7.86(d, 2 H, J=7.6Hz), 7.69(s, 1 H), 7.66(d, 2 H, J=7.6Hz), 7.47(m, 2 H), 7.38(m, 2 H), 7.28(m, 3 H), 5.34(s, 2 H); LC-MS *m/z* 467.0(M+1)。

实施例 7

5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1*H*-咪唑-2-甲酸





步骤 1：向 2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-醇(1.55g, 6.05mmol)和

K_2CO_3(1.30g, 12.1mmol)在无水 DMF(15ml)中的混合物中加入 1-(4-溴甲基-苯基)-乙酮(1.29g, 6.05mmol)在无水 DMF(6ml)中的溶液。然后将所得混合物在氮气氛下、室温搅拌 12 小时。然后向该混合物中加入水(30ml)。用乙酸乙酯(80ml x 3)萃取。合并有机层，用盐水(50ml)洗涤，用 $MgSO_4$ 干燥，浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化(EtOAc/己烷, 梯度)，得到 1-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-乙酮 16: ^1H NMR 400MHz($CDCl_3$) δ 8.01(m, 2 H), 7.56(d, 2 H, J=8.4Hz), 7.36(m, 2 H), 7.25(m, 3 H), 7.14(m, 3 H), 5.20(s, 2 H), 2.63(s, 3 H); MS *m/z* 389.1(M + 1), 411.1(M+Na)。

步骤 2: 将 1-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-乙酮(16, 723mg, 1.86mmol)溶于乙酸(4ml)。按照滴加方式加入 Br_2(86μl, 1.67mmol)在 AcOH(1ml)中的溶液。然后将该混合物搅拌 4 小时。此后将整个混合物倾入水(50ml)中，加入固体碳酸氢钠以中和至 pH 7。用乙酸乙酯(3 x 60ml)萃取该混合物。合并有机层，用盐水(30ml)洗涤，用 $MgSO_4$ 干燥，浓缩，通过硅胶柱色谱法纯化(己烷:乙酸乙酯=10:1)，得到 2-溴-1[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]乙酮 17: ^1H NMR 400MHz($CDCl_3$) δ 8.05(m, 2 H), 7.61(d, 2 H), 7.37(m, 2 H), 7.26(m, 3 H), 7.15(m, 3 H), 5.23(s, 2 H), 4.24(s, 2 H); MS *m/z* 467.0(M + 1), 489.0(M+Na)。

步骤 3: 在室温向六亚甲基四胺(252mg, 1.8mmol)在氯仿(5ml)中的溶液中滴加 2-溴-1-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-乙酮 17(700mg, 1.5mmol)在氯仿(5ml)中的溶液。然后将该混合物搅拌 12 小时。此后在真空中除去溶剂。向残余物中加入己烷/氯仿混合物(1:1, 5ml)。过滤该混悬液，收集固体产物，干燥。然后将该固体产物溶于甲醇(10ml)，加入浓盐酸(0.68ml)。将该混合物在室温搅拌 2 小时。通过蒸发使混合物体积降至 5ml。过滤除去白色固体，浓缩获得的溶液。由此获得的粗化合物 8 不经进一步纯化用于下一步。LC-MS m/z: 404.2(M+1)。

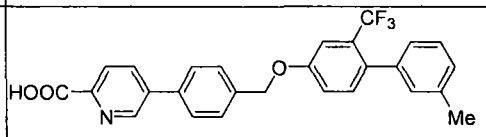
步骤 4: 在室温历经 5 分钟向氮气氛下的 2-硫代草氨酸乙基酯(66mg)在二氯甲烷(5ml)中的溶液中滴加三乙基氧鎓四氟硼酸盐在二氯甲烷(0.75ml)中的 1.0 M 溶液。此后将该混合物搅拌 2 小时。此后在减压下蒸出

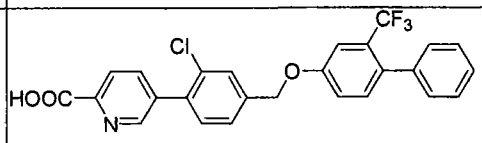
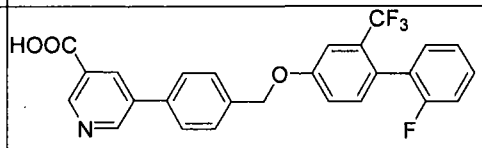
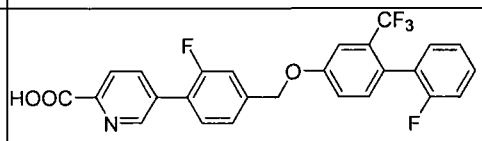
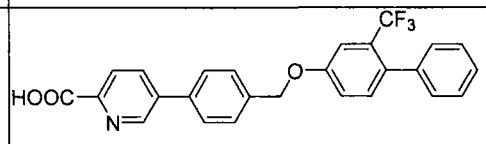
二氯甲烷，将残余物与乙酸(3ml)、乙酸钠(81mg)和来自上述步骤的粗产物(400mg)混合。使该混合物在 96°C 反应 3 小时。冷却至室温后，过滤除去无机盐，浓缩滤液，然后通过硅胶色谱法纯化残余物(CH_2Cl_2/乙酸乙酯=10/1)，得到纯产物 5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-1*H*-咪唑-2-甲酸乙酯(18)。

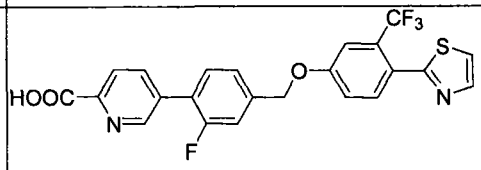
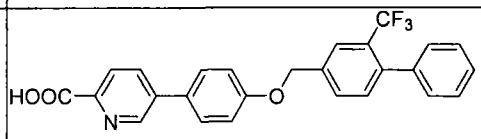
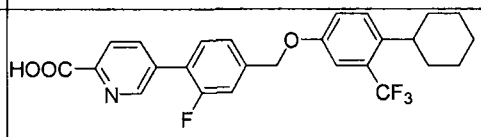
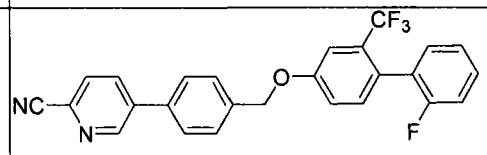
步骤 5: 向上述获得的化合物(18, 58mg)在 1,4-二噁烷(2ml)中的溶液中加入 1N NaOH 溶液(1.0ml)。然后将该混合物在 60°C 搅拌 5 小时。冷却至室温后，加入三氟乙酸(0.5ml)。然后浓缩该混合物，将所得残余物溶于 DMSO，通过制备型质量触发的 HPLC 纯化(C_{18} 柱，用包含 0.05% TFA 的 CH_3CN-H_2O 洗脱)，得到所需产物 19: 1H NMR 400MHz(DMSO-d6) δ 7.89(m, 3 H), 7.52(m, 2 H), 7.47(m, 2 H), 7.38(m, 2 H), 7.27(m, 3 H), 5.26(s, 2 H); MS *m/z* 457.1(M + 1)。

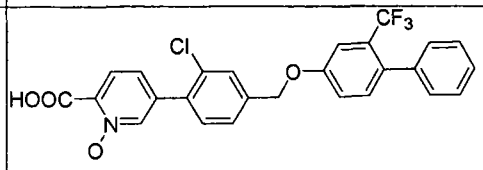
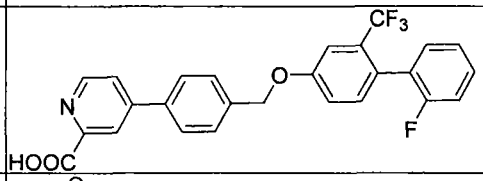
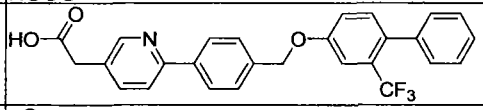
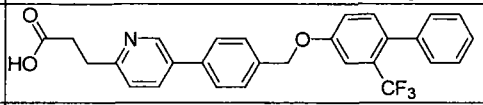
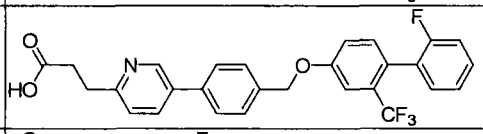
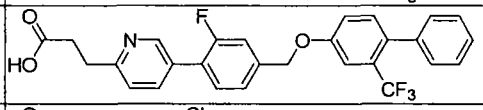
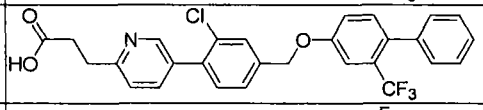
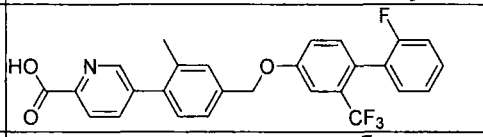
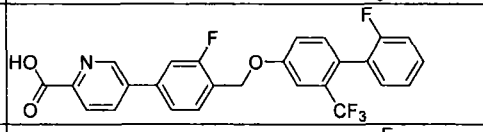
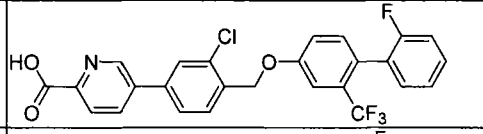
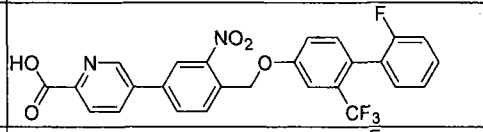
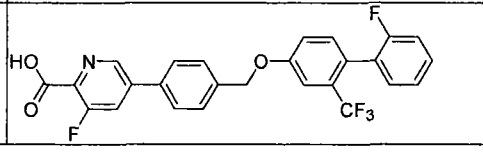
通过重复上述实施例中所述的操作步骤，使用适当的原料，获得下列表 1 中鉴定的式 I 化合物。

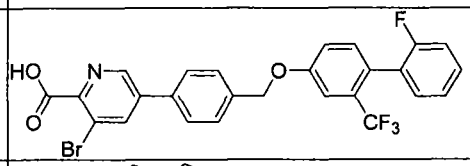
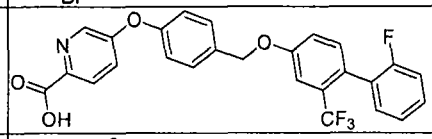
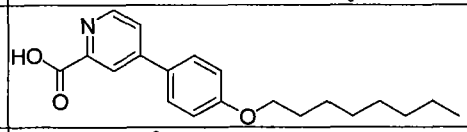
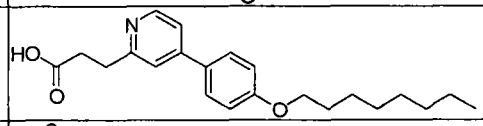
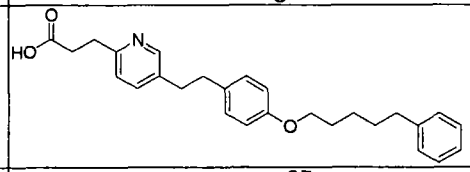
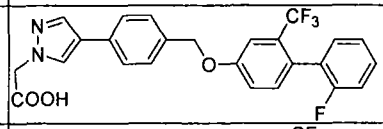
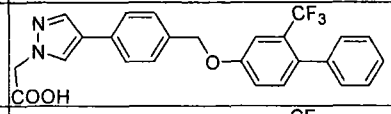
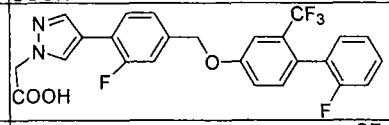
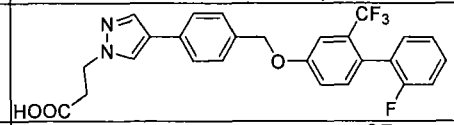
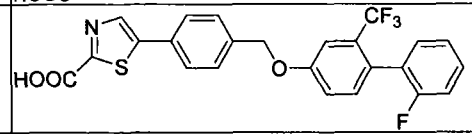
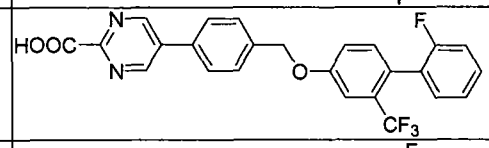
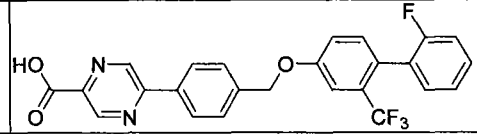
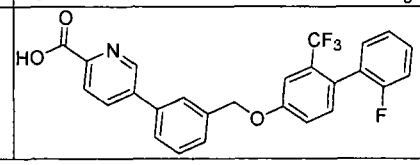
表 1

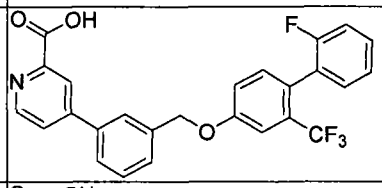
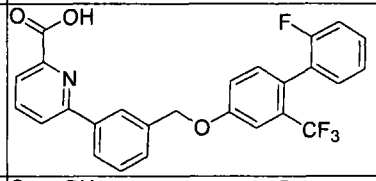
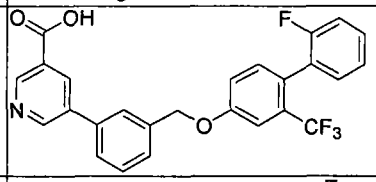
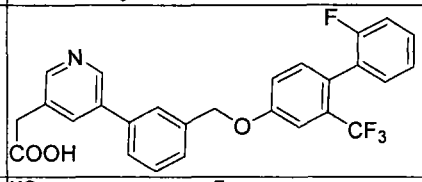
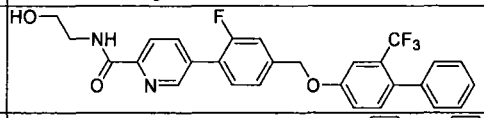
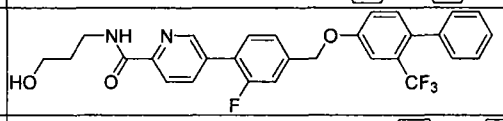
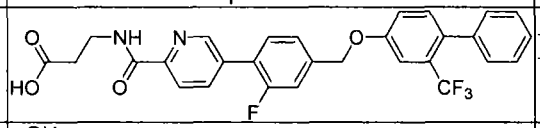
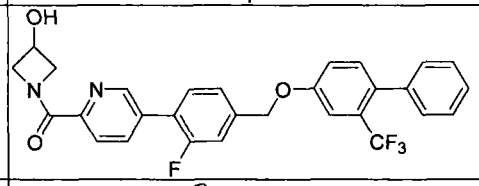
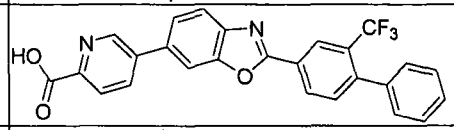
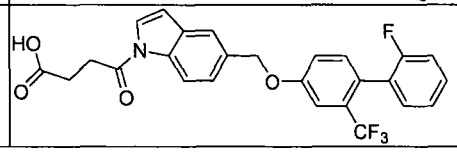
实施例	结构	物理数据
8		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 9.05(s, 1 H), 8.30(d, 1 H, J=7.6Hz), 8.13(d, 1 H, J=7.6Hz), 7.89(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.66(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.42(d, 1 H, J=2.4Hz), 7.33(m, 3 H), 7.20(d, 1 H, J=7.6Hz), 7.09(s, 1 H), 7.06(d, 1 H, 7.6Hz), 5.33(s, 2 H), 2.33(s, 3 H); LC-MS *m/z* 464.1(M+1).

实施例	结构	物理数据
9		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 8.79(s, 1 H), 8.15(d, 1 H, J=7.2Hz), 8.13(d, 1 H, J=7.2Hz), 7.79(s, 1H), 7.60(m, 2 H), 7.41(m, 6H), 7.29(d, 2H, J=7.2Hz), 5.34(s, 2 H); LC-MS *m/z* 484.0(M+1).
10		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 9.20(s, 1 H), 9.10(s, 1 H), 8.57(s, 1 H), 7.84(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.66(d, 2H, J=8.0Hz), 7.46(m, 2 H), 7.38(m, 2 H), 7.27(m, 3 H), 5.34(s, 2H); LC-MS *m/z* 468.0(M+1).
11		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 8.91(s, 1 H), 8.20(d, 1 H, J=8.8Hz), 8.16(d, 1 H, J=8.8Hz), 7.74(t, 1H, J=8.0Hz), 7.52(m, 4 H), 7.39(m, 2H), 7.28(m, 3 H), 5.36(s, 2H); LC-MS *m/z* 486.0(M+1).
12		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 9.06(s, 1 H), 8.29(d, 1 H, J=8.0Hz), 8.13(d, 1 H, J=8.0Hz), 7.88(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.66(d, 2 H, J=8.0Hz), 7.40(m, 7 H), 7.27(d, 2 H, J=8.0Hz), 5.34(s, 2 H); LC-MS *m/z* 450.1(M+1).

实施例	结构	物理数据
13		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 8.91(s, 1 H), 8.21(d, 1 H, J=8.0Hz), 8.16(d, 1 H, J=8.0Hz), 7.95(d, 1 H, J=3.2Hz), 7.90(d, 1 H, J=3.2Hz), 7.75(d, 1 H, J=8.0Hz), 7.71(d, 1 H, J=9.6Hz), 7.54(m, 4 H), 5.39(s, 2 H); LC-MS *m/z* 475.0(M+1).
14		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 9.01(s, 1 H), 8.24(d, 1 H, J=8.0Hz), 8.09(d, 1 H, J=8.0Hz), 7.95(s, 1 H), 7.81(m, 3 H), 7.44(m, 4 H), 7.33(m, 2 H), 7.22(d, 2 H, J=8.8Hz), 5.35(s, 2 H); LC-MS *m/z* 450.1(M+1).
15		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 8.90(s, 1 H), 8.19(d, 1 H, J=8.8Hz), 8.16(d, 1 H, J=8.0Hz), 7.72(t, 1 H, J=8.0Hz), 7.50(m, 3H), 7.30(d, 1H, J=8.0Hz), 7.26(s, 1 H), 5.26(s, 2 H), 2.74(m, 1 H), 1.77(m, 2 H), 1.67(m, 3 H), 1.48(m, 2 H), 1.30(m, 3 H); LC-MS *m/z* 474.1(M+1).
16		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 9.14(s, 1 H), 8.39(dd, 1H, J_1=8.0Hz, J_2=2.4Hz), 8.15(d, 1H, J=8.8Hz), 7.91(d, 2 H, J=7.6Hz), 7.68(d, 2 H, J=7.6Hz), 7.47(m, 2H), 7.38(m, 2 H), 7.28(m, 3H), 5.35(s, 2H); LC-MS *m/z* 449.0(M+1).

实施例	结构	物理数据
17		^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 9.00(s, 1 H), 8.38(d, 1 H, J=7.6Hz), 8.05(d, 1 H, J=8.0Hz), 7.82(s, 1H), 7.64(s, 2 H), 7.41(m, 6H), 7.28(d, 2H, J=8.0Hz), 5.35(s, 2H) ; LC-MS *m/z* 500.0(M+1).
18		LC-MS *m/z* 468.0 (M+1).
19		LC-MS *m/z* 464.1 (M+1).
20		LC-MS *m/z* 478.1 (M+1).
21		LC-MS *m/z* 496.1 (M+1).
22		LC-MS *m/z* 496.1 (M+1).
23		LC-MS *m/z* 512.1 (M+1).
24		LC-MS *m/z* 482.1 (M+1).
25		LC-MS *m/z* 486.1 (M+1).
26		LC-MS *m/z* 502.1 (M+1).
27		LC-MS *m/z* 513.1 (M+1).
28		LC-MS *m/z* 486.1 (M+1).

实施例	结构	物理数据
29		LC-MS *m/z* 546.0 (M+1).
30		LC-MS *m/z* 484.1 (M+1).
31		LC-MS *m/z* 328.2 (M+1).
32		LC-MS *m/z* 356.2 (M+1).
33		LC-MS *m/z* 418.2 (M+1).
34		LC-MS *m/z* 471.1 (M+1).
35		LC-MS *m/z* 453.1 (M+1).
36		LC-MS *m/z* 489.1 (M+1).
37		LC-MS *m/z* 485.1 (M+1).
38		LC-MS *m/z* 474.1 (M+1).
39		LC-MS *m/z* 469.1 (M+1).
40		LC-MS *m/z* 469.1 (M+1).
41		LC-MS *m/z* 468.1 (M+1).

实施例	结构	物理数据
42		LC-MS *m/z* 468.1 (M+1).
43		LC-MS *m/z* 468.1 (M+1).
44		LC-MS *m/z* 468.1 (M+1).
45		LC-MS *m/z* 481.1 (M+1).
46		LC-MS *m/z* 511.1 (M+1).
47		LC-MS *m/z* 525.2 (M+1).
48		LC-MS *m/z* 539.2 (M+1).
49		LC-MS *m/z* 523.2 (M+1).
50		LC-MS *m/z* 461.1 (M+1).
51		LC-MS *m/z* 486.1 (M+1).

实施例 52

式 I 化合物表现生物活性

A. 体外：用于测定 GTP[γ-^{35}S]与自表达人 EDG/S1P 受体的 CHO 细胞制备的膜的结合的闪烁亲近测定法(SPA)。

EDG-1(S1P1) GTP[γ-^{35}S]结合测定法：由稳定表达人 EDG-1 N-末端 c-myc 标记的 CHO 细胞克隆制备膜蛋白混悬液。用 DMSO/50mM HCl 制备 10mM-0.01nM 范围的供试化合物溶液，然后稀释入测定缓冲液(20mM HEPES, pH7.4, 100mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 0.1%不含脂肪的 BSA)。将包含 10mM GDP 的测定缓冲液与麦胚凝集素-包被的 SPA-珠(1mg/孔)混合，随后添加人 EDG-1 膜蛋白混悬液(10μg/孔)和供试化合物。然后将珠/膜/化合物测定成分在室温和振荡器上混合 10-15 分钟。将 GTP [γ-^{35}S](200pM)和珠/膜/化合物测定混合物加入到 96 孔 Optiplate ™的各孔中(最终体积 225μl/孔)，密封，在室温和恒定振荡下孵育 110-120 分钟。离心(2000rpm, 10 分钟)后，用 TopCount ™仪测定发光。

使用 ORIGIN V. 6.1 剂量响应曲线-拟合工具拟合 GTP [γ-^{35}S]结合曲线(原始数据)，获得 EC50 值。将基础结合(无化合物)和用激动剂获得的 GTP [γ-^{35}S]结合的最高刺激用作拟合范围。使用 7 种不同浓度生成浓度响应曲线(每个浓度使用两个或三个数据点)。

按照与 EDG-1 GTP [γ-^{35}S]结合测定相差无几的方式，使用来自 CHO 的膜，或就 EDG-8 RH7777 膜而言其来自稳定表达 c-末端 c-myc 标记的或未标记的受体的细胞，进行 EDG-3、-5、-6 和-8 GTP [γ-^{35}S]结合测定。表达 EDG 受体的膜的浓度在 13-19μg/孔的范围。按照上述测定法测试本发明的化合物，观察到它们显示对 EDG-1 受体的选择性。例如，5-[4-(2'-氟-2-三氟甲基-联苯-4-基氧基甲基)-苯基]-吡啶-2-甲酸在上述测定法中的 EC_{50} 为 0.9nM，对 EDG-1 的选择性至少 500 倍于其它受体中的一种或多种、包括 EDG-3、EDG-5、EDG-6 和 EDG-8。

B. 体外：FLIPR 钙流测定

使用 FLIPR 钙流测定法测试本发明化合物对 EDG-1、EDG-3、EDG-5 和 EDG-6 的激动剂活性。简言之，将表达 EDG 受体的 CHO 细胞维持在包含 5% FBS 与 500ug/ml G418 的 F-12K 培养基(ATCC)中，在测定前，将细胞以 10,000 个细胞/孔/25μl 的密度接种于 384 孔黑色澄清底平板内的包含 1% FBS 的 F-12K 培养基中。第二天，用洗涤缓冲液将细胞洗涤 3 次

(25 μl/孔)。向各孔中加入约 25μl 染料，在 37°C 和 5% CO_2 下孵育 1 小时。然后用洗涤缓冲液将细胞洗涤 4 次(25 μl/每次)。将 25μl SEQ2871 溶液添加到各孔的细胞中后测定钙流。使用表达各个不同 EDG 受体的细胞进行相同测定。在 3-分钟间隔内记录 FLIPR 钙流测定中的滴定过程，定量为对 EDG-1 活化的最大峰高响应百分比。

C. 体内：测定血液淋巴细胞耗竭的筛选试验

循环淋巴细胞的测定：将化合物溶于 DMSO 和 PEG300，稀释至获得终浓度为 2% DMSO 和 2% PEG300(v/v，终浓度)。在短期异氟烷麻醉下以 0.01-5mg/kg 管饲对 Lewis 大鼠口服施用化合物溶液。

在短期异氟烷麻醉下于施用后 6 和 48 小时从眶后窦采血。对全血样品进行血液学分析。使用自动分析仪测定外周淋巴细胞计数。用荧光染料-缀合的特异性抗体染色外周血淋巴细胞亚群，使用荧光活化细胞分选仪(Facscalibur)分析。将 2－3 只大鼠用于评价每种筛选化合物的淋巴细胞耗竭活性。结果为 ED_{50}，将其定义为显示 50 %血液淋巴细胞耗竭所需的有效剂量。按照上述测定法测试本发明化合物，发现它们显示的 ED_{50} 优选低于 1mg/kg、更优选 ED_{50} 低于 0.5mg/kg。例如，实施例 1 的化合物显示的 ED50 为 0.3mg/kg。

应理解本文所述的实施例和实施方案仅用于解释目的，并且可以对本领域技术人员提示依据其进行各种变型或改变，并且这些变型或改变包括在本申请的实质和理解以及待批权利要求范围内。为所有目的而将本文引述的所有公开文献，专利和专利申请引入本文作为参考。