

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98811895.5

[51] Int. Cl.

C07D 213/56 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
C07D 215/14 (2006.01)
C07D 237/08 (2006.01)
C07D 239/26 (2006.01)
C07D 241/12 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 11 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100436418C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/50 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

[22] 申请日 1998.12.11 [21] 申请号 98811895.5

[30] 优先权

[32] 1997.12.12 [33] US [31] 08/989,353

[32] 1998.12.7 [33] US [31] 09/206,245

[86] 国际申请 PCT/GB1998/003712 1998.12.11

[87] 国际公布 WO1999/031065 英 1999.6.24

[85] 进入国家阶段日期 2000.6.7

[73] 专利权人 OSI 制药公司

地址 美国纽约

共同专利权人 亚利桑那大学

[72] 发明人 格哈德·施佩尔 保罗·格罗斯

克劳斯·布伦德尔 加里·皮亚扎
里法特·帕姆克库

[56] 参考文献

US5643959A 1997.7.1

审查员 杨 轶

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 杨 青 樊卫民

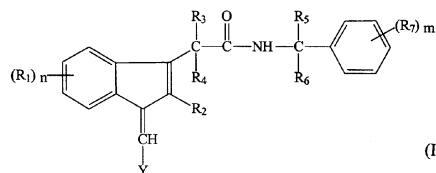
权利要求书 3 页 说明书 43 页

[54] 发明名称

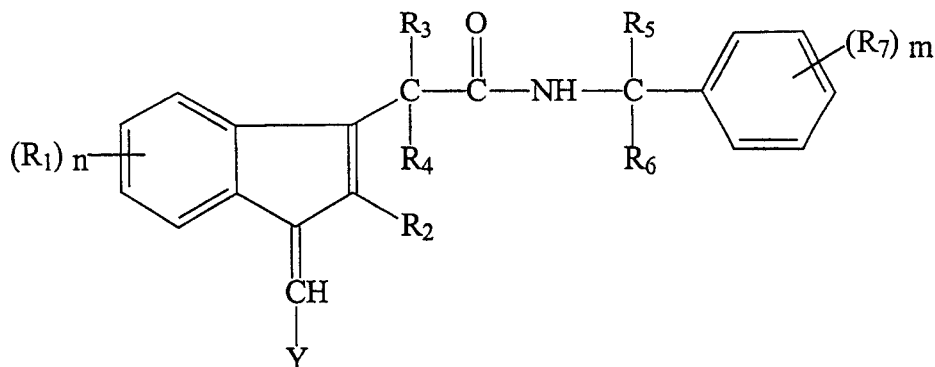
用于治疗肿瘤的 N-苄基-3-茛乙酰胺衍生物

[57] 摘要

N-苄基-3-茛乙酰胺(分子式 I)和杂环醛的替代性缩合反应产物能引导或促进细胞程序性死亡并阻止肿瘤细胞的失控增生,还能特异性地阻止和治疗肿瘤,包括前癌和癌损伤。



1. 以下分子式中所代表的化合物



其中，取代基 R_1 独立地选自氢和卤素；

取代基 R_2 选自氢和 C_{1-8} 烷基；

R_3 选自氢、卤素、氨基、羟基、 C_{1-8} 烷基胺基和 C_{1-8} 双烷基胺基；

R_4 代表氢；

R_5 和 R_6 各自独立地选自氢；

R_7 独立地选自氢；

m 和 n 代表 0 与 3 之间的任何一个整数；

Y 选自喹啉基、异喹啉基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、吲哚基、以及带一个或两个取代基的这些杂环基，所述取代基选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷氧基、 $-SO_2-C_{1-8}$ 烷基和 $-SO_2NH_2$ ；

或以上化合物药物学上可接受的盐。

2. 权利要求 1 中的化合物，其中 Y 为吡啶基或喹啉基。

3. 权利要求 1 中的化合物，其中 R_1 选自卤素。

4. 权利要求 1 中的化合物，其中 R_2 为 C_{1-8} 烷基。

5. 权利要求 1 中的化合物，其中 R_3 选自氢、羟基和 C_{1-8} 烷基胺基。

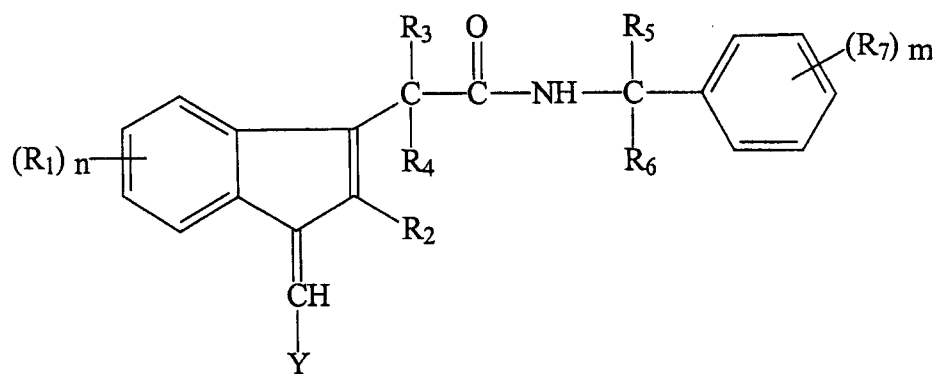
6. 权利要求 1 中的化合物, 其中 Y 代表喹啉基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基或带一个或两个取代基的这些杂环基, 所述取代基选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷氧基、 $-SO_2-C_{1-8}$ 烷基和 $-SO_2NH_2$ 。

7. 权利要求 6 中的化合物, 其中 Y 上的取代基为一个或两个选自 C_{1-8} 烷氧基、 $-SO_2-C_{1-8}$ 烷基和 $-SO_2NH_2$ 的基团。

8. 权利要求 7 中的化合物, 其中 Y 上的取代基为一个或两个 C_{1-8} 烷氧基。

9. 权利要求 1 中的化合物, 其为(Z)-5-氟-2-甲基-1-(4-吡啶基)亚甲基-茚-3-基-N-苄基乙酰胺盐酸盐。

10. 药物组合物, 包括可接受的药物载体和以下分子式中所代表的化合物:



其中, 取代基 R_1 独立地选自氢和卤素;

取代基 R_2 选自氢和 C_{1-8} 烷基;

R_3 选自氢、卤素、氨基、羟基、 C_{1-8} 烷基胺基和 C_{1-8} 双烷基胺基;

R_4 代表氢;

R_5 和 R_6 各自独立地选自氢;

R_7 独立地选自氢；

m 和 n 代表 0 与 3 之间的任何一个整数；

Y 选自喹啉基、异喹啉基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、吲哚基、以及带一个或两个取代基的这些杂环基，所述取代基选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷氧基、 $-SO_2-C_{1-8}$ 烷基和 $-SO_2NH_2$ ；

或以上化合物药物学上可接受的盐。

11. 权利要求 10 中的药物组合物，其中 Y 为吡啶基或喹啉基。

12. 权利要求 10 中的药物组合物，其中 R_1 选自卤素。

13. 权利要求 10 中的药物组合物，其中 R_2 为 C_{1-8} 烷基。

14. 权利要求 10 中的药物组合物，其中 R_3 选自氢、羟基和 C_{1-8} 烷基胺基。

15. 权利要求 10 中的药物组合物，其中 Y 代表喹啉基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基或带一个或两个取代基的这些杂环基团，所述取代基选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷氧基、 $-SO_2-C_{1-8}$ 烷基和 $-SO_2NH_2$ 。

16. 权利要求 15 中的药物组合物，其中 Y 上的取代基为一个或两个选自 C_{1-8} 烷氧基、 $-SO_2-C_{1-8}$ 烷基和 $-SO_2NH_2$ 的基团。

17. 权利要求 1 至 9 中任一项所述的化合物在制备治疗肿瘤用的药物组合物中的应用。

用于治疗肿瘤的 N-苄基-3-苄乙酰胺衍生物

技术概况

本发明涉及能引导和促进细胞程序性死亡并阻止肿瘤细胞突发性增生的化合物及方法学。这些方法可特异性地用于包括前癌和癌损伤的肿瘤治疗。

发明背景

科研和商品开发领域已愈来愈重视研究用于早期肿瘤治疗的有效药品，这些药品可延迟或阻止前癌损伤恶变为癌。就美国而言，每年有无数的人患前癌，这些病人有显著性(统计上)的趋势会发展成为恶性肿瘤和癌症。这些损伤主要包括在乳腺(可发展成乳腺癌)、皮肤(可发展成恶性黑色素瘤或基底细胞肿瘤)、结肠腺瘤息肉(可发展为结肠瘤)、子宫颈异常(宫颈癌)，以及其它肿瘤组织。

能预防或诱导存在性前癌、癌损伤及肿瘤逆转的化合物可延缓癌症的爆发，并至少可在某种程度上大大地减少这类疾病的痛苦和死亡。

此类化合物和方法学能有益于患有重复性前癌损伤而高机率患癌的病人群。许多癌症(像乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等)都有这种病人群。其中一个重要的例子是家族性多息肉结肠癌，如不予治疗，这些病人都会患癌症。家族性多息肉病人的特征是在十几岁时就长有许多(成千上万)的结肠息肉，根据报导，由于每个结肠息肉群(不管是家族性或非家族性的)终身大约有百分之五的危险性会变为癌，直到最近对于这个家族性多息肉病的治疗还是局限于在二十几岁时手术切除。

和整体患肿瘤的人群相比，许多其他类肿瘤也有在早年得癌和癌重发的高危人群，例如乳腺癌和结肠癌病人群。在结肠癌病人中，切除长出的息肉瘤是目前的治疗选择。对于非家族性病人，切除息肉瘤可用手术或纤维内窥镜息肉切除术。这些手术都不舒服，而且费用高(每个内窥镜息肉切除术的费用在一千美元到一千五百美元左右，而用手术切除的费用更高)，并可引起少量但显著性的结肠穿孔危险。

由于化疗和手术治疗癌症效果并非很好，并且现有的化学疗法常常还有严重的副作用，所以寻找有效的能治疗和预防早期肿瘤的药物就显得很重要，而寻找有效的具抗前癌损失作用，但又无常用化疗药物副作用的化合物更为重要。因为这些化合物选择性地诱发细胞程序性死亡，但不伤及正常细胞，所以可用于有肿瘤复发可能性的肿瘤病人的复原治疗，甚至一般的肿瘤病人也能从中获益。

因为化疗药物所拥有的副作用(来自于抗肿瘤作用)往往大于它们预防肿瘤的作用，所以标准的肿瘤化疗药物对于癌症的化学预防治疗并不适用。现在许多标准的化疗药物的杀癌细胞作用被认为是通过诱导细胞程序性死亡而实现。身体中的各个组织都有自然的细胞程序性死亡，细胞程序性死亡在体内的组织平衡中起着重要的作用，它保证了体内新产生的细胞数和死亡的细胞数的相等平衡。在自我更新组织如骨髓、免疫细胞、内脏及皮肤组织中细胞程序性死亡的作用尤其显著。例如，小肠壁的细胞分裂很快，三天后身体必须清除这些细胞来保护和预防小肠壁的增生。

标准的化疗药物不仅引起肿瘤细胞的程序性死亡，而且引起正常人体组织中细胞的程序性死亡，尤其对体内迅速分裂的正常组织(像头发、肠和皮肤)细胞，因此具有严重的副作用。对正常细胞的副作用包括头发脱落、体重减轻、呕吐和骨髓免疫抑制，这是标准化疗药物不适用于癌症预防的一个原因。

除非一次性治愈(例如基因疗法), 预防癌症总需要长期多次给药来抑制肿瘤的形成, 这对于标准化疗药物来说是禁忌的, 因为它们有上面所述的副作用。

细胞程序性死亡的失调可以导致前癌损伤和肿瘤。近来的科研表明, 细胞程序性死亡的缺损对肿瘤以外的其它疾病也起着重要作用。所以能调节细胞程序性死亡的药物不但可用于预防或控制癌症, 还可用于其它疾病的治疗。

原本用于治疗关节炎的一些非甾体抗炎药(NSAIDs)在抑制和消除结肠息肉方面显示出一定效果。当病人服用非甾体抗炎药舒林酸后, 息肉会消失。不幸的是, 由于 NSAIDs 抑制前列腺合成酶(“PGE-2”), 长期使用现有的 NSAIDs 会使病人特别是多息肉综合症病人出现严重的副作用, 这些副作用包括胃肠道损伤、穿孔、溃疡以及肾毒性。由于 PGE-2 活力增高与发炎有关, 所以 NSAIDs 抑制 PGE-2 酶是它们消炎作用的前提, 而 PGE-2 又具有保护胃肠道的作用, 所以长期使用 NSAIDs 治疗会引起胃肠道反应。对于关节炎患者来说, 因是短期治疗, 所以 NSAIDs 的胃肠道反应并不明显。但是, 对于多息肉患者来说, 为了消除息肉和预防息肉的再生, 长期施用舒林酸会引起胃肠副反应。多息肉综合症病人由于这些副反应而不得不停止服用 NSAIDs, 但息肉又重生。

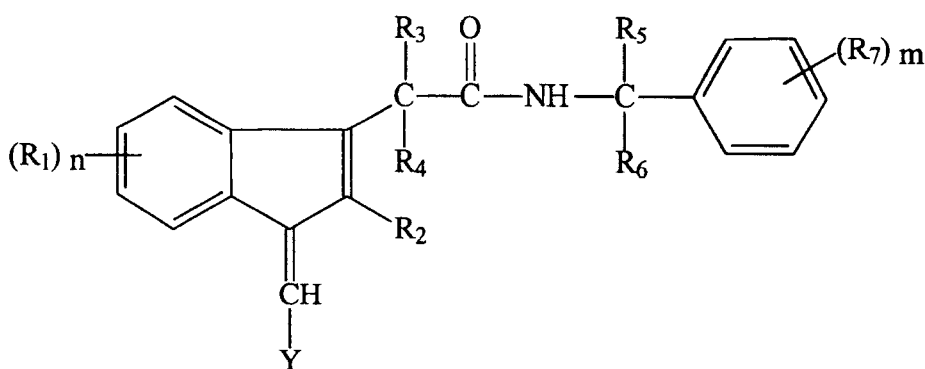
美国专利 5,643,959 中公开的那些化合物已显示出具有只引起肿瘤细胞程序性死亡而不影响人的正常细胞的作用, 因此这些新的治疗药物避免了常用化疗药引起正常细胞程序性死亡的严重副作用, 从而使它们具有治疗肿瘤损失的优势。(请见: “舒林酸舒砒治疗家族性多息肉瘤的 I 期临床试验: 适用剂量和安全性”, 消化性疾病周会, 摘要号: 2457, 5 月 10~16, 1997, 美国胃肠道协会等)。此外, 由于这些药物并不抑制 PGE-2, 因而不象 NSAIDs 那样会产生胃肠道副作用。因此更需要抗肿瘤性更强但无明显 PGE-2 抑制性的化合物。

发明概述

本发明中的有效化合物可引发肿瘤细胞的程序性死亡(但对正常细胞无显著性影响), 治疗肿瘤损伤但无显著性抑制 PGE-2 作用。本发明还包括这些化合物测定试验的筛选方法, 它们包括测定化合物是否可以引发细胞培养中肿瘤细胞的程序性死亡、测定药物的有效剂量来治疗病人, 以及测定前癌损伤和肿瘤的程序性死亡与生长的调节, 并排除常用化疗药物以及 NSAIDs 的副作用。

发明的详述

本发明包括以下分子式 I 所代表的治疗肿瘤尤其是前癌用的化合物(以及它们药物学上可接受的盐)。



I

其中, 取代基 R_1 分别代表氢、卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、氨基、低碳烷基胺、双低碳烷基胺、低碳烷硫基、低碳烷砷基、氰基、羧胺基、羧酸、巯基、磺酸、黄原酸和羟基;

取代基 R_2 代表氢和低碳烷基;

R_3 代表氢、卤素、氨基、羟基、低碳烷基胺和低碳双烷基胺;

R_4 代表氢基, 或 R_3 和 R_4 合并为氧;

R_5 和 R_6 各自代表氢、低碳烷基、羟基替代的低碳烷基、氨基低碳烷基、低碳烷基胺基烷基、低碳烷基氨基双低碳烷基、低碳烷基脞、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)NH_2$ 和二碳至六碳氨基酸;

R_7 各自代表氢、氨基低碳烷基、低碳烷氧基、低碳烷基、羟基、氨基、低碳烷基胺基、双低碳烷基胺基、卤素、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 和 $-\text{SO}_2$ (低碳烷基)；

m 和 n 代表 0 与 3 之间的任何一个整数；

Y 代表喹啉基、异喹啉基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、吡咯基、苯咪唑基、三嗪基、四唑基、苯硫基、呋喃基、噻吩基、吡唑基、吡咯基、以及带取代基的这些杂环基。这些取代基可为卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、氨基、低碳烷基胺基、双低碳烷基胺基、羟基、 $-\text{SO}_2$ (低碳烷基)和 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 之一或之二。

此发明还包括分子式 I 中优选的化合物以及它们的筛选方法和应用，其中：

R_1 代表的基团有卤素、低碳烷氧基、氨基、羟基、低碳烷基胺基和双低碳烷基胺基，其中以卤素、低碳烷氧基、氨基和羟基为优选化合物；

R_2 代表的基团为低碳烷基；

R_3 代表的基团为氢、卤素、羟基、氨基、低碳烷基胺基和双低碳烷基胺基，其中以氢、羟基和低碳烷基胺基为首选化合物；

R_5 和 R_6 分别代表氢、羟基取代的低碳烷基、氨基低碳烷基、低碳烷基胺基低碳烷基、低碳烷基胺基双取代低碳烷基、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ ，其中以氢、羟基取代低碳烷基、低碳烷基氨基双低碳烷基、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 和 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 为优选化合物；

R_7 代表的基团为氢、低碳烷氧基、羟基、氨基、低碳烷基胺基、双低碳烷基胺基、卤素、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 和 $-\text{SO}_2$ (低碳烷基)，其中以氢、低碳烷氧基、羟基、氨基、氨基低碳烷基、卤素、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 和 $-\text{SO}_2$ (低碳烷基)为优选化合物。至少 R_7 取代基代表中的任何一个基团可位于旁位、邻位或对位，最优选位置是邻位；

Y 代表喹啉、异喹啉、吡啶、嘧啶、吡嗪或它们的具有不同取代基的衍生物。较优先选择的 Y 杂环基上的取代基有低碳烷氧基、氨基、低碳烷基胺基、双低碳烷基胺基、羟基、 $-\text{SO}_2$ (低碳烷基)，和 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ，

其中以低碳烷氧基、双低碳烷基胺基、羟基、 $-\text{SO}_2$ (低碳烷基)和 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 为最优选。

此发明还包括以上分子式 I 中所有的化合物以及它们用于治疗肿瘤的方法、有效药物剂型和有效药物剂量，其中以无 NSAIDs 治疗剂量的剂型为最优选。

此发明还包括以上所述化合物的肠衣片剂以及它们在治疗肿瘤病人上的应用方法。

此发明包括用以上分子式 I 中所有化合物的有效剂量来抑制肿瘤细胞的筛选方法。

在另一个实施方案中此发明包括用以上分子式 I 中所有化合物的有效剂量来诱导人体细胞程序性死亡的筛选方法。

另外，在另一个实施方案中此发明又包括用以上分子式 I 中所有化合物的有效剂量来治疗与细胞程序性死亡失调有关的疾病。细胞程序性死亡的调节在与细胞生长失调有关的疾病中起着重要的作用，像良性前列腺增生、神经变质性病(例如帕金森氏病)、自动免疫性疾病包括多发性硬化和风湿性关节炎、感染性疾病像爱滋病以及其它的疾病。

此发明的化合物又是肿瘤细胞 cGMP-特异性磷酸二酯酶(cGMP-PDE)的抑制剂。此酶包括 PDE5 以及在美国专利号 09/173.375 中公开的新型 PDE。为了方便起见，这些化合物的 PDE 抑制活性可用已登记的美国专利 09/046,739(1998 年 3 月 24 日)所述的方法来测试。因此，此发明的化合物是 PDE5 的抑制剂，它们可用来治疗需抑制此酶的疾病。

文中所用术语“前癌损伤”包括以异常肿瘤形成为代表的综合症，包括异型增生、组织改变。实例包括结肠、乳腺、前列腺或肺组织内的异型增生，或如异型增生痣综合征、皮肤恶性黑色素瘤的前体等病症。除异型增生痣综合征外，实例还包括息肉病、结肠息肉、子宫的前癌损伤(即子宫异型增生)、食管、肺、前列腺异型增生、前列腺内肿瘤、乳腺和/或皮肤以及相关疾病(如 actinic keraosis)，不论所述损伤在临床上是否是可鉴定的。

文中所用术语“卤代”或“卤素”指氯、溴、氟、碘。术语“烷基”指直链、支链和环化的烷基，以及替代性芳基烷基。术语“低碳烷基”指一碳至八碳的烷基。

术语“羟基取代低碳烷基”指至少单羟基而最好不超过三羟基取代的低碳烷基。

术语“-SO₂(低碳烷基)”指低碳烷基取代的磺酰基。

术语“低碳烷氧基”指具有一至八碳的直链、支链或环化烷氧基。

术语“低碳烷基巯基”指低碳烷基取代的硫化基。术语“低碳烷基磺酰基”指低碳烷基取代的磺酰基。

术语“药物学上可接受的盐”指分子式 I 中所有化合物与无毒性酸或碱和金属碱所组成的盐。这些盐可在化合物最后分离和纯化时直接制成，或者间接地与有机酸或碱反应而得。代表性的酸盐有：盐酸盐、溴酸盐、硫酸盐、亚硫酸盐、醋酸盐、戊酸盐、油酸盐、软脂酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐、月桂硫酸盐等。代表性的碱和金属碱盐有：钠盐、钙盐、钾和镁盐。

对于分子式 I 中含有不对称碳原子的化合物，它们的对映体可能也存在。除非有特别说明，本发明还包括这些对映体和外消旋体。这些对映体化合物可由手性原料来合成。外消旋体可由常用的化学方法来分离，这些方法包括手性层析、非对映体盐的分级结晶等。

分子式 I 中代表的化合物还存在立体异构体(顺式和反式)，以反式(I)具优先。

此发明的化合物可与药物载体混合制成可供口服的固体剂型和液体剂型。尽管这些剂型以口服为主，也可直肠或表皮给药。

口服用的药物载体包括胶囊、片剂、丸剂、粉末、锭剂和粒剂。固体剂型的载体可含至少一种如常规所用的蔗糖、乳糖或淀粉类的惰性稀释液。这些载体还可添加其他物质，例如，润滑剂硬脂酸镁。胶囊、片剂、锭剂、丸剂和粒剂的载体可含有缓冲剂。片剂、丸剂和粒剂的载体可由在药片、药丸和药粒外面涂上肠衣而制得，而包裹上肠衣的化合物可直接压成片、丸和粒给病人服用。肠衣以在肠中 pH 情况下易溶或易分解的虫胶或 Eudragts 类为好。

药物的载体还包括口服用的液体剂型，例如：药物乳剂、溶液、悬液、糖浆和含有水的普通作画用惰性稀释剂、酞剂。除了惰性稀释剂，药物成份还可含有佐剂，像润湿剂、乳化和悬浮剂、甜化剂和香精。

供皮肤给药用药物载体有 DMSO、酒精或丙二醇和其它一些可用来混合或保持湿润的物质，这些载体可使药物紧贴皮肤而不会因干而脱落。

直肠给药的药物载体以栓剂为好，这些栓剂可由化合物与像可可油、栓剂蜡、凝胶类的赋形剂混合而成。

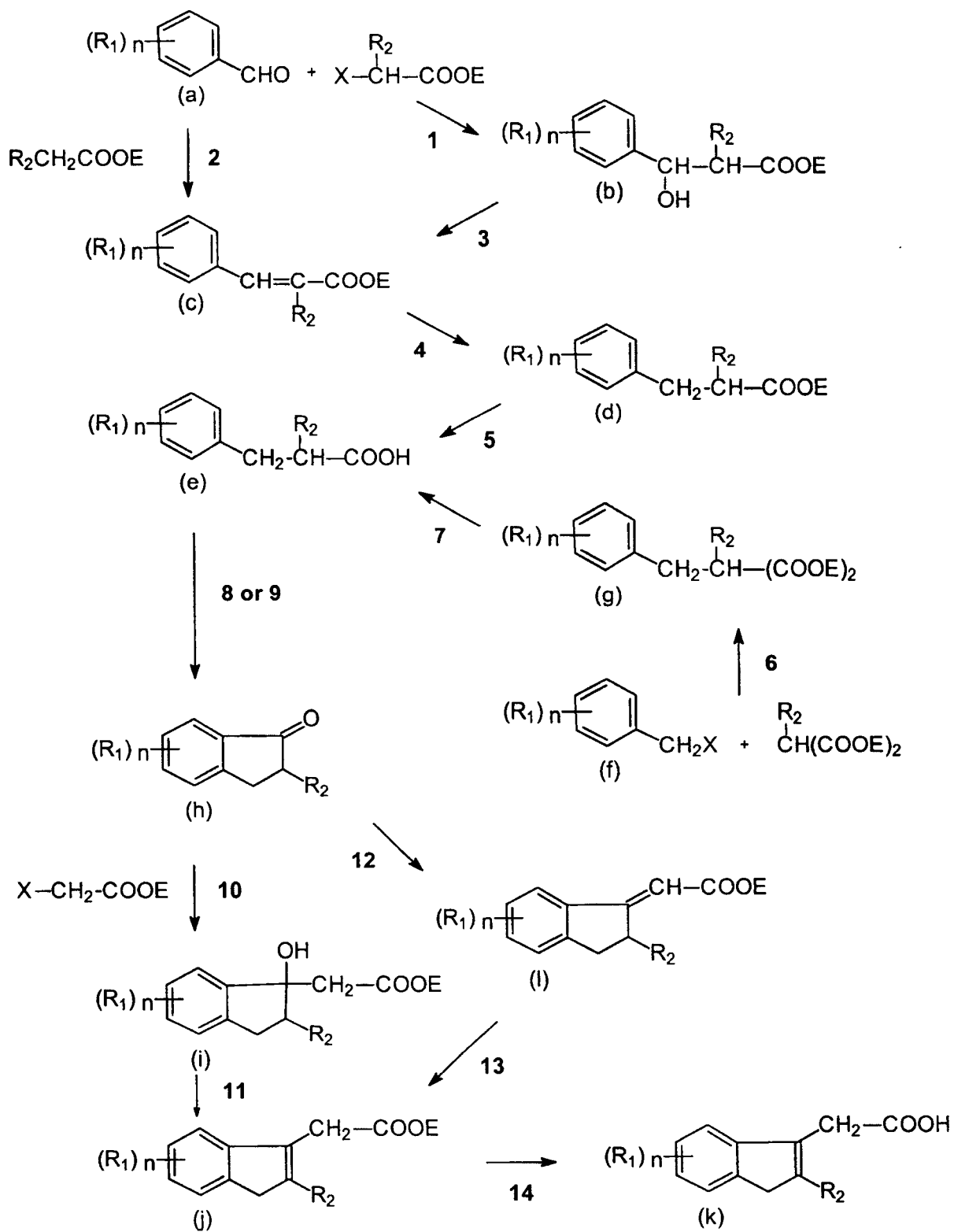
此发明的化合物与药物载体可制成给病人服用的单位剂量型，随着服药途径的不同(例如口服或直肠给药)，可根据对损伤治疗有效的所需剂量而调节单位剂量中有效成份的含量。可根据有效化合物的吸收性质、服用途径、所需的治疗时间及其他因素来选择剂量范围。如果需要的话，可按每天一次所需有效化合物的量来制定单位剂量，也可按多次服用(每天二至四次)剂量而定。

此发明的药物成份最好装入容器(如盒子、瓶子)，容器上应有适当的显示具体成份、含量、使用方法等的说明书或标签。

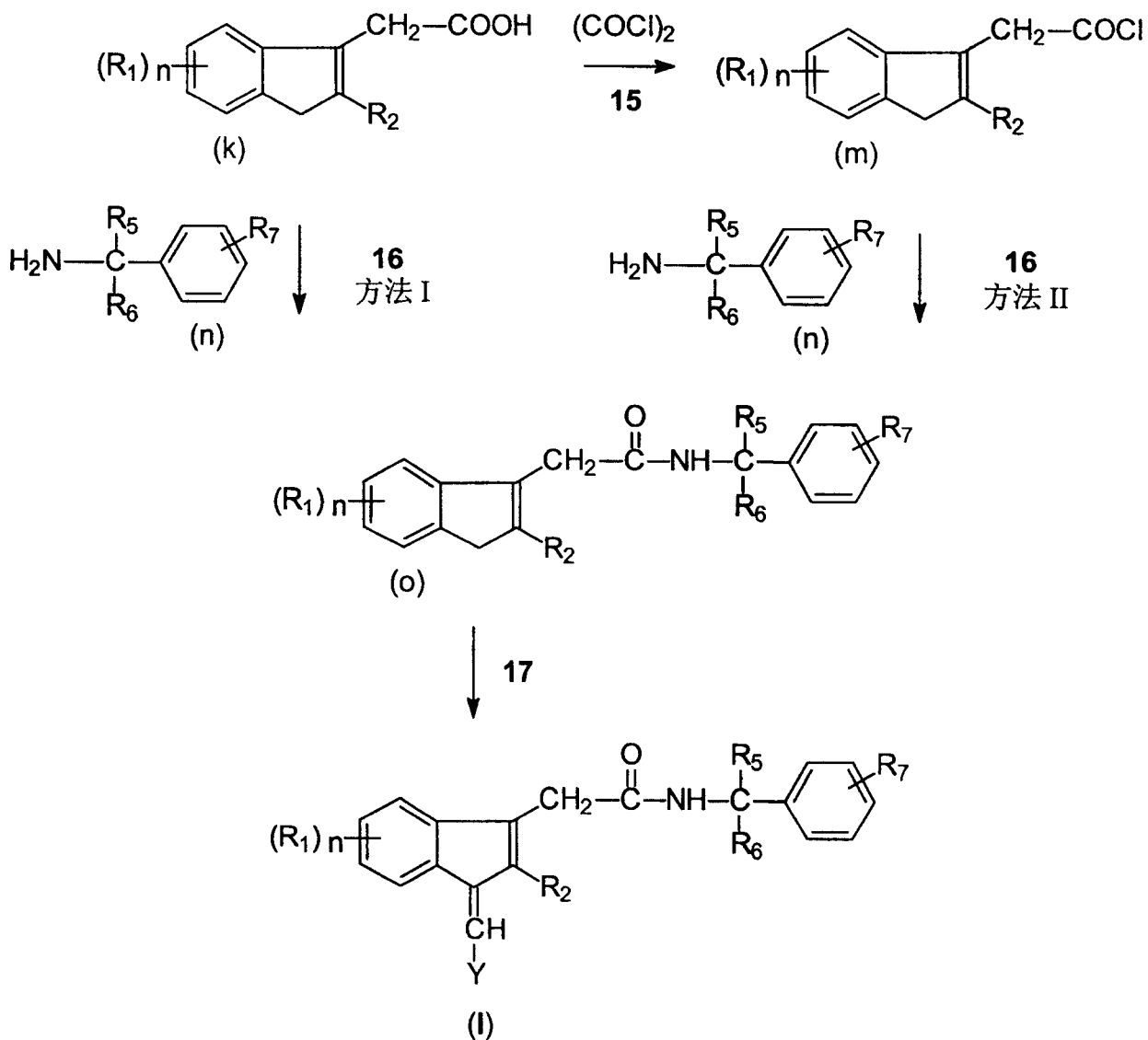
此发明中包括几个合成这些化合物的流程图。第一个流程图(同时有其他选择性途径列出)代表的例子是 R_3 和 R_4 均为氢时的化合物合成。具体请看流程图 I。其他的流程图(也有其他通路列出)描述的例子为当 R_3 和 R_4 中至少有一个不是氢但还是符合分子式 I 中代表的化合物的合成。第二流程图列于“流程图 II”。

R_3 和 R_4 均为氢时的化合物的合成路线列于流程图 I，美国专利号 3,312,730 中已有流程图 I 的描述，在此作为参考。在流程图 I 中， R_1 除了代表分子式 I 中所包含的基团外，还可以是一个硝基样的反应基团，从而可由硝基取代的茛菪化物而合成出大量其它取代基的茛菪化物。

流程图 I



流程图 I (续)



在流程图 I 中,也可用几个选择途径。一个是替代性苯甲醛与乙酸乙酯的 Knoevenagel 缩合反应(反应式 2), 或与 α -卤代丙炔酯的 Reformatsky 反应(反应式 1 和 3)。所合成的不饱和酯(c)再氢化和水解得到替代性苄基丙炔酸(e)(反应式 4 和 5)。另外, 还可用典型的丙二酸酯合成法(反应式 6 和 7), 用替代性丙二酸酯水解, 脱羧而生成替代

性酯(g), 然后得到苄基丙炔酸(e)。后面一种方式更适用于硝基和烷基硫基取代的苯环化合物的合成。

第二步是 β -芳基丙炔酸(e)环合成茛酮(h), 这一步反应可用 Lewis 酸催化的 Friedel-Crafts 反应(参考有机反应第二册第 130 页), 或与多磷酸(反应式 8 和 9)加热而得。茛酮(h)与 α -卤代酯产生 Reformatsky 反应, 取代羧基后而引进脂族酸(见反应式 10)。另外, 这一步反应还可用 Wittig 反应来完成, Wittig 试剂、 α -三苯磷酯取代茛酮(h)上的羰基为双键(反应式 12)而得到产物(i)。产物(i)可立即重排生成茛并化合物(j)(见反应式 13)。如果选择的是 Reformatsky 反应, 中间物 3-羟基-3-脂族酸衍生物(i)必须脱水而成茛并化合物(j)(见反应式 11)。

茛基乙酸(k)与草酰氯或亚硫酰氯或其他相类似试剂在四氢呋喃中蒸发可生成酰氯化合物(m)(见反应式 15)。酰氯(m)与取代苄胺(n)的加成反应可用两种方法进行。

方法 I

取代苄胺(n)在室温下慢慢地加入到 5-氟-2-甲基-3-茛基乙酰氯(k)的二氯二甲烷溶液中, 反应混合物回馏过夜, 然后用 10% 盐酸和 5% 碳酸氢钠的水溶液萃取。有机层用硫酸钠干燥, 蒸发后得到酰胺化合物(o)。

方法 II

茛基乙酸(k)可与苄胺在碳化二亚胺(例如 N-(3-二甲基胺丙基)-N'-乙基碳化二亚胺)催化下发生脱水缩合反应。反应采用 DMA 作溶剂, 在常温下持续二天。反应的混合物再逐滴加入到搅拌的冰水中。黄色沉淀物经过滤、水洗和真空干燥, 再结晶而得纯品(o)。

化合物 a'类(流程图 III)、o 类(流程图 I)、t 类(流程图 II)、y 类(流程图 II B)可经流程图 III 中的缩合反应而制得。

取代基:

X=卤素, 通常为 Cl 或 Br。

E=甲基、乙基、苄基或低碳酰基。

R₁、R₂、R₆、R₅ 和 R₇ 与分子式 I 中描述的相同。

Y、n 和 m 与分子式 I 中描述的相同。

流程图 I 中的试剂和反应条件(数字代表反应式)

(1) 锌粒、无水惰性溶剂像苯、乙醚。

(2) 硫酸氢钾或对-甲苯磺酸。

(3) 醋酸钠、无水乙醇, 室温下。

(4) 氢气、披钨木炭、40 个大气压, 室温下。

(5) 氢氧化钠、乙醇水溶液、20~100 度。

(6) 醋酸钠或其它强硷, 像氢化钠或正丁基氧化钾。

(7) 酸。

(8) Friedel-Crafts 反应, 路易丝酸催化, 参考有机反应第二卷第 130 页。

(9) 多磷酸, 加热。

(10) Reformatsky 反应: 锌、惰性溶剂, 加热。

(11) 对甲苯磺酸和氯化钙或碘气, 温度 200 度

(12) 维梯希反应, (C₆H₅)₃P=C-COOE, 温度 20~80 度, 乙醚或苯。

(13)(a) NBS/CCl₄/过氧化苯甲酰

(b) PtO₂/H₂(1 大气压)/醋酸

(14)(a) 氢氧化钠

(b) 盐酸

(15) 草酰氯或亚硫酰氯, 在二氯甲烷或四氢呋喃溶剂中。

(16) 方法 I: 2 倍 NH₂-C(R₅R₆)-Rh(R₇)_m

方法 II: 碳化二亚胺于四氢呋喃中

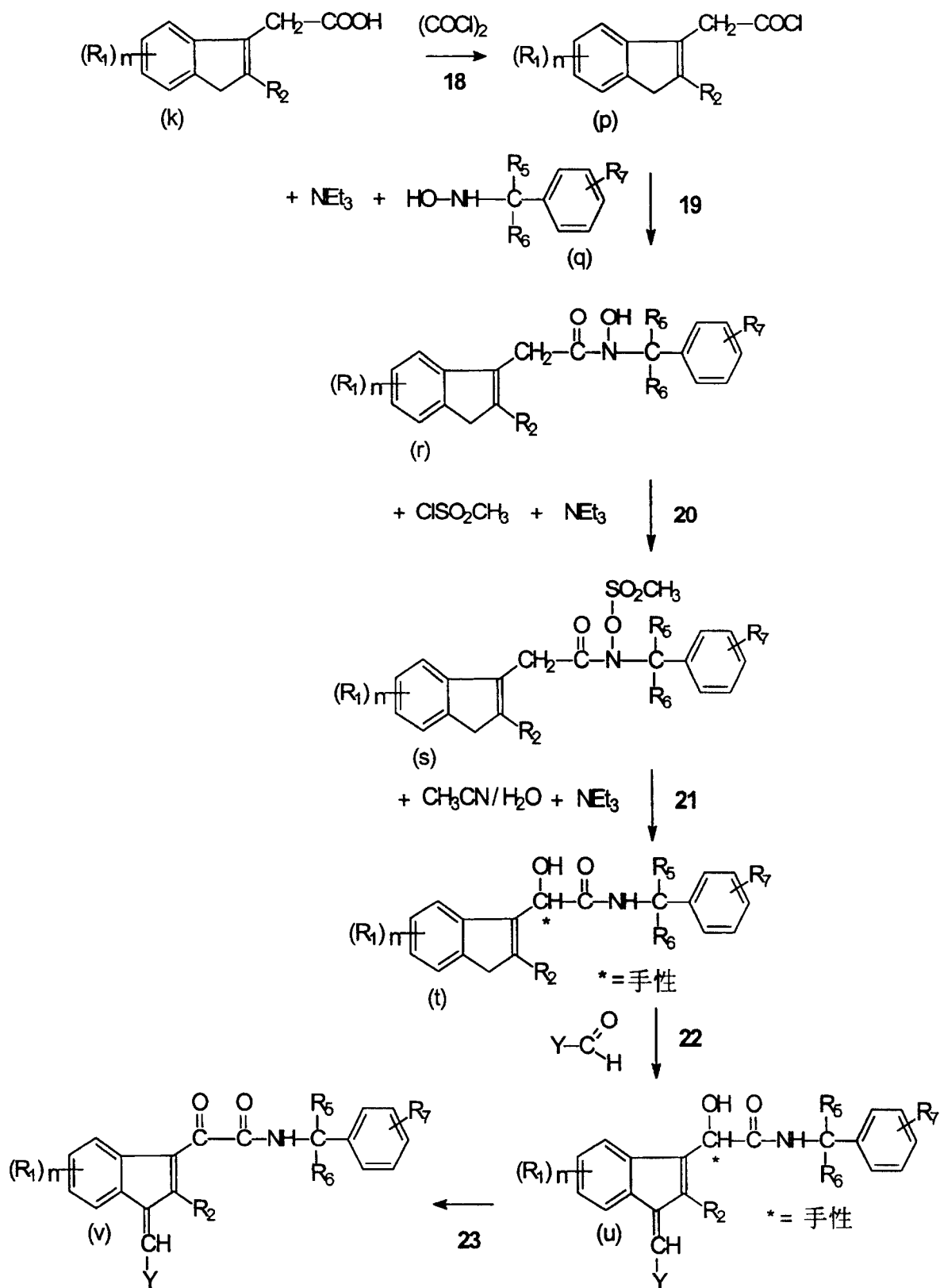
(17) 1N 甲基氧化钠, 于甲醇中回馏

流程 I 中化合物(h)包含的已知茛酮可直接用作中间体来合成终产物, 因此可免除反应式 1~7。这些已知的茛酮包括:

- 5-甲氧茛酮
- 6-甲氧茛酮
- 5-甲基茛酮
- 5-甲基-6-甲氧基茛酮
- 5-甲基-7-氯代茛酮
- 4-甲氧基-7-氯代茛酮
- 4-异丙基-2,7-双甲基茛酮
- 5,6,7-三氯茛酮
- 2-正丁基茛酮
- 5-甲基-硫代茛酮

流程图 II 中分两个分图: 流程图 II A 和流程图 II B。流程图 II A 用于当 R_3 等于羟基和 R_4 等于氢或 R_3 和 R_4 形成氧桥时的化合物的合成, 流程图 II B 用于当 R_3 等于低碳烷基氨基时的化合物的合成。

流程图 II A



和流程图 I 相似，在流程图 II A 中，茛基乙酸(k)溶于四氢呋喃，和草酰氯在回流条件下反应，当溶剂蒸发后就形成了酰氯(p)(见反应式 18)产物。然后，溶于二氯甲烷的酰氯(p)与苄基羟氨盐酸盐(q)和三乙基胺在 0℃混合 40~60 分钟，反应的混合物加热至室温并继续搅拌 1 小时，加入水后形成的有机层用 1 当量盐酸和盐水洗后，用硫酸镁干燥，蒸发后得粗产品 N-羟基-N-苄基乙酰氨(r)，最后用结晶法或快速色谱分离法纯化。这部反应在 Hoffman 等人写的 JOC 1992, 57, 5700—5707 文献中有具体描述。

接下去是 N-甲磺酰胺(s)的制备(反应式 20)。这部反应也在 Hoffman 等人写的 JOC 1992, 57, 5700—5707 文献中有描述。具体地，三乙胺加入到预冷至零度的异羟肟酸的二氯甲烷溶液中，反应混合物搅拌 10~12 分钟后，逐滴加入甲磺酰氯。反应继续在 0℃搅拌 2 小时，然后加热至室温，再搅拌 2 小时。反应的有机层分别用水、1 当量盐酸和盐水洗，最后用硫酸镁干燥，产物(s)用结晶或快速色谱分离法纯化。

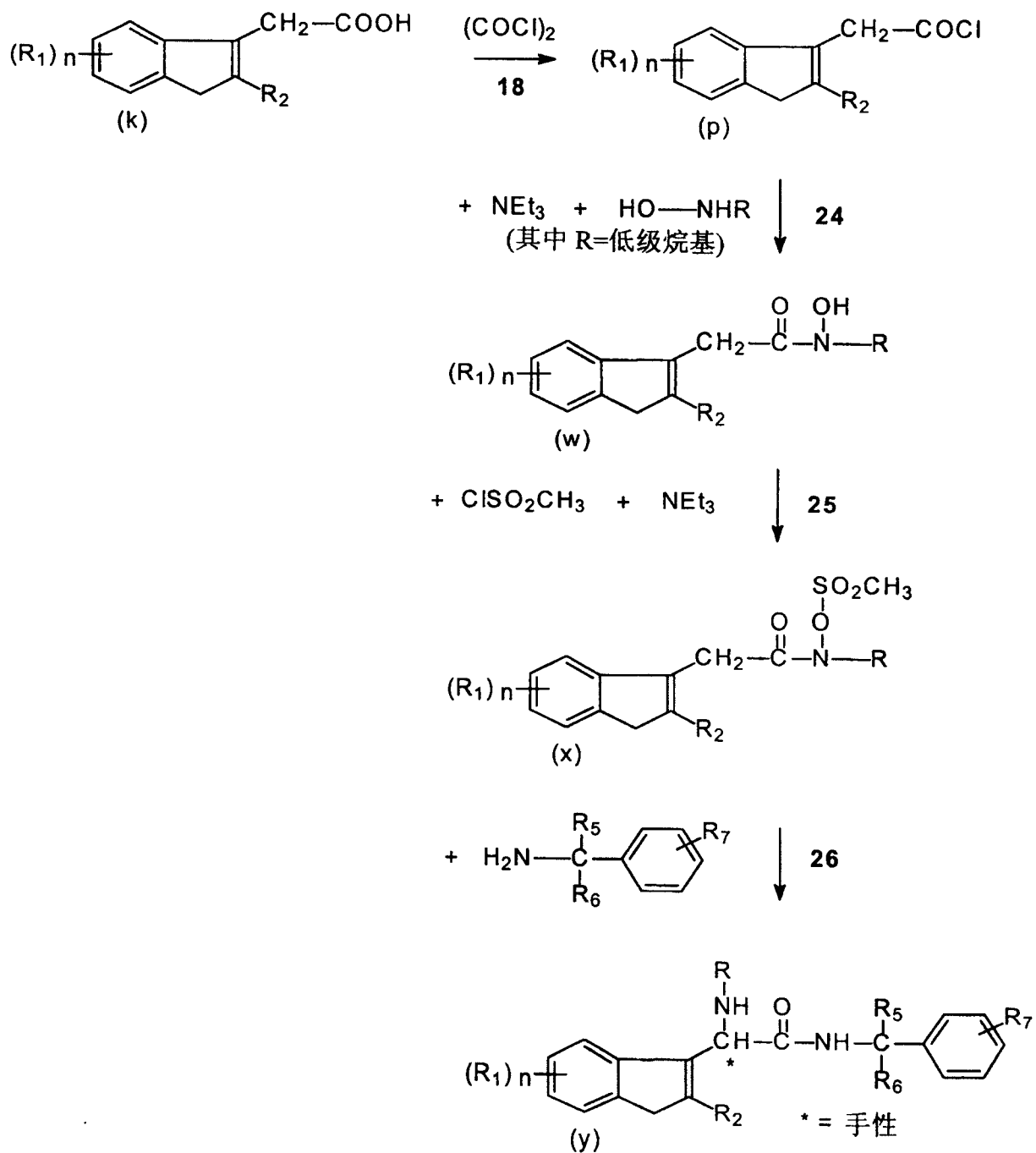
反应式 21 中 N-苄基- α -(羟基)酰胺(t)的制备也在 Hoffman 等著的 JOC 1992, 57, 5700—5707 和 JOC 1995, 60, 4121—4125 文献中有详细描述。具体地，于 N-甲磺酰胺(s)的乙腈与水的混合溶液中慢慢加入(需 6~12 小时)溶于乙腈的三乙胺，反应混合物搅拌过夜。反应的溶剂蒸发后残留物溶于乙酸乙酯，分别用水、1 当量盐酸和盐水洗，有机层用硫酸镁干燥，溶剂蒸发后，便得产物(t)。用结晶法纯化。

流程图 II A 中反应式 22 包括的与某些醛的缩合反应在流程图 III 中有详细的描述。流程图 III 普遍用于流程图 I、II A 和 II B 终产物的合成。

流程图 II A 中最后反应式 23 是 N-苄基- α -酮酰胺(v)的制备，这步反应是二级醇(u)氧化成酮。可采用像 Pfitzner-Moffatt 的氧化反应，

它能选择性地氧化醇基而不影响 Y 基团。化合物(u)和(v)还可衍化为分子式 I 中 R₃、R₄ 不同取代基化合物。

流程图 II B

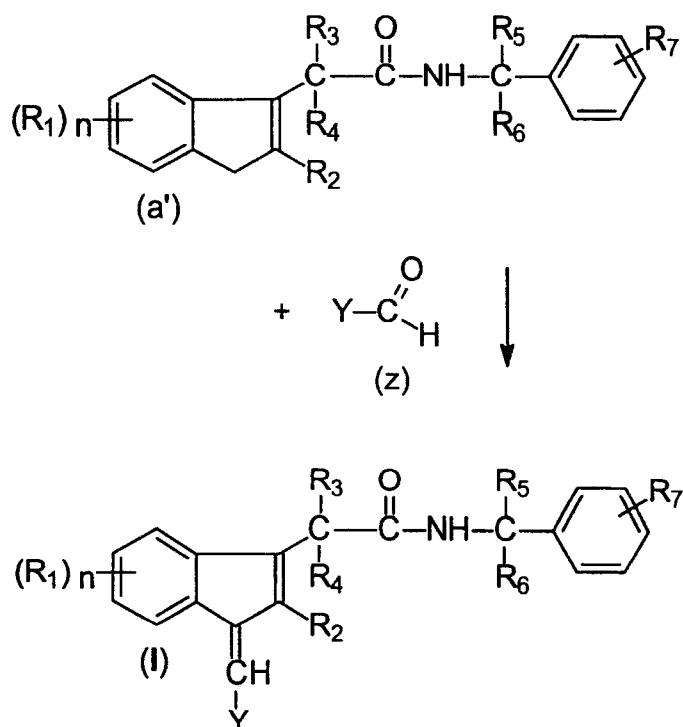


如上所述，流程图 II B 用于 R_3 等于低碳烷基胺基时化合物的合成。与流程图 II 类似，流程图 II B 中，茛基乙酸(k)先溶于四氢呋喃溶剂中，与草酰氯回流蒸发后产生酰氯产物(p)(见反应 18)，然后进行反应式 24。溶于二氯甲烷的酰氯(p)与烷基羟胺盐酸盐(例如 HO-NHR, R 是低碳烷基，以异丙基为优选)和三乙胺在 0°C 混合 40~60 分钟，混合物加热至室温，继续搅拌 1 小时，然后用水稀释形成有机层，分别用 1 当量盐酸和盐水洗，有机层用硫酸镁干燥后蒸发至干。粗产品 N-羟基-N-烷基乙酰胺(w)用结晶法或快速色谱分离法纯化。这步反应也在 Hoffman 等著的 JOC 1992, 57, 5700-5707 中有描述。

反应式 25 中 N-甲磺酰胺(x)的制备也在 Hoffman 等著的 JOC 1992, 57, 5700-5707 中有描述。具体地，三乙胺慢慢加入到预冷至零度的异羟肟酸的二氯甲烷溶液中，反应混合物搅拌 10~12 分钟后，逐滴加入甲磺酰氯，反应继续在 0°C 搅拌 2 小时，然后加热至室温，继续搅拌 2 小时。反应产生的有机层分别用水、1 当量盐酸和盐水洗，用硫酸镁干燥后，蒸发得产品(x)。最后用结晶法或快速色谱分离法纯化。

流程图 II B 中 N-苄基茛基- α -低碳烷基胺乙酰胺(y)的制备见 Hoffman 等著的 JOC 1995, 60, 4121-25 和 J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 5031-34 文献中描述。于预冷至 0°C 的苄基胺二氯甲烷溶液中分 30 分钟慢慢加入 N-甲磺酰胺(x)混合物，继续在 0°C 搅拌 1 小时，加热至室温后搅拌过夜。溶剂蒸发后，于残留物中加入 1 当量氢氧化钠，用二氯甲烷萃取，水洗后用硫酸镁干燥，蒸发溶剂后，产物(y)由结晶或快速色谱分离法纯化。

流程图III



流程图III包括了杂环醛(例如 $Y-CHO$)与茛基酰胺的缩合反应。反应后产生分子式 I 中的终产物。流程图 I 中反应式 17 和流程图 II A 中反应式 22 都采用此缩合方法。此法还用于流程图 II B 中化合物 y 转变为分子式 I 中终产物的合成。

流程图III中, 酰胺(a')、N-杂环醛(z)和甲烷氧钠(1M 溶于甲醇)在氮气中 $60^{\circ}C$ 混合反应 24 小时。冷却后, 反应混合物倒于冰水中。沉淀物过滤、水洗后, 于真空中干燥, 结晶纯化而得流程图 II 和 II B 中分子式 I 的化合物以及流程图 II A 中中间体(u)。

如上所述, 以用茛酮苯环上硝基取代的化合物为优先初始物来制备多种此发明中的化合物。因为这个途径可产生出多种取代的产品。在这个途径中, 硝基还原成氨基后, 用 Sandmeyer 反应引进氯、溴、腈或黄原酸代替氨基。从腈基取代的衍生物水解可得到羰基酰胺和羧

酸化合物。其他像酯类的羧基衍生物也可进一步制得。黄原酸化合物水解后可得巯基化合物，氧化后很易得到磺酸或烷化成烷基巯基再氮化为烷基磺酸化合物。这些反应可在引进 1 位取代基以前或以后进行。

这些反应可以从以下的具体例子中得到很详细的说明，这些例子是为了更好地表达此发明而不是用于限制此发明的范围。在以下的例子中，像取代基 R_1 、 R_2 等都是指分子式 I 中所相应的取代物。

例一

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基酰胺

(A)对-氟- α -甲基肉桂酸

对-氟苯甲醛(200 克, 1.61 摩尔)、丙酸酐(3.5 克, 2.42 摩尔)和丙酸钠(155 克, 1.61 摩尔)混合于充满氮气的一升三颈烧瓶中, 慢慢地用油浴加热至 140°C , 20 小时后冷却至 100°C , 倒入 8 升水中, 所生成的沉淀物溶于 2 升的氢氧化钾(302 克)溶液中。水溶液经乙醚提取, 乙醚提取液再经氢氧化钾溶液洗。氢氧化钾水溶液合并后, 过滤, 用浓盐酸酸化而产生沉淀物, 过滤后得对-氟- α -甲基肉桂酸固体, 经水洗后, 干燥。

(B)对-氟- α -甲基氢化肉桂酸

于对-氟- α -甲基肉桂酸(177.9 克, 0.987 摩尔溶于 3.6 升乙醇中)乙醇溶液中加入 11 克 5% Pd/C, 通入氢气(40 大气压)在室温下氢化还原, 当氢气不再消耗后, 过滤掉催化剂, 减压蒸发溶剂后得到产物对-氟- α -甲基氢化肉桂酸。此产物直接用于下一步反应。

(C)6-氟-2-甲基茛酮

将对-氟- α -甲基氢化肉桂酸(93.2 克, 0.5 摩尔)慢慢加入 70°C (蒸气浴)的 932 克多磷酸中, 并慢慢搅拌, 逐渐升温至 95°C , 保持此温 1 小时, 冷却后加入 2 升水。用乙醚提取水悬浮液, 乙醚提取液分别用饱和氯化钠溶液、5% 碳酸氢钠溶液和水溶液洗涤, 干燥后用 200 克

硅胶浓缩，浓缩液加入到用 5% 乙醚—石油醚制备的硅胶柱上(5 磅)，用 5~10% 乙醚—石油醚洗脱，得到 6-氟-2-甲基茛酮。薄层层析用于检测洗脱过程。

(D)5-氟-2-甲基茛基-3-乙酸

6-氟-2-甲基茛酮(18.4 克, 0.112 摩尔)、氰基乙酸(10.5 克, 0.123 摩尔)、乙酸(6.6 克)和溶于干甲苯(15.5 毫升)的醋酸铵(1.7 克)混合, 搅拌, 回馏 21 小时, 反应释放的水用 Dean Stark 收集器收集。蒸发掉甲苯后, 残留物溶解于 60 毫升热乙醇和 14 毫升 2.2 当量氢氧化钾水溶液中。加入 22 克 85% 氢氧化钾水溶液(150 毫升水), 混合物在氮气中回馏 13 小时。减压除去乙醇后, 加入 500 毫升水。水溶液用乙醚提取洗涤, 然后与活性炭煮沸, 过滤后, 溶液用 50% 冰盐酸酸化至 pH2。沉淀物过滤, 干燥, 而得产物 5-氟-2-甲基茛基-3-乙酸(熔点 164 °C~166°C)。

(E)5-氟-2-甲基茛基-3-乙酰氯

5-氟-2-甲基茛基-3-乙酸(70 毫摩尔)溶于 70 毫升四氢呋喃中, 与草酰氯(70 毫摩尔溶于 35 毫升二氯甲烷, 2 摩尔当量)混合回馏 24 小时, 蒸发溶剂后得到的 5-氟-2-甲基茛基-3-乙酰氯直接用于下一步反应。

(F)5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

苄胺(5 毫摩尔)在室温下慢慢地加入到 5-氟-2-甲基茛基-3-乙酰氯(2.5 毫摩尔)的二氯甲烷溶液(10 毫升)中, 回馏过夜。分别用盐酸(10%)、水、碳酸氢钠水溶液(5%)洗涤, 有机层用硫酸钠干燥, 蒸发后得到产物。用二氯甲烷再结晶得到白色固体(熔点 144°C)。

(G)(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-N-苄基)-茛基乙酰胺

5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)- α -茛基乙酰胺(3.38 毫摩尔)、4-吡啶羧基醛(4 毫摩尔)和甲基氧化钠(1 摩尔溶于 30 毫升甲醇中)混合在氮气中加

热、搅拌 24 小时，冷却后，反应混合物倒入 2000 毫升冰水中，生成的沉淀物过滤后，用水洗涤，于真空中干燥。在乙腈中重结晶而得黄色固体(熔点 202°C)($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -吡啶)。

(H)(E)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

化合物 1G 在乙腈中重结晶的母液中以 E-异构体为主。纯的 E-异构体可经在乙腈中重复结晶而得。

例二

(Z)-5-氟-2-甲基-(3-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺(见例一 F)和 3-吡啶羧基醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同(只不过用 3-吡啶羧基醛代替 4-吡啶羧基醛)，用乙腈重结晶得到纯化产品(熔点 175°C)($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=3$ -吡啶基)。

例三

(Z)-5-氟-2-甲基-(2-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺(见例一 F)和 2-吡啶羧基醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同(只不过用 2-吡啶羧基醛代替 4-吡啶羧基醛)，用乙酸乙酯重结晶得到纯化产品(熔点 218°C)($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=2$ -吡啶基)。

例四

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-喹啉亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺(见例一 F)和 4-喹啉羧基醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同(只不过用 4-喹啉羧基醛代替 4-吡啶羧基醛)，用乙酸乙酯重结晶得到纯化产

品(熔点 239°C)($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -喹啉基)。

例五

(Z)-5-氟-2-甲基-(4,6-二甲基-2-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺 (见例一 F)和 4,6-二甲基-2-吡啶羧基醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4,6$ -二甲基-2-吡啶基)。

例六

(Z)-5-氟-2-甲基-(3-喹啉亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺 (见例一 F)和 3-喹啉羧基醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=3$ -喹啉基)。

例七

(Z)-5-氟-2-甲基-(2-喹啉亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺 (见例一 F)和 2-喹啉羧基醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=2$ -喹啉基)。

例八

(Z)-5-氟-2-甲基-(吡嗪亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺 (见例一 F)和吡嗪醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=$ 吡嗪基)。

例九

(Z)-5-氟-2-甲基-(3-哒嗪亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺 (见例一 F)和 3-哒嗪醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=3$ -哒嗪基)。

例十

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-嘧啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺 (见例一 F)和 4-嘧啶醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -嘧啶基)。

例十一

(Z)-5-氟-2-甲基-(2-甲基-4-嘧啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺 (见例一 F)和 2-甲基-4-嘧啶醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=2$ -甲基-4-嘧啶基)。

例十二

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-哒嗪亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺 (见例一 F)和 4-哒嗪醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -哒嗪基)。

例十三

(Z)-5-氟-2-甲基-(1-甲基-3-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺(见例一 F)和 1-甲基吡啶-3 羧醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=1$ -甲基-3-吡啶基)。

例十四(Z)-5-氟-2-甲基-(1-乙酰基-3-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺(见例一 F)和 1-乙酰基-3-吡啶羧醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=1$ -乙酰基-3-吡啶基)。

例十五(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺(A)5-氟-2-甲基-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基茛基-3-乙酰氯(见例一 E)和 2-氟苄胺反应而得, 反应步骤与例一 F 相同(只不过用 2-氟苄胺代替苄胺)。

(B)(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一的方法用 5-氟-2-甲基-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺和 4-吡啶羧醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -吡啶基)。

例十六(Z)-5-氟-2-甲基-(3-吡啶亚基)-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例十五 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺和 3-吡啶羧醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到

纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=3$ -吡啶基)。

例十七

(Z)-5-氟-2-甲基-(2-吡啶亚基)-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例十五 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺和 2-吡啶羧醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=2$ -吡啶基)。

例十八

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-喹啉亚基)-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例十五 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺和 4-喹啉羧醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -喹啉基)。

例十九

(Z)-5-氟-2-甲基-(3-吡嗪亚基)-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例十五 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺和 3-吡嗪醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=3$ -吡嗪基)。

例二十

(Z)-5-氟-2-甲基-(3-哒嗪亚基)-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例十五 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺和 3-哒嗪醛反应而得, 反应步骤与例一 G 相同, 重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=3$ -哒嗪基)。

例二十一

(Z)-5-氟-2-甲基-(3-嘧啶亚基)-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例十五 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺和 3-嘧啶醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=3$ -嘧啶基)。

例二十二

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-哒嗪亚基)-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例十五 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-2-氟基苄基)-茛基乙酰胺和 4-哒嗪醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -哒嗪基)。

例二十三

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

(A)5-氟-2-甲基-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

溶于 DMA(2 毫升)的 5-氟-2-甲基茛基-3-乙酸(按例一 D 制得)(2.6 毫摩尔)与正(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(4 毫摩尔)和 S-2-氨基-2-苯基乙醇(3.5 毫摩尔)在室温下反应二天，将反应混合物逐滴加入到搅拌中的冰水中(50 毫升)，过滤白色沉淀，此沉淀经水洗，真空干燥，用乙酸乙酯重结晶可得纯化产品。

(B)(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例一 G 的方法将 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺与 4-吡啶羧醛反应而得，反应步骤与例一 G 相

同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_2OH$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -吡啶基)。

例二十四

(Z)-5-氟-2-甲基-(3-吡啶亚基)-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例二十三 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺和 3-吡啶羧醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_2OH$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=3$ -吡啶基)。

例二十五

(Z)-5-氟-2-甲基-(2-吡啶亚基)-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例二十三 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺和 2-吡啶羧醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_2OH$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=2$ -吡啶基)。

例二十六

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-喹啉亚基)-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例二十三 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺和 2-喹啉羧醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_2OH$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -喹啉基)。

例二十七

(Z)-5-氟-2-甲基-(吡嗪亚基)-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例二十三 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺和吡嗪羧醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_2OH$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=$ 吡嗪基)。

例二十八

(Z)-5-氟-2-甲基-(3-哒嗪亚基)-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例二十三 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺和 3-哒嗪醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_2OH$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=3$ -哒嗪基)。

例二十九

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-嘧啶亚基)-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例二十三 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺和 4-嘧啶醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_2OH$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -嘧啶基)。

例三十

(Z)-5-氟-2-甲基-(4-哒嗪亚基)-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺

此化合物是用例二十三 A 中的 5-氟-2-甲基-3-(N-(S- α -羟甲基)苄基)-茛基乙酰胺和 4-哒嗪醛反应而得，反应步骤与例一 G 相同，重结晶得到纯化产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_2OH$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -哒嗪基)。

例三十一

外消旋-(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基- α -羟基乙酰胺

(A)5-氟-2-甲基-3-(N-苄基-N-羟基)-茛基乙酰胺

5-氟-2-甲基茛基-3-乙酰氯(10 毫摩尔)(见例一 E)溶于二氯甲烷(75 毫升)中, 此冷溶液在 0℃下慢慢加入(45~60 分钟)到 N-苄基羟基胺盐酸盐(12 毫摩尔)和三乙胺(22 毫摩尔)的二氯乙烷(100 毫升)混合液中, 将混合液加热到室温并搅拌 1 小时。用水(100 毫升)稀释混合液, 有机层用盐酸(二次, 每次 100 毫升)和盐水(二次, 每次 100 毫升)洗涤, 经硫酸镁干燥后蒸干。粗产品经快速色谱法纯化得终产品。

(B)5-氟-2-甲基-3-(N-苄基-N-甲磺酰氧基)-茛基乙酰胺

将三乙胺(5 毫摩尔)加入到 0℃的 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基-N-羟基)-茛基乙酰胺(5 毫摩尔)的二氯乙烷(25 毫升)溶液中, 搅拌 10 分钟, 逐滴加入甲磺酰氯(5.5 毫摩尔), 此溶液在 0℃下搅拌 2 小时, 加热至室温后再搅拌 2 小时。有机层用水(二次, 每次 20 毫升)、盐酸(15 毫升)和盐水(20 毫升)洗涤, 用硫酸镁干燥。旋转蒸馏后的产品用快速色谱法纯化得终产品。

(C)外消旋-5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)- α -羟基茛基乙酰胺

将三乙胺(2.1 毫摩尔)乙腈(24 毫升)溶液慢慢加入(大于 6 小时)到 5-氟-2-甲基-3-(N-苄基-N-甲磺酰氧基)-茛基乙酰胺(2 毫摩尔)的乙腈/水(各 12 毫升)溶液中, 搅拌过夜, 去除溶剂, 残留物用乙酸乙酯(60 毫升)稀释, 经水(四次, 每次 20 毫升), 盐酸(15 毫升)和盐水(20 毫升)洗涤, 硫酸镁干燥, 产品旋转蒸馏后重结晶得终产品。

(D)外消旋-(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基- α -羟基乙酰胺

此化合物由外消旋-5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)- α -羟基茛基乙酰胺而得, 反应步骤与例一 G 相同($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=OH$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -吡啶基)。

例三十二

2-(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基-氧基乙酰胺

按照 Pfitzner-Moffatt 氧化反应, 外消旋-(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基- α -羟基乙酰胺(1 毫摩尔)的 DMSO(5 毫升)溶液与二环己基碳二亚胺(3 毫摩尔)反应, 搅拌过夜, 蒸干溶剂。粗产品经快速色谱法纯化得终产品($R_1=F$, $R_2=CH_3$, R_3 与 R_4 合并形成 $C=O$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -吡啶基)。

例三十三

外消旋-(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶基)-3(N-苄基)-茛基- α -(2-丙胺)-乙酰胺

(A)5-氟-2-甲基-3-(N-2-丙基-N-羟基)-茛基乙酰胺是由 5-氟-2-甲基茛基-3-乙酰氯而得(见例一 E), 反应步骤与例三十一 A 相同(只不过用盐酸 N-2-丙基羟胺代替盐酸 N-苄基羟胺)。

(B)5-氟-2-甲基-3-(N-2-丙基-N-甲磺酰氧基)-茛基乙酰胺的制备与例三十一 B 的反应步骤相同。

(C)外消旋-5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)- α -(2-丙胺基)-乙酰胺

将苄胺(4.4 毫摩尔)的二氯甲烷(15 毫升)溶液慢慢加入(30 分钟)到 0°C 的 5-氟-2-甲基-3-(N-2-丙基-N-甲磺酰氧基)-茛基乙酰胺(2 毫摩尔)的二氯甲烷(25 毫升)溶液中, 并在 0°C 搅拌 1 小时, 在室温下放置过夜。去除溶剂后的残留物用 1 当量氢氧化钠处理后, 用二氯甲烷(100 毫升)萃取。萃取液水洗(二次, 每次 10 毫升)后, 用硫酸镁干燥。旋转蒸发后的产品用快速色谱法纯化。

(D)外消旋-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基- α -(2-丙胺基)-乙酰胺是由外消旋-5-氟-2-甲基-3-(N-苄基)- α -(2-丙胺基)-乙酰氯

而制得，反应步骤与例一 G 相同($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=$ 异丙胺基, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -吡啶基)。

例三十四

(Z)-6-甲氧基-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

(A)乙基-2-羟基-2-(对-甲氧基苯酚)-1-丙酸甲酯

36.2 克的锌粒(0.55 摩尔)置于一 500 毫升三颈瓶中，在 250 毫升漏斗中装入 80 毫升无水苯、20 毫升无水乙醚、80 克对甲氧基苯甲醛(0.58 摩尔)和 98 克(0.55 摩尔)的 2-溴丙酸乙酯溶液，剧烈搅拌下将约 10 毫升的溶液加入锌粒中，缓慢加温至产生放热反应。余下的溶液逐滴加入混合物中，加入的速率应使反应物平缓回流(约 30~35 分钟)。溶液加完后将混合物置于水浴上回流 30 分钟。将混合物冷至 0℃，剧烈搅拌下加入 250 毫升 10% 的硫酸溶液。苯层用 5% 的硫酸溶液萃取两次，每次 50 毫升，再用水洗涤两次，每次 50 毫升。将酸溶液与水层合并，并用乙醚萃取两次，每次 50 毫升。将乙醚溶液与苯层合并，并用硫酸钠干燥。蒸去溶剂并用 6"Vigreux 分馏柱分馏得到 89 克乙基-2-羟基-2-(对-甲氧基苯酚)-1-丙酸甲酯的粗产品(60%)，沸点 165~160℃(1.5 毫米)。

(B)6-甲氧基-2-甲基-2,3-二氢-1-茛酮

根据 Vander Zanden, Rec. Trav. Chim., 68, 413(1949)所述方法，A 中的化合物会转化成 6-甲氧基-2-甲基-2,3-二氢-1-茛酮。

此外还可通过另一种方法获得此化合物，即：将 α -甲基- β -(对-甲氧基苯基)丙酸(15 克)加入到 50℃ 的多聚磷酸(170 克)中，此混合物在 83~90℃ 加热 2 小时后倒入冰水中，搅拌一个半小时，用乙醚萃取三次。乙醚溶液经水洗两次、5% 碳酸氢钠洗涤 5 次直至去除所有酸性物质后，用硫酸钠干燥。溶液蒸干后得到 9.1 克灰黄色油状物。

(C)(Z)-6-甲氧基-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

根据例一 D 至 G 反应步骤中所述, 可用 6-甲氧基-2-甲基-2,3-二氢-1-茛酮替代例一 D 中的 6-氟-2-甲基 2,3-二氢-1-茛酮制备此化合物。

例三十五

(Z)-5-甲氧基-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

(A)5-甲氧基-2-甲基-3-茛基乙酸乙酯

将 13.4 克的 6-甲氧基-2-甲基-茛酮和 21 克的溴乙酸乙酯溶于 40 毫升苯中, 缓慢加入(5 分钟)到 110 毫升苯与 45 毫升干乙醚作溶剂的 21 克锌汞齐(制备方法参见 Org. Syn. Coll. Vol. 3)溶液中。加入少量结晶碘启动反应, 混合物由内部热能来保持回流温度(大约 65°C)。三小时后, 分两批加入每批 10 克的锌汞齐和 10 克的溴乙酯, 回流 8 小时。加入 30 毫升乙醇和 150 毫升乙酸。将反应物倒入 700 毫升 50% 的乙酸水溶液中, 分离有机层, 水层用乙醚提取两次。合并后的有机层用水, 氢氧化铵和水洗净, 硫酸钠干燥, 80°C(浴温)(1-2 毫米)真空抽干溶剂得粗产品(1-羟基-2-甲基-6-甲氧基-茛基)乙酸乙酯(18 克)。

将上述粗产品的羟基酯、20 克对甲苯磺酸一水化合物和 20 克无水氯化钙加入到 250 毫升甲苯中, 回流过夜。过滤后的固体物用甲苯洗涤。合并甲苯溶液后用水、碳酸氢钠和水洗涤, 然后用硫酸钠干燥。蒸干后的粗产品 5-甲氧基-2-甲基-3-茛基乙酸乙酯经酸洗过的氧化铝柱色谱分离, 用石油醚-乙醚(体积比 50~100%)洗脱后得黄色油状产品(11.8 克, 70%)。

(B)(Z)-5-甲氧基-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

根据例一 E 至 G 反应步骤中所述, 可用 5-甲氧基-2-甲基-3-茛基乙酸乙酯替代例一 E 中的 5-氟-2-甲基茛基-3-乙酸制备此化合物。

例三十六

(Z)- α -5-甲氧基-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基丙酰胺

(A) α -(5-甲氧基-2-甲基-3-茛基)丙酸

按照例三十五 A 的反应步骤, 以等量的 α -溴丙酸乙酯来代替溴乙酸乙酯, 即可得 α -(1-羟基-6-甲氧基-2-甲基-1-二氢化茛基)溴丙酸乙酯, 同样方式脱水后成 α -(5-甲氧基-2-甲基-3-茛基)溴丙酸乙酯。

将上述乙酯皂化后得到 α -(5-甲氧基-2-甲基-3-茛基)丙酸。

(B)(Z)- α -5-甲氧基-2-甲基-(4-吡啶基)-3-(N-苄基)- α -甲基茛基丙酰胺

根据例一 E 至 G 反应步骤中所述, 可用 α -5-甲氧基-2-甲基-(3-茛基)丙酸替代例一 E 中的 5-氟-2-甲基茛基-3-乙酸制备此化合物。

例三十七

(Z) α -氟-5-甲氧基-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)茛基乙酰胺

(A)5-甲氧基-2-甲基-3-茛基- α -氟乙酸甲酯

氟化钾(0.1 摩尔)与 5-甲氧基-2-甲基-3-茛基- α -甲苯磺酰氧基乙酸甲酯(0.05 摩尔)溶于 200 毫升二甲基甲酰胺溶液中, 在氮气中加热回流 2~4 小时, 冷却, 倒入冰水中, 并用乙醚萃取。乙醚溶液经水、碳酸氢钠洗后, 用硫酸钠干燥。蒸去溶剂后经酸洗过的氧化铝柱色谱分离, 用乙醚-石油醚(体积比 20~50%)洗脱后得产品 5-甲氧基-2-甲基-3-茛基- α -氟乙酸甲酯。

(B)(Z)- α -氟-5-甲氧基-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)-茛基乙酰胺

根据例一 E 至 G 反应步骤中所述, 可用 5-甲氧基-2-甲基-3-茛基- α -氟乙酸甲酯替代例一 E 中的 5-氟-2-甲基茛基-3-乙酸制备此化合物。

正如流程三中=CH-Y 部份所介绍的, 适当的任何杂环醛既可直接使用于碱催化缩合反应中, 也可用于另一种方法的 Wittig 反应中。下表一中列出了可能使用的杂环醛:

表一

吡咯-2-甲醛*
吡啶-2-乙醛
6-甲基吡啶-2-乙醛*
1-甲基苯并咪唑-2-乙醛
异喹啉-4-乙醛
4-吡啶羧醛*
3-吡啶羧醛*
2-吡啶羧醛*
4,6-二甲基-2-吡啶羧醛*
4-甲基-吡啶羧醛*
4-喹啉羧醛*
3-喹啉羧醛*
2-喹啉羧醛*
2-氟-3-喹啉羧醛*
吡嗪醛
(按 Rutner 等, JOC 1963, 28, 1898-99 文献中所述制备)
3-哒嗪醛
(按 Heinisch 等, Monatshefte Fuer Chemie <u>108</u> , 213-224, 1977 文 献中所述制备)
4-嘧啶醛
(按 Brederick 等, Chem. Ber. 1964, <u>97</u> , 3407-17 文献中所述制备)
2-甲基-4-嘧啶醛
(按 Brederick 等, Chem. Ber. 1964, <u>97</u> , 3407-17 文献中所述制备)
4-哒嗪醛
(按 Heinisch 等, Monatshefte Fuer Chemie <u>104</u> , 1372-1382(1973) 文献中所述制备)
1-甲基吲哚-3-羧醛*
1-乙酰基-3-吲哚羧醛*

*可由 Aldrich 公司提供

在前述反应流程中上述的醛可与各种适当的胺结合而得到本发明范围内的化合物。下表二中列出了适当胺的例子:

表二

苄胺

2, 4-二甲氧基苄胺

2-甲氧基苄胺

2-氟苄胺

4-二甲胺基苄胺

4-磺化胺苄胺

1-苯乙胺(R-对映体)

2-氨基-2-苯基乙醇(S-对映体)

2-苯基甘氨酸(S-对映体)

例三十八

(Z)-5-氟-2-甲基(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)茛基乙酰胺盐酸盐

将例一中的(Z)-5-氟-2-甲基-(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)茛基乙酰胺(1396 克; 分子量 384.45; 3.63 摩尔)溶于 45°C 的乙醇(28 升)中, 逐步加入盐酸水溶液(12 摩尔; 363 毫升)。反应混合物加热回流 1 小时后冷至室温, 在 -10°C 放置 3 小时。过滤后的固体物质用乙醚洗涤两次, 每次 1.5 升, 风干过夜, 70°C 真空干燥三天后得产品(Z)-5-氟-2-甲基(4-吡啶亚基)-3-(N-苄基)茛基乙酰胺盐酸盐, 熔点 207~209°C ($R_1=F$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$, $R_6=H$, $R_7=H$, $n=1$, $m=1$, $Y=4$ -吡啶基盐酸盐)。收率: 1481 克(97%; 3.51 摩尔); 分子量: 420.91 克/摩尔。

核磁共振氢谱(DMSO 氘化剂): 2.18(s,3, = C-CH₃); 3.54(s,2, = CH₂CO); 4.28(d,2,NCH₂); 6.71(m,1,ar.); 7.17(m,8,ar.); 8.11(d,2,ar., AB

系统); 8.85(m,1,NH); 8.95(d,2,ar., AB 系统); 红外光谱(溴化钾): 3432 NH; 1635 C=O; 1598 C=C。

生物效应的测定

(A)生长抑制的测定

例一化合物细胞生长抑制活力的测定采用人结肠肿瘤细胞株 SW-480(细胞来源 ATCC, Rockville, Md)。化合物对此细胞的生长抑制能作为抗前癌损伤和肿瘤的指标。此细胞株及生长抑制的测定方法已非常成熟, 能用来评估 NSAIDs 的抗肿瘤作用。此方法已被美国肿瘤研究所用于新抗肿瘤药物的筛选。

将药物先溶于 100%DMSO 中, 然后用 RPMI 培养液稀释成测定所需浓度。所有药物都在测试当天配制。所用的培养细胞为第 99 代。用含有 5%胎牛血清、2 毫摩尔谷氨酸、100 单位/毫升青霉素、100 单位/毫升链霉素和 0.25 微克/毫升二性霉素的 RPMI 培养液培养。细胞置于 37℃的 95%空气和 5%二氧化碳培养箱中, 在细胞接近长满表面密度时用 0.05%胰酶和 0.53 毫摩尔的 EDTA 消化传代。用于细胞抑制测定的细胞接种于 96 孔平底的测定板上。

肿瘤细胞生长抑制的测定采用 Sulforhodamine B(SRB)蛋白质结合的方法。肿瘤细胞先接种于 96 孔板中, 然后加入含有测定药物的培养液持续培养 6 天(持续性治疗)。在每个板上, 6 个孔用于没有药物治疗的空白对照, 6 个孔用于溶剂对照(0.1%DMSO), 其余的孔用于不同药物浓度, 每个药物浓度重复做三个孔。六天后, 固定细胞, 用 Sulforhodamine B 染色(一种能与蛋白质结合的染料), 与细胞蛋白质结合的染料被溶解后, 可用能读 96-孔板的光密度计来测定浓度。加入药物孔的密度(中数)除于溶剂对照组(六孔)的密度中数得到的商值可测定药物对于细胞生成的抑制作用。由于染色的密度和细胞数量或每孔蛋白含量成正比。因此, 得到的抑制百分比值可代表药物抑制细胞生长的程度。

对于每个实验，测得的半数抑制值可用于比较药物的有效程度，这个值等于可抑制肿瘤细胞生长 50% 时的药物浓度。半数抑制值由不同药物浓度作图求得。X-轴上用药物浓度的对数值。例一化合物的 SW480 细胞的半数抑制值为 0.724 微摩尔。

(B) 环氧化酶的抑制

环氧化酶催化花生四烯酸氧化成前列腺素和血栓素的反应。此发明例一化合物以及作为正对照化合物、舒林酸硫化物，都经过对是否抑制纯化的环氧化酶 I 型的评估。

此发明的化合物都经过对纯化环氧化酶的抑制作用的评估。环氧化酶是从公羊精液囊泡中提纯的，方法在 Boopathy, R 和 Balasubramnian, J, 1988 所著的文献中有详细描述。环氧化酶活力的测定在 Evans, A.T. 等著的“大麻主要成份对花生四烯酸代谢酶的抗炎作用” (Biochem. Pharmacol., 36:2035-2037, 1987) 中有详细描述。简单地说，纯化的环氧化酶和 100 微摩尔花生四烯酸在加入或不加入被测化合物的情况下，在 37°C 培养 2 分钟，然后加入三氯乙酸而终止反应。环氧化酶活力由测定 530nm 的吸收值而求得。

表三

举例化合物	环氧化酶 I %抑制(100 微摩尔) (*-1000·M)
舒林酸硫化物	86
1	<25

(C) 细胞程序性死亡

细胞程序性死亡测定采用测定死亡细胞的形态特征的方法，即用程序性死亡细胞的形态特征(如染色体浓缩等)。除用 HT-29 细胞以外，

药物溶液的制备和细胞培养的条件都与上面所述的 SRB 法(用于测定细胞生长抑制)相同。细胞(5×10^6 细胞/盘)接种于 12.5cm^2 细胞培养盘中, 等细胞快长满培养底盘时用吖啶橙和溴化乙锭(溴化 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓)染色后在荧光显微镜下测定细胞程序性死亡。悬浮的和贴壁的细胞用胰酶采集后合并, 用 PBS 洗涤三次。细胞再悬浮于 25 微升培养液和 1 微升含有 100 微升/毫升吖啶橙和 100 微克/毫升溴化乙锭的染料混合液中, 并轻轻摇匀。10 微升的混合液放于显微镜玻璃片上, 用 22mm^2 盖玻片盖上后用 40 倍镜头在过滤镜下观察。

在显微镜下随机地选取至少 100 个细胞组为一个样品, 核染色体浓缩的细胞计数为程序性死亡的细胞。实验结果列于表四中。

表四
化合物的细胞程序性死亡作用

化合物	细胞形态	DNA 片断化	
	%程序性死亡细胞 (1 微摩尔)	刺激倍数 (100 微摩尔)	有效半数剂量 (微摩尔)
1	88	4.2	29
2		5.4	
3		8.5	
4		3.9	
38			15

细胞程序性死亡还可用细胞 DNA 片断化的数量来测定。简要说, SW480 结肠肿瘤细胞种于 96-孔微孔板上(简称 MTP), 种量为 10,000 细胞/孔, 180 微升/孔。培养 24 小时后, 加入 20 微升含有药物的培养液, 继续培养 48 小时。

药物治疗后, 测定样品的制备步骤如下: 96 孔微孔板离心(1000 转/分, 15 分钟)后, 上层液体小心快速地倒去。使孔上细胞沉淀物重

新悬浮于 200 微升细胞裂解液中，于常温下培养 45 分钟以便于使细胞彻底裂解。细胞裂解混合物离心(15 分钟，1000 转/分)后，吸取 20 微升上层液体(细胞质部份)转移至涂有抗生蛋白链霉素的微孔测定板上。特别要注意别晃动含有细胞碎片的微孔板，因为细胞核含有高分子量的整体 DNA，摇动后会漂浮于上层液，因此影响实验结果。样品处理完后要马上测定。如在 4℃或-20℃贮藏会减少酶标的信号。

然后根据 DNA 片断化测定的步骤处理样品。光密度值可用于绘制剂量反应曲线。DNA 片断的定量采用由 Mannheim-Boehringer 生产的“细胞死亡测定酶标法”来测定。此测定方法是基于定量三明治-酶-免疫测定量的原理，主要用小鼠抗 DNA 和组蛋白的单克隆抗体来测定。此方法能特异性地检测细胞裂解液中细胞质部份的单和寡聚核小体。简要来说，测定步骤如下：样品(细胞裂解液、血清、细胞培养上层液等)放于涂有抗生蛋白链霉素的微孔板上，然后相继加入抗组蛋白-生物素和抗 DNA-POD 抗体的混合物，常温培养 2 小时。在培养期间，抗组蛋白抗体与核小体上的组蛋白结合，同时通过生物素把免疫复合体固定于涂有抗生蛋白链霉素的微孔板上，然后，抗 DNA-POD 的抗体与核小体上的 DNA 结合。洗涤除去多余不结合的抗体后，核小体的量可由结合于免疫复合体上的 POD 而定量测得。POD 的活力以 ABTS®(2,2'-连氨基-双[3-乙基苯噻唑啉-磺酸]作为底物，用光密度测定。

刺激倍数(FS=OD 最大值/OD 溶剂)是细胞程序性死亡反应的一个指标，每个化合物的刺激倍数经此方法测得。有效半数剂量经特异地数据处理软件或经每个化合物的有效浓度范围(ECR=最小有效剂量-最小达到峰值的剂量)来测得。所测试化合物的刺激倍数 FS 和有效半数剂量 EC₅₀ 值列于表四中。

另外，用 DNA 片断化试验法，又可得到化合物的剂量反应。具体数据列于表五中。

表五

剂量(微摩尔)	细胞程序性死亡水平(OD 平均值±标准偏差)
0.5	0.186±0.008
1.0	0.207±0.061
5.0	0.208±0.073
10	0.296±0.050
50	0.500±0.048
100	0.633±0.053
500	0.659±0.012

此发明的化合物可用制药上可接受的载体制成常规剂量的剂型而使前癌的病人可根据此发明的方法定期地用药。此发明化合物的正确初始剂量可用实验而测得，其中一项标准是初始剂量应该足够达到药物血液浓度接近于化合物的半数抑制值的百分比，此百分比的量可根据化学预防或化学治疗指数来定。初始剂量的计算还须考虑其他因素，像药物的剂型、给药途径(例如口服或静脉注射)。举例来说，假如一个病人的平均循环系统体积是四升，基于此发明的化合物的 IC_{50} (半数抑制剂量)，我们可计算出的初始剂量大约为 0.6 毫克至 4 克。如静脉注射，循环系统的药物浓度可达 IC_{50} 浓度。

此发明的化合物又是 cGMP-特异性磷酸二酯酶的抑制剂。正如美国专利申请号 09/046,739(申请日期 1998 年 3 月 24 日)中所述，化合物可用从肿瘤细胞 HT-29 或 SW480 中的磷酸二酯酶来测定对此酶的抑制能力。磷酸二酯酶活力可用已知方法测得，例如用放射性 3H -cGMP 作为 PDE5 酶的底物(Thompson, WJ., Teraski, W. L. Epstein, PM, Strada, s.J., *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, 10:69-92, 1997, 参见参考文献)。简要来说，含有 3H -cGMP 底物(0.2 微摩尔；100,000 cpm，含有 40 毫摩尔的 Tris 盐酸盐(pH=8.0)、5 毫摩尔氯化镁和 1 毫克/毫升白蛋白)的溶液和被测药物混合，总体积为 400 微升。混合物与从 HT-

29 细胞中部份纯化的 cGMP-特异性磷酸二酯酶在 30°C 培养 10 分钟，然后反应由煮沸 75 秒种而终止。在冰上冷却后，加入 100 微升 0.5 毫克/毫升蛇毒素(O. Hannah 毒素, Sigma 公司)，在 30°C 继续培养 10 分钟。加入 1 毫升的 100% 甲醇终止反应。测定的样品过阴离子交换层析柱(1 毫升 Dowex, Aldrich 公司)，用 1 毫升 100% 甲醇洗脱柱子，柱上流出的放射性总量可由液闪计数器测得。PDE5 的抑制程度可经用加入药物反应的放射性量与对照反应(不加入药物反应)的放射性量作比较计算而得。

用以上所述步骤，例一化合物的 cGMP-特异性磷酸二酯酶(HT29) 得 IC_{50} 值为 0.68 微摩尔。

在不脱离此发明主要思想的情况下，一些具体操作步骤、制剂和应用可作一些改变或修正。这些在以下权利要求项中有详细表述。