



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101421252 B

(45) 授权公告日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200780012735. 4

(22) 申请日 2007. 04. 12

(30) 优先权数据

60/744, 676 2006. 04. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 10. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/066481 2007. 04. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02007/121280 EN 2007. 10. 25

(73) 专利权人 塞诺菲 - 安万特股份有限公司

地址 法国巴黎

(72) 发明人 D · 斯泰梵尼 K · J · 哈里斯

T · A · 基莱斯皮 C · J · 伽德纳

J · C · 阿奎亚

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C07D 239/46 (2006. 01)

C07D 403/04 (2006. 01)

C07D 409/04 (2006. 01)

A61K 31/505 (2006. 01)

A61P 11/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 87103906 A, 1988. 02. 24, 权利要求 1-7.

W0 03/066047 A1, 2003. 08. 14, 权利要求 1-10.

审查员 郝鹏

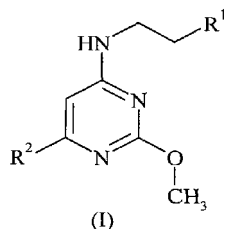
权利要求书 2 页 说明书 34 页

(54) 发明名称

作为前列腺素 D2 受体拮抗剂的 2, 6- 取代的 -4- 单取代氨基嘧啶

(57) 摘要

本 发 明 涉 及 式 (I) 化 合 物



其中 R¹和 R²如本文

所定义,或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其药学上可接受的前体药物,或该前体药物的药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物;药物组合物,其包含与药学上可接受的载体混合的药物有效量的一种或多种本发明的化合物;通过给患者施用药物有效量的本发明的化合物,为患者治疗由 PGD2 介导的障碍的方法,这些障碍包括但不限于过敏性疾病(如过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、特应性皮炎、支气管哮喘和食物过敏)、全身性肥大细胞增多症、伴随全身性肥大细胞活化的各种障碍、过敏反应休克、支气管狭窄、支气管炎、荨麻疹、湿疹、伴随瘙痒的各种疾病(如特应性皮炎和

荨麻疹)、以伴随瘙痒的行为(如搔痒和打击)作为次要原因而引起的各种疾病(如白内障、视网膜脱离、炎症、感染和睡眠障碍)、炎症、慢性阻塞性肺疾病、缺血性再灌注损伤、脑血管意外、慢性类风湿性关节炎、胸膜炎、溃疡性结肠炎等。

1. 化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物为:

1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-吡咯烷-3-甲酸,

2-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-2-甲基丙酸,

2-[3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-5-(1-羟基-1-甲基-乙基)-苯基]-丙-2-醇,

[6-(3-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺,

[6-(4-氨基哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺,
N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-4-基)-乙酰胺,

5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸,

2-甲基-丙-2-磺酸 [2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺,

N,N-二甲基酰胺-2-磺酸 [2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺,

2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-1-硫代吗啉-4-基-丙-1-酮,

2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-异丁酰胺,

2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-N,N-二甲基-异丁酰胺,

(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-乙酸,

1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸,

N-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-甲磺酰胺,

N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-甲磺酰胺,

乙磺酸 (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-酰胺,

2-甲基-丙-2-磺酸 (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-酰胺,

N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-C,C,C-三氟-甲磺酰胺,

1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸

(1H- 四唑 -5- 基)- 酰胺,

1- {6- [2- (2,4- 二氯 - 苯基)- 乙基氨基]-2- 甲氧基 - 嘧啶 -4- 基 }- 哌啶 -3- 甲酸酰胺,

1- {6- [2- (2,4- 二氯 - 苯基)- 乙基氨基]-2- 甲氧基 - 嘧啶 -4- 基 }- 哌啶 -3- 甲酸二甲基酰胺,

N, N- 二甲基酰胺 -2- 磺酸 1- {6- [2- (2,4- 二氯 - 苯基)- 乙基氨基]-2- 甲氧基 - 嘧啶 -4- 基 }- 哌啶 -3- 羧酰胺,

5- {2- 甲氧基 -6- [2- (4- 三氟甲氧基 - 苯基)- 乙基氨基]- 嘧啶 -4- 基 }- 噻吩 -2- 甲酸, 或

5- {6- [2- (2,4- 二氯 - 苯基)- 乙基氨基]-2- 甲氧基 - 嘧啶 -4- 基 }-2,3- 二氢 - 苯并呋喃 -2- 甲酸。

2. 药物组合物, 其包含药物有效量的权利要求 1 的化合物, 或其药学上可接受的盐, 与药学上可接受的载体混合。

3. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗下列疾病的药物中的用途: 过敏性疾病、全身性肥大细胞增多症、伴随全身性肥大细胞活化的障碍、支气管狭窄、支气管炎、伴随瘙痒的疾病、以伴随瘙痒的行为作为次要原因而引起的疾病、慢性阻塞性肺病、缺血性再灌注损伤、脑血管意外、慢性类风湿性关节炎、胸膜炎、或溃疡性结肠炎。

4. 根据权利要求 3 的用途, 其中以伴随瘙痒的行为作为次要原因而引起的疾病是白内障、视网膜脱离、炎症、感染或睡眠障碍。

5. 根据权利要求 3 的用途, 其中所述的过敏性疾病是过敏反应休克、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、特应性皮炎、支气管哮喘或食物过敏。

6. 根据权利要求 3 的用途, 其中伴随瘙痒的疾病是湿疹、特应性皮炎或荨麻疹。

7. 根据权利要求 3 的用途, 其用于治疗支气管哮喘。

8. 根据权利要求 3 的用途, 其用于治疗过敏性鼻炎。

9. 根据权利要求 3 的用途, 其用于治疗过敏性皮炎。

10. 根据权利要求 3 的用途, 其用于治疗过敏性结膜炎。

11. 根据权利要求 3 的用途, 其用于治疗慢性阻塞性肺疾病。

12. 药物组合物, 其包含药物有效量的权利要求 1 的化合物, 或其药学上可接受的盐, 以及选自抗组胺药、白三烯拮抗剂、 β 激动剂、PDE4 抑制剂、TP 拮抗剂和 CrTh2 拮抗剂的化合物, 与药学上可接受的载体混合。

13. 根据权利要求 12 的药物组合物, 其中的抗组胺药是非索非那定、氯雷他定或西替利嗪; 白三烯拮抗剂是孟鲁司特或扎鲁司特; β 激动剂是沙丁胺醇或特布他林; PDE4 抑制剂是罗氟司特和西洛司特; TP 拮抗剂是雷马曲班; CrTh2 拮抗剂也是雷马曲班。

作为前列腺素 D2 受体拮抗剂的 2,6- 取代的 -4- 单取代氨基嘧啶

发明领域

[0001] 本发明涉及 2,6- 取代 -4- 单取代的氨基嘧啶化合物、它们的制备、含有这些化合物的药物组合物,以及它们在治疗某些可通过抑制前列腺素 D2 受体而调节的疾病状态的药物用途。

[0002] 发明背景

[0003] 对过敏性鼻炎、支气管哮喘、过敏性结膜炎和特应性皮炎患者进行局部变应原激发后显示,在鼻腔及支气管的洗出液、眼泪及皮肤腔液中,前列腺素 D2 “(PGD2)” 水平迅速升高。PGD2 有许多致炎作用,比如增加结膜和皮肤的血管渗透性,增加鼻腔气道阻力,气道收缩以及嗜酸细胞对结膜和气管的浸润。

[0004] PGD2 是花生四烯酸的主要环氧化酶产物,是在免疫激发下从肥大细胞中产生的 [Lewis, RA, Soter NA, Diamond PT, Austen KF, Oates JA, Roberts LJ II, prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE (用抗 IgE 药物激活大鼠及人类肥大细胞后前列腺素 D2 的产生), J. Immunol 129, 1627-1631, 1982]。激活的肥大细胞是 PGD2 的主要来源,是在哮喘、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、过敏性皮炎等病症中推动过敏反应的关键因素之一。[Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ, New Insights into the role of the mast cell in asthma (肥大细胞在哮喘中的作用新解), Clin Exp Allergy 33, 550-556, 2003]。

[0005] PGD2 的许多作用都是通过其对 D 类前列腺素 (DP) 受体的作用介导的, D 类前列腺素受体是在上皮细胞和平滑肌上表达的 G 蛋白耦合性受体。

[0006] 长期以来,在哮喘研究方面,呼吸上皮细胞被认为是推动疾病发展的炎性细胞因子和趋化因子的主要来源 [Holgate S, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D, Bronchial Epithelium as a key Regulator of Airway Allergen Sensitization and Remodeling in Asthma (支气管上皮细胞作为哮喘中气道变应原致敏及重建的关键调节因子), Am J Respir Crit Care Med. 162, 113-117, 2000]。在哮喘的实验小鼠模型中,受到抗原激发时, DP 受体在气道上皮细胞上大幅上调 [Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Ushikubi F, Aze Y, Eguchi N, Urade Y, Yoshida N, Kimura K, Mizoguchi A, Honda Y, Nagai H, Narumiya S, prostaglandin D2 as a mediator of allergic Asthma (前列腺素 D2 作为过敏性哮喘的一种媒介), Science 287, 2013-2017, 2000]。在基因剔除小鼠中,由于缺乏 DP 受体,气道高反应性和慢性炎症都显著降低 [Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Ushikubi F, Aze Y, Eguchi N, Urade Y, Yoshida N, Kimura K, Mizoguchi A, Honda Y, Nagai H, Narumiya S, Prostaglandin D2 as a mediator of allergic Asthma (前列腺素 D2 作为过敏性哮喘的一种媒介), Science 287, 2013-2017, 2000] ; 气道高反应性和慢性炎症是人类哮喘的两个主要特征。

[0007] DP 受体还被认为与人类的过敏性鼻炎有关 ; 过敏性鼻炎是一种常见的过敏性疾

病,以打喷嚏、瘙痒、鼻漏及鼻塞等症状为特征。对鼻子局部施用 PGD₂,可引起剂量依赖性增加的鼻塞 [Doyle WJ, Boehm S, Skoner DP, Physiologic responses to intranasal dose-response challenges with histamine, methacholine, bradykinin, and prostaglandin in adult volunteers with and without nasal allergy(有鼻过敏症和无鼻过敏症的成人志愿者对组胺、乙酰甲胆碱、缓激肽和前列腺素鼻内剂量-反应激发的生理性反应), J Allergy Clin Immunol. 86(6 Pt 1), 924-35, 1990]。

[0008] 在豚鼠的实验性哮喘模型中, DP 受体拮抗剂已显示能减少气道炎症。[Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, Ohtani M, Arita H(2001), Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist(新颖前列腺素受体拮抗剂 S-5751 对过敏性炎症的预防作用), J Pharmacol Exp Ther. 298(2), 411-9, 2001]。因此, PGD₂ 似乎作用于 DP 受体,并在诱发过敏性哮喘的某些关键特征中起着重要作用。

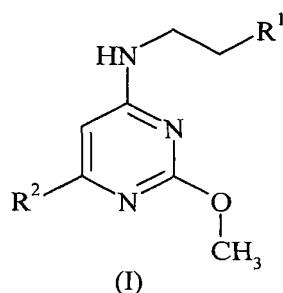
[0009] DP 拮抗剂已显示能在多个物种中有效缓解过敏性鼻炎症状,尤其是,已显示能抑制由抗原引发的鼻塞,这是过敏性鼻炎最明显的症状 [Jones, T. R., Savoie, C., Robichaud, A., Sturino, C., Scheigetz, J., Lachance, N., Roy, B., Boyd, M., Abraham, W., Studies with a DP receptor antagonist in sheep and guinea pig models of allergic rhinitis(一种 DP 受体拮抗剂在过敏性鼻炎的绵羊及豚鼠模型中的研究), Am. J. Resp. Crit. Care Med. 167, A218, 2003; 以及 Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, Ohtani M, Arita H, Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist(新颖前列腺素受体拮抗剂 S-5751 对过敏性炎症的预防)。J Pharmacol Exp Ther. 298(2), 411-9, 2001]。

[0010] DP 拮抗剂在过敏性结膜炎和过敏性皮炎的实验模型中也是有效的 [Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, Ohtani M, Arita H, Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751(新颖前列腺素受体拮抗剂 S-5751 对过敏性炎症的预防作用)。J Pharmacol Exp Ther. 298(2), 411-9, 2001; 以及 Torisu K, Kobayashi K, Iwahashi M, Nakai Y, Onoda T, Nagase T, Sugimoto I, Okada Y, Matsumoto R, Nanbu F, Ohuchida S, Nakai H, Toda M, Discovery of a new class of potent, selective, and orally active prostaglandin D₂ receptor antagonist(一种新型强效、选择性及口服有效的前列腺素 D₂ 受体拮抗剂的发现), Bioorg. & Med. Chem. 12, 5361-5378, 2004]。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及式 (I) 化合物:

[0013]



[0014] 其中：

[0015] R^1 为 2,4-二氯苯基或 4-三氟甲氧基-苯基,且

[0016] 当 R^1 为 2,4-二氯苯基时, R^2 为 3-羧基吡咯烷基、3,5-二(1-羟基-1-甲基-乙基)-苯基、3-氨基哌啶-1-基、4-氨基-哌啶-1-基、4-乙酰胺-哌啶-1-基、1-甲基-2-羧基-2,3-二氢-1H-吡啶-5-基、3-(1-叔丁基磺酰基氨基羰基-1-甲基乙基)-苯基、3-(1-二甲基氨基磺酰基氨基羰基-1-甲基-乙基)-苯基、3-(1-硫代吗啉-4-基羰基-1-甲基-乙基)-苯基、3-(1-氨基羰基-1-甲基-乙基)-苯基、3-(1-二甲基氨基羰基-1-甲基-乙基)-苯基、3-羧基甲基-哌啶-1-基、3-甲基磺酰基氨基羰基-哌啶-1-基、3-乙基磺酰基氨基羰基-哌啶-1-基、3-叔丁基磺酰基氨基羰基-哌啶-1-基、3-三氟甲基磺酰基氨基羰基-哌啶-1-基、3-[(1H-四唑-5-基)-氨基羰基]-哌啶-1-基、3-氨基羰基-哌啶-1-基、3-二甲基氨基羰基-哌啶-1-基、3-二甲基氨基磺酰基氨基羰基-哌啶-1-基,或 2-羧基-2,3-二氢-苯并呋喃-5-基,以及当 R^1 为 4-三氟甲氧基-苯基时, R^2 为 3-(1-甲基-1-羧基-乙基)-哌啶基、3-

[0017] 羧基哌啶基、3-甲基磺酰基氨基羰基-哌啶-1-基、5-羧基-噻吩-2-基,或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其药学上可接受的前体药物,或该前体药物的药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0018] 本发明的另一个方面为药物组合物,其包含药物有效量的一种或多种本发明的化合物,或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其药学上可接受的前体药物,或该前体药物的药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,与药学上可接受的载体混合。

[0019] 本发明的另一方面为通过给所述的患者施用药物有效量的本发明的化合物,或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其药学上可接受的前体药物,或该前体药物的药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,对患者治疗由 PGD2 介导的障碍的方法。这些障碍包括但不限于过敏性疾病(如过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、特应性皮炎、支气管哮喘和食物过敏)、全身性肥大细胞增多症、通过全身性肥大细胞活化的各种障碍、过敏反应休克、支气管狭窄、支气管炎、荨麻疹、湿疹、伴随瘙痒的各种疾病(如特应性皮炎和荨麻疹)、以伴随瘙痒的行为(如搔痒和打击)作为次要原因而引起的各种疾病(如白内障、视网膜脱离、炎症、感染和睡眠障碍)、炎症、慢性阻塞性肺病、缺血性再灌注损伤、脑血管意外、慢性类风湿性关节炎、胸膜炎、溃疡性结肠炎等。

[0020] 发明详述

[0021] 术语的定义

[0022] 如上文所用以及贯穿本发明的说明,下列各种术语,应理解为具有以下含义,除非另有说明：

[0023] “本发明的化合物”及其相当的表述,意为包括本文所述的式(I)化合物。该表述包括其药学上可接受的盐、溶剂化物(例如水合物)、前体药物,以及该前体药物的药学上可接受的盐、溶剂化物和水合物,视上下文而定。类似地,当提及中间体时,无论是否就其本身提出权利要求,均意为包括它们的盐和溶剂化物,视上下文而定。

[0024] “患者”包括人和其它哺乳动物。

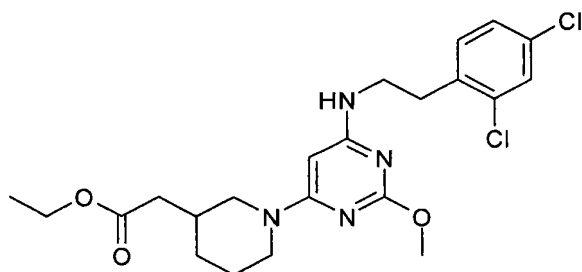
[0025] “药学上可接受的盐”是指本发明的化合物的非毒性的、无机酸和有机酸加成盐,以及碱加成盐。这些盐可在该化合物的最终分离和纯化阶段当场制备。

[0026] “药物有效量”意为能产生本文所述的所需的治疗效果(如减轻过敏或减轻炎症作用)的一种或数种本发明的化合物的量。

[0027] 本文中所述的“药学上可接受的前体药物”,意指本发明的化合物的这样一些前体药物:在合理的医学判断范围内,对于那些易出现过度的毒性、刺激和过敏性反应的患者,它们适合用于与身体组织接触,且具有一个合理的利益/风险比;而且,它们在本发明的化合物预定的用途方面是有效的。“前体药物”意指那些在生物体内转化(例如在血液中水解)而生成本发明的母体化合物的化合物。在体内能以代谢方式裂解而迅速转化的官能团可形成一类能与本发明的化合物的羧基反应的基团。它们包括但不限于下列基团:烷酰基(例如乙酰基、丙酰基、丁酰基等),未取代的和取代的芳酰基(例如苄酰基和取代的苄酰基),烷氧基羰基(例如乙氧基羰基),三烷基甲硅烷基(例如三甲基甲硅烷基和三乙基甲硅烷基),以及与二羧酸(例如丁二酰基)形成的单酯。由于本发明的化合物中能以代谢方式裂解的基团很容易在生物体内裂解,故含有这类基团的化合物可像前体药物那样起作用。含有能以代谢方式裂解基团的化合物的优点在于,由于该以代谢方式裂解基团的存在,提高了母体化合物的溶解性和/或吸收速率,故可显示出更好的生物利用度。以下文献提供了详尽的讨论:Design of Prodrugs(前体药物的设计),H. Bundgaard, ed., Elsevier(1985);Methods in Enzymology(酶化学的方法),K. Widder 等人, Ed., Academic Press, 42, 309-396(1985);A Textbook of Drug Design and Development(药物设计和研发教科书),Krogsgaard-Larsen and H. Bandaged, ed., Chapter 5;Design and Applications of Prodrugs(前体药物的设计和应用)113-191(1991);Advanced Drug Delivery Reviews(先进药物递送综述),H. Bundgaard, 8, 1-38, (1992);J. Pharm. Sci., 77, 285(1988);Chem. Pharm. Bull., N. Nakaya 等人, 32, 692(1984);Pro-drugs as Novel Delivery Systems(用作新型递送系统的前体药物),T. Higuchi and V. Stella, 14A. C. S. Symposium Series, 以及 Bioreversible Carriers in Drug Design(药物设计中的生物可逆性载体),E. B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987;本文引用上述文献作为参考。

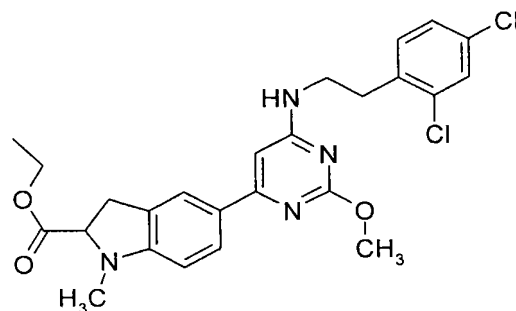
[0028] “酯类前体药”意指可在体内通过代谢方法(例如通过水解)转化为本发明化合物的化合物。例如,一种含有羟基的本发明的化合物的酯,可在体内通过水解转化为母体分子。或者,一种含有羧基的本发明的化合物的酯,可在体内通过水解转化为母体分子。示例性的酯类前体药为:

[0029]



[0030] (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-吡啶-3-基)-乙酸乙酯;以及

[0031]



[0032] 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸乙酯。

[0033] 适宜的含有羟基的本发明的化合物的酯为:例如乙酸酯、柠檬酸酯、乳酸酯、酒石酸酯、丙二酸酯、草酸酯、水杨酸酯、丙酸酯、琥珀酸酯、富马酸酯、马来酸酯、亚甲基-双-b-羟基萘甲酸酯、龙胆酸酯、羟乙基磺酸酯,二-对-甲苯酰基酒石酸酯、甲磺酸酯、乙磺酸酯,苯磺酸酯,对-甲苯磺酸酯、环己基氨基磺酸酯和奎尼酸酯。

[0034] 适宜的含有羧基的本发明的化合物的酯为:例如 F. J. Leinweber, DrugMetab. Res., 1987, 18, 第 379 页所述的那些酯。

[0035] 尤其有用的含有羟基的本发明的化合物的酯,可从 Bundgaard 等人, J. Med. Chem., 1989, 32, 第 2503-2507 页所述的那些羧基形成,并包括取代的(氨基甲基)苯甲酸酯,例如二烷基氨基甲基苯甲酸酯(其中所述的两个烷基可连接在一起和/或间隔一个氧原子或一个任意取代的氮原子,例如烷基化氮原子);尤其是(吗啉代-甲基)苯甲酸酯,例如 3-或 4-(吗啉代甲基)-苯甲酸酯;以及(4-烷基哌嗪-1-基)苯甲酸酯,例如 3-或 4-(4-烷基哌嗪-1-基)苯甲酸酯。

[0036] “溶剂化物”意指本发明的化合物与一个或数个溶剂分子的物理性结合。这种物理性结合包括氢键键合。在某些情况下,例如当结晶固体的晶格内含有一个或数个溶剂分子时,溶剂化物可以被分离。“溶剂化物”包括溶液相和可分离的溶剂化物。代表性的溶剂化物包括水合物、乙醇化物和甲醇化物。

[0037] 本发明的某些化合物是碱性的,而且游离碱形式或其药学上可接受的酸加成盐形式的这类化合物是有用的。

[0038] 酸加成盐是更便于使用的形式;实际上,以盐的形式使用在本质上相当于以游离碱的形式使用。用于制备酸加成盐的酸优选地包括这样的酸,当它们与游离碱结合时,将形成药学上可接受的盐,换言之,在药用剂量条件下该盐的阴离子对患者无毒性,使得该游离

碱内在有益的抑制作用不会因阴离子的副作用而受到损害。虽然所述碱性化合物的药学上可接受的盐是优选的,但所有的酸加成盐都可用作游离碱形式的来源,即使是某种特定的盐本身只是作为中间产物,例如,当仅仅是出于纯化和鉴别的目的而制备该盐时,或当使用该盐作为中间体以离子交换方法制备一种药学上可接受的盐时。尤其是,酸加成盐可通过让游离碱形式的纯化后化合物与适当的有机或无机酸分别反应、然后分离所形成的盐来制备。属于本发明范围内的药学上可接受的盐包括从无机酸和有机酸衍生的那些。示例性的酸加成盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、奎尼酸盐、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、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐、甲磺酸盐、葡庚酸盐、乳糖酸盐、氨基磺酸盐、丙二酸盐、水杨酸盐、丙酸盐、亚甲基-双-β-羟基萘甲酸盐、龙胆酸盐、羟乙基磺酸盐、二-对-甲苯酰基酒石酸盐、乙基磺酸盐、苯磺酸盐、环己基氨基磺酸盐和月桂基磺酸盐。参阅例如 S. M. Berge, 等人., “Pharmaceutical Salts,” (药用盐类) J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977), 本文引用作为参考。

[0039] 当本发明的化合物被酸性基团取代时,可形成碱加成盐,而且该盐是更便于使用的形式;实际上,以盐的形式使用在本质上相当于以游离酸的形式使用。用于制备碱加成盐的碱优选包括这样的碱,当它们与游离酸结合时,将形成药学上可接受的盐,换言之,在药用剂量条件下该盐的阳离子对患者无毒性,使得该游离碱内在有益的抑制作用不会因阴离子的副作用而受到损害。碱加成盐可通过让游离酸形式的纯化后化合物与从碱金属盐和碱土金属盐衍生的适当的有机碱或无机碱分别反应、然后分离所形成的盐来制备。碱加成盐包括药学上可接受的金属盐和胺盐。适当的金属盐包括钠盐、钾盐、钙盐、钡盐、锌盐、镁盐以及铝盐。优选的盐为钠盐和钾盐。适当的无机碱加成盐是从金属的碱制备的,该金属的碱包括氢化钠、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化锌等。适当的胺的碱加成盐是从某些胺制得的,这些胺具有足够的碱性以形成一种稳定的盐,优选地包括药物化学中经常使用的那些胺,由于它们具有适合于医学用途的低毒性和可接受性。氨、乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、N-苄基苯乙胺、二乙胺、哌嗪、三(羟基甲基)氨基甲烷、四甲基氢氧化铵、三乙胺、二苄胺、苯丙胺、二氢松香胺、N-乙基哌啶、苄胺、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺、碱性的氨基酸如赖氨酸和精氨酸,以及二环己胺。

[0040] 本发明的化合物的盐不但其本身作为活性化合物是有用的,从纯化该化合物的目的而言,它们也是有用的,例如,以本领域技术人员众所周知的技术,利用该盐、副产物和/或初始材料与母体化合物之间在溶解性上的差别可纯化该化合物。

[0041] 应该意识到,本发明的化合物可能含有不对称中心。这些不对称中心可以分别是R构型或S构型。对于本领域技术人员显而易见的是,本发明的某些化合物也可显示几何异构现象。应该理解,本发明的范围包括上述本发明的化合物的各种几何异构体和立体异构体及其混合物,包括外消旋混合物。这样的异构体可通过应用或改进已知的方法如色谱技术和重结晶技术,从它们的混合物中分离出来,或者也可从与其中间体对应的异构体分别制备。此外,在本发明的化合物可能存在互变异构体的情况下,本发明意在包括该化合物所有的互变异构体。

[0042] 本发明的特别的实施方式

[0043] 本发明的一种具体实施方式是式 (I) 的化合物, 其为:

[0044] 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲基-嘧啶-4-基}-吡咯烷-3-甲酸,

[0045] 2-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-2-甲基-丙酸,

[0046] 2-[3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-5-(1-羟基-1-甲基-乙基)-苯基]-丙-2-醇,

[0047] [6-(3-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺,

[0048] [6-(4-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺,

[0049] N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-4-基)-乙酰胺,

[0050] 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸,

[0051] 2-甲基-丙-2-磺酸[2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺,

[0052] N,N-二甲基酰胺-2-磺酸[2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺,

[0053] 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-1-硫代吗啉-4-基-丙-1-酮,

[0054] 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-异丁酰胺,

[0055] 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-N,N-二甲基-异丁酰胺,

[0056] (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-乙酸,

[0057] 1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸,

[0058] N-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-甲磺酰胺,

[0059] N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-甲磺酰胺,

[0060] 乙磺酸(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-酰胺,

[0061] 2-甲基-丙-2-磺酸(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-酰胺,

[0062] N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-C,C,C-三氟-甲磺酰胺,

[0063] 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸(1H-四唑-5-基)-酰胺,

[0064] 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸酰胺,

[0065] 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸二甲基酰胺,

[0066] N,N-二甲基酰胺-2-磺酸 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酰胺,

[0067] 5-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-噻吩-2-甲酸,或

[0068] 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸,

[0069] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其药学上可接受的前体药物,或该前体药物的药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0070] 本发明另一种特别的实施方式是式(I)的化合物或其酯类前体药物,其为:

[0071] 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲基-嘧啶-4-基}-吡咯烷-3-甲酸,

[0072] 2-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-2-甲基-丙酸,

[0073] 2-[3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-5-(1-羟基-1-甲基-乙基)-苯基]-丙-2-醇,

[0074] [6-(3-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺,

[0075] [6-(4-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺,

[0076] N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-4-基)-乙酰胺,

[0077] 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸,

[0078] 2-甲基-丙-2-磺酸[2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺,

[0079] N,N-二甲基酰胺-2-磺酸[2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺,

[0080] 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-1-硫代吗啉-4-基-丙-1-酮,

[0081] 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-异丁酰胺,

[0082] 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-N,N-二甲基-异丁酰胺,

[0083] (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-乙酸,

[0084] 1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸,

[0085] N-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-甲磺酰胺,

[0086] 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸乙酯,

[0087] (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-乙酸乙酯,

[0088] N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-甲磺酰胺,

[0089] 乙磺酸(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-酰胺,

[0090] 2-甲基-丙-2-磺酸(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-酰胺,

[0091] N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-C,C,C-三氟-甲磺酰胺,

[0092] 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸(1H-四唑-5-基)-酰胺,

[0093] 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸酰胺,

[0094] 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸二甲基酰胺,

[0095] N,N-二甲基酰胺-2-磺酸1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酰胺,

[0096] 5-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-噻吩-2-甲酸,或

[0097] 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸,

[0098] 或其药学上可接受的盐、水合物、或溶剂化物。

[0099] 本发明的化合物以及用于其制备的中间体和初始材料按照 IUPAC 命名规则命名,其中特征基团作为主要基团而引述的优先次序递减如下:酸、酯、酰胺等。但是应该理解,对于同时以结构式和命名名称提到的某一特定化合物,如果其结构式和命名名称互相不一致,则以结构式为准。

[0100] 本发明的化合物呈现了前列腺素 D2 受体拮抗剂活性,可作为药理学活性剂使用。因此,它们被纳入药物组合物并用于治疗患有某些医学障碍的患者。

[0101] 根据文献和下文中药理学试验部分所述的试验,本发明范围内的化合物是前列腺素 D2 受体的拮抗剂,而且这些试验结果据信与人和其它哺乳动物体内的药理学活性相

关。因此,在进一步的实施方式中,本发明提供了本发明的化合物和含有本发明的化合物的药物组合物,用于那些患有或易患可通过施用 PGD2 拮抗剂而获改善的病症的患者的治疗。例如,本发明的化合物可用于治疗各种各样由 PGD2 介导的障碍,包括但不限于过敏性疾病(如过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、特应性皮炎、支气管哮喘和食物过敏)、全身性肥大细胞增多症、伴随全身性肥大细胞活化的各种障碍、过敏反应休克、支气管狭窄、支气管炎、荨麻疹、湿疹、伴随瘙痒的各种疾病(如特应性皮炎和荨麻疹)、以伴随瘙痒的行为(如搔痒和打击)作为次要原因而引起的各种疾病(如白内障、视网膜脱离、炎症、感染和睡眠障碍)、炎症、慢性阻塞性肺疾病、缺血性再灌注损伤、脑血管意外、慢性类风湿性关节炎、胸膜炎、溃疡性结肠炎等等。

[0102] 本发明的化合物在涉及与下列药物的组合疗法的治疗中也是有用的:

[0103] (i) 抗组胺药,例如非索非那定、氯雷他定和西替利嗪,用于治疗过敏性鼻炎;

[0104] (ii) 白三烯拮抗剂,例如孟鲁司特和扎鲁司特,用于治疗过敏性鼻炎、COPD、过敏性皮炎、过敏性结膜炎等。请具体参考 W001/78697A2 的专利要求;

[0105] (iii) β 激动剂,例如沙丁胺醇(albuterol)、沙丁胺醇(salbuterol)和特布他林,用于治疗哮喘、COPD、过敏性皮炎、过敏性结膜炎等;

[0106] (iv) 抗组胺药,例如非索非那定、氯雷他定和西替利嗪,用于治疗哮喘、COPD、过敏性皮炎、过敏性结膜炎等;

[0107] (v) PDE4(磷酸二酯酶 4)抑制剂,例如罗氟司特和西洛司特,用于治疗哮喘、COPD、过敏性皮炎、过敏性结膜炎等;或

[0108] (vi) TP(血栓烷 A2 受体)或 CrTh2(在 Th2 细胞上表达的化学引诱物受体-同源分子)拮抗剂,例如雷马曲班(Ramatrobran)(BAY-u3405),用于治疗 COPD、过敏性皮炎、过敏性结膜炎等。

[0109] 本发明的治疗方法的特别的实施方式是过敏性鼻炎的治疗。

[0110] 本发明的治疗方法的另一特别的实施方式是支气管哮喘的治疗。

[0111] 依照本发明的另一特点,提供了一种方法,可用于治疗患有或易患某些病症(例如上文所述的一些病症),但经过服用前列腺素 D2 受体拮抗剂可获得改善的人类或动物患者。该方法包括给患者施用有效量的本发明化合物或含有本发明的化合物的组合物。“药物有效量”旨在说明作为前列腺素 D2 受体拮抗剂起作用、从而产生所需疗效的本发明的化合物的量。

[0112] 本文中提及的治疗应被理解为包括预防性治疗和确诊病症的治疗。

[0113] 本发明在其范围内还包括各种药物组合物,包含至少一种本发明的化合物与药学上可接受的载体。

[0114] 实际上,本发明的化合物可以药学上可接受的剂型,通过局部性或全身性施用方式施用于人和其它动物,包括口服、吸入、直肠、鼻腔、口腔、舌下、阴道、结肠、肠胃外(包括皮下、肌内、静脉、皮内、鞘内和硬膜外)、脑池内,以及腹腔内施用。应该理解,优选的途径可随受药者的身体状况而变化。

[0115] “药学上可接受的剂型”意指本发明的化合物的剂型,包括,例如片剂、糖衣丸、粉剂、酞剂、糖浆、包括悬浮液在内的液体制剂、喷雾剂、吸入片剂、锭剂、乳液、溶液、颗粒、胶囊和栓剂,以及用于注射的液体制剂,包括脂质体制剂。其技术和制剂通常可在雷氏药大

全 (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版) 中找到。

[0116] 本发明的一个特别方面提供了一种以药物组合物形式施用的依照本发明的化合物。依照本发明的药物组合物包含本发明的化合物和药学上可接受的载体。

[0117] 取决于施用方式和剂型, 药学上可接受的载体包括至少一种以下的成分: 药学上可接受的载体、稀释剂、包衣、辅剂、赋形剂或溶媒, 如防腐剂、填充剂、崩解剂、润湿剂、乳化剂、乳液稳定剂、悬浮剂、等渗剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、着色剂、抗菌剂、抗真菌剂、其它治疗剂、润滑剂、吸附延缓或促进剂、以及分散剂。

[0118] 示例性的悬浮剂包括乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇酯和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄耆胶, 或这些物质的混合物。

[0119] 示例性的预防微生物作用的抗菌剂和抗真菌剂包括对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等。

[0120] 示例性的等渗剂包括糖、氯化钠等。

[0121] 示例性的用于延缓吸收的吸附延缓剂包括单硬脂酸铝和明胶。

[0122] 示例性的用于增加吸收的吸附促进剂包括二甲基亚砷和相关类似物。

[0123] 示例性的稀释剂、溶剂、溶媒、增溶剂、乳化剂和乳液稳定剂包括水、氯仿、蔗糖、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、四氢糠醇、苯甲酸苯甲酯、多元醇、丙二醇、1,3-丁二醇、甘油、聚乙二醇、二甲基甲酰胺、Tween [®] 60、Span [®] 60、鲸蜡醇硬脂醇混合物、肉豆蔻醇、单硬脂酸甘油酯和月桂烷基硫酸钠、脱水山梨糖醇脂肪酸酯、植物油 (如棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油) 以及可注射的有机酯如油酸乙酯等, 或这些物质的适当混合物。

[0124] 示例性的赋形剂包括乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙和磷酸二钙。

[0125] 示例性的崩解剂包括淀粉、藻酸以及某些络合的硅酸盐类。

[0126] 示例性的润滑剂包括硬脂酸镁、月桂基硫酸钠、滑石粉, 以及高分子量聚乙二醇。

[0127] 药学上可接受的载体的选择通常取决于活性化合物的化学性质 (如可溶性)、施用的特定方式和用药过程中须遵守的规定。

[0128] 适合于口服施用的本发明的药物组合物可以独立的单元存在如固体剂型, 如每剂含有预定剂量活性成分的胶囊、扁胶囊或片剂, 或粉末或颗粒; 也可制成液体剂型如溶液或水性或非水性悬浮液, 或者水包油乳液或油包水乳液。活性成分也可以大丸剂、药糖剂或糊剂存在。

[0129] “固体剂型”意指本发明的化合物的剂型是固态形式, 例如胶囊、片剂、丸剂、粉末、糖衣丸或颗粒。在这种固体剂型中, 本发明的化合物与至少一种常用的惰性赋形剂 (或载体) 混合, 如柠檬酸钠或磷酸二钙或 (a) 填充剂或增量剂, 例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸, (b) 粘合剂, 例如羧甲基纤维素、藻酸盐类、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶, (c) 保湿剂, 例如甘油, (d) 崩解剂, 例如琼脂、碳酸钙、马铃薯粉或木薯淀粉、藻酸、某些络合的硅酸盐类和 Na_2CO_3 , (e) 溶液阻滞剂, 例如石蜡, (f) 吸收促进剂, 例如季铵化合物, (g) 润湿剂, 例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯, (h) 吸附剂, 例如高岭土和膨润土, (i) 润滑剂, 例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠, (j) 遮光剂, (k) 缓冲剂, 以及可在肠道某一部分以缓释方式释放本发明的化合物的药物。

[0130] 片剂可以压制或模制的方式制备,任选还可含有一种或多种辅助成分。压制片剂可通过将活性成分以自由流动形式如粉末或颗粒,任选地与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂混合,再在适当的机器中压制而制备。赋形剂如乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸二钙,崩解剂如淀粉、藻酸以及某些与硬脂酸镁、月桂基硫酸钠及滑石粉等润滑剂相结合的复杂硅酸盐类都可以使用。用惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物的混合物可在适当的机器中模制而制成模制片剂。片剂可任选地包衣或刻痕,也可配制成使所含活性成分得以缓慢或控制性释放。

[0131] 固体组合物也可作为软胶囊和硬胶囊的填充剂,以乳糖以及高分子量聚乙二醇等为赋形剂。

[0132] 如果需要,并为了更有效的分布,化合物可用微胶囊密封或附着于一种缓释或靶向给药体系,例如生物兼容的、可生物降解的聚合物基质(如聚(d, l-丙交酯乙交酯共聚物))、脂质体和微球体,并通过一种被称为皮下或肌肉贮库的技术进行皮下注射或肌肉注射,使该化合物在两周或更长时间内得以持续缓慢地释放。该化合物可以各种方式灭菌,例如,用除菌过滤器过滤,或将除菌剂加入到无菌固体药物组合物中,在使用前再溶于无菌水或其它无菌注射介质中。

[0133] “液体剂型”意指给患者施用的活性化合物的剂型是处于液态,例如药学上可接受的乳浊液、溶液、悬浮液、糖浆剂和酏剂。除活性化合物之外,液体剂型可含有本领域中常用的惰性稀释剂,例如溶剂、增溶剂和乳化剂等。

[0134] 当使用水性悬浮液时,它们可含有乳化剂或促进悬浮的试剂。

[0135] 适合于局部施用的药物组合物意指以适合于患者局部施用的形式而存在的制剂。可将此制剂配制成本领域内众所周知的局部使用的软膏、油膏、粉剂、喷雾剂和吸入剂、凝胶剂(水性或醇性)、乳膏;或者,加入一种基质以贴片形式敷用,使得化合物可经由皮肤障碍控制性释放。当配制成软膏时,活性成分可与石蜡或水溶性软膏基质一起使用。或者,活性成分可以水包油乳膏基质配制成乳膏。适合于在眼部局部施用的制剂包括滴眼剂,其中活性成分系溶解或悬浮于适当的载体中,尤其是该活性成分的水性溶剂。适合于在口腔局部施用的制剂包括调味基质中含有活性成分的锭剂,该基质通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶;还包括惰性基质中含有活性成分的芳香锭剂,该惰性基质的例子为明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶;还包括在适当液体载体中含有活性成分的漱口剂。

[0136] 乳液状药物组合物的油相可以已知的方式由已知的成分组成。虽然该相可仅由乳化剂组成,但它最好含有由至少一种乳化剂与一种脂肪或油,或与脂肪和油两者所组成的混合物。在特别的实施方式中,亲水乳化剂与作为稳定剂的亲脂乳化剂一起使用。该乳化剂单独或与稳定剂一起构成乳化蜡,与油和脂肪一起则构成乳化软膏基质,后者形成乳膏制剂的油性分散相。

[0137] 如果需要,乳膏基质的水相可包括例如至少 30% w/w 的多元醇,即含有两个或两个以上羟基的醇,如丙二醇、丁烷 1,3-二醇、甘露醇、山梨糖醇、甘油和聚乙二醇(包括 PEG400)及其混合物。可取的是,局部应用的制剂可含有促进吸收或促进活性成分穿透皮肤或其它受影响部位的化合物。

[0138] 适合于组合物的油类或脂肪的选择是基于能否获得所需的性质。因此,乳膏应优选非油脂、不着色及容易洗去的产品,并具有适当的稠度以避免从软管或其它容器中渗漏

出来。直链或支链、一元或二元的烷基酯如豆蔻酸二异丙酯、油酸癸酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸丁酯、棕榈酸-2-乙基己酯或被称为 Crodamol CAP 的支链酯混合物均可以使用。取决于所需的性质,可以单独使用或结合使用这些。或者,也可使用高熔点脂质如白色软石蜡和/或液体石蜡或其它矿物油。

[0139] 适合于直肠或阴道施用的药物组合物,意指以适合于患者经由直肠或阴道施用的制剂,并且含有至少一种本发明的化合物。栓剂是这种制剂的一种特别形式,可将本发明的化合物与适当的无刺激性赋形剂或载体如可可脂、聚乙二醇或某种栓剂用蜡混合的方式来制备。这些载体在常温下是固体但在体温时为液体,因此可在直肠或阴道腔中融化并释放活性组分。

[0140] 以注射方式施用的药物组合物可经由肌肉、静脉内、腹腔内和/或皮下进行注射。本发明的组合物可配制在液体溶液中,尤其是生理上兼容的缓冲液如 Hank 溶液或 Ringer 溶液中。此外,该组合物可配制成固态形式并在使用之前再重新溶解或混悬。冻干的形式也包括在内。此制剂是无菌的,且包括乳液、悬浮液、含水与不含水注射溶液,可含有悬浮剂和增稠剂以及抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂,以及使该制剂与预期受药者的血液等渗,并调节至适当 pH 值的溶质。

[0141] 适合于经鼻腔或吸入途径施用的本发明的药物组合物,意指以适合于患者经鼻腔或吸入途径施用的形式的组合物。此组合物可含有粉末状载体,其粒径为例如 1 至 500 微米的范围(包括 20 和 500 微米之间的范围,以 5 微米为增量,例如 30 微米、35 微米等)。其载体为液体的适当组合物,例如作为鼻腔喷剂或滴剂而施用的组合物,包括活性成分的水溶液或油溶液。适合于以气雾剂施用的药物组合物可按照传统的方法制备,并可与其它治疗剂一起递送。计量制剂吸入器可用于施用吸入疗法的本发明组合物。

[0142] 本发明的组合物所含活性成分的实际剂量水平可以改变,以便确定活性成分的药物有效量,使得患者对某种特定的组合物和施用方法产生所需的治疗反应。因此,为任何特定患者选择的剂量水平取决于所希望的治疗作用等各种因素,取决于施用途径,取决于所希望的治疗持续时间、疾病的病因和严重性,患者的病情、体重、性别、饮食和年龄,每种活性成分的类型和效价、吸收、代谢和/或排泄的速率及其它因素。

[0143] 患者每日单次或分次施用的本发明的化合物的日总剂量可以是,例如,每天按每公斤体重计约 0.001 至约 100mg/kg,优选 0.01 至 10mg/kg/天。例如,一个成年人每日按每公斤体重计的吸入剂量通常是约 0.01 至约 100mg/kg,优选约 0.01 至 10mg/kg;每日按每公斤体重计的口服剂量是约 0.01 至 100mg/kg,优选约 0.1 至 70mg/kg;更特别的是 0.5 至 10mg/kg;每日按每公斤体重计的静脉内施用剂量是约 0.01 至 50mg/kg,优选 0.01 至 10mg/kg。组合物中活性组分的百分比可以改变,但它仍应构成一定的比例,以获得某一适当的剂量。剂量单位组合物的含量可以是每日剂量的一部分,由若干单位剂量组成每日剂量。显然,几种形式的单位剂量可以几乎同时施用。为了获得所需的治疗作用,可以根据需要而频繁地施用某一剂量。某些患者可能会对较高或较低的剂量迅速地作出反应,也可能发现低得多的剂量已足以维持。对于另一些患者,按照每个具体患者的生理要求,可能有必要进行每日 1 至 4 个剂量的长期治疗。自不待言,对于另一些患者,将有必要每日只开不超过一个剂量或两个剂量的药。

[0144] 该制剂可用药剂学领域中众所周知的任何方法制备成单位剂量形式。这些方法包

括将活性成分与由一种或多种辅助成分构成的载体相结合的步骤。通常,这些制剂将活性组分与液体载体或磨得很细的固体载体或这两者一起均匀和密切地结合,然后,若有必要,使产品成形。

[0145] 这些制剂可置于单位剂量或多剂量容器内,例如密封的安瓿剂和带胶塞的管形瓶,并可在冻干条件下保存,只需在使用之前加入无菌液体载体如注射用水。实时准备的注射溶液和悬浮液可从前述的那类无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0146] 本发明的化合物可通过应用或改进已知的方法来制备,所谓已知的方法是指此前使用的方法或文献中叙述的方法,例如 R. C. Larock 在 *Comprehensive Organic Transformations* (VCH publishers, 1989) 中所述的那些方法。

[0147] 依照本发明的另一个特点,本发明的化合物的酸加成盐可通过应用或改进已知的方法通过游离碱与适当的酸进行反应来制备。例如,本发明的化合物的酸加成盐可通过以下任一步骤制备:或者是将该游离碱溶于水或醇的水溶液,或其它含有适当酸的适当溶剂,并通过蒸发该溶液而分离出该盐;或者是让该游离碱在一种有机溶剂中与酸反应,在此情况下可直接分离出该盐或可通过浓缩该溶液而获得该盐。

[0148] 本发明的化合物的酸加成盐可通过应用或改进已知的方法从盐再生。例如,通过用一种碱例如碳酸氢钠水溶液或氨水溶液处理,本发明的母体化合物可从它们的酸加成盐再生。

[0149] 本发明的化合物可通过应用或改进已知的方法从它们的碱加成盐再生。例如,通过用一种酸例如盐酸处理,本发明的母体化合物可从它们的碱加成盐再生。

[0150] 在本发明的制备过程中,本发明的化合物可以溶剂化物(例如水合物)的形式很方便地制备或形成。通过使用有机溶剂例如二噁烷、THF 或 MeOH,从水/有机溶剂的混合物中重结晶的方式,可很方便地制备本发明化合物的水合物。

[0151] 依照本发明的另一个特点,本发明化合物的碱加成盐可通过应用或改进已知的方法通过游离酸与适当的碱进行反应来制备。例如,本发明化合物的碱加成盐可通过以下任一步骤制备:或者是将该游离酸溶于水或醇的水溶液,或其它含有适当碱的适当溶剂,并通过蒸发该溶液而分离出该盐;或者是让该游离酸在一种有机溶剂中与碱反应,在此情况下可直接分离出该盐,或可通过浓缩该溶液而获得该盐。

[0152] 初始材料和中间体可通过本申请中所述的方法或改进已知的方法来制备。

[0153] 通过审查以下实施例,本发明的化合物、它们的方法或制备、以及它们的生物活性将显得更加清楚。这些实施例只是作为例证而提出的,而且不应被认为是限制本发明的范围。本发明的化合物是通过以下分析方法鉴定的。

[0154] 确定保留时间 (R_f) 和相关的质量离子的高压液相色谱-质谱 (LCMS) 实验是采用以下方法之一进行的。

[0155] 质谱 (MS) 是用 Micromass LCT 质谱仪记录的。此方法是正电喷射离子化,扫描质量 m/z 为 100 至 1000。液相色谱是在 Hewlett Packard 1100 系列二元泵及脱气器上进行的;固定相:phenomenex Synergi 2 μ Hydro-RP20X4.0mm 柱,流动相:A = 0.1% 甲酸 (FA) 水溶液,B = 0.1% FA 乙腈溶液。进样量为 5 μ L,用 CTC Analytical PAL System 进样。流量为 1 mL/分钟。梯度为 3 分钟内从 10% B 增至 90% B,2 分钟内从 90% B 增至 100% B。辅助检测器为:Hewlett Packard 1100 系列 UV 检测器,波长 = 220nm 以及 Sedere SEDEX75 蒸

发光散射检测器 (ELS), 温度 = 46°C, 氮压 = 4 巴。

[0156] 300MHz¹H核磁共振光谱 (NMR) 是用配有 ASW5mm 探头的 VarianMercury (300MHz) 型光谱仪于环境温度下记录的。在 NMR 中, 化学位移 (δ) 参照作为内标的四甲基硅烷 (TMS) 以 ppm 为单位表示。

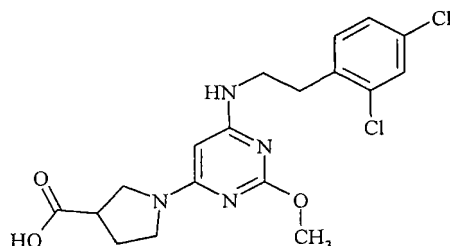
[0157] 在以下实施例和制备中, 以及本申请的其余部分, 所用的术语将具有以下含意: “kg”表示千克, “g”表示克, “mg”表示毫克, “ μ g”表示微克, “mol”表示摩尔, “mmol”表示毫摩尔, “M”表示摩尔/升, “mM”表示毫摩尔/升, “ μ M”表示微摩尔/升, “nM”表示纳摩尔/升, “L”表示升, “mL”或“ml”表示毫升, “ μ L”表示微升, “°C”表示摄氏温度, “mp”或“m. p.”表示熔点, “bp”或“b. p.”表示沸点, “mm of Hg”表示以毫米汞柱计的压力, “cm”表示厘米, “nm”表示纳米, “abs.”表示绝对的, “cone.”表示浓的, “c”表示以克/毫升计的浓度, “rt”表示室温, “TLC”表示薄层层析, “HPLC”表示高效液相色谱, “i. p.”表示腹腔内的, “i. v.”表示静脉内的, “s”=单峰, “d”=双峰; “t”=三重峰; “q”=四重峰; “m”=多重峰, “dd”=双重双峰; “br”=宽峰, “LC”=液相色谱, “MS”=质谱法, “ESI/MS”=电喷雾离子化/质谱法, “R_t”=保留时间, “M”=分子离子, “PSI”=磅/平方英寸, “DMSO”=二甲基亚砜, “DMF”=N,N-二甲基甲酰胺, “CDI”=1,1'-羰基二咪唑, “DCM”或“CH₂Cl₂”=二氯甲烷, “HCl”=盐酸, “SPA”=闪烁逼近测定法, “ATTC”=美国菌种保藏中心, “FBS”=胎牛血清, “MEM”=最低基本培养基, “CPM”=每分钟计数, “EtOAc”=乙酸乙酯, “PBS”=磷酸盐缓冲盐水, “TMD”=跨膜结构域, “IBMX”=3-异丁基-1-甲基黄嘌呤, “cAMP”=环单磷酸腺苷。 “IUPAC”=国际理论和应用化学联合会, “MHz”=兆赫, “PEG”=聚乙二醇, “MeOH”=甲醇, “N”=当量, “THF”=四氢呋喃, “h”=小时, “min”=分钟, “MeNH₂”=甲胺, “N₂”=氮气, “O. D.”=外径, “MeCN”或“CH₃CN”=乙腈, “Et₂O”=乙醚, “Prep LC”=制备型“快速”液相色谱, “SPE”=固相萃取, “K₂CO₃”=碳酸钾, “Na₂CO₃”=碳酸钠, “pmol”=微微摩尔, “庚烷”=正庚烷, “HMBA-AM”树脂=4-羟基甲基苯甲酸氨基甲基树脂, “PdCl₂(dppf)₂”=1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)DCM络合物, “~”=大约, 以及“IC₅₀”=在人类 LS174T 细胞的 SPA cAMP 分析中产生 50%抑制的化合物浓度。

[0158] 实施例

[0159] 实施例 1:

[0160] 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲基-嘧啶-4-基}-吡咯烷-3-甲酸

[0161]



[0162] 步骤 1: 将 4,6-二氯-2-甲氧基嘧啶 (0.7g)、2-(2,4-二氯-苯基)-乙胺 (0.74g) 和 Na₂CO₃ (0.88g) 的 EtOH (25mL) 溶液于 80°C 加热 3 小时并倒入水 (400mL) 中。将所得的固体过滤并用空气干燥, 即得 (6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙

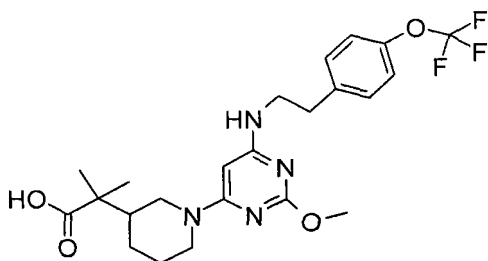
基]-胺。

[0163] 步骤2:在试管中将(6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺(300mg)、3-吡咯烷甲酸盐(341mg)、 K_2CO_3 (373mg)和1-甲基-2-吡咯烷酮(5mL)合并。将该试管封住并加热至140℃且搅拌16小时。任该混合物冷却至环境温度,以水(60mL)稀释并用3M HCl酸化,用乙酸乙酯(60mL)萃取三遍。将有机萃取液合并且以硫酸镁干燥、浓缩,并以硅胶色谱纯化(40g),以0至20% MeOH的二氯甲烷溶液洗脱,即得1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲基-嘧啶-4-基}-吡咯烷-3-甲酸(190mg),为一固体。LCMS R_T = 2.22分钟,MS:411(M+H)。 1H NMR[300MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 7.57(1H, s); 7.36(2H, s); 6.77(1H, s); 5.01(1H, s); 3.72(3H, s); 3.5(6H, m); 3.12(1H, m); 2.91(2H, t); 2.09(2H, m)。IC₅₀ = 9nM。

[0164] 实施例2:

[0165] 2-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-吡咯烷-3-基)-2-甲基-丙酸

[0166]



[0167] 步骤1:将吡啶-3-基乙酸乙酯(12.6g)和在氧化铝上的铈(12.6g)在乙醇(200mL)中的混合物置于帕尔振荡器上,于60℃和60PSI摇动16小时。使悬浮液通过硅藻土填料过滤。用乙醇洗涤该填料,将滤液浓缩至约50mL体积并添加水(600mL)。用EtOAc(3X100mL)萃取该溶液。将合并后的有机层用盐水洗涤、干燥(Na_2SO_4)、过滤并在真空中蒸发。将残余物溶于THF(150mL)并添加三乙胺(10.7mL)。将该溶液冷却至0℃并滴加苄基氯甲酸酯(11mL)。于0℃搅拌该溶液两小时。将该溶液浓缩至约50mL体积并添加水(600mL)。用EtOAc(2X150mL)萃取该溶液。将合并后的有机层用盐水洗涤、干燥(Na_2SO_4)、过滤并在真空中蒸发,即得3-乙氧基羰基甲基-吡啶-1-甲酸苄基酯(21.5g)。该产物未经进一步纯化即用于下一步骤。MS:306(M+H); 1H NMR(300MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.3(m, 5H); 5.05(s, 2H); 3.8-4.1(m, 4H); 2.5-2.6(m, 1H); 1.5-1.7(m, 4H); 1-1.4(m, 4H)。步骤2:于-78℃在一段10分钟时间内向1M叔丁醇钾在THF(200mL)中的悬浮液中滴加3-乙氧基羰基-甲基-吡啶-1-甲酸苄基酯(21.5g)的THF(25mL)溶液。一次性加入甲基碘(6.85mL)。该悬浮液于-78℃搅拌1小时,于-40℃搅拌1小时,并任其升温至室温过夜。将该悬浮液倒入水(800mL)中并用EtOAc(2x150mL)萃取。将合并后的有机层用盐水洗涤、干燥(Na_2SO_4)、过滤并在真空中蒸发。以硅胶色谱纯化残余物,以100%庚烷至30% EtOAc的庚烷溶液洗脱,即得3-(1-乙氧基羰基-1-甲基-乙基)-吡啶-1-甲酸苄基酯(151.1g)。MS:334(M+H); 1H NMR(300MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.3(m, 5H); 5.05(s, 2H); 3.8-4.1(q, 2H); 2.5-2.6(m, 1H); 1.5-1.7(m, 4H); 1-1.4(m, 4H); 1(s, 6H)。

[0168] 步骤3:将3-(1-乙氧基羰基-1-甲基-乙基)-吡啶-1-甲酸苄基酯(3.3g)和

10%在碳上的钯(500mg)在冰醋酸(2mL)/甲醇(200mL)中的悬浮液置于帕尔震荡器上于室温和 50PSI 摇动 90 分钟。使该悬浮液通过硅藻土填料过滤。用甲醇洗涤该填料,并将滤液浓缩至约 50mL 体积。将该甲醇溶液用 THF(50mL)和 2N 氢氧化钾水溶液(50mL)稀释。于室温搅拌该溶液 16 小时,并真空浓缩至 70-80mL 体积。将该溶液冷却至 5℃并缓慢地加入浓 HCl 水溶液(8.5mL)。用 EtOAc(3X100mL)萃取该溶液。将合并后的有机层用盐水洗涤、干燥(Na_2SO_4)、过滤并在真空中蒸发,即得 2-甲基-2-哌啶-3-基丙酸(1.1g)。该产物未经进一步纯化即用于下一步骤。MS:172(M+H); ^1H NMR(300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.5(m, 1H); 1.5-1.7(m, 4H); 1-1.4(m, 5H); 1(s, 6H)。

[0169] 步骤 4:

[0170] 方法 A:用氨气饱和(4-三氟甲氧基-苯基)-乙腈(5.05g)的 MeOH(75mL)溶液,并在水(2mL, 50%)中的兰尼镍处理。将该悬浮液置于帕尔震荡器上于 50PSI 和 50℃摇动 3 小时,并通过硅藻土过滤。将滤液蒸发并将残余油状物在水和乙酸乙酯之间分配。将有机相以硫酸钠干燥、过滤和蒸发。将残余物溶于 MeOH 并用浓盐酸(1mL)处理。将该溶液在真空中蒸发至固体,该产物用乙醚研磨并用空气干燥,即得 2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙胺盐酸盐(5.15g)。MS:206(M+H), ^1H NMR(CDCl_3): δ 8.2(2H, m); 7.4(2H, d, $J = 5\text{Hz}$); 7.3(2H, d, $J = 5\text{Hz}$); 3-3.1(2H, m); 2.9-3(2H, m)。

[0171] 方法 B:用乙酸铵(1.01g)处理 4-三氟甲氧基苯甲醛(1g)和硝基甲烷(0.96g)的乙酸(10.6mL)溶液,并微波加热至 150℃达 15 分钟。以水稀释该反应混合物,并用 DCM(50mL)萃取三遍。依次用 2N 氢氧化钠、水和盐水洗涤合并的萃取液,以硫酸钠干燥后浓缩。以硅胶色谱处理残余物,即得 4-三氟甲氧基-(2-硝基-乙烯基)-苯(1.23g),为一固体。将一部分 4-三氟甲氧基-(2-硝基-乙烯基)-苯(0.504g)用氢气瓶氢气、含有浓盐酸(0.27mL)的 10% Pd/C(115mg)的 MeOH(22mL)溶液于室温下氢化 15 小时。将该混合物过滤,将滤液浓缩至固态并用 Et_2O 洗涤,即得 2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙胺盐酸盐(0.3g),为一固体。LC/MS:MS:206(M+H)。

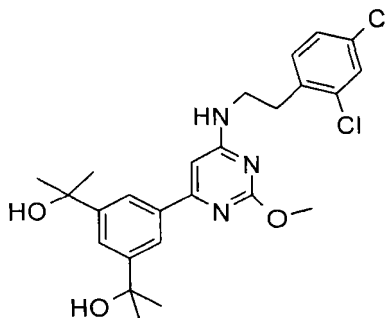
[0172] 步骤 5:以与实施例 1 的步骤 1 类似的方式进行,但使用 4,6-二氯-2-甲氧基嘧啶(0.39g)、2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙胺盐酸盐(0.38)和碳酸氢钠(0.74g),即得 (6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基]-胺(0.61g)。MS:360(M+H), ^1H NMR(CDCl_3): δ 7.4(2H, d, $J = 7\text{Hz}$); 7.3(2H, d, $J = 7\text{Hz}$); 6.2(1H, s); 3.8(3H, s); 3.5-3.6(2H, m); 2.8(2H, t)。

[0173] 步骤 6:将 2-甲基-2-哌啶-3-基-丙酸(0.6g)、(6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基]-胺(0.46g)和 K_2CO_3 (0.46g)的 1-甲基吡咯烷-2-酮(10mL)溶液于 140℃加热 16 小时。将该溶液冷却并倒入水(200mL)中。用冰醋酸将该水溶液酸化至 pH ~ 6,并用 EtOAc(3X100mL)萃取。将合并后的有机层用盐水洗涤、干燥(Na_2SO_4)、过滤并在真空中蒸发。硅胶色谱纯化残余物,以 5% MeOH 的 EtOAc 溶液洗脱,即得 2-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-2-甲基丙酸(105mg)。MS:483(M+H); ^1H NMR(300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.45(d, $J = 3$, 2H); 7.3(d, $J = 3$, 2H); 5.5(s, 1H); 3.95(s, 3H); 3.6(m, 2H); 2.9(t, 2H); 2.7(m, 1H); 1.7-1.9(m, 4H); 1.3-1.4(m, 3H); 1.1(d, $J = 3$, 6H)。IC₅₀ = 2nM。

[0174] 实施例 3:

[0175] 2-[3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-5-(1-羟基-1-甲基-乙基)-苯基]-丙-2-醇

[0176]



[0177] 步骤1:将二甲基-5-溴异邻苯二甲酸盐(5g)的THF(250mL)溶液冷却至 -78°C ,在维持温度低于 -70°C 的同时滴加3M甲基溴化镁的乙醚(36.6mL)溶液。于 -78°C 搅拌该溶液2小时并任其升温至室温过夜。将该溶液用乙醚(300mL)稀释并冷却至 0°C 。滴加1N HCl(100mL)水溶液。将合并后的有机层用盐水洗涤、干燥(Na_2SO_4)、过滤并在真空中蒸发。以硅胶色谱纯化残余物,以60% EtOAc的庚烷溶液洗脱,即得2-[3-溴-5-(1-羟基-1-甲基-乙基)-苯基]-丙-2-醇(4.1g)。MS:272(M+H); ^1H NMR(300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.5(s, 1H); 7.4(s, 2H); 5.15(s, 2H); 1.4(s, 12H)。

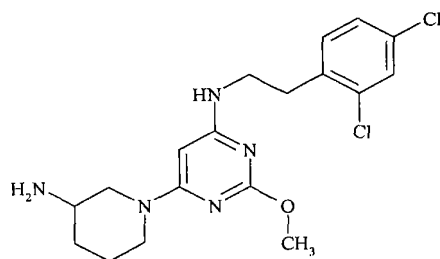
[0178] 步骤2:将2-[3-溴-5-(1-羟基-1-甲基-乙基)-苯基]-丙-2-醇(1.08g)、4,4,5,5,4',4',5',5'-八甲基-[2,2']二[[1,3,2]-二氧杂硼环戊烷基](1.12g)、乙酸钾(0.78g)和 $\text{PdCl}_2(\text{dppf})_2$ (42mg)悬浮在DMSO(20mL)中并除气20分钟。将该悬浮液于 90°C 加热16小时。将该溶液倒入水(300mL)中并用EtOAc(2X150mL)萃取。将合并后的有机层用盐水洗涤、干燥(Na_2SO_4)、过滤并在真空中蒸发。以硅胶色谱纯化残余物,以50% EtOAc的庚烷溶液洗脱,即得2-[3-(1-羟基-1-甲基-乙基)-5-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼环戊烷-2-基)-苯基]-丙-2-醇(0.9g)。MS:285(M+H); ^1H NMR(300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.5(s, 1H); 7.2(s, 2H); 5.15(s, 2H); 1.6(s, 12H); 1.4(s, 12H)。

[0179] 步骤3:将2-[3-(1-羟基-1-甲基-乙基)-5-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼环戊烷-2-基)-苯基]-丙-2-醇(0.35g)、(6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺(0.2g)、碳酸铯(0.58g)和四(三苯基膦)钯(0)(41mg)在20mL水/80mL二甲氧基乙烷中的溶液除气20分钟,并于 90°C 加热16小时。在真空中蒸发该溶液。以色谱法纯化残余物,以70% EtOAc的庚烷溶液洗脱,即得2-[3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-5-(1-羟基-1-甲基-乙基)-苯基]-丙-2-醇(0.44g)。MS:491(M+H); ^1H NMR(300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.9(s, 2H), 7.8(s, 1H); 7.45(s, 1H); 7.2-7.3(m, 2H); 6.5(s, 1H); 3.95(s, 3H); 3.85(m, 2H); 3.1(t, 2H); 1.6(s, 12H)。IC₅₀ = 730nM。

[0180] 实施例4:

[0181] [6-(3-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺

[0182]



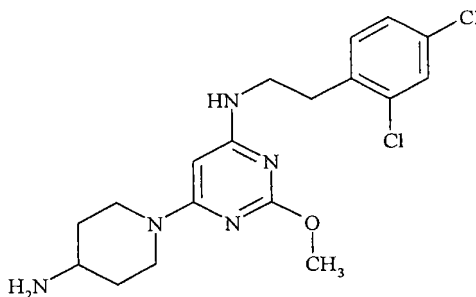
[0183] 步骤1:以与实施例1的步骤2类似的方式进行,但以3-N-Boc-氨基哌啶(450mg)代替3-吡咯烷甲酸盐,并以快速柱硅胶色谱(40g)处理反应产物,以20至50% EtOAc的庚烷溶液洗脱,即得(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-氨基甲酸叔丁酯(281mg)。¹H NMR[300MHz, (CD₃)₂SO]: δ 7.57(1H, s); 7.36(2H, s); 6.9(2H, m); 5.29(1H, s); 4(2H, m); 3.71(3H, s); 3.41(5H, m); 2.91(2H, t); 2.65(2H, m); 1.82(1H, s); 1.63(1H, s); 1.39(9H, s)。

[0184] 步骤2:用三氟乙酸(4mL)处理(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-氨基甲酸叔丁酯(234mg)的二氯甲烷(4mL)溶液。于环境温度搅拌该混合物3小时并真空浓缩。将残余物溶于饱和碳酸氢钠溶液(25mL),并用乙酸乙酯(25mL)萃取两遍。将有机萃取液合并,用盐水(20mL)洗涤,并以硫酸镁干燥、浓缩,再以硅胶色谱纯化(12g),以0至10% MeOH的二氯甲烷溶液洗脱,即得[6-(3-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺(157mg),为一固体。LCMS R_t = 1.77 分钟, MS:396(M+H)。¹H NMR[300MHz, (CD₃)₂SO]: δ 7.59(1H, s); 7.36(2H, s); 6.86(2H, m); 5.93(1H, b); 5.29(1H, s); 4.16(2H, d); 3.82(2H, d); 3.73(3H, s); 3.41(4H, m); 2.91(4H, m); 1.91(1H, m); 1.69(1H, m); 1.41(2H, m); 1.23(1H, s)。IC₅₀ = 985nM。

[0185] 实施例5:

[0186] (a) [6-(4-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺

[0187]



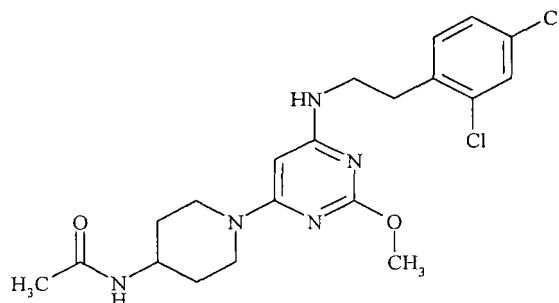
[0188] 步骤1:以与实施例1的步骤2类似的方式进行,但以4-N-Boc-氨基哌啶(450mg)代替3-吡咯烷甲酸盐,并以快速柱硅胶色谱(40g)处理反应产物,以0至40% EtOAc的庚烷溶液洗脱,即得(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-4-基)-氨基甲酸叔丁酯(320mg)。

[0189] 步骤2:用三乙基硅烷(194 μL)处理((1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-4-基)-氨基甲酸叔丁酯(300mg)的DCM(5mL)溶

液,再加入三氟乙酸 (106 μ L)。于环境温度搅拌该混合物 20 小时并真空浓缩。将残余物溶于饱和碳酸氢钠溶液 (30mL) 并用乙酸乙酯 (30mL) 萃取两遍。将有机萃取液合并,用盐水 (20mL) 洗涤,并以硫酸镁干燥后浓缩,即得 [6-(3-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺 (230mg),为一固体。

[0190] (b) N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-4-基)-乙酰胺

[0191]

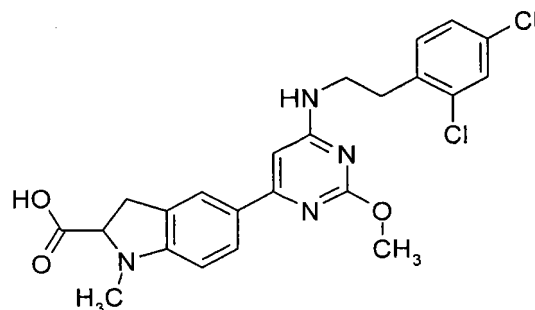


[0192] 将乙酰氯 (41 μ L, 0.58mmol) 加入到 [6-(3-氨基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-嘧啶-4-基]-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺 (190mg)、三乙胺 (134 μ L, 0.96mmol) 以及 N,N-二甲基氨基吡啶 (6mg) 在四氢呋喃 (6mL) 中的混合物中。将反应混合物搅拌 17 小时,加水 (20mL) 终止反应并用乙酸乙酯 (25mL) 萃取两遍。将有机萃取液合并,以硫酸镁干燥、浓缩,并以硅胶色谱纯化 (12g),以 0 至 12% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液洗脱,即得 N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-4-基)-乙酰胺 (48mg),为一固体。LCMS $R_t = 1.9$ 分钟, MS : 438 (M+H)。 ^1H NMR [300MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] : δ 7.81 (1H, d) ; 7.59 (1H, s) ; 7.36 (2H, s) ; 6.79 (2H, m) ; 5.31 (1H, s) ; 4.07 (2H, m) ; 3.78 (1H, d) ; 3.71 (3H, s) ; 3.41 (2H, m) ; 2.91 (4H, m) ; 1.78 (3H, s) ; 1.73 (1H, m) ; 1.25 (4Hm)。IC₅₀ = 26nM。

[0193] 实施例 6 :

[0194] 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸

[0195]



[0196] 步骤 1 : 向乙基-5-溴吡啶-2-甲酸盐 (2.5g) 在 DMF (20mL) 中的混合物中加入 60% NaH (485mg) 的 DMF (10mL) 溶液。将生成的混合物搅拌 15 分钟并用注射针筒加入碘甲烷 (0.638mL)。将该反应混合物于环境温度搅拌 20 小时。加水 (200mL) 并用乙酸乙酯 (100mL) 萃取该混合物两遍。将有机萃取液合并,用水洗涤三遍 (3x50mL),用盐水洗涤一

遍 (50mL), 并以硫酸镁干燥、浓缩, 即得 5-溴-1-甲基-1H-吡啶-2-甲酸乙酯 (1.28g), 为一固体。¹H NMR[300MHz, CDCl₃] : δ 7.79(1H, d) ; 7.41(1H, dd) ; 7.27(1H, t) ; 7.2(1H, s) ; 4.39(2H, q) ; 4.05(3H, s) ; 1.41(3H, t)。

[0197] 步骤 2 : 于 0℃ 向 5-溴-1-甲基-1H-吡啶-2-甲酸乙酯 (1.28g) 的三氟乙酸 (10mL) 溶液加入氰基硼氢化钠 (680mg)。任该反应混合物升温至环境温度, 搅拌 20 小时并用水 (100mL) 终止反应。用 NaOH 碱化该混合物, 并用 Et₂O (3x50mL) 萃取。将有机萃取液合并, 用盐水 (30mL) 洗涤, 以硫酸镁干燥、浓缩, 并以硅胶色谱纯化 (34g), 以 0 至 25% 乙酸乙酯的庚烷溶液洗脱, 即得 5-溴-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸乙酯 (800mg), 为一固体。¹H NMR[300MHz, CDCl₃] : δ 7.19(1H, d) ; 7.21(1H, s) ; 6.34(1H, d) ; 4.25(2H, qd) ; 4.06(1H, t) ; 3.21(2H, m) ; 2.82(3H, s) ; 1.30(3H, t)。

[0198] 步骤 3 : 将 5-溴-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸乙酯 (800mg)、双联频哪醇硼酸酯 (1.5g)、乙酸钾 (1.47g) 以及 PdCl₂(dppf)₂ (139mg) 在二甲基亚砜 (10mL) 中的混合物用氮气鼓泡除气 5 分钟。于 90℃ 加热该混合物 4 小时。冷却该反应混合物, 用水 (75mL) 和乙酸乙酯 (100mL) 稀释, 并在脱色炭中搅拌。使该两相混合物通过硅藻土过滤并用 EtOAc (50mL) 萃取滤液两遍。将有机萃取液合并, 用水 (50mL) 洗涤三遍, 用盐水 (30mL) 洗涤一遍, 以硫酸镁干燥、浓缩, 并以硅胶色谱纯化 (34g), 以 0 至 20% 乙酸乙酯的庚烷溶液洗脱, 即得 1-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼环戊烷-2-基)-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸乙酯 (903mg), 为一固体。¹H NMR[300MHz, (CD₃)₂SO] : δ 7.39(1H, d) ; 7.28(1H, s) ; 6.46(1H, d) ; 4.18(3H, m) ; 3.3(1H, d) ; 2.97(1H, m) ; 2.79(3H, s) ; 1.24(12H, s) ; 1.22(3H, t)。

[0199] 步骤 4 : 将 (6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺 (200mg)、1-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼环戊烷-2-基)-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸乙酯 (300mg)、Cs₂CO₃ (390mg) 以及四(三苯基膦)钯 (35mg) 在水 (0.4mL) 和乙二醇二甲醚 (1.6mL) 中的混合物用氮气鼓泡除气 5 分钟, 并于 90℃ 加热 19 小时。冷却该反应混合物, 以水稀释 (50mL) 并用乙酸乙酯 (50mL) 萃取两遍。将有机萃取液合并, 以硫酸镁干燥, 浓缩, 并以硅胶色谱纯化 (40g), 以 0 至 40% 乙酸乙酯的庚烷溶液洗脱, 即得 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸乙酯 (110mg), 为一固体。LCMS R_t = 5.57 分钟, MS : 501 (M+H)。¹H NMR[300MHz, (CD₃)₂SO] : δ 7.72(2H, m) ; 7.59(1H, s) ; 7.37(3H, s) ; 6.54(1H, d) ; 6.42(1H, s) ; 4.30(1H, m) ; 4.17(2H, qd) ; 3.84(3H, s) ; 3.54(2H, b) ; 3.41(1H, m) ; 3.06(1H, m) ; 2.97(2H, t) ; 2.83(3H, s) ; 1.23(3H, t)。

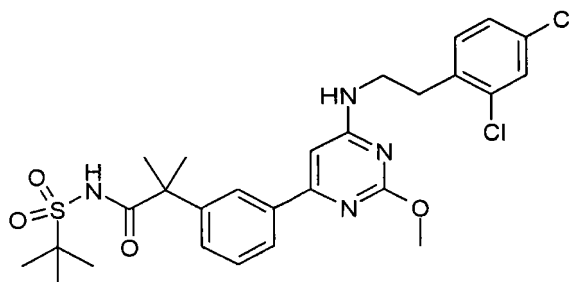
[0200] 步骤 5 : 将氢氧化锂一水合物 (1.28mmol) 加入搅拌中的 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸乙酯 (0.43mmol) 的 MeOH/H₂O (10mL, 9:1) 溶液中。于室温搅拌该反应混合物过夜。以水稀释该反应物并在真空中除去挥发物。用 Et₂O 萃取水性残余物一遍, 酸化 (1N, HCl) 至 pH4, 并用乙酸乙酯萃取两遍。将合并后的有机层干燥 (MgSO₄) 并真空浓缩, 即得 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-1-甲基-2,3-二氢-1H-吡啶-2-甲酸。

[0201] 实施例 7 :

[0202] (a) 2-甲基-丙-2-磺酸 [2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧

基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺

[0203]



[0204] 步骤1:在一段15分钟的时间内于0℃向LDA的THF/正庚烷/乙基苯(1.8M,17mL)溶液滴加2-(3-溴-苯基)-丙酸(3g)的THF(5mL)溶液。将该混合物搅拌1小时,再在一段10分钟的时间内滴加甲基碘(4.93g)的THF(5mL)溶液。将该反应混合物搅拌15小时,用2N盐酸终止反应,真空浓缩,并用乙醚(150mL)稀释。用2N盐酸洗涤乙醚层,并用2N氢氧化钠(50mL)萃取三遍。将合并后的氢氧化钠层用6N盐酸酸化至pH~1并用乙醚(75mL)萃取三遍。用盐水洗涤合并后的有机层,以硫酸钠干燥后浓缩,即得2-(3-溴-苯基)-2-甲基丙酸,为一固体(3.08g)。该产物未经进一步纯化即可使用。LC/MS:243(M+H)。

[0205] 步骤2:于-78℃向2-(3-溴-苯基)-2-甲基-丙酸(2.18mmol)的无水乙醚(20mL)溶液中滴加叔丁基锂(1.7M戊烷溶液,5.4mL,9.16mmol),将此混合物搅拌30分钟并用硼酸三丁酯(2.34mL,8.72mmol)处理。任该反应混合物升温至常温,搅拌15小时,用乙醚稀释,并用1M₃PO₄终止反应。搅拌30分钟之后将乙醚层分离并用2N氢氧化钠水溶液(3x20mL)萃取。将合并后的氢氧化钠萃取液用6N盐酸酸化至pH~1,并用乙醚(50mL)萃取三遍。将合并的有机萃取液用盐水洗涤,以硫酸钠干燥后浓缩,即得3-(1-羧基-1-甲基-乙基)-苯基硼酸。该产物未经进一步纯化即可使用。

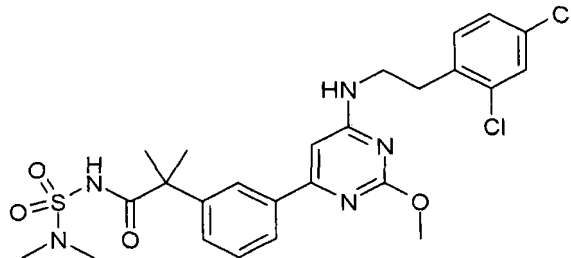
[0206] 步骤3:将(6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺(0.51mmol)和3-(1-羧基-1-甲基-乙基)-苯基硼酸(0.61mmol)在MeCN(2.5mL)和Na₂CO₃水溶液(0.4M,2.5mL)中的溶液用氮气除气5分钟,再加入四(三苯基膦)钯(0)(29.5mg)。将反应容器密封并于130℃微波加热30分钟。向该反应混合物加入2mL水,用2N盐酸水溶液将pH调节至~7,并将此混合物用EtOAc(30mL)萃取三遍。将合并后的萃取液用盐水洗涤,以硫酸钠干燥后浓缩。以硅胶色谱处理生成的油状物,以0至7% MeOH的DCM溶液洗脱,即得2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酸(205mg),为一固体。LC/MS:R_f=2.39分钟,MS:460.2(M+H)。¹H NMR[300MHz,(CD₃)₂SO]:δ 12.38(1H,s),7.36-8(7H,m),6.58(1H,s),3.84(3H,s),3.58(2H,m),2.98(2H,m),1.54(6H,s)。

[0207] 步骤4:在氮气气氛中将N-(3-二甲基氨基丙基)-N-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.23mmol)加入到搅拌中的冰冷的2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基丙酸(0.22mmol)、叔丁基磺酰胺(0.23mmol)和4-二甲基氨基吡啶(0.22mmol)在干燥DCM中的溶液中。移去冰浴并于60℃将该反应混合物搅拌过夜。减压除去挥发物,将残余物溶于乙酸乙酯,用0.1N HCl、盐水和洗涤,以硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。以色谱法(SiO₂填充柱)纯化粗制残余物,以EtOAc/DCM洗脱,即得2-甲基-丙-2-磺酸[2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙-2-磺酸]

基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺 (25mg)。LCMS : R_t = 2.67 分钟, MS :579,581 (M+H)。IC₅₀ = 2nM。

[0208] (b) N,N-二甲基酰胺-2-磺酸[2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺

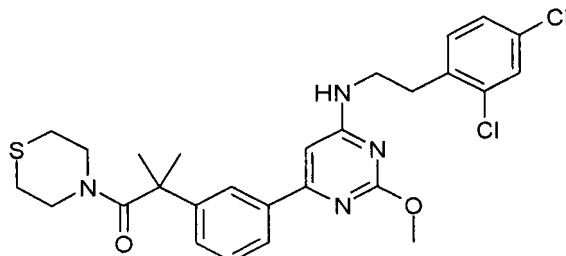
[0209]



[0210] 以与实施例 7(a) 的步骤 4 类似的方式进行,但以 N,N-二甲基磺酰胺代替叔丁基磺酰胺,即得 N,N-二甲基酰胺-2-磺酸[2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-丙酰基]-酰胺 (185mg)。LCMS : R_t = 2.26 分钟, MS : 566,568 (M+H)。

[0211] (c) 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-1-硫代吗啉-4-基-丙-1-酮

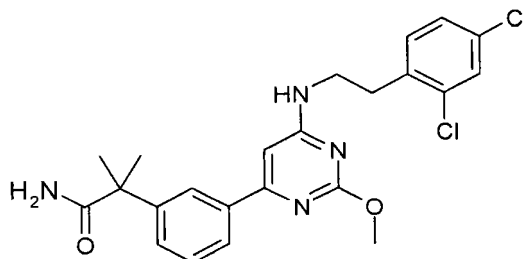
[0212]



[0213] 以与实施例 7(a) 的步骤 4 类似的方式进行,但以硫代吗啉代替叔丁基磺酰胺,即得 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-2-甲基-1-硫代吗啉-4-基-丙-1-酮 (120mg)。LCMS : R_t = 2.68 分钟, MS :545,547 (M+H)。IC₅₀ = 383nM

[0214] (d) 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-异丁酰胺

[0215]

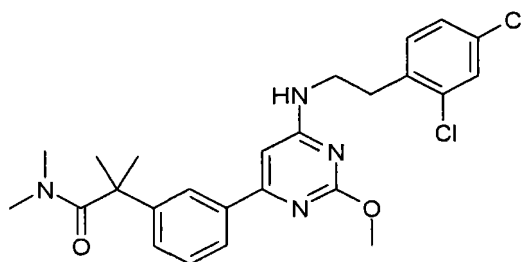


[0216] 以与实施例 7(a) 的步骤 4 类似的方式进行,但以碳酸氢铵代替叔丁基磺酰胺,即得 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-异丁

酰胺 (120mg)。LCMS : $R_t = 2.01$ 分钟, MS :459,461 (M+H)。

[0217] (e) 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-N,N-二甲基-异丁酰胺

[0218]

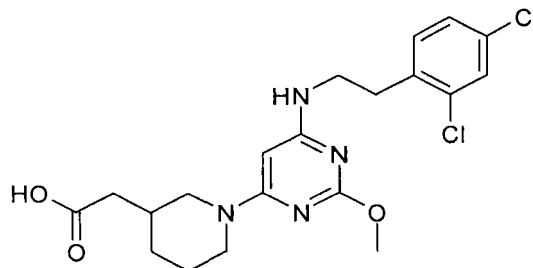


[0219] 以与实施例 7(a) 的步骤 4 类似的方式进行,但以二甲胺代替叔丁基磺酰胺,即得 2-(3-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-苯基)-N,N-二甲基-异丁酰胺 (186mg)。LCMS : $R_t = 2.44$ 分钟, MS :487,489 (M+H)。

[0220] 实施例 8 :

[0221] (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-乙酸

[0222]



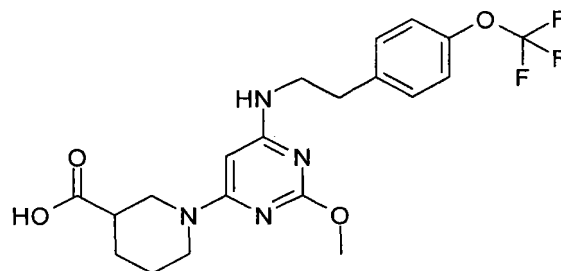
[0223] 步骤 1 :将 (6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺 (3mmol)、哌啶乙酸乙酯 (7.5mmol) 和 K_2CO_3 (9mmol) 的 1-甲基-2-吡咯烷酮 (10mL) 溶液于 145℃ 搅拌过夜。将反应物冷却至室温,以水稀释 (60mL) 并用 DCM 萃取两遍。在激烈搅拌的同时,用 1N 盐酸将水层缓慢地酸化至 pH4,再继续搅拌 1.5 小时。以吸滤法过滤形成的沉淀并用空气干燥,即得 (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-乙酸乙酯 (1.42g)。LCMS : $R_t = 2.35$ 分钟, MS :467,469 (M+H)。

[0224] 步骤 2 :将氢氧化锂一水合物 (54mg) 加入搅拌中的 (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-乙酸乙酯 (0.2g) 的 MeOH/ H_2O (10mL, 9:1) 溶液。将反应混合物于室温搅拌过夜。以水稀释该反应物并在真空中除去挥发物。将该水性残余物用 Et_2O 萃取一遍,酸化 (1N, HCl) 至 pH4,并用乙酸乙酯萃取两遍。将合并后的有机层干燥 ($MgSO_4$) 并真空浓缩,即得 (1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-基)-乙酸 (180mg)。LCMS : $R_t = 2.08$ 分钟, MS :439,441 (M+H)。IC₅₀ = 0.5nM。

[0225] 实施例 9 :

[0226] 1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸

[0227]

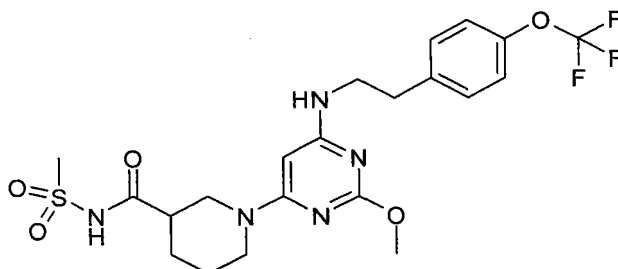


[0228] 将(6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基]-胺(1g)、哌啶酸(0.93g)和 K_2CO_3 (1.19g)的1-甲基-2-吡咯烷酮(10mL)溶液于145℃搅拌过夜。将该反应物冷却至室温,以水(60mL)稀释并用二氯甲烷萃取两遍。在激烈搅拌的同时,用1N盐酸将水层缓慢地酸化至pH4,再继续搅拌1.5小时。以吸滤法过滤形成的沉淀并用空气干燥,即得1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸,其为粉末状(0.99g)。LCMS: $R_t = 2.07$ 分钟,MS:441(M+H)。IC₅₀ = 9nM。

[0229] 实施例10:

[0230] N-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羧基)-甲磺酰胺

[0231]

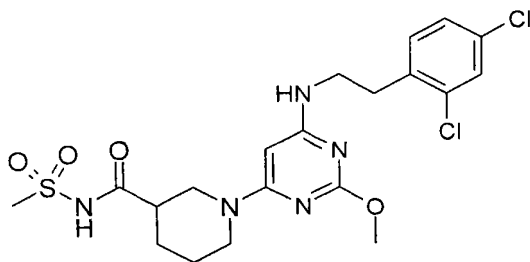


[0232] 在 N_2 气氛中将N-(3-二甲基氨基丙基)-N-乙基碳二亚胺盐酸盐(68mg)加入到搅拌中的冰冷的1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸(150mg)、甲磺酰胺(48.6mg)和4-二甲基氨基吡啶(50mg)在干燥DCM中的溶液中。移去冰浴并将该反应混合物搅拌过夜,同时任其升温至室温。真空浓缩该混合物。将残余物溶于乙酸乙酯,用0.1NHCl、盐水和洗涤,干燥(Na_2SO_4),过滤和浓缩。以色谱法(SiO_2 填充柱)纯化残余物,以EtOAc/DCM洗脱,即得N-(1-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羧基)-甲磺酰胺(65mg)。LCMS: $R_t = 2.09$ 分钟,MS:518(M+H)。IC₅₀ = 22nM。

[0233] 实施例11:

[0234] (a) N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羧基)-甲磺酰胺

[0235]

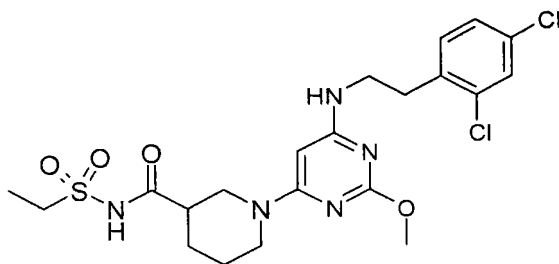


[0236] 步骤1:在一试管中将(6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺(200mg)、哌啶酸(194mg)、 K_2CO_3 (249mg)和1-甲基-2-吡咯烷酮(2.5mL)合并。将该试管封住并加热至140℃且搅拌5小时。任该混合物冷却至环境温度,静置12小时,以水(20mL)稀释并用3M HCl水溶液酸化。形成沉淀,以过滤收集并在高真空条件下干燥,即得1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸(121mg),为一固体。LCMS $R_T = 2.15$ 分钟,MS:425(M+H)。

[0237] 步骤2:在 N_2 气氛中将N-(3-二甲基氨基丙基)-N-乙基碳二亚胺盐酸盐(71mg)加入到搅拌中的冰冷的1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸(150mg)、甲磺酰胺(43.6mg)和4-二甲基氨基吡啶(52mg)在干燥二氯甲烷中的溶液中。移去冰浴并将反应混合物于室温搅拌过夜。真空浓缩该混合物。将残余物溶于乙酸乙酯,分别用0.1N HCl、盐水和洗涤,干燥(Na_2SO_4),过滤和浓缩。以色谱法(SiO_2 填充柱)纯化粗品,以EtOAc/DCM洗脱,即得N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羧基)-甲磺酰胺(145mg)。LCMS: $R_T = 1.88$ 分钟,MS:502,504(M+H)。IC₅₀ = 1nM。

[0238] (b) 乙磺酸(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羧基)-酰胺

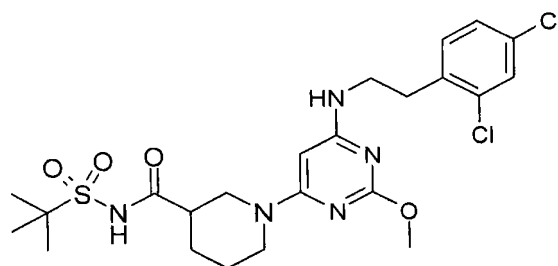
[0239]



[0240] 以与实施例11(a)的步骤2类似的方式进行,但用乙磺酰胺代替甲磺酰胺,即得乙磺酸(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羧基)-酰胺(125mg)。LCMS: $R_T = 2.12$ 分钟,MS:516,518(M+H)。

[0241] (c) 2-甲基-丙-2-磺酸(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羧基)-酰胺

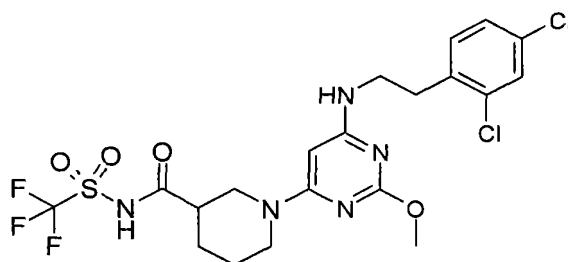
[0242]



[0243] 以与实施例 11(a) 的步骤 2 类似的方式进行,但以叔丁基磺酰胺代替甲磺酰胺,即得 2-甲基-丙-2-磺酸(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-酰胺 (132mg)。LCMS: $R_t = 2.2$ 分钟, MS: 544, 546 (M+H)。

[0244] (d) N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-C, C, C-三氟-甲磺酰胺

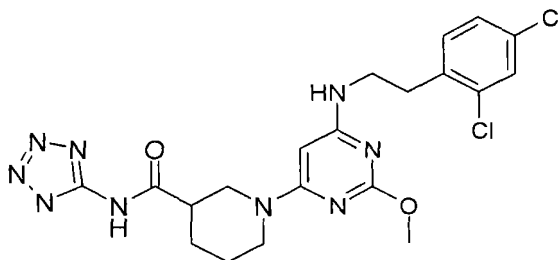
[0245]



[0246] 以与实施例 11(a) 的步骤 2 类似的方式进行,但以三氟甲基磺酰胺代替甲磺酰胺,即得 N-(1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羰基)-C, C, C-三氟-甲磺酰胺 (257mg)。LCMS: $R_t = 2.3$ 分钟, MS: 556, 558 (M+H)。IC₅₀ = 18nM。

[0247] (e) 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸(1H-四唑-5-基)-酰胺

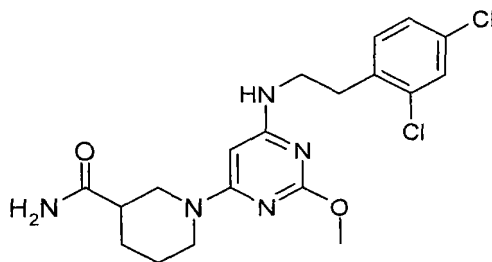
[0248]



[0249] 以与实施例 11(a) 的步骤 2 类似的方式进行,但以 1H-四唑-5-胺代替甲磺酰胺,即得 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸(1H-四唑-5-基)-酰胺 (15mg)。LCMS: $R_t = 1.81$ 分钟, MS: 492, 494 (M+H)。IC₅₀ = 4.4nM。

[0250] (f) 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酰胺

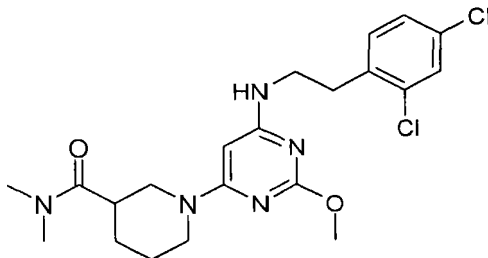
[0251]



[0252] 在 N_2 中将 N-(3-二甲基氨基丙基)-N-乙基碳二亚胺盐酸盐 (0.23mmol) 加入到搅拌中的冰冷的 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸 (0.22mmol)、乙磺酰胺 (0.23mmol) 以及 4-二甲基氨基吡啶 (0.22mmol) 在干燥二氯甲烷中的溶液中。移去冰浴并于 60°C 将该反应混合物搅拌过夜。真空浓缩该混合物。将残余物溶于乙酸乙酯, 分别用 0.1N HCl、盐水和洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并在减压下浓缩。以色谱法 (SiO_2 填充柱) 纯化粗制残余物, 以 EtOAc/DCM 洗脱, 即得 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酰胺 (75mg)。LCMS : $R_t = 1.77$ 分钟, MS : 424, 426 (M+H)。

[0253] (g) 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸二甲基酰胺

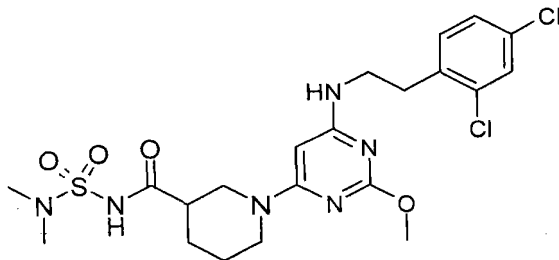
[0254]



[0255] 以与实施例 11(a) 的步骤 2 类似的方式进行, 但以二甲胺代替甲磺酰胺, 即得 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-甲酸二甲基酰胺 (65mg)。LCMS : $R_t = 1.88$ 分钟, MS : 452, 454 (M+H)。

[0256] (h) N,N-二甲基酰胺-2-磺酸 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羧酰胺

[0257]

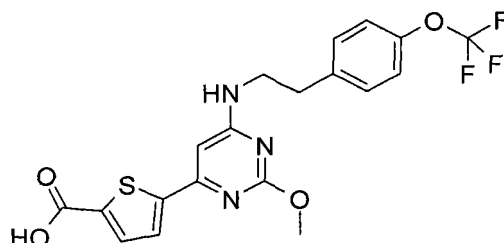


[0258] 以与实施例 11(a) 的步骤 2 类似的方式进行, 但以 N,N-二甲基磺酰胺代替甲磺酰胺, 即得 N,N-二甲基酰胺-2-磺酸 1-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-哌啶-3-羧酰胺 (241mg)。LCMS : $R_t = 2.5$ 分钟, MS : 531, 533 (M+H)。IC₅₀ = 14nM。

[0259] 实施例 12:

[0260] 5-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-噻吩-2-甲酸

[0261]



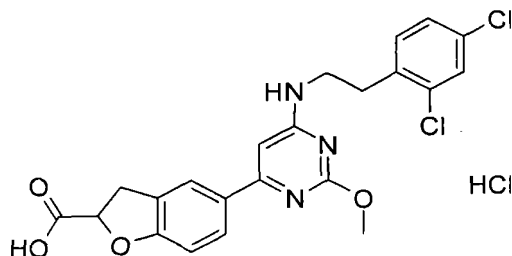
[0262] 步骤 1:将 5-(二羟基氧硼基)-2-噻吩甲酸 (527mg) 和 2,2-二甲基-丙-1,3-二醇 (361mg) 于室温在 THF (10mL) 中搅拌 19 小时并真空浓缩,即得 5-(5,5-二甲基-[1,3,2]二氧杂硼环己烷-2-基)-噻吩-2-甲酸 (748mg),为一固体。LCMS: $R_t = 1.15$ 分钟; ^1H NMR [300MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 13.15 (1H, s); 7.7 (1H, m); 7.45 (1H, m); 3.75 (4H, s); 0.95 (6H, s)。

[0263] 步骤 2:将 (6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基]-胺 (267mg)、5-(5,5-二甲基-[1,3,2]二氧杂硼环己烷-2-基)-噻吩-2-甲酸 (277mg)、氟化铯 (351mg) 以及四(三苯基膦)钯 (71mg) 在水 (1.6mL) 和乙二醇二甲醚 (6.4mL) 中的混合物用氮气鼓泡除气 5 分钟,并于 85°C 加热 16 小时。冷却该反应混合物,以水 (150mL) 和盐水 (25mL) 稀释,用 EtOAc (100mL) 萃取两遍并真空浓缩萃取液。以硅胶 (10g) 快速柱色谱处理残余物,以 0 至 5% MeOH 的 EtOAc 溶液洗脱。用 DCM (5mL) 和乙醚 (5mL) 研磨生成的晶状固体并干燥,即得 5-{2-甲氧基-6-[2-(4-三氟甲氧基-苯基)-乙基氨基]-嘧啶-4-基}-噻吩-2-甲酸 (42mg),为一固体。MS: 440; LCMS: $R_t = 3.48$ 分钟; ^1H NMR [300MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 7.7 (3H, m); 7.35 (2H, m); 7.25 (2H, m); 6.6 (1H, s); 3.85 (3H, s); 2.55 (2H, m); 1.9 (2H, t, $J = 7\text{Hz}$)。IC₅₀ = 2nM。

[0264] 实施例 13:

[0265] 5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸盐盐酸盐

[0266]



[0267] 步骤 1:向 2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸 (510mg) 的冰醋酸 (4mL) 溶液滴加溴 (497mg)。16 小时之后,用水 (100mL) 和亚硫酸氢钠 (1g) 终止反应并用 EtOAc (100mL) 萃取两遍。真空浓缩萃取液并在高真空条件下干燥,即得 5-溴-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸 (811mg),为一固体。MS: 241 (M+H), ^1H NMR [300MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 13.05 (1H, s); 7.4 (1H, s); 7.25 (1H, d); 6.8 (1H, m); 5.25 (1H, q); 3.55 (1H, dd); 3.25 (1H, m)。

[0268] 步骤2:将5-溴-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸(0.74g)、双联频哪醇硼酸酯(1.51g)、乙酸钾(1.47g,15mmol)以及PdCl₂(dppf)₂(115mg,0.14mmol)在二甲基亚砜(10mL)中的混合物用氮气鼓泡除气5分钟。于90℃加热该混合物16小时。冷却该反应混合物,以水(200mL)和盐水(25mL)稀释,并通过硅藻土过滤,再加水(200mL)和EtOAc(200mL)。用EtOAc(200mL)萃取滤液两遍并真空浓缩萃取液。以硅胶(4g)快速柱色谱处理残余物,以80至100%EtOAc的庚烷溶液洗脱,即得5-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼环戊烷-2-基)-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸(715mg),为油状产物。MS:289(M-H),¹H NMR[300MHz, (CD₃)₂SO]: δ 13.05(1H, s); 7.5(2H, m); 6.8(1H, m); 5.2(1H, m); 3.6(1H, m); 3.3(1H, m); 1.05(12H, s)。步骤3:将(6-氯-2-甲氧基-嘧啶-4-基)-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基]-胺(212mg)、5-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼环戊烷-2-基)-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸(124mg)、碳酸铯(414mg)以及四(三苯基膦)钯(49mg)在水(1.2mL)和乙二醇二甲醚(4.8mL)中的混合物用氮气鼓泡除气5分钟并于70℃加热64小时。冷却该反应混合物,以水(150mL)和盐水(25mL)稀释,用EtOAc(150mL)萃取两遍,并真空浓缩萃取液。以硅胶(4g)快速柱色谱处理残余物,以0至25%MeOH的EtOAc溶液洗脱,即得5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸(80mg),为油状产物。MS:460;LCMS;R_t = 2.81分钟。

[0269] 步骤4:将部分5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸以硅胶(5g)快速柱色谱处理,以0至25%MeOH的EtOAc溶液洗脱。将该产物溶于MeOH,用0.5M氯化氢的MeOH溶液处理并真空浓缩。将该产物溶于THF(3mL)并加入乙醚(10mL)。取出沉淀并干燥,即得5-{6-[2-(2,4-二氯-苯基)-乙基氨基]-2-甲氧基-嘧啶-4-基}-2,3-二氢-苯并呋喃-2-甲酸盐酸盐(20mg),为一固体。LCMS;R_t = 2.79分钟;MS:460。IC₅₀ = 2nM。

[0270] 药理学试验

[0271] 在人类DP功能测定中,评估了本发明的化合物的抑制作用。采用了cAMP分析,并使用表达内源性DP受体的人类细胞系LS174T。此方案与以前所叙述的方案类似[Wright DH, Ford-Hutchinson AW, Chadee K, Metters KM, The human prostanoid DP receptor stimulates mucin secretion in LS174T cells(人类前列腺素DP受体在LS174T细胞内刺激粘蛋白分泌), BrJ Pharmacol. 131(8):1537-45(2000)]。

[0272] 人类LS174T细胞内SPA cAMP测定方案

[0273] 材料

- [0274] • PGD2(Cayman 化学品目录号 12010)
- [0275] • IBMX(Sigma 目录号 5879)
- [0276] • cAMP SPA 直接筛选测定系统(Amersham 代号 RPA559)
- [0277] • 96孔细胞培养板(Wallac 目录号 1450-516)
- [0278] • Wallac1450Microplate Trilux 闪烁计数器(PerkinElmer)
- [0279] • 培养板密封器
- [0280] • Eppendorf 管
- [0281] • Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水(PBS)(Invitrogen 目录号 14040-133)
- [0282] • 蒸馏水

- [0283] • 涡流器
- [0284] • 磁性搅拌器和搅拌棒
- [0285] 试剂制备：
- [0286] 所有试剂在重新组合之前其温度均应与室温平衡。
- [0287] 1X 测定缓冲液
- [0288] 将瓶内的内容物转移至一 500mL 带刻度的量筒，用蒸馏水反复淋洗。用蒸馏水将最终体积调节至 500mL 并充分混合。
- [0289] 溶解试剂 1 与 2
- [0290] 将溶解试剂 1 和 2 分别溶于 200mL 测定缓冲液。在室温下放置 20 分钟使其溶解。
- [0291] SPA 抗兔微珠
- [0292] 在该瓶内加入 30mL 溶解缓冲液 2。缓缓地振摇该瓶 5 分钟。
- [0293] 抗血清
- [0294] 在每个小瓶内加入 15mL 溶解缓冲液 2，并缓缓地混合直至内容物完全溶解。
- [0295] 示踪剂 (I^{125} -cAMP)
- [0296] 在每个小瓶内加入 14mL 溶解缓冲液 2，并缓缓地混合直至内容物完全溶解。
- [0297] 免疫试剂的制备
- [0298] 1) 在瓶内加入等体积的示踪剂、抗血清和 SPA 抗兔试剂，确保所制备混合物的体积能满足所需数量的培养孔 (150 μ L/ 孔)。
- [0299] 2) 充分地混合。
- [0300] 3) 此免疫试剂溶液应在每次测定前实时制备，而且不得再次使用。
- [0301] 标准液
- [0302] 1) 加入 1mL 溶解缓冲液 1，并缓缓地混合直至内容物完全溶解。
- [0303] 2) 最终溶液中 cAMP 的浓度为 512pmol/mL。
- [0304] 3) 取 7 支聚丙烯管或聚苯乙烯管并标以 0. 2pmol、0. 4pmol、0. 8pmol、1. 6pmol、3. 2pmol、6. 4pmol 以及 12. 8pmol。
- [0305] 4) 吸取 500 μ L 溶解缓冲液 1 移入所有各管。
- [0306] 5) 吸取 500 μ L 标准储备液 (512pmol/mL) 移入 12. 8pmol 管，并充分混合。从 12. 8pmol 管转移 500 μ L 至 6. 4pmol 管，并充分混合。在其余管中相继重复这一双倍稀释操作。
- [0307] 6) 取每种连续稀释液 50 μ L 一式两份和标准储备液将生成 8 种标准浓度的 cAMP，其浓度范围为 0. 2-25. 6pmol。
- [0308] 化合物稀释缓冲液
- [0309] 取 50 μ L 的 1mM IBMX 加入 100mL PBS 内，使最终浓度为 100 μ M，并于 30°C 以声波处理 20 分钟。
- [0310] PGD2 制备
- [0311] 取 1mg PGD2 (FW, 352. 5) 溶解于 284 μ L DMSO，以制备 10mM 储备液并储存于 20°C。在每次测定前，应实时制备。取 3 μ L 10mM 储备液加入 20mL DMSO，充分混合，并取 10mL 转移至 40mL PBS 内。
- [0312] 化合物稀释

[0313] 化合物的稀释是在 Biomex2000 (Beckman) 上进行的,采用方法 1_cAMP DP11 点。

[0314] 从 10mM 储备化合物培养板分别转移每种化合物 5 μ L 至 96 孔培养板的各孔内,如下表所示。

[0315]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1											
B	2											
C	3											
D	4											
E	5											
F	6											
G	7											
H	对照											

[0316] 除了第 7 列注入 28 μ L DMSO 以外,培养板其余孔内均注入 45 μ L DMSO。完全吸尽第 1 列,并将 12 μ L 平行地转移至第 7 列。以转移 5 μ L 至 45 μ L DMSO 的方式,从第 1 列至第 6 列以及从第 7 列至第 11 列进行 1:10 连续稀释,以制备以下浓度:

[0317]

第一块培养板	最终浓度
第 12 列	0
第 11 列	0.03 μ M
第 10 列	0.3 μ M
第 9 列	3 μ M
第 8 列	0.03mM
第 7 列	0.3mM
第 6 列	0.01 μ M
第 5 列	0.1 μ M
第 4 列	1 μ M
第 3 列	0.01mM
第 2 列	0.1mM
第 1 列	1mM

[0318] 将 247.5 μ L 化合物稀释缓冲液注入一块新的 96 孔培养板。从上述培养板将 2.5 μ L 连续稀释的化合物转移至这一新的培养板 (1:100 稀释比),如下表所示:

[0319]

第一块培养板	第二块培养板	最终浓度
第 12 列	第 1 列	0
第 6 列	第 2 列	0.1nM
第 11 列	第 3 列	0.3nM
第 5 列	第 4 列	1nM
第 10 列	第 5 列	3nM
第 4 列	第 6 列	0.01 μ M
第 9 列	第 7 列	0.03 μ M
第 3 列	第 8 列	0.1 μ M
第 8 列	第 9 列	0.3 μ M
第 2 列	第 10 列	1 μ M
第 7 列	第 11 列	3 μ M
第 1 列	第 12 列	10 μ M

[0320] 细胞生长

[0321] 1. LS174T 总是在 MEM(ATCC 目录号 30-2003)、10% FBS(ATCC 目录号 30-2020) 和另外的 2mM L- 谷氨酰胺中于 37°C 和 5% CO₂ 的条件下生长。

[0322] 2. 在 37°C 水浴中加热 0.05% 胰蛋白和 Versine(Invitrogen 目录号 25300-054)。

[0323] 3. 除去细胞的生长培养基。在 T165 烧瓶中用 4mL 胰蛋白洗涤细胞两次, 然后在 37°C 和 5% CO₂ 的条件下培养 3 分钟。

[0324] 4. 加入 10mL 培养基并完全吸尽, 以分离细胞并进行细胞计数。

[0325] 5. 使细胞密度增至 2.25×10^5 细胞 / mL, 并于测定前一天在 96 孔培养板上接种 200 μ L 细胞 / 孔 (45,000 细胞 / 孔)。

[0326] 测定步骤

[0327] 第 1 天

[0328] 在 96 孔培养板上于 200 μ L 培养基内接种 45,000 细胞 / 孔。将该细胞培养板在 37°C、5% CO₂ 以及 95% 湿度的条件下培养过夜。

[0329] 第 2 天

[0330] 1. 进行化合物稀释。

[0331] 2. 制备测定缓冲液、溶解缓冲液 1 和 2、PGD₂ 以及标准液。

[0332] 3. 采用 Zymark Sciclone-ALH/FD 方案 cAMP DP, 从细胞中吸取培养基并加入 100 μ L 化合物溶液。

[0333] 4. 在 37°C、5% CO₂ 以及 95% 湿度的条件下培养细胞 15 分钟。

[0334] 5. 采用 Zymark 方案 cAMP DP PGD₂, 在每孔内加入 5 μ L 300nM PGD₂ (20X15nM 最终浓度), 并在 37°C、5% CO₂ 以及 95% 湿度的条件下再培养细胞 15 分钟。

[0335] 6. 采用 Zymark 方案 cAMP DP 溶解, 从细胞中吸取培养基并加入 50 μ L 溶解缓冲液 1, 并在室温下培养, 同时振摇 30 分钟。

[0336] 7. 在所有孔内加入 150 μ L 免疫试剂 (总体积为 200 μ L / 孔)。

[0337] 8. 密封该培养板并振摇 2 分钟, 在 Wallac 微量滴定盘 μ 闪烁计数器的腔内放置 16 小时。

[0338] 第 3 天

[0339] 在 1450Trilux 闪烁计数器内计数 [¹²⁵I]cAMP 的量为时 2 分钟。

[0340] 数据处理

[0341] 建立 cAMP 相对于 CPM 的标准曲线。

[0342] 表 1. 标准液典型分析数据

[0343]

cAMP(pmol/mL)	CPM		平均 CPM
0.2	5725	5769	5530
0.4	5367	5259	6317
0.8	4695	4796	6507
1.6	4251	4178	6581
3.2	3434	3429	6601
6.4	2758	2716	6711
12.8	2094	2054	6680
25.6	1531	1573	6653

[0344] 从 cAMP 相对于 CPM 的标准曲线算出每份未知试样的 cAMP 浓度 (pmol/mL)。使用以下公式计算抑制率%：

[0345]

$$\text{抑制}\% = \frac{(\text{对照 pmol} - \text{试样 pmol}) \times 100}{\text{对照 pmol}(\text{细胞} + \text{仅仅 PGD}_2)}$$

[0346] 本发明可以其它特殊方式实施而不背离其精神或基本特征。