



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1787817 B

(45) 授权公告日 2011.09.07

(21) 申请号 200480013194.3

A61K 31/195(2006.01)

(22) 申请日 2004.05.19

A61K 31/216(2006.01)

(30) 优先权数据

C07C 323/63(2006.01)

60/471,931 2003.05.19 US

C07D 207/12(2006.01)

C07D 211/32(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C07D 241/04(2006.01)

2005.11.15

C07D 205/04(2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2004/015701 2004.05.19

WO 033037271 A2, 2003.05.08, 全文.

(87) PCT申请的公布数据

审查员 黄轶洁

W02004/103309 EN 2004.12.02

(73) 专利权人 IRM 责任有限公司

地址 百慕大群岛(英)哈密尔顿

(72) 发明人 T·H·马尔西利耶 N·S·格雷

江涛 陆文硕 潘世风

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 31/397(2006.01)

A61K 31/40(2006.01)

A61K 31/445(2006.01)

A61K 31/495(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 21 页

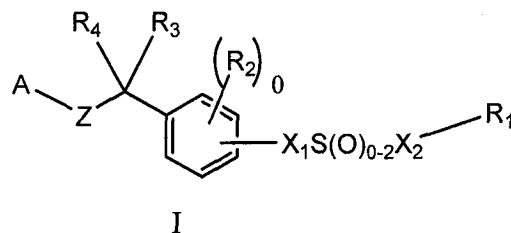
(54) 发明名称

免疫抑制剂化合物及组合物

(57) 摘要

本发明涉及免疫抑制剂、其制备方法、其用途以及含有它们的药物组合物。本发明提供了一类新的用于治疗或预防由淋巴细胞相互作用介导的疾病或紊乱、特别是与 EDG 受体介导的信号转导有关的疾病的化合物。

1. 化合物,选自式 I 化合物或其可药用的盐:

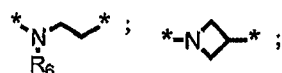


其中:

A 是 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}_5$; 其中 R_5 是氢;

X_1 和 X_2 各自独立地选自键或 C_1 亚烷基;

Z 选自:



其中 Z 的左右星号分别表示式 I 中 $-\text{C}(\text{R}_3)(\text{R}_4)-$ 与 A 之间的连接点; R_6 是氢;

R_1 为 C_{6-10} 芳基; 其中 R_1 的任何芳基任选被选自卤代、 C_{6-10} 芳基 C_0 烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_0 烷基或 C_{1-6} 烷基的基团取代; 其中 R_1 的任何芳基基团可任选被选自卤素取代的 C_{1-6} 烷基的一至五个基团取代; 其中所述的芳基是苯基;

R_2 选自 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-12} 环烷基 C_{0-4} 烷基、卤代、卤素取代的 C_{1-6} 烷基以及卤素取代的 C_{1-6} 烷氧基;

R_3 及 R_4 是氢。

2. 权利要求 1 的化合物, 选自:

- 1-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸,
- 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄氨基]-丙酸,
- 1-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸,
- 1-[4-(2-乙基-联苯-4-基甲硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸,
- 3-[4-(2-甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄氨基]-丙酸,
- 1-[4-(4-溴-3-甲基-苄基硫甲基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸,
- 1-[4-(2-甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸,
- 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基甲硫基)-苄氨基]-丙酸,
- 1-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基甲硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸,
- 3-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基硫基)-苄氨基]-丙酸,
- 3-[4-(2'-乙基-2-三氟甲基-联苯-4-基甲硫基)-苄氨基]-丙酸,
- 1-[4-(2'-乙基-2-三氟甲基-联苯-4-基甲硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸,
- 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基甲基亚磺酰基)-苄氨基]-丙酸, 和
- 3-[4-(2-乙基-联苯-4-基甲硫基)-苄氨基]-丙酸。

3. 药物组合物, 包含治疗有效量的权利要求 1 或 2 的化合物以及可药用的赋形剂。

免疫抑制剂化合物及组合物

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求美国临时专利申请号 60/471,931 (于 2003 年 5 月 19 日提交) 的优先权。这些申请的全部公开内容整体引入本文作为参考,并用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] 发明领域

[0005] 本发明提供了一类新的用于治疗或预防由淋巴细胞相互作用介导的疾病或紊乱、特别是与 EDG 受体介导的信号转导有关的疾病的免疫抑制剂化合物。

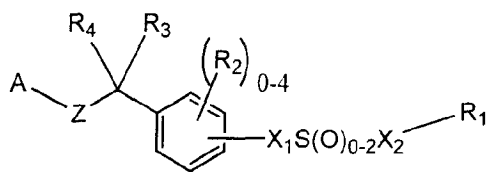
[0006] 背景

[0007] EDG 受体属于紧密相关的脂活化 G- 蛋白偶联受体家族。EDG-1、EDG-3、EDG-5、EDG-6 及 EDG-8 (还分别称为 S1P1、S1P3、S1P2、S1P4 及 S1P5) 作为 1- 磷酸鞘氨醇 (S1P) 的特异性受体而被识别。EDG2、EDG4 及 EDG7 (还分别称为 LPA1、LPA2 及 LPA3) 是溶血磷脂酸 (LPA) 的特异性受体。在同型的 S1P 受体中,EDG-1、EDG-3 及 EDG-5 在多种组织中被广泛表达,而 EDG-6 的表达主要限于淋巴组织和血小板,EDG-8 的表达限于中枢神经系统。EDG 受体负责信号转导并且被认为在包括细胞生长、增殖、维持、迁移、分化、可塑性及细胞凋亡在内的细胞过程中发挥着重要作用。某些 EDG 受体与由淋巴细胞相互作用介导的疾病、例如移植排斥、自身免疫性疾病、炎症疾病、传染性疾病及癌症有关。EDG 受体活性的改变对这些疾病的病理学和 / 或症候学而言是有益的。因此,本身能改变 EDG 受体活性的分子作为治疗剂在治疗这些疾病中是有用的。

[0008] 发明概述

[0009] 本申请涉及式 I 化合物及其 N- 氧化物衍生物、前药衍生物、被保护的衍生物、单独的异构体及异构体的混合物以及这些化合物的可药用的盐和溶剂化物 (例如水合物) :

[0010]



I

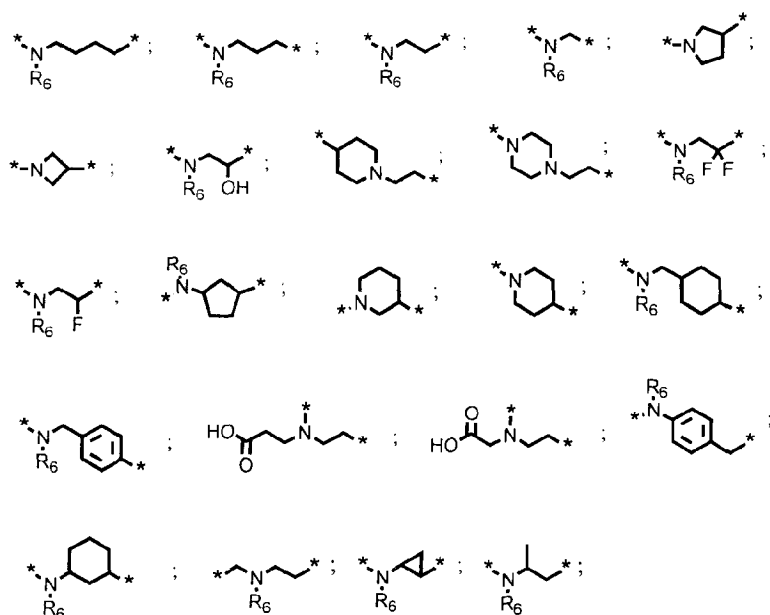
[0011] 其中 :

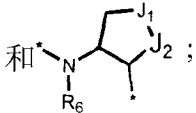
[0012] A 选自 $-C(O)OR_5$ 、 $-OP(O)(OR_5)_2$ 、 $-P(O)(OR_5)_2$ 、 $-S(O)_2OR_5$ 、 $-P(O)(R_5)OR_5$ 和 1H- 四唑 -5- 基 ; 其中每个 R_5 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基 ;

[0013] X_1 和 X_2 各自独立地选自键或 C_{1-6} 亚烷基 ;

[0014] Z 选自 :

[0015]



[0016] 和  ;

[0017] 其中 Z 的左右星号分别表示式 I 中 $-C(R_3)(R_4)-$ 与 A 之间的连接点; R_6 选自氢和 C_{1-6} 烷基; 且 J_1 和 J_2 独立地为亚甲基或选自 S、O 和 NR_5 的杂原子; 其中 R_5 选自氢和 C_{1-6} 烷基;

[0018] R_1 选自 C_{6-10} 芳基和 C_{2-9} 杂芳基; 其中 R_1 的任何芳基或杂芳基任选被选自卤代、 C_{6-10} 芳基 C_{0-4} 烷基、 C_{2-9} 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} 烷基或 C_{1-6} 烷基的基团取代; 其中 R_1 的任何芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基基团可任选被选自卤代、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素取代的 C_{1-6} 烷基及卤素取代的 C_{1-6} 烷氧基的一至五个基团取代; 且 R_1 的任何烷基基团的亚甲基可任选被选自 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-NR_5-$ 及 $-O-$ 的原子或基团替换; 其中 R_5 选自氢或 C_{1-6} 烷基;

[0019] R_2 选自 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-12} 环烷基 C_{0-4} 烷基、卤代、卤素取代的 C_{1-6} 烷基以及卤素取代的 C_{1-6} 烷氧基;

[0020] R_3 及 R_4 独立地选自氢、 C_{1-6} 烷基、卤代、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素取代的 C_{1-6} 烷基及卤素取代的 C_{1-6} 烷氧基。

[0021] 本发明的第二个方面是含有与一种或多种适宜赋形剂混合的式 I 化合物或其 N-氧化物衍生物、单独的异构体或异构体的混合物、或者其可药用盐的药物组合物。

[0022] 本发明的第三个方面是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预防、抑制或改善该疾病的病理学和 / 或症候学, 该方法包括给动物施用治疗有效量的式 I 化合物或其 N-氧化物衍生物、单独的异构体或异构体的混合物、或者其可药用盐。

[0023] 本发明的第四个方面是式 I 化合物在制备用于治疗动物疾病的药物中的用途, 其中 EDG 受体介导的信号转导的改变可引起该疾病的病理学和 / 或症候学。

[0024] 本发明的第五个方面是制备式 I 化合物及其 N-氧化物衍生物、前药衍生物、被保护的衍生物、单独的异构体及异构体的混合物及其可药用盐的方法。

[0025] 优选实施方案的叙述

[0026] 本发明提供了用于治疗 and / 或预防由淋巴细胞相互作用介导的疾病或紊乱的化合物。还提供了治疗这些疾病或紊乱的方法。

[0027] 定义

[0028] 在本说明中,除非另有定义,否则:

[0029] 作为基团及作为其它基团(例如卤素取代的烷基、烷氧基、酰基、烷硫基、烷基磺酰基及烷基亚磺酰基)结构成分的“烷基”可以是直链或支链。作为基团及作为其它基团结构成分的“链烯基”含有一个或多个碳-碳双键,且可以是直链或支链。任何双键可以是顺式或反式构型。作为基团及作为其它基团和化合物结构成分的“炔基”含有至少一个 $C \equiv C$ 三键且还可含有一个或多个 $C = C$ 双键,并且只要可能就可以是直链或支链。单独的或作为其它基团结构成分的任何环烷基可以含有 3 至 8 个碳原子,优选 3 至 6 个碳原子。“亚烷基”和“亚烯基”分别为由“烷基”和“链烯基”基团衍生的二价基团。在本申请中, R^1 的任何烷基基团可任选地插入选自 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-NR^{20}-$ 和 $-O-$ (其中 R^{20} 为氢或 C_{1-6} 烷基)基团的一个基团。这些基团包括 $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-S(O)_2-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-NR^{20}-CH_2-$ 和 $-CH_2-O-(CH_2)_2-$ 等。

[0030] “芳基”表示含有六至十个环碳原子的单环或稠合二环芳香环组合。例如, C_{6-12} 芳基可以是苯基、联苯基或萘基,优选苯基。稠合二环可以是部分饱和的,例如 1,2,3,4-四氢萘等。“亚芳基”表示由芳基基团衍生的二价基团。例如,本申请中所用的亚芳基可以是亚苯基、亚联苯基和亚萘基等。

[0031] “卤代”或“卤素”表示 F、Cl、Br 或 I,优选 F 或 Cl。卤素取代的烷基基团和化合物可以被部分卤代或全卤代,由此对于多卤代,卤素取代基可以相同或不同。优选的全卤代烷基基团例如是三氟甲基或三氟甲氧基。

[0032] “杂芳基”表示本申请中定义的芳基加上至少一个选自 N、O 或 S 的杂原子部分,并且除非另有说明,每个环包括 5 至 6 个环原子。例如 C_2 杂芳基包括噁二唑和三唑等。 C_9 杂芳基包括喹啉和 1,2,3,4-四氢-喹啉等。本申请中所用的 C_{2-9} 杂芳基包括噻吩基、吡啶基、呋喃基、异噻唑基、苯并噻唑基或苯并[1,3]二氧杂环戊烯基,优选噻吩基、呋喃基或吡啶基。“亚杂芳基”表示环组合包含二价基团的在本申请中定义的杂芳基。稠合二环的杂芳基环系可以是部分饱和的,例如,2,3-二氢-1H-异吲哚和 1,2,3,4-四氢-喹啉等。

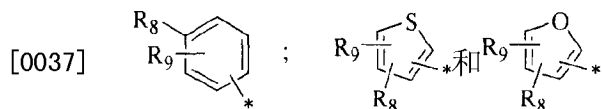
[0033] 本发明中所用的 EDG-1 选择性化合物(药物或调节剂)具有特异性,与 EDG-3 以及 EDG-5、EDG-6 和 EDG-8 中的一种或多种相比,该特异性对 EDG-1 是选择性的。本文所用的对一种 EDG 受体(“选择性受体”)相对于另一种 EDG 受体(“非选择性受体”)而言的选择性表示该化合物在诱导由选择性 EDG 受体(例如 EDG-1)介导的活性方面比非选择性 SIP-特异性 EDG 受体具有高得多的效力。如果在 GTP- γ S 结合试验中进行测定(如下文实施例中所述),则 EDG-1 选择性化合物对选择性受体(EDG-1)的 EC_{50} (产生最大响应 50% 的有效浓度)比非选择性受体(例如 EDG-3、EDG-5、EDG-6 和 EDG-8 中的一种或多种)的 EC_{50} 一般低至少 5、10、25、50、100、500 或 1000 倍。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明提供了用于治疗或预防由淋巴细胞相互作用介导的疾病或紊乱的化合物。在一个实施方案中,对于式 I 化合物, R_1 为任选被卤代、 C_{6-10} 芳基 C_{0-4} 烷基、 C_{2-9} 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} 烷基或 C_{1-6} 烷基取代的苯基、萘基、呋喃基或

噻吩基；其中 R_1 的任何芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基基团可任选被选自卤代、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素取代的 C_{1-6} 烷基及卤素取代的 C_{1-6} 烷氧基的一至五个基团取代；且 R^1 的任何烷基基团的亚甲基可任选被选自 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-NR_5-$ 及 $-O-$ 的原子或基团替换；其中 R_5 为氢或 C_{1-6} 烷基。

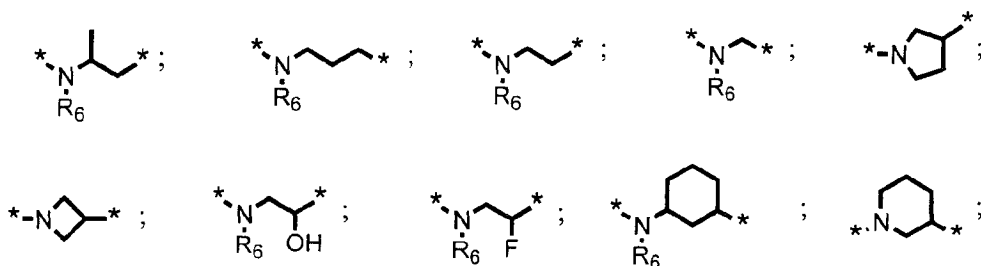
[0036] 在另一个实施方案中， R_1 选自：



[0038] 其中星号为 R_1 和 X_2 的连接点； R_8 为卤代、 C_{6-10} 芳基 C_{0-4} 烷基、 C_{2-9} 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} 烷基或 C_{1-6} 烷基；其中 R_8 的任何芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基基团可任选被选自卤代、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素取代的 C_{1-6} 烷基及卤素取代的 C_{1-6} 烷氧基的一至三个基团取代；且 R_8 的任何烷基基团的亚甲基可任选被选自 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-NR_5-$ 及 $-O-$ 的原子或基团替换；其中 R_5 为氢或 C_{1-6} 烷基；且 R_9 选自卤代、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素取代的 C_{1-6} 烷基及卤素取代的 C_{1-6} 烷氧基。

[0039] 在另一个实施方案中，A 为 $-C(O)OH$ ；Z 选自：

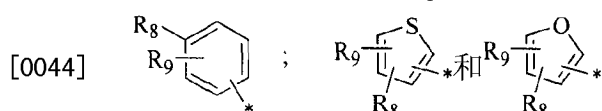
[0040]



[0041] 其中 Z 的左右星号分别表示式 I 中 $-C(R_3)(R_4)-$ 和 A 之间的连接点； R_6 选自氢和 C_{1-6} 烷基；且 R_3 和 R_4 均为氢。

[0042] 在另一实施方案中， R_2 选自甲基、乙基、环丙基、氯、溴、氟和甲氧基。

[0043] 在另一实施方案中， R_1 选自：



[0045] 其中 R_8 选自卤代、苯基、环己基、噻吩基、3,3-二甲基-丁基、吡啶基、环戊基和哌啶基；其中 R_8 可任选被选自三氟甲基、甲氧基、氟、三氟甲氧基和甲基的 1 至 3 个基团取代；且 R_9 选自三氟甲基、氟、甲基、氯、甲氧基和乙基。

[0046] 本发明优选的化合物选自：

[0047] 1-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸，

[0048] 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄氨基]-丙酸，

[0049] 1-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸，

[0050] 1-[4-(2-乙基-联苯-4-基甲硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸，

[0051] 3-[4-(2-甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄氨基]-丙酸，

[0052] 1-[4-(4-溴-3-甲基-苄基硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸，

[0053] 1-[4-(2-甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸，

[0054] 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基甲硫基)-苄氨基]-丙酸，

[0055] 1-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基甲硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸,

[0056] 3-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基硫基)-苄氨基]-丙酸,

[0057] 3-[4-(2'-乙基-2-三氟甲基-联苯-4-基甲硫基)-苄氨基]-丙酸,

[0058] 1-[4-(2'-乙基-2-三氟甲基-联苯-4-基甲硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸,

[0059] 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基甲基亚磺酰基)-苄氨基]-丙酸,和

[0060] 3-[4-(2-乙基-联苯-4-基甲硫基)-苄氨基]-丙酸。

[0061] 此外,优选的化合物还显示在下文的实施例和表 1 中。

[0062] 本发明提供了具有以被保护形式存在的羟基或氨基基团的化合物形式,这些形式作为前药而起作用。前药是施用后通过一种或多种化学或生化转化而转变为活性药物形式的化合物。在生理条件下易于转变为所要求化合物的本发明化合物的形式是所要求化合物的前药,并且在本发明的范围之内。前药的实例包括羟基基团被酰化而形成相对不稳定的酯、例如乙酸酯的形式,以及氨基基团被甘氨酸或 L-氨基酸如丝氨酸的羧基基团酰化而形成对普通代谢酶水解特别敏感的酰胺键的形式。

[0063] 式 I 化合物可以以游离形式或以盐的形式、例如与无机或有机酸的加成盐的形式存在。当存在羟基基团时,这些基团还可以以盐的形式、例如铵盐或金属盐(例如锂、钠、钾、钙、锌或镁的盐)或者其混合物的形式存在。水合物或溶剂化物形式的式 I 化合物及其盐同样是本发明的一部分。

[0064] 当式 I 化合物在分子中具有不对称中心时,可得到多种旋光异构体。本发明还包括对映异构体、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,本发明还包括顺式化合物、反式化合物及其混合物。当涉及显示出上文提到的不对称碳原子或不饱和键的原料时,应有类似的考虑。

[0065] 治疗免疫调节性病症的方法和药物组合物

[0066] 游离形式或可药用盐形式的式 I 化合物显示出有价值的药理特性,例如淋巴细胞再循环调节特性,例如由实施例 5 的体外和体内试验所表明的,因此表明可用于治疗。式 I 化合物的 EC_{50} 优选为 1×10^{-11} 至 $1 \times 10^{-5} M$, 优选小于 50nM。该化合物对一种或多种 EDG/S1P 受体、优选 EDG-1/S1P-1 显示出选择性。本发明的 EDG-1/S1P-1 选择性调节剂可以通过测定化合物与 EDG-1/S1P-1 及一种或多种其它 EDG/S1P 受体(例如 EDG-3/S1P-3、EDG-5/S1P-2、EDG-6/S1P-4 和 EDG-8/S1P-5)的结合来鉴别。EDG-1/S1P-1 选择性调节剂对于 EDG-1/S1P-1 受体的 EC_{50} 通常为 1×10^{-11} 至 $1 \times 10^{-5} M$, 优选小于 50nM, 更优选小于 5nM。它对一种或多种其它 EDG/S1P 受体的 EC_{50} 比对 EDG-1/S1P-1 的 EC_{50} 高至少 5、10、25、50、100、500 或 1000 倍。因此,一些 EDG-1/S1P-1 调节性化合物对 EDG-1/S1P-1 的 EC_{50} 将小于 5nM, 而对一种或多种其它 EDG/S1P 受体的 EC_{50} 为至少 100nM 或更高。除了测定与 EDG/S1P 受体的结合活性外, EDG-1/S1P-1 选择性药物还可以通过检查测试药物修饰细胞过程的能力或由 EDG/S1P 受体介导的活性来鉴别。

[0067] 因此,式 I 化合物在治疗和 / 或预防由淋巴细胞相互作用介导的疾病或紊乱中是有用的,例如在移植中,例如细胞、组织或器官的同种异体移植或异种移植急性或慢性排斥或者延迟移植功能、移植抗宿主病、自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、桥本甲状腺炎、多发性硬化症、重症肌无力、I 型或 II 型糖尿病及与其有关的紊乱、

脉管炎、恶性贫血、舍格伦 (Sjogren) 综合征、眼色素层炎、牛皮癣、格雷夫斯 (Graves) 眼病、局限性脱发等、过敏性疾病如过敏性哮喘、特应性皮炎、过敏性鼻炎 / 结膜炎、过敏性接触性皮炎, 任选伴有潜在异常反应的炎性疾病如炎性肠病、节段性回肠炎或溃疡性结肠炎、内源性哮喘、炎性肺损伤、炎性肝损伤、炎性肾小球损伤、动脉粥样硬化、骨关节炎、刺激性接触性皮炎及另外的湿疹性皮炎、脂溢性皮炎、免疫介导性紊乱的皮肤表现、炎性眼病、角膜结膜炎、心肌炎或肝炎、缺血 / 再灌注损伤如心肌梗塞、中风、肠缺血、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, 传染性疾病如中毒性休克 (例如超抗原诱导的)、败血症性休克、成人呼吸窘迫综合征或病毒性感染如 AIDS、病毒性肝炎、慢性细菌感染或者老年性痴呆。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、神经组织、心脏、肺、联合性心 - 肺、肾脏、肝脏、肠、胰脏、气管或食管。对于上述用途, 所需剂量当然可以根据施用方式、所治疗的具体病症及所需效应而改变。

[0068] 此外, 式 I 化合物在癌症的化疗中、特别是对实体瘤如乳腺癌的癌症化疗是有用的, 或者用作抗血管生成剂。

[0069] 所需剂量当然可以根据施用方式、所治疗的具体病症及所需效应而改变。通常, 以约 0.03 至 2.5mg/kg 体重的每日剂量全身施用可得到满意的结果。在较大的哺乳动物、例如人类中, 标示的每日剂量为约 0.5mg 至约 100mg, 以例如至多一日四次的分开剂量或以延迟的形式方便地施用。适用于口服施用的单位剂型包含约 1 至 50mg 活性成分。

[0070] 式 I 化合物可以通过任何常规的途径来施用, 特别是肠内施用 (例如口服, 例如以片剂或胶囊剂的形式施用) 或胃肠道外施用, 例如以可注射溶液或混悬液的形式施用, 局部施用 (例如以洗剂、凝胶剂、软膏剂或乳膏剂的形式施用), 或者经鼻施用或以栓剂形式施用。包含游离形式或可药用盐形式的式 I 化合物以及至少一种可药用载体或稀释剂的药物组合物可以按常规方法通过与可药用载体或稀释剂混合来生产。

[0071] 式 I 化合物可以以游离形式或以可药用盐的形式施用, 例如上文所说明的。这些盐可以按常规方法来制备并且显示出与游离化合物相同级别的活性。

[0072] 根据前文所述, 本发明还提供了:

[0073] 1.1 在需要这种治疗的受试者中预防或治疗例如上文表明的由淋巴细胞介导的紊乱或疾病的方法, 该方法包括给所述受试者施用有效量的式 I 化合物或其可药用盐;

[0074] 1.2 在需要这种治疗的受试者中预防或治疗例如上文表明的急性或慢性移植排斥或 T- 细胞介导的炎性或自身免疫性疾病的方法, 该方法包括给所述受试者施用有效量的式 I 化合物或其可药用盐;

[0075] 1.3 在需要其的受试者中抑制或控制血管生成失常、例如 1- 磷酸鞘氨醇 (S1P) 介导的血管生成的方法, 该方法包括给所述受试者施用治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐;

[0076] 1.4 在需要其的受试者中预防或治疗由新血管生成过程介导的或与血管生成失常有关的疾病的方法, 该方法包括给所述受试者施用治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐;

[0077] 2. 游离形式或可药用盐形式的式 I 化合物, 用作药物, 例如用于上文 1.1 至 1.4 项下表明的任何一种方法中;

[0078] 3. 药物组合物, 例如用于上文 1.1 至 1.4 项中的任何一种方法中, 该组合物包含游

离形式或可药用盐形式的式 I 化合物以及用于其的可药用稀释剂或载体；

[0079] 4. 式 I 化合物或其可药用盐，用于制备在上文 1.1 至 1.4 项的任何一种方法中使用的药物组合物。

[0080] 式 I 化合物可以作为唯一的活性成分施用或者例如作为辅助药与其它药物组合施用，所述的其它药物例如是免疫抑制剂或免疫调节剂或者其它抗炎药物（例如用于治疗或预防同种异体移植物或异种移植物的急性或慢性排斥或者炎性或自身免疫性紊乱），或者是化疗剂（例如恶性细胞抗增殖剂）。例如，式 I 化合物可以与如下药物组合使用：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、40-0-(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；环磷酸胺；硫唑嘌呤（azathioprene）；甲氨蝶呤；来氟米特；咪唑立宾；麦考酚酸；麦考酚酸吗乙酯；15-脱氧精脒菌素或其免疫抑制同系物、类似物或衍生物；免疫抑制单克隆抗体，例如对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，例如具有至少一部分 CTLA4 或其突变体的胞外域的重组结合分子，例如与非-CTLA4 蛋白序列结合的 CTLA4 或其突变体的至少细胞外部分，例如 CTLA4Ig（例如指定的 ATCC 68629）或其突变体，例如 LEA29Y；粘附分子抑制剂，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；或者化疗剂。

[0081] 术语“化疗剂”表示任何的化疗剂，并且它包括但不限于：

[0082] i. 芳香酶抑制药，

[0083] ii. 抗雌激素药、抗雄激素药（特别是患前列腺癌时）或戈那瑞林激动剂，

[0084] iii. 拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 II 抑制剂，

[0085] iv. 微管活化剂、烷化剂、抗肿瘤抗代谢药物或铂配合物，

[0086] v. 靶向 / 减小蛋白或脂类激酶活性或者蛋白或脂类磷酸酶活性的化合物，其它抗血管生成化合物或可诱导细胞分化过程的化合物，

[0087] vi. 缓激肽 1 受体或血管紧张素 II 拮抗剂，

[0088] vii. 环加氧酶抑制剂、二磷酸酯化合物、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、肝素酶（heparanase）抑制剂（防止硫酸乙酰肝素降解）如 PI-88、生物应答修饰剂，优选淋巴因子或干扰素，例如干扰素 γ 、遍在蛋白化抑制剂或能阻断抗细胞凋亡途径的抑制剂，

[0089] 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，

[0090] ix. 端粒末端转移酶抑制剂，例如 telomestatin，

[0091] x. 蛋白酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、蛋氨酸氨基肽酶抑制剂，例如 bengamide 或其衍生物，或蛋白体抑制剂，例如 PS-341，和 / 或

[0092] xi. mTOR 抑制剂。

[0093] 如本文所用的术语“芳香酶抑制剂”涉及能抑制雌激素生成，即将雄甾烯二酮和甾酮底物分别转化为雌酮和雌二醇的化合物。该术语包括但不限于甾类，尤其是阿他美坦、依西美坦和福美坦，和特别是非甾类，尤其是氨鲁米特、罗谷亚胺、吡鲁米特、曲洛司坦、甾内酯、酮康唑、伏氯唑、法屈唑、阿那曲唑和来曲唑。包含芳香酶抑制剂化疗剂的本发明的组合对于治疗激素受体阳性肿瘤如乳腺癌是特别有用的。

[0094] 如本文所用的术语“抗雌激素药”涉及在雌激素受体水平对抗雌激素效应的化合物。该术语包括但不限于他莫昔芬、氟维司群、雷洛昔芬和盐酸雷洛昔芬。包含抗雌激素化疗剂的本发明的组合对于治疗雌激素受体阳性肿瘤如乳腺癌是特别有用的。

[0095] 如本文所用的术语“抗雄激素药”涉及能够抑制雄性激素生物效应的任一物质，包括但不限于比卡鲁胺。

[0096] 如本文所用的术语“戈那瑞林激动剂”包括但不限于阿巴瑞克、戈舍瑞林和乙酸戈舍瑞林。

[0097] 如本文所用的术语“拓扑异构酶 I 抑制剂”包括但不限于托泊替康、依立替康、9- 硝基喜树碱和大分子喜树碱钨合物 PNU-166148 (W099/17804 中的化合物 A1)。

[0098] 如本文所用的术语“拓扑异构酶 II 抑制剂”包括但不限于蒽环霉素类如阿霉素、柔红霉素、表柔比星、伊达比星和奈莫柔比星 (nemorubicin)、蒽醌米托蒽醌和洛索蒽醌，以及鬼臼脂素 (podophyllotoxines) 依托泊苷和替尼泊苷。

[0099] 术语“微管活性剂”涉及微管稳定剂和微管去稳定剂，包括但不限于紫杉烷类如紫杉醇和多西他赛，长春生物碱如长春花碱且特别是硫酸长春花碱、长春新碱且特别是硫酸长春新碱，以及长春瑞滨，discodermolides 以及埃坡霉素及其衍生物，例如埃坡霉素 B 或其衍生物。

[0100] 如本文所用的术语“烷化剂”包括但不限于白消安、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥或亚硝基脲 (BCNU 或 Gliadel™)。

[0101] 术语“抗肿瘤抗代谢物”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。

[0102] 如本文所用的术语“铂配合物”包括但不限于卡铂、顺铂和奥沙利铂。

[0103] 如本文所用的术语“靶向 / 减小蛋白或脂类激酶活性的化合物，其它抗血管生成化合物”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脂激酶抑制剂，例如能靶向、减小或抑制以下酶活性的化合物：酪氨酸激酶受体的表皮生长因子家族 (EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 作为同或异二聚物)、酪氨酸激酶受体的血管内皮生长因子家族 (VEGFR)、血小板源性生长因子受体 (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 酪氨酸激酶受体家族、Ax1 酪氨酸激酶受体家族、Ret 酪氨酸激酶受体、Kit/SCFR 酪氨酸激酶受体、c-Ab1 家族成员及其基因融合物 (例如 BCR-Ab1)、蛋白激酶 C (PKC) 和丝氨酸 / 苏氨酸激酶的 Raf 家族成员、MEK、SRC、JAK、FAK、PDK 或 PI (3) 激酶家族成员或与 PI (3) 激酶有关的激酶家族成员、和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶家族 (CDK) 成员和有其它例如与蛋白或脂类激酶抑制无关的活性机理的抗血管生成化合物。

[0104] 靶向、减小或抑制 VEGFR 活性的化合物尤其是能抑制 VEGF 酪氨酸激酶受体、抑制 VEGF 受体或与 VEGF 结合的化合物、蛋白质或抗体，和特别是在下述文献中一般和具体公开的化合物、蛋白质或单克隆抗体，例如 WO 98/35958 中的 1-(4- 氯苯氨基)-4-(4- 吡啶基甲基) 酞嗪或其可药用盐，如琥珀酸盐；WO 00/27820 中的 N- 芳基 (硫代) 氨基苯甲酸酰胺衍生物，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 -4- 吡啶基) 甲基] 氨基 -N-[3- 三氟甲基苯基] 苯甲酰胺，或者 WO 00/09495、WO 00/59509、WO 98/11223、WO 00/27819 和 EP0769947 中的那些；如 M. Prewett 等人在 Cancer Research 59(1999)5209-5218 中、F. Yuan 等人在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第 93

卷,第 14765-14770 页,1996 年 12 月中、Z. Zhu 等人在 *Cancer Res.* 58,1998,3209-3214 中和 J. Mordenti 等人在 *Toxicologic Pathology*, 第 27 卷第 1 期,第 14-21 页,1999 中描述的那些;WO 00/37502 和 WO 94/10202 中的那些;M. S. O' Reilly 等人在 *Cell* 79,1994,315-328 中描述的 Angiostatin™;M. S. O' Reilly 等人在 *Cell* 88,1997,277-285 中描述的 Endostatin™;邻氨基苯甲酸酰胺;ZD4190;ZD6474;SU5416;SU6668;或抗 VEGF 抗体或抗 -VEGF 受体抗体,例如 RhuMab。

[0105] 抗体表示完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体以及抗体碎片,只要该抗体碎片能显示出所需的生物活性。

[0106] 靶向、减小或抑制表皮生长因子受体家族活性的化合物尤其是能抑制 EGF 酪氨酸激酶受体家族成员如 EGF 受体、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 或结合 EGF 或 EGF 有关配体的化合物、蛋白质或抗体,或者是对 ErbB 及 VEGF 激酶受体具有双重抑制作用的那些,它们特别是下述文献中概括和具体公开的化合物、蛋白质或单克隆抗体:WO 97/02266,如实施例 39 的化合物,或者 EP 0 564 409、WO 99/03854、EP 0520722、EP 0 566 226、EP 0 787 722、EP 0 837 063、US 5,747,498、WO 98/10767、WO 97/30034、WO 97/49688、WO 97/38983,尤其是在 WO 96/30347(例如称为 CP 358774 的化合物)、WO 96/33980(例如化合物 ZD 1839)及 WO 95/03283(例如化合物 ZM105180)或 PCT/EP02/08780 中公开的那些;例如曲妥单抗(Herpetin[®])、西妥昔单抗、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。

[0107] 靶向、减小或抑制 PDGFR 活性的化合物尤其是能抑制 PDGF 受体的化合物,例如 N-苯基-2-嘧啶-胺衍生物,如伊马替尼。

[0108] 靶向、减小或抑制 c-AbI 家族成员及其基因融合产物活性的化合物例如是 N-苯基-2-嘧啶-胺衍生物,如伊马替尼;PD180970;AG957 或 NSC 680410。

[0109] 靶向、减小或抑制蛋白激酶 C、Raf、MEK、SRC、JAK、FAK 和 PDK 家族成员或 PI(3)激酶或与 PI(3)激酶有关家族成员和/或细胞周期蛋白依赖性激酶家族(CDK)成员活性的化合物,尤其是 EP 0 296 110 中公开的星孢素衍生物如米哚妥林;其它化合物的实例包括例如 UCN-01、沙芬戈、BAY 43-9006、苔藓抑素 1、哌立福辛;伊莫福新;RO 318220 和 RO 320432;G0 6976;Isis 3521;或 LY333531/LY379196。

[0110] 其它抗血管生成化合物例如是萨力多胺(THALOMID)和 TNP-470。

[0111] 靶向、减小或抑制蛋白或脂质磷酸酶活性的化合物例如是磷酸酶 1、磷酸酶 2A、PTEN 或 CDC25 如冈田酸或其衍生物的抑制剂。

[0112] 能诱导细胞变异过程的化合物例如是视黄酸、 α -、 γ -或 6-生育酚或 α -、 γ -或 6-生育三烯酚。

[0113] 如本文所用的术语环加氧酶抑制剂包括但不限于例如塞来考昔(Celebrex[®])、罗非考昔(Vioxx[®])、etoricoxib、伐地考昔或 5-烷基-2-芳基氨基苯基乙酸如 5-甲基-2-(2'-氯-6'-氟苯氨基)苯基乙酸。

[0114] 如本文所用的术语“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。

[0115] 如本文所用的术语“二磷酸酯化合物”包括但不限于依替膦酸、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。

[0116] 如本文所用的术语“基质金属蛋白酶抑制剂”包括但不限于胶原模拟肽和非模拟肽抑制剂、四环素衍生物例如异羟肟酸模拟肽抑制剂巴马司他及其口服生物可接受类似物马立马司他、普淋司他、BMS-279251、BAY12-9566、TAA211 或 AAJ996。

[0117] 如本文所用的术语“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- 去氧雷帕霉素、16- 戊 -2- 炔基氧基 -32- 去氧雷帕霉素、16- 戊 -2- 炔基氧基 -32(S)- 二氢 - 雷帕霉素、16- 戊 -2- 炔基氧基 -32(S)- 二氢 -40-0-(2- 羟乙基) - 雷帕霉素及更优选的 40-0-(2- 羟乙基) - 雷帕霉素。雷帕霉素衍生物的其它实例包括例如 CCI779 或 40-[3- 羟基 -2-(羟甲基) -2- 甲基丙酸盐] - 雷帕霉素或其可药用盐（如 USP 5, 362, 718 中所公开的），ABT578 或 40-(四唑基) - 雷帕霉素、特别是 40- 表-(四唑基) - 雷帕霉素（例如 WO 99/15530 中所公开的），或者是如例如 WO 98/02441 和 W001/14387 中公开的 rapalogs，例如 AP23573。

[0118] 当式 I 化合物与其它免疫抑制 / 免疫调节、抗炎或化疗疗法组合施用，共同施用的免疫抑制、免疫调节、抗炎或化疗化合物的剂量当然可以根据所共用药物的类型（例如它是类固醇还是钙调磷酸酶抑制剂）、所用的具体药物和所治疗的病症等而变化。

[0119] 根据前文所述，本发明在另一方面还提供了：

[0120] 5. 上文定义的方法，该方法包括共同施用、例如同时或依次施用治疗有效的非中毒量的式 I 化合物以及至少第二种药物物质，例如免疫抑制药物、免疫调节药物、抗炎药物或化疗药物，例如上文所指出的；

[0121] 6. 药物组合，例如药盒，包含 a) 第一种药物，为游离形式或可药用盐形式的如本文所公开的式 I 化合物，及 b) 至少一种共用药物，例如免疫抑制药物、免疫调节药物、抗炎药物或化疗药物，例如上文所指出的。该药盒可以包含其施用说明。

[0122] 如本文所用的术语“共同施用”或“组合施用”等意欲囊括给单个患者施用选定的治疗药物，并且意欲包括其中药物不一定通过相同施用途径或在相同时间施用的治疗方案。

[0123] 如本文所用的术语“药物组合”表示将一种以上的活性成分混合或组合而得到的产品，包括活性成分的固定组合及非固定组合。术语“固定组合”表示以单一实体或剂量的形式给患者同时施用活性成分（例如式 I 化合物）及共用药物。术语“非固定组合”表示活性成分（例如式 I 化合物）及共用药剂作为单独的实体没有具体时间限制地同时、共同或依次施用于患者，其中这种施用对患者体内可提供这两种化合物的治疗有效水平。后者还应用于鸡尾酒疗法，例如施用三种或三种以上的活性成分。

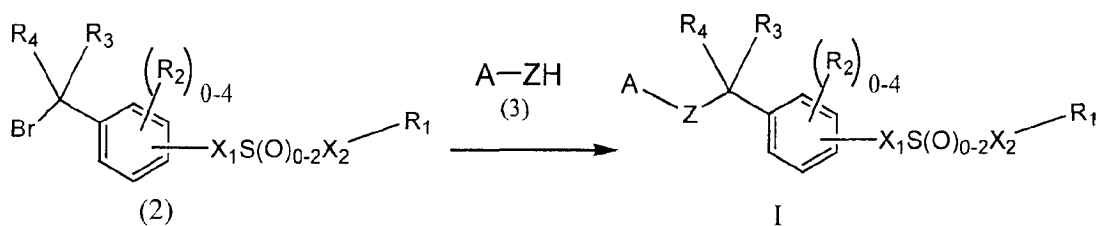
[0124] 制备本发明化合物的方法

[0125] 本发明还包括制备本发明的免疫调节化合物的方法。在所述的反应中，有必要保护反应活性官能团来避免它们不被希望地参与反应，例如羟基、氨基、亚氨基、硫基或羧基基团，这些基团在终产物中是希望存到的。常规的保护基团可以根据标准实践来使用，例如，参见 T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts 的“有机化学中的保护基团” (Protective Groups in Organic Chemistry, John Wiley and Sons, 1991)。

[0126] 式 I 化合物可以通过以下反应流程图 1 中的过程来制备：

[0127] 反应流程图 1

[0128]



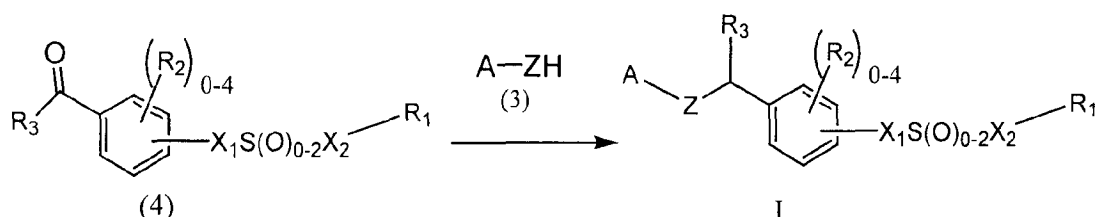
[0129] 其中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 X_1 、 X_2 、A 和 Z 如上述式 I 中定义。式 I 化合物可通过使式 2 化合物与式 3 化合物在适宜溶剂 (例如 DCM 或 DMF 等) 和适宜碱 (例如 DIEA 或 NaOH 等) 的存在下反应来制备。反应在约 0°C 至约 100°C 温度下进行, 并且进行约 48 小时使反应完全。

[0130] 其中 R_3 是氢或 C_{1-6} 烷基且 R_4 是氢的式 I 化合物可以通过以下反应流程图 2 中的过程来制备:

[0131]

反应流程图 2

[0132]



[0133] 其中 R_1 、 R_2 、 X_1 、 X_2 、A 和 Z 如上述式 I 中定义。式 I 化合物可通过使式 4 化合物与式 3 化合物在适宜溶剂 (例如 MeOH 等)、适宜碱 (例如 TEA 等) 和适宜还原剂 ($NaCNBH_3$ 等) 的存在下反应来制备。反应在约 0°C 至约 100°C 温度下进行, 并且进行约 48 小时使反应完全。

[0134] 制备本发明化合物的额外方法:

[0135] 本发明的化合物的可药用的酸加成盐可以通过使化合物的游离碱形式与可药用的无机或有机酸反应来制备。或者, 本发明化合物的可药用的碱加成盐可以通过使化合物的游离酸形式与可药用的无机或有机碱反应来制备。或者, 本发明化合物的盐形式可以使用原料或中间体的盐来制备。

[0136] 本发明化合物的游离酸或游离碱的形式可以分别由相应的碱加成盐或酸加成盐来制备。例如酸加成盐形式的本发明的化合物可以通过用适宜的碱 (例如氢氧化铵溶液或氢氧化钠等) 处理而转变为相应的游离碱。碱加成盐形式的本发明的化合物可以通过用适宜的酸 (例如盐酸等) 处理而转变为相应的游离酸。

[0137] 未氧化形式的本发明的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、三溴化合物等) 在适宜的惰性有机溶剂 (例如乙腈、乙醇、二噁烷水溶液等) 中于 0 至 80°C 处理来制备。

[0138] 本发明化合物的前药衍生物可以通过本领域普通技术人员已知的方法来制备 (例如, 进一步的详情参见 Saulnier 等人, (1994), Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 第 4 卷, 第 1985 页)。例如, 适宜的前药可以通过使非衍生化的本发明化合物与适宜的氨甲酰剂 (例如 1,1-酰氧基烷基碳酸酯氯化物 (1,1-acyloxyalkylcarbonatechloride)、对硝基苯基碳酸酯等) 反应来制备。

[0139] 本发明化合物的被保护的衍生物可以通过本领域普通技术人员已知的方法来制备。可用于保护基团的产生及其除去的详细技术描述可以在 T W. Greene 的“有机化学中

的保护基团”(Protecting Groups in Organic Chemistry, 第3版, John Wiley and Sons, Inc., 1999) 中找到。

[0140] 本发明的化合物可以作为溶剂化物(例如水合物)方便地制备或在本发明的方法中形成。本发明的化合物的水合物可以使用有机溶剂如二氧芑、四氢呋喃或甲醇从水性/有机溶剂的混合物中重结晶来方便地来制备。

[0141] 单独立体异构体形式的本发明的化合物可如下制备:使化合物的外消旋混合物与旋光活性拆分剂反应形成一对非立体异构体化合物,分离非立体异构体并回收旋光纯的对映异构体。当采用本发明化合物的共价非立体异构体衍生物进行对映异构体的拆分时,优选可分离的复合物(例如结晶性非立体异构的盐)。非立体异构体具有不同的物理特性(例如熔点、沸点、溶解度、反应活性等),并且可以通过利用这些差异而易于分离。非立体异构体可以通过色谱法或优选通过基于溶解度差异的分离/拆分技术来分离。然后通过任何不会导致外消旋的可行方法来回收旋光纯的对映异构体及拆分剂。可用于从其外消旋混合物中拆分化合物的立体异构体的更详细的技术描述见于 Jean Jacques, Andre Collet 和 Samuel H. Wilen 的“对映异构体、外消旋物及拆分”(Enantiomers, Racemates and Resolutions, John Wiley And Sons, Inc., 1981) 中。

[0142] 总之,式 I 化合物可以通过包括如下步骤的方法来制备:

[0143] (a) 上述反应流程图 1 或 2; 及

[0144] (b) 任选将本发明的化合物转变为可药用盐;

[0145] (c) 任选将本发明化合物的盐形式转变为非盐形式;

[0146] (d) 任选将本发明化合物的未氧化形式转变为可药用的 N-氧化物;

[0147] (e) 任选将本发明化合物的 N-氧化物形式转变为其未氧化形式;

[0148] (f) 任选从本发明化合物的异构体混合物中拆分出单独异构体;

[0149] (g) 任选将非衍生化的本发明化合物转变为可药用的前药衍生物; 及

[0150] (h) 任选将本发明化合物的前药衍生物转变为其非衍生化形式。

[0151] 在没有具体描述原料制备的情况下,化合物是已知的或者可类似于本领域已知的或在下文实施例中公开的方法来制备。

[0152] 本领域技术人员应当理解:上述转化仅是制备本发明化合物的方法的示范,可以类似地使用其它众所周知的方法。

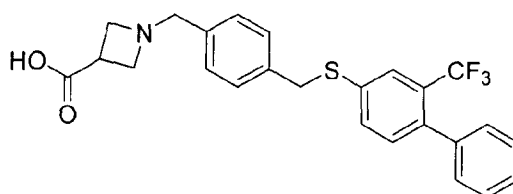
[0153] 实施例

[0154] 以下实施例提供了制备代表性化合物的详述,用来说明而非限制本发明。

[0155] 实施例 1

[0156] 1-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸

[0157]



[0158] 向 4-溴-3-(三氟甲基)苯胺(360mg, 1.50mmol, 1 当量)在 DMF(5mL) 中的溶液中加入苯基硼酸(274mg, 2.25mmol, 1.5 当量)、K₂CO₃(621mg, 4.5mmol, 3 当量)和四(三苯

膦) 钯 (0) (173mg, 0.15mmol, 0.1 当量)。将混合物用 N_2 (g) 净化 5 分钟, 于 120℃ 加热 20 小时。冷却至室温后, 反应物用 EtOAc 稀释, 用 H_2O 洗涤, 然后用饱和 NaCl 水溶液洗涤, 有机溶液经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后, 残余物通过梯度硅胶色谱法纯化 (己烷至 3 : 1 己烷 / EtOAc), 得到 2-三氟甲基-联苯-4-基胺。[MS : (ES⁺) 238.1 (M+1)⁺]。

[0159] 将 2-三氟甲基-联苯-4-基胺 (175mg, 0.7377mmol, 1 当量) 溶于 CH_3OH (0.75mL)、 H_2O (0.75mL) 和浓 HCl 水溶液 (0.4mL) 的混合物中。将溶液冷却至 0℃, 在 1 小时内缓慢加入 $NaNO_2$ (71mg, 1.033mmol, 1.4 当量) 溶于 H_2O (0.30mL) 中的溶液, 保持反应温度为 0℃。加入完成后, 将反应混合物快速加入预加热至 65℃ 的 0-乙基-黄原酸钾盐 (237mg, 1.475mmol, 2 当量) 在 H_2O (0.70mL) 中的溶液中。反应混合物于 65℃ 搅拌 15 分钟。冷却至室温后, 反应物用 EtOAc 稀释, 用 H_2O 、然后用饱和 NaCl 水溶液洗涤。有机溶液经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后, 残余物经硅胶色谱法纯化 (9 : 1 己烷 / EtOAc), 得到二硫代甲酸 0-乙基酯 S-(2-三氟甲基-联苯-4-基) 酯。

[0160] 向二硫代甲酸 0-乙基酯 S-(2-三氟甲基-联苯-4-基) 酯 (128mg, 0.3738mmol) 在 EtOH (5mL) 中的溶液中加入 NaOH 水溶液 (1N, 5mL)。混合物于 65℃ 加热 3 小时。冷却至室温后, 加入 1N HCl (aq) 直至反应物 pH 调节为约 pH = 5。反应物用 EtOAc 稀释, 用 H_2O 、然后饱和 NaCl 水溶液洗涤。有机溶液经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后, 将所得 2-三氟甲基-联苯基-4-硫醇粗品 (64mg, 0.2519mmol) 溶于 EtOH (5mL) 中。向该溶液中加入 $NaBH_4$ (19mg, 0.5039mmol, 2 当量)。所得混合物于室温搅拌 25 分钟, 此时向该反应物中加入在 DMF (1.5mL) 中的 4-(溴甲基) 苯甲酸甲酯 (58mg, 0.2519mmol, 1 当量)。混合物于室温另外搅拌 30 分钟。真空除去 EtOH。所得 DMF 溶液用 EtOAc 稀释, 用 H_2O 、然后用饱和 NaCl 水溶液洗涤。有机溶液经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后, 残余物经硅胶色谱法纯化 (3 : 1 己烷 / EtOAc), 得到 4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苯甲酸甲酯。[MS : (ES⁺) 425.1 (M+23)⁺]。

[0161] 向 4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苯甲酸甲酯 (83mg, 0.2062mmol, 1 当量) 在无水甲苯 (5mL) 中的冷却至 -78℃ 的溶液中加入 DIBAL-H (1M, 在甲苯中, 0.41mL, 0.41mmol, 2 当量)。混合物于 -78℃ 搅拌 30 分钟。反应通过加入饱和 NH_4Cl 水溶液使之淬灭, 之后使反应混合物温热至室温。反应物用 EtOAc 稀释, 用 1N HCl (aq)、 H_2O 和饱和 NaCl 水溶液洗涤。有机溶液经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后, 残余物经硅胶色谱法纯化 (1 : 1 己烷 / EtOAc), 得到 [4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-甲醇。[MS : (ES⁺) 397.1 (M+23)⁺]。

[0162] 向 [4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-甲醇 (162mg, 0.4327mmol, 1 当量) 在无水 DCM (5mL) 中的溶液中加入 PPh_3 (148mg, 0.5625mmol, 1.3 当量)。混合物于室温搅拌 5 分钟。此时将反应物冷却至 0℃。向 0℃ 的反应混合物中加入 CBr_4 (187mg, 0.5625mmol, 1.3 当量) 在无水 DCM (2mL) 中的溶液。使反应物缓慢温热至室温, 搅拌 12 小时。反应混合物直接进行硅胶色谱法 (6 : 1 己烷 / EtOAc), 得到 4-(4-溴甲基-苄基硫基)-2-三氟甲基-联苯。

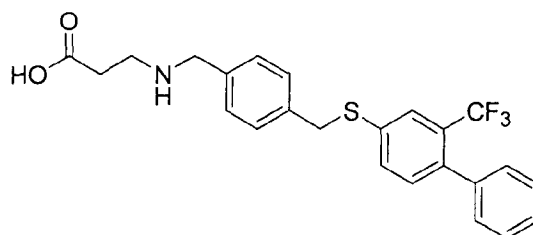
[0163] 向 4-(4-溴甲基-苄基硫基)-2-三氟甲基-联苯 (185mg, 0.4230mmol, 1 当量) 在无水 DCM (7mL) 中的溶液中加入氮杂环丁烷-3-甲酸甲酯 (HCl 盐, 96mg, 0.6345mmol, 1.5 当量) 和 DIEA (0.74mL, 4.230mmol, 10 当量)。混合物于室温搅拌 3 小时。反应混合物直接进行硅胶色谱法 (梯度为 5 : 1 己烷 / EtOAc 至 1 : 2 己烷 / EtOAc), 得到 1-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸甲酯。

[0164] 向 1-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸甲酯 (129mg, 0.2736mmol, 1 当量) 在 MeOH(5mL) 与 H₂O(0.5mL) 的混合物中的溶液中加入 LiOH-H₂O(23mg, 0.5472mmol, 2 当量)。混合物于室温搅拌 3 小时。在浓缩后, 粗品经制备型 RP LC-MS 纯化, 得到 1-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸: ¹H NMR(CD₃OD, 400MHz) 67.61(s, 1H), 7.60(d, 1H), 7.56(d, 2H), 7.46-7.39(m, 6H), 7.29(d, 2H), 4.42(s, 2H), 4.35(s, 2H), 4.31(d, 4H), 3.73-3.61(m, 1H); MS(ES⁺): (458.1, M+1)⁺。

[0165] 实施例 2

[0166] 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄氨基]-丙酸

[0167]



[0168] 如上所述, 通过 4-(4-溴甲基-苄基硫基)-2-三氟甲基-联苯与 3-氨基-丙酸叔丁酯的反应类似地合成 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄氨基]-丙酸叔丁酯。

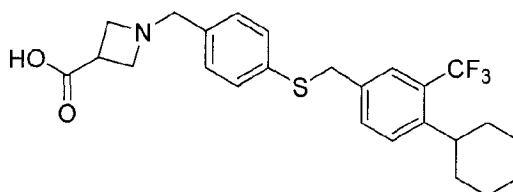
[0169] 向 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄氨基]-丙酸叔丁酯 (24mg, 0.0478mmol, 1 当量) 在 DCM(2mL) 中的溶液中加入三乙基硅烷 (0.038mL, 0.2392mmol, 5 当量), 然后加入 TFA(2mL)。混合物于室温搅拌 2 小时。在浓缩后, 粗品经制备型 RP LC-MS 纯化, 得到 3-[4-(2-三氟甲基-联苯-4-基硫甲基)-苄氨基]-丙酸: ¹H NMR(CD₃OD, 400MHz) 67.66(s, 1H), 7.60(d, 1H), 7.55-7.38(m, 7H), 7.28-7.21(m, 3H), 4.33(s, 2H), 4.18(s, 2H), 3.26(t, 2H), 2.72(t, 2H); MS(ES⁺): (446.1, M+1)⁺。

[0170]

实施例 3

[0171] 1-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸

[0172]



[0173] 步骤 1: 中间体的合成: 4-溴甲基-1-环己基-2-三氟甲基-苯

[0174] 于 0℃向 4-氯-3-三氟甲基-苯甲醛 (2.1g, 10mmol) 在甲醇 (30mL) 中的溶液中加入 NaBH₄ (400mg, 10.6mmol)。2 小时后, 通过加入 H₂O(20mL)、然后加入 HCl 水溶液 (1N, 10mL) 使反应淬灭。混合物用 EtOAc (3×20mL) 萃取。所合并的有机层用饱和 NaCl 水溶液洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥。在浓缩后, 粗品 (4-氯-3-三氟甲基-苯基)-甲醇未经进一步纯化直接用于下一步骤。

[0175] 于 0℃向 (4-氯-3-三氟甲基-苯基)-甲醇粗品在 DMF(无水, 40mL) 中的溶液中加入 NaH(600mg, 15mmol)。搅拌 30 分钟后, 将 4-甲氧基苄基溴 (2.21g, 11mmol) 经注射器

逐滴加入。于室温搅拌 3 小时后,将反应物倾入冰与饱和 NH_4Cl 水溶液的混合物中使之淬灭。混合物用 EtOAc ($3 \times 30\text{mL}$) 萃取,所合并的有机层用饱和 NaCl 水溶液洗涤,经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后,粗品经硅胶色谱法纯化(5% EtOAc 的己烷溶液),得到 1-氯-4-(4-甲氧基-苄氧基甲基)-2-三氟甲基-苯,为无色油状物。

[0176] 向 1-氯-4-(4-甲氧基-苄氧基甲基)-2-三氟甲基-苯(1.5g, 4.5mmol) 和环己基溴化锌的 THF 溶液(0.5M, 27mL) 在 NMP(30mL) 中的混合物中加入双(三叔丁基膦)钯(0)(115mg, 0.225mmol)。将混合物用 N_2 净化 5 分钟,然后在 N_2 下于 120°C 加热 12 小时。冷却至室温后,加入 H_2O (100mL) 和 HCl 水溶液(1N, 20mL) 使反应淬灭。混合物用 EtOAc ($3 \times 40\text{mL}$) 萃取。所合并的有机相用饱和 NaHCO_3 水溶液、饱和 NaCl 水溶液洗涤,经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后,残余物经硅胶色谱法纯化(5% EtOAc 的己烷溶液),得到 1-环己基-4-(4-甲氧基-苄氧基甲基)-2-三氟甲基-苯,为无色油状物。

[0177] 将所得的 1-环己基-4-(4-甲氧基-苄氧基甲基)-2-三氟甲基-苯溶于 TFA 与 DCM(8mL, 1 : 1 v/v) 的混合物中。于室温搅拌 2 小时后,蒸发所有的挥发性物质,所得残余物溶于 EtOAc 中,用饱和 NaHCO_3 水溶液洗涤。分离有机层,用饱和 NaCl 水溶液洗涤,经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后,残余物经硅胶色谱法纯化(20% 乙酸乙酯的己烷溶液),得到 4-环己基-3-三氟甲基-苯基)-甲醇,为无色油状物。

[0178] 于 0°C 向 4-环己基-3-三氟甲基-苯基)-甲醇(300mg, 1.16mmol) 和 PPh_3 (460mg, 1.74mmol) 在 DCM(5mL) 中的混合物中加入溶于 DCM(2mL) 中的 CBr_4 (580mg, 1.74mmol)。反应物于 0°C 搅拌 1 小时,然后浓缩。所得残余物经硅胶色谱法纯化(5% EtOAc 的己烷溶液),得到 4-溴甲基-1-环己基-2-三氟甲基-苯,为白色固体。

[0179] 步骤 2 : 1-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸的合成

[0180] 在配有 Dean-Stark 装置的圆底烧瓶中,将 4-甲硫基苯甲醛(5g, 32.8mmol)、1,3-丙二醇(2.75g, 36.1mmol) 和甲苯磺酸(550mg, 3.28mmol) 在甲苯(300mL, 无水)中的混合物在 N_2 下于回流加热。5 小时后,将反应混合物冷却至室温,用饱和 NaHCO_3 水溶液($3 \times 40\text{mL}$) 洗涤。有机相浓缩,所得粗品经硅胶柱色谱法纯化(15% EtOAc 的己烷溶液),得到 2-(4-甲硫基-苯基)-[1,3] 二噁烷,为黄色油状物。

[0181] 于 0°C 向 2-(4-甲硫基-苯基)-[1,3] 二噁烷(2g, 9.5mmol) 在 DCM(50mL) 中的溶液中加入 m-CPBA(2.46g, 10.5mmol)。将混合物于 0°C 搅拌 1 小时,之后加入 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (770mg, 10.5mmol)。反应物另外搅拌 30 分钟,然后将反应混合物用 DCM 稀释,经硅藻土过滤。收集滤液并浓缩,得到 2-(4-甲基亚磺酰基-苯基)-[1,3] 二噁烷,为白色固体。

[0182] 将 2-(4-甲基亚磺酰基-苯基)-[1,3] 二噁烷(400mg, 1.76mmol) 溶于乙腈(20mL) 中。加入 2,6-二甲基吡啶(0.64mL, 5.5mmol),并将溶液冷却至 -10°C 。经注射器逐滴加入 TFAA(0.75mL, 5.3mmol)。反应物于 -10 至 0°C 搅拌 1 小时。所有挥发性物质被蒸发,同时维持反应混合物为 0°C 。加入预冷却至 0°C 的 MeOH 与三乙胺的混合物(50mL, 1 : 1 v/v)。温热所得混合物并于室温搅拌 30 分钟。蒸发所有挥发性物质。将所得残余物溶于乙醚中,用饱和 NH_4Cl 水溶液洗涤。分离有机层,经 Na_2SO_4 干燥,并浓缩,得到 4-[1,3] 二噁烷-2-基-苯硫酚粗品,为黄色油状物,其未经进一步纯化立即用于下一步骤。

[0183] 将 4-[1,3] 二噁烷-2-基-苯硫酚粗品(0.9mmol) 溶于 DMF(15mL, 无水)中。溶

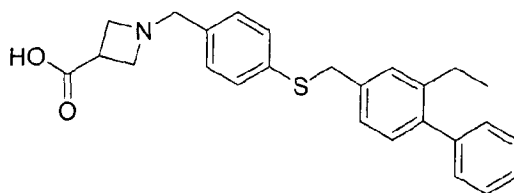
液冷却至 0℃, 然后加入 NaH (76mg, 1.8mmol)。搅拌 30 分钟后, 将上述制备的溶于 DMF (2mL) 中的 4-溴甲基-1-环己基-2-三氟甲基-苯 (0.8mmol) 经注射器逐滴加入。混合物搅拌 1 小时, 然后倾入冰与饱和 NH₄Cl 水溶液的混合物中。水相用乙醚萃取 (3×30mL)。所合并的有机层用饱和 NaCl 水溶液洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 并浓缩。所得残余物经硅胶色谱法纯化 (10% 乙酸乙酯的己烷溶液), 得到 2-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基硫基)-苯基]-[1, 3] 二噁烷, 为白色固体。

[0184] 向 2-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基硫基)-苯基]-[1, 3] 二噁烷 (90mg, 0.2mmol) 在 THF (10mL) 中的溶液中加入 HCl 水溶液 (2N, 0.7mL)。溶液于室温搅拌 4 小时。将溶液用乙醚 (30mL) 稀释, 用饱和 NaHCO₃ 水溶液 (3×10mL) 洗涤。有机层用饱和 NaCl 水溶液洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 并部分浓缩, 然后用 MeOH (10mL) 稀释。向所得溶液中加入三乙胺 (0.5mL) 和氮杂环丁烷-3-甲酸 (46mmol, 0.4mmol)。所得混合物于 50℃ 搅拌 30 分钟。将反应物冷却至室温, 加入 NaCNBH₃ (63mg, 1mmol)。所得混合物搅拌 30 分钟, 然后浓缩至干。粗品经制备型 RP LC-MS 纯化, 得到 1-[4-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸, 为无色油状物。¹HNMR (400MHz, CD₃OD) δ 7.55-7.54 (m, 2H), 7.52-7.35 (m, 5H), 4.39 (s, 2H), 4.35 (m, 4H), 4.17 (s, 2H), 3.68 (tt, 1H), 2.90 (tt, 1H), 1.87-1.75 (m, 5H), 1.72-1.48 (m, 5H); MS (ES⁺): (464.2, M+1)⁺。

[0185] 实施例 4

[0186] 1-[4-(2-乙基-联苯-4-基甲硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸

[0187]



[0188] 步骤 1: 中间体的合成: 4-溴甲基-2-乙基-联苯

[0189] 向 4-氨基-3-乙基苄腈 (4g, 27.4mmol) 和 CuBr₂ (9.2g, 41.1mmol) 在乙腈 (150mL) 中的混合物中逐滴加入亚硝酸异戊酯 (5.5mL, 41.1mmol)。加入完成后, 将混合物于 60℃ 加热 4 小时。冷却至室温后, 将反应混合物部分浓缩。加入乙醚, 混合物用饱和 NH₄Cl 水溶液洗涤。有机层经 Na₂SO₄ 干燥, 并浓缩。所得残余物经硅胶色谱法纯化, 得到 4-溴-3-乙基苄腈, 为浅褐色油状物。

[0190] 将 4-溴-3-乙基苄腈 (1g, 4.76mmol)、苯基硼酸 (1.16g, 9.5mmol)、K₂CO₃ (1.97g, 14.3mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (543mg, 0.48mmol) 在 DMF (无水, 15mL) 中的混合物在密闭试管中于 120℃ 加热 12 小时。冷却至室温后, 将反应混合物倾入冰与饱和 NH₄Cl 水溶液的混合物中。混合物用 EtOAc (3×30mL) 萃取。所合并的有机层用饱和 NaCl 水溶液洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 并浓缩。所得粗品经硅胶色谱法纯化 (5% EtOAc 的己烷溶液), 得到 2-乙基-联苯-4-甲腈, 为无色油状物。

[0191] 向 2-乙基-联苯-4-甲腈 (0.95g, 4.58mmol) 在乙醇 (50mL) 中的溶液中加入固体 KOH (2.56g, 45.8mmol)。所得混合物于回流加热 12 小时。冷却至室温后, 将溶剂减压蒸发至干。加入 H₂O (100mL), 并缓慢加入 HCl 水溶液 (2N) 至 pH 调节为约 pH = 1。混合物用 EtOAc (3×50mL) 萃取。所合并的有机层用饱和 NaCl 水溶液洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 并浓缩。

将所得 2-乙基-联苯-4-甲酸粗品溶于甲醇 (20mL) 中。加入浓 HCl 水溶液 (5mL), 混合物于回流加热 4 小时。冷却至室温后, 将反应混合物减压浓缩。所得残余物溶于乙醚中, 用饱和 NaHCO_3 水溶液 ($3 \times 10\text{mL}$) 洗涤。分离有机层, 经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后, 将 2-乙基-联苯-4-甲酸甲酯粗品溶于 THF (5mL) 中, 逐滴加入 LAH (200mg, 5.2mmol) 在 THF (15mL, 无水) 中的 0°C 混合物中。1 小时后, 缓慢加入 H_2O 使反应淬灭, 然后加入 HCl 水溶液 (1N, 20mL)。混合物用 EtOAc ($3 \times 40\text{mL}$) 萃取。所合并的有机层用饱和 NaHCO_3 水溶液和饱和 NaCl 水溶液洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥。在浓缩后, 粗品经硅胶色谱法纯化 (20% EtOAc 的己烷溶液), 得到 (2-乙基-联苯-4-基)-甲醇, 为无色油状物。

[0192] 于 0°C 向 (2-乙基-联苯-4-基)-甲醇 (780mg, 3.67mmol) 和 PPh_3 (1.44g, 5.5mmol) 在 DCM (15mL) 中的混合物中加入在 DCM (2mL) 中的 CBr_4 (1.82g, 5.5mmol)。将反应物于 0°C 搅拌 1 小时, 然后浓缩。所得残余物经硅胶色谱法纯化 (5% EtOAc 的己烷溶液), 得到 4-溴甲基-2-乙基-联苯, 为无色油状物。

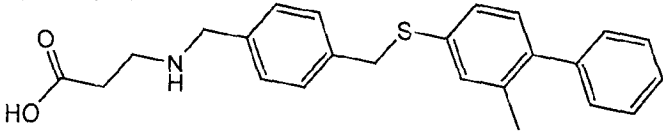
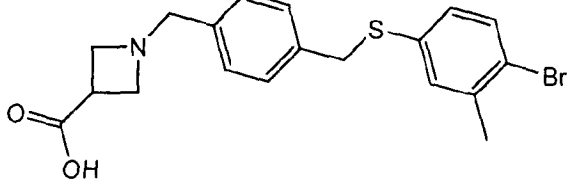
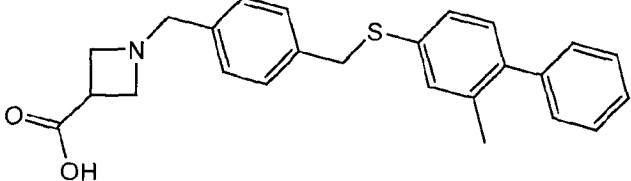
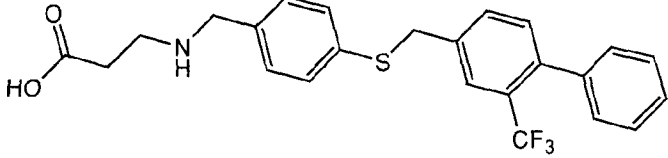
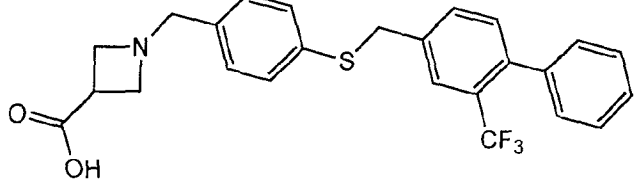
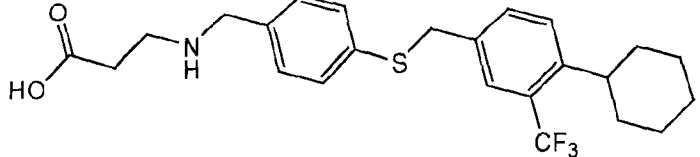
[0193] 步骤 2: 1-[4-(2-乙基-联苯-4-基甲硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸的合成

[0194] 在前述方法中采用 4-溴甲基-2-乙基-联苯代替 4-溴甲基-1-环己基-2-三氟甲基-苯, 得到 1-[4-(2-乙基-联苯-4-基甲硫基)-苄基]-氮杂环丁烷-3-甲酸: $^1\text{HNMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ 7.44-7.23 (m, 11H), 7.12 (s, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.39-4.33 (m, 5H), 4.27 (s, 2H), 3.68 (tt, 1H), 2.54 (q, 2H), 1.03 (t, 3H); MS (ES^+): (418.2, $\text{M}+1$) $^+$ 。

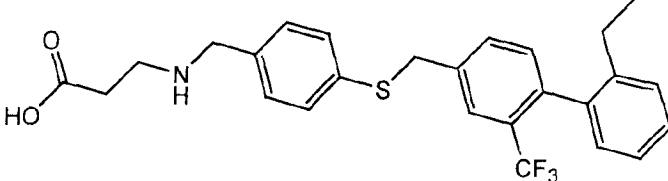
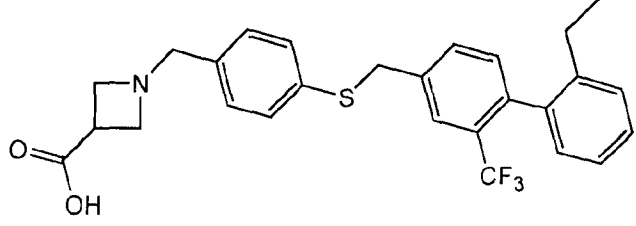
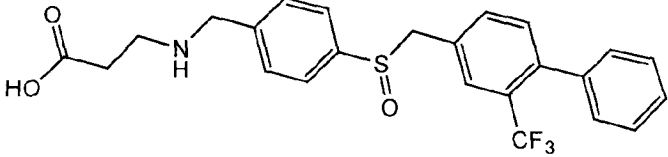
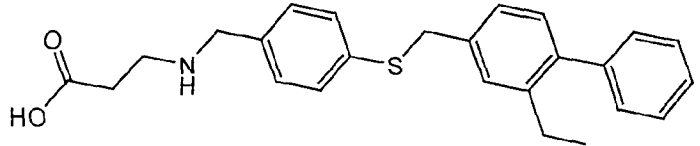
[0195] 通过采用适宜的原料重复上述实施例的方法, 可以合成下述式 I 化合物 (表 1)。

[0196] 表 1

[0197]

化合物	结构	物理数据 MS ES (M+1)
5		391.5
6		406.3
7		403.5
8		445.5
9		457.5
10		451.5

[0198]

化合物	结构	物理数据 MS ES (M+1)
11		473.6
12		485.6
13		461.5
14		405.6

[0199] 实施例 5

[0200] 式 I 化合物显示出生物活性

[0201] A. 体外：测定 GTP[γ - ^{35}S] 与由表达人 EDG 受体的 CHO 细胞制备的膜结合的 GPCR 活化试验

[0202] EDG-1 (S1P₁) GTP[γ - ^{35}S] 结合试验：匀化膜由稳定表达人 EDG-1N 末端 c-myc 标记的 CHO 细胞克隆来制备。收集前，细胞在两个 850cm² 滚瓶的悬浮液中生长三或四天。将细胞离心下来，用冷 PBS 冲洗一次并重新混悬于 $\leq 20\text{ml}$ 的缓冲液 A (20mM HEPES, pH7.4, 10mM EDTA, 不含 EDTA 的完全蛋白酶抑制剂混合片 [1 片 / 25ml]) 中。将细胞混悬液在冰上使用 Polytron 匀化器以 30000rpm 匀化 4 次，每次间隔 15 秒。首先将匀化物在台式低速离心机中以 2000rpm 离心 10 分钟。然后将上清液经过细胞渗滤器后于 4℃ 以 50,000xg 再离心 25 分钟。将沉淀物重新混悬于缓冲液 B (15% 甘油, 20mM HEPES, pH 7.4, 0.1mM EDTA, 不含 EDTA 的完全蛋白酶抑制剂混合片 [1 片 / 10ml]) 中。以 BSA 为标准、使用 BCA 蛋白质分析试剂盒 (Pierce) 测定制备的蛋白质浓度。将膜等分并于 -80℃ 冷冻保存。

[0203] 在 DMSO 中制备 10mM 至 0.01nM 的受试化合物溶液。将 S1P 用 4% BSA 溶液稀释作为阳性对照。将所需量的制备膜用冰冷的分析缓冲液 (20mM HEPES, pH 7.4, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0.1% 不含脂肪酸的 BSA, 5 μM GDP) 稀释并充分涡旋。将 2 μl 或更少的化合物分配至圆底 96 孔聚苯乙烯分析板的每个孔中，然后加入 100 μl 稀释的膜 (3-10 μg / 孔)，于冰上保存直至加入热的 GTP γ S。用冷分析缓冲液将 [^{35}S]-GTP γ S 以 1 : 1000 (v/v) 稀

释,每个孔中加入 100 μ l。反应在室温下进行 90 分钟,然后用 Packard Filtermate 收集器将膜收集到 Perkin-Elmer Unifilter[®] GF/B-96 过滤板上。用洗涤缓冲液 (20mM HEPES, pH7.4, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂) 洗涤数次并用 95% 乙醇漂洗后,将过滤器在 37°C 的烘箱中干燥 30 分钟。加入 MicroScint-20,将板密封,在 TopCount 上进行闪烁计数。用 GraphPad Prism 的剂量响应曲线拟合工具对 GTP[γ -³⁵S] 结合曲线 (原始数据) 拟合,得到 EC₅₀ 值。使用 6 或 12 个不同的浓度来产生浓度响应曲线 (每个浓度使用 3 个数据点)。

[0204] 以与 EDG-1GTP[γ -³⁵S] 结合试验相当的方法,使用来源于稳定表达 c-末端 c-myc 标记或未标记受体的 CHO 细胞的膜进行 EDG-3、-5、-6 和 -8GTP[γ -³⁵S] 结合试验。对于每次膜制备,首先用 S1P 对照进行滴定实验以确定每个分析孔中膜的最佳加入量。根据上述试验对本发明的化合物进行测定,观察到显示对 EDG-1 受体的选择性。例如,在上述试验中,化合物 9 的 EC₅₀ 为 0.82nM,与一种或多种包括 EDG-3、EDG-5、EDG-6 和 EDG-8 的其它受体相比,对 EDG-1 的选择性至少是其它受体的 1000 倍。

[0205] B. 体外:FLIPR 钙流分析

[0206] 用 FLIPR 钙流分析测定本发明的化合物对 EDG-1、EDG-3、EDG-5 和 EDG-6 的激动剂活性。简言之,表达 EDG 受体的 CHO 细胞用含有 5% FBS 和 500 μ g/ml G418 的 F-12K 培养基 (ATCC) 维持。试验之前,将细胞以 10,000 细胞/孔/25 μ l 含有 1% FBS 的 F-12K 培养基的密度铺在 384 黑色透明底的板中。第二天,用洗涤缓冲液将细胞洗涤 3 次 (25 μ l/次)。向每孔中加入约 25 μ l 染料并在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育 1 小时。然后用洗涤缓冲液将细胞洗涤 4 次 (25 μ l/次)。向每孔细胞中加入 25 μ l SEQ2871 溶液后分析钙流。用表达每个不同 EDG 受体的细胞进行相同的试验。在 FLIPR 钙流分析中以 3 分钟间隔记录滴定,并以与 EDG-1 活化有关的最大峰高百分数响应来定量。

[0207] C. 体内:测定血液淋巴细胞耗竭和评价心脏影响的筛选实验

[0208] 循环淋巴细胞的测定:化合物溶解于 DMSO 中并稀释得到 4% DMSO (v/v, 终浓度) 的终浓度,然后进一步用恒定体积的 Tween8025% /H₂O (v/v) 稀释。分别包含 Tween8025% /H₂O (200 μ l)、4% DMSO 和 FTY720 (10 μ g) 作为阴性和阳性对照。在短期异氟烷麻醉下,通过管饲给大鼠 (C57b1/6 雄性,6-10 周龄) 口服施用 250-300 μ l 化合物溶液。

[0209] 在短期异氟烷麻醉下施药后的 6 和 24 小时从后眼窦取血。将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。用连结有荧光色素的特异性抗体对外周血液淋巴细胞亚组进行染色,并使用荧光活化细胞分类器 (FacsCalibur) 进行分析。使用两只大鼠来评价每种所筛选化合物的淋巴细胞耗竭活性。结果为 ED₅₀,该值定义为使 50% 的血液淋巴细胞耗竭所需的有效剂量。根据上述试验对本发明的化合物进行测定,优选发现显示的 ED₅₀ 小于 1mg/kg,更优选 ED₅₀ 小于 0.5mg/kg。例如,化合物 9 显示的 ED₅₀ < 0.1mg/kg。

[0210] 心脏影响的评价:使用 AnonymOUSE ECG 筛选系统监测化合物对心脏功能的影响。在化合物施用前后,记录清醒大鼠 (C57b1/6 雄性,6-10 周龄) 的心电图。然后采用 e-MOUSE 软件对 ECG 信号进行处理和分析。将进一步稀释于 200 μ l 水、15% DMSO 中的 90 μ g 化合物腹腔内注射。使用四只大鼠来评价每种化合物对心脏的影响。

[0211] D:体内:抗血管生成活性

[0212] 将含有在 0.5ml 0.8% w/v 琼脂 (含有肝素,20U/ml) 中的 (i)1- 磷酸鞘氨醇

(5 μ M/室)或(ii)人 VEGF(1 μ g/室)的多孔室皮下植入大鼠侧腹。SIP 或 VEGF 诱导室周血管生成组织的生长。这种响应呈剂量依赖性,并且可以通过测定组织的重量和含血量来定量。从植入多孔室之前 4-6 小时开始,大鼠用式 I 化合物经口服或静脉内处理,每日一次,持续 4 天。在最后剂量后的 24 小时,处死动物以测定血管生成组织。测定室周血管生成组织的重量和含血量。与仅用载体处理的动物相比,用式 I 化合物处理的动物的血管生成组织的重量和 / 或含血量减少。当以约 0.3 至约 3mg/kg 的剂量施用式 I 化合物时,式 I 化合物具有抗血管生成作用。

[0213] E:体外:抗肿瘤活性

[0214] 使用最初从乳腺癌中分离的小鼠乳腺癌细胞系,例如 JygMC(A)。步骤开始前,将细胞数目调至 5×10^5 ,用于铺在新鲜培养基中。细胞用含有 2.5mM 胸苷的不含 FCS 的新鲜培养基孵育 12 小时,然后用 PBS 洗涤两次,随后加入含有 10% FCS 的新鲜培养基并另外孵育 12 小时。然后将细胞用含有 2.5mM 胸苷的不含 FCS 的新鲜培养基孵育 12 小时。为了使细胞从板上释放,用 PBS 洗涤细胞两次,重新铺在含有 10% FCS 的新鲜培养基中。同步化后,将细胞用或不用多种浓度的式 I 化合物孵育 3、6、9、12、18 或 24 小时。用 0.2% EDTA 处理后收集细胞,用 70%冰冷乙醇溶液固定,用 250 μ g/ml RNaseA(1-A 型;Sigma 化学公司)于 37°C 水解 30 分钟,并用 10mg/ml 碘化丙啶染色 20 分钟。孵育期之后,通过在 Coulter 计数器中计数细胞和通过 SRB 比色分析来测定细胞数目。在这些情形下,式 I 化合物在 10^{-12} 至 10^{-6} M 的浓度范围内抑制肿瘤细胞增殖。

[0215] 可以理解:本文所述的实施例和实施方案仅是为了说明的目的,它们的各种变通方式或变化将提示给本领域技术人员,并且它们意欲包括在本发明的宗旨和理解以及所附的权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、专利及专利申请被引入作为所有目的的参考。