



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107266332 B

(45)授权公告日 2020.07.24

(21)申请号 201710329198.1  
 (22)申请日 2013.04.05  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107266332 A  
 (43)申请公布日 2017.10.20  
 (30)优先权数据  
 61/641,814 2012.05.02 US  
 (62)分案原申请数据  
 201380035139.3 2013.04.05  
 (73)专利权人 勃林格殷格翰国际有限公司  
 地址 德国殷格翰  
 (72)发明人 M·迪尤塔  
 艾莉森·多萝西·芬德莱  
 J·S·富特  
 沃尔夫冈·亚罗利梅克  
 I·A·麦克唐纳 艾伦·罗伯逊  
 C·I·特纳  
 (74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
 代理人 陈桢  
 (51)Int.Cl.  
 C07C 235/46(2006.01)  
 C07C 323/62(2006.01)  
 C07C 311/29(2006.01)  
 C07C 237/30(2006.01)

A61K 31/166(2006.01)  
 A61K 31/18(2006.01)  
 A61P 29/00(2006.01)  
 A61P 1/16(2006.01)  
 A61P 11/00(2006.01)  
 A61P 11/06(2006.01)  
 A61P 27/02(2006.01)  
 A61P 3/10(2006.01)  
 A61P 13/12(2006.01)  
 A61P 25/00(2006.01)  
 A61P 19/02(2006.01)  
 A61P 1/00(2006.01)  
 A61P 17/06(2006.01)  
 A61P 11/08(2006.01)  
 A61P 9/10(2006.01)  
 A61P 31/04(2006.01)  
 A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件  
 WO 2007120528 A2,2007.10.25,说明书第27页化合物、第45页化合物,第6页第[0020]段和第39页第[0047]段。  
 CN 101917845 A,2010.12.15,说明书第6页第[0042]段和说明书第15页第[0125]段,说明书第6页第[0042]-[0050]段,说明书第[0120]-[0122]段,权利要求11和权利要求12-34。

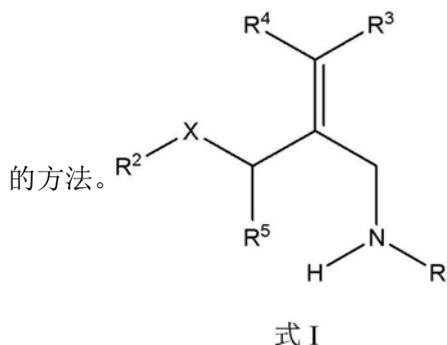
审查员 王化邦

权利要求书3页 说明书54页 附图22页

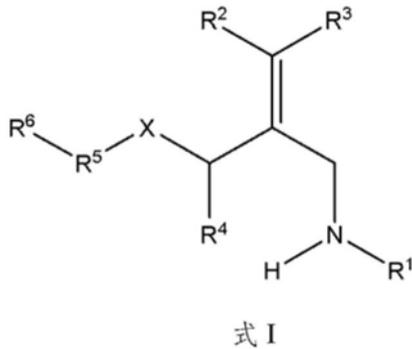
(54)发明名称  
 SSAO的取代的3-卤代烯丙基胺抑制剂及其用途

(57)摘要

本发明涉及具有式I的结构作为SSAO/VAP-1抑制剂的取代的3-卤代烯丙基胺生物物的制备和药物用途,如在说明书中定义的。本发明还涉及使用式I的化合物或者其药物可接受的盐或衍生物用于治疗例如,炎性疾病、眼病、纤维变性疾病、糖尿病诱导的疾病和癌症的多种适应症



1. 式I的化合物,或者其药物可接受的盐:



其中:

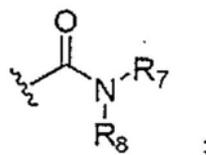
R<sup>1</sup>和R<sup>4</sup>独立地为氢或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

R<sup>2</sup>是氢;

R<sup>3</sup>是氟;

R<sup>5</sup>为未取代的亚苯基或被独立地选自烷基、卤素、烷氧基和卤代烷基中的一个或多个基团取代的亚苯基;

R<sup>6</sup>是



R<sup>7</sup>和R<sup>8</sup>独立地选自氢、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基和任选取代的C<sub>3-7</sub>环烷基;以及

X为CH<sub>2</sub>、或氧;

其中,术语“烷基”是指具有1~6个碳原子的单价直链或支链饱和烃基;

术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘;

术语“烷氧基”是指直链或支链烷氧基,其中烷基如上所定义;

术语“任选取代”是指该术语所指代的基团可以是未取代的,也可以是被独立地选自卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、羟基(C<sub>1-6</sub>)烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、C(O)H、C(O)OH、NHC(O)H、NHC(O)C<sub>1-4</sub>烷基、C(O)C<sub>1-4</sub>烷基、NH<sub>2</sub>、NHC<sub>1-4</sub>烷基、N(C<sub>1-4</sub>烷基)<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、OH和CN中的一个或多个基团取代。

2. 如权利要求1所述的化合物,其中,R<sup>1</sup>为氢且R<sup>4</sup>为甲基,或者R<sup>1</sup>为甲基且R<sup>4</sup>为氢。

3. 如权利要求1所述的化合物,其中,R<sup>1</sup>和R<sup>4</sup>都为氢。

4. 如权利要求1所述的化合物,其中,R<sup>5</sup>为未取代的亚苯基,或被一个或多个独立地选自甲基、氟、氯、溴、OCH<sub>3</sub>和CF<sub>3</sub>的基团取代的亚苯基。

5. 如权利要求1所述的化合物,其中R<sup>7</sup>和R<sup>8</sup>都是氢,或者R<sup>7</sup>和R<sup>8</sup>都是C<sub>1-6</sub>烷基,或者R<sup>7</sup>是氢和R<sup>8</sup>是C<sub>1-6</sub>烷基。

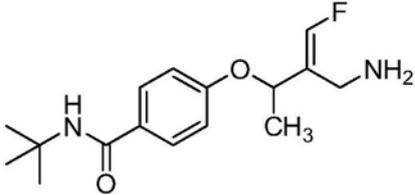
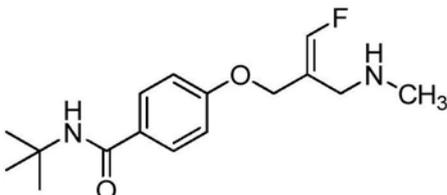
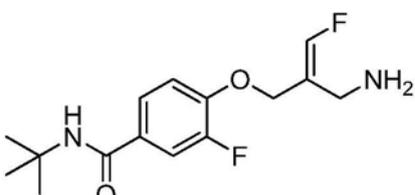
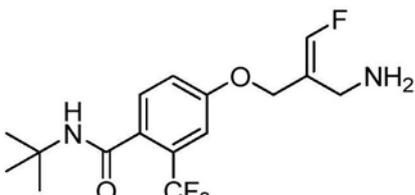
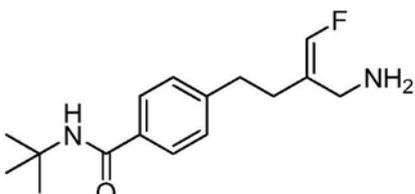
6. 如权利要求1所述的化合物,其中X为氧。

7. 如权利要求1所述的化合物,其中R<sup>1</sup>是氢,R<sup>4</sup>是氢,X是氧,R<sup>5</sup>是未取代的亚苯基,R<sup>7</sup>是氢,R<sup>8</sup>是C<sub>1-6</sub>烷基,或其药物可接受的盐。

8. 如权利要求1或权利要求7所述的化合物,其中R<sup>7</sup>是氢,R<sup>8</sup>是叔丁基,或其药物可接受

的盐。

9. 如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物选自:

5		(E)-4-(3-(氨基甲基)-4-氟丁-3-烯-2-基氧基)-N-叔丁基苯甲酰胺
12		(E)-N-叔丁基-4-(3-氟-2-((甲基氨基)甲基)烯丙氧基)苯甲酰胺
19		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基-3-氟苯甲酰胺
21		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基-2-(三氟甲基)苯甲酰胺
34		(Z)-4-(3-(氨基甲基)-4-氟丁-3-烯基)-N-叔丁基苯甲酰胺

或者其药物可接受的盐。

10. 权利要求1至9中任一权利要求所述的化合物的药物可接受的盐。

11. 权利要求10所述的药物可接受的盐,其为酸加成盐。

12. 权利要求11所述的药物可接受的盐,其中,所述酸加成盐选自:乙酸盐、苯甲酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、盐酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、草酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐和酒石酸盐。

13. 权利要求11所述的药物可接受的盐,其中,所述酸加成盐为盐酸盐。

14. 组合物,其包含权利要求1至9中任一权利要求所述的化合物或者权利要求10至13中任一权利要求所述的药物可接受的盐,和至少一种药物可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

15. 权利要求1至9中任一权利要求所述的化合物或其药物可接受的盐或者权利要求14所述的组合物在制备用于抑制有此需要的个体中的SSAO/VAP-1的胺氧化酶活性的药物的用途,包括给予所述个体有效量的所述的化合物或其药物可接受的盐或者所述的组合物以

产生正性治疗反应。

16. 权利要求1至9中任一权利要求所述的化合物或其药物可接受的盐或者权利要求14所述的组合物在制备用于治疗与SSAO/VAP-1蛋白有关或者由SSAO/VAP-1蛋白调节的疾病的药物的用途,包括给予有此需要的个体治疗有效量的所述的化合物或者其药物可接受的盐,或者所述的组合物。

17. 如权利要求16所述的用途,其中所述疾病为炎症。

18. 如权利要求17所述的用途,其中所述炎症与肝病有关。

19. 如权利要求17所述的用途,其中所述炎症与呼吸疾病有关。

20. 如权利要求17所述的用途,其中所述炎症与囊性纤维化有关。

21. 如权利要求17所述的用途,其中所述炎症与哮喘或慢性阻塞性肺病有关。

22. 如权利要求17所述的用途,其中所述炎症与眼病有关。

23. 如权利要求16所述的用途,其中所述疾病为选自糖尿病肾病、肾小球硬化症、糖尿病视网膜病变、非酒精性脂肪肝疾病和脉络膜新生血管的糖尿病诱导的疾病。

24. 如权利要求16所述的用途,其中所述疾病为神经炎性疾病。

25. 如权利要求16所述的用途,其中所述疾病选自肝纤维化、肝硬化、非酒精性脂肪肝、肾纤维化、特发性肺纤维化和放射性诱导的纤维化。

26. 权利要求25的用途,其中所述疾病为非酒精性脂肪肝。

27. 如权利要求16所述的用途,其中所述疾病为癌症。

## SSAO的取代的3-卤代烯丙基胺抑制剂及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及能够抑制某些胺氧化酶的新化合物。这些化合物可用于治疗多种适应症,例如,人类个体以及宠物和家畜中的炎症和/或纤维化症状,治疗心理疾病、神经变性疾病等。此外,本发明涉及包含这些化合物的药物组合物,因此还涉及各种用途。

### [0002] 背景

[0003] 氨基脲敏感性胺氧化酶(SSAO),还被称为伯胺氧化酶、血浆胺氧化酶和苜胺氧化酶在结构上与血管粘附蛋白-1(VAP-1)相同。在下列讨论中,SSAO/VAP-1用于描述该蛋白。该蛋白在炎症性疾病中的作用已有综述(参见例如,Smith D.J.和Vaino P.J., Targeting Vascular Adhesion Protein-1 to Treat Autoimmune and Inflammatory Diseases (靶向血管粘附蛋白-1以治疗自身免疫和炎症性疾病). Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007, 1110, 382-388; 以及McDonald I.A.等, Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase and Vascular Adhesion Protein-1: One Protein Being Validated as a Therapeutic Target for Inflammatory Diseases (氨基脲敏感性胺氧化酶和血管粘附蛋白-1: 一种蛋白被验证作为炎症性疾病的治疗靶向). Annual Reports in Medicinal Chemistry, 2008, 43, 229-241)。

[0004] 在包括人类的大多数生物体中,两个族的哺乳动物胺氧化酶代谢各种内源产生的或从外源来源吸收的单胺-、二胺-和多胺。这些包括存在于大多数细胞类型的线粒体中并且使用共价结合的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)作为辅助因子的单胺氧化酶(MAO-A和MAO-B)。多胺氧化酶是氧化脱氨基精胺和亚精胺的另一种FAD-依赖性胺氧化酶。SSAO/VAP-1属于依赖铜的第二族并且使用除了FAD之外的诸如氧化酪氨酸残基(简称为TPQ或LTQ)的其他辅助因子。MAO和SSAO/VAP-1氧化脱氨基包括单胺如多巴胺、酪胺和苜胺的一些常见底物。SSAO/VAP-1还氧化内源性甲基胺和氨基丙酮。

[0005] 最初通过一些化合物抑制其酶活性的能力定义这些酶中的一些。例如,MAO-A被氯吉兰选择性抑制、MAO-B被L-苜甲炔胺选择性抑制,虽然氯吉兰或L-苜甲炔胺都不可抑制SSAO/VAP-1的胺氧化酶活性。SSAO/VAP-1可被氨基脲抑制,因此命名氨基脲敏感性胺氧化酶。

[0006] SSAO/VAP-1是胞外酶,其包含非常短的胞质尾、单一跨膜结构域和大的包含用于胺氧化酶活性的活性中心的高度糖基化的细胞外结构域。SSAO/VAP-1还在一些动物的血浆中循环的溶解形式存在。已经证明该形式是膜结合的SSAO/VAP-1的断裂产物。

[0007] SSAO/VAP-1似乎具有两种生理学功能:第一种是上述胺氧化酶活性且第二种是细胞粘附活性。两种活性与炎症过程有关。SSAO/VAP-1被证明在来自炎症部位的循环的炎症细胞的外渗中发挥重要作用(Salmi M.和Jalkanen S., VAP-1: 粘附素和酶。Trends Immunol. 2001, 22, 211-216)。VAP-1抗体被证实通过阻滞SSAO/VAP-1蛋白的粘附部位来减弱炎症过程,并且提供了大量的体外和体内敲除证据,现在清楚SSAO/VAP-1是重要的炎症的细胞介体。缺乏SSAO/VAP-1的转基因小鼠显示白细胞与内皮细胞的降低的粘附,归巢于淋巴节的淋巴细胞减少和腹膜炎模型中伴随的炎症反应减弱。这些动物或者为健康的、正常生长的、能生育的,并且各种器官和组织检查显示正常表型。此外,发现SSAO/VAP-1的胺

氧化酶活性的抑制剂干扰白细胞滚动、粘附和渗出,并且与SSAO/VAP-1抗体相似,显示抗炎性质。

[0008] 炎症是免疫系统对感染或刺激的第一反应。白细胞从进入组织的循环的移动对该过程是重要的。不适当的炎性反应可导致另外的健康组织的局部炎症,其可导致诸如类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化症和呼吸疾病的疾病。白细胞首先在它们可开始通过血管壁的过程之前通过结合粘附分子粘附于内皮。膜结合SSAO/VAP-1在诸如淋巴器官的高小静脉内皮细胞(HVE)的血管内皮细胞中大量表达并且还在肝窦内皮细胞(HSEC)、平滑肌细胞和脂肪细胞中表达。内皮细胞的细胞表面上的SSAO/VAP-1的表达在炎症过程中紧密控制并增加。在SSAO/VAP-1底物(苜蓿)的存在下,NF $\kappa$ B在HSEC中激活同时在体外其他粘附分子,E-选择素和趋化因子CXCL8(IL-8)上调。最近研究通过显示(通过突变)E-选择素和P-选择素的转录和翻译通过SSAO/VAP-1的酶活性诱导证实该结果。这些结果表明SSAO/VAP-1的胺氧化酶活性在炎性反应中的重要作用。据报道SSAO/VAP-1的氧化酶活性诱导内皮E-和P-选择素和白细胞结合(Jalkanen,S.等人,The oxidase activity of vascular adhesion protein-1(VAP-1) induces endothelial E-and P-selectins and leukocyte binding(血管粘附蛋白-1(VAP-1)的氧化酶活性诱导内皮E-和P-选择素和白细胞结合)Blood 2007,110,1864-1870)。

[0009] 过度和慢性炎性反应与许多诸如类风湿性关节炎、多发性硬化症、哮喘和慢性阻塞性肺病(COPD)的慢性疾病的症状有关。患有特应性湿疹或牛皮癣(二者都是慢性炎性皮肤病)的患者在它们的皮肤中具有比来自健康对照者的皮肤更高水平的SSAO/VAP-1阳性细胞。

[0010] 哮喘可被认为是由呼吸道的慢性炎症产生的疾病,其导致支气管狭窄和粘液的过多积聚。许多患者可使用支气管扩张剂(例如, $\beta$ 2激动剂、白三烯拮抗剂和吸入性类固醇)适当治疗。然而,多达约20%的患者患有严重哮喘并且对这些治疗没有太大反应。这些患者的一部分耐受吸入性类固醇并且在他们的肺液中存在高的中性粒细胞计数。SSAO/VAP-1在肺中表达并且在中性粒细胞的转运中发挥作用。

[0011] 另一部分的哮喘患者对呼吸道的病毒感染极度敏感;这类感染恶化潜在炎症并且可导致严重的哮喘侵袭。

[0012] 最近人们认识到患有囊性纤维化的患者频繁遭受可能独立于慢性肺部感染的持续性肺炎。人们认为囊性纤维化患者中的组织损伤是由于由中性粒细胞释放的介质。尽管如果炎症仅仅由于感染,期望明确细菌感染的治疗解决潜在炎症,来自最近研究的数据表明情况并非如此并且表明呼吸道处于对细菌感染的过度和延迟炎性反应待发的中性粒细胞驱动的促炎状态。参见Rao S.和Grigg J.,New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis(囊性纤维化中肺炎的新见解)Arch Dis Child 2006,91:786-788。

[0013] SSAO/VAP-1还在脂肪细胞中高度表达,在那里它在独立于胰岛素存在的葡萄糖转运中发挥作用。观察到血浆SSAO/VAP-1的水平在患有糖尿病的患者中升高。在患有诸如充血性心力衰竭和肝硬化的其他疾病的患者中发现高水平的血浆SSAO/VAP-1。表明SSAO/VAP-1与如果不是全部,但不论炎症是否反应于免疫反应或随后反应于诸如血管闭塞和再灌注的其他事件大多数炎性疾病有关。

[0014] 近年来人们认识到SSAO/VAP-1在肝窦内皮细胞中表达并且人们认为该蛋白与肝病,特别是肝纤维化有关(Weston C.J.和Adams D.H.,Hepatic consequences of vascular adhesion protein-1 expression(血管粘附蛋白-1表达的肝后果),J Neural Transm 2011;118:1055-1064)。此外,发现VAP-1抗体和小分子抑制剂减弱小鼠中四氯化碳诱导的纤维化。因此,SSAO/VAP-1抑制剂具有治疗纤维化疾病的潜力(WO 2011/029996)。最近报道在肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的存在下通过SSAO/VAP-1氧化甲胺诱导肝脏血管中MAdCAM-1的表达并且报道了这与炎性肠病(IBD)的肝并发症有关(Liaskou W.等人,Regulation of Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1 Expression in Human and Mice by Vascular Adhesion Protein 1 Amine Oxidase Activity(通过血管粘附蛋白1胺氧化酶活动的人和小鼠中粘膜地质素细胞粘附分子1表达的调节),Hepatology 2011;53,661-672)。

[0015] 据报道SSAO/VAP-1抑制剂可减弱血管生成和淋巴管生成,并且报道这些抑制剂对治疗诸如黄斑变性、角膜血管生成、白内障和诸如葡萄膜炎的炎症疾病状态的眼病提供潜力(US 2009/0170770;WO 2009/051223;Noda K.,等,Inhibition of vascular adhesion protein-1 suppresses endotoxin-induced uveitis(血管粘附蛋白-1抑制内毒素诱导的葡萄膜炎的抑制),FASEB J.2008,22,1094-1103)。

[0016] 在患有肝细胞癌的患者血清中观察到水平提高的SSAO/VAP-1。在鼠黑素瘤模型中,证实小分子SSAO/VAP-1抑制剂阻止肿瘤生长,与没有活性的VAP-1抗体相比(Weston C.J.和Adams D.H.,Hepatic consequences of vascular adhesion protein-1 expression(血管粘附蛋白-1表达的肝结果),J Neural Transm 2011,118,1055-1064)。

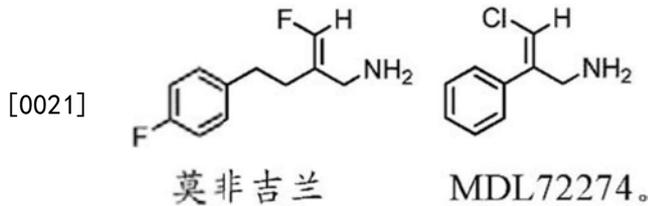
[0017] 据报道SSAO/VAP-1在癌症生物学中发挥重要作用(Marttila-Ichihara F.等,Small-Molecule Inhibitors of Vascular Adhesion Protein-1 Reduce the Accumulation of Myeloid Cells into Tumors and Attenuate Tumor Growth in Mice.(减少进入肿瘤的骨髓细胞的累积和减弱小鼠中的肿瘤生长的血管粘附蛋白-1的小分子抑制剂)The Journal of Immunology,2010,184,3164-3173)。SSAO/VAP-1小分子抑制剂减少黑素瘤和淋巴瘤中促血管新生因子Gr-1+CD11b+骨髓细胞的数量。

[0018] 在SSAO/VAP-1胺氧化酶催化循环过程中,共价结合的辅助因子,TPQ首先减少,然后在铜的存在下被氧气再氧化,同时产生过氧化氢作为副产物。据推测,过量的过氧化氢浓度可能有害并且可能促成各种炎症和神经变性过程的病理学(Götz M.E.,等人,Oxidative stress:Free radical production in neural degeneration.(氧化应激:神经变性的自由基产生)Pharmacol Ther 1994,63,37-122)。

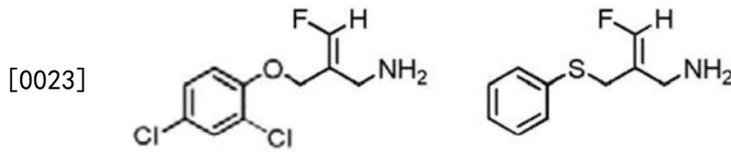
[0019] 人们认为炎症是神经变性疾病诸如帕金森氏病、阿尔茨海默氏病和多发性硬化症的重要特征,并且类似地是在脑栓塞/再灌注事件之后发生的病理生理学的特征(Aktas,0.等人,Neuronal damage in brain inflammation.(脑炎的神经元损伤).Arch Neurol 2007,64,185-9)。过度活性SSAO/VAP-1独立地参与这些过程(Xu,H-L.等人,Vascular Adhesion Protein-1 plays an important role in postischemic inflammation and neuropathology in diabetic,estrogen-treated ovariectomized female rats subjected to transient forebrain ischemia(血管粘附蛋白-1在糖尿病,遭受短暂性全脑缺血的雌性激素治疗的切除卵巢的磁性大鼠缺血后炎症和神经病理学中发挥重要作用)

Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2006, 317, 19-26)。

[0020] 一些已知的MAO抑制剂也抑制SSAO/VAP-1 (例如,下面例示的MAO-B抑制剂莫非吉兰)。据报道莫非吉兰抑制实验自身免疫性脑脊髓炎(US 2006/0025438 A1)。该抑制剂是MAO抑制剂的卤代烯丙基胺家族的成员;莫非吉兰中的卤素是氟。氟烯丙基胺抑制剂在US 4,454,158中描述。有氯烯丙基胺,MDL72274(下面例示的)的报道,与MAO-A和MAO-B相比选择性抑制大鼠SSAO/VAP-1:

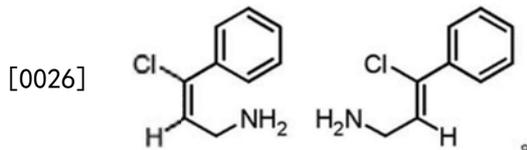


[0022] 另外的氟烯丙基胺抑制剂在US 4,699,928中描述;下面例示的两种化合物被描述为MAO-B的选择性抑制剂:

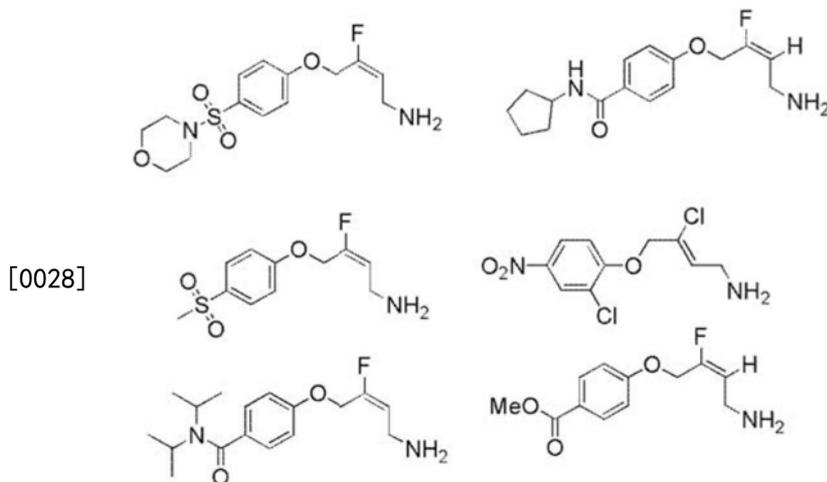


[0024] 可在WO 2007/120528中获悉与莫非吉兰结构相关的其他实例。

[0025] 已经合成了核心结构不同于莫非吉兰的卤代烯丙基胺化合物并且被证实抑制来自许多种类的铜依赖性的胺氧化酶的胺氧化酶活性(参见Kim J.,等人, Inactivation of bovine plasma amine oxidase by haloallylamines. (通过卤代烯丙基胺灭活牛血浆胺氧化酶). Bioorg Med Chem 2006, 14, 1444-1453)。在专利申请(WO 2007/005737)中包括这些化合物:



[0027] WO 2009/066152描述了是SSAO/VAP-1的抑制剂的3-取代3-卤代烯丙基胺的族并且宣称作为用于包括炎性疾病的多种适应症的治疗。具体描述了下列化合物:

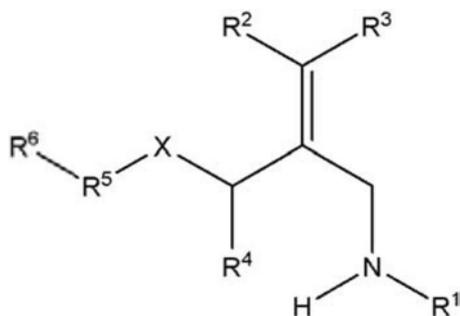


[0029] 参考SSAO/VAP-1抑制剂在各个疾病的动物模型中的作用可在McDonald I.A.等, Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase and Vascular Adhesion Protein-1:One Protein Being Validated as a Therapeutic Target for Inflammatory Diseases.(氨基脒敏感性胺氧化酶和血管粘附蛋白-1:一种蛋白被验证作为炎症疾病的治疗靶向) Annual Reports in Medicinal Chemistry,2008,43,229-241的综述公开中和下列公开中,O'Rourke A.M.等,Anti-inflammatory effects of LJP 1586[Z-3-fluoro-2-(4-methoxybenzyl)allylamine hydrochloride],an amine-based inhibitor of semicarbazide-sensitive amine oxidase activity.(Anti-inflammatory effects of LJP 1586[Z-3-氟-2-(4-甲氧基苄基)烯丙基胺盐酸盐]的抗炎作用,氨基脒-敏感性胺氧化酶活性的胺基抑制剂).J.Pharmacol.Exp.Ther.,2008,324,867-875;和O'Rourke A.M.等人,Benefit of inhibiting SSAO in relapsing experimental encephalomyelitis.(复发性实验脑脊髓炎中抑制SSAO的益处).J.Neural.Transm.,2007,114,845-849中获悉。

[0030] 概述

[0031] 本发明提供了抑制SSAO/VAP-1的取代的卤代烯丙基胺化合物。出人意料地,前面描述的2-取代-3-卤代烯丙基胺结构的修饰导致新化合物的开发,其为人SSAO/VAP-1酶的强效抑制剂并且具有显著改进的药理学和安全性质。这些化合物对SSAO/VAP-1非常有效并且出人意料地被发现是诸如单胺氧化酶A、单胺氧化酶B、二胺氧化酶、赖氨酰氧化酶和赖氨酰样胺氧化酶LOX1-4的其他族成员的非常弱的抑制剂。

[0032] 本发明的第一方面提供了式I的化合物或者其立体异构体、药物可接受的盐、多晶型、溶剂化物或前药:



[0033]

式 I

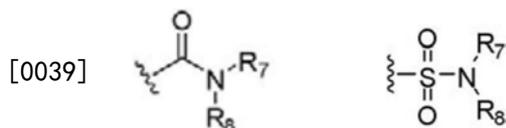
[0034] 其中:

[0035] R<sup>1</sup>和R<sup>4</sup>独立地为氢或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

[0036] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>独立地选自氢、氯和氟;然而,条件是R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>不同时为氢;

[0037] R<sup>5</sup>为任选取代的亚芳基;

[0038] R<sup>6</sup>选自



[0039]

[0040] R<sup>7</sup>和R<sup>8</sup>独立地选自氢、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基和任选取代的C<sub>3-7</sub>环烷基;以及

[0041] X为CH<sub>2</sub>、氧、硫或SO<sub>2</sub>。

[0042] 本发明的第二方面提供了包含本发明的第一方面的化合物或者其药物可接受的

盐或溶剂化物和至少一种药物可接受的赋形剂、载体或稀释剂的药物组合物。

[0043] 本发明的第三方面提供了抑制有此需要的个体中的SSAO/VAP-1的胺氧化酶活性的方法,所述方法包括给予所述个体有效量的本发明的第一方面化合物或者其药物可接受的盐或溶剂化物,或者本发明的第二方面的组合物。

[0044] 本发明的第四方面提供了治疗与SSAO/VAP-1蛋白有关或由SSAO/VAP-1蛋白调节的疾病的方法,所述方法包括给予有此需要的个体治疗有效量的本发明的第一方面的化合物或其药物可接受的盐或溶剂化物或者本发明的第二方面的组合物。

[0045] 本发明的第五方面提供了治疗与SSAO/VAP-1蛋白有关或由SSAO/VAP-1蛋白调节的疾病的方法,所述方法包括给予有此需要的个体治疗有效量的本发明的第一方面的化合物或其药物可接受的盐或溶剂化物或本发明的第二方面的组合物。

[0046] 本发明的第六方面提供了本发明的第一方面的化合物或其药物可接受的盐或溶剂化物在制备用于治疗与SSAO/VAP-1蛋白有关或由SSAO/VAP-1蛋白调节的疾病的药物中的用途。

[0047] 本发明的第七方面提供了本发明的第一方面的化合物或其药物可接受的盐或溶剂化物用于治疗与SSAO/VAP-1蛋白有关或由SSAO/VAP-1蛋白调节的疾病的用途。

[0048] 在另一方面中,本发明描述了抑制SSAO/VAP-1的胺氧化酶活性的化合物的合成和用途并且描述了这类抑制剂治疗患有炎症疾病的患者的用途。

[0049] 本发明的化合物可用于治疗人个体以及宠物和家畜中的炎症和/或纤维化的症状。在本文预期治疗的人炎症性疾病包括关节炎、克罗恩病、肠易激综合征、牛皮癣、嗜酸性哮喘、重度哮喘、迅速恶化的哮喘、慢性阻塞性肺病、囊性纤维化、支气管扩张、动脉粥样硬化、由糖尿病产生的炎症、炎症细胞-介导的组织破坏中风后等。在本文预期治疗的人纤维变性疾病和疾病包括特发性肺纤维化或其他间质性肺病、肝纤维化、肾纤维化、其他器官和组织的纤维化、放射性诱导的纤维化等。

[0050] 本发明的化合物还可用于治疗与囊性纤维化有关的细菌诱导的肺炎。治疗可为预防性和治疗性二者。此外,本发明的化合物可用于治疗其他细菌诱导的肺病诸如败血症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ALI)、输血诱导的肺损伤(TRALI)等。

[0051] 本发明的化合物还可用于治疗诸如葡萄膜炎和黄斑变性的眼病。

[0052] 本发明的化合物还可用作治疗癌症的辅助疗法。结合标准和新化学治疗剂,本发明的化合物可导致癌症的更好控制并且帮助减少转移性继发性癌症。

[0053] 由于SSAO/VAP-1小分子抑制剂积极减弱肺嗜中性的脂多糖(LPS)小鼠模型中的中性粒细胞水平,这类分子具有治疗人个体中类固醇耐药的哮喘的潜力。因此,根据本发明的一个方面,提供了使用SSAO/VAP-1的抑制剂作为减少中性粒细胞水平和治疗重度哮喘症状的预防性或治疗性试剂治疗患者的方法。

[0054] 根据本发明的另一方面,提供了使用SSAO/VAP-1抑制剂作为预防性试剂或治疗发作中的疾病的治疗剂治疗患者的方法。

[0055] 根据本发明的另一方面,提供了使用SSAO/VAP-1抑制剂调节呼吸道中的中性粒细胞浓度和治疗患有呼吸道炎症的患者中炎症的潜在原因的方法。

[0056] 根据本发明的另一方面,提供了使用SSAO/VAP-1抑制剂治疗患有肝纤维化的患者的方法。

[0057] 根据本发明的其他方面,提供了使用SSAO/VAP-1抑制剂治疗患有眼病的患者以治疗疾病的症状的方法。

[0058] 由于SSAO/VAP-1在多种癌症类型中表达,因此根据本发明的另一方面,预期使用SSAO/VAP-1抑制剂作为治疗患有表达SSAO/VAP-1的癌症的患者的辅助疗法。

[0059] 在本发明的方法和用途的一个实施方案中,疾病为炎症。在另一实施方案中,炎症与肝病有关。在其他实施方案中,炎症与呼吸疾病有关。在其他实施方案中,炎症与囊性纤维化有关。在另一实施方案中,炎症与哮喘或慢性阻塞性肺病有关。在其他实施方案中,炎症与眼病有关。

[0060] 在本发明的方法和用途的一个实施方案中,疾病为选自糖尿病肾病、肾小球硬化症、糖尿病视网膜病变、非酒精性脂肪肝疾病和脉络膜新生血管的糖尿病诱导的疾病。

[0061] 在本发明的方法和用途的另一实施方案中,疾病为神经炎性疾病。在本发明的方法和用途的其他实施方案中,所述疾病选自肝纤维化、肝硬化、肾纤维化、特发性肺纤维化和放射性诱导的纤维化。在本发明的方法和用途的其他实施方案中,疾病为癌症。

[0062] 定义

[0063] 下面是可有助于理解本发明的描述的一些定义。意图将这些作为一般定义并且绝不应该以任何方式将本发明的范围限制于那些单独的术语,而是提出用于更好地理解下列描述。

[0064] 除非上下文要求另外或具体地规定相反的情况,本文引用的单数整数、步骤或元素形式的本发明的整数、步骤或元素明确包括引用的整数、步骤或元素的单数和复数形式二者。

[0065] 在整个说明书中,除非上下文另外规定,词语“包括(comprise)”或其诸如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”的变型被理解为意指包括规定的步骤或元素或整数或步骤或元素或整数组,而不排除任何其他步骤或元素或整数或元素或整数组。因此,在本说明书的上下文中,术语“包括(comprising)”是指“主要包括但不必唯一地”。

[0066] 本领域技术人员理解本文描述的本发明易受除了具体描述的那些之外的变型和改变影响。应当理解,本发明包括所有这样的变型和修改。本发明还包括所有本说明书中提及或指出的步骤、特征、组合物和化合物,单独地或共同地,以及任何和所有组合或者任何两个或多个所述步骤或特征。

[0067] 如本文使用的,术语“烷基”在它的含义范围内包括具有1至6个碳原子,例如,1、2、3、4、5或6个碳原子(除非具体定义)的一价(“烷基”)和二价(“亚烷基”)直链或支链饱和和炔自由基。直链或支链烷基在任何可使用点处连接以产生稳定的化合物。在许多实施方案中,低级烷基是包含1-6、1-4或1-2个碳原子的直链或支链烷基。例如,术语烷基包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、异丙基、1-丁基、2-丁基、异丁基、叔丁基、戊基、1,2-二甲基丙基、1,1-二甲基丙基、戊基、异戊基、己基、4-甲基戊基、1-甲基戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、1,2,2-三甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基等。

[0068] 本文使用的术语“烷氧基”是指直链或支链烷氧基(即,0-烷基),其中烷基如上述定义的。烷氧基的实例包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基和异丙氧基。

[0069] 本文使用的术语“环烷基”在它的含义范围内包括一价(“环烷基”)和二价(“环亚

烷基”)的饱和、单环、二环、多环或稠合类似物。在本公开的上下文中,环烷基可具有3至10或3至7个碳原子。环烷基的稠合类似物是指与芳基或杂芳基稠合的单环,其中连接点在非芳香族部分上。环烷基及其稠合类似物的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、四氢萘基、十氢萘基、茛满基等。

[0070] 本文使用的术语“芳基”或诸如“亚芳基”的变型是指具有6至10个碳原子的芳族烃的一价(“芳基”)和二价(“亚芳基”)的单核、多核、共轭和稠合类似物。芳基的稠合类似物是指与单环环烷基或单环杂环基稠合的芳基,其中连接点在芳族部分上。芳基及其稠合类似物的实例包括苯基、萘基、茛满基、茛基、四氢萘基、2,3-二氢苯并呋喃基、二氢苯并吡喃基、1,4-苯并二氧六环基等。亚芳基的实例包括亚苯基和亚萘基。“取代的芳基”是独立地被一个或多个,优选被1、2或3个取代基取代的芳基,在任何可获得原子处连接以产生稳定的化合物。“取代的亚芳基”是独立地被一个或多个,优选被1、2或3个取代基取代的亚芳基,在任何可获得原子处连接以产生稳定的化合物。

[0071] 如本文使用的术语“烷基芳基”在它的含义范围内包括与二价、饱和、直链或支链亚烷基自由基连接的一价(“芳基”)和二价(“亚芳基”)的、单核、多核、共轭和稠合芳族烃自由基。烷基芳基的实例包括但不限于苄基。

[0072] 术语“杂芳基”是指包含5或6个环原子的单环芳族环结构,其中杂芳基包含一个或多个独立地选自O、S和N的杂原子。杂芳基还意图包括诸如亚磺酰基、磺酰基和叔环氮(tertiary ring nitrogen)的N-氧化物的氧化的S或N。碳或氮原子是使得产生稳定的化合物的杂芳基环结构的连接点。杂芳基的实例包括但不限于吡啶基、吡嗪基、吡嗪基、喹啉基、吲哚基、苯并[b]噻吩基、喹啉基、嘌呤基、吲哚基、喹啉基、嘧啶基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、噻吩基、异噁唑基、噁噻二唑基、异噻唑基、四唑基、咪唑基、三嗪基、呋喃基、苯并呋喃基和吲哚基。“含氮的杂芳基”是指其中任何杂原子为N的杂芳基。“取代的杂芳基”是独立地被一个或多个,优选被1、2或3个取代基取代的杂芳基,在任何可获得原子处连接以产生稳定的化合物。

[0073] “杂亚芳基”是指包含5或6个环原子的二价、单环芳族环结构,其中杂亚芳基包含一个或多个独立地选自O、S和N的杂原子。杂亚芳基还意图包括诸如亚磺酰基、磺酰基和叔环氮的N-氧化物的氧化的S或N。碳或氮原子是杂亚芳基环结构与在其上的取代基的连接点使得产生稳定的化合物。杂亚芳基的实例包括但不限于亚吡啶基、亚吡嗪基、亚吡嗪基、亚喹啉基、亚吲哚基、苯并[b]亚噻吩基、亚喹啉基、亚嘌呤基、亚吲哚基、亚喹啉基、亚嘧啶基、亚吡咯基、亚噁唑基、亚噻唑基、亚噻吩基、亚异噻唑基、亚噁噻二唑基、亚异噻唑基、亚四唑基、亚咪唑基、亚三嗪基、亚呋喃基、亚苯并呋喃基和亚吲哚基。“含氮杂亚芳基”是指其中任何杂原子为N的杂亚芳基。“取代的杂亚芳基”是独立地被一个或多个,优选被1、2或3个取代基取代的杂亚芳基,在任何可获得原子处连接以产生稳定的化合物。

[0074] 如本文使用的术语“杂环基”和诸如“杂环烷基”的变型在它的含义范围内包括具有3至10个环原子的一价(“杂环基”)和二价(“杂亚环基”)、饱和、单环、二环、多环或稠合烃自由基,其中1或5,或1至3个环原子为独立地选自O、N、NH或S的杂原子,其中连接点可为碳或氮。杂环基的稠合类似物是指与芳基或杂芳基稠合的单环杂环,其中连接点不在芳香族部分部分上。杂环基可为C<sub>3-8</sub>杂环基。杂环烷基可为C<sub>3-6</sub>杂环基。杂环基可为C<sub>3-5</sub>杂环基。杂环基及其稠合类似物的实例包括吡丙啶基、吡咯烷基、噻唑烷基、哌啶基、哌嗪基、咪唑烷基、

2,3-二氢氟(2,3-b)吡啶基、苯并噁嗪基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、二氢吲哚基、奎宁环基、氮杂环丁二烯基、吗啉基、四氢噻吩基、四氢呋喃基、四氢吡喃基等。该术语还包括不是芳香族的部分不饱和单环,例如通过氮连接的2-或4-吡啶酮类或N-取代的尿嘧啶。

[0075] 本文使用的术语“卤素”或诸如“卤化物”或“卤代”的变型是指氟、氯、溴和碘。

[0076] 本文使用的术语“杂原子”或诸如“杂-”或“杂基团”的变型是指O、N、NH和S。

[0077] 通常,“取代的”是指本文定义的有机基团(例如,烷基)其中一个或多个其中包含的氢原子的键被非氢或非碳原子的键取代。取代的基团还包括其中一个或多个碳或氢原子的键被包括一个或多个杂原子的双键或三键取代的键所取代的基团。因此,取代的基团被一个或多个取代基取代,除非另外规定。在一些实施方案中,取代的基团被1、2、3、4、5或6个取代基所取代。

[0078] 本文使用的术语“任选取代的”是指该术语所指的基团可为未取代的,或者可被一个或多个独立地选自以下基团所取代:烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、杂环烷基、卤代、卤代烷基、卤代炔基、羟基、羟基烷基、烷氧基、硫代烷氧基、烯氧基、卤代烷氧基、卤代烯氧基、NO<sub>2</sub>、NH(烷基)、N(烷基)<sub>2</sub>、硝基烷基、硝基烯基、硝基炔基、硝基杂环基、烷基氨基、二烷基氨基、烯基胺、炔基氨基、酰基、烯酰基(alkenoyl)、炔酰基(alkynoyl)、酰基氨基、二酰基氨基、酰基氧基、烷基磺酰氧基、杂环氧基、杂环氨基、卤代杂环烷基、烷基亚磺酰基、烷基羰基氧基、烷基硫代、酰基硫代、诸如磷酰基和氧磷基的含磷基团、芳基杂芳基、烷基芳基、芳烷基、烷基杂芳基、氰基、氰酸酯、异氰酸酯、CO<sub>2</sub>H、CO<sub>2</sub>烷基、C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NH(烷基)和-C(O)N(烷基)<sub>2</sub>。优选的取代基包括卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>烯基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>卤代烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、羟基(C<sub>1-6</sub>)烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基、C(O)H、C(O)OH、NHC(O)H、NHC(O)C<sub>1-4</sub>烷基、C(O)C<sub>1-4</sub>烷基、NH<sub>2</sub>、NHC<sub>1-4</sub>烷基、N(C<sub>1-4</sub>烷基)<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、OH和CN。特别优选的取代基包括C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>1-3</sub>烷氧基、卤素、OH、羟基(C<sub>1-3</sub>)烷基(例如,CH<sub>2</sub>OH)、C(O)C<sub>1-4</sub>烷基(例如,C(O)CH<sub>3</sub>)和C<sub>1-3</sub>卤代烷基(例如,CF<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)。

[0079] 本发明包括它范围内的所有本文公开的化合物的立体异构体和异构体形式,包括所有非对映异构体、外消旋体、对映异构体及其混合物。本发明的化合物可具有不对称中心并且可以立体异构体的混合物形式或者以单独的非对映异构体或对映异构体形式存在,除非当特别指出时,所有异构体形式在本发明内。还应当理解,由式I描述的化合物可以E和Z异构体,还称为顺式和反式异构体形式存在。因此,应该理解本公开包括例如,化合物的E、Z、顺式、反式、(R)、(S)、(L)、(D)、(+)和/或(-)的形式,如在各个情况下合适。在结构不具有指出的特殊立体异构现象的情况下,应当理解包括任何和所有可能的异构体。本发明的化合物包括所有构象异构体。本发明的化合物还可以一种或多种互变异构体形式存在,包括单核互变异构体和互变异构体混合物二者。在本发明的范围内还包括所有本文公开的化合物的多晶型和晶体形式。

[0080] 本发明包括它的范围内的不同原子的同位素。未具体指定为特定同位素的任何原子是指代表所述原子任何稳定的同位素。因此,本公开应被理解为包括氢的氕和氘同位素。

[0081] 本申请中应用的所有参考文献以它们的内容通过交叉引用具体并入。参考任何这类文献不应被理解为承认所述文献形成公知常识的一部分或者是现有技术。

[0082] 在本说明书的上下文中,术语“给药(administering)”和该术语的变型包括“给药(administer)”和“给药(administration)”包括接触、应用、向生物体递送或提供本发明的

化合物或组合物,或者通过任何合适方法触及表面。在本说明书的上下文中,术语“治疗”是指治疗疾病状态或症状,预防疾病的建立或者另外以不管任何方式预防、阻止、延迟或完全改变疾病或其他不期望症状的发展的任何和所有用途。

[0083] 在本说明书的上下文中,术语“有效量”包括它含义范围内足够的但无毒量的本发明的化合物或组合物以提供期望效果。因此,术语“治疗有效量”包括它含义范围内足够的但无毒量的本发明的化合物或组合物以提供期望的治疗效果。需要的精确量对个体而变化,其取决于诸如受治疗的种类,个体的性别、年龄和身体状况,受治疗的疾病状态的严重程度,待给予的特殊试剂,给药模式等的因素。因此,不可能规定精确的“有效量”。然而,对于任何给定情况,可由本领域一般技术人员仅使用常规实验确定合适的“有效量”。

[0084] 附图简述

[0085] 图1A-1E示出在一次口服剂量后化合物23抑制大鼠的各个组织中的SSAO/VAP-1酶的能力,具有在给药后24小时测定的活性。

[0086] 图2A-2E示出在一次口服剂量后2mg/kg的化合物23抑制大鼠的各个组织中的SSAO/VAP-1酶的能力,以及在给药后各个时间点测定的活性。

[0087] 图3A-3E示出在每天口服给药重复5天后化合物23抑制大鼠的各个组织中的SSAO/VAP-1酶的能力,以及在最终剂量的给药后24小时测定的活性。

[0088] 图4A-4D示出在小鼠模型中化合物23减少白细胞迁移至发炎的气囊的能力。

[0089] 图5A和5B示出化合物23减少白细胞在小鼠辜提肌微循环中迁移的能力。

[0090] 图6A和6B示出化合物23减少白细胞迁移至肺(6A)并且防止全身炎症的小鼠模型中的死亡率(6B)的能力。

[0091] 图7A-7F示出化合物9减少神经变性的小鼠模型中的中性粒细胞迁移和小胶质细胞激活的能力。

[0092] 图8A-8C示出化合物9减少急性肺炎的小鼠模型中的中性粒细胞迁移和激活的能力。

[0093] 图9A和9B示出化合物23减少过敏性哮喘的小鼠模型中的中性粒细胞迁移至肺(9A)和气道高反应性(9B)的能力。

[0094] 图10A和10B示出化合物9减少细菌性肺感染的小鼠模型中的白细胞迁移至肺(10A)和防止死亡率(10B)的能力。

[0095] 图11示出化合物23减少COPD的小鼠模型中可溶性胶原的量的能力。

[0096] 图12A-12E示出化合物23改善肝功能(12A和12B)、减少肝纤维化的大鼠模型中的纤维化(12c和12E)和减少炎症的能力。

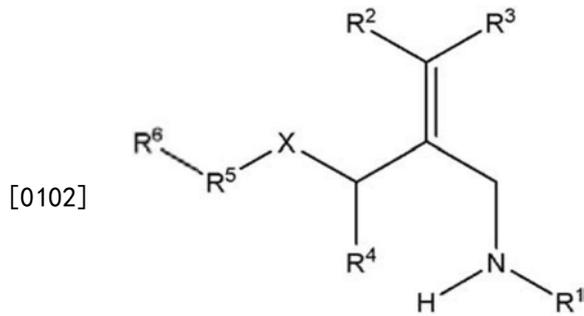
[0097] 图13A-13D示出化合物23减少脂肪肝病的小鼠模型中的炎症和纤维化的能力。

[0098] 图14A和14B示出化合物23减少葡萄膜炎的小鼠模型中的嗜酸性粒细胞迁移至眼睛(14B)和减少临床评分(14A)的能力。

[0099] 详细描述

[0100] 本发明涉及可抑制SSAO/VAP-1的取代的卤代烯丙基胺化合物。

[0101] 根据本发明,提供了具有结构(式I)的化合物或其立体异构体、药物可接受的盐、多晶型、溶剂化物或前药:



式 I

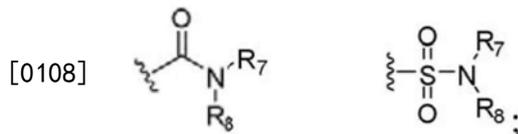
[0103] 其中:

[0104]  $R^1$ 和 $R^4$ 独立地为氢或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0105]  $R^2$ 和 $R^3$ 独立地选自氢、氯和氟;然而,条件是 $R^2$ 和 $R^3$ 不同时为氢;

[0106]  $R^5$ 为任选取代的亚芳基;

[0107]  $R^6$ 选自



[0109]  $R^7$ 和 $R^8$ 独立地选自氢、任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基和任选取代的 $C_{3-7}$ 环烷基;且

[0110] X为 $CH_2$ 、氧、硫或 $SO_2$ 。

[0111] 在本发明化合物的一个实施方案中, $R^1$ 和 $R^4$ 都是氢。在本发明化合物的另一实施方案中, $R^1$ 为氢且 $R^4$ 为任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。在本发明化合物的其他实施方案中, $R^1$ 为任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基且 $R^4$ 为氢。在本发明化合物的另一实施方案中, $R^1$ 为氢且 $R^4$ 为甲基。在本发明化合物的其他实施方案中, $R^1$ 为甲基且 $R^4$ 为氢。

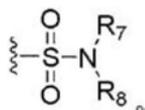
[0112] 在本发明化合物的一个实施方案中, $R^2$ 和 $R^3$ 独立地选自氢、氯和氟,条件是 $R^2$ 和 $R^3$ 不同时为氢。在本发明化合物的另一实施方案中, $R^2$ 和 $R^3$ 独立地为氢或氟,条件是 $R^2$ 和 $R^3$ 不同时为氢。在本发明化合物的其他实施方案中, $R^2$ 和 $R^3$ 都是氟。在本发明化合物的另一实施方案中, $R^2$ 为氢且 $R^3$ 为氟。在本发明化合物的其他实施方案中, $R^2$ 为氟且 $R^3$ 为氢。

[0113] 在本发明化合物的一个实施方案中, $R^5$ 为任选取代的亚芳基。在本发明化合物的另一实施方案中, $R^5$ 为未取代的亚芳基。在本发明化合物的其他实施方案中, $R^5$ 为任选取代的亚苯基。在本发明化合物的另一实施方案中, $R^5$ 为未取代的亚苯基。在本发明化合物的一个实施方案中, $R^5$ 为任选被一个或多个独立地选自烷基、卤代、烷氧基和卤代烷基的基团取代的亚苯基。在本发明化合物的另一实施方案中, $R^5$ 为任选被一个或多个独立地选自甲基、氟、氯、溴、 $OCH_3$ 和 $CF_3$ 的基团取代的亚苯基。

[0114] 在本发明化合物的一个实施方案中, $R^6$ 选自:

在本发明化合物的另一实施方案中, $R^6$ 为

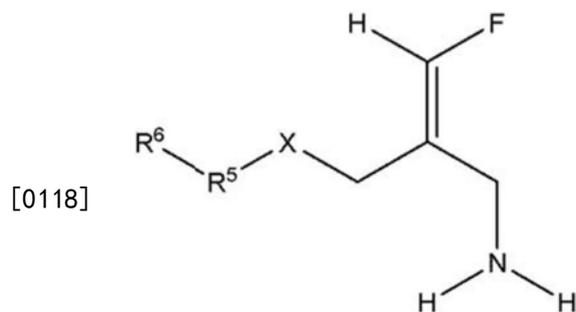
在本发明化合物的其他实施方案中, $R^6$ 为



[0115] 在本发明化合物的一个实施方案中,  $R^7$ 和 $R^8$ 独立地选自氢、任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基和任选取代的 $C_{3-7}$ 环烷基。在本发明化合物的另一实施方案中,  $R^7$ 和 $R^8$ 独立地选自氢和任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。在本发明化合物的其他实施方案中,  $R^7$ 和 $R^8$ 都是氢。在本发明化合物的另一实施方案中,  $R^7$ 和 $R^8$ 都是 $C_{1-6}$ 烷基。在本发明化合物的其他实施方案中,  $R^7$ 为氢且 $R^8$ 为 $C_{1-6}$ 烷基。在其他实施方案中,  $R^7$ 和 $R^8$ 独立地选自氢、叔丁基、甲基、乙基, 异丙基和2-丁基。

[0116] 在本发明化合物的一个实施方案中,  $X$ 为 $CH_2$ 、氧、硫或 $SO_2$ 。在本发明化合物的另一实施方案中,  $X$ 为 $CH_2$ 、氧或硫。在本发明化合物的其他实施方案中,  $X$ 为氧。

[0117] 在本发明的特殊实施方案中, 提供了具有如下结构(式II)的化合物或其药物可接受的盐、溶剂化物、多晶型或前药:

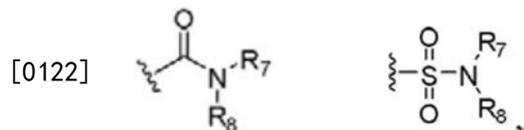


式 II

[0119] 其中:

[0120]  $R^5$ 为任选取代的亚芳基;

[0121]  $R^6$ 选自



[0123]  $R^7$ 和 $R^8$ 独立地选自氢、任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基和任选取代的 $C_{3-7}$ 环烷基; 且

[0124]  $X$ 为 $CH_2$ 、氧、硫或 $SO_2$ 。

[0125] 根据本发明的一个实施方案, 目前优选的化合物包括式I和II的化合物, 其中 $R^3$ 为氟, 且 $X$ 为氧。

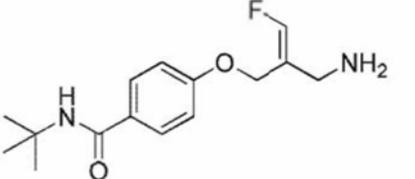
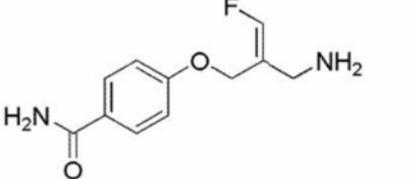
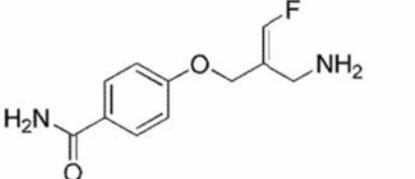
[0126] 应当理解可以前药形式给予由式I或II描述的化合物, 其中取代基 $R^1$ 可选自这类官能团如 $-C(O)$ 烷基、 $-C(O)$ 芳基、 $-C(O)$ -芳基烷基、 $C(O)$ 杂芳基、 $-C(O)$ -杂芳基烷基等。

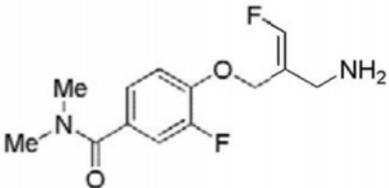
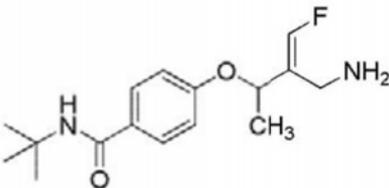
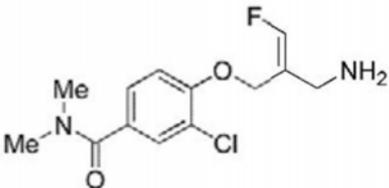
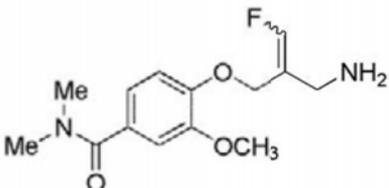
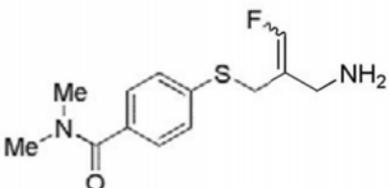
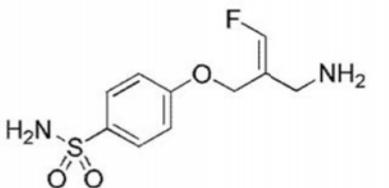
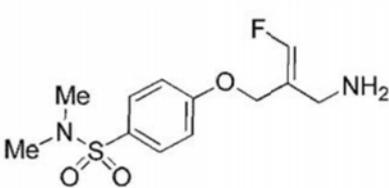
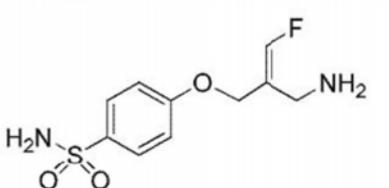
[0127] 由式I描述的化合物当存在碱性氨基基团时可以酸加合盐形式存在, 或者当存在酸性基团时以金属盐形式存在。

[0128] 本发明的示例性化合物包括表1中阐述的化合物或其药物可接受的盐或溶剂化物:

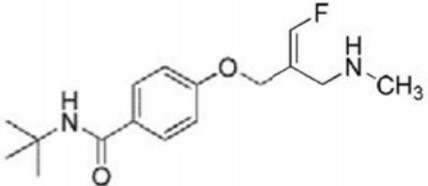
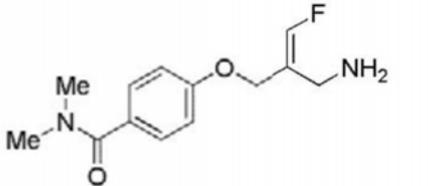
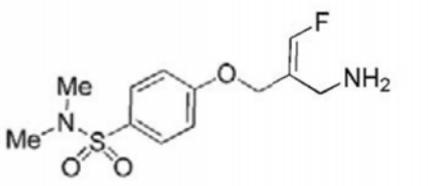
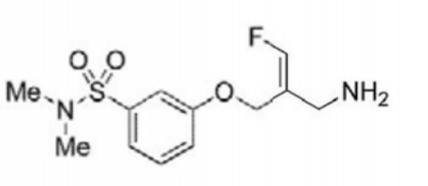
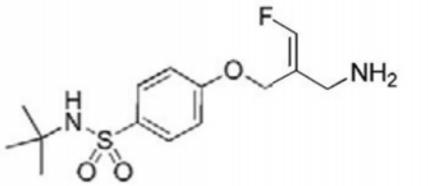
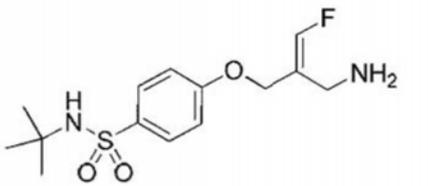
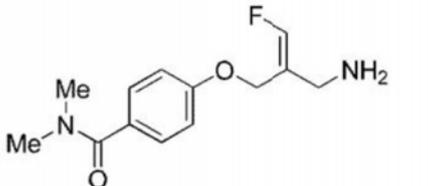
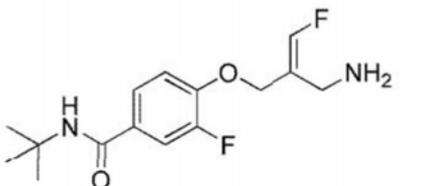
[0129] 表1

[0130]

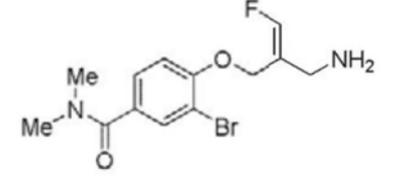
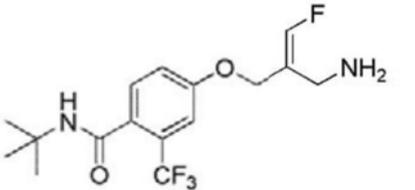
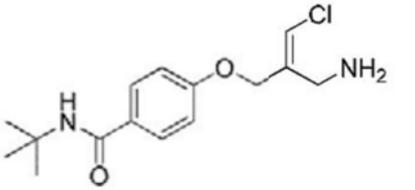
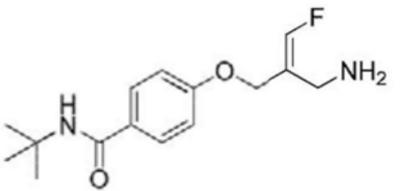
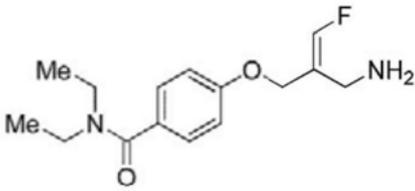
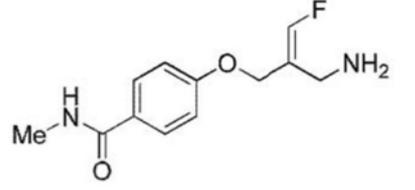
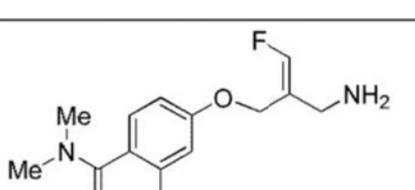
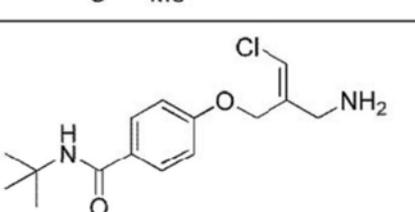
1		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基苯甲酰胺
2		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)苯甲酰胺
3		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)苯甲酰胺

4		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-3-氟-N,N-二甲基苯甲酰胺
5		(E)-4-(3-(氨基甲基)-4-氟丁-3-烯-2-基氧基)-N-叔丁基苯甲酰胺
6		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-3-氯-N,N-二甲基苯甲酰胺
7		4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-3-甲氧基-N,N-二甲基苯甲酰胺
8		4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙基硫代)-N,N-二甲基苯甲酰胺
9		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)苯-磺酰胺
10		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯磺酰胺
11		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)苯-磺酰胺

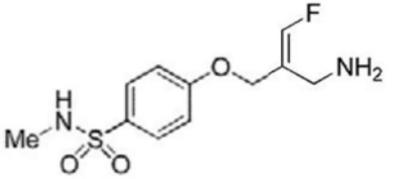
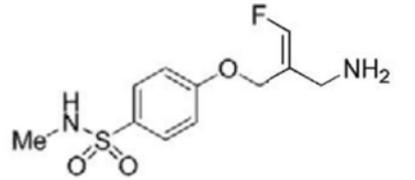
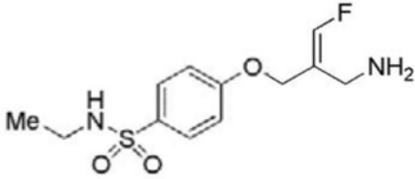
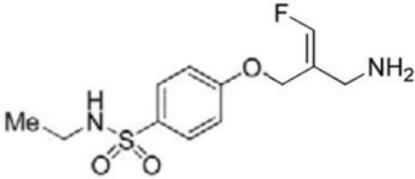
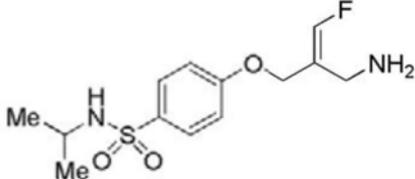
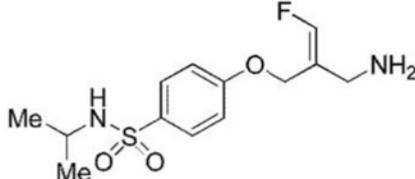
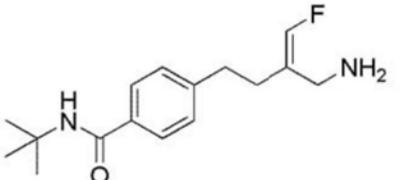
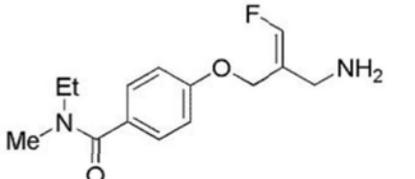
[0131]

12		(E)-N-叔丁基-4-(3-氟-2-((甲基氨基)甲基)烯丙氧基)苯甲酰胺
13		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯甲酰胺
14		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯磺酰胺
15		(Z)-3-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯磺酰胺
16		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基苯磺酰胺
17		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基苯磺酰胺
18		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯甲酰胺
19		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基-3-氟苯甲酰胺

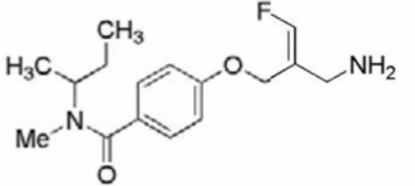
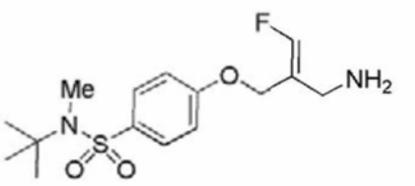
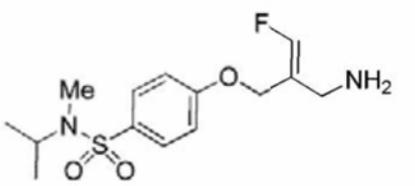
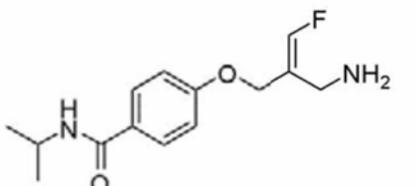
[0132]

20		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-3-溴-N,N-二甲基苯甲酰胺
21		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基-2-(三氟甲基)苯甲酰胺
22		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氯烯丙氧基)-N-叔丁基苯甲酰胺
23		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基苯甲酰胺
24		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二乙基苯甲酰胺
25		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-甲基苯甲酰胺
26		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N,2-三甲基苯甲酰胺
27		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氯烯丙氧基)-N-叔丁基苯甲酰胺

[0133]

28		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-甲基苯磺酰胺
29		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-甲基苯磺酰胺
30		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-乙基苯磺酰胺
31		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-乙基苯磺酰胺
32		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-异丙基苯磺酰胺
33		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-异丙基苯磺酰胺
34		(Z)-4-(3-(氨基甲基)-4-氟丁-3-烯基)-N-叔丁基苯甲酰胺
35		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-乙基-N-甲基苯甲酰胺

[0134]

36		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-仲丁基-N-甲基苯甲酰胺
37		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基-N-甲基苯磺酰胺
38		(Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-异丙基-N-甲基苯磺酰胺
39		(E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-异丙基苯甲酰胺

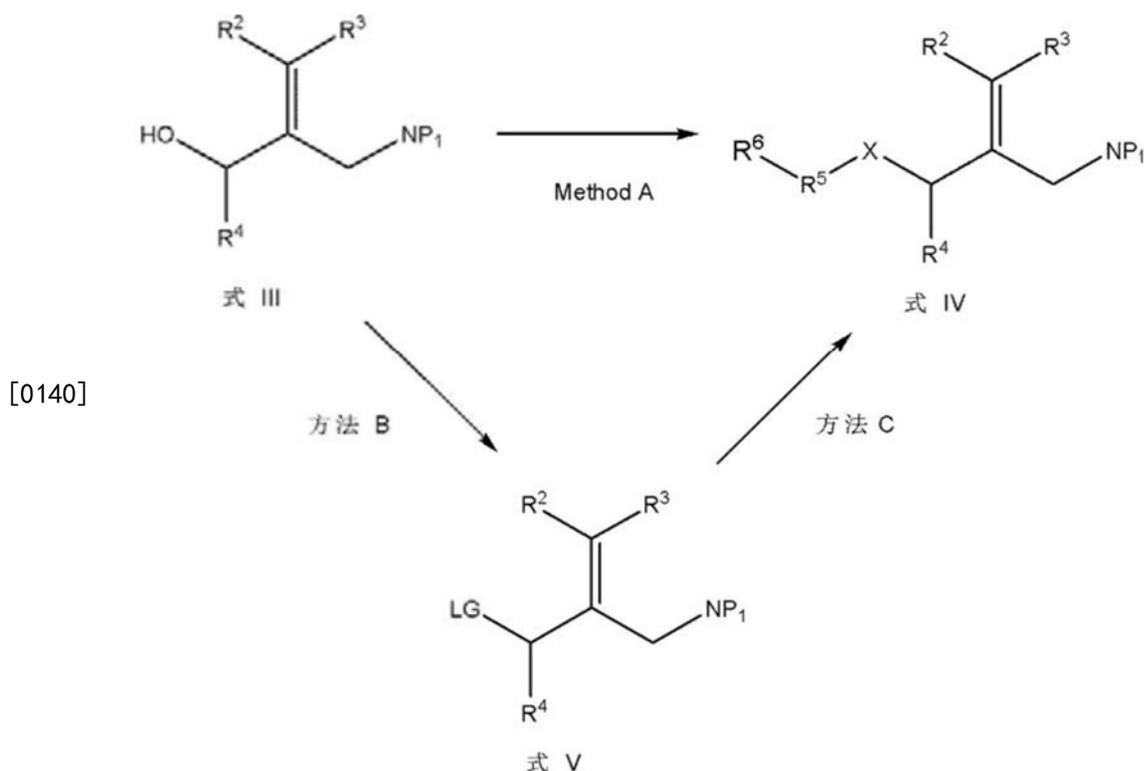
[0135]

[0136] 式I的化合物的制备

[0137] 可以多种方式制备本发明的化合物,例如,US 4,454,158、US 4,699,928和U.S 4,650,907中描述的步骤。

[0138] 制备由式I描述的化合物(其中X=O或S)的可选路线使用下面反应方案1描述的合成方案。这与W0 2007/120528中描述的步骤相似。

[0139] 反应方案1



[0141] 其中 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $X$ 和 $R^5$ 如在本文定义的； $P_1$ 是用于保护氮功能性的官能团；且 $LG$ 为离去基团。 $P_1$ 的实例是诸如叔丁氧基羰基 (BOC)、9-苄基甲氧基-羰基 (Fmoc) 和苄氧基羰基 (CBZ) 基团的碳酸酯； $LG$ 的实例为溴、氯、碘、三氟甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯和酯基团。

[0142] 由式III代表的化合物或者直接用于诸如光延 (Mitsunobu) 反应的置换反应 (方法A) 以产生由式IV代表的化合物, 或者通过本领域熟知的步骤 (方法B) 首先转换为由式V代表的化合物, 其包含诸如溴、氯或碘的离去基团 (LG)。或者, 所述可使用甲苯磺酰基保护基/活化基团 ( $P_2$ =反应方案2中甲苯磺酰基, 式VIII; 参见下面) 直接活化所述醇。然后, 使用亲核试剂处理由式V描述的活性化合物以提供由式IV代表的化合物 (方法C)。

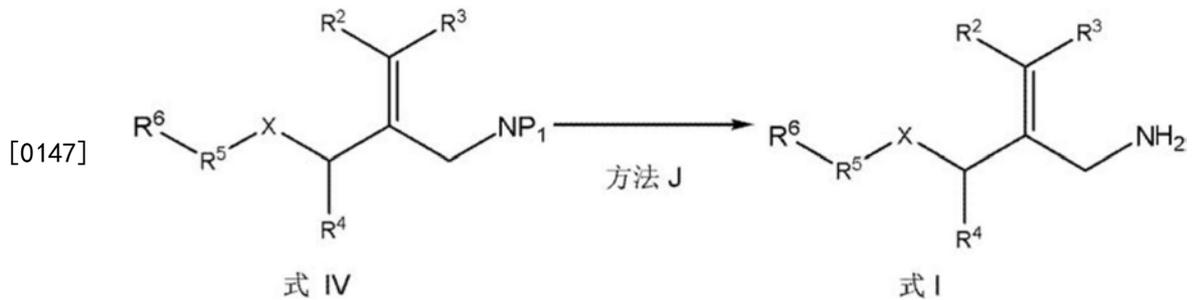
[0143] 光延反应条件在科学和专利文献 (在 [en.wikipedia.org/wiki/Mitsunobu\\_reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Mitsunobu_reaction) 的万维网上和 Mitsunobu, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. (在天然产物的合成和转化中偶氮二碳酸二乙酯和三苯基磷的使用. 合成1981, 1-28) 可获得) 中充分描述, 并且通过在诸如四氢呋喃 (THF) 或  $CH_2Cl_2$  ( $CH_2Cl_2$ ) 的有机溶剂中, 在偶氮二碳酸二烷基酯和三苯基磷的存在下使醇与合适取代的酚或硫代酚基团, 或取代的邻苯二甲酰亚胺接触来进行。

[0144] 通过许多通常使用的步骤实现式III中醇基团转化为相应的溴、氯或碘 (参见, 例如, March J. Advanced Organic Synthesis (高等有机合成), John Wiley & Sons, 第三版, 1985), 包括在甲苯或  $CBR_4$  中使用  $PBr_3$  处理和 在诸如  $CH_2Cl_2$  的有机溶剂中使用三苯基磷处理。可使用诸如取代的醇、酚、胺或硫醇的亲核试剂处理产生的卤化物以提供由式IV代表的化合物。

[0145] 有许多已经建立的化学步骤用于将由式IV描述的化合物脱保护为由式I描述的本发明的化合物 (方法J; 参见反应方案2)。例如, 如果  $P_1$  为 BOC 保护基, 可在诸如乙醚的溶剂中

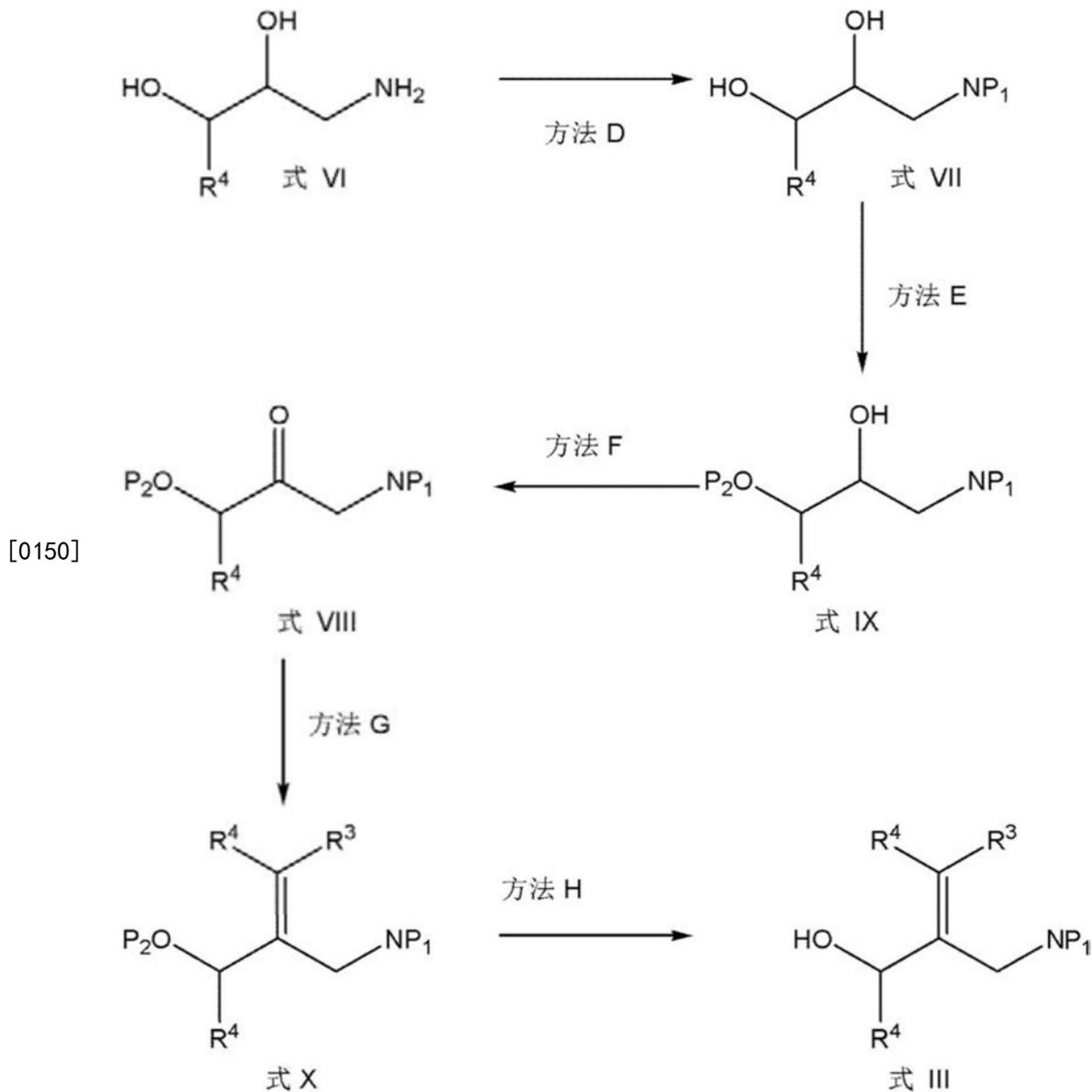
使用诸如干燥氯化氢的酸性物质处理由式IV描述的化合物以提供盐酸盐形式的由式I描述的化合物。通常,为方便处理和提高化学稳定性而将游离氨基化合物转化为酸加合盐。酸加合盐的实例包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐和甲磺酸盐。

[0146] 反应方案2



[0148] 由式III描述的化合物的制备直接来自商业可得或容易获得的由式VI例示的氨基二醇(参见反应方案3)。

[0149] 反应方案3



[0151] 第一步是伯胺的选择性保护,优选以氨基甲酸叔丁基酯(BOC)形式(式VII中 $P_1=$ BOC),随后是伯醇的选择性保护以提供由式IX描述的醇。选择性保护方法(方法E)是合成化学领域熟知的。例如,可在咪唑的存在下使伯醇有选择地与叔丁基-(氯)二甲基硅烷反应以提供叔丁基二甲基甲硅烷基保护的醇(式VII)。最好在Swern氧化条件(方法F)下实现仲醇的氧化产生由式VIII代表的酮。式X中的卤代烯烃官能团通过Wittig或Horner-Wadsworth-Emmons反应引入。当在由式I描述的结构中 $R^2$ 和 $R^3$ 为F和H时,在诸如钠双(三甲基甲硅烷基)酰胺的强碱的存在下,由式VIII描述的酮与(三苯基)磷四氟硼酸氟甲基酯的反应提供E和Z异构体(由式X描述的)的混合物形式的氟烯烃。可通过色谱程序分离这些异构体以提供单独的E和Z异构体。可容易地实现由式X描述的化合物中的保护基的去除(方法H)。由保护基 $P_1$ 和 $P_2$ 的性质决定脱保护试剂的选择。当 $P_2$ 为叔丁基二甲基甲硅烷基且 $P_1$ 为BOC基团时,使用TBAF实现 $P_2$ 的选择性去除以产生由式III描述的醇。

[0152] 治疗用途和制剂

[0153] 本发明提供了使用由式I和II描述的化合物以抑制膜结合SSAO/VAP-1和可溶SSAO/VAP-1的方法。可通过以多种方式抑制SSAO/VAP-1的胺氧化酶活性所需的量测定化合物的相对抑制效能,例如,在体外检验中使用重组人蛋白或使用重组非人酶、在表达正常啮齿动物酶的细胞检验中、在已经使用人蛋白转染的细胞检验中、在啮齿动物和其他哺乳动种类的体内试验中等。

[0154] 本发明还公开了使用由式I和II描述的化合物抑制患有炎性疾病的患者中的SSAO/VAP-1的方法和/或治疗炎性疾病的方法。人炎性疾病包括关节炎、克罗恩病、肠易激综合征、牛皮癣、哮喘、慢性阻塞性肺病、支气管扩张、关节硬化、由糖尿病产生的炎症和中风后炎性细胞破坏。

[0155] 因此,在一个方面中,本发明涉及抑制有此需要的个体中的胺氧化酶的方法,所述方法包括给予所述个体有效量的式I或式II的化合物以产生正性治疗反应。

[0156] 在另一方面中,本发明涉及治疗与胺氧化酶相关的疾病的方法,所述方法包括给予有此需要的个体治疗有效量的式I或式II的化合物。

[0157] 在另一方面中,本发明涉及治疗由SSAO/VAP-1调节的疾病的方法,所述方法包括给予有此需要的个体治疗有效量的式I或式II的化合物。

[0158] 上述方法适用其中疾病为炎症。如本文使用的,“炎症”包括多种适应症,包括关节炎(包括幼年型类风湿性关节炎)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、炎性肠病(例如,肠易激综合征)、牛皮癣、哮喘、肺炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、支气管扩张、皮肤炎症、眼病、接触性皮炎、肝炎、肝自身免疫性疾病、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性胆管炎、酒精肝病、动脉粥样硬化、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、缺血性疾病、中风及其并发症、心肌梗死及其并发症、中风后炎性细胞破坏、滑膜炎、全身炎性败血症等。

[0159] 上述方法也适用其中所述疾病为类型I糖尿病及其并发症、类型II糖尿病及其并发症等。

[0160] 上述方法也适用其中所述疾病为黄斑变性或其他眼病。

[0161] 上述方法也适用其中所述疾病为纤维化。如此处使用的,“纤维化”包括这类疾病如囊性纤维化、特发性肺纤维化、肝纤维化、包括非酒精性脂肪肝病诸如非酒精性脂肪肝(NASH)和醇诱导的纤维化导致肝硬化、肾纤维化、硬皮病、放射性诱导的纤维化和其中过多

的纤维化促成疾病病理学的其他疾病。

[0162] 上述方法也适用其中所述疾病为神经炎性疾病。如本文使用的，“神经炎疾病”包括多种适应症，包括中风、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、多发性硬化症、慢性多发性硬化症等。

[0163] 上述方法也适用其中所述疾病为癌症。在一个实施方案中，所述癌症选自肺癌；乳腺癌；结直肠癌；肛门癌；胰腺癌；前列腺癌；卵巢癌；肝和胆管癌；食管癌；非霍奇金淋巴瘤；膀胱癌；子宫癌；胶质瘤、胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤和其他脑肿瘤；肾癌；头颈癌；胃癌；多发性骨髓瘤；睾丸癌；生殖细胞瘤；神经内分泌瘤；子宫颈瘤；胃肠道、乳腺和其他器官的良性肿瘤；印戒细胞癌；间叶细胞肿瘤包括肉瘤、纤维肉瘤、血管瘤、血管瘤病、血管外皮细胞瘤、假血管瘤性间质增生、肌纤维母细胞瘤、纤维瘤病、炎性肌纤维母细胞瘤、脂肪瘤、血管脂肪瘤、颗粒细胞瘤、纤维神经瘤、神经鞘瘤、血管肉瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌瘤或平滑肌肉瘤。

[0164] 药物制剂和/或治疗制剂

[0165] 在本发明的另一实施方案中，提供了包含具有式I或式II的化合物和至少一种药物可接受的赋形剂、载体或稀释剂的组合物。式I的化合物还可以合适的盐包括药物可接受的盐形式存在。

[0166] 短语“药物可接受的载体”是指适用于特殊给药方式的本领域已知的任何载体。此外，可以在组合物中的单独的药物活性成分形式配制化合物或者可与其他活性成分结合。

[0167] 短语“药物可接受的盐”是指适于在药物应用中使用的任何盐制剂。药物可接受的盐，是指在合理的医学判断范围内适用于接触人和低级动物的组织使用而没有过多毒性、刺激性、过敏反应等的那些盐，并且与合理的效益/风险比相称。药物可接受的盐是本领域熟知的并且包括酸加合盐和碱性盐。还可形成酸和碱的半盐。药物可接受的盐包括矿物酸的胺盐（例如，盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐等）；和有机酸的胺盐（例如，甲酸盐、乙酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、抗坏血酸盐，琥珀酸盐、马来酸盐、丁酸盐、戊酸盐、延胡索酸盐等）。

[0168] 对于具有碱性位点的式(I)的化合物，合适的药物可接受的盐可为酸加合盐。例如，可通过混合诸如盐酸、硫酸、甲烷磺酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、苯甲酸、磷酸、乙酸、草酸、碳酸、酒石酸或柠檬酸的药物可接受的酸与本发明的化合物制备这类化合物的合适的药物可接受的盐。

[0169] S.M.Berge等在J.Pharmaceutical Sciences,1977,66:1-19中详细描述了药物可接受的盐。可在本发明的化合物的最终分离和纯化过程中原位制备盐，或者单独地通过使游离碱功能与合适的有机酸反应制备。代表性酸加合盐包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、二葡萄糖酸盐、环戊烷丙酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月硅酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫代氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。从形成无毒盐的

碱形成合适的碱性盐。实例包括铝、精氨酸、苜蓿、钙、胆碱、二乙基胺、二醇胺、甘氨酸、赖氨酸、镁、葡甲胺、乙醇胺、钾、钠、氨丁三醇和锌盐。代表性碱或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等以及无毒铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲基胺、二甲胺、三甲胺、三乙基胺、乙基胺、三乙醇胺等。

[0170] 可通过本领域技术人员已知的方法制备式I化合物的药物可接受的盐,包括例如

[0171] i. 通过使式I的化合物与期望的酸或碱反应;

[0172] ii. 通过从式I的化合物的合适前体去除酸-或碱-不稳定的保护基或通过使用期望的酸或碱开环诸如内酯或内酰胺的合适的环前体;或者

[0173] iii. 通过与合适的酸或碱反应或者通过合适的离子交换柱将式I化合物的一种盐转化为另一种。

[0174] 通常在溶液中进行上述反应(i)-(iii)。生成的盐可沉淀析出并通过过滤收集或者可通过蒸发溶剂回收。生成的盐的电离程度可能从完全电离到几乎未电离而完全不同。

[0175] 因此,例如,可通过混合诸如盐酸、硫酸、甲烷磺酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、苯甲酸、磷酸、乙酸、草酸、碳酸、酒石酸或柠檬酸的药物可接受的酸与本发明的化合物制备本发明化合物的合适的药物可接受的盐。因此,本发明化合物的合适的药物可接受的盐包括酸加合盐。

[0176] 本发明的化合物可以非溶剂化物和溶剂化物形式存在。术语“溶剂化物”在本文用于描述包含本发明的化合物和化学计量的一种或多种诸如乙醇的药物可接受的溶剂分子的分子复合物。当溶剂为水时使用术语“水合物”。

[0177] 在一个实施方案中,可以“前药”形式给予式I的化合物。短语“前药”是指经体内给药,通过一个或多个步骤或过程代谢或者另外转化为化合物的生物、药物或治疗活性形式的化合物。可通过以或者在常规操作中或者在体内将修饰断裂为本文描述的化合物的方式修饰化合物中存在的官能团制备前药。例如,前药包括当给予哺乳动物个体时,可将其中羟基、氨基或巯基基团结合任何基团的本发明的化合物断裂以分别形成游离羟基、游离氨基或游离巯基。代表性前药包括例如,本发明化合物中的醇和胺官能团的酰胺、酯、烯醇醚、烯醇酯、乙酸酯、甲酸酯、苯甲酸酯衍生物等。凭借体内药效学过程和药物代谢的知识,一旦已知药物活性化合物,本领域技术人员就能设计化合物的前药(参见例如,Nogrody (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach (药物化学A生物化学方法), Oxford University Press, New York, 第388-392页)。

[0178] 本文的组合物包含一种或多种本文提供的化合物。在一个实施方案中,将化合物配制成合适的药物制剂,例如用于口服给药的溶液剂、悬浮剂、片剂、可分散片剂、丸剂、胶囊剂、粉末剂、缓释制剂或酞剂或用于肠胃外给药的无菌溶液剂或悬浮剂形式以及透皮贴剂制剂和干粉吸入剂。在一个实施方案中,使用本领域熟知的技术和步骤将上述化合物配制成药物组合物(参见例如,Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms (药物剂型介绍), 第四版, 1985, 126)。

[0179] 在组合物中,将有效浓度的一种或多种化合物或其药物可接受的衍生物与合适的药物载体混合。如上所述,在配制前可将化合物衍生为相应的盐、酯、烯醇醚或酯、缩醛、缩酮、原酸酯、半缩醛、半缩酮、酸、碱、溶剂化物、水合物或前药。组合物中化合物的浓度是经给药,对于递送治疗、预防或改善一种或多种待治疗的疾病或病症的症状的量有效。

[0180] 在一个实施方案中,配制组合物用于单剂量给药。为了配制组合物,以有效浓度将重量分数的化合物溶解、悬浮、分散或另外混合在选择的载体中使得减轻、预防受治疗的疾病状态或者改善一种或多种症状。

[0181] 活性化合物以足以发挥治疗有用效果而对受治疗的患者没有不期望副作用的量包含在药物可接受的载体中。可通过在本文和PCT公开WO 04/018997中描述的体外和体内系统中测试化合物经验确定治疗有效浓度,然后由其推测用于人的剂量。

[0182] 药物组合物中活性化合物的浓度依赖活性化合物的吸收、灭活和排泄速率、化合物的物理化学特性、给药方案和给药量以及本领域技术人员已知的其他因素。

[0183] 在一个实施方案中,治疗有效剂量应该产生约0.1ng/mL至约50–100µg/mL的活性成分的血清浓度。在另一实施方案中,药物组合物应该提供约0.001mg至约2000mg的化合物每千克体重每天的剂量。制备药物单位剂型以提供约0.01mg、0.1mg或1mg至约500mg、1000mg或2000mg,并且在一个实施方案中约10mg至约500mg的活性成分或主要成分的组合每单位剂型。

[0184] 可以分钟、小时、天、周、月或年为间隔或在这些时间内连续发生给药。合适的剂量位于约0.1ng每千克体重至1g每千克体重每次给药的范围内。剂量优选为1µg至1g每千克体重每次给药,例如在1mg至1g每千克体重每次给药的范围内。适当地,剂量在1µg至500µg每千克体重每次给药,例如1µg至200mg每千克体重每次给药,或1µg至100mg每千克体重每次给药的范围内。其他合适的剂量可在1mg至250mg每千克体重,包括1mg至10、20、50或100mg每千克体重每次给药或10µg至100mg每千克体重每次给药的范围内。

[0185] 可由主治医生确定合适的剂量和给药方案并且可依赖受治疗的特殊疾病状态、疾病状态的严重程度以及个体的健康状况、年龄和体重。

[0186] 可一次给予活性成分,或者可分为多个较小剂量以根据一定时间间隔给予。应当理解,精确的剂量和治疗持续时间是受治疗的疾病的函数并且可使用已知试验方案经验确定或通过体内或体外试验数据推断。应当注意,浓度和剂量值还可随待减轻的疾病状态的严重程度变化。还应当理解,对于任何特定个体,应该根据个体需要和给予或管理组合物给药的人员的专业判断随时间调整特殊的给药方案,并且本文阐述的浓度范围仅为例示性的并且不意图限制要求保护的组合物的范围或实践。

[0187] 在其中化合物显示不充分溶解度的实例中,可使用溶解化合物的方法方法。这类方法是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于使用诸如二甲基亚砜(DMSO)的共溶剂,使用诸如TWEEN®的表面活性剂,在碳酸氢钠水溶液中溶解,配制纳米粒形式的感兴趣的化合物等。诸如化合物的前药的化合物的衍生物也可用于配制有效的药物组合物。

[0188] 在混合或添加化合物后,生成的混合物可为溶液、悬浮液、乳液等。生成的混合物的形式依赖许多因素,包括预期的给药方式和化合物在选择的载体或媒介中的溶解度。有效浓度足够用于减轻受治疗的疾病、病症或疾病状态的症状并且可经验确定。

[0189] 提供药物组合物用于以单位剂型向人和动物给药,所述单位剂型例如片剂、胶囊剂、丸剂、粉末剂、颗粒剂,无菌肠胃外溶液剂或悬浮剂和口服溶液剂或悬浮剂和包含合适量的化合物或其药物可接受的衍生物的水包油乳液。在一个实施方案中,以单位-剂型或多个剂型形式配制和给予药物治疗活性化合物及其衍生物。本文使用的单位剂型是指适用于人和动物个体的物理独立单位并且如本文领域已知的单独包装。各个单位剂量包含足以产

生期望的治疗效果的预定量的治疗活性化合物,结合需要的药物载体、媒介或稀释剂。单位剂型的实例包括安瓶和注射器以及单独包装的片剂或胶囊剂。可以其部分或倍数给予单位剂型。多剂型是待以分离的范围剂型给予的在单个容器中包装的多个相同的单位剂型。多剂型的实例包括小瓶、片剂或胶囊剂的瓶或品脱或加仑的瓶。因此,多剂型是包装不分离的多个单位剂量。

[0190] 制备这类剂型的实际方法是已知的,或者对于本领域技术人员是明显的;例如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学),Mack Publishing Company,Easton,Pa.,第15版,1975。

[0191] 可制备包含0.005%至100%(wt%)的活性成分,其他由无毒载体制备的剂型或组合物。用于制备这些组合物的方法是本领域技术人员已知的。预期的组合物可包含0.001%-100%(wt%)的活性成分,在一个实施方案中,0.1-95%(wt%),在另一实施方案中,75-85%(wt%)。

[0192] 给药方式

[0193] 方便的给药的方式包括注射(皮下注射、静脉内注射等)、口服给药、吸入、透皮应用、局部乳膏剂或凝胶剂或粉末剂、阴道或直肠给药。依赖给药途径,可使用材料包衣制剂和/或化合物以保护化合物免受酶、酸和其他自然条件的作用,其可灭活化合物的治疗活性。还可肠胃外或腹腔内给予化合物。

[0194] 用于口服给药的组合物

[0195] 口服药物剂型或者为固体、凝胶或液体。固体剂型为片剂、胶囊剂、颗粒剂和散粉末剂。口服片剂的类型包括压缩、咀嚼锭剂和肠衣、糖衣或膜衣的片剂。胶囊剂可为硬或软明胶胶囊剂,同时可结合本领域技术人员已知的其他成分以非泡腾或泡腾形式提供颗粒剂和粉末剂。

[0196] 用于口服给药的固体组合物

[0197] 在一些实施方案中,制剂为固体剂型,在一个实施方案中,胶囊剂或片剂。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可包含一种或多种下列成分,或者相似性质的化合物:粘结剂;润滑剂;稀释剂;助流剂;崩解剂;着色剂;甜味剂;调味剂;润湿剂;催吐剂包衣;和膜包衣。粘结剂的实例包括微晶纤维素、黄芪胶、葡萄糖溶液、阿拉伯树胶、明胶溶液、糖蜜、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、交聚维酮、蔗糖和淀粉糊。润滑剂包括滑石、淀粉、硬脂酸镁或钙、石松粉和硬脂酸。稀释剂包括例如,乳糖、蔗糖、淀粉、高岭土、盐、甘露醇和磷酸氢钙。助流剂包括但不限于胶体二氧化硅。崩解剂包括交联羧甲基纤维素钠、淀粉乙醇酸钠、海藻酸、玉米淀粉、土豆淀粉、膨润土、甲基纤维素、琼脂和羧甲基纤维素。着色剂包括例如,任何批准认证的水可溶的FD和C染料、其混合物;和悬浮在氧化铝水合物上的水不溶的FD和C染料。甜味剂包括蔗糖、乳糖、甘露醇和诸如糖精的人工甜味剂,和任何数量的喷雾干燥的调味剂。调味剂包括从诸如水果的植物中提取的天然调味剂和产生快感的化合物的合成混合物,其例如但不限于薄荷和水杨酸甲酯。润湿剂包括丙二醇单硬脂酸酯、单油酸脱水山梨糖醇酯,二乙二醇单月桂酸酯和聚氧乙烯月桂基醚。催吐剂包衣包括脂肪酸、脂肪、蜡、虫胶、氨化虫胶和邻苯二甲酸乙纤维素。膜包衣包括羟基乙基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙二醇4000和邻苯二甲酸乙纤维素。

[0198] 可在保护它免受胃的酸性环境的组合物中提供化合物或其药物可接受的衍生物。

例如,可以在胃中保持它的完整性并在肠内释放活性化合物的肠包衣形式配制组合物。还可结合抗酸剂或其他这类成分配制组合物。

[0199] 当单位剂型为胶囊剂时,除了上述类型的物质之外,它可包含诸如脂肪油的液体载体。此外,单位剂型可包含各种其他物质,其改变剂量单位的物理形式,例如,糖和其他肠溶剂的包衣。还可给予化合物作为酞剂、悬浮剂、糖浆剂、薄片剂、分散剂、口香糖等的组分。除了活性化合物之外,糖浆剂可包含蔗糖作为甜味剂和一些防腐剂、染料和着色剂和调味剂。

[0200] 还可将活性物质与不给予期望作用的其他活性物质或者与诸如抗酸剂,H<sub>2</sub>阻滞剂和利尿剂的补充期望作用的物质混合。活性成分是本文描述的化合物或其药物可接受的衍生物。可包含更高浓度,以活性成分的重量计多达约98%。

[0201] 在所有实施方案中,如本领域技术人员已知的,可将片剂和胶囊剂包衣以改变或维持活性成分的溶解。因此,例如,可使用诸如水杨酸苯酯、蜡和邻苯二甲酸乙酸纤维素的常规肠溶可消化包衣将它们包衣。

[0202] 用于口服给药的液体组合物

[0203] 液体口服剂型包括水性溶液剂、乳剂、悬浮剂、从非泡腾颗粒剂重组的溶液剂和/或悬浮剂和从泡腾颗粒剂重组的泡腾制剂。水性溶液剂包括例如,酞剂和糖浆剂。乳剂为水包油或油包水。

[0204] 例如,可通过在诸如水、盐水、葡萄糖水溶液、甘油、乙二醇、乙醇等的载体中溶解、分散或另外混合上述定义的活性化合物和任选的药物佐剂以由此形成溶液或悬浮液制备液体药物可给予的组合物。如果需要,待给予的药物组合物还可包含微量的诸如润湿剂、乳化剂、增溶剂、pH缓冲剂等无毒辅助物质,例如,乙酸盐、柠檬酸钠、环糊精衍生物、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺、乙酸钠、三乙醇胺油酸酯和其他这类试剂。

[0205] 酞剂为透明、变甜、水醇制剂。可用于酞剂的药物可接受的载体包括溶剂。糖浆剂为诸如蔗糖的糖的浓缩水溶液,并且可包含防腐剂。乳液是两相体系,其中一种液体以小球形式分散在另一液体中。可用于乳剂的药物可接受的载体为非水性液体、乳化剂和防腐剂。悬浮剂使用药物可接受的悬浮剂和防腐剂。可用于待重组为液体口服剂型的非泡腾颗粒剂的药物可接受的物质包括稀释剂、甜味剂和润湿剂。可用于待重组为液体口服剂型的泡腾颗粒剂的药物可接受的物质包括有机酸和二氧化碳源。着色剂和调味剂可用于所有上述剂型。

[0206] 溶剂包括甘油、山梨醇、乙醇和糖浆。防腐剂的实例包括甘油、甲基和丙基对羟基苯甲酸酯、苯甲酸、苯甲酸钠和醇。可用于乳剂的非水性液体的实例包括矿物油和棉籽油。乳化剂的实例包括明胶、阿拉伯树胶、黄芪胶、膨润土和诸如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯的表面活性剂。悬浮剂包括羧甲基纤维素钠、果胶、黄芪胶、硅酸镁铝和阿拉伯树胶。甜味剂包括蔗糖、糖浆剂、甘油和诸如糖精的人工甜味剂。润湿剂包括丙二醇单硬脂酸酯、脱水山梨糖醇单油酸酯、乙二醇单月桂酸酯和聚氧乙烯月桂基醚。有机酸包括柠檬酸和酒石酸。二氧化碳源包括碳酸氢钠和碳酸钠。着色剂包括任何批准认证的水可溶的FD和C染料及其混合物。调味剂包括从诸如水果的植物中提取的天然调味剂和产生愉快味觉的化合物的合成混合物。

[0207] 对于固体剂型,在一个实施方案中,将在例如碳酸丙烯酯、植物油或三酸甘油酯中

的溶液或悬浮液包装在明胶胶囊中。这类溶液及其制剂和包装在第4,328,245号、第4,409,239号和第4,410,545号美国专利中公开。对于液体剂型,例如,可使用对于给药容易测量的足够量的诸如水的药物可接受的液体载体稀释在聚乙二醇中的溶液。

[0208] 或者,可通过在植物油、乙二醇、三酸甘油酯、丙二醇酯(例如,碳酸丙烯酯)和其他这样的载体中溶解或分散活性化合物或盐,并且在硬或软明胶胶囊壳中包装这些溶液剂或悬浮剂制备液体或半固体口服制剂。其他有用的制剂包括在RE28,819和4,358,603美国专利中阐述的那些。简略地,这类制剂包括但不限于包含本文提供的化合物、二烷基化单-或多-亚烷基二醇的那些,包括但不限于1,2-二甲氧基甲烷、二甘醇二甲醚、三甘醇二甲醚、四甘醇二甲醚、聚乙二醇-350-二甲基醚、聚乙二醇-550-二甲基醚、聚乙二醇-750-二甲基醚,其中350、550和750是指聚乙二醇的近似平均分子量和一种或多种诸如丁基化羟基甲苯(BHT)、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、没食子酸丙酯、维生素E、氢醌、羟基香豆素、乙醇胺、卵磷脂、脑磷脂、抗坏血酸、苹果酸、山梨醇、磷酸、硫代二丙酸及其酯和二硫代氨基甲酸酯的抗氧化剂。

[0209] 其他制剂包括但不限于包括药物可接受的缩醛的水性醇溶液。可用于这些制剂的醇为具有一个或多个羟基的任何药物可接受的水可溶的溶剂,其包括但不限于丙二醇和乙醇。缩醛包括但不限于诸如乙醛二乙基缩醛的低级烷基醛的二(低级烷基)缩醛。

[0210] 注射剂、溶液剂和乳液

[0211] 在一个实施方案中,本文还包括特征为或者皮下注射、肌肉注射或者静脉内注射的注射的肠胃外给药。可以常规形式制备注射剂,或者以液体溶液剂或悬浮剂形式、在注射之前的适用于液体形式的溶液或悬浮液的固体形式或者以乳剂形式。注射剂、溶液剂和乳剂还包含一种或多种赋形剂。合适的赋形剂为例如,水、盐水、葡萄糖、甘油或乙醇。此外,如果需要,待给药的药物组合物还可包含诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解增强剂的微量无毒辅助物质和诸如例如,乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯和环糊精的其他这样的试剂。

[0212] 在本文也包括移植缓释或持续释放系统以便保持恒定水平的剂量(参见例如,第3,710,795号美国专利)。简略地,将本文提供的化合物分散在固体内部基质中,例如,聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸丁酯、增塑或未增塑聚氯乙烯、增塑尼龙、增塑聚对苯二甲酸乙二醇酯、天然橡胶、聚异戊二烯、聚异丁烯、聚丁二烯、聚乙烯、乙烯-醋酸乙烯酯共聚物、硅橡胶、聚二甲基硅氧烷、碳酸硅共聚物、诸如丙烯酸和甲基丙烯酸的酯的水凝胶的亲水聚合物、胶原、交联聚乙烯醇和交联部分水解聚醋酸乙烯酯,被外部聚合物膜包围,例如,聚乙烯、聚丙烯、乙烯/丙烯共聚物、乙烯/丙烯酸乙酯共聚物、乙烯/醋酸乙烯酯共聚物、硅橡胶、聚二甲基硅氧烷、氯丁橡胶、氯化聚乙烯、聚氯乙烯、氟乙烯共聚物与醋酸乙烯酯、偏二氯乙烯、乙烯和丙烯、离聚物聚对苯二甲酸乙二醇酯、丁基橡胶表氯醇橡胶、乙烯/乙烯醇共聚物、乙烯/醋酸乙烯酯/乙烯醇三聚物和乙烯/乙烯基氧基乙醇共聚物,其在体液中不溶。化合物在释放速率控制步骤中扩散在外部聚合物膜中。在这种肠胃外组合物中包含的活性化合物的百分比高度依赖其特殊性质以及化合物的活性和个体的需要。

[0213] 组合物的肠胃外给药包括静脉内注射、皮下注射和肌肉注射给药。用于肠胃外给药的制剂包括准备用于注射的无菌溶液剂,诸如冻干粉剂的无菌干燥可溶产物,准备在使用前与溶剂混合,包括皮下注射片剂、准备用于注射的无菌悬浮剂、准备在使用前与媒介混

合的无菌干燥不溶产物和无菌乳剂。溶液剂可为水性或非水性的。

[0214] 如果静脉注射给药,合适的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)和诸如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇及其混合物的包含增稠剂和增溶剂的溶液。

[0215] 可用于肠胃外制剂的药物可接受的载体包括水性媒介、无水媒介、抗菌剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮剂和分散剂、乳化剂、掩蔽剂或螯合剂以及其他药物可接受的物质。

[0216] 水性媒介的实例包括氯化钠注射剂、林格氏注射剂、等渗葡萄糖注射剂、无菌水注射剂、葡萄糖和乳酸林格氏注射剂。无水肠胃外媒介包括植物源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油和花生油。必须将抑菌或抑真菌浓度的抗菌剂加入至包装在多剂量容器中的肠胃外制剂,其包含酚类或甲酚、汞剂、苜醇、氯丁醇、甲基和丙基对羟基苯甲酸酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苜索氯铵。等渗剂包括氯化钠和葡萄糖。缓冲剂包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因。悬浮剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯80(TWEEN® 80)。金属离子的掩蔽剂或螯合剂包括EDTA。药物载体还包括乙醇、聚乙二醇和丙二醇用于水可溶的媒介;和氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸用于pH调节。

[0217] 调整药物活性化合物的浓度使得注射提供有效量以产生期望的药理学效果。如本领域已知的,精确剂量依赖患者或动物的年龄、体重和疾病状态。

[0218] 使用针将单位剂量肠胃外制剂包装在安瓶、小瓶或注射器中。所有用于肠胃外给药的制剂必需为无菌的,如本领域已知和实践的。

[0219] 例示性地,包含活性化合物的无菌水溶液的静脉内注射或动脉内输注是有效的给药方式。另一实施方案是根据需要注射的包含活性物质的无菌水性或油性溶液或悬浮液以产生期望的药理学效果。

[0220] 设计注射剂用于局部和全身给药。在一个实施方案中,配制治疗有效剂量以包含至少约0.1%w/w多达至约90%w/w或更多的浓度,在一些实施方案中大于1%w/w的活性化合物至受治疗的组织。

[0221] 可将化合物悬浮在微粒化或其他合适的形式或者可将其衍生化以产生更多可溶的活性产物或产生前药。生成的混合物的形式依赖许多因素,包括预期的给药方式和化合物在选择载体或媒介中的溶解度。有效浓度对于减轻疾病状态的症状是足够的并且可经实验确定。

[0222] 冻干粉剂

[0223] 本文感兴趣的也是冻干粉剂,可将其重组用于以溶液剂、乳剂和其他混合物形式给药。还可将它们重组并且配制成固体或凝胶。

[0224] 通过在合适的溶剂中溶解本文提供的化合物或其药物可接受的衍生物制备无菌、冻干粉剂。溶剂可包含改善粉末或从粉末制备的重组溶液的稳定性或其他药理学组成的赋形剂。可使用的赋形剂包括但不限于葡萄糖、山梨醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他合适的试剂。溶剂还可包含缓冲剂,诸如柠檬酸盐、钠或钾磷酸盐或本领域技术人员已知的其他这类缓冲剂,在一个实施方案中,约中性pH。随后溶液的无菌过滤,随后在本领域技术人员已知的标准条件下冻干提供期望的制剂。在一个实施方案中,将生成的溶液分配在小瓶中用于冻干。各个小瓶包含单剂量或多剂量的化合物。可在诸如在约4℃

至室温下的合适条件下储存冻干粉剂。

[0225] 使用注射用水重组该冻干粉剂提供可用于肠胃外给药的制剂。为了重组,将冻干粉剂加入至无菌水或其他合适的载体。精确量依赖选择的化合物。可经验确定这样的量。

[0226] 局部给药

[0227] 按照描述制备局部混合物用于局部和全身给药。生成的混合物可为溶液、悬浮液、乳剂等并且被配制为乳膏剂、凝胶剂、软膏剂、乳剂、溶液剂,酞剂、洗剂、悬浮剂、酞剂、糊剂、泡沫剂、气雾剂、灌溉剂、喷雾剂、栓剂、绷带、皮肤贴剂或适用于局部给药的任何其他制剂。

[0228] 可将化合物或其药物可接受的衍生物配制为用于诸如通过吸入的局部应用的气雾剂(参见例如,第4,044,126号、第4,414,209号和第4,364,923号美国专利,其描述用于递送可用于治疗炎症性疾病,特别是哮喘的类固醇的气雾剂)。用于向呼吸道给药的这些制剂可为用于喷雾器的气雾剂或溶液剂形式,或者为用于吹气法的超细粉末,单独地或结合诸如乳糖的惰性载体。在这种情况下,在一个实施方案中,制剂的颗粒具有小于50微米的直径,在一个实施方案中小于10微米。

[0229] 可配制化合物用于外部或局部应用,例如用于以凝胶剂、乳膏剂和洗剂形式局部应用于皮肤和诸如眼睛中的粘膜,并且用于应用于眼睛或用于脑池内或脊柱内应用。局部给药预期用于透皮递送并且还用于给予眼睛或粘膜,或用于吸入治疗。还可给予单独地或结合其他药物可接受的赋形剂的活性化合物的鼻溶液剂。

[0230] 可使用合适的盐将这些溶液剂,特别意图用于眼睛使用的那些配制成0.01%–10% (vol%)等渗溶液剂,pH约5–7。

[0231] 用于其他给药途径的组合物

[0232] 在本文还包括诸如透皮贴剂的其他给药途径,包括离子电渗疗法和电泳装置和直肠给药。

[0233] 包括离子电渗疗法和电泳装置的透皮贴剂是本领域技术人员熟知的。例如,这类贴剂在第6,267,983号、第6,261,595号、第6,256,533号、第6,167,301号、第6,024,975号、第6,010715号、第5,985,317号、第5,983,134号、第5,948,433号和第5,860,957号美国专利中公开。

[0234] 例如,用于直肠给药的药物剂型为直肠栓剂、胶囊剂和用于全身作用的片剂。在本文使用直肠栓剂是指用于插入直肠的固体,其在体温下融化或软化释放一种或多种药理学或治疗活性成分。可用于直肠栓剂的药物可接受的物质为提高熔点的基质或媒介和试剂。基质的实例包括可可脂(可可油)、甘油-明胶、聚乙二醇(聚氧乙二醇)和脂肪酸的单-、二-和三酸甘油酯的合适的混合物。可使用各种基质的组合。提高栓剂熔点的试剂包括鲸蜡和蜡。可通过压缩方法或通过模制制备直肠栓剂。在一个实施方案中,直肠栓剂的重量为约2至3gm。

[0235] 使用相同的药物可接受的物质和通过与用于口服给药的配制相同的方法制备用于直肠给药的片剂和胶囊剂。

[0236] 靶向制剂

[0237] 还可配制本文提供的化合物或其药物可接受的衍生物靶向特定组织、受体或受治疗个体的身体的其他部位。许多这种靶向方法是本领域技术人员熟知的。在本文包括所有

这类靶向方法用于在即时组合物中使用。对于靶向方法的非限制性实例,参见例如,第6,316,652号、第6,274,552号、第6,271,359号、第6,253,872号、第6,139,865号、第6,131,570号、第6,120,751号、第6,071,495号、第6,060,082号、第6,048,736号、第6,039,975号、第6,004,534号、第5,985,307号、第5,972,366号、第5,900,252号、第5,840,674号、第5,759,542号和第5,709,874号美国专利。

[0238] 在一个实施方案中,脂质体悬浮剂,包括诸如肿瘤靶向脂质体的组织靶向脂质体也可适用作药物可接受的载体。可根据本领域技术人员已知的方法制备这些。例如,可根据第4,522,811号美国专利中描述的制备脂质体制剂。简略地,可通过在烧瓶内干燥蛋磷脂酰胆碱和脑磷脂酰丝氨酸(7:3摩尔比)形成诸如多层囊泡(MLV's)的脂质体。加入在没有二价阳离子(PBS)的磷酸盐缓冲盐水中的本文提供的化合物的溶液并且烧瓶摇动直至脂质膜分散。洗涤生成的囊泡以去除未包装的化合物,通过离心制粒,然后再悬浮于PBS。

[0239] 与其他药物共同给药

[0240] 根据本发明的另一方面,预期可将本文描述的化合物结合本领域技术人员认为是用于感兴趣的疾病状态的目前护理标准的药物给予有此需要的个体。这类组合向个体提供一种或多种优点,例如,需要减少的剂量以获得相似受益、在较少时间内获得期望的姑息性影响等。

[0241] 可与其他药物一起给予本发明的化合物作为治疗方案的一部分。可期望地给予活性化合物的组合,例如,为了治疗特殊疾病或疾病状态的目的。因此,可以适用于组合物的共同给药的试剂盒形式组合两种或多种药物组合物,其中的至少一种包含本发明的式(I)化合物在本发明的范围内。

[0242] 在本发明方法的一个实施方案中,可与第二治疗剂一起给予式I的化合物。在一个实施方案中,第二治疗剂选自抗癌剂、抗炎剂、抗高血压剂、抗纤维化试剂、抗血管生成剂、抗糖尿病剂和免疫抑制剂。

[0243] 当共同给予两种或多种活性成分时,可同时、相继或单独给予活性成分。在一个实施方案中,与第二治疗剂同时共同给予式I的化合物。在另一实施方案中,相继给予式I的化合物和第二治疗剂。在其他实施方案中,单独给予式I的化合物和第二治疗剂。

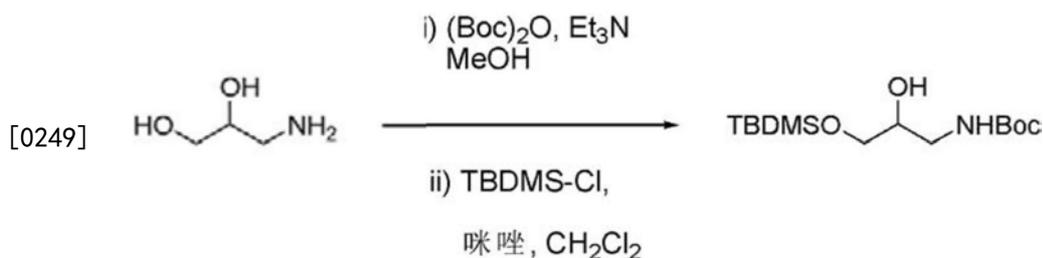
[0244] 现在,参考下列非限制性实施例更详细地描述本发明。实施例预期用以例示本发明并且不应被解释为限制遍及该说明书的描述的公开内容的一般性。

[0245] 实施例1

[0246] 合成子2-(溴甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯和2-(溴甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(E)-叔丁基酯的制备

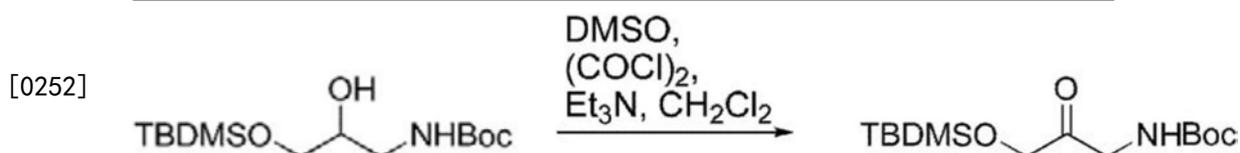


[0248] 3-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)-2-羟基丙基氨基甲酸叔丁基酯的制备



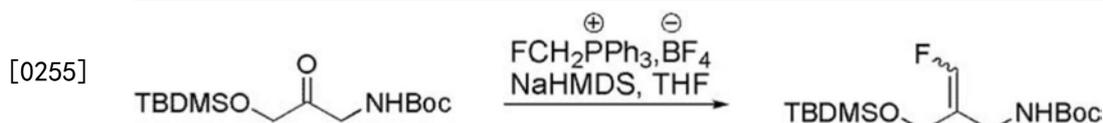
[0250] 在室温下向搅拌的3-氨基-1,2-丙二醇(10.0g, 0.11mol) and三乙胺(23mL, 0.17mol)的MeOH(200mL)溶液加入二碳酸二叔丁基酯(26.4g, 0.12mol)。使生成的溶液搅拌过夜。将反应混合物在减压下浓缩,然后与甲苯共蒸发以去除所有MeOH。在 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中后处理粗剩余物,在冷却至 $0^\circ\text{C}$ 后,相继加入咪唑和叔丁基-(氯)二甲基硅烷。使生成的混合物在该温度下搅拌2h。将反应混合物在水(100mL)和 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (70mL)之间分层并使用另外的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ( $2 \times 70\text{mL}$ )萃取水层。在 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上干燥合并的有机物并真空浓缩。在使用正己烷随后是10%乙酸乙酯的己烷洗脱的硅胶上纯化粗剩余物以提供无色油状物形式的3-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)-2-羟基丙基氨基甲酸叔丁基酯(32.6g, 97.3%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ppm: 0.09(6H, s), 0.91(9H, s), 1.46(9H, s), 2.86(1H, br d, J 4.2Hz), 3.13(1H, ddd, J 14.1, 6.7, 5.3Hz), 3.30-3.43(1H, m), 3.54(1H, dd, J 10.1, 6.2Hz), 3.66(1H, dd, J 10.1, 4.5Hz), 3.70-3.80(1H, m), 4.98(1H, br s)。

[0251] 3-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)-2-氧基丙基氨基甲酸叔丁基酯的制备



[0253] 在 $\text{N}_2$ 下,在 $-78^\circ\text{C}$ 下,在30min内向搅拌的草酰氯(13.6mL, 0.16mol)的干燥的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (150mL)溶液滴加DMSO(15.2mL, 0.21mol)。在完成加入后,将生成的溶液在 $-78^\circ\text{C}$ 下搅拌1h。然后,在20min内滴加3-(叔丁基二甲基-甲硅烷基氧基)-2-羟基丙基氨基甲酸叔丁基酯(32.6g, 0.11mol)的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50mL)溶液。继续搅拌另外1小时,在此时加入三乙胺(59.6mL, 0.43mol)。去除冷却浴并使反应混合物升温至室温。在水(100mL)和 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (70mL)之间将反应混合物分层并使用另外的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ( $2 \times 70\text{mL}$ )萃取水层;在 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上干燥合并的有机物并在氮气流下浓缩。在使用5%乙酸乙酯的正己烷洗脱的硅胶上纯化粗剩余物以提供淡黄色油状物形式的3-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)-2-氧基丙基氨基甲酸叔丁基酯(29.8g, 92%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ppm: 0.11(6H, s), 0.94(9H, s), 1.47(9H, s), 3.92(2H, s), 4.26(2H, d, J 4.6Hz), 5.22(1H, br s)。

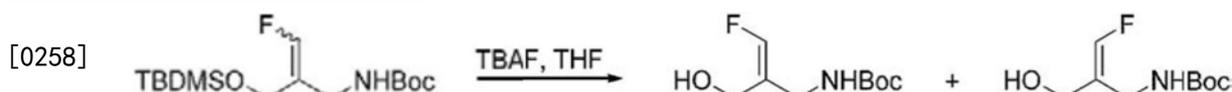
[0254] 2-((叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸叔丁基酯的制备



[0256] 在 $\text{N}_2$ 下,在 $-20^\circ\text{C}$ 下,在10min内向剧烈搅拌的氟甲基(三苯基)-膦四氟硼酸盐(18.9g, 49.4mmol)的干燥的THF(190mL)悬浮液缓慢加入钠双(三甲基甲硅烷基)酰胺(1.0M的THF; 49.4mL, 49.4mmol)。使生成的深橙色溶液在该温度下搅拌15min。然后,在10min内缓慢加入3-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)-2-氧基丙基氨基甲酸叔丁基酯(10.0g, 33.0mmol)

的THF (10mL) 溶液。在完成加入后,继续搅拌另外1h,在此期间使反应缓慢升温至室温。通过加入水 (5mL) 淬灭反应并将反应混合物真空浓缩。在水 (100mL) 和乙醚 (100mL) 之间将剩余物分层并使用另外的乙醚 (2×100ml) 萃取水层。在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥合并的有机物并在减压下浓缩。在使用正己烷随后是6%乙酸乙酯的正己烷洗脱的硅胶上纯化粗剩余物以提供E/Z双键异构体混合物形式的2-((叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸叔丁基酯 (E/Z=1:1;9.9g,94%)。异构体在该阶段未分离。

[0257] 3-氟-2-(羟基甲基)烯丙基氨基甲酸(E)-叔丁基酯和3-氟-2-(羟基甲基)烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯的制备

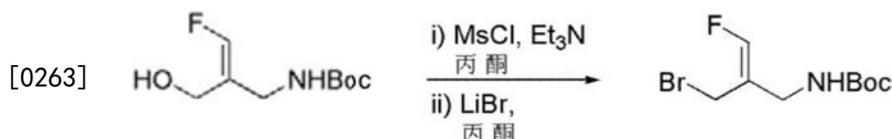


[0259] 在室温下,向搅拌的2-((叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸叔丁基酯 (E/Z=1:1;12.0g,37.6mmol) 的THF (30mL) 溶液加入TBAF (1.0M的THF;45.1mL,45.1mmol)。使生成的溶液搅拌30min。将反应混合物在水 (70mL) 和乙酸乙酯 (50mL) 之间分层。使用乙酸乙酯 (50mL) 萃取水层并使用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (70mL),随后是盐水 (70mL) 洗涤合并的有机物。在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥后,真空浓缩有机物。在使用20%乙酸乙酯和5%THF的正己烷洗脱的硅胶上纯化粗物质提供3-氟-2-(羟基甲基)-烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯 (0.5g,6.5%)、3-氟-2-(羟基甲基)烯丙基氨基甲酸(E)-叔丁基酯 (1.2g,15.6%) 和E/Z异构体的混合物 (5.5g,71.4%)。

[0260] 3-氟-2-(羟基甲基)烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯:<sup>1</sup>H-NMR (300MHz;CDCl<sub>3</sub>) δppm: 1.46 (9H,s), 3.41 (1H,br s), 3.74 (2H,dd,J 6.5,3.1Hz), 4.28 (2H,dd,J 6.0,2.3Hz), 4.87 (1H,br s), 6.53 (1H,dd,J 83.5Hz)。

[0261] 3-氟-2-(羟基甲基)烯丙基氨基甲酸(E)-叔丁基酯:<sup>1</sup>H-NMR (300MHz;CDCl<sub>3</sub>) δppm: 1.47 (9H,s), 3.78 (1H,t,J 6.4Hz), 3.93-4.02 (4H,m), 4.94 (1H,br s), 6.63 (1H,d,J 83.6Hz)。

[0262] 2-(溴甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯的制备



[0264] 在N<sub>2</sub>下,在0℃下,向搅拌的3-氟-2-(羟基甲基)-烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯 (0.50g,2.44mmol) 的丙酮 (15mL) 溶液相继加入三乙胺 (0.51mL,3.65mmol) 和甲烷磺酰基氯 (0.23mL,2.92mmol)。将生成的混合物在该温度下搅拌30min。将反应混合物过滤以去除沉淀的盐并使用另外的丙酮 (10mL) 洗涤滤饼。使滤液填充溴化锂 (1.06g,12.18mmol) 并将生成的悬浮液在室温下搅拌1h。将反应混合物在水 (25mL) 和乙酸乙酯 (25mL) 之间分层并使用另外的乙酸乙酯 (25mL) 萃取水层。使用盐水 (25mL) 洗涤合并的有机物,在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥并真空浓缩以提供淡黄色油状物形式的2-(溴甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯 (0.63g,96%)。<sup>1</sup>H-NMR (300MHz;CDCl<sub>3</sub>) δppm: 1.47 (9H,s), 3.80 (2H,br s), 4.09 (2H,d,J 2.6Hz), 4.75 (1H,br s), 6.65 (1H,d,J 81.9Hz)。

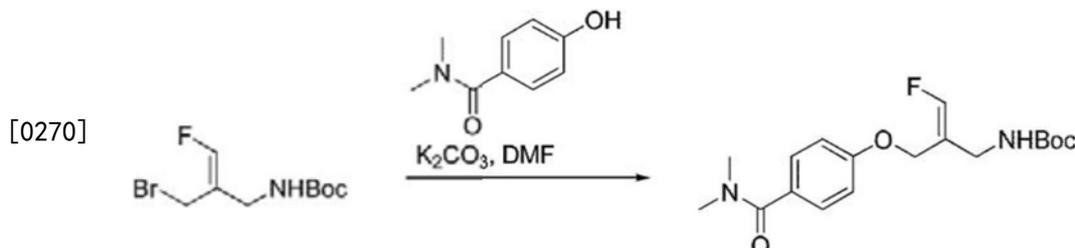
[0265] 2-(溴甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(E)-叔丁基酯的制备



[0267] 在N<sub>2</sub>下,在0℃下,向搅拌的3-氟-2-(羟基甲基)-烯丙基氨基甲酸(E)-叔丁基酯(1.20g,5.85mmol)的丙酮(205mL)溶液相继加入三乙胺(1.22mL,8.77mmol)和甲烷磺酰基氯(0.54mL,7.02mmol)。将生成的混合物在该温度下搅拌30min。将反应混合物过滤以去除沉淀的盐并使用另外的丙酮(10mL)洗涤滤饼。使滤液填充溴化锂(2.54g,29.24mmol)并将生成的悬浮液在室温下搅拌1h。将反应混合物在水(25mL)和乙酸乙酯(25mL)之间分层并使用另外的乙酸乙酯(25mL)萃取水层。使用盐水(25mL)洗涤合并的有机物,在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥并真空浓缩以提供淡黄色油状物形式的2-(溴甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(E)-叔丁基酯(1.46g,93%)。<sup>1</sup>H-NMR(300MHz;CDCl<sub>3</sub>) δppm:1.47(9H,s),3.97(2H,dd,J 3.5,0.7Hz),4.02(2H,br d,J 6.1Hz),4.78(1H,br s),6.79(1H,d,J 81.1Hz)。

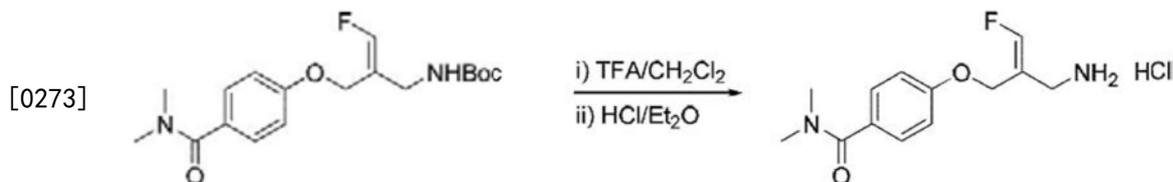
[0268] 实施例2

[0269] 步骤A:2-((4-(二甲基氨基甲酰基)苯氧基)-甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯的制备



[0271] 在N<sub>2</sub>下,在室温下,向剧烈搅拌的2-(溴甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯(430.0mg,1.60mmol)和碳酸钾(332.5mg,2.41mmol)的干燥的DMF(2.0mL)悬浮液加入4-羟基-N,N-二甲基苯甲酰胺(291.4mg,1.76mmol)。将生成的混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物在水(40mL)和乙酸乙酯(20mL)之间分层并使用另外的乙酸乙酯(2×20mL)萃取水层。使用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(40mL)、盐水(40mL)洗涤合并的有机物,在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥并在减压下浓缩。在使用60%乙酸乙酯的正己烷随后是75%乙酸乙酯的正己烷洗脱的硅胶上纯化粗物质提供无色油状物形式的2-((4-(二甲基氨基甲酰基)苯氧基)甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯(520.0mg,92%)。<sup>1</sup>H-NMR(300MHz;CDCl<sub>3</sub>) δppm:1.44(9H,s),3.07(6H,br s),3.78(2H,br s),4.74(2H,dd,J 2.7,0.8Hz),4.80(1H,br s),6.75(1H,d,J 82.7Hz),6.95(2H,d,J 8.9Hz),7.42(2H,d,J 8.8Hz)。

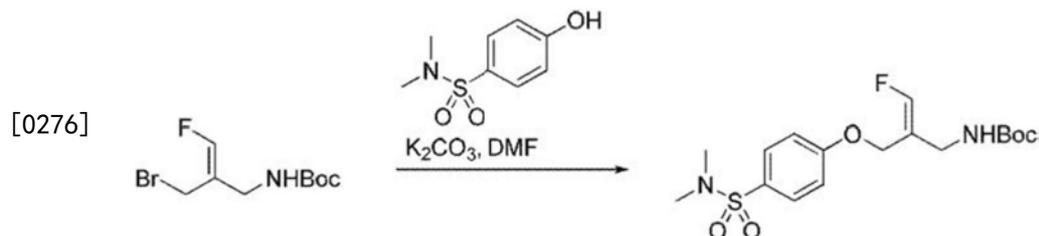
[0272] 步骤B: (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基-苯甲酰胺盐酸盐(化合物18)的制备



[0274] 在室温下,向搅拌的2-((4-(二甲基氨基甲酰基)-苯氧基)甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯(520.0mg,1.48mmol)的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(8.0mL)溶液加入三氟乙酸(2.0mL)。将生

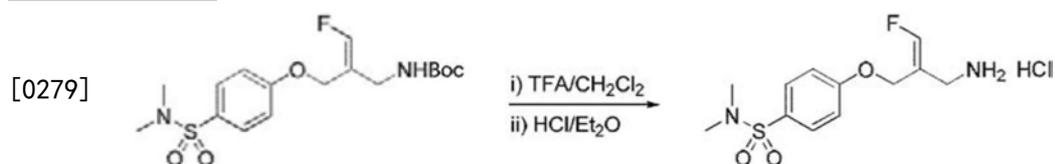
成的混合物在室温下搅拌30min。真空去除所有挥发物并将剩余物与CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×20mL) 共蒸发以去除三氟乙酸。在乙酸乙酯 (3.0mL) 中后处理生成的油, 然后加入含醚的HCl (2.0M的乙醚; 1.0mL, 2.0mmol)。将形成的沉淀分离并在减压下干燥以提供淡黄色固体形式的 (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯磺酰胺盐酸盐 (301mg, 71%); m. p. = 135-137°C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; MeOD) δppm: 3.06 (3H, br s), 3.10 (3H, br s), 3.71 (2H, d, J 3.0Hz), 4.88 (2H, dd, J 2.8, 0.8Hz), 7.11 (2H, d, J 8.9Hz), 7.13 (1H, d, J 80.8Hz), 7.45 (2H, d, J 8.9Hz)。

[0275] 步骤C: 2-((4-(N,N-二甲基氨磺酰基)苯氧基)甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯的制备



[0277] 在N<sub>2</sub>下, 在室温下, 向剧烈搅拌的2-(溴甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯 (232.0mg, 0.87mmol) 的干燥的DMF (2.0mL) 悬浮液相继加入碳酸钾 (300.0mg, 2.16mmol) 和4-羟基-N,N-二甲基苯磺酰胺 (174.0mg, 0.87mmol)。使生成的悬浮液在室温下搅拌2h。将反应混合物在饱和水溶液NH<sub>4</sub>Cl (40mL) 和乙酸乙酯 (20mL) 之间分层并使用另外的乙酸乙酯 (20mL) 萃取水层。在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥合并的有机物并在减压下浓缩。在使用50%乙酸乙酯的正己烷洗脱的硅胶上纯化粗物质提供无色油状物形式的2-((4-(N,N-二甲基氨磺酰基)苯氧基)甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯 (279.0mg, 83%)。<sup>1</sup>H-NMR (300MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1.42 (9H, s), 2.69 (6H, s), 3.79 (2H, br s), 4.76 (2H, d, J 2.7Hz), 4.81 (1H, br s), 6.76 (1H, d, J 82.6Hz), 7.04 (2H, d, J 8.9Hz), 7.72 (2H, d, J 9.0Hz)。

[0278] 步骤D: (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基-苯磺酰胺盐酸盐(化合物10)的制备

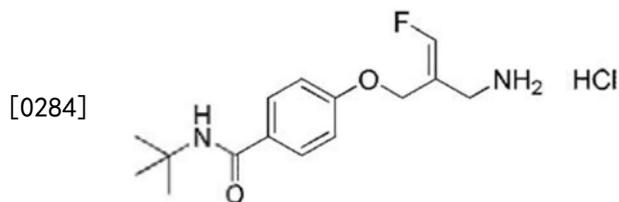


[0280] 在室温下, 向搅拌的2-((4-(N,N-二甲基氨磺酰基)苯氧基)甲基)-3-氟烯丙基氨基甲酸(Z)-叔丁基酯 (279.0mg, 0.72mmol) 的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0mL) 溶液加入三氟乙酸 (1.0mL)。将生成的混合物在室温下搅拌30min。真空去除所有挥发物并将剩余物与CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×20mL) 共蒸发。在乙酸乙酯/MeOH (5:1; 3.0mL) 中后处理生成的油, 然后加入含醚HCl (2.0M的乙醚; 0.5mL, 1.0mmol)。将形成的沉淀分离并在减压下干燥以提供白色固体形式的 (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯磺酰胺盐酸盐 (196.0mg, 84%); m. p. 185-187°C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; d<sub>6</sub>-DMSO) δppm: 3.39 (6H, br s), 3.54 (2H, br s), 4.81 (2H, d, J 2.3Hz), 7.16 (2H, d, J 9.0Hz), 7.24 (1H, d, J 82.3Hz), 7.25 (2H, br s), 7.77 (2H, d, J 9.0Hz)。

[0281] 实施例3

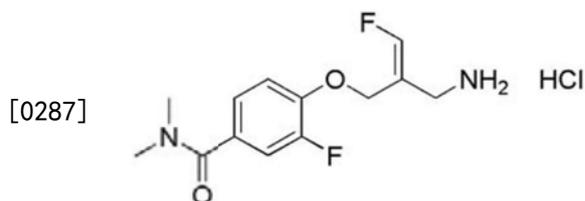
[0282] 根据实施例2中阐述的步骤A和B制备下列化合物。

[0283] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基苯甲酰胺盐酸盐(化合物1):



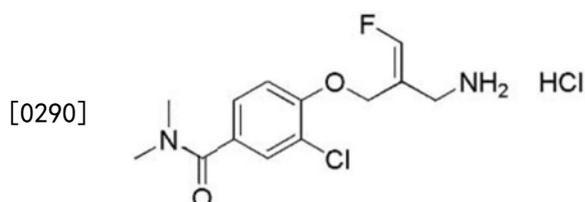
[0285] 米黄色固体;m.p.180-184°C;<sup>1</sup>H-NMR(300MHz;CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>ppm</sub>:1.45(9H,s),3.70(2H,d,J 2.2Hz),4.86(2H,dd,J 2.9,0.7Hz),7.06(2H,d,J 9.0Hz),7.13(1H,d,J 80.9Hz),7.76(2H,d,J 8.9Hz)。

[0286] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-3-氟-N,N-二甲基-苯甲酰胺盐酸盐(化合物4):



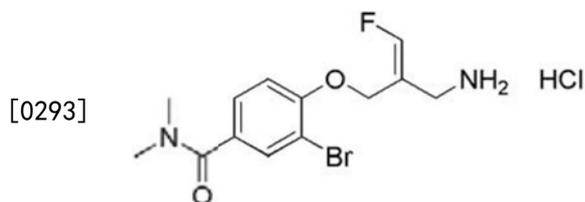
[0288] 褐色固体;<sup>1</sup>H-NMR(300MHz;CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>ppm</sub>:3.04(3H,br s),3.09(3H,br s),3.73(2H,d,J 2.4Hz),4.93(2H,dd,J 2.9,0.8Hz),7.16(1H,d,J 90.0Hz),7.25-7.29(2H,m)。

[0289] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-3-氯-N,N-二甲基-苯甲酰胺盐酸盐(化合物6):



[0291] 褐色固体;<sup>1</sup>H-NMR(300MHz;CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>ppm</sub>:3.04(3H,br s),3.09(3H,br s),3.76(2H,d,J 2.3Hz),4.96(2H,dd,J 2.8,0.9Hz),7.16(1H,d,80.6Hz),7.26(1H,d,J 8.6Hz),7.43(1H,dd,J 8.5,2.1Hz),7.55(1H,d,J 2.0Hz)。

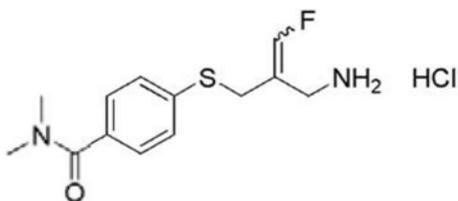
[0292] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-3-溴-N,N-二甲基-苯甲酰胺盐酸盐(化合物20):



[0294] 米黄色固体;m.p.54-57°C;<sup>1</sup>H-NMR(300MHz;CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>ppm</sub>:3.04(3H,br s),3.09(3H,br s),3.78(2H,d,J 2.4Hz),4.95(2H,dd,J 2.9,0.9Hz),7.15(1H,d,J 80.5Hz),7.22(1H,d,J 8.5Hz),7.47(1H,dd,J 8.5,2.1Hz),7.71(1H,d,J 2.0Hz)。

[0295] E和Z异构体的混合物形式的4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙基硫代)-N,N-二甲基苯甲酰胺盐酸盐(化合物8E和8Z):

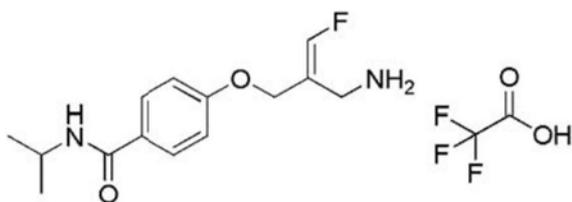
[0296]



[0297] 无色固体;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{ppm}}$ : 2.99 (3H, br s), 3.00 (3H, br s), 3.10 (6H, br s), 3.64 (2H, d, J 3.0Hz), 3.71 (2H, dd, J 3.1, 1.1Hz), 3.77 (2H, d, J 1.0Hz), 3.87 (2H, dd, J 2.1, 0.8Hz), 6.82 (1H, d, J 82.1Hz), 6.93 (1H, d, J 81.6Hz), 7.38 (2H, d, J 8.6Hz), 7.41 (2H, d, J 8.6Hz), 7.48 (2H, d, J 8.6Hz), 7.49 (2H, d, J 8.3Hz)。

[0298] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-异丙基苯甲酰胺三氟乙酸盐(化合物39):

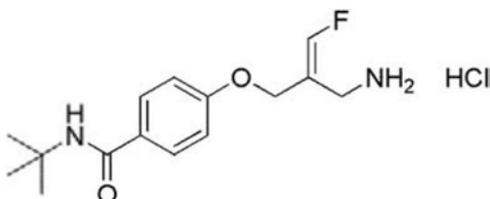
[0299]



[0300] 黄色胶状物;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz;  $d_6\text{-DMSO}$ )  $\delta_{\text{ppm}}$ : 1.13 (6H, d, J 6.9Hz), 3.58 (2H, d, J 5.1Hz), 4.05 (1H, septet, J 6.6Hz), 4.65 (2H, d, J 3.6Hz), 7.02 (2H, d, J 6.9Hz), 7.32 (1H, d, J 81.9Hz), 7.82 (2H, d, J 6.9Hz), 8.07 (1H, d, J 7.5Hz), 8.18 (3H, br s)。

[0301] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-叔丁基苯甲酰胺盐酸盐(化合物23):

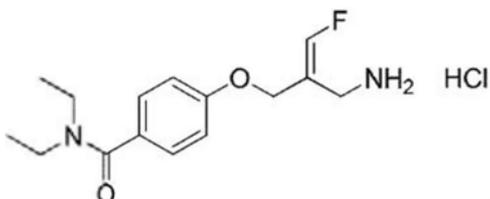
[0302]



[0303] 无色粉末; m.p. 140-142°C;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz;  $d_6\text{-DMSO}$ )  $\delta_{\text{ppm}}$ : 1.37 (9H, s), 3.60 (2H, d, J 3.9Hz), 4.68 (2H, d, J 3.6Hz), 7.02 (2H, d, J 6.9Hz), 7.34 (1H, d, J 82.5Hz), 7.61 (1H, s), 7.81 (2H, d, J 6.9Hz), 8.28 (3H, br s)。

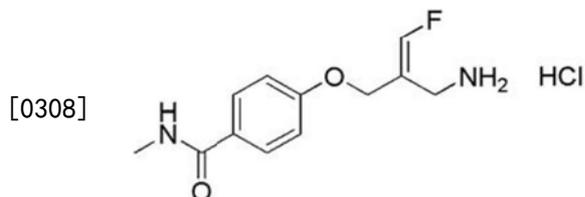
[0304] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二乙基苯甲酰胺盐酸盐(化合物24):

[0305]



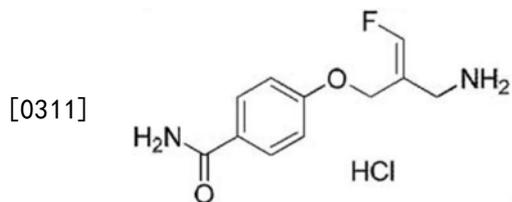
[0306] 褐色固体;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{ppm}}$ : 1.18 (3H, br s), 1.25 (3H, br s), 3.37 (2H, br s), 3.56 (2H, br s), 3.83 (2H, s), 4.68 (2H, d, J 3.5Hz), 7.12 (2H, d, J 8.6Hz), 7.40 (2H, d, J 8.7Hz)。

[0307] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-甲基苯甲酰胺盐酸盐(化合物25):



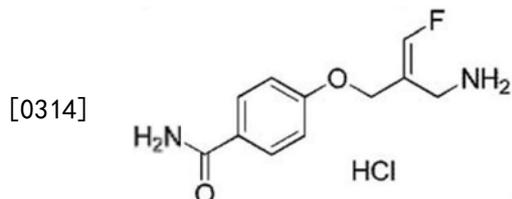
[0309] 无色固体; m.p. 203-205 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>ppm</sub>: 2.90 (3H, s), 3.83 (2H, d, J 1.8Hz), 4.67 (2H, dd, J 3.7, 0.8Hz), 7.07 (2H, d, J 9.0Hz), 7.24 (1H, d, J 81.2Hz), 7.81 (2H, d, J 9.0Hz)。

[0310] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)苯甲酰胺盐酸盐(化合物2):



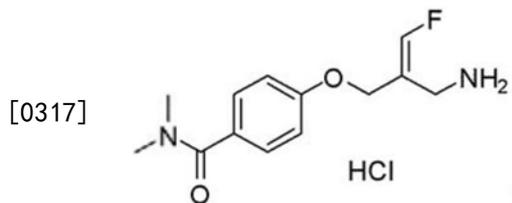
[0312] 无色固体; m.p. 195-198 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; MeOD) δ<sub>ppm</sub>: 3.72 (2H, d, J 2.2Hz), 4.90 (2H, dd, J 2.9, 0.8Hz), 7.11 (2H, d, J 9.0Hz), 7.14 (1H, d, J 80.8Hz), 7.90 (2H, d, J 9.0Hz)。

[0313] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)苯甲酰胺盐酸盐(化合物3):



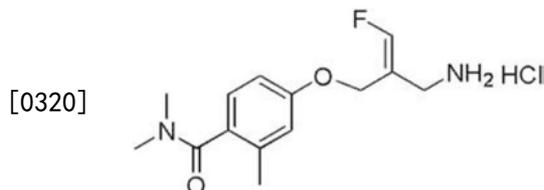
[0315] 无色固体; m.p. 225-228 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; MeOD) δ<sub>ppm</sub>: 3.85 (2H, s), 4.70 (2H, dd, J 3.6, 1.0Hz), 7.10 (2H, d, J 9.0Hz), 7.26 (1H, d, J 81.2Hz), 7.90 (2H, d, J 9.0Hz)。

[0316] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯甲酰胺盐酸盐(化合物13):



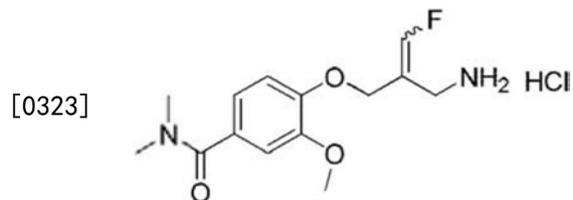
[0318] m.p. 185-187 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; d<sub>6</sub>-DMSO) δ<sub>ppm</sub>: 2.95 (6H, s), 3.60 (2H, d (br), J 4.2Hz), 4.67 (2H, d, J 3.6Hz), 7.03 (2H, d, J 8.7Hz), 7.33 (1H, d, J 82.2), 7.40 (2H, d, J 8.7Hz), 8.29 (3H, br s)。

[0319] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N,2-三甲基苯甲酰胺盐酸盐(化合物26):



[0321]  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz; DMSO)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 2.17 (3H, s), 2.75 (3H, s), 2.98 (3H, s), 3.54 (2H, m (br)), 4.72 (2H, d, J 2.4Hz), 6.85 (1H, dd, J 2.4, 8.4Hz), 6.89 (1H, d, J 2.4Hz), 7.10 (1H, d, J 8.4Hz), 7.21 (1H, d, J 8.2Hz), 8.15 (3H, s)。

[0322] E和Z异构体的混合物形式的4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-3-甲氧基-N,N-二甲基苯甲酰胺盐酸盐(化合物7E和7Z)：



[0324] E-异构体

[0325]  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz; DMSO)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 2.95 (6H, s), 3.52 (2H, m (br)), 3.79 (3H, s), 4.65 (2H, d, J 3.3Hz), 6.95-7.09 (3H, m), 7.24 (1H, d, J 82.0Hz), 8.25 (3H, s)。

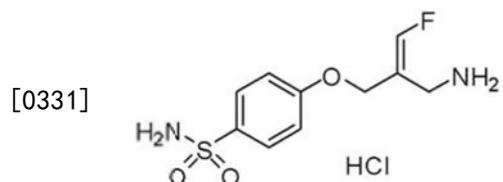
[0326] Z-异构体

[0327]  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz; DMSO)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 2.95 (6H, s), 3.59 (2H, m (br)), 3.79 (3H, s), 4.77 (2H, d, J 2.1Hz), 6.95-7.09 (3H, m), 7.29 (1H, d, J 82.0Hz), 8.25 (3H, s)。

[0328] 实施例4

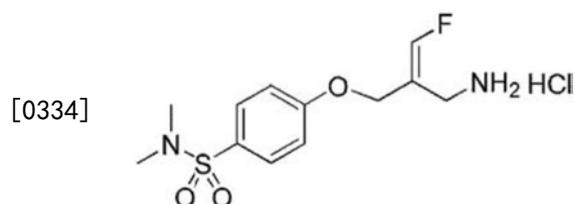
[0329] 根据实施例2中阐述的步骤C和D制备下列化合物。

[0330] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)苯磺酰胺盐酸盐(化合物11)：



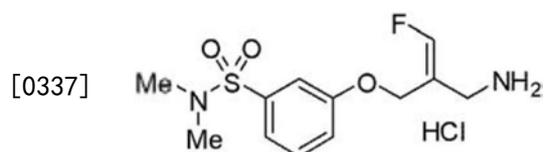
[0332] 无色固体; m.p. 107-110°C;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz; MeOD)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 3.85 (2H, d, J 2.0Hz), 4.71 (2H, dd, J 3.6, 0.8Hz), 7.16 (2H, d, J 9.0Hz), 7.27 (1H, d, J 81.5Hz), 7.88 (2H, d, J 9.0Hz)。

[0333] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯磺酰胺盐酸盐(化合物14)：



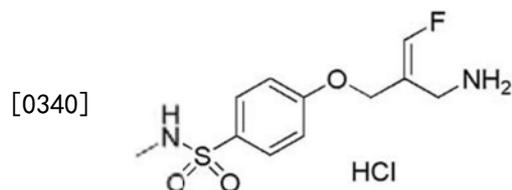
[0335] m.p. 178-180°C;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz;  $d_6$ -DMSO)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 2.57 (6H, s), 3.61 (2H, d (br), J 2.1Hz), 4.73 (2H, d, J 3.3Hz), 7.22 (2H, d, J 8.7Hz), 7.36 (1H, d, J 82.2Hz), 7.71 (2H, d, J 8.7Hz), 8.29 (3H, brs)。

[0336] (Z)-3-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N,N-二甲基苯磺酰胺盐酸盐(化合物15)：



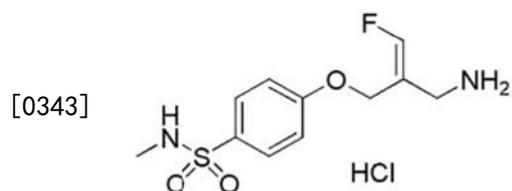
[0338] 淡白色固体; m.p. 140–142°C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>ppm</sub>: 2.70 (6H, s), 3.71 (2H, d, J 2.3Hz), 4.90 (2H, dd, J 2.9, 0.8Hz), 7.14 (1H, d, J 80.8Hz), 7.31–7.62 (4H, m)。

[0339] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-甲基苯磺酰胺盐酸盐 (化合物28):



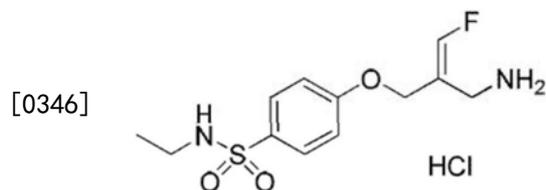
[0341] 米黄色固体; m.p. 143–146°C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; MeOD) δ<sub>ppm</sub>: 2.51 (3H, s), 3.85 (2H, s), 4.73 (2H, d, J 3.3Hz), 7.19 (2H, d, J 8.8Hz), 7.27 (1H, d, J 81.0Hz), 7.80 (2H, d, J 8.7Hz)。

[0342] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-甲基苯磺酰胺盐酸盐 (化合物29):



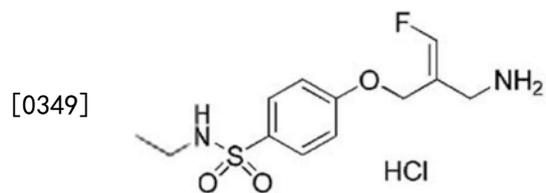
[0344] 无色固体; m.p. 178–180°C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; d<sub>6</sub>-DMSO) δ<sub>ppm</sub>: 2.38 (3H, d, J 5.0Hz), 3.55 (2H, br s), 4.81 (2H, d, J 2.3Hz), 7.20 (2H, d, J 8.9Hz), 7.25 (1H, d, J 82.0Hz), 7.34 (1H, q, J 5.1Hz), 7.73 (2H, d, J 8.9Hz), 8.15 (3H, br s)。

[0345] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-乙基苯磺酰胺盐酸盐 (化合物30):



[0347] 无色固体; m.p. 80–85°C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; MeOD) δ<sub>ppm</sub>: 1.06 (3H, t, J 7.3Hz), 2.88 (2H, q, J 7.2Hz), 3.85 (2H, d, J 2.0Hz), 4.72 (2H, dd, J 3.6, 0.8Hz), 7.18 (2H, d, J 9.0Hz), 7.27 (1H, d, J 81.0Hz), 7.82 (2H, d, J 9.0Hz)。

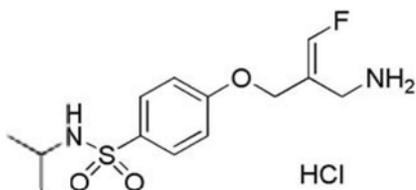
[0348] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-乙基苯磺酰胺盐酸盐 (化合物31):



[0350] 白色固体; m.p. 65–67°C; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz; d<sub>6</sub>-DMSO) δ<sub>ppm</sub>: 0.96 (3H, t, J 7.2Hz), 2.74 (2H, dq, J 7.0, 7.2Hz), 3.55 (2H, br s), 4.80 (2H, br s), 7.19 (2H, d, J 8.8Hz), 7.25 (1H, d, J 81.9Hz), 7.44 (1H, t, J 5.5Hz), 7.74 (2H, d, J 8.7Hz), 8.16 (3H, br s)。

[0351] (E)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-异丙基苯磺酰胺盐酸盐 (化合物32):

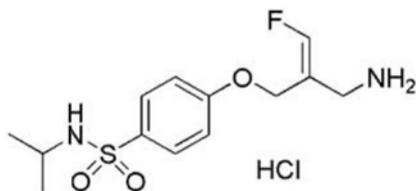
[0352]



[0353] 无色固体; m.p. 151-153°C;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz; MeOD)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 1.03 (6H, d, J 6.6Hz), 3.33 (1H, m), 3.85 (2H, s), 4.72 (2H, d, J 3.8Hz), 7.17 (2H, d, J 9.0Hz), 7.27 (1H, d, J 80.9Hz), 7.83 (2H, d, J 8.9Hz)。

[0354] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)-N-异丙基-苯磺酰胺盐酸盐 (化合物33):

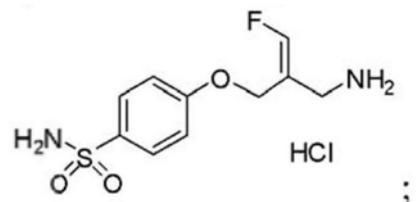
[0355]



[0356] 白色固体; m.p. 50-52°C;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz;  $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 0.94 (6H, d, J 6.5Hz), 3.18 (1H, m), 3.56 (2H, br s), 4.81 (2H, br s), 7.18 (2H, d, J 8.9Hz), 7.25 (1H, d, J 81.9Hz), 7.46 (1H, d, J 7.1Hz), 7.76 (2H, d, J 8.9Hz), 8.09 (3H, br s)。

[0357] (Z)-4-(2-(氨基甲基)-3-氟烯丙氧基)苯磺酰胺盐酸盐 (化合物9):

[0358]



[0359] m.p. 227-230°C;  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz;  $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 3.54 (2H, br), 4.80 (2H, s), 7.24 (1H, d, J 82.2Hz), 7.15 (2H, d, J 8.7Hz), 7.26 (2H, s), 7.77 (2H, d, J 8.7Hz), 8.14 (3H, br s)。

[0360] 实施例5

[0361] 测定式I的化合物抑制人重组SSAO/VAP-1的能力的方法

[0362] 使用针对单胺氧化酶、含铜的胺氧化酶和相关酶描述的耦合比色方法测试所有式I的化合物对人重组SSAO/VAP-1的抑制作用 (Holt A.和Palcic M., A peroxidase-coupled continuous absorbance plate-reader assay for flavin monoamine oxidases, copper-containing amine oxidases and related enzymes. (过氧化物酶-偶联的连续吸光度板-用于黄素单胺氧化酶、含铜的胺氧化酶和相关酶的读数仪检验) .Nat. Protoc. 2006, 1, 2498-2505)。简略地, 通过Genart AG在哺乳动物表达载体 (pLO-CMV) 中组装相应于人SSAO/VAP-1的残基34-763的克隆的cDNA模板并且结合小鼠Ig kappa ( $\kappa$ ) 信号序列、N-末端Flag表位标记和烟草蚀纹病毒 (TEV) 裂解位点。将该包含人SSAO/VAP-1残基的载体转染为CHO-K1糖基化突变细胞系, Lec 8。将稳定表达人SSAO/VAP-1的克隆分离并以大规模培养。使用免疫亲和层析法纯化并回收活性人SSAO/VAP-1。这用作SSAO/VAP-1活动的来源。使用96或384孔模板开发高通量比色检验。简略地, 在标准96孔板检验中, 将50 $\mu\text{L}$ 的纯净人SSAO/VAP-1 (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的0.1M  $\text{NaPO}_4$ 缓冲液 (pH 7.4) 加入至各个孔。将试验化合物溶于DMSO并使用4-9个数据点的浓度响应曲线 (CRC) 测试, 通常在37°C下使用人

SSAO/VAP-1 孵化 30min 后在微摩尔或纳摩尔范围内。在 30min 孵化后, 将 50 $\mu$ L 的在 0.1M NaPO<sub>4</sub> 缓冲液 (pH 7.4) 中制备的包含 600 $\mu$ M 苄胺 (Sigma Aldrich)、120 $\mu$ M Amplex 红 (Sigma Aldrich) 和 1.5U/mL 辣根过氧化酶 (Sigma Aldrich) 的反应混合物加入至相应孔。在 37 $^{\circ}$ C, 激发 565nm 和发射 590 (最佳; BMG labtech) 下, 每隔 2.5min 读取荧光单位 (RFU), 时间为 30min。使用 MARS 数据分析软件 (BMG labtech) 计算各个孔的动力学斜率并且该值用于推断 IC<sub>50</sub> 值 (Dotmatics)。结果在表 2 中示出。

[0363] 表 2

[0364] 本发明的化合物和对比化合物的实例的 SSAO/VAP-1、MAO-B 和 DAO 抑制活性

化合物	人 MAO-B 活性 IC <sub>50</sub> (微摩尔)	在 HMEC 细胞中表达的人 SSAO/VAP-1 活性 IC <sub>50</sub> (纳摩尔)	大鼠脂肪中的内源性 SSAO/VAP-1 活性 IC <sub>50</sub> (纳摩尔)	人二胺氧化酶活性 IC <sub>50</sub> (微摩尔)
1	< 1	< 100	< 100	< 1
2	> 1	< 100	< 100	< 0.1
3	> 10	< 100	< 100	> 1
4	> 0.1	< 100	< 100	< 1
6	> 1	< 100	NT	< 1
7	> 10	< 100	NT	< 1
8	> 1	< 100	NT	NT
9	> 10	< 100	< 100	< 1
10	> 10	< 100	< 100	> 1
11	> 10	< 100	< 100	> 10
13	> 0.1	< 100	< 100	> 1
14	> 10	< 100	< 100	> 10
15	> 100	< 100	< 100	NT
18	> 0.1	< 100	< 100	< 0.1
20	> 1	< 100	NT	< 1
23	> 1	< 100	< 100	> 10
24	> 1	< 100	< 100	> 10
25	> 1	< 100	< 100	< 1
26	> 1	< 100	NT	< 1
28	> 10	< 100	< 100	> 10
29	> 10	< 100	< 100	> 1
30	> 10	< 100	< 100	> 10
31	> 1	< 100	< 100	< 1
32	> 10	< 100	< 100	> 10
33	> 10	< 100	< 100	< 1
莫非吉兰	5 nM	19	6	> 10

[0365]

[0366] 实施例 6

[0367] 测定式 I 的化合物抑制在 HMEC 细胞中表达的人重组 SSAO/VAP-1 的能力的方法

[0368] 除了人 SSAO/VAP-1 源之外, 使用与实施例 5 中描述的类似方法测定 SSAO/VAP-1 活性。使用脂质体 (Invitrogen Ltd) 将 pcDNA-DEST40-hSSAO/VAP-1 转染为 HMEC 细胞。选择稳

定表达人SSAO/VAP-1的克隆并储存在液氮中直至比色检验需要细胞裂解液。简略地,使表达人SSAO/VAP-1的HMEC细胞在几个10cm皮氏培养皿中生长,一旦细胞达到100%融合,将细胞收获并制备匀浆。使用5mL的冷冻的HES缓冲液(20mM HEPES,1mM EDTA,250mM蔗糖,pH 7.4)将细胞洗涤两次。加入包含1×蛋白酶抑制剂(Sigma Aldrich)的HES缓冲液并将细胞在冰上孵化3min。将缓冲液去除并将细胞刮掉并转移至离心管。通过穿过23G针10次并且随后穿过27G针10次制备细胞裂解液。或者,针对每10mL的细胞悬浮剂,通过使用IKA Ultra-Turrax T 10均质机时间为3min制备细胞裂解液。然后,在300xg下使细胞旋转5min。将透明上清液转移至新的离心管并在-80℃下储存直至进行比色检验。在检验之前,加入0.5mM优降宁以抑制任何剩余MAO活动。按照实施例5中的描述进行检验。简略地,在37℃下,使用测试化合物将50μL的细胞裂解液孵化30min。加入反应混合物并按照实施例5中的详细描述读取动力学。表2示出几个式I的化合物的数据。

#### [0369] 实施例7

##### [0370] 测定式I的化合物抑制小鼠和大鼠脂肪匀浆中的SSAO/VAP-1的能力的方法

[0371] 手术切除来自BALB/c小鼠、Wistar或Sprague Dawley大鼠的腹部脂肪,其为富含SSAO/VAP-1-的组织。对于每克的动物腹部脂肪组织,加入1mL的0.1M NaPO<sub>4</sub>缓冲液(pH 7.4)。使用IKA Ultra-Turrax T 10均质机将组织均质化3min,在3000xg下将匀浆离心15min。去除中间层(透明上清液)而不扰动上层(高脂肪含量)或者管底部的碎片。通过检验荧光信号测定SSAO/VAP-1活性。测定K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub>值并将脂肪匀浆等分并在-80℃下储存直至进行检验。以与针对人SSAO/VAP-1(实施例5)相似的方式进行检验,除了用于小鼠脂肪匀浆和大鼠脂肪匀浆的底物(苄胺)浓度分别为80μM和30μM。结果在表2中示出。

#### [0372] 实施例8

##### [0373] 测定式I的化合物抑制人重组MAO-B的能力的方法

[0374] 通过测定它们体外抑制MAO-B活性的能力测试本发明化合物的特异性。重组人MAO-B(0.06mg/mL;Sigma Aldrich)用作MAO-B酶活性的来源。以与针对人SSAO/VAP-1(实施例5)相似的方式进行检验,除了在100μM下使用底物苄胺之外。表2示出几个式I的化合物的数据。

#### [0375] 实施例9

##### [0376] 测定式I的化合物抑制人重组二胺氧化酶的能力的方法

[0377] 发现三种人基因编码含铜的胺氧化酶。二胺氧化酶(DAO)是由AOC1基因产生的一种酶,以它对二胺的底物优先选择命名。通过测定它们体外抑制DAO活性的能力测试式I的化合物的特异性。重组人DAO(2.4μg/mL)用作DAO酶活性的来源。如在用于人SSAO/VAP-1的方法中描述的(实施例5)进行检验,除了使用的底物为200μM腐胺之外,并且对照孔包含10μM氨基胍而非莫非吉兰。表2示出几个式I的化合物的数据。

#### [0378] 实施例10

##### [0379] 测定式I的化合物抑制赖氨酰氧化酶的能力的方法

[0380] 赖氨酰氧化酶(LOX)是氧化胶原中的肽基赖氨酸和羟基赖氨酸残基和弹性蛋白中的赖氨酸残基以产生肽基α-氨基脂肪-δ-半醛的细胞外铜依赖酶。可通过与LOX的活性位结合的β-氨基丙腈(BAPN)不可逆地抑制该催化反应(Tang S.S.,Trackman P.C.和Kagan H.M.,Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-aminopropionitrile(主动脉赖

氨酰氧化酶与 $\beta$ -氨基丙腈的反应). *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 4331-4338)。有五种LOX家族成员;这些是LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3和LOXL4。通过测定它们体外抑制LOX家族的不同来源的能力测试式I的化合物的特异性。

[0381] 使用(1)来自正常人肺纤维母细胞(NHLF)的上清液和(2)来自大鼠皮肤的匀浆制备两种富含LOX的来源。简略地,在T175烧瓶中在包含具有5%FBS的SingleQuot补充物的完全培养基(Lonza Australia Pty Ltd)和FGM-2培养基(Lonza Australia Pty Ltd)中培养NHLF直至60%至80%融合。一旦达到最佳融合,使用磷酸盐盐水缓冲液将细胞洗涤两次并使用包含0.1%FBS和FGM-2培养基的培养基替换。两至四天之后,收集上清液并在300xg下离心5min。将细胞碎片去除并使用具有10kDa截止的 **Amicon®** Ultra-4离心过滤装置(Millipore Ltd)进一步浓缩LOX蛋白。简略地,将样品加入至柱并在4000xg, 4°C下离心直至获得1mL的最终体积。在离心过程期间,使用硼酸钠缓冲液(1.2M脲;0.05M硼酸钠;pH 8.2)更换缓冲液。在富含LOX上清液上测试不同底物并使用比色检验测定荧光信号。底物特异性和富集的上清液的药理学性质被公开的文献证实。将富集的上清液等分并在-80°C下储存。

[0382] 发现LOX蛋白在皮肤上高度表达(Rucker等人,1995),因此大鼠皮肤匀浆用作用于测定LOX酶活性的第二来源。简略地,向每克精细切碎的大鼠皮肤组织加入3mL的磷酸盐缓冲液。然后,使用IKA Ultra-Turrax T 10均质机将组织均质3min。在冰上进行这个和所有下列均质化。在4°C下将匀浆离心(20817xg, 30min)并将上清液丢弃。使用4.2M脲-硼酸钠缓冲液将组织重新悬浮并均质化约3min(2.5mL缓冲液/g)。将匀浆在4°C下孵化过夜。将样品旋转(20817xg, 30min)并收集上清液。细胞团块经历两个均质化循环并收集来自各个过程的上清液。将所有上清液合并并使用具有10kDa截止的 **Amicon®** Ultra-4离心过滤装置将大鼠皮肤匀浆中的LOX蛋白富集。样品经历缓冲液更换直至达到1.2M脲的浓度。在富集的LOX皮肤匀浆上测试不同底物并使用比色检验测定荧光信号。测定底物特异性和药理学性质。将富集的皮肤匀浆等分并在-80°C下储存。

[0383] 使用来自正常人肺纤维母细胞(NHLF)的LOX上清液和来自大鼠皮肤的匀浆的两种不同来源测试式I的化合物的特异性。如在用于人SSAO/VAP-1的方法中描述的(实施例5)进行检验,除了使用优降宁(0.5mM)处理这两种来源之外,使用的底物为10mM腐胺,对照孔包含10 $\mu$ M BAPN而非莫非吉兰,并在45°C下读数。表2示出几个式I的化合物的数据。

[0384] 实施例11

[0385] 测定当给予小鼠和大鼠时式I的化合物抑制SSAO/VAP-1的能力的方法

[0386] 在0.1mg/Kg至100mg/Kg的各个浓度下,或者口服(p.o.)或者静脉内注射(i.v.)给予小鼠和大鼠本发明的化合物。p.o.或i.v.给予对照组相同体积的媒介。在0至96小时的各个时间点下收集腹部脂肪、血浆和肺、肝和主动脉组织。

[0387] 在HES缓冲液中使用1 $\times$ 磷酸酶抑制剂(Sigma Aldrich)和1 $\times$ 蛋白酶抑制剂(对于大鼠5mL/g且对于小鼠20mL/g)均质化各个组织。如在人SSAO/VAP-1(实施例5)中描述的,匀浆用于检测SSAO活性,除了分别在1:5和1:20比例下使用0.1M NaPO<sub>4</sub>缓冲液(pH 7.4)进一步稀释小鼠和大鼠匀浆之外。用于小鼠脂肪匀浆和大鼠脂肪匀浆的底物(苜蓿)浓度分别为80 $\mu$ M和30 $\mu$ M。使用MARS数据分析软件计算各个孔的动力学斜率。使用来自标准化为对照动

物的受治疗动物组织的SSAO活性计算百分比反应。使用GraphPad Prism软件绘制图表。由Yu, P.H.等人描述的方法, *Involvement of SSAO-mediated deamination in adipose glucose transport and weight gain in obese diabetic KKay mice (SSAO-介导的去氨基参与肥胖糖尿病KKay小鼠中的脂肪葡萄糖输送和体重增加)*, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 286:E634-E64用于测定血浆中SSAO/VAP-1抑制的程度。图1A-1E、2A-2E和3A-3E示出在使用各种给药方案的所有组织中化合物23的剂量反应图。

[0388] 实施例12

[0389] 角叉菜胶诱导的大鼠爪浮肿的抑制

[0390] 角叉菜胶-诱导的爪浮肿是测定各个治疗剂的抗炎活性的广泛使用的试验并且是评价化合物缓解急性炎症的功效益的有用实验系统。通过足底注射20 $\mu$ L的角叉菜胶悬浮液(1%的盐水)诱导炎症,如描述的(参见Roussin, A.等人, *Neutrophil-associated inflammatory responses in rats are inhibited by phenylarsine oxide (通过氧化苯砷抑制大鼠中的中性粒细胞-有关的炎性反应)* .*Eur. J. Pharmacol*, 1997, 322, 91-96和Wise, L.E.等人, *Evaluation of fatty acid amides in the carrageenan-induced paw edema model. (角叉菜胶-诱导的爪浮肿模型中脂肪酸酰胺的评价)* .*Neuropharmacology*, 2008. 54, 181-188)。在角叉菜胶的给药之前1小时给予试验化合物(0.1-100mg/kg)。在角叉菜胶注射之前和注射之后1、3、5、6和24小时使用电子数显卡尺测定爪厚度以证实与对照动物相比,大于50%的浮肿抑制。

[0391] 实施例13

[0392] 全身炎症模型中的功效

[0393] 在由高剂量的脂多糖(LPS) (5mg/kg)的腹膜内注射组成的内毒素血症模型中进行本发明的化合物功效的评价(参见Schabbauer, G.等人, *PI3K-Akt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice. (PI3K-Akt通路抑制内毒素血症小鼠中的凝血和炎症)* .*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, 24, 1963-1969和Lentsch, A.B.等人, *STAT4 and STAT6 regulate systemic inflammation and protect against lethal endotoxemia (STAT4和STAT6调节全身炎症并且防止致死内毒素血症)* .*J. Clin. Invest.*, 2001, 108, 1475-1482)。在LPS注射后0、1、2、4和8hrs收集血液样品(50mL)并用于血液涂片和细胞因子评价。如通过ELISA检测的,使用化合物(0.1-100mg/kg)治疗的小鼠中TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1和KC的血浆浓度降低20-80%。在接下来3天记录动物存活率并且化合物治疗的小鼠显示20%更大的存活率。

[0394] 实施例14

[0395] 小鼠中气囊炎症的抑制

[0396] 角叉菜胶的注射诱导炎症并且气囊充当可容易地在局部累积的液体中检测的细胞和介体的储存器。

[0397] 将动物麻醉并且如描述的皮下注射6ml的无菌空气(参见Romano, M.等人, *Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. (小鼠气囊滑膜模型中角叉菜胶-诱导的急性炎症。肿瘤坏死因子的作用)* .*Mediators Inflamm*, 1997. 6, 32-38)。在3天后,使用3ml的无菌空气重新注射气囊。在第6天,对照接受1ml的介质;治疗的对照接受10mg/kg地塞米松且化

合物23组接受2mg/kg。在治疗后1小时,使用1ml角叉菜胶溶液注射小鼠至气囊。在角叉菜胶注射之后4小时,将动物安乐死并使用盐水洗涤气囊。渗出液用于细胞计数以及细胞因子测定。化合物23处理的小鼠显示减少的炎症,并且渗出液体积和中性粒细胞渗透显著减少以及显著减少的TNF- $\alpha$ 和IL-6产生(图4)。

[0398] 实施例15

[0399] 睾提肌微循环中的白细胞迁移的抑制

[0400] 如描述的,小鼠睾提肌制备用于研究白细胞迁移至微循环和相邻结缔组织的抑制(参见Pinho,V.等,Tissue-and Stimulus-Dependent Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase Isoforms for Neutrophil Recruitment Induced by Chemoattractants In Vivo.(由体内化学引诱物诱导的中性粒细胞募集的磷脂酰肌醇3-激酶亚型的组织和刺激依赖作用).J Immunol 2007;179:7891-7898和Nanhekhani,L.V.,Microcirculatory hemodynamics of the rat cremaster muscle flap in reduced blood flow states.(减少血流状态中大鼠睾提肌肌瓣的微循环血液动力学).Ann Plast Surg.2003 Aug;51(2):182-8)。

[0401] 简略地,在阴囊皮肤中进行切口以暴露左侧睾提肌肌肉,然后从相连筋膜中将其小心去除。使用烧灼术在睾提肌肌肉的腹侧面上进行纵向切口。从深层肌肉中分离睾丸和附睾并且移入腹腔。在光学透明查看底座上展开肌肉并且使用缝线沿着边缘弄牢固。使用温碳酸氢盐-缓冲盐水浇注暴露的组织。选择单一、未分支的睾提肌小静脉(直径为25-40 $\mu$ m)并且为了最小化变化性,在整个实验中观察相同部分的睾提肌小静脉。在视频回放分析期间,离线测定经KC或LPS刺激滚动、粘附和移动的白细胞数量。将滚动的白细胞定义为在速率小于指定血管内的红细胞的速率下运动的那些细胞。以每分钟通过小静脉给定点的滚动细胞的数量形式测定滚动细胞的流量。如果它保持静止至少30s,则认为白细胞是粘附的,并且将总共的白细胞粘附定量为在100 $\mu$ m长的小静脉内粘附的细胞数。在刺激物给药之前1小时给予化合物23(6mg/kg)。当与对照组比较时,化合物23显示>50%的滚动和粘附抑制(图5)。

[0402] 实施例16

[0403] 经盲肠结扎和穿孔(CLP)损伤的诱导的炎症的抑制

[0404] 如描述的,CLP步骤包括回盲瓣远侧的盲肠的剖腹手术和结扎(参见Martin,E.等人,Phosphoinositide-3 Kinase  $\gamma$  Activity Contributes to Sepsis and Organ Damage by Altering Neutrophil Recruitment(通过改变中性粒细胞募集磷酸肌醇-3激酶  $\gamma$  活性促进败血症和器官损伤).Am.J.Respir.Crit.Care Med.2010年九月,182(6)762-773和Lutterloh,E.C.,Inhibition of the RAGE products increases survival in experimental models of severe sepsis and systemic infection.(RAGE产物的抑制增加严重败血症和全身感染的实验模型中的存活率).Crit Care.2007;11(6):R122)。

[0405] 使用针穿孔盲肠以诱导中度败血症;在穿孔后,从各个穿孔中喷出少量粪便物。假手术动物接受剖腹手术而没有盲肠操作。在穿孔前6小时给予化合物23。在结扎和穿孔后,将盲肠送回至腹腔,将腹膜壁和皮肤切口闭合,并使动物恢复。在CLP/假手术之后18小时,将一定比例的来自各个组的动物致死并将肺灌洗。将灌洗离心以分离炎症性细胞用于微细胞分析,同时单独的等分用于使用血细胞计数器和光学显微镜计算总共活细胞数。在7天内

监测存活率。与显示50%致死发生率的媒介物处理的组相比,化合物-处理的小鼠导致致死率的统计学显著减少,90%的小鼠在第7天存活(图6B)。此外,通过减少BALF中的总共白细胞观察化合物对疾病的炎性组分的抑制作用(图6A)。

[0406] 实施例17

[0407] 化学诱导的结肠炎的抑制

[0408] 该步骤用于与对照相比使用TNBS-诱导的结肠炎模型筛选抑制结肠炎的发展的化合物(参见Maslowski,K.M.等人,Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43.(通过肠道菌群和化学引诱物受体GPR43调节炎性反应).Nature,2009.461,1282-1286)。简略地,通过在肩胛骨之间剃光的皮肤上应用具有TNBS(50:50,总共)的丙酮/橄榄油混合物(50:50)使小鼠具有敏感性。7天之后,在离肛门边缘3.5cm处使小鼠直肠内激发具有50%乙醇的2.5mg TNBS。在直肠内激发之前,将小鼠禁食过夜,并且在饮用水中给予5%葡萄糖。在TNBS激发之后3天分析小鼠。

[0409] 结肠炎还由葡聚糖硫酸钠盐(DSS)诱导,如描述的(参见Vieira,A.T.等人,Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis.(使用新的趋化因子结合蛋白或嗜酸性粒细胞血统-切除治疗保护小鼠免受实验结肠炎).Am.J.Pathol,2009.175.2382-2891)。小鼠在它们自由取食的饮用水中接受4%(w/v)DSS时间为7天,然后转变为高压灭菌饮用水。在整个实验期间以0.1-100mg/kg给予化合物。在第7天将小鼠致死,并分析结肠。为了存活研究,在DSS治疗开始之后使小鼠遵循25天。如通过较少体重减轻(20%)评价的化合物抑制疾病发展并且减少临床症状。它们还延迟粪便中血液的出现和硬度损失。结肠切片的组织学分析证实>30%减少的炎症。细胞因子测定显示IL5、IL6和TNF $\alpha$ 产生多达70%的抑制。

[0410] 实施例18

[0411] 小鼠中ConA肝诱导的损伤的抑制

[0412] 自身免疫性肝疾病包括自身免疫性肝炎(AIH)、急性和慢性炎性肝疾病的独特形式,其中发现对抗宿主抗原的免疫反应为主要病理学机制。AIH可导致诸如肝硬化的严重肝疾病。小鼠中ConA-诱导的特异性肝损伤是实验动物模型,其已经在肝损伤的发病机制中进行仔细研究。认为T细胞介导的免疫力和TNF- $\alpha$ 的随后释放在该疾病中发挥重要作用。

[0413] 在盐水中静脉注射给予伴刀豆球蛋白A(ConA)10mg/kg。使用盐水注射对照小鼠。血液和肝中的转氨酶和碱性磷酸酶被0.1-100mg/kg的化合物减少>40%。诸如IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-5的细胞因子显著减少,当与对照相比时显示多达75%减少。肝组织病理学证实化合物治疗组中减少的炎症和组织损伤(参见Hu,X.D.等人,Preventive effects of 1,25-(OH)<sub>2</sub>V<sub>D</sub>3 against ConA-induced mouse hepatitis through promoting vitamin D receptor gene expression.(通过促进维生素D受体基因表达1,25-(OH)<sub>2</sub>V<sub>D</sub>3对ConA-诱导的小鼠肝炎的预防作用).Acta Pharmacol.Sin,2010,31,703-708;Zhang,X.L.等人,Protective effects of cyclosporine A on T-cell dependent ConA-induced liver injury in Kunming mice.(昆明小鼠中环孢霉素A对T-细胞依赖ConA-诱导的肝损伤的保护作用).World J.Gastroenterol.,2001,7,569-571;Erhardt,A.等人,IL-10,regulatory T cells,and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver

injury in mice. (小鼠中伴刀豆球蛋白A-诱导的肝损伤的IL-10, 调节T细胞和Kupffer细胞介导的耐药性). *Hepatology*, 2007, 475-485)。

[0414] 实施例19

[0415] 大鼠中帕金森氏疾病病理学的抑制

[0416] 模型A: 全身暴露于LPS以促进神经变性

[0417] 帕金森氏病是病理学、年龄相关的神经变性疾病, 特征在于多巴胺能神经元的特异性和进行性变性。外周暴露于LPS, 啮齿动物中炎症的有效诱导物已被证实导致神经炎症, 持续性小胶质细胞激活, 黑质中延迟和进行性多巴胺神经元损失, 与在帕金森氏病中观察的相似。最近证据涉及黑质纹状体多巴胺能神经元的神经变性中的炎症, 并且证实LPS促进它 (参见Qin, L. 等人, *Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration* (全身LPS导致慢性神经炎症和进行性神经变性), 2007 *Glia*, 453-462)。

[0418] 在LPS的第一次 (时间0h) 和第三次 (时间24h) 注射之前, 腹膜内 (ip) 给予Long Evans大鼠2mg/kg的化合物9或媒介1h。在时间0, 动物接受10mg/kg的LPS的剂量。在时间6和24h, ip. 给予动物3mg/kg的LPS溶液。在第一次LPS注射之后30h, 动物接受ip注射的lethabarb并在4°C下经心 (transcardially) 灌注400ml PBS, 随后是400ml的4%多聚甲醛 (PFA)。在4°C下在4%PFA中将大脑快速固定过夜, 随后20%蔗糖溶液时间为24h。收集30μm切片并染色用于免疫荧光法、免疫组织化学和免疫印迹分析。使用化合物9治疗的组显示背外侧纹状体和海马中减少的中性粒细胞渗透和黑质和背外侧纹状体中小胶质细胞募集和激活 (树突长度、表面和体积) 的减少 (图7)。

[0419] 模型B: 局部暴露于LPS以促进神经变性

[0420] 可进行在选择的大脑区域中直接注射LPS以诱导大脑中的局部炎性反应。多巴胺能神经元更容易受到基于炎症的神经毒性, 并且诸如黑质和纹状体的相关区域中的局部LPS注射已被用作帕金森氏病的模型 (参见Liu, M. 和Bing, G., *Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease*. (帕金森氏病的脂多糖动物模型). *帕金森氏病*, 2011, 327089; Choi, D.-Y. 等人, *Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats*. (纹状体神经炎症促进大鼠中的帕金森症). *PloS one*, 2009, 4 (5), e5482)。LP也已被证实促进黑质多巴胺能神经元变性 (参见Machado, A. 等人, *Inflammatory animal model for Parkinson's Disease: The intranigral injection of LPS induced the inflammatory process along with the selective degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons*. (帕金森氏病的炎性动物模型: LPS诱导的炎性过程的黑质内 (intranigral) 注射连同黑质纹状体多巴胺能神经元的选择性变性). *ISRN Neurology*, 2011, 1-16)。

[0421] 将包含2μL的1mg/mL的LPS的溶液注射在预先麻醉的雌性大鼠的左黑质中。使用0.1-100mg/Kg的化合物处理动物并且结果显示与对照动物相比, 炎症减少多达80%同时减少的小胶质细胞激活。媒介处理的动物伴随多巴胺能神经元减少并且减少多巴胺 (DA) 的细胞内含量, 其作用被化合物显著抑制。媒介处理组中多巴胺能系统的平均减少为约35%, 而在化合物处理组中为<20%。

[0422] 实施例20

[0423] 小鼠中与中风有关的炎症的抑制

[0424] 中风中脑组织损伤的发展包括直接组分随后是再灌注后伴随次生组织的炎症反应。缺血/再灌注模型模仿组织损伤以及炎症组分(参见Hase,Y.等人,Cilostazol,a phosphodiesterase inhibitor,prevents no-reflow and haemorrhage in mice with focal cerebral ischemia.(西洛他唑,磷酸二酯酶抑制剂防止小鼠中无复流和出血与局灶性脑缺血).Exp.Neurol.,2012,233(1),523)。通过将尼龙单丝引入至右颈总动脉(CCA)使小鼠进行大脑中动脉阻塞/再灌注手术。从颈动脉分叉小心前进至11mm并且建立右侧大脑中动脉的近端阻塞。在90min阻塞后,抽出单丝以使允许再灌注另外22.5hr。使用化合物0.1-100mg/Kg处理动物并且显示血小板聚集和微血管中白细胞阻塞减少多达50%。治疗显著减少死亡率,并且动物存活>80%。

[0425] 实施例21

[0426] LPS驱动模型中急性肺炎的抑制

[0427] 使用气管手术激发方法,通过滴注LPS进入小鼠的肺诱导炎症(参见,Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4.(抑制小鼠肺中LPS的先天免疫反应并通过抑制TLR-4通过中和GM-CSF颠倒).Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.,2004,L877-85;和Harrod,K.S.,A.D.Mounday和J.A.Whitsett,Adenoviral E3-14.7K protein in LPS-induced lung inflammation.(LPS-诱导的肺炎中的腺病毒E3-14.7K蛋白).Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.,2000,278,L631-9)。简略地,在使用10mg/kg的地塞米松或2mg/kg的化合物9治疗后1小时,将小鼠麻醉,在颈部进行中线切口,通过钝器解剖分离肌肉层并将1ml/kg LPS(20mg/kg)或媒介注射至气管。使用创缘夹将切口闭合并将小鼠放回笼子。

[0428] 在LPS/盐水注射之后6小时,将小鼠麻醉,去除创缘夹,使用23G钝针在气管上插管,并使用0.5ml肝素化盐水将肺灌洗8次。将灌洗合并,轻轻倒立,并保留样品用于白细胞(WBC)差异分析。将灌洗的剩余物离心,上清液用于细胞因子分析。与对照相比,化合物9显示中性粒细胞渗透的显著减少和IL-6和TNF- $\alpha$ 水平的减少(图8)。

[0429] 实施例22

[0430] 病毒感染的小鼠的肺过敏性炎症的抑制

[0431] 早期呼吸道病毒感染,明显具有呼吸道合胞体病毒(RSV)增加幼儿哮喘的随后发展的风险。感染小鼠肺炎病毒(PVM),其属于相同科(副粘病毒科(Paramyxoviridae))和属(肺病毒属(Pneumovirus))作为RSV,提供RSV疾病的模型(参见Rosenberg,H.F.等人,The pneumonia virus of mice infection model for severe respiratory syncytial virus infection:identifying novel targets for therapeutic intervention.(严重呼吸道合胞体病毒感染的小鼠感染模型的肺炎病毒:识别治疗干预的新靶向).Pharmacol.Ther.,2005,105,1-6)。过敏性呼吸道炎症,包括嗜酸性粒细胞募集在新生感染PVM的动物中是显著的,然后激发OVA抗原(参见Siegle,J.S.等人,Early-life viral infection and allergen exposure interact to induce an asthmatic phenotype in mice.(早期病毒感染和过敏原暴露相互作用以诱导小鼠中的哮喘表型).Respir.Res.,2010,11,14)。

[0432] 在生命的第1天和第2天,在外鼻孔上将小鼠鼻内接种2pfu (PVM J3666菌株约 $1 \times 10^5$ pfu/mL)的5 $\mu$ L磷酸盐缓冲盐水(PBS)。对照动物为单独的假感染PBS。分别使用5 $\mu$ g OVA/5 $\mu$ L PBS或100 $\mu$ g/40 $\mu$ L,在生命的第1天和第2天或在第28天和第29天进行OVA的鼻内敏化。小鼠接受低水平气雾剂激发卵清蛋白(治疗浓度为 $\approx 3\text{mg}/\text{m}^3$ 的卵清蛋白时间为30min/天,3天/周时间为4周)。这随后是单独中等水平激发( $\approx 30\text{mg}/\text{m}^3$ 时间为30分钟)以诱导急性恶化的变化。该研究的目的是评价由于早期感染倾向于发展哮喘特征的小鼠中的化合物(0.1-100mg/kg)的抗炎作用。

[0433] 进行支气管肺泡灌洗(BAL)用于恢复气道腔细胞。通过气管内滴注800 $\mu$ L的PBS/小鼠实现该步骤。使用血细胞计数仪计算白细胞的总数。由BAL液体制备细胞离心涂片载片,然后使用Wright-Giemsa染色法染色用于微分细胞计数。根据标准形态学标准将细胞分类为单核细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞并且在光学显微镜下计算至少200细胞每个载片。对于肺组织学,在免疫组织化学分析之前将肺灌注,膨胀并在10%缓冲福尔马林中固定。将渗透物中自细胞的程度评分为0,最小或没有炎症;1,轻微炎症,仅血管周或细支气管周;2,中度炎症,一些薄壁组织参与;3,显著炎症,广泛的薄壁组织参与;4,如前面描述的重度炎症。以0.1mg/kg-100mg/kg给予化合物并且与对照相比,动物显示中性粒细胞渗透减少40-80%,IL-6和TNF $\alpha$ 减少多达30%。

[0434] 实施例23

[0435] HDM-诱导的哮喘模型的恶化的抑制

[0436] 主要由患有哮喘的人的鼻病毒引起的呼吸道感染使呼吸道炎症恶化并且进一步促成疾病负担和护理成本。鼻病毒恶化屋尘螨(HDM)模型用于研究化合物23在过敏性哮喘模型中的作用(Collison,A.等人,The E3ubiquitin ligase midline 1 promotes allergen and rhinovirus-induced asthma by inhibiting protein phosphatase 2A activity. (E3泛素连接酶1通过抑制蛋白质磷酸酶2A活性促进过敏原和鼻病毒诱导的哮喘).Nat.Med.2013,19(2):232-7)。

[0437] 将小鼠致敏并且通过使它们鼻内暴露于粗HDM提取物来激发(在第0、1和2天50 $\mu$ g每天,随后从第14天至第17天在50 $\mu$ L的无菌盐水中递送的四次暴露的5 $\mu$ g HDM每天)。使用50 $\mu$ L有感染性或紫外线(UV)-灭活的RV1B41( $2.5 \times 10^6$ 半数组织培养感染剂量)将动物鼻内感染(第18天,在最后HDM提取物激发之后1d)。在鼻病毒激发之前1小时以0.1-100mg/kg给予化合物。在最后的过敏原或鼻病毒激发之后24h将小鼠致死。由支气管肺泡灌洗液制备细胞离心涂片载片,然后使用Wright-Giemsa染色法染色用于微分细胞计数。根据标准形态学标准将细胞分类为单核细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞并且在光学显微镜下计算至少200细胞每个载片。使用6mg/kg的化合物23处理的动物在BALF中显示在渗出物中中性粒细胞的显著减少(图9A)和后退至对照组的反应于乙酰甲胆碱激发的减少的气道高反应性(图9B)。

[0438] 实施例24

[0439] 牛皮癣的SCID小鼠模型中皮肤炎症的抑制

[0440] 牛皮癣是常见炎性皮肤病,特征在于异常上皮分化、乳头状真皮中广泛的毛细血管形成和炎性白细胞包括T淋巴细胞、NK淋巴细胞和粒细胞的累积。在免疫功能不全的小鼠上移植人皮肤(重症综合性免疫缺陷[SCID]小鼠)提供了研究牛皮癣的模型。使用该方

法,表皮增厚,广泛膜层形成挂钩和炎性细胞的存在在移植的皮肤中长时间保持(参见 Zeigler, M. 等人, Anti-CD11a ameliorates disease in the human psoriatic 皮肤-SCID mouse transplant model: comparison of antibody to CD11a with Cyclosporin A and clobetasol propionate. (抗CD11a减轻人牛皮癣皮肤中的疾病-SCID小鼠移植模型:使用环孢菌素A和丙酸氯倍他索比较抗体与CD11a). Lab. Invest., 2001, 81, 1253-1261 和 Nickoloff, B. J. 等人, Severe combined immunodeficiency mouse and human psoriatic 皮肤 chimeras. Validation of a new animal model. (重症综合性免疫缺陷小鼠和人牛皮癣皮肤嵌合体. 新动物模型的验证). Am. J. Pathol., 1995, 146, 580-588)。

[0441] 制备SCID小鼠(6-8周大)用于原位皮肤异种移植。使用可吸收Dexon缝线将人皮肤异种移植物(检测 $1.5 \times 1.5 \times 0.05\text{cm}$ )缝合至各个SCID小鼠的侧面区域。每隔2天更换敷料,并使动物在整个研究中保持没有病原体。在异种移植物移植后4周或6周将人皮肤/SCID小鼠嵌合体致死(因为该时间确保充分的接受和愈合)。处理异种移植物活组织检查用于细胞因子ELISA以及组织病理学分析。在移植后,化合物处理组(0.1-100mg/kg)显示真皮和表皮中炎症减少20-50%,与媒介物处理组相比。此外,通过化合物处理抑制多达80%的诸如IL-6和TNF $\alpha$ 的细胞因子。

[0442] 实施例25

[0443] 抗菌活性-肺炎克雷伯菌(Klebsiella pneumoniae)感染

[0444] 在由革兰氏阴性菌肺炎克雷伯菌(Klebsiella pneumoniae)引起的肺感染模型中研究化合物的功效。结果是在小鼠肺感染之后的化合物和对照的致死率、细菌计数和炎症指标之间的差异(参见Soares, A. C. 等人, Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with Klebsiella pneumoniae in transgenic mice. (长穿透素PTX3抵抗转基因小鼠中肺感染肺炎克雷伯菌(Klebsiella pneumoniae)的双重功能). Microbes Infect., 2006, 8, 1321-1329.)。

[0445] 将BALB/c小鼠(8周大)分成3组;2只感染的和1只未感染的。感染组:组A,口服给予动物媒介物;组B,口服给予动物2mg/kg的化合物;和组C,动物为未感染的。收集支气管肺泡灌洗液(BALF)以测定白细胞的总数。由BAL液体制备细胞离心涂片载片,然后使用Wright-Giemsa染色法染色用于微分细胞计数。根据标准形态学标准将细胞分类为单核细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞并且在光学显微镜下计算至少200细胞每个载片。对于细菌计数,将肺均质化,连续稀释并在MacConkey琼脂板上制板。在37°C下24小时孵化结束时计算菌落形成单位。在接下来10天记录动物存活率。

[0446] 与显示45%致死率的媒介物治疗组相比,化合物23治疗的小鼠显示统计学显著减少的致死率,在8天后100%的小鼠存活( $p=0.0597$ ) (图10A)。此外,在BALF的渗出物中减少的白细胞中观察到化合物23对疾病的炎性组分的抑制作用(图10B)。

[0447] 实施例26

[0448] 慢性阻塞性肺病的抑制

[0449] 慢性阻塞性肺病(COPD)是肺的衰弱疾病。所述疾病特征在于慢性呼吸道炎症、粘液分泌过多、呼吸道重建和肺气肿,其导致降低的肺功能和呼吸急促。气流受限通常是进行性的并且与肺对有害气体和颗粒的异常炎性反应相关。香烟烟雾引起重复炎症侵袭,其被认为是通过诸如蛋白酶的介体的作用导致肺的结构和功能变化。此外,患有COPD的患者更

易遭受呼吸道感染(参见Beckett,E.L.,A new short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis.(慢性阻塞性肺病的新的短期小鼠模型识别肥大细胞类胰蛋白酶在致病机制中的作用).J Allergy Clin Immunol.2013Mar;131(3):752-762.e7;Guerassimov,A., The Development of Emphysema in Cigarette Smoke-exposed Mice Is Strain Dependent.(香烟烟雾暴露小鼠中肺气肿的发展是品系依赖性的).Am.J.Respir.Crit.Care Med.Nov,2004(170)974-980和Morris,A.,Comparison of Cigarette Smoke-Induced Acute Inflammation in Multiple Strains of Mice and the Effect of a Matrix Metalloproteinase Inhibitor on These Responses.(多品系小鼠中香烟烟雾-诱导的急性炎症的比较和基质金属蛋白酶抑制剂对这些反应的作用).JPET 2008年十二月(327)851-862)。

[0450] 通过使用专门设计和为特定目的建造的鼻吸烟,顺流吸入和在烟和层流罩中安装的烟雾暴露系统(CH Technologies,Westwood,NJ)将BALB/c小鼠同时暴露于香烟烟雾(十二3R4F参考香烟[University of Kentucky,Lexington,Ky]每天两次和每周5次时间为1至12周)。每次暴露持续75分钟。使用递送烟雾和正常空气至动物的鼻子的专门控制管实现鼻吸烟暴露。该方案允许比全身暴露系统更密集的烟雾递送。对于最初2天,使小鼠暴露于1届吸烟同时从各个香烟12次吹气以允许适应环境。在第2次吹气递送烟雾,同时在每次吹气之间30秒的正常空气。在第2天之后,使小鼠进行2届,其中使它们暴露于来自12只香烟的烟雾(早晨和中午,由恢复期隔开)。从实验步骤起第6周以2mg/kg给予化合物23并且显著抑制肺胶原蛋白含量(图11)。

[0451] 实施例27

[0452] CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化的抑制

[0453] 通过使用CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化模型进行使用VAP-1/SSAO抑制剂治疗炎性/纤维变性疾病的分析。肝损伤是频繁的,随后是由于肝细胞的再生能力产生的完整的薄壁组织再生。然而,储脂细胞的伴随激活导致伴随复发性肝细胞坏死、炎症和再生过程的细胞外基质积聚,并且引起肝纤维化,因此引起肝硬化(参见Natsume,M.等人,Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice.(四氯化碳处理的IL-6-缺乏小鼠中减弱的肝纤维化和减少的血清白蛋白水平).J.Leukoc.Biol.,1999,66,.601-608.)。

[0454] 通过口服应用CCl<sub>4</sub>(2.5μL/g的CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液,3次每周)诱导雄性Sprague Dawley (SD)大鼠中的肝纤维化。从第1天至第28天将媒介物(PBS)和阳性对照甲磺酸伊马替尼(2.5mg/kg)给予大鼠,并从第14天至第28天将化合物23(6mg/kg)给予大鼠。化合物23证实减少的纤维化组织水平的明显趋势,如由天狼星红染色减少代表的(图12C)。此外,化合物23显示肝功能保护作用 and 炎症减少,其当与仅CCl<sub>4</sub>组比较时,由显著降低的血清ALT和AST水平(图12A和12B)和炎症评分的减少(12D)证实。

[0455] 实施例28

[0456] 非酒精性脂肪肝(NASH)诱导的肝纤维化的抑制

[0457] 通过使用非酒精性脂肪肝(NASH)诱导的肝纤维化模型进行使用VAP-1/SSAO抑制剂治疗炎性/纤维变性疾病的分析。通过在出生后2天链脲霉素溶液的单一皮下注射并且在

年龄为4周至10周之后喂养高脂肪饮食 (HFD, 57kcal%脂肪) 在30只雄性小鼠中诱导NASH的STAM模型。从7周大开始, 每天口服给予小鼠一定剂量的媒介物 (PBS)、化合物23 (6mg/kg) 或阳性对照替米沙坦 (10mg/kg) 时间为3周。经临床检查, 化合物23降低炎症和非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 评分二者 (图13A和13B)。如通过天狼星红阳性区域 (图13C) 证实的纤维化也减少。

[0458] 实施例29

[0459] 葡萄膜炎的抑制

[0460] 该步骤通过本发明的化合物测定抑制葡萄膜炎。葡萄膜炎是可导致失明的复杂炎性眼病。它可影响眼睛的任何部分并且特征在于白细胞在眼组织中积聚。目前用于葡萄膜炎的疗法包括皮质类固醇和化学治疗剂以减少炎症。然而, 诸如增加眼内压或细胞毒性的这些药物的严重副作用限制它们的使用 (参见Moorthy, R.S. 等人, *Glaucoma associated with uveitis.* (与葡萄膜炎有关的青光眼). *Surv. Ophthalmol.*, 1997, 41, 361-394和 Lightman, S., *New therapeutic options in uveitis.* (葡萄膜炎的新治疗选择). *Eye* 1997, 11, 222-226)。

[0461] 将三十 (30) 只 Lewis albino 大鼠分为四 (4) 组。对于三组中的4只, 通过1mg/kg脂多糖的单一足垫注射 (来自鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium*) 的LPS) 诱导眼睛炎症。在诱导之前 (第0天) 1小时通过口服喂养 (1ml/kg) 给予化合物23 (2mg/kg) 和媒介。就在诱导之后 (第0天) 通过静脉内注射 (2.5ml/kg) 给予参考项目 (地塞米松, 2mg/kg)。在诱导之后24h通过眼房水中中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和蛋白质的临床检查和定量评价眼睛炎症。

[0462] 炎症的临床检查; 在诱导之后24h (第1天), 在基线处使用裂隙灯检查动物 (第1天)。使用描述的评分系统将各个动物中的炎症评分 (Devos A. 等人, *Systemic antitumor necrosis factor antibody treatment exacerbates Endotoxin Induced Uveitis in the rat.* (全身抗肿瘤坏死因子抗体治疗恶化大鼠中内毒素诱导的葡萄膜炎). *Exp. Eye. Res.* 1995; 61: 667-675)。针对没有 (0) 或存在 (1) 将耀斑、瞳孔缩小和前房积脓评分, 并且针对没有 (0) 或轻微 (1) 或重度存在 (2) 将虹膜充血和前方中的细胞评分。最大得分 (五个参数得分的和) 为7。在使用化合物23处理的组中, 与针对媒介物组观察到的得分相比, 在诱导之后24小时和口服给药之后25小时检测到眼睛炎症的严重程度降低33% (图14A)。

[0463] 在临床评价结束时 (在诱导之后24h), 通过肌肉注射 **Rompun®** (甲苯噻嗪) 和 **Imalgene®** 1000 (氯胺酮) 的混合溶液将动物麻醉并通过心脏注射过量戊巴比妥使动物安乐死。立即收集各个眼睛的眼房水。

[0464] 眼房水中细胞浸润的定量; 在Giemsa染色之前使用PBS稀释10-倍的眼房水样品的细胞学制剂中手工计算浸润的中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。对于使用化合物23处理的组与使用媒介物处理的组 ( $p=0.033$ ) 观察到嗜酸性粒细胞的显著减少 (平均 $\pm$ SEM:  $8.9 \pm 1.7$  细胞/ $\mu$ L,  $n=20$ ) (图14B)。

[0465] 实施例30

[0466] 黄斑变性的抑制

[0467] 年龄相关的黄斑变性 (AMD) 是失明的主要原因并且以两种主要形式出现。第一种

是地图状萎缩(“干燥”)形式,其被定义为黄斑附近的光感受器变性和视网膜色素上皮细胞(RPE),脂褐质(A2E)的累积和玻璃疣的形成。第二种是与脉络膜新血管生成有关的“湿”形式(参见Randazzo,J.等人,Orally active multi-functional antioxidants are neuroprotective in a rat model of light-induced retinal damage.(在光诱导的视网膜损伤的大鼠模型中口服活性多功能抗氧化剂是神经保护的).PLoS One,2011,6 e21926和Davis,S.J.等人,The Effect of Nicotine on Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in a Mouse Model of Neovascular Age-Related Macular Degeneration.(新生血管性年龄相关黄斑变性的小鼠模型中尼古丁对抗血管内皮生长因子疗法的作用).Retina,2011)。

[0468] 模型A:光模型

[0469] 在两周的暗适应之后,将来自各个组的大鼠暴露于有破坏性的光三小时至1000lx的冷白色荧光(光损伤的大鼠,LD)。将各个组中的对照大鼠也放置在灯箱装置中三小时,但不暴露于光(非光损伤的大鼠,NLD)。在光暴露后立即评价氧化应激标记。化合物处理的动物0.1-100mg/kg显示氧化应激减少>20%,如通过评价神经视网膜观察到的,在安乐死后从摘出的眼睛切开。对于功能和形态学评价,在暴露后将大鼠返回至黑暗环境并在5至7天之后通过ERG评价视网膜功能。在ERG分析之后,将大鼠安乐死并且立即处理摘出的眼睛用于定量形态学。化合物处理组显示与对照动物相比,疾病严重程度降低,如通过眼睛形态学变化的降低观察到的。

[0470] 模型B:激光模型

[0471] 使用氩激光器(光斑尺寸,50mm;持续时间,0.05秒;功率,260mW)在小鼠中通过激光光凝术诱导CNV。将三个激光光斑放置在邻近视神经的各个眼睛中。在激光时蒸发气泡的产生证实BM的破裂。在激光后第1、3、5和7天将来自各个组的动物致死。与对照相比,化合物处理的小鼠(0.1-100mg/kg)显示尺寸(20%)和CNV发生率(>40%)的显著减少,如通过显微镜测定的。

[0472] 实施例31

[0473] 癌症发展的抑制

[0474] 在动物的剃光限定区域中注射B16F10黑素瘤细胞( $4 \times 10^5$ 细胞/动物),如在Marttila-Ichihara,F.等人,Small-Molecule Inhibitors of Vascular Adhesion Protein-1 Reduce the Accumulation of Myeloid Cells into Tumors and Attenuate Tumor Growth in Mice.(血管粘附蛋白-1的小分子抑制剂减少骨髓细胞累积进入肿瘤和减弱小鼠中的肿瘤生长).The Journal of Immunology,2010,184,3164-3173中描述的。肿瘤的生长随后是使用电子卡尺测定尺寸。在化合物处理动物(0-1.-100mg/kg)中肿瘤发展减弱,当与对照组比较时多达25%更少的肿瘤生长。化合物处理的组显示肿瘤中减弱的骨髓细胞累积,显示>40%更少的细胞浸润;此外,处理的小鼠显示抑制血管生成。

[0475] 本说明书中引用的所有专利和其他参考文献显示本发明涉及的领域的技术人员的技术水平,并且以它们整体通过引用并入,包括任何表格和附图,达到相同程度如同各个参考文献以其整体单独地通过引用并入。

[0476] 本领域技术人员容易理解,本发明非常适于获得提及的目的和优点以及其中固有的那些。本文描述的方法、变型和组合物如目前优选实施方案的代表为例示性的并且不意

图作为对本发明范围的限制。本领域技术人员可想到其中的变化和其他用途,其包括在通过权力要求的范围限定的本发明的实质范围内。

[0477] 本领域技术人员容易理解,在不违背本发明的范围和实质下可对本文公开的发明进行不同替换和修改。例如,可进行变化以提供另外的式I的化合物和/或可使用各种给药方法。因此,这种另外的实施方案在本发明和下列权利要求的范围内。

[0478] 在没有本文未具体公开的任何元素或多种元素、限制或多种限制情况下可适当地实施本文例示性描述的本发明。已经使用的术语和表达被用作说明书的术语而不是限制的术语,并且不意图在这类术语和表达的使用中排除显示和描述的特征的等效物或其部分,但认识到在要求保护的本发明的范围内各种修改是可能的。因此,应当理解,尽管已经通过优选实施方案具体公开本发明并且本文公开的概念的任选特征、修改和变型可被本领域技术人员采用,并且认为这种修改和变型在通过附加权利要求定义的本发明的范围内。

[0479] 此外,在根据马库什组或替代物的其他分组描述本发明的特征或方面的情况下,本领域技术人员知道由此还根据马库什组或其他分组的任何单独成员或成员的亚组描述本发明。

[0480] 此外,除非规定相反情况,在针对实施方案提供各个数值的情况下,通过采用任何2个不同值作为范围的端点描述另外的实施方案。这样的范围也在描述的发明的范围内。

[0481] 因此,另外的实施方案在本发明的范围内并且在下列权利要求的范围内。

[0482] 本申请是申请日为2013年4月5日、中国申请号为201380035139.3、发明名称为“SSA0的取代的3-卤代烯丙基胺抑制剂及其用途”的发明申请的分案申请。

图 1 (B) 血浆

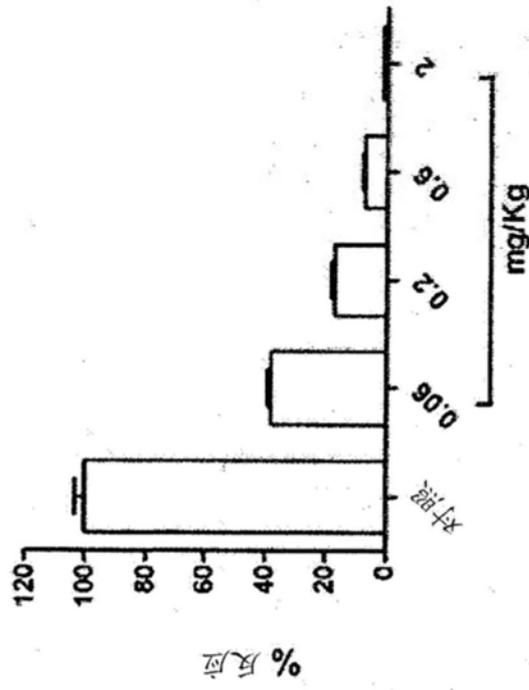


图 1 (A) 腹部脂肪

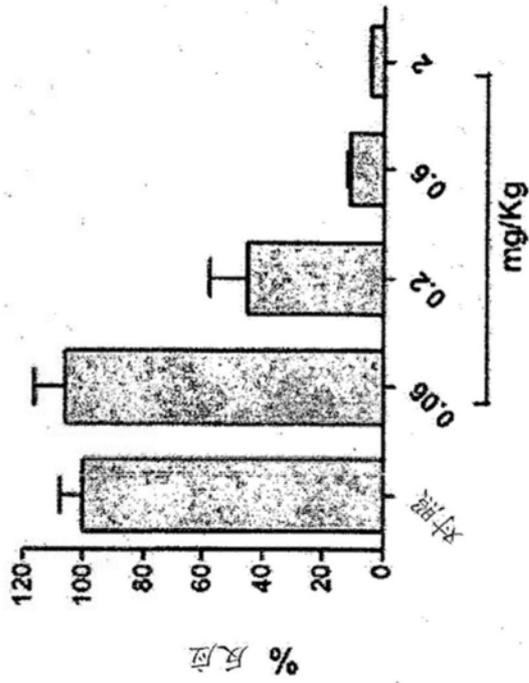


图 1 (D) 主动脉

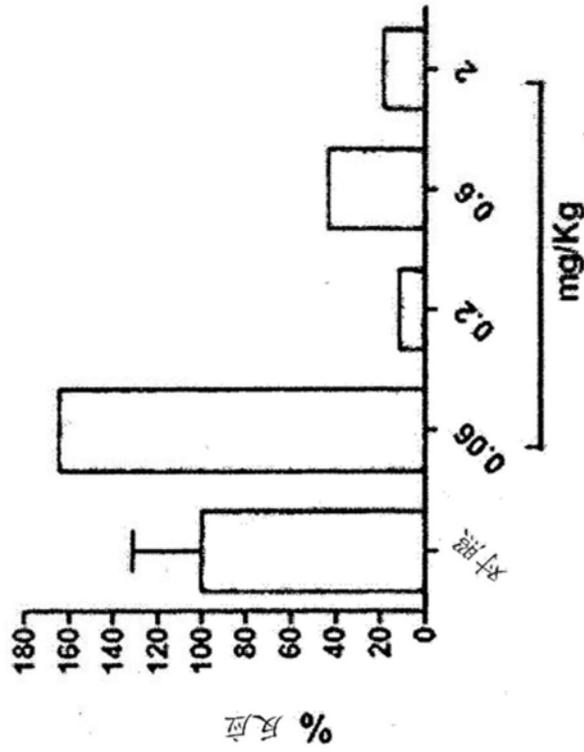
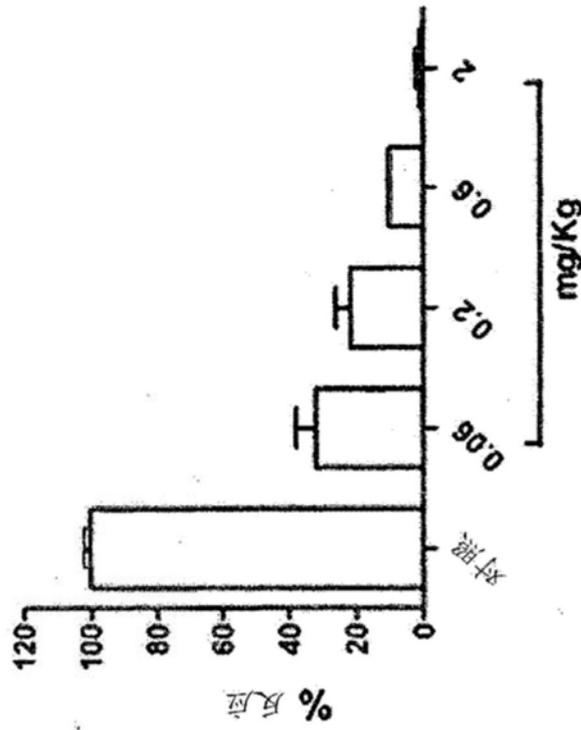


图 1 (C) 肺



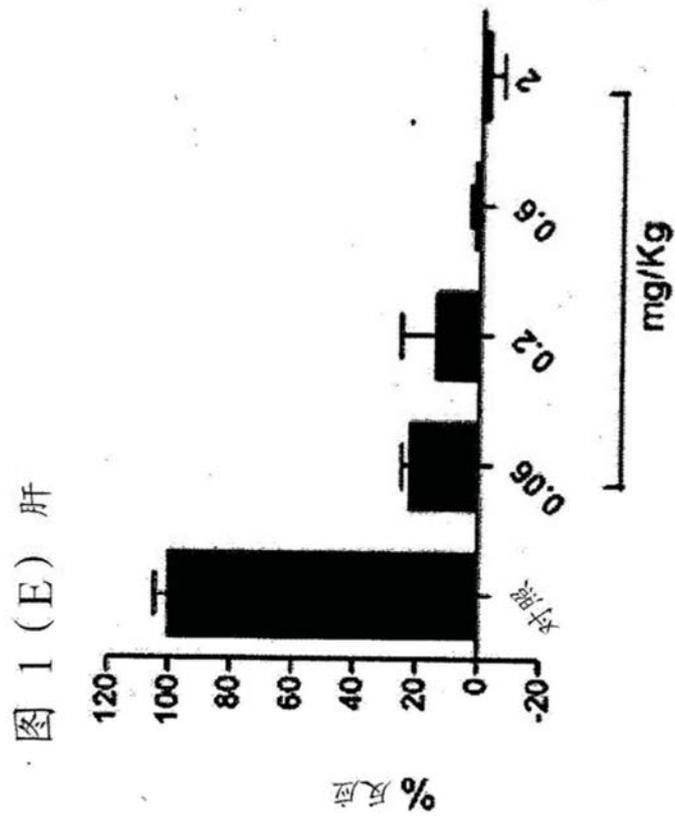


图1

图 2 (A) 腹部脂肪

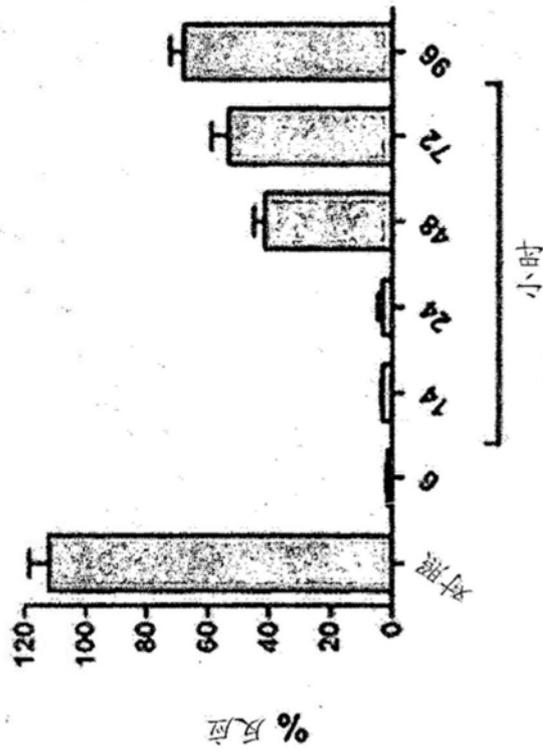


图 2 (B) 血浆

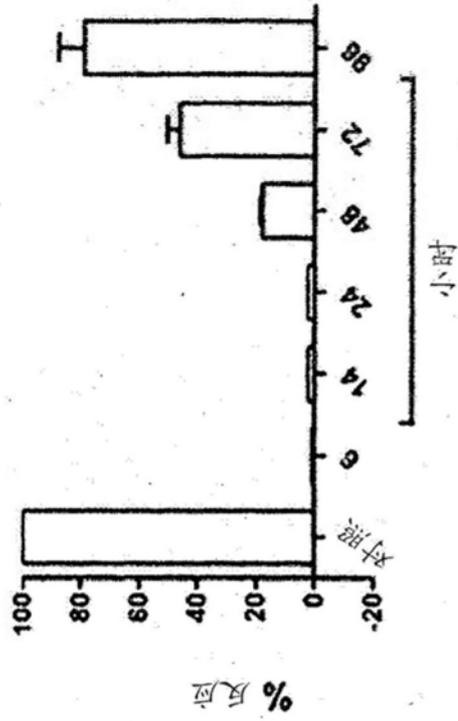


图 2 (D) 主动脉

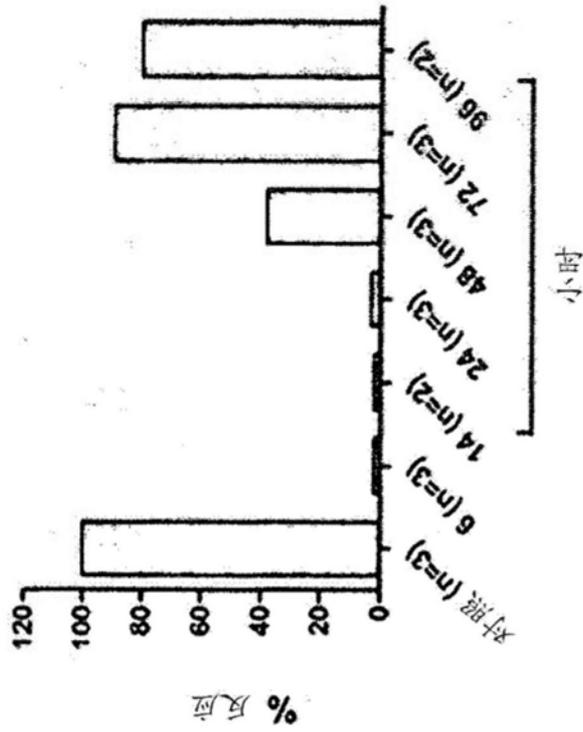
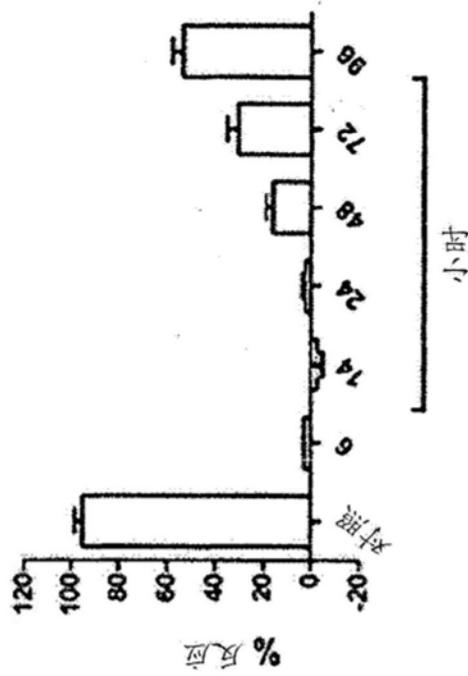


图 2 (C) 肺



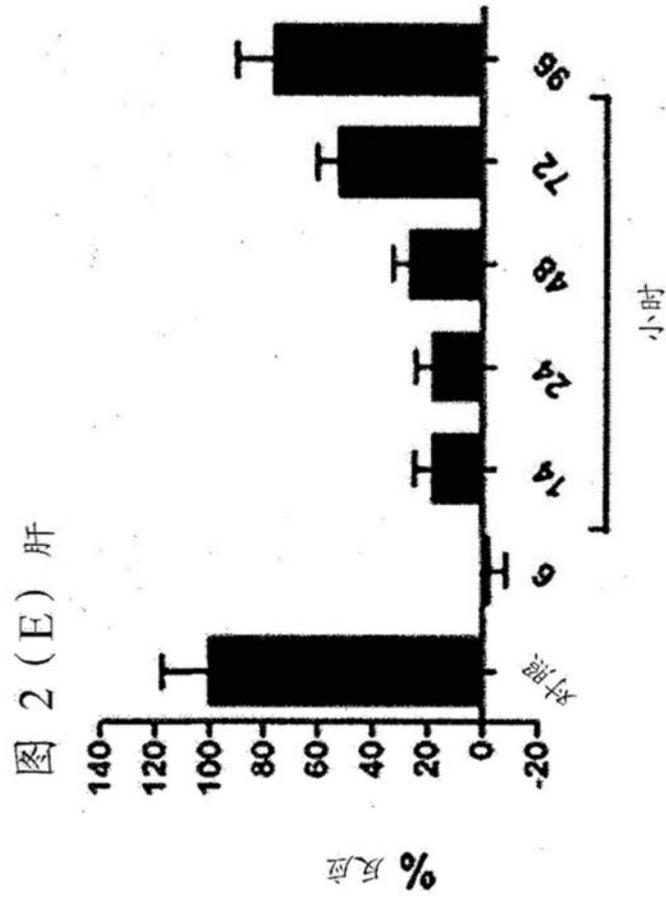


图2

图 3 (B) 血浆

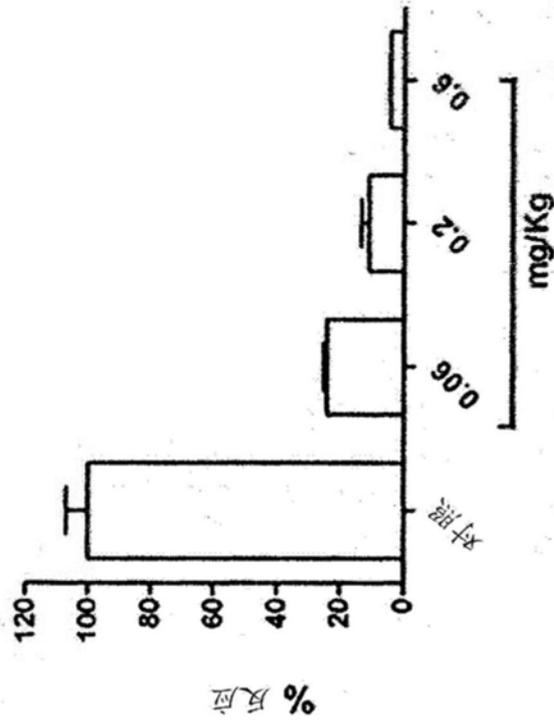


图 3 (A) 腹部脂肪

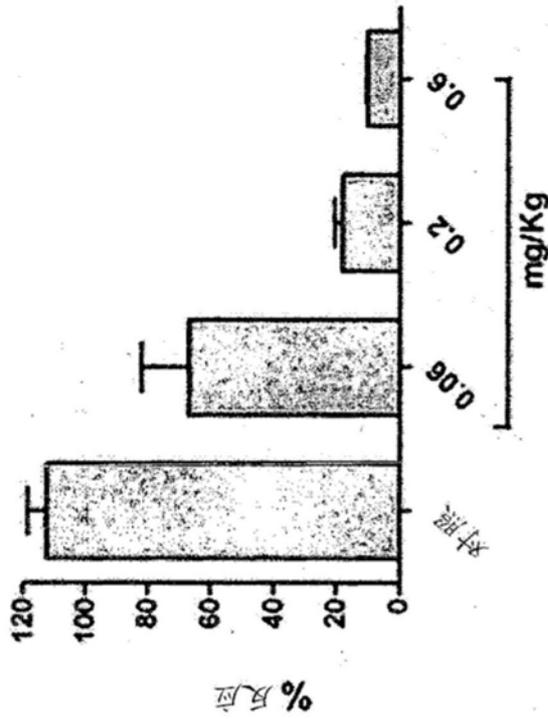


图 3 (D) 主动脉

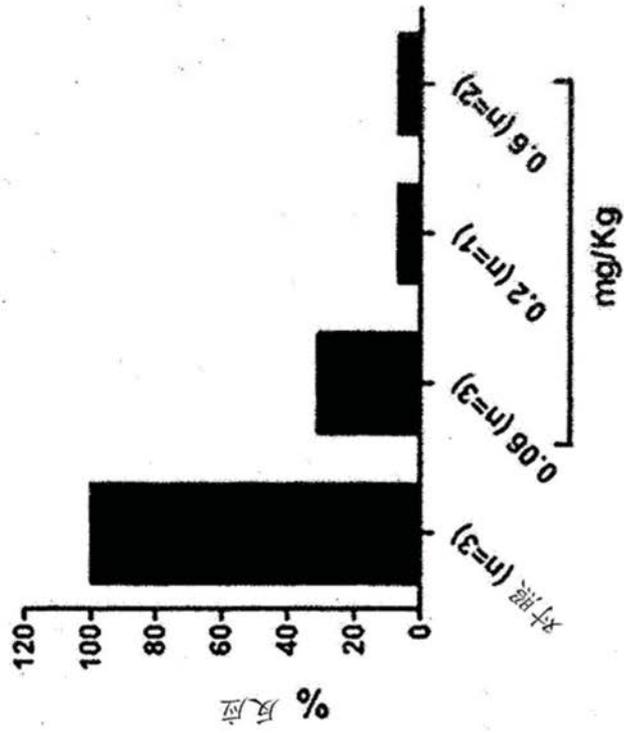
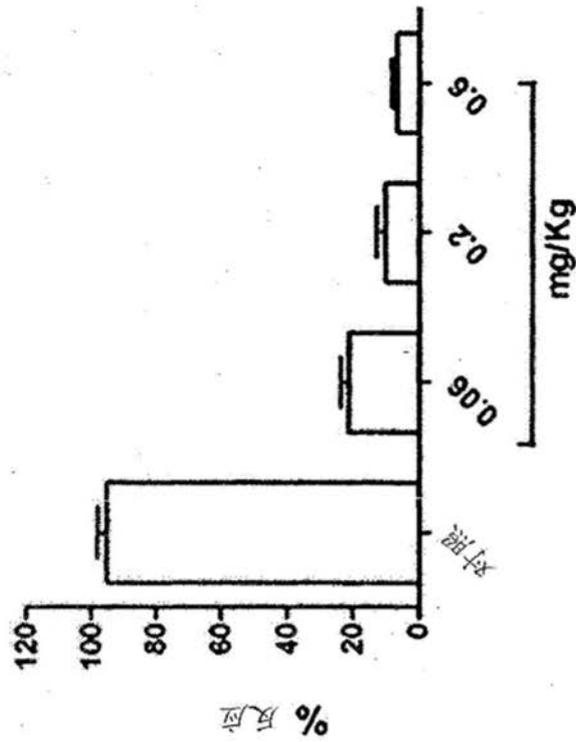


图 3 (C) 肺



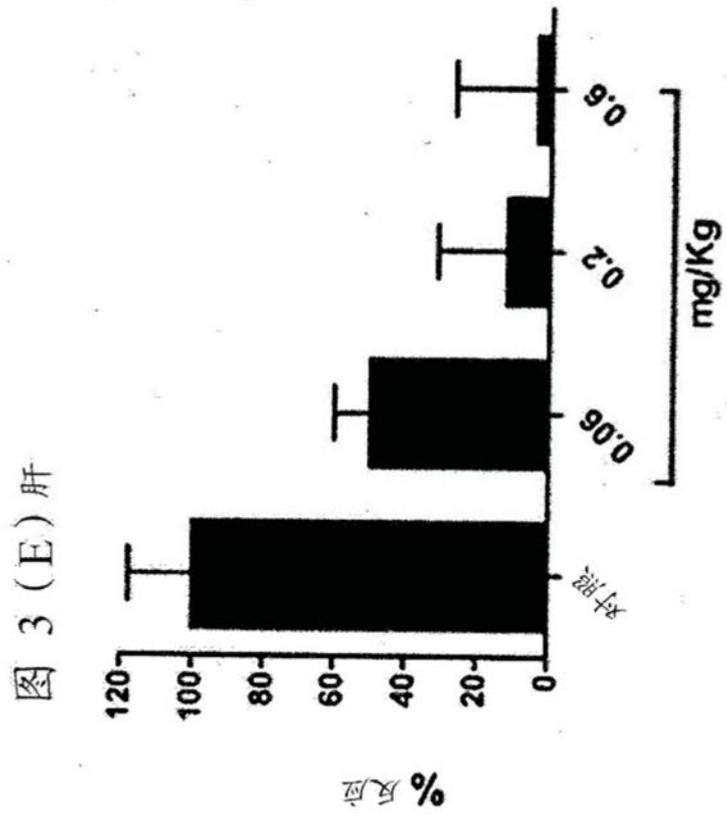


图3

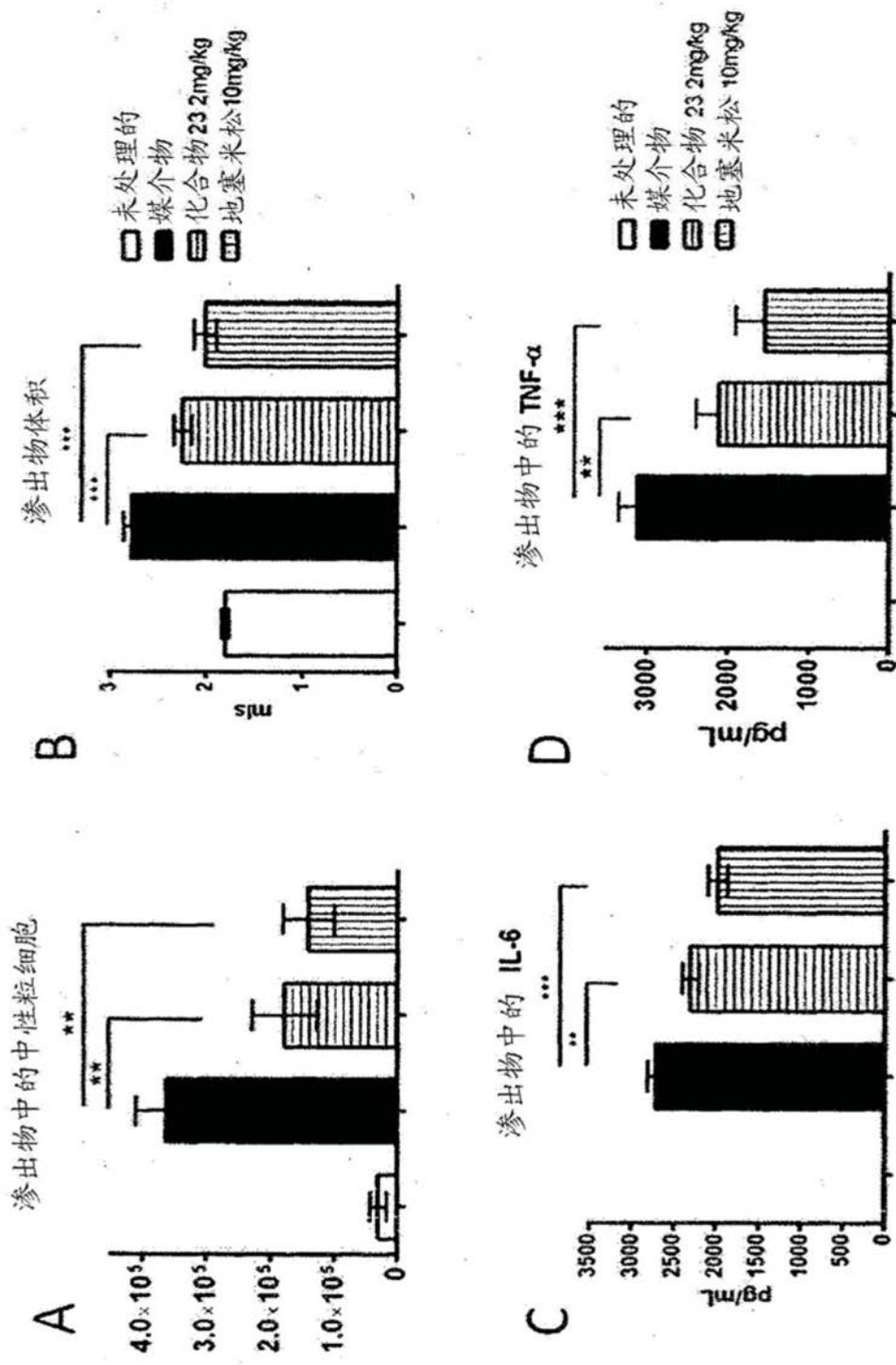


图4

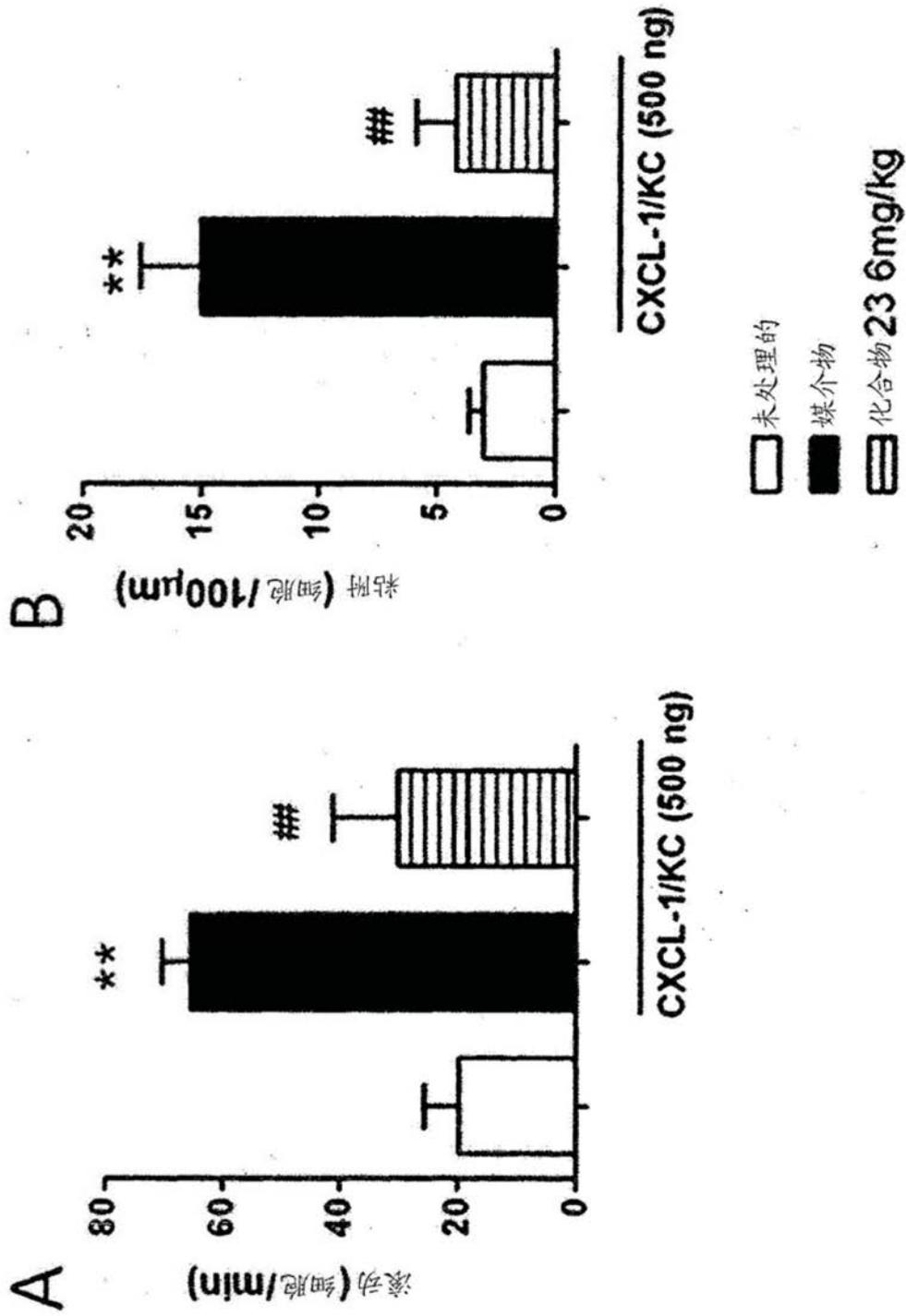


图5

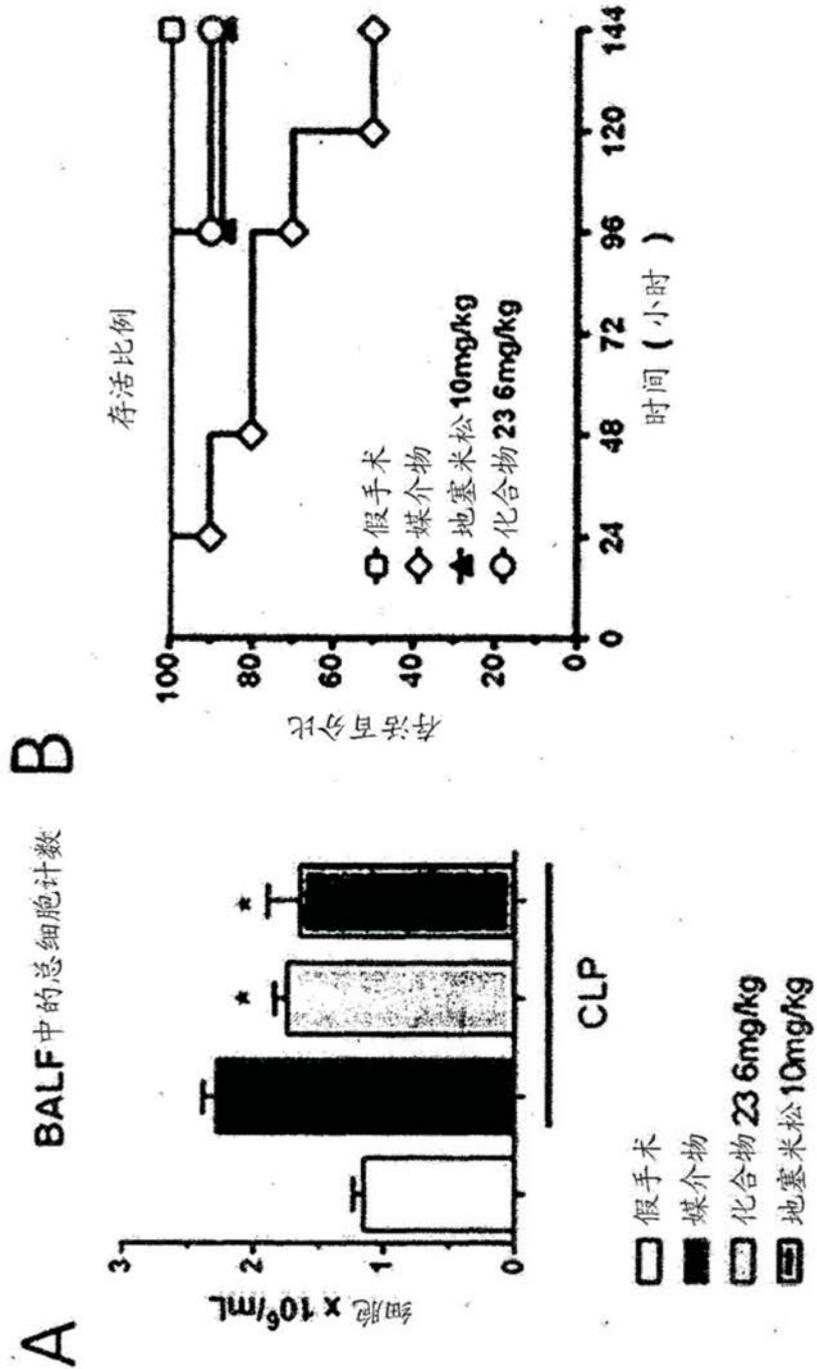


图6

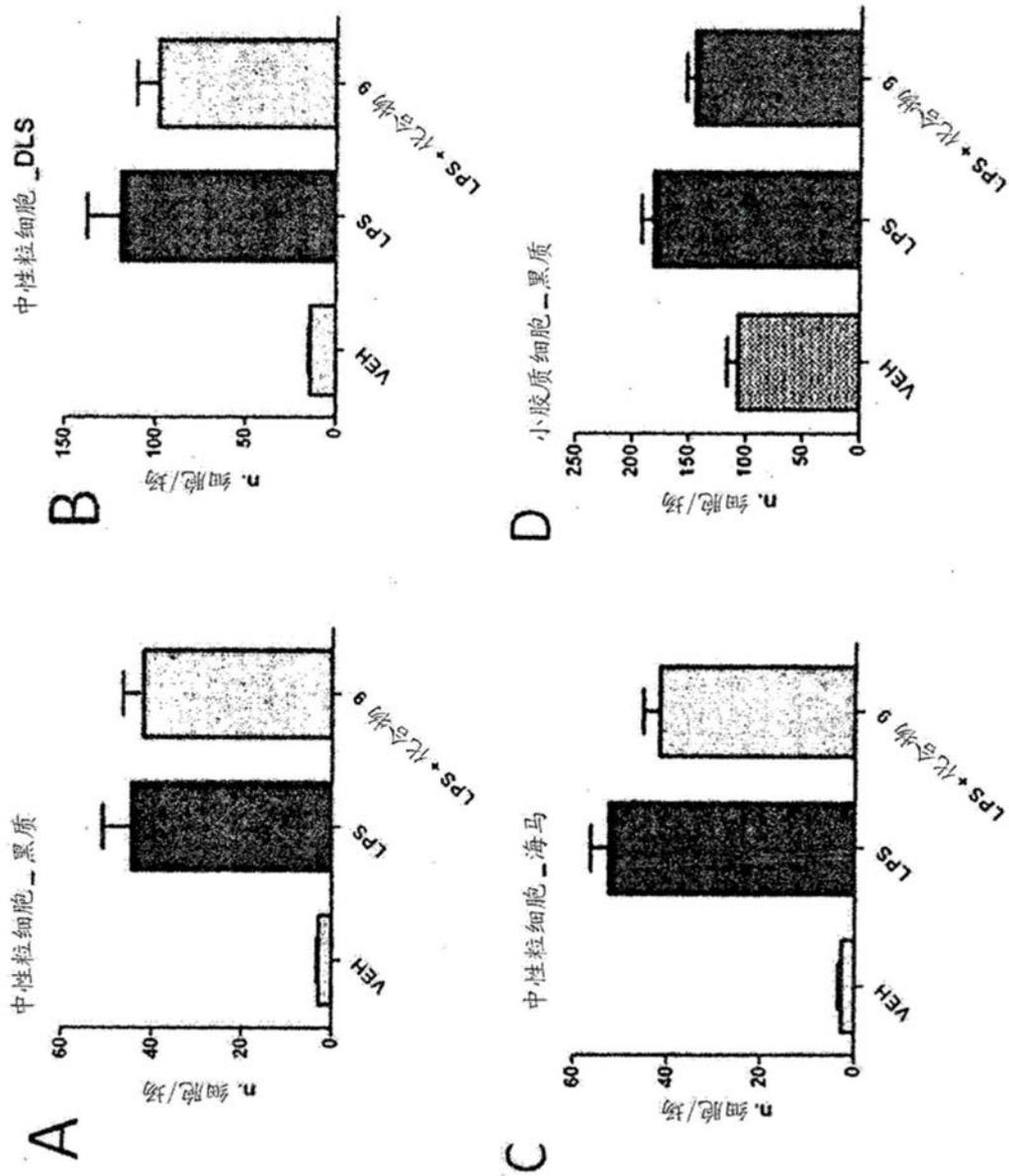


图7

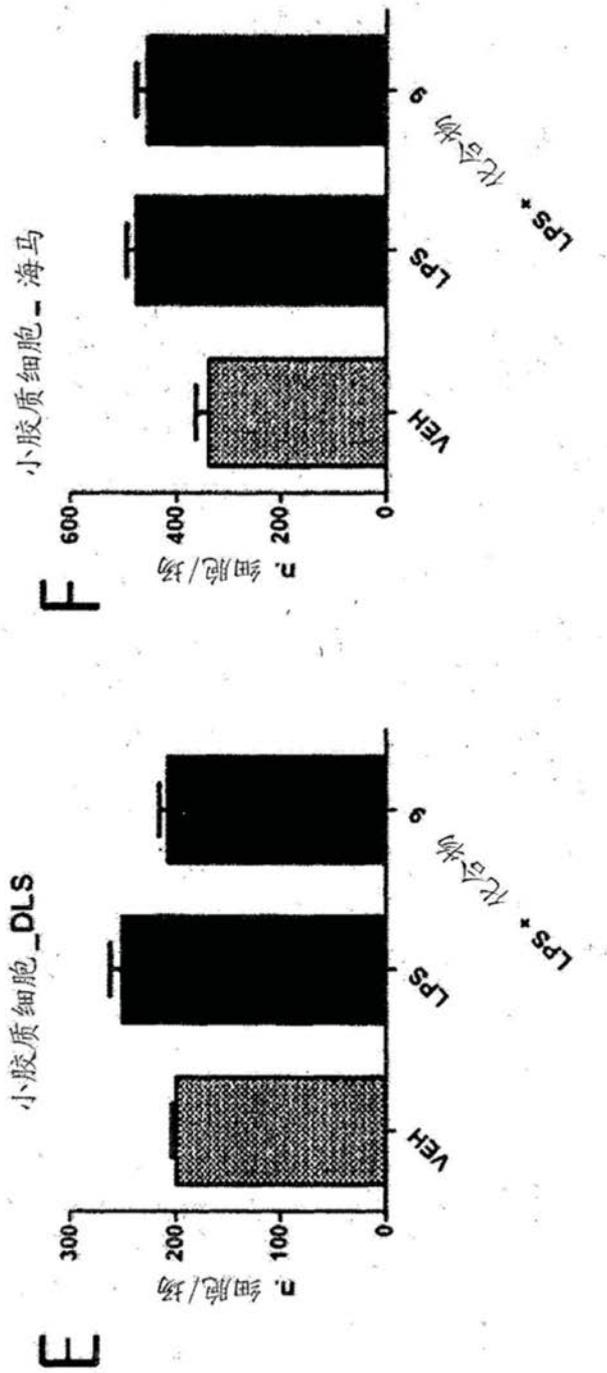


图7

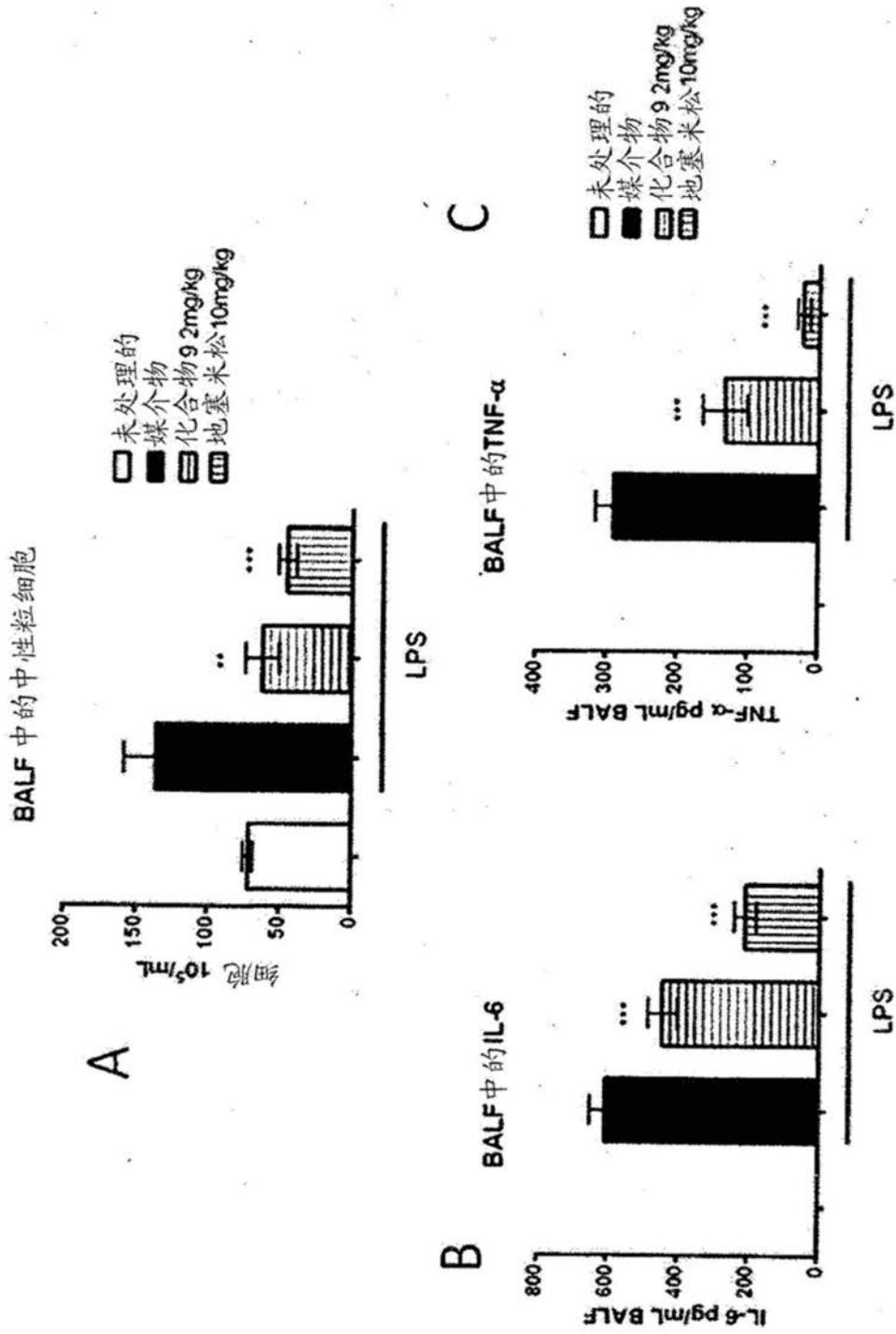


图8

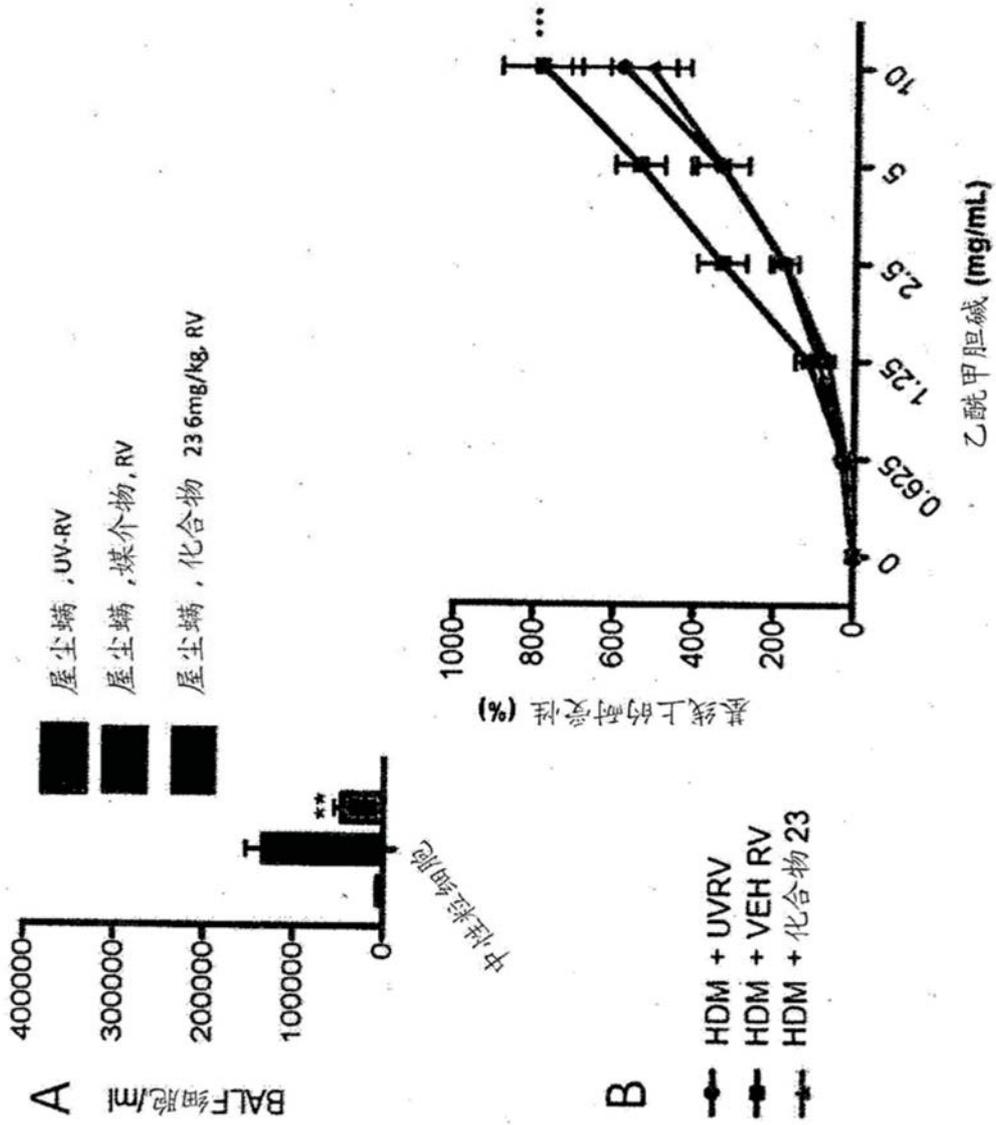


图9

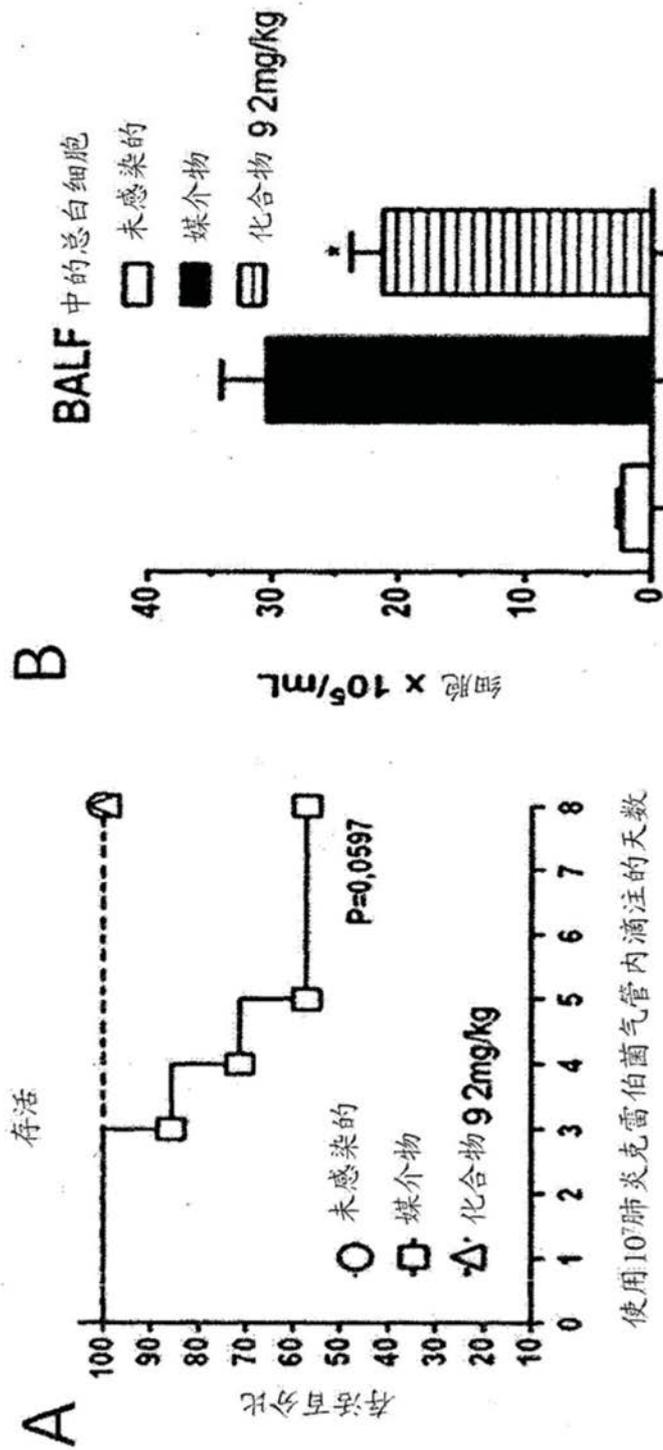


图10

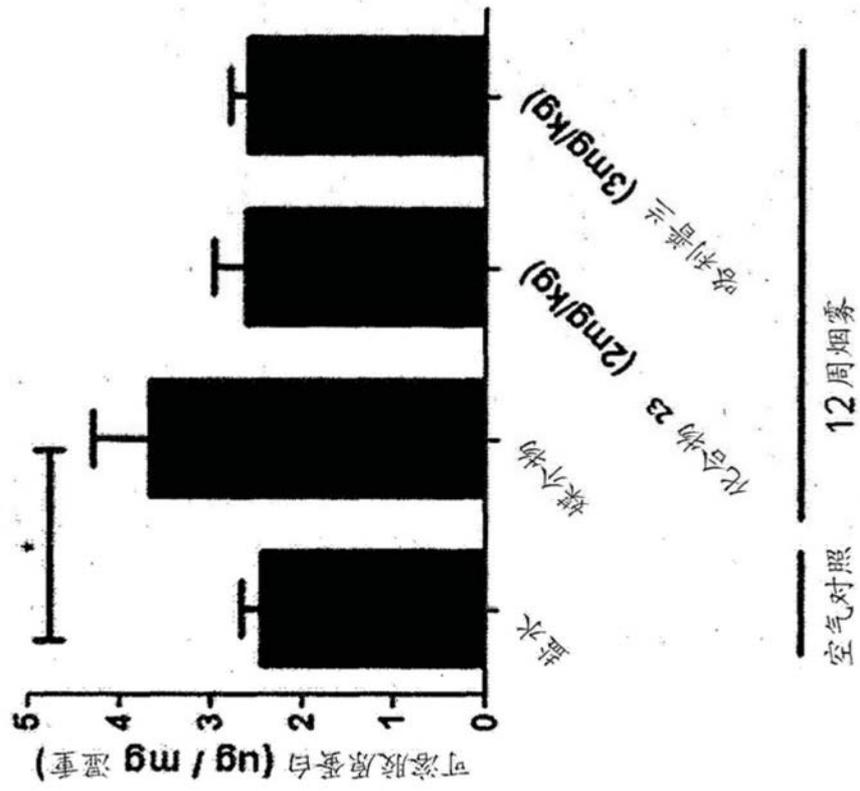


图11

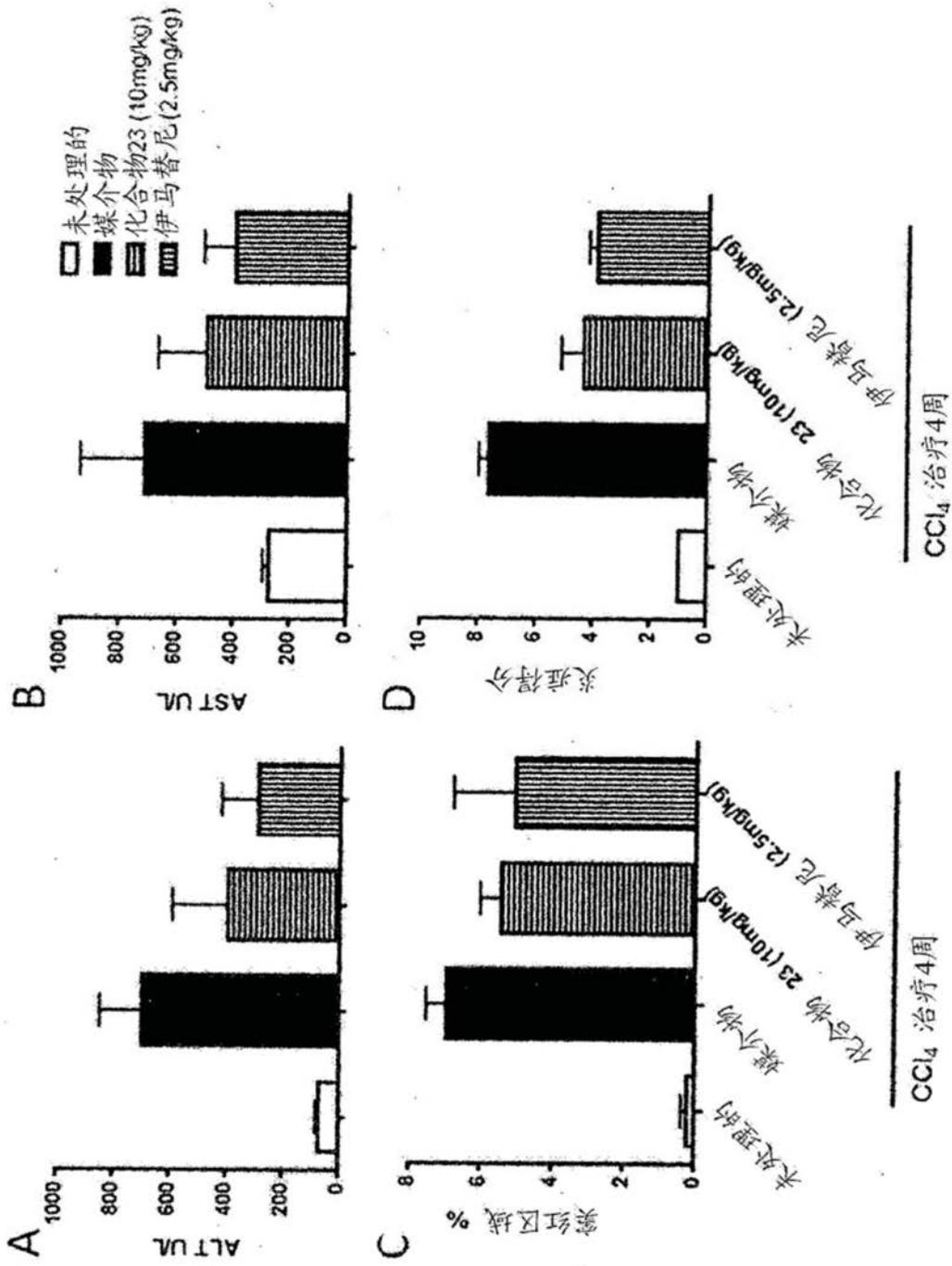


图12

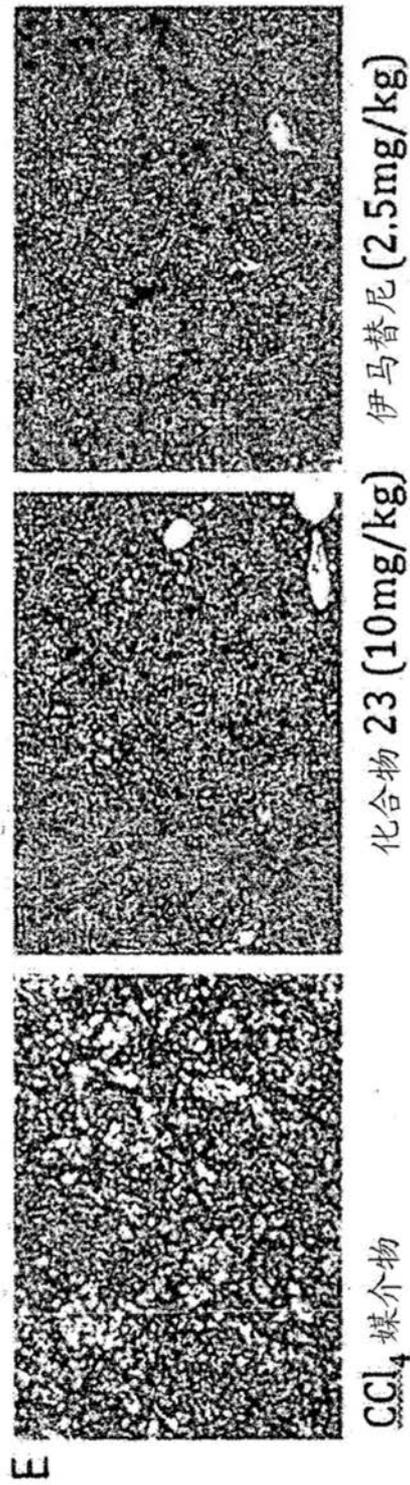


图12

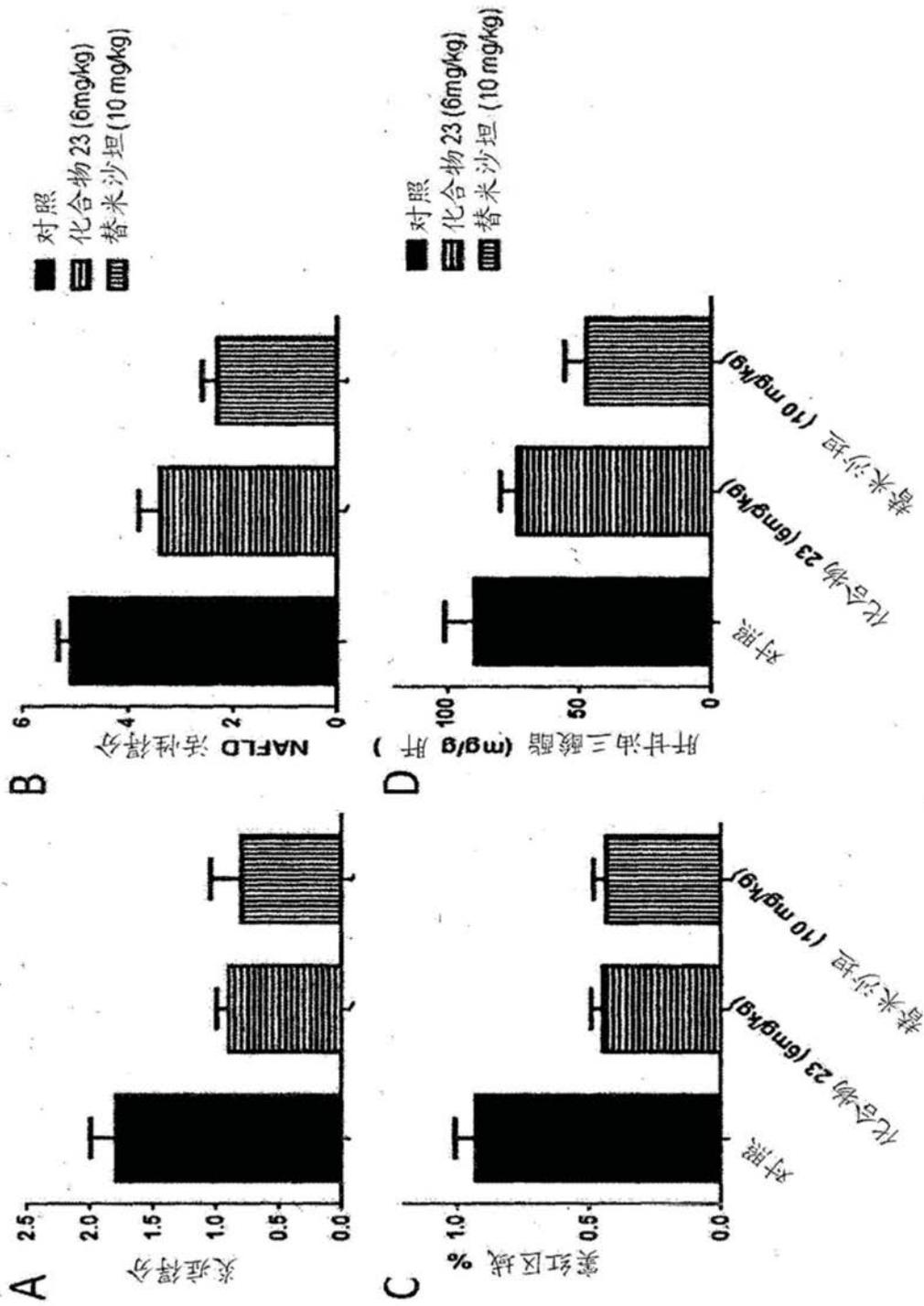


图13

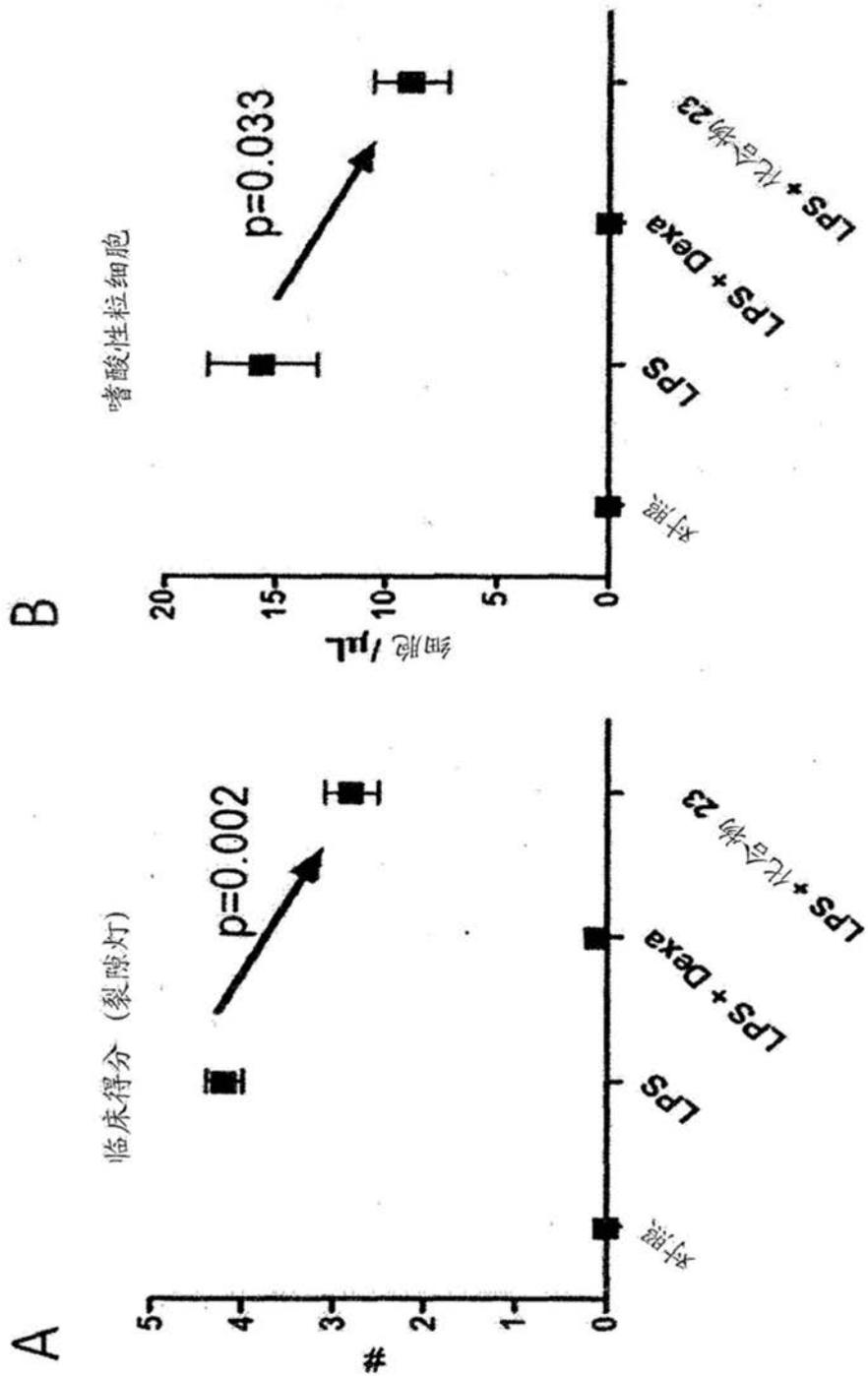


图14