



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102020577 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 13

(21) 申请号 201010520800. 8

A61K 31/196 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 07. 24

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 29/00 (2006. 01)

RM2005A000389 2005. 07. 22 IT

A61P 1/04 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200680030077. 7 2006. 07. 24

(56) 对比文件

US 4522839 , 1985. 06. 11, 说明书第 18 栏第 40 行 .

(73) 专利权人 朱利亚尼国际有限公司

EP 1285908 A1, 2003. 02. 26, 说明书第

地址 爱尔兰都柏林

1-190 段 .

(72) 发明人 G · 纳卡里 S · 巴罗尼

审查员 赵永江

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李华英

(51) Int. Cl.

C07C 229/42 (2006. 01)

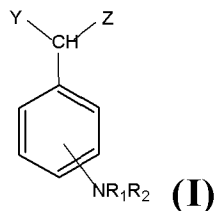
权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 12 页

(54) 发明名称

PPAR 受体和 EGF 受体特异性化合物及其盐以及它们在医药领域中的用途

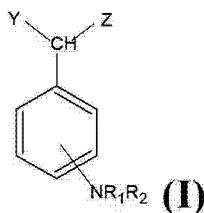
(57) 摘要

本发明涉及包含通式 (I) 的化合物



同, 选自 -H、或者含有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基基团, 或者一起形成含有 5 或 6 个原子的芳香族或脂肪族环; Y 和 Z, 可以相同或不同, 选自 -H、-OH、-COOH、-OR<sub>3</sub>、-CH(OR<sub>3</sub>)COOH, 其中 R<sub>3</sub>选自 H、苯基、苄基、-CF<sub>3</sub>或 -CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>、乙烯基、烯丙基和含有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基基团。

## 1. 通式 (I) 的化合物或其盐



其中

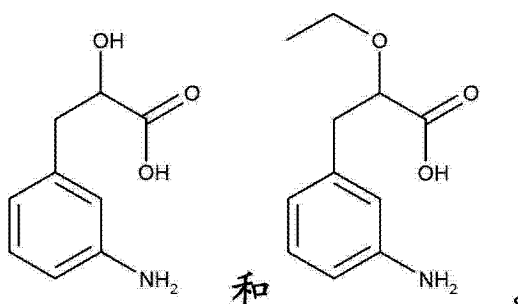
$R_1$  和  $R_2$  都是 -H；

Y 是 -H；

Z 是  $-\text{CH}(\text{OR}_3)\text{COOH}$ ，其中  $R_3$  是 H；且

其中  $\text{NR}_1\text{R}_2$  位于芳族环的 3 位。

## 2. 化合物或其盐，该化合物选自下组化合物：



3. 根据权利要求 1-2 任一项的化合物或其盐，其为对映体纯的 R 或 S 形式。

4. 根据权利要求 1-2 任一项的化合物或 2- 甲氧基 -3-(3' - 氨基苯基) 丙酸或其盐在制备用于预防和治疗表达 PPAR  $\gamma$  受体和 EGF 受体的肿瘤或慢性炎症性疾病的药物产品中的用途。

5. 根据权利要求 4 的用途，所述肿瘤是食道肿瘤、胃肿瘤、胰腺肿瘤、结肠肿瘤、前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、子宫及子宫附件肿瘤、肾肿瘤或肺肿瘤。

6. 根据权利要求 4 的用途，所述慢性炎症性疾病是克罗恩病或溃疡性直肠结肠炎。

7. 根据权利要求 4 - 6 任一项的用途，其中所述化合物的应用是以混合物使用，该混合物中一种对映体以任何比例过量于另一种对映体。

8. 药物组合物，它包含与一种或多种可药用赋形剂或助剂组合的作为活性成分的一种或多种根据权利要求 1-2 任一项的化合物或 2- 甲氧基 -3-(3' - 氨基苯基) 丙酸或其盐。

## PPAR 受体和 EGF 受体特异性化合物及其盐以及它们在医药领域中的用途

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 07 月 24 日、申请号为 200680030077.7、发明名称为“PPAR 受体和 EGF 受体特异性化合物及其盐以及它们在医药领域中的用途”的发明专利申请的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及 PPAR 受体和 EGF 受体特异性化合物及其盐以及它们在医药领域中的用途。

[0003] 发明目的

[0004] 特别地,根据本发明的化合物及其盐可有利地用于预防和治疗表达 PPAR  $\gamma$  受体(过氧化物酶体增生物激活受体)和 EGF 受体(表皮生长因子受体)的肿瘤,如食道肿瘤、胃肿瘤、胰腺肿瘤、结肠肿瘤、前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、子宫及附件肿瘤、肾肿瘤和肺肿瘤。此外,根据本发明的化合物及其盐可用于治疗慢性炎症性疾病,尤其是慢性肠疾病,如克罗恩病和溃疡性直肠结肠炎。

[0005] 发明背景

[0006] PPAR  $\gamma$  受体是核受体(约 50 个转录因子的组),其控制多种基因的表达,这些基因对于调节脂类代谢、胰岛素合成以及致癌作用和炎症过程是重要的。(Bull AW, Arch Pathol Lab Med 2003 ;127 :1121-1123) (Koeffler HP, Clin Cancer Res 2003 ;9 :1-9) (Youssef J 等人, J Biomed Biotech 2004 ;3 :156-166)。

[0007] 有各种与 PPAR  $\gamma$  受体结合并改变其构象,产生激活作用的天然和合成激动剂。天然和合成的配体描述于 The Lancet 2002 ;360 :1410-1418。

[0008] 最近的研究已显示肿瘤细胞用 PPAR  $\gamma$  受体的配体处理诱发细胞增生、细胞分化和编程性细胞死亡的降低,表明这类化合物作为预防致癌作用的潜在应用 (Osawa E 等人, Gastroenterology 2003 ;124 : 361-367)。

[0009] 其它研究已显示在 IBD 动物模型中 PPAR  $\gamma$  受体的配体(例如曲格列酮)具有抗炎作用并抑制粘膜炎性反应 (Tanaka T 等人, Cancer Res 2001 ;61 :2424-2428)。

[0010] 此外,最近已公开的证据表明,5-ASA(即 IBD 治疗中的金标准)的肠内抗炎活性依赖于 PPAR  $\gamma$  受体的结合及随后激活 (Rousseaux C 等人, J Exp Med 2005 ;201 : 1205-1215)。

[0011] 在各种类型的肿瘤中具有酪氨酸激酶 EGF 活性的跨膜受体以被活化的形式极高程度地表达 (Mendelsohn J, Endocr Relat Cancer 2001 ;8 :3-9) (Harari PM, Endocr Relat Cancer 2004 ;11 :689-708)。

[0012] 受体的过表达还与癌细胞潜在的转移能力相关。关于这一点,已证明了 EGF 在与细胞外基质相互作用的水平上促进与病变相关的各种细胞类型的迁移和侵袭力 (Brunton 等, Oncogene 1997 ;14 :283-293)。

[0013] 在实验室动物和人类中进行的许多研究已确立了 EGF 受体的抑制剂在控制增殖

和肿瘤扩散中的功效 (Mendelsohn J, Endocr Relat Cancer 2001 ;8 :3-9) (Harari PM, Endocr Relat Cancer 2004 ;11 :689-708)。

[0014] 毫无疑问,通过 EGF 受体激活激发的细胞内信号促进肿瘤细胞的生长和存活,有助于病理状况的发展,并且这类信号在确定肿瘤细胞扩散和移生至远端器官的能力中是必要的。(Mendelsohn J, Endocr Relat Cancer 2001 ;8 :3-9) (Kari C 等人, Cancer Res 2003 ;63 :1-5)。

[0015] 根据前述内容并且此外考虑到根据生物学观点,慢性炎症过程参与致癌作用,很清楚存在对新化学实体的创新研究的实际需要,所述新化学实体通过其对 PPAR  $\gamma$  受体和 EGF 受体的互补作用能发挥化学预防、抗增殖和抗转移类型的抗炎和抗肿瘤作用。

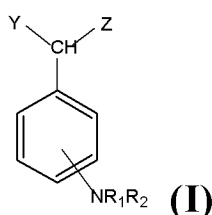
[0016] 本发明提供了通过调节特异性受体如 PPAR  $\gamma$  受体和 EGF 受体而适合于预防和治疗癌症和慢性炎症的新的一类化合物。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明涉及一系列化合物的新颖的和创造性的医药和治疗用途。就这些化合物中的任何一个都是未知的来说,本发明还涉及这些化合物。

[0019] 本发明涉及包含通式 (I) 的化合物

[0020]



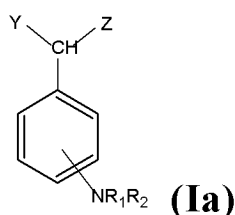
[0021] 其中

[0022]  $R_1$  和  $R_2$ , 可以相同或不同,选自 -H、或者含有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基基团,或者一起形成含有 5 或 6 个原子的芳香族或脂肪族环;

[0023] Y 和 Z, 可以相同或不同,选自 -H、-OH、-COOH、-OR<sub>3</sub>、-CH(OR<sub>3</sub>)COOH, 其中 R<sub>3</sub> 选自 H、苯基、苄基、-CF<sub>3</sub> 或 -CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>、乙烯基、烯丙基和含有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基基团。

[0024] 本发明还涉及通式 (Ia) 的化合物亚群

[0025]



[0026] 其中

[0027]  $R_1$  和  $R_2$ , 可以相同或不同,选自 -H 或者含有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基基团;

[0028] Y 和 Z, 可以相同或不同,选自 -H、-OH、-COOH、-OR<sub>3</sub>、-CH(OR<sub>3</sub>)COOH, 其中 R<sub>3</sub> 选自 -H 和含有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基基团。

[0029] 在本发明的一些实施方案中, Z 和 Y 是不同的。在本发明的一些实施方案中, Y 或 Z 中至少一个以 -COOH 结尾。因此,在本发明的一些实施方案中, Y 或 Z (以及在一些实施方案中 Y 或 Z 中至少一个,和在一些实施方案中, Y 或 Z 中仅有一个) 是 -COOH。在本发明的

一些实施方案中, Y 或 Z ( 以及在一些实施方案中 Y 或 Z 中至少一个, 和在一些实施方案中, Y 或 Z 中仅有一个 ) 是  $-\text{CH}(\text{OR}_3)\text{COOH}$ 。

[0030] 本发明还涉及根据式 (I) 和 (Ia) 的化合物, 除其中 Y 和 Z, 可以相同或不同, 选自  $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OR}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{OR}_3)\text{COOH}$  以外。因此, 在本发明的一些实施方案中, Z 或 Y 可以不是  $-\text{OH}$ 。在本发明的这类实施方案中, 排除化合物 10 和 11。

[0031] 在本发明的一些实施方案中, 当 Y 是  $-\text{H}$  且 Z 是  $-\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$  时, 基团  $\text{NR}_1\text{R}_2$  连接于 3' 位。因此, 在本发明的一些实施方案中, 排除化合物 21。

[0032] 本发明的其它实施方案中, 当 Z 是  $-\text{OCH}_3$  且 Y 是  $-\text{COOH}$  时, 基团  $\text{NR}_1\text{R}_2$  连接于 4' 位。因此, 在本发明的一些实施方案中, 排除化合物 22。

[0033] 在本发明的一些实施方案中, 当 Y 是  $-\text{H}$  且 Z 是  $-\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{COOH}$  时, 基团  $\text{NR}_1\text{R}_2$  连接于 4' 位。因此, 在本发明的一些实施方案中, 排除化合物 35。

[0034] 特别地, 上述含有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基基团可选自  $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{C}\text{H}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ , 其中 n 是烷基链中的碳原子数。

[0035] 式 (I) 和式 (Ia) 化合物可选自:

[0036] 3-(3' - 氨基苯基)2- 羟基丙酸 ( 化合物 20)

[0037] 2-(4- 氨基苯基)2- 甲氧基乙酸 ( 化合物 23)

[0038] 2-(3- 氨基苯基)2- 乙氧基乙酸 ( 化合物 32)

[0039] 2-(4- 氨基苯基)2- 乙氧基乙酸 ( 化合物 33)

[0040] 3-(4' - 氨基苯基)2- 甲氧基丙酸 ( 化合物 34)

[0041] 3-(4' - 氨基苯基)2- 乙氧基丙酸 ( 化合物 39)

[0042] 3-(3' - 氨基苯基)2- 乙氧基丙酸 ( 化合物 40)。

[0043] 上述化合物名称也可写成如下的标准化学名称 ( 该名称将在整篇文章中使用 ):

[0044] (±)-2- 羟基 -3-(3' - 氨基苯基) 丙酸 ( 化合物 20)

[0045] (±)-2- 甲氧基 -2-(4' - 氨基苯基) 乙酸 ( 化合物 23)

[0046] (±)-2- 乙氧基 -2-(3' - 氨基苯基) 乙酸 ( 化合物 32)

[0047] (±)-2- 乙氧基 -2-(4' - 氨基苯基) 乙酸 ( 化合物 33)

[0048] (±)-2- 甲氧基 -3-(4' - 氨基苯基) 丙酸 ( 化合物 34)

[0049] (±)-2- 乙氧基 -3-(4' - 氨基苯基) 丙酸 ( 化合物 39)

[0050] (±)-2- 乙氧基 -3-(3' - 氨基苯基) 丙酸 ( 化合物 40)。

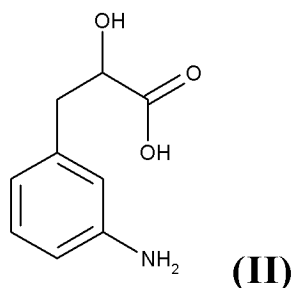
[0051] 根据本发明的化合物可以有利地用于医药领域。因此, 本发明涉及包含一种或多种如上文所定义的作为有效成分的化合物与一种或多种可药用赋形剂或助剂组合的药物组合物。

[0052] 此外, 本发明涉及如上文所定义的化合物用于制备用于预防和/或治疗表达 PPAR  $\gamma$  受体和 EGF 受体的肿瘤的药物的用途, 所述肿瘤例如食道肿瘤、胃肿瘤、胰腺肿瘤、结肠肿瘤、前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、子宫及其附件肿瘤、肾肿瘤和肺肿瘤。

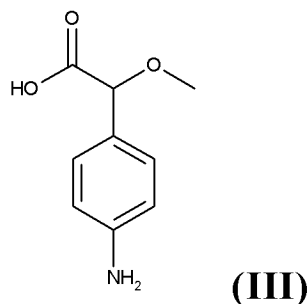
[0053] 此外, 本发明涉及根据本发明的化合物用于制备用于治疗慢性炎症性疾病的药物的用途, 所述炎症性疾病例如克罗恩病和溃疡性结肠炎。

[0054] 特别地, 可用于上述应用中的根据本发明的化合物, 除已经描述的以外, 可以是如下化合物:

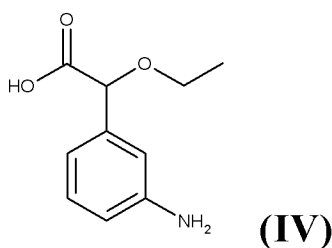
- [0055] (R, S)-2-羟基-2-(3-氨基苯基)乙酸(化合物 10)  
 [0056] (R, S)-2-羟基-2-(4-氨基苯基)乙酸(化合物 11)  
 [0057] (R, S)-2-羟基-3-(4'-氨基苯基)丙酸(化合物 21)  
 [0058] (R, S)-2-甲氧基-3-(3'-氨基苯基)丙酸(化合物 35)  
 [0059] (R, S)-2-甲氧基-3-(3-氨基苯基)丙酸(化合物 34)。  
 [0060] 上述化合物名称也可写成如下的标准化学名称(该名称将在整篇文章中使用):  
 [0061] (±)-2-羟基-2-(3'-氨基苯基)乙酸(化合物 10)  
 [0062] (±)-2-羟基-2-(4'-氨基苯基)乙酸(化合物 11)  
 [0063] (±)-2-羟基-3-(4'-氨基苯基)丙酸(化合物 21)  
 [0064] (±)-2-甲氧基-3-(3'-氨基苯基)丙酸(化合物 35)  
 [0065] (±)-2-甲氧基-3-(4'-氨基苯基)丙酸(化合物 34)。  
 [0066] 根据一个实施方案,根据下式(II),式(I)化合物的R<sub>3</sub>可以是H  
 [0067]



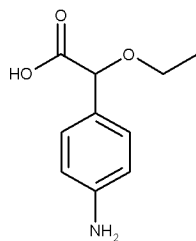
- [0068] 而R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、X和Y如上文所定义。  
 [0069] 根据另一个实施方案,根据下式(III),式(I)化合物的R<sub>3</sub>可以是-CH<sub>3</sub>  
 [0070]



- [0071] 而R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、X和Y如上文所定义。  
 [0072] 根据另一个实施方案,根据下式(IV),式(I)化合物的R<sub>3</sub>可以是-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 [0073]



- [0074] 而R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、X和Y如上文所定义。  
 [0075] 根据另一个实施方案,根据下式(V),式(I)化合物的R<sub>3</sub>可以是-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 [0076]

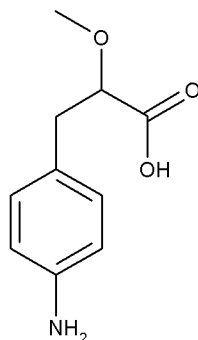


(V)

[0077] 而  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $X$  和  $Y$  如上文所定义。

[0078] 根据另一个实施方案,根据下式 (VI),式 (I) 化合物的  $R_3$  可以是  $-\text{CH}_3$

[0079]

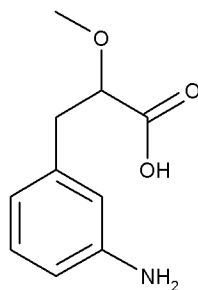


(VI)

[0080] 而  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $X$  和  $Y$  如上文所定义。

[0081] 根据另一个实施方案,根据下式 (VI),式 (I) 化合物的  $R_3$  可以是  $-\text{CH}_3$

[0082]

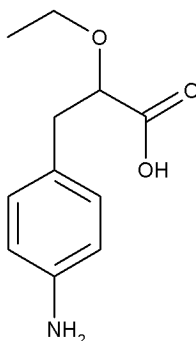


(VI)

[0083] 而  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $X$  和  $Y$  如上文所定义。

[0084] 根据另一个实施方案,根据下式 (VII),式 (I) 化合物的  $R_3$  可以是  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$

[0085]

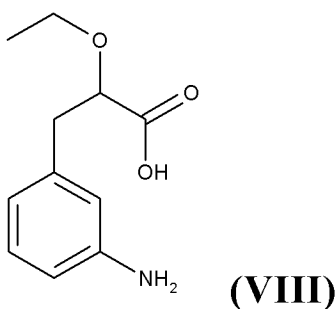


(VII)

[0086] 而  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $X$  和  $Y$  如上文所定义。

[0087] 根据另一个实施方案,根据下式 (VIII),式 (I) 化合物的  $R_3$  可以是  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$

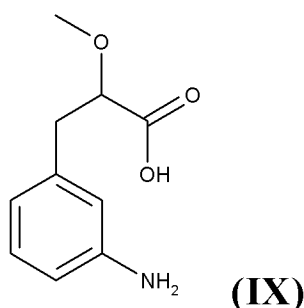
[0088]



[0089] 而  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $X$  和  $Y$  如上文所定义。

[0090] 根据另一个实施方案,根据下式 (IX),式 (I) 化合物的  $R_3$  可以是  $-\text{CH}_3$

[0091]



[0092] 而  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $X$  和  $Y$  如上文所定义。

[0093] 优选地,式 (I) 化合物可以选自:

[0094] (±)-2-羟基-3-(3'-氨基苯基)丙酸(化合物 20)

[0095] (±)-2-甲氧基-2-(4'-氨基苯基)乙酸(化合物 23)

[0096] (±)-2-乙氧基-2-(3'-氨基苯基)乙酸(化合物 32)

[0097] (±)-2-乙氧基-2-(4'-氨基苯基)乙酸(化合物 33)

[0098] (±)-2-甲氧基-3-(4'-氨基苯基)丙酸(化合物 34)

[0099] (±)-2-乙氧基-3-(4'-氨基苯基)丙酸(化合物 39)

[0100] (±)-2-乙氧基-3-(3'-氨基苯基)丙酸(化合物 40)。

[0101] 根据本发明的化合物可有利地用于医药领域。因此,本发明涉及包含一种或多种如上文所定义的作为有效成分的化合物与一种或多种可药用赋形剂或助剂组合的药物组合物。

[0102] 此外,本发明涉及如上文所定义的化合物用于制备用于预防和/或治疗表达 PPAR  $\gamma$  受体和 EGF 受体的肿瘤的药物的用途,所述肿瘤例如食道肿瘤、胃肿瘤、胰腺肿瘤、结肠肿瘤、前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、子宫及其附件肿瘤、肾肿瘤和肺肿瘤。

[0103] 此外,本发明涉及根据本发明的化合物用于制备用于治疗慢性炎症性疾病的药物的用途,所述炎症性疾病例如克罗恩病和溃疡性结肠炎。本发明还涉及治疗人类和/或哺乳动物(包括啮齿类动物、家畜、家养宠物、小鼠、大鼠、仓鼠、兔、犬、猫、猪、羊、奶牛、马)的方法。

[0104] 特别地,可用于上述应用中的根据本发明的化合物,除已经描述的以外,可以是如下化合物:

[0105] (±)-2-羟基-2-(3-氨基苯基)乙酸(化合物 10)

[0106] (±)-2-羟基-2-(4-氨基苯基)乙酸(化合物 11)



[0107] (±)-2-羟基-3-(4'-氨基苯基)丙酸(化合物 21)

[0108] (±)-2-甲氧基-3-(3'-氨基苯基)丙酸(化合物 35)

[0109] (±)-2-甲氧基-3-(4'-氨基苯基)丙酸(化合物 34)。

[0110] 所述化合物的使用不限于其以外消旋形式的使用。本发明延及任何所述化合物以对映体纯的 R 或 S 形式的使用,或以其中一种对映体超过另一种,以任何比例的任何混合物使用。

[0111] 实际上,完成的对接研究表明 S 对映体较 R 对映体更有活性,尽管纯 R 对映体确实显示出活性。

[0112] 本发明的分子得自使用美沙拉秦作为基础的分子建模工作,并且评价了所有化学上可行的变化,以便在计算机对接实验中得到最好的分数(受体的亲和力和激活)。结果,认为显示与美沙拉秦功能和/或活性相当的本发明化合物通过相似的生物学途径发挥作用。有人认为本发明的分子中固有的与美沙拉秦相似的特性赋予了该分子与 EGF 途径相关的相似活性。

[0113] 本文所提供的实施例是用于预测所述化合物在各种已经讨论的医药领域中的用途的有用模型。因此,不管其作用机理,该模型提供了有价值和有意义的结果。

[0114] 除上文提及的化合物以外,本发明还提供了以下化合物的用途:

[0115] 10

11

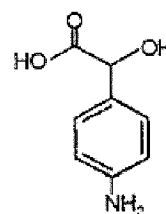
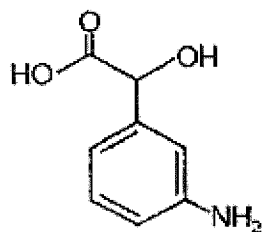
[0116] (R, S) 2-羟基-2-(3-氨基苯基)

(R, S) 2-羟基-2-(4-氨基苯基)

[0117] 乙酸

乙酸

[0118]



[0119] 21

22

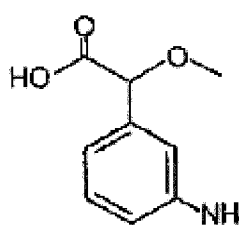
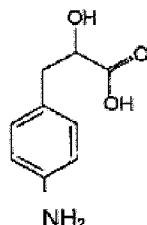
[0120] (R, S) 2-羟基-3-(4'-氨基苯基)

(R, S) 2-甲氧基-2-(3-氨基苯基)

[0121] 丙酸

基)乙酸

[0122]



[0123] 根据其优选的实施方案,特别参照附图中的图表,为了举例说明的目的,现在将描述本发明,但不限于此。

[0124] 附图和表格简述

[0125] 表 1:由指定化合物的分级剂量(0.5-10mM)抑制 DLD-1 细胞的百分数。细胞在化合物存在或缺乏下培养,然后在 48 小时培养后通过比色(BrdU)测定法评价细胞生长。

[0126] 图 1 显示了化合物 20、23、32、33、34、35、39 和 40 的结构。

[0127] 图 2 :经用化合物处理的 PPAR  $\gamma$  的活性。

[0128] 图 3-4 :指定物质对人结肠癌细胞系 (即 HT29、HT115 和 DLD1) 增殖的作用。细胞用增加性浓度的物质 (0.5-10mM) 处理 48 小时,使用用于测量 BrdU 结合的比色测定法确定增殖。使用 ELISA 读出器在 450nm 处测定光密度 (OD)。数据表明 3 次单独实验的平均值  $\pm$  SD。

[0129] 图 5 : (R) 化合物 34 和 PPAR  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢键合)。

[0130] 图 6 : (S) 化合物 34 和 PPAR  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢键合)。

[0131] 图 7 : (R) 化合物 35 和 PPAR  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢键合)。

[0132] 图 8 : (S) 化合物 35 和 PPAR  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢键合)。

[0133] 图 9 : (R) 化合物 39 和 PPAR  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢键合)。

[0134] 图 10 : (S) 化合物 39 和 PPAR  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢键合)。

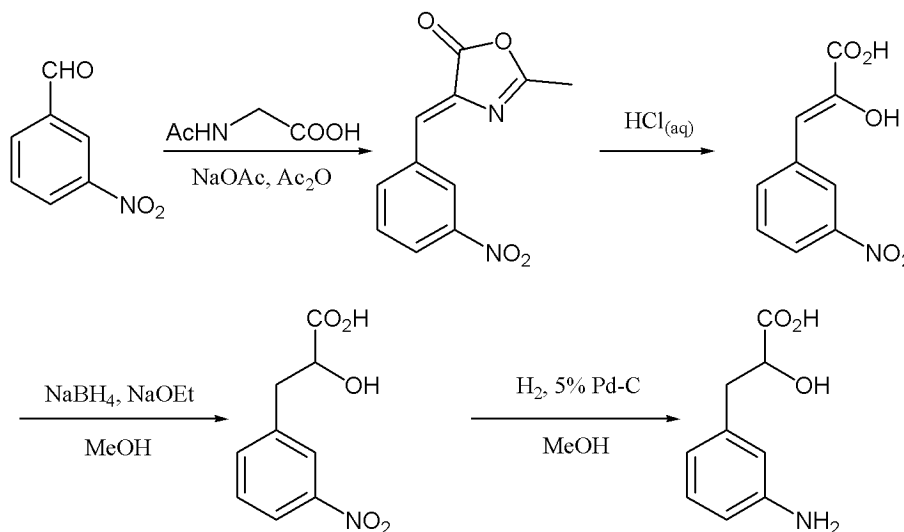
[0135] 图 11 :美沙拉秦和 PPAR  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢键合)。

[0136] 图 12 :化合物 39 的合成图示和随后的拆分。

[0137] 实施例 1

[0138] 制备 (±)-2-羟基-3-(3'-氨基苯基)-丙酸 (化合物 20) 的方法

[0139]



[0140] 步骤 1

[0141] 将 3-硝基苯甲醛 (45.3g, 0.3mol)、N-乙酰甘氨酸 (42.1g, 0.36mol) 和乙酸钠 (32g, 0.39mol) 与乙酸酐 (142ml, 1.5mol) 混合,并将得到的混合物在搅拌下加热至 120°C 保持 6 小时,得到深色溶液。然后,将混合物冷却至室温过夜,致形成沉淀的固体。将反应混合物倾入到冰水 (130g) 中,经过滤收集得到的悬浮固体。粗制固体产物 (72g) 用丙酮 (80ml) 洗涤,然后从热丙酮 (320ml) 重结晶,得到晶状固体,该晶状固体用 50% 乙醇水溶液洗涤,然后于 40°C /40mmHg 干燥,得到淡黄色针状的 2-甲基-4-(3-硝基亚苄基)噁唑-5(4H)-酮 (49.0g, 78%)。

[0142]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) = 2.47 (3H, s), 7.15 (1H, s), 7.63 (1H, dd, 8.2&7.6Hz), 8.27 (1H, d, 8.2Hz), 8.34 (1H, d, 7.6Hz), 9.02 (1H, s)。

[0143] 步骤 2

[0144] 将 2-甲基-4-(3-硝基亚苄基)噁唑-5(4H)-酮 (52.0g, 0.224mol) 与 3M 盐酸 (1.3L) 混合, 并将混悬液于 100°C 搅拌 6 小时。得到的混悬液于室温搅拌过夜, 然后经过滤收集悬浮固体, 用水 (2×40ml) 洗涤, 然后在真空中干燥, 得到 2-羟基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸 (29.3g)。合并的滤液和洗涤物用乙酸乙酯 (4×0.5L) 萃取, 然后将合并的有机提取物经硫酸钠干燥, 并浓缩至干燥, 得到另一批量的 2-羟基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸 (12.0g)。2-羟基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸的总收率为 41.3g (88%)。

[0145]  $^1\text{H NMR}(\delta, 250\text{MHz}, \text{DMSO-d}_6) = 6.56(1\text{H}, \text{s}), 7.64(1\text{H}, \text{t}, 8\text{Hz}), 8.0-8.1(2\text{H}, \text{m}), 8.78(1\text{H}, \text{s}), 9.95(1\text{H}, \text{brs}), 12.80(1\text{H}, \text{brs})$ 。

[0146] 步骤 3

[0147] 将乙醇钠 (1.8g, 26.4mmol) 于 0°C 分批加入到搅拌的 2-羟基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸 (5.25g, 25.0mmol) 在甲醇 (131ml) 中的溶液中, 形成澄清的淡黄色溶液。然后, 将硼氢化钠 (1g, 26.4mmol) 分成两份小心加入, 该混合物于 5-10°C 搅拌 30 分钟。然后加入少量水以猝灭反应并破坏任何过量的  $\text{NaBH}_4$ 。真空中除去甲醇, 得到固体残余物, 其与乙酸乙酯和庚烷的 5 : 2 混合物 (21ml) 磨细, 然后用 3% 甲醇水溶液进一步磨细。经过滤收集得到的固体, 并在真空中干燥, 得到 2-羟基-3-(3-硝基苯基)丙酸 (3.0g, 57%)。

[0148]  $^1\text{H NMR}(\delta, 250\text{MHz}, \text{DMSO-d}_6) = 2.97(1\text{H}, \text{dd}, 14\&8.2\text{Hz}), 3.15(1\text{H}, \text{dd}, 14\&4.2\text{Hz}), 4.23(1\text{H}, \text{dd}, 8.2\&4.2\text{Hz}), 7.58(1\text{H}, \text{t}, 8\text{Hz}), 7.70(1\text{H}, \text{d}, 8\text{Hz}), 8.0-8.15(2\text{H}, \text{m})$ 。

[0149] 步骤 4

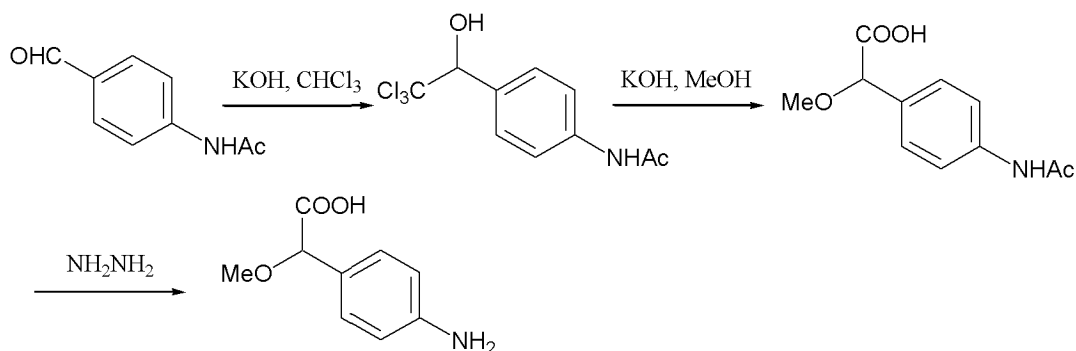
[0150] 将 2-羟基-3-(3-硝基苯基)丙酸 (3.0g, 14.2mmol)、甲醇 (129ml) 和 5% 活性炭上钯 (600mg, 2mol%) 的混合物在 10psi  $\text{H}_2$  气氛中氢化 1 小时。然后将该混合物经硅藻土过滤, 滤饼用甲醇洗涤, 于 40°C 在高真空下浓缩滤液, 得到泡沫状固体产物。将其溶解于水中, 冷冻干燥该溶液, 得到白色固体 (±)-2-羟基-3-(3'-氨基苯基)-丙酸 (2.6g, 100%)。

[0151]  $^1\text{H NMR}(\delta, 250\text{MHz}, \text{DMSO-d}_6) = 2.61(1\text{H}, \text{dd}, 13.6\&8.3\text{Hz}), 2.81(1\text{H}, \text{dd}, 13.6\&4.6\text{Hz}), 4.09(1\text{H}, \text{dd}, 8.25\&4.6\text{Hz}), 6.35-6.43(2\text{H}, \text{m}), 6.45(1\text{H}, \text{d}, 1\text{Hz}), 6.90(1\text{H}, \text{t}, 7.6\text{Hz})$ 。

[0152] 实施例 2

[0153] 制备 (±)-2-甲氧基-2-(4'-氨基苯基)-乙酸 (化合物 23) 的方法

[0154]



[0155] 步骤 1

[0156] 以保持温度低于 -5°C 的速率将氢氧化钾 (6.72g, 0.12mol) 在甲醇 (25ml) 中的溶液加入到冷却的 (-7°C) 4-乙酰氨基苯甲醛 (24.5g, 0.15mol) 和氯仿 (40.1g, 0.33mol) 在

DMF(100ml) 中的溶液中。将混合物温热至 2℃, 历经 5.5 小时, 然后将其加入 1M HCl 水溶液 (200ml) 和甲苯 (200ml) 的混合物中, 并搅拌过夜。经过滤收集得到的 2-(4-乙酰氨基苯基)-三氯甲醇 (29g), 并抽吸干燥。

[0157] 步骤 2

[0158] 将 2-(4-乙酰氨基苯基)-三氯甲醇 (14.0g, 49.5mmol) 在甲醇 (330ml) 中的溶液和氢氧化钾 (13.8g, 250mmol) 在甲醇 (150ml) 中的溶液合并, 并将该混合物加热至 70-80℃ 保持 3 小时。冷却后, 经过滤除去 KCl 副产物, 然后在真空中浓缩滤液, 得到白色固体 2-(4-乙酰氨基苯基)-2-甲氧基乙酸 (14g)。

[0159] 步骤 3

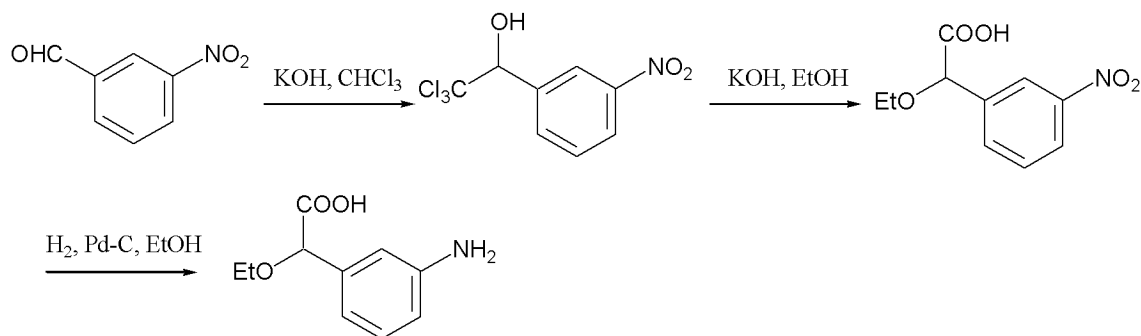
[0160] 将 2-(4-乙酰氨基苯基)-2-甲氧基乙酸 (7.1g, 31.8mmol) 和胼一水合物 (40ml) 加热 16 小时, 冷却并在真空中浓缩。得到的残余油状物经硅胶柱色谱法 (洗脱剂, 在 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中的 20-40% 甲醇) 纯化, 得到 2.6g (45%) 的 (±)-2-甲氧基-2-(4'-氨基苯基)-乙酸。

[0161] <sup>1</sup>H NMR (δ, 250MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 3.27 (3H, s), 4.43 (1H, s), 6.66 (2H, d, 8.5Hz), 7.18 (2H, d, 8.2Hz)。

[0162] 实施例 3

[0163] 制备 (±)-2-乙氧基-2-(3'-氨基苯基)-乙酸 (化合物 32) 的方法

[0164]



[0165] 步骤 1

[0166] 将 3-硝基苯甲醛 (25g, 165mmol) 和氯仿 (30ml, 375mmol) 溶解于 DMF (100ml) 中, 并将溶液冷却至 -5℃ 到 -10℃ 之间。缓慢加入氢氧化钾 (7.5g, 134mmol) 在甲醇 (22.5ml) 中的新鲜溶液以便维持内部温度 < -5℃。将反应在 < -5℃ 维持 2 小时, 然后用冷却的盐酸水溶液 (225ml) 在甲苯 (225ml) 中的混合物猝灭。将溶液在冰浴中缓慢温热至室温过夜。此后分离甲苯层, 并将水层用甲苯进一步提取。合并的有机层用水 (2×225ml)、5% 碳酸氢钠溶液 (225ml) 和水 (225ml) 洗涤。将溶液干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 过滤并在真空中浓缩, 得到橙色固体 2-(3-硝基苯基)-三氯甲醇 (42g, 155mmol, 94%)。

[0167] <sup>1</sup>H NMR (δ, 250MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3.7 (br. s, 1H), 5.4 (s, 1H), 7.6 (t, 1H, 8.0Hz), 8.0 (d, 1H, 8.0Hz), 8.3 (d, 1H, 8.0Hz), 8.5 (s, 1H)。

[0168] 步骤 2

[0169] 将 2-(3-硝基苯基)-三氯甲醇 (20g, 74mmol) 溶解于无水乙醇 (74ml) 中, 并缓慢加入氢氧化钾 (20.7g, 369mmol) 在无水乙醇 (150ml) 中的溶液。将溶液回流加热 4 小时, 冷却, 然后在真空中浓缩。残余物用稀盐酸酸化, 并将产物在乙酸乙酯中萃取 (x3)。将合并

的有机层干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ), 过滤并在真空中浓缩, 得到棕色固体 2-乙氧基-2-(3-硝基苯基)乙酸 (6.4g, 28.4mmol, 38%)。

[0170]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.0 (t, 3H, 7.0Hz), 3.6 (m, 1H), 3.7 (m, 1H), 5.1 (s, 1H), 7.7 (t, 1H, 7.8Hz), 7.9 (d, 1H, 7.8Hz), 8.3 (d, 1H, 7.8Hz), 8.4 (s, 1H).

[0171] 步骤 3

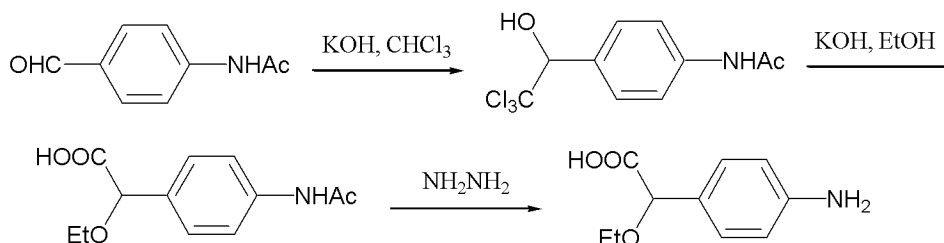
[0172] 将 2-乙氧基-2-(3-硝基苯基)乙酸 (6.4g, 28.4mmol) 溶解于无水乙醇 (500ml) 中, 加入 5% 钯碳 (湿的) (1.5g), 将混合物于 60psi 氢化过夜。混悬液经硅藻土过滤, 浓缩滤液, 得到棕色固体 (±)-2-乙氧基-2-(3'-氨基苯基)-乙酸 (3.0g, 15.3mmol, 54%)。

[0173]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.2 (t, 3H,  $J = 6.9\text{Hz}$ ), 3.5 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 4.6 (s, 1H), 6.7 (d, 1H,  $J = 7.6\text{Hz}$ ), 6.9 (m, 2H), 7.0 (t, 1H,  $J = 7.6\text{Hz}$ ).

[0174] 实施例 4

[0175] 制备 (±)-2-乙氧基-2-(4'-氨基苯基)-乙酸 (化合物 33) 的方法

[0176]



[0177] 步骤 1

[0178] 见“化合物 23 步骤 1”

[0179] 步骤 2

[0180] 将 2-(4-乙酰氨基苯基)-三氯甲醇 (14.0g, 49.5mmol) 在乙醇 (400ml) 中的溶液和氢氧化钾 (13.8g, 250mmol) 在乙醇 (150ml) 中的溶液合并, 并将混合物于 70-80°C 加热 2.5 小时。将混合物冷却, 过滤, 以除去 KCl 副产物, 并在真空中浓缩, 得到黄色固体 2-(4-乙酰氨基苯基)-2-乙氧基乙酸 (14g)。

[0181] 步骤 3

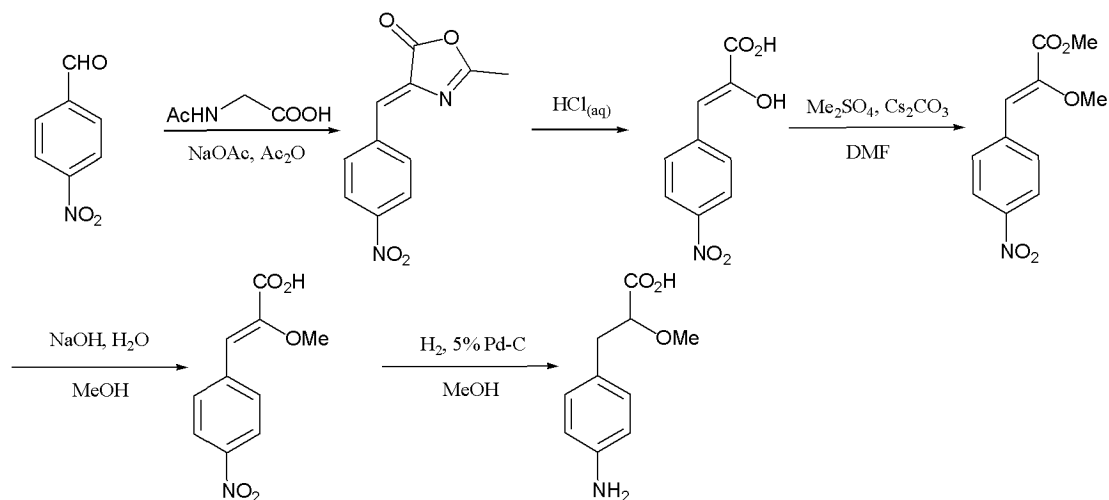
[0182] 将 2-(4-乙酰氨基苯基)-2-乙氧基乙酸 (7.54g, 31.8mmol) 和胼一水合物 (40ml) 加热 16 小时, 冷却混合物, 然后在真空中浓缩。然后将残余油状物经硅石柱色谱法 (在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中的 20-40% 甲醇洗脱剂) 纯化, 得到白色泡沫状的 (±)-2-乙氧基-2-(4'-氨基苯基)-乙酸 (2.3g, 37%)。

[0183]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.18 (3H, t, 7.0Hz), 4.42 (1H, qd, 7.3, 2.4Hz), 4.56 (2H, s), 5.50 (1H, qd, 7.0, 2.1Hz), 6.66 (2H, d, 8.7Hz), 7.20 (2H, d, 8.5Hz)

[0184] 实施例 5

[0185] 制备 (±)-2-甲氧基-3-(4'-氨基苯基)-丙酸 (化合物 34) 的方法

[0186]



## [0187] 步骤 1

[0188] 将 4-硝基苯甲醛 (53.7g, 0.356mol)、N-乙酰甘氨酸 (49.9g, 0.427mol) 和乙酸钠 (37.9g, 0.463mol) 与乙酸酐 (168g, 1.78mol) 混合, 并将得到的混合物在搅拌下加热至 120℃ 保持 6 小时, 得到深色混悬液。然后将混合物冷却至室温过夜, 使得形成沉淀固体。将反应混合物倾入到冰水 (150g) 中, 经过滤收集得到的悬浮固体。粗制固体产物用丙酮 (100ml) 洗涤, 然后从热丙酮 (650ml) 重结晶, 得到晶状固体, 该晶状固体用 50% 乙醇水溶液洗涤, 然后在真空中干燥, 得到淡黄色针状的 2-甲基-4-(4-硝基亚苄基) 噁唑-5(4H)-酮 (55.0g, 66%)。将结晶母液和洗涤物合并, 蒸发, 得到固体残余物, 其从丙酮重结晶, 得到第二批量的 2-甲基-4-(4-硝基亚苄基) 噁唑-5(4H)-酮 (8g, 10%)。2-甲基-4-(4-硝基亚苄基) 噁唑-5(4H)-酮的合并收率为 63g (76%)。

[0189]  $^1\text{H NMR} (\delta, 250\text{MHz}, \text{CDCl}_3) = 2.47 (3\text{H}, \text{s}), 7.14 (1\text{H}, \text{s}), 8.28 (4\text{H}, \text{m})$ 。

## [0190] 步骤 2

[0191] 将 2-甲基-4-(4-硝基亚苄基) 噁唑-5(4H)-酮 (63.0g, 0.272mol) 和 3M 盐酸 (1.2L) 混合, 并将混悬液于 100℃ 搅拌 6 小时。得到的混悬液在室温下搅拌过夜, 然后经过滤收集悬浮固体, 用水 (2×50ml) 洗涤, 然后在真空中干燥, 得到 2-羟基-3-(4-硝基苯基) 丙烯酸 (46.6g, 81%)。将合并的滤液和洗涤物用乙酸乙酯 (4×0.5L) 萃取, 然后经硫酸钠干燥合并的有机提取物, 浓缩至干燥, 得到另一批量的 2-羟基-3-(4-硝基苯基) 丙烯酸 (0.8g, 1%)。2-羟基-3-(4-硝基苯基) 丙烯酸的总收率为 47.4g (82%)。

[0192]  $^1\text{H NMR} (\delta, 250\text{MHz}, \text{DMSO}-d_6) = 6.52 (1\text{H}, \text{s}), 8.01 (2\text{H}, \text{d}, 8.5\text{Hz}), 8.22 (2\text{H}, \text{d}, 8.5\text{Hz})$ 。

## [0193] 步骤 3

[0194] 将 2-羟基-3-(4-硝基苯基) 丙烯酸 (15g, 71.7mmol)、碳酸铯 (56g, 172.1mmol) 和硫酸二甲酯 (14.2ml, 150.6mmol) 在 DMF (270ml) 中的混合物于室温下搅拌 18 小时。加入水 (220ml) 和乙酸乙酯 (150ml), 并分离各层。水层进一步用乙酸乙酯 (4×100ml) 萃取, 然后将合并的有机相用水 (6×100ml)、盐水 (2×120ml) 洗涤, 并浓缩至一半体积。加入庚烷 (70ml), 混合物浓缩至 200ml 体积。经过滤收集得到的沉淀固体, 用庚烷 (2×100ml) 洗涤, 在滤器上抽吸干燥, 得到含有痕量庚烷的黄褐色固体 2-甲氧基-3-(4-硝基苯基) 丙烯酸甲酯 (9.2g, 收率 54%)。

[0195]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 3.82 (s, 3-H, OMe), 3.84 (s, 3-H, OMe), 7.02 (s, 1-H, CH =), 8.04 (d, 2-H, CH 芳香族), 8.26 (d, 2-H, CH 芳香族)。

[0196] 步骤 4

[0197] 将 2-甲氧基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸甲酯 (7.8g, 32.8mmol) 溶解于 IMS (156ml) 中。加入 NaOH (1.44g, 36.1mmol) 在水 (78ml) 中的溶液, 并将该混合物在室温 (18°C) 下搅拌 18 小时。反应混合物用 1M HCl (120ml) 酸化, 并将得到的沉淀固体经过滤收集, 用水 (2×100ml) 洗涤, 在过滤器上部分抽吸干燥 30 分钟, 随后经真空干燥箱于 18°C 干燥 18 小时。由此得到 2-甲氧基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸为含有一些结晶水的黄褐色固体 (6.7g, 91%)。

[0198]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 3.83 (s, 3-H, OMe), 6.97 (s, 1-H, CH =), 8.02 (d, 2-H, CH 芳香族), 8.25 (d, 2-H, CH 芳香族)。

[0199] 步骤 5

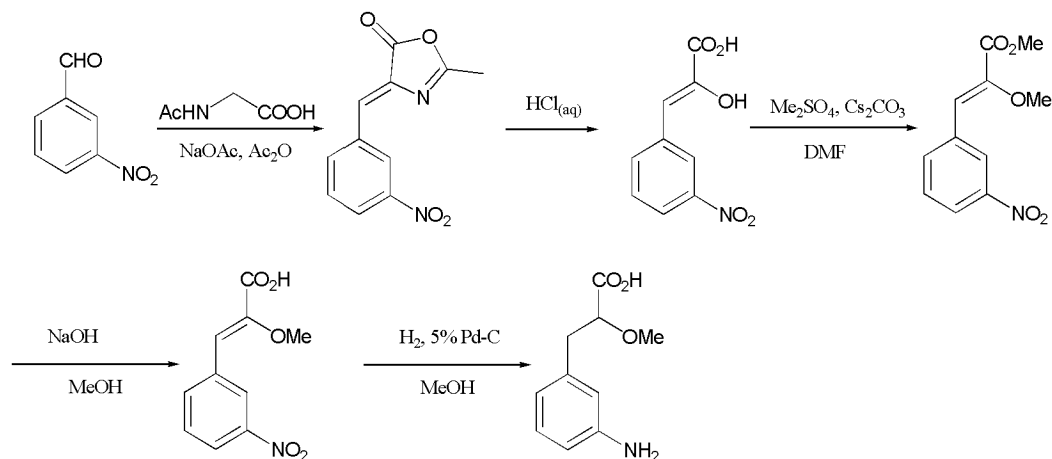
[0200] 将 2-甲氧基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸 (6.7g, 30mmol) 置于甲醇 (700ml) 中, 并加入 THF (300ml) 和 10% 钯碳 (湿基) (0.67g)。将混合物于 45psi 氢化 43 分钟, 随后每隔 1 小时重复再填充至 45-48psi, 持续 3 小时, 最后在 48ps 持续 18 小时。将得到的混悬液经 GF/F 滤纸过滤, 滤渣用 MeOH (200ml) 洗涤。将滤液浓缩至灰白色固体。于 20°C 将固体在 IMS (75ml) 中浆化 1.5 小时, 过滤, 并用 IMS/庚烷 (1:2) (20ml) 洗涤, 在过滤器上干燥 1 小时, 得到灰白色固体 (±)-2-甲氧基-3-(4'-氨基苯基)-丙酸 (5.1g, 收率 88%)。

[0201]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 2.74 (m, 2-H), 3.23 (s, 3-H, CH<sub>3</sub>), 3.80 (dd, 1-H, CH), 6.47 (d, 2-H, 芳香族), 6.87 (d, 2-H, 芳香族)。

[0202] 实施例 6

[0203] 制备 (±)-2-甲氧基-3-(3'-氨基苯基)-丙酸 (化合物 35) 的方法

[0204]



[0205] 步骤 1 和 2

[0206] 按照化合物 20

[0207] 步骤 3

[0208] 将硫酸二甲酯 (13.23g, 105mmol) 加入到搅拌的 2-羟基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸 (10.5g, 50.0mmol) 和碳酸铯 (39.1g, 120mmol) 在 DMF (105ml) 中混合物中, 形成澄清的淡黄色混合物, 将其在室温下搅拌过夜。将得到的深红色混悬液在真空中浓缩, 并将残余物

分配于水 (100ml) 和二氯甲烷 (150ml) 之间。分离有机层, 进一步用水 (2×100ml) 洗涤, 经硫酸钠干燥并经硅胶过滤。将得到的黄色溶液在真空中蒸发至干燥, 得到黄色固体 2-甲氧基-3-(3-硝基苯基) 丙烯酸甲酯 (8.1g, 67%)。

[0209]  $^1\text{H NMR}(\delta, 250\text{MHz}, \text{DMSO-d}_6) = 3.81(3\text{H}, \text{s}), 3.83(3\text{H}, \text{s}), 7.08(1\text{H}, \text{s}), 7.71(1\text{H}, \text{dd}, 7.9\&8.2\text{Hz}), 8.10-8.22(2\text{H}, \text{m}), 8.66(1\text{H}, \text{s})$ 。

[0210] 步骤 4

[0211] 将氢氧化钾 (2.0g, 35.9mmol) 在水 (25ml) 中的溶液加入到搅拌的 2-甲氧基-3-(3-硝基苯基) 丙烯酸甲酯 (8.1g, 34.2mmol) 在甲醇 (150ml) 中的溶液中, 得到的混合物于室温下搅拌过夜。加入更多量的在水 (10ml) 中的 KOH (0.5g, 8.9mmol), 并将该混合物加热至 80°C 保持 1 小时。然后将甲醇在真空中蒸发, 残余物用水 (200ml) 稀释。溶液用二氯甲烷 (2×100ml) 洗涤, 经硅藻土垫过滤, 然后通过加入 3M HCl 酸化至 pH3。将混合物冷藏 18 小时, 然后经过滤收集沉淀的固体, 用水洗涤 (3×30ml), 并在真空中于 40°C 干燥, 得到黄色固体 2-甲氧基-3-(3-硝基苯基) 丙烯酸 (6.4g, 84%)。

[0212]  $^1\text{H NMR}(\delta, 250\text{MHz}, \text{DMSO-d}_6) = 3.82(3\text{H}, \text{s}), 7.02(1\text{H}, \text{s}), 7.70(1\text{H}, \text{t}, 7.93\text{Hz}), 8.10-8.22(2\text{H}, \text{m}), 8.65(1\text{H}, \text{s})$ 。

[0213] 步骤 5

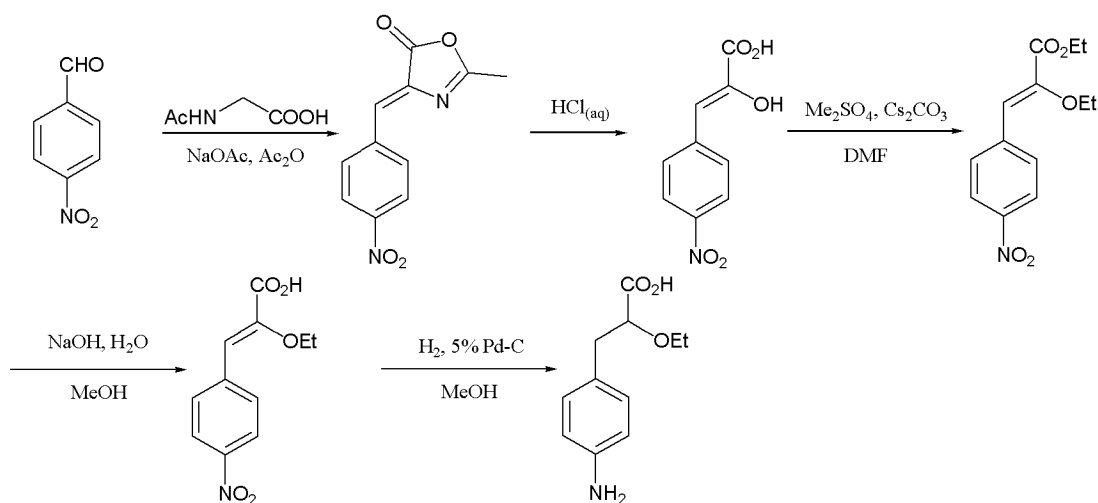
[0214] 将 2-甲氧基-3-(3-硝基苯基) 丙烯酸 (3.4g, 15.25mmol)、甲醇 (340ml) 和 5% 活性炭上钯 (1.36g, 4mol%) 的混合物于 12-36psi  $\text{H}_2$  气氛下氢化 1.5 小时。然后, 经硅藻土过滤混合物, 滤饼用甲醇洗涤, 滤液于 40°C 在真空下浓缩, 得到泡沫状固体产物。将其溶解于水 (100ml) 中, 并将溶液冷冻干燥, 得到灰白色固体 (±)-2-甲氧基-3-(3'-氨基苯基)-丙酸 (2.6g, 100%)。

[0215]  $^1\text{H NMR}(\delta, 250\text{MHz}, \text{DMSO-d}_6) = 2.68(1\text{H}, \text{dd}, 13.9\&8\text{Hz}), 2.80(1\text{H}, \text{dd}, 13.9\&4.6\text{Hz}), 3.21(3\text{H}, \text{s}), 3.84(1\text{H}, \text{dd}, 8.25\&4.6\text{Hz}), 6.36-6.44(3\text{H}, \text{m}), 6.91(1\text{H}, \text{dd}, 7.6\text{Hz})$ 。

[0216] 实施例 7

[0217] 制备 (±)-2-乙氧基-3-(4'-氨基苯基)-丙酸 (化合物 39) 的方法。对映体的拆分 (图 12)。

[0218]



[0219] 步骤 1 和 2



[0220] 按照化合物 34 步骤 1 和 2。

[0221] 步骤 3

[0222] 将 2-羟基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸 (20g, 95.6mmol) 悬浮于 DMF (200ml) 中。加入  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (74.9g, 229.9mmol) 和硫酸二乙酯 (26.3ml, 201mmol), 并观察到溶解。于 18°C 搅拌 18 小时后, 加入水 (350ml) 和乙酸乙酯 (250ml), 并分离各层。水层进一步用乙酸乙酯 (5×200ml) 萃取, 然后将合并的有机相用水 (2×200ml)、盐水 (2×200ml) 洗涤, 经硫酸镁干燥。将有机层浓缩至干燥, 得到含有 3.6% 质量的 DMF 的橙色固体 2-乙氧基-3-(4-硝基苯基)-丙烯酸乙酯 (27.6g 潮湿的, 收率 > 100%)。

[0223]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 1.32 (t, 6-H,  $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.13 (q, 2-H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.30 (q, 2-H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 6.99 (s, 1-H, CH =), 8.06 (d, 2-H, CH 芳香族), 8.26 (d, 2-H, CH 芳香族)。

[0224] 步骤 4

[0225] 含有 3.6wt% DMF 的 2-乙氧基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸乙酯 (校正 26.07g, 98.3mmol) 溶解于 IMS (500ml) 中, 并加入 NaOH (1.44g, 36.1mmol) 在水 (260ml) 中的溶液。得到的混合物在室温下搅拌 18 小时, 然后用 1M HCl (120ml) 酸化, 经过滤收集得到的固体, 用水 (2×100ml) 洗涤, 并在过滤器上抽吸干燥 30 分钟, 随后经真空干燥箱于 18°C 干燥 18 小时。由此得到 2-乙氧基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸为含有结晶水的橙色固体 (18.4g, 79%)。

[0226]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 1.31 (t, 3-H, Me), 4.11 (q, 2-H,  $\text{CH}_2$ ), 6.98 (s, 1-H, CH =), 8.05 (d, 2-H, CH 芳香族), 8.25 (d, 2-H, CH 芳香族)。

[0227] 步骤 5

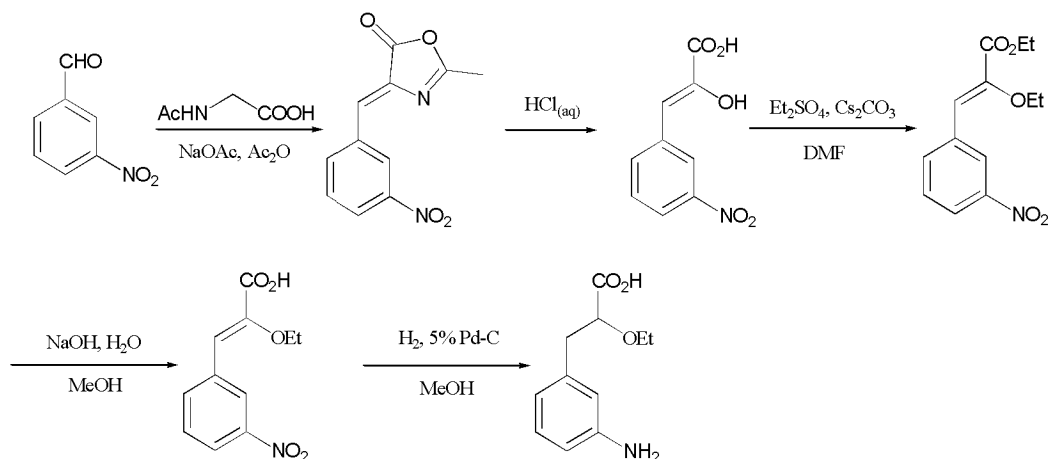
[0228] 将 2-乙氧基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸 (18.4g 潮湿的, 约 77.5mmol) 溶解于 MeOH (1.1L) 中, 并加入 10% 钨碳 (湿基) (1.84g)。将混合物于 12psi 氢化 10 分钟, 随后每隔 10-20 分钟重复再填充至 20-28psi, 持续 5 小时, 然后至 46psi 持续 18 小时。将混合物通过 GF/F 纸过滤, 并将残余物在 IMS (100ml) 中浆化, 过滤, 用庚烷 (100ml) 洗涤, 并在过滤器上抽吸干燥。由此得到灰白色固体 (±)-2-乙氧基-3-(4'-氨基苯基)-丙酸 (11.2g, 69%)。

[0229]  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 1.03 (t, 3-H,  $\text{CH}_3$ ), 2.73 (m, 2-H, ), 3.29 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.80 (dd, 1-H), 6.50 (d, 2-H), 6.87 (d, 2-H)。

[0230] 实施例 8

[0231] 制备 (±)-2-乙氧基-3-(3'-氨基苯基)-丙酸 (化合物 40) 的方法

[0232]



[0233] 步骤 1 和 2

[0234] 按照化合物 20 步骤 1 和 2。

[0235] 步骤 3

[0236] 将硫酸二乙酯 (12g, 78.2mmol) 加入到搅拌的 2-羟基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸 (6.1g, 30.0mmol) 和碳酸铯 (29.3g, 90mmol) 在 DMF (61ml) 中的混合物中, 形成澄清的淡黄色混合物, 将其于室温下搅拌过夜。将得到的深红色混悬液加热至 50℃ 保持 4 小时, 然后在真空中浓缩, 并将残余物分配于水 (100ml) 和二氯甲烷 (150ml) 之间。分离有机层, 再用水 (2×100ml) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 并通过硅胶垫过滤。在真空中将得到的黄色溶液蒸发至干燥, 得到黄色固体 2-乙氧基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸乙酯 (5.6g, 72%)。

[0237] 步骤 4

[0238] 将氢氧化钾 (1.3g, 22.2mmol) 在水 (20ml) 中的溶液加入搅拌的 2-乙氧基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸乙酯 (5.6g, 21.1mmol) 在甲醇 (100ml) 中的溶液中, 并将得到的混合物加热至回流过夜。然后, 在真空中蒸发甲醇, 残余物用水 (150ml) 稀释。溶液用二氯甲烷 (2×80ml) 洗涤, 经硅藻土垫过滤, 然后通过加入 3M HCl 酸化至 pH 3。将混合物冷藏 18 小时, 然后经过滤收集沉淀的固体, 用水 (3×30ml) 洗涤, 并于 40℃ 在真空中干燥。得到的固体从乙酸乙酯和庚烷重结晶, 得到黄色固体的 2-乙氧基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸 (3.06g, 61%)。

[0239]  $^1\text{H NMR}(\delta, 250\text{MHz}, \text{DMSO}-d_6) = 1.34(3\text{H}, \text{t}, 7\text{Hz}), 4.10(2\text{H}, \text{q}, 7\text{Hz}), 7.04(1\text{H}, \text{s}), 7.69(1\text{H}, \text{t}, 7.93\text{Hz}), 8.07-8.22(2\text{H}, \text{m}), 8.80(1\text{H}, \text{m}), 13.25(1\text{H}, \text{brs})$ 。

[0240] 步骤 5

[0241] 将 2-乙氧基-3-(3-硝基苯基)丙烯酸 (3.06g, 12.9mmol)、甲醇 (150ml) 和 5% 活性炭上钯 (0.60g, 2mol%) 的混合物于 12-30psi  $\text{H}_2$  气氛下氢化 2 小时。然后, 经硅藻土过滤混合物, 滤饼用甲醇洗涤, 并于 40℃ 在真空中浓缩滤液, 得到泡沫状固体产物。将其溶解于水 (100ml) 中, 并将该溶液冷冻干燥, 得到灰白色固体 (±)-2-乙氧基-3-(3'-氨基苯基)-丙烯酸 (2.7g, 100%)。

[0242]  $^1\text{H NMR}(\delta, 250\text{MHz}, \text{DMSO}-d_6) = 1.07(3\text{H}, \text{t}, 7\text{Hz}), 2.6-2.85(2\text{H}, \text{m}), 3.20-3.38(1\text{H}, \text{m}), 3.40-3.60(1\text{H}, \text{m}), 3.92(1\text{H}, \text{dd}, 5\&7.7\text{Hz}), 6.3-6.45(3\text{H}, \text{m}), 7.01(1\text{H}, \text{t}, 7.6\text{Hz})$ 。

[0243] 实施例 9

[0244] 分子建模

[0245] 使用 SYBYL 软件 6.9.1 版 (Tripos Associates Inc, St Louis, MO) 在 Silicon Graphics 工作站上运行,进行分子建模研究。由标准碎片库建立了 5-ASA 的两性离子形式的三维模型,随后使用 Tripos 力场 (3) 优化其几何形状。由于化合物的 pKa 仍是未知的,所以 SPARC 在线计算器用于测定在生理 pH(7.4) 时发生的种类 (<http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/index.cfm>)。离子化化合物的三维模型由标准碎片库建立,随后使用 Tripos 力场 (3),包括由 Gasteiger 和 Hückel 原子电荷计算的静电项,优化其几何形状。Maximin2 程序中可用的 Powell 方法用于使能量最小化,直至梯度值小于 **0.001kcal/mol.Å**。

[0246] 人 PPAR $\gamma$  配体结合域的结构得自其与在 RCSB 蛋白数据库 (1I7I) 中可用的泰沙格列赛 (tesaglitazar(Az 242)) 络合的 X-射线晶体结构 (4,5)。化合物进入受体活性位点的柔性对接使用 GOLD 软件进行 (6)。最稳定的对接模型根据由 GoldScore(6) 和 X-Score 评分机能 (7) 所预测的评分最高的构象选择。使用 Maximin2 程序中可用的 Powell 法和 Tripos 力场以及 4.0 的介电常数,使络合物能量降至最低,直至梯度值达到 **0.01 kcal/mol.Å**。围绕配体定义热域 (**10Å**)和兴趣区域 (**15Å**),使用退火机能。

[0247] 结果

[0248] 分子建模受体对接研究表明,一般而言, S 对映体较 R 对映体更有活性,即使 R 对映体也确实显示活性。一个对映体更有生物活性这一现象是众所周知的。

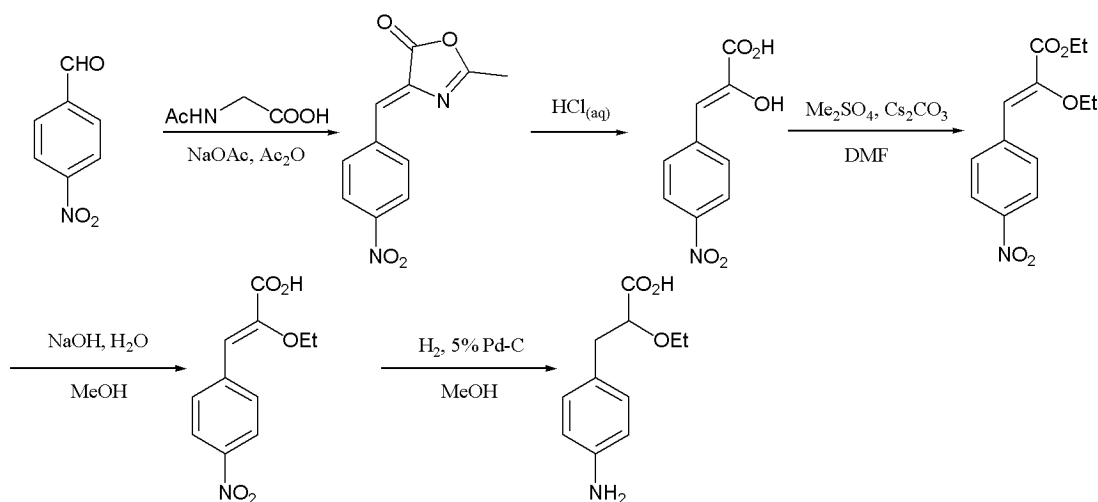
[0249] 结果,本发明提供了一种将化合物拆分为对映体的方法。化合物 32 的拆分方法以图解方式显示于图 12。

[0250] 尽管不希望被理论所束缚,但是认为化合物的 S-对映体将提供较高的活性。对接研究的结果显示于图 5-11。

[0251] 实施例 7

[0252] 制备 (±)-2-乙氧基-3-(4'-氨基苯基)-丙酸 (化合物 39) 的方法。对映体的拆分 (图 12)。

[0253]



[0254] 步骤 1 和 2

[0255] 按照化合物 34 步骤 1 和 2。

[0256] 步骤 3

[0257] 将 2-羟基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸 (20g, 95.6mmol) 悬浮于 DMF (200ml) 中。加

入  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (74.9g, 229.9mmol) 和硫酸二乙酯 (26.3ml, 201mmol), 并观察到溶解。于 18°C 搅拌 18 小时后, 加入水 (350ml) 和乙酸乙酯 (250ml), 并分离各层。水层进一步用乙酸乙酯 (5×200ml) 萃取, 然后将合并的有机相用水 (2×200ml)、盐水 (2×200ml) 洗涤, 经硫酸镁干燥。将有机层浓缩至干燥, 得到含有 3.6% 质量的 DMF 的橙色固体 2-乙氧基-3-(4-硝基苯基)-丙烯酸乙酯 (27.6g 潮湿的, 收率 > 100%)。

[0258]  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta$ , 250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 1.32 (t, 6-H,  $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.13 (q, 2-H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.30 (q, 2-H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 6.99 (s, 1-H, CH = ), 8.06 (d, 2-H, CH 芳香族), 8.26 (d, 2-H, CH 芳香族)。

[0259] 步骤 4

[0260] 含有 3.6wt% DMF 的 2-乙氧基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸乙酯 (校正 26.07g, 98.3mmol) 溶解于 IMS (500ml) 中, 并加入 NaOH (1.44g, 36.1mmol) 在水 (260ml) 中的溶液。得到的混合物在室温下搅拌 18 小时, 然后用 1M HCl (120ml) 酸化, 经过滤收集得到的固体, 用水 (2×100ml) 洗涤, 并在过滤器上抽吸干燥 30 分钟, 随后

[0261] 结果

[0262] 激活 PPAR  $\gamma$  导致一连串使与特异性 DNA 序列元件 (称为过氧化物酶体增殖物反应元件 (PPRE)) 结合的反应 (7-9)。

[0263] 我们通过用海鳃萤光素酶和 PPRE 质粒瞬时转染上皮细胞, 研究了 PPAR  $\gamma$  转录活性。为了评价所述新分子是否具有比 5-ASA 更高的刺激 PPAR  $\gamma$  激活的功效, 我们以 1mM 的浓度检测了这些分子。将 1mM 浓度的新分子的作用与 5-ASA 和罗格列酮比较, 后二者分别以 30mM 和  $10^{-5}\text{M}$  的最佳浓度用作阳性对照。在 24 小时期间用不同的分子刺激细胞。

[0264] 在转染的 HT-29 细胞中 PPAR  $\gamma$  活性的分析显示, 1mM 的新分子 34、39、35 和 40 分别增加了报道基因活性  $4.8 \pm 0.71$ 、 $2.73 \pm 0.31$ 、 $2.64 \pm 0.46$ 、 $3.4 \pm 0.97$  倍, 由此显示出类似于或优于 30mM 的 5-ASA ( $2.8 \pm 0.7$ ) 和  $10^{-5}\text{M}$  的罗格列酮 ( $3.17 \pm 0.29$ ) 的活性。

[0265] 图 2 表示在一式三份进行的 2 或 3 个实验中所有得到的每一个分子的所有结果。不同实验之间的重现性良好, 并与文献中所述的数据相似。

[0266] 本研究使我们鉴别了 4 个对激活 PPAR  $\gamma$  具有较 5-ASA 大 30-50 倍功效的新分子。

[0267] 实施例 11

[0268] 结肠癌细胞生长

[0269] 检测了以下物质 (即 20、34、35、39 和 40) 它们调节结肠癌细胞生长的能力。为此, 使用三个人结肠癌细胞系 (即 HT-29、HT-115 和 DLD-1)。在环氧合酶-2 (COX-2) 表达的基础上选择这些细胞类型。事实上, HT-115 细胞表达生物学活性的 COX-2, HT-29 细胞表达无功能的 COX-2 同工型, DLD-1 是 COX-2-缺陷细胞。现认为这些分子对不表达 COX-2 的细胞也是有活性的, 因此本发明的分子可用于不表达 COX-2 的细胞以便治疗肿瘤和本文所述的其它应用。

[0270] HT-29 和 DLD-1 细胞分别在 McCoy 和 RPMI1640 培养基中培养, 所述培养基中补充了 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 青霉素 / 链霉素 (P/S) 和 50mg/ml 庆大霉素。HT-115 在补充了 15% FBS 和 1% P/S 的 DMEM 培养基中培养。将细胞于 37°C 在 5%  $\text{CO}_2$  存在下维持在增湿的培养箱中。

[0271] 为了细胞生长测定, 将单个细胞悬浮液以  $2 \times 10^3$  细胞 / 孔 (HT115 为  $4 \times 10^3$  细胞

/孔)接种于含有0.5% FBS的培养基的96-孔培养皿中,并使其粘附。然后除去非粘附细胞,将含有0.5% FBS的新鲜培养基加入到每一个孔中。细胞在指定物质存在或缺乏下培养。将各物质溶解于含有0.5% FBS的培养介质中,作为25mM储备溶液,需要时用NaOH将各储备溶液的pH调节至7.4。以0.5至10mM范围内的终浓度使用物质。

[0272] 使用市售的细胞增殖试剂盒(Roche Diagnostics, Monza, 意大利),通过测定掺入到DNA中的5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)测定细胞增殖。在温育的最后6小时期间将BrdU加入到细胞培养物中,在培养48小时后通过联免疫吸附测定法(ELISA)来评价BrdU-阳性细胞的水平。使用ELISA读出器在450nm处测定光密度(OD)。一式三份进行实验,并以平均值±标准偏差(SD)报告结果。

[0273] 结果

[0274] 所述化合物在其抑制结肠癌细胞生长的能力方面存在差异。结果概括于表1中,其中显示了指定化合物抑制DLD-1细胞生长的百分数。物质20,以剂量依赖性方式在受试的三个细胞系中的每一个中都显示出明显的抗增殖作用(图3和4)。当化合物以终浓度10mM使用时,可见细胞生长抑制超过90%。当以终浓度5或10mM使用时,可见化合物20明显抑制细胞生长的能力。

[0275] 当以高剂量(10mM)使用时,化合物34和39轻微降低细胞生长(图4),但是组间差异无统计学意义。类似地,在加入了物质35和40的培养基中未见细胞生长的抑制(见表1)。

[0276] 结论

[0277] 本发明的第一组实施例(实施例10)表明了四个优化的分子34、39、35和40以1mM浓度增加转染的HT-29细胞中PPAR $\gamma$ 活性的能力,显示出相似于或优于30mM的5-ASA和 $10^{-5}$ M的罗格列酮的活性。

[0278] 本发明的第二组实施例(实施例11)显示化合物不同程度地影响结肠癌细胞系,HT-29、HT-115和DLD1的生长抑制作用。所述化合物在其抑制结肠癌细胞系生长的能力方面存在差异。物质20对受试细胞系显示了明显的抗增殖效应。

[0279] 本发明的这些分子对于不表达COX-2的细胞也是有活性的,因此本发明的分子可用于不表达COX-2的细胞以便治疗肿瘤和本文所述的其它应用。

[0280] 总的结论

[0281] 由建模研究表明的合成的最高等级化合物,均显示了相似/优于美沙拉秦的活性。

[0282] 参考文献

[0283] 1. Dubuquoy, L., E. A. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J. F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson, and P. Desreumaux. 2003. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124 :1265-1276.

[0284] 2. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, Metzger D, Wahli W, Desvergne B, Naccari GC, Chavatte P, Farce A, Bulois P, Cortot A, Colombel JF, Desreumaux P. Intestinal anti-inflammatory effect of 5-amino salicylic acid is dependent on PPAR $\gamma$ . *J Exp Med* 2005 ;201 :1205-15.

[0285] 3. Clark, M. C. R. D. I. V. O., N. 1989. Validation of the General Purpose Tripos 5. 2Field. J. Comput Chem. 10 :982-1012.

[0286] 4. Gampe, R. T., Jr., V. G. Montana, M. H. Lambert, A. B. Miller, R. K. Bledsoe, M. V. Milburn, S. A. Klierer, T. M. Willson, and H. E. Xu. 2000. Asymmetry in the PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. Mol Cell 5 :545-555.

[0287] 5. Jones, G., P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, and R. Taylor. 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. J Mol Biol 267 : 727-748.

[0288] 6. Wang, R., L. Lai, and S. Wang. 2002. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. J Comput Aided Mol Des 16 :11-26.

[0289] 7. Westin, S., R. Kurokawa, R. T. Nolte, G. B. Wisely, E. M. McInerney, D. W. Rose, M. V. Milburn, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass. 1998. Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. Nature 395 :199-202.

[0290] 8. Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and et al 1995. The nuclear receptor superfamily :the second decade. Cell 83 :835-839.

[0291] 9. Misra, P., E. D. Owuor, W. Li, S. Yu, C. Qi, K. Meyer, Y. J. Zhu, M. S. Rao, A. N. Kong, and J. K. Reddy. 2002. Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 277 : 48745-48754. Epub 42002Sep 48727.

[0292] 表 1 :指定化合物的分级剂量 (0.5-10mM) 抑制 DLD-1 细胞的百分数

[0293] 生长抑制的百分数

[0294]

<b>mM</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>2.5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>2-20</b>	<b>4.3</b>	<b>12.8</b>	<b>16.2</b>	<b>25.6</b>	<b>47</b>
<b>2-34</b>	<b>0</b>	<b>3.6</b>	<b>1.8</b>	<b>3.6</b>	<b>15.1</b>
<b>2-35</b>	<b>0</b>	<b>3.2</b>	<b>1.6</b>	<b>6.4</b>	<b>4.8</b>
<b>2-39</b>	<b>1.6</b>	<b>3.3</b>	<b>8.2</b>	<b>11.5</b>	<b>12.8</b>
<b>2-40</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2.7</b>

化合物 20、23、32、33、34、35、39、40 的结构

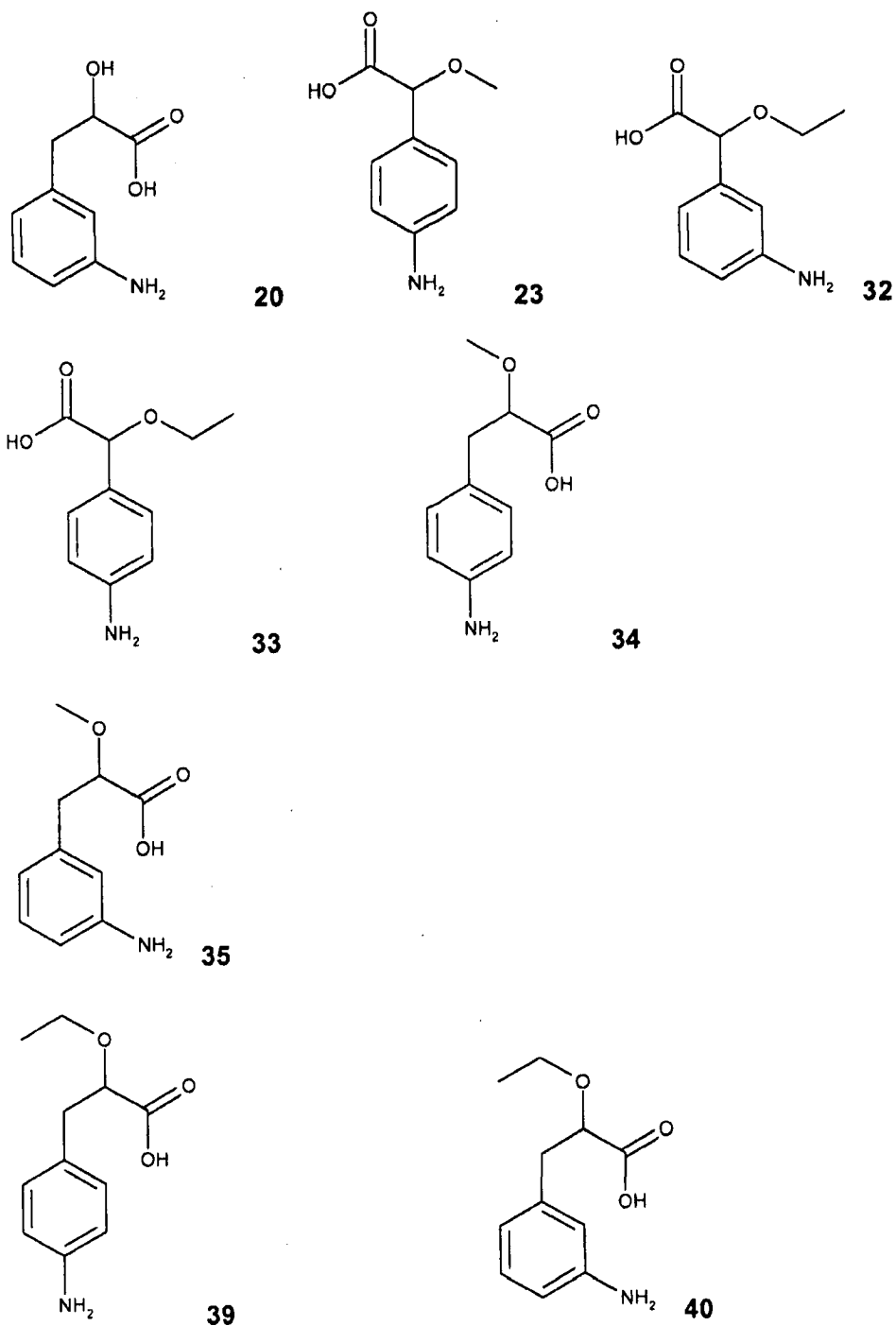


图 1

PPAR  $\gamma$  活性的分析

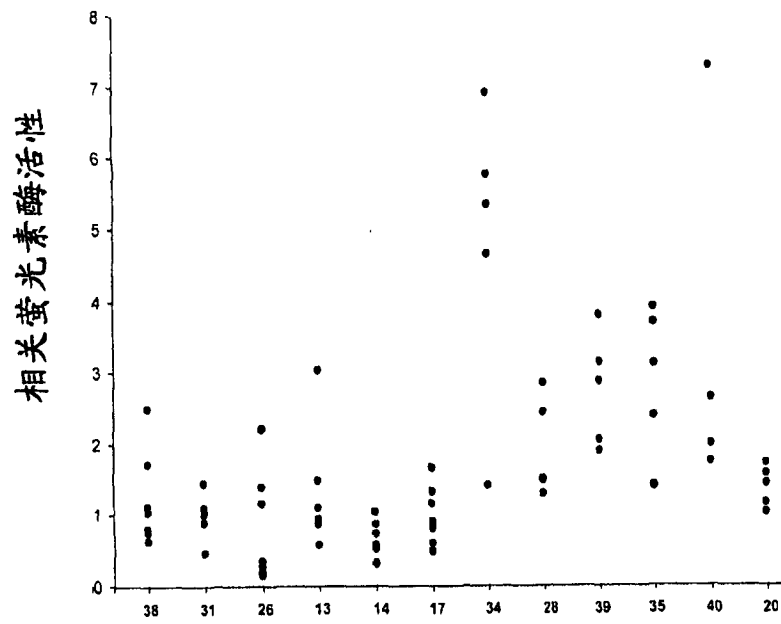
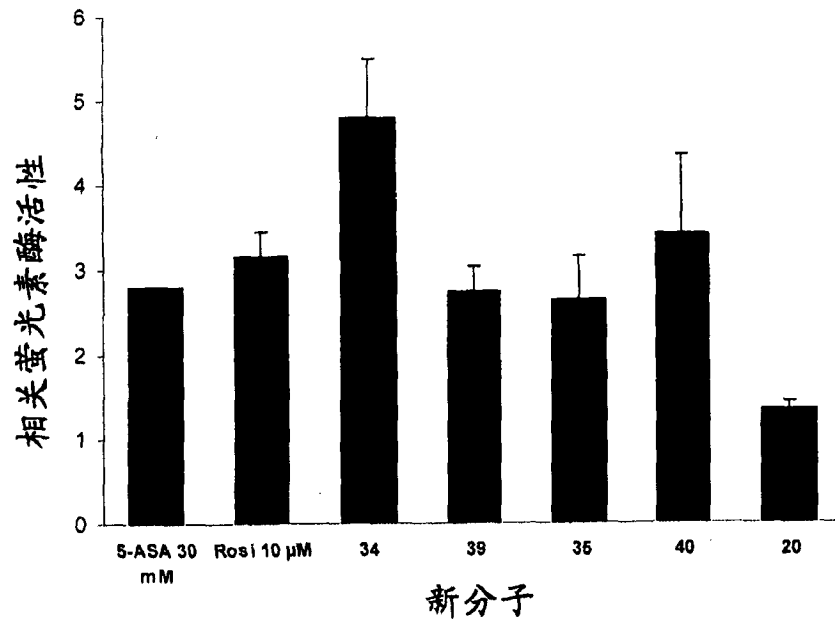


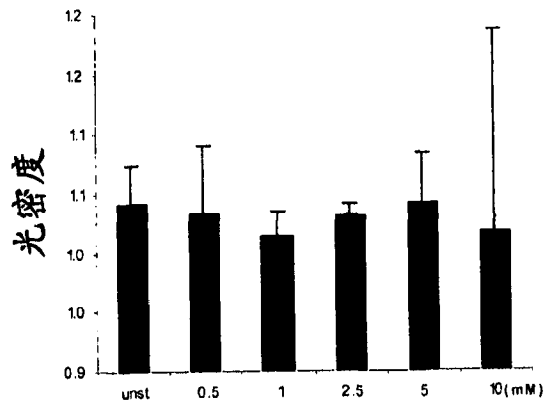
图 2

用 0.5-10mM 的新化合物 20 处理 48 小时,HT29、HT115 和 DLD1 人结肠癌细胞系的增殖

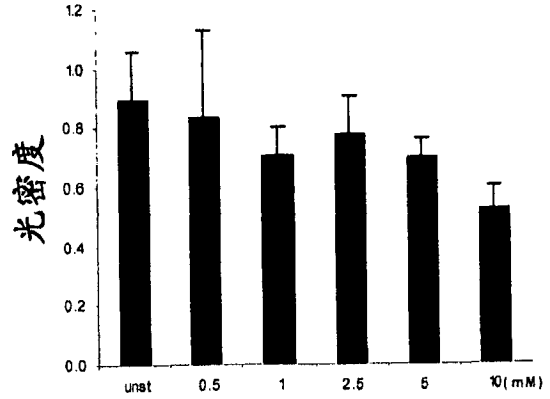


化合物 20

HT115



NT29



DLD1

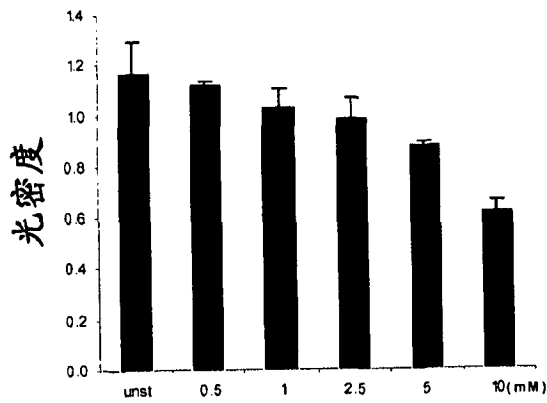


图 3

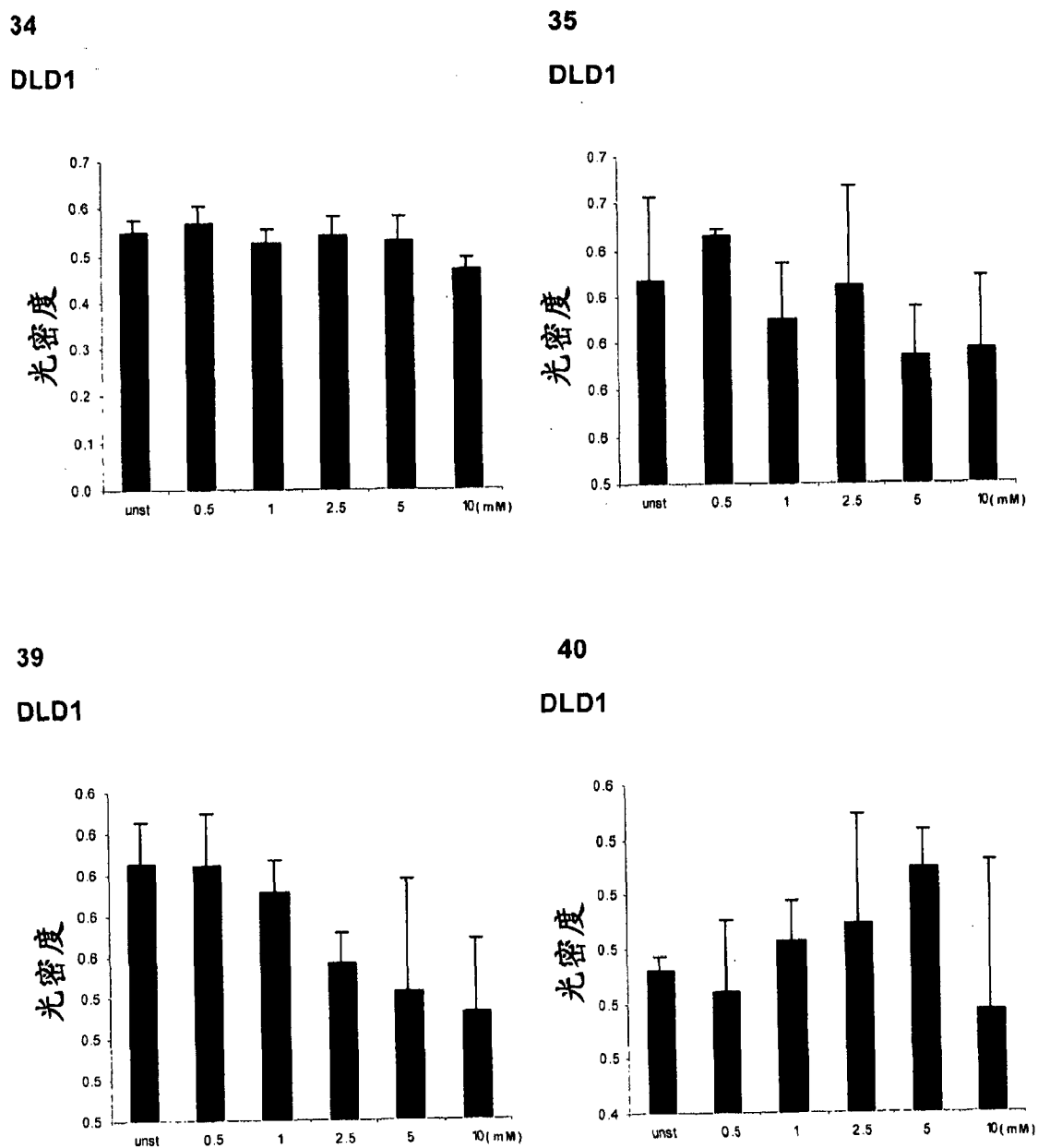


图 4

用 0.5-10mM 的新化合物 34、35、39、40 处理 48 小时, HT29、HT115 和 DLD1 人结肠癌细胞系的增殖

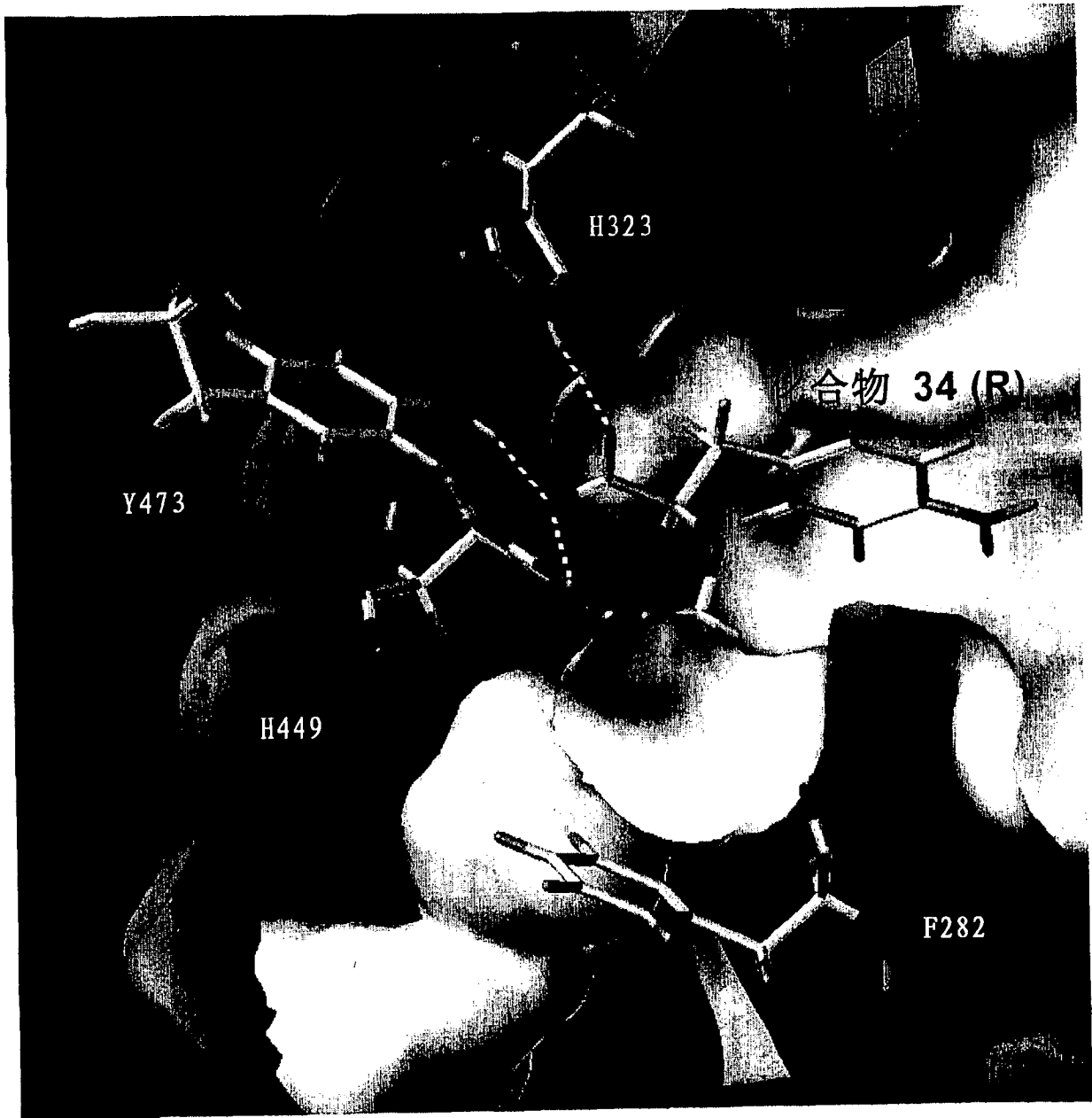


图 5

(R) 化合物 34 与 PPAP  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢结合)

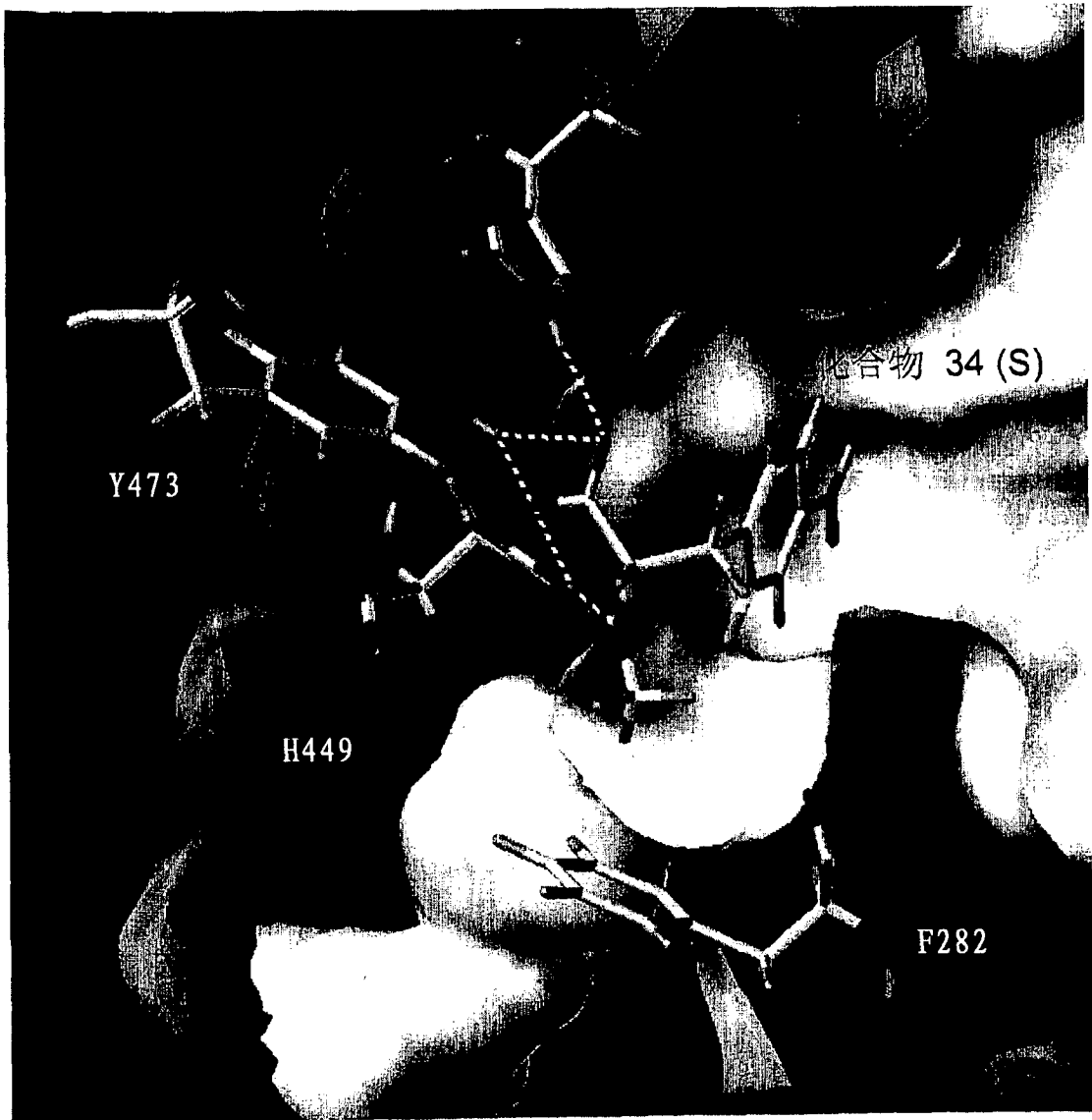


图 6

(S) 化合物 34 与 PPAP  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢结合)

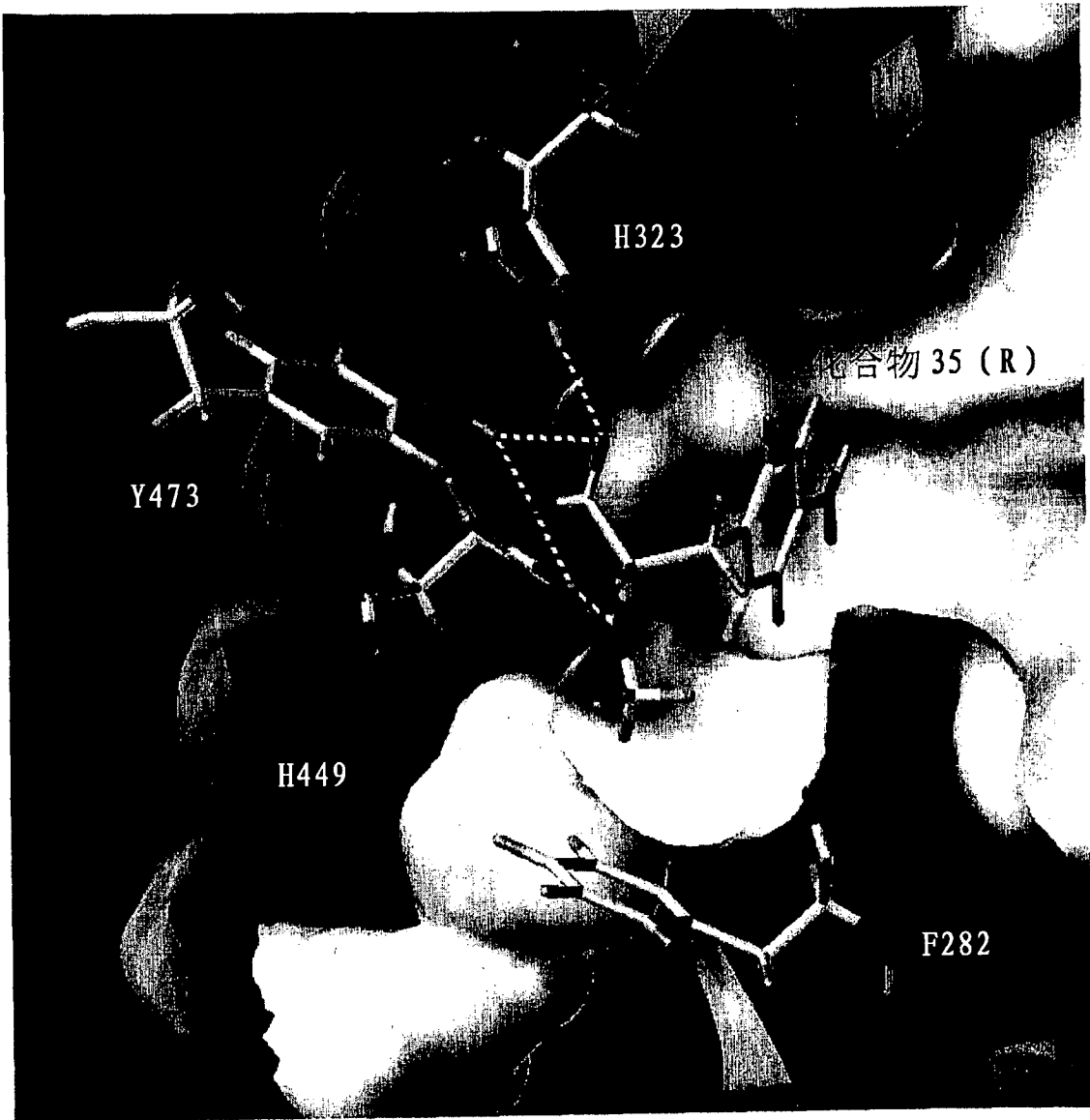


图 7

(R) 化合物 35 与 PPAP  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢结合)

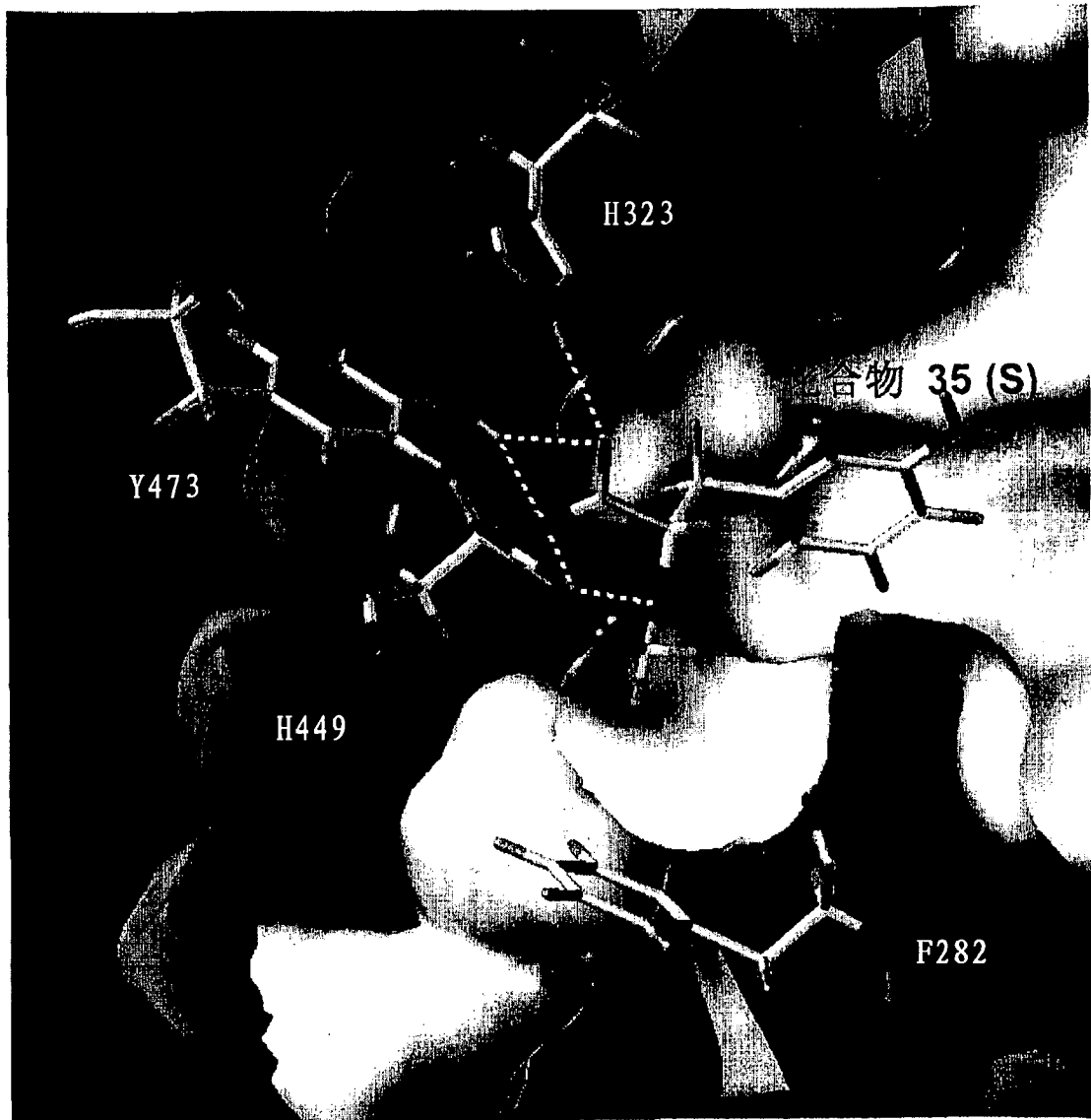


图 8

(S) 化合物 35 与 PPAP  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢结合)

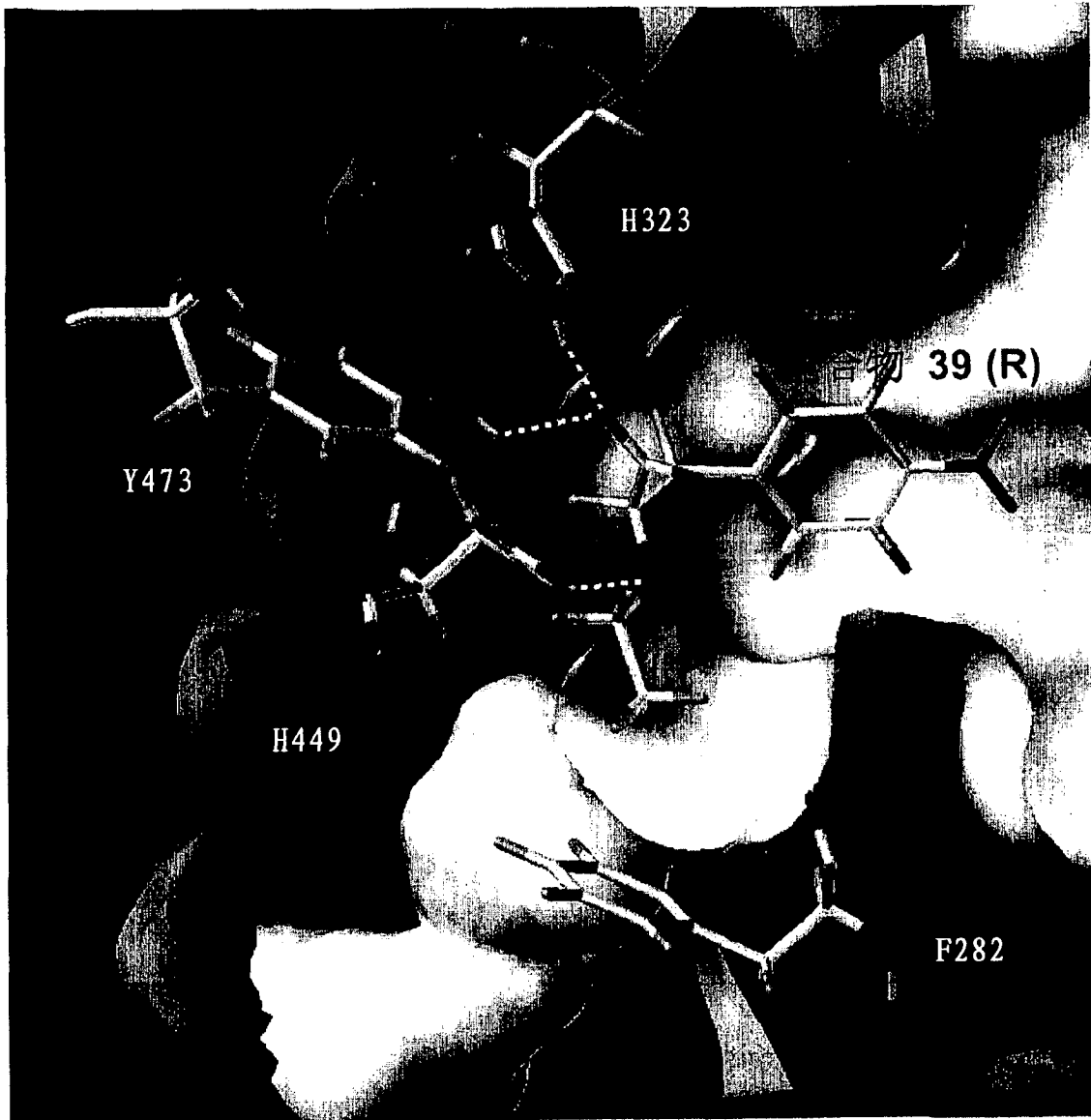


图 9

(R) 化合物 39 与 PPAP  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢结合)

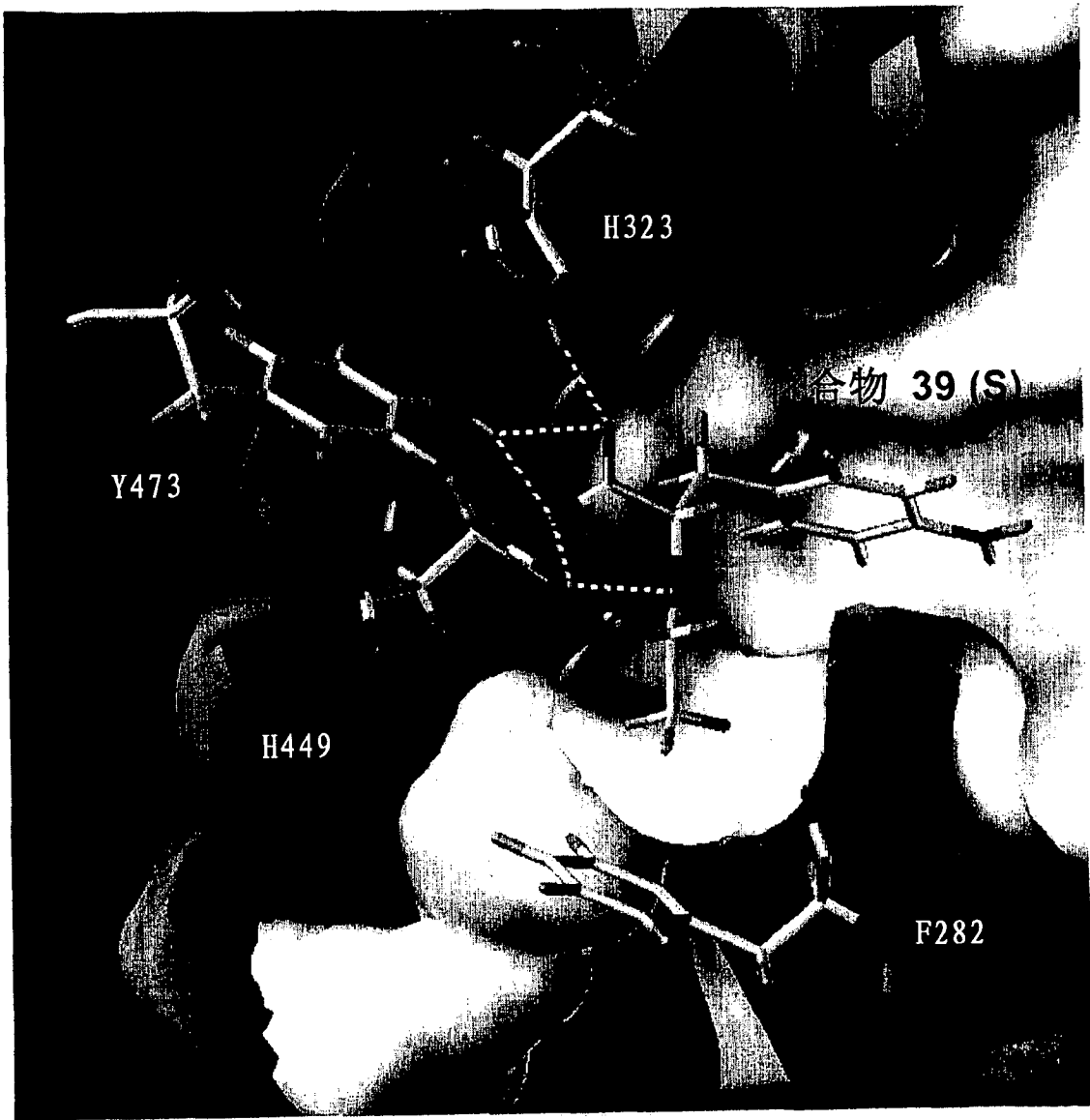
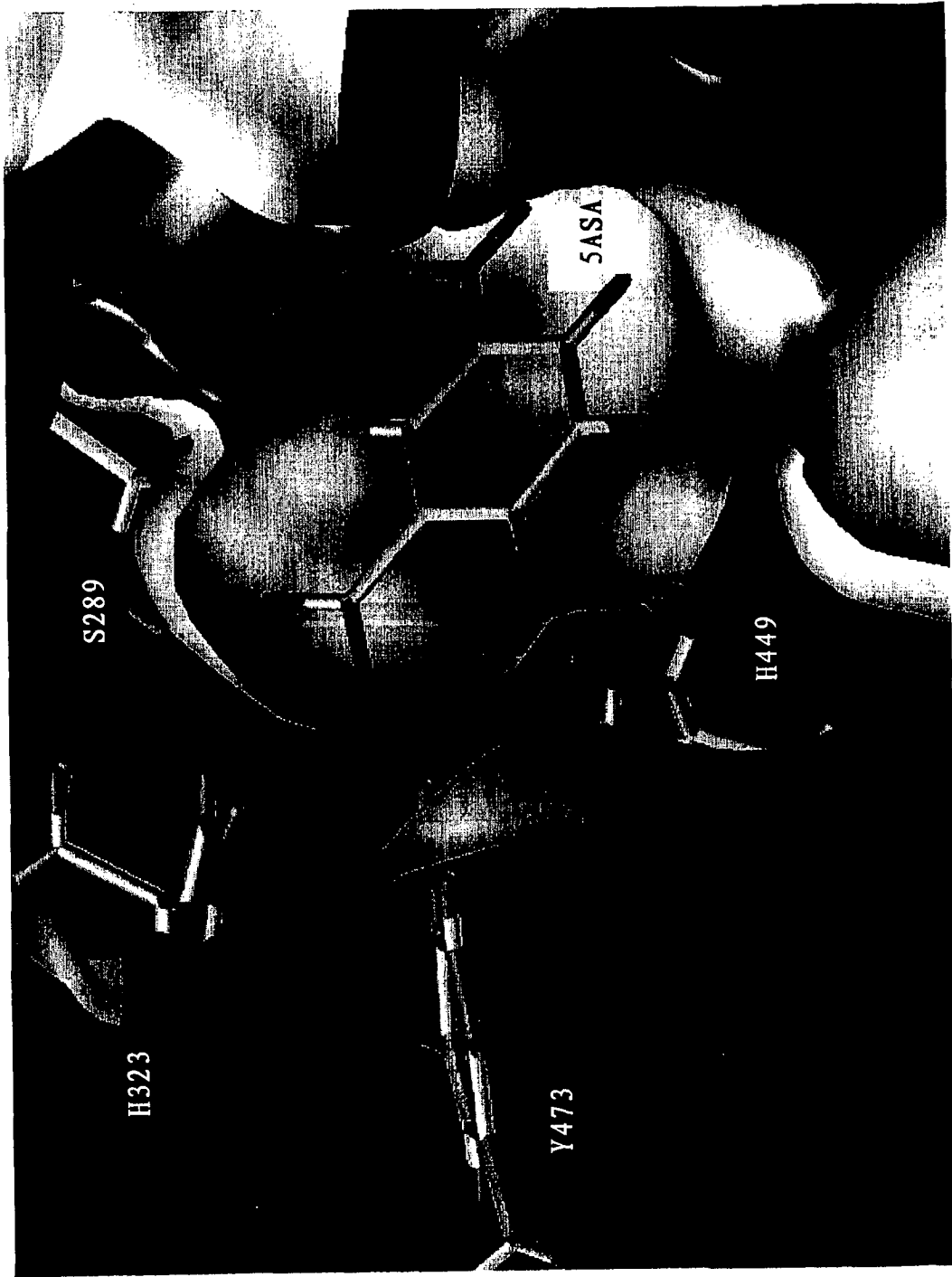


图 10

(S) 化合物 39 与 PPAP  $\gamma$  受体的对接 (显示了氨基酸残基标记和氢结合)





5-氨基水杨酸(美沙拉秦)与PPAP  $\gamma$ 受体的对接(显示了氨基酸残基标记)

图 11

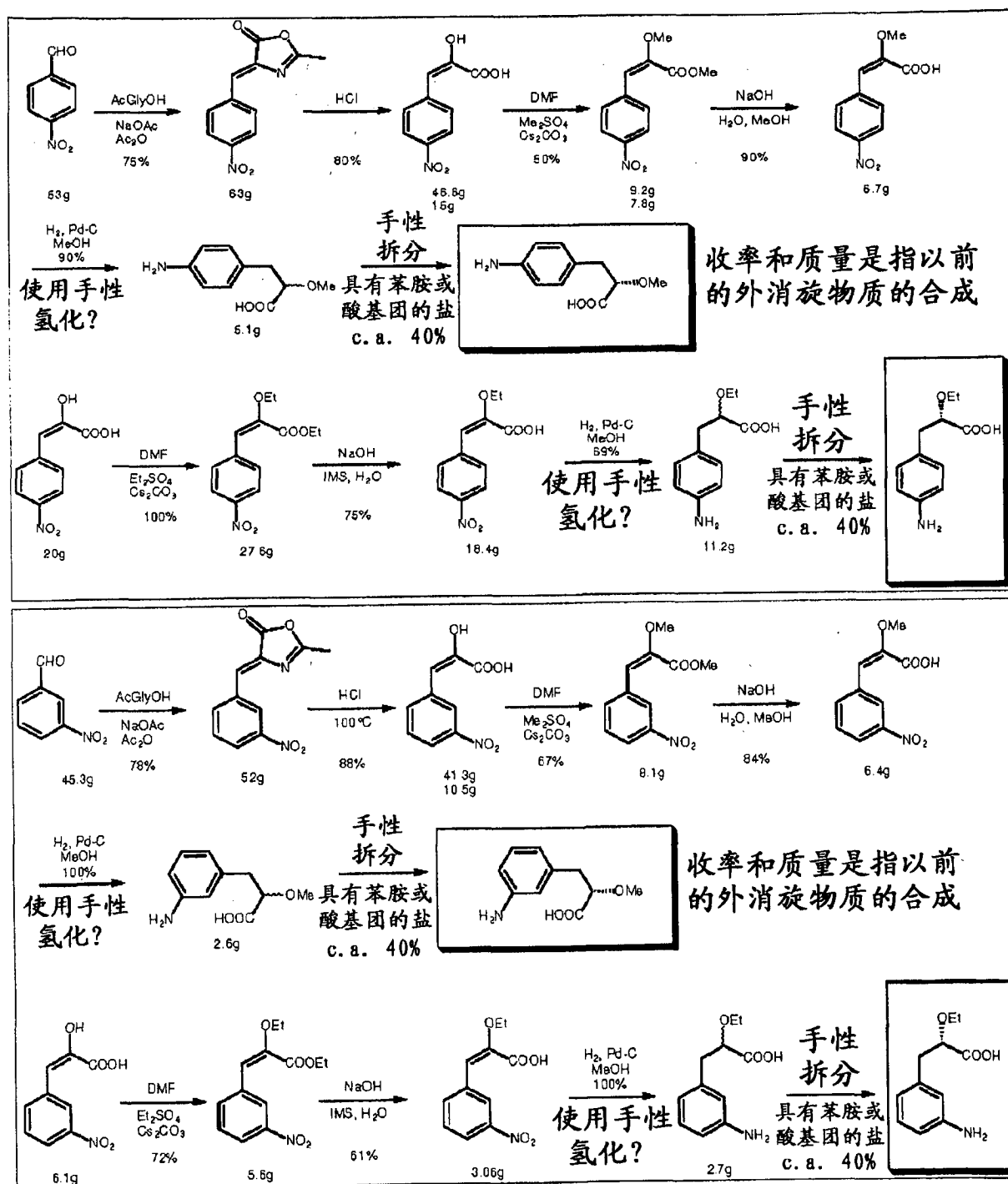


图 12

化合物 39 的合成及随后的对映体拆分方案