

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/352

A61K 31/382 A61K 31/215

A61P 39/02 A61P 43/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01143840.1

[43] 公开日 2002 年 7 月 31 日

[11] 公开号 CN 1360890A

[22] 申请日 1996.8.23 [21] 申请号 01143840.1

分案原申请号 96197896.1

[30] 优先权

[32]1995.9.1 [33]US [31]522779

[32]1995.9.1 [33]US [31]522778

[32]1995.10.13 [33]US [31]542648

[32]1996.3.11 [33]US [31]613863

[71] 申请人 阿勒根公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 E·S·克莱恩 A·T·约翰森

A·M·斯坦德文 R·L·贝尔德

S·J·吉勒特 杨翠仙 S·纳帕尔

V·维利贡达 滕敏

R·A·钱德拉拉纳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

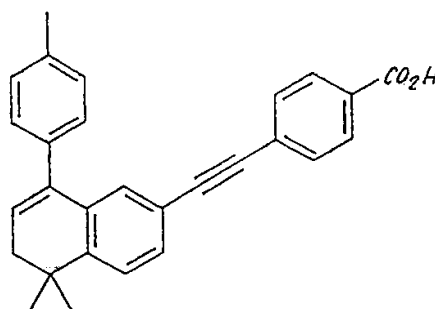
代理人 姜建成

权利要求书 17 页 说明书 172 页 附图页数 15 页

[54] 发明名称 具负性激素和/或拮抗剂活性视黄醛衍生物的用途

[57] 摘要

芳基取代和芳基及(3-氧代-1-丙烯基)-取代的苯并吡喃、苯并噻喃、1,2-二氢喹啉和5,6-二氢萘衍生物具有视黄醛衍生物负性激素和/或拮抗剂样的生物活性。为了预防或降低RAR兴奋剂对于所结合的受体位点的作用,本发明的RAR拮抗剂可以给予哺乳动物包括人类。尤其可以给予或与视黄醛衍生物药物共同给予所述RAR兴奋剂,以便预防或改善由视黄醛衍生物或维生素A或维生素A前体引起的毒性或副作用。所述视黄醛衍生物负性激素可用于加强其它视黄醛衍生物和核受体兴奋剂的活性。例如,视黄醛衍生物负性激素(称为AGN 193109)在体外反式激活测试中有效地增加其它视黄醛衍生物和甾体激素的效力。此外,反式激活测试可以用于鉴定具有负性激素活性的化合物。这些测试方法基于负性激素下行调节设计用来加工组成性转录激活因子结构域的嵌合视黄醛衍生物受体能力。



知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1.能够与选自 RAR_{α} 、 RAR_{β} 和 RAR_{γ} 的视黄酸受体亚型结合的视黄醛衍生物拮抗剂或负性激素在制备用于治疗哺乳动物的病理症状
5 (所述症状对视黄醛衍生物拮抗剂或负性激素的治疗敏感)的药物中的用途。

2.根据权利要求1的用途,其中所述药物用于改善由于给予所述哺乳动物视黄醛衍生物所引起的毒性或不需要的副作用。

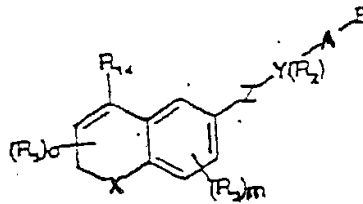
3.根据权利要求2的用途,其中所述药物用于改善由于所述哺乳动物服用视黄醛衍生物药物或维生素A或维生素A前体引起的预先存在的病理症状。
10

4.根据权利要求1的用途,其中所述药物用于局部给药。

5.根据权利要求1的用途,其中所述药物用于全身性给药。

6.根据权利要求1的用途,其中所述视黄醛衍生物拮抗剂或负性激素与 K_d 低于约1微摩尔的视黄醛衍生物受体的亚型结合。
15

7.根据权利要求1的用途,其中所述负性激素或拮抗剂具有下式:
有下式:



其中 X 为 S、O、 NR' , 其中 R' 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基, 或 X 为 $[C(R_1)_2]_n$ 其中 R_1 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基, 及 n 为 0-2 之间的整数;

25 R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I、 CF_3 、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基;

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F;

m 为 0-3 的整数;

o 为 0-3 的整数;

Z 为 $-C\equiv C-$,

$-N=N-$,

5

$-N=CR_1-$,

$-CR_1=N$,

$-(CR_1=CR_1)_{n'}$ -其中 n' 为 0-5 的整数,

$-CO-NR_1-$,

$-CS-NR_1-$,

10

$-NR_1-CO$,

$-NR_1-CS$,

$-COO-$,

$-OCO-$,

$-CSO-$,

15

$-OCS-$;

Y 是苯基或萘基或选自吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡嗪基、嘧啶基、吡嗪基、噻唑基、咪唑基、咪唑基和吡唑基的杂芳基, 所述苯基和杂芳基可选被一个或两个 R_2 基团取代, 或

当 Z 为 $-(CR_1=CR_1)_{n'}$ -和 n' 为 3、4 或 5 时, 则 Y 代表在该 $(CR_1=CR_1)_{n'}$ 基团和 B 之间的直接价键;

20

A 为 $(CH_2)_q$ 其中 q 为 0-5, 具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基, 具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基, 具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基;

25

B 为氢, $COOH$ 或其药学上可接受的盐, $COOR_8$, $CONR_9R_{10}$, $-CH_2OH$, CH_2OR_{11} , CH_2OCOR_{11} , CHO , $CH(OR_{12})_2$, $CHOR_{13}O$, $-COR_7$, $CR_7(OR_{12})_2$, $CR_7OR_{13}O$ 或三-低级烷基甲硅烷基, 其中 R_7 为烷基、环烷基或含有 1-5 个碳原子的链烯基, R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子, 或 5-10 个碳原子的环



烷基, 或 R_8 为苯基或低级烷基苯基, R_9 和 R_{10} 独立为氢, 1-10 个碳原子的烷基, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或苯基或低级烷基苯基, R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基, R_{12} 为低级烷基, 及 R_{13} 为 2-5 个碳原子的二价烷基, 和

5 R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基, 其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子, r 为 0-5 的整数, 和

R_{15} 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO_2 , $N(R_8)_2$, $NH(R_8)COR_8$, $NR_8CON(R_8)_2$, OH, $OCOR_8$, OR_8 , CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基, 具有 1-10 个碳原子的氟代烷基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基, 或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基
10 其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

8. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Y 为苯基、吡啶基、噻吩基或呋喃基。

9. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Y 为苯基。
15

10. 根据权利要求 9 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, 所述苯环为 1,4 (对位) 取代。

11. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Y 为萘基。

12. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Y 为吡啶基。
20

13. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Y 为噻吩基或呋喃基。

14. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Z 为 $-(CR_1=CR_1)_n-$ 和 n' 为 3、4 或 5 及 Y 代表在该 $(CR_1=CR_1)_n$ 基团和 B 之间的直接价键。
25

15. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_2 为 H、F 或 CF_3 。

16. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_3 为 H 或甲基。

17. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基。

5 18. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -杂芳基。

19. 根据权利要求 18 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -杂芳基其中所述杂芳基为具有 1 或 2 个杂原子的 5 或 6 元环。

10 20. 根据权利要求 19 的用途, 其中在所述拮抗剂的式中所述杂芳基选自 2-吡啶基、3-吡啶基、2-噁吩基和 2-噻唑基。

21. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{15} 为 H、 CF_3 、F、低级烷基、低级烷氧基、羟基或氯。

15 22. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Z 为 $-C\equiv C-$ 。

23. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Z 为 $-N=N-$ 。

24. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Z 为 $-CO-NR_1-$ 。

20 25. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Z 为 $-CS-NR_1-$ 。

26. 根据权利要求 25 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_1 为 H。

25 27. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Z 为 $-COO-$ 。

28. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, Z 为 $-(CR_1=CR_1)n'$ -和 n' 为 1。

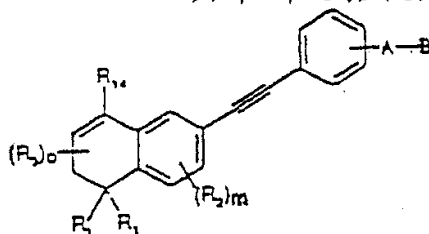
29. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中,

X 为 $[C(R_1)_2]_n$ 和 n 为 1 或 0。

30. 根据权利要求 7 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, X 为 S、O 或 NR' 。

31. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述拮抗剂或负性激素具有下式:

5



其中 R_1 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基;

10

R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I 或 CF_3 、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基;

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F;

m 为 0-3 的整数;

15

o 为 0-3 的整数;

A 为 $(CH_2)_q$ 其中 q 为 0-5, 具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基, 具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基, 具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基;

20

B 为氢, COOH 或其药学上可接受的盐, $COOR_8$, $CONR_9R_{10}$, $-CH_2OH$, CH_2OR_{11} , CH_2OCOR_{11} , CHO, $CH(OR_{12})_2$, $CHOR_{13}O$, $-COR_7$, $CR_7(OR_{12})_2$, $CR_7OR_{13}O$ 或三-低级烷基甲硅烷基, 其中 R_7 为烷基、环烷基或含有 1-5 个碳原子的链烯基, R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或 R_8 为苯基或低级烷基苯基, R_9 和 R_{10} 独立为氢, 1-10 个碳原子的烷基, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或苯基或低级烷基苯基, R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基, R_{12} 为低级烷基, 及 R_{13} 为 2-5 个碳原子的二价烷基, 和

25

R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基, 其中所述杂芳基具

有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子, r 为 0-5 的整数, 和

5 R₁₅ 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO₂, N(R₈)₂, NH(R₈)COR₈, NR₈CON(R₈)₂, OH, OCOR₈, OR₈, CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基, 具有 1-10 个碳原子的氟代烷基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基, 或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

32. 根据权利要求 31 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R₁₄ 为 (R₁₅)_r-苯基, (R₁₅)_r-吡啶基, (R₁₅)_r-噻唑基和 (R₁₅)_r-噻吩基。

10 33. 根据权利要求 32 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R₁₅ 独立为 H, CH₃, C₂H₅, F, CF₃, Cl, CH₃O 或 OH。

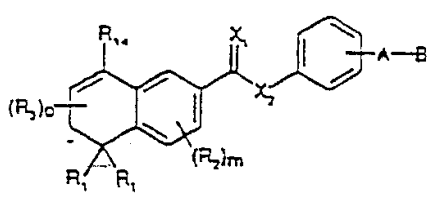
34. 根据权利要求 33 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, A 为 (CH₂)_n 其中 n 为 0-5 及其中 B 为 COOH 或其药学上可接受的盐、COOR₈ 或 CONR₉R₁₀。

15 35. 根据权利要求 34 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R₁ 为 CH₃, R₂ 为 H 或 F 和 R₃ 为 H。

36. 根据权利要求 35 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, n 为 0 及 B 为 COOH、其药学上可接受的盐或 COOC₂H₅。

37. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述拮抗剂或负性激素具有下式:

20



25

其中 R₁ 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基;
R₂ 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I 或 CF₃、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基;

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F；

m 为 0-3 的整数；

o 为 0-3 的整数；

X_1 为 O 或 S；

5 X_2 为 O 或 NR_1 ；

A 为 $(CH_2)_q$ 其中 q 为 0-5，具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基，具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基，具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基；

10 B 为氢，COOH 或其药学上可接受的盐， $COOR_8$ ， $CONR_9R_{10}$ ， $-CH_2OH$ ， CH_2OR_{11} ， CH_2OCOR_{11} ，CHO， $CH(OR_{12})_2$ ， $CHOR_{13}O$ ， $-COR_7$ ， $CR_7(OR_{12})_2$ ， $CR_7OR_{13}O$ 或三-低级烷基甲硅烷基，其中 R_7 为烷基、环烷基或含有 1-5 个碳原子的链烯基， R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子，或 5-10 个碳原子的环烷基，或 R_8 为苯基或低级烷基苯基， R_9 和 R_{10} 独立为氢，1-10 个碳原子的烷基，或 5-10 个碳原子的环烷基，或苯基或低级烷基苯基，
15 R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基， R_{12} 为低级烷基，及 R_{13} 为 2-5 个碳原子的二价烷基，和

R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基， $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基，其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子， r 为 0-5 的整数，和

20 R_{15} 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO_2 , $N(R_8)_2$, $NH(R_8)COR_8$, $NR_8CON(R_8)_2$, OH, $OCOR_8$, OR_8 , CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基，具有 1-10 个碳原子的氟代烷基，具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基，具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基，或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

25 38. 根据权利要求 37 的用途，其中在所述拮抗剂或负性激素的式中， R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基， $(R_{15})_r$ -吡啶基， $(R_{15})_r$ -噻唑基和 $(R_{15})_r$ -噻吩基。

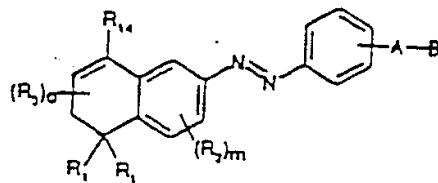
39. 根据权利要求 38 的用途，其中在所述拮抗剂或负性激素的式中， R_{15} 独立为 H, CH_3 , C_2H_5 , F, CF_3 , Cl, CH_3O 或 OH。

40. 根据权利要求 39 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, A 为 $(CH_2)_n$ 其中 n 为 0-5 及其中 B 为 COOH 或其药学上可接受的盐、COOR₈ 或 CONR₉R₁₀.

41. 根据权利要求 40 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R₁ 为 CH₃, R₂ 为 H 或 F 和 R₃ 为 H.

42. 根据权利要求 41 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, n 为 0 及 B 为 COOH、其药学上可接受的盐或 COOC₂H₅.

43. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述拮抗剂或负性激素具有下式:



15

其中 R₁ 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基;

R₂ 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I 或 CF₃、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基;

20

R₃ 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F;

m 为 0-3 的整数;

o 为 0-3 的整数;

A 为 $(CH_2)_q$ 其中 q 为 0-5, 具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基, 具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基, 具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基;

25

B 为氢, COOH 或其药学上可接受的盐, COOR₈, CONR₉R₁₀, -CH₂OH, CH₂OR₁₁, CH₂OCOR₁₁, CHO, CH(OR₁₂)₂, CHOR₁₃O, -COR₇, CR₇(OR₁₂)₂, CR₇OR₁₃O 或三-低级烷基甲硅烷基, 其中 R₇ 为烷基、环烷

基或含有 1-5 个碳原子的链烯基, R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或 R_8 为苯基或低级烷基苯基, R_9 和 R_{10} 独立为氢, 1-10 个碳原子的烷基, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或苯基或低级烷基苯基,
5 R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基, R_{12} 为低级烷基, 及 R_{13} 为 2-5 个碳原子的二价烷基;

R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基, 其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子, r 为 0-5 的整数, 和

R_{15} 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO_2 , $N(R_8)_2$, $NH(R_8)COR_8$, $NR_8CON(R_8)_2$,
10 OH, $OCOR_8$, OR_8 , CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基, 具有 1-10 个碳原子的氟代烷基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基, 或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

44. 根据权利要求 43 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
15 中, R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -吡啶基, $(R_{15})_r$ -噻唑基和 $(R_{15})_r$ -噻吩基。

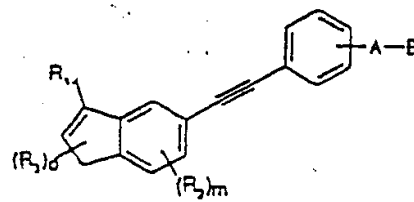
45. 根据权利要求 44 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中, R_{15} 独立为 H, CH_3 , C_2H_5 , F, CF_3 , Cl, CH_3O 或 OH。

46. 根据权利要求 45 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中, A 为 $(CH_2)_n$ 其中 n 为 0-5 及其中 B 为 $COOH$ 或其药学上可接受的
20 盐、 $COOR_8$ 或 $CONR_9R_{10}$ 。

47. 根据权利要求 46 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中, R_1 为 CH_3 , R_2 为 H 或 F 和 R_3 为 H。

48. 根据权利要求 47 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中, n 为 0 及 B 为 $COOH$ 、其药学上可接受的盐或 $COOC_2H_5$ 。

49. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述拮抗剂或负性激素具有下
25 式:



5

其中 R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I 或 CF_3 、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基；

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F；

10

m 为 0-3 的整数；

o 为 0-3 的整数；

A 为 $(CH_2)_q$ 其中 q 为 0-5，具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基，具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基，具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基；

15

B 为氢，COOH 或其药学上可接受的盐， $COOR_8$ ， $CONR_9R_{10}$ ， $-CH_2OH$ ， CH_2OR_{11} ， CH_2OCOR_{11} ，CHO， $CH(OR_{12})_2$ ， $CHOR_{13}O$ ， $-COR_7$ ， $CR_7(OR_{12})_2$ ， $CR_7OR_{13}O$ 或三-低级烷基甲硅烷基，其中 R_7 为烷基、环烷基或含有 1-5 个碳原子的链烯基， R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子，或 5-10 个碳原子的环烷基，或 R_8 为苯基或低级烷基苯基， R_9 和 R_{10} 独立为氢，1-10 个碳原子的烷基，或 5-10 个碳原子的环烷基，或苯基或低级烷基苯基， R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基， R_{12} 为低级烷基，及 R_{13} 为 2-5 个碳原子的二价烷基；

20

R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基， $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基，其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子， r 为 0-5 的整数，和

25

R_{15} 独立为 H、F、Cl、Br、I、 NO_2 ， $N(R_8)_2$ ， $NH(R_8)COR_8$ ， $NR_8CON(R_8)_2$ ，OH， $OCOR_8$ ， OR_8 ，CN，具有 1-10 个碳原子的烷基，具有 1-10 个碳原子的氟代烷基，具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基，具有 1-10 个

碳原子和 1-3 个三键的炔基，或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基
其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

50. 根据权利要求 49 的用途，其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中， R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基， $(R_{15})_r$ -吡啶基， $(R_{15})_r$ -噻唑基和 $(R_{15})_r$ -噻吩基。

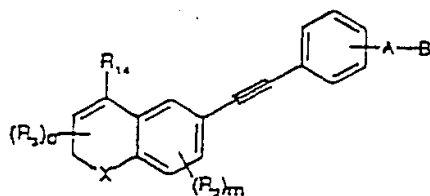
51. 根据权利要求 50 的用途，其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中， R_{15} 独立为 H, CH_3 , C_2H_5 , F, CF_3 , Cl, CH_3O 或 OH。

52. 根据权利要求 51 的用途，其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中，A 为 $(CH_2)_n$ 其中 n 为 0-5 及其中 B 为 COOH 或其药学上可接受的
盐、 $COOR_8$ 或 $CONR_9R_{10}$ 。

53. 根据权利要求 52 的用途，其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中， R_2 为 H 或 F 和 R_3 为 CH_3 ，及 o 为 2。

54. 根据权利要求 53 的用途，其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中，n 为 0 及 B 为 COOH、其药学上可接受的盐或 $COOC_2H_5$ 。

55. 根据权利要求 1 的用途，其中所述拮抗剂或负性激素具有下
式：



其中 X 为 O 或 S；

R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I 或 CF_3 、
1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-
6 个碳原子的烷硫基；

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F；

m 为 0-3 的整数；

o 为 0-3 的整数；

A 为 $(\text{CH}_2)_q$ 其中 q 为 0-5, 具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基, 具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基, 具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基;

B 为氢, COOH 或其药学上可接受的盐, COOR_8 , $\text{CONR}_9\text{R}_{10}$, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{OR}_{11}$, $\text{CH}_2\text{OCOR}_{11}$, CHO , $\text{CH}(\text{OR}_{12})_2$, CHOR_{13}O , $-\text{COR}_7$, $\text{CR}_7(\text{OR}_{12})_2$, $\text{CR}_7\text{OR}_{13}\text{O}$ 或三-低级烷基甲硅烷基, 其中 R_7 为烷基、环烷基或含有 1-5 个碳原子的链烯基, R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或 R_8 为苯基或低级烷基苯基, R_9 和 R_{10} 独立为氢, 1-10 个碳原子的烷基, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或苯基或低级烷基苯基, R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基, R_{12} 为低级烷基, 及 R_{13} 为 2-5 个碳原子的二价烷基;

R_{14} 为 $(\text{R}_{15})_r$ -苯基, $(\text{R}_{15})_r$ -萘基或 $(\text{R}_{15})_r$ -杂芳基, 其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子, r 为 0-5 的整数, 和

R_{15} 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO_2 , $\text{N}(\text{R}_8)_2$, $\text{NH}(\text{R}_8)\text{COR}_8$, $\text{NR}_8\text{CON}(\text{R}_8)_2$, OH, OCOR_8 , OR_8 , CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基, 具有 1-10 个碳原子的氟代烷基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基, 或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

56. 根据权利要求 55 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{14} 为 $(\text{R}_{15})_r$ -苯基, $(\text{R}_{15})_r$ -吡啶基, $(\text{R}_{15})_r$ -噻唑基和 $(\text{R}_{15})_r$ -噻吩基。

57. 根据权利要求 56 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{15} 独立为 H, CH_3 , C_2H_5 , F, CF_3 , Cl, CH_3O 或 OH。

58. 根据权利要求 57 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, A 为 $(\text{CH}_2)_n$ 其中 n 为 0-5 及其中 B 为 COOH 或其药学上可接受的盐、 COOR_8 或 $\text{CONR}_9\text{R}_{10}$ 。

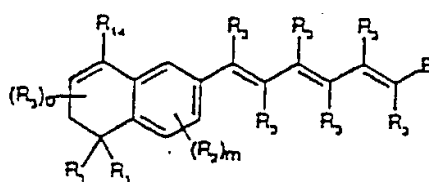
59. 根据权利要求 57 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, X 为 S。

60. 根据权利要求 59 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_2 为 H 或 F 和 R_3 为 H.

61. 根据权利要求 60 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, n 为 0 及 B 为 COOH、其药学上可接受的盐或 COOC₂H₅.

5 62. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述拮抗剂或负性激素具有下式:

10



其中 R_1 为氢或 1-6 个碳原子的烷基;

15 其中 R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I 或 CF₃、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基;

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F;

m 为 0-3 的整数;

o 为 0-3 的整数;

20 B 为氢, COOH 或其药学上可接受的盐, COOR₈, CONR₉R₁₀, -CH₂OH, CH₂OR₁₁, CH₂OCOR₁₁, CHO, CH(OR₁₂)₂, CHOR₁₃O, -COR₇, CR₇(OR₁₂)₂, CR₇OR₁₃O 或三-低级烷基甲硅烷基, 其中 R_7 为烷基、环烷基或含有 1-5 个碳原子的链烯基, R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或 R_8 为苯基或低级烷基苯基, R_9 和 R_{10} 独立为氢, 1-10 个碳原子的烷基, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或苯基或低级烷基苯基, R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基, R_{12} 为低级烷基, 及 R_{13} 为 2-25 5 个碳原子的二价烷基;

R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基, 其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子, r 为 0-5 的整数, 和

R_{15} 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO_2 , $N(R_8)_2$, $NH(R_8)COR_8$, $NR_8CON(R_8)_2$, OH, $OCOR_8$, OR_8 , CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基, 具有 1-10 个碳原子的氟代烷基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基, 或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

63. 根据权利要求 62 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -吡啶基, $(R_{15})_r$ -噻唑基和 $(R_{15})_r$ -噻吩基。

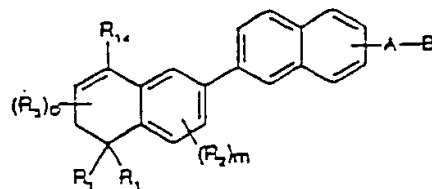
64. 根据权利要求 63 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{15} 独立为 H, CH_3 , C_2H_5 , F, CF_3 , Cl, CH_3O 或 OH。

65. 根据权利要求 64 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, B 为 $COOH$ 或其药学上可接受的盐、 $COOR_8$ 或 $CONR_9R_{10}$ 。

66. 根据权利要求 65 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_1 为 CH_3 , R_2 为 H 或 F 和 R_3 为 H 或 CH_3 。

67. 根据权利要求 66 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, n 为 0 及 B 为 $COOH$ 、其药学上可接受的盐或 $COOC_2H_5$ 。

68. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述拮抗剂或负性激素具有下式:



其中 R_1 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基;

R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I 或 CF_3 、

1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基;

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F;

m 为 0-3 的整数;

5 o 为 0-3 的整数;

A 为 $(CH_2)_q$ 其中 q 为 0-5, 具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基, 具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基, 具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基;

10 B 为氢, COOH 或其药学上可接受的盐, $COOR_8$, $CONR_9R_{10}$, $-CH_2OH$, CH_2OR_{11} , CH_2OCOR_{11} , CHO, $CH(OR_{12})_2$, $CHOR_{13}O$, $-COR_7$, $CR_7(OR_{12})_2$, $CR_7OR_{13}O$ 或三-低级烷基甲硅烷基, 其中 R_7 为烷基、环烷基或含有 1-5 个碳原子的链烯基, R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或 R_8 为苯基或低级烷基苯基, R_9 和 R_{10} 独立为氢, 1-10 个碳原子的烷基, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或苯基或低级烷基苯基,
15 R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基, R_{12} 为低级烷基, 及 R_{13} 为 2-5 个碳原子的二价烷基;

R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基, 其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子, r 为 0-5 的整数, 和

20 R_{15} 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO_2 , $N(R_8)_2$, $NH(R_8)COR_8$, $NR_8CON(R_8)_2$, OH, $OCOR_8$, OR_8 , CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基, 具有 1-10 个碳原子的氟代烷基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基, 或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

25 69. 根据权利要求 68 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -吡啶基, $(R_{15})_r$ -噻唑基和 $(R_{15})_r$ -噻吩基。

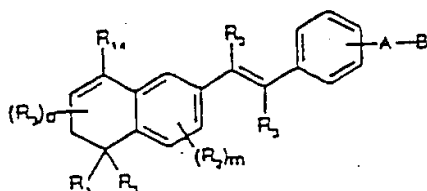
70. 根据权利要求 69 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_{15} 独立为 H, CH_3 , C_2H_5 , F, CF_3 , Cl, CH_3O 或 OH.

71. 根据权利要求 70 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, A 为 $(CH_2)_n$ 其中 n 为 0-5 及其中 B 为 COOH 或其药学上可接受的盐、 $COOR_8$ 或 $CONR_9R_{10}$ 。

72. 根据权利要求 71 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, R_1 为 CH_3 , R_2 为 H 或 F 和 R_3 为 H。

73. 根据权利要求 72 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式中, n 为 0 及 B 为 COOH、其药学上可接受的盐或 $COOC_2H_5$ 。

74. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述拮抗剂或负性激素具有下式:



其中 R_1 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基;

R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I 或 CF_3 、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基;

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F;

m 为 0-3 的整数;

o 为 0-3 的整数;

A 为 $(CH_2)_q$ 其中 q 为 0-5, 具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基, 具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基, 具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基;

B 为氢, COOH 或其药学上可接受的盐, $COOR_8$, $CONR_9R_{10}$, $-CH_2OH$, CH_2OR_{11} , CH_2OCOR_{11} , CHO, $CH(OR_{12})_2$, $CHOR_{13}O$, $-COR_7$, $CR_7(OR_{12})_2$, $CR_7OR_{13}O$ 或三-低级烷基甲硅烷基, 其中 R_7 为烷基、环烷

基或含有 1-5 个碳原子的链烯基, R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或 R_8 为苯基或低级烷基苯基, R_9 和 R_{10} 独立为氢, 1-10 个碳原子的烷基, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或苯基或低级烷基苯基,
5 R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基, R_{12} 为低级烷基, 及 R_{13} 为 2-5 个碳原子的二价烷基;

R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基, 其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子, r 为 0-5 的整数, 和

R_{15} 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO_2 , $N(R_8)_2$, $NH(R_8)COR_8$, $NR_8CON(R_8)_2$,
10 OH, $OCOR_8$, OR_8 , CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基, 具有 1-10 个碳原子的氟代烷基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基, 或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

75. 根据权利要求 74 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
15 中, R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -吡啶基, $(R_{15})_r$ -噻唑基和 $(R_{15})_r$ -噻吩基。

76. 根据权利要求 75 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中, R_{15} 独立为 H, CH_3 , C_2H_5 , F, CF_3 , Cl, CH_3O 或 OH。

77. 根据权利要求 76 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
20 中, A 为 $(CH_2)_n$ 其中 n 为 0-5 及其中 B 为 COOH 或其药学上可接受的盐、 $COOR_8$ 或 $CONR_9R_{10}$ 。

78. 根据权利要求 77 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中, R_1 为 CH_3 , R_2 为 H 或 F 和 R_3 为 H 或 CH_3 。

79. 根据权利要求 78 的用途, 其中在所述拮抗剂或负性激素的式
中, n 为 0 及 B 为 COOH、其药学上可接受的盐或 $COOC_2H_5$ 。

25

说明书

具负性激素和/或拮抗剂活性视黄醛衍生物的用途

本申请是1996年8月23日提交的、发明名称为“具负性激素和/或拮抗剂活性视黄醛衍生物的合成和用途”的96197896.1号专利申请的分案申请。

本发明的范围

5 本发明涉及具有视黄醛衍生物负性激素(retinoid negative hormone)和/或视黄醛衍生物拮抗剂样生物活性的新的化合物。更准确地说,本发明涉及4-芳基取代苯并吡喃、4-芳基取代苯并噻喃、4-芳基取代1,2-二氢喹啉和8-芳基取代5,6-二氢萘衍生物(它们也可以被取代的3-氧代-1-丙烯基基团所取代)。这些新的化合物具有视黄醛衍生物拮抗剂
10 样的活性,用于治疗或预防视黄醛衍生物和维生素A及维生素A的前体在哺乳动物中引起的毒性,并作为使用视黄醛衍生物治疗哺乳动物的辅助剂,以便预防或改善不需要的副作用。本发明还涉及视黄醛衍生物负性激素用于增加其它视黄醛衍生物和甾体激素的生物活性并抑制非配体结合视黄酸受体基础活性的用途。
15

本发明的背景

具有视黄醛衍生物样活性的化合物在本领域内为众所周知的,并在许多美国的和其它国家的专利中和科学出版物中已有描述。视黄醛衍生物样活性用于治疗哺乳动物包括人类,以便治愈或减轻与许多疾病有关的症状为本领域内众所周知和普遍接受。
20

已知视黄醛衍生物(维生素A及其衍生物)具有广泛的活性,包括在不同的生物系统中对于细胞增生和分化的作用。该活性已经使得视黄醛衍生物用于治疗各种疾病,包括皮肤病和癌症。现有技术已经开发了大量的具有视黄醛衍生物样生物活性的化合物,大量的专利和化学文献介绍了这类化合物。相关的专利文献包括美国专利号4980369,
25 5006550, 5015658, 5045551, 5089509, 5134159, 5162546, 5234926, 5248777, 5264578, 5272156, 5278318, 5324744, 5346895, 5346915,

5348972, 5348975, 5380877, 5399561, 5407937 (转让给本申请的同一受让人), 和其中所引用的专利和出版物, 它们尤其介绍或涉及具有视黄醛衍生物样生物活性的苯并二氢吡喃、二氢苯并噻喃和 1,2,3,4-四氢喹啉衍生物。此外, 几个申请是悬而未决的, 它们转让给本申请的受让人, 它们涉及具有视黄醛衍生物样活性的其它化合物。

美国专利号 4740519 (Shroot et al.), 4826969 (Maignan et al.), 4326055 (Loeliger et al.), 5130335 (Chandraratna et al.), 5037825 (Klaus et al.), 5231113 (Chandraratna et al.), 5324840 (Chandraratna), 5344959 (Chandraratna), 5130335 (Chandraratna et al.), 公开的欧洲专利申请号 10 0176034A (Wuest et al.), 0350846A (Klaus et al.), 0176032A (Frickel et al.), 0176033A (Frickel et al.), 0253302A (Klaus et al.), 0303915A (Bryce et al.), 英国专利申请 GB 2190378A (Klaus et al.), 德国专利申请号 DE 3715955A1 (Klaus et al.), DE 3602473A1 (Wuest et al.)和下列文章: J. Amer. Acad. Derm. 15:756-764 (1986) (Sporn et al.), Chem. Pharm. Bull. 15 33:404-407 (1985) (Shudo et al.), J. Med Chem. 31:2182-2192 (1988) (Kagechika et al.), Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids CRC Press Inc. 1990 pp. 334-335, 354 (Dawson et al.)中介绍或涉及包括四氢萘基部分和具有视黄醛衍生物样的或有关的生物活性的化合物。美国专利号 4391731 (Boller et al.)介绍了用于液晶组成中的四氢化萘衍生物。

Kagechika 等人在 J. Med. Chem 32:834 (1989) 中的文章介绍了某些具有视黄醛衍生物样活性的 6-(3-氧代-1-丙烯基)-1,2,3,4-四甲基-1,2,3,4-四氢化萘衍生物和相关的黄酮化合物。 Shudo 等人在 Chem. Pharm. Bull. 33:404 (1985) 和 Jetten 等人在 Cancer Research 47:3523 (1987) 中的文章介绍或涉及其它的 3-氧代-1-丙烯基衍生物(查耳酮化合物)和它们的视黄醛衍生物样的或相关的生物活性。

不幸的是, 具有视黄醛衍生物样活性的化合物(视黄醛衍生物)在治疗剂量水平下, 也引起一些不需要的副作用, 包括头痛、畸形发生、

粘膜与皮肤的毒性、肌与骨骼的毒性、异常脂质血症(dyslipidemias)、皮肤刺激、头痛和对肝的毒性。这些副作用限制了视黄醛衍生物用于治疗疾病的可接受性和实用性。

在本领域内现在普遍认为：在哺乳动物(和其它生物)中存在两种主要类型的视黄醛衍生物受体。这两种主要类型或家族(family)的受体分别称作 RARs 和 RXRs。在每类型内有亚型：在 RAR 家族内，其亚型称作 RAR- α 、RAR- β 和 RAR- γ ，在 RXR 中，其亚型为：RXR- α 、RXR- β 和 RXR- γ 。这两家族受体为转录因子，根据它们的配体结合特异性可以将其彼此区分开。全反式-RA (ATRA) 结合并激活一类视黄酸受体(RARs)包括 RAR- α 、RAR- β 和 RAR- γ 。不同的配体 9-顺式-RA (9C-RA) 结合并激活 RARs 和视黄醛衍生物 X 受体(RXR)家族的成员。

在本领域中也已经确定两种主要的视黄醛衍生物受体类型和几种亚型的分布在哺乳动物的各类组织和器官中是不均匀的。此外，在本领域内已经普遍认为视黄醛衍生物的许多不需要的副作用是受一种或多种 RAR 受体亚型介导的。因此，在视黄醛衍生物受体上具有兴奋剂样活性的化合物中，对于主要类型或家族之一的特异性或选择性及甚至对于一个受体家族中的一种或多种亚型的特异性或选择性被认为是所需要的药理学性质。

最近，在本领域已经开发与 RAR 受体结合，而不引起所述应答即由相同受体的兴奋剂引起应答的化合物。因而，结合 RAR 受体而不引起“视黄醛衍生物”应答的化合物或药物为在生物测定和系统中能够(在某种程度上或多或少地)阻滞 RAR 兴奋剂的活性。更具体地说，就本领域内的科学和专利文献而言，公开的 PCT 申请 WO 94/14777 介绍了某些与 RAR 视黄醛衍生物受体结合的杂环羧酸衍生物，在该申请中，据说用于治疗某些疾病例如痤疮、牛皮癣、风湿性关节炎和病毒性感染。在 Yoshimura 等人的文章[J Med. Chem. 38:3163-3173(1995)]中公开了类似的内容。Kaneko 等人在 Med. Chem Res. 1:220-225 (1991); Apfel 等人在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7129-7133 Augusty

1992 Cell Biology; Eckhardt 等人在 Toxicology Letters 70: 299-308 (1994); Keidel 等人在 Molecular and Cellular Biology 14:287-298 (1994); 和 Eyrolles 等人在 J. Med. Chem. 37: 1508-1517 (1994)中介绍了对一个或多个 RAR 视黄醛衍生物亚型上具有拮抗剂样活性的化合物。

5 除了使用视黄醛衍生物治疗的不需要的副作用外，偶尔也会出现由维生素 A 或维生素 A 前体过量引起的严重的疾病，它或者由于服用过量的维生素补剂或者由于摄入含有高含量的所述维生素的某些鱼和动物的肝脏所造成的。具有维生素 A 过多综合症的慢性或急性毒性包括头痛、脱皮、骨的毒性、异常脂质血症等。近年来，使用维生素 A 类似物即视黄醛衍生物所引起的毒性已经显而易见，基本概括为维生素 A 过多综合症的毒性，提示一种常见的生物诱因即 RAR 激活。这些毒性目前主要通过支持性的方法来治疗并避免进一步与成因因子接触，无论它是肝脏、维生素补剂还是视黄醛衍生物。尽管部分毒性可以随着时间的推移而解除，其它一些(例如早熟性骺板闭合)为永久性的。

10

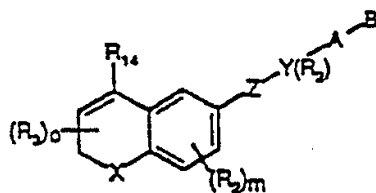
15

一般而言，特定的解毒药为通过药剂用于中毒的最好治疗，然而，在成千上万个化合物中只有大约 24 个化合物或化合物类型为已知的特异性解毒药。显然，特异性解毒药在治疗维生素 A 过多症和视黄醛衍生物毒性方面是有价值的。确实随着不断增加的有效力的视黄醛衍生物在临床上使用，用于视黄醛衍生物中毒的特异性解毒药可以挽救许多生命。

20

本发明概述

本发明包括式 I 化合物:



式 1

其中 X 为 S、O、NR', 其中 R' 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基, 或 X 为 $[C(R_1)_2]_n$ 其中 R_1 独立为 H 或 1-6 个碳原子的烷基, 及 n 为 0-2 之间的整数;

5 R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I、 CF_3 、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基;

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F;

m 为 0-3 的整数;

o 为 0-3 的整数;

10

Z 为 $-C\equiv C-$,

$-N=N-$,

$-N=CR_1-$,

$-CR_1=N$,

$-(CR_1=CR_1)_{n'}$ 其中 n' 为 0-5 的整数,

15

$-CO-NR_1-$,

$-CS-NR_1-$,

$-NR_1-CO$,

$-NR_1-CS$,

$-COO-$,

20

$-OCO-$,

$-CSO-$,

$-OCS-$;

25 Y 是苯基或萘基或选自吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡嗪基、嘧啶基、吡嗪基、噻唑基、咪唑基、咪唑基和吡唑基的杂芳基, 所述苯基和杂芳基可选被一个或两个 R_2 基团取代, 或

当 Z 为 $-(CR_1=CR_1)_{n'}$ 和 n' 为 3、4 或 5 时, 则 Y 代表在该 $(CR_1=CR_1)_{n'}$ 基团和 B 之间的直接价键;

A 为 $(CH_2)_q$ 其中 q 为 0-5, 具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基, 具

有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基；

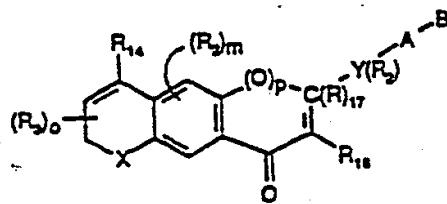
B 为氢，COOH 或其药学上可接受的盐，COOR₈，CONR₉R₁₀，-CH₂OH，CH₂OR₁₁，CH₂OCOR₁₁，CHO，CH(OR₁₂)₂，CHOR₁₃O，-COR₇，CR₇(OR₁₂)₂，CR₇OR₁₃O 或三-低级烷基甲硅烷基，其中 R₇ 为烷基、环烷基或含有 1-5 个碳原子的链烯基，R₈ 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子，或 5-10 个碳原子的环烷基，或 R₈ 为苯基或低级烷基苯基，R₉ 和 R₁₀ 独立为氢，1-10 个碳原子的烷基，或 5-10 个碳原子的环烷基，或苯基或低级烷基苯基，R₁₁ 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基，R₁₂ 为低级烷基，及 R₁₃ 为 2-5 个碳原子的二价烷基，和

R₁₄ 为(R₁₅)_r-苯基，(R₁₅)_r-萘基或(R₁₅)_r-杂芳基，其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子，r 为 0-5 的整数，和

R₁₅ 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO₂, N(R₈)₂, N(R₈)COR₈, NR₈CON(R₈)₂, OH, OCOR₈, OR₈, CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基，具有 1-10 个碳原子的氟代烷基，具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基，具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基，或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

本发明还包括式 101 化合物：

20



式 101

25

其中 X 为 S、O、NR'，其中 R' 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基，或 X 为 [C(R₁)₂]_n 其中 R₁ 独立为 H 或 1-6 个碳原子的烷基，及 n 为 0-2 之间的整数；



R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、Cl、Br、I、 CF_3 、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基;

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F;

5 m 为 0-3 的整数;

o 为 0-3 的整数;

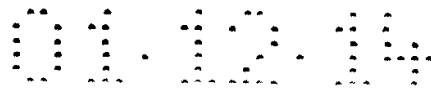
Y 是苯基或萘基或选自吡啶基、噻吩基、呋喃基、咪唑基、嘧啶基、吡嗪基、噻唑基、噁唑基、咪唑基和吡唑基的杂芳基, 所述苯基和杂芳基可选被一个或两个 R_2 基团取代;

10 A 为 $(CH_2)_q$ 其中 q 为 0-5, 具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基, 具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基, 具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基;

B 为氢, COOH 或其药学上可接受的盐, $COOR_8$, $CONR_9R_{10}$, $-CH_2OH$, CH_2OR_{11} , CH_2OCOR_{11} , CHO, $CH(OR_{12})_2$, $CHOR_{13}O$, $-COR_7$,
15 $CR_7(OR_{12})_2$, $CR_7OR_{13}O$ 或三-低级烷基甲硅烷基, 其中 R_7 为烷基、环烷基或含有 1-5 个碳原子的链烯基, R_8 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或 R_8 为苯基或低级烷基苯基, R_9 和 R_{10} 独立为氢, 1-10 个碳原子的烷基, 或 5-10 个碳原子的环烷基, 或苯基或低级烷基苯基,
20 R_{11} 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基, R_{12} 为低级烷基, 及 R_{13} 为 2-5 个碳原子的二价烷基, 和

R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基, 其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子, r 为 0-5 的整数, 和

R_{15} 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO_2 , $N(R_8)_2$, $N(R_8)COR_8$, $NR_8CON(R_8)_2$,
25 OH, $OCOR_8$, OR_8 , CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基, 具有 1-10 个碳原子的氟代烷基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基, 或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子;



R_{16} 为 H、1-6 个碳原子的低级烷基;

R_{17} 为 H、1-6 个碳原子的低级烷基、OH 或 $OCOR_{11}$, 和

p 为 0 或 1, 假如当 p 为 1 时, 则没有 R_{17} 取代基, m 为 0-2 的整数。

5 本发明的化合物用于预防给予视黄醛衍生物以便治疗或预防某些疾病时视黄醛衍生物的某些不需要的副作用。为此, 本发明的化合物可以与视黄醛衍生物共同给药。本发明的化合物也用于治疗由于过量服用视黄醛衍生物药物或维生素 A 或这类药物中毒导致的急性或慢性毒性。

10 本发明另外涉及在生物系统中(包括哺乳动物)RAR 拮抗剂用于阻滞所有或部分 RAR 受体位点, 以便预防或降低在这类受体位点上 RAR 兴奋剂的作用的用途。更具体地说, 本发明涉及用于(a)预防和(b)治疗视黄醛衍生物(包括维生素 A 或维生素 A 前体)慢性或急性毒性和视黄醛衍生物治疗中的副作用的 RAR 拮抗剂的用途。

15 本发明的一个具体方面, 提供治疗哺乳动物病理症状的方法。所治疗的疾病与视黄酸受体活性有关。该方法包括给予哺乳动物能与下列视黄酸受体亚型: RAR_{α} 、 RAR_{β} 和 RAR_{γ} 之一结合的视黄醛衍生物拮抗剂或负性激素。以药理学有效量给予所述拮抗剂或负性激素, 以便提供对抗哺乳动物病理症状的有益的治疗作用。

20 作为急性或慢性视黄醛衍生物或维生素 A 中毒的解毒药, 可以经肠道即: 胃插管或食物/水混合物, 或胃肠外例如腹膜内、肌内、皮下或皮肤局部等给予 RAR 拮抗剂。对于给药途径的唯一的要求是它必须能够传递所述拮抗剂到靶组织。可以单独或与赋形剂混合配制 RAR 拮抗剂。在经肠道给药的情况下, RAR 拮抗剂不必配制成溶液。

25 作为使用视黄醛衍生物治疗的辅助剂, 并且为了预防给予视黄醛衍生物药物的一种或多种副作用, 可以类似地经肠道或胃肠外给予 RAR 拮抗剂。不必以相同的给药途径给予 RAR 拮抗剂和 RAR 兴奋剂。其关键是在接触 RAR 兴奋剂时, 足够量的 RAR 拮抗剂持续地存

在于有关组织中。为了预防视黄醛衍生物的毒性，最好在用 RAR 兴奋剂治疗的同时或预先给予 RAR 拮抗剂。在许多情况下，将通过不同于兴奋剂的途径给予 RAR 拮抗剂。例如，通过皮肤局部给予 RAR 拮抗剂可以预防或改善经肠道给予视黄醛衍生物的不需要的皮肤作用。

5 本发明的另一个方面是鉴定视黄醛衍生物负性激素的方法。该方法包括下列步骤：获得含有对于结合重组视黄醛衍生物受体转录应答的报告基因的转染细胞，所述重组视黄醛衍生物受体至少具有位于完整的视黄醛衍生物受体的 DNA 结合结构域 C-端的蛋白结构域，测定在未处理转染细胞中报告基因表达的基础水平，使所述未处理的转染

10 细胞在不加入视黄醛衍生物的条件下繁殖，用待检验负性激素活性的视黄醛衍生物处理该转染细胞，测定在处理细胞中报告基因表达的水平，比较处理细胞和未处理细胞中测定的报告基因表达的水平，并鉴定作为视黄醛衍生物负性激素的那些与未处理细胞中测得的报告基因表达的基础水平相比处理细胞中产生的降低水平的报告基因表达的视

15 黄醛衍生物。在本方法一些优选的实施方案中，所述完整的受体为 RAR- α 、RAR- β 和 RAR- γ 亚型。在另一些实施方案中，所述完整的受体为 RXR- α 、RXR- β 和 RXR- γ 亚型。所述重组受体也可以是重组 RAR 或 RXR 受体。在某些实施方案中，所述重组受体为具有组成性转录激活因子结构域嵌合体(chimeric)的视黄醛衍生物受体。该组成性转录激活因子结构域可以包括具有一个净负电荷的许多氨基酸或具有病毒转录激活因子结构域例如单纯性疱疹病毒 VP-16 转录激活因子结构域的氨基酸序列。在其中所述组成性转录激活因子结构域具有一个净负电荷的实施方案中，所述视黄醛衍生物受体可以是重组体并

20 从中缺失 DNA 结合结构域，例如对于除了视黄酸应答元件外的顺式-调控元件特异性的 DNA 结合结构域。这些元件包括雌激素应答元件。

25 优选使所述转染细胞在基本上缺失内源性视黄醛衍生物的生长培养基例如包含活性炭提取血清的生长培养基中繁殖。在该方法中，所述报告基因可以是荧光素酶基因，在此情况下，所述测定步骤可以包括发

光法(luminometry)。所述报告基因也可以是 β -半乳糖苷酶基因，在此情况下，所述测定步骤将包括 β -半乳糖苷酶测定法。所述转染细胞可以是转染的哺乳动物细胞，例如绿猴细胞或人细胞。

5 本发明的另一个方面为加强给予哺乳动物的甾族化合物超家族受体兴奋剂的药理活性的方法。该方法包括与甾体化合物超家族受体兴奋剂一起给哺乳动物共服包含药学有效剂量的视黄醛衍生物负性激素，以加强所述甾体化合物超家族受体激动剂的药理活性。该药理活性在体外报告基因反式激活测试中例如通过测试抗-AP-1 活性是可测定的。所述待加强的药理活性可以是抗增生活性，例如在视网膜色素沉着上皮细胞(retinal pigment epithelium)中可测定的活性类型。所述甾体化合物超家族受体兴奋剂可以是下列任何兴奋剂：视黄醛衍生物受体兴奋剂、维生素 D 受体兴奋剂、糖皮质激素受体兴奋剂、甲状腺激素受体兴奋剂、过氧化物酶体激活增生剂受体兴奋剂或雌激素受体兴奋剂。所述视黄醛衍生物受体兴奋剂可以是 RAR 兴奋剂例如全-反式-10 视黄酸或 13-顺式视黄酸。所述视黄醛衍生物受体兴奋剂也可以是 RXR 兴奋剂。优选的维生素 D 受体兴奋剂为 1,25-二羟基维生素 D₃。优选的糖皮质激素受体兴奋剂为地塞米松。优选的甲状腺激素受体兴奋剂为 3,3',5-三碘甲状腺氨酸。所述视黄醛衍生物负性激素为 RAR-特异性视黄醛衍生物负性激素，它优选具有低于或约等于 30 nM 的离解常数。所述 RAR-特异性视黄醛衍生物负性激素的实例包括 AGN 193109, 15 AGN 193385, AGN 193389 和 AGN 193871。含有药学上有效剂量的视黄醛衍生物负性激素的组合物可以同时作为甾体化合物超家族兴奋剂共服，并且在共服前混合。它们也可以作为分开的成分共服。

附图简介

25 图 1 显示 AGN 193109 的化学结构。

图 2A-2F 为显示 AGN 139109 在 RARs 上抑制 ATRA 依赖性反式激活作用的系列线图。图 2A 和 2B 代表在 RAR- α 受体上的活性；图 2C 和 2D 代表在 RAR- β 受体上的活性；图 2E 和 2F 代表在 RAR- γ 受

体上的活性。在图 2A、2C 和 2E 中，空心方形代表视黄酸处理而实心圆形代表 AGN 193109 处理。在图 2B、2D 和 2F 中，单独的线代表用 10^{-8} M ATRA 和改变浓度的 AGN 193109 处理后所测定的荧光素酶活性。

5 图 3A 和 3B 代表用报告质粒 ERE-tk-Luc 和表达质粒 ER-RAR- α 转染的和用不同浓度的 ATRA (图 3A)或 AGN 193109 (图 3B)刺激的 CV-1 细胞中测定的荧光素酶活性的线图。取值点代表三个独立荧光素酶测定的均数 \pm SEM。使用不同量的共转染 ER-RAR- α (0.05, 0.1 和 0.2 μ g/孔)进行转染的结果在每一个图形中表示。

10 图 4A 和 4B 代表用报告质粒 ERE-tk-Luc 和表达质粒 ER-RAR- β 转染的和用不同浓度的 ATRA (图 4A)或 AGN 193109 (图 4B)刺激的 CV-1 细胞中荧光素酶活性的线图。取值点代表三个独立荧光素酶测定的均数 \pm SEM。使用不同量的共转染 ER-RAR- β (0.05, 0.1 和 0.2 μ g/孔)进行转染的结果在每一个图形中表示。

15 图 5A 和 5B 代表用报告质粒 ERE-tk-Luc 和表达质粒 ER-RAR- γ 转染的和用不同浓度的 ATRA (图 5A)或 AGN 193109 (图 5B)刺激的 CV-1 细胞中测定的荧光素酶活性的线图。取值点代表三个独立荧光素酶测定的均数 \pm SEM。使用不同量的共转染 ER-RAR- γ (0.05, 0.1 和 0.2 μ g/孔)进行转染的结果在每一个图形中表示。

20 图 6 显示用 ERE-tk-Luc 报告质粒及单独的 ER-RXR- α 嵌合体受体表达质粒或与 RAR- γ -VP-16 表达质粒一起共转染 CV-1 细胞的 ATRA 和 AGN 193109 剂量应答。用 ATRA(方形)和 AGN 193109(菱形)处理 ER-RXR- α 共转染细胞。用 ATRA(圆形)或 AGN 193109(三角形)处理合用 ER-RXR- α 和 RAR- γ -VP-16 共转染的细胞。

25 图 7 显示代表用 ERE-tk-Luc 报告质粒和 ER-RAR- γ 表达构成物转染的，然后用 10^{-8} M 的 ATRA 和表示在横轴上的不同浓度试验化合物处理的 CV-1 细胞的溶解产物中记录的荧光素酶活性测定值的线图。所述试验化合物为 AGN 193109 (方形)、AGN 193357 (空心菱形)、

AGN 193385 (圆形)、AGN 193389 (三角形)、AGN 193840 (实心方形) 和 AGN 192870 (实心菱形)。

5 图 8 显示代表用 ERE-tk-Luc 报告质粒和 RAR- γ -VP-16 及 ER-RXR- α 表达构成物转染的，然后用表示在横轴上的不同浓度试验化合物处理的 CV-1 细胞的溶解产物中记录的荧光素酶活性测定值的线图。所述试验化合物为 ATRA (空心方形)、AGN 193109 (空心圆形)、AGN 193174 (空心三角形)、AGN 193199 (实心方形)、AGN 193385 (实心圆形)、AGN 193389 (倒三角形)、AGN 193840 (斜的实心方形) 和 AGN 193871(半实心菱形)。

10 图 9A、9B 和 9C 用图解法表示利用 AGN 193109 可以调节 RAR (阴影部分)和在反式激活测试的内容中所述负性共激活因子蛋白(-)之间的相互作用的机理。图 9A 显示负性共激活因子蛋白和正性共激活因子蛋白(+)与 RAR 的结合平衡。在无配体的情况下，产生报告基因的基础水平的转录。如图 9B 中所述，加入 RAR 兴奋剂促进正性共激活因子蛋白与 RAR 的结合并导致上行调节(upregulated)的报告基因转录。如图 9C 中所述，加入 AGN 193109 促进负性共激活因子蛋白与 RAR 的结合并阻止报告基因的转录。

15 图 10 为显示用浓度保持在 10^{-8} M 的 AGN 193109 抑制作为 AGN 191183 浓度(10^{-10} - 10^{-12} M)的函数的 TPA 诱导的 Str-API-CAT 表达的条形图。将单独使用 AGN 191183 进行的试验所获结果以阴影线条表示，而带条纹线条代表合用 AGN 193109 和 AGN 191183 处理的结果。

20 图 11 用图解法表示利用 AGN 193109 可以加强 RARs 和其它核受体家族成员活性的机理。如该图解所述，诱导的 RARs(具有 AB-C-DEF 结构域空心长方形)已经增加了在抗-API 测试中对 RAR 配体的敏感性，因为存在于有限的供给物中的负性共激活因子蛋白(ncp)被分离成(sequester)RARs，从而导致两个族群：RAR+ncp 和 RAR-ncp。RAR-ncp 已经增加了对配体的敏感性。非 RAR 核因子(具有 AB-C-DEF 结构域的带阴影的长方形)已经增加了对同族配体的敏感性，因为通过

AGN 193109 的活性已经将 ncp 分离成 RAR。使用标准名称如“AB” (不依赖配体的反式激活结构域)、“C”(DNA 结合结构域)和“DEF” (配体调节的反式激活结构域和二聚结构域)指定所述核受体的模式结构域。

5 图 12 为显示 AGN 193109 对于在使用 MTV-DR3-Luc 报告质粒转染的 CV-1 细胞中 1,25-二羟基维生素 D₃ 剂量应答作用的线图。用 1,25-二羟基维生素 D₃(实心方形)、1,25-二羟基维生素 D₃ 和 10⁻⁸M AGN 193109 (实心三角形)、1,25-二羟基维生素 D₃ 和 10⁻⁷ M AGN 193109 (实心圆形)处理转染子。

10 图 13 为显示 AGN 193109 (10 nM)共服对于 1,25-二羟基维生素 D₃-介导的对 TPA 诱导的 Str-AP1-CAT 活性抑制的作用条形图。实心条代表对于单独用 1,25-二羟基维生素 D₃ 处理的转染细胞中 CAT 活性的抑制作用。空心条代表对于用混合的 1,25-二羟基维生素 D₃ 和 AGN 193109 处理的转染细胞中 CAT 活性的抑制作用。

15 如 14 为显示单独的 AGN 193109 和与 AGN 191183 的混合物形式对于用 RAR- γ 和 RAR 应答 MTV-TREp-Luc 报告构成物共转染 HeLa 细胞的作用线图。在该图中介绍的药物处理为:单独的 AGN 193109 (方形)、与 10⁻¹⁰M AGN 191183 合用的 AGN 193109 (菱形)和与 10⁻⁹ M AGN 191183 合用的 AGN 193109。

20 图 15 为显示作为 EGF (实心方形)的应答,但不作为对单独的限定的培养基应答 (空心圆形)的增生的 ECE16-1 细胞的线图。用实心三角形代表单独用 AGN 193109 处理的细胞。实心圆形代表用 10 nM AGN 191183 和 0-1000 nM AGN 193109 处理细胞所获得的结果。

25 图 16 为显示存在或不存在 AGN 191183 视黄醛衍生物兴奋剂的情况下, AGN 193109 对于 CaSki 细胞增生的作用的条形图。除了在单独限定培养基(DM)中繁殖的样品(空心条)外,所有的样品组接受 20 ng/ml 的表皮生长因子(EGF)。带条纹条形代表在没有 AGN 193109 情况下繁殖的样品。实心条形代表在 1000 nM AGN 193109 存在的情况

下繁殖的样品。用在该过程中的 AGN 191183 的浓度被表示在横轴上。

图 17 为显示 AGN 193109 加强在视网膜色素上皮(RPE)细胞上 ATRA 抗增生活性的剂量应答曲线。用实心方形代表单独用 ATRA 处理的样品。用实心圆形代表用合用的 ATRA 和 AGN 193109 ($10^{-7}M$)处理的样品。用于处理不同样品的 ATRA 的浓度在横轴上给出。

图 18 为显示 13-顺式-RA 和 ATRA 抑制 RPE 细胞生长和 AGN 193109 加强 13-顺式-RA 的抗增生活性的剂量应答曲线。显示在所述剂量应答中的不同样品处理包括单独的 13-顺式-RA (实心方形)、与 AGN 193109 ($10^{-6}M$)混合的 13-顺式-RA (实心圆形)、与 AGN 193109 ($10^{-8}M$)混合的 13-顺式-RA (实心三角形)和 ATRA (实心菱形)。用于所述样品处理中的 13-顺式-RA 和 ATRA 浓度表示于横轴上。

图 19 为显示 AGN 193109 增强在原始 RPE 细胞培养物中地塞米松的抗增生活性的剂量应答曲线。显示在所述剂量应答中的不同样品处理包括 ATRA(实心方形)、单独的地塞米松(实心圆形)、与 AGN 193109 ($10^{-8}M$)合用的地塞米松(实心三角形)和与 AGN 193109 ($10^{-6}M$)合用的地塞米松(实心菱形)。用于所述样品处理中的地塞米松和 ATRA 浓度表示于横轴上。

图 20 为显示 AGN 193109 增强在原始 RPE 细胞培养物中甲状腺激素(T3)的抗增生活性的剂量应答曲线。显示在所述剂量应答中的不同样品处理包括 ATRA(实心方形)、单独的 T3(实心圆形)、与 AGN 193109 ($10^{-8}M$)合用的 T3(实心三角形)、与 AGN 193109 ($10^{-6}M$)合用的 T3(实心菱形)。用于所述样品处理中的 T3 和 ATRA 浓度表示于横轴上。

本发明的详细介绍

25 定义

就本发明而言，RAR 拮抗剂定义为结合一个或多个具有 K_d 低于 1 微摩尔($K_d < 1 \mu M$)的 RAR 亚型的化合物，然而，它不引起在受体共转染测试中 RAR 亚型调节基因的显著的转录激活作用。拮抗剂一般为



抑制兴奋剂活性的化学试剂。从而，受体拮抗剂的活性一般通过其抑制兴奋剂活性的能力来测定。

5 RAR 兴奋剂定义为结合一个或多个具有 K_d 低于 1 微摩尔 ($K_d < 1 \mu\text{M}$) 的 RAR 受体亚型并引起在受体共转染测试中 RAR 亚型调节基因的转录激活作用的化合物。术语“RAR 兴奋剂”包括可以结合和/或激活除了 RARs 外，含有其它受体例如 RXR 受体的化合物。

10 在此，负性激素或反兴奋剂为使得所述受体采取相对于不存在任何受体情况下基础状态的非活动性状态的受体配体。从而，尽管拮抗剂可以抑制兴奋剂的活性，负性激素为可以在无兴奋剂的情况下改变所述受体构象的配体。Bond 等人 [Nature 374:272 (1995)] 已经研究了负性激素或反兴奋剂的概念。更准确地说，Bond 等人已经提出在非活性构象和自发的活性构象之间的平衡中存在非配体结合的 β_2 -肾上腺素能受体。提出兴奋剂使活性构象中的受体稳定。相反，认为反兴奋剂稳定非活性受体构象。从而，尽管拮抗剂通过抑制兴奋剂显示其活性，
15 另外，负性激素可以在无兴奋剂存在的情况下，通过抑制非配体结合受体向活性构象自发性转化显示其活性。只有一类拮抗剂将作为负性激素发挥作用。如在此所述，AGN 193109 为拮抗剂和负性激素。迄今为止，还没有其它的视黄醛衍生物显示出具有负性激素活性。

20 在此，共同给予两种药理活性化合物指的是或者体外或者体内给予两种单独的化学实体。共同给予指的是同时给予独立的制剂；同时给予制剂的混合物；以及给予一种制剂后再给予第二种制剂。在所有情况下，共同给予的制剂将彼此结合发挥作用。

25 术语烷基指的是(包括)任何(所有)已知的一般烷基、支链烷基和环烷基。术语链烯基指的是(包括)具有一个或多个不饱和位置的一般的链烯基、支链链烯基和环链烯基。类似，术语炔基指的是(包括)具有一个或多个三键的一般炔基和支链炔基。

低级烷基指的是在一般的低级烷基的情况下，以上确定的广泛定义的具有 1-6 个碳原子的烷基，及适用于 3-6 个碳原子的低级支链和环

烷基。类似地低级链烯基定义为具有 2-6 个碳原子的一般的低级链烯基，和 3-6 个碳原子的支链和环状的低级链烯基。类似地，低级炔基也定义为具有 2-6 个碳原子的一般的低级炔基和 4-6 个碳原子的支链低级炔基。

5 在此所用术语“酯”指的是(包括)在一般用于有机化学术语所定义范围内的任何化合物。它包括有机酯和无机酯。当 B(式 1 或式 101 中的)为-COOH 时，该术语包括用醇或硫醇(优选使用具有 1-6 个碳原子的脂肪族醇)处理该官能度衍生的产物。当所述酯衍生自其中 B 为-CH₂OH 的化合物时，该术语包括衍生自能够形成酯的有机酸包括磷基
10 酸和硫基酸的化合物或具有式-CH₂OCOR₁₁的化合物，其中 R₁₁ 为任何取代或未取代的脂肪族、芳香族、杂芳族或脂肪族芳基(优选在脂肪族部分具有 1-6 个碳原子)。

 在本申请中除非另外指明，优选的酯衍生自 10 个或少于 10 个碳原子的饱和脂肪族醇或酸或 5-10 个碳原子的环状或饱和脂肪族环状醇
15 和酸。特别优选的脂肪族酯为衍生自低级烷酸和醇的酯。也优选苯基或低级烷基苯基酯。

 酰胺具有一般有机化学中术语的定义。在此，它包括未取代的酰胺和所有脂肪族和芳族的一取代和二取代的酰胺。在本申请中除非另外指明，优选的酰胺为由 10 个或少于 10 个碳原子的饱和脂肪基衍生
20 的一取代和二取代酰胺或 5-10 个碳原子的环状或饱和脂肪族环状基衍生的一或二取代酰胺。特别优选的酰胺为由取代和未取代低级烷基胺衍生的酰胺。也优选取代和未取代苯基或低级烷基苯基胺衍生的一或二取代酰胺。也优选未取代的酰胺。

 缩醛和缩酮包括式-CK 的基团，其中 K 为(-OR)₂。在此，R 为低级烷基。K 也可以是-OR₇O-，其中 R₇ 为 2-5 个碳原子的低级烷基，直
25 链或支链。

 可以制备任何具有能形成盐的官能度，例如酸官能度的本发明化合物的药学上可接受的盐。药学上可接受的盐为保留母体化合物的活

性，并不产生对于接受给药受试者的任何有害的或不适当作用的盐。

5 药学上可接受的盐可以来自于有机或无机碱。该盐可以是单价或多价离子。特别感兴趣的是无机离子，钠、钾、钙和镁。使用胺可以制备有机盐，特别是铵盐，例如一-、二-和三-烷基胺或乙醇胺。使用咖啡碱、三甲醇氨基甲烷和类似分子也可以形成盐。其中有足够碱性的氮原子以便能形成酸的加成盐，它可以使用任何无机或有机酸或烷基化剂例如碘甲烷来形成。优选的盐为使用无机酸例如盐酸、硫酸或磷酸形成的盐。也可以使用任何简单有机酸例如一-、二-或三-酸中的任何一种。

10 本发明的一些化合物可以具有反式和顺式(E和Z)异构体。此外，本发明的化合物可以包括一个或多个手性中性，从而，可以以对映体或非对映体的形式存在。本发明的范围准备包括所有的这类异构体本身以及顺式和反式异构体的混合物，也包括非对映体混合物和对映体(光学异构体)的外消旋的混合物。在本申请中，当没有特别提及化合物(或不对称碳原子)的构型(顺式、反式或R或S)时，则指的是这类异构体的混合物或其中任何一种异构体。

15 具有视黄醛衍生物拮抗剂样生物活性的芳基取代的苯并吡喃、苯并噻喃、1,2-二氢喹啉和5,6-二氢萘的衍生物

20 对于式1中的符号Y而言，优选的本发明化合物为其中Y是苯基、吡啶基、噻吩基或呋喃基的化合物。更优选的化合物是其中Y是苯基或吡啶基的化合物，最好是Y为苯基的化合物。对于所述Y(苯基)和Y(吡啶基)上的取代基而言，优选的化合物为其中所述苯基被Z和A-B基团1,4(对位)取代的化合物和其中吡啶环被Z和A-B基团2,5取代的化合物。(在“吡啶”命名法中2,5位取代相当于“烟酸”命名法中6位取代。)在本发明优选的化合物中，或者在Y基团上没有可选的R₂取代基或者所述可选的R₂取代基为氟(F)。

25 优选化合物的A-B基团为(CH₂)_n-COOH或(CH₂)_n-COOR₈，其中n和R₈如上所定义。最好n为零和R₈为低级烷基，或n为零及B为COOH

或其药学上可接受的盐。

5 在大部分本发明化合物的优选实施例中，X 为 $[C(R_1)_2]_n$ ，其中 n 为 1。此外，也优选其中 n 为零(茚衍生物)和其中 X 为 S 或 O(苯并噻喃和苯并吡喃衍生物)的化合物。当 X 为 $[C(R_1)_2]_n$ 和 n 为 1 时，则 R_1 优选为 1-6 个碳原子的烷基，更优选甲基。

优选连接到式 1 化合物的四氢萘、苯并吡喃、苯并噻喃或二氢喹啉部分的芳族部分上的 R_2 基团为 H、F 或 CF_3 。 R_3 优选为氢或甲基，更优选为氢。

10 涉及在本发明化合物中的和在式 1 中所表示的基团 Z，在大多数优选的实施例中，Z 代表炔键($Z = -C\equiv C-$)。然而，“连接基团”Z 也优选为重氮基($Z = -N=N-$)，优选为烯或多烯基团($Z = -(CR_1=CR_1)_n-$)，优选为酯基($Z = -COO-$)，酰胺($Z = -CO-NR_2-$)或硫代酰胺($Z = -CS-NR_2-$)键。

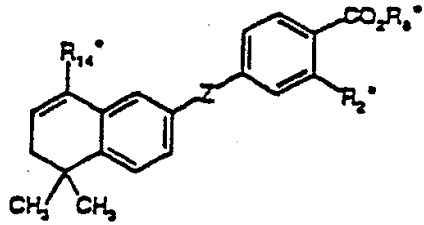
15 涉及 R_{14} 基团，优选其中 R_{14} 为苯基、2-吡啶基、3-吡啶基、2-噻吩基和 2-噻唑基的化合物。优选 R_{15} 基团(R_{14} 上的取代基)为氢、低级烷基、三氟甲基、氯、低级烷氧基或羟基。

涉及式 2、式 3、式 4、式 5 和式 5a 的本发明最优选化合物示于表 1 中。

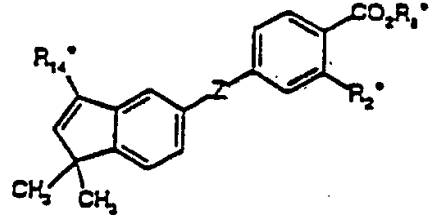
20

25

5

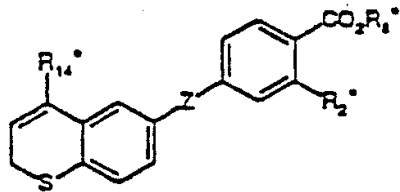


式 2

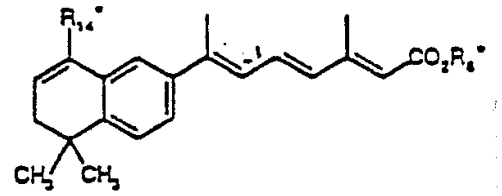


式 3,

10



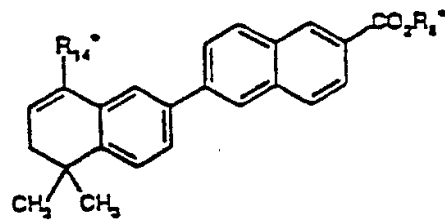
式 4



式 5

15

20



25

式 5a

表 1

化合物 #	式	R ₁₄	Z	R ₂	R ₈
1	2	4-甲基苯基	-C≡C-	H	Et
1a	2	苯基	-C≡C-	H	Et
2	2	3-甲基苯基	-C≡C-	H	Et
3	2	2-甲基苯基	-C≡C-	H	Et
4	2	3,5-二甲基苯基	-C≡C-	H	Et
5	2	4-乙基苯基	-C≡C-	H	Et
6	2	4-丁基苯基	-C≡C-	H	Et
7	2	4-氯代苯基	-C≡C-	H	Et
8	2	4-甲氧基苯基	-C≡C-	H	Et
9	2	4-三氟甲基苯基	-C≡C-	H	Et
10	2	2-吡啶基	-C≡C-	H	Et
11	2	3-吡啶基	-C≡C-	H	Et
12	2	2-甲基-5-吡啶基	-C≡C-	H	Et
13	2	3-羟基苯基	-C≡C-	H	Et
14	2	4-羟基苯基	-C≡C-	H	Et
15	2	5-甲基-2-噻唑基	-C≡C-	H	Et
15a	2	2-噻唑基	-C≡C-	H	Et
16	2	4-甲基-2-噻唑基	-C≡C-	H	Et
17	2	4,5-二甲基-2-噻唑基	-C≡C-	H	Et
18	2	2-甲基-5-吡啶基	-C≡C-	H	H
19	2	2-吡啶基	-C≡C-	H	H
20	2	3-甲基苯基	-C≡C-	H	H
21	2	4-乙基苯基	-C≡C-	H	H
22	2	4-甲氧基苯基	-C≡C-	H	H
15	2	4-三氟甲基苯基	-C≡C-	H	H
23	2	3,5-二甲基苯基	-C≡C-	H	H
24	2	4-氯代苯基	-C≡C-	H	H
25	2	3-吡啶基	-C≡C-	H	H
26	2	2-甲基苯基	-C≡C-	H	H
27	2	3-羟基苯基	-C≡C-	H	H
28	2	4-羟基苯基	-C≡C-	H	H
29	2	5-甲基-2-噻唑基	-C≡C-	H	H
30	2	2-噻唑基	-C≡C-	H	H
20	2	4-甲基-2-噻唑基	-C≡C-	H	H
31	2	4,5-二甲基-2-噻唑基	-C≡C-	H	H
32	2	5-甲基-2-噻吩基	-C≡C-	H	Et
33	2	2-噻吩基	-C≡C-	H	Et
33a	2	5-甲基-2-噻吩基	-C≡C-	H	H
34	2	2-噻吩基	-C≡C-	H	H
34a	2	4-甲基苯基	-CONH-	H	Et
35	2	4-甲基苯基	-CONH-	H	H
36	2	4-甲基苯基	-COO-	H	Et
37	2	4-甲基苯基	-COO-	H	(CH ₂) ₂ Si(CH ₃)
25	2	4-甲基苯基	-COO-	H	H
38	2	4-甲基苯基	-CONH-	F	Et
39	2	4-甲基苯基	-CONH-	F	H
40	2	4-甲基苯基	-CSNH-	H	Et
41	2	4-甲基苯基	-CSNH-	H	H
42	2	4-甲基苯基	-CH-CH-	H	Et
43	2	4-甲基苯基			
44	2	4-甲基苯基			

	45	2	4-甲基苯基	-CH-CH·	H	H
	46a	2	4-甲基苯基	-N-N·	H	Et
	46b	2	4-甲基苯基	-N-N·	H	H
5	47	3	4-甲基苯基	-C≡C·	H	Et
	48	3	4-甲基苯基	-C≡C·	H	H
	49	4	4-甲基苯基	-C≡C·	H	Et
	50	4	4-甲基苯基	-C≡C·	H	H
	51	5	4-甲基苯基	.	.	Et
	52	5	4-甲基苯基	.	.	H
	60	2	4-甲基苯基	-C≡C·	H	H
	60a	2	苯基	-C≡C·	H	H
	61	2	4-甲基苯基	-C≡C·	H	H
10	62	2	4-甲基苯基	-CSNH	F	Et
	63	2	4-甲基苯基	-CSNH	F	H
	64	5a	4-甲基苯基	---	.	Et
	65	5a	4-甲基苯基	---	.	H
	66	2	2-呋喃基	-C≡C·	H	Et
	67	2	2-呋喃基	-C≡C·	H	H

15 具有视黄醛衍生物拮抗剂样生物活性的芳基和(3-氧代-1-丙烯基)
取代的苯并吡喃、苯并噻喃、1,2-二氢喹啉和5,6-二氢萘的衍生物

参照式 101 中的符号 Y，优选的本发明化合物为其中 Y 是苯基、吡啶基、噻吩基或呋喃基的化合物。更优选的化合物为其中 Y 是苯基或吡啶基的化合物，最优选的化合物为其中 Y 是苯基的化合物。就所述 Y (苯基)和 Y (吡啶基)上的取代基而言，优选的化合物为其中所述苯基被 -CR₁₆=CR₁₇- 和 A-B 基团 1,4 (对位)取代的化合物和其中吡啶环被 -CR₁₆=CR₁₇- 和 A-B 基团 2,5 取代的化合物。(在“吡啶”命名法中 2,5 位取代相当于“烟酸”命名法中 6 位取代。)在本发明优选的化合物中，在 Y 基团上没有可选的 R₂ 取代基。

25 优选化合物的 A-B 基团为 (CH₂)_n-COOH 或 (CH₂)_n-COOR₈，其中 n 和 R₈ 如上所定义。最好 n 为零和 R₈ 为低级烷基，或 n 为零及 B 为 COOH 或其药学上可接受的盐。

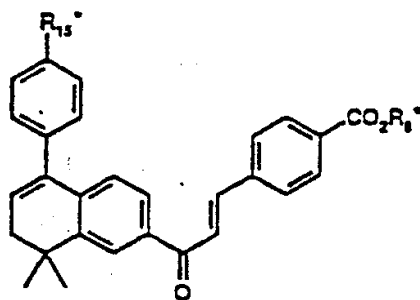
在本发明化合物的优选实施例中，X 为 [C(R₁)₂]_n，其中 n 为 1。

此外,也优选其中 X 为 S 或 O(苯并噻喃和苯并吡喃衍生物)的化合物。
 当 X 为 $[C(R_1)_2]_n$ 和 n 为 1 时,则 R_1 优选为 1-6 个碳原子的烷基,更优选甲基。

5 优选连接到式 101 化合物的四氢萘、苯并吡喃、苯并噻喃或二氢喹啉部分的芳族部分上的 R_2 基团为 H、F 或 CF_3 。 R_3 优选为氢或甲基,更优选为氢。

涉及 R_{14} 基团,优选其中 R_{14} 为苯基、2-吡啶基、3-吡啶基、2-噻吩基和 2-噻唑基的化合物。优选 R_{15} 基团(R_{14} 基团的取代基)为氢、低级烷基、三氟甲基、氯、低级烷氧基或羟基。

10 涉及式 102 的本发明优选化合物示于表 2 中。



式 102

表 2

化合物	R_{15}	R_8
101	CH_3	H
102	CH_3	Et
103	H	H
104	H	Et

生物活性, 给药形式

25 如上所述,本发明的化合物为一种或多种 RAR 受体亚型的拮抗剂。这意味着本发明化合物与一种或多种的 RAR 受体亚型结合,然而不触发由相同受体的兴奋剂触发的应答。部分本发明的化合物为所有三种 RAR 受体亚型(RAR- α 、RAR- β 和 RAR- γ)的拮抗剂,并称为

“RAR 全拮抗剂”。其它的部分化合物仅为一种或两种 RAR 受体亚型的拮抗剂。在本发明范围内的部分化合物为一种或两种 RAR 受体亚型的部分兴奋剂和其余亚型的拮抗剂。本发明化合物不与 RXR 受体结合，从而它们既不是 RXR 的兴奋剂也不是 RXR 的拮抗剂。

5 根据位点和需要抑制或改善的不需要的副作用的性质，根据本发明使用的化合物可以仅是一种或两种 RAR 受体亚型的拮抗剂。根据本发明所用的部分化合物可以是一种或两种 RAR 受体亚型的部分兴奋剂和其余亚型的拮抗剂。一般而言，如果所述拮抗剂是作用在 RAR 受体一种或多种亚型上(它或它们是造成食用过量中毒或不需要的副作用的主要原因)，根据本发明这类化合物是有用的。在此关系中注意
10 到，一般而言，如果在下述共转染测试中所述化合物不引起受体调节报告基因显著的转录激活作用，然而与具有 K_d 值低于约 $1 \mu\text{M}$ 的受体结合，则认为该化合物是某一给定受体亚型的拮抗剂。

15 是否化合物为 RAR 拮抗剂，从而根据本发明可以使用，在以下的测试中可以检验。

在公开的 PCT 申请号 WO94/17796 中(在 1994 年 8 月 18 日公开)详细介绍了嵌合体受体反式激活测试，它检验在 RAR- α 、RAR- β 和 RAR- γ 、RXR- α 受体亚型中兴奋剂样活性，它是基于 Feigner P. L. 和 Holm M. 的工作[Focus Vol 11, No. 2 (1989)]。所述公开是美国申请系列号 08/016404(在 1993 年 2 月 11 日申请，以美国专利 5455265 授权)
20 的 PCT 的相应部分。在该测试中，化合物应不引起通过特定受体亚型(RAR- α 、RAR- β 和 RAR- γ)报告基因的显著激活作用，以便作为 RAR 的合格拮抗剂用于本发明中。

25 在公开的 PCT 申请号 WO93/11755(尤其在 30-33 页和 37-41 页中，在 1993 年 6 月 24 日公开)中分别介绍了测定本发明化合物的拮抗剂/兴奋剂样活性或其与几种视黄醛衍生物受体亚型的结合能力的全受体反式激活测定和配体结合测定。以下也提供全受体反式激活测定的介绍。

全受体反式激活测定

使用 RAR 报告质粒 MTV-TREp-LUC (50 ng), 以及通过 Heyman 等人(Cell 68:397-406)的磷酸钙方法, 在自动 96 孔格式(format)中的 RAR 表达媒介物(10 ng)之一未转染 CV1 细胞(5000 细胞/孔)。就 RXR- α 和 RXR- γ 的反式激活测定而言, 基本按照 Heyman 等人(上述)和 Allegretto 等人(J. Biol. Chem. 268:26625-26633)所述方法, 使用 RXR-应答报告质粒 CRBP II-tk-LUC (50 ng)以及合适的 RXR 表达媒介物(10 ng)。就 RXR- β 反式激活测定而言, 如上所述使用 RXR-应答报告质粒 CPRE-tk-LUC (50 mg)以及 RXR- β 表达媒介物(10 mg)。这些报告质粒分别含有来自人 CRBP II 的 DRI 元件和来自启动子的某些 DRI 元件(见 Mangelsdorf et al. The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine, pp. 319-349, Raven Press Ltd., New York 和 Heyman et al., 上述)。使用 β -半乳糖苷酶(50 ng)表达媒介物作为在转染中的内对照物以便使转染效率方面的变异标准化。将所述细胞一式三份转染 6 小时, 然后用视黄醛衍生物孵化 36 小时, 并测定其提取物的荧光素酶和 β -半乳糖苷酶的活性。Heyman 等人(上述)和 Allegretto 等人(上述)已经介绍了用于全受体反式激活的详细的试验过程。在该测定中得到的结果以 EC₅₀ 数值表示, 同样在嵌合体受体反式激活测定中也以 EC₅₀ 数值表示。配体结合测定的结果以 K_d 数值表示。见 Cheng et al. Biochemical Pharmacology 22:3099-3108。

化合物不应该通过在全受体反式激活测定中某一受体亚型(RAR- α 、RAR- β 或 RAR- γ), 引起受体基因的显著激活, 以作为合格的用于本发明中的 RAR 拮抗剂。最后但一样重要, 化合物应该在 K_d 低于约 1 微摩尔(K_d < 1 μ M)的配体结合测定中与至少一个 RAR 受体亚型结合, 以便能够作为所述结合的受体亚型的拮抗剂发挥功能, 假定同一受体亚型不被所述化合物显著激活。

就本发明的某些实例性化合物而言, 下表 3 显示全受体反式激活测定的结果, 表 4 中介绍了与所有反式视黄酸有关的试验化合物测定

中的效率(以百分率表示)。表 5 显示了对本发明的某些实例性化合物的配体结合测定的结果。

表 3

全受体反式激活测定

5

化合物 #	EC ₅₀ (nM)					
	RAR α	RARB	RAR γ	RXR α	RXR β	RXR γ
18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
46b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
101	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
103	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

15

20

在表 3 中 0.0 表示所述化合物在该测定中的活性(有效性)比所有反式视黄酸活性低 20%。

25

表 4

5

全反式激活测定效率(相当 RA 活性的%)

化合物 #	RAR α	RAR β	RAR γ	RXR α	RXR β	RXR γ
18	4.00	1.00	0.00	2.00	10.00	1.0
19	0.00	5.0	3.0	0.0	9.0	4.0
20	3.0	4.0	0.00	4.00	0.00	3.0
21	2.00	2.00	2.00	3.00	0.00	3.00
22	0.00	0.00	2.00	1.00	0.00	2.00
23	0.00	6.00	3.00	1.00	0.00	4.00
24	3.00	7.00	4.00	1.00	0.00	3.00
25	2.00	3.00	3.00	5.00	0.00	3.00
26	1.00	6.00	0.00	2.00	0.00	3.00
27	9.00	14.00	6.00	2.00	0.00	4.00
28	2.00	10.00	2.00	2.00	0.00	3.00
29	0.00	6.00	11.00	0.00	6.00	2.00
30	3.00	5.00	1.00	0.00	9.00	3.00
31	4.00	14.00	2.00	1.00	8.00	6.00
32	0.00	2.00	2.00	1.00	0.00	2.00
34	3.00	5.00	2.00	1.00	0.00	3.00
36	1.00	5.00	0.00	1.00	7.00	2.00
39	1.00	7.00	9.00	2.00	0.00	1.00
41	3.00	5.00	6.00	1.00	0.00	3.00
45	2.00	0.00	7.00	3.00	8.00	0.00
46b	4.00	5.00	3.00	2.00	0.00	4.00
52	0.00	15.00	3.00	0.00	0.00	10.00
60	0.00	1.00	4.00	3.00	0.00	3.00
61	2.00	2.00	0.00	1.00	0.00	3.00
63	2.00	2.00	7.00	1.00	0.00	1.00
101	0.00	4.00	2.00	1.00	0.00	3.0
103	4.00	12.0	7.0	0.00	0.0	2.0

25

5

表 5
配体结合测定

化合物 #	K _d (nM)					
	RAR α	RARB	RAR γ	RXR α	RXR β	RXR γ
18	24.00	11.00	24.00	0.00	0.00	0.00
19	565	210	659	0.00	0.00	0.00
20	130.00	22.0	34.00	0.00	0.00	0.00
21	16	9	13	0.00	0.00	0.00
22	24.0	17.0	27.0	0.00	0.00	0.00
23	32.00	25.00	31.00	0.00	0.00	0.00
24	699	235	286	0.00	0.00	0.00
25	50	17	20	0.00	0.00	0.00
26	40.00	31.00	36.00	0.00	0.00	0.00
27	69.00	14.00	26.00	0.00	0.00	0.00
28	669	77	236	0.00	0.00	0.00
29	234	48	80	0.00	0.00	0.00
30	683	141	219	0.00	0.00	0.00
31	370	52.00	100.00	0.00	0.00	0.00
32	0.00	89.00	169.00	0.00	0.00	0.00
34	52.00	30.00	17.00	0.00	0.00	0.00
36	13.00	550.00	0.00	0.00	0.00	0.00
39	67.00	38.00	113.00	0.00	0.00	0.00
41	5.1	491	725	0.00	0.00	0.00
45	12.0	2.80	17.0	0.00	0.00	0.00
46b	250	3.70	5.80	0.00	0.00	0.00
52	60.00	63.00	56.00	0.00	0.00	0.00
60	1.5	1.9	3.3	0.00	0.00	0.00
61	96	15	16	0.00	0.00	0.00
63	133	3219	0.00	0.00	0.00	0.00
101	750	143	637	0.00	0.00	0.00
103	301	273	261	0.00	0.00	0.00

25

表 5 中 0.0 表示大于 1000 nM 的值。

正如从归结于表 3、4 和 5 中的试验结果可见，其中显示的本发明的实例性化合物为 RAR 受体亚型的拮抗剂，然而不具有对于 RXR 受体亚型的亲和力。(本发明的其它化合物可以是部分然而不是所有

RAR 受体亚型的拮抗剂并且是其余 RAR 亚型的兴奋剂。)由于这一性质, 本发明的化合物可以在生物测定中用于阻滞 RAR 兴奋剂的活性。在哺乳动物包括人类中, 可以与 RAR 兴奋剂一起共同给予本发明的化合物, 通过药理选择性或位点特异性传递, 优选防止 RAR 兴奋剂的不需要的副作用。本发明的化合物也可以用于治疗由于过量服用维生素 A 补剂或摄入含有高含量维生素 A 的某些鱼和动物的肝脏导致的慢性或急性维生素 A 过量。此外, 本发明的化合物也可以用于由视黄醛衍生物药物引起的急性或慢性毒性。在本领域内已知: 观察到的维生素 A 过多综合症(头痛、脱皮、骨毒性、异常脂质血症)的毒性与使用其它视黄醛衍生物观察到的毒性类似或相同, 提示共同的生物学因素, 即 RAR 激活。因为本发明的化合物阻滞 RAR 激活, 所以它们适用于治疗上述毒性。

当将本发明的化合物局部共同给药于皮肤上时, 本发明的化合物基本上能够防止由 RAR 兴奋剂视黄醛衍生物所诱导的皮肤刺激。类似, 可以将本发明的化合物局部用药给予皮肤, 以便在全身性给予 RAR 兴奋剂化合物的患者或动物中阻滞皮肤刺激。本发明的化合物可以加速自预先存在的视黄醛衍生物毒性的恢复, 可以阻滞由共同给予视黄醛衍生物所引起的血甘油三酯过多和可以阻滞由 RAR 兴奋剂(视黄醛衍生物)引起的骨毒性。

一般而言, 作为根据本发明在哺乳动物中的治疗用法, 可以经肠道或皮肤表面给予所述拮抗剂化合物, 作为已经不再继续服用致病因子(维生素 A 前体或其它视黄醛衍生物)后的维生素 A、维生素 A 前体的解毒剂或由于过量服用或长期接触导致的视黄醛衍生物毒性的解毒剂。可选将所述拮抗剂化合物与根据本发明的视黄醛衍生物药物一起共同给药, 在此情况下, 所述视黄醛衍生物提供有益的治疗作用, 而所述共同给予的拮抗剂改善或除去所述视黄醛衍生物的一种或多种不需要的副作用。就这种类型用法而言, 可以在特定部位给予所述拮抗剂, 例如作为皮肤表面涂抹的乳膏或洗剂, 而所述共给予的视黄醛衍

生物可以经肠道给药。

5 就根据本发明的治疗用法而言，将所述拮抗剂化合物掺入药用组合物中例如片剂、丸剂、胶囊、溶液剂、悬浮液、乳膏、软膏、凝胶、油膏、洗剂等，使用本身为本领域内熟知的药学上可接受的赋形剂和载体。例如在 Remington's Pharmaceutical Science (Edition 17, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania) 中详细介绍了皮肤表面制剂的制备。就皮肤表面用法而言，也可以以粉末或喷雾剂尤其气溶胶形式给予拮抗剂化合物。如果全身性给予该药物，可以将其配制成粉末、丸剂、片剂等或适合口服的糖浆剂或酏剂。就静脉或腹膜内注射而言，10 将所述拮抗剂化合物制成能够注射给药的溶液或悬浮液。在某些情况下，配制注射用拮抗剂化合物是有用的。在某些情况下，配制所述拮抗剂化合物为栓剂或置于皮下或肌肉注射的缓释制剂是有用的。

15 以根据本发明的有效治疗剂量给予所述拮抗剂化合物。治疗浓度为使具体病症(例如由于接触视黄醛衍生物或维生素 A 引起的毒性或视黄醛衍生物药物的副作用)减轻或阻止其扩张的浓度。可以理解，当共同给予所述拮抗剂化合物以便阻滞视黄醛衍生物诱导的毒性或根据本发明的副作用时，以预防方式使用所述拮抗剂化合物以便防止具体病症例如皮肤刺激的发生。

20 有用的治疗或预防浓度随着病症的不同而变化，在某些情况下，随着所治疗疾病的严重性和患者对于治疗的敏感性可以改变所用浓度。因此，没有一种浓度可以一成不变地使用，而是根据慢性或急性视黄醛衍生物毒性的特殊性或治疗的有关症状需要加以改变。通过常规试验可以得到所需浓度。然而，预期每毫升制剂含有 0.01-1.0 毫克的拮抗剂化合物的制剂为皮肤表面使用的有效治疗浓度。如果需要全身性给药，预期每日每公斤体重 0.01-5 毫克的用量可以达到治疗效果。25

利用 RAR 拮抗剂以便预防或治疗 RAR 兴奋剂诱导的毒性的基础是竞争性抑制由 RAR 兴奋剂激活 RAR 受体。RAR 拮抗剂的这两种用

途的主要差别在于有或没有先前存在的视黄醛衍生物毒性。以下将介绍的大部分的实施例涉及用于防止视黄醛衍生物毒性的视黄醛衍生物
的用途，然而，在此所述的一般的方法也用于治疗先前存在的视黄醛
衍生物毒性。

5

显示用于预防或治疗视黄醛衍生物毒性和/或视黄醛衍生物药物的副
作用的 RAR 用途的试验介绍

实施例 1：皮肤表面使用的拮抗剂治疗由局部皮肤使用兴奋剂诱导的
皮肤刺激

10

化合物 4-[(E)-2-(5,6,7,8-四氢-5,5,8,8-四甲基萘-2-基)丙烯-1-基]苯
甲酸(称为 AGN 191183)在现有技术中被认为是有效的 RAR 兴奋剂(例
如见美国专利 5324840 的说明书部分和图 2b)。(“AGN”数字为本发
明的合作受让人所使用的任意指定的参考数字，目的是识别化合物)

15

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(AGN
192869 也称作化合物 60a)为以下介绍的制备过程中的化合物。该化
合物为 RAR 拮抗剂。

也通过在裸鼠皮肤表面给予 RAR 拮抗剂 AGN 192869 可以阻滞由
皮肤表面给予 RAR 兴奋剂 AGN 191183 诱导的皮肤刺激。

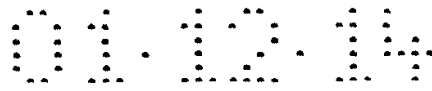
20

更具体地说，通过日常主观评价脱皮和擦伤，在半定量级别上测
定皮肤刺激。一个单一数字(皮肤表面刺激指数)概括了在试验过程中
在动物体上产生的皮肤刺激。皮肤刺激指数如下计算。所述皮肤表面
刺激指数为综合脱皮指数和综合擦伤指数的代数和。对于脱皮和擦伤
的综合指数分别在 0-9 和 0-8 的范围内，并且考虑所述观察脱皮和擦伤
的最大严重性、发作时间和平均严重性。

25

按 5 分级给脱皮的严重性评分，按 4 分级给擦伤的严重性评分，
较高的指数反映较大的严重性。综合指数的最高严重分值为在观察过
程中给某一动物打的最高日常严重性指数。

就综合指数的开始发作分值而言，所指定的 0-4 范围的指数如



下:

表 6

严重性 2 或 2 以上的外观脱皮或擦伤次数

<u>(天)</u>	<u>发作指数的次数</u>
8	0
6-7	1
5	2
3-4	3
1-2	4

5

综合指数的平均严重性分值为日常脱皮或擦伤指数的总合除以观察的天数。治疗的第一天不计算在内，因为所述药物在第一次治疗时还没有发挥作用。

10 为了计算综合脱皮和擦伤指数，将平均严重性和发作指数的次数加和并除以 2。将该结果加到最高严重性指数中。然后将综合脱皮和擦伤指数加和以便给出总的皮肤表面刺激指数。每个动物有其皮肤表面刺激指数，其值被表示为每组动物的单独指数的均值±SD。该值近似成整数。

15 用丙酮、AGN 191183、AGN 192869 或 AGN 192869 和 AGN 191183 的某种混合物连续 5 天皮肤表面处理雌性裸鼠[CrI:SKH1-hrBR] (8-12 周龄，n=6)。各个化合物的剂量示于表 7 中。以总体积为 4 ml/kg (约 0.1 ml)将所述治疗剂涂抹到动物的背侧皮肤上。每天观察小鼠并就脱皮和擦伤进行评分直到最后一次治疗后 3 天，即第 8 天为止。

20

表 7

实施例 1 的试验设计和结果

5

10

<u>组</u>	<u>剂量</u> AGN 191183 (mg/kg/d)	<u>剂量</u> AGN 192869 (mg/kg/d)	<u>摩尔比</u> (192869: 191183)	<u>皮肤表面</u> <u>刺激指数</u>
A	0	0	--	0 ± 0
B	0.025	0	--	8 ± 2
C	0.025	0.06	2:1	5 ± 2
D	0.025	0.30	10:1	2 ± 1
E	0.025	1.5	50:1	1 ± 0
F	0	1.5	--	0 ± 0

15

20

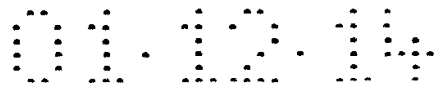
在表 7 中给出了实施例 1 的皮肤表面刺激评分。在剂量为 1.5 mg/kg/d (组 F) 下, 丙酮(溶媒)或 AGN 192869 (拮抗剂)不引起可观察到的皮肤表面刺激。在剂量为 0.025 mg/kg/d 情况下, AGN 191183 (RAR 兴奋剂)引起适度的皮肤表面刺激。然而, 使用 AGN 192869 以剂量依赖形式抑制 AGN 191183 诱导的皮肤表面刺激, 在 50 倍摩尔过量的 AGN 192869 的存在下, 几乎完全消除刺激作用。这表明皮肤表面 RAR 拮抗剂阻滞由皮肤表面 RAR 兴奋剂引起的皮肤刺激。当所述 RAR 拮抗剂更有效时, 例如化合物 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(AGN 193109 在本申请中也称作化合物 60), 使用

较低的拮抗剂与兴奋剂的摩尔比可以达到对 RAR 兴奋剂诱导的皮肤刺激的完全阻滞。

25

实施例 2: 通过皮肤表面使用拮抗剂来阻滞由口服兴奋剂所诱导的皮肤刺激

在该实施例中使用有效力的 RAR 兴奋剂 AGN 191183 (4-[(E)-2-(5,6,7,8-四氢-5,5,8,8-四甲基萘-2-基)丙烯-1-基]苯甲酸)和有效力的 RAR 拮抗剂 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯



甲酸(AGN 193109, 化合物 60)并利用试验动物(小鼠)的体重作为全身性 RAR 兴奋剂接触的标志。

5 使用玉米油或悬浮在玉米油(5 ml/kg)中的 AGN 191183 (0.26 mg/kg)通过胃内插管给予各组中的雌性裸鼠(8-12 周龄, n = 6)。同时
10 在小鼠的背侧皮肤上表面给予溶媒(97.6%丙酮/2.4%二甲亚砜)或 AGN 193109 在溶媒中的溶液(6 ml/kg)。用于不同组的特定剂量示于表 8 中。连续 4 天每日给药。将小鼠称重并按照实施例 1 中所述给每日的皮肤表面刺激评分,直到最后一次试验后 1 天为止。通过由最初体重(第一天)减去最终体重(第五天),除以最初体重并乘以 100%,计算体重变化的百分比。如实施例 1 中所述计算皮肤表面刺激指数。

对于不同组的表面刺激指数和失去体重示于表 8 中。分别通过皮肤表面和口服给予溶媒即丙酮和玉米油的联合治疗不引起皮肤表面刺激或失去体重。类似,利用口服溶媒和皮肤表面给予拮抗剂 AGN
15 193109 联合治疗不产生皮肤表面刺激或失去体重。单独口服 AGN 191183 导致显著失去体重和皮肤刺激。当与较低剂量的 AGN 193109 一起使用时,AGN 191183 诱导的皮肤刺激被显著地降低,而在较高剂量的 AGN 193109 下可以完全阻滞。通过皮肤表面给予 AGN
20 193109, 以与剂量相关的方式也阻滞 AGN 191183 诱导的失去体重,然而该阻滞不完全。因而,皮肤表面给予 AGN 193109 优选阻滞 AGN 191183 的皮肤毒性。假定低剂量的 AGN 193109 被全身性吸收,从而部分阻滞由 AGN 191183 诱导的失去体重。然而,这种吸收在具有较低渗透性皮肤的动物例如人类中可能较低。另外,AGN 193109 对于失去体重的抑制作用可能是由于改善了 AGN 191183 诱导的皮肤刺激的结果。

25

表 8

实施例 2 的试验设计和结果

组	皮肤表面使用 AGN193109 的剂量 (mg/kg/d)	口服 AGN191183 的剂量 (mg/kg/d)	增加或失去的 体重%	皮肤表面 刺激指数
A	0	0	1 ± 2	0 ± 0
B	0	0.26	(21 ± 6)	8 ± 1
C	0.12	0.26	(9 ± 5)	1 ± 1
D	0.47	0.26	(3 ± 5)	0 ± 1
E	0.47	0	3 ± 3	0 ± 0

从而，实施例 2 显示皮肤表面给予 RAR 拮抗剂可用于优选阻滞由口服给予 RAR 兴奋剂诱导的皮肤刺激。

实施例 3：皮肤表面使用拮抗剂加速自预先存在的视黄醛衍生物毒性的恢复

在该实施例中，通过皮肤表面给予 RAR 兴奋剂 AGN 191183 诱导失去体重，然后经皮肤表面给予溶媒或 RAR 拮抗剂 AGN 193109 治疗所述试验动物。

连续 2 天，每天用在溶媒(97.6%丙酮/2.4% DMSO, 4 ml/kg)中的 AGN 191183 (0.13 mg/kg/d)经皮肤表面处理雌性裸鼠(8-12 周龄，n = 5)。然后，从第三天开始，连续 3 天，每天用溶媒或在溶媒中的 AGN 193109 (4 mg/kg)经皮肤表面处理各组中相同的小鼠(n = 5)。在 1-5 天和第 8 天称量小鼠。体重表示为均值 ± SD。使用未配对的、二-尾部 t-检验(two-tailed t-test)从统计学上比较均值。当 P < 0.05 时，认为差异显著。

表 9
实施例 3 的结果

治疗 (3-5 天)	体重(g)					
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 8 天
溶媒	24.6 ± 1.5	23.9 ± 1.2	21.4 ± 1.2	20.3 ± 1.7	21.0 ± 1.4	24.7 ± 1.0
AGN 193109	23.9 ± 1.0	23.5 ± 1.2	21.4 ± 0.6	22.2 ± 0.7	22.8 ± 0.8	25.0 ± 1.1

实施例 3 中体重随时间的变化过程示于表 9 中。由于在第一天和

第二天 AGN 191183 处理的结果，两组小鼠的体重在第二天和第三天平行下降。然而，AGN 193109 处理与溶媒处理相比在第四天和第五天显著增加体重。这些数据显示通过其后使用 AGN 193109 的处理加速自 AGN 191183 诱导的失去体重的恢复。在第八天，两组小鼠之间体重没有显著差异，显示在给定的足够时间内，可达到完全恢复。从而，RAR 拮抗剂可以有效地减轻 RAR 兴奋剂诱导的毒性，即使 RAR 兴奋剂诱导的毒性在 RAR 拮抗剂处理之前，即在所述 RAR 兴奋剂毒性方案中。

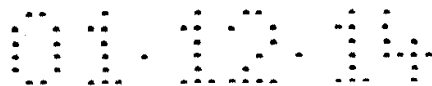
10 实施例 4：口服给予拮抗剂阻滞由口服共同给予视黄醛衍生物兴奋剂诱导的血甘油三酯过多症

5-[(E)-2-(5,6,7,8-四氢-3,5,5,8,8-五甲基萘-2-基)丙烯-1-基]-2-噻吩羧酸为已知的 RAR/RXR 全-兴奋剂(见美国专利 5324840，表 32)并称为 AGN 191659。该化合物口服用于在大鼠中诱导急性血甘油三酯过多症，口服共同给予 AGN 193109 (化合物 60)以便阻滞 AGN 191659 诱导的血甘油三酯过多症。

15 使用玉米油(溶媒)、AGN 191659、AGN 193109 或 AGN 191659 和 AGN 193109 的混合物，经胃管给予雄性 Fescher 大鼠(6-7 周龄，n = 5)。给予在玉米油中的微细悬浮液形式的 AGN 191659 和 AGN 193109。所述试验设计，包括所用剂量示于表 10 中。

20 在二氧化碳麻醉下，自下静脉腔中抽取血样。通过低速离心将血清自血液中分出。利用市场上可买到成套仪器并适用于 96-孔接种板格的标准分光光度终点测定法测定总的血清甘油三酯(甘油三酯加甘油)。血清甘油三酯的水平表示为均值±SD。通过单向方差分析从统计学上比较均值，如果发现显著性差异，然后进行 Dunnett's 检验。
25 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

如在表 10 中所示，AGN 191659 本身引起相对溶媒处理血清甘油三酯的显著升高。AGN 193109 本身不显著增加血清甘油三酯。AGN 193109 和 AGN 191659 的摩尔比为 1:1 和 5:1 的混合物显著降低血清甘



油三酯到与对照没有显著区别的水平。

表 10

实施例 4 的试验设计和结果

组	治疗(剂量)	血清甘油三酯 (mg/dl)
5	A 溶媒	55.0 ± 3.1
	B AGN 193109 (19.6 mg/kg)	52.4 ± 6.3
	C AGN 191659 (3.7 mg/kg)	122.5 ± 27.6
	D AGN 193109 (3.9 mg/kg) + AGN 191659 (3.7 mg/kg)	55.7 ± 14.7
	E AGN 193109 (19.6 mg/kg) + AGN 191659 (3.7 mg/kg)	72.7 ± 8.9

10 实施例 4 显示可以使用 RAR 拮抗剂阻滞由共同给予的视黄醛衍生物诱导的血甘油三酯过多症。

实施例 5: 胃肠外使用拮抗剂阻滞由胃肠外共同给予视黄醛衍生物兴奋剂诱导的骨毒性

15 实施例 5 显示 RAR 拮抗剂可以阻滞由 RAR 兴奋剂诱导的骨毒性。在该实施例中, 使用 AGN 193109 以便在豚鼠中阻滞由共同给予 RAR 兴奋剂 AGN 191183 引起的早熟性骺板闭合。

20 将含有溶媒(20%二甲亚砜/80%聚乙二醇-300)、AGN 191183 (0.06 mg/ml)或与 AGN 193109 (0.34 mg/ml)结合的 AGN 191183 (0.06 mg/ml)的渗透泵腹膜内移植入各组的雄性 Hartley 豚鼠(约 3 周龄, n = 4)体内。由制造商设计的渗透泵可每小时传递约 5 μl 溶液, 连续 14 天。

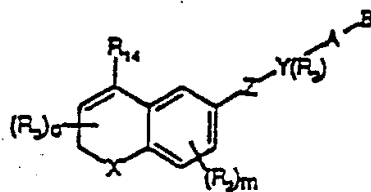
25 在移植 14 天后通过二氧化碳窒息处死动物。取出左胫骨并置于 10%的缓冲福尔马林中。通过与甲酸/福尔马林溶液接触 3-4 天使该胫骨脱钙, 并制备石蜡切片。通过标准方法, 用苏木素和曙红使切片染色。检查近端胫骨骺板并根据闭合或未闭合评分。为此, 将骺板闭合规定为所示骺生长板软骨连续性中断, 即被骨和/或成纤维细胞组织所代替。

四只用溶媒处理的豚鼠没有一只在所示试验结束时显示骺板闭合。这是预料之中的, 因为豚鼠胫骨近端骺板一般直到所述动物至少

10月龄才闭合。所有四只 AGN 191183 处理的豚鼠显示部分或完全骺板闭合。然而，用 AGN 191183 和 AGN 193109 的混合物处理任何一只豚鼠均未显示骺板闭合。从而，当胃肠外共同给予这些化合物时，以 5 倍摩尔过量的 AGN 193109 完全阻滞 AGN 191183 诱导的骨毒性。

5 RAR 拮抗剂化合物

化合物 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸 (AGN 193109, 化合物 60) 和 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸 (AGN 192869, 化合物 60a) 为 RAR 拮抗剂的实例，将它们用于上述动物试验以便阻滞根据本发明的 RAR 受体。下式 (式 1) 化合物作为根据本发明使用的其它 RAR 拮抗剂化合物其它的和一般的实例。



15 式 1

在式 1 中，X 为 S、O、NR'，其中 R' 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基，或

20 X 为 $[C(R_1)_2]_n$ 其中 R_1 为 H 或 1-6 个碳原子的烷基，及 n 为 0 或 1 的整数；

R_2 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基、F、 CF_3 、1-6 个碳原子的氟取代烷基、OH、SH、1-6 个碳原子的烷氧基或 1-6 个碳原子的烷硫基；

R_3 为氢、1-6 个碳原子的低级烷基或 F；

25 m 为 0-3 的整数；

o 为 0-3 的整数；

Z 为 $-C\equiv C-$,

$-N=N-$,

- N=CR₁-,
- CR₁=N,
- (CR₁=CR₁)_n-其中 n' 为 0-5 的整数,
- CO-NR₁-,
- 5 -CO-NR₁-,
- NR₁-CO,
- NR₁-CS,
- COO-,
- OCO-,
- 10 -CSO-,
- OCS-;

Y 是苯基或萘基或选自吡啶基、噻吩基、咪唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、噻唑基、噁唑基、咪唑基和吡唑基的杂芳基，所述苯基和杂芳基可选被一个或两个 R₂ 基团取代，或

15 当 Z 为 -(CR₁=CR₁)_n- 和 n' 为 3、4 或 5 时，则 Y 代表在该 (CR₁=CR₁)_n 基团和 B 之间的直接价键；

A 为 (CH₂)_q 其中 q 为 0-5，具有 3-6 个碳原子的低级支链烷基，具有 3-6 个碳原子的环烷基、具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个双键的链烯基，具有 2-6 个碳原子和 1 或 2 个三键的炔基；

20 B 为氢，COOH 或其药学上可接受的盐，COOR₈，CONR₉R₁₀，-CH₂OH，CH₂OR₁₁，CH₂OCOR₁₁，CHO，CH(OR₁₂)₂，CHOR₁₃O，-COR₇，CR₇(OR₁₂)₂，CR₇OR₁₃O 或三-低级烷基甲硅烷基，其中 R₇ 为含有 1-5 个碳原子的烷基、环烷基或链烯基，R₈ 为 1-10 个碳原子的烷基或三甲基甲硅烷基烷基其中所述烷基具有 1-10 个碳原子，或 5-10 个碳原子的环烷基，或 R₈ 为苯基或低级烷基苯基，R₉ 和 R₁₀ 独立为氢，1-10 个碳原子的烷基，或 5-10 个碳原子的环烷基，或苯基或低级烷基苯基，R₁₁ 为低级烷基、苯基或低级烷基苯基，R₁₂ 为低级烷基，及 R₁₃ 为 2-5 个碳原子的二价烷基，和

25

R_{14} 为 $(R_{15})_r$ -苯基, $(R_{15})_r$ -萘基或 $(R_{15})_r$ -杂芳基, 其中所述杂芳基具有选自 O、S 和 N 的 1-3 个杂原子, r 为 0-5 的整数, 和

R_{15} 独立为 H, F, Cl, Br, I, NO_2 , $N(R_8)_2$, $N(R_8)COR_8$, $NR_8CON(R_8)_2$, OH, $OCOR_8$, OR_8 , CN, 具有 1-10 个碳原子的烷基, 具有 1-10 个碳原子的氟代烷基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个双键的链烯基, 具有 1-10 个碳原子和 1-3 个三键的炔基, 或三烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷氧基其中所述烷基独立具有 1-6 个碳原子。

芳基取代化合物的合成方法

通过在此介绍的合成化学途径可以制备式 1 实例性 RAR 拮抗剂化合物。合成化学家将容易赞同在此所设立的反应条件为可以一般化到任何及所有由式 1 所代表的化合物的特定实施方案。

15

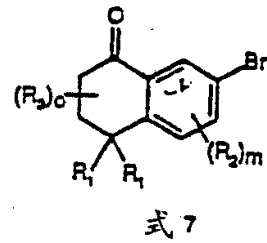
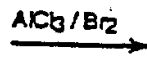
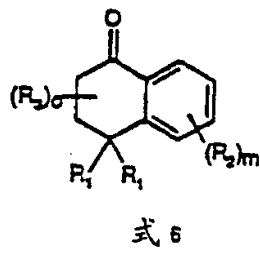
20

25

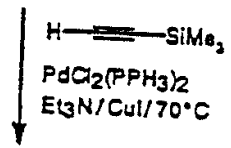
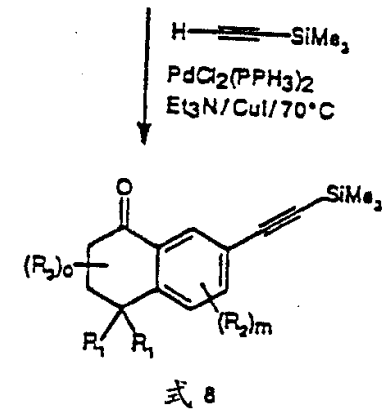
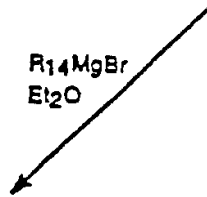
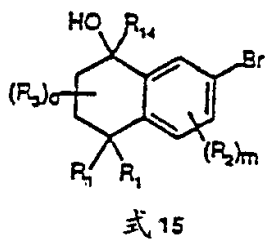
5

反应图式 1

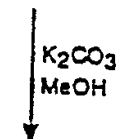
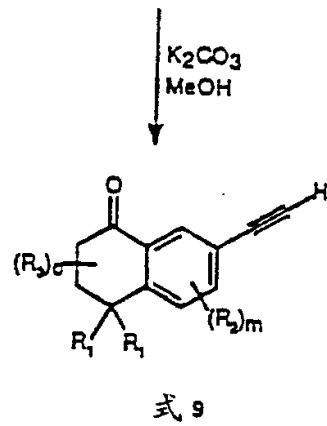
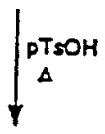
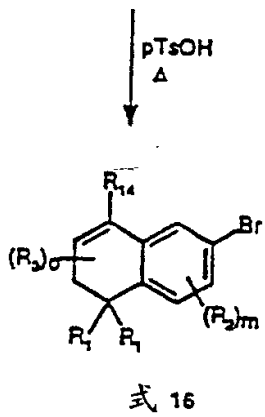
10



15



20

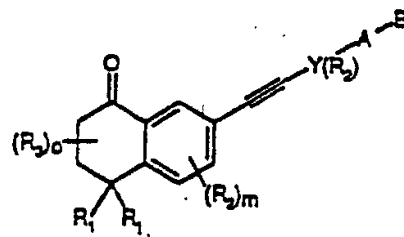
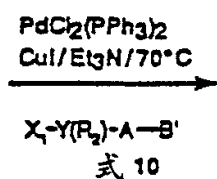
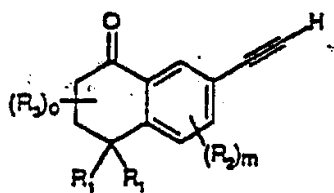


25

反应图式 1

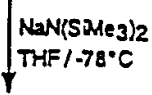
(续)

5

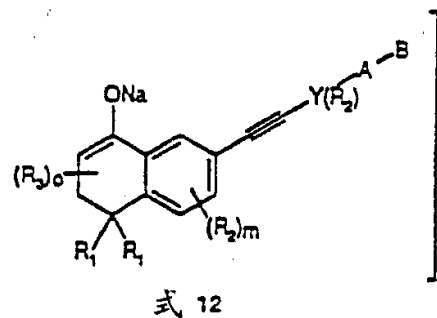


10

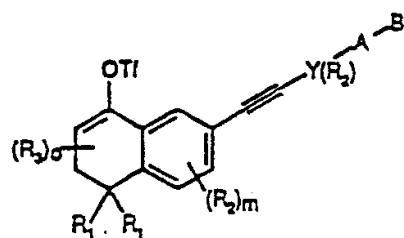
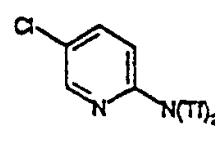
同系物和衍生物



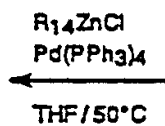
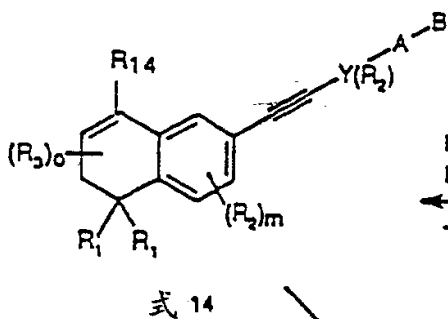
15



20



25



同系物和衍生物

反应图式 1 显示式 1 化合物的合成, 其中 Z 基团为乙炔基(-C≡C-)和 X 为[C(R₁)₂]_n, 其中 n 为 1。换句话说, 反应图式 1 显示本发明的乙炔基取代的二氢萘衍生物的合成。根据该图式, 使式 6 四氢萘-1-酮化合物溴化以提供式 7 溴代衍生物。所述式 6 化合物已经带有所需的 R₁、R₂ 和 R₃ 取代基(它们根据以上式 1 所定义)。式 6 化合物的优选实例为 3,4-二氢-4,4-二甲基-1(2H)-萘, 它在化学文献中被介绍[Arnold et al. J. Am. Chem. Soc. 69:2322-2325 (1947)]。自 1-溴-3-苯基丙烷合成该化合物的优选的途径也在本申请的实验部分被介绍。

然后, 使式 7 化合物与(三甲基甲硅烷基)乙炔反应, 提供式 8 (三甲基甲硅烷基)乙炔基取代-3,4-二氢-萘-1(2H)-酮。与(三甲基甲硅烷基)乙炔的反应一般在碘化亚酮、合适的催化剂[一般具有式 Pd(PPh₃)₂Cl₂]、酸性受体(例如三乙胺)的存在下, 在惰性气体(氩气)中, 加热(约 100 °C)进行。一般反应时间为约 24 小时。然后, 使式 8 (三甲基甲硅烷基)乙炔基取代-3,4-二氢-萘-1(2H)-酮与碱(氢氧化钾或碳酸钾)在醇溶剂例如甲醇中反应, 提供式 9 乙炔基取代-3,4-二氢-1-萘-1(2H)-酮。然后, 使式 9 化合物与芳族或杂芳族试剂 X₁-Y(R₂)-A-B' (式 10) 在碘化亚酮、合适的催化剂(一般为 Pd(PPh₃)₂Cl₂)、酸性受体(例如三乙胺)的存在下, 在惰性气体(氩气)中偶合。可选将式 9 化合物的锌盐(或其它合适的金属盐)与式 10 反应剂在 Pd(PPh₃)₄ 或类似的复合物存在下偶合。一般与试剂 X₁-Y(R₂)-A-B' (式 10) 的偶合反应在室温或适度升高的温度下进行。一般而言, 在乙炔基芳基衍生物或其锌盐和卤素取代芳基或杂芳基化合物(例如式 10 试剂)之间的偶合过程在美国专利 5264456 中被介绍。式 11 化合物为本发明实例性化合物或其在 B' 基团中保护的衍生物(通过本领域内众所周知的反应可以容易地将该保护基除去)的前体。通过本领域内熟知的这类反应和转化, 可以将所述式 11 化合物转变成所述实例性化合物的其它前体。通过转化为“同系物和衍生物”的这类反应在反应图式 1 中被说明。用于几个实例性化

合物合成的这类转变之一为酯基(当 B 或 B' 为酯基时)的皂化以便提供游离羧酸或其盐。

一般而言,通过本领域内众所周知的反应可以获得式 10 卤素取代芳基或杂芳基化合物。这类化合物的实例为 4-碘代苯甲酸乙酯,例如它可以通过 4-碘代苯甲酸的酯化而得到。另一实例为 6-碘代烟酸乙酯(ethyl 6-iodonicotinoate),它可以通过在 6-氯烟酸上进行卤素交换反应,然后酯化而得。一般而言,关于式 11 化合物的衍生化和/或式 10 的芳基和杂芳基化合物(它们然后可以与式 9 化合物反应)的合成,可以利用下列众所周知和公开的一般原理和工艺。

一般通过在酸性催化剂例如氯化氢或亚硫酸氯的存在下,在合适的醇的溶液中,回流所述酸将羧酸酯化。可选将所述羧酸与合适的醇在二环己基碳二亚胺和二甲氨基吡啶存在下缩合。用常规方法回收和纯化所述酯。通过 March 所述方法(Advanced Organic Chemistry, 2nd Edition, McGraw-Hill Book Company, p. 810)可以容易地制备缩醛和缩酮。醇、醛和酮均可以通过例如在 McOmie (Plenum Publishing Press, 1973)和 Protecting Groups (Ed. Greene, John Wiley & Sons, 1981)中所介绍的已知方法分别形成醚和酯、缩醛或缩酮来保护。

为了在进行反应图式 1 的偶合反应(其中相当于式 10 的所述化合物不能从市场上买到)之前,增加式 10 化合物中 n 的值,通过在 Arndt-Eistert 条件或其它容许的反应过程下连续地处理,使芳族或杂芳族羧酸符合要求(homologation)。也可选通过合适的方法,使不是羧酸的衍生物符合要求。然后,通过以上所述的通法使符合要求的酸酯化。

例如通过为具有实践经验的有机化学家所熟知的合成图式,可以制备其中 A 为具有一个或多个双键的链烯基的式 10 化合物(或其它中间体或实例化合物);例如通过 Wittig 等反应或通过自 α -卤代芳基烷基羧酸、酯或类似的羧基醛(carboxaldehyde)中除去卤素导入双键。通过相应的芳基甲基酮与强碱例如二异丙基氨基锂反应(与氯代磷酸二乙酯反应,然后加入二异丙基氨基锂)可以制备其中 A 基团具有三键(乙

炔基)的式 10 化合物(或其它中间体或实例化合物)。

5 由相应的酯可以容易地获得由式 11 化合物(或其它中间体或实例化合物)衍生的酸和盐。使用碱金属碱的碱性皂化将提供所述酸。例如可以将式 11 酯(或其它中间体或实例化合物)溶解在极性溶剂例如链醇中, 优选在惰性气体中, 在室温下, 使用约 3 摩尔过量的碱例如氢氧化锂或氢氧化钾。将所述溶液搅拌一定时间, 15-20 小时, 冷却, 酸化并通过常规方法回收其水解产物。

10 通过本领域内任何已知的、合适的酰胺化方法由相应的酯或羧酸可以形成酰胺。制备这类化合物的一个方法为转变羧酸为酰氯, 然后用氢氧化铵或适合的胺处理该化合物。

15 通过使用亚硫酰氯或其它的方法(J. March, Advanced Organic Chemistry, 2nd Edition, McGraw-Hill Book Company)将相应的酸转化为酰氯, 然后用硼氢化钠(March, *Ibid*, p. 1124)还原所述酰氯, 产生相应的醇来制备醇。可选使用氢化锂铝在低温下还原酯。在 Williamson 反应条件下(March, *Ibid*, p. 357)使用合适的卤化烷使这些醇烷基化, 产生相应的醚。通过使所述醇与合适的酸在酸性催化剂或二环己基碳二亚胺和二甲氨基吡啶的存在下反应, 可以将所述醇转化为酯。

20 使用温和的氧化剂例如二氯甲烷中的重铬酸吡啶鎓(Corey, E. J., Schmidt, G., *Tet. Lett.* 399, 1979)或二氯甲烷中的二甲亚砷/草酰氯(Omura, K., Swern, D., *Tetrahedron* 34:1651(1978))可以由相应的一级醇制备醛。

通过用烷基-Grignard 试剂或类似的试剂处理所述醛, 然后氧化可以由合适的醛制备酮。

25 通过在 March, *Ibid*, p. 810 中所述方法, 由相应的醛或酮制备缩醛或缩酮。

由相应的卤化芳族或杂芳族化合物(优选其中所述卤素为碘)可以制备其中 B 是氢的式 10 化合物(或其它中间体或实例性化合物)。

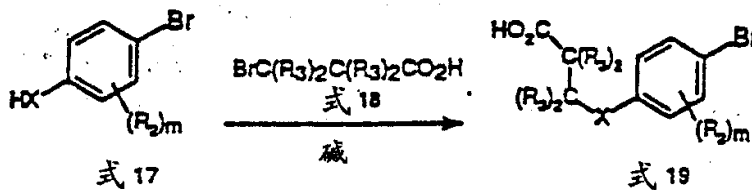
再次参考反应图式 1, 使式 11 化合物与双(三甲基甲硅烷基)氯化

钠和 2-[N,N-双(三氟甲基磺酰基)氨基]-5-氯代吡啶在惰性醚类溶剂例如四氢呋喃中, 于低温(-78 °C 和 0 °C)下反应。所述内容被显示在反应图式 1 中, 其中通常将未分离的钠盐中间体表示在括号中, 如式 12。所述反应产生式 13 所代表的三氟甲基磺酰氧基衍生物。(Tf = SO₂CF₃)。然后, 通过与由所述芳基或杂芳基化合物 R₁₄H 所衍生有机金属衍生物反应, 将式 13 化合物转变成为以式 14 所表示的本发明的实例性化合物, 所述有机金属衍生物的分子式为 R₁₄Met (Met 代表一价金属), 优选 R₁₄Li (R₁₄ 如式 1 中所定义)。所述与有机金属衍生物(优选分子式 R₁₄Li 的锂衍生物)的反应一般在惰性醚类溶剂(例如四氢呋喃)中, 在氯化锌(ZnCl₂)和四(三苯基磷)-钯(0)(Pd(PPh₃)₄)的存在下进行。如果所述有机锂试剂 R₁₄Li 市场上不能买到, 可以由所述化合物 R₁₄H (或其卤素衍生物 R₁₄-X₁ 其中 X₁ 为卤素)在本领域内已知的醚类溶剂中制备。所述试剂 R₁₄Li 和式 13 化合物之间反应的温度范围一般而言在约-78 °C - 50 °C 内。根据以上所讨论的反应, 可以将式 14 化合物转变成其它同系物和衍生物。

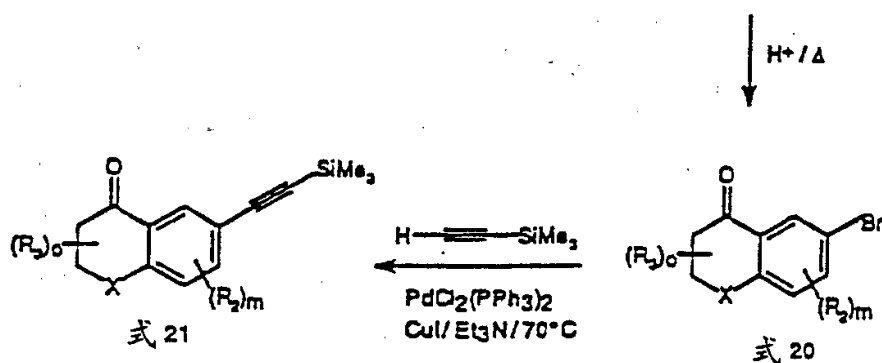
也可以将反应图式 1 中所示的式 7 中间体 7-溴-四氢萘-1-酮化合物与具有式 R₁₄MgBr (R₁₄ 如式 1 中所定义)的 Grignard 试剂发生转化产生式 15 叔醇。通过用酸处理使所述叔醇脱水提供式 16 的 3,4-二氢-7-溴代萘衍生物, 它作为合成本发明的其它化合物的中间体(见反应图式 6、7 和 8)。

反应图式 2

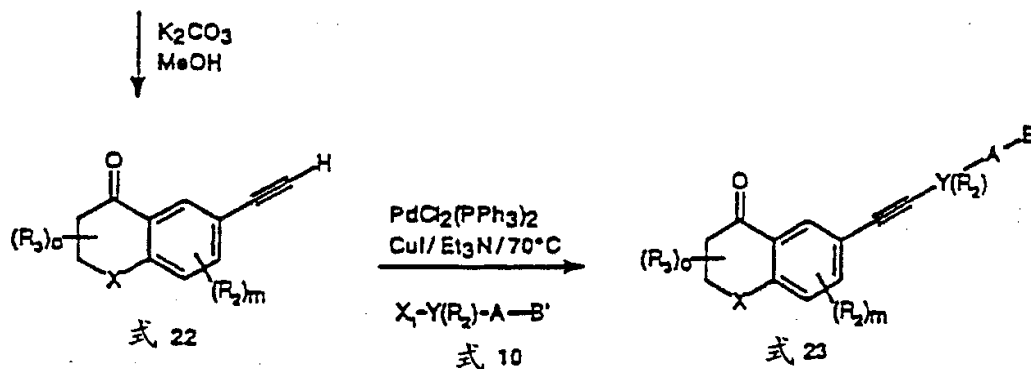
5



10

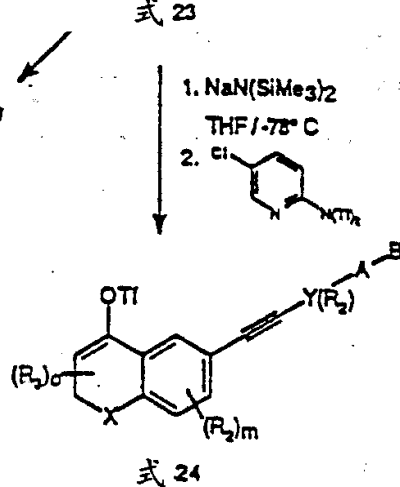


15

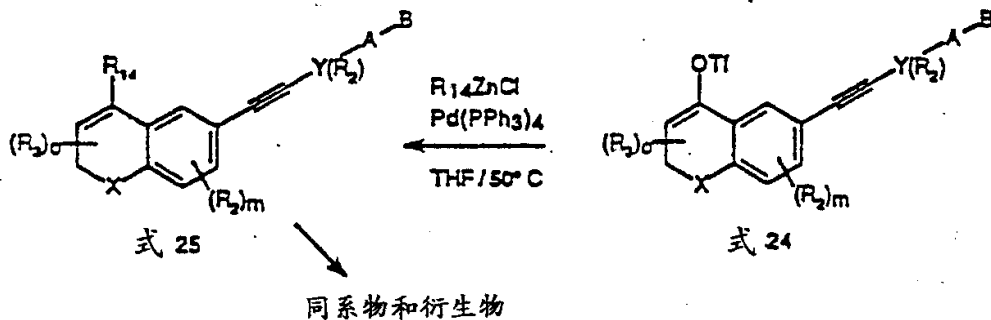


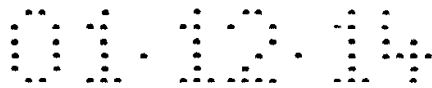
20

同系物和衍生物



25





参照反应图式 2，介绍了上述化合物的合成途径，其中对于式 1 而言，X 为 S、O 或 NR'，及 Z 为乙炔基(-C≡C-)。在该反应序列中的原料为具有式 17 所示结构的溴代苯酚、溴代硫酚或溴代苯胺。为了简化本说明书，在其后的介绍中，可以认为 X 主要是硫，用于制备苯并噻喃衍生物。然而，应记住的是：在此所述的图式(包括对于本领域内的技术人员是显而易见的改进)也适用于制备本发明的苯并吡喃(X = O)和二氢喹啉(X = NR')化合物。因而，使式 17 化合物优选对溴硫酚、对溴苯酚或对溴苯胺在碱性条件下与式 18 的 3-溴羧酸反应。在该反应图式中，所述符号具有式 1 中所述的定义。作为式 18 反应剂的实例(其中 R₃ 为氢)为 3-溴丙酸。与式 18 的 3-溴羧酸反应产生式 19 化合物。通过用酸处理使后者环合产生具有式 20 的 6-溴二氢苯并噻喃-4-酮衍生物(当 X 为 S 时)或 6-溴苯并二氢吡喃衍生物(当 X 为 O 时)。然后使式 20 溴代化合物在反应图式 1 中所述的用于转化式 7 溴代化合物成为本发明的化合物的类似条件下，经过基本相同的反应顺序。从而，简单概括如下：使式 20 溴代化合物与(三甲基甲硅烷基)乙炔反应提供式 21 的 6-(三甲基甲硅烷基)乙炔基取代二氢苯并噻喃-4-酮或苯并二氢噻喃-4-酮化合物。然后，使式 21 的 6-(三甲基甲硅烷基)乙炔基取代二氢苯并噻喃-4-酮化合物与碱(氢氧化钾或碳酸钾)反应提供式 22 的乙炔基取代 6-乙炔基取代二氢苯并噻喃-4-酮化合物。然后，使式 22 化合物与芳族或杂芳族试剂 X₁-Y(R₂)-A-B' (式 10)在反应图式 1 类似反应中所述相似条件下偶合产生式 23 化合物。

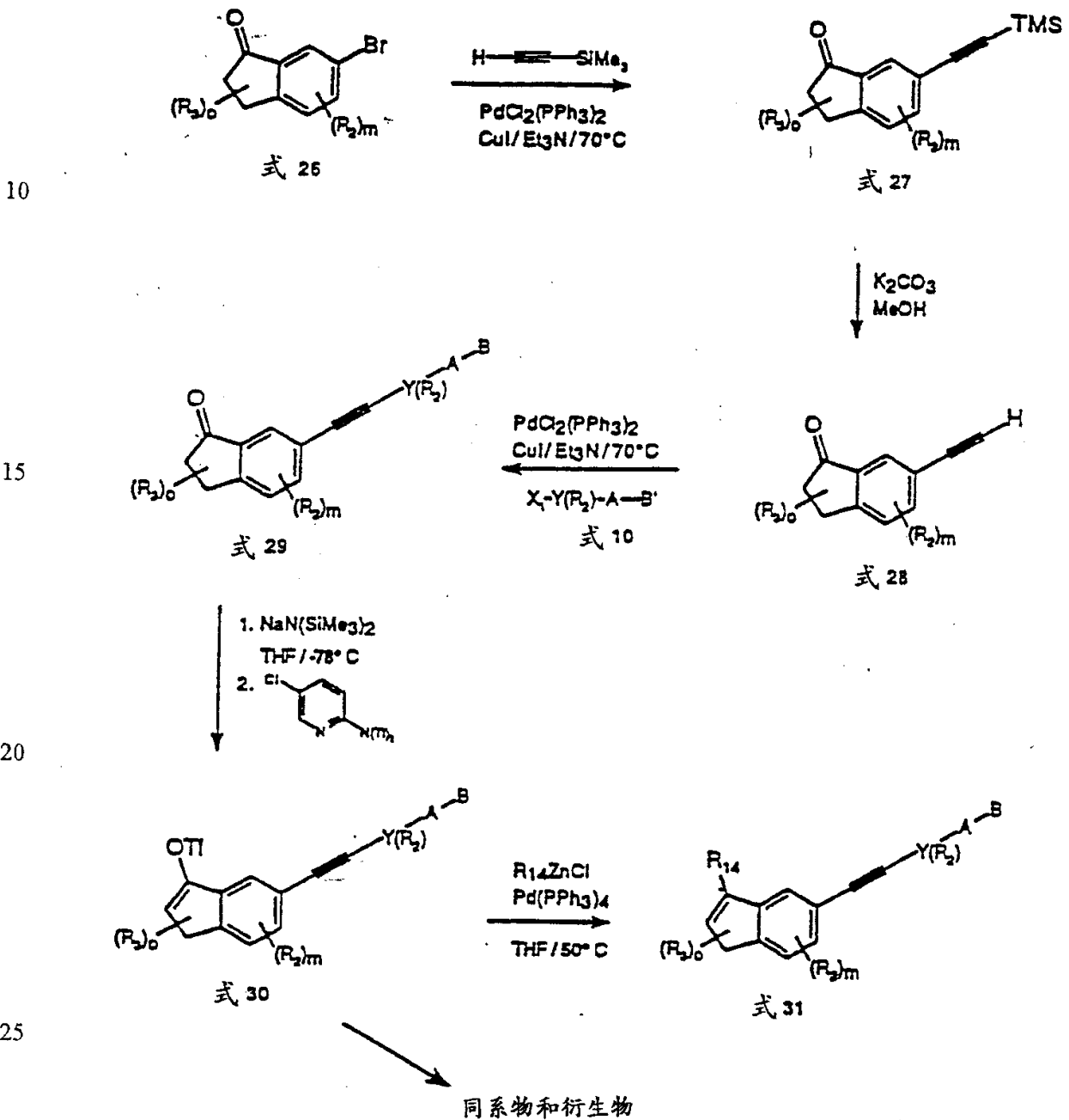
然后，使式 23 化合物在反应图式 1 中所述类似反应中相似条件下与双(三甲基甲硅烷基)氯化钠和 2-[N,N-双(三氟甲基磺酰基)氨基]-5-氯吡啶反应产生式 24 所代表的 4-三氟甲基磺酰氧基苯并噻喃或苯并吡喃衍生物。然后，通过与衍生自如反应图式 1 中所述的芳基或杂芳基化合物 R₁₄H 的有机金属衍生物反应，使式 24 化合物转变成式 25 所示的化合物。

类似于反应图式 1 的式 7 中间体 7-溴-四氢萘-1-酮化合物的用途，

式 20 中间体 6-溴二氢苯并噻喃-4-酮化合物也可以用于本发明范围内的其它化合物的制备(如以下反应图式 6、7 和 8 中所述)。在类似于反应图式 1 中所述的反应中,也可以将式 25 化合物转变成其它同系物和衍生物。

5

反应图式 3



反应图式 3 介绍其中对于式 1 而言, X 为 $[C(R_1)_2]_n$, n 为 0 及 Z 为乙炔官能团 ($-C\equiv C-$) 的化合物的合成途径。根据该反应图式, 按照类似于以上图式 1 和 2 中所述反应的反应顺序(由三甲基甲硅烷基乙炔开始反应), 使式 26 的 6-溴-2,3-二氢-1H-茚-1-酮衍生物反应, 经过式 27-30 的中间体提供式 31 茚衍生物。在反应图式 3 范围内的优选实施方案中, 所述原料为 6-溴-2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-茚-1-酮, 根据化学文献它可以得到(见 Smith et al. Org. Prep. Proced. Int. 1978, 10, 123-131)。如下所述, 式 26 化合物例如 6-溴-2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-茚-1-酮也可以用于本发明中所用的其它实例性化合物的合成中。

10

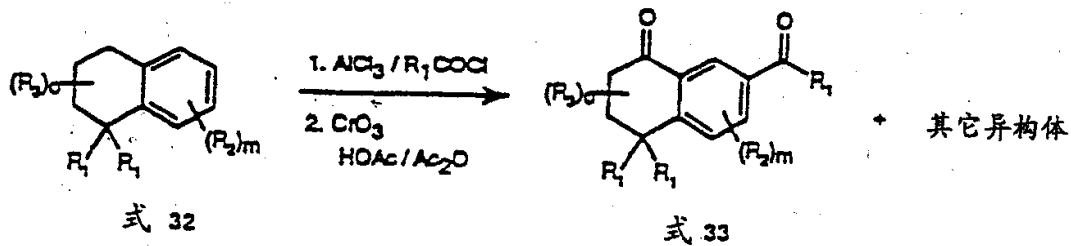
15

20

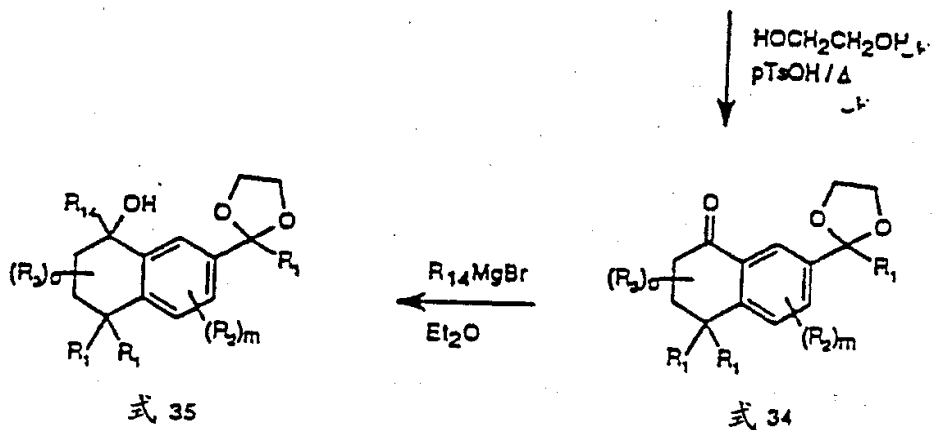
25

反应图式 4

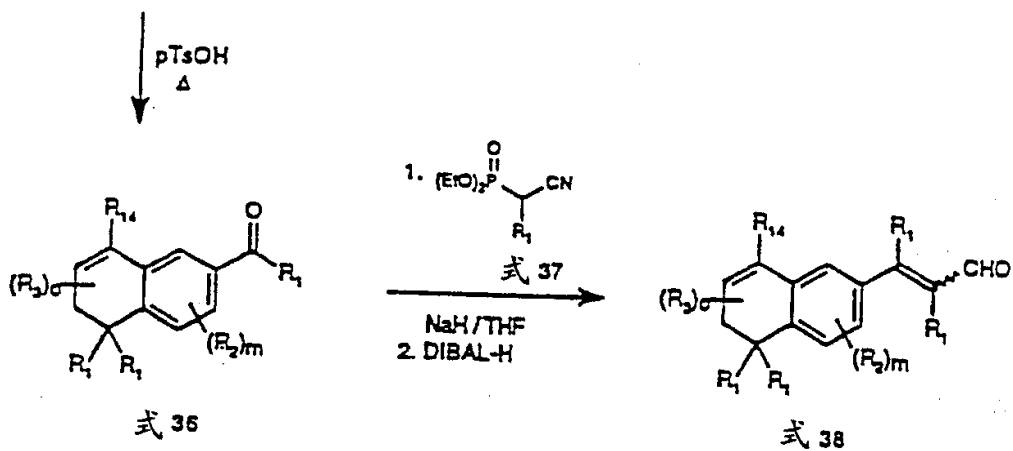
5



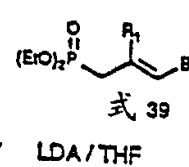
10



15

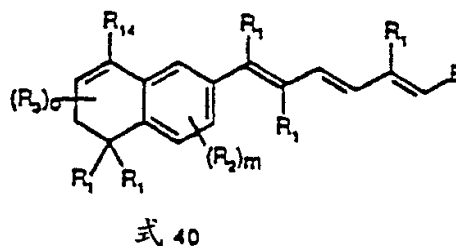


20



25

同系物和衍生物



5 参照反应图式 4，介绍实例性化合物的合成途径，其中对于式 1 而言，Z 为 $-(CR_1=CR_1)_{n'}$ ， n' 为 3、4 或 5，及 Y 代表在 $(CR_1=CR_1)_{n'}$ 基团和 B 之间的直接结合键。介绍了例如其中 X 基团为 $[C(R_1)_2]_n$ 及 n 为 1(二氢萘衍生物)的合成途径。此外，应该理解在反应图式 4 和其后其它图式中介绍的反应和合成工艺(包括对于本领域内技术人员是显而易见的改进)也适用于其中 X 为 S、O 或 NR' (苯并噻喃、苯并吡喃或二氢喹啉衍生物)或 $[C(R_1)_2]_n$ 及 n 为 0(茛衍生物)的衍生物。

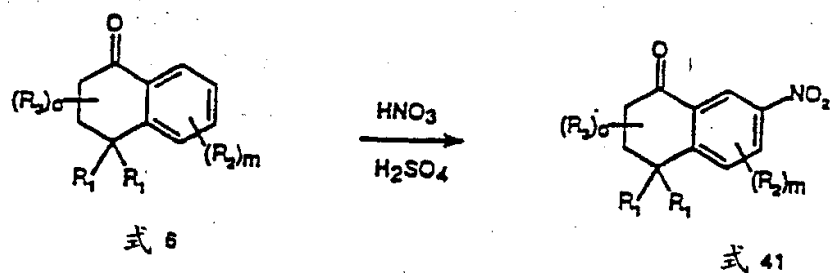
10 根据反应图式 4，使式 32 的 1,2,3,4-四氢萘衍生物与酰氯(R_1COCl)在 Friedel Crafts 条件下反应，并在例如 Jones 氧化反应中使所生成的乙酰化产物氧化，产生式 33 的异构的 6-和 7-乙酰基-1(2H)-萘酮衍生物的混合物。在该反应的特别优选的实施例中，所述式 32 原料为 1,2,3,4-四氢-1,1-二甲基萘(已知化合物)，它可以根据在本申请实验部分中所述的方法制备。使式 33 的 7-乙酰基-1(2H)-萘酮衍生物与乙二醇在酸的存在下反应，以式 34 的缩酮衍生物形式保护外向环酮部分的氧代官能团。然后，使式 34 的缩酮与式 $R_{14}MgBr$ (符号如式 1 中所定义的)的 Grignard 试剂反应，产生式 35 的叔醇。然后，除去二氧戊环保护基并通过用酸处理所述叔醇脱水提供式 36 的 3,4-二氢-7-乙酰基萘衍生物。使式 36 化合物的酮官能团经过在强碱条件下与使用式 37 磷酸酯(phosphonate)试剂的 Horner Emmons (或类似的)反应，在还原后产生式 20 38 醛化合物。另一个在强碱条件下使用式 39 试剂的 Horner Emmons (或类似的)反应提供式 40 化合物。根据上述反应，后者可以转变成其它的同系物和衍生物。用于制备优选化合物的式 37 Horner Emmons 试剂的特定实例为氰基甲基磷酸二乙酯；式 39 的 Horner Emmons 试剂的实例为(E)-3-乙氧基羰基-2-甲基烯丙基磷酸二乙酯。

25

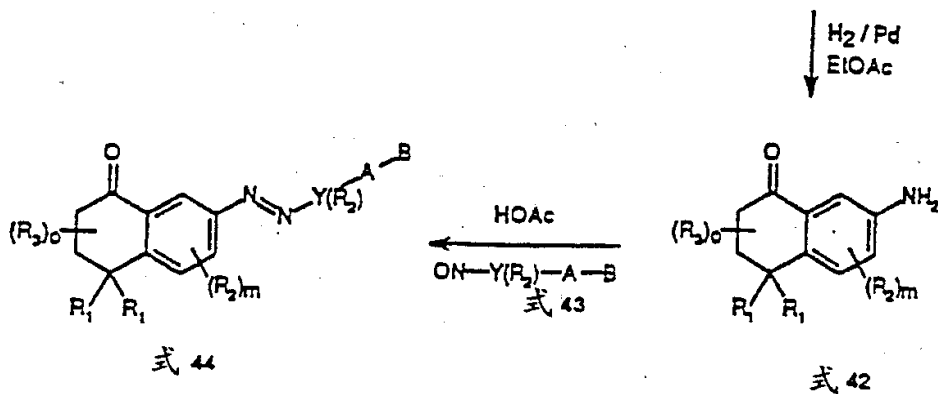
5

反应图式 5

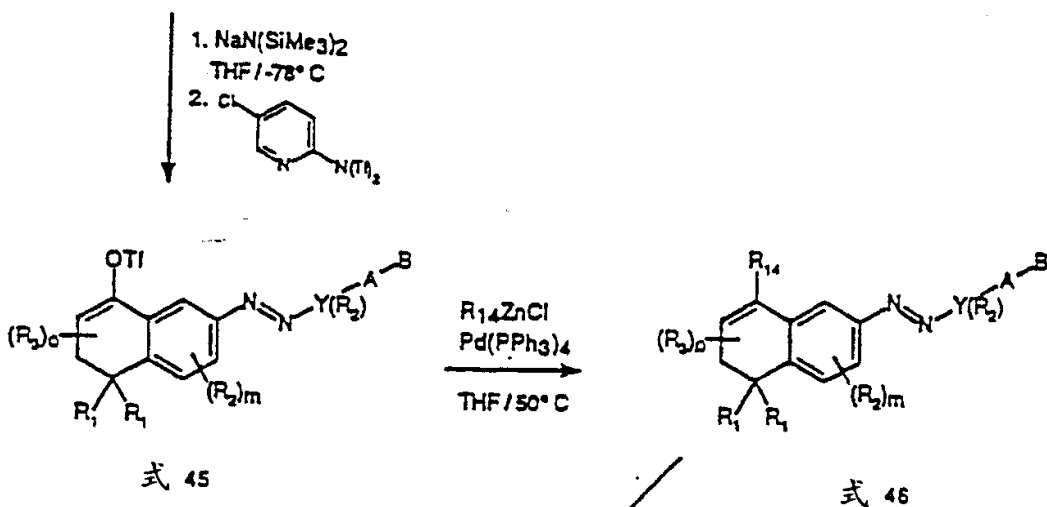
10



15



20



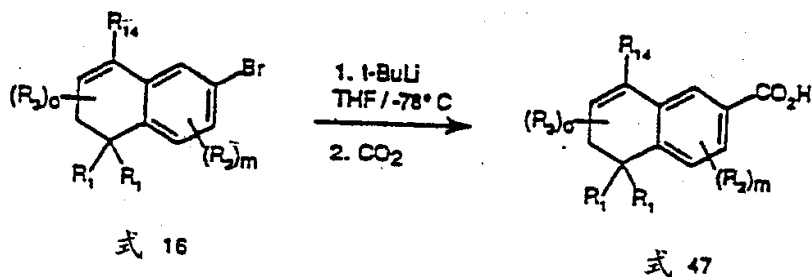
25

同系物和衍生物

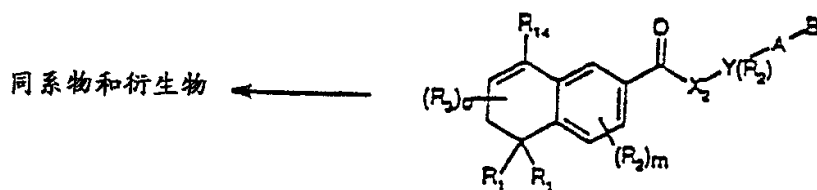
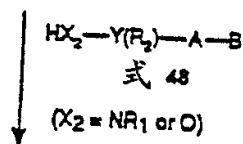
反应图式5介绍用于制备其中Z基团为偶氮基(-N=N-)的化合物的合成方法。如同反应图式4,介绍了例如其中X基团为 $[C(R_1)_2]_n$ 及n为1(二氢萘衍生物)的合成途径。此外,应该理解所述合成工艺(包括对于本领域内技术人员是显而易见的改进)也适用于用于本发明中的所有偶氮化合物,即其中X为S、O或NR'(苯并噻喃、苯并吡喃或二氢喹啉衍生物)或 $[C(R_1)_2]_n$ 及n为0(茚衍生物)的衍生物。从而,在基本为标准的硝化条件下,将硝基引入式6起始化合物中产生式41的3,4-二氢-7-硝基-1(2H)-萘酮衍生物。使后者还原成式42的3,4-二氢-7-氨基-1(2H)-萘酮衍生物,然后与式ON-Y(R₂)-A-B(式43)的亚硝基化合物在一般用于制备偶氮化合物的条件(冰乙酸)下反应。根据本领域内已知的反应可以获得式43亚硝基化合物。用于合成优选化合物的该化合物的特定实例为4-亚硝基苯甲酸乙酯。然后,使式44的偶氮化合物与双(三甲基甲硅烷基)氯化钠和2-[N,N-双(三氟甲基磺酰基)氨基]-5-氯吡啶反应产生式45所代表的4-三氟甲基磺酰氧基衍生物。然后,通过与衍生自芳基或杂芳基化合物R₁₄H的有机金属衍生物反应,将式45化合物转变成式46中所示的偶氮化合物。这后两个反应即转变4-三氟甲基磺酰氧基衍生物和其后与有机金属衍生物的反应在上述反应图式1、2和3中已经被介绍,并用于产生实例性RAR拮抗剂化合物的几种优选的合成方法中。

20

反应图式6



25



式 49

5

10

15

20

反应图式 6 介绍了用于制备其中对于式 1 而言，Z 基团为 COO- 或 CONR₁ (R₁ 优选为 H) 化合物的优选合成方法。这些酯和酰胺衍生物由式 16 的 3,4-二氢-7-溴代萘衍生物(它可以按照反应图式 1 中所述获得)制备。从而，使式 16 化合物与强碱例如叔丁基锂在惰性醚类溶剂例如四氢呋喃中，在低温下反应，并加入二氧化碳(CO₂)提供式 47 的 5,6-二氢-2-萘羧酸衍生物。然后，使式 47 化合物与式 X₂-Y(R₂)-A-B (式 48) 的化合物反应，其中 X₂ 代表 OH 或 NR₁ 基团，R₁ 优选为氢。本领域内的技术人员将理解：式 48 化合物为根据现有技术可以得到的芳基或杂芳基羟基或氨基衍生物。式 47 和式 48 化合物之间的反应可以在各种已知的酯或酰胺形成条件下进行，例如二者在 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 4-二甲氨基吡啶存在下偶合。可选将式 47 化合物转变成相应的酰氯以便在碱存在下与式 48 化合物偶合。如上所述，可以将式 49 的酰胺或酯化合物转变成其它的同系物和衍生物。尽管作为其中式 1 的 X 基团为 [C(R₁)₂]_n 和 n 为 1 (二氢萘衍生物) 的实例介绍和显示了反应图式 6，在此所述方法可适用于制备苯并吡喃、苯并噻喃、二氢喹啉以及茚的衍生物。

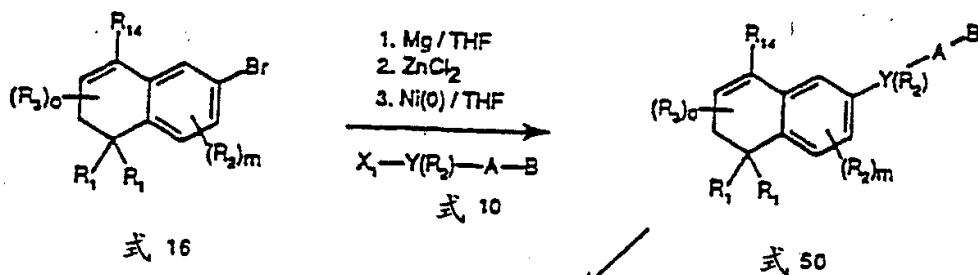
25

根据美国专利号 5324744 所述内容，其中对于式 1 而言，Z 为 -OCO-、NR₁CO 的本发明化合物以及相应的硫酯和硫代酰胺同系物可以由衍生自式 16 化合物(其中所述溴官能团用氨基或羟基取代)的中间体制备。

反应图式 7

5

10



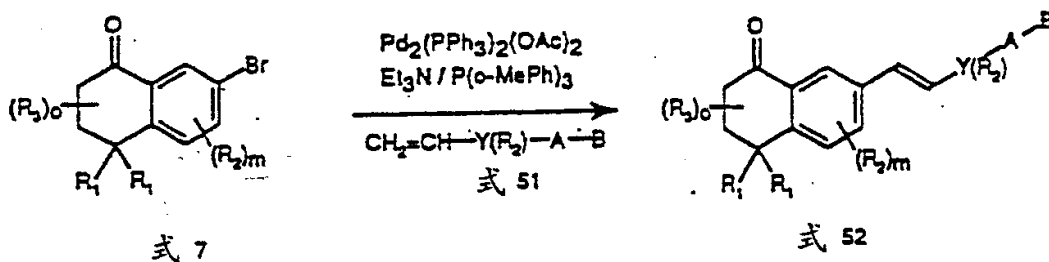
同系物和衍生物

15

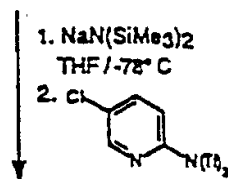
反应图式 7 介绍用于制备其中对于式 1 而言, Z 为 $-(CR_1=CR_1)_n-$ 和 n' 为 0 化合物的优选的合成方法。在式 16 化合物和由式 10 卤代化合物衍生的 Grignard 试剂之间的偶合反应中可以得到所述式 50 化合物。所述偶合反应一般在锌盐和镍(Ni(0))催化剂存在下, 在惰性醚类溶剂例如四氢呋喃中进行。如上所述, 可以将式 50 化合物转变成其它同系物和衍生物。

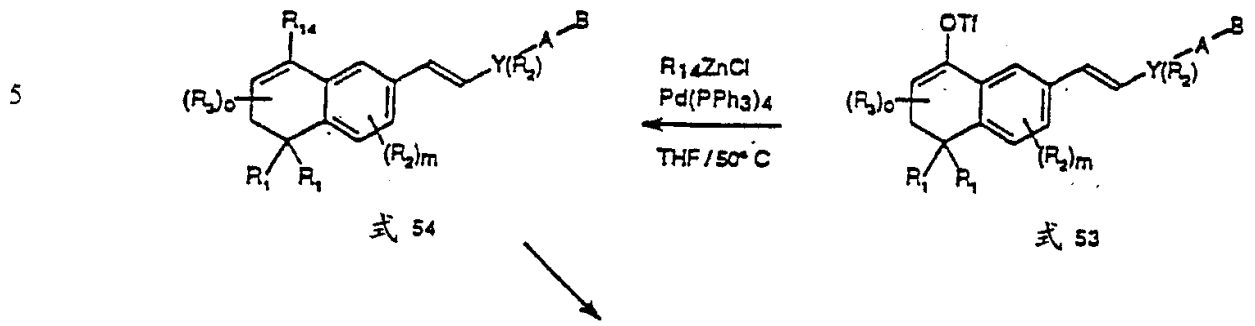
反应图式 8

20



25





同系物和衍生物

10

15

20

参考反应图式 8 介绍了用于制备其中 Z 为 $-(CR_1=CR_1)_n-$ 和 n 为 1 化合物的优选合成方法。更准确地说，反应图式 8 介绍用于制备那些为二氢萘衍生物及其中 Z 基团代表乙烯基 $(-CH=CH-)$ 官能团的化合物的优选的方法。然而，在此所述的一般工艺(包括对于本领域内技术人员是显而易见的改进)可适用于类似的苯并吡喃、苯并噻喃、二氢喹啉化合物和适用于其中乙烯基被取代的化合物。从而，根据反应图式 8，在合适的催化剂[一般具有式 $Pd(PPh_3)_4$]、酸性受体(例如三乙胺)存在下，在惰性气体(氩气)中，使式 7 的 7-溴-1(2H)-萘酮衍生物与结构为 $-CH_2=CH-Y(R_2)-A-B$ (式 51) 的乙烯基衍生物反应。该反应的条件类似于式 9 乙炔基衍生物与式 10 试剂(例如见反应图式 1)的偶合过程的条件，并且这类反应一般在本领域内称为 Heck 反应。根据现有技术可以得到式 51 乙烯基衍生物，用于本发明中优选化合物合成的这类试剂的实例为 4-乙烯基苯甲酸乙酯。

25

所述 Heck 偶合反应的产物为式 52 乙烯基衍生物，然后通过用双(三甲基甲硅烷基)氯化钠和 2-[N,N-双(三氟甲基磺酰基)氨基]-5-氯吡啶处理产生式 53 的 4-三氟甲基磺酰氧基衍生物，其后如上所述，与衍生自芳基或杂芳基化合物 $R_{14}H$ 的有机金属衍生物反应，将其转化为用于本发明中的化合物。可以将产生的式 54 化合物转变为其它的同系物和

衍生物。

5 通过使用 Wittig 或 Horner Emmons 反应的合成图式, 也可以得到式 54 化合物。例如, 可以使式 33(见反应图式 4)中间体与溴化三苯基磷(Wittig)试剂或更优选与具有结构式 $(\text{EtO})_2\text{PO}-\text{CH}_2-\text{Y}(\text{R}_2)-\text{A}-\text{B}$ 的磷酸二乙酯(Horner Emmons)试剂反应(如类似于美国专利 5324840 中所述的 Horner Emmons 反应)。所述 Horner Emmons 反应提供在结构上类似于式 52 的中间体化合物, 并通过在反应图式 8 中所述用于式 52 化合物的反应顺序将该中间体转变成为式 54 化合物。

芳基和(3-氧代-1-丙烯基)-取代化合物的合成方法

10 通过在此所述的合成化学途径可以制备具有式 101 的实例性 RAR 拮抗剂化合物。合成化学家容易理解: 在此所设立的条件为可以一般化到任何及全部由式 101 所代表的化合物的特定实施方案。

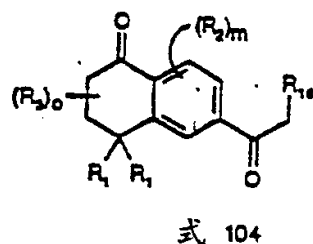
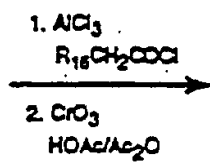
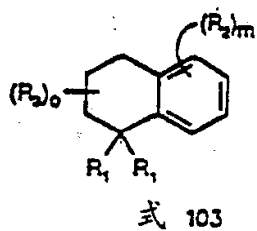
15

20

25

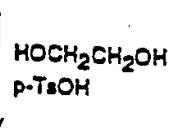
反应图式 101

5

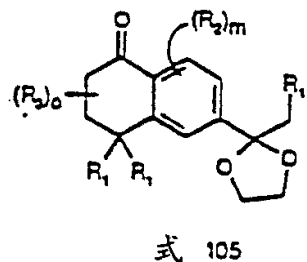
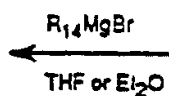
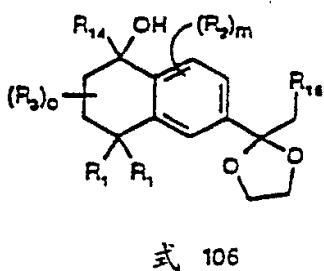


异构体二酮

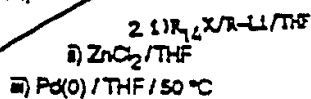
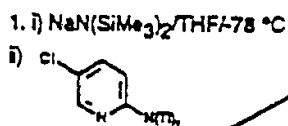
10



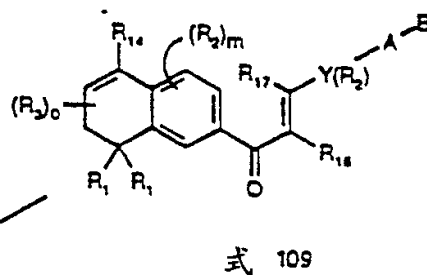
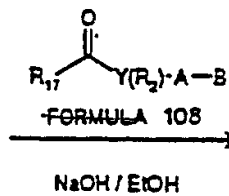
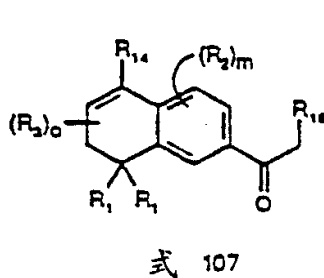
15



20



25

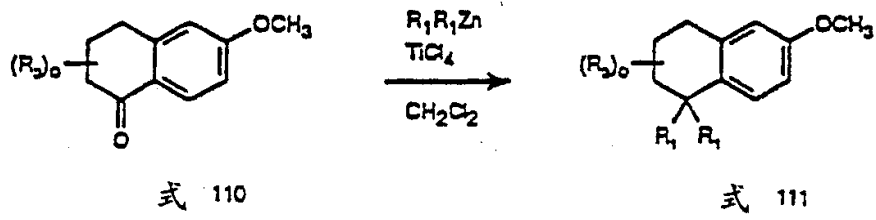


同系物和衍生物

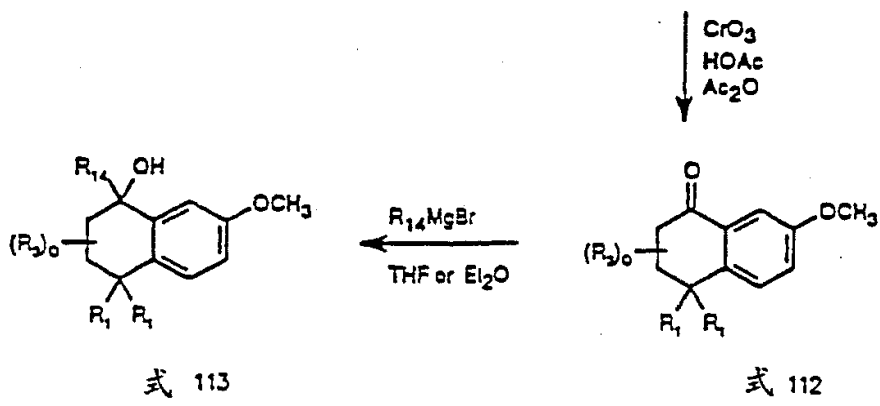
5

反应图式 104 (续)

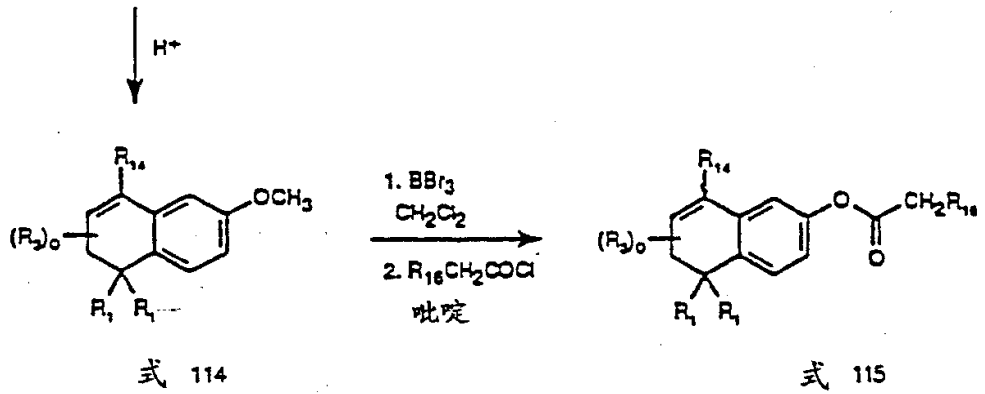
10



15



20



25

反应图式 101 介绍式 101 化合物的合成，其中 X 为 $[C(R_1)_2]_n$ ，n 为 1，p 为零及 R_{17} 为 H 或低级烷基。换句话说，反应图式 101 介绍本发明化合物的合成，它们为 3,4-二氢萘的衍生物。根据该图式，被 R_3 和 R_2 基团(如同式 101 中所定义)适当取代的式 103 四氢萘化合物作为原料。式 103 化合物优选的实例为 1,3,3,4-四氢-1,1-二甲基-萘，它在化学文献(Mathur et al. Tetrahedron, 1985, 41:1509)中被介绍。在本申请的实验部分中也介绍了自 1-溴-3-苯基丙烷合成该化合物的优选的途径。

在 Friedel Crafts 类型的反应中，使式 103 化合物与具有结构为 $R_{16}CH_2COCl$ (R_{16} 如同式 101 中所定义)的酰氯反应，然后，用三氧化铬在乙酸中氧化提供异构的 6 和 7 乙酰基-3,4-二氢-1(2H)-萘酮衍生物。在反应图式 101 中只显示了从本发明角度出发是重要的 6-乙酰基化合物的结构式(式 104)。在本发明优选的化合物的制备过程中， R_1 基团代表甲基， R_2 、 R_3 和 R_{16} 为 H，从而，相应于式 104 的优选中间体为 3,4-二氢-4,4-二甲基-6-乙酰基-1(2H)-萘酮。

然后，例如通过用酸中的乙二醇处理，将式 104 化合物的外向环酮官能团作为缩酮保护，提供式 105 的 1,3-二氧戊环基衍生物。然后，使式 105 化合物与式 $R_{14}MgBr$ (R_{14} 如同式 101 中的定义)的 Grignard 试剂反应产生式 106 的 1,2,3,4-四氢-1-羟基-萘衍生物。然后，通过用酸处理和脱水使式 106 化合物的外向环酮官能团去保护，产生式 107 化合物。

用于从式 105 化合物获得式 107 化合物的另一种方法为使式 105 化合物与双(三甲基甲硅烷基)氯化钠和 2-[N,N-双(三氟甲基磺酰基)氨基]-5-氯吡啶($Tf = SO_2CF_3$)在惰性醚类溶剂例如四氢呋喃，在低温下(-78 °C - 0 °C)反应。该反应通过钠盐中间体进行，该中间体一般不分离，在反应图式 101 中不表示。总的反应产生三氟甲基磺酰氧基衍生物，然后，使其与衍生自芳基或杂芳基化合物 $R_{14}H$ 的有机金属衍生物反应，如此所述有机金属衍生物的分子式为 $R_{14}Met$ (Met 代表一价金属)，优

选 $R_{14}Li$ (R_{14} 如同式 101 中的定义)。所述与有机金属衍生物优选式 $R_{14}Li$ 的锂衍生物的反应一般在惰性醚类溶剂中(例如四氢呋喃), 在氯化锌($ZnCl_2$)和四(三苯基磷)-钯(0) ($Pd(PPh_3)_4$)存在下进行。如果不能从市场上买到, 可以根据现有技术的已知的方法从化合物 $R_{14}H$ (或其卤素衍生物 $R_{14}-X_1$, 其中 X_1 为卤素), 在醚类溶剂中制备有机金属试剂 $R_{14}Li$ 。一般而言, 试剂 $R_{14}Li$ 和三氟甲基磺酰氧基衍生物间反应的温度范围在约 $-78\text{ }^\circ\text{C} - 50\text{ }^\circ\text{C}$ 内。

式 107 酮化合物和式 108 醛或酮之间缩合的结果形成本发明化合物。在制备本发明的优选实例性化合物的过程中, 式 108 试剂为 4-羧基苯甲醛($R_{17}-H$)。在式 108 范围内的并适合于缩合反应及用于本发明范围内化合物(式 101)合成的其它试剂的实例为: 5-羧基-吡啶-2-醛、4-羧基-吡啶-2-醛、4-羧基-噻吩-2-醛、5-羧基-噻吩-2-醛、4-羧基-呋喃-2-醛、5-羧基-呋喃-2-醛、4-羧基苯乙酮、2-乙酰基-吡啶-5-甲酸、2-乙酰基-吡啶-4-甲酸、2-乙酰基-噻吩-4-甲酸、2-乙酰基-噻吩-5-甲酸、2-乙酰基-呋喃-4-甲酸和 2-乙酰基-呋喃-5-甲酸。根据化学文献可以得到后面的化合物; 例如见 Decroix et al., *J. Chem. Res.(S)*, 4:134 (1978); Dawson et al., *J. Med. Chem.* 29:1282 (1983); and Queguiner et al., *Bull Soc. Chimique de France No. 10*, pp. 3678-3683 (1969)。所述式 107 和式 108 化合物之间的缩合反应在碱存在下, 在醇溶剂中进行。优选所述反应在乙醇中, 在氢氧化钠存在下进行。本领域内的技术熟练人员将该缩合反应称为醛醇缩合, 在此所述的优选实施例中(式 107 酮与式 108 醛的缩合)称为 Claisen-Schmidt 反应。[见 March: Advanced Organic Chemistry : Reactions, Mechanisms, and Structure, pp. 694-695, McGraw Hill (1968)]。式 109 化合物在本发明的范围内, 也可以经过进一步转化产生本发明的其它化合物。另外, 式 108 的 A-B 基团只有在经过一种或多种其性质为众所周知和在有经验化学家的技术范围内的合成转变后, 可以是本发明范围内如式 101 所定义的基团。例如, 在所述 A-B 基团上进行的反应可以是去保护、容许反应(homologation)、

酯化、皂化、酰胺形成等反应。

一般而言，就式 109 化合物的衍生化和/或式 108 芳基和杂芳基化合物的合成(然后，它们可以与式 107 化合物反应)而言，可以使用下列众所周知的和公开的一般性原理和合成工艺。

- 5 如上所述，一般通过使所述酸在合适的醇溶液中，在酸性催化剂例如盐酸或亚硫酸氯的存在下回流将所述羧酸酯化。另外，可以使所述羧酸与合适的醇在二环己基碳二亚胺和二甲氨基吡啶存在下缩合。可用常规方法回收和提纯酯。通过在 March, Advanced Organic Chemistry (2nd Edition, McGraw-Hill Book Company, p. 810)中所述方法可以容易地制备缩醛和缩酮。通过已知的方法(例如在 McOmie, Plenum Publishing Press, 1973 和 Protecting Groups, Ed. Greene, John Wiley & Sons, 1981 中所述方法)通过分别形成相应的醚和酯、缩醛或缩酮，可以保护所有的醇、醛和酮。

- 15 为了在进行反应图式 101 的缩合反应(其中相当于式 108 的所述化合物不能从市场上买到)之前，增加式 108 化合物中 n 的值，通过在 Arndt-Eistert 条件或其它容许反应过程下连续地处理，使芳族或杂芳族羧酸符合要求(同时将所述醛基保护)。也可选通过合适的方法，使不是羧酸的衍生物符合要求。然后，通过以上所述的通法使符合要求的酸酯化。

- 20 例如通过为具有实践经验的有机化学家所熟知的合成图式，例如通过 Wittig 等反应或通过自 α -卤代芳基烷基羧酸、酯或类似的羧基醛中除去卤素导入双键，可以制备其中 A 为具有一个或多个双键的链烯基的式 108 化合物(或本发明的其它中间体，当适用时)。通过相应的芳基甲基酮与强碱例如二异丙基氨基锂反应(与氯代磷酸二乙酯反应，然后加入二异丙基氨基锂)可以制备其中 A 基团具有一个三键(乙炔基)的式 108 化合物(或本发明的其它中间体，当适用时)。

25 作为所述缩合反应的结果或由相应的酯可以容易地直接获得由式 109 化合物(或本发明的其它中间体或化合物，当适用时)衍生的酸和

5 盐。使用碱金属碱的碱性皂化将提供所述酸。例如可以将式 109 酯(或本发明的其它中间体或化合物, 当适用时)溶解在极性溶剂例如链烷醇中, 优选在惰性气体中, 在室温下, 使用约 3 摩尔过量的碱例如氢氧化锂或氢氧化钾。将所述溶液搅拌一定时间, 15-20 小时, 冷却, 酸化并通过常规方法回收其水解产物。

通过本领域内任何已知的、合适的酰胺化方法由相应的酯或羧酸可以形成酰胺。制备这类化合物的一个方法为转变酸为酰氯, 然后用氢氧化铵或适合的胺处理该化合物。

10 通过使用亚硫酰氯或其它的方法(J. March, Advanced Organic Chemistry, 2nd Edition, McGraw-Hill Book Company)将相应的酸转化为酰氯, 然后用硼氢化钠(March, *Ibid*, p. 1124)还原所述酰氯, 产生相应的醇来制备醇。可选使用氢化锂铝在低温下还原酯。在 Williamson 反应条件下(March, *Ibid*, p. 357)使用合适的卤化烷使这些醇烷基化, 产生相应的醚。通过使所述醇与合适的酸在酸性催化剂或二环己基碳二亚胺和二甲氨基吡啶的存在下反应, 可以将所述醇转化为酯。

15 使用温和的氧化剂例如二氯甲烷中的重铬酸吡啶鎓(Corey, E. J., Schmidt, G., *Tet. Lett.* 399, 1979)或二氯甲烷中的二甲亚砷/草酰氯(Omura, K., Swern, D., *Tetrahedron* 34:1651(1978))可以由相应的一级醇制备醛。

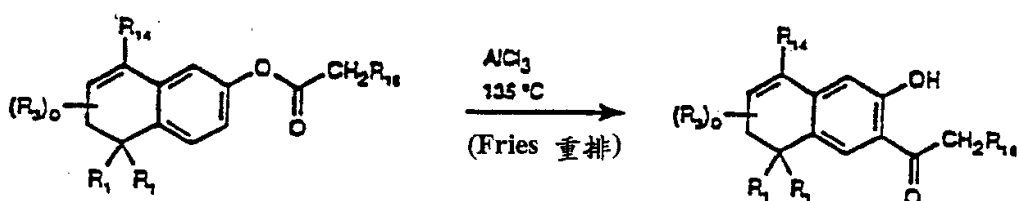
20 通过用烷基 Grignard 试剂或类似的试剂处理所述醛, 然后氧化可以由合适的醛制备酮。

通过在 March, *Ibid*, p. 810 中所述方法, 由相应的醛或酮可以制备缩醛或缩酮。

25

反应图式 102

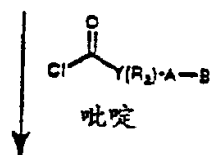
5



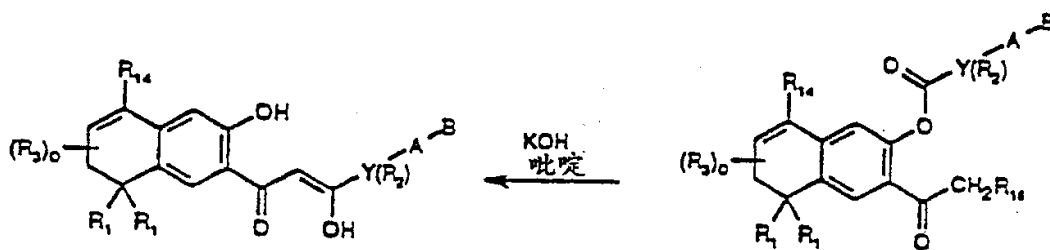
10

式 115

式 116



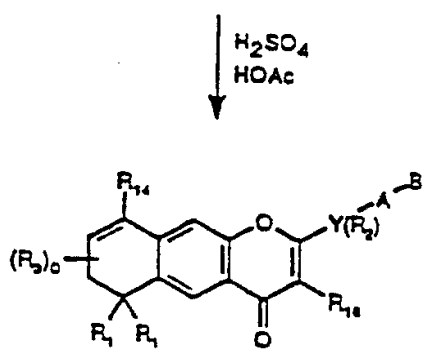
15



式 118

式 117

20



式 119

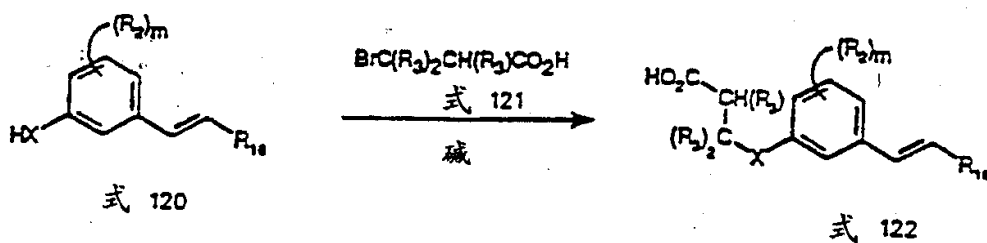
25

同系物和衍生物

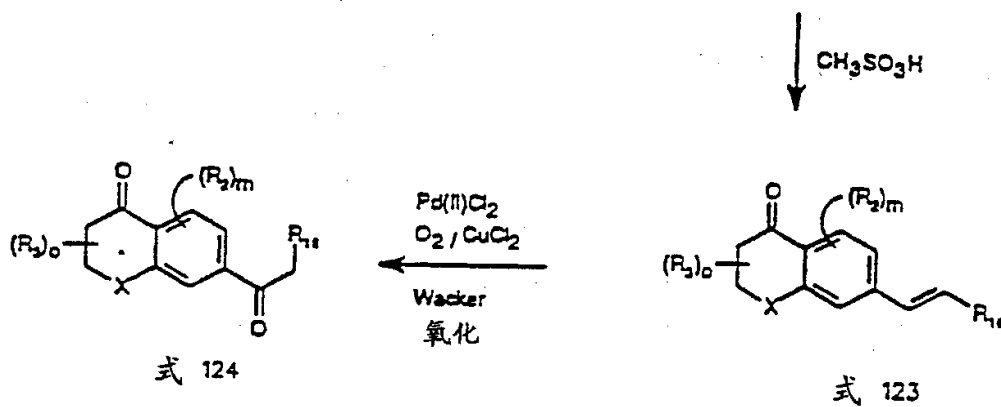
5

反应图式 102 (续)

10



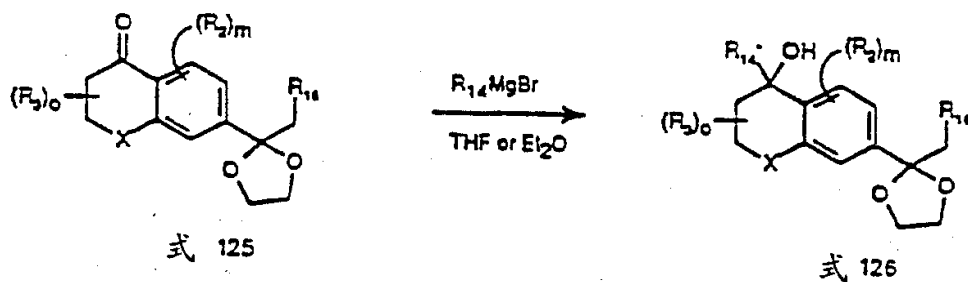
15



20



25



参照反应图式 102，介绍其中对于式 101 而言， p 为零，在所述缩合环结构的芳基部分中 R_2 为 OH 及 R_{17} 为 OH 的那些本发明化合物的合成途径。本领域内的技术熟练人员容易理解这些化合物为以烯醇形式的 β -二酮。反应图式 102 也介绍其中 p 为 1 的那些本发明化合物的合成途径。本领域内的技术熟练人员容易理解后面的化合物为黄

5 酮。从而，根据该反应图式，使式 110 的 1,2,3,4-四氢-6-甲氧基萘-1-酮衍生物与二烷基锌(R_1Zn)在四氯化钛存在下，在合适的溶剂例如二氯甲烷中反应，用偕位的二烷基 R_1R_1 代替氧代官能团，产生其中 R_1 为低级烷基的式 111 化合物。在根据反应图式 102 制备的本发明化合物的优选实例中， R_3 基团为氢及 R_1 为甲基。因此，所述二烷基锌为

10 二甲基锌，及优选的式 110 原料为 1,2,3,4-四氢-6-甲氧基萘-1-酮。后一化合物可从市场上买到，例如从 Aldrich Chemical Company 买到。然后，用三氧化铬在乙酸和乙酸酐中氧化式 111 的 1,2,3,4-四氢-1,2-二烷基-6-甲氧基萘衍生物产生式 112 的 1,2,3,4-四氢-3,4-二烷基-7-甲氧基

15 萘-1-酮衍生物。使式 112 酮化合物与 Grignard 试剂($R_{14}MgBr$ ， R_{14} 如式 101 中所定义)反应产生式 113 的 1-羟基-1-芳基-3,4-二氢-3,4-二烷基-7-甲氧基萘衍生物。通过加热，优选在酸中加热，使式 113 的羟基化合物经过消除过程，产生式 114 的二氢萘化合物。通过用三溴化硼在合适的溶剂例如二氯甲烷中处理，从式 114 的化合物的酚甲醚官能团

20 中除去甲基，然后用引入 $R_{16}CH_2CO$ 基团的酰化剂使所述酚羟基酰化，产生式 115 化合物。在优选的实施方案中， R_{16} 为 H，从而所述酰化剂为乙酰氯或乙酸酐。使所述酰化反应在碱性溶剂例如吡啶中进行。使式 115 酰基化酚化合物与三氯化铝在高温下反应，使其经过 Fries 重排并产生式 116 的 1-芳基-3,4-二烷基-3,4-二氢-6-乙酰基-7-羟基-萘

25 化合物。用引入 $CO-Y(R_2)-A-B$ 基团的酰化剂(例如酰氯)使式 116 化合物的酚羟基酰化，产生式 117 化合物。在所述酰氯试剂 $Cl-CO-Y(R_2)-A-B$ (或类似的酰化剂)中，符号 Y、 R_2 和 A-B 具有式 101 中的定义。在制备根据本反应图式的本发明的优选化合物的过程中，该试剂为

$\text{ClCOC}_6\text{H}_4\text{COOEt}$ (对苯二甲酸的半乙酯半酰氯)。

5 使式 117 化合物与强碱例如吡啶中的氢氧化钾反应，作为分子内 Claisen 缩合反应的结果产生式 118 化合物。式 118 化合物在本发明和式 101 范围内，其中在缩合环部分的芳族部分中具有羟基作为 R_2 取代基，及 R_{17} 为羟基。根据前述反应(分子内 Claisen 缩合)和以前提及的 Fries 重排，注意到在本说明书中提及可能的反应机理，以便全面地解释在此所述的反应并有助于本领域内技术人员完成在此所述反应和制备本发明的化合物的工作。此外，本发明人不希望受到反应机理和理论的约束，从而在此介绍的本发明不应该受到限制。

10 使式 118 化合物与强酸例如硫酸在合适的质子溶剂例如乙酸中反应产生式 119 黄酮化合物。式 119 化合物也是在式 101 范围内(其中 p 为 1)的本发明化合物。可以使式 118 和式 119 化合物经过进一步反应和转化过程，提供如以上反应图式 101 中所述的其它同系物和衍生物。反应图式 102 中表明转化为同系物和衍生物的过程。

15

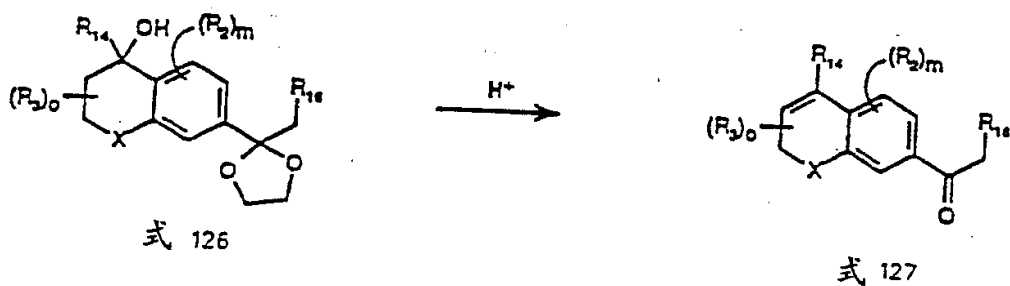
20

25

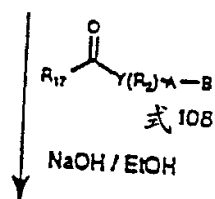
反应图式 103

5

10

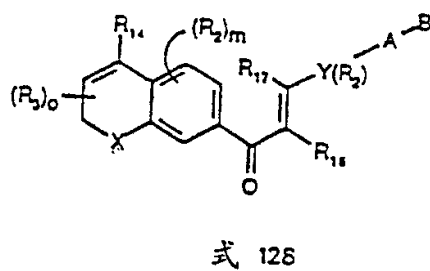


15



20

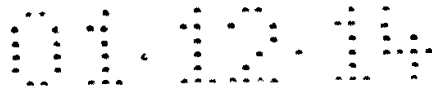
同系物和衍生物



25

参考反应图式 103, 显示产生其中对于式 101 而言, X 为 S、O 或 NR', p 为零及 R₁₇ 为 H 或低级烷基的那些本发明化合物的合成途径。然而, 利用在反应图式 102 中所示的一般合成原理, 本领域内的技术熟练人员可以对所示的合成方法加以改进, 也可以得到其中 X 为 S、O 或 NR' 及 p 为 1 或其中 X 为 S、O 或 NR' 及 p 为零, 在所述缩合环部分的芳族部分中 R₂ 基团为 OH 和 R₁₇ 为 OH 的本发明化合物。

反应图式 103 的原料为式 120 的苯酚、苯硫酚或苯胺衍生物。在本发明的优选化合物中, R₂ 和 R₁₆ 基团均为氢, 式 120 的优选原料为 3-乙烯基-苯硫酚或 3-乙烯基-苯酚, 它们为化学文献中已知的化合物 [Nuyken, et al. Polym. Bull (Berlin) 11:165 (1984)]. 为了简化说明, 在其后的介绍中, 可以认为 X 主要是硫, 用于制备本发明的苯并噻喃衍生物。然而, 应记住的是: 在此所述的图式(包括对于本领域内的技术人员是显而易见的改进)也适用于制备本发明范围内的苯并吡喃(X=O)和二氢喹啉(X=NR')化合物。因而, 使式 120 化合物在碱性条件下与式 121 的 3-溴羧酸反应。在该反应图式中, 所述符号具有式 101 中所述的定义。作为式 121 试剂的实例(其中 R₃ 为氢)为 3-溴丙酸。与式 121 的 3-溴羧酸反应产生式 122 化合物。通过用酸处理使后者环合产生具有式 123 的 7-乙烯基-二氢苯并噻喃-4-酮衍生物(当 X 为 S 时)或 7-乙烯基-苯并二氢吡喃衍生物(当 X 为 O 时)。然后使式 123 的 7-乙烯基-二氢苯并噻喃-4-酮衍生物或 7-乙烯基-苯并二氢吡喃-4-酮衍生物在 Pd(II)Cl₂ 和 CuCl₂ 催化剂存在下氧化提供式 124 的相应 7-酰基(酮)化合物。本领域内的技术熟练人员称此一反应为 Wacker 氧化。例如通过用酸中的乙二醇处理, 将式 124 化合物的外向环酮基以缩酮的形式保护, 提供式 125 的 1,3-二氧戊环基衍生物。然后, 使式 125 化合物经过类似于在反应图式 101 中式 105 化合物的反应顺序。从而, 使式 125 的 1,3-二氧戊环基衍生物与式 R₁₄MgBr 的 Grignard 试剂反应, 产生式 126 叔醇, 然后在酸中使其脱水提供式 127 的苯并噻喃(X 为 S)、苯并吡喃(X 为 O)或二氢喹啉衍生物(X 为 NR')。然后, 使式 127 酮化合物



在碱存在下，在醛醇缩合(Claisen Schmidt)反应中与式 108 试剂反应，提供式 128 的本发明化合物。如以上反应图式 101 和 102 中所述可以将式 128 化合物进一步转变成同系物和衍生物。

特定实施例

5 2-羟基-2-甲基-5-苯基戊烷

将 100.0 g (0.492 mol) 的 1-溴-3-苯基丙烷的 100 ml 乙醚溶液加入 13.16 g (0.541 mol) 镁屑在 200 ml 无水乙醚的混合物中，加入 5-10 ml 的所述溶液后，停止加料直到所述 Grignard 试剂形成开始进行为止。然后用 1 小时加入剩余的溴化物。于 35 °C 下，搅拌该 Grignard 试剂 20 分钟，然后用 45 分钟加入 31.64 g (0.541 mol) 的丙酮。在冷却到 0 °C 以前，于室温下搅拌该反应物过夜，并小心加入 20% 盐酸酸化。用乙醚 (3 x 200 ml) 提取其水层，在用硫酸镁干燥前用水和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层。减压除去溶剂，并蒸馏其残余物，得到 63.0 g (72%) 淡黄色油状产物：

15 bp 99-102°C / 0.5 mm Hg. ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.28-7.18 (5H, m), 2.63 (2H, t, J = 7.5 Hz), 1.68 (2H, m), 1.52 (2H, m), 1.20 (6H, s).

1,2,3,4-四氢-1,1-二甲基萘

20 将五氧化二磷(55.3 g, 0.390 mol)在 400 ml 甲磺酸中的混合物在氩气下于 105 °C 加热直到所述固体溶解为止。将所形成的溶液冷却到室温并在搅拌下缓慢地加入 2-羟基-2-甲基-5-苯基戊烷(63.0 g, 0.354 mol)。4 小时后，小心地将该溶液倒入 1 升冰中使反应物骤冷。用乙醚(4 x 125 ml)提取所形成的混合物，并在用硫酸镁干燥前用水、饱和碳酸氢钠水溶液、水和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层。减压浓缩该溶液，然后蒸馏产生 51.0 g (90%) 澄清无色油状物：

25 bp. 65-67°C / 1.1 mmHg. ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.32 (1H, d, J = 7.4 Hz), 7.16-7.05 (3H, m), 2.77 (2H, t, J = 6.3 Hz), 1.80 (2H, m), 1.66 (2H, m), 1.28 (6H, s).

3,4-二氢-4,4-二甲基-1(2H)-萘酮(化合物 A)

将 350 ml 冰乙酸和 170 ml 乙酸酐的溶液冷却到 0 °C，并分小批量小心加入 25.0 g (0.25 mol) 三氧化铬。在加入 120 ml 苯以前，搅拌所形成的混合物 30 分钟。缓慢加入在 30 ml 苯溶液中的 1,2,3,4-四氢-1,1-二甲基萘。在加料结束后，将反应物于 0 °C 下搅拌 4 小时。用水(200 ml)稀释该溶液并用乙醚(5 x 50 ml)提取。在用硫酸镁干燥前用水、饱和碳酸钠水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层。减压除去溶剂，并蒸馏产生 16.0 g (74%) 的淡黄色油状产物:

bp 93-96°C / 0.3 mm Hg 1H NMR (CDCl₃): δ 8.02 (1H, dd, J = 1.3, 7.8 Hz), 7.53 (1H, m), 7.42 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.29 (1H, m), 2.74 (2H, t, J = 6.8 Hz), 2.02 (2H, t, J = 6.8 Hz), 1.40 (6H, s).

3,4-二氢-4,4-二甲基-7-溴-1(2H)-萘酮(化合物 B)

将 9.5 g (71.4 mmol) 三氯化铝和 3 ml 二氯甲烷的混合物加入带有高效回流冷凝器、干燥管和加料漏斗的 100 ml 三颈烧瓶中。于室温，搅拌下滴加 3,4-二氢-4,4-二甲基-1(2H)-萘酮(5.0 g, 28.7 mmol)(注意: 放热反应!)到该混合物中。然后，非常缓慢地加入 5.5 g (34.5 mmol) 溴，然后于室温搅拌所形成的混合物 2 小时。(注意: 如果搅拌停止，所述混合物温度会升到 70 °C，直到再次开始搅拌。)然后，通过缓慢加入冰冷冷却的 6 M 盐酸使反应骤冷。用乙醚提取该混合物，并在用硫酸镁干燥前，用水、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠洗涤合并后的有机层。减压除去溶剂，并蒸馏其残留物，提供 5.8 g (80%) 淡黄色油状产物(放置后固化):

bp: 140°C / 0.4 mm Hg. 1H NMR (CDCl₃): δ 8.11 (1H, d, J = 3.0 Hz), 7.61 (1H, dd, J = 3.0, 9.0 Hz), 7.31 (1H, d, J = 9.0 Hz), 2.72 (2H, t, J = 6.0 Hz), 2.01 (2H, t, J = 6.0 Hz), 1.28 (6H, s).

1,2,3,4-四氢-1-羟基-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-7-溴萘(化合物 C)

分两份将4-溴甲苯(5.40 g, 31.8 mmol)在10 ml THF中的溶液加入镁屑(648.0 mg, 27.0 mmol)在25 ml THF中的混合物中。通过加入2 ml所述溶液使反应开始, 然后通过加料漏斗缓慢加入其余溶液。于室温下搅拌所述混合物1小时, 然后用套管将该溶液转移到第二个烧瓶中。将4.0 g (15.9 mmol)的3,4-二氢-4,4-二甲基-7-溴-1(2H)-萘酮(化合物B)的15 ml THF溶液加入到所形成的Grignard试剂中。将所形成的溶液加热到回流过夜, 冷却到室温, 通过小心加入冰冷却的10%盐酸使反应物骤冷。用乙醚提取然后用水和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层, 然后经硫酸镁干燥。减压除去溶剂提供油状产物, 经柱层析纯化(己烷/乙酸乙酯, 96:4)提供无色产物:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7.36 (1H, dd, $J = 2.1, 7.6$ Hz), 7.26 (3H, m), 7.12 (3H, s), 2.34 (3H, s), 2.24-2.04 (2H, m), 1.81 (1H, m), 1.55 (1H, m), 1.35 (3H, s), 1.30 (3H, s).

3,4-二氢-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-7-溴萘(化合物D)

将3.4 g (9.85 mmol)的1,2,3,4-四氢-1-羟基-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-7-溴萘(化合物C)和40 ml的苯加入带有Dean-Stark分水器的烧瓶内。加入催化量的对甲基苯磺酸一水合物并将所形成的溶液加热到回流达2小时。冷却到室温后, 加入乙醚并用水、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤该溶液, 然后经硫酸镁干燥。减压除去溶剂, 柱层析纯化(100%己烷/硅胶)提供无色固体状目的化合物:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7.32 (1H, dd, $J = 2.1, 8.2$ Hz), 7.21 (5H, m), 7.15 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 5.98 (1H, t, $J = 4.7$ Hz), 2.40 (3H, s), 2.32 (2H, d, $J = 4.7$ Hz), 1.30 (6H, s).

7-乙炔基-3,4-二氢-4,4-二甲基萘-1(2H)-酮(化合物E)

将0.97 g (1.3 mmol)氯化双(三苯基磷)钼(II)和0.26 g (1.3 mmol)的碘化亚铜加入7 g (27.6 mmol)的3,4-二氢-4,4-二甲基-7-溴-1(2H)-萘酮(化合物B)在150 ml三乙胺的溶液中(通入氩气流15分钟)。将氩气通入所述反应混合物中达5分钟, 然后加入39 ml (36.6 mmol)的(三甲基

甲硅烷基)乙炔。将所述反应混合物密封在压力管中并置于预热的油浴中(100 °C)达 24 小时。然后, 经硅藻土(Celite)过滤所述反应混合物, 用乙醚洗涤并在真空浓缩该滤液产生粗品 7-(三甲基甲硅烷基)乙炔基-3,4-二氢-4,4-二甲基萘-1(2H)-酮。将 0.6 g (4.3 mmol)的碳酸钾加入所述粗品 TMS-乙炔基化合物的 50 ml 甲醇溶液中。将该混合物在室温下搅拌 8 小时然后过滤。真空浓缩其滤液, 用乙醚稀释, 用水、10%盐酸和盐水洗涤, 经硫酸镁干燥并真空浓缩。经柱层析纯化(硅胶, 10%乙酸乙酯-己烷), 产生白色固体状的目的化合物:

PMR (CDCl₃): δ 1.39 (6H, s), 2.02 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.73 (2H, t, J = 7.0 Hz), 3.08 (1H, s), 7.39 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.61 (1H, dd, J = 1.8, 8.2 Hz), 8.14 (1H, d, J = 9 1.8 Hz).

4-碘代苯甲酸乙酯

将 2 ml 亚硫酸氯加入 10 g (40.32 mmol) 4-碘代苯甲酸在 100 ml 无水乙醇的悬浮液中, 然后在回流状态下加热该混合物 3 小时。真空除去溶剂并将其残留物溶解在 100 ml 乙醚中。用饱和碳酸氢钠和饱和氯化钠溶液洗涤该醚溶液并经硫酸镁干燥。然后, 真空除去溶剂, 使其残留物经 Kugelrohr 蒸馏(100 °C, 0.55 mm)产生无色油状的目的化合物: PMR (CDCl₃): δ 1.42 (3H, t, J ~7 Hz), 4.4 (2H, q, J~7 Hz), 7.8 (4H).

6-碘代烟酸

将碘化钠(20.59 g, 137.40 mmol)在氩气下冷却到-78 °C, 然后加入氢碘酸(97.13 g, 759.34 mmol)。移去制冷浴, 并搅拌该悬浮液 5 分钟。将 6-氯烟酸(22.09 g, 140.20 mmol)加入该混合物中并将所形成的混合物缓慢温热到室温并搅拌。在 125 °C 加热该混合物至回流达 24 小时, 冷却到室温并倒入 0 °C 的丙酮(500 ml)中。过滤收集黄色的固体, 用 200 ml 1N 的硫酸氢钠水溶液洗涤。经甲醇重结晶(用乙醚洗涤结晶)提

供白色结晶状的目的化合物:

mp 177-179°C [lit. mp 187-192, Newkome et al. "Reductive Dehalogenation of Electron-Poor Heterocycles: Nicotinic Acid Derivatives" *J. Org. Chem.* 51: 953-954 (1986). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8.81 (1H, dd, J = 0.8, 2.4 Hz), 8.01 (1H, dd, J = 0.8, 8.2 Hz), 7.91 (1H, dd, J = 2.4, 8.2 Hz).

5

6-碘代烟酸乙酯

将 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(19.86 g, 103.6 mmol)在二氯甲烷(250 ml)中的溶液加入 6-碘代烟酸(23.38 g, 94.20 mmol)在二氯甲烷(100 ml)的悬浮液中。将乙醇(12.40 g, 269.27 mmol), 然后二甲氨基吡啶(1.15 g, 9.41 mmol)加入该混合物中。将该混合物于 50 °C 下加热 24.5 小时, 真空浓缩, 并用水(200 ml)稀释, 然后用乙醚(550 ml)提取。用饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层, 干燥(硫酸镁)并浓缩成黄色固体。经快速层析纯化(硅胶, 10% 乙酸乙酯-己烷)提供白色针晶状目的化合物:

15

as white needles: mp 48-49°C; ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.94 (1H, d, J = 2.1 Hz), 7.91 (1H, dd, J = 2.1, 8.2 Hz), 7.85 (1H, d, J = 8.2 Hz), 4.41 (2H, q, J = 7.1 Hz), 1.41 (3H, t, J = 7.1 Hz).

4-[(5,6,7,8-四氢-5,5-二甲基-8-氧代-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 F)

20

将 5 g (7.2 mmol)双(三苯基磷)氯化钨(II)和 1.4 g (7.2 mmol)碘化亚铜加入 4 g (21.7 mmol)的 7-乙炔基-3,4-二氢-4,4-二甲基萘-1(2H)-酮(化合物 E) (通入氩气流 15 分钟)和 6 g (21.7 mmol) 4-碘代苯甲酸乙酯在 100 ml 三乙胺的溶液中。向该混合物中通入氩气 5 分钟, 然后于室温下搅拌 18 小时。使该反应混合物经硅藻土过滤并真空浓缩其滤液。经快速层析纯化(硅胶, 10% 乙酸乙酯-己烷)产生白色固体状的目的化合物:

25

PMR (CDCl₃): δ 1.41 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.41 (6H, s), 2.04 (2H, t, J = 6.5 Hz), 2.76 (2H, t, J = 6.5 Hz), 4.40 (2H, q, J = 7.2 Hz), 7.44 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.68 (1H, dd, J = 1.8, 8.2 Hz), 8.04 (2H, d, J = 8.4 Hz), 8.15 (1H, d, J = 1.8 Hz).

5 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)

10 将 500.0 mg (1.44 mmol) 4-[(5,6,7,8-四氢-5,5-二甲基-8-氧代-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 F)在 4.0 ml THF 中的溶液加入 291.6 mg (1.59 mmol)双(三甲基甲硅烷基)氯化钠在 5.6 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中。将该反应混合物于-78 °C 搅拌 35 分钟, 然后加入 601.2 mg (1.59 mmol)5-氯(2-双-三氟甲基磺酰基)酰亚胺在 4.0 ml THF 中的溶液。于-78 °C 搅拌 1 小时后, 将该溶液温热到 0 °C 并搅拌 2 小时。通过加入饱和氯化铵水溶液使反应物骤冷。用乙酸乙酯(50 ml)提取该混合物并用 5% 氢氧化钠水溶液、水和盐水洗涤合并的有机层。使该有机相经硫酸钠干燥, 然后真空浓缩为黄色油状物。经柱层析纯化(硅胶, 15 7% 乙酸乙酯-己烷)产生无色固体状的目的化合物:

1H NMR (CDCl₃): δ 8.04 (2H, dd, J = 1.8, 8.4 Hz), 7.60 (2H, dd, J = 1.8, 8.4 Hz), 7.51 (2H, m), 7.32 (1H, d, J = 8.0 Hz), 4.40 (2H, q, J = 7.1 Hz), 6.02 (1H, t, J = 5.0 Hz), 2.44 (2H, d, J = 5.0 Hz), 1.43 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.33 (6H, s).

20 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苄基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)

25 通过加入 189.9 mg (1.74 ml, 2.96 mmol)的叔丁基锂(1.7 M 的己烷溶液)到 253.6 mg (1.482 mmol)的 4-溴代甲苯在 2.0 ml THF 的冷溶液(-78 °C)中制备 4-甲苯基锂(lithiototulene)溶液。搅拌 30 分钟后, 加入 269.4 mg (1.977 mmol)的氯化锌在 3.0 ml THF 中的溶液。将所形成的溶液温热到室温, 搅拌 30 分钟, 并经套管加入到 472.9 mg (0.988 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲

酸乙酯(化合物 G)和 50 mg (0.04 mmol)的四(三苯基磷)钯(0)在 4.0 ml THF 的溶液中。将所形成的溶液于 50 °C 加热 45 分钟，冷却到室温，并用饱和氯化铵水溶液稀释。用乙酸乙酯(40 ml)提取该混合物并用水和盐水洗涤合并的有机层。使其有机相经硫酸钠干燥并真空浓缩到黄色油状物。经柱层析纯化(硅胶，5%乙酸乙酯-己烷)产生无色固体状的目的化合物。 ¹H NMR (d₆-丙酮):

δ 1.35 (6H, s), 1.40 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.36 (2H, d, J = 4.7 Hz), 2.42 (3H,s), 4.38 (2H, q, J = 7.1 Hz), 5.99 (1H, t, J = 4.7 Hz), 7.25 (5H, m), 7.35 (2H, m), 7.52 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.98 (2H, d, J = 8.5 Hz).

10

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-苯基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1a)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法，使用 58.2 mg (0.36 ml, 0.69 mmol)苯基锂(在环己烷/乙醚中的 1.8 M 溶液)、116.1 mg (0.85 mmol)氯化锌和 13.8 mg (0.01 mmol)四(三苯基磷)钯(0)将 203.8 mg (0.43 mmol)的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

15

PMR (CDCl₃): δ 1.36 (6H, s), 1.40 (3H, t, J = 7.1Hz), 2.37 (2H, d, J = 4.7 Hz), 4.38 (2H, q, J = 7.1 Hz), 6.02 (1H, t, J = 4.7 Hz), 7.20 (1H, d, J = 1.5 Hz), 7.27 (1H, m), 7.39 (6H, m), 7.52 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.98 (2H, d, J = 8.2 Hz).

20

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 2)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法，使用在 2.0 ml THF 中的 284.8 mg (2.090 mmol)氯化锌、24 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钯(0)和 3-甲基苯基锂[通过加入 201.2 mg (1.86 ml, 3.14 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 274.0 mg(1.568 mmol)的 3-甲基溴代苯在 2.0

25

ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg (0.522 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (CDCl₃):

δ 7.99 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.51 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.39-7.14 (7H, m), 5.99 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.60 (3H, s), 2.35 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.34 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 3)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 4.0 ml THF 中的 199.4 mg (1.463 mmol)氯化锌、 24 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钨(0)和 2-甲基苯基锂[通过加入 133.9 mg (1.23 ml, 2.09 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 178.7 mg(1.045 mmol)的 2-甲基溴代苯在 2.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 200.0 mg (0.418 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (CDCl₃):

δ 7.97 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.50 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.49-7.19 (6H, m), 6.81 (1H, d, J = 1.6 Hz), 5.89 (1H, t, J = 4.5 Hz), 4.36 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.43-2.14 (2H, dq, J = 3.7, 5.4 Hz), 2.15 (3H, s), 1.39-1.34 (9H, m).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3,5-二甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 4)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 2.0 ml THF 中的 249.0 mg (1.827 mmol)氯化锌、 24 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钨(0)和 3,5-二甲基苯基锂[通过加入 167.7 mg (1.54 ml, 2.62 mmol)的叔丁基

锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 249.0 mg(1.305 mmol)的 3,5-二甲基溴代苯在 2.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg (0.522 mmol)的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

5 $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃): δ 7.98 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.52 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.40-7.33 (2H, m), 7.20 (1H, d, J = 1.6 Hz), 7.00 (1H, s), 6.97 (2H, s), 5.97 (1H, t, J = 4.8 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.36 (6H, s), 2.34 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.37 (6H, s).

10 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-乙基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 5)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 2.0 ml THF 中的 249.0 mg (1.827 mmol)氯化锌、 24 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钼(0)和 4-乙苯基锂[通过加入 167.7 mg (1.54 ml, 2.62 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 244.0 mg(1.305 mmol)的 4-乙基溴代苯在 2.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg (0.522 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

20 $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃): δ 7.99 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.51 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.42 - 7.24 (7H, m), 5.99 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.71 (2H, q, J = 7.6 Hz), 2.35 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.34 (6H, s).

25 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-(1,1-二甲基乙基)苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 6)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-噻唑基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用 142.4 mg (1.045 mmol)

氯化锌和4-叔丁基苯基锂[通过加入 100.6 mg (0.97 ml, 1.57 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.5 M 溶液)到 167.0 mg (0.78 mmol)的 4-叔丁基溴代苯在 1.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg (0.52 mmol)的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.99 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.55 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.28-7.45 (7H, m), 6.02 (1H, t, J = 4.9 Hz), 4.38 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.36 (2H, d, J = 4.9 Hz), 1.59 (3H, s), 1.40 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.39 (9H, s), 1.35 (6H, s).

10 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-氯苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 7)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 2.0 ml THF 中的 249.0 mg (1.827 mmol)氯化锌、 24 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钨(0)和 4-氯苯基锂[通过加入 167.7 mg (1.54 ml, 2.62 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 252.4 mg(1.305 mmol)的 4-氯-1-溴代苯在 2.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg (0.522 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

1H NMR (CDCl₃): δ 7.98 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.53 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.40-7.27 (6H, m), 7.12 (1H, d, J = 1.6 Hz), 6.00 (1H, t, J = 4.8 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.35 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.40 (2H, t, J = 7.1 Hz), 1.34 (6H, s).

25 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲氧基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 8)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 2.0 ml THF 中的

249.0 mg (1.827 mmol)氯化锌、 24 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钨(0)和4-甲氧基苯基锂[通过加入 167.7 mg (1.54 ml, 2.62 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 244.1 mg(1.305 mmol)的 4-甲氧基-1-溴代苯在 2.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg (0.522 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.98 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.52 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.40-7.21 (5H, m), 6.95 (2H, d, J = 8.7 Hz), 5.97 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.34 (3H, s), 2.34 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.34 (6H, s).

10

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-三氟甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 9)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 2.0 ml THF 中的 249.0 mg (1.827 mmol)氯化锌、 24 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钨(0)和4-三氟甲基苯基锂[通过加入 167.7 mg (1.54 ml, 2.62 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 296.6 mg(1.305 mmol)的 4-三氟甲基溴代苯在 2.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg (0.522 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.98 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.67 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.54 - 7.36 (6H, m), 7.10 (1H, d, J = 1.6 Hz), 6.06 (1H, t, J = 4.8 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.38 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.35 (6H, s).

25

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-吡啶基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 10)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔

基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法,使用 142.4 mg (1.045 mmol) 氯化锌和 2-吡啶锂(lithiopyridine)[通过加入 100.6 mg (0.97 ml, 1.57 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.5 M 溶液)到 123.8 mg(0.784 mmol)的 2-溴吡啶在 1.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg(0.52mmol)的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (d₆-丙酮): δ 8.64 (1H, m), 7.99 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.85 (1H, ddd, J = 1.8, 7.7, 9.5 Hz), 7.58 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.50 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.47 (2H, d, J = 1.1 Hz), 7.35 (2H, m), 6.32 (1H, t, J = 4.8 Hz), 4.34 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.42 (2H, d, J = 7.4 Hz), 1.35 (3H, t, J = 7.0 Hz), 1.35 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-吡啶基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 11)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法,使用 142.4 mg (1.045 mmol) 氯化锌和 3-吡啶锂[通过加入 100.2 mg (0.92 ml, 1.56 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.5 M 溶液)到 123.8 mg(0.784 mmol)的 3-溴吡啶在 1.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 170.0 mg(0.35 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.63-8.61 (2H, dd, J = 1.7 Hz), 7.99 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.67 (1H, dt, J = 7.9 Hz), 7.52 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.43-7.34 (3H, m), 7.10 (1H, d, J = 1.6 Hz), 6.07 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.40 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.390 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.36 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-甲基-5-吡啶基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 12)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法,使用 142.4 mg (1.045 mmol) 氯化锌和 2-甲基-5-吡啶锂[通过加入 100.5 mg (0.92 ml, 1.57 mmol)的

叔丁基锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 134.8 mg(0.784 mmol)的 2-甲基-5-溴吡啶在 1.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg (0.522 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

5

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.50 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.99 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.56 (1H, dd, J = 2.3, 8.0 Hz), 7.53 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.43 (1H, dd, J = 2.3, 8.0 Hz), 7.37 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.21 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.11 (1H, d, J = 1.5 Hz), 6.04 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.38 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.63 (3H, s), 2.38 (2H, d, J = 4.6 Hz), 1.40 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.35 (6H, s).

10

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 H)

15

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)相同的通用方法, 使用在 2.0 ml THF 中的 150.0 mg (1.10 mmol)氯化锌、 24 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钼(0)和 3-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)苯基锂[通过加入 100.2 mg (0.92 ml, 1.564 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 226.0 mg(0.787 mmol)的 3-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)溴代苯在 2.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 150.0 mg (0.314 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

20

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.98 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.51 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.40-7.22 (4H, m), 6.95 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.84-6.82 (2H, m), 6.00 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.35 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.34 (3H, s), 0.99 (9H, s), 0.23 (6H, s).

25

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 I)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔

基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 2.0 ml THF 中的 209.0 mg (1.53 mmol)氯化锌、 24 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钨(0)和 4-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)苯基锂[通过加入 140.3 mg (1.30 ml, 2.19 mmol)的叔丁基锂(在戊烷中的 1.7 M 溶液)到 315.0 mg (1.09 mmol)的 4-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)溴代苯在 2.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 210.0 mg (0.439 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.98 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.51 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.39-7.25 (3H, m), 7.21 (2H, d, J = 8.5 Hz), 5.87 (2H, d, J = 8.5 Hz), 5.96 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.33 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.33 (6H, s), 1.01 (9H, s), 0.25 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-羟基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 13)

于室温下, 将 91.5 mg (0.35 ml, 0.35 mmol)的氟化四丁基铵(在 THF 中的 1M 溶液)加入 60.0 mg (0.114 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)-苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 H)在 1.0 ml THF 的溶液中。搅拌过夜后, 用乙酸乙酯稀释该溶液, 在经硫酸镁干燥之前, 用水和饱和氯化钠水溶液洗涤。减压除去溶剂, 然后经柱层析纯化(4:1, 己烷:乙酸乙酯)提供无色固体状的目的化合物:

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.98 (2H, d, J = 7.8 Hz), 7.52 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.39 - 7.21 (4H, m), 6.93 (1H, d, J = 7.5 Hz), 6.84 (1H, d, 7.1 Hz), 6.83 (1H, s), 6.01 1H, t, J = 4.7 Hz), 4.91 (1H, s), 4.39 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.35 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.34 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-羟基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 14)

于室温下, 将 73.2 mg (0.29 ml, 0.29 mmol)的氟化四丁基铵(在

THF 中的 1M 溶液)加入 50.0 mg (0.095 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 I)在 1.0 ml THF 的溶液中。搅拌过夜后,用乙酸乙酯稀释该溶液,在经硫酸镁干燥之前,用水和饱和氯化钠水溶液洗涤。
 5 减压除去溶剂,然后经柱层析纯化(4:1,己烷:乙酸乙酯)提供无色固体状的目的化合物:

¹H NMR (CDCl₃):

δ 7.98 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.52 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.41 - 7.20 (5H, m), 6.88 (2H, d, J = 8.4 Hz), 5.96 (1H, t, J = 4.5 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.34 (2H, d, J = 4.5 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.34 (6H, s).

10

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(5-甲基噻唑-2-基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 15)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法,使用在 4.0 ml THF 中的
 15 150.0 mg (1.10 mmol)氯化锌、14 mg (0.012 mmol)四(三苯基磷)钨(0)和 5-甲基噻唑-2-基锂[通过加入 53.2 mg (0.53 ml, 0.83 mmol)的正丁基锂(在戊烷中的 1.55 M 溶液)到 82.0 mg (0.83 mmol)的 5-甲基噻唑在 5.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 264.0 mg (0.552 mmol) 的 4-
 20 [(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (CDCl₃):

δ 7.99 (2H, d, J = 7.8 Hz), 7.88 (1H, d, J = 1.5 Hz), 7.55 (2H, d, J = 7.8 Hz), 7.54 (1H, s), 7.45 (1H, dd, J = 1.5, 8.0 Hz), 7.35 (1H, d, J = 7.9 Hz), 6.48 (1H, t, J = 4.8 Hz), 4.38 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.51 (3H, s), 2.38 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.40 (3H, s), 1.32 (6H, s).

25

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-噻唑基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 15a)

通过将 41.2 mg (0.42 ml, 0.63 mmol)的正丁基锂(在己烷中的 1.5

M 溶液)加入 53.4 mg (0.63 mmol)噻唑在 1.0 ml THF 的冷却溶液(-78 °C)中制备 2-噻唑锂(2-lithiothiazole)溶液。搅拌该溶液 30 分钟, 然后加入 113.9 mg (0.84 mmol)氯化锌在 1.5 ml THF 中的溶液。将所形成的溶液温热到室温, 搅拌 30 分钟, 然后经套管将该有机锌加入 200.0 mg (0.42 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)和 12.4 mg (0.01 mmol)的四(三苯基磷)钼(0)在 1.5 ml THF 的溶液中。将所形成的溶液在 50 °C 下加热 45 分钟, 冷却到室温并用饱和氯化铵水溶液稀释。用乙酸乙酯(40 ml)提取该混合物, 并用水和盐水洗涤合并的有机层。使该有机相经硫酸钠干燥, 并真空浓缩到黄色油状物。经柱层析纯化(硅胶, 20%乙酸乙酯-己烷)产生无色油状的目的化合物:

PMR (CDCl₃): δ 1.35 (6H, s), 1.40 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.42 (2H, d, J = 4.8 Hz), 4.38 (2H, q, J = 7.1 Hz), 6.57 (1H, t, J = 4.8 Hz), 7.33 (1H, d, J = 3.3 Hz), 7.36 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.46 (1H, dd, J = 1.7, 8.1 Hz), 7.55 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.87 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.92 (1H, d, J = 3.3 Hz), 8.00 (2H, d, J = 8.4 Hz).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基噻唑-2-基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 16)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 6.0 ml THF 中的 168.0 mg (1.23 mmol)氯化锌、16 mg (0.014 mmol)的四(三苯基磷)钼(0)和 4-甲基噻唑-2-基锂[通过加入 59.6 mg (0.60 ml, 0.93 mmol)的正丁基锂(在己烷中的 1.55 M 溶液)到 92.0 mg (0.93 mmol)的 4-甲基噻唑在 6.0 ml THF 的冷溶液(-78 °C)中制备]将 295.0 mg (0.617 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

1H NMR (CDCl₃):

δ 8.00 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.80 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.55 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.45 (1H, dd, J = 1.7, 8.0 Hz), 7.35 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.87 (1H, s), 6.52 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.54 (3H, s), 2.39 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.40 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.33 (3H, s).

5 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 17)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 2.0 ml THF 中的 110.0 mg (0.84 mmol)氯化锌、 12 mg (0.011 mmol)四(三苯基磷)钼(0)和 4,5-二甲基噻唑-2-基锂[通过加入 40.2 mg (0.39 ml, 0.63 mmol)的正丁基锂(在己烷中的 1.55 M 溶液)到 71.0 mg (0.63 mmol)的 4,5-二甲基噻唑在 2.0 ml THF 中的冷溶液(-78 °C)中制备]将 200.0 mg (0.418 mmol)的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

10
15
1H NMR (CDCl₃): δ 8.00 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.82 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.54 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.43 (1H, dd, J = 1.7, 8.0 Hz), 7.33 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.45 (1H, t, J = 4.9 Hz), 4.38 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.41 (3H, s), 2.40 (3H, s), 2.37 (2H, d, J = 4.9 Hz), 1.40 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.32 (6H, s).

20 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-甲基-5-吡啶基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 18)

于室温下, 搅拌 81.7 mg (0.194 mmol)的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-甲基-5-吡啶基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 12)和 40.7 mg (0.969 mmol)的 LiOH-H₂O 在 3 ml THF/水(3:1, v/v)中的溶液过夜。通过加入饱和氯化铵水溶液抑制该反应, 并用乙酸乙酯提取。用水和盐水洗涤合并的有机层, 经硫酸钠干燥, 真空浓缩产生无色固体状目的化合物:

25
1H NMR (d₆-DMSO): δ 8.41 (1H, d, J = 1.9 Hz), 7.90 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.63 (1H, dd, J = 2.3, 7.9 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.49 (2H, m), 7.33 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.95 (1H, s), 6.11 (1H, t, J = 4.5 Hz), 2.52 (3H, s), 2.37 (2H, d, J = 4.6 Hz), 1.31 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-吡啶基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 19)

5 于室温下, 搅拌 80.0 mg (0.196 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-吡啶基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 10)和 20.6 mg (0.491 mmol) 的 LiOH-H₂O 在 3 ml THF/水(3:1, v/v) 中的溶液过夜. 通过加入饱和氯化铵水溶液抑制该反应, 并用乙酸乙酯提取. 用水和盐水洗涤合并的有机层, 经硫酸钠干燥, 真空浓缩产生无色固体状目的化合物:

10 ¹H NMR (d₆-DMSO): δ 8.64 (1H, m), 7.94 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.87 (1H, dt, J = 1.7, 7.8 Hz), 7.58 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.50 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.47 (2H, s), 7.37 (1H, m), 7.25 (1H, s), 6.30 (1H, t, J = 4.6 Hz), 2.39 (2H, d, J = 4.6 Hz), 1.31 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 20)

15 将 28.0 mg (0.70 mmol, 0.7 ml) 的氢氧化钠(1 M 水溶液)加入 30.0 mg (0.071 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 2)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中. 将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时, 冷却到室温并用 10% 盐酸酸化. 用乙酸乙酯提取, 然后经硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 提供无色固体状的目的化合物:

20 ¹H NMR (DMSO): δ 7.90 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.46 (2H, s), 7.32-7.13 (4H, m), 7.10 (1H, s), 6.98 (1H, t, J = 4.5 Hz), 2.34 (3H, s), 2.31 (2H, d, J = 4.5 Hz), 1.30 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-乙基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 21)

25 将 28.0 mg (0.70 mmol, 0.7 ml) 的氢氧化钠(1 M 水溶液)加入 47.0

mg (0.108 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-乙基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 5)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中。将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时, 冷却到室温并用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取, 然后经硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 提供无色固体状的目的化合物:

¹H NMR (DMSO): δ 7.90 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.46 (2H, s), 7.29-7.21 (4H, m), 7.02 (1H, s), 6.01 (1H, t, J = 4.5 Hz), 2.64 (2H, q, J = 7.5 Hz), 2.33 (2H, d, J = 4.5 Hz), 1.29 (6H, s), 1.22 (3H, t, J = 7.5 Hz).

10
4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲氧基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 22)

将 40.0 mg (1.00 mmol, 1.0 ml) 的氢氧化钠(1 M 水溶液)加入 80.0 mg (0.183 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲氧基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 8)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中。将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时, 冷却到室温并用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取, 然后经硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 提供无色固体状的目的化合物:

¹H NMR (DMSO): δ 7.90 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.60 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.45 (2H, s), 7.24 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.02-6.89 (3H, m), 5.98 (1H, t, J = 4.4 Hz), 3.79 (3H, s), 2.31 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.29 (6H, s).

20
4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-三氟甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 23)

将 60.0 mg (1.50 mmol, 1.50 ml) 的氢氧化钠(1.0M 水溶液)加入 70.0 mg (0.148 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-三氟甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 9)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中。将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时, 冷却到室温并用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取, 然后经硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 提供无色固体

状的目的化合物:

¹H NMR (DMSO): δ 7.90 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.80 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.61-7.47 (6H, m), 6.97 (2H, s), 6.16 (1H, t, J = 4.5 Hz), 2.37 (2H, d, J = 4.6 Hz), 1.30 (6H, s).

5 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3,5-二甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 24)

将 48.0 mg (1.20 mmol, 1.20 ml)的氢氧化钠(1.0 M 水溶液)加入 90.0 mg (0.207 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3,5-二甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 4)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中。将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时, 冷却到室温并用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取, 然后经硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 提供无色固体状的目的化合物:

10

¹H NMR (DMSO): δ 7.90 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.45 (2H, s), 7.00 (1H, s), 6.97 (1H, s), 5.97 (1H, t, J = 4.5 Hz), 2.31 (2H, d, J = 4.5 Hz), 2.30 (6H, s), 1.29 (6H, s).

15

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-氯苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 25)

将 48.0 mg (1.20 mmol, 1.20 ml)的氢氧化钠(1.0 M 水溶液)加入 80.0 mg (0.181 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-氯苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 7)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中。将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时, 冷却到室温并用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取, 然后经硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 提供无色固体状的目的化合物:

20

¹H NMR (DMSO): δ 7.90 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.60 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.51-7.48 (4H, m), 7.34 (2H, d, J = 8.4 Hz), 6.97 (1H, s), 6.07 (1H, t, J = 4.5 Hz), 2.34 (2H, d, J = 4.6 Hz), 1.29 (6H, s).

25

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-吡啶基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 26)

5 将 48.0 mg (1.20 mmol, 1.20 ml)的氢氧化钠(1.0 M 水溶液)加入 45.0 mg (0.110 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-吡啶基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 11)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中。将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时，冷却到室温并用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取，然后经硫酸钠干燥，减压除去溶剂，提供无色固体状的目的化合物：

1H NMR (DMSO): δ 8.60 (1H, d, J = 4.6 Hz), 8.55 (1H, s), 7.90 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.76 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.60 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.51-7.46 (3H, m), 6.94 (1H, s), 6.14 (1H, t, J = 4.5 Hz), 2.37 (2H, d, J = 4.5 Hz), 1.31 (6H, s).

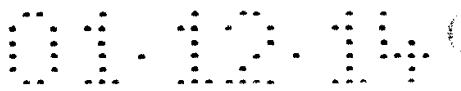
15 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 27)

20 将 60.0 mg (1.50 mmol, 1.50 ml)的氢氧化钠(1.0 M 水溶液)加入 80.0 mg (0.190 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 3)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中。将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时，冷却到室温并用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取，然后经硫酸钠干燥，减压除去溶剂，提供无色固体状的目的化合物：

1H NMR (DMSO): δ 7.89(2H, d, J = 8.4 Hz), 7.57 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.46 (2H, s), 7.29-7.14 (4H, m), 6.59 (1H, s), 5.90 (1H, t, J = 4.7 Hz), 2.39 (2H, m), 2.60 (3H, s), 1.39 (3H, s), 1.29 (3H, s).

25 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-羟基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 28)

将 40.0 mg (1.00 mmol, 1.00 ml)的氢氧化钠(1.0 M 水溶液)加入



40.0 mg (0.076 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(3-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 H)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中。将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时，冷却到室温并用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取，然后经硫酸钠干燥，减压除去溶剂，提供无色固体状的目的化合物：

¹H NMR (d₆-丙酮) : δ 7.90 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.49 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.35 (2H, s), 7.15-7.07 (2H, m), 6.77-6.69 (3H, m), 5.92 (1H, t, J = 4.7 Hz), 2.25 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.23 (6H, s).

10 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-羟基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 29)

将 60.0 mg (1.50 mmol, 1.50 ml) 的氢氧化钠(1.0 M 水溶液)加入 75.0 mg (0.143 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-((2,2-二甲基乙基)-二甲基硅氧基)苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 I)在 3 ml 乙醇和 2 ml THF 的溶液中。将该溶液在 50 °C 下加热 2 小时，冷却到室温并用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取，然后经硫酸钠干燥，减压除去溶剂，提供无色固体状的目的化合物：

¹H NMR (d₆-丙酮) : δ 8.01 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.45 (2H, s), 7.20-7.17 (3H, m), 6.92-6.89 (2H, m), 5.97 (1H, t, J = 4.7 Hz), 2.35 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.34 (6H, s).

20

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(5-甲基噻唑-2-基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 30)

于室温下，将氢氧化钠水溶液(1 ml, 1 M, 1 mmol)加入 100 mg (0.23 mmol) 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(5-甲基噻唑-2-基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 15)和 4 ml 乙醇的溶液中。将该形成的溶液在 50 °C 下加热 1 小时并真空浓缩。使其残留物悬浮在二氯甲烷和醚(5:1)溶液中，用 1 M 盐酸水溶液酸化到 pH 为 5。使其分层，并用盐水洗涤

25

其有机层，干燥(硫酸钠)，过滤并减压除去溶剂，产生白色固体状的
 目的化合物: $^1\text{H NMR}$ (d_6 -DMSO): δ 7.96 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 7.95 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.65 (2H,
 d, $J = 8.0$ Hz), 7.64 (1H, s), 7.53 (1H, dd, $J = 1.7, 8.0$ Hz), 7.46 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.59 (1H, t, J
 - 4.5 Hz), 2.50 (3H, s), 2.39 (2H, d, $J = 4.5$ Hz), 1.27 (6H, s).

5

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-噻唑基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物
 30a)

10 于室温下，搅拌 33.9 mg (0.08 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-
 8-(2-噻唑基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 15a)和 8.5 mg (0.20
 mmol) 的 LiOH-H₂O 在 3 ml THF/水(3:1, v/v) 中的溶液过夜。通过加入
 饱和氯化铵水溶液抑制该反应，并用乙酸乙酯提取。用水和盐水洗涤
 合并的有机层，经硫酸钠干燥，真空浓缩产生无色固体状目的化合物:

15

PMR

(d_6 -DMSO): δ 1.29 (6H, s), 2.42 (2H, d, $J = 4.6$ Hz), 6.68 (1H, t, $J = 4.6$ Hz), 7.51 (2H, m), 7.62 (2H,
 d, $J = 8.2$ Hz), 7.77 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 7.93 (2H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.98 (1H, d, $J = 3.3$ Hz).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基噻唑-2-基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化
 合物 31)

20

于室温下，将氢氧化钠水溶液(1 ml, 1 M, 1 mmol)加入 4-[(5,6-二
 氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基噻唑-2-基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物
 16)(145.0 mg, 0.34 mmol)和 4 ml 乙醇的溶液中。将所形成的溶液在 50
 °C 下加热 1 小时并真空浓缩。使其残留物悬浮在二氯甲烷和醚(5:1)溶
 液中，用 1 M 盐酸水溶液酸化到 pH 为 5。使其分层，并用盐水洗涤
 25 其有机层，干燥(硫酸钠)，过滤并减压除去溶剂，产生白色固体状的
 目的化合物:

¹H NMR (d6-DMSO): δ 7.94 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.87 (1H, d, J = 1.6 Hz), 7.63 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.50 (1H, dd, J = 1.6, 8.1 Hz), 7.45 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.27 (1H, s), 6.58 (1H, t, J = 4.8 Hz), 2.43 (3H, s), 2.37 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.26 (6H, s).

5 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 32)

于室温下, 将氢氧化钠水溶液(1 ml, 1 M, 1 mmol)加入 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 17)(58.0 mg, 0.13 mmol)和 4 ml 乙醇的溶液中。将所形成的溶液在 50 °C 下加热 1 小时并真空浓缩。使其残留物悬浮在二氯甲烷和醚(5:1)溶液中, 用 1 M 盐酸水溶液酸化到 pH 为 5。使其分层, 并用盐水洗涤其有机层, 干燥(硫酸钠), 过滤并减压除去溶剂, 产生白色固体状的目的化合物:

15 ¹H NMR (d6-DMSO): δ 7.94 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.86 (1H, d, J = 1.6 Hz), 7.61 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.50 (1H, dd, J = 1.6, 8.0 Hz), 7.45 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.51 (1H, t, J = 4.9 Hz), 2.37 (3H, s), 2.36 (2H, d, J = 4.6 Hz), 2.32 (3H, s), 1.26 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(5-甲基-2-噻吩基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 33)

20 使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基萘基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用在 2.0 ml THF 中的 202.0 mg (1.48 mmol)氯化锌、24 mg (0.022 mmol)四(三苯基磷)钨(0)和 5-甲基-2-噻吩锂[通过加入 58.6 mg (0.36 ml, 0.915 mmol)的正丁基锂(在己烷中的 2.5 M 溶液)到 89.8 mg (0.915 mmol)的 2-甲基噻吩在 2.0 ml THF 的冷溶液(-78 °C)中制备]将 170.0 mg (0.366 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

¹H NMR (CDCl₃): δ

8.00 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.59 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.55 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.43 (1H, dd, J = 1.7, 8.0 Hz), 7.35 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.87 (1H, d, J = 3.5 Hz), 6.74 (1H, d, J = 2.8 Hz), 6.15 (1H, t, J = 4.8 Hz), 4.38 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.52 (3H, s), 2.32 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.40 (3H, t, 7.1 Hz), 1.32 (6H, s).

5

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-噻吩基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 33a)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用 186.8 mg (1.37 mmol) 氯化锌、 37.1 mg (0.03 mmol) 四(三苯基磷)钨(0)和 2-噻吩锂[通过加入 65.9 mg (0.69 ml, 1.03 mmol)的正丁基锂(在己烷中的 1.5 M 溶液)到 86.5 mg (1.03 mmol)的噻吩在 1.0 ml THF 的冷溶液(-78 °C)中制备]将 250.0 mg (0.52 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

10

15

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.33 (6H, s), 1.36 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.38 (2H, d, J = 4.7 Hz), 4.34 (2H, q, J = 7.2 Hz), 6.25 (1H, t, J = 4.7 Hz), 7.13 (2H, m), 7.47 (4H, m), 7.62 (2H, d, J = 8.5 Hz), 8.00 (2H, d, J = 8.5 Hz).

20

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(5-甲基-2-噻吩基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 34)

于室温下, 将氢氧化钠水溶液(1 ml, 1 M, 1 mmol)加入 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(5-甲基-2-噻吩基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 33)(35.0 mg, 0.082 mmol)在 2 ml 乙醇和 1 ml THF 的溶液中。将所形成的溶液在室温下搅拌过夜, 然后用 10% 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取, 然后经硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 提供无色固体状的目的化合物:

25

¹H NMR (d₆-丙酮): δ 8.03 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.63 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.54-7.48 (3H, m), 6.89 (1H, m), 6.18 (1H, t, J = 4.7 Hz), 2.49 (3H, s), 2.35 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.32 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-噻吩基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 34a)

5 使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-噻唑基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 30a)相同的方法, 使用在水中的 17.8 mg (0.42 mmol) LiOH, 将 70.0 mg (0.17 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-噻吩基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 33a)转变成目的化合物(无色固体):

10 PMR (d_6 -DMSO): δ 1.27 (6H, s), 2.33 (2H, d, J = 4.9 Hz), 6.23 (1H, t, J = 4.9 Hz), 7.14 (2H, m), 7.38 - 7.56 (4H, m), 7.61 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.92 (2H, d, J = 8.3 Hz).

5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘甲酸(化合物 K)

15 将 3,4-二氢-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-7-溴萘(化合物 D)(250.0 mg, 0.764 mmol) 在 2.0 ml THF 中的溶液冷却到 -78 °C, 并缓慢加入 1.0 ml 的叔丁基锂(1.68 mmol, 1.7 M 戊烷溶液)。于 -78 °C 搅拌 1 小时后, 将气体二氧化碳(通过干冰的蒸发而产生, 经过干燥管)鼓泡通入反应物中达 1 小时。然后, 使该反应液温热到室温, 通过加入 10% 盐酸抑制反应。用乙酸乙酯提取, 然后用水和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层, 经硫酸镁干燥。减压除去溶剂, 并用己烷洗涤该固体提供无色固体目的化合物:

20 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7.94 (1H, dd, J = 1.8, 8.1 Hz), 7.76 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.45 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.24 (4H, m), 6.01 (1H, t, J = 4.7 Hz), 2.40 (3H, s), 2.36 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.35 (6H, s).

25 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羰基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 35)

于室温下, 将 170.0 mg (0.58 mmol) 的 5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘甲酸(化合物 K)、115.0 mg (0.70 mmol) 的 4-氨基苯甲

酸乙酯、145.0 mg (0.76 mmol)的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 92.4 mg (0.76 mmol)的 4-二甲氨基吡啶在 6.0 ml DMF 中的溶液搅拌过夜。加入乙酸乙酯，并用水、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤所形成的溶液，然后经硫酸镁干燥。减压除去溶剂后，通过柱层析(10 - 15% 乙酸乙酯/己烷)分离无色固体状的产物：

¹H NMR (CDCl₃): δ

8.02 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.72 (2H, m), 7.65 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.52 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.48 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.25 (4H, m), 6.15 (1H, t, J = 4.9 Hz), 4.36 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.40 (3H, s), 2.38 (2H, d, J = 4.9 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.37 (6H, s).

10

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羰基]氨基]苯甲酸(化合物 36)

将 240.1 mg 氢氧化钠(6.00 mmol, 3.0 ml 2M 的水溶液)加入 26.5 mg (0.06 mmol)的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羰基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 35) 在 3.0 ml 乙醇和 4.0 ml THF 中的溶液中。于室温下搅拌 72 小时后，通过加入 10% 盐酸抑制该反应。用乙酸乙酯提取，经硫酸镁干燥有机层，在减压除去溶剂后提供固体。经乙腈结晶提供无色固体状的目的化合物：¹H NMR (d₆-DMSO): δ 10.4 (1H, s), 7.91-7.81 (5H, m), 7.54 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.45 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.23 (4H, s), 6.04 (1H, t, J = 4.7 Hz), 2.35 (5H, s), 1.33 (6H, s).

20

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羰基]氧基]苯甲酸乙酯(化合物 37)

于室温下，将 25.0 mg (0.086 mmol)的 5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘甲酸(化合物 K)、17.5 mg (0.103 mmol)的 4-羟基苯甲酸乙酯、21.4 mg (0.112 mmol)的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 12.6 mg (0.103 mmol)的 4-二甲氨基吡啶在 2.0 ml DMF 中

25

的溶液搅拌过夜。加入乙酸乙酯，并在用硫酸镁干燥以前，用水、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤所形成的溶液。减压除去溶剂后，通过柱层析(10%乙酸乙酯/己烷)分离淡黄色固体状的产物：

5 ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.08
 (2H, d, J = 8.1 Hz), 8.05 (1H, dd, J = 1.8, 8.1 Hz), 7.89 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.50 (2H, d, J = 8.1 Hz),
 7.22 (5H, m), 6.05 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.39 (2H, d, J = 4.7 Hz), 2.38 (3H,
 s), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.37 (6H, s).

10 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羰基]氧基]苯甲酸 2-三甲硅基乙酯(化合物 38)

于室温下，将 93.5 mg (0.320 mmol) 的 5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘甲酸(化合物 K)、76.0 mg (0.319 mmol) 的 4-羟基苯甲酸 2-三甲硅基乙酯、80.0 mg (0.417 mmol) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 51.0 mg (0.417 mmol) 的 4-二甲氨基吡啶在 4.0 ml DMF 中的溶液搅拌过夜。加入乙酸乙酯，并在用硫酸镁干燥以前，用水、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤所形成的溶液。减压除去溶剂后，通过柱层析(5%乙酸乙酯/己烷)分离无色固体状的产物：

20 ¹H NMR
 (CDCl₃): δ 8.08 (2H, d, J = 8.8 Hz), 8.05 (1H, dd, J = 1.8, 8.1 Hz), 7.50 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.26-
 7.18 (6H, m), 6.05 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.42 (2H, t, J = 8.4 Hz), 2.40 (2H, d, J = 4.7 Hz), 2.39 (3H,
 s), 1.38 (6H, s), 0.09 (9H, s).

25 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羰基]氧基]苯甲酸(化合物 39)

于室温下，将 110.0 mg (0.213 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羰基]氧基]苯甲酸 2-三甲硅基乙酯(化合物 38)

和 167.3 mg 氟化四丁基铵(0.640 mmol, 0.64 ml 在 THF 中的 1M 溶液) 在 2.0 ml THF 中的溶液搅拌 22 小时。加入乙酸乙酯, 用水和饱和氯化钠水溶液洗涤所形成的溶液, 然后经硫酸镁干燥。减压除去溶剂并用乙酸乙酯和乙腈洗涤残留固体提供无色固体状的目的化合物:

5

¹H NMR (d₆-丙酮): δ

8.10 (2H, d, J = 8.8 Hz), 8.06 (1H, dd, J = 2.0, 8.1 Hz), 7.82 (1H, d, J = 1.9 Hz), 7.64 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.35 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.25 (4H, m), 6.08 (1H, t, J = 4.7 Hz), 2.42 (2H, d, J = 4.7 Hz), 2.35 (3H, s), 1.39 (6H, s).

10 2-氟-4-[[[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羧基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 40)

15 将 115.0 mg (0.41 mmol) 的 5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘甲酸(化合物 K)、89.0 mg (0.49 mmol) 的 2-氟-4-氨基苯甲酸乙酯、102.0 mg (0.53 mmol) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 65.0 mg (0.53 mmol) 的 4-二甲氨基吡啶在 5.0 ml DMF 中的溶液于 50 °C 下搅拌 1 小时, 然后于室温下搅拌过夜。加入乙酸乙酯, 并在用硫酸镁干燥以前, 用水、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤所形成的溶液。减压除去溶剂后, 通过柱层析(20%乙酸乙酯/己烷)分离无色固体状的产物:

20

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.96 (1H, s), 7.89 (1H, t, J = 8.4 Hz), 7.70 (2H, m), 7.52 (1H, d, J = 1.9 Hz), 7.45 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.23 (5H, m), 6.04 (1H, t, J = 4.8 Hz), 4.36 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.38 (3H, s), 2.35 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.36 (6H, s).

25

2-氟-4-[[[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羧基]氨基]苯甲酸(化合物 41)

将 40.0 mg 氢氧化钠(1.00 mmol, 1.0 ml 1M 的水溶液)加入 41.6 mg (0.091 mmol) 的 2-氟-4-[[[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羧基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 40)在 2.0 ml 乙醇和 2.0 ml THF 中的

溶液中。于室温下搅拌过夜后，通过加入 10% 盐酸抑制该反应。用乙酸乙酯提取，经硫酸镁干燥有机层，在减压除去溶剂后提供固体。经乙腈结晶提供淡黄色固体状的目的化合物：

$^1\text{H NMR}$ (d_6 -丙酮): δ 9.84 (1H, s), 7.94-7.83 (3H, m), 7.64 (1H, dd, $J = 2.0$ Hz), 7.53 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.23 (4H, s), 6.04 (1H, t, $J = 4.7$ Hz), 2.38 (2H, d, $J = 4.7$ Hz), 2.36 (3H, s), 1.35 (6H, s).

10 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)硫代羰基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 42)

将 110.0 mg (0.25 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)硫代羰基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 35)和 121.0 mg (0.30 mmol) 的 [2,4-双(4-甲氧基苯基)-1,3-二硫代-2,4-diphosphetane-2,4-二硫醚] (Lawesson's 试剂)在 12.0 ml 苯中的溶液回流过夜。在冷却到室温后，将所述混合物过滤并减压浓缩其滤液。经柱层析(10 - 25% 乙酸乙酯/己烷)分离黄色固体状的目的化合物：

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.92 (1H, s), 8.06 (2H, t, $J = 8.5$ Hz), 7.88-7.70 (3H, m), 7.42 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.18 (4H, m), 6.03 (1H, t, $J = 4.7$ Hz), 4.37 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 2.38 (3H, s), 2.36 (2H, d, $J = 4.7$ Hz), 1.56 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.35 (6H, s).

20 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)硫代羰基]氨基]苯甲酸(化合物 43)

25 将 60.0 mg 氢氧化钠(1.50 mmol, 1.5 ml 1M 的水溶液)加入 84.0 mg (0.184 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)硫代羰基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 42)在 2.0 ml 乙醇和 2.0 ml THF 中的溶液中。于室温下搅拌过夜后，通过加入 10% 盐酸抑制该反应。用乙酸乙酯提取，经硫酸镁干燥有机层，在减压除去溶剂后提供固体。经乙腈结晶提供黄色固体状的目的化合物：

1H NMR (d6 丙酮): δ 10.96 (1H, s), 8.05 (4H, m), 7.72 (1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz), 7.54 (1H, s), 7.46 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.20 (4H, m), 6.04 (1H, t, J = 4.7 Hz), 2.38 (2H, d, J = 4.7 Hz), 2.33 (3H, s), 1.35 (6H, s).

5 2-乙酰基-6-溴代萘(化合物 L)

将 21.0 g (267 mmol) 乙酰氯加入 44.0 g (0.212 mol) 2-溴代萘和 34.0 g (0.255 mol) 的三氯化铝在 400 ml 硝基苯的冷的(10 °C)混合物中。将该机械搅拌下的反应混合物温热到室温, 在 40 °C 下加热 18 小时。在冰浴中冷却到 0 °C 后, 通过加入 12 M 盐酸(70 ml)抑制反应。使其分

10 层, 并用水和稀的碳酸氢钠水溶液洗涤其有机相。Kugelrohr 蒸馏, 然后经 10% 乙酸乙酯-己烷重结晶产生 23 g 黄褐色固体状的目的化合物:

1H NMR (CDCl₃): δ 8.44 (1H, br s), 8.04-8.10 (2H, m), 7.85 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.82 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.64 (1H, d, J = 8.8 Hz), 2.73 (3H, s).

15

6-溴-2-萘甲酸(化合物 M)

将 4 g (16.06 mmol) 2-乙酰基-6-溴代萘(化合物 L)在 50 ml 1,4-二氧六环中的溶液加入次氯酸钠(62 ml, 5.25% 的水溶液(w/w), 3.6 g, 48.18 mmol)和氢氧化钠(6.4 g, 160.6 mmol)在 50 ml 水的溶液中。将该

20 黄色溶液在油浴中于 70 °C 下加热 2 小时, 冷却到室温, 用乙醚(2 x 50 ml)提取。用亚硫酸氢钠溶液稀释其水层(直到碘化钾指示液保持无色为止), 然后用 1 N 硫酸酸化(pH < 2)产生白色沉淀。用乙醚提取该混合物, 并用饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机相, 干燥(硫酸镁)和浓缩产生 3.54 g (88%) 固体状的目的化合物:

1H NMR (DMSO-d₆): δ 8.63 (1H, br s), 8.32 (1H, d, J = 2.0 Hz), 8.10 (1H, d, J = 8.8 Hz), 8.00-8.05 (2H, m), 7.74 (1H, dd, J = 2.0, 8.8 Hz).

25

6-溴-2-萘甲酸乙酯(化合物 N)

18 M 硫酸(2 ml)加入 3.1 g (12.43 mmol)的 6-溴-2-萘甲酸(化合物 M)在乙醇(30 ml, 23.55 g, 511.0 mmol)的溶液中。将该溶液回流 30 分钟, 冷却到室温, 在戊烷(100 ml)和水(100 ml)之间分配该反应混合物。用戊烷(100 ml)提取其水相, 用饱和氯化钠水溶液(100 ml)洗涤合并的有机层, 干燥(硫酸镁)并浓缩产生灰白色的固体。经快速层析纯化(硅胶, 10% 乙酸乙酯:己烷)提供白色固体状的目的化合物:

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.58 (1H, br s), 8.10 (1H, dd, J = 1.7, 9 Hz), 8.06 (1H, d, J = 2 Hz), 7.83 (1H, d, J = 9 Hz), 7.80 (1H, d, J = 9 Hz), 7.62 (1H, dd, J = 2, 9 Hz).

(E)-4-[2-(5,6,7,8-四氢-5,5-二甲基-8-氧代-2-萘基)乙烯基]-苯甲酸乙酯(化合物 O)

将 124.0 mg (0.40 mmol)的三(2-甲基苯基)磷, 然后 44.0 mg (0.20 mmol)的乙酸钨(II)加入 520.0 mg (2.00 mmol)的 3,4-二氢-4,4-二甲基-7-溴-1(2H)-萘酮(化合物 B)和 510.0 mg (2.90 mmol)的 4-乙烯基苯甲酸乙酯在 4.0 ml 三乙胺(通入氩气 25 分钟脱气)的溶液中。将所形成的溶液于 95 °C 加热 2.5 小时, 冷却到室温, 减压浓缩。经柱层析纯化(10% 乙酸乙酯/己烷)提供无色固体状的目的化合物:

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.19 (1H, d, J = 2.0 Hz), 8.03 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.69 (1H, dd, J = 2.0, 8.2 Hz), 7.57 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.45 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.20 (2H, s), 4.39 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.76 (2H, t, J = 6.5 Hz), 2.04 (2H, t, J = 6.5 Hz), 1.41(3H, t, J = 7.1 Hz, and 6H, s).

(E)-4-[2-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]-苯甲酸乙酯(化合物 P)

将 700.0 mg (2.00 mmol)的(E)-4-[2-(5,6,7,8-四氢-5,5-二甲基-8-氧代-2-萘基)乙烯基]-苯甲酸乙酯(化合物 O)在 25.0 ml THF 中的溶液加入 440.0 mg (2.40 mmol)的双(三甲基硅基)氯化钠在 10.0 ml THF 的冷

的(-78 °C)溶液中. 于-78 °C 搅拌 1.5 小时后, 一次性加入 960.0 mg (2.40 mmol)的 2[N,N-双(三氟甲基磺酰基)氨基]-5-氯吡啶. 30 分钟后, 将该溶液温热到 0 °C 并搅拌 3 小时. 通过加入饱和氯化铵水溶液抑制该反应, 用乙酸乙酯提取. 用 5%氢氧化钠水溶液洗涤合并的提取物, 干燥(硫酸钠), 减压除去溶剂. 经柱层析(7%乙酸乙酯/己烷)分离无色固体状的目的化合物:

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.04 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.57 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.52 (1H, s), 7.49 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.33 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.20 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.10 (1H, d, J = 16.4 Hz), 6.00 (1H, t, J = 4.9 Hz), 4.39 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.43 (2H, d, J = 4.9 Hz), 1.41 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.32 (6H, s).

(E)-4-[2-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙烯基]-苯甲酸乙酯(化合物 44)

于-78 °C, 通过将 130.7 mg 的叔丁基锂(2.04 mmol, 1.20 ml 1.7 M 的戊烷溶液)加入 374.5 mg (2.20 mmol)的 4-溴甲苯在 2.5 ml THF 的溶液中制备 4-甲苯锂溶液. 30 分钟后, 加入 313.4 mg (2.30 mmol)氯化锌在 2.0 ml THF 中的溶液. 将所形成的溶液温热到室温, 搅拌 1.25 小时, 然后经套管加到 285.0 mg (0.590 mmol)的(E)-4-[2-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氨基-2-萘基)乙烯基]-苯甲酸乙酯(化合物 P)和 29.0 mg (0.025 mmol)的四(三苯基磷)钯(0)在 2.0 ml THF 的溶液中. 于室温下, 搅拌所形成的溶液 1 小时, 然后于 55 °C 搅拌 2 小时. 冷却到室温后, 通过加入饱和氯化铵水溶液抑制该反应. 用乙酸乙酯提取该混合物, 并用 5%氢氧化钠水溶液、饱和氯化钠水溶液洗涤合并的提取物, 在减压浓缩以前经硫酸钠干燥. 经柱层析(10%乙酸乙酯/己烷)分离无色固体状目的化合物:

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.96 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.47 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.43-7.16 (7H, m), 7.07 (1H, d, J = 16.3 Hz), 6.93 (1H, d, J = 16.3 Hz), 5.97 (1H, t, J = 4.7 Hz), 4.39 (2H, q, J = 7.0 Hz), 2.41 (3H, s), 2.33 (1H, d, J = 4.7 Hz), 1.38 (3H, t, J = 7.0 Hz), 1.33 (6H, s).

(E)-4-[2-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙烯基]-苯甲酸
(化合物 45)

5 将 30.0 mg 的氢氧化锂(0.909 mmol, 1.0 ml 1.1 M 溶液)和 1.0 ml 甲醇加入 65.0 mg (0.190 mmol)的(E)-4-[2-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙烯基]-苯甲酸乙酯(化合物 44)在 4.0 ml THF 的溶液中。将该溶液于 55 °C 下加热 3 小时, 冷却到室温, 并减压浓缩。将其残留物溶于水中并用己烷提取。用 10% 盐酸酸化其水层到 pH 1, 并用乙醚提取。用饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层, 用乙酸乙酯稀
 10 释, 产生澄清的溶液, 并经硫酸钠干燥。减压除去溶剂产生无色固体状的目的化合物:
 $^1\text{H NMR}$ (d_6 -DMSO): δ 7.86 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.66 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.58 (1H, dd, J = 1.7, 8.1 Hz), 7.41 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.28 (1H, d, J = 16.5 Hz), 7.23 (4H, s), 7.08 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.07 (1H, d, J = 16.5 Hz), 5.97 (1H, t, J = 4.6 Hz), 2.35 (3H, s), 2.31 (1H, d, J = 4.6 Hz), 1.29 (6H, s).

15

4-[2-(1,1-二甲基-3-(4-甲基苯基)-5-茚基)乙炔基]-苯甲酸乙酯(化合物 47)

20 将 32.0 mg (0.187 mmol)的 4-溴甲苯在 1.0 ml THF 中的溶液冷却到 -78 °C 并缓慢地加入 24.0 mg 叔丁基锂(0.375 mmol, 0.22 ml 在戊烷中的 1.7 M 溶液)。将该黄色溶液搅拌 30 分钟, 同时加入 29.8 mg(0.219 mmol)的氯化锌的 1 ml THF 溶液。将所形成的溶液温热到室温, 30 分钟后加到含有在 1 ml THF 中的 29.0 mg (0.062 mmol) 4-[2-(1,1-二甲基-3-(三氟甲基磺酰基)氧基-5-茚基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 FF)和
 25 2.9 mg (0.003 mmol)的四(三苯基磷)钨(0)的第二个烧瓶中。将所形成的溶液在 50 °C 下加热 1 小时, 然后于室温下搅拌 4 小时。通过加入饱和氯化铵水溶液抑制该反应, 然后用乙醚提取。用水、饱和氯化钠水溶



液洗涤合并的有机层，在减压浓缩以前经硫酸镁干燥。经柱层析(10% 乙醚/己烷)分离无色油状目的化合物:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.03 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.66 (1H, s), 7.58 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.50 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.46 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.38 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.28 (2H, d, $J = 9$ Hz), 6.43 (1H, s), 4.40 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 2.43 (3H, s), 1.41 (3H, t; + 6H, s).

5

10 4-[2-(1,1-二甲基-3-(4-甲基苯基)-5-茚基)乙炔基]-苯甲酸(化合物 48)

将 5.2 mg (0.12 mmol) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 加入 10.0 mg (0.025 mmol) 的 4-[2-(1,1-二甲基-3-(4-甲基苯基)-5-茚基)乙炔基]-苯甲酸乙酯(化合物 47) 在 0.5 ml $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1 v/v) 的溶液中。在室温下搅拌 48 小时后，用己烷提取该溶液并用饱和氯化铵水溶液酸化其水层。加入固体氯化钠并用乙酸乙酯提取所形成的混合物。干燥(硫酸钠)合并的有机层并减压

15

浓缩产生无色固体状的目的化合物: ^1H NMR (300 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 7.95 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.65 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.57 (2H, m), 7.49 (3H, m), 7.30 (2H, d, $J = 7.9$ Hz), 6.61 (1H, s), 2.36 (3H, s), 1.36 (6H, s).

20

3-(4-溴代苯磺基氧基)丙酸

将 6.79 g (35.7 mmol) 4-溴代苯磺酚加入 1.44 g (35.7 mmol) 氢氧化钠在 20.0 ml 脱气水(通入氩气)的溶液中。将所形成的混合物于室温下搅拌 30 分钟。将 2.26 g (16.3 mmol) 的碳酸钾和 15 ml 脱气的水加入第二个烧瓶中。将 5.00 g (32.7 mmol) 的 3-溴代丙酸(分批)加入该溶液中。将所形成的羧酸钾溶液加入所述磺醇钠溶液中，于室温下搅拌所形成的混合物 48 小时。将该混合物过滤，并用苯提取其滤液，弃去合并的有机层。用 10% 盐酸酸化含水层并用乙酸乙酯提取。用饱和氯化钠水

25

溶液洗涤该合并的有机层，经硫酸镁干燥，减压浓缩。经乙醚-己烷重结晶所形成的固体产生灰白色结晶状的目的化合物：

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7.43 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.25 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 3.15 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 2.68 (2H, t, $J = 7.3$ Hz).

5

2,3-二氢-6-溴-(4H)-1-苯并噻喃-4-酮

将 3.63 g (13.9 mmol) 的 3-(4-溴代苯硫氧基)丙酸在 60 ml 甲磺酸中的溶液于 75 °C 下加热 1.5 小时。冷却到室温后，用水稀释该溶液并用乙酸乙酯提取。用 2 N 氢氧化钠水溶液、水和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层，然后经硫酸镁干燥。减压除去溶剂后提供黄色固体，从中经柱层析(3% 乙酸乙酯-己烷)分离淡黄色固体状的产物：

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.22 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 7.48 (1H, dd, $J = 2.1, 8.3$ Hz), 7.17 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 3.24 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 2.98 (2H, t, $J = 6.7$ Hz).

15

2,3-二氢-6-(2-三甲基甲硅烷基乙炔基)-(4H)-1-苯并噻喃-4-酮

将 1.00 g (4.11 mmol) 的 2,3-二氢-6-溴-(4H)-1-苯并噻喃-4-酮和 78.3 mg (0.41 mmol) 的 CuI 在 15.0 ml THF 和 6.0 ml Et_2NH 中的溶液通入氩气 5 分钟。将 2.0 ml (1.39 g, 14.2 mmol) 的(三甲基甲硅烷基)乙炔，然后 288.5 mg (0.41 mmol) 的氯化双(三苯基磷)钯(II)加入该溶液中。于室温下，搅拌所形成的黑暗色溶液 3 天，然后经硅藻土垫过滤，用乙酸乙酯洗涤。在经硫酸镁干燥以前用水和饱和氯化钠水溶液洗涤该滤液。经柱层析(4% 乙酸乙酯-己烷)分离橙色油状物的目的化合物：

25

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.13 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 7.36 (1H, dd, $J = 2.1, 8.2$ Hz), 7.14 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 3.19 (2H, d, $J = 6.3$ Hz), 2.91 (2H, d, $J = 6.3$ Hz), 0.21 (9H, s).

2,3-二氢-6-乙炔基-(4H)-1-苯并噻喃-4-酮

于室温下，搅拌含有 600.0 mg (2.25 mmol) 的 2,3-二氢-6-(2-三甲基硅烷基乙炔基)-(4H)-1-苯并噻喃-4-酮和 100.0 mg (0.72 mmol) 碳酸钾在 15 ml 甲醇中的溶液 20 小时。用水稀释该溶液并用乙醚提取。
 5 在经硫酸镁干燥以前用水和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层。减压除去溶剂提供橙色固体状的目的化合物：

1H NMR (CDCl₃): δ 8.17 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.40 (1H, dd, J = 1.8, 8.2 Hz), 7.19 (1H, d, J = 8.2 Hz), 3.22 (2H, t, J = 6.3 Hz), 3.08 (1H, s) 2.94 (2H, t, J = 6.3 Hz).

10

4-[2-(6-(2,3-二氢-(4H)-1-苯并噻喃-4-酮基))乙炔基]苯甲酸乙酯

将氩气通入 405.0 mg (2.15 mmol) 2,3-二氢-6-乙炔基-(4H)-1-苯并噻喃-4-酮和 594.0 mg (2.15 mmol) 的 4-碘代苯甲酸乙酯在 15 ml 三乙胺和 3 ml THF 中的溶液达 15 分钟。将 503.0 mg (0.72 mmol) 的氯化双(三苯基磷)钼(II)和 137.0 mg (0.72 mmol) 的 CuI 加入该溶液中。于室温
 15 下搅拌该溶液 20 小时，然后经硅藻土垫过滤，用乙酸乙酯洗涤。减压除去溶剂提供棕色固体。柱层析纯化(3%乙酸乙酯:己烷)提供橙色固体状的目的化合物：

1H NMR (d₆-丙酮): δ 8.15 (1H, d, J = 2.0 Hz), 8.02 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.69 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.61 (1H, dd, J = 2.1, 8.3 Hz), 7.40 (1H, d, J = 8.2 Hz), 4.35 (2H, q, J = 7.1 Hz), 3.40 (2H, t, J = 6.3 Hz), 2.96 (2H, t, J = 6.3 Hz), 1.37 (3H, t, J = 7.1 Hz).

20

4-[2-(6-(4-(三氟甲基磺酰基)氧基-(2H)-1-苯并噻喃基))乙炔基]苯甲酸乙酯

将 370.0 mg (1.10 mmol) 的 4-[2-(6-(2,3-二氢-(4H)-1-苯并噻喃-4-酮基))乙炔基]苯甲酸乙酯在 4.0 ml THF 中的溶液加入冷却到 -78 °C 的 221.9 mg (1.21 mmol) 的双(三甲基甲硅烷基)氯化钠在 3.0 ml THF 中的溶液中。30 分钟后，缓慢加入 2-[N,N-双(三氟甲基磺酰基)氨基]-5-氯

25

吡啶在 4.0 ml THF 的溶液中。将该反应物缓慢地温热到室温，5 小时后通过加入饱和氯化铵水溶液抑制反应。用乙酸乙酯提取该混合物，并在用硫酸镁干燥以前，用 5% 氢氧化钠水溶液、水和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层。减压除去溶剂，然后经柱层析(4% 乙酸乙酯-己烷)提供淡黄色固体状的目的化合物:

¹H NMR (d₆-丙酮): δ 8.12 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.66 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.56 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.49 (1H, dd, J = 1.7, 8.1 Hz), 7.40 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.33 (1H, t, J = 5.7 Hz), 4.35 (2H, q, J = 7.1 Hz), 3.82 (2H, d, J = 5.7 Hz), 1.37 (3H, t, J = 7.1 Hz).

10 4-[2-(6-(4-(4-甲基苯基)-(2H)-1-苯并噻喃基))乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 49)

于 -78 °C 下，将 88.4 mg (1.38 mmol, 0.81 ml 的 1.7 M 戊烷溶液) 的叔丁基锂加入 120.8 mg (0.70 mmol) 的 4-溴甲苯在 2.0 ml THF 的溶液中。30 分钟后，加入 131.6 mg (0.97 mmol) 的氯化锌在 2.0 ml THF 中的溶液，使形成的淡黄色溶液温热到室温。搅拌 40 分钟，然后将该溶液加入含有 129.2 mg (0.28 mmol) 的 4-[2-(6-(4-(三氟甲基磺酰基)氧基-(2H)-1-苯并噻喃基))乙炔基]苯甲酸乙酯、14.0 mg (0.012 mmol) 的四(三苯基磷)钼(0)和 2.0 ml THF 的第二个烧瓶中。将所形成的溶液于 50 °C 下加热 5 小时，冷却到室温，通过加入饱和的氯化铵溶液抑制该反应。用乙酸乙酯提取该混合物，用水和饱和的氯化钠水溶液洗涤合并的有机层，然后干燥(硫酸镁)并浓缩成为橙色油状物。经柱层析(3-5% 乙酸乙酯-己烷)分离无色固体状的目的化合物:

¹H NMR (d₆-丙酮): δ 7.98 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.58 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.44-7.38 (2H, m), 7.26-7.15 (5H, m), 6.14 (1H, t, J = 5.8 Hz), 4.34 (2H, q, J = 7.1 Hz), 3.53 (2H, d, J = 5.8 Hz), 2.37 (2H, s), 1.35 (3H, t, J = 7.1 Hz).

25 4-[2-(6-(4-(4-甲基苯基)-(2H)-1-苯并噻喃基))乙炔基]苯甲酸(化合物 50)

将 160.0 mg (4.00 mmol, 2.0 ml 2M 的水溶液)加入 29.0 mg (0.07

mmol)的 4-[2-(6-(4-(4-甲基苯基)-(2H)-1-苯并噻喃基))乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 49)在 2.0 ml THF 和 2.0 ml 乙醇的溶液中。将所形成的溶液在 35 °C 下搅拌 2 小时, 然后冷却到室温并再搅拌 2 小时。通过加入 10% 盐酸水溶液抑制该反应并用乙酸乙酯提取。用水和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层, 经硫酸钠干燥。减压除去溶剂, 提供固体, 用乙腈洗涤, 高真空干燥产生淡黄色固体状的目的化合物:

¹H NMR (d₆-DMSO): δ 7.90 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.40 (4H, m), 7.25-7.13 (4H, m), 7.02 (1H, d, J = 1.7 Hz), 6.11 (1H, t, J = 5.7 Hz), 3.54 (2H, d, J = 5.7 Hz), 2.34 (3H, s).

3,4-二氢-4,4-二甲基-7-乙酰基-1(2H)-萘酮(化合物 R); 3,4-二氢-4,4-二甲基-6-乙酰基-1(2H)-萘酮(化合物 S)

用 20 分钟将在二氯甲烷(20 ml)中的乙酰氯(15 g, 192 mmol)和 1,2,3,4-四氢-1,1-二甲基萘(24.4 g, 152 mmol)加入三氯化铝(26.3 g, 199.0 mmol)在二氯甲烷(55 ml)中的冷却(0 °C)混合物中。将该反应混合物温热到室温并搅拌 4 小时。将冰(200 g)加入所述反应烧瓶中, 用醚(400 ml)稀释该混合物。使其分层, 用硫酸镁干燥以前, 用 10% 盐酸(50 ml)、水(50 ml)、10% 碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液(50 ml)洗涤有机相。蒸馏除去溶剂提供溶于苯(50 ml)中的黄色油状物。

在氩气下, 用 20 分钟分小批量将三氧化铬(50 g, 503 mmol)加入乙酸(240 ml)和乙酸酐(120 ml)的冷(0 °C)溶液中。于 0 °C 下搅拌该混合物 30 分钟, 用苯(120 ml)稀释。在搅拌下, 用 20 分钟, 通过加料漏斗加入以上制备的苯溶液。8 小时后, 通过于 0 °C 下仔细加入异丙醇(50 ml), 然后水(100 ml)抑制该反应。15 分钟后, 用醚(1100 ml)和水(200 ml)稀释该反应混合物, 然后用固体碳酸氢钠(200 g)中和。用水(100 ml)和饱和氯化钠水溶液(2 x 100 ml)洗涤该醚层, 经硫酸镁干燥。减压除去溶剂提供异构体二酮的混合物, 经层析(5% 乙酸乙酯/己烷)可将其分离。(化合物 R):

1H NMR

(CDCl₃): δ 8.55 (1H, d, J = 2.0 Hz), 8.13 (1H, dd, J = 2.0, 8.3 Hz), 7.53 (1H, d, J = 8.3 Hz), 2.77 (2H, t, J = 6.6 Hz), 2.62 (3H, s), 2.05 (2H, t, J = 6.6 Hz), 1.41 (6H, s). (化合物 S): 1H NMR (CDCl₃): δ 8.10 (1H, d, J = 8.1 Hz), 8.02 (1H, d, J = 1.6 Hz), 7.82 (1H, dd, J = 1.6, 8.1 Hz), 2.77 (2H, t, J = 7.1 Hz), 2.64 (3H, s), 2.05 (2H, t, J = 7.1 Hz), 1.44 (6H, s).

5

3,4-二氢-4,4-二甲基-7-(2-(2-甲基-1,3-二氧戊环基))-1(2H)-萘酮(化合物 T)

10

使用 Dean-Stark 仪将 3,4-二氢-4,4-二甲基-7-乙酰基-1(2H)-萘酮 (化合物 R)(140.0 mg, 0.60 mmol)、乙二醇(55.0 mg, 0.90 mmol)、对-甲苯磺酸一水合物(4 mg)和苯(25 ml)混合物回流 12 小时。通过加入 10%碳酸氢钠水溶液抑制该反应, 用醚(2 x 75 ml)提取。用水(5 ml)和饱和氯化钠水溶液(5 ml)洗涤合并的有机层, 经硫酸镁干燥。减压除去溶剂提供油状目的化合物:

15

1H NMR (CDCl₃): δ 8.13 (1H, d, J = 2.0 Hz), 7.64 (1H, dd, J = 2.0, 8.2 Hz), 7.40 (1H, d, J = 8.2 Hz), 3.97- 4.10 (2H, m), 3.70-3.83 (2H, m), 2.73 (2H, t, J = 6.5 Hz), 2.01 (2H, t, J = 6.5 Hz), 1.64 (3H, s), 1.39 (6H, s).

20

1,2,3,4-四氢-1-羟基-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-7-(2-(2-甲基-1,3-二氧戊环基))萘(化合物 U)

25

将 3,4-二氢-4,4-二甲基-7-(2-(2-甲基-1,3-二氧戊环基))-1(2H)-萘酮 (化合物 T)(135.0 mg, 0.52 mmol)在 5 ml THF 中的溶液加入 195.4 mg (1.00 mmol)的对-甲苯甲酰溴化镁(1.0 ml, 1 M 醚溶液)在 2 ml THF 的溶液中。使该溶液回流 16 小时, 冷却到室温, 并用醚(50 ml)稀释。用水(5 ml)和饱和氯化铵水溶液(5 ml)洗涤该溶液, 经硫酸镁干燥。减压除去溶剂, 柱层析(5%乙酸乙酯/己烷)提供固体状目的化合物: 1H NMR

(CDCl₃): δ 7.37 (2H, d), 7.21 (1H, s), 7.13 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.08 (2H, d, J = 8.5 Hz), 3.88-3.99 (2H, m), 3.58-3.75 (2H, m), 2.34 (3H, s), 2.12-2.30 (2H, m), 1.79-1.90 (1H, m), 1.57 (3H, s), 1.48-1.58 (1H, m), 1.38 (3H, s), 1.31 (3H, s).

5 3,4-二氢-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-7-乙酰基萘(化合物 V)

将 130.0 mg (0.38 mmol) 的 1,2,3,4-四氢-1-羟基-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-7-(2-(2-甲基-1,3-二氧戊环基))萘(化合物 U)、对-甲苯磺酸一水合物(4 mg)和苯(5 ml)的混合物回流 16 小时。在冷却到室温后,用醚(100 ml)稀释该反应混合物并用 10% 碳酸氢钠水溶液、水和饱和氯化钠溶液洗涤。经硫酸镁干燥其有机层,减压除去溶剂产生固体状的目的化合物:

10

1H NMR (CDCl₃): δ 7.83 (1H, dd, J = 1.8, 8.0 Hz), 7.66 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.45 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.25 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.22 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.03 (1H, t, J = 6.3 Hz), 2.47 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.37 (2H, d, J = 6.3 Hz), 1.36 (6H, s).

15

(E)-3-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)-2-丁烯腈(化合物 W)

将氰基甲基磷酸二乙酯(450.0 mg, 2.50 mmol)加入氢化钠(48.0 mg, 2.00 mmol)在 THF (6 ml)的淤浆中。40 分钟后,加入 95.0 mg (0.33 mmol)的 3,4-二氢-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-7-乙酰基萘(化合物 V)在 THF (4 ml)的溶液中。将该混合物搅拌 16 小时,用醚(100 ml)稀释,在经硫酸镁干燥前用水和饱和氯化钠水溶液洗涤。减压除去溶剂,柱层析(3% 乙酸乙酯:己烷)纯化提供固体目的化合物:

20

1H NMR (CDCl₃): δ 7.39 (1H, d, J = 1H), 7.32 (1H, dd, J = 2.0, 8.1 Hz), 7.20-7.25 (4H, brs), 7.15 (1H, d, J = 2.0 Hz), 6.03 (1H, t, J = 6.0 Hz), 5.44 (1H, s), 2.42 (3H, s), 2.36 (2H, d, J = 6.0 Hz), 2.35 (3H, s), 1.35 (6H, s).

25

(E)-3-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)-2-丁烯醛(化合物 X)

5 将 0.50 ml (0.50 mmol) 的氯化二异丁基铝(1 M 的二氯甲烷溶液) 加入 84.0 mg (0.29 mmol) 的 (E)-3-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)-2-丁烯腈(化合物 W) 在二氯甲烷(4 ml) 的冷的(-78 °C) 溶液中。搅拌 1 小时后, 通过加入用醚(100 ml) 稀释的 2-丙醇(1 ml) 于-78 °C 抑制反应。温热到室温后, 用水、10% 盐酸和饱和氯化钠水溶液洗涤该溶液。经硫酸镁干燥其有机层, 减压除去溶剂产生油状的目的化合物: ¹H NMR (CDCl₃): δ 10.12 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.43 (2H, s), 7.19-7.28 (5H, m), 6.27 (1H, d, J = 7.9 Hz), 6.03 (1H, t, J = 4.8 Hz), 2.47 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.37 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.37 (6H, s).

10

(E,E,E)-3-甲基-7-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)-2,4,6-辛三烯酸乙酯(化合物 51)

15 将在己烷中的 26.0 mg (0.41 mmol, 0.65 ml) 正丁基锂(1.6 M 溶液) 加入 264.0 mg (1.00 mmol) 的(E)-3-乙氧基羰基-2-甲基烯丙基磷酸二乙酯[根据 J. Org. Chem. 39:821 (1974) 制备] 在 THF (2 ml) 的冷却(-78 °C) 溶液中, 然后立即加入在 THF (3 ml) 中的 82.0 mg (0.26 mmol) 的(E)-3-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)-2-丁烯醛(化合物 X)。1 小时后, 用醚(60 ml) 稀释该反应混合物, 用水(5 ml)、饱和氯化钠水溶液(5 ml) 洗涤并经硫酸镁干燥。减压除去溶剂后, 经柱层析纯化(5% 乙酸乙酯/己烷, 然后经 HPLC 使用 1% 乙酸乙酯/己烷) 分离油状的目的化合物:

20 ¹H NMR (丙酮-d₆): δ 7.36-7.43 (2H, m), 7.18-7.27 (4H, m), 7.17 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.08 (1H, dd, J = 11.2, 15.2 Hz), 6.46 (1H, d, J = 11.2 Hz), 6.38 (1H, d, J = 15.2 Hz), 5.98 (1H, t, J = 4.7 Hz), 5.78 (1H, s), 4.10 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.35 (3H, s), 2.33 (3H, s), 2.32 (2H, d, J = 4.7 Hz), 2.12 (3H, s), 1.31 (6H, s), 1.22 (3H, t, J = 7.1 Hz).

25

(E,E,E)-3-甲基-7-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)-2,4,6-辛

三烯酸(化合物 52)

将 12.0 mg (0.50 mmol) 的 LiOH (0.5 ml, 1M 溶液) 加入在 THF (1 ml) 和甲醇 (1 ml) 中的 85.0 mg (0.20 mmol) 的 (E,E,E)-3-甲基-7-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)-2,4,6-辛三烯酸乙酯(化合物 51) 的溶液中。将该混合物搅拌 6 小时, 用醚(60 ml) 稀释, 用 10% 盐酸(1 ml) 酸化。在经硫酸镁干燥以前, 用水和饱和氯化钠水溶液洗涤该溶液。减压除去溶剂提供固体状的目的化合物, 使其经丙酮重结晶纯化:

¹H NMR (丙酮-d₆)

: δ 7.35-7.45 (2H, m), 7.19-7.28 (4H, m), 7.17 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.09 (1H, dd, J = 11.5, 15.1 Hz), 6.48 (1H, d, J = 11.5 Hz), 6.42 (1H, d, J = 15.1 Hz), 5.99 (1H, t, J = 4.7 Hz), 5.82 (1H, s), 2.36 (3H, s), 2.33 (2H, d, J = 4.7 Hz), 2.32 (3H, s), 2.13 (3H, s), 1.32 (6H, s).

3,4-二氢-4,4-二甲基-7-硝基-1(2H)-萘酮(化合物 Y)

将 783.0 mg (4.49 mmol) 3,4-二氢-4,4-二甲基-1(2H)-萘酮缓慢加入在 -5 °C (冰氯化钠浴) 中的 1.7 ml (3.0 g, 30.6 mmol, 18 M) 的硫酸中。缓慢加入 426.7 mg (6.88 mmol, 0.43 ml, 16 M) 的硝酸和 1.31 g (0.013 mol, 0.74 ml, 18 M) 硫酸的溶液。20 分钟后, 加入冰, 用乙酸乙酯提取所形成的混合物。减压浓缩合并的提取物, 产生残留物, 从中经柱层析(10% 乙酸乙酯: 己烷) 分离淡黄色固体状的目的化合物:

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.83 (1H, d, J = 2.6 Hz), 8.31

(1H, dd, J = 2.8, 8.9 Hz), 7.62 (1H, d, J = 8.7 Hz), 2.81 (2H, t, J = 6.5 Hz), 2.08 (2H, t, J = 6.5 Hz), 1.45 (6H, s).

3,4-二氢-4,4-二甲基-7-氨基-1(2H)-萘酮(化合物 Z)

在 1 个大气压氢气下, 使用催化量的 10% 钯炭, 于室温下搅拌 230.0 mg (1.05 mmol) 3,4-二氢-4,4-二甲基-7-硝基-1(2H)-萘酮(化合物 Y) 在 5.0 ml 乙酸乙酯中的溶液达 24 小时。经硅藻土垫过滤除去所述催化剂, 减压浓缩其滤液产生暗绿色油状的目的化合物:

1H NMR

(CDCl₃): δ 7.30 (1H, d, J = 2.7 Hz), 7.22 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.88 (1H, dd, J = 2.7, 8.5 Hz), 2.70 (2H, t, J = 6.6 Hz), 1.97 (2H, t, J = 6.6 Hz), 1.34 (6H, s).

5 4-[(5,6,7,8-四氢-5,5-二甲基-8-氧代-2-萘基)偶氮]苯甲酸乙酯(化合物 AA)

将 180.0 mg (1.00 mmol) 的 4-亚硝基苯甲酸乙酯加入 198.7 mg (1.05 mmol) 的 3,4-二氢-4,4-二甲基-7-氨基-1(2H)-萘酮(化合物 Z) 在 5.0 ml 冰乙酸的溶液中。于室温下, 将所形成的溶液搅拌过夜, 然后减压浓缩。经柱层析(15%乙酸乙酯:己烷)自其残留油状物中分离出红色固

10 体状的产物: 1H NMR (CDCl₃): δ 8.57 (1H, d, J = 2.0 Hz), 8.19 (2H, d, J = 8.4 Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.94 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.58 (1H, d, J = 8.6 Hz), 4.41 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.79 (2H, t, J = 6.6 Hz), 2.07 (2H, t, J = 7.02 Hz), 1.44 (6H, s), 1.42 (3H, t, J = 7.1 Hz).

15 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)偶氮]-苯甲酸乙酯(化合物 BB)

将在 2 ml THF 中的 153.0 mg (0.437 mmol) 的 4-[(5,6,7,8-四氢-5,5-二甲基-8-氧代-2-萘基)偶氮]苯甲酸乙酯(化合物 AA) 于 -78 °C 加入 90.4 mg 双(三甲基甲硅烷基)氯化钠(0.48 mmol, 0.48 ml 的 1.0 M THF 溶液)

20 在 2.0 ml THF 的溶液中。于 -78 °C 搅拌所述暗红色的溶液 30 分钟, 然后加入 204.0 mg (0.520 mmol) 的 2-[N,N-双(三氟甲基磺酰基)氨基]-5-氟吡啶在 2.0 ml THF 中的溶液。使所述反应混合物温热到室温, 3 小时后, 通过加入水抑制该反应。减压将其有机层浓缩为红色油状物, 经柱层析(25%乙酸乙酯:己烷)分离出红色油状的产物:

25 1H NMR (CDCl₃): δ 8.21 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.96 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.94 (2H, m), 7.49 (1H, d, J = 8.2 Hz), 6.08 (1H, t, J = 2.5 Hz), 4.42 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.49 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.44 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.38 (6H, s).

011014

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)偶氮]苯甲酸乙酯(化合物 46a)

通过加入 62.9 mg (0.58 ml, 0.98 mmol)的叔丁基锂(1.7 M 的戊烷溶液)到 84.0 mg (0.491 mmol)的 4-溴甲苯在 1.0 ml THF 的冷溶液(-78 °C)中制备 4-甲苯锂溶液。搅拌 30 分钟后, 加入 107.0 mg (0.785 mmol)的氯化锌在 2.0 ml THF 中的溶液。将所形成的溶液温热到室温, 搅拌 30 分钟, 通过套管加到 94.7 mg (0.196 mmol)的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)偶氮]-苯甲酸乙酯(化合物 BB)和 25 mg (0.02 mmol)的四(三苯基磷)钼(0)在 2.0 ml THF 的溶液中。于 50 °C 下, 将所形成的溶液加热 1.5 小时, 冷却到室温, 用饱和氯化铵水溶液稀释。用乙酸乙酯(40 ml)提取该混合物, 并用水和盐水洗涤合并的有机层。将该有机相用硫酸钠干燥, 真空浓缩, 经柱层析(25%乙酸乙酯:己烷)分离红色固体状的目的化合物: ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.21 (2H, d, J = 8.6 Hz),

7.96 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.94 (2H, m), 7.49 (1H, d, J = 8.2 Hz), 6.08 (1H, t, J = 2.5 Hz), 4.42 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.49 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.44 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.38 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)偶氮]苯甲酸(化合物 46b)

将 80.0 mg (2.00 mmol)氢氧化钠(2.0 ml, 1M 水溶液)加入 16.5 mg (0.042 mmol)的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)偶氮]苯甲酸乙酯(化合物 46a)在 THF (2 ml)和乙醇(1 ml)的溶液中。于室温下, 将所述混合物搅拌 12 小时, 用 10% 盐酸酸化并用乙酸乙酯提取。用水和饱和氯化钠水溶液洗涤合并的有机层, 然后经硫酸镁干燥。减压除去溶剂后, 经乙酸乙酯/己烷重结晶其残留物, 提供红色固体状的目的化合物:

¹H NMR

(丙酮-d₆): δ 8.19 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.92 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.88 (2H, dd, J = 2.1, 6.1 Hz), 7.66 (1H, s), 7.64 (2H, d, J = 2.3 Hz), 7.28 (4H, d, J = 3.0 Hz), 6.09 (1H, t, J = 2.5 Hz), 2.42 (2H, d, J = 4.8 Hz), 2.39 (3H, s), 1.40 (6H, s).

5 6-(2-三甲基甲硅烷基)乙炔基-2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-茛-1-酮(化合物 CC)

10 将 259.6 mg (1.363 mmol) 的碘化亚酮(I)、956.9 mg (1.363 mmol) 的氯化双(三苯基磷)钨(II)和 3.14 g (34.08 mmol) 的(三甲基甲硅烷基)乙炔加入 815.0 mg (3.41 mmol) 的 6-溴-2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-茛-1-酮(见 Smith et al. Org. Prep. Proced. Int. 1978 10 123-131) 在 100 ml 脱气三乙胺(通入氩气 20 分钟)的溶液中。于 70 °C 下加热该混合物 42 小时, 冷却到室温, 经硅胶滤垫过滤, 并用醚洗涤。在经硫酸镁干燥以前, 用水、1 M 盐酸、水, 最终用饱和氯化钠水溶液洗涤该滤液。减压浓缩该溶液, 然后经柱层析(硅胶, 10% 乙醚-己烷)纯化提供棕色油状的目的化合物:

15

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.79(1H, d, $J = 1.4$ Hz), 7.69 (1H, dd, $J = 1.6, 8.3$ Hz), 7.42 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 2.60 (2H, s), 1.41 (6H, s), 0.26 (9H, s).

6-乙炔基-2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-茛-1-酮(化合物 DD)

20 将 197.3 mg (1.43 mmol) 的碳酸钾一次性加入 875.0 mg (3.41 mmol) 的 6-(2-三甲基甲硅烷基)乙炔基-2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-茛-1-酮(化合物 CC) 在 28 ml 甲醇的溶液中。于室温下搅拌 6 小时后, 使所述混合物通过硅藻土滤垫并减压浓缩其滤液。将其残留油状物置于硅胶柱上并用 5% 乙酸乙酯-己烷洗脱产生无色油状的目的产物:

25 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.82 (1H, s), 7.72 (1H, dd, $J = 1.6, 7.8$ Hz), 7.47 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 3.11 (1H, s), 2.61 (2H, s), 1.43 (6H, s).

4-[2-(5,6-二氢-5,5-二甲基-7-氧代-2-茛基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物

EE)

在 280.0 mg (1.520 mmol) 的 6-乙炔基-2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-茛-1-酮(化合物 DD) 和 419.6 mg (1.520 mmol) 的 4-碘代苯甲酸乙酯在 5 ml 三乙胺的溶液中通入氩气 40 分钟。将 271.0 mg (1.033 mmol) 的三苯基磷、53.5 mg (0.281 mmol) 的碘化亚酮(I) 和 53.5 mg (0.076 mmol) 的氯化双(三苯基磷)钨(II) 加入该溶液中。将所形成的混合物在回流状态下加热 2.5 小时, 冷却到室温, 用乙醚稀释。经硅藻土滤垫过滤后, 用水、1 M 盐酸和饱和氯化钠水溶液洗涤滤液, 然后经硫酸镁干燥, 减压浓缩。经柱层析(15% 乙酸乙酯-己烷) 分离淡黄色固体状的目的化合物:

¹H NMR (300 MHz, d₆-丙酮):

δ 8.05 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.87 (1H, dd, J = 1.4, 8.1 Hz), 7.75 (2H, m), 7.70 (2H, d, J = 8.5 Hz), 4.36 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.60 (2H, s), 1.45 (6H, s), 1.37 (3H, t, J = 7.1 Hz).

4-[2-(1,1-二甲基-3-(三氟甲基-磺酰基)氨基-5-茛基)乙炔基]苯甲酸乙酯 (化合物 FF)

将 88.0 mg (0.48 mmol) 的双(三甲基甲硅烷基)氯化钠在 0.5 ml THF 中的溶液冷却到 -78 °C, 并加入 145.0 mg (0.436 mmol) 的 4-[2-(5,6-二氢-5,5-二甲基-7-氧代-2-茛基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 EE) 在 1.0 ml THF 中的溶液。30 分钟后, 加入 181.7 mg (0.480 mmol) 的 2-[N,N-双(三氟甲磺酰基)氨基]-5-氯吡啶在 1.0 ml THF 中的溶液。使所述反应物缓慢温热到室温, 在 5 小时后, 通过加入饱和的氯化铵水溶液抑制反应。用乙酸乙酯提取该混合物, 用 5% 氢氧化钠水溶液、水和饱和的氯化钠水溶液洗涤合并的有机层, 然后干燥(硫酸镁) 并减压浓缩。经柱层析(10% 乙醚-己烷) 分离无色固体状的产物:

¹H NMR (300 MHz, d₆-丙酮): δ 8.05 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.69 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.63 (2H, s), 7.55 (1H, s), 4.36 (2H, q, J = 7.1 Hz), 1.44 (6H, s), 1.37 (3H, t, J = 7.1 Hz).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 60)

于室温下搅拌 142.6 mg (0.339 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1) 和 35.6 mg (0.848 mmol) 的 LiOH-H₂O 在 12 ml THF/水(4:1, v/v) 中的溶液过夜。用己烷提取该反应混合物，并用 5% 的氢氧化钠水溶液提取己烷部分。合并水层并用 1 M 盐酸酸化，然后用乙酸乙酯和乙醚提取。经硫酸钠干燥合并的有机层，真空浓缩产生无色固体状的目的化合物：¹H NMR (d₆-DMSO): δ 7.91 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.60 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.47 (2H, s), 7.23 (4H, q, J = 8.1 Hz), 7.01 (1H, s), 6.01 (1H, t, J = 4.6 Hz), 2.35 (3H, s), 2.33 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.30 (6H, s).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-苯基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 60a)

使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-噻唑基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 30a) 相同的通用方法，使用 5.9 mg (0.14 mmol) 在水中的 LiOH 将 27.0 mg (0.07 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-苯基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1a) 转变成目的化合物(无色固体):

PMR (d₆-DMSO): δ 1.31 (6H, s), 2.35 (2H, d, J = 4.5 Hz), 6.05 (1H, t, J = J = J = 4.5 Hz), 7.00 (1H, s), 7.33 (2H, d, J = 6.2 Hz), 7.44 (4H, m), 7.59 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.90 (2H, d, J = 8.1 Hz).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-(1,1-二甲基乙基)苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 61)

于室温下搅拌 80.0 mg (0.173 mmol) 的 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-(1,1-二甲基乙基)苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 6) 和 18.1 mg (0.432 mmol) 的 LiOH-H₂O 在 6 ml THF/水(3:1, v/v) 中的溶液过夜。用己烷提取该反应混合物，并用 1 M 盐酸酸化剩余的水层，然后用乙酸乙酯提取。经硫酸钠干燥合并的有机层，真空浓缩产生无色固

体状的目的化合物: $^1\text{H NMR}$ (d_6 -DMSO): δ 7.82 (2H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.44 (6H, m), 7.25 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.02 (1H, s), 6.01 (1H, t, $J = 4.6$ Hz), 2.32 (2H, d, $J = 4.7$ Hz), 1.32 (9H, s), 1.29 (6H, s).

5

2-氟-4-[[[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)硫代羰基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 62)

将 54.4 mg (0.119 mmol) 的 2-氟-4-[[[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)羰基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 40)和 57.7 mg (0.143 mmol) 的 [2,4-双(4-甲氧基苯基)-1,3-二硫代-2,4-diphosphetane-2,4-二硫醚] (Lawesson's 试剂) 在 12.0 ml 苯中的溶液回流过夜。在冷却到室温后, 将所述混合物过滤并减压浓缩其滤液。经柱层析(10 - 25% 乙酸乙酯/己烷)分离黄色固体状的目的化合物:

10

15

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 9.08 (1H, s), 7.92 (1H, br s), 7.90 (1H, t, $J = 8.2$ Hz), 7.66 (1H, dd, $J = 2.0, 6.0$ Hz), 7.38 (3H, m), 7.18 (4H, m), 6.01 (1H, t, $J = 4.7$ Hz), 4.35 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 2.36 (3H, s), 2.33 (2H, d, $J = 4.7$ Hz), 1.38 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.33 (6H, s).

2-氟-4-[[[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)硫代羰基]氨基]苯甲酸(化合物 63)

将 55 mg 氢氧化钠(1.4 mmol)和 1.0 ml 水加入 46.5 mg (0.098 mmol) 的 2-氟-4-[[[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)硫代羰基]氨基]苯甲酸乙酯(化合物 62)在 1.0 ml 乙醇和 1.0 ml THF 的溶液中。于室温下搅拌过夜后, 加入乙酸乙酯, 通过加入 10% 的盐酸抑制该反应。用乙酸乙酯提取, 然后用水、饱和的氯化钠水溶液洗涤合并的有机层, 经硫酸镁干燥。减压除去溶剂提供固体, 使其经乙腈结晶提供淡黄色固体状的目的化合物:

20

25

1H NMR (d_6 -丙酮) δ 11.05 (1H, s), 8.02 (1H, m), 7.99 (1H, t, $J = 8.3$ Hz), 7.75 (1H, m), 7.69 (1H, dd, $J = 2.0, 6.1$ Hz), 7.52 (1H, s), 7.46 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.21 (4H, m), 6.04 (1H, t, $J = 4.8$ Hz), 2.37 (2H, d, $J = 4.8$ Hz), 2.33 (3H, s), 1.36 (6H, s).

5 5',6'-二氢-5',5'-二甲基-8'-(4-甲基苯基)-[2,2'-联萘]-6-甲酸乙酯(化合物 64)

于室温, 在氩气下将镁屑(0.044 g, 1.82 mmol)加入 3,4-二氢-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-7-溴代萘(化合物 D)(0.45 g, 1.40 mmol)和 THF (2.1 ml)的溶液中。加入两滴二溴乙烷, 将该溶液(缓慢变浑浊和黄色)于回流状态加热 1.5 小时。在第二个烧瓶中, 加入氯化锌(0.210 g, 1.54 mmol), 它的高真空下融化, 冷却到室温并溶于 THF (3 ml)中。将所述 Grignard 试剂加入第二个烧瓶中, 30 分钟后, 在室温下, 加入 0.293 g (1.05 mmol)的 6-溴-2-萘甲酸乙酯(化合物 N)和 THF (2 ml)的溶液。在第三个烧瓶中, 制备 $Ni(PPh_3)_4$ 和 THF 的溶液如下: 将 1 M 的氢化二异丁基铝溶液和己烷(2.5 ml, 2.5 mmol)加入 $NiCl_2(PPh_3)_2$ (0.82 g, 1.25 mmol)和 PPh_3 (0.66 g, 2.5 mmol)在 THF (3.5 ml)的溶液中, 用 THF 稀释所形成的溶液到总体积为 15 ml 并于室温下搅拌 15 分钟。以 15 分钟的间隔将三份 0.60 ml 等份的 $Ni(PPh_3)_4$ 溶液加入第二个烧瓶中。于室温下搅拌所形成的悬浮液 2 小时。通过加入 5 ml 1N 的盐酸水溶液抑制反应, 并在用乙酸乙酯提取其产物以前搅拌 1 小时。合并其有机层, 用盐水洗涤, 干燥(硫酸镁), 过滤并真空除去溶剂。其残留物经己烷结晶产生 130 mg 纯物质。减压浓缩其母液, 并经硅胶层析(95:5 己烷:乙酸乙酯)纯化其残留物产生另外 170 mg 无色固体状的目的化合物(总收率 = 300 mg, 64%):

25 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.57 (s, 1H), 8.05 (dd, 1H, $J = 1.7, 8.0$ Hz), 7.84-7.95 (重迭 d's, 3H), 7.66 (dd, 1H, $J = 1.7, 8.5$ Hz), 7.58 (dd, 1H, $J = 2.0, 8.0$ Hz), 7.48 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.43 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.32 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.21 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.04 (t, 1H, $J = 4.8$ Hz), 4.44 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 2.40 (s, 3H), 2.39 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz), 1.45 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 1.39 (s, 6H).

5',6'-二氢-5',5'-二甲基-8'-(4-甲基苯基)-[2,2'-联萘]-6-甲酸(化合物 65)

将5',6'-二氢-5',5'-二甲基-8'-(4-甲基苯基)-[2,2'-联萘]-6-甲酸乙酯(化合物 64)(0.19 g, 0.43 mmol)、乙醇(8 ml)和1 N氢氧化钠水溶液(2 ml)的溶液于60 °C加热3小时。将该溶液冷却到0 °C并用1N的盐酸水溶液酸化。用乙酸乙酯提取其产物，合并有机层，用水、盐水洗涤，干燥(硫酸镁)，过滤并真空除去溶剂。将其残留物于0 °C经THF/乙酸乙酯重结晶产生35 mg的纯物质。减压浓缩其母液，使其残留物经硅胶层析纯化(100%乙酸乙酯)产生另外125 mg无色固体状的目的化合物(总收率 = 160mg, 90%):

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8.57 (s, 1H), 8.11 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 7.96-7.82 (多重, d's, 3H), 7.65 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.50 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.28 (s, 1H), 7.26 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 7.21 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 6.01 (t, 1H, J = 4.5 Hz), 3.34 (br s, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.31 (d, 2H, J = 4.5 Hz), 1.31 (s, 6H).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-咪喃基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 66)

使用与制备4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲基苯基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 1)相同的通用方法, 使用142.4 mg (1.045 mmol)氯化锌、24.1 mg (0.02 mmol)四(三苯基磷)钨(0)和2-咪喃基锂[通过加入53.4 mg (0.52 ml, 0.78 mmol)的正丁基锂(在己烷中的1.5 M溶液)到53.4 mg(0.784 mmol)的咪喃在1.0 ml THF中的冷溶液(-78 °C)中制备]将250.0 mg (0.52 mmol)的4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(三氟甲基磺酰基)氧基-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 G)转变成目的化合物(无色固体):

PMR (CDCl₃): δ 1.32 (6H, s), 1.41 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.35 (2H, d, J = 5.0 Hz), 4.39 (2H, q, J = 7.1 Hz), 6.41 (1H, t, J = 5.0 Hz), 6.50 (2H, s), 7.36 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.45 (1H, dd, J = 1.7, 8.0 Hz), 7.49 (1H, s), 7.57 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.63 (1H, d, J = 1.7 Hz), 8.02 (2H, d, J = 8.2 Hz).

4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-咪喃基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 67)

5 使用与制备 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-咪喃基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸(化合物 30a)相同的通用方法, 使用 16.0 mg (0.38 mmol)在水中的 LiOH 将 4-[(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-咪喃基)-2-萘基)乙炔基]苯甲酸乙酯(化合物 66)转变成目的化合物(无色固体):

10 PMR (d_6 -DMSO): δ 1.26 (6H, s), 2.33 (2H, d, J = 4.9 Hz), 6.41 (1H, t, J = 4.9 Hz), 6.60 (2H, m), 7.45-7.53 (3H, m), 7.64 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.75 (1H, d, J = 1.6 Hz), 7.93 (2H, d, J = 8.3 Hz).

3,4-二氢-4,4-二甲基-7-乙酰基-1(2H)-萘酮(化合物 100C)和 3,4-二氢-4,4-二甲基-6-乙酰基-1(2H)-萘酮(化合物 100D)

15 用 20 分钟, 将在二氯甲烷(20 ml)中的乙酰氯(15 g, 192 mmol)和 1,2,3,4-四氢-1,1-二甲基萘(24.4 g, 152 mmol)加入三氯化铝(26.3 g, 199.0 mmol)在二氯甲烷(55 ml)中的冷的(0 °C)混合物中。将该反应混合物温热到室温并搅拌 4 小时。将冰(200 g)加入所述反应烧瓶中, 并用醚(400 ml)稀释该混合物。分离水层和有机层, 用 10% 盐酸(50 ml)、
20 水(50 ml)、10% 碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液(50 ml)洗涤该有机相, 然后干燥(硫酸镁)。蒸馏除去溶剂提供溶于苯(50 ml)中的黄色油状物。

25 在氩气下, 用 20 分钟分小批量将三氧化铬(50 g, 503 mmol)加入乙酸(240 ml)和乙酸酐(120 ml)的冷溶液(0 °C)中。于 0 °C 下, 搅拌该混合物 30 分钟并用苯(120 ml)稀释。搅拌下, 用 20 分钟, 通过加料漏斗加入以上制备的苯溶液。8 小时后, 通过于 0 °C 小心加入异丙醇(50 ml)然后加入水(100 ml)抑制反应。15 分钟后, 用醚(1100 ml)和水(200 ml)稀释该反应混合物, 然后用固体碳酸氢钠(200 g)中和。用水(100 ml),

然后用饱和氯化钠水溶液(2 x 100 ml)洗涤其醚层并经硫酸镁干燥。减压除去溶剂, 提供异构体二酮的混合物, 它们可以经层析(5%乙酸乙酯/己烷)分离。(化合物 100 C):

1H NMR (CDCl₃): δ 8.55 (1H, d, J = 2.0 Hz), 8.13 (1H, dd, J = 2.0, 8.3 Hz), 7.53 (1H, d, J = 8.3 Hz), 2.77 (2H, t, J = 6.6 Hz), 2.62 (3H, s), 2.05 (2H, t, J = 6.6 Hz), 1.41 (6H, s). (化合物 100D): 1H NMR (CDCl₃): δ 8.10 (1H, d, J = 8.1 Hz), 8.02 (1H, d, J = 1.6 Hz), 7.82 (1H, dd, J = 1.6, 8.1 Hz), 2.77 (2H, t, J = 7.1 Hz), 2.64 (3H, s), 2.05 (2H, t, J = 7.1 Hz), 1.44 (6H, s).

3,4-二氢-4,4-二甲基-6-(2-(2-甲基-1,3-二氧戊环基))-1(2H)-萘酮(化合物 100E)

将 1.80 g (8.34 mmol) 3,4-二氢-4,4-二甲基-7-乙酰基-1(2H)-萘酮(化合物 100C)和 3,4-二氢-4,4-二甲基-6-乙酰基-1(2H)-萘酮(化合物 100D)的 1:5 混合物在 50 ml 苯中的溶液与 517.7 mg (8.34 mmol) 的乙二醇和 20.0 mg (0.11 mmol) 的对-甲苯磺酸一水合物混合。将所形成的溶液在回流状态下加热 18 小时, 冷却到室温, 并减压浓缩。通过柱层析(10%乙酸乙酯-己烷)分离无色油状的目的化合物。

1H NMR (CDCl₃): δ 8.01 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.51 (1H, s), 7.43 (1H, dd, J = 1.7, 6.4 Hz), 4.07 (2H, m), 3.79 (2H, m), 2.74 (2H, t, J = 6.5 Hz), 2.04 (2H, t, J = 7.1 Hz), 1.67 (3H, s), 1.46 (6H, s).

1,2,3,4-四氢-1-羟基-1-(4-甲基苄基)-4,4-二甲基-6-(2-(2-甲基-1,3-二氧戊环基))萘(化合物 100F)

将 3,4-二氢-4,4-二甲基-6-(2-(2-甲基-1,3-二氧戊环基))-1(2H)-萘酮(化合物 100E, 200.0 mg, 0.769 mmol)在 THF (5 ml)中的溶液加入 496.2 mg (2.54 mmol)对-甲苯基溴化镁在 20 ml THF 中的溶液(2.54 ml, 1 M 醚溶液)中。将该溶液回流 16 小时, 冷却到室温, 用水、饱和氯化铵水溶液洗涤, 并经硫酸镁干燥。减压除去溶剂, 经柱层析纯化(10%乙酸乙酯/己烷)提供无色固体状的目的化合物:

1H NMR (CDCl₃): δ 7.49 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.19 (2H, m), 7.10 (2H, d, J = 7.9 Hz), 7.04 (1H, d, J = 8.2 Hz), 4.05 (2H, m), 3.80 (2H, m), 2.34 (3H, s), 2.21 (1H, m), 2.10 (1H, m), 1.88 (1H, m), 1.65 (3H, s), 1.54 (1H, m), 1.39 (3H, s), 1.33 (3H, s).

5 3,4-二氢-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-6-乙酰基萘(化合物 100 G)

将 1,2,3,4-四氢-1-羟基-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-6-(2-(2-甲基-1,3-二氧戊环基))萘(化合物 100F, 160.0 mg, 0.52 mmol)、对-甲苯磺酸一水合物(4 mg)和 30 ml 苯的溶液回流 12 小时。冷却到室温后, 将该反应混合物用醚(100 ml)稀释并用 10%碳酸氢钠水溶液、水和饱和氯化钠水溶液洗涤。经硫酸镁干燥有机层, 减压除去溶剂产生目的化合物, 将其经柱层析(10%乙酸乙酯-己烷)分离产生黄色油状的目的化合物:

10 1H NMR (CDCl₃): δ 7.97 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.67 (1H, dd, J = 1.7, 6.4 Hz), 7.22 (4H, s), 7.13 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.10 (1H, t, J = 4.5 Hz), 2.59 (3H, s), 2.40 (3H, s), 2.38 (2H, d, J = 4.7 Hz), 1.38 (6H, s).

15 4-[3-氧代-3-(7,8-二氢-5-(4-甲基苯基)-8,8-二甲基-2-萘基)-1-丙烯基]-苯甲酸(化合物 101)

将 53.1 mg (0.354 mmol) 4-羧基苯甲醛和 80 mg (2.00 mmol, 2.0 ml 1M 氢氧化钠水溶液)加入 78.7 mg (0.272 mmol)的 3,4-二氢-1-(4-甲基苯基)-4,4-二甲基-6-乙酰基萘(化合物 100 G)在 4.0 ml 甲醇的溶液中。将所形成的溶液于室温下搅拌 12 小时, 减压浓缩, 并将残留的油状物溶于乙酸乙酯中。用 10%盐酸处理该溶液, 用水和饱和氯化钠水溶液洗涤其有机层, 然后经硫酸钠干燥。减压除去溶剂产生无色固体状的目的化合物, 使其经乙腈重结晶纯化:

25 1H NMR (丙酮-d₆): δ 8.00 (7H, m), 7.83 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.24 (4H, s), 7.13 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.12 (1H, t, J = 4.5 Hz), 2.42 (2H, d, J = 4.8 Hz), 2.38 (3H, s), 1.41 (6H, s).

3,4-二氢-1-苯基-4,4-二甲基-6-乙酰基萘 (化合物 100H)

将 496.2 mg 的苯基溴化镁(2.54 mmol, 2.54 ml 1M 的乙醚溶液)加入 508.0 mg (1.95 mmol)的 3,4-二氢-4,4-二甲基-6-(2-(2-甲基-1,3-二氧戊环基))-1(2H)-萘酮(化合物 100E)在 10 ml THF 的溶液中。将所形成的溶液在回流状态下加热 8 小时, 加入水, 并继续加热 30 分钟。减压除去 THF 并用乙酸乙酯提取其含水的残留物。使合并的有机层经硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经柱层析(10%乙酸乙酯-己烷)自该残留物中分离无色油状的目的化合物:

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)}: \delta$ 7.97 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.67 (1H, dd, J = 2.1, 8.0 Hz), 7.34 (5H, m), 7.10 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.12 (1H, d, J = 4.6 Hz), 2.59 (3H, s), 2.39 (2H, d, J = 4.8 Hz), 1.38 (6H, s).

4-[3-氧代-3-(7,8-二氢-5-苯基-8,8-二甲基-2-萘基)-1-丙烯基]-苯甲酸(化合物 103)

将 120.0 mg 的氢氧化钠(3.00 mmol, 3.0 ml 1M 水溶液)加入 115.0 mg (0.42 mmol) 3,4-二氢-1-苯基-4,4-二甲基-6-乙酰基萘(化合物 100H)和 65.0 mg (0.43 mmol)的 4-甲酰基-苯甲酸在 5.0 ml 乙醇和 1.0 ml THF 的溶液中。于室温下搅拌所形成的黄色溶液 12 小时。用 6% 盐酸水溶液酸化该溶液并用乙酸乙酯提取。使合并的有机层经硫酸镁干燥, 减压浓缩, 经柱层析(50%乙酸乙酯-己烷)分离出淡黄色固体状的目的化合物:

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)}: \delta$ 8.13 (2H, d, J = 7.7 Hz), 8.04 (1H, s), 7.81 (1H, d, J = 15.5 Hz), 7.75 (3H, m), 7.60 (1H, d, J = 15.5 Hz), 7.35 (5H, m), 7.14 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.15 (1H, t, J = 4.2 Hz), 2.41 (2H, d, J = 4.2 Hz), 1.41 (6H, s).

增强核受体兴奋剂的方法概述和介绍

已经发现，显示负性激素活性的作为子集的视黄醛衍生物拮抗剂可用于增强其它视黄醛衍生物和甾体受体超家族激素的生物活性。所述的其它视黄醛衍生物和甾体受体超家族激素可以是内源性激素或药物制剂。从而，例如当与视黄醛衍生物负性激素一起使用时，在引起特异的生物作用方面，药用视黄醛衍生物兴奋剂的某些活性得到加强。这种联合给药的方法有利于最大限度地降低药用视黄醛衍生物的不需要的副作用，因为可以使用较低剂量的药用视黄醛衍生物以改善疗效。

更具体地说，已经发现 AGN 193109 (具有图 1 所示结构的合成视黄醛衍生物)显示独特的和未预料到的药理活性。AGN 193109 显示对于 RAR 亚型核受体的高亲和力而不激活这些受体或刺激视黄醛衍生物应答基因的转录。而 AGN 193109 抑制由视黄醛衍生物兴奋剂激活的 RARs，从而作为视黄醛衍生物拮抗剂发挥作用。

另外，已经发现可以使用视黄醛衍生物负性激素而不与视黄醛衍生物兴奋剂或甾体激素共同给药，以便控制某些疾病症状。更准确地说，在此所公开的视黄醛衍生物负性激素可以下行调节对于未与配体结合的 RARs 的应答基因的高水平基础转录。例如，如果未控制的细胞增生起因于作为对于未与配体结合的 RARs 应答的基因的活性，则通过给予使 RARs 灭活的视黄醛衍生物负性激素可以降低基因活性。结果，依赖于未与配体结合的 RARs 的活性的细胞增生可以被所述负性激素抑制。使用常规的拮抗剂不能达到抑制未与配体结合的 RARs 的作用。

重要的是，已经发现 AGN 193109 既可以抑制 RAR 的基础活性，有时又可以增强其它视黄醛衍生物和甾体受体超家族激素兴奋剂的活性。在本发明的上下文中，如果在所述负性激素的存在下，降低浓度的兴奋剂引起与单独使用所述兴奋剂所能得到基本上相同的定量应答，则认为负性激素例如 AGN 193109 增强激素兴奋剂。所述定量应答例如可以在体外报告基因测定法中测定。从而，如果与 AGN 193109

一起使用，当以特定剂量和浓度使用时，AGN 193109 可以增强引起所需应答的治疗性视黄醛衍生物，较低剂量或浓度的所述治疗性视黄醛衍生物可以用于产生与单独使用所述治疗性的视黄醛衍生物时较高剂量或浓度的所述治疗性视黄醛衍生物基本相同的效果。可以通过共同给予 AGN 193109 所增强的兴奋剂包括 RAR 兴奋剂、维生素 D 受体兴奋剂、糖皮质激素受体兴奋剂和甲状腺激素受体兴奋剂。更具体地说，可以通过共同给药所增强的特异性兴奋剂包括：ATRA、13-顺式视黄酸、合成的 RAR 兴奋剂 AGN 191183、1,25-二羟基维生素 D₃、地塞米松和甲状腺激素(3,3',5-三碘代甲状腺氨酸)。在此也公开可以用于鉴定可以通过与 AGN 193109 共同给药所增强的其它激素的方法。

从而，从某种意义上并未期望 AGN 193109 作为简单的视黄醛衍生物拮抗剂，而是作为可以增强核受体家族不同成员活性的负性激素。我们也公开了可以解释负性激素活性和 AGN 193109 增强其它核受体配体活性能力的可能的机理。该机理结合了已知参与视黄醛衍生物依赖性信息传递通道的元件(elements)和另外结合了新的负性调节组分。

本领域内的普通技术人员可以理解作为 AGN 193109 结合的高亲和力和靶的 RARs 为调节各种视黄醛衍生物应答基因的表达的转录因子。已经鉴定了作为 RARs 的顺式-调控 DNA 的结合位点为以视黄醛衍生物依赖性方式被转录调节的邻近基因。已经详细定义了称为视黄酸应答元件(RAREs)的结合所述 DNA 位点的 RAR。重要的是所述 RAREs 与由一个 RAR 和一个 RXR 组成的异质二聚体结合。所述异质二聚体的 RXR 组分的功能为促进 RAR/RXR 异质二聚体和 RARE 之间高亲合力的相互作用(Mangelsdorf et al. The Retinoid Receptors in The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine, 2nd edition, eds. Sporn et al., Raven Press, Ltd., New York 1994)。

如以下所详细介绍的内容，涉及 AGN 193109 负性激素活性的发现与涉及假定的负性共激活因子蛋白(NCP)与 RAR 的相互作用的机理

一致。根据该提出的机理，这种相互作用被 AGN 193109 所稳定化。

我们的结果进一步显示 AGN 193109 可以调节作为与除了为 AGN 193109 所占据的 RARs 以外的核受体相互作用的 NCP 的细胞内的有效性。其次，AGN 193109 可以增强包括与所述 RARs 分享有结合 NCP 能力的核受体的转录调节转递通道。在这一点上，AGN 193109 显示调节不同的核受体转递通道的能力和调节对于常规视黄醛衍生物拮抗剂而言所不能期待的活性的能力。因此，AGN 193109 用作增强核受体配体活性的药剂，包括内源性激素和处方药。该特异性的实例说明更加普遍的原理，即任何核受体负性激素将增强竞争性结合 NCP 的其它核受体的活性。

尽管其它与在此所述类似或等同的物质和方法可以用于本发明的实施和验证，现介绍优选的方法和物质。可以用于完成在此所述不同的核酸处理和过程的方法的一般参考可见 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al. eds. Cold Spring Harbor Lab Publ. 1989)和 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. eds., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 1987)。以下为导致本发明形成的实验和结果的介绍。

实施例 6 介绍用于证明 AGN 193109 具有高的亲合力与三种 RARs 中的每一种结合而不激活视黄醛衍生物依赖性基因表达的方法。

实施例 6

AGN 193109 具有高的亲合力与 RARs 结合而不反式激活视黄醛衍生物依赖性基因表达

使用基本根据 Allegretto 等人[J. Biol. Chem. 268:26625 (1993)]所述方法采用杆状病毒表达系统，将人类 RAR- α 、RAR- β 和 RAR- γ 受体分别表达为重组蛋白。分别使用所述重组受体蛋白以利用 Heyman 等人[Cell 68:397(1992)]所述 ^3H -ATRA 置换测定法测定 AGN 193109 结合的亲合力。根据 Cheng 等人[Biochemical Pharmacology 22:3099(1973)]所述方法测定离解常数(Kds)。

也检验 AGN 193109 在用 RAR 表达型载体和视黄醛衍生物应答报告基因构成物短暂共转染的 CV-1 细胞中反式激活 RARs 的能力。用 Δ MTV-TREp-Luc 报告质粒将受体表达型载体 pRShRAR- α [Giguere et al. Nature 330:624 (1987)]、 pRShRAR- β [Benbrook et al. Nature 333:669(1988)]和 pRShRAR- γ [Ishikawa et al. Mol. Endocrinol. 4:837(1990)]分别共转染。所述 Δ MTV-TREp-Luc 质粒与 Umesono 等人 [Nature 336:262(1988)]所述 Δ MTV-TREp-CAT 报告构成物基本相同,除了所述氯霉素乙酰基转移酶(CAT)报告基因被多核苷酸序列编码的萤火虫荧光素酶取代。使用 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al. eds. Cold Spring Harbor Lab Publ. 1989)中所述磷酸钙共沉淀方法完成绿猴 CV-1 细胞转染过程。以密度为 4×10^4 /孔,将 CV-1 细胞平面接种到 12 孔的多孔平面接种板上,并用含有 $0.7 \mu\text{g}$ 报告质粒和 $0.1 \mu\text{g}$ 根据标准实验方法的受体质粒的磷酸钙沉淀短暂转染。18 小时后,洗涤细胞以便转移该沉淀物并再加入含有 10%的活性炭提取的牛胚胎血清(Gemini Bio-Products)的 Dulbecco's 改进 Eagle's 培养基(DMEM) (Gibco)。单独用溶媒(乙醇)或 AGN 193109 ($10^{-9} - 10^{-6}$ M)处理细胞 18 小时。制备在 0.1 M KPO_4 (pH 7.8)、 1.0% TRION X-100、 1.0 mM DTT 、 2 mM EDTA 中的细胞溶解产物。按照 de Wet 等人[Mol. Cell. Biol. 7:725 (1987)]所述方法,使用萤火虫荧光素(Analytical Luminescence Laboratory)和 EG&G Berthold 96 孔平面接种板式发光计测定荧光素酶的活性。所报道的荧光素酶值用一式三份测定值的均值 \pm SEM 表示。

表 11 中的结果表明 AGN 193109 具有高的亲合力与 RAR- α 、 RAR- β 和 RAR- γ 的每一种结合而不激活视黄醛衍生物依赖性基因表达。更准确地说, AGN 193109 与具有的 K_d 值在 $2-3 \text{ nM}$ 范围内的三种受体中的每一种结合。尽管存在这种紧密的结合,当与由 ATRA 刺激的诱导相比, AGN 193109 不激活基因表达。因此, AGN 193109 的最大有效浓度的一半(EC_{50})不能测定。尽管未示于表中,也发现 AGN

具有不可测定的对于 RXRs 的亲合力。

表 11

AGN 193109 结合和 RARs 的反式激活

	RAR- α	RAR- β	RAR- γ
EC ₅₀ (nM)	无活性	无活性	无活性
Kd(nM)	2	2	3

5 实施例 7 介绍用于证明 AGN 193109 为 ATRA 依赖性基因表达的拮抗剂的方法。

实施例 7

对由 ATRA 引起的 RAR 反式激活的 AGN 193109 依赖性抑制
在通过 Sambrook 等人(Molecular Cloning: A Laboratory Manual

10 Cold Spring Harbor Lab Publ. 1989)的磷酸钙共沉淀方法共转染 CV-1 细胞中, 研究了 AGN 193109 拮抗 ATRA 介导的 RAR 激活的能力。用 Hollenberg 等人[Cell 55:899 (1988)]所述 Δ MTV-Luc 报告质粒将真核细胞表达型载体 pRShRAR- α [Giguere et al. Nature 330:624 (1987)], pRShRAR- β [Benbrook et al. Nature 333:669(1988)]和 pRShRAR- γ [Ishikawa et al. Mol. Endocrinol. 4:837(1990)]共转染。所述报告质粒引人注目地含有两个复制的 TRE-复发的应答元件。磷酸钙转染过程完全按照实施例 6 中所述进行。用单独溶媒(乙醇)、ATRA (10^{-9} - 10^{-6} M)、AGN 193109(10^{-9} - 10^{-6} M)或与 AGN 193109(10^{-9} - 10^{-6} M)混合的 10^{-8} M ATRA 处理细胞达 18 小时。也按照实施例 6 中所述进行细胞溶解产物
15 和荧光素酶活性的测定。
20

这些过程的结果表示于图 2A - 图 2F 中, 其中荧光素酶值用一式三份测定值的均值 \pm SEM 表示。更准确地说, 在示于图 2A、2C 和 2E 中的结果表明用 ATRA 刺激转染细胞导致荧光素酶活性上的剂量应答增加。这证实在所述实验系统中 ATRA 激活三种 RARs 中的每一种,

并提供作为测定拮抗剂活性的比较的基础。示于图 2B、2D 和 2F 中的绘图结果显示用 10 nM ATRA 共处理转染细胞和增加 AGN 193109 的浓度导致抑制荧光素酶的活性。尤其同样剂量的 AGN 193109 和 ATRA 相对单独使用 ATRA 产生对于所有三种 RAR 亚型大于 50% 的抑制。比较在不同浓度 AGN 193109 存在下的 ATRA 剂量应答显示 ATRA 受到 AGN 193109 的竞争性的抑制。显而易见，在图 2 中所示所有图形上的横轴代表视黄醛衍生物浓度的 log 值。这些结果证明 AGN 193109 是有效力的 RAR 拮抗剂。

其次，我们进行阐明以下 AGN 193109 拮抗剂活性机理的实验。本领域内的普通技术人员可以理解：核受体激活被认为涉及为配体结合所诱导的受体的构象变化。蛋白酶保护测试的结果确实已经证实核激素兴奋剂和拮抗剂使得受体蛋白采取不同的构象形式[Keidel et al. Mol. Cell. Biol. 14: 287 (1994); Allan et al. J. Biol. Chem. 267:19513 (1992)]。我们利用这种测试方法以便确定是否 AGN 193109 和 ATRA 使得 RAR- α 采取不同的构象。将 AGN 193583 (RAR- α 选择性拮抗剂) 作为阳性对照，已知它可作为蛋白酶敏感性的拮抗剂特异性模型。

实施例 8 介绍用于检测由 AGN 193109 的结合所产生的 RAR- α 构象变化一种方法。如下所示，该过程结果出人预料地显示 AGN 193109 导致胰蛋白酶敏感性模型，它与 ATRA(RAR 兴奋剂)诱导的模型基本相同，而不同于模式 RAR 拮抗剂诱导的模型。这一发现提示 AGN 193109 具有不同于其它视黄醛衍生物拮抗剂的性质。

实施例 8

蛋白酶保护分析

构成于载体 pGEM3Z (Pharmacia) 中并含有 RAR- α cDNA [Giguere et al. Nature 330: 624 (1987)] 的质粒与 TNT-偶联的网状细胞溶解产物体外转录-翻译系统(Promega) 结合使用以便制备 [35 S]-蛋氨酸标记 RAR- α 。所标记蛋白 RAR- α 的有限的蛋白水解消化根据 Keidel 等人 [Mol. Cell. Biol. 14:287(1994)] 所述的方法进行。将等份含有 [35 S]-蛋氨酸

酸标记 RAR- α 的网状细胞溶解产物用 ATRA、AGN 193583 或 AGN 193109 以总体积为 9 μ l，在冰冻下，孵育 45 分钟。对于所有实验而言，视黄醛衍生物的最终浓度对于 ATRA 和 AGN 193109 为 100 nM，对于 AGN 193583 为 1000 nM。在所述视黄醛衍生物最终浓度间的差异为基于 ATRA 和 AGN 193109 (在 RAR- α 上具有的 Kd 分别为 2 和 10 nM) 和 AGN 193583 (在 RAR- α 上具有的 Kd \geq 100 nM) 的相对亲和力上的差异的大约 10 倍。在配体结合后，将 1 μ l 适当浓度的胰蛋白酶加入该混合物中产生为 25、50 或 100 μ g/ml 的终浓度。于室温下孵化样品 10 分钟，并加入 SDS-样品缓冲液终止胰蛋白酶消化。根据标准方法，使样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影。

所述兴奋剂和拮抗剂均产生胰蛋白酶敏感性的不同模型，它们不同于未与配基结合受体的消化所得的结果。放射自显影的结果显示在不加入视黄醛衍生物的情况下，25、50 或 100 μ g/ml 浓度的胰蛋白酶于室温下，在 10 分钟内完全消化放射性标记的 RAR- α 。ATRA 的预先结合产生两种主要的耐蛋白酶种的表象。RAR- α 选择性拮抗剂 AGN 193583 的预先结合产生耐蛋白酶种，其分子量低于由 ATRA 预先结合所产生的种的分子量。该结果显示视黄醛衍生物兴奋剂和拮抗剂导致通过改变的胰蛋白酶敏感性可检测到的构象变化。令人感到吃惊的是，AGN 193109 预先结合产生蛋白酶保护模式，它与 ATRA 预先结合产生的模式很难区分。

以上结果证实 AGN 193109 与 RAR- α 结合并改变其构象。令人感兴趣的是，与拮抗剂(AGN 193583)结合产生的变化比较，这种构象变化的性质与兴奋剂(ATRA)结合产生的构象变化更为相似。显然，AGN 193109 依赖性拮抗作用机理是独特的。

我们考虑了能够解释 AGN 193109 拮抗剂活性的可能的机理。尤其，我们使用标准凝胶位移测定法以便检验是否 AGN 193109 干扰 RAR/RXR 异质二聚体的形成或抑制 RAR 和其同族 DNA 结合位点间的相互作用。

实施例 9 介绍用于证明 AGN 193109 既不抑制 RAR/RXR 二聚合作用又不抑制二聚体与靶向 DNA 结合的凝胶电泳移动性位移测定法。

实施例 9

5

凝胶位移分析

除了省去 ³⁵S 标记的蛋氨酸外，基本按照实施例 8 中所述产生体外翻译的 RAR- α 。使用含有 Mangelsdorf 等人[Nature 345:224-229 (1990)]所述 RXR- α cDNA 的基于 pBluescript(II)(SK)的载体作为产生体外转录本的模板类似地产生体外翻译的 RXR- α 。使所述标记的 RAR- α 和 RXR- α (单独或混合)或与 AGN 193109 (10^{-6} M)预先结合(单独或混合)与具有序列 5'-TCAGGTCACCAGGAGGTCAGA-3' (SEQ ID NO:1)的末端标记 DR-5 RARE 双链探针相互作用。按照标准的实验室方法，将所述结合混合物在非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳和放射自显影。出现在放射自显影谱上对于该凝胶上所有路径为常见的单独延迟种(species)代表在网状细胞溶解产物中存在的未定义的结合因子。只有 RAR/RXR 组合产生视黄醛衍生物受体特异性延迟种。单独的 RAR 或单独与所述探针结合的 RXR 均不产生这种位移种。AGN 193109 的存在不减少这种相互作用。

20 这些结果显示 AGN 193109 基本不改变 RAR- α 的同质或异质二聚性质。另外，AGN 193109 不抑制受体二聚体与含有关连结合位点的 DNA 片段的相互作用。

考虑到表现 AGN 193109 特征的独特的性质，我们继续研究是否该拮抗剂另外抑制未与配体结合的 RARs 的活性。用于进行该检测的受体/报告质粒体系有利地显示不加入视黄醛衍生物兴奋剂下高水平的组成活性。更准确地说，这些方法使用 ER-RAR 嵌合受体和 ERE-tk-Luc 报告系统。所述 ERE-tk-Luc 质粒包括连接 HSV 胸苷激酶启动子和荧光素报告基因的质粒 tk-Luc 上游的 Xenopus vitellogenin A2 基因 5'-旁侧区的雌激素应答的-397 至-87 区[如 Klein-Hitpass 等人所述，

Cell 46:1053-1061 (1986)]. 所述 ER-RAR 嵌合受体由融合所述 RARs 的“D-E-F”结构域的雌激素受体 DNA 结合结构域所组成。本领域内的普通技术人员可以理解该“D-E-F”结构域起着与视黄醛衍生物结合的功能，以便提供视黄醛衍生物诱导的反式激活功能及提供用于与 RXR 异质二聚作用的接触位点。从而，在该报告系统中荧光素酶的表达取决于所述转染嵌合受体构成物的激活作用。

实施例 10 介绍了用于证明 AGN 193109 抑制起因于未与配体结合的 RARs 的基础基因活性的方法。在不加入视黄醛衍生物兴奋剂情况下进行这些过程。以下表示的结果提供 AGN 193109 显示负性激素活性的首次证明。

实施例 10

对于视黄醛衍生物调节的报告质粒在短暂共转染细胞系中的基础基因活性的阻遏作用

用 ERE-tk-Luc 报告质粒和 ER-RAR- α 、ER-RAR- β 或 ER-RAR- γ 表达质粒使 CV-1 细胞共转染。所述 ERE-tk-Luc 质粒含有 *Xenopus laevis* vitellogenin A2 基因的雌激素应答启动子元件并与 Klein-Hitpass 等人所述[Cell 46:1053 (1986)]的报告质粒基本相同，除了该 CAT 报告基因被多核苷酸序列编码的荧光素酶取代。Graupner 等人[Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:1554 (1991)]已经介绍了用于所述共转染的 ER-RAR- α 、ER-RAR- β 或 ER-RAR- γ 嵌合受体编码的多核苷酸。使这些多核苷酸与 Ellis 等人[Cell 45:721 (1986)]所述的 pECE 表达载体连接并在 SV-40 启动子的转录控制下被表达。完全按照实施例 6 中所述的方法，使用 0.5 μg /孔的报告质粒及 0.05 μg 、0.10 μg 或 0.2 μg /孔的受体质粒进行磷酸钙转染过程。用单独溶媒(乙醇)、ATRA (10^{-9} - 10^{-6} M) 或 AGN 193109 (10^{-9} - 10^{-6} M)处理细胞达 18 小时。如实施例 6 中所述进行细胞溶解产物和荧光素酶活性的测定。

在图 3A、4A 和 5A 中所示的结果证实 ATRA 很强地诱导在所有转染子中荧光素酶的表达。作为这三种转染嵌合 RAR 异构体的荧光素

酶的基础水平表达范围在约 7000-40000 相对光单位(light units) (rlu)并在某种程度上取决于用在所述转染中的受体质粒的量。从而, 如所预期的一样, 这三种嵌合受体可为 ATRA 激活。更准确地说, 所有这三种受体与 ATRA 结合并激活暂居于 ERE-tk-Luc 质粒上的荧光素酶报告基因的转录。

图 3B、4B 和 5B 表示在没有任何外源性视黄醛衍生物兴奋剂的情况下获得的 AGN 193109 剂量应答曲线。令人感兴趣的是, ER-RAR- α (图 3B)基本不受 AGN 193109 的影响, 而 ER-RAR- β 和 ER-RAR- γ 嵌合受体(分别为图 4B 和 5B)显示 AGN 193109 剂量应答的荧光素酶报告质粒活性的降低。

我们另外通过检验 AGN 193109 抑制由设计具有组成转录激活因子结构域的嵌合 RAR- γ 受体介导基因表达的能力, 研究了其负性激素活性。更准确地说, 我们在两种类型的荧光素酶报告系统中使用融合 HSV VP-16(称为 RAR- γ -VP-16)的酸性激活因子结构域的组成活性 RAR- γ 嵌合受体。第一种由用 ER-RARs 和 ER-RXR- α 共转染的 ERE-tk-Luc 报告质粒所组成。第二种利用 Δ MTV-TREp-Luc 报告质粒代替 ERE-tk-Luc 报告质粒。

实施例 11 介绍用于证明 AGN 193109 可以抑制 RAR 的转录激活因子结构域活性的方法。以下所示的结果证明 AGN 193109 可以抑制在没有兴奋剂情况下的 RAR 依赖性基因表达并证实 AGN 193109 显示负性激素活性。

实施例 11

对在短暂转染的细胞中 RAR-VP-16 活性的阻遏作用

根据实施例 6 中所述的磷酸钙共沉淀技术, 用 0.5 μ g/孔的 ERE-tk-Luc 荧光素酶报告质粒、0.1 μ g/孔的 ER-RXR- α 嵌合受体表达质粒及 0 μ g 或 0.1 μ g/孔的 RAR- γ -VP-16 表达质粒使 CV-1 细胞短暂共转染。所述嵌合受体 ER-RXR- α 由融合雌激素受体 DNA 结合结构域 [Graupner et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:1554 (1991)]的

RXR- α [Mangelsdorf, et al. Nature 345:224-229 (1990)]激素结合结构域(氨基酸 181-458)所组成并由基于 Ellis 等人[Cell 45:721 (1986)]所述表达载体 pECE 的 SV-40 所表达。RAR- γ -VP-16 与 Nagpal 等人[EMBO J. 12:2349 (1993)]所述 VP16RAR- γ 1 表达质粒相同, 并给具有与全长度 RAR- γ 的氨基端融合的 HSV 的 VP-16 蛋白的激活结构域的嵌合蛋白编码。转染后 18 小时, 用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗细胞并加入含有已经用炭提取除去视黄醛衍生物的 10% FBS(Gemini Bio-Products)的 DMEM (Gibco-BRL)。用适当稀释的 AGN 193109 或在乙醇溶媒中的 ATRA 或单独的乙醇处理细胞达 18 小时, 然后用 PBS 漂洗并用 0.1 M KPO₄ (pH 7.8)、1.0% TRITON X-100、1.0 nM DTT、2 nM EDTA 溶解。根据 de Wet 等人[Mol. Cell. Biol. 7:725 (1987)]所述方法, 使用萤火虫荧光素(Analytical Luminescence Laboratory)和 EG&G Berthold 96 孔平面接种发光计测定荧光素酶活性。荧光素酶值用一式三份测定值的均值 \pm SEM 表示。

如图 6 中所示, 用 ERE-tk-Luc 报告构成物使 CV-1 细胞转染, 所述 ER-RAR- α 嵌合表达质粒显示由 ATRA 引起的弱的激活荧光素酶活性, 可能是由于 ATRA 异构化为 9C-RA, 即对于 RXRs 而言的天然配体[Heyman et al. Cell 68:397 (1992)]。用报告质粒和嵌合受体质粒的相同混合物转染, 但经 AGN 193109 处理的细胞并不对荧光素酶活性显示出任何作用。因为 AGN 193109 不与 RXRs 结合, 该后一结果是预料到的。类似地用 ERE-tk-Luc 报告质粒转染 CV-1 细胞, 然而用 ER-RAR 嵌合受体表达质粒代替在 ATRA 处理后显示极强的荧光素酶活性诱导作用的 ER-RXR- α 。

相反, 在所述转染混合物中 RAR- γ -VP-16 表达质粒与 ER-RXR- α 和 ERE-tk-Luc 质粒的包涵物导致在没有任何加入视黄醛衍生物的情况下测定时, 基础荧光素酶活性的显著的增加。当与单独使用 ER-RXR- α 转染的细胞所得结果相比时, 对于 ER-RXR- α /RAR- γ -VP-16 共转染子而言, 所观测到的基础荧光素酶活性上的增加显示重组 ER-RXR- α 和

RAR- γ -VP-16 蛋白可以异质二聚合。该异质二聚体与所述顺式调节雌激素应答元件的相互作用导致所述 VP-16 激活结构域对于 ERE-tk-Luc 报告质粒的启动子区的靶向性。用 ATRA 处理该三重转染细胞导致超过高的基础水平的荧光素酶活性的适度增加。然而，用 AGN 193109 处理该三重转染子导致荧光素酶活性上剂量依赖性降低。重要的是，图 6 显示 AGN 193109 处理用 ER-RXR- α 和 RAR- γ -VP-16 共转染的细胞导致在约 10^{-8} M AGN 193109 下出现具有最大抑制的对荧光素酶活性的阻遏作用。

通过其中使 AGN 193109 与 RAR 结合导致 RAR 中构象变化(它使促进反式-作用负性共激活因子蛋白的结合的负性构象稳定化)的模型，解释了我们的观察结果即 AGN 193109 阻遏在 RXR 存在下的 RAR- γ -VP-16 的组成转录激活功能。当通过 NCP 使 AGN 193109/RAR 复合物结合时，RAR 能够上行调节对激活的 RARs 为一般应答的基因的转录。我们的模型进一步提出细胞内储备的 NCP 在某些方面浓度为有限的，并可以通过 AGN 193109 刺激于 RARs 的络合而将其耗竭。

在图 6 中表示的结果另外显示甚至在 10^{-6} M AGN 193109 下，ER-RXR- α 和 RAR- γ -VP-16 蛋白可以相互作用形成能够激活所述报告基因转染的异质二聚体。更准确地说，用 ER-RXR- α 和 RAR- γ -VP-16 转染并以足以提供最大抑制的浓度(10^{-8} - 10^{-6} M)的 AGN 193109 处理的细胞产生示数为约 16000 rlu 的荧光素酶活性。相反，只用 ER-RXR- α 转染，然后以浓度高达 10^{-6} M 的 AGN 193109 处理的细胞显示荧光素酶表达的水平只有约 8000 rlu。甚至在 10^{-6} M 的 AGN 193109 存在下，在表达 ER-RXR- α 和 RAR- γ -VP-16 的细胞中得到较高水平的荧光素酶活性的事实显示在这两种重组受体间存在持续的相互作用。由 AGN 193109 对 RAR- γ -VP-16 活性的阻遏作用提示用 VP-16 激活作用可以共同控制(codominant) NCP 相互作用的调节。因此，我们认识到调节一般不被 AGN 193109 依赖性方式的视黄醛衍生物所调节的基因的表达是可能的。

作为 AGN 193109 可调节基因的候选者包括那些被转录因子复合物激活的可调节基因，它们由于 RARs 结合或异质二聚的非 RAR 因子所组成，其中所述非 RAR 因子不要求 RAR 兴奋剂激活。而用 RAR 兴奋剂的刺激可以基本对该基因的表达没有影响，给予 AGN 193109 可以促进含有 AGN 193109/RAR/NCP 的非活性转录复合物的形成。其次，加入 AGN 193109 视黄醛衍生物负性激素可以下行调节其它视黄醛衍生物不敏感基因转录。

相同的机理可以解释 AGN 193109 可以阻遏在 HL-60 细胞中的组织转谷氨酰胺酶(TGase)基因活性。由三个被 5 和 7 个碱对隔开的典型的视黄醛衍生物的半位点组成的视黄醛衍生物应答元件在该基因的转录控制区中一直为相同的。尽管 TGase 可以被 RXR 选择性兴奋剂诱导，它对 RAR 选择性兴奋剂不应答。通过 RAR/RXR 异质二聚体使 TGase 视黄醛衍生物应答元件结合(Davies et al. in Press)。令人感兴趣的是，AGN 193109 能够阻遏由 RXR 兴奋剂诱导的 TGase 活性。通过该负性激素使 NCPs 与所述异质二聚体的 RAR 组分分离，从而阻遏有关 RXR 的活性的能力可以解释该 AGN 193109 介导的阻遏作用。

通过使用 RAR- γ -VP-16 和表达构成物及使用所述 AMTV-TREp-Luc 报告质粒取代 RAR- γ -VP-16 和 ER-RXR- α 表达构成物与 ERE-tk-Luc 报告质粒结合，我们也获得了支持与实施例 11 所述内容一致结论的结果。于上述结果一致，我们发现 AGN 193109 抑制在 Δ MTV-TREp-Luc 报告质粒上的 RAR- γ -VP-16 的活性。从而，当该嵌合受体直接与视黄酸受体应答元件结合，代替间接与在报告质粒的启动子区中雌激素应答元件结合时，AGN 193109 阻遏 RAR- γ -VP-16 的活性。这些发现证明用于鉴定具有负性激素活性试剂的测定不必限于使用特定的报告质粒。代之，用于鉴定视黄醛衍生物负性激素的实验系统所包括的重要特征涉及检测化合物阻遏设计含有组成性转录激活结构域的 RAR 的活性的能力。

一般而言，可以确定视黄醛衍生物负性激素为视黄醛类化合物的



子集，它们在转染细胞中阻遏报告基因的基本水平的表达，所述报告基因对于包括至少位于受体的 DNA 结合结构域的 C 端的视黄醛衍生物受体结构域的视黄醛衍生物受体或嵌合受体的直接或间接结合的转录应答。该方法已经被采用作为用于鉴定视黄醛衍生物负性激素的筛选方法。在本发明筛选方法的不同实施方案中，用于寻找负性激素的受体结构为可变的。更准确地说，所述视黄醛衍生物受体可以是 RAR 或 RXR 的亚型。可选设计所述受体包括组成性转录激活因子结构域。用于筛选负性激素的视黄醛衍生物受体可选含有作为对于所述天然受体为内源性的 DNA 结合结构域的替代物的异质的 DNA 结合结构域。然而，当在筛选方法中使用第二种受体时，其中第二种受体可以与用于寻找负性激素的视黄醛衍生物受体二聚合，然后该视黄醛衍生物受体可以不需要 DNA 结合结构域，因为它间接通过与本身结合在转录控制区的第二种受体的二聚合可以被连接到所述受体基因的转录控制区上。

在所述筛选方法的实施中，在体外检测方法中，一般测定化合物阻遏报告质粒的基础表达的能力。基础表达代表在没有外源性加入的视黄醛衍生物兴奋剂存在的条件下，在转染细胞中报告质粒表达的基线水平。可选采取步骤，通过例如活性炭提取用于体外培养细胞的血清的方法自所述转染细胞的周围除去内源性视黄醛衍生物配体。

用于所述筛选方法中的报告基因的实例包括那些编码的荧光素酶、 β 半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶或者能通过免疫化学方法检测的细胞表面抗原。实际上，没有预期报告基因的性质对于方法的可操作性是至关重要的。然而，所述报告基因的构成物的转录调控区必须包括一个或多个顺式调控元件，它们为用于寻找负性激素的转录因子的靶子。例如，如果一个人想要鉴定 RAR 负性激素，那么所述报告因子构成物转录调节区可以含有可为含 RAR 蛋白结合的顺式调控元件。在该实例中，在 RAR 的 DNA 结合结构域与所述报告因子构成物的转录调控区的顺式调控元件之间应该具有相应关系。从而，如果具

有组成性转录激活因子结构域和 DNA 结合结构域(它们可以结合顺式调控雌激素应答元件)的嵌合 RAR 用于所述筛选方法中, 则所述报告因子构成物的转录调控区应该含有雌激素应答元件。

5 Mangelsdorf 等人[The Retinoid Receptors in The Retinoids : Biology, Chemistry and Medicine, 2nd edition, eds. Sporn et al., Raven Press, Ltd., New York (1994)]公开了用于报告基因测试中的直接结合视黄醛衍生物受体(RAREs)的顺式调控元件的实例。间接结合嵌合受体的顺式调控元件的实例包括对于任何 DNA 结合蛋白而言的 DNA 结合位点, 其中所述蛋白的 DNA 结合结构域可以被加入由连接视黄醛衍生物受体的该 DNA 结合结构域组成的嵌合受体中。可以被设计进入嵌合受体并将识别异质顺式调控元件的异质 DNA 结合结构域的特定实例包括那些识别雌激素应答元件。从而, 用于所述识别方法中的嵌合受体的视黄醛衍生物受体部分不必含有视黄醛衍生物受体的 DNA 结合, 然而至少必须含有视黄醛衍生物受体的配体结合结构域。

15 结合所述顺式调控元件的间接视黄醛衍生物受体的其它实例包括能结合所述顺式调控元件和与视黄醛衍生物受体二聚合的蛋白的用途。在该情况下, 所述视黄醛衍生物受体只通过与负责 DNA 结合的蛋白结合而与所述顺式调控元件结合。该系统的实例将包括由融合 RXR 的异质 DNA 结合结构域组成的并含有至少与负责与 RARs 二聚合的 RXR 的结构域的融合蛋白的用途。共诱导的 RARs 可以与该结合顺式调控元件的融合蛋白二聚合。我们认为任何与 RARs 二聚合导致所述 RAR 与所述顺式调控元件的间接结合的顺式调控元件结合蛋白也将适用于负性激素筛选方法。

25 在所述筛选方法的优选方案中, 视黄醛衍生物负性激素被鉴定为可以阻遏已经增加了基础活性的设计 RAR 转录因子的基础表达的视黄醛衍生物。尽管对于所述筛选方法的可操作性而言不是必需的, 然而用于下列实施例中的设计 RAR 包括组成性转录激活结构域。在没有任何视黄醛衍生物的情况下, 采用嵌合受体很好地提供了一种升高报

告基因的基础表达的方法。尽管在以上详述的方法中已经使用短暂转染，组成性表达嵌合受体的稳定转染细胞系也用于所述筛选方法中。

如下列实施例中所公开的，对于设计含有对雌激素应答顺式调控元件特异性的 DNA 结合结构域的第二受体而言，具有组成性转录激活因子结构域的嵌合视黄醛衍生物受体为可异质二聚的。在该情况下，具有组成性转录激活因子结构域的嵌合视黄醛衍生物受体，间接经过与结合 DNA 靶向序列的第二受体结合，与顺式调控区控制报告基因表达关联。更具体地说，第二受体被设计含有识别雌激素应答元件的 DNA 结合结构域。在上游启动子区中具有雌激素应答元件的报告基因对没有具组成性转录激活因子结构域的转染嵌合受体情况下的视黄醛衍生物兴奋剂不应答更为有利。因此，所有报告基因活性起因于所述转染受体。雌激素应答元件 DNA 结合结构域和雌激素应答元件顺式调控元件的联合使用目的仅为说明。本领域内的普通技术人员将理解对于非 RARE 顺式调控元件具有特异性的工程(engineered)受体的其它联合形式也用于本发明筛选方法的实施中。

用于所述筛选方法中的细胞为可以被转染的真核细胞。这些细胞可以为动物细胞例如人类、灵长类或啮齿动物细胞。我们使用 CV-1 细胞已经取得了非常好的结果，然而，适当地期待其它培养细胞系也可以成功地使用。任何本领域内已知的常规转染方法可以用于诱导编码具有组成性转录激活因子结构域的嵌合视黄醛衍生物受体的表达构成物。

所述组成性转录激活因子结构域由大部分氨基酸组成，它们可能具有通过在中性 pH 条件下一个负电荷所表示的整体酸性。例如，所述组成性转录激活因子结构域可以具有也在病毒转录因子中发现的氨基酸序列。具有组成性转录激活因子结构域的病毒转录因子的一个实例为单纯性疱疹病毒 16。然而，其它病毒或合成性转录激活因子结构域也可以用于编码具有组成性转录激活因子结构域的嵌合视黄醛衍生物受体的表达构成物的构成中。

如下所述, 我们已经开发了用于鉴定视黄醛衍生物负性激素的一般化的筛选方法。该筛选方法提供将简单的拮抗剂与负性激素区分开的方法。表 12 列出显示对于 RAR- γ 有效亲合力的几种视黄醛衍生物化合物, 只对 ATRA 例外, 在短暂共转染反式激活测试中它们不反式激活该受体。从而, 我们检测了这些化合物是否哪些为 RAR- γ 拮抗剂, 即使有的话, 这些拮抗剂中那些显示负性激素活性。

实施例 12

对于视黄醛衍生物负性激素的测试

通过在 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al. eds. Cold Spring Harbor Lab Publ. 1989) 中所述磷酸钙共沉淀方法, 用 0.5 μg ERE-tk-Luc 报告质粒和 0.1 μg ER-RAR- γ [Graupner et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:1554 (1991)] 嵌合表达质粒使 4×10^4 CV-1 细胞转染。18 小时后, 用 PBS 漂洗细胞并加入含有 10% 活性炭提取的 FBS (Gemini Bio-Products) 的 DMEM (Gibco-BRL)。用在乙醇中的 10^{-8} M ATRA 或单独用乙醇处理细胞。此外, 用 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 或 10^{-6} M 表 12 中所列的化合物处理经 ATRA 处理的细胞。18 小时后, 将细胞在 PBS 中漂洗并溶解在 0.1 M KPO_4 (pH 7.8)、1.0% TRITON X-100、1.0 mM DTT、2 mM EDTA 中。根据 de Wet 等人 [Mol. Cell. Biol. 7:725 (1987)] 所述方法测定荧光素酶活性。

表 12

20

化合物	Kd (nM) @ RAR- γ^a	EC ₅₀ (nM) @ RAR- γ^b
ATRA	12	17
AGN 193109 (化合物 60)	6	na
AGN 193174 (化合物 34a)	52	na
AGN 193199	30	na
AGN 193385 (化合物 23)	25	na

25

AGN 193389 (化合物 25)	13	na
AGN 193840	40	na
AGN 193871 (化合物 50)	30	na

5 a 通过 ^3H -ATRA 竞争性的与杆状病毒表达的 RAR- γ 的结合和应用 Cheng-Prusoff 方程测定的相对亲和力(Kd)。

b 用 $\Delta\text{MTV-TREp-Luc}$ 和 RS- RAR- γ 短暂共转染的 CV-1 细胞中测定的 EC_{50} 。 “na” 代表无活性。

10 如部分在图 7 和表 12 中所示结果表明的, ATRA 例外, 表 12 中所列的所有化合物在 RAR- γ 上为视黄醛衍生物拮抗剂。

其次, 筛选表 2 中鉴定的 RAR- γ 拮抗剂以便确定即使有的话那些也是视黄醛衍生物负性激素。根据在 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al. eds. Cold Spring Harbor Lab Publ. 1989) 中所述磷酸钙方法, 用 0.5 μg ERE-tk-Luc 报告质粒和 0.1 μg ER-RXR- α [Graupner et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:1554 (1991)] 和 0.2 μg RAR- γ -VP-16 [Nagpal et al. EMBO J. 12:2349 (1993)] 嵌合表达质粒使 4×10^4 CV-1 细胞转染。 18 小时后, 用 PBS 漂洗细胞并加入含有 10% 活性炭提取的 FBS (Gemini Bio-Products) 的 DMEM (Gibco-BRL)。用 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 或 10^{-6} M 表 12 中所列的每种化合物处理细胞。用作 20 为阴性对照的单独的乙醇溶媒处理细胞。 18 小时后, 将细胞在 PBS 中漂洗并溶解在 0.1 M KPO_4 (pH 7.8)、1.0% TRITON X-100、1.0 mM DTT、2 mM EDTA 中。根据 de Wet 等人 [Mol. Cell. Biol. 7:725 (1987)] 前述方法测定荧光素酶活性。

25 如图 8 中所示, 根据其对于 RAR- γ -VP-16 嵌合视黄醛衍生物受体的组成性转染激活功能的作用可以将表 12 中的视黄醛衍生物拮抗剂分成两类。一类(包括 AGN 193174、AGN 193199 和 AGN 193840)尽管它们为 ATRA 拮抗剂, 不阻遏 RAR- γ -VP-16 活性。相反, AGN 193109、AGN 193385、AGN 193389 和 AGN 193871 显示剂量依赖

性阻遏 RAR- γ -VP-16 组成性活性。从而，尽管两组化合物均为 RAR- γ 拮抗剂，只有第二组化合物显示负性激素活性。该测试方法可以有利地将视黄醛衍生物负性激素与简单的视黄醛衍生物拮抗剂区分开。

5 前述试验结果表明 AGN 193109 满足定义负性激素的标准。更准确地说，在实施例 11 中所示的结果证明 AGN 193109 甚至在没有外源性加入的视黄醛衍生物配体的情况下，仍具有在 RARs 上施加抑制活性的能力。如此，该具有生物活性的化合物不取决于 RARs 和兴奋剂例如 ATRA 和 AGN 191183 之间相互作用的阻滞。这些发现导致得出结论：AGN 193109 稳定 RARs 和 NCPs 之间的相互作用。如图 9 中所示，NCP/RAR/PCP 的相互作用以平衡状态存在。兴奋剂的作用为增加 PCP 的相互作用并降低 NCP 的相互作用。如前文所述，我们的试验结果揭示通过给予 AGN 193109 可以调节对于其它受体而言 NCP 的细胞内有效性。更准确地说，我们发现 AGN 193109 可以促进 NCP 与 RARs 的复合作用，从而降低可用于与除 RARs 外的转录因子相互作用的 NCP 的细胞内储存。

15 其次，我们检验了 AGN 193109 对于兴奋剂介导的 AP-1 依赖性基因表达抑制的作用。在 *Endocr. Rev.* 14:651 (1993) 中，Pfalz 公开了视黄醛衍生物通过包括抑制 AP-1 活性的机理可以下行调节基因表达。我们假定当与指定测定 AP-1 活性的模型系统中的视黄醛衍生物兴奋剂结合使用时，AGN 193109 可以具有两种作用之一。首先，可以认为 AGN 193109 已经拮抗所述兴奋剂的作用，从而缓解对于 AP-1 活性的兴奋剂依赖性抑制。此外，AGN 193109 可能已经增强了所述兴奋剂的活性，从而夸大对于 AP-1 活性的兴奋剂依赖性抑制作用。

25 实施例 13 介绍用于证明 AGN 193109 增强视黄醛衍生物兴奋剂的抗 AP-1 活性的方法。如下所述，AGN 191183 视黄醛衍生物兴奋剂微弱地抑制 AP-1 依赖性基因表达。AGN 193109 和视黄醛衍生物兴奋剂联合使用强烈抑制 AP-1 依赖性基因表达。AGN 193109 本身基本上没有抗 AP-1 的活性。

实施例 13

AGN 193109 增强视黄醛衍生物兴奋剂的抗 AP-1 活性

如 Giguere 等人[Nature 33:624 (1987)]所述,利用 LIPOFECTAMINE (Life Technologies, Inc.), 使用 1 μ g 的 Str-AP1-CAT 报告基因构成物和 0.2 μ g 的质粒 pRS-hRAR α 使 HeLa 细胞转染。通过克隆相应于大鼠 pBLCAT3 的 HindIII-BamHI 位点[Luckow et al., Nucl. Acids Res. 15:5490 (1987)]之间 stromelysin-1 启动子[Matrisian et al., Mol. Cell. Biol. 6:1679 (1986)]的-84 至+1 位的 DNA 片段制备 Str-AP1-CAT。所述 stromelysin-1 启动子的序列含有 AP1 结构域单元作为其唯一的增强子元件[Nicholson et al., EMBO J. 9:4443 (1990)]。使具有如下序列的两种合成的低聚核苷酸退火制备所述启动子序列:

5'-AGAAGCTTATGGAAGCAATTATGAGTCAGTTTGC GGGTGACTCTGCAAATACTGCCACTCTATAAAAGTTGG
GCTCAGAAAGGTGGACCTCGAGGATCCAG-3'(SEQ ID NO:2)和

5'-CTGGATCCTCGAGGTCCACCTTTCTGAGCCCACTTTTATAGAGTGGCAGTATTTGCAGAGTCACCCGCAAAC
TGACTCATAATTGCTTCCATAAGCTTCT-3' (SEQ ID NO:3).

如 Nagpal 等人[J. Biol. Chem. 270:923 (1995)]所述, 完成包括转染、用合适的化合物处理和测定 CAT 活性的过程。

这些过程的结果表明 AGN 193109 加强所述视黄醛衍生物兴奋剂 AGN 191183 的抗 AP-1 活性。更准确地说, 在浓度为 10^{-12} - 10^{-10} M 的范围内, AGN 191183 不抑制 TPA 诱导的 Str-AP1-CAT 表达。用 AGN 193109 在浓度为 10^{-10} - 10^{-8} M 范围内处理基本不抑制 AP-1 介导的报告基因的活性。然而, 在图 10 中所示的结果表明以浓度为 10^{-12} - 10^{-10} M 的范围内, 使用 AGN 193109 (10^{-8} M)和 AGN 191183 联合刺激所述转染子基本上抑制 TPA 诱导的 Str-AP1-CAT 表达的 12% - 21%的量。因而, 在 AGN 191183 这一视黄醛衍生物兴奋剂一般不抑制 AP-1 活性的



条件下, AGN 193109 加强 AGN 191183 抗 AP-1 活性。

5 我们认为, 通过可能涉及 NCPs 到 RARs 的 AGN 193109 依赖性受体聚集的机理, AGN 193109 加强所述兴奋剂介导的对 AP-1 活性的阻遏作用。RARs 属于超家族的核受体, 它也包括作为 1,25-二羟基维生素 D₃、糖皮质激素、甲状腺激素、雌激素和黄体酮的受体。假定结合 NCPs 的能力可为核受体超家族的不同成员所分享是合理的。这使我们推测 AGN 193109 可以加强与该超家族核受体相互作用的一种或多种配体的抗 AP-1 活性。

10 在先实施例中所述的结果清楚地表明 AGN 193109 加强视黄醛衍生物兴奋剂的抗 AP-1 活性。更准确地说, AGN 193109 降低可以检测到 AGN 191183 的抗 AP-1 活性的阈剂量。因为 AGN 193109 本身基本没有抗 AP-1 活性, 其对于核受体兴奋剂的作用为协同作用。我们也发现 AGN 193109 负性激素加强作为维生素 D₃ 受体的天然配体的 1,25-二羟基维生素 D₃ 的抗 AP-1 活性。

15 在先实施例中观察到的 AGN 193109 和 AGN 191183 之间的协同作用必然意味着所述视黄醛衍生物兴奋剂的抗 AP-1 活性和 AGN 193109 介导的加强该活性必定根据不同的机理。如果这两种制剂的作用机理为相同的, 从而导致 AGN 193109 和所述兴奋剂的联合作用的效果是相加的。然而, 联合的结果显示比单独使用任何一种制剂均更有效, 其效果在该发现之前是没有预料到的。

20 使用比所述视黄醛衍生物兴奋剂约 100 倍摩尔过量的 AGN 193109, 有效地完成所述 RAR 兴奋剂的 AGN 193109 介导的加强作用。因此, 大部分的 RARs 应该被 AGN 193109 所结合, 只留下非常少的 RARs 供兴奋剂结合。尽管存在这一事实, 未与 AGN 193109 结合的 RARs 群能够结合视黄醛衍生物兴奋剂并有力地刺激作为抑制报告基因表达可测的兴奋剂依赖性应答。从而, 我们的数据提示为 AGN 25 193109 所诱导的 RARs 的可能的异质性。

AGN 193109 的负性激素活性起因于其促进 RARs 和 NCPs 相互作

用的能力，提供理解 AGN 193109 和视黄醛衍生物兴奋剂之间协同作用的基础。我们的结果与其中 AGN 193109 处理细胞促进 RARs 和 NCPs 的结合，从而降低所述细胞外游离 NCP 和游离 RAR 的数量的模型完全一致。这导致产生功能上有差异的两个 RARs 群。第一群由与 NCPs 结合的 RARs 所代表。该 AGN 193109/RAR/NCP 复合物不能为视黄醛衍生物兴奋剂所激活。第二群由 RARs 组成，它们不为 NCP 所结合并保留与兴奋剂的相互作用。后一细胞群称为“RAR”，表明在基本耗尽 NCP 的环境中的游离 RARs。

RAR*s 已经降低了通过平衡结合与 NCP 关联的可能性并具有增加了的对于可测的视黄醛衍生物兴奋剂的敏感性，例如作为抗 AP-1 活性的敏感性。所以如此是因为尽管通过给予 AGN 193109 耗竭细胞内的 NCP 的储存，然而还未耗尽 PCP 的储存。因此，游离 RAR*s 可以与视黄醛衍生物兴奋剂结合并在基本耗尽 NCP 的环境下与 PCP 因子相互作用。AGN 193109 增加其它核受体对于其各自的兴奋剂的敏感性的能力可以归因于这些不同的核受体与相同的 NCPs (它们与 AGN 193109/RAR 复合物相互作用)相互作用的能力。这种 AGN 193109 介导可用于核受体家族成员的 NCP 的调节的模型用图解形式表示于图 11 中。

该图解模型使我们能预测 AGN 193109 可以调节除了视黄醛衍生物兴奋剂以外的核受体配体的活性。如在下列实施例中所述，我们证实 AGN 193109 在体外反式激活测试中加强 1,25-二羟基维生素 D₃ 的活性。

实施例 14 介绍用于证明 AGN 193109 在反式激活测试中提高 1,25-二羟基维生素 D₃ 活性的方法。

实施例 14

AGN 193109 加强 1,25-二羟基维生素 D₃ 的活性

使用 Felgner 等人[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413 (1987)]所述的阳离子脂质体介导的转染方法转染 Hela 细胞。将 5×10^4 细胞平面接

种在 12 孔的多孔接种板上并在加入 10% FBS 的 DMEM 中生长。使用 2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 的 LIPOFECTAMINE 试剂(Life Technologies, Inc.), 用含有来自连接报告质粒 $\Delta\text{MTV-Luc}$ [Heyman et al. in Cell 68:397 (1992)]的小鼠 osteopontin 基因的两个复制的 1,25-二羟基维生素 D_3 应答元件 5'-
5 GTACAAGGTTTCACGAGGTTTCACGTCTTA-3' (SEQ ID NO:4) [Ferrara et al. J. Biol. Chem. 269:2971 (1994)]和 0.3 μg 的质粒 pGEM3Z (Pharmacia, Inc.) 作为载体 DNA, 以使 DNA 的最终浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 在无血清的培养基中使细胞共转染。转染后 6 小时, 供给细胞终浓度为 10% 的含有活性炭提取的 FBS 的生长培养基。转染后 18 小时,
10 用单独溶媒(乙醇)或以终浓度为 10^{-8} 或 10^{-7} M 的 AGN 193109 的乙醇溶液处理细胞。6 小时后, 加入乙醇中的 1,25-二羟基维生素 D_3 到终浓度为 10^{-10} - 10^{-7} M。用 1,25-二羟基维生素 D_3 处理后 18 小时溶解并收获细胞。如上所述, 测定荧光素酶活性。该实验系统可以使用监视和使 1,25-二羟基维生素 D_3 依赖性基因表达定量化的方便的方法。

15 图 12 中所示结果表明, 当与单独使用 1,25-二羟基维生素 D_3 所获结果相比时, 与 1,25-二羟基维生素 D_3 共同给予 AGN 193109 使其剂量应答曲线向左位移。这证实在体外反式激活测试中 AGN 193109 加强 1,25-二羟基维生素 D_3 的效力。更准确地说, 图 12 以图解的方式介绍了浓度低至 10-100 nM 的 AGN 193109 使得 1,25-二羟基维生素 D_3
20 的活性大约增加 10 倍。需要 10^{-8} M 浓度的 1,25-二羟基维生素 D_3 以便产生约 2000 rlu 的荧光素酶表达, 而当将该维生素与浓度为 10^{-8} - 10^{-7} M 的 AGN 193109 共同给予时, 产生同样的荧光素酶量只需要 1,25-二羟基维生素 D_3 浓度 1/10 的量。尽管在图 12 中的图中未显示, 使用浓度为 10^{-9} - 10^{-8} M 的 AGN 193109 可以获得基本相同的结果。因而, 共同
25 给予 AGN 193109 基本降低在没有所述负性激素的情况下, 产生类似的效果所需 1,25-二羟基维生素 D_3 的量。

令人感兴趣的是, 当用共同转染的维生素 D 受体(VDR)表达质粒重复以上过程时, 在 AGN 193109 加强 1,25-二羟基维生素 D_3 活性的

能力上有一致的降低。我们对于该结果的解释为 VDRs 的过量表达可以影响 AGN 193109 加强 1,25-二羟基维生素 D₃ 活性的能力。从而，配体受体的细胞内浓度(在组织特异性方式上可以不同)可以影响 AGN 193109 加强与该受体结合的配体活性的能力。这又与模型一致，其中 titratable NCPs 有助于调节所述维生素 D₃ 的应答并支持以上提出的模型。

如下列实施例所述，我们也证实 AGN 193109 也加强 1,25-二羟基维生素 D₃ 的抗 AP-1 活性。我们的用于 AGN 193109 作用活性的模型通过在该药物的存在下引起 NCPs 与 RARs 迫切结合解释了这一观察结果。存在于 Hela 细胞中的内源性维生素 D 受体可能被给予更多的对于 1,25-二羟基维生素 D₃ 配体的敏感性，其结果为夸大了该配体抑制来自 Str-AP1-CAT 报告因子的表达。

实施例 15 介绍了用于证明 AGN 193109 加强 1,25-二羟基维生素 D₃ 的抗 AP-1 活性的方法。

实施例 15

AGN 193109 加强 1,25-二羟基维生素 D₃ 的抗 AP-1 活性

根据 Nagpal 等人[J. Biol. Chem. 270:923 (1995)]所述方法，使用 LIPOFECTAMINE，用 1 μg 的 Str-AP1-CAT 使 Lela 细胞转染。用单独的 AGN 193109 (10⁻⁹-10⁻⁷ M)、单独的 1,25-二羟基维生素 D₃ (10⁻¹²-10⁻⁷ M)或在 10⁻⁸ M 的 AGN 193109 存在下的 1,25-二羟基维生素 D₃ (10⁻¹²-10⁻⁷ M)处理转染的细胞。

这些过程的结果表明 AGN 193109 加强 1,25-二羟基维生素 D₃ 抑制 TPA 诱导的 AP-1 活性的能力。当以 10⁻⁹-10⁻⁷ M 的浓度范围单独使用时，AGN 193109 无可检测到的抗 AP-1 活性。在图 13 中所示的结果显示 1,25-二羟基维生素 D₃ 只有在 10⁻⁸-10⁻⁷ M 的浓度范围内才阻遏 TPA 刺激的活性。分析在 10⁻⁸ M AGN 193109 存在下，1,25-二羟基维生素 D₃ 介导对 TPA 刺激的 CAT 活性的阻遏作用表明抗 AP-1 活性在 10⁻¹⁰-10⁻⁹ M 的 1,25-二羟基维生素 D₃ 下为可检测到的，并且与单独用

1,25-二羟基维生素 D₃ 治疗相比, 在 10⁻⁸-10⁻⁷ M 剂量下活性增加。该 AGN 193109 依赖性调节 1,25-二羟基维生素 D₃ 介导的抗 AP-1 活性与其中 NCP 对 RARs 的整合作用使得该 NCP 不能用于与其它核受体家族成员相互作用的模型一致。因而, 使该受体对于 1,25-二羟基维生素 D₃ 治疗更敏感。

以下 RAR 介导反式激活和抗 AP-1 活性的机理可能不同。该结论基于我们的观察即高剂量的 AGN 193109 完全抑制反式激活而基本不抑制抗 AP-1 活性。因而, 希望获得其它的证据以便支持作为由 AGN 193109 治疗介导的 RAR*形成的模型。为此, 我们研究是否 AGN 193109 可以加强 RAR 特异性兴奋剂 AGN 191183 在体外反式激活测试中的活性。

实施例 16 介绍用于证明 193109 加强 RAR 特异性兴奋剂 AGN 191183 活性的方法。该过程的结果显示在特定情况下, AGN 193109 提高 RAR 特异性视黄醛衍生物的效力并提供 AGN 193109 促进 RAR* 形成的强有力的证据。

实施例 16

通过共同给予 AGN 193109 加强视黄醛衍生物的效力

使用 Felgner 等人[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413 (1987)]所述的阳离子质脂体介导的转染方法转染 Hela 细胞。将 5 x 10⁴ 细胞平面接种在 12 孔的多孔接种板上并在加入 10% FBS 的 DMEM 中生长。使用 LIPOFECTAMINE 试剂(2 μg/孔, Life Technologies, Inc.), 用含有插入报告质粒 ΔMTV-Luc[Heyman et al. in Cell 68:397 (1992)]中的两个复制 TRE_{pal} 应答元件 5'-TCAGGTCATGACCTGA-3' (SEQ ID NO:5)的 0.7 μg 的报告质粒 MTV-TRE_{pal}-Luc 和 0.1 μg 的 RAR-γ 表达质粒 pRShRAR-γ (Ishikawa et al. Mol. Endocrinol. 4:837 (1990))在不含血清培养基中使细胞共转染。转染后 6 小时, 供给细胞终浓度为 10%的含有活性炭提取的 FBS 的生长培养基。转染后 18 小时, 用单独溶媒(乙醇)或以终浓度为 10⁻¹¹-10⁻⁸ M 的 AGN 193109 的乙醇溶液处理细胞。6 小时后, 加入

乙醇中的 AGN 191183 到终浓度为 0、 10^{-10} 或 10^{-9} M。用 AGN 191183 处理后 18 小时收获细胞并如上所述，测定荧光素酶活性。

初步实验表明 10^{-9} M 的 AGN 193109 在抑制对于 10^{-9} M 的 AGN 191183 在 HeLa 细胞中的应答相对无效。这与 10^{-9} M 的 AGN 193109 抑制在 CV-1 细胞中的 10^{-8} M ATRA (图 2) 形成对照。

在图 14 中所示的结果支持 AGN 193109 刺激 RAR* 形成的预测。与 AGN 193109 的拮抗剂和负性激素活性的鉴定一致，用 AGN 193109 处理导致两相性的剂量应答曲线。AGN 193109 的最低剂量 (10^{-11} - 10^{-10} M) 导致超过单独 AGN 191183 的对荧光素酶活性的刺激。该作用提示 RAR*s 由 AGN 193109 所产生。令人好奇的是，该结果从 AGN 193109 的单独治疗中也可见，提示 RAR*'s 可以对内源性配体产生应答。

AGN 191183 为合成的视黄醛衍生物兴奋剂，与 ATRA 类似，通过 RARs 激活转录。AGN 191183 代替实施例 7 中的 ATRA 将给出定量的类似结果(即 AGN 193109 将拮抗 10 nM AGN 191183 的作用)。实施例 16 说明：尽管 AGN 193109 可以作为 RAR 兴奋剂的拮抗剂发挥作用，剂量给药条件可以容易地识别，其中 AGN 193109 共同给药加强了由 RAR 兴奋剂介导的激活作用。注意到用于实施例 16 中化合物的剂量基本低于在实施例 7 所述方法中使用的剂量是重要的。我们认为 AGN 193109 治疗可以导致 RAR 异质性 RARs 对于 RAR*s。表观异质性(即加强的能力)似乎在对于 AP-1 阻遏的反式激活中具有不同的窗口。所述曲线为双相的原因为随着 AGN 193109 量的增加，可以用于与所述兴奋剂结合的 RAR 成比例地降低。这对于 AP-1 阻遏情况似乎不是这样，我们仍然推测这种差异必然反映通过相同受体物种反式激活和 AP-1 阻遏的两种不同的机理。

临床结果已经证实一些视黄醛衍生物用于抑制恶化前和恶化的颈损害部分的生长。用于支持该结论的实例性研究已由 Graham 等人在 West J. Med. 145:192 (1986)，由 Lippman 等人在 J. Natl. Cancer Inst. 84:241 (1992) 和由 Weiner 等人在 Invest. New Drugs 4:241 (1986) 上发

表。

类似的结论得到用于培养细胞以使不同的视黄醛衍生物的抗增生作用定量的体外研究结果的支持。更准确地说, Agarwal 等人在 Cancer Res. 51:3982 (1991)中使用 ECE16-1 细胞系于颈发育不良的早期阶段的模型并证明视黄酸可以抑制表皮生长因子(EGF)依赖性细胞增生。

实施例 17 介绍用于证明 AGN 193109 可以拮抗 AGN 191183 视黄醛衍生物兴奋剂的活性(它可以抑制 ECE16-1 细胞系的增生)的方法。

实施例 17

10 AGN 193109 拮抗视黄醛衍生物在 ECE16-1 细胞中的抗增生作用
在含有 DMEM:F12 (3:1)、非必需氨基酸、5% FBS、5 $\mu\text{g/ml}$ 转铁蛋白、2 nM 的 3,3',5-三碘甲状腺氨酸(甲状腺激素或“ T_3 ”)、0.1 nM 的霍乱毒素、2 nM 的 L-谷氨酰胺、 1.8×10^{-4} M 的腺嘌呤和 10 ng/ml EGF 的全培养基中,以密度为 1×10^4 细胞/ cm^2 接种 ECE16-1 细胞。使细胞附在接种平面上过夜,然后转移到含有 DMEM:F12 (3:1)、15 2 mM L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、0.1%牛血清白蛋白、 1.8×10^{-4} M 的腺嘌呤、5 $\mu\text{g/ml}$ 转铁蛋白、2 nM 的 T_3 、50 $\mu\text{g/ml}$ 抗坏血酸、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、100 单位/ml 的青霉素和 50 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素的限定的培养基中。补充 10 ng/ml EGF 到限定的培养基(DM)中。EGF 处理的细胞接受 10 nM 的 AGN 191183 视黄醛衍生物兴奋剂结合 0、0.1、20 1.0、10、100 或 1000 nM AGN 193109,或者单独 1000 nM 的 AGN 193109。处理 3 天后,如 Hembree 等人[Cancer Res. 54:3160 (1994)]所述收获细胞并用 COULTER 计数器测细胞数目。

图 15 中所示结果证明作为对 EGF 的应答但不在单独的限定培养基中 ECE16-1 细胞增生。这证实了由 Andreatta-van Leyen 等人[J. Cell. Physio. 160:265 (1994)]和由 Hembress 等人[Cancer Res. 54:3160 (1994)]所公开的发现结果。加入 10 nM AGN 191183 和 0 nM 的 AGN 193109 完全抑制 EGF 介导的增生。因而, AGN 191183 为有效的抗增生视黄

醛衍生物。增加 AGN 193109 浓度由 0 nM - 10 nM 拮抗 AGN 191183 介导的生长抑制达约 50%。10 倍摩尔过量的 AGN 193109 完全逆转 AGN 191183 的抗增生作用。用 1000 nM 193109 单独处理细胞对于 EGF 介导的增生增加没有作用。这些结果证明 AGN 193109 拮抗视黄醛衍生物的抗增生作用，然而当用于处理代表颈上皮的细胞(它对视黄醛衍生物例如 AGN 191183 的生长抑制敏感)时，其本身基本上没有抗增生的作用。引人注意的是，没有证据表明使用 ECE16-1 模式系统，AGN 193109 加强 AGN 191183 兴奋剂的抗增生作用。

与 ECE16-1 细胞系所代表的模式系统相比，有其它实施例，其中与颈发育不良有关的细胞增生不能被视黄醛衍生物兴奋剂所抑制。例如，Agarwal 等人[Cancer Res. 54:2108 (1994)]介绍 CaSki 细胞作为颈肿瘤模型的用途，它们对于视黄醛衍生物治疗无应答。如下所述，除了抑制细胞增生外，视黄醛衍生物治疗对于 CaSki 细胞的生长速率基本没有影响。以下实施例强调 AGN 193109 负性激素对于该细胞系增生速率的作用。其结果出人预料地证明 AGN 193109 可以抑制颈肿瘤细胞(它们对于视黄醛衍生物兴奋剂的抗增生作用无应答)的增生。

实施例 18 介绍用于证明 AGN 193109 对于其它视黄醛衍生物例如 AGN 191183 的抗增生作用无应答的颈肿瘤细胞系生长的抑制作用的方法。AGN 193109 在无加入的视黄醛衍生物存在下明显地显示抗增生的活性。

实施例 18

AGN 193109 抑制来自 CaSki 颈癌细胞系的增生速率

我们检验了 EGF 以 10^{-6} M 浓度单独或与 AGN 191183 视黄醛衍生物兴奋剂和/或 AGN 193109 负性激素结合对于 CaSki 细胞增生的作用。如上所述涉及 ECE16-1 细胞的研究的方法进行细胞增生测试。将 EGF 加入所述视黄醛衍生物处理培养物中，以便产生终浓度 20 ng/ml。在存在或不存在 10^{-6} M 的 AGF 193109 的情况下，用 AGN 191183 (10^{-10} - 10^{-6} M)处理细胞总共 3 天。如合适，每天用新的培养基

和两种视黄醛衍生物中的每一种替换所述培养基。如上所述，用 COULTOER 计数器测定细胞数量。

图 16 的所示结果表明 CaSki 细胞对于视黄醛衍生物兴奋剂的作用基本不应和 AGN 193109 显示在无加入的视黄醛衍生物存在下抗增生活性。在所述培养基中 EGF 的存在刺激 CaSki 细胞生长。该结论是基于代表无 AGN 191183 的斜线条和代表单独限定的生长培养基 (“DM”) 的空心条的比较。AGN 191183 处理对于 CaSki 肿瘤细胞系没有抗增生的作用。我们忽视与视黄醛衍生物兴奋剂有关的细胞增生速率中任何微小的增加，因为在所述视黄醛衍生物浓度上 1 万倍的增加与在增生速率上只大约增加 20% 相关联。从而，AGN 191183 兴奋剂对于 CaSki 细胞的增生速率基本没有作用。

在图 16 中所示结果也表明 AGN 193109 抑制 CaSki 颈表皮细胞系的增生。该结论基于作为 “0” AGN 191183 黑色条和 “0” AGN 191183 斜线条的测定结果的比较。从而，AGN 193109 当用于处理由视黄醛衍生物兴奋剂例如 AGN 191183 抑制不生长的颈肿瘤细胞时，能够刺激无加入的视黄醛衍生物存在下的生物应答。

我们的发现即 AGN 193109 负性激素能够抑制细胞增生与其中未与配体结合的 RAR 介导的为增生所需要的基因表达的模型一致。尽管 RAR 兴奋剂例如 AGN 191183 基本对于细胞增生没有作用或略微有促进作用，AGN 193109 具有抗增生作用。所述 AGN 193109 负性激素可能与 RARs 结合，从而促进 NCP 结合和使得 RARs 采用非活性构象。根据我们的模型，它阻遏受未与配体结合的 RARs 正性调节的基因活性。所述 AGN 193109 下型调节未与配体结合的 RARs 的活性的能力可能产生于其促进 RARs 与 NCPs 结合的能力。

本领域的普通技术人员将理解某些视黄醛衍生物兴奋剂用于控制视网膜脱离后细胞生长的不需要的结果。在视网膜脱离后，视网膜色素上皮细胞(RPE)间变、增生和迁移到视网膜下空间中。该过程对于针对视网膜再附着的外科手术的成功具有不利的影

等人[Invest. Ophthal & Vis. Sci. 32:65 (1991)]已经证明 RAR 兴奋剂例如 ATRA 显示对于初级的人 RPE 培养物的生长的抗增生作用。视黄醛衍生物兴奋剂也已经显示降低视网膜再附着手术后视网膜脱离的机会 [Fekrat et al. Ophthalmology 102:412 (1994)]。如下列实施例中所公开的内容，我们分析了 AGN 193109 负性激素抑制在初级人 RPE 培养物中生长的能力。

实施例 19 介绍了用于证明 AGN 193109 加强在人视网膜色素上皮细胞的初级培养物中的视黄醛衍生物拮抗剂的抗增生作用。

实施例 19

AGN 193109 加强 ATRA 的抗增生活性

根据 Campochiaro 等人[Invest. Ophthal & Vis. Sci. 32:65 (1991)]中所述方法确立人视网膜色素上皮细胞(RPE)的初级培养物。将 5×10^4 细胞平面接种到在 24 孔多孔接种板的 16-mm 孔的含有 5% FBS 的 DMEM (Gibco) 中。细胞模拟用单独的乙醇溶媒、乙醇中的 ATRA (10^{-10} - 10^{-6} M)、乙醇中的 AGN 193109 (10^{-10} - 10^{-6} M) 或 ATRA (10^{-10} - 10^{-6} M) 和 10^{-6} M 的 AGN 193109 处理。给细胞提供含有合适浓度的这些化合物的新的培养基，每两天一次，总共处理 5 天。通过用胰蛋白酶温和消化自所述接种板上转移细胞，用电子细胞计数器记录细胞数量。

在图 17 中所示的结果显示 AGN 193109 令人注目地加强 ATRA 对于 RPE 细胞的抗增生活性。用 ATRA 处理初级 RPE 细胞导致在 RPE 细胞增生方面剂量依赖性降低，与对照培养物相比在 10^{-6} M ATRA 下降低约 40%。在所述过程中任何检测浓度下，AGN 193109 处理基本不改变 RPE 细胞的生长速度。出乎意料的是，ATRA (10^{-11} - 10^{-6} M) 和 10^{-6} M 的 AGN 193109 的联合使用具有比单独的 ATRA 更强的抗增生活性。从而，AGN 193109 共处理加强 ATRA 的抗增生作用。更准确地说，在所述图中所示的结果表明只使用 10^{-10} M ATRA 结合 10^{-7} M AGN 193109 可以获得 10^{-8} M ATRA 的抗增生作用。从而，AGN 193109 负性激素可有利地提高 ATRA 的抗增生活性约 100 倍。

在独立的实验中，比较 ATRA (10^{-11} - 10^{-6} M)与 ATRA 和 10^{-6} M 的 AGN 193109 的抗增生作用再次表明在 AGN 193109 存在下，初级 RPE 细胞对于 ATRA 的敏感性明显增加。在该系统中，AGN 193109 当单独适用时，既不作为视黄醛衍生物拮抗剂发挥作用，也不显示抗增生作用。然而，共同给予 AGN 193109 加强所述视黄醛衍生物兴奋剂的抗增生作用。

使用上述测定 RPE 细胞增生的条件和技术，检验 AGN 193109 在初级 RPE 培养物中加强 13-顺式视黄酸(13-顺式 RA)的抗增生作用。引人注目的是，13-顺式 RA 在临床上重要的化合物。更具体地说，13-顺式 RA 结合干扰素 2α [Lippman et al. J. Natl. Cancer Inst. 84:241 (1992); Moore et al. Seminars in Hematology 31:31 (1994)]用于治疗几种疾病，包括痤疮[Peck et al. N. Engl. J. Med. 300:329 (1977); Jones et al. Br. J. Dermatol. 108:333 (1980)]和皮肤和子宫颈鳞状细胞癌。

在图 18 中所示结果显示 13-顺式 RA (10^{-12} - 10^{-6} M)和 ATRA (10^{-12} - 10^{-6} M)均可以有效地抑制 RPE 细胞生长。引人注目的是，13-顺式异构体当与 ATRA 比较在该测试中效力约低两个数量级。与使用 AGN 193109 和 ATRA (上述)共同给药获得的结果类似，共同给予 AGN 193109(10^{-8} 或 10^{-6} M)及 13-顺式 RA (10^{-12} - 10^{-6} M)在 RPE 细胞增生的调节表达中显著地增加 13-顺式 RA 的效力。与单独用 13-顺式 RA 处理相比，共同给予 AGN 193109 提高了 13-顺式 RA 的效力。从而，AGN 193109 加强 13-顺式 RA 的抗增生活性。

其次，我们检验了 AGN 193109 加强初级 RPE 细胞培养物中其它核受体激素的活性的能力。地塞米松(合成糖皮质激素受体兴奋剂)为一类因其有效的抗炎和免疫抑制性质临床上已经使用的化合物的一个成员。甲状腺激素(T3; 3,3',5'-三碘代甲状腺氨酸)为主要用于在治疗甲状腺机能减退的激素替代疗法中的天然甲状腺激素受体兴奋剂。用于这些实验中的方法与上述用于使用 ATRA 和 13-顺式 RA 过程中所述方法一致。

这些方法的结果显示共同给予 AGN 193109 和所述核受体兴奋剂加强所述核受体兴奋剂的抗增生活性。更准确地说, 在图 19 中所示结果显示用地塞米松(10^{-11} - 10^{-6} M)或 ATRA(10^{-12} - 10^{-6} M)单一药物处理 RPE 细胞基本不能够抑制 RPE 细胞的增生。然而, 用地塞米松(10^{-11} - 10^{-6} M)和 10^{-8} 或 10^{-6} M 的 AGN 193109 处理 RPE 细胞阻遏 RPE 细胞增生到大约为用 ATRA 处理所引起的抑制的程度。类似地, 图 20 中所示结果显示 AGN 193109 加强甲状腺激素的抗增生活性。与使用地塞米松所得结果类似, RPE 细胞的增生对于使用甲状腺激素(10^{-11} - 10^{-6} M)单独药物处理为不应有的。然而, 使用甲状腺激素(10^{-11} - 10^{-6} M)和 AGN 193109 (10^{-8} 或 10^{-6} M)共同处理 RPE 细胞, 以甲状腺激素依赖性方式抑制 RPE 细胞的增生。我们得出结论: AGN 193109 使得初级 RPE 培养物对于这些核受体兴奋剂的抗增生作用敏感。AGN 193109 介导这些作用的机理可能涉及调节 NCP/RAR 的相互作用。

此外, 我们检验了对于视黄醛衍生物兴奋剂敏感的其它实验系统中 AGN 193109 对于标记基因表达的作用。已知 MRP8 和 stromelysin 基因在各种生物系统中受到视黄醛衍生物兴奋剂的抑制作用。例如, Wilkinson 等人[J. Cell Sci. 91:221 (1988)]和 Madsen 等人[J. Invest. Dermatol. 99:299 (1992)]已经公开在牛皮癣中 MRP8 基因的表达被提高。相反, 在人的牛皮癣皮肤(Nagpal et al., submitted 1995)、在人的角化细胞培养物[Chandraratna et al. J. Invest. Dermatol. 102:625 (1994)]和在培养的人的新生包皮角化细胞[Thacher et al. J. Invest. Dermatol. 104:594 (1995)]中视黄醛衍生物兴奋剂 AGN 190168 阻遏 MRP8 基因的表达。Nagpal 等人[J. Biol. Chem. 270:923 (1995)]已经公开了在培养的人的新生包皮角化细胞中, 视黄醛衍生物兴奋剂例如 AGN 190168 阻遏 stromelysin mRNA 的水平。我们分析了在用 AGN 191183 兴奋剂或 AGN 193109 处理培养的人的新生包皮角化细胞后, 这些基因调节的表达。

实施例 20 介绍用于显示 AGN 193109 抑制在培养的人的角化细胞中的

MRP-8 的表达。

实施例 20

AGN 193109 抑制在角化细胞中的 MRP-8 的表达

根据 Nagpal 等人[J. Biol. Chem. 270:923 (1995)]所述方法将初期
5 的包皮角化细胞分离并在购自 Clonetics 的角化细胞生长培养基(KGM)
中培养。用 AGN 191183 (10^{-7} M)或 AGN 193109 (10^{-6} M)处理 3 天后,
按照标准方法,自处理和对照角化细胞中分离总的细胞 RNA。使用作
为甘油醛磷酸盐脱氢酶(GAPDH)看家基因或 MRP-8 特异的引物将其
mRNA 逆转录成为 cDNA,它然后在扩增记录中作为模板。所述
10 GAPDH 引物具有以下序列:

5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3'(SEQ ID NO:6)和 5'-
TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'(SEQ ID NO:7)。所述 MRP-8
引物具有的序列为: 5'-ACGCGTCCGGAAGACCTGGT-3'(SEQ ID
NO:8)和 5'-ATTCTGCAGGTACATGTCCA-3'(SEQ ID NO:9)。从 12 个
15 循环开始到 21 个循环结束的每一个循环 PCR 扩增后,转移来自 MRP-8
扩增反应的等份试样(10 μ l)。类似地,从 15 个循环开始到 24 个循环
结束的每一个 PCR 循环后,转移 GAPDH 扩增反应的等份试样。将样
品在 2%琼脂糖凝胶中进行电泳并通过溴化 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基
菲啶喹啉染色检测所分离的扩增产物。所述扩增产物的染色强度作为对
20 于给定的引物系列特异性的起始 mRNA 的定量测定。

该过程的结果显示 AGN 191183 和 AGN 193109 独立地抑制
MRP-8 在角化细胞中的表达。所述染色 GAPDH 扩增产物的强度在代
表自对照物、AGN 191183 就 AGN 193109 处理的角化细胞中分离的
起始物质的凝胶的流道中基本为相等的。代表 GAPDH 扩增产物的弱
25 带为在相应 18 个循环的 PCR 扩增后转移的样品的流道中首先可检
测到的。在凝胶的不同流道中等量染色强度表明等量的起始物质用于
所有样品中。因此,在代表 MRP-8 扩增产物的染色带的强度中的差异
表示在不同的起始样品中 MRP-8 mRNA 表达中的差异。如同所预料

的，与未处理的对照相比，在 AGN 191183 (10^{-7} M)处理的培养基中使 MRP-8 扩增信号被抑制。如通过染色扩增产物的较低强度所判断的，AGN 193109 (10^{-6} M)处理培养的角化细胞也阻遏 MRP8 的表达。

如下列实施例中所述，AGN 193109 也抑制在角化细胞中第二标记基因的表达。Nagpal 等人[J. Biol. Chem. 270:923 (1995)]公开了 stromelysin mRNA 表达在培养的人的新生包皮角化细胞中受 RAR 特异性兴奋剂的下行调节。Nicholson 等人[EMBO J. 9:4443 (1990)]公开 AP-1 启动子元件在 stromelysin-1 基因的视黄醛衍生物依赖性负性调节中起着重要的作用。从而，确定 AGN 193109 是否可以改变该基因的表达是重要的。

实施例 21 介绍用于证明 AGN 193109 在无外源性加入的视黄醛衍生物兴奋剂存在的情况下抑制 stromelysin-1 基因的表达。

实施例 21

AGN 193109 抑制在培养的角化细胞中的 stromelysin-1 的表达

用 RAR 兴奋剂 AGN 191183 (10^{-7} M)或 AGN 193109 (10^{-6} M)将初期包皮角化细胞模式处理或处理 24 小时。由模式处理和视黄醛衍生物处理的角化细胞制备的总的 RNA 反式转录并完全按照 Nagpal 等人[J. Biol. Chem. 270:923 (1995)]所述方法，使用 β -肌动蛋白或 stromelysin-1 寡引物使所形成的 cDNA PCR 扩增。从 PCR 扩增的 18 个循环开始的每 3 个循环后，自所述 PCR 扩增反应转移样品(10 μ l)。将该样品在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳并在溴化 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶酮染色后进行检测。

这些过程的结果表明 AGN 193109 在没有外源性加入的视黄醛衍生物兴奋剂的情况下抑制 stromelysin 基因表达。更准确地说，代表 β -肌动蛋白扩增产物的溴化 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶酮染色带在 PCR 的 18 个循环后的琼脂糖凝胶中是容易检测的。尽管所有带强度随着所述扩增作用循环的增加而增加，代表 AGN 191183 处理细胞的样品中染色带强度略有降低。这表明稍降低量的 RNA 必定已经存在于相

应用 AGN 191183 处理的细胞的起始样品中。该结果也表明 stromelysin-1 mRNA 在 PCR 扩增的 33 个循环开始的模式处理的角化细胞中是可检测的。如所期待的，如通过与来自模式处理样品的样品相比的较弱的带的强度所判断的，AGN 191183 (10^{-7} M) 处理后，
5 stromelysin-1 mRNA 的表达受到抑制。当使常态化到 β -肌动蛋白扩增产物的强度并与在 MRP-8 表达测定中所获得的结果一致时，角化细胞的 AGN 193109 (10^{-6} M) 处理导致下行调节 stromelysin-1 mRNA 的水平。实际上，由 AGN 193109 处理刺激的下行调节与用 RAR 兴奋剂 AGN 191183 处理角化细胞引起的下行调节无区别。

10 正如在此所公开的，AGN 193109 可以具有调节共同给予的甾体超家族兴奋剂活性的三种可能作用中的任何一种。首先，AGN 193109 可以没有作用。其次，AGN 193109 可以拮抗所述兴奋剂的作用，从而导致所述兴奋剂活性的降低。最后，AGN 193109 可以加强所述兴奋剂的活性，从而导致由所述兴奋剂产生的测定的效果的刺激作用。

15 具有可以被 AGN 193109 所调节的活性的化合物包括视黄醛衍生物受体兴奋剂和与甾体受体超家族的其它成员结合的兴奋剂。后一类型的兴奋剂包括维生素 D 受体兴奋剂、糖皮质激素受体兴奋剂和甲状腺激素受体兴奋剂。具有目前未知配体的过氧化物酶增生剂-激活受体、雌激素受体和孤儿受体也可以被 AGN 193109 加强。其中所述甾体
20 超家族兴奋剂为 RAR 兴奋剂的情况下，AGN 193109 可以拮抗或加强该兴奋剂的活性。其中与 AGN 193109 结合使用的兴奋剂为可以与除了 RAR 外的核受体结合的化合物的情况下，共同给予 AGN 193109 将没有作用或对该兴奋剂系统变得敏感，以至使该兴奋剂的活性得到加强。

25 用于检测在具体系统中 AGN 193109 将具有三种可能活性中的哪一种的一般化实例性方法如下。本说明书介绍 AGN 193109 与甾体受体超家族兴奋剂共同给药的每种可能的结果。用于评价 AGN 193109 调节核受体兴奋剂活性的能力的生物学系统包括(但不限于): 已建立

组织培养细胞系、病毒转化细胞系、体外-体内初级培养细胞和利用活体的体内研究。在这类系统中，AGN 193109 生物作用的测定可以包括测定各种生物学端点(endpoint)的任何一个。这些端点包括：细胞增生分析、程序化细胞死亡分析(apoptosis)、通过基因表达测试的细胞差异状态分析、细胞在裸鼠中形成肿瘤能力的分析和短暂和稳定的引种报告基因构成物后基因表达的分析。

为了说明，指定为 mRNA “X” 的 mRNA 种在自器官 “Z” 分离的初级培养的 “Y” 细胞中由基因 “X” 表达。在标准的培养条件下，其中保留几个 “Y” 细胞遗传标记，包括基因 “X” 的表达，加入视黄醛衍生物兴奋剂导致 “X” mRNA 富余性的降低。通过分离细胞 mRNA 和通过聚合酶链反应、核糖核酸酶保护或 RNA 印迹方法例如 Northern 分析测定 X mRNA 富余性水平可以评价基因 X 的表达的分析。在分离器官 Z 后，在合适的生长培养基中培养初级 Y 细胞。然后，将该初级培养物接种到用于放大细胞群的组织培养接种板中。该步骤有助于将所述细胞分离成 4 个样品组，以便可以使用各种剂量的视黄醛衍生物兴奋剂和 AGN 193109。第一组为对照组，只接受溶媒。第二组以足以提供最终浓度为 10^{-11} - 10^{-6} M 的量接受 RAR 兴奋剂、视黄酸(在乙醇中给予)。最低剂量可以根据所述系统的敏感性由经验确定。该确定方法在本领域内普通技术人员所知的一般实验范围内。第三组将以处理第二组细胞所用的相同剂量接受所述核受体兴奋剂和接受常量的 AGN 193109。用于处理第三组细胞的 AGN 193109 的剂量将由经验确定，但应该接近于 AGN 193109 对于 RAR 亚型的亲和力常数(Kd)(即至少 10^{-8} M)。第四组接受最低剂量的 AGN 193109，包括用于在第三组中兴奋剂共同给药。作为该剂量制度的改变将用 AGN 193109 代替上述实施例中所述的视黄醛衍生物兴奋剂，具体在第二组中，并用常量的视黄醛衍生物兴奋剂代替 AGN 193109，具体在第三和第四组中。在合适的孵育期后，以适于检测作为兴奋剂活性的指示器测定的生物学端点的方式收获细胞。

例如，分析 AGN 193109 对于基因表达的视黄酸依赖性调节的作用包括在自根据上述四种方案中每一种处理的细胞收获的 mRNA 储备中，比较 mRNA 种 X 的富余性。来自所述对照细胞的 RNA 将用作测定 X mRNA 的基线表达并代表相应于不阻遏的条件。将该水平与用视黄酸处理的细胞衍生的 mRNA 的储备中测定的水平相比较可以测定该兴奋剂对于基因表达的作用。然后，可以将定量水平的产生于视黄酸处理的特异性 mRNAs 表达与来自用单独的 AGN 193109 或与视黄酸结合的 AGN 193109 平行处理细胞的 mRNA 富余性相比较。该一般化的实例介绍了共同给予 AGN 193109 对于由视黄醛衍生物兴奋剂阻遏的基因表达作用的分析的同时，该实例另外也介绍了共同给予 AGN 193109 对于由视黄醛衍生物兴奋剂所诱导的基因的作用的分析。用于确定是否 AGN 193109 将作为兴奋剂、作为负性激素发挥作用或在特定系统中无作用的重要特征包括定量地比较存在和不存在 AGN 193109 情况下所述作用的大小。

其中 AGN 193109 加强共同给予的兴奋剂的活性的实例为与视黄酸共同给予 AGN 193109 产生相对单独用视黄酸处理的细胞所测水平的被进一步阻遏的 X mRNA 表达的水平的情况。更准确地说，比较在 Y 轴上的生物作用(即对 X mRNA 富余性的阻遏作用)对于 X 轴上的兴奋剂的剂量(对数尺度)的剂量应答曲线，能够比较存在和不存在 AGN 193109 共同给药的情况下，兴奋剂介导对 X mRNA 富余性的阻遏作用。通过在所述剂量应答曲线中向左位移而表明 AGN 193109 使对于所述兴奋剂的生物应答敏感化，从而加强所述兴奋剂活性的能力。更准确地说，在存在 AGN 193109 的情况下，将需要较少的兴奋剂以便获得与单独使用所述兴奋剂所获得的相同的生物学作用。

共同给予兴奋剂的 AGN 193109 介导的拮抗作用的实例为其中与视黄酸共同给予 AGN 193109 产生与单独用视黄酸处理的细胞中所测水平相比被阻遏较低的 X mRNA 表达的水平的情况。比较在存在和不存在 AGN 193109 情况下，X mRNA 阻遏对于兴奋剂剂量的 log 值的

剂量应答曲线表明在所述剂量应答曲线中向右位移。更准确地说，在存在 AGN 193109 的情况下，需要更多的兴奋剂以便获得与单独使用所述兴奋剂所获得的相同的生物学作用。

其中 AGN 193109 介导拮抗作用或加强作用的上述实例介绍 AGN 193109 与视黄醛衍生物兴奋剂共同给药的实验结果。然而，如果与 AGN 193109 共同给予的所述兴奋剂为能够与除了 RAR 之外的甾体受体超家族成员结合并激活，则不是拮抗该兴奋剂，AGN 193109 可能对于所述兴奋剂的活性没有作用。如果 AGN 193109 与这类兴奋剂共同处理产生与单独使用兴奋剂处理细胞所测水平相同的 mRNA 表达的水平，则 AGN 193109 通过促进 RAR:NCP 结合影响 NCPs 的有效性的能力在该系统中不显示。这是 AGN 193109 对于共同给予的兴奋剂没有作用的实例。

拮抗作用实例

在实施例 7 中所述方法中例举了用于测定 AGN193109 与视黄醛衍生物兴奋剂共同给药作用的一般化的实例中所介绍的方法。使用乙醇(对照, 组 1)、最终浓度为 10^{-9} - 10^{-6} M 的 AGN 193109(组 2)、与 10^{-8} M 的视黄酸共同给药的终浓度为 10^{-9} - 10^{-6} M 的 AGN 193109(组 3)或视黄酸(10^{-8} M, 组 4)处理与三种视黄酸受体之一共转染的 CV-1 细胞和所述视黄醛衍生物兴奋剂诱导的 MTV-TREp-Luc 受体构成物。将组 1 的荧光素酶活性与组 4 的荧光素酶活性相比能够测定在无加入的 AGN 193109 存在下测定视黄醛衍生物兴奋剂诱导的荧光素酶报告基因的表达。将在组 3 细胞中荧光素酶报告基因表达与在组 4 细胞中测定的结果相比较表明 AGN 193109 在该系统中作为视黄醛衍生物兴奋剂的抑制剂发挥作用。

拮抗作用的实例

用于测定 AGN193109 与视黄醛衍生物兴奋剂共同给药作用的一般化的实例中所介绍的方法在实施例 17 中类似地用于测定 AGN 193109 在 ECE-16-1 转化的颈上皮细胞中作为视黄醛衍生物兴奋剂介

导的对 EGF-刺激的细胞增生阻遏作用的拮抗剂的功能。在该过程中，ECE-16-1 细胞的处理包括单独用 EGF 处理对照样品(组 1)、用 EGF 和 AGN 193109 的组合物以终浓度为 10^{-6} M(组 2)处理样品、用终浓度为 10^{-10} - 10^{-6} M EGF 和 AGN 193109 的组合物与浓度为 10^{-8} M 的单剂量的视黄醛衍生物兴奋剂 AGN 191183 共同给药(组 3)处理样品和用浓度为 10^{-8} M 的 EGF 和 AGN 191183 组合物(组 4)处理样品。在处理三天后，测定细胞增生速率。测定由 EGF 已经刺激增生的细胞是可能的，因为包括其它对照处理，其中将细胞置于不含有 EGF 的限定培养基中。将组 1 中细胞的数目与组 4 中细胞的数目比较能够测定 RAR 兴奋剂 AGN 191183 阻遏 EGF-刺激的 ECE-16-1 细胞的增生。比较组 3 与组 4 表明 AGN 193109 拮抗该系统中 RAR 兴奋剂的活性。

增强作用实例

用于测定 AGN193109 与视黄醛衍生物兴奋剂共同给药作用的一般化的实例中所介绍的方法也用于实施例 14 中，以便确定 AGN 193109 加强在用 1,25-二羟基维生素 D₃ 诱导的 MTV-VDRE-Luc 报告基因转染的 Hela 细胞中核受体兴奋剂的活性。转染细胞的处理包括单独溶媒(对照, 组 1)、终浓度为 10^{-10} - 10^{-7} M 的 1,25-二羟基维生素 D₃ (组 2)、终浓度为 10^{-10} - 10^{-7} M 的 1,25-二羟基维生素 D₃ 与终浓度为 10^{-8} 或 10^{-7} M 的 AGN 193109 共同给药(组 3)和以终浓度为 10^{-8} 或 10^{-7} M 的 AGN 193109 的单一药物处理(组 4)。将组 1(对照)细胞中所测荧光素酶活性与组 2 细胞荧光素酶活性比较能够确定 1,25-二羟基维生素 D₃ 刺激荧光素酶活性为剂量依赖性的。比较在组 4(AGN 193109 单独给药处理)细胞中测定的荧光素酶活性与在组 3(共同给予 AGN 193109)细胞中测定的荧光素酶活性，类似地能够在给定浓度的 AGN 193109 的存在下测定剂量依赖性 1,25-二羟基维生素 D₃ 刺激的荧光素酶活性。在该情况下，零值代表在单独用 AGN 193109(组 4)处理的细胞中荧光素酶活性。该剂量制度考虑比较 1,25-二羟基维生素 D₃ 三种剂量应答曲线。比较无 AGN 193109 情况下 1,25-二羟基维生素 D₃ 的剂量应答曲

线与代表共同给予 AGN 193109 (10^{-8} 或 10^{-7} M) 的曲线的结果证明如通过在半数最大应答中向左位移所证实的加强所述兴奋剂的活性。

增强作用的实例

5 在用于测定 AGN 193109 与视黄醛衍生物兴奋剂共同给药的作用的一般化的实例中所述方法进一步用于在实施例 19 中测定 AGN 193109 加强在人视网膜色素上皮细胞的初级培养物中 RAR 兴奋剂的抗增生活性。细胞的处理包括：单独的乙醇溶媒(组 1)、以终浓度为 10^{-10} - 10^{-6} M 的视黄酸(组 2)、以终浓度为 10^{-10} - 10^{-6} M 的视黄酸共同给予 10^{-6} M AGN 193109 (组 3)和以终浓度为 10^{-10} - 10^{-6} M 单独的 AGN 10 193109(组 4)。比较使用组 1 和组 2 细胞获得的测定结果考虑确定通过视黄酸的剂量依赖性抑制这些细胞的增生。类似地，比较使用组 3 细胞获得的结果与组 1 所获结果考虑确定在共同给予 AGN 193109 的情况下，通过视黄酸的剂量依赖性抑制这些细胞的增生。组 4 证明 AGN 193109 当作为单独处理药物时，基本上没有改变这些细胞增生速率的能力。比较在组 2 和组 3 中产生的视黄酸介导细胞增生的阻遏作用的剂量应答曲线为 AGN 193109 使初级 RPE 细胞对于所述 RAR 兴奋剂的抗增生作用敏感，从而加强 RAR 兴奋剂活性的结论提供基础。

15 如上所述，Agarwal 等人[Cancer Res. 54:2108 (1994)]认为与 HPV 永生化 ECE-16-1 细胞生长不同，CaSki 细胞的生长不受用视黄醛衍生物兴奋剂处理的抑制。如同在此所公开的内容，我们出乎意外地发现在不存在视黄醛衍生物兴奋剂的情况下，CaSki 细胞的生长受到 AGN 193109 的抑制。以下实施例解释 AGN 193109 如何用于抑制体内 CaSki 细胞瘤的生长。

实施例 22

25 在给予 AGN 193109 后抑制 CaSki 细胞瘤在裸鼠中的生长

将 1×10^6 CaSki 细胞注射到一组裸鼠的每一只中。使用对于本领域内技术人员所熟知的技术评价肿瘤的形成。注射后，将小鼠随机分成对照组和试验组。所述对照组接受空白药。试验组给予 AGN

193109。给予空白药的动物接受胃内插管给予玉米油。在治疗期间，试验组的动物每天接受 20 $\mu\text{mol/kg}$ 玉米油中的 AGN 193109。使用有刻度的测径器测定以立方毫升为单位的肿瘤体积。以肿瘤体积作为时间的函数作图。通过在研究期间肿瘤的大小和数目来判断，接受 AGN 193109 的小鼠与对照组小鼠的肿瘤相比显示其肿瘤在生长速率上明显较低。该结果提供体内的证明即 AGN 193109 抑制对包括给予视黄醛衍生物兴奋剂的治疗具有耐药性的晚期颈癌的生长。

如上所述，CaSki 细胞为颈肿瘤的模式，它们对于视黄醛衍生物兴奋剂治疗不应答。然而，我们公开在不用视黄醛衍生物兴奋剂治疗的情况下，用 AGN 193109 抑制 CaSki 细胞的生长。AGN 193109 抑制 CaSki 细胞增生的能力提示 AGN 193109 可以用于治疗对于视黄醛衍生物兴奋剂治疗不敏感的颈癌。下列实施例介绍一种能用于评价 AGN 193109 在治疗颈癌方面的治疗效果的方法。

实施例 23

15 评价在患有颈癌的患者中 AGN 193109 的治疗效果

首先鉴定具有晚期颈癌的患者。根据本领域内普通技术人员所熟知的方法进行颈组织活检。根据标准技术将来自扩散肿瘤的细胞在组织培养基中繁殖，以便提供足以分成三个样品组的细胞数目。为此使用 Agarwal 等人[Cancer Res. 54:2108 (1994)]所述的培养条件。第一组作为对照组并接受单独的溶媒(乙醇)。第二组用浓度为 10^{-10} - 10^{-6} M 的 RAR 兴奋剂视黄酸处理。第三组用剂量范围在 10^{-10} - 10^{-6} M 的 AGN 193109 处理。每日为细胞提供新的生长培养基并提供对于每个样品组为适当的上述视黄醛衍生物。三天后，使用电子细胞计数器记录细胞个数。比较对照培养物中细胞的数目与在视黄酸处理培养物中细胞的数目的结果表明 RAR 兴奋剂基本不抑制培养的颈癌细胞的生长速度。相反，用 AGN 193109 处理的细胞显示当与对照组中的细胞计数相比时，在细胞数目上显示剂量依赖性降低。其中 AGN 193109 处理抑制培养的颈癌细胞增生的结果显示 AGN 193109 是用于治疗具有转

移的颈癌患者的有用的治疗剂。

在目的是证明 AGN 193109 在所述疾病中的有益的治疗作用的随机临床研究中，招募已经经过外科手术除去主要的肿瘤的颈癌患者。将患者分成两组。第一组为对照组而第二组用 AGN 193109 治疗。将 AGN 193109 与药学上可接受的赋形剂混合产生适于全身给药的组合物，所用技术为本领域内的技术人员所熟知的。所述对照组给予空白制剂试验组给予含有 AGN 193109 负性激素的所述制剂。以最大耐受剂量给药于患者每隔一天给药，持续三个月到一年。通过测定一定时间后的无疾病存活使所述研究的结果定量。接受 AGN 193109 的各患者显示在无疾病存活上的显著地增加，包括显示其转移疾病完全缓解的一些不成比例的患者。该结果显示 AGN 193109 具有体内治疗对视黄醛衍生物兴奋剂例如视黄酸的抗增生作用不应答的颈癌的用途。

如上所述，AGN 193109 加强在人视网膜色素上皮细胞的初级培养物中 RAR 兴奋剂的抗增生活性。因此，合理的期待在体内共同给予 AGN 193109 和 RAR 兴奋剂增加该兴奋剂的治疗指数，因为为获得相同的治疗终点将需要较少量的 RAR 兴奋剂。此外，已经证明 AGN 193109 使得人视网膜色素上皮细胞的初级培养物对于糖皮质激素和甲状腺激素受体兴奋剂的抗增生作用敏感。下列 PVR 兔模型将用于两种独立的研究中，以便证明通过共同给予 AGN 193109 和 RAR 兴奋剂(13-顺式视黄酸)或分别给予甲状腺激素受体兴奋剂增加治疗指数。引人注意的是由 Sen 等人[Arch. Ophthalmol. 106:1291 (1988)]提出的兔视网膜重新脱离模型已经用于证明在体外抑制初级 RPE 细胞增生的视黄醛衍生物兴奋剂也降低体内视网膜脱离的次数[Araia et al. Invest. Ophthalmol. 34:522 (1993)]。从而，对于它们作为预防视网膜脱离的药物而言，在体外和体内视黄醛衍生物的兴奋剂的活性之间的联系已经建立。下列实施例解释 AGN 193109 如何可以用于针对预防视网膜脱离的治疗用途中。

实施例 24

AGN 193109 在治疗增生性玻璃体视网膜病(PVR)中增加甾体超家族受体兴奋剂的治疗性的用途

在第一个研究中, 根据 Sen 等人[Arch. Ophthalmol. 106:1291 (1988)]
5 所述的方法将人 RPE 细胞注射入兔眼的玻璃体腔。玻璃体腔内注射
后, 将兔分为五组: 第一组(对照)通过玻璃体内注射单独接受溶媒。
第二组通过玻璃体内注射接受作为单独药物治疗的视黄酸(100 μg)。第
三组通过玻璃体内注射接受作为单独药物治疗的 AGN 193109(100
10 μg)。第四组通过玻璃体内注射接受以组 2 给药量的 1/10 剂量的 RAR
兴奋剂(视黄酸)(10 μg)。第五组通过玻璃体内注射接受 AGN
193109(100 μg)和视黄酸(10 μg)的组合物。在玻璃体内注射人 RPE 细
胞后一天动物接受单独玻璃体内注射适当的治疗药物。通过间接检眼
镜检查法在第 7 天、第 14 天和第 28 天检查兔子并就牵引性视网膜脱
离的次数和严重性评分。注射 100 μg 视黄酸组中的兔子显示与对照组
15 兔子或单独接受 AGN 193109 或视黄酸(10 μg)的兔子相比显著地降低
视网膜脱离的次数和严重性。共同给予 AGN 193109 和视黄酸(10 μg)
组中的兔子与对照组、AGN 193109 或视黄酸(10 μg)组中的兔子相比
显示显著地降低视网膜脱离的次数和严重性。这些结果证明 AGN
193109 改善 PVR 体内模型中 RAR 兴奋剂视黄酸的治疗指数。

20 在第二个研究中, 首先提供将人 RPE 细胞注射入兔眼的玻璃体腔
中的兔子, 然后分成四个组。第一组(对照)通过玻璃体内注射单独接
受溶媒。第二组通过玻璃体内注射接受作为单独药物治疗的甲状腺激
素(100 μg)。第三组通过玻璃体内注射给予作为单独药物治疗的 AGN
193109(100 μg)。第四组给予 AGN 193109(100 μg)和甲状腺激素(100 μg)
25 的组合物。通过间接检眼镜检查法在第 7 天、第 14 天和第 28 天检查
兔子并就牵引性视网膜脱离的次数和严重性评分。比较所述四个组中
视网膜脱离的次数和严重性的结果显示用 AGN 193109 或甲状腺激素
的单独药物治疗当与对照组兔子相比不抑制视网膜脱离。相反, 给予

AGN 193109 和甲状腺激素组合物的组的兔子显示明显降低视网膜脱离的次数和严重性。该结果证明 AGN 193109 改善 PVR 体内模型中甲状腺激素的治疗指数。

5 以下实施例介绍 AGN 193109 如何用于提高 RAR 兴奋剂用于治疗视网膜重新再附着外科手术患者的治疗指数。

实施例 25

增加 RAR 兴奋剂 13-顺式视黄酸治疗指数

首先鉴定具有由 PVR 引起的视网膜脱离的一些成年自愿者。每个人均经过使用本领域内标准技术进行的视网膜脱离的外科修复手术。
10 然后，将患者分成五组。对照组由经过视网膜脱离外科修复且没有接受任何视黄醛类化合物的患者所组成。第二组在手术后每天两次口服接受 40 mg 13-顺式视黄酸达四周。第三组在手术后每日两次口服接受 40 mg AGN 103109 达四周。第四组在手术后每天两次口服接受 4 mg 13-顺式视黄酸达四周。在手术后每天两次口服接受 40 mg AGN 103109
15 结合 4 mg 的 13-顺式视黄酸达四周。基本按照 Fekrat 等人 [Ophthalmology 102:412 (1995)]所述进行治疗方案和评价药物效力。

使用为本领域内普通技术人员所熟知的检眼镜检查技术监测在 9 个月的时间内在所有五个组中术后患者视网膜重复脱离的次数和严重性。接受 40 mg 口服 13-顺式视黄酸的患者当与对照组患者、每天两次
20 接受 4 mg 的 13-顺式视黄酸的患者或每日两次接受 40 mg AGN 193109 的患者相比时显示明显地降低视网膜重复脱离的次数。检验在手术后每天两次联合接受口服 40 mg AGN 103109 和口服 4 mg 的 13-顺式视黄酸达四周患者组的结果显示在该患者组中的治疗结果等同或好于术后每天两次接受口服 40 mg 的 13-顺式视黄酸达四周的患者的治疗效果。
25 该结果证明 AGN 193109 负性激素通过降低 PVR 患者中视网膜重复脱离的次数和严重性改善 RAR 兴奋剂的治疗指数。

用于鉴定核受体负性激素的一般化检测

以上我们已经证明 AGN 193109 可以作为能够阻遏 RAR 核受体的

基础转录活性的负性激素发挥作用。其次，我们已经介绍了使用由 ERE-tk-Luc 荧光素酶报告质粒和 ER-RXR- α 及 RAR- γ -VP-16 受体表达质粒共转染的 CV-1 细胞，以便为简单拮抗剂的 RAR 配体与那些具有负性激素活性的配体区别开来的检测方法。

5 我们已经得出结论：RAR 负性激素通过促进提高 RAR 和 NCPs 之间的相互作用介导阻遏 RAR 介导的转录活性。此外，我们已经证明 AGN 193109 可以以与甾体超家族的核受体的成员之间相互分享 NCPs 一致的方式加强其它核受体兴奋剂的作用。如此，可以指定并筛选配体以便鉴定在这些非 RAR 核受体上具有负性激素活性的化合物。

10 我们的基于使用由 ERE-tk-Luc 荧光素酶报告质粒和 ER-RXR- α 及 RAR- γ -VP-16 受体表达质粒共转染的 CV-1 细胞的 RAR 负性激素筛选的方法一般可以被采用，以至将 RAR- γ -VP-16 质粒的 RAR- γ 部分转化为过氧化物酶增生剂激活受体(PPAR)、维生素 D 受体(VDR)、甲状腺激素受体(T3R)或任何其它能够与 RXR 异质二聚的甾体超家族核受体。与这些质粒共转染的 CV-1 细胞可以表达高基础水平的荧光素酶活性。能够结合取代 RAR- γ 部分的受体的配体结合结构域的配体通过测定其阻遏荧光素酶活性的能力可以容易被筛选负性激素活性。

15 对于不与 RXR 异质二聚的的甾体超家族核受体(例如糖皮质激素和雌激素受体)而言，使用 GR-VP-16 或 ER-VP-16 受体和由融合异质启动子元件和荧光素酶或其它报告基因的适宜的糖皮质激素或雌激素应答元件组成的荧光素酶报告质粒可以取得最终结果。一般化的负性激素筛选测试方法的基本特征为包括至少用于筛选反向兴奋剂的特定核受体的配体结合结构域和用于将所述核受体配体结构域集中于报告基因的启动子的方法。这可以通过使用受体的天然 DNA 结合位点或可
20 选通过构成具有异质 DNA 结合结构域的嵌合受体及相应使用在 DNA 调节元件控制下的报告基因(它可以被所述异质 DNA 结合结构域识别)而被达到。在优选实施方案中，表达可用于筛选反向兴奋剂的核受体的质粒可以表达作为含有组合激活结构域例如 HSV VP-16 激活结构域
25

的融合蛋白的该核受体，以便提供容许的高基础活性。该高基础活性有效地增加测试的灵敏度，从而使得能够分析在没有加入的核受体兴奋剂的情况下阻遏基础转录活性的核受体配体。

下列实施例介绍可以用于筛选在甲状腺激素受体上具有负性激素活性的化合物的一个方法。

实施例 26

鉴定甲状腺激素受体负性激素的方法

用荧光素酶报告质粒 ERE-tk-Luc 和质粒 ER-RXR- α 及 T3R-VP-16 共转染 CV-1 细胞。T3R-VP-16 与 RAR- γ -VP-16 相同，除了 RAR- γ -VP-16 受体的 RAR- γ 部分已经被甲状腺激素受体 cDNA 所代替。如此，T3R-VP-16 表达在与甲状腺激素受体的 N 端结构中的 HSV VP-16 的激活结构域的融合蛋白。为此使用标准的转染和细胞培养方法。在转染后，漂洗细胞并提供含有已经用活性炭提取的 10% 牛胚胎血清的生长培养基。用单独的溶媒(乙醇)、甲状腺激素(10^{-9} - 10^{-10} M) 或化合物 TR-1 (10^{-9} - 10^{-6} M) 处理细胞。TR-1 为合成的甲状腺激素受体配体，它显示在竞争性结合研究中对于所述甲状腺激素受体强的亲和力，然而它在使用甲状腺激素应答报告基因和甲状腺激素受体表达质粒的短暂共转染反式激活测试中不激活转染的甲状腺激素受体。此外，TR-1 能够拮抗甲状腺激素介导的反式激活及本身为甲状腺受体拮抗剂。

分析来自用 ERE-tk-Luc、ER-RXR- α 及 T3R-VP-16 转染的 CV-1 细胞的荧光素酶活性显示在溶媒处理的细胞中高基础水平的荧光素酶报告基因活性。用甲状腺激素处理的细胞显示以剂量依赖性方式荧光素酶的活性略有增加。用 TR-1 处理的细胞显示在荧光素酶活性中剂量依赖性降低。这表明 TR-1 显示甲状腺受体反向兴奋剂活性，假定是由于增加了 NCP 与甲状腺激素受体的相互作用。

通过用 RAR 兴奋剂处理阻遏人初级视网膜色素上皮细胞的增生速度。该观察的治疗值已经显示在视网膜重新附着手术后的术后使用视黄醛衍生物治疗中。以上我们已经证明 AGN 193109 RAR 负性激素

可以使初级 RPE 细胞对于在共同给药过程中的 ATRA 和 13-顺式视黄酸的抗增生作用敏感。此外, AGN 193109 也显示使 RPE 细胞对于其它核受体兴奋剂的抗增生作用敏感。更准确地说, AGN 193109 使 RPE 细胞对于糖皮质激素兴奋剂、地塞米松和甲状腺激素兴奋剂 3,3',5-三碘代甲状腺氨酸(T3)的抗增生作用敏感。这些数据与我们的工作模型一致, 其中 AGN 193109 调节在所述核受体家族成员之间分享的 NCPs 的有效性。用甲状腺激素受体反向兴奋剂 TR-1 处理 RPE 细胞将类似地改变分享 NCPs 的有效性, 以至与非甲状腺受体兴奋剂例如 RAR 兴奋剂 13-顺式视黄酸共同给药将导致与作为单独药物处理的 13-顺式视黄酸相比增强对于 RPE 培养物的抗增生作用。

下列实施例介绍可用于使初级 RPE 细胞对于 RAR 兴奋剂的抗增生活性更敏感的一个方法。引人注意的是, 该实施例进一步介绍通过与负性激素共同给药如何加强 RAR 兴奋剂的活性。

实施例 27

通过共同给予 TR-1 甲状腺激素反向兴奋剂使初级视网膜色素上皮细胞对于 RAR 兴奋剂的抗增生作用敏感

根据标准方法得到人初级 RPE 细胞并培养。将该培养的细胞分成四个组并如下处理。组 1 接受单独的溶媒(乙醇)。组 2 用浓度在 10^{-11} - 10^{-6} M 的 13-顺式视黄酸处理。组 3 用浓度在 10^{-11} - 10^{-1} M 的甲状腺激素反向兴奋剂 TR-1 处理。组 4 用浓度在 10^{-11} - 10^{-6} M 的 13-顺式视黄酸及 TR-1 共处理。在总的五天处理过程中每两天为细胞重新提供新的生长培养基并用合适的化合物重新处理。通过用电子细胞计数器测定培养物中的细胞数目使在所述试验过程中的增生速率定量。

TR-1 处理细胞(组 3)显示基本与对照组(组 1)细胞相同的细胞增生的速率并且这种反向兴奋剂对于所述培养物测定的生长速度没有影响。用 13-顺式视黄酸(组 2)处理的细胞显示在细胞数目上的剂量依赖性降低。比较在组 4 细胞(共同给予 13-顺式 RA 和 TR-1)的细胞增生中的剂量依赖性降低与在组 3 中所获得结果证明如同通过组 4 相对组 2

细胞, 所述 RAR 兴奋剂的剂量应答曲线向左位移所确定的, 共同给予 TR-1 甲状腺激素受体反向兴奋剂使 RPE 培养物对于 13-顺式视黄酸的抗增生作用敏感。

5

10

15

20

25

说明书附图

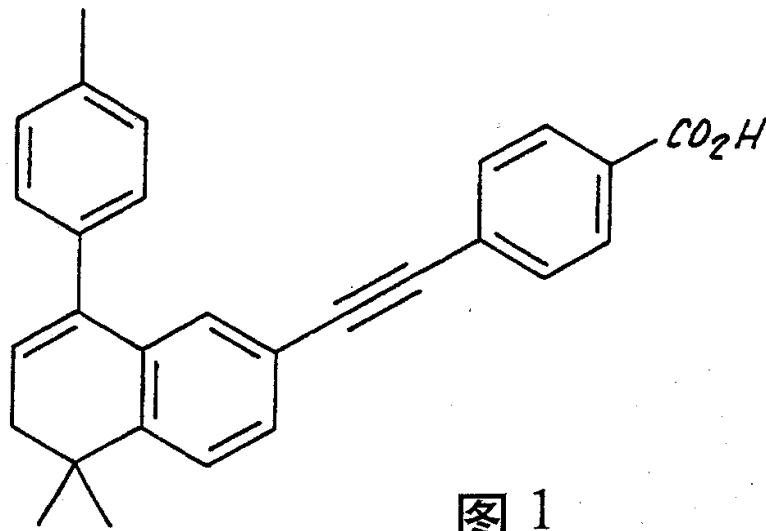


图 1

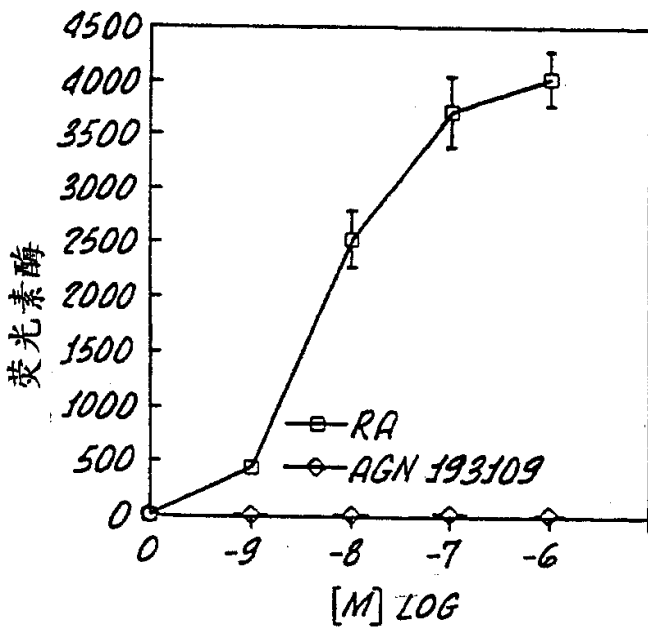


图 2A

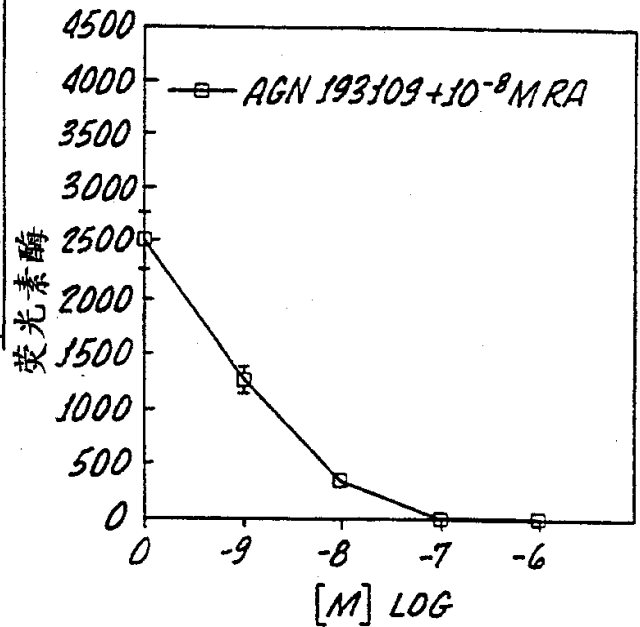


图 2B

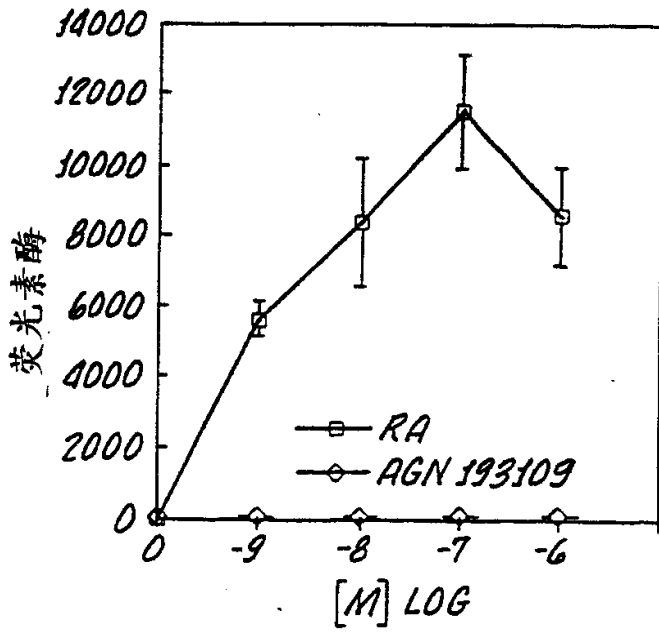


图 2C

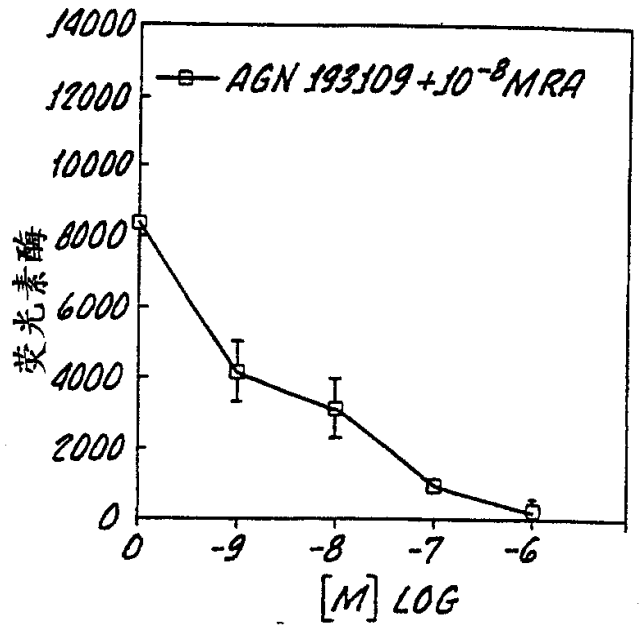


图 2D

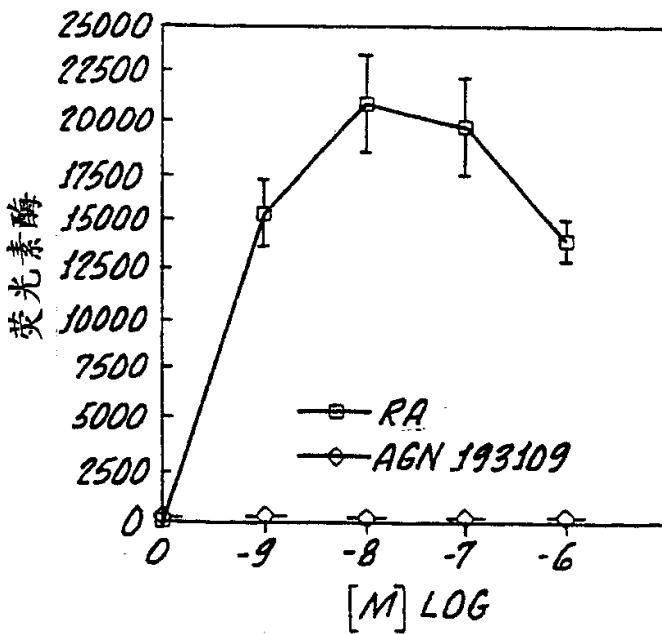


图 2E

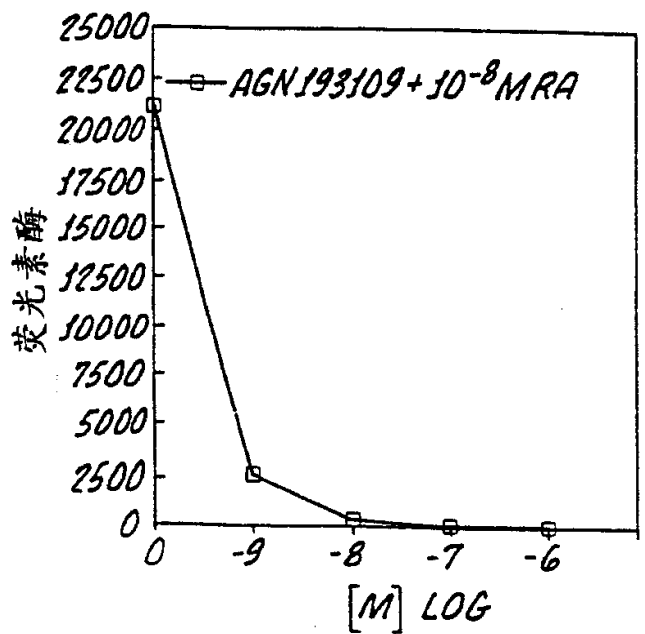


图 2F

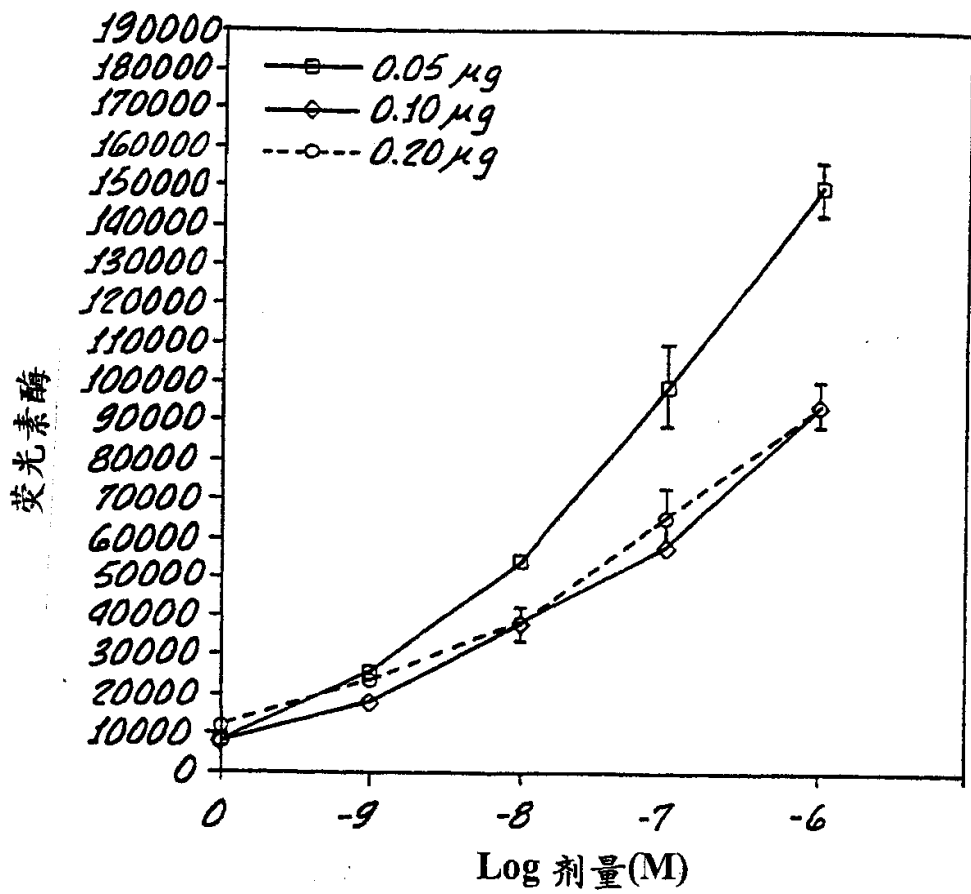


图 3A

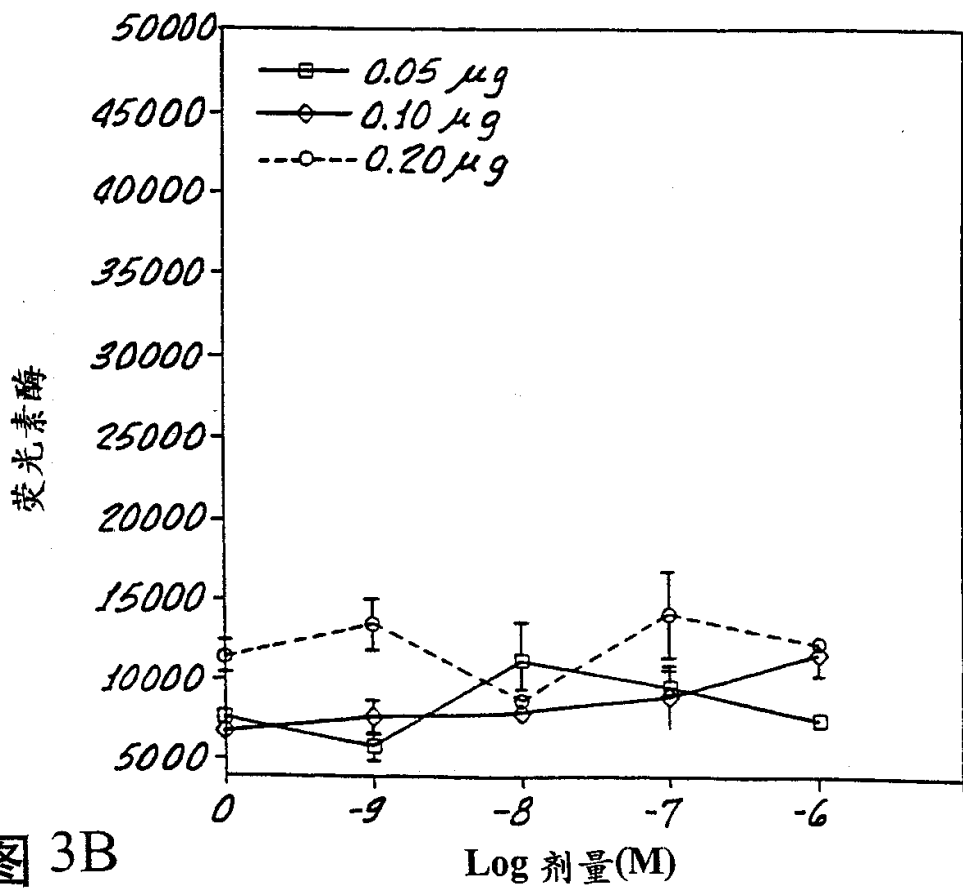


图 3B

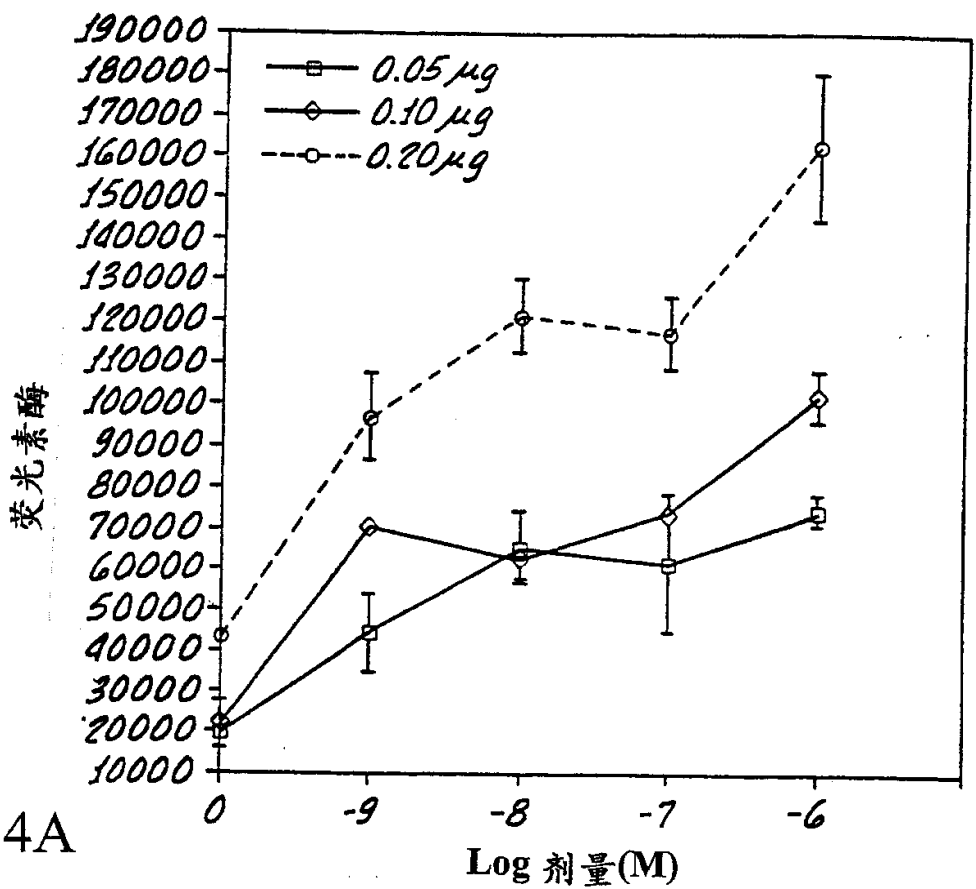


图 4A

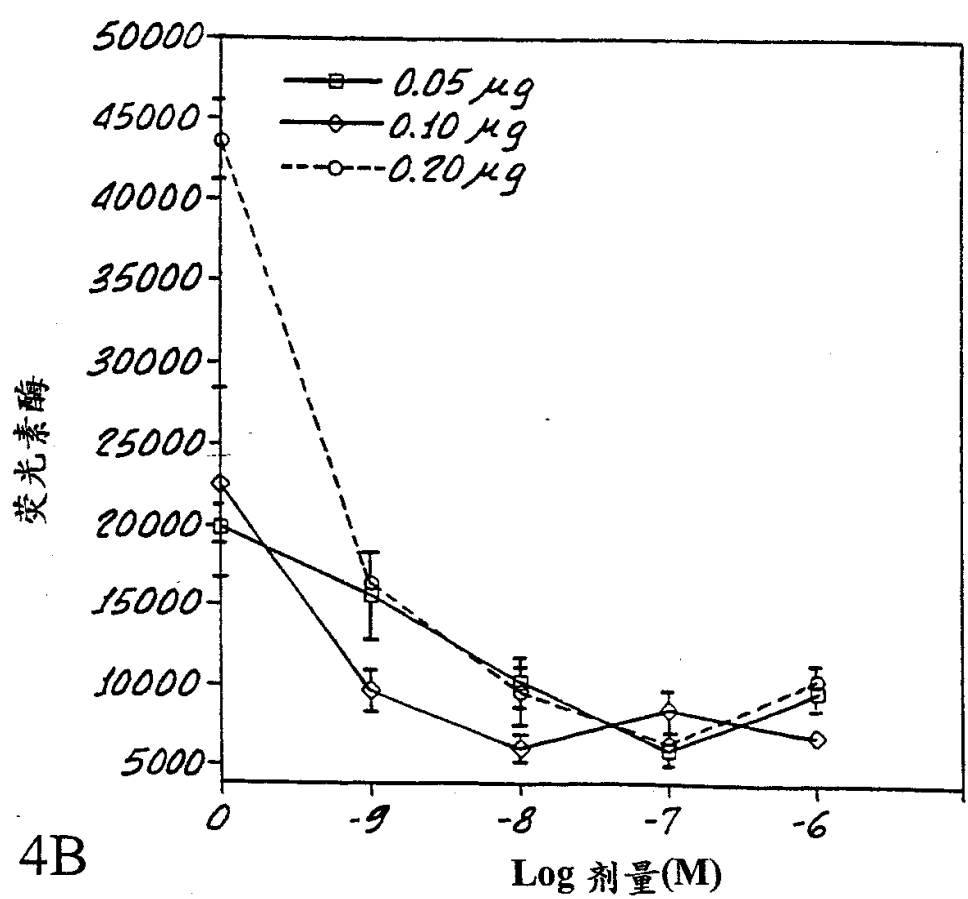


图 4B

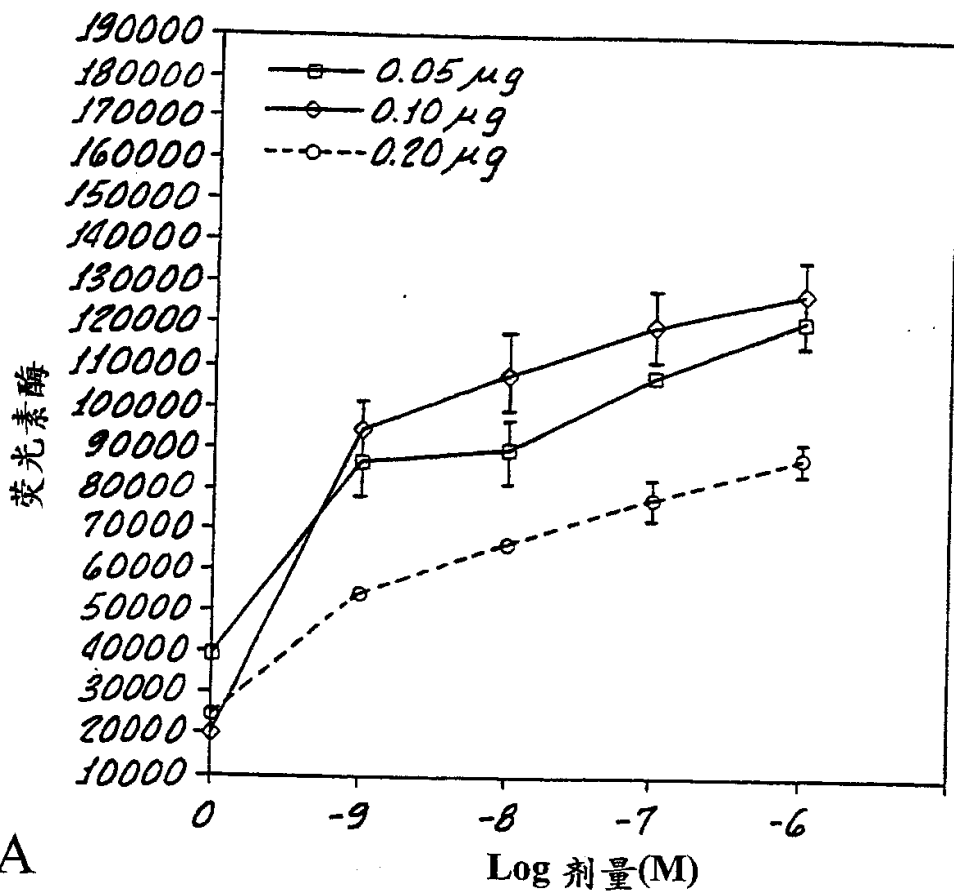


图 5A

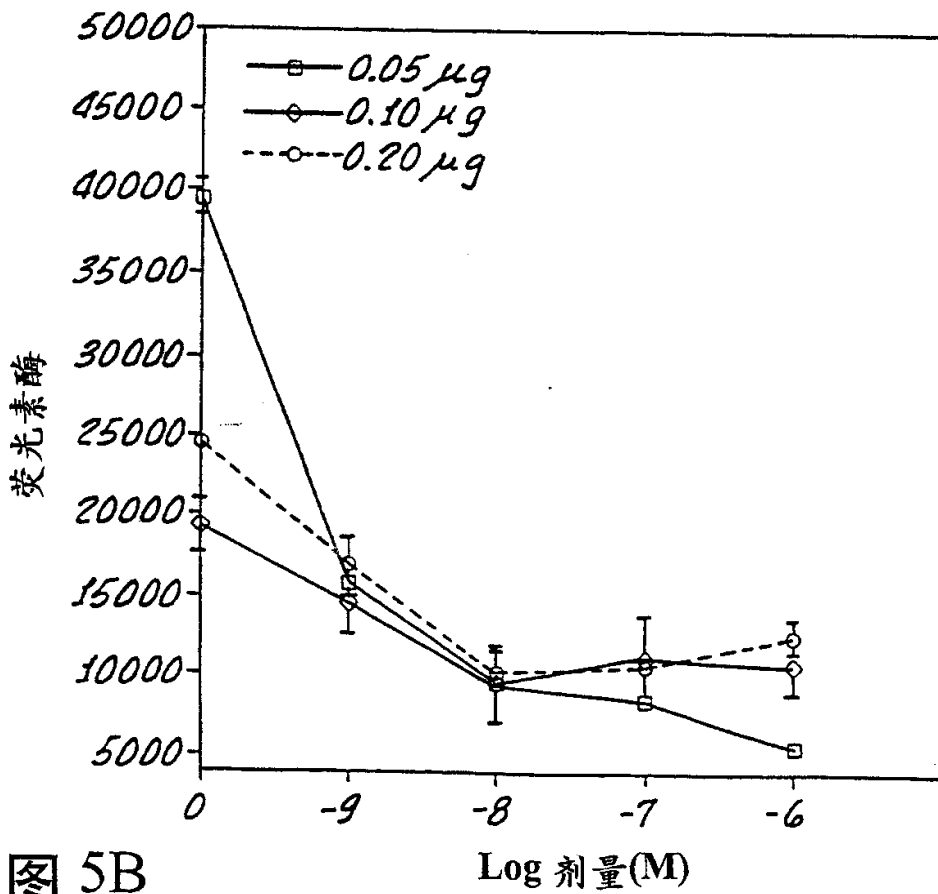


图 5B

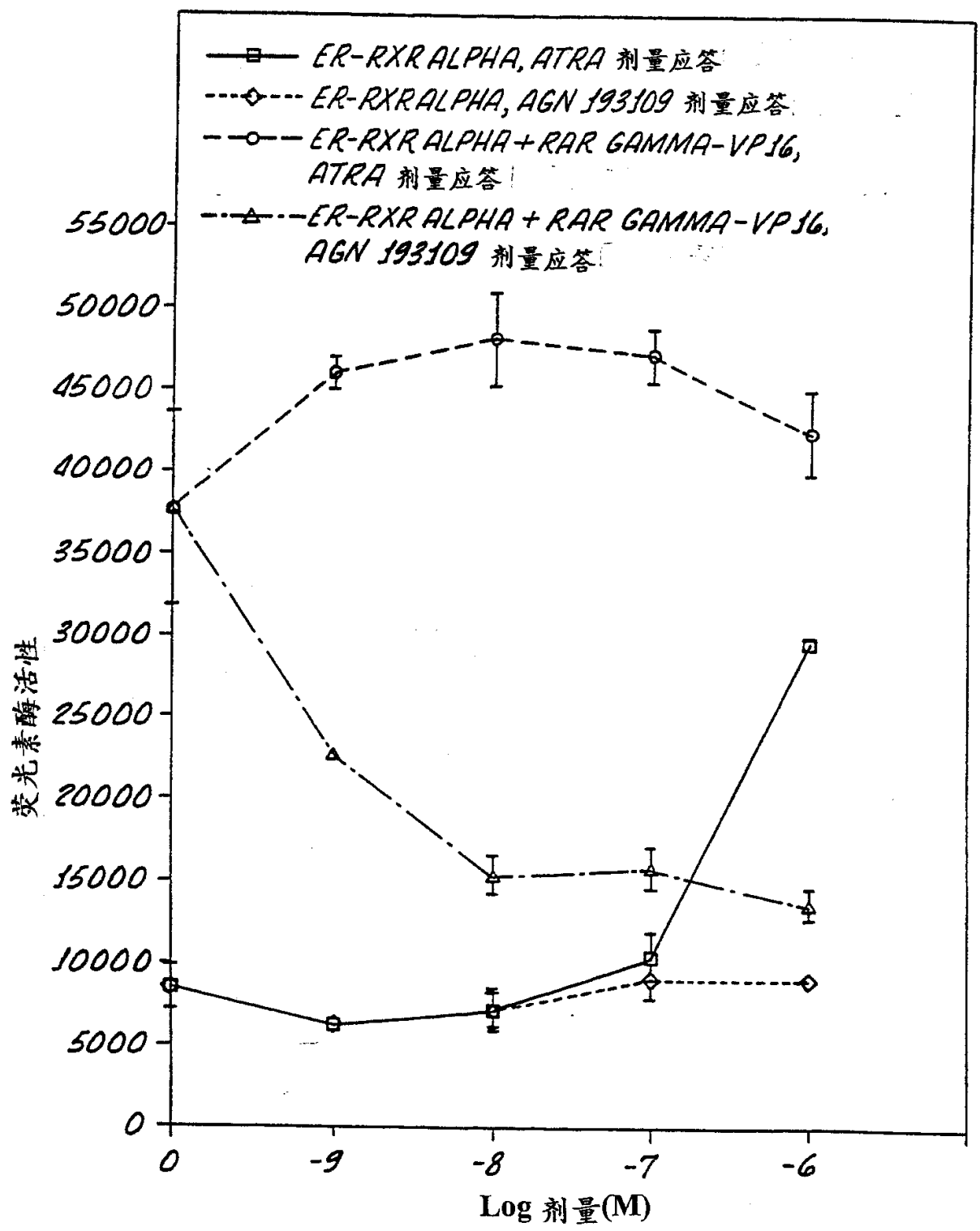


图 6

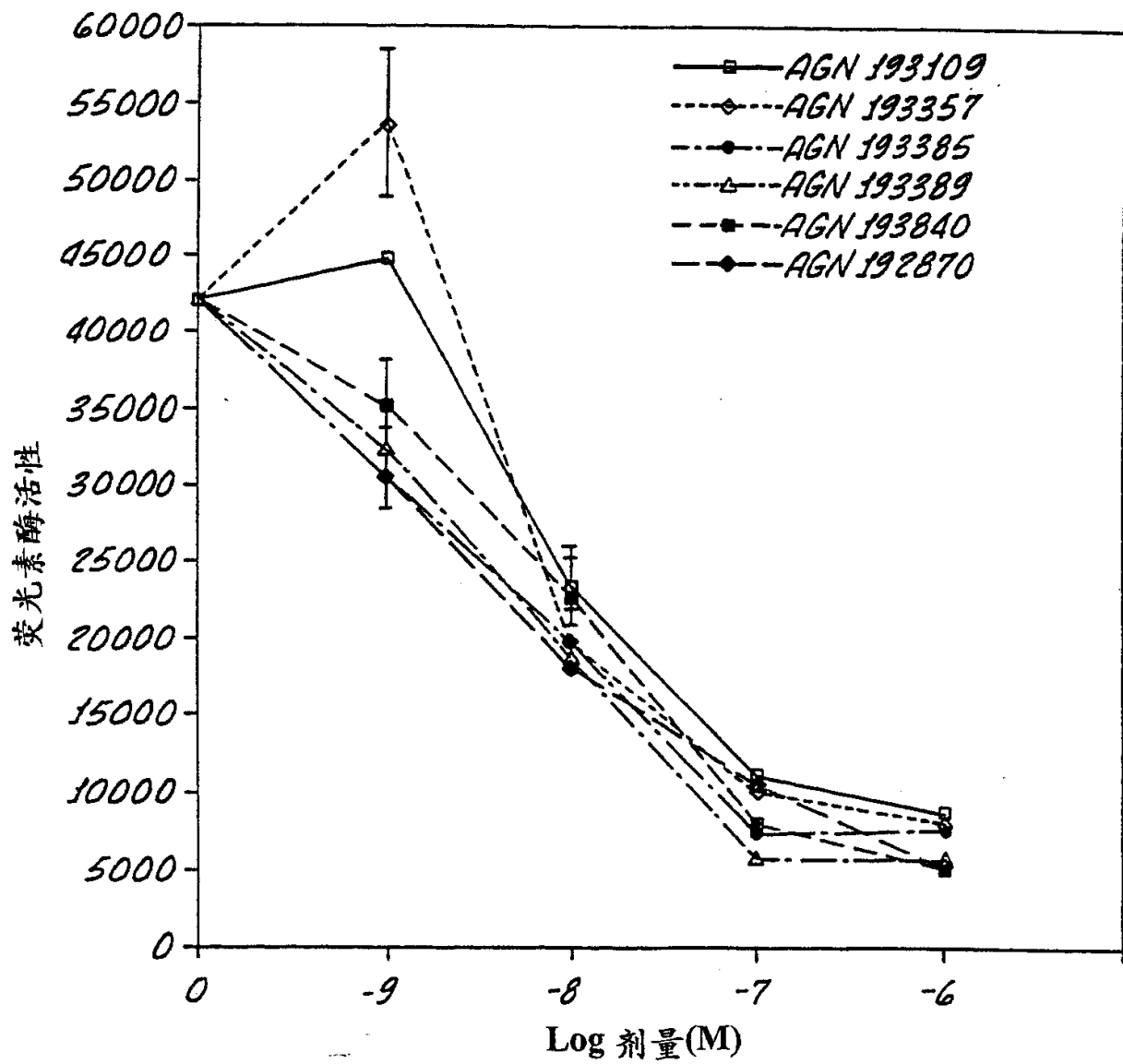


图 7

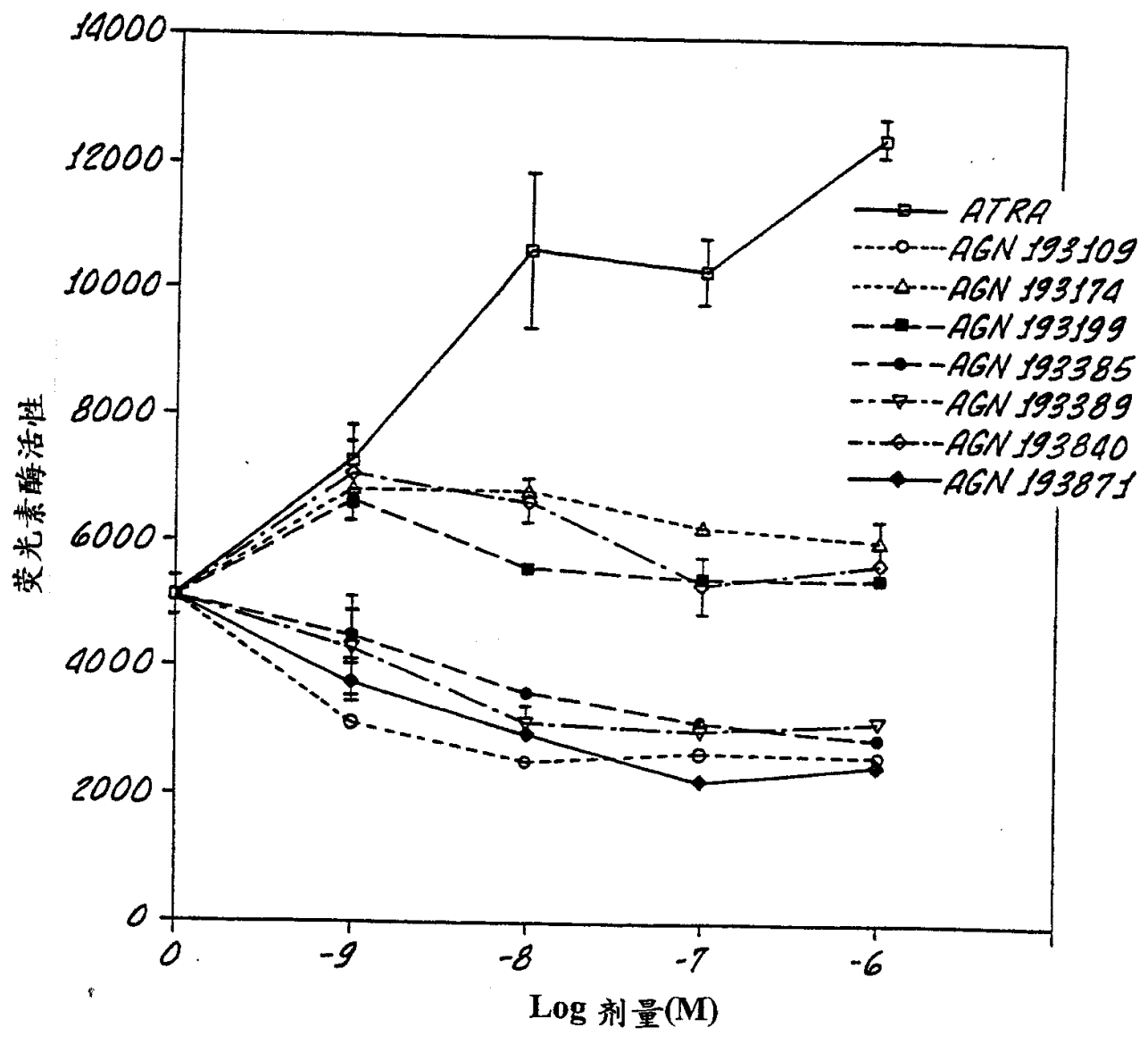


图 8

图 9A
无配体

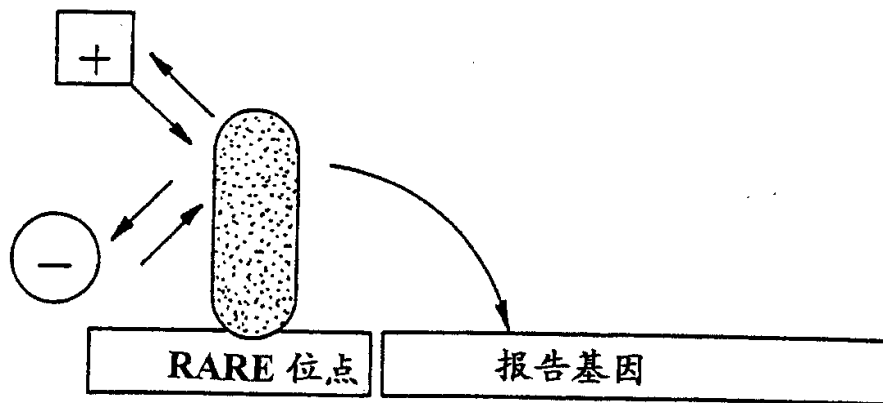


图 9B
加入兴奋剂

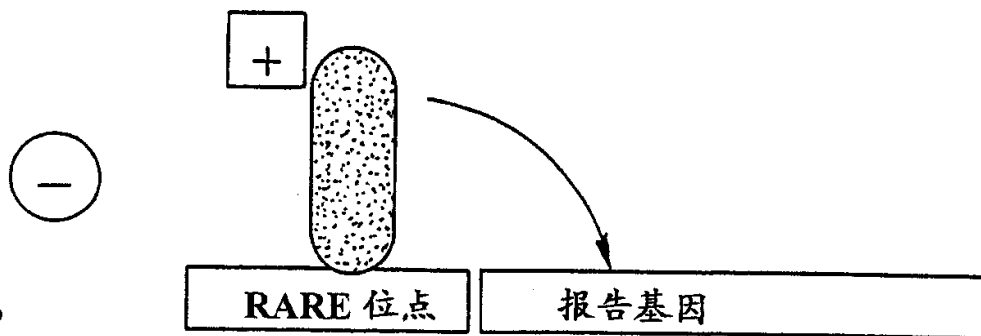
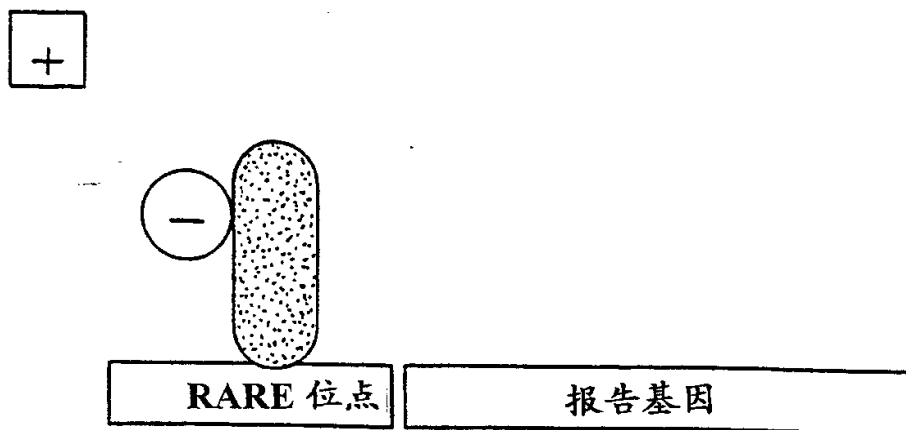


图 9C

加入 AGN193109



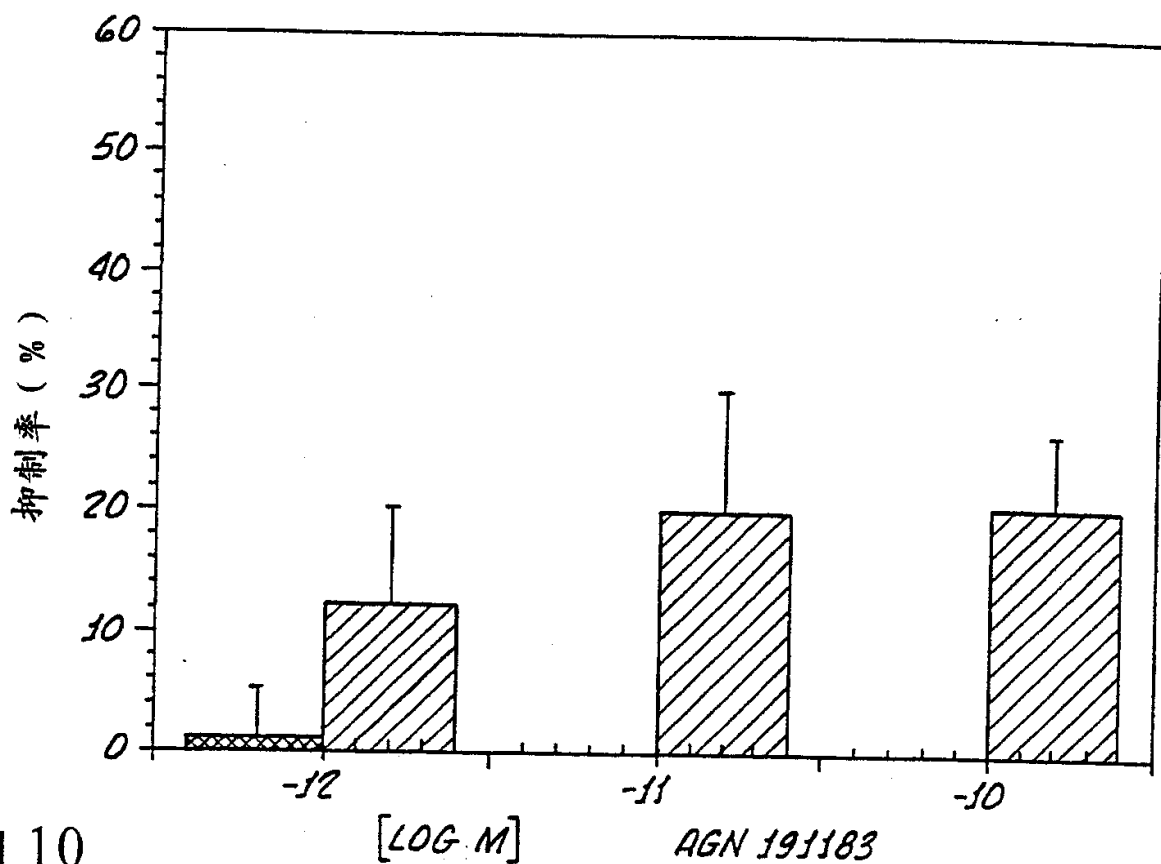


图 10

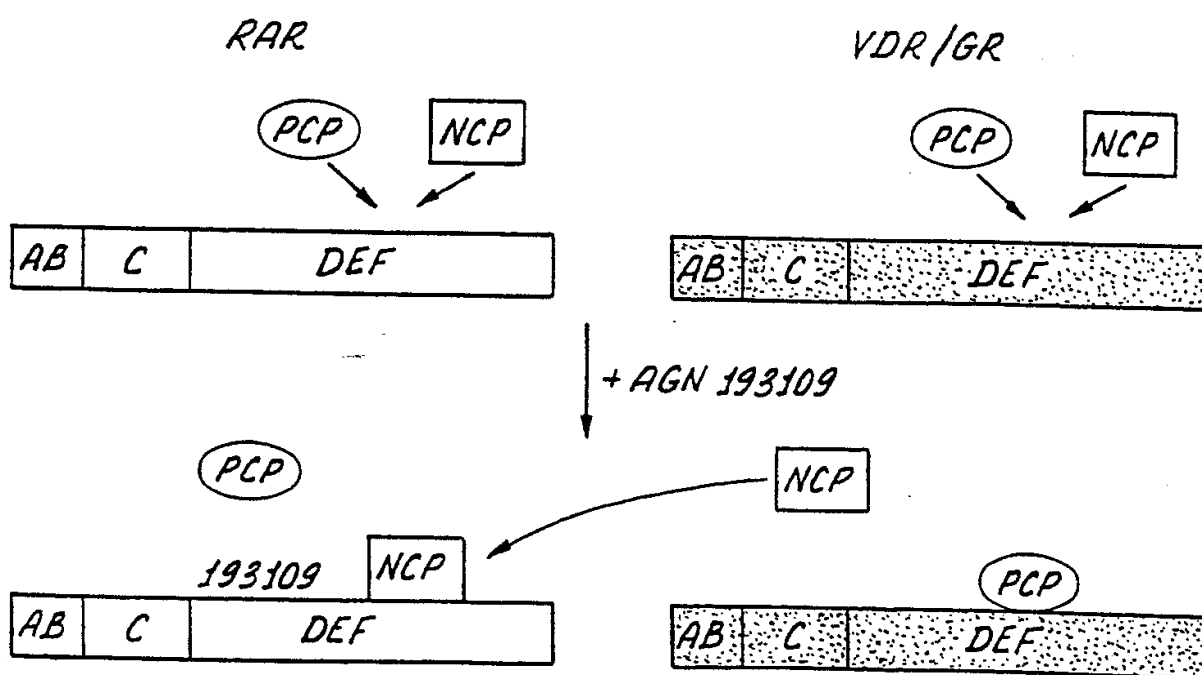


图 11

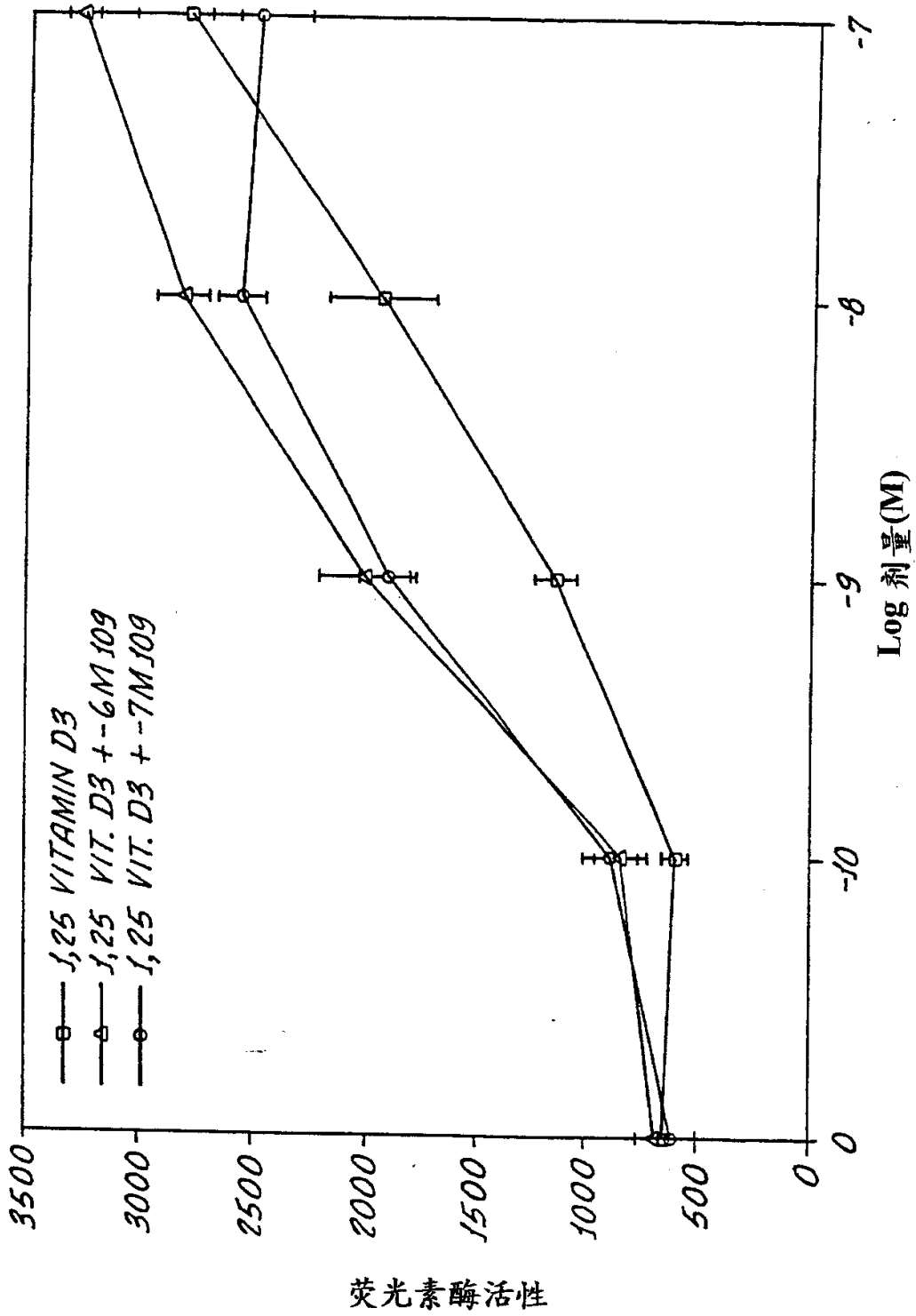


图 12

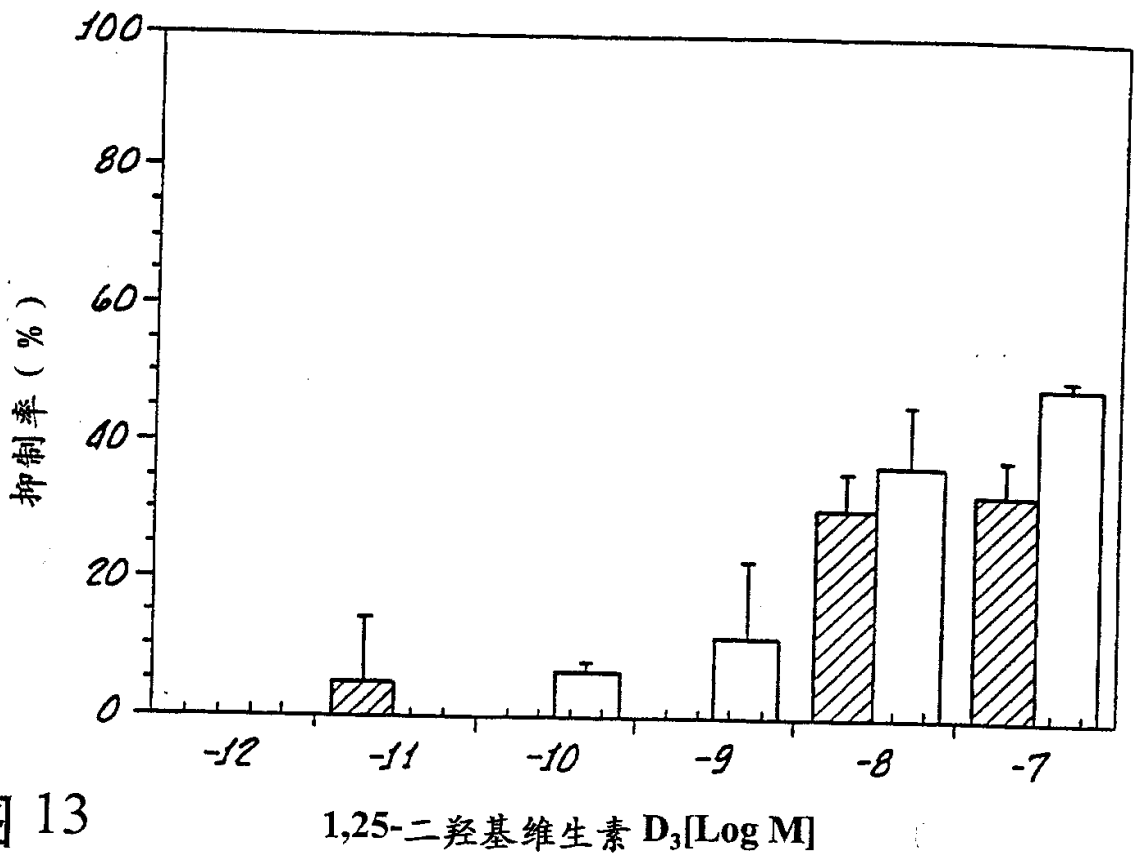


图 13

1,25-二羟基维生素 D₃[Log M]

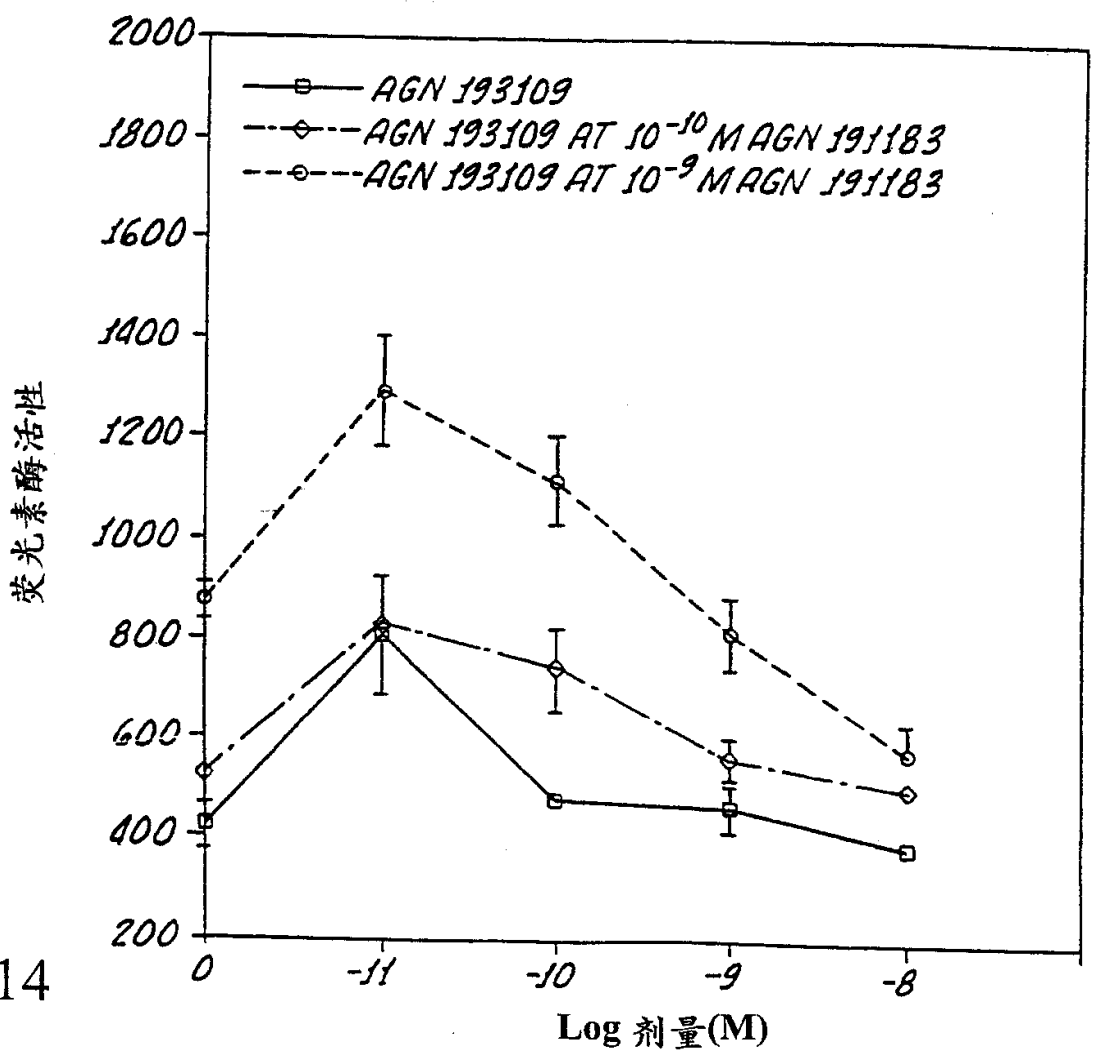


图 14

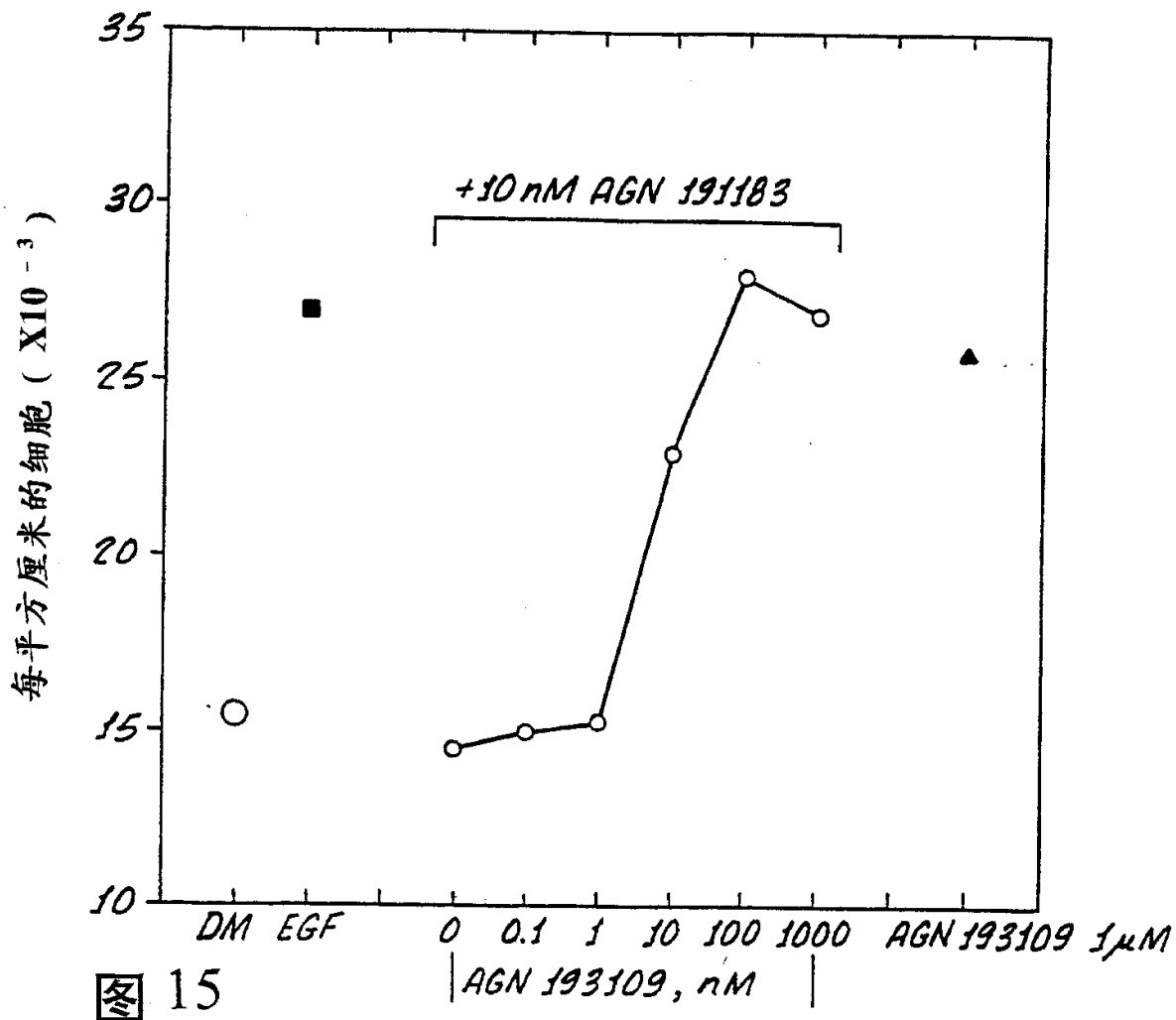


图 15

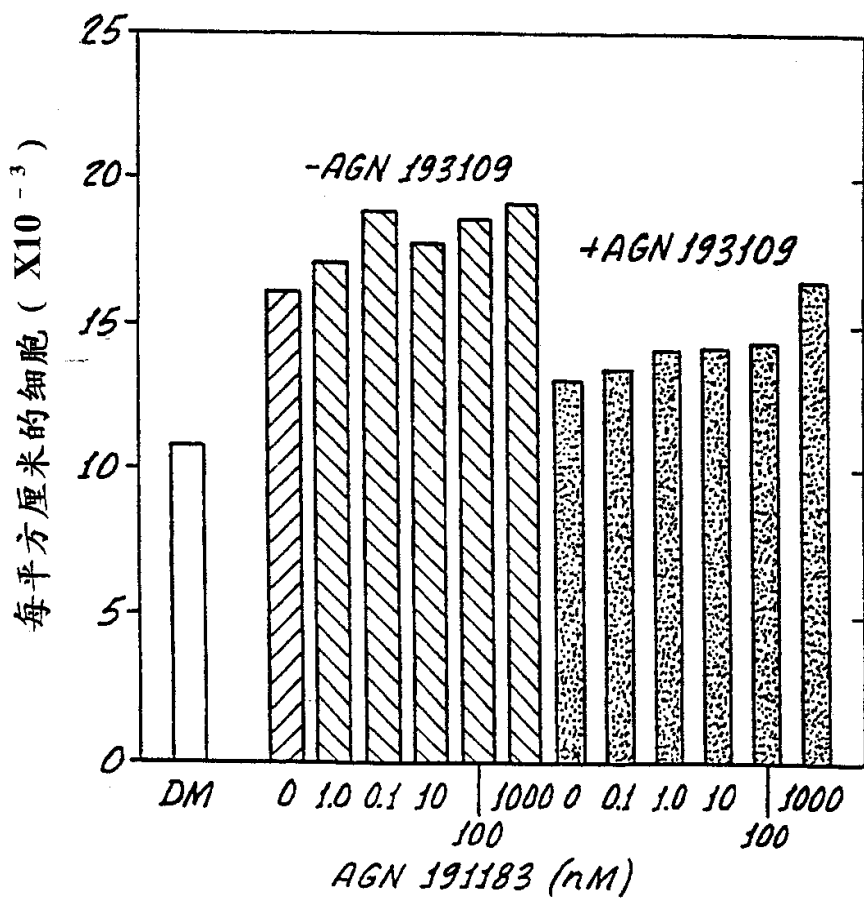


图 16

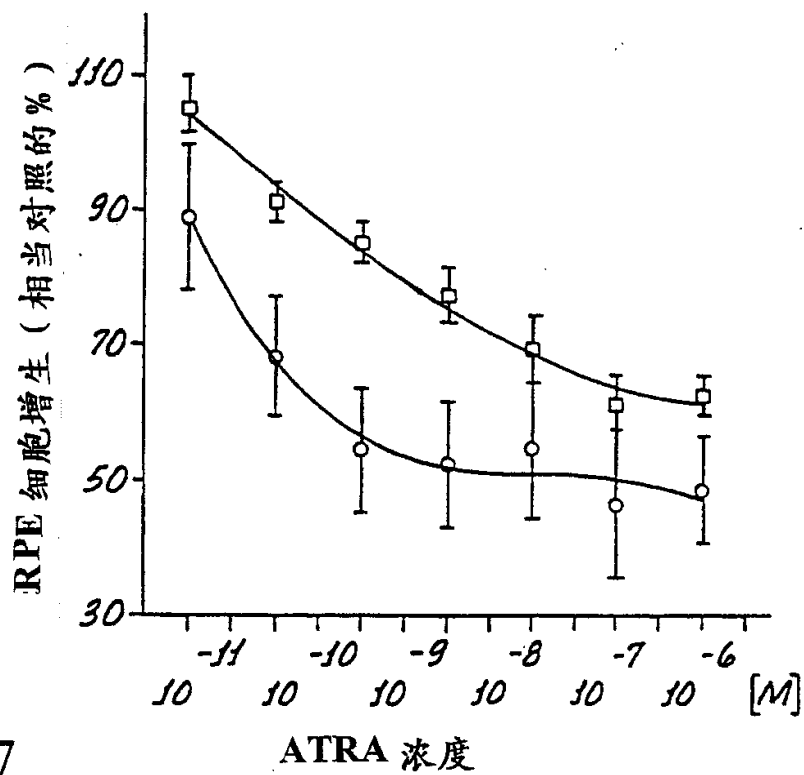


图 17

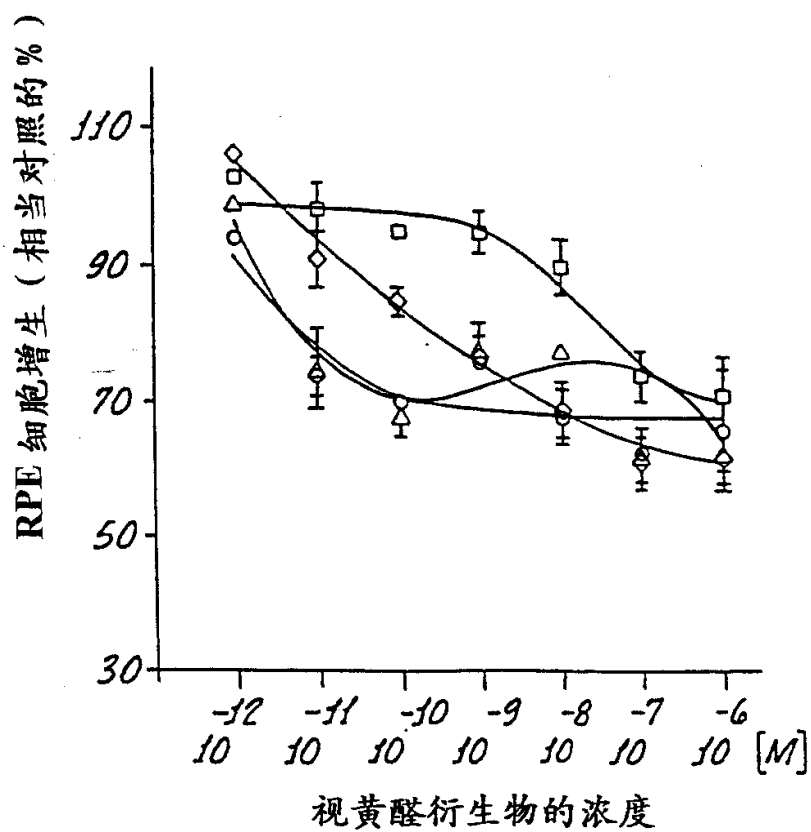


图 18

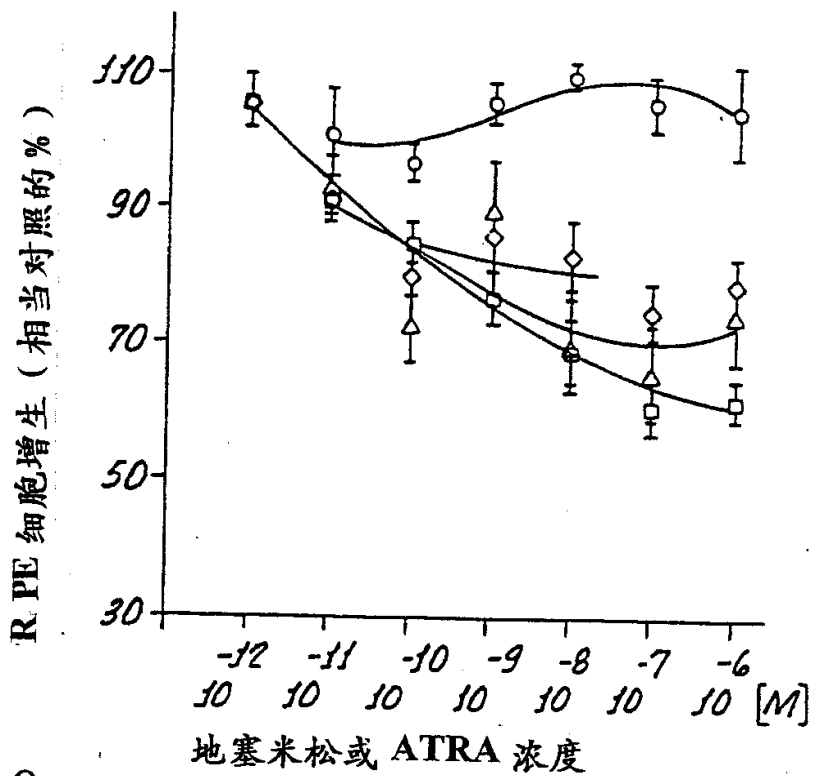


图 19

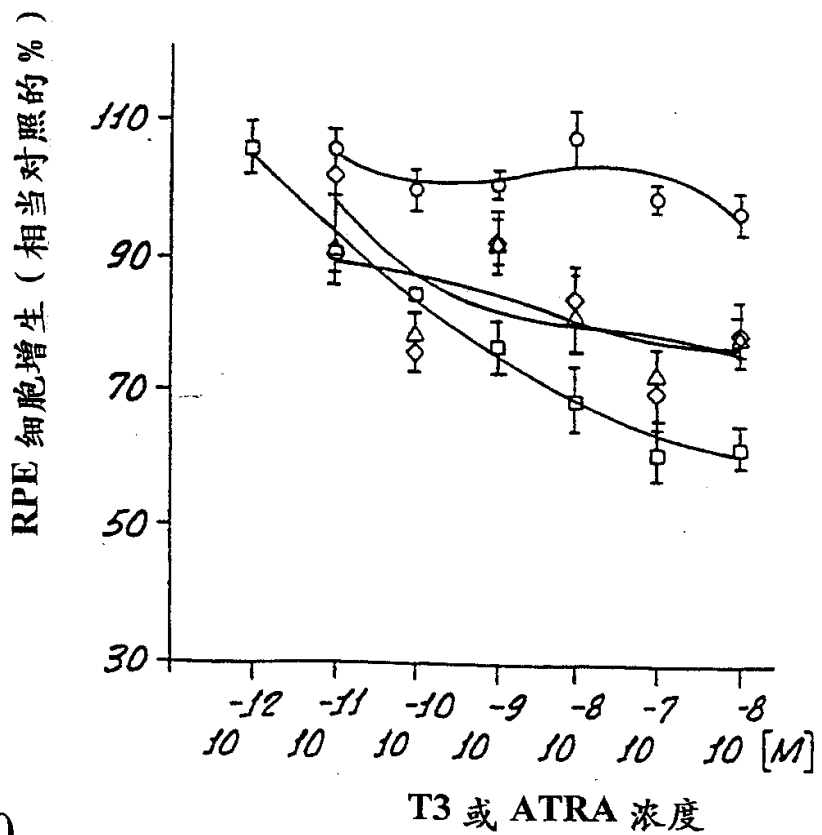


图 20