

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480035324.3

[51] Int. Cl.

C07D 213/80 (2006.01)  
A61K 31/455 (2006.01)  
A61P 3/04 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月27日

[11] 公开号 CN 1886377A

[22] 申请日 2004.11.25

[21] 申请号 200480035324.3

[30] 优先权

[32] 2003.11.29 [33] GB [31] 0327761.3

[86] 国际申请 PCT/GB2004/004966 2004.11.25

[87] 国际公布 WO2005/054200 英 2005.6.16

[85] 进入国家阶段日期 2006.5.29

[71] 申请人 阿斯利康(瑞典)有限公司

地址 瑞典南泰利耶

[72] 发明人 C·约翰斯通 D·麦克雷彻尔  
K·G·派克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 刘健 李连涛

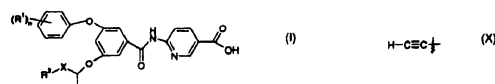
权利要求书 5 页 说明书 40 页

[54] 发明名称

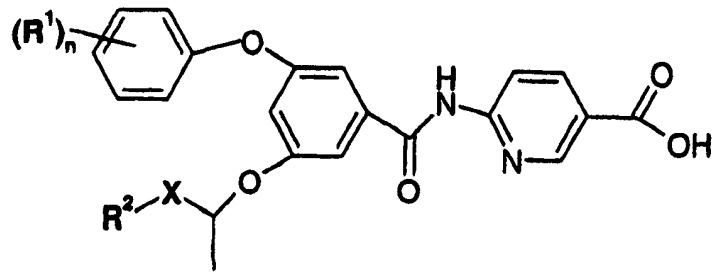
用作葡糖激酶(GLK)激活剂的苯甲酰基氨基吡啶基羧酸衍生物

[57] 摘要

本发明涉及式(I)化合物或其盐、前药或溶剂化物,其中: $R^1$ 选自:氟、氯、 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{1-3}$ 烷氧基; $R^2-X$ 选自:甲基、甲氧基甲基和式(X);n是0、1或2。本发明还涉及所述化合物作为GLK激活剂的应用,含有它们的药物组合物,以及它们的制备方法。

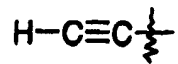


## 1. 式(I)化合物或其盐、前药或溶剂化物:



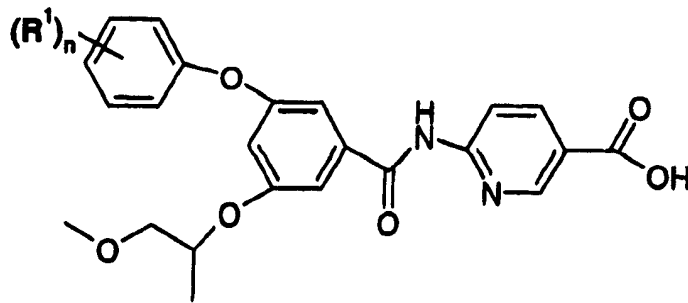
式(I)

其中:

R<sup>1</sup>选自: 氟、氯、C<sub>1-3</sub>烷基和 C<sub>1-3</sub>烷氧基;R<sup>2</sup>-X-选自: 甲基、甲氧基甲基和

n 是 0、1 或 2.

## 2. 权利要求 1 的化合物, 其中所述化合物是式(Ia)化合物



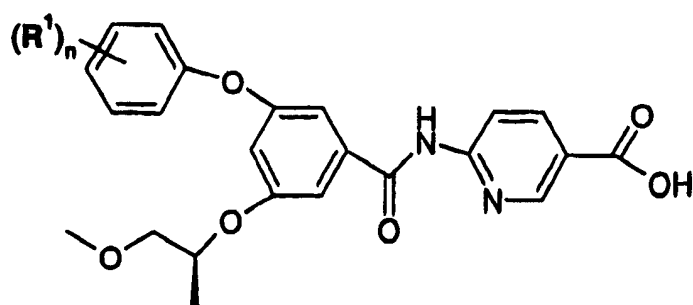
式(Ia)

其中:

R<sup>1</sup>和 n 如上面式(I)化合物中所定义;

或其盐、溶剂化物或前药。

## 3. 权利要求 1 的化合物, 其中所述化合物是式(Ib)化合物



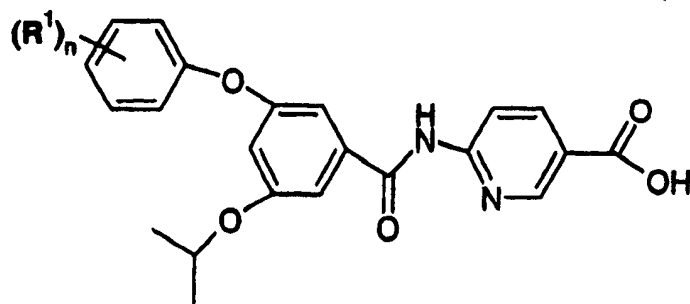
式(Ib)

其中:

R<sup>1</sup>和n如上面式(I)化合物中所定义;

或其盐、溶剂化物或前药。

4. 权利要求1的化合物,其中所述化合物是式(Ic)化合物



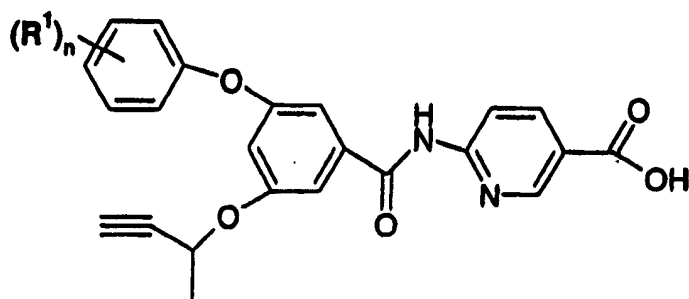
式(Ic)

其中:

R<sup>1</sup>和n如上面式(I)化合物中所定义;

或其盐、溶剂化物或前药。

5. 权利要求1的化合物,其中所述化合物是式(Id)化合物



式(Id)

其中:

R<sup>1</sup>和n如上面式(I)化合物中所定义;

或其盐、溶剂化物或前药。

6. 选自下列的化合物:

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{3-甲基苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-苯氧基苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{3,5-二氟-苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{3-氟苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{3-氟-5-氟苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{3-乙氧基苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{4-甲氧基苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-异丙氧基-5-{3,5-二氟-苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-异丙氧基-5-{苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-异丙氧基-5-{3-氟-苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸; 和

6-[3-{4-氟苯氧基}-5-((1S)-1-甲基丙-2-炔-1-基氧基)苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸

或其盐、溶剂化物或前药。

7. 药物组合物, 所述组合物包含权利要求 1-6 任一项的式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药与可药用稀释剂或载体。

8. 用作药物的权利要求 1-6 任一项的式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药。

9. 用于制备用来治疗通过 GLK 介导的疾病, 特别是 2 型糖尿病的药物, 的权利要求 1-6 任一项的式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药。

10. 治疗 GLK 介导的疾病, 尤其是糖尿病的方法, 包括给需要这样的治疗的哺乳动物施用有效量的权利要求 1-6 任一项的式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药。

11. 权利要求 1-6 任一项的式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药在制备用于糖尿病和肥胖的联合治疗或预防的药物中的应用。

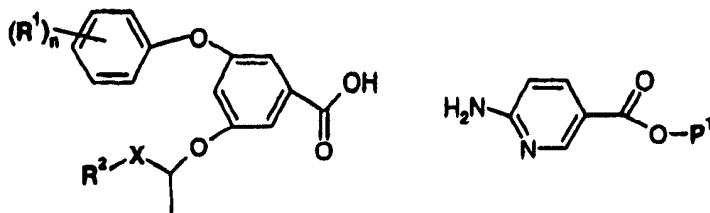
12. 权利要求 1-6 任一项的式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药在制备用于治疗或预防肥胖的药物中的应用。

13. 用于肥胖和糖尿病的联合治疗的方法，包括给需要这样的治疗的哺乳动物施用有效量的权利要求 1-6 任一项的式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药。

14. 用于治疗肥胖的方法，包括给需要这样的治疗的哺乳动物施用有效量的权利要求 1-6 任一项的式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药。

15. 制备权利要求 1 的式(I)化合物或其盐、前药或溶剂化物的方法，所述方法包括：

(a) 将式(IIIa)的酸或其活化衍生物与式(IIIb)化合物反应



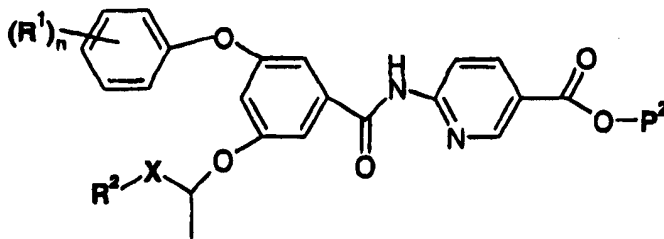
式(IIIa)

式(IIIb);

其中  $P^1$  是氨或保护基；

或者

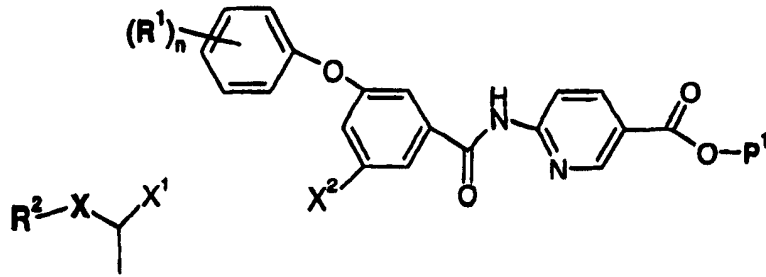
(b) 将式(IIIc)化合物脱保护，



式(IIIc)

其中  $P^2$  是保护基；或者

(c) 将式(IIIe)化合物与式(IIIe)化合物反应，

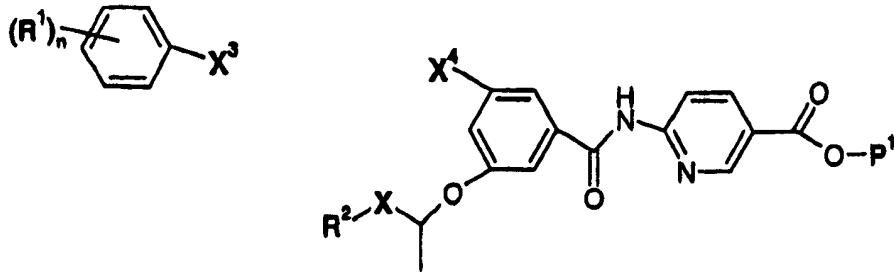


式(IIIe)

式(IIIe)

其中  $X^1$  是离去基团, 且  $X^2$  是羟基, 或者  $X^1$  是羟基, 且  $X^2$  是离去基团, 并且  $P^1$  是氢或保护基; 或者

(d) 将式(IIIe)化合物与式(IIIg)化合物反应

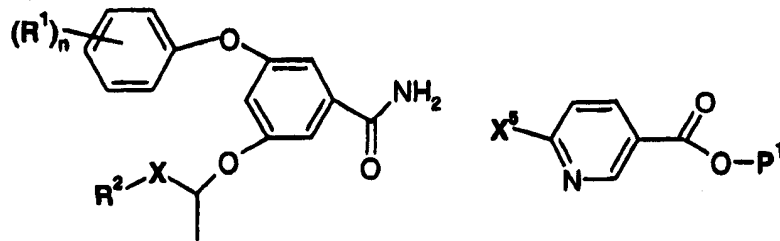


式(IIIf)

式(IIIg)

其中  $X^3$  是离去基团或有机金属试剂, 并且  $X^4$  是羟基, 或者  $X^3$  是羟基, 并且  $X^4$  是离去基团或有机金属试剂, 并且其中  $P^1$  是氢或保护基; 或者

(e) 将式(IIIb)化合物与式(IIIi)化合物反应,



式(IIIh)

式(IIIi);

其中  $X^5$  是离去基团, 并且其中  $P^1$  是氢或保护基;

并且之后如果需要的话:

- i) 将一种式(I)化合物转化成另一种式(I)化合物;
- ii) 除去任何保护基;
- iii) 形成其盐、前药或溶剂化物。

## 用作葡糖激酶 (GLK) 激活剂的苯甲酰基氨基吡啶基羧酸衍生物

本发明涉及一组苯甲酰基氨基吡啶基羧酸化合物，所述化合物可用于治疗或预防通过葡糖激酶 (GLK) 介导的疾病或病症，并且导致胰岛素分泌的葡萄糖阈值降低。此外，预计所述化合物通过增加肝脏葡萄糖摄取来降低血液葡萄糖。这些化合物可用于治疗 2 型糖尿病和肥胖症。本发明还涉及含有所述化合物的药物组合物，和使用所述化合物来治疗由 GLK 介导的疾病的方法。

在胰腺 $\beta$ -细胞和肝脏实质细胞中主要的血浆膜葡萄糖转运蛋白是 GLUT2。在生理葡萄糖浓度下，GLUT2 转运葡萄糖穿过膜的速率不是葡萄糖摄取进入这些细胞的总速率的限制速率。葡萄糖摄取的速率是由葡萄糖成为葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P) 的磷酸化作用的速率限制的，该作用经葡糖激酶 (GLK) 催化[1]。GLK 对于葡萄糖具有高 (6-10mM) 的  $K_m$  且不被生理浓度的 G-6-P 抑制。GLK 表达局限在少数组织和细胞类型，最常见的是胰腺 $\beta$ -细胞和肝脏细胞 (肝细胞) [1]。在这些细胞中 GLK 活性是葡萄糖利用的限速作用且由此调控葡萄糖引起的胰岛素分泌的程度和肝糖原合成。这些过程在整体葡萄糖内稳态的维持中十分关键且两者在糖尿病中均功能不全[2]。

在一种亚型糖尿病，青年的 2 型发育期发作糖尿病 (MODY-2) 中，该糖尿病是由功能突变的 GLK 损失引起的[3,4]。在 MODY-2 患者中，高血糖源自胰腺和肝脏两者中的缺损性葡萄糖利用[5]。MODY-2 患者的胰腺中缺损性葡萄糖利用导致葡萄糖刺激胰岛素分泌的阈值升高。相反，稀有的 GLK 的激活突变作用降低该阈值导致家族性胰岛素分泌过多[6,7]。除了在 MODY-2 糖尿病中观察到降低的 GLK 活性以外，肝脏葡糖激酶活性在 2 型糖尿病中也降低[8]。重要的是，GLK 的全面或肝脏选择性过度表达阻止或逆转该疾病的饮食和遗传模型两者中糖尿病表型的恶化[9-12]。此外，用果糖对 2 型糖尿病的快速治疗通过刺激肝脏葡萄糖利用来提高葡萄糖耐受性[13]。据信这种效应是通过下列机理由[13]果糖诱发的肝细胞中胞质 GLK 活性增高来介导的。

通过与 GLK 调节蛋白 (GLKRP) 缔合可抑制肝脏 GLK 活性。GLK/GLKRP 复合物通过果糖-6-磷酸 (F6P) 结合 GLKRP 稳定化且

通过果糖-1-磷酸 (F1P) 置换这种糖磷酸去稳定化。在果糖激酶介导的食物果糖的磷酸化作用介导下生成 F1P。所以, GLK/GLKRP 复合物的完整性和肝脏 GLK 活性以营养依赖方式受到调节, 因为 F6P 在吸收后状态升高而 F1P 在进餐后状态占优势。与肝细胞形成对照, 胰腺 $\beta$ -细胞在 GLKRP 不存在的条件下表达 GLK。所以,  $\beta$ -细胞 GLK 活性仅仅由其底物葡萄糖的可利用性来调节。小分子可以直接或者通过使 GLK/GLKRP 复合物去稳定化来激活 GLK。前者种类的化合物预计可刺激肝脏和胰腺两者中的葡萄糖利用而后者预计仅仅在肝脏中起作用。然而, 具有一种性能的化合物预计具有治疗 2 型糖尿病的治疗效益, 因为这种疾病特征在于在上述两种组织中的缺损性葡萄糖利用。

GLK 和 GLKRP 和  $K_{ATP}$  通道在下丘脑的神经元中表达, 下丘脑是调节能量平衡和控制食物摄取非常重要的脑区域[14-18]。已经证实这些神经元表达开胃和厌食神经肽[15, 19, 20], 且被推断是下丘脑内的葡萄糖传感神经元, 它们通过环境葡萄糖浓度的改变来抑制或兴奋[17, 19, 21, 22]。这些神经元感觉葡萄糖水平变化的能力在多种遗传和试验诱导的肥胖模型中是缺损的[23-28]。葡萄糖类似物, 也就是葡糖激酶的竞争性抑制剂的脑室内(icv)输注, 刺激瘦弱大鼠的食物摄取[29,30]。相反, 葡萄糖的 icv 输注抑制进食[31]。所以, GLK 的小分子激活剂可以通过对 GLK 的中枢作用减少食物摄取和体重增加。所以, GLK 激活剂可以治疗性应用于治疗除糖尿病以外的饮食性疾病, 包括肥胖。下丘脑的作用将与这些化合物的作用加合或协同地在肝脏和/或胰腺中发挥使葡萄糖内稳态正常化的作用, 例如治疗 2 型糖尿病。所以 GLK/GLKRP 系统可以描述成为潜在“糖尿病肥胖”靶向(在糖尿病和肥胖中都有益)。

在 WO0058293 和 WO 01/44216 (Roche) 中, 描述了一系列作为葡糖激酶激活剂的苄基氨基甲酰基化合物。此类化合物激活 GLK 的机理是通过测量这些化合物在其中 GLK 活性与 NADH 生成有关的试验中的直接作用来评估的, 而 NADH 生成是通过光学方法测定的 - 参见实施例 A 中描述的体外试验详情。本发明化合物可直接激活 GLK 或者可以通过抑制 GLKRP 与 GLK 的相互作用来激活 GLK。与 GLK 的直接激活剂相比, 后一机制具有重要优点, 因为它们不会引起在直接刺激之后所预测的严重的低血糖发作。与已知的 GLK 激活剂相比, 很多



本发明化合物可表现出有利的选择性。

WO9622282、WO9622293、WO9622294、WO9622295、WO9749707 和 WO9749708 公开了多种用于制备可用作加压素剂的化合物的中间体，这些中间体与本发明公开的化合物在结构上类似。结构上类似的化合物还公开在 WO9641795 和 JP8143565 (加压素拮抗作用)以及 JP8301760 (预防皮肤损害)和 EP619116 (骨病)中。

WO01/12621 描述了用作 c-JUN N-末端激酶抑制剂的异恶唑基嘧啶以及相关化合物的制备，以及含有这样的化合物的药物组合物。

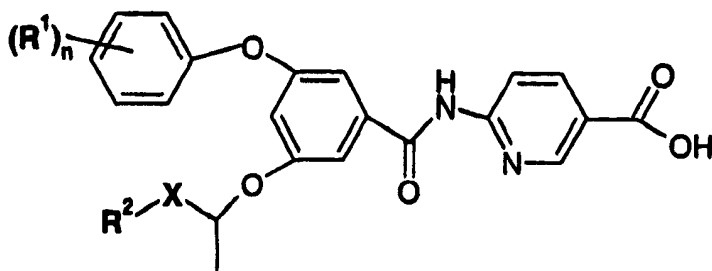
Cushman 等人[Bioorg Med Chem Lett (1991) 1(4), 211-14]描述了含有吡啶的均二苯代乙烯和酰胺化合物及其作为蛋白-酪氨酸激酶抑制剂的评估。Rogers 等人[J Med Chem (1981) 24(11) 1284-7]描述了作为环-AMP 磷酸二酯酶抑制剂的介离子 6-羟基嘌呤类似物。

WO00/26202 描述了用作抗肿瘤剂的 2-氨基噻唑衍生物的制备。GB 2331748 描述了具有杀虫作用的噻唑衍生物的制备。WO96/36619 描述了用作消化道运动改善剂的氨基噻唑衍生物的制备。US 5466715 和 US 5258407 描述了 3,4-二取代的苯酚免疫刺激剂的制备。JP 58069812 描述了含有苯甲酰胺衍生物的降血压药物。US 3950351 描述了 2-苯甲酰氨基-5-硝基噻唑化合物，Cavier 等人[Eur J Med Chem - Chim Ther (1978) 13(6), 539-43]讨论了这些化合物的生物益处。

WO03/000262 公开了用作 GLK 激活剂的乙烯基苯基衍生物，WO03/015774 公开了用作 GLK 激活剂的苯甲酰胺化合物，WO03/066613 公开了用作 GLK 激活剂的 N-苯基-2-嘧啶胺衍生物。

未决国际申请 PCT/GB02/02873 ( WO03/000267)描述了一组苯甲酰基氨基吡啶羧酸化合物，所述化合物是葡糖激酶(GLK)的激活剂。我们惊奇地发现了一些从这些化合物当中选择的一小部分化合物，这些选择的一小部分化合物在口服给药后具有优良的血浆药物水平，这是由于提高的水溶解度以及降低的血浆结合水平的缘故，同时保持了对 GLK 酶的高效力。这使得该亚组化合物特别适于用来治疗或预防通过 GLK 介导的疾病或病症。

因此，根据本发明的第一个方面，本发明提供了式(I)化合物或其盐、前药或溶剂化物：

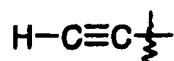


式(I)

其中:

$R^1$  选自: 氟、氯、 $C_{1-3}$ 烷基和  $C_{1-3}$ 烷氧基;

$R^2-X$ -选自: 甲基、甲氧基甲基和



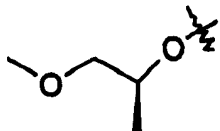
$n$  是 0、1 或 2。

式(I)化合物可以形成盐, 其属于本发明的范围内。优选可药用盐, 虽然其他盐可以用于例如分离或提纯化合物。

应当理解, 由于一个或多个不对称碳原子, 在某些如上所定义的式(I)化合物的范围内可以存在旋光或外消旋形式, 本发明在其定义中包括任何这样的具有直接刺激 GLK 或抑制 GLK/GLKRP 相互作用的性质的任何这样的旋光或外消旋形式。旋光形式的合成可以通过所属领域众所周知的有机化学的标准技术来进行, 例如通过由旋光原料合成或通过外消旋形式的拆分来进行。应当理解, 一些化合物可以以互变异构形式存在, 并且本发明还涉及能够激活 GLK 的本发明化合物的任何以及所有互变异构形式。

优选的式(I)化合物是其中适用任何一个或多个以下限定的那些:

(1) 在式(I)的苯甲酰基氨基的 3-位的基团优选为:



(2)  $R^1$  选自氟、氯、甲基、乙基、甲氧基和乙氧基;

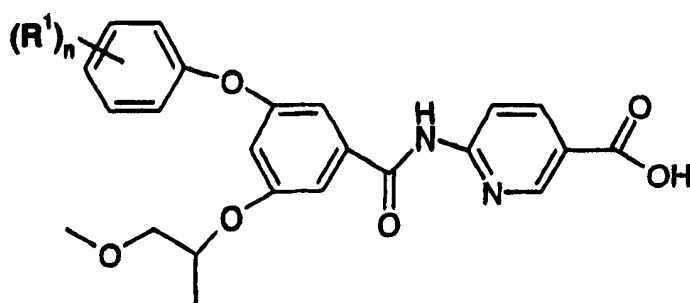
(3)  $R^1$  选自氟、氯、甲基和乙基;

(4)  $R^1$  选自氟、氯和甲基;

- (5)  $(R^1)_n$  选自甲基、氟、二氟和氟-氯；  
 (6)  $(R^1)_n$  选自甲基、氟、二-氟、氟-氯和氟-甲基；  
 (7)  $(R^1)_n$  选自 3-甲基、3-氟、3,5-二氟和 3-氟-5-氯；  
 (8)  $n$  是 1；  
 (9)  $n$  是 2；  
 (10)  $n$  是 2，且  $R^1$  独立地选自氟和氯。

根据本发明的另一个特征，本发明提供了下列优选组的本发明化合物：

(I) 式(Ia)化合物

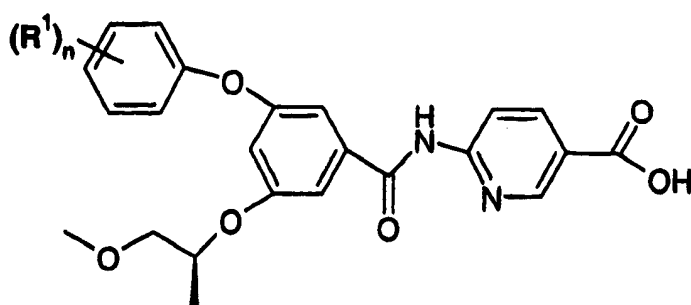


式(Ia)

其中：

$R^1$  和  $n$  如上面式(I)化合物中所定义；  
 或其盐、溶剂化物或前药。

(II) 式(Ib)化合物

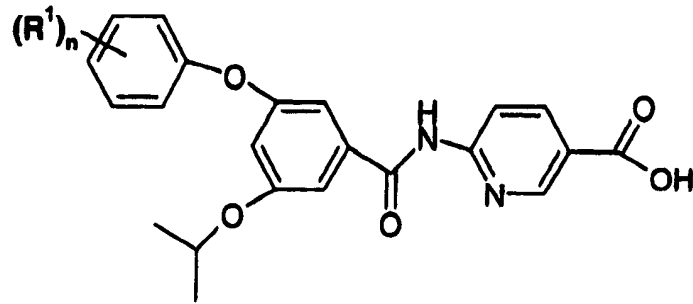


式(Ib)

其中：

$R^1$  和  $n$  如上面式(I)化合物中所定义；  
 或其盐、溶剂化物或前药。

(III) 式(Ic)化合物



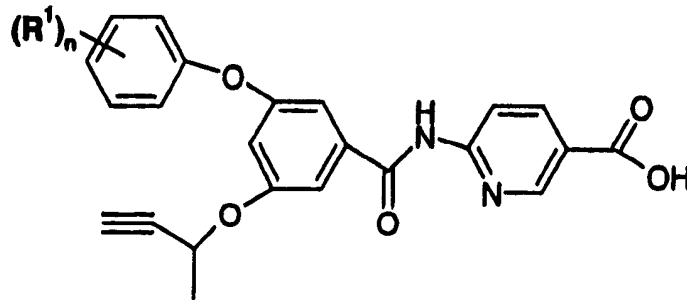
式(Ic)

其中:

$R^1$  和  $n$  如上面式(I)化合物中所定义;

或其盐、溶剂化物或前药。

(IV) 式(Id)化合物



式(Id)

其中:

$R^1$  和  $n$  如上面式(I)化合物中所定义;

或其盐、溶剂化物或前药。

优选的本发明化合物包括一种或多种下列化合物:

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{3-甲基苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-苯氧基苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{3,5-二氟-苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{3-氟苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-{3-氟-5-氟苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-(3-乙氧基苯氧基)苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-((1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基)-5-(4-甲氧基苯氧基)苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-异丙氧基-5-(3,5-二氟-苯氧基)苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-异丙氧基-5-(苯氧基)苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸;

6-[3-异丙氧基-5-(3-氟-苯氧基)苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸; 和

6-[3-(4-氟苯氧基)-5-((1S)-1-甲基丙-2-炔-1-基氧基)苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸

或其盐、溶剂化物或前药。

本发明化合物可以以前药的形式给药。前药是在机体内可降解以生成本发明化合物的生物前体或可药用化合物(例如本发明化合物的酯或酰胺,特别是体内可水解的酯)。多种不同形式的前药是本领域已知的。这样的前药衍生物的实例可参见:

a) Design of Prodrugs, H. Bundgaard 编写, (Elsevier, 1985) and Methods in Enzymology, Vol. 42, p. 309-396, K. Widder, 等人编写 (Academic Press, 1985);

b) A Textbook of Drug Design and Development, Krogsgaard-Larsen 编写;

c) H. Bundgaard, Chapter 5 "Design and Application of Prodrugs", H. Bundgaard p. 113-191 (1991);

d) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38 (1992);

e) H. Bundgaard, 等人, Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988); 和

f) N. Kakeya, 等人, Chem Pharm Bull, 32, 692 (1984).

上述文件的内容引入本文以供参考。

前药的实例如下。含有羧基或羟基的本发明化合物的体内可水解酯,例如,在人或动物体内水解以生成母体酸或醇的可药用酯。对于羧基,适当可药用酯包括 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基甲基酯,例如甲氧基甲基酯, C<sub>1-6</sub> 烷酰氧基甲基酯,例如新戊酰氧基甲基酯, 2-苯并[c]咪唑酮基酯, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 环烷氧基羰基氧基 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基酯,例如 1-环己基羰氧基乙基

酯；1,3-二氧杂环戊烯-2-酮基甲基酯，例如 5-甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮基甲基酯；和 C<sub>1-6</sub> 烷氧基羰基氧基乙基酯。

含有羟基的本发明化合物的体内可水解酯包括无机酯例如磷酸酯（包括磷酰胺环酯(phosphoramidic cyclic esters)）和 $\alpha$ -酰氧基烷基醚和有关化合物，作为酯在体内水解的结果，它们断裂以产生母体羟基。 $\alpha$ -酰氧基烷基醚的实例包括乙酰氧基甲氧基和 2,2-二甲基丙酰氧基-甲氧基。用于与羟基形成体内可水解的酯的基团的选择包括烷酰基、苯甲酰基、苯基乙酰基和取代的苯甲酰基和苯基乙酰基、烷氧基羰基(以生成碳酸烷基酯)、二烷基氨基甲酰基和 N-(二烷基氨基乙基)-N-烷基氨基甲酰基(以生成氨基甲酸酯)、二烷基氨基乙酰基和羧基乙酰基。

本发明化合物的适当可药用盐是，例如，具有足够碱性的本发明化合物的酸加成盐，例如，与例如无机或有机酸形成的酸加成盐，所述酸是例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、三氟乙酸、柠檬酸或马来酸。此外，本发明的具有足够酸性的苯并噁嗪酮衍生物的适当可药用盐是碱金属盐，例如钠或钾盐，碱土金属盐，例如钙或镁盐，铵盐或与提供生理可接受阳离子的有机碱形成的盐，例如与甲胺、二甲胺、三甲胺、吡啶、吗啉或三-(2-羟基乙基)胺形成的盐。

本发明的另一个特征是包含如上所定义的式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物或其盐、溶剂化物或前药与可药用稀释剂或载体的药物组合物。

根据本发明的另一个方面，本发明提供了用作药物的如上所定义的式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物。

本发明还提供了用于制备用来治疗通过 GLK 介导的疾病，特别是 2 型糖尿病的药物式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物。

将本发明化合物适当地配制成用于以该方式使用的药物组合物。

根据本发明的另一个方面，本发明提供了治疗 GLK 介导的疾病，尤其是糖尿病的方法，包括给需要这样的治疗的哺乳动物施用有效量的式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物或其盐、溶剂化物或前药。

可以用本发明化合物或组合物治疗的具体疾病包括：在没有严重低血糖危险的情况下降低 2 型糖尿病中的血糖（并有效治疗 1 型）；异常脂血症；肥胖；胰岛素抗性；代谢综合征 X；葡萄糖耐量减低。

如上所述，GLK/GLKRP 系统可因此描述成为潜在的“糖尿病肥

胖”靶向（在糖尿病和肥胖中都有益）。因此，根据本发明的另一个方面，本发明提供了式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物或其盐、溶剂化物或前药在制备用于联合治疗或预防糖尿病和肥胖的药物中的应用。

根据本发明的另一个方面，本发明提供了式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物或其盐、溶剂化物或前药在制备用于治疗或预防肥胖的药物中的应用。

根据本发明的另一个方面，本发明提供了用于肥胖和糖尿病的联合治疗的方法，包括给需要这样的治疗的哺乳动物施用有效量的式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物或其盐、溶剂化物或前药。

根据本发明的另一个方面，本发明提供了用于治疗肥胖的方法，包括给需要这样的治疗的哺乳动物施用有效量的式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物或其盐、溶剂化物或前药。

本发明的组合物可以是适合口服使用的形式（例如片剂、锭剂、硬或软胶囊、水或油悬浮液、乳剂、可分散散剂或颗粒剂、糖浆剂或酞剂），局部使用的形式（例如霜剂、膏剂、凝胶剂或水或油溶液或悬浮液），吸入给药的形式（例如微粉散剂或液体气雾剂），通过吹入给药的形式（例如微粉散剂）或非肠道给药的形式（例如用于静脉内、皮下、肌肉内或肌肉内给药的灭菌水或油溶液或用于直肠给药的栓剂）。

本发明的组合物可以通过常规方法利用该领域众所周知的常规药物赋形剂来获得。所以，用于口服使用的组合物可以含有，例如，一种或多种着色剂、甜味剂、矫味剂和/或防腐剂。

用于片剂制剂的合适的可药用赋形剂包括，例如，惰性稀释剂例如乳糖、碳酸钠、磷酸钙或碳酸钙，制粒剂和崩解剂例如玉米淀粉或藻酸；粘合剂例如淀粉；润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉；防腐剂例如对羟基苯甲酸乙酯或丙酯，和抗氧化剂例如抗坏血酸。片剂制剂可以无包衣或有包衣来改变其崩解作用和随后活性成分在胃肠道内的吸收作用，或改进其稳定性和/或表现，在任意情况中，使用该领域众所周知的常规包衣剂和方法。

口服使用的组合物可以是硬明胶胶囊的形式，其中活性成分与惰性固体稀释剂例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合，或成为软明胶胶囊，其中活性成分与水或油例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

水悬浮液一般含有微粉形式的活性成分和一种或多种悬浮剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶和阿拉伯胶；分散剂或湿润剂例如卵磷脂或氧化烯与脂肪酸的缩合产物（例如聚氧乙烯硬脂酸酯），或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物，例如十七氧化乙烯鲸蜡醇（heptadecaethyleneoxycetanol），或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物，例如聚氧化乙烯山梨糖醇一油酸酯，或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物，例如十七氧化乙烯鲸蜡醇（heptadecaethyleneoxycetanol），或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物，例如聚氧化乙烯山梨糖醇一油酸酯，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物，例如聚乙烯脱水山梨糖醇一油酸酯。水悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂（例如对羟基苯甲酸乙酯或丙酯）、抗氧化剂（例如抗坏血酸）、着色剂、矫味剂和/或甜味剂（例如蔗糖、糖精和天冬甜素）。

油悬浮液可以通过将活性成分悬浮在植物油（例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油）或矿物油（例如液体石蜡）中来配制。油悬浮液也可以含有增稠剂例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂例如上述那些，和矫味剂来提供可口的口服制剂。这些组合物可以通过加入抗氧化剂例如抗坏血酸来防腐。

适合通过加入水制成水悬浮液的可分散剂和颗粒剂一般含有活性成分和分散剂或湿润剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂。适当的分散剂或湿润剂和悬浮剂例如上述那些。附加的赋形剂例如甜味剂、矫味剂和着色剂，也可以存在。

本发明的药物组合物也可以以水包油乳剂的形式存在。油相可以是植物油，例如橄榄油或花生油，或矿物油，例如液体石蜡或任何这些的混合物。适当的乳化剂可以是，例如，天然树脂例如阿拉伯胶或黄芪胶，天然磷脂例如大豆卵磷脂，和衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯（例如脱水山梨糖醇一油酸酯）和所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物例如聚氧化乙烯脱水山梨糖醇一油酸酯。乳剂也可以含有甜味剂、矫味剂和防腐剂。

糖浆剂和酏剂可以与甜味剂例如甘油、丙二醇、山梨糖醇、天冬甜素或蔗糖配制，并且也可以含有缓和剂、防腐剂、矫味剂和/或着色



剂。

所述的药物组合物还可以是灭菌可注射水或油悬浮液的形式，其可以按照已知方法利用一种或多种适当的分散或湿润剂和悬浮剂来配制，这些物质如上所述。灭菌可注射制剂也可以是存在于无毒胃肠外可接受稀释剂或溶剂中的灭菌可注射溶液或悬浮液，例如在 1,3-丁二醇中的溶液。

用于吸入给药的组合物可以是设计为分配活性成分的常规加压气雾剂，其是含有微粉固体或液滴的气雾剂的形式。可以使用常规气雾剂推进剂例如挥发性氟化烃或烃，且气雾剂装置通常装配为分配计量量的活性成分。

有关制剂的其他信息可参见 *Comprehensive Medicinal Chemistry* 的第 5 卷，25.2 章 (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board)，Pergamon Press 1990。

与一种或多种赋形剂合并以制备为单一剂型的活性成分的量必须根据被治疗宿主和具体给药途径来变化。例如，用于对人体口服给药的制剂一般含有，例如，0.5mg - 2g 的与适当和常规量的赋形剂混合的活性剂，其可以占该组合物总重量的约 5 - 约 98%。单位剂型一般含有约 1mg - 约 500mg 活性成分。有关给药途径和给药方案的进一步信息可参见 *Comprehensive Medicinal Chemistry* 的第 5 卷，25.3 章 (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board)，Pergamon Press 1990。

式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)、(Id)或(Ie)化合物出于治疗或预防目的的给药剂量自然应根据病症的性质和严重性、动物或患者的年龄和性别以及给药途径、按照药物的众所周知原则来改变。

在出于治疗或预防目的而使用式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)、(Id)或(Ie)化合物时一般是以日剂量在例如 0.5mg - 75mg/kg 体重的范围内给药，如果需要可以分次给药。通常当采用非肠道途径时采用较低剂量。所以，例如，为了静脉内给药，一般采用例如 0.5mg - 30mg/kg 体重范围内的剂量。同样地，为了吸入给药，采用例如 0.5mg - 25mg/kg 体重范围内的剂量。然而优选口服给药。

本发明所述 GLK 活性的升高可以用作单独疗法或者可以与一种或多种用于所治疗的适应症的其它物质和/或治疗联合使用。这样的联合

治疗可以通过各个治疗组分的同时、顺序或分开施用的方式来达到。同时治疗可以在单一片剂或在分开的片剂中。例如在糖尿病的治疗中，化疗可以包括下列主要类型的治疗：

- 1) 胰岛素和胰岛素类似物；
- 2) 胰岛素促分泌剂，包括磺酰脲类(例如格列本脲，格列吡嗪)，饮食葡萄糖调节剂(例如瑞格列奈、那格列奈)；
- 3) 改善肠降血糖素作用的活性剂(例如二肽基肽酶 IV 抑制剂和 GLP-1 激动剂)；
- 4) 胰岛素敏化剂，包括 PPAR $\gamma$ 激动剂(例如吡格列酮和罗格列酮)，和具有组合的 PPAR $\alpha$ 和 $\gamma$ 活性的活性剂；
- 5) 调节肝脏葡萄糖平衡的活性剂(例如二甲双胍、果糖-1,6-二磷酸酶抑制剂、糖原磷酸化酶抑制剂、糖原合成酶激酶抑制剂)；
- 6) 减少从肠内吸收葡萄糖的活性剂(例如阿卡波糖)；
- 7) 阻止肾对葡萄糖的再吸收的活性剂(SGLT 抑制剂)；
- 8) 治疗长期高血糖的并发症的活性剂(例如醛糖还原酶抑制剂)；
- 9) 抗肥胖剂(例如西布茶明和奥利司他)；
- 10) 抗异常脂血症，例如 HMG-CoA 还原酶抑制剂(他汀类(statins)，例如帕伐他汀)；PPAR $\alpha$ 激动剂(贝特类(fibrates)，例如吉非贝齐)；胆酸螯合剂(考来烯胺)；胆固醇吸收抑制剂(植物谷甾醇(stanol)，合成抑制剂)；胆酸吸收抑制剂(IBATi)和烟酸以及类似物(烟酸和缓释制剂)；
- 11) 抗高血压剂，例如 $\beta$ 阻滞剂(例如阿替洛尔，普萘洛尔)；ACE 抑制剂(例如赖诺普利)；钙拮抗剂(例如尼非地平)；血管紧张素受体拮抗剂(例如坎地沙坦)， $\alpha$ 拮抗剂和利尿剂(例如呋塞米、苄噻嗪)；
- 12) 止血调节剂，例如抗血栓形成剂，纤维蛋白溶解的激活剂和抗血小板剂；凝血酶拮抗剂；Xa 因子抑制剂；VIIa 因子抑制剂)；抗血小板剂(例如阿司匹林、氯吡格雷)；抗凝血剂(肝素和低分子量类似物，水蛭素)和华法令；
- 13) 拮抗胰高血糖素的作用的活性剂；和
- 14) 抗炎剂，例如非甾族抗炎药(例如阿司匹林)和甾族抗炎药(例如可的松)。

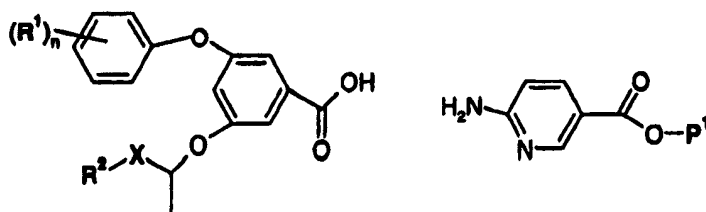
根据本发明的另一个方面，本发明提供了在下面的实施例中作为

终产物制得的各种化合物及其盐/溶剂化物和前药。

本发明化合物或其盐、前药或溶剂化物可以通过任何用于制备此类化合物或结构上相关化合物的已知方法来制备。官能团可以利用常规方法保护和脱保护。例如，保护基例如氨基和羧酸保护基(以及形成的方式和最后的脱保护)可参见 T.W. Greene 和 P.G.M. Wuts, “有机合成中的保护基”, 第 2 版, John Wiley & Sons, New York, 1991。

合成式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物的方法作为本发明另外的特征而提供。因此, 根据本发明的另一个方面, 本发明提供了制备式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)化合物的方法, 所述方法包括:

(a) 将式(IIIa)的酸或其活化衍生物与式(IIIb)化合物反应



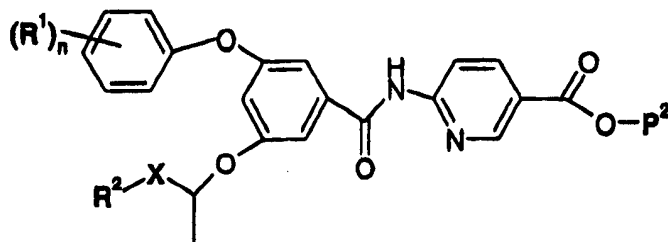
式(IIIa)

式(IIIb);

其中 P<sup>1</sup> 是氢或保护基;

或者

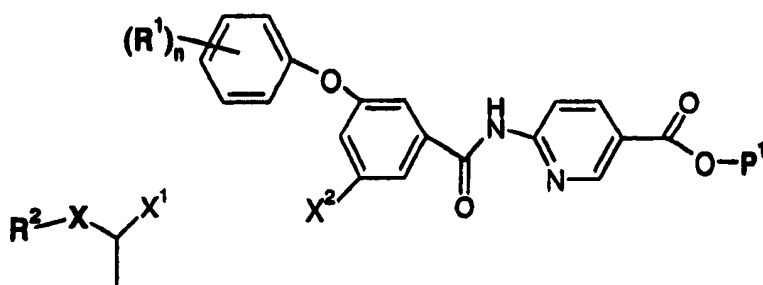
(b) 将式(IIIc)化合物脱保护,



式(IIIc)

其中 P<sup>2</sup> 是保护基; 或者

(c) 将式(III d)化合物与式(III e)化合物反应,

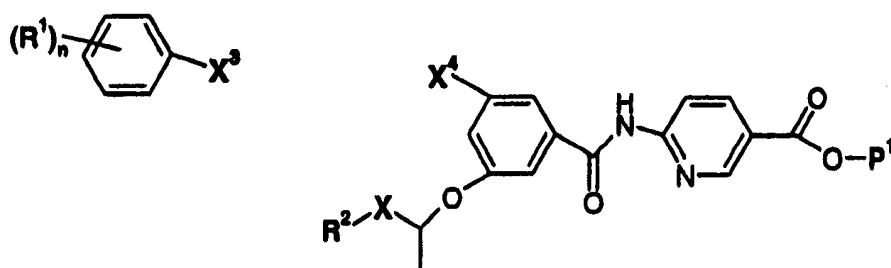


式(IIIId)

式(IIIe)

其中  $X^1$  是离去基团, 且  $X^2$  是羟基, 或者  $X^1$  是羟基, 且  $X^2$  是离去基团, 并且  $P^1$  是氢或保护基; 或者

(d) 将式(IIIe)化合物与式(IIIg)化合物反应

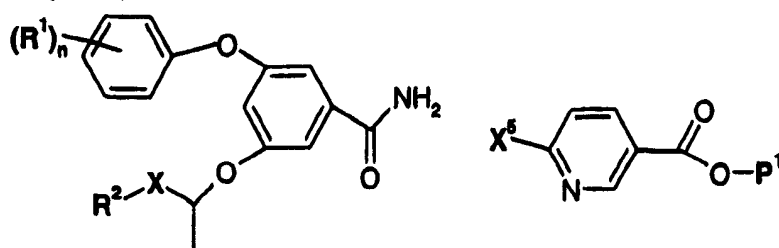


式(IIIf)

式(IIIg)

其中  $X^3$  是离去基团或有机金属试剂, 并且  $X^4$  是羟基, 或者  $X^3$  是羟基, 并且  $X^4$  是离去基团或有机金属试剂, 并且其中  $P^1$  是氢或保护基; 或者

(e) 将式(IIIh)化合物与式(IIIi)化合物反应,



式(IIIh)

式(IIIi);

其中  $X^5$  是离去基团, 并且其中  $P^1$  是氢或保护基;

并且之后如果需要的话:

- i) 将一种式(I)化合物转化成另一种式(I)化合物;
- ii) 除去任何保护基;
- iii) 形成其盐、前药或溶剂化物。

对于方法 a) - e), 合适的离去基团是本领域技术人员众所周知的,

并且包括例如活化的羟基离去基团(例如甲磺酸酯和甲苯磺酸酯基团), 以及卤素离去基团例如氟、氯或溴。

式(IIIa) - (IIIi)化合物可商购获得, 或者可以通过本领域已知的任何方便方法知道和/或如本发明实施例所述而知道。通常应该理解, 任何芳基-O 或烷基-O 键可以任选在合适的碱存在下通过亲核取代或金属催化的方法来形成。

对于上述反应, 具体的反应条件如下, 其中当  $P^1$  是保护基时,  $P^1$  优选为  $C_{1-4}$  烷基例如甲基或乙基:

方法 a) -氨基与羧酸的偶联反应以形成酰胺是本领域众所周知的。例如,

(i) 使用合适的偶联反应, 例如, 于室温, 在合适的溶剂例如 DCM、氯仿或 DMF 中, 在 DMAP 存在下, 使用 EDAC 进行的碳二亚胺偶联反应; 或者

(ii) 其中通过与草酰氯在合适的溶剂例如二氯甲烷存在下反应而将羧基活化成酰氯的反应。之后可于  $0^\circ\text{C}$  - 室温的温度下, 在合适的溶剂例如氯仿或 DCNM 中, 在碱例如三乙胺或吡啶存在下, 将酰氯与式 IIIb 化合物反应。

方法 b) -脱保护反应是本领域众所周知的。 $P^1$  的实例包括  $C_{1-6}$  烷基和苄基。当  $P^1$  是  $C_{1-6}$  烷基时, 该反应可在合适的溶剂例如 THF/水中, 在氢氧化钠存在下进行。

方法 c) -可将式(IIIId)和(IIIe)化合物一起在合适的溶剂例如 DMF 或 THF 中, 使用碱例如氢氧化钠或叔丁醇钾, 于  $0 - 100^\circ\text{C}$  温度下, 任选使用金属催化剂例如乙酸钡(II)、披钡碳、乙酸铜(II)或碘化铜(I)来进行反应; 或者, 可将式(IIIId)和(IIIe)化合物一起在合适的溶剂例如 THF 或 DCM 中, 使用合适的膦例如三苯基膦和偶氮二甲酸酯例如偶氮二甲酸二乙酯来进行反应。

方法 d) -可将式(IIIId)和(IIIe)化合物一起在合适的溶剂例如 DMF 或 THF 中, 使用碱例如氢氧化钠或叔丁醇钾, 于  $0 - 100^\circ\text{C}$  温度下, 任选使用金属催化剂例如乙酸钡(II)、披钡碳、乙酸铜(II)或碘化铜(I)来进行反应;

方法 e) -式(IIIh)化合物与式(IIIi)化合物的反应可以在极性溶剂例如 DMF 或非极性溶剂例如 THF 中, 使用强碱例如氢氧化钠例如氢氧化钠

或叔丁醇钾，于 0-100℃ 温度下，任选使用金属催化剂例如乙酸钡(II)、披钡碳、乙酸铜(II)或碘化铜(I)来进行。

在制备方法期间，使用用于分子内的官能团的保护基可能是有利的。保护基可以通过文献中描述的或化学领域技术人员已知的适于除去所关注的保护基的任何适宜方法来除去，方法的选择应实现保护基的除去并最小限度地干扰分子这的其他基团。

方便起见，下面给出保护基的具体实例，其中“低级”表示该基团优选具有 1-4 个碳原子。应理解这些实例不是穷举的。虽然下面给出除去保护基的方法的具体实例，但这些方法同样也不是穷举的。没有具体提及的保护基的使用和脱保护的方法显然属于本发明的范围内。

羧基保护基可以是成酯脂族或芳脂族醇的残基或成酯甲硅烷醇的残基(所述醇或甲硅烷基优选含有 1-20 个碳原子)。羧基保护基的实例包括直链和支链(C1-12)烷基(例如异丙基、叔丁基)；低级烷氧基低级烷基(例如甲氧基甲基、乙氧基甲基、异丁氧基甲基)；低级脂族酰氧基低级烷基(例如乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基、新戊酰氧基甲基)；低级烷氧基羰基氧基低级烷基(例如 1-甲氧基羰基氧基乙基、1-乙氧基羰基氧基乙基)；芳基低级烷基(例如对甲氧基苄基、邻硝基苄基、对硝基苄基、二苯甲基和 2-苯并[c]咪唑酮基)；三(低级烷基)甲硅烷基(例如三甲基甲硅烷基和叔丁基二甲基甲硅烷基)；三(低级烷基)甲硅烷基低级烷基(例如三甲基甲硅烷基乙基)；和(2-6C)链烯基(例如烯丙基和乙烯基乙基)。

特别适合除去羧基保护基的方法包括例如酸-、金属-或酶促-催化的水解。

羟基保护基的实例包括低级链烯基(例如烯丙基)；低级烷酰基(例如乙酰基)；低级烷氧基羰基(例如叔丁氧基羰基)；低级链烯基氧基羰基(例如烯丙基氧基羰基)；芳基低级烷氧基羰基(例如苯甲酰基氧基羰基、对甲氧基苄基氧基羰基、邻硝基苄基氧基羰基、对硝基苄基氧基羰基)；三低级烷基/芳基甲硅烷基(例如三甲基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基)；芳基低级烷基(例如苄基)；和三芳基低级烷基(例如三苯基甲基)。

氨基保护基的实例包括甲酰基、芳烷基(例如苄基和取代的苄基，

例如对甲氧基苄基、硝基苄基和 2,4-二甲氧基苄基, 和三苯基甲基); 二对茴香基甲基和呋喃基甲基; 低级烷氧基羰基(例如叔丁氧基羰基); 低级链烯基氧基羰基(例如烯丙基氧基羰基); 芳基低级烷氧基羰基(例如苄基氧基羰基、对甲氧基苄基氧基羰基、邻硝基苄基氧基羰基、对硝基苄基氧基羰基); 三烷基甲硅烷基(例如三甲基甲硅烷基和叔丁基二甲基甲硅烷基); 亚烷基(例如亚甲基); 亚苄基和取代的亚苄基。

适合除去羧基和氨基保护基的方法包括例如酸-、碱、金属-或酶促-催化的水解, 或对于基团例如邻硝基苄基氧基羰基, 使用光解, 或对于甲硅烷基, 使用氟离子。

酰胺基的保护基的实例包括芳烷氧基甲基(例如苄基氧基甲基和取代的苄氧基甲基); 烷氧基甲基(例如甲氧基甲基和三甲基甲硅烷基乙氧基甲基); 三烷基/芳基甲硅烷基(例如三甲基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基); 三烷基/芳基甲硅烷基氧基甲基(例如叔丁基二甲基甲硅烷基氧基甲基、叔丁基二苯基甲硅烷基氧基甲基); 4-烷氧基苄基(例如 4-甲氧基苄基); 2,4-二(烷氧基)苄基(例如 2,4-二甲氧基苄基); 4-烷氧基苄基(例如 4-甲氧基苄基); 2,4-二(烷氧基)苄基(例如 2,4-二(甲氧基)苄基); 和链烯基(例如烯丙基、丁-1-烯基和取代的乙烯基, 例如 2-苯基乙烯基)。

芳烷氧基甲基, 可以通过后者与适当芳烷氧基甲基氟反应引入到酰胺基上, 并且通过催化氢化除去。烷氧基甲基、三烷基/芳基甲硅烷基和三烷基/甲硅烷基氧基甲基可以通过将酰胺与适当氯化物反应来引入并用酸除去; 或在含有甲硅烷基基团的情况中, 使用氟离子。所述烷氧基苄基和烷氧基苄基通过与适当卤化物芳基化或烷基化引入并通过用硝酸铈铵氧化来除去。最后, 烷-1-烯基可以通过将酰胺与适当醛反应来引入并用酸除去。

下列实施例举例说明且不限定本申请的范围。各个例举的化合物代表本发明的具体和独立方面。在下列非限定实施例中, 除非另外说明:

(i) 蒸发是通过旋转蒸发在真空下进行且处理过程是在除去残留固体例如通过过滤除去干燥剂之后进行的;

(ii) 操纵是在室温下进行的, 也就是在 18 - 25℃ 的范围内并在惰性气体如氩气或氮气的气氛下进行;

(iii)收率仅是举例说明且无需是最大收率;

(iv)式(I)的终产物的结构是通过核(一般是质子)磁共振(NMR)和质谱技术来确定;质子磁共振化学位移值是在 $\delta$ 刻度上测量且峰的多重态显示如下:s,单峰;d,二重峰;t,三重峰;m,多重峰;br,宽封;q,四重峰;quin,五重峰;

(v)中间体一般没有完全定性,且纯度是通过薄层层析(TLC)、高效液相色谱(HPLC)、红外(IR)或NMR分析来评估的;

(vi) Biotage 筒是指预填充的硅胶筒(40g-400g),用 biotage 泵和级份收集器系统洗脱; Biotage UK Ltd, Hertford, Herts, UK.

### 缩写

DCM	二氯甲烷;
DMAP	4-(N,N-二甲基氨基)吡啶
DMSO	二甲亚砜;
DMF	二甲基甲酰胺;
EDAC	1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;
HPLC	高压液相色谱
HPMC	羟丙基甲基纤维素;
LCMS	液相色谱/质谱;
RT	室温; 和
THF	四氢呋喃。

根据下列标准制备方法来描述制备。

### 方法 A - 酯水解

向酯(0.2 mmol)在 THF (2-4 mL)内的溶液中加入氢氧化锂一水合物(2.5 当量)或氢氧化钠(5.0 当量)在水(2-4 mL)中的溶液。将该混合物在室温搅拌 2 - 4 小时。将该反应的 pH 调节至 <7.0, 真空除去 THF, 用水(8 mL)替换。将所得固体过滤, 用水洗涤, 干燥, 获得了所需的酸。如果适当的话, 用乙腈将酸研制, 然后过滤, 干燥所得固体以除去杂质。

### 方法 B - 硼酸偶联

将苯酚化合物(0.5 mmol)、硼酸(2 当量)、乙酸铜(II)(1-2 当量)、三



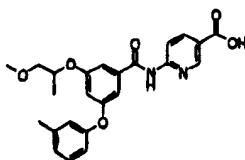
乙胺(5 当量)和新活化的 4Å 分子筛(1 g)在 DCM (5-10 mL)中的溶液于室温和环境气氛下搅拌 2-6 天。如果适当的话,再加入 DCM 以保持所需的溶液体积,加入另外的试剂以帮助转化成所需产物。将该反应混合物过滤,真空除去 DCM,把残余油状物在乙酸乙酯与盐酸(1-2 N)之间分配。分离出乙酸乙酯层,用碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>),蒸发,获得了残余物,通过硅胶色谱纯化,用 10-40% 乙酸乙酯在异己烷中的混合物洗脱,获得了所需的酯。

#### 方法 C-硼酸化合物合成

在-78℃,向溴化物(10 mmol)在乙醚(25 mL)内的溶液中加入 1.6M 正丁基锂在己烷中的溶液(11 mmol)。将该反应混合物在-78℃搅拌 10 分钟,加入硼酸三异丙酯(11mmol),将该反应混合物在-78℃搅拌 30 分钟。让该反应混合物达到室温,再搅拌 30 分钟,然后用水(20 mL)中止反应。分离出水层,用乙醚(25 mL)洗涤,用浓盐酸酸化至 pH 1。过滤出所得固体,用水洗涤,干燥,获得了所需的硼酸化合物。

#### 实施例 1

6-[3-{{(1*S*)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基}-5-{3-甲基苯氧基}苯基羰基氨基}吡啶-3-甲酸



实施例 1 是依据方法 A 由相应的酯 6-[[{3-[[{(1*S*)-1-甲基-2-(甲基氧基)乙基]氧基}-5-[(3-甲基苯基)氧基]苯基}羰基)氨基]吡啶-3-甲酸甲酯制得的。

$m/z$  437 (M+H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H NMR δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.2 (d, 3H), 2.3 (s, 3H), 3.3 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 4.75 (m, 1H), 6.75 (dd, 1H), 6.85 (m, 2H), 7.0 (d, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.3 (dd, 1H), 7.4 (s, 1H), 8.25 (dd, 2H), 8.85 (d, 1H), 11.15 (s, 1H).

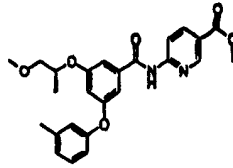
使用类似于实施例 1 的方法,采用合适的酯还制得了实施例 1.1-1.6.

No	结构	MS	NMR
1.1		423 (M+H) <sup>+</sup> 421 (M+H) <sup>-</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.22 (d, 3H), 3.25 (s, 3H 被溶剂峰遮蔽), 3.47 (m, 2H), 4.75 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 7.09 (d, 2H), 7.15 (m, 2H), 7.42 (m, 3H), 8.26 (s, 2H), 8.86 (s, 1H), 11.16 (s, 1H), 13.11 (brs, 1H).
1.2		459 (M+H) <sup>+</sup> 457 (M-H) <sup>-</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.23 (d, 3H), 3.28 (s, 3H 被溶剂峰遮蔽), 3.48 (m, 2H), 4.77 (s, 1H), 6.81 (d, 2H), 6.93 (s, 1H), 7.02 (m, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 8.28 (s, 2H), 8.87 (s, 1H), 11.19 (s, 1H), 13.11 (brs, 1H).

No	结构	MS	NMR
1.3		441 (M+H) <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.23 (d, 3H), 3.27 (s, 3H 被溶剂峰遮蔽), 3.47 (m, 2H), 4.76 (s, 1H), 6.76-7.09 (m, 4H), 7.22 (s, 1H), 7.43 (m, 2H), 8.27 (s, 2H), 8.86 (s, 1H), 11.18 (s, 1H), 12.68 (brs, 1H).
1.4			<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.2 (d, 3H), 3.3 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 4.8 (m, 1H), 6.95 (m, 2H), 7.0 (d, 1H), 7.2 (m, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.5 (s, 1H), 8.25 (dd, 2H), 8.85 (d, 1H), 11.2 (s, 1H).
1.5		467 (M+H) <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.2 (d, 3H), 1.3 (t, 3H), 3.3 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 4.0 (q, 2H), 4.8 (m, 1H), 6.6 (m, 2H), 6.8 (m, 2H), 7.2 (s, 1H), 7.3 (m, 1H), 7.4 (s, 1H), 8.25 (dd, 2H), 8.85 (d, 1H), 11.2 (s, 1H).
1.6		453 (M+H) <sup>+</sup> 451 (M-H) <sup>-</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.22 (d, 3H), 3.27 (s, 3H 被溶剂峰遮蔽), 3.46 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 4.73 (m, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.99 (d, 2H), 7.04 (m, 3H), 7.36 (s, 1H), 8.25 (m, 2H), 8.86 (s, 1H), 11.14 (s, 1H), 13.13 (brs, 1H).

用于实施例1的制备的中间体是如下所述制得的:

6-[3-{(1S)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基}-5-{3-甲基苯氧基}苯基羧基氨基]吡啶-3-甲酸甲酯



安装方法 B, 由 6-[[[3-羟基-5-[[[(1S)-1-甲基-2-(甲基氧基)乙基]氧基]苯基]羰基]氨基]吡啶-3-甲酸甲酯和 3-甲基苯基硼酸制得了用于实施例 1 的制备的合适的酯。

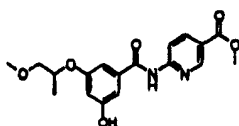
$m/z$  451 (M+H)<sup>+</sup>.

还制得了用于实施例 1.1 - 1.6 的制备的合适的酯。

No	结构	MS	NMR
1.1		437 (M+H) <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.22 (d, 3H), 3.27(s, 3H 被溶剂峰遮蔽), 3.47 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 4.74 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 7.08 (d, 2H), 7.18 (m, 2H), 7.42 (m, 3H), 8.29 (m, 2H), 8.88 (s, 1H), 11.21 (s, 1H).
1.2		473 (M+H) <sup>+</sup>	
1.3		455 (M+H) <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.23 (d, 3H), 3.27 (s, 3H 被溶剂峰遮蔽), 3.48 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 4.76 (s, 1H), 6.80-7.07 (m, 4H), 7.23 (s, 1H), 7.45 (m, 2H), 8.30 (m, 2H), 8.89 (s, 1H), 11.24 (s, 1H).
1.4		489 (M+H) <sup>+</sup>	
1.5		481 (M+H) <sup>+</sup>	
1.6		467 (M+H) <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.23 (d, 3H), 3.27 (s, 3H 被溶剂峰遮蔽), 3.46 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.73 (m, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.99 (d, 2H), 7.04 (m, 3H), 7.36 (s, 1H), 8.28 (m, 2H), 8.89 (s, 1H), 11.19 (s, 1H).

所用硼酸化合物是商购获得的或者是按照方法 C 由市售原料合成的。6-[[3-羟基-5-[[*(1S)*-1-甲基-2-(甲基氧基)乙基]氧基]苯基]羰基]氨基]吡啶-3-甲酸甲酯是如下所述制得的。

6-[3-[[*(1S)*-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基]-5-羟基苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸甲酯

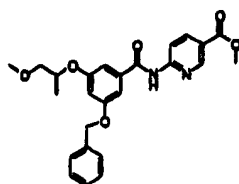


向 6-[(3-[(1*S*)-1-甲基-2-(甲基氧基)乙基]氧基]-5-[(苯基甲基)氧基]苯基]羰基]氨基]吡啶-3-甲酸甲酯(0.038 mol)在 THF (85 mL)内的搅拌着的溶液中加入甲醇(85 mL)。在氩气氛下加入披钨碳催化剂(1.7g 10% w/w)，将所得悬浮液在室温于氩气氛下搅拌过夜。经由硅藻土过滤出催化剂，用 THF 洗涤，将所得滤液蒸发，获得了浅棕色固体。用乙醚研制，获得了所需的化合物(产率为 72%)。

$m/z$  361 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 359 ( $M-H$ )<sup>-</sup>;

<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  ( $d_6$ -DMSO): 1.25 (d, 3H), 3.3 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 4.65 (m, 1H), 6.55 (m, 1H), 6.95 (m, 1H), 7.1 (m, 1H), 8.3 (m, 2H), 8.9 (m, 1H), 11.0, (s, 1H).

6-[3-[(1*S*)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基]-5-{苄基氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸甲酯



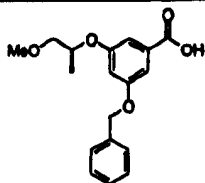
在氩气氛下向 3-[(1*S*)-1-甲基-2-(甲基氧基)乙基]氧基]-5-[(苯基甲基)氧基]苯甲酸(75.9 mmol)在含有 DMF (1 mL)的 DCM (250 mL)内的搅拌着的溶液中滴加草酰氯(151.7 mmol)，将所得溶液搅拌 4 小时。然后将该溶液真空蒸发，再与 DCM (3 × 100 mL)共沸，将残余物在高度真空下干燥，获得了酰氯，其不用定性而直接使用。

将上面获得的酰氯(约 75.9 mmol)溶解在 THF (100 mL)中，在氩气氛下加到 6-氨基烟酸甲酯(91.1 mmol)在 THF (100 mL)与吡啶(100 mL)的混合物内的搅拌着的溶液中。将该反应混合物搅拌过夜，然后真空除去大部分溶剂。将残余物置于乙酸乙酯(250 mL)中，把悬浮液依次用 1M 柠檬酸(2 部分，直至洗涤液呈酸性)和盐水洗涤；将所得溶液干燥( $MgSO_4$ )，蒸发，获得了粗产物，为棕色树脂状物。将其通过色谱法纯化(400 g Biotage 硅胶筒，用含有乙酸乙酯的己烷，20% v/v 洗脱)，获得了所需的化合物(产率为 50%)。

$m/z$  451.47 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 449.48 ( $M-H$ )<sup>-</sup>;

<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  ( $d_6$ -DMSO): 1.21 (d, 3H), 3.47 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.72 (m, 1H), 5.16 (s, 2H), 6.78 (t, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.31-7.49 (m, 5H), 8.32 (s, 2H), 8.90 (app t, 1H), 11.15 (s, 1H).

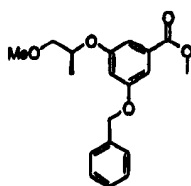
3-[(1*S*)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基-5-苄基氧基-苯甲酸



将 3-[[*(1S)*-1-甲基-2-(甲氧基)乙基]氧基]-5-[(苄基甲基)氧基]苯甲酸甲酯(77.4 mmol)在 THF (232 mL)与甲醇(232 mL)的混合物内的溶液用氢氧化钠溶液(2N) (232 mmol)处理, 将该反应混合物在室温搅拌 4 小时。将所得溶液用水(250 mL)洗脱, 真空除去大部分溶剂。将所得悬浮液用乙醚(3 × 200 mL)洗涤, 弃去洗涤液。将所得水溶液用盐酸(2M)酸化至 pH 4, 用乙酸乙酯(2 × 200 mL)萃取; 将萃取液合并, 用盐水洗涤, 干燥(MgSO<sub>4</sub>)并蒸发, 获得了所需的化合物(产率为 99%)。

<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  ( $d_6$ -DMSO): 1.20 (d, 3H), 3.46 (m, 2H), 4.64 (m, 1H), 5.15 (s, 2H), 6.83 (app t, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.30-7.49 (m, 5H), 12.67 (brs, 1H).

3-[(1*S*)-1-甲基-2-甲氧基-乙氧基-5-苄基氧基-苯甲酸甲酯



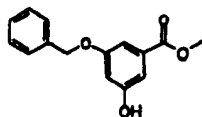
向 3-羟基-5-[(苄基甲基)氧基]苯甲酸甲酯(77.4 mmol)在 THF 内的溶液中加入聚合物负载的三苯基磷(51.7g 3mmol/g 负载量, 155 mmol)和 (R)-(-)-1-甲氧基-2-丙醇(102 mmol)。将该搅拌着的溶液用氩气覆盖, 在冰浴中冷却; 通过注射器用 10 分钟滴加偶氮二甲酸二异丙酯(116 mmol)。加入完成后, 将该溶液搅拌 20 分钟, 然后过滤, 将残余物用 THF (500 mL)洗涤; 将滤液和洗涤液合并, 蒸发, 获得了所需的化合物, 其不用进一步纯化直接用于下一步骤。

<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  ( $d_6$ -DMSO): 3.26 (s, 3H), 3.44 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 4.63

(m, 1H), 5.14 (s, 2H), 6.85 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.30-7.47 (m, 5H);

光谱还含有与少量二(1-甲基乙基)胍-1,2-二甲酸酯相一致的信号。

3-羟基-5-[苄基氧基]苯甲酸甲酯

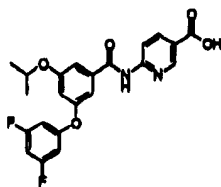


向 3,5-二羟基苯甲酸甲酯(5.95 mol)在 DMF (6 L)内的搅拌着的溶液中加入碳酸钾(9 mol), 将该悬浮液在室温于氩气下搅拌。用 1 小时向该悬浮液中缓慢地加入苄基溴(8.42 mol), 发生轻微的放热, 将该反应混合物在室温搅拌过夜。将其小心地用氯化铵溶液(5 L)处理, 然后用水(35 L)处理。将该水悬浮液用 DCM (1×3 L 和 2×5 L)萃取。将合并的萃取液用水(10 L)洗涤, 干燥(MgSO<sub>4</sub>)过夜。将该溶液真空蒸发, 把粗产物分三批进行色谱纯化(快速柱, 3×2 kg 硅胶, 用含有 10% DCM 的己烷, 至纯 DCM, 至含有 50% 乙酸乙酯的 DCM 进行梯度洗脱)以除去原料; 然后将所得粗的洗脱液以 175 g 批量进行色谱纯化(Amicon HPLC, 5 kg 正相硅胶, 用含有 20% v/v 乙酸乙酯的异己烷进行洗脱), 获得了所需的化合物(产率为 21%)。

<sup>1</sup>H NMR δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 3.8 (s, 3H), 5.1 (s, 2H), 6.65 (m, 1H), 7.0 (m, 1H), 7.05 (m, 1H), 7.3-7.5 (m, 5H), 9.85 (brs, 1H).

## 实施例 2

6-[3-{1-甲基乙氧基}-5-{3,5-二氟-苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸。



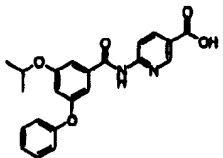
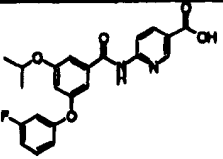
实施例 2 是按照方法 A, 由相应的酯 6-[(3-[(3,5-二氟苯基)氧基]-5-[(1-甲基乙基)氧基]苯基)羰基]氨基]吡啶-3-甲酸甲酯制得的。

m/z 429 (M+H)<sup>+</sup> 427 (M-H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H NMR δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.25 (d, 6H), 4.75 (m, 1H), 6.8 (dd, 2H), 6.9

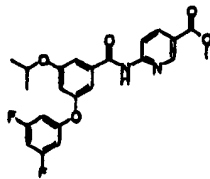
(s, 1H), 7.0 (m, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 8.3 (s, 2H), 8.9 (s, 1H), 11.2 (brs, 1H).

使用类似于实施例 2 的方法, 采用合适的酯, 还制得了实施例 2.1 - 2.2.

No	结构	MS	NMR
2.1		393 (M+H) <sup>+</sup> 391 (M+H) <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.28 (d, 6H), 4.73 (m, 1H), 6.74 (s, 1H), 7.07 (d, 2H), 7.18 (m, 2H), 7.42 (m, 3H), 8.26 (s, 2H), 8.86 (s, 1H), 11.15 (s, 1H), 13.12 (brs, 1H).
2.2		411 (M+H) <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.25 (d, 6H), 4.8 (m, 1H), 6.8 (s, 1H), 6.9 - 7.1 (m, 3H), 7.2 (s, 1H), 7.4 (m, 2H), 8.25 (s, 2H), 8.9 (s, 1H), 11.2 (brs, 1H)

用于实施例 2 的制备的中间体是如下所述制得的:

6-[3-{1-甲基乙氧基}-5-{3,5-二氟-苯氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸甲酯



用于实施例 2 的制备的合适的酯是按照方法 B 由 6-[(3-羟基-5-[(1-甲基乙基)氧基]苯基)羰基)氨基]吡啶-3-甲酸甲酯和 3,5-二氟苯基硼酸制得的。

m/z 443 (M+H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H NMR δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.3 (d, 6H), 3.9 (s, 3H), 4.75 (m, 1H), 6.8 (d, 2H), 6.9 (s, 1H), 7.0 (m, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 8.3 (s, 2H), 8.9 (s, 1H), 11.2 (brs, 1H).

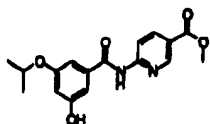
还制得了用于实施例 2.1 - 2.2 的制备的合适的酯。



No	结构	MS	NMR
2.1		407 (M+H) <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.28 (d, 6H), 3.86 (s, 3H), 4.73 (m, 1H), 6.73 (s, 1H), 7.07 (d, 2H), 7.18 (m, 2H), 7.43 (m, 3H), 8.29 (m, 2H), 8.88 (s, 1H), 11.20 (s, 1H).
2.2			<sup>1</sup> H NMR δ (d <sub>6</sub> -DMSO): 1.3 (d, 6H), 3.9 (s, 3H), 4.75 (m, 1H), 6.8 (s, 1H), 6.9 - 7.1 (m, 3H), 7.2 (s, 1H), 7.4 (m, 2H), 8.3 (s, 2H), 8.9 (s, 1H), 11.2 (brs, 1H).

所用的硼酸化合物是商购获得的或者是按照方法 C 由市售原料合成的。还如下所述制得了 6-[(3-(1-甲基乙氧基)-5-[(1-甲基乙基)氧基]苯基)羧基)氨基]吡啶-3-甲酸甲酯。

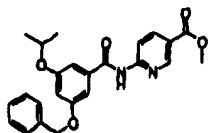
6-[3-{1-甲基乙氧基}-5-羟基苯基羧基氨基]吡啶-3-甲酸甲酯



向 6-[(3-[(1-甲基乙基)氧基]-5-[(苯基甲基)氧基]苯基)羧基)氨基]吡啶-3-甲酸甲酯(64.9 mmol)在 1:1 THF/甲醇混合物(1 L)内的搅拌着的溶液中加入披钨碳催化剂(3.3g 10% w/w)。将所得悬浮液在氢气氛下搅拌过夜。通过经由硅藻土过滤来除去催化剂，将所得滤液真空蒸发。用乙醚研制，获得了所需的化合物(产率为 73%)。

<sup>1</sup>H NMR δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.26 (d, 6H), 3.86 (s, 3H), 4.60-4.73 (m, 1H), 6.49 (t, 1H), 6.96 (t, 1H), 7.07 (t, 1H), 8.30 (s, 2H), 8.88 (app t, 1H), 9.67 (s, 1H), 11.01 (s, 1H)。

6-[3-{1-甲基乙氧基}-5-{苄基氧基}苯基羧基氨基]吡啶-3-甲酸甲酯

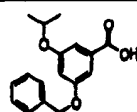


向 3-[(1-甲基乙基)氧基]-5-[(苯基甲基)氧基]苯甲酸(95.5 mmol)在 DCM (260 mL)和 DMF (1 mL)内的溶液中加入草酰氯(477.5 mmol)。将所得溶液搅拌 4 小时。将该反应混合物真空蒸发，将残余物与乙醚(3 × 150 mL)共沸，然后在高度真空下干燥 1 小时。把残余物溶解在 THF

(100 mL)中，在氩气氛下加到 6-氨基烟酸甲酯(114.6 mmol)在含有吡啶(40 mL)的 THF (100 mL)内的搅拌着的溶液中。将该反应混合物搅拌过夜，然后在乙酸乙酯与柠檬酸(1M)之间分配。将有机相合并，用柠檬酸(1M)、氢氧化钠溶液(0.5M)、水、盐水洗涤，干燥(MgSO<sub>4</sub>)，并真空浓缩。将残余物用乙酸乙酯研制，获得了所需的化合物(产率为 68%)。

<sup>1</sup>H NMR δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.26 (d, 6H), 3.86 (s, 3H), 4.65-4.77 (m, 1H), 5.16 (s, 2H), 6.74 (app t, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.30-7.50 (m, 6H), 8.29-8.35 (m, 2H), 8.90 (s, 1H), 11.14 (s, 1H).

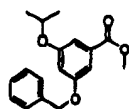
### 3-[1-甲基乙氧基]-5-[苄基氧基]苯甲酸



向 3-[(1-甲基乙基)氧基]-5-[(苄基甲基)氧基]苯甲酸甲酯(37g)在 1:1 的 THF/甲醇混合物(300 mL)内的溶液中加入氢氧化钠溶液(4M) (150ml)。将该混合物回流 45 分钟，然后真空除去有机相。用盐酸(2M)将水相酸化至 pH 4，用乙酸乙酯萃取。将有机相合并，用水、盐水洗涤，干燥(MgSO<sub>4</sub>)，并真空浓缩，获得了所需的化合物(33.45g)。其不用纯化而直接使用。

<sup>1</sup>H NMR δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.26 (d, 6H), 4.59-4.69 (m, 1H), 5.15 (s, 2H), 6.80 (app t, 1H), 7.04 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 7.33 (app t, 1H), 7.40 (t, 2H), 7.46 (d, 2H), 12.95 (s, 1H).

### 3-[1-甲基乙氧基]-5-[苄基氧基]苯甲酸甲酯

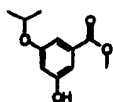


向 3-羟基-5-[(1-甲基乙基)氧基]苯甲酸甲酯(25g)在 DMF (250 mL)内的溶液中加入无水碳酸钾(297 mmol)和苄基溴(143 mmol)。将该混合物在 60℃搅拌 5 小时，然后冷却至室温。真空除去溶剂，把残余物在乙酸乙酯与水之间分配。将有机相合并，进一步用水、盐水洗涤，干燥(MgSO<sub>4</sub>)，并真空浓缩，获得了所需的化合物(37g)。其不用纯化而直接使用。

<sup>1</sup>H NMR δ (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.26 (d, 6H), 3.84 (s, 3H), 4.61-4.70 (m, 1H),

5.12 (s, 2H), 6.84 (t, 1H), 7.05 (app t, 1H), 7.12-7.15 (m, 1H), 7.31-7.37 (m, 1H), 7.40 (t, 2H), 7.46 (d, 2H)

3-羟基-5-[1-甲基乙氧基]苯甲酸甲酯

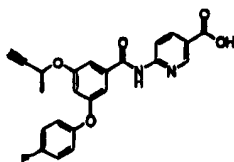


向 3,5-二羟基苯甲酸甲酯(0.1 mol)在 DMF (180 mL)内的搅拌着的溶液中加入碳酸钾粉末(0.2 mol)和 2-碘丙烷(0.1 mol), 将所得混合物在室温搅拌 16 小时。将该反应混合物倒入水(1000 mL)中, 用乙醚萃取该混合物。将萃取液合并, 依次用水(2 次)和盐水洗涤; 将该溶液干燥 ( $MgSO_4$ ), 过滤并真空蒸发, 获得了粗产物, 为浅黄色油状物(12.6g)。将其用甲苯(40 mL)处理, 让其静置过夜。通过过滤除去不溶物(苯酚原料), 把滤液真空蒸发。将所得油状物进行色谱法纯化( $2 \times 90$  g Biotage 硅胶筒, 用含有乙酸乙酯, 10%增至 15% v/v 的己烷洗脱)。获得了本标题化合物, 为油状物(产率为 25%), TLC 表明, 其与通过类似方法制得的样本相同。

$^1H$  NMR  $\delta$  ( $d_6$ -DMSO): 1.2 (d, 6H), 3.8 (s, 3H), 4.5 – 4.6 (hept, 1H), 6.55 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.95 (m, 1H), 9.8 (s, 1H).

实施例 3

6-[3-{4-氟苯氧基}-5-[(1S)-1-甲基丙-2-炔-1-基氧基]苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸



实施例 3 是按照方法 A, 由相应的酯 6-[[3-[(4-氟苯基)氧基]-5-[(1S)-1-甲基丙-2-炔-1-基]氧基]苯基)羰基]氨基]吡啶-3-甲酸甲酯制得的, 然而, 将酸性沉淀用乙酸乙酯萃取几次, 并浓缩, 获得了所需的化合物(产率为 55%)。

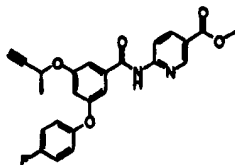
$m/z$  421( $M+H$ )<sup>+</sup>, 419 ( $M-H$ )<sup>-</sup>,

$^1H$  NMR  $\delta$  ( $d_6$ -DMSO): 1.55 (d, 3H), 3.55 (s, 1H), 5.21 (m, 1H), 6.83

(s, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.25 (m, 3H), 7.47 (s, 1H), 8.27 (m, 2H), 8.86 (s, 1H), 11.15 (s, 1H), 13.13 (brs, 1H).

用于实施例3的制备的中间体是如下所述制得的。

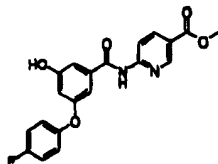
6-[3-{4-氟苯氧基}-5-((1S)-1-甲基丙-2-炔-1-基氧基)苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸甲酯



将偶氮二甲酸二异丙酯(1.1 mmol)以滴加的方式加到6-[[3-[(4-氟苯基)氧基]-5-羟基苯基]羰基)氨基]吡啶-3-甲酸甲酯(1 mmol)、三苯基膦(1.1 mmol)和(R) 3-丁炔-2-醇(1.1 mmol)在THF (10 mL)内的溶液中。将该反应在室温搅拌16小时。将该反应混合物真空浓缩,把残余物用1:1乙酸乙酯/异己烷研制,过滤,把滤液真空浓缩。通过硅胶色谱纯化残余物,用20-25%乙酸乙酯在异己烷中的混合物作为洗脱剂,获得了所需的化合物(产率为74%)。

$m/z$  436(M+H)<sup>+</sup>.

6-[3-{4-氟苯氧基}-5-羟基苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸甲酯

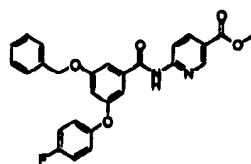


在氩气氛下,将披钨碳(10%重量)(250 mg)加到6-[[3-[(4-氟苯基)氧基]-5-[(苯基甲基)氧基]苯基]羰基)氨基]吡啶-3-甲酸甲酯(5.28 mmol)在THF (70 mL)和甲醇(70 mL)内的溶液中。将该惰性气氛用氢气替换,将该反应混合物在室温搅拌6小时。将氩气氛用空气替换,将该反应混合物经由硅藻土过滤,并真空浓缩。把残余物通过硅胶色谱纯化,用1-5%甲醇在DCM内的混合物作为洗脱剂,获得了所需的化合物(产率为78%)。

$m/z$  383(M+H)<sup>+</sup>, 381 (M-H)<sup>-</sup>,

<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  (d<sub>6</sub>-DMSO): 3.86 (s, 3H), 6.56 (s, 1H), 7.14 (m, 4H), 7.24 (m, 2H), 8.27 (m, 2H), 8.87 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 11.08 (s, 1H).

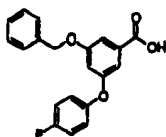
### 6-[3-{4-氟苯氧基}-5-{苄基氧基}苯基羰基氨基]吡啶-3-甲酸甲酯



将草酰氯(22.2 mmol)加到 3-[(4-氟苯基)氧基]-5-[(苄基甲基)氧基]苯甲酸(7.39 mmol)在 DCM (50 mL)和 DMF (0.5 mL)内的浆液中。将该反应在室温搅拌 6.5 小时,然后真空浓缩。把残余物与 DCM ( $\times 3$ )共沸,真空干燥。向残余物中加入 6-氨基烟酸甲酯(8.87 mmol)和吡啶 (40 - 50 mL),将该反应在氩气氛下搅拌 16 小时。将该反应真空浓缩,把残余物在乙酸乙酯与盐酸(2M)之间分配。分离出有机层,用饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,干燥( $\text{MgSO}_4$ )并真空浓缩。通过硅胶色谱纯化残余物,使用 30%乙酸乙酯在异己烷中的混合物作为洗脱剂,获得了所需的化合物(产率为 72%)。

$m/z$  473( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 471 ( $\text{M}-\text{H}^-$ );  $^1\text{H NMR } \delta$  ( $d_6$ -DMSO): 3.86 (s, 3H), 5.19 (s, 2H), 6.85 (s, 1H), 7.01-7.48 (m, 10H), 7.51 (s, 1H), 8.29 (m, 2H), 8.89 (s, 1H), 11.21 (s, 1H).

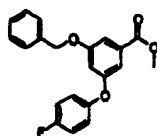
### 3-(4-氟苯氧基)-5-(苄基氧基)苯甲酸



将氢氧化钠溶液(1N) (42 mmol)加到 3-[(4-氟苯基)氧基]-5-[(苄基甲基)氧基]苯甲酸甲酯(8.32 mmol)在甲醇(30 mL)和 THF (10 mL)内的溶液中。将该反应在室温搅拌 16 小时,真空除去有机溶剂,用水代替。将该反应混合物用盐酸(2M)酸化,把沉淀过滤,用水洗涤,真空干燥,获得了所需的化合物(产率为 89%)。

$m/z$  337 ( $\text{M}-\text{H}^-$ );  $^1\text{H NMR } \delta$  ( $d_6$ -DMSO): 5.14 (s, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.14 (m, 2H), 7.17-7.49 (m, 8H), 13.07 (brs, 1H).

### 3-(4-氟苯氧基)-5-(苄基氧基)苯甲酸甲酯

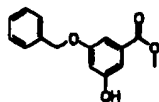


按照方法 B, 由 3-羟基-5-[(苄基甲基)氧基]苯甲酸甲酯制得了上述化合物。

$m/z$  351 (M-H)<sup>-</sup>;

<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  (d<sub>6</sub>-DMSO): 3.80 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 6.88-7.00 (m, 2H), 7.06-7.50 (m, 10H).

3-羟基-5-(苄基氧基)苯甲酸甲酯



实施例 1 中已经描述了 3-羟基-5-[(苄基甲基)氧基]苯甲酸甲酯的制备。

生物学

试验:

本发明的式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)、(Id)或(Ie)化合物的生物作用可以在下列试验中测试:

(1) GLK 的酶活性可以通过培养 GLK、ATP 和葡萄糖来测定。产物生成的速率可以通过将该试验与 G-6-P 脱氢酶、NADP/NADPH 体系偶联并测定 340nm 下光密度的增加来测定(Matschinsky 等人 1993)。化合物对 GLK 的激活可以使用该试验, 在或不在 GLKRP (GLK 调控蛋白)存在下来评估, 如 Brocklehurst 等人所述(Diabetes 2004, 53, 535-541)。

(2) GLK/GLKRP 结合试验用于测定 GLK 和 GLKRP 之间的结合作用。该方法可以用来鉴定通过调节 GLK 和 GLKRP 之间的相互作用来调节 GLK 的化合物。将 GLKRP 和 GLK 与抑制浓度的 F-6-P、任选在试验化合物存在的条件下培养, 并且测定 GLK 和 GLKRP 之间的相互作用。置换 F-6-P 或以某些其他方式减弱 GLK/GLKRP 之间相互作用的化合物将通过 GLK/GLKRP 复合物生成量的减少来检测。促进 F-6-P 结合或以某些其他方式提高 GLK/GLKRP 相互作用的化合物将通过 GLK/GLKRP 复合物生成量的增加来测定。此类结合试验的具体实例描述如下。

GLK/GLKRP 闪烁计数近接试验

如 WO01/20327 所述 (其内容引入本文以供参考), 重组人 GLK 和 GLKRP 用来显色 (develop) "混合和测定" 96 孔 SPA (闪烁计数近接试验 (scintillation proximity assay)). GLK (生物素化的) 和 GLKRP 与链霉抗生物素蛋白连接的 SPA 珠 (Amersham) 在抑制浓度的放射性标记的 [ $^3\text{H}$ ] F-6-P (Amersham Custom Synthesis TRQ8689) 的存在下培养, 得到信号. 置换 F-6-P 或以某些其他方式打破 GLK/GLKRP 结合相互作用的化合物使该信号消失.

结合试验在室温下进行 2 小时. 含有 50mM Tris-HCl (pH = 7.5)、2mM ATP、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM DTT、重组生物素化的 GLK (0.1 mg)、重组 GLKRP (0.1 mg)、0.05m Ci [ $^3\text{H}$ ] F-6-P (Amersham) 的反应混合物给出 100ml 的终体积. 随后培养, 通过加入 0.1mg/孔链霉抗生物素蛋白结合的 SPA 珠 (Amersham) 并在 Packard TopCount NXT 上闪烁计数来测定 GLK/GLKRP 复合物形成的程度.

(3) F-6-P/GLKRP 结合试验用于测定 GLKRP 和 F-6-P 之间的相互作用. 这种方法可以用来提供有关所述化合物的作用机理的信息. 在 GLK/GLKRP 结合试验中鉴定的化合物可以通过置换 F-6-P 或通过以某些其他方式改变 GLK/GLKRP 相互作用来调节 GLK 和 GLKRP 的相互作用. 例如, 蛋白-蛋白的相互作用一般被认为是通过多个结合位点间的相互作用而发生. 所以可能是改变 GLK 和 GLKRP 间相互作用的化合物可通过结合一个或多个若干不同结合位点发挥作用.

F-6-P/GLKRP 结合试验鉴定出只有那些通过从 GLKRP 上其结合位点置换 F-6-P 来调节 GLK 和 GLKRP 间相互作用的化合物.

GLKRP 与试验化合物和抑制浓度的 F-6-P、在 GLK 不存在的条件下培养, 并且测定 F-6-P 和 GLKRP 之间相互作用的程度. 置换 F-6-P 结合 GLKRP 的化合物可以通过 GLKRP/F-6-P 复合物生成量的改变来测定. 该结合试验的具体实例如下所述.

#### F-6-P/GLKRP 闪烁计数近接试验

如 WO01/20327 所述 (其内容引入本文以供参考), 重组人 GLKRP 用来显色 "混合和测定" 96 孔闪烁计数近接试验. FLAG-标记的 GLKRP 与蛋白 A 涂层的 SPA 珠 (Amersham) 和抗 FLAG 抗体在抑制浓度的放射性标记的 [ $^3\text{H}$ ] F-6-P 的存在下培养. 产生信号. 置换 F-6-P 的化合物将使这个信号消失. 本试验和所述 GLK/GLKRP 结合试验的联用将使

观察者能够鉴定出通过置换 F-6-P 打破 GLK/GLKRP 结合作用的化合物。

结合试验是在室温下进行 2 小时。含有 50mM Tris-HCl (pH = 7.5)、2mM ATP、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM DTT、重组 FLAG 标记的 GLKRP (0.1 mg), 抗 Flag M2 抗体(0.2mg) (IBI Kodak)、0.05mCi [<sup>3</sup>H]F-6-P(Amersham)的反应混合物得到 100ml 的终体积。培养后, 通过加入 0.1mg/孔链霉抗生物素蛋白结合的 SPA 珠(Amersham)并在 Packard TopCount NXT 上闪烁计数来测定 F-6-P/GLKRP 复合物形成的程度。

#### 重组 GLK 和 GLKRP 的制备:

##### mRNA 的制备

人肝脏全 mRNA 是通过在 4M 异硫氰酸胍、2.5mM 柠檬酸盐、0.5% Sarkosyl、100mM β-巯基乙醇中 polytron 均化、随后经 5.7M CsCl、25mM 乙酸钠在 135,000g(最大)离心、按照 Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T, 1989 所述来制备。

Poly A<sup>+</sup> mRNA 直接利用 FastTrack™ mRNA 分离试剂盒 (Invitrogen)来制备。

##### GLK 和 GLKRP cDNA 序列的 PCR 扩增

人 GLK 和 GLKRP cDNA 通过 PCR、由人肝脏 mRNA、利用 Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989 中所述的建立的技术来获得。按照 Tanizawa 等 1991 和 Bonthron, D. T.等 1994(后者在 Warner, J. P. 1995 修正)中所述的 GLK 和 GLKRP cDNA 序列设计 PCR 引物。

##### 在 Bluescript II 运载体中克隆

使用 pBluescript II (Short 等人 1998)将 GLK 和 GLKRP cDNA 克隆在大肠杆菌中, pBluescript II 是类似于 Yanisch-Perron C 等(1985)所用的重组克隆载体体系, 包含带有含多个独特限制位点的多连接体 DNA 片段的 colEI-基复制子, 侧面具有噬菌体 T3 和 T7 启动子序列; 复制的丝状噬菌体源和氨苄青霉素耐药性标记基因。

##### 转化

大肠杆菌转化一般通过电穿孔来进行。菌株 DH5a 或 BL21 (DE3) 的 400 ml 培养物在 L-肉汤中生长至 OD 600 为 0.5 且通过在 2,000g 下离心来收获。细胞用冰冷的去离子水洗涤 2 次, 再次悬浮在 1ml 10% 甘油中并以等份试样保存在 -70℃。连接混合物用 Millipore V series™



膜(0.0025mm)孔径)脱盐,40ml的细胞与1ml的连接混合物或质粒DNA在冰上在0.2cm电穿孔比色杯中培养10分钟,并且随后利用Gene Pulser™仪(BioRad)在 $0.5\text{kVcm}^{-1}$ ,250mF下加脉冲。在补充有10 mg/ml四环素或100 mg/ml氨苄青霉素的L-琼脂上选择转化体。

### 表达

GLK由载体pTB375NBSE在大肠杆菌BL21细胞中表达,产生重组蛋白,该重组蛋白含有与N-末端蛋氨酸紧邻的6-His标记。或者,另一种适当的载体是pET21(+)-DNA,Novagen,登记号697703。该6-His标记用于重组蛋白在填充有购自Qiagen(cat no 30250)的镍-次氨基三乙酸琼脂糖的柱上纯化。

GLKRP由载体pFLAG CTC(ABI Kodak)在大肠杆菌BL21细胞中表达,生成重组蛋白,该重组蛋白含有C-末端FLAG标记。该蛋白首先通过DEAE琼脂糖离子交换纯化,随后利用FLAG标记在购自Sigma-Aldrich(cat no. A1205)的M2抗-FLAG免疫亲和性柱上进行最后纯化。

### GLK的生物素化:

GLK通过与购自Sigma-Aldrich(登记号B2643)的生物素酰氨基己酸N-羧基琥珀酰亚胺酯(生物素-NHS)反应来生物素化。简单来说,靶向蛋白(GLK)的游离氨基与生物素-NHS以指定摩尔比反应形成稳定的酰胺键,得到含有共价结合的生物素的产物。通过透析除去产物中的过量、未偶联的生物素-NHS。具体而言,将7.5mg的GLK加入到存在于4mL 25mM HEPES pH = 7.3, 0.15M KCl, 1mM 二硫苏糖醇, 1mM EDTA, 1mM MgCl<sub>2</sub> (缓冲液A)中的0.31mg生物素-NHS。将该反应混合物相对于100mL的含有22mg生物素-NHS的缓冲液A透析。4小时后通过对缓冲液A的充分透析除去过量的生物素-NHS。

### 对大鼠口服给药后测定血浆水平和血浆蛋白结合

化合物对大鼠给药以及取血样

将行星式研磨的化合物[15分钟s, 500rpm, 5 Zirconium Balls, 在Pulverisette 7 Mill (Glen Creston Ltd, Stanmore, Middlesex, UK)中]悬浮在0.5% HPMC Tween中,以5ml/kg的速度和0.3 - 10mg/kg的剂量通过口服管饲法对高脂肪饮食(Research Diets, D12451, 随意进食14天)雌性Alderley Park Zucker或Alderley Park Wistar大鼠进行给药。

如下所述通过意识清醒状态下的取血样或最终的取血样来获得血样:

意识清醒状态下的取血样(用于化合物水平或血液化学) - 静脉内血样是使用 600 $\mu$ l Starstedt Multivette (EDTA)和 22G 针头在所需时间点从尾巴抽取的。在取血样后的 15 - 30 分钟内, 将血样在冰上保持, 并且以 3000rpm 离心 10 分钟。抽吸出血浆, 在-20 $^{\circ}$ C 贮存。

用于化合物水平或血液化学的最终的取血样 - 在试验结束时, 通过暴露于而 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 将动物安乐死。通过心脏穿刺来提取血样。在取血样后的 15 - 30 分钟内, 将血样在冰上保持, 并且以 3000rpm 离心 10 分钟。抽吸出血浆, 在-20 $^{\circ}$ C 贮存。

#### 测定大鼠血浆中的化合物水平

将 25 $\mu$ l 大鼠血浆加到 96 孔蛋白沉淀板 (Varian inc. Palo Alto, California, USA) 的孔中。向每个孔中加到含有 1 $\mu$ g/ml 作为内标物的 (3-异丙氧基-5-苄基氧基-苯甲酰基) 氨基吡啶-3-甲酸的 500 $\mu$ l 乙腈中以沉淀出血浆蛋白。然后将血浆/溶剂混合物在真空下从沉淀板中洗脱出来, 收集洗脱液。使用离心蒸发器将洗脱液蒸发至干, 在 200 $\mu$ l 甲醇:水:甲酸 (60:40:0.1) 中重新构成。

然后高效液相色谱法分析重新构成的样本, 该色谱具有串联的质谱检测 (HPLC-MS-MS)。该 HPLC 使用 Phenomenex Prodigy C8, 50  $\times$  4.6, 5 $\mu$ m. 柱 (Phenomenex, Macclesfield, UK) 以 1ml/分钟的流速, 使用 10 $\mu$ l 的注射体积以及下列梯度洗脱来进行:

流动相 A	0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	0.1% 甲酸在甲醇中的溶液
流动相梯度	0分钟 50% A
	0.5分钟 5% A
	2.5分钟 5% A
	2.6分钟 50% A
	3.0分钟 50% A.

质谱是用 Applied Biosystems API3000 质谱仪 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) 进行的。在运转样本之前, 将质谱仪进行关于试验化合物结构的优化。

试验样本的浓度是由试验样本的峰高度与内标物的峰高度的比例

确定的。从关于浓度比例的标准曲线计算试验样本的浓度，所述标准曲线是用如上所述进行处理的加到大鼠血清样本中的已知浓度的试验样本，使用(3-异丙氧基-5-苄基氧基-苯甲酰基)氨基吡啶-3-甲酸作为内标物而制得的。

#### 测定化合物与血浆蛋白的结合

化合物与血浆蛋白的结合是用平衡透析技术(W. Lindner 等人, J.Chromatography, 1996, 677, 1-28)测定的。在 37℃，使用血浆和等渗磷酸盐缓冲液 pH 7.4 (在每个透析室中分别为 1ml)将化合物以 20 μM 的浓度透析 18 小时。使用 Spectrum® 20-室平衡透析仪以及 Teflon 半微透析室和 Spectra/Por®2 膜盘，其分子量截止为 12 - 14000 道尔顿，47mm (由 PerBio Science UK Ltd, Tattenhall, Cheshire 提供)。透析之后，取出血浆和缓冲液样本，使用 HPLCUV/MS (具有 UV 和质谱检测的高效液相色谱)进行分析，获得了在血浆中的 % 游离水平。

#### 评估血浆半衰期

血浆半衰期是指化合物在血浆中的浓度降至其初始值的一半时的时间。这一般是通过如下方法测定的：静脉内施用试验化合物，然后如上所述测定血浆样本中的化合物浓度。从半对数图中估测血浆半衰期，所述图是用血浆浓度的 log 值( $\ln C_p$ )对着取样时间( $t$ , 直线)而绘制的。表现一级消除速度常数  $k$  等于直线的斜率，消除半衰期( $t_{1/2}$ )是速度常数的倒数(Gibaldi, M 和 Perrier, D, 1975 Pharmacokinetics, Marcel Dekker, New York):

$$t_{1/2} = \frac{1}{k}$$

本发明化合物具有下列特征:

- (i) 对于葡糖激酶的激活活性，其  $EC_{50}$  小于约 00nM;
  - (ii) 在血浆中的百分比游离浓度为约 0.04% - 约 1%;
  - (iii) 对于 1mg 化合物/kg 大鼠体重的标准化剂量，峰值血液水平 (包括结合和游离的)为约 0.3μM - 约 10μM; 和
  - (iv) 在血浆中的半衰期( $t_{1/2}$ )为至少约 1 小时。
- 例如，实施例 1 的化合物具有下列值:

EC <sub>50</sub>	%在血浆中的游离浓度	峰值血浆水平	t <sub>1/2</sub>
110nM	0.76%	2.06μM	6.4 小时

### 参考文献

- 1 Printz, R. L., Magnuson, M. A.和 Granner, D. K. (1993) Annual Review of Nutrition 13, 463-96
- 2 DeFronzo, R. A. (1988) Diabetes 37, 667-87
- 3 Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J.和 Passa, P. (1993) New England Journal of Medicine 328, 697-702
- 4 Bell, G. I., Pilkis, S. J., Weber, I. T.和 Polonsky, K. S. (1996) Annual Review of Physiology 58, 171-86
- 5 Velho, G., Petersen, K. F., Perseghin, G., Hwang, J. H., Rothman, D. L., Pueyo, M. E., Cline, G. W., Froguel, P.和 Shulman, G. I. (1996) Journal of Clinical Investigation 98, 1755-61
- 6 Christesen, H. B., Jacobsen, B. B., Odili, S., Buettger, C., Cuesta-Munoz, A., Hansen, T., Brusgaard, K., Massa, O., Magnuson, M. A., Shiota, C., Matschinsky, F. M.和 Barbetti, F. (2002) Diabetes 51, 1240-6
- 6a Gloyn, A.L., Noordam, K., Willemsen, M.A.A.P., Ellard, S., Lam, W.W.K., Campbell, I. W., Midgley, P., Shiota, C., Buettger, C., Magnuson, M.A., Matschinsky, F.M.,和 Hattersley, A.T.; Diabetes 52: 2433-2440
- 7 Glaser, B., Kesavan, P., Heyman, M., Davis, E., Cuesta, A., Buchs, A., Stanley, C. A., Thornton, P. S., Permutt, M. A., Matschinsky, F. M.和 Herold, K. C. (1998) New England Journal of Medicine 338, 226-30
- 8 Caro, J. F., Triester, S., Patel, V. K., Tapscott, E. B., Frazier, N. L.和 Dohm, G. L. (1995) Hormone & Metabolic Research 27, 19-22
- 9 Desai, U. J., Slosberg, E. D., Boettcher, B. R., Caplan, S. L., Fanelli, B., Stephan, Z., Gunther, V. J., Kaleko, M.和 Connelly, S. (2001) Diabetes 50, 2287-95
- 10 Shiota, M., Postic, C., Fujimoto, Y., Jetton, T. L., Dixon, K., Pan, D., Grimsby, J., Grippo, J. F., Magnuson, M. A.和 Cherrington, A.

**D. (2001) Diabetes 50, 622-9**

11 Ferre, T., Pujol, A., Riu, E., Bosch, F.和 Valera, A. (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7225-30

12 Seoane, J., Barbera, A., Telemaque-Potts, S., Newgard, C. B.和 Guinovart, J. J. (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274, 31833-8

13 Moore, M. C., Davis, S. N., Mann, S. L.和 Cherrington, A. D. (2001) *Diabetes Care* 24, 1882-7

14 Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J. A., Vazquez, P.和 Blazquez, E. (2002) *Journal of Neurochemistry* 80, 45-53

15 Lynch, R. M., Tompkins, L. S., Brooks, H. L., Dunn-Meynell, A. A.和 Levin, B. E. (2000) *Diabetes* 49, 693-700

16 Roncero, I., Alvarez, E., Vazquez, P.和 Blazquez, E. (2000) *Journal of Neurochemistry* 74, 1848-57

17 Yang, X. J., Kow, L. M., Funabashi, T.和 Mobbs, C. V. (1999) *Diabetes* 48, 1763-1772

18 Schuit, F. C., Huypens, P., Heimberg, H.和 Pipeleers, D. G. (2001) *Diabetes* 50, 1-11

19 Levin, B. E. (2001) *International Journal of Obesity* 25, supplement 5, S68-S72.

20 Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J. A., Thorens, B.和 Blazquez, E. (1996) *Journal of Neurochemistry* 66, 920-7

21 Mobbs, C. V., Kow, L. M.和 Yang, X. J. (2001) *American Journal of Physiology-Endocrinology & Metabolism* 281, E649-54

22 Levin, B. E., Dunn-Meynell, A. A.和 Routh, V. H. (1999) *American Journal of Physiology* 276, R1223-31

23 Spanswick, D., Smith, M. A., Groppi, V. E., Logan, S. D.和 Ashford, M. L. (1997) *Nature* 390, 521-5

24 Spanswick, D., Smith, M. A., Mirshamsi, S., Routh, V. H.和 Ashford, M. L. (2000) *Nature Neuroscience* 3, 757-8

25 Levin, B. E.和 Dunn-Meynell, A. A. (1997) *Brain Research* 776, 146-53

- 
- 26 Levin, B. E., Govek, E. K.和 Dunn-Meynell, A. A. (1998) Brain Research 808, 317-9**
- 27 Levin, B. E., Brown, K. L.和 Dunn-Meynell, A. A. (1996) Brain Research 739, 293-300**
- 28 Rowe, I. C., Boden, P. R.和 Ashford, M. L. (1996) Journal of Physiology 497, 365-77**
- 29 Fujimoto, K., Sakata, T., Arase, K., Kurata, K., Okabe, Y.和 Shiraishi, T. (1985) Life Sciences 37, 2475-82**
- 30 Kurata, K., Fujimoto, K.和 Sakata, T. (1989) Metabolism: Clinical & Experimental 38, 46-51**
- 31 Kurata, K., Fujimoto, K., Sakata, T., Etou, H.和 Fukagawa, K. (1986) Physiology & Behavior 37, 615-20**