(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104650047 A
(43)申请公布日 2015.05.27

(21)申请号 201510059285.0

(22)申请日 2011.11.15

(30)优先权数据
102010044131.7 2010.11.18 DE

(62)分案原申请数据
201180055239.3 2011.11.15

(71)申请人 拜耳知识产权有限责任公司
地址 德国蒙海姆

(72)发明人 H-C. 米利策尔 J. 格里斯 S. 克普

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 赵苏林 林森

(51)Int.Cl.
C07D 403/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页 附图11页

(54)发明名称

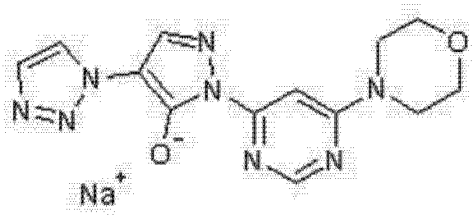
取代的1H-吡唑-5-酚钠

(57)摘要

本申请涉及1-[6-(吗啉-4-基)嘧啶-4-基]-4-(1H-1,2,3-三唑-1-基)-1H-吡唑-5-酚钠、其制备方法、其在治疗和/或预防疾病方面的应用以及其在制备用于治疗和/或预防疾病的药物方面的应用，特别是在治疗和/或预防心血管和血液系统疾病、肾脏疾病以及促进伤口愈合方面。

CN 104650047 A

1. 对应于式 (II) 化合物的 1-[6-(吗啉 -4- 基) 嘧啶 -4- 基]-4-(1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)-1H- 吡唑 -5- 酚钠



(II)。

2. 根据权利要求 1 的式 (II) 化合物,其特征在于 :所述式 (II) 化合物以晶体形式存在,在红外光谱中具有下述的振动谱带 :

结构元素	红外谱带位置 (cm^{-1})
v = C-H	3153-3006
vC-H	2976-2855
vC = C, vC = N	1630-1439
vC-N	1241
vC-O	1112
δ = $C-H_{同相}$	987

。

3. 根据权利要求 1 的式 (II) 化合物,其特征在于 :所述式 (II) 化合物以晶体形式存在,在拉曼光谱中具有下述的振动谱带 :

结构元素	拉曼谱带位置 (cm^{-1})
v = C-H	3153-3010
vC-H	2978-2856
vC = C, vC = N	1623-1401
vC-N	1244
vC-O	1118
δ = $C-H_{同相}$	988

。

4. 制备根据权利要求 1 的式 (II) 化合物的方法,其特征在于 :将式 (I) 化合物



(Ia) (I) (Ib)

在溶剂中与氢氧化钠或氢氧化钠水溶液，任选在添加碱的情况下，进行反应。

5. 根据权利要求 4 的制备式 (II) 化合物的方法，其特征在于：将所述式 (I) 化合物在溶剂中与氢氧化钠水溶液，任选在添加碱的情况下，进行反应。

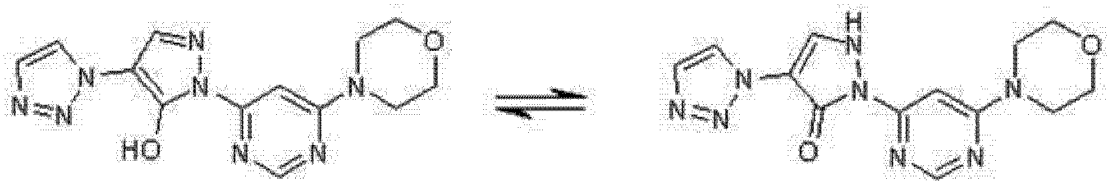
6. 根据权利要求 4 的制备式 (II) 化合物的方法，其特征在于：将所述式 (I) 化合物在溶剂中与氢氧化钠水溶液，在添加三乙胺的情况下，进行反应。

取代的 1H- 吡唑 -5- 酚钠

[0001] 本申请是分案申请，其母案是申请日为 2011 年 11 月 15 日、申请号为 201180055239.3、发明名称为“取代的 1H- 吡唑 -5- 酚钠”的申请。

[0002] 本申请涉及 1-[6-(吗啉 -4- 基)嘧啶 -4- 基]-4-(1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)-1H- 吡唑 -5- 酚钠、其制备方法、其在治疗和 / 或预防疾病方面的应用以及其在制备用于治疗和 / 或预防疾病的药物方面的应用，特别是在治疗和 / 或预防心血管和血液系统疾病、肾脏疾病以及促进伤口愈合方面。

[0003] 式(I)化合物，1-[6-(吗啉 -4- 基)嘧啶 -4- 基]-4-(1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)-1H- 吡唑 -5- 酚(烯醇形式；式(Ia)) 或 2-[6- (吗啉 -4- 基) 嘧啶 -4- 基]-4- (1H-1,2,3- 三唑 -1- 基) -1,2- 二氢 -3H- 吡唑 -3- 酮(酮形式；式(Ib)) 在 WO2008/067871 中是已知的。



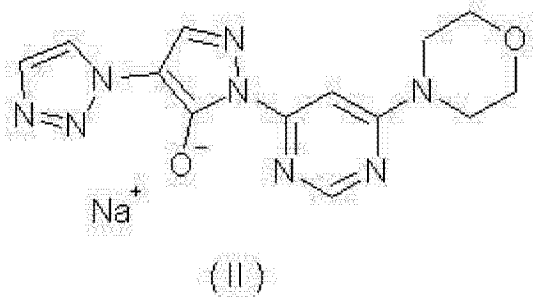
(Ia) (I) (Ib)

[0004] 式(I)的化合物起到 HIF- 脯氨酰 -4- 羟化酶的抑制剂的作用，并由于这个具体的作用机制在胃肠外或口服给药后在体内诱导 HIF- 靶基因，例如促红细胞生成素，而且导致由此引发的生物过程，例如红血球生成。

[0005] 所述式(I)化合物是吸湿性的，并且在通常的已经超过 20%rF 的相对空气湿度的环境条件(20-35℃，常压)吸收最多约 6 重量 % 的水分。在 30%rF 的空气湿度的情况下，几乎达到 6 重量 % 的水分吸收。在低于 30%rF 的减少的空气湿度的情况下，含有水的式(I)化合物再次释放出部分含有的水。这种水分吸收或水分释放使得处理所述式(I)化合物(例如称重过程)变得困难，并且使得制备以统一的、稳定的和确定的形式用于药物的式(I)化合物或制备含有所述式(I)化合物的药物变得困难。特别是由此在制备含有所述式(I)化合物的施用剂型(例如片剂、颗粒或饮用液)时提高了技术消耗，因为对于统一的式(I)化合物浓度需要采取控制和调节空气湿度的措施。

[0006] 如今令人惊奇地发现，由所述式(I)化合物可以制备钠盐，该钠盐相对于所述式(I)化合物具有起决定作用的优点。

[0007] 本发明的主题是对应于式(II)化合物的 1-[6-(吗啉 -4- 基) 嘧啶 -4- 基]-4-(1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)-1H- 吡唑 -5- 酚钠化合物

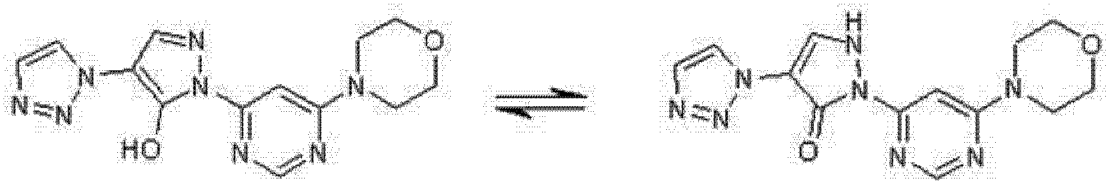


(II)

[0008] 在本发明的范围内，1-[6-(吗啉-4-基)嘧啶-4-基]-4-(1H-1,2,3-三唑-1-基)-1H-吡唑-5-酚钠(式(II)的化合物)优选以晶体形式存在。

[0009] 通过按照本发明使用所述式(II)化合物，确保在波动的空气湿度的情况下吸收或释放水分时达到相对于已知式(I)化合物显著更高的稳定性。1-[6-(吗啉-4-基)嘧啶-4-基]-4-(1H-1,2,3-三唑-1-基)-1H-吡唑-5-酚钠(式(II)的化合物)含有少于0.5重量%的水分，是没有吸湿性的，而且在通常的环境条件(20-35℃，常压)以及甚至在更高的最多90%rF的空气湿度下仅仅最小程度地改变其水分含量，即低于0.5重量%。所述式(II)化合物在技术上明显可以更容易地操作，即在称重过程中，特别是为了保证在施用剂型(例如颗粒、饮用液或片剂)中统一的式(II)化合物的浓度。此外，所述式(II)化合物相对于所述式(I)化合物具有提高的水溶性。

[0010] 本发明的另一主题是制备根据本发明的式(II)化合物的方法，其特征在于，将所述式(I)化合物



(Ia) (I) (Ib)

在溶剂中与氢氧化钠或氢氧化钠水溶液或钠盐，任选在添加碱的情况下，进行反应。

[0011] 优选制备根据本发明的式(II)化合物的方法，其特征在于，将所述式(I)化合物在溶剂中与氢氧化钠水溶液，任选在添加碱的情况下，进行反应。

[0012] 特别优选制备根据本发明的式(II)化合物的方法，其特征在于，将所述式(I)化合物在溶剂中与氢氧化钠水溶液，在添加三乙胺的情况下，进行反应。

[0013] 氢氧化钠或氢氧化钠水溶液或钠盐的反应通常在溶剂中，优选在20-120℃的温度范围，特别优选在40-70℃的温度范围，在常压下进行。将所述式(II)化合物从所得到的悬浮液中在-20℃到80℃的温度，优选在0-20℃的温度在常压下通过过滤而分离和然后干燥。

[0014] 如果在添加碱的情况下进行反应，通常首先在添加有机碱的情况下将所述式(I)化合物在20-120℃的温度，优选在40-70℃的温度，在常压溶于溶剂中，并且然后将所述式(II)化合物通过添加氢氧化钠或氢氧化钠水溶液或钠盐在20-120℃的温度，优选在40-70℃的温度，在常压下沉淀。将所述式(II)化合物从所得到的悬浮液中在-20℃到80℃的温度，优选在0-20℃的温度在常压下通过过滤而分离和然后干燥。

[0015] 以基于所述式(I)化合物计的0.8-2摩尔当量的摩尔比例使用氢氧化钠和氢氧化钠水溶液和钠盐。优选以基于所述式(I)化合物计的1.0-1.4摩尔当量的摩尔比例使用氢氧化钠和氢氧化钠水溶液和钠盐。

[0016] 合适的钠盐例如有有机酸盐，例如羧酸钠，例如乙酸钠或柠檬酸钠，或无机酸盐，例如碳酸钠、碳酸氢钠、磷酸钠、磷酸氢钠或氯化钠。

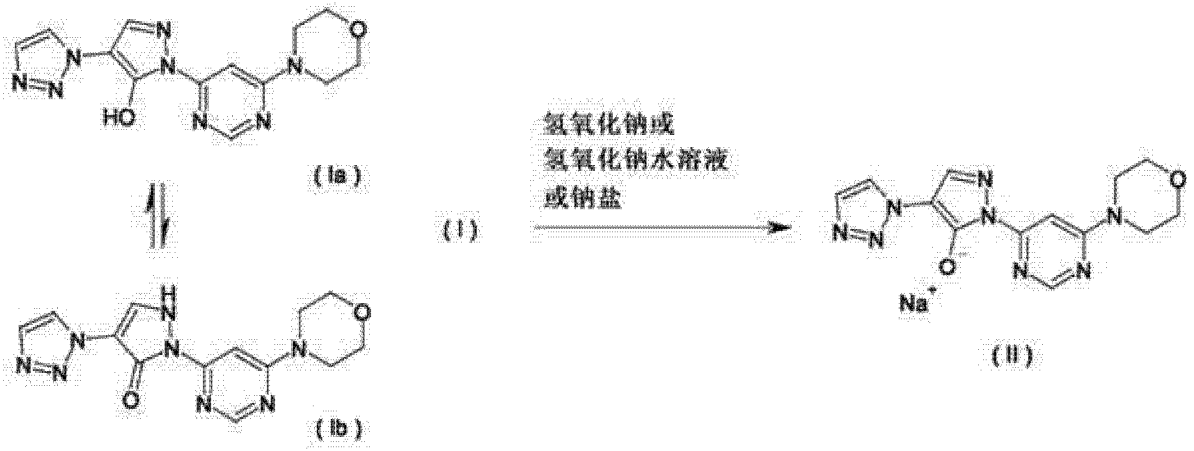
[0017] 合适的溶剂是低级醇，例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、仲丁醇、异丁醇、1-戊醇、或四氢呋喃、或乙腈、或甲苯、或1,4-二噁烷或上述溶剂的混合物、或上述溶剂与水的混合物。优选甲醇、乙醇、2-丙醇、四氢呋喃、或所提到的溶剂与水的混合物。特别优选

甲醇与水或乙醇与水以 1 :1 到 50 :1 （v/v）的比例的混合物，完全特别优选甲醇与水以 7 ：3 到 30 :1 （v/v）的比例的混合物。

[0018] 合适的有机碱是叔胺，例如三乙胺或二异丙基乙基胺。优选三乙胺。以基于所述式（I）化合物计的 0-4 摩尔当量的比例使用所述有机碱。优选以基于所述式（I）化合物计的 0.7-1.5 摩尔当量的比例使用所述有机碱。

[0019] 制备本发明的式（II）化合物可以通过下列反应示意图直观化。

[0020] 示意图



[0021] 附图说明：

图 1 ： 式（II）化合物和式（I）化合物的红外光谱

图 2 ： 式（II）化合物和式（I）化合物的拉曼光谱

图 3 ： 式（II）化合物和式（I）化合物的 UV/VIS 光谱

图 4 ： 式（II）化合物的 ^{1}H-NMR 图谱

图 5 ： 式（I）化合物的 ^{1}H-NMR 图谱

图 6 ： 式（II）化合物的 ^{13}C-NMR 图谱

图 7 ： 式（I）化合物的 ^{13}C-NMR 图谱

图 8 ： 式（II）化合物的质谱

图 9 ： 式（I）化合物的质谱

图 10 ： 式（II）化合物的 X- 射线衍射图

图 11 ： 式（I）化合物的 X- 射线衍射图。

[0022] 本发明的式（II）化合物展示了不可预见的、有价值的药物活性光谱。因此，它适合用作治疗和 / 或预防人或动物的疾病的药物。

[0023] 本发明的式（II）化合物的特点在于作为 HIF- 脯氨酰 -4- 羟化酶的特定抑制剂。

[0024] 由于其药学特性，本发明的式（II）化合物可以用于治疗和 / 或预防心血管疾病，特别是心功能不全、冠状动脉心脏病、心绞痛、心肌梗死、中风、动脉硬化、原发性、肺和恶性高血压以及外周动脉闭塞性疾病。

[0025] 此外，本发明的式（II）化合物适用于治疗和 / 或预防造血紊乱，例如原发性贫血，肾脏贫血和伴随肿瘤疾病的贫血（特别是化疗引起的贫血症）、感染（特别是 HIV 感染）或其它炎症性疾病，例如类风湿性关节炎。此外，本发明的式（II）化合物适用于辅助性治疗由于失血引起的贫血、缺铁性贫血、缺维生素性贫血（例如由于缺乏维生素 B12 或缺乏叶酸引

起的)、发育不良和再生障碍性贫血、溶血性贫血、或者用于辅助性治疗铁利用紊乱造成的贫血(铁失利用性贫血)或其它内分泌紊乱(例如甲状腺功能减退)造成的贫血。

[0026] 另外,本发明的式(II)化合物适用于为了在手术前获得自血捐献的血液而增加血细胞比容。

[0027] 此外,本发明的式(II)化合物可以用于治疗和/或预防在外科手术之后由手术引起的缺血状态及其后遗症,尤其是在使用心肺机(例如搭桥手术、心脏瓣膜植入)的情况下对心脏的干预、对颈动脉的干预、对主动脉(Aorta)的干预和通过仪器打开或颅盖渗透的干预。另外,本发明的式(II)化合物适用于在外科手术的情况下为了加速伤口愈合和缩短康复时间而进行的一般性治疗和/或预防。

[0028] 另外,本发明的式(II)化合物适用于治疗和/或预防急性和长期性脑缺血状态(如中风,出生窒息)的后遗症。

[0029] 另外,本发明的式(II)化合物可以用于治疗和/或预防癌症,以及治疗和/或预防在治疗癌症过程中出现的健康状况的损伤,特别是在通过细胞抑制剂,抗生素和辐照的治疗之后。

[0030] 另外,本发明的式(II)化合物适用于治疗和/或预防风湿性疾病和其它算作自身免疫性疾病的疾病形式,以及特别是治疗和/或预防在药物治疗这些疾病的过程中出现的健康状况的损伤。

[0031] 另外,本发明的式(II)化合物可以用于治疗和/或预防眼科疾病(例如青光眼)、脑科疾病(例如帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、痴呆症、慢性痛觉)、慢性肾脏疾病、肾功能不全和急性肾功能衰竭以及用于促进伤口愈合。

[0032] 另外,本发明的式(II)化合物适用于治疗和/或预防特别是在较高寿命经常出现的一般性身体虚弱,甚至是恶病质。

[0033] 另外,本发明的式(II)化合物适用于治疗和/或预防性功能障碍。

[0034] 另外,本发明的式(II)化合物适用于治疗和/或预防糖尿病及其后遗症,例如糖尿病大血管和毛血管病变、糖尿病性肾病变和神经病。

[0035] 另外,本发明的式(II)化合物适用于治疗和/或预防纤维化疾病,例如心脏、肺和肝脏的纤维化疾病。

[0036] 本发明的式(II)化合物也特别适用于治疗和/或预防早产儿视网膜病变(retinopathia prematurorum)。

[0037] 本发明的另一主题是将本发明的式(II)化合物用于治疗和/或预防疾病特别是治疗和/或预防上述的疾病的用途。

[0038] 本发明的另一主题是将本发明的式(II)化合物用于制备治疗和/或预防疾病特别是上述的疾病的药物的用途。

[0039] 本发明的另一主题是在使用有效量的本发明的式(II)化合物的情况下治疗和/或预防疾病特别是上述疾病的方法。

[0040] 本发明的式(II)化合物可以单独或者根据需要连同其它活性物质一起使用。本发明的另一主题是包含本发明的式(II)化合物和一种或多种其它活性物质的药物,特别是用于制备治疗和/或预防上述的疾病。优选的合适的组合活性物质例如有:ACE-抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、β受体阻滞剂、钙拮抗剂、PDE-抑制剂、盐皮质激素受体拮抗剂、

利尿剂、阿司匹林、补充铁剂、维生素 B12 和叶酸补充剂、他汀类药物、洋地黄(地高辛)衍生物、肿瘤化疗药物以及抗生素。

[0041] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同 ACE- 抑制剂一起给药,优选的 ACE- 抑制剂例如有依那普利、卡托普利、赖诺普利、雷米普利、地拉普利、福辛普利、喹罗普利(quinopril)、哌道普利或川多普利。

[0042] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同血管紧张素 AII 拮抗剂一起给药,优选的血管紧张素 AII 拮抗剂例如有氯沙坦、坎地沙坦、缬沙坦、替米沙坦或恩布沙坦。

[0043] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同 β 受体阻滞剂一起给药,优选的 β 受体阻滞剂例如有普萘洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、心得舒、心得平、喷布特罗、布拉洛尔、美替洛尔、纳多洛尔、甲吲洛尔、咔唑心安、索他洛尔、美托洛尔、倍他洛尔、塞利洛尔、比索洛尔、卡替洛尔、艾司洛尔、拉贝洛尔、卡维地洛、阿达洛尔、兰地洛尔、奈必洛尔、依泮洛尔或布新洛尔。

[0044] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同钙拮抗剂一起给药,优选的钙拮抗剂例如有硝苯地平,amlopidine,维拉帕米或地尔硫卓。

[0045] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同磷酸二酯酶(PDE)抑制剂一起给药,优选的 PDE- 抑制剂例如有米力农、氨力农、匹莫苯、西洛他唑、西地那非、伐地那非或他达拉非。

[0046] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同盐皮质激素受体拮抗剂一起给药,优选的盐皮质激素受体拮抗剂例如有螺内酯、依普利酮、烯睾丙内酯或坎利酸钾。

[0047] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同利尿剂一起给药,优选的利尿剂例如有呋塞米、布美他尼、托拉塞米、苄氟噻嗪、氯噻嗪、氢氯噻嗪、氢氟噻嗪、甲氯噻嗪、泊利噻嗪、三氯甲噻嗪、氯噻酮、吲达帕胺、美托拉宗、喹乙宗、乙酰唑胺、二氯苯酰胺、甲醋唑胺、甘油、异山梨醇、甘露醇、氨氯吡咪或氨苯蝶啶。

[0048] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同出自他汀类的 HMG-CoA- 还原酶抑制剂一起给药,优选的 HMG-CoA- 还原酶抑制剂例如有洛伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀、西立伐他汀或匹伐他汀。

[0049] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同肿瘤化疗药物一起给药,优选的肿瘤化疗药物例如有铂配合物(例如顺铂和卡铂)、烷基化剂(例如环磷酰胺和苯丁酸氮芥)、抗代谢物(例如 5- 氟尿嘧啶和氨甲喋呤)、拓扑异构酶抑制剂(例如鬼臼乙叉甙和喜树碱)、抗生素(例如阿霉素和柔红霉素)、或激酶抑制剂(例如索拉非尼和舒尼替尼)。

[0050] 在本发明优选的实施方式中,本发明的式(II)化合物连同抗生素一起给药,优选的抗生素例如有青霉素类,头孢菌素类或喹诺酮类,例如环丙沙星和莫西沙星。

[0051] 本发明的另一主题是包含本发明的式(II)化合物和通常一种或多种惰性的、无毒性的、药学上适用的助剂的药物,以及其为了上述目的的应用。

[0052] 本发明的式(II)化合物可以系统性地和 / 或局部地起作用。为此目的,可以以合适的方式施用它,例如口服、胃肠外、经肺、经鼻、经舌下、经舌、经颊、经直肠、经皮肤、透皮、经结膜、经耳给药或以植入物或支架的形式给药。

[0053] 对于这些施用途径，本发明的式（II）化合物可以以合适的施用剂型进行给药。

[0054] 对于口服施用按照现有技术可行的、快速和 / 或以改性的形式给出本发明的式（II）化合物的合适的施用剂型，例如有片剂（未包衣或包衣的片剂，例如具有耐胃液或迟缓溶解或者是不溶性的包衣，该包衣控制本发明的化合物的释放）、在口腔中快速分解的片剂或膜 / 胶囊、膜 / 冻干物、胶囊（例如硬或软明胶胶囊）、糖衣药丸、颗粒剂、丸剂、粉剂、乳化剂、悬浮液、气雾剂或溶液。

[0055] 胃肠外给药可以在绕过吸收步骤的情况下进行（例如静脉内、动脉内、心脏内、脊柱内或腰髓内）或在开启吸收的情况下进行（例如肌内、皮下、皮内、经皮或腹膜内）。对于胃肠外施用，合适的施用剂型主要是以溶液、悬浮液、乳化液、冻干物或无菌粉末的形式注射和输入制剂。

[0056] 对于其它的施用途径，合适的例如有吸入药剂剂型（特别是粉末吸入器、喷雾器）、鼻用滴剂、鼻用溶液或鼻用喷雾剂，可以舌、舌下或口腔施用的片剂，膜 / 胶囊或胶囊，栓剂，耳朵或眼睛制剂，阴道胶囊，水性悬浮液（洗剂，震荡合剂），亲脂性悬浮液，软膏，乳膏，经皮治疗体系（如膏药），乳液，糊剂，泡沫剂，撒用粉，植入物或支架。

[0057] 优选口服或胃肠外施用，特别是口服和静脉内施用。

[0058] 本发明的式（II）化合物可以转化为列出的施用剂型。这可以以本身已知的方式通过与惰性的、无毒性的、药学上适用的助剂混合而进行。这些助剂主要有载体物质（例如微晶纤维素、乳糖、甘露醇）、溶剂（例如液态聚乙二醇）、乳化剂、分散剂或润湿剂（例如十二烷基硫酸钠、聚氧山梨糖醇油酸盐 / 酯）、粘合剂（例如聚乙烯基吡咯烷酮）、合成和天然的聚合物（例如清蛋白）、稳定剂（例如抗氧化剂如抗坏血酸）、着色剂（例如无机颜料如铁的氧化物）以及味道和 / 或气味矫味剂。

[0059] 通常，证明有利的是，为了达到有效的效果在胃肠外施用时给药量为基于体重计的约 0.001-1mg/kg，优选约 0.01-0.5mg/kg。在口服施用时，剂量为基于体重计的约 0.01-100mg/kg，优选约 0.01-20mg/kg 和完全特别优选 0.1-10mg/kg。

[0060] 尽管如此，任选可能需要与所述量有所偏差，特别是取决于体重、施用途径、相对于活性物质的个体行为、制剂种类以及进行施用的时间点或时间间隔。因此，在一些情况下使用少于上述的最少量可能已经足够，而在其它的情况下还必须超过上述的上限。在大量施用的情况下，推荐可以分配在一天中多次给药。

[0061] 下面的实施例阐述了本发明。本发明不限于所述实施例。

[0062] 如果不另作说明，在下面试验和实施例中的百分比说明是重量百分比；份为重量份。液体或液体溶液的溶剂比例、稀释比例和浓度说明分别是指体积。

[0063] A. 实施例

缩写：

ACN	乙腈
bS	宽单峰（在 NMR 图谱中）
D	双峰（在 NMR 图谱中）
DSC	差示扫描量热法
Gew%	重量 %
M	多重峰（在 NMR 图谱中）

n.d.	没有检测
NMR	核磁共振
rF	相对湿度
S	单峰(在 NMR 图谱中)
sec	秒
T	三重峰（在 NMR 图谱中）
v/v	体积 / 体积
δ	变形振动
v	伸缩振动。

[0064] 起始化合物

实施例 1A

2-（1H-1,2,3- 三唑 -1- 基）丙烯酸甲酯

将 450g 的 2-（1H-1.2,3- 三唑 -1- 基)乙酸乙酯溶于 3.5l 甲醇中，加入 30g 三乙胺并在 22℃搅拌 16 小时。然后，在真空中蒸馏出所有溶剂。得到 410g 油状的标题化合物。

[0065] 实施例 2A

3-（二甲氨基）-2-（1H-1,2,3- 三唑 -1- 基）丙烯酸甲酯

将 522g 二甲基甲酰胺二甲基缩醛加入到 400g 的 2-（1H-1,2,3- 三唑 -1- 基）丙烯酸甲酯中，并加热至沸腾。蒸馏出生成的低沸物。在 4 小时后冷却到 55℃，并计量加入 1050ml 甲基叔丁醚 /2- 丙醇（3 :1 v/v)。将所得到的悬浮液冷却到 22℃，并过滤。 将滤饼多次用甲基叔丁醚冲洗，并在真空中在 40℃干燥。得到 493g 固体的标题化合物。

[0066] 将实施例 3A

1-[6-（吗啉 -4- 基)嘧啶 -4- 基]-4-（1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)-1H- 吡唑 -5- 酚(烯醇形式 ;式（Ia))或 2-[6-（吗啉 -4- 基)嘧啶 -4- 基]-4-（1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)-1,2- 二氢 -3H- 吡唑 -3- 酮(酮形式 ;式（Ib))

将 5.84g 三氟乙酸加入到在 210ml 乙酸乙酯中的 20g 的 4-（6- 肼基嘧啶 -4- 基)吗啉和 24.6g（2E/ Z)-3-（二甲氨基）-2-（1H-1,2,3- 三唑 -1- 基）丙烯酸甲酯，并将该混合物在回流下搅拌 24 小时。将得到的悬浮液冷却至 0℃，并过滤。将滤饼用乙酸乙酯冲洗，强烈地抽吸过滤并然后悬浮在 160ml 水中。通过添加 4.5ml 乙酸将所述悬浮液调节到大约 pH5，再搅拌 15 分钟并过滤。将滤饼用 50ml 水冲洗两次，并然后在真空中在 40℃干燥。产率 :26.0g（理论值的 79.4%）标题化合物。

[0067] 在 WO 2008/067871 中已经描述了化合物 4-（6- 肼基嘧啶 -4- 基）吗啉(实施例 16A)、2-(1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)乙酸乙酯(实施例 39A)和 3-(二甲氨基)-2-(1H-1,2,3- 三唑 -1- 基）丙烯酸乙酯(实施例 3A）的制备。

[0068] 在 WO 2008/067871 中同样描述了由 4-（6- 肼基嘧啶 -4- 基）吗啉和 3-（二甲氨基)-2-（1H-1,2,3- 三唑 -1- 基）丙烯酸乙酯制备化合物 2-（6- 吗啉 -4- 基嘧啶 -4- 基）-4-（1H-1,2,3- 三唑 -1- 基）-1,2- 二氢 -3H- 吡唑 -3- 酮(实施例 71)。

[0069] 实施例 :

实施例 1

1-[6-（吗啉 -4- 基)嘧啶 -4- 基]-4-（1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)-1H- 吡唑 -5- 酚钠(式

(II)的化合物)

实施例 1.1

将 10g 实施例 3A 中的化合物悬浮在 50ml 甲醇 / 水(9 :1 v/v)。在搅拌下向所述悬浮液中加入 3.4g 的 45% 的氢氧化钠溶液,并再添加 50ml 甲醇 / 水(9 :1 v/v)。将所述悬浮液加热到 50℃,并在 50℃搅拌 2 小时。然后冷却到 0℃,再在 0℃搅拌 1 小时并过滤。将所得到的滤饼用甲醇 / 水(9 :1 v/v)冲洗并干燥。产率 :10.1g 式(II)化合物 ;6.8 重量 % 的钠。

[0070] 实施例 1.2

将 5g 实施例 3A 中的化合物悬浮在 60ml 乙醇 / 水(1 :1 v/v),并在 22℃加入 1.41g 的 45% 的氢氧化钠溶液。将所述悬浮液在 50℃搅拌 3 天,并在 20℃搅拌 2 小时。将其中固体过滤出来,用 10ml 水冲洗并干燥。产率 :4g 式(II)的化合物。

[0071] 实施例 1.3

将 30.25g 实施例 3A 中的化合物在 22℃悬浮在 150ml 甲醇 / 水(9 :1 v/v)。加入 13.3ml 三乙胺,并将该混合物加热到 60℃。在 15 分钟后过滤所得到的几乎透明溶液,然后用 10ml 甲醇 / 水(9 :1 v/v)冲洗过滤器,并在 60℃向所收集到的滤液中慢慢加入 10.3g 的 45% 的氢氧化钠溶液。向所得到的悬浮液中加入少量式(II)化合物的晶体,再在 60℃搅拌 1 小时,然后慢慢冷却到 0℃并过滤。将滤饼用 15ml 甲醇 / 水(9 :1 v/v)冲洗,并在真空中在 40℃干燥。产率 :25.1 g 式(II)的化合物。

[0072] 实施例 1.4

将 25g 实施例 3A 中的化合物悬浮在 150ml 甲醇 / 水(1 :1 v/v),并加入 11ml 三乙胺。将所得到的溶液加热到 60℃,并加入 8.5g 的 45% 的氢氧化钠溶液。将所获得的悬浮液慢慢冷却到 22℃,并在 22℃搅拌 2 小时和然后在 0-5℃搅拌 1 小时。在过滤后将滤饼用 15ml 甲醇 / 水(1 :1 v/v)冲洗,并在真空中在 40℃干燥。产率 :26g 式(II)的化合物。

[0073] 差示扫描量热法(DSC):

通过使用 Perkin-Elmer 公司的差示扫描量热仪 DSC7 或 Pyris-1 和热重分析仪 TGA7 得到差示热分析图。

[0074] 差示扫描量热仪 DSC7 或 Pyris-1 ;制造商 :Perkin-Elmer ;加热速度 :2 和 20K/min ;吹扫气体 :氮气 ;坩埚 :非气密性铝坩埚 ;样品制备 :无。

[0075] 热重分析仪 TGA7 ;制造商 :Perkin-Elmer ;加热速度 :10K/min ;吹扫气体 :氮气,20-30ml/min ;坩埚 :开放式的铂坩埚 ;样品制备 :无。

[0076] 1-[6- (吗啉 -4- 基)嘧啶 -4- 基]-4- (1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)-1H- 吡唑 -5- 酚钠(式(II)的化合物)在超过 300℃不经熔化而分解。

[0077] 水蒸气吸附和水蒸气脱附 :

通过 Hiden Analytical 公司的动态蒸气吸附分析仪 IGA Sorp 记录水分吸附等温线。测量温度为 25℃。没有进行样品制备。

[0078] 表 1 : 1-[6- (吗啉 -4- 基) 嘧啶 -4- 基]-4- (1H-1,2,3- 三唑 -1- 基)-1H- 吡唑 -5- 酚钠(式(II)的化合物)的水蒸气吸附和水蒸气脱附

	式（II）的化合物		式（I）的化合物	
相对空气湿度	吸附	脱附	吸附	脱附
0% rF	0%	0%	0.1%	0.1%（5% rF）
10% rF	0%	0%	0.2%	0.1%
20% rF	0.1%	0%	0.3%	0.2%
30% rF	0.1%	0.1%	4.8%	4.7%
40% rF	0.2%	0.2%	5.1%	5.2%
50% rF	0.2%	0.3%	5.3%	5.4%
60% rF	0.2%	0.3%	5.4%	5.6%
70% rF	0.4%	0.4%	5.6%	5.6%
80% rF	0.4%	0.5%	5.7%	5.7%
90% rF	0.8%	0.8%	5.9%	5.9%

[0079] 溶解度数据：

方法：在25℃通过16小时搅拌在水中的悬浮液制备试验物质的饱和溶液。然后过滤所得到的悬浮液，并借助HPLC测量确定滤液中的含量。

[0080] 表2：水中溶解度

	式(II)的化合物	式(I)的化合物
在25℃水中溶解度 [mg/100ml]	2800	14.3

[0081] 红外和拉曼光谱法：

借助下列参数使用Bruker公司的傅立叶红外(FT/IR)分光光度计IFS 66v和Bruker公司的傅立叶拉曼(FT/Raman)分光光度计MultiRAM来测定式(II)化合物的红外和拉曼光谱：

	红外	拉曼
光谱分辨率	2 cm^{-1}	2 cm^{-1}
单次测量数（扫描次数）	32	64
波数范围	4000-500 cm^{-1}	3500-200 cm^{-1}
样品制备	KBr压制品	没有

[0082] 表3：式(II)化合物的红外或拉曼光谱的特征性振动谱带的归属

结构元素	红外谱带位置（cm^{-1}）	拉曼谱带位置(cm^{-1})
ν =C-H	3153-3006	3153-3010
ν C-H	2976-2855	2978-2856
ν C=C，ν C=N	1630-1439	1623-1401
ν C-N	1241	1244
ν C-O	1112	1118
δ $=C-H_{同相}$	987	988

[0083] 借助下列参数使用Bruker公司的傅立叶红外分光光度计Vertex 80v和Bruker公司的傅立叶拉曼分光光度计MultiRAM来测定式(I)化合物的红外和拉曼光谱：

	红外	拉曼
光谱分辨率	2 cm^{-1}	2 cm^{-1}
单次测量数（扫描次数）	32	64
波数范围	4000-500 cm^{-1}	3500-100 cm^{-1}
样品制备	KBr压制品	没有

[0084] 表 4 :式(I)化合物的红外或拉曼光谱的特征性振动谱带的归属

结构元素	红外谱带位置（cm^{-1}）	拉曼谱带位置(cm^{-1})
ν O-H	3441	-
ν =C-H	3135-3108	3134-3006
ν C-H	2965-2884	2967-2884
ν C=C, ν C=N, δ C-H	1636-1345	1650-1345
ν $C-O_{酯}$	1257	1259

[0085] UV/VIS 光谱法 :

借助下列条件或参数使用 Perkin Elmer 分光光度计(Lambda 40P)来测定 UV/VIS 光谱 :

吸收池 : 径长 1 cm ; 石英玻璃

波数范围 : 200-800 nm

狭缝宽度 : 1 nm

样品制备 : 约 1 mg/100ml 乙腈 / 水 1 :1

谱带 : 285 ; 249 nm 式(II)的化合物,和 289.3 ; 248.2 nm 式(I)的化合物。

[0086] 表 5 : 吸收率和摩尔吸光系数的计算

化合物	溶剂	波长（nm）	吸收率 $A^{1\%}_{1\ cm}$（1/g * cm）	摩尔吸光系数 ε （1/mol * cm）
式(I)	乙腈 / 水 1 :1	249	1111	34928
式(II)	乙腈 / 水 1 :1	284	501.2	16855

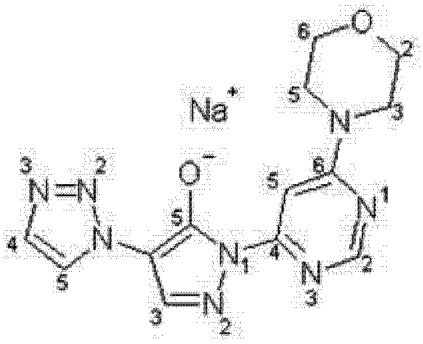
[0087] NMR 波谱法 :

借助下列条件或参数使用 Bruker 公司的 NMR 波谱仪(Advance) 来记录 UV/VIS 图谱 :

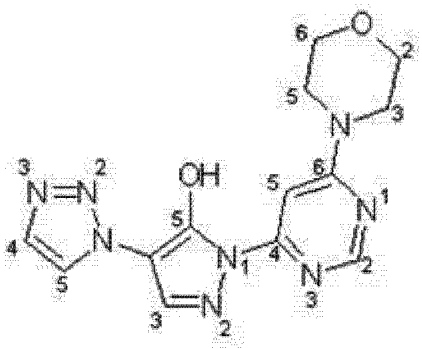
式（II）的化合物	^{1}H NMR 图谱	^{13}C NMR 图谱
工作频率	500.13 MHz	125.76 MHz
溶剂	三氟乙酸	三氟乙酸
浓度	6.84 mg/ml	42.7 mg/ml
内标物	四甲基硅烷 （TMS）	四甲基硅烷（TMS）
样品管直径	5 mm	5 mm
温度	25℃	25℃
技术	傅立叶变换技术	傅立叶变换技术
谱宽	20.65 ppm	245.41 ppm
数字分辨率	0.079 Hz/Pt	0.4710 Hz/Pt
脉冲持续时间	2.83 μsec，激发角 30°	9.1 μsec，激发角 90°
记录时间	6.399 sec	1.06 sec
弛豫时间	0.5 sec	4 sec
自由感应衰减数	32	128

式（I）的化合物	^{1}H NMR 图谱	^{13}C NMR 图谱
工作频率	500.13 MHz	125.76 MHz
溶剂	二甲亚砜-d_6（DMSO）	二甲亚砜-d_6（DMSO）
浓度	6.3 mg/ml	35.8 mg/ml
内标物	四甲基硅烷（TMS）	四甲基硅烷（TMS）
样品管直径	5 mm	5 mm
温度	25℃	27℃
技术	傅立叶变换技术	傅立叶变换技术
谱宽	20.65 ppm	240.89 ppm
数字分辨率	0.079 Hz/Pt	0.9248 Hz/Pt
脉冲持续时间	3.1 μsec，激发角 30°	7.0 μsec，激发角 90°
记录时间	6.344 sec	1.08 sec
弛豫时间	0.5 sec	4 sec
自由感应衰减数	32	1024

[0088] 具有每个 NMR 信号归属的式（II）化合物和式（I）化合物的结构式



(II)



(I)

[0089] 表 6：式（II）的化合物的 ^{1}H NMR 图谱 - 化学位移，信号多重性，相对质子数（为了归属每个 NMR 信号，H 原子的编号基于所述结构式）

H 原子	化学位移δ（ppm）	多重性和耦合常数	质子数/分子
钠-1-[6-（吗啉-4-基）			
H-2；H-3；H-5；H-6	4.00-4.25	M	8
嘧啶-4-基]-			
H-2	8.72	S	1
H-5	7.77	S	1
4-（1H-1,2,3-三唑-1-基）-			
H-4	8.64	D J= 1.4 Hz	1
H-5	8.98	D J= 1.4 Hz	1
1H-吡唑-5-酚盐			
H-3	8.68	S	1

[0090] 表 7：式（I）的化合物的 ^{1}H NMR 图谱 - 化学位移，信号多重性，相对质子数（为了归属每个 NMR 信号，H 原子的编号基于所述结构式）

H 原子	化学位移δ（ppm）	多重性和耦合常数	质子数/分子
1-[6-（吗啉-4-基）			
H-2；H-3；H-5；H-6	3.71	S	8
嘧啶-4-基]-			
H-2	8.55	S	1
H-5	7.42	S	1
-（1H-1,2,3-三唑-1-基）-			
H-4	7.86	D（0.6 Hz）	1
H-5	8.38	D（0.6 Hz）	1
1H-吡唑-5-酚			
H-3	8.27	S	1
5-OH	n.d（c）	n.d.	1

[0091] 表 8：式（II）的化合物的 ^{13}C NMR 图谱－化学位移，信号多重性，式（II）化合物中的相对 C 核数（为了归属每个 NMR 信号，C 原子的编号基于所述结构式）

C 原子	化学位移δ（ppm）	多重性和耦合常数	C 核数目/分子
钠-1-[6-（吗啉-4-基）			
C-2；C-6	67.80	T	2
C-3；C-5	48.21	T	2
嘧啶-4-基]-			
C-2	151.65	D	1
C-4	152.01	S	1
C-5	91.48	D	1
C-6	159.90	S	1
4-（1H-1,2,3-三唑-1-基）-			
C-4	130.93	D	1
C-5	129.57	D	1
1H-吡唑-5-酚盐			
C-3	138.03	D	1
C-4	106.99	S	1
C-5	157.43	S	1

[0092] 表 9：式（I）的化合物的 ^{13}C NMR 图谱－化学位移，信号多重性，式（I）化合物中的相对 C 核数（为了归属每个 NMR 信号，C 原子的编号基于所述结构式）

C 原子	化学位移δ（ppm）	多重性和耦合常数	C 核数目/分子
1-[6-（吗啉-4-基）			
C-2；C-6	65.56	T	2
C-3，C-5	44.29	T	2
嘧啶-4-基]-			
C-2	154.08	D	1
C-4	152.43	S	1
C-5	85.62	D	1
C-6	161.99	S	1
4-（1H-1,2,3-三唑-1-基）-			
C-4	132.94	D	1
C-5	123.68	D	1
1H-吡唑-5-酚			
C-3	135.84	D	1
C-4	102.82	S	1
C-5	154.70	S	1

[0093] 质谱分析：

借助下面列出的条件或参数使用 Waters 质谱仪（ZQ）来记录质谱：

电离方法	ESI（电喷雾电离）
溶剂	乙腈/水

[0094] 表 10：式（II）化合物的质谱解读

		质量数（A）
离子形成 M+H	C13H14N8O2 + H	315
离子形成 M+Na	C13H14N8O2 + Na	337

[0095] 表 11：式（I）化合物的质谱解读

		质量数（A）
离子形成 M+H	C13H15N8O2	315

[0096] 元素分析：

表 12：式（II）化合物的元素分析结果

元素	测量值（%）	计算值（%）	误差（%）
C	46.1	46.4	0.3
H	4.0	3.9	0.1
N	33.1	33.3	0.2

[0097] 表 13：式（I）化合物的元素分析结果

元素	测量值（%）	计算值（%）	误差（%）
C	49.5	49.7	0.2
H	4.4	4.5	0.1
N	35.5	35.7	0.2
O	12.6	10.2	2.4

[0098] X-射线衍射法：

具有 PIXcel 计数器(多道)的传输衍射仪 PANalytical X`Pert PRO：

辐射： 铜,Kα

主单色器： 聚焦 X-射线镜

波长(K1)： 1.5406 Å

波长(K2)： 1.5444 Å

发生器参数： 40 kV,40 mA

测量范围： 2-38°

房间条件： 25℃,40-60% rF

或者

STOE 粉末衍射系统：

衍射仪 ： 传输

单色器： 弯曲的锗（111）

发生器 ： 45 kV,35 mA

波长 ： 1.540598 Cu

检测器： 线形 PSD

扫描模式 ： 传输 / 动态 PSD / 固定 Ω

扫描类型 ： 2theta：Ω

房间条件： 25℃,40-60% rF。

[0099] 表 14：式(II)的化合物 X-射线粉末衍射法

式（II）的化合物 反射 [2 theta]	
5.7	23.6
11.5	25.3
13.2	26.4
13.7	26.9
15.8	27.7
16.4	27.7
18.4	29.4
18.9	29.9
19.3	30.0
21.0	30.7
22.0	31.5
23.1	31.6

[0100] 表 15：式(I)的化合物 X-射线粉末衍射法

式（I）的化合物 反射 [2 theta]	
5.6	24.6
14.4	24.8
14.9	25.1
16.3	26.3
16.5	26.8
17.6	28
17.8	28.5
18.2	29
18.5	29.9
19	32.4
19.7	32.7
21.6	33.2
22	33.8
22.4	34.7
22.9	35.7
24	36.4
24.5	36.7

[0101] B. 药学效果的评估

本发明化合物的药学特性可以显示在下列检测中：

缩写：

DMEM Dulbecco 改良的 Eagle 培养基

FCS 胎牛血清

TMB 3,3',5,5'-四甲基联苯胺

Tris 三(羟甲基)-氨基甲烷。

[0102] 1. 确定 HIF-脯氨酰-4-羟化酶抑制剂的活性和选择性的体外试验

1.a) 抑制 HIF-脯氨酰羟化酶的活性：

羟基化的 HIF 特定连接在 von Hippel-Lindau 蛋白质-人延伸蛋白 B-人延伸蛋白 C-配合物(VBC 配合物)。只有当在贮藏的脯氨酰残基上羟基化 HIF，才出现这种相互作用。它是生化方法确定 HIF-脯氨酰羟化酶活性的基础。如所描述的进行该试验 [Oehme F., Jonghaus W., Narouz-Ott L., Huetter J., Flamme I., *Anal. Biochem.* 330 (1),74-80 (2004)]：

透明的、通过 NeutrAvidin HBC 涂覆的 97-孔-微量滴定板(Pierce 公司)借助阻断剂酪蛋白孵育 30 分钟。然后，将所述板的分别用每个孔 200μl 洗涤缓冲液(50mM Tris，pH 值 7.5，100mM NaCl，10％ (v/v) 阻滞剂酪蛋白，0.05％ (v/v) Tween 20) 洗涤三次。将肽生物素-DLDLEMLAPYIPMDDDFQL (Eurogentec 公司，4102 Seraing，比利时)以 400nM 的浓度加入到 100μl 的洗涤缓冲液中。这种肽用作脯氨酰羟基化的底物，并被结合到微量滴定板上。在 60 分钟孵育之后，将该板用洗涤缓冲液洗涤三次，用 1mM 生物素在阻断剂酪蛋白中孵育 30 分钟，然后用洗涤缓冲液再次洗涤三次。

[0103] 为了进行脯氨酰羟化酶的反应，将在所述板上结合的肽底物与含有脯氨酰羟化酶的细胞溶胞产物孵育 1-60 分钟。该反应在 100μl 反应缓冲液(20 mM Tris，pH 7.5，5 mM KCl，1.5 mM $MgCl_2$，1 μM-1 mM 2-酮戊二酸，10 μM $FeSO_4$，2 mM 抗坏血酸盐)中在室温进

行。此外，该反应混合物包含各种浓度的待测试的脯氨酰羟化酶的抑制剂。试验物质优选、但不是唯一地使用的浓度为 1nM-100μM。通过用洗涤缓冲液洗涤所述板三次来停止所述反应。

[0104] 为了定量测定脯氨酰的羟基化，将含有大肠杆菌的硫氧还蛋白和 VBC 配合物的融合蛋白加入 80μl 的结合缓冲液（50 mM Tris，pH 7.5，120 mM NaCl）中。15 分钟后，将 10μl 源自兔子的多克隆抗硫氧还蛋白抗体添加到结合缓冲液中。再过 30 分钟后，将 10μl 与辣根过氧化物酶偶合的抗兔免疫球蛋白的溶液添加到结合缓冲液中。在 30 分钟室温孵育后，用洗涤缓冲液洗涤三次，以便除去未结合的 VBC 配合物和抗体。为了确定结合的 VBC 配合物的量，与 TMB 孵育 15 分钟。通过添加 100μl 的 1M 硫酸终止该显色反应。通过测量在 450nm 的吸光度（optical density）来确定结合的 VBC 配合物的量。其与在肽底物中的羟基化的脯氨酸量成正比。

[0105] 为了检测脯氨酰的羟基化，替代性地可以使用与铕（Perkin Elmer 公司）偶合的 VBC- 配合物。在这种情况下，通过时间分辨的荧光确定结合的 VBC- 配合物的量。此外，可以使用用 [^{35}S]- 甲硫氨酸标记的 VBC- 配合物。为此，可以通过体外 - 转录 - 翻译在网织红细胞溶胞产物中制备放射性标记的 VBC 配合物。

[0106] 在本试验中，本发明的式（II）化合物抑制 HIF- 脯氨酰羟化酶活性的 IC_{50} 值为 0.47μM（EGLN2/PHD1 的平均值）或 0.14μM（EGLN1/PHD2 的平均值）。

[0107] 1.b）细胞的、功能的体外试验：

借助重组细胞系量化本发明的化合物的效果。该细胞源自人的肺癌细胞系（A549，ATCC：American Type Culture Collection，Manassas，VA 20108，USA）。测试细胞系稳定地通过含有在人工最小启动子的控制下的北美产萤火虫荧光素酶（以下称为荧光素酶）的报道基因的载体来转染。最小启动子由 TATA 盒上游的两个缺氧诱导元件（hypoxie-responsiblen Elementen）组成 [Oehme F.，Ellinghaus P.，Kolkhof P.，Smith T.J.，Ramakrishnan S.，Hütter J.，Schramm M.，Flamme I.，*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296（2），343-9（2002）]。在缺氧的作用下（如在 1％氧气的存在下培养 24 小时）或在非选择性的双加氧酶抑制剂的作用下（如浓度为 100μM 的去铁胺，浓度为 100μM 的氯化钴或浓度为 1mM 的 N- 草酰甘氨酸二乙酯），所述测试细胞系产生荧光素酶，该荧光素酶可以借助合适的生物发光试剂（如 Steady-Glo® 萤光素酶检测系统，Promega 公司，Madison，WI53711，美国）和一个合适的发光计进行检测和量化。

[0108] 测试过程：试验前一天，将所述细胞在 384- 或 1536- 孔 - 微量滴定板中铺板在经准确测量的量的培养基（DMEM，10％ FCS，2mM 谷氨酰胺），并保持在细胞孵育箱（96％的空气湿度，5％ v/v CO_2，37℃）。在测试当天，将所述测试物质以分级的浓度添加到培养基中。没有以作为阴性对照的批量将所述测试物质添加到细胞中。作为确定细胞对抑制剂的敏感性的阳性对照，例如以 100μM 的终浓度添加去铁胺。在将测试物质转移到微量滴定板的孔中之后的 6-24 小时测量发光计中所得到的光信号。借助测量值绘制剂量 / 效果关系，其作为确定半最大活性浓度（称为 EC_{50} 值）的基础。

[0109] 在这里描述的试验中，制备本发明的式（II）化合物具有的 EC_{50} 值为 7μM。

[0110] 1.b）改变基因表达的细胞的、功能的体外试验：

为了研究在人类细胞系中特定的 mRNA 表达在用测试物质处理后的变化，将下列细

胞系培养在6-或24-孔板上：人的肝细胞(HUH，JCRB细胞库，日本)，人的胚胎肾成纤维细胞(HEK/293，ATCC，Manassas，VA20108，USA)，人的宫颈癌细胞(HeLa，ATCC，Manassas，VA20108，USA)，人的脐静脉内皮细胞(HUVEC，Cambrex，East Rutherford，新泽西州07073，美国)。在添加测试物质之后的24小时，使用磷酸盐缓冲盐水洗涤所述细胞，并且在使用合适方法的情况下由此获得整个RNA(例如 Trizol® 试剂，Invitrogen GmbH，76131 Karlsruhe，德国)。

[0111] 对于典型的分析实验，分别将1μg如此获得的整个RNA用DNaseI消化，并在使用合适的逆转录酶反应的情况下(ImProm-II 逆转录体系，Promega公司，Madison，WI53711，美国)转译成互补的DNA(cDNA)。分别将2.5％如此获得的cDNA批量用于聚合酶链反应。在使用ABI棱镜7700序列检测仪(Applied Biosystems公司)的情况下，借助实时定量聚合酶链反应[TaqMan-PCR；Heid C.A.，Stevens J.，Livak K.J.，Williams P.M.，*Genome Res.* 6(10)，986-94(1996)]研究待研究的基因的mRNA的表达水平。这里使用的引物-探针组合通过引物表达1.5软件(Applied Biosystems公司)而产生。具体来说，研究了促红细胞生成素，碳酸酐酶(carboanhydrase)IX，乳酸脱氢酶A和血管内皮细胞生长因子的的mRNA。

[0112] 2. 证明在心血管系统中效果的体内试验

2.b)改变基因表达的体内试验：

将溶于合适的溶剂的试验化合物或者通过胃管施用口服、腹膜内或静脉内给药于老鼠或大鼠。典型的剂量是每千克体重和每次给药0.1，0.5，1，5，10，20，50，100和300 mg物质。对照动物只得到溶剂。在给药试验物质之后4、8或24小时，通过过度剂量的异氟烷和接下来的颈部骨折杀害所述动物，并取出待研究的器官。将部分器官在液氮中休克冰冻(schock-frieren)。由所述器官部分如在B.1.a)中描述地获得整个RNA，并且将其转译为cDNA。在使用ABI棱镜7700序列检测仪(Applied Biosystems公司)的情况下，借助实时定量聚合酶链反应[TaqMan-PCR；Heid C.A.，Stevens J.，Livak K.J.，Williams P.M.，*Genome Res.* 6(10)，986-94(1996)]研究待研究的基因的mRNA的表达水平。

[0113] 口服或胃肠外给药后，相比于安慰剂对照，根据本发明的物质导致显著的、剂量依赖性的在肾脏中的促红细胞生成素的mRNA的增加。

[0114] 2.b)确定血清中的促红细胞生成素含有量：

将在合适的溶剂中的试验化合物或者通过腹膜内或口服每日一次或两次给药于老鼠或大鼠。典型的剂量是每千克体重和每次给药0.1，0.5，1，5，10，20，50，100和300 mg物质。安慰剂对照动物只得到溶剂。在施用之前和在末次给物质之后4小时，从处于短暂昏迷状态的动物从眶后静脉丛或尾静脉取血。通过添加肝素锂将该血液变得不可凝固。通过离心分离得到血浆。借助促红细胞生成素-ELISA(Quantikine® mouse Epo Immunoassay，R&D Systems公司，Minneapolis，美国)按照制造商的说明书来测定血浆中的促红细胞生成素的含量。借助对老鼠促红细胞生成素获得的参照测量将测量值转化成pg/ml。

[0115] 口服或胃肠外给药后，相比于起始值和安慰剂对照，根据本发明的物质导致显著的、剂量依赖性的血浆促红细胞生成素的增加。

[0116] 2.b)确定末梢血的细胞组合物：

将在合适的溶剂中的试验化合物或者通过腹膜内或口服经过多天每日一次或两次地

给药于老鼠或大鼠。典型的剂量例如是每千克体重和每次给药 0.1,0.5,1,5,10,20,50,100 和 300 mg 物质。对照动物只得到溶剂。在研究结束时,从处于短暂昏迷状态的所述动物眼角的静脉丛或尾静脉取血,并通过加入柠檬酸钠使血液变得不可凝固。使用合适的电子测量装置确定血样中的红细胞、白细胞和血小板的浓度。借助为此合适的染色液(KABE Labortechnik, Nuembrecht)来染色的血液涂片通过分别1000个红细胞的显微镜仔细检查来确定网织红细胞的浓度。为了测定血细胞比容,从眶后静脉丛借助血细胞比容毛细管取血,并在为此合适的离心机中将毛细管离心后手动读取血细胞比容值。

[0117] 口服或胃肠外给药后,相比于起始值和安慰剂对照,根据本发明的物质导致显著的、剂量依赖性的血细胞比容、红细胞数和网织红细胞的增加。

[0118] C.药物组合物的实施例

本发明的化合物可以如下转化成药物制剂。

[0119] 片剂:

组成:

100mg 本发明的化合物,50mg 乳糖(一水合物),50mg 玉米淀粉(本地的),10mg 聚乙烯基吡咯烷酮(PVP 25)(BASF,Ludwigshafen,德国)和 2mg 硬脂酸镁。

[0120] 片剂重量 212mg。直径 8mm,曲率半径 12mm。

[0121] 制备:

将本发明的化合物、乳糖和淀粉的混合物用 5% PVP 溶液(m/m)在水中颗粒化。在干燥后,将所述颗粒与硬脂酸镁混合 5 分钟。用常用的压片机(片剂大小规格见上文)压制所述混合物。使用 15kN 的压力作为压制的标准值。

[0122] 可以口服施用的悬浮液:

组成:

1000mg 本发明的化合物,1000mg 乙醇(96%),400mg Rhodigel® (出自 FMC 的黄原酸胶,Pennsylvania,美国)和 99g 水。

[0123] 10ml 口服悬浮液对应于 100mg 本发明化合物的单独剂量。

[0124] 制备:

将所述 Rhodigel 悬浮在乙醇中,将本发明的化合物添加到该悬浮液中。在搅拌下添加水。搅拌约 6 小时,直到所述 Rhodigel 不再浸胀。

[0125] 可以口服施用的溶液:

组成:

500mg 本发明的化合物,2.5g 聚山梨酯和 97g 聚乙二醇 400。20g 口服溶液对应于 100mg 本发明化合物的单独剂量。

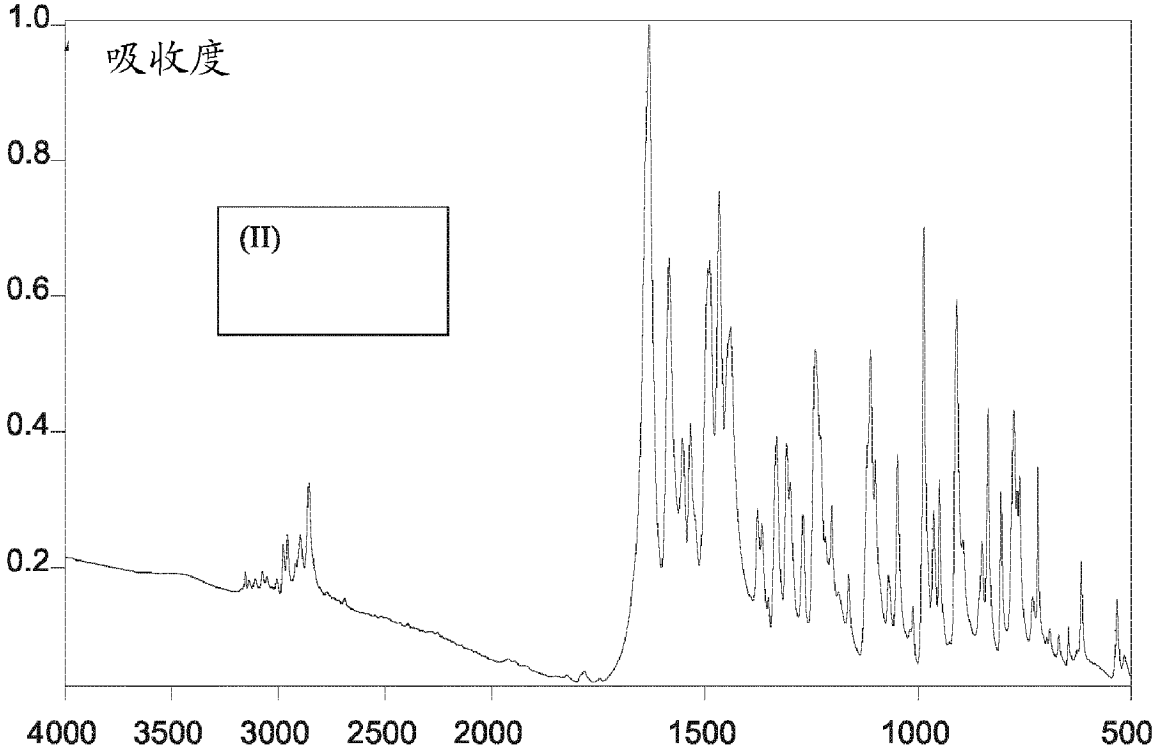
[0126] 制备:

将本发明的化合物在搅拌下悬浮在聚乙二醇和聚山梨酯的混合物中。搅拌过程一直进行到本发明的化合物完全溶解。

[0127] 静脉内注射溶液:

将本发明的化合物以低于饱和溶解度的浓度溶解在生理上可接受的溶剂(如等渗食盐溶液,5%葡萄糖溶液,和 / 或 30% PEG400 溶液)。将该溶液进行无菌过滤,并填充到无菌和无热原的注射容器中。

式（II）化合物和式（I）化合物的红外光谱



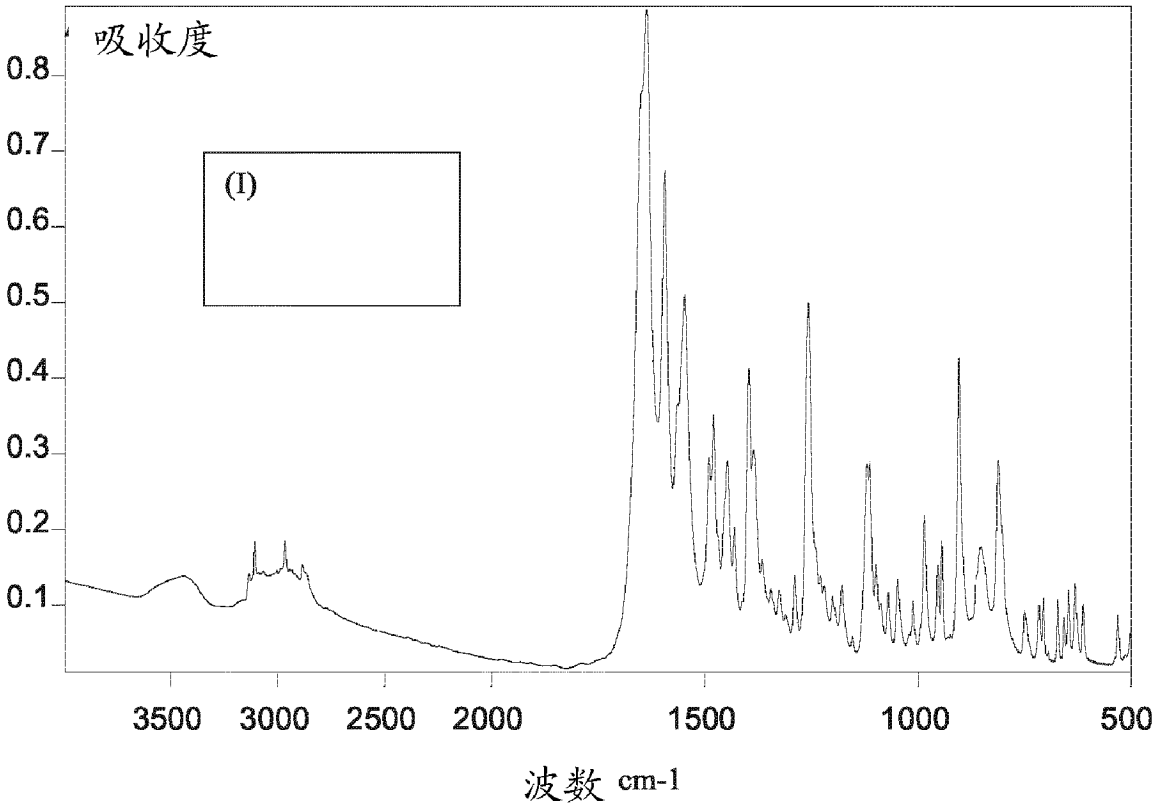
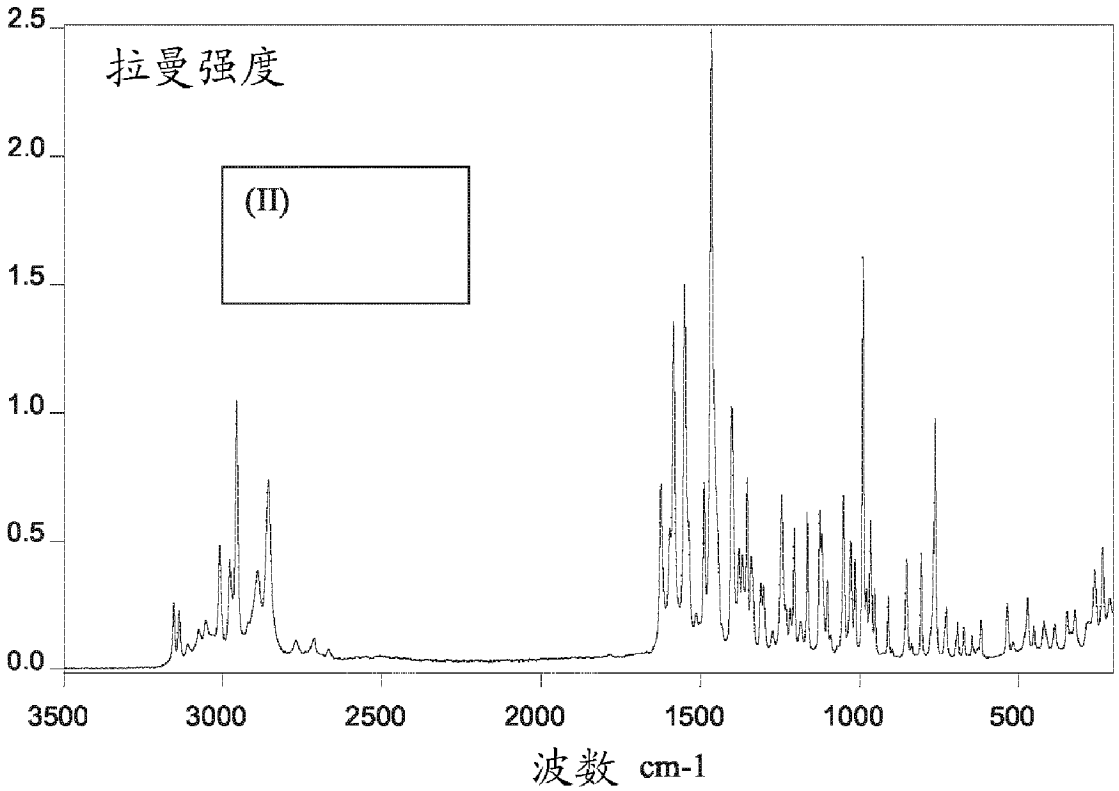


图 1

式（II）化合物和式（I）化合物的拉曼光谱



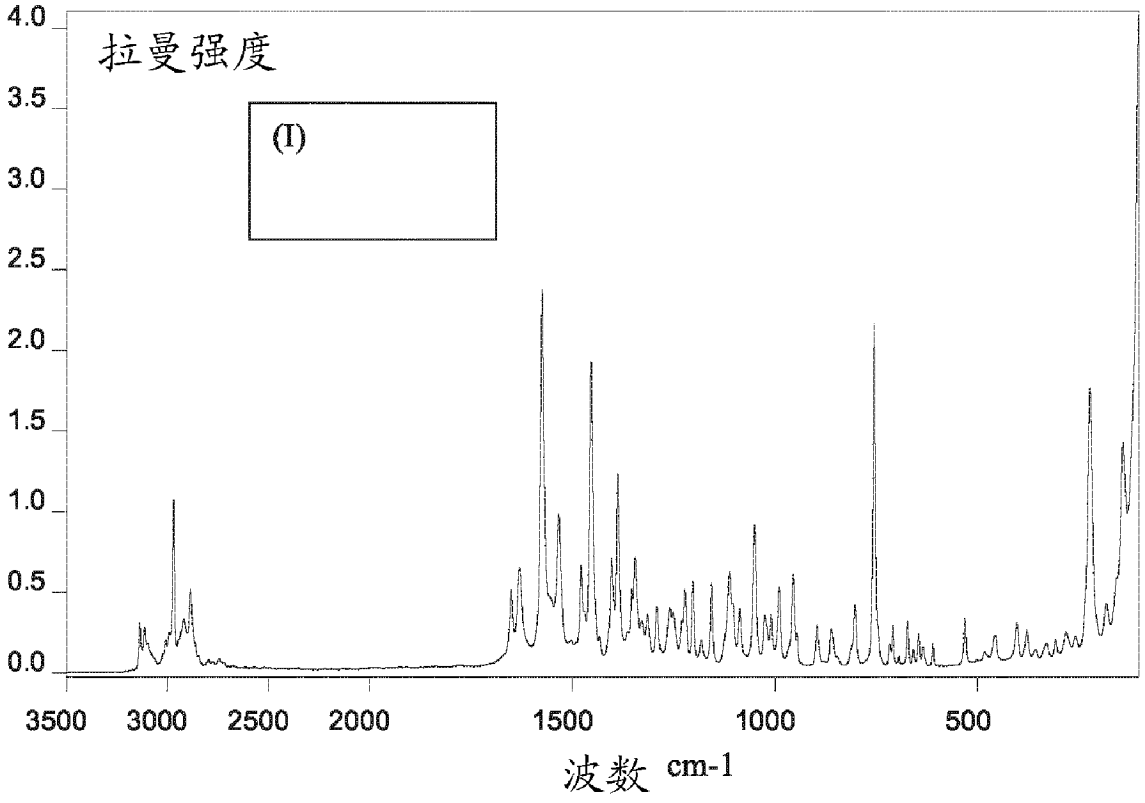


图 2

式（II）化合物和式（I）化合物的UV/VIS光谱

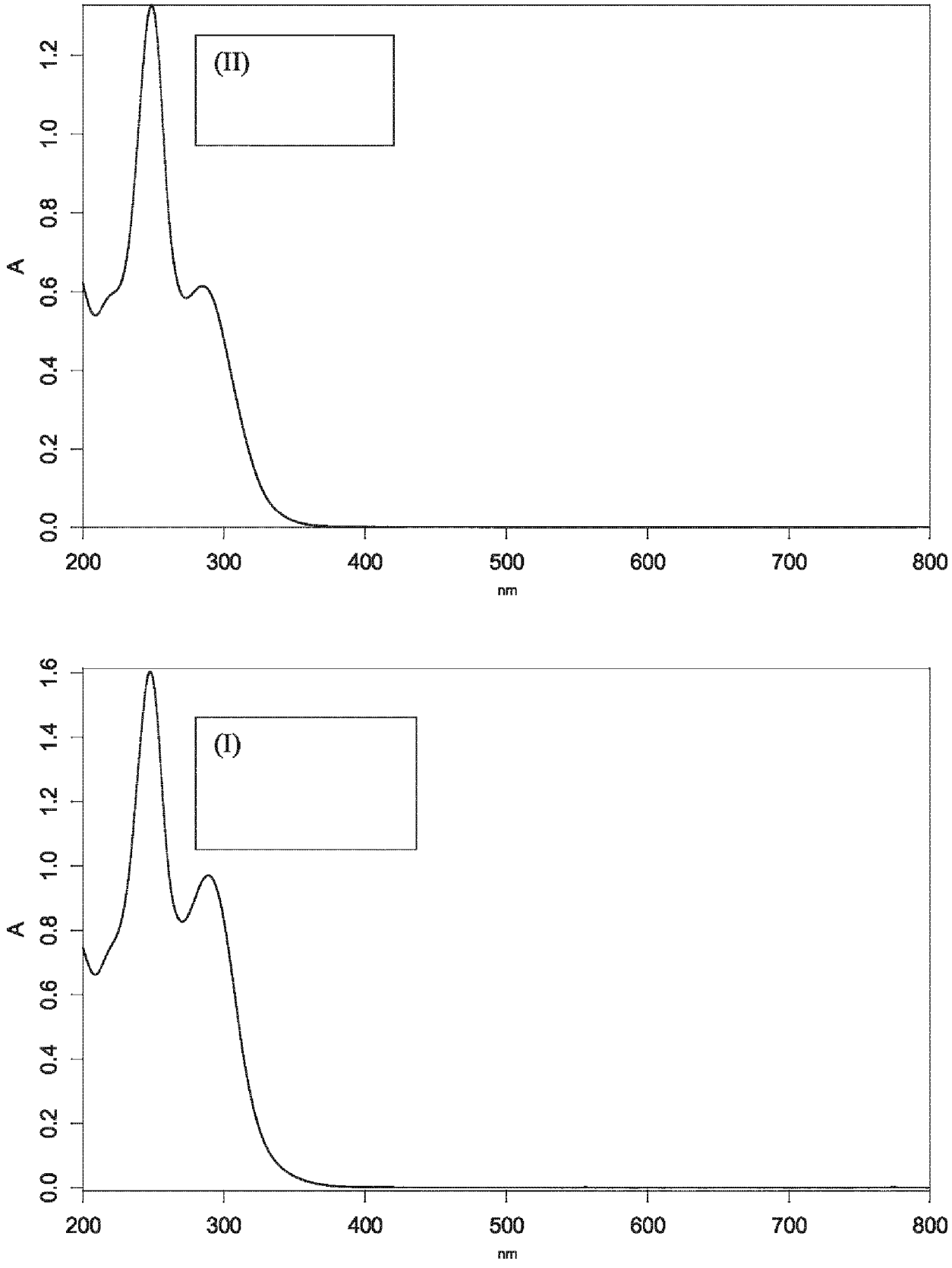


图 3

式（II）化合物的 ^{1}H-NMR 图谱

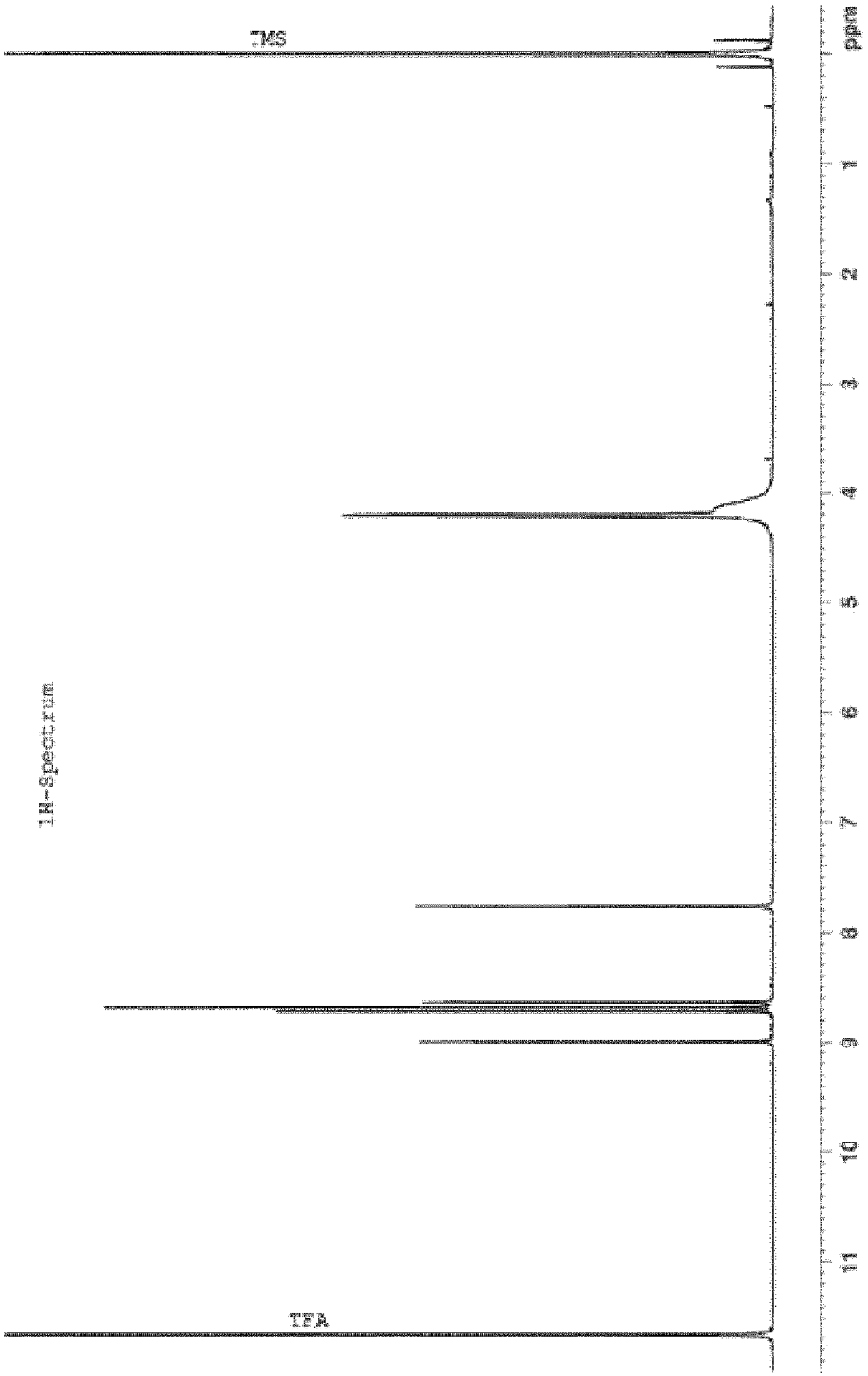


图 4

式（Ⅰ）化合物的 ^{1}H-NMR 图谱

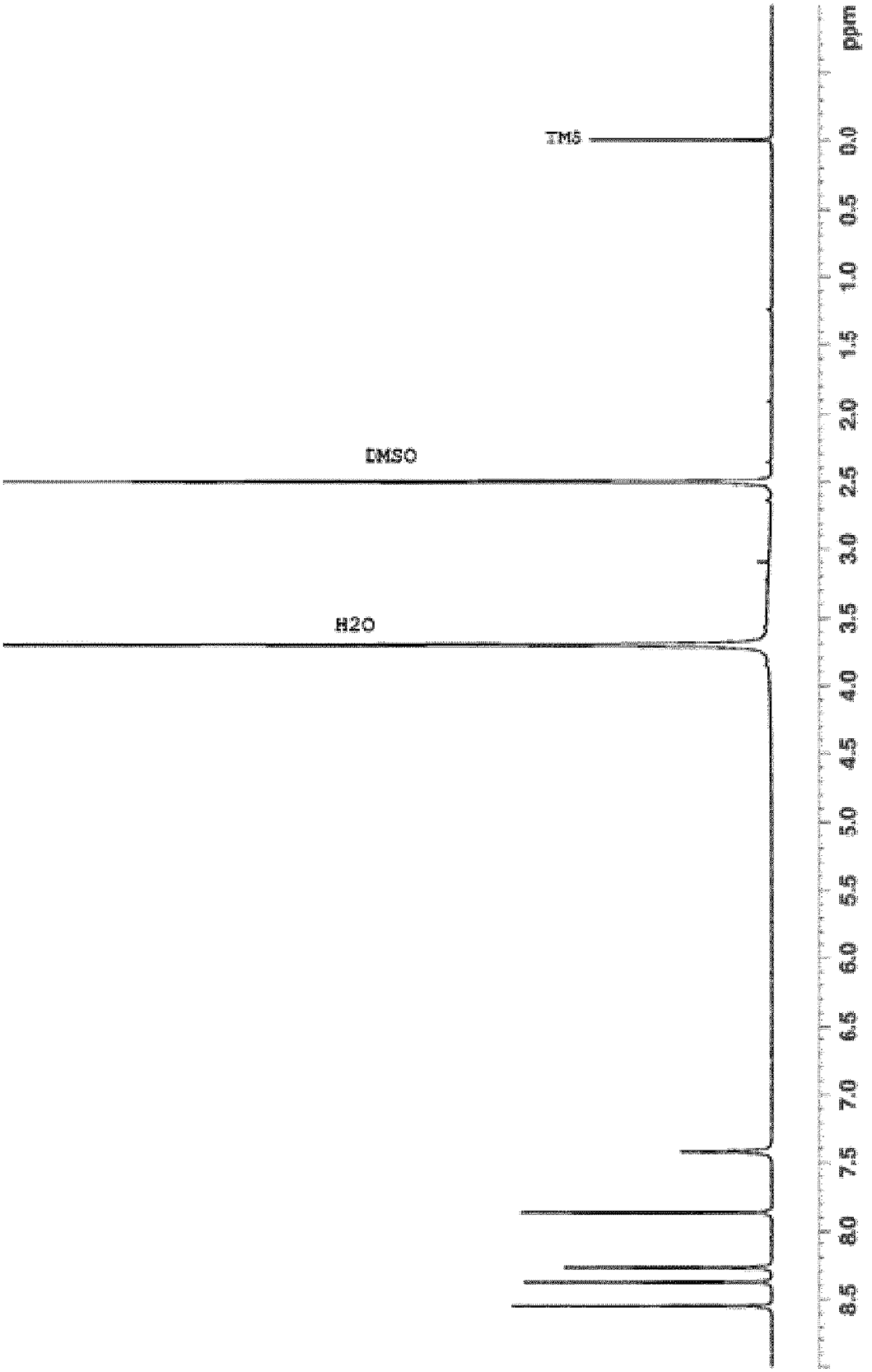


图 5

式（II）化合物的 ^{13}C-NMR 图谱

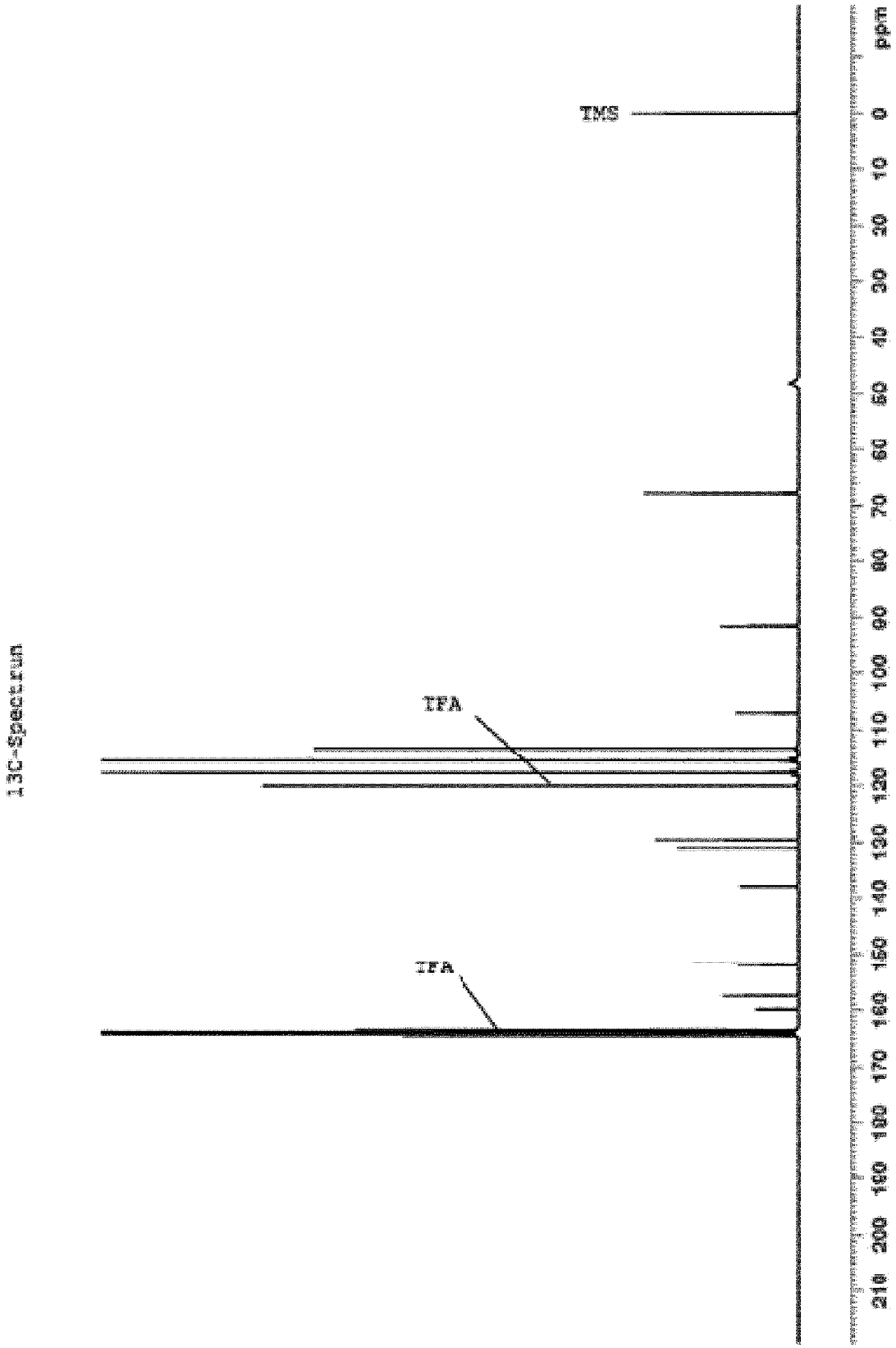


图 6

式（Ⅰ）化合物的 ^{13}C-NMR 图谱

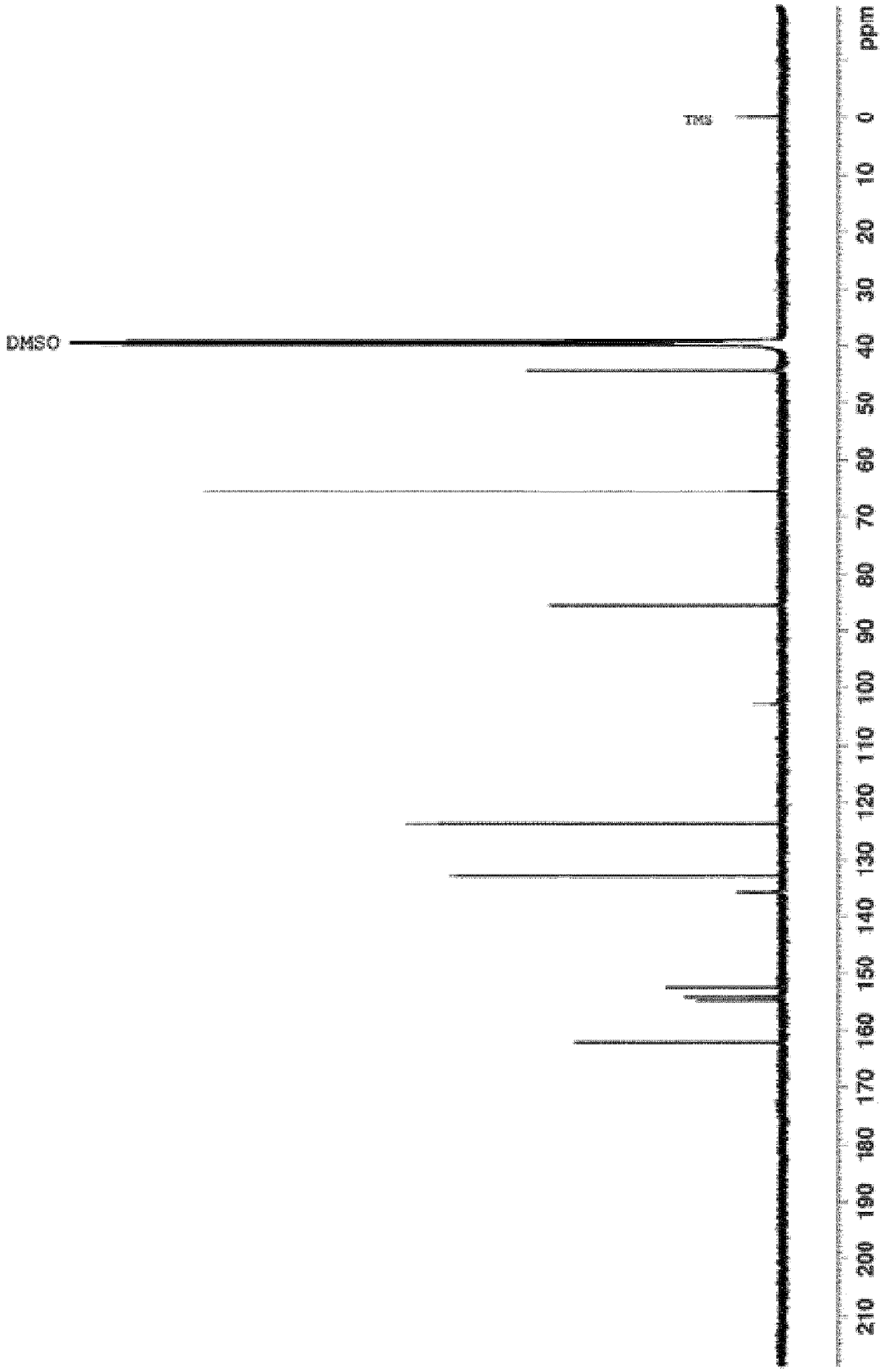


图 7

式（II）化合物的质谱

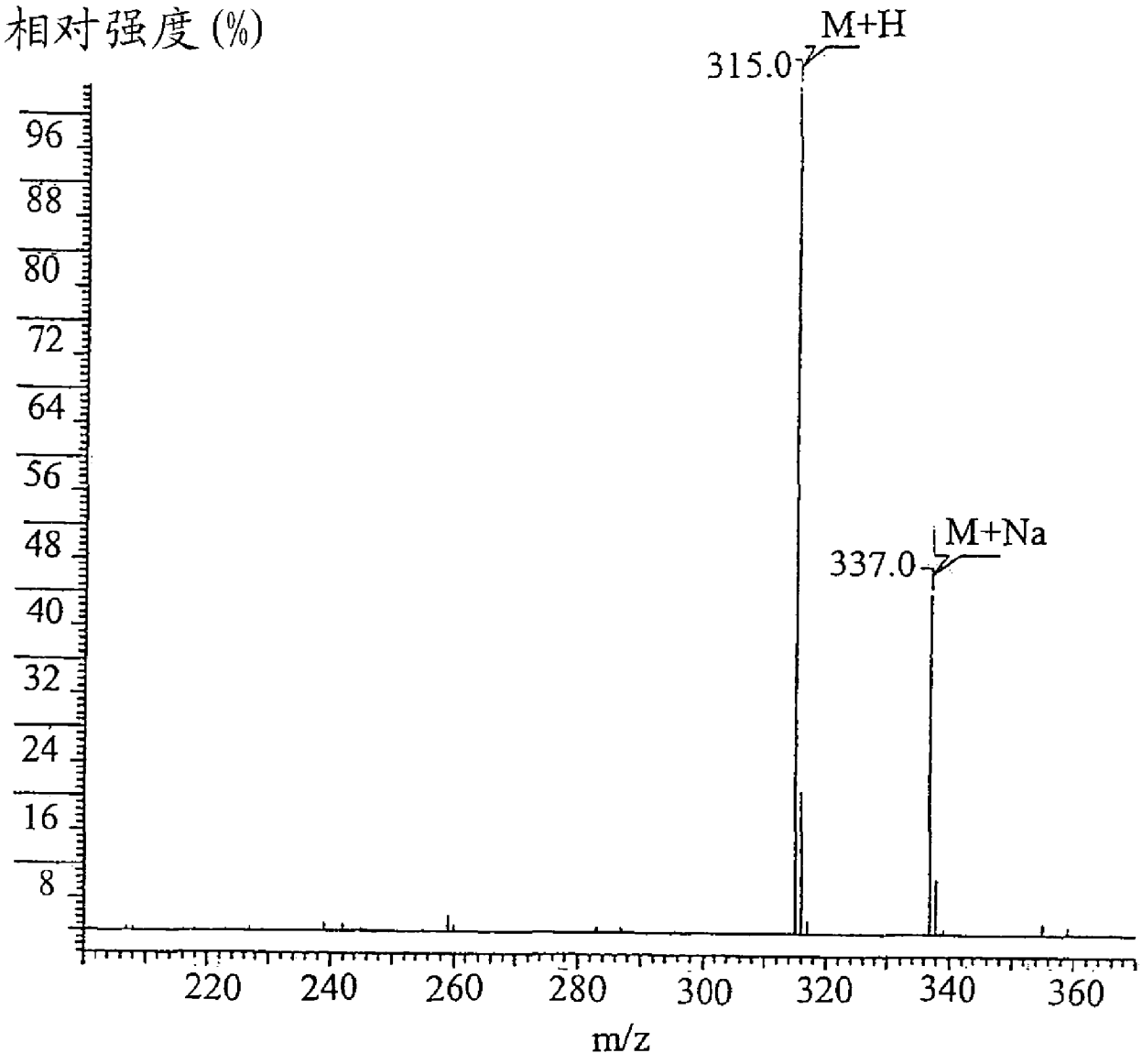


图 8

式（Ⅰ）化合物的质谱

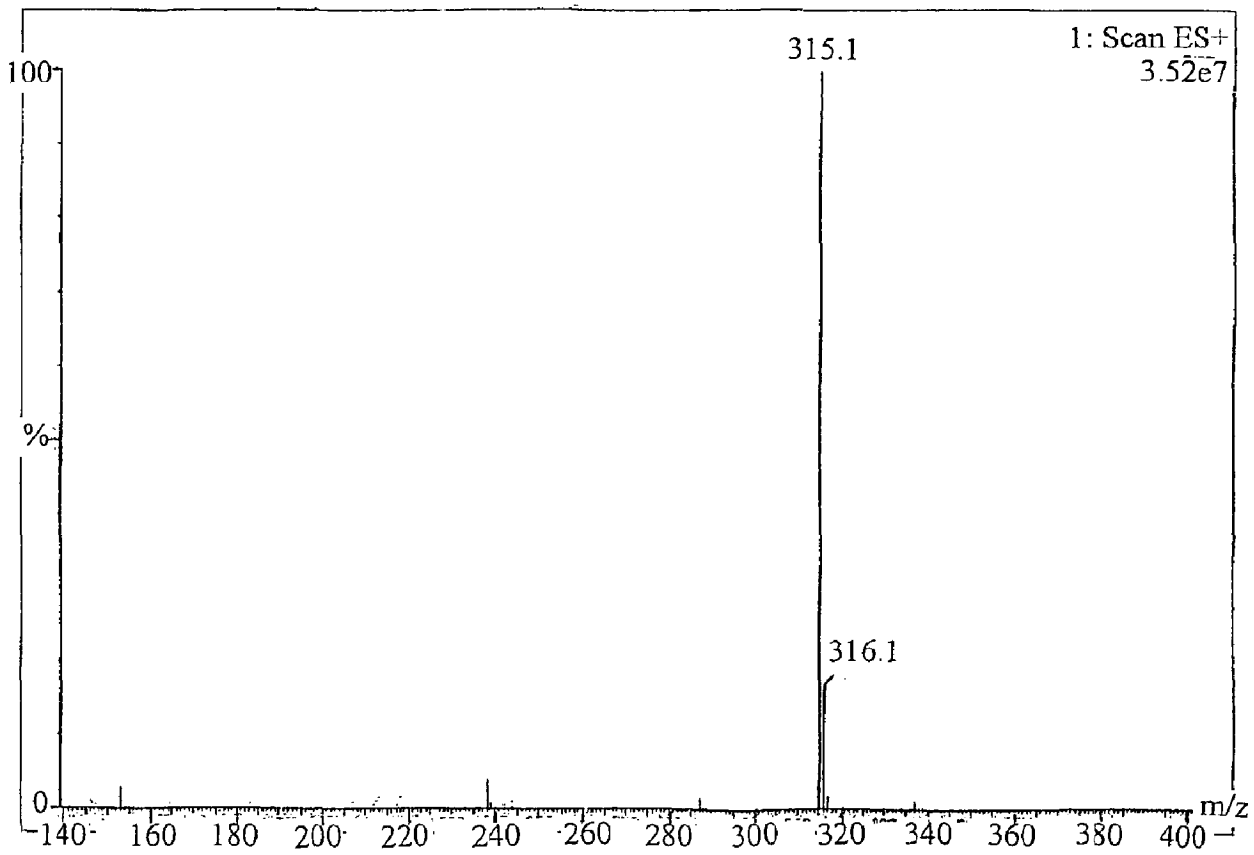

315.1
1: Scan ES+
3.52e7
100
%
316.1
0
m/z
140
160
180
200
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400

图 9

式（II）化合物的X-射线衍射图

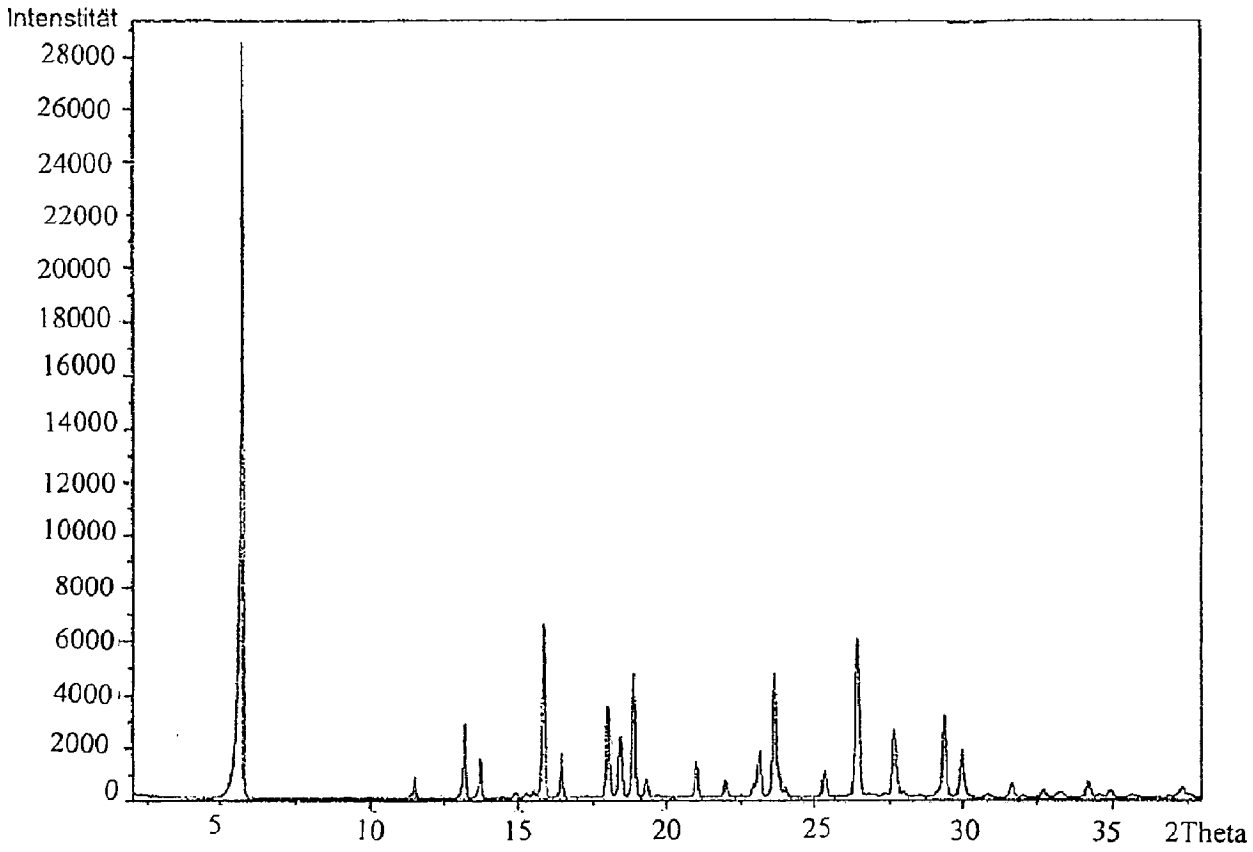


图 10

式（I）化合物的X-射线衍射图

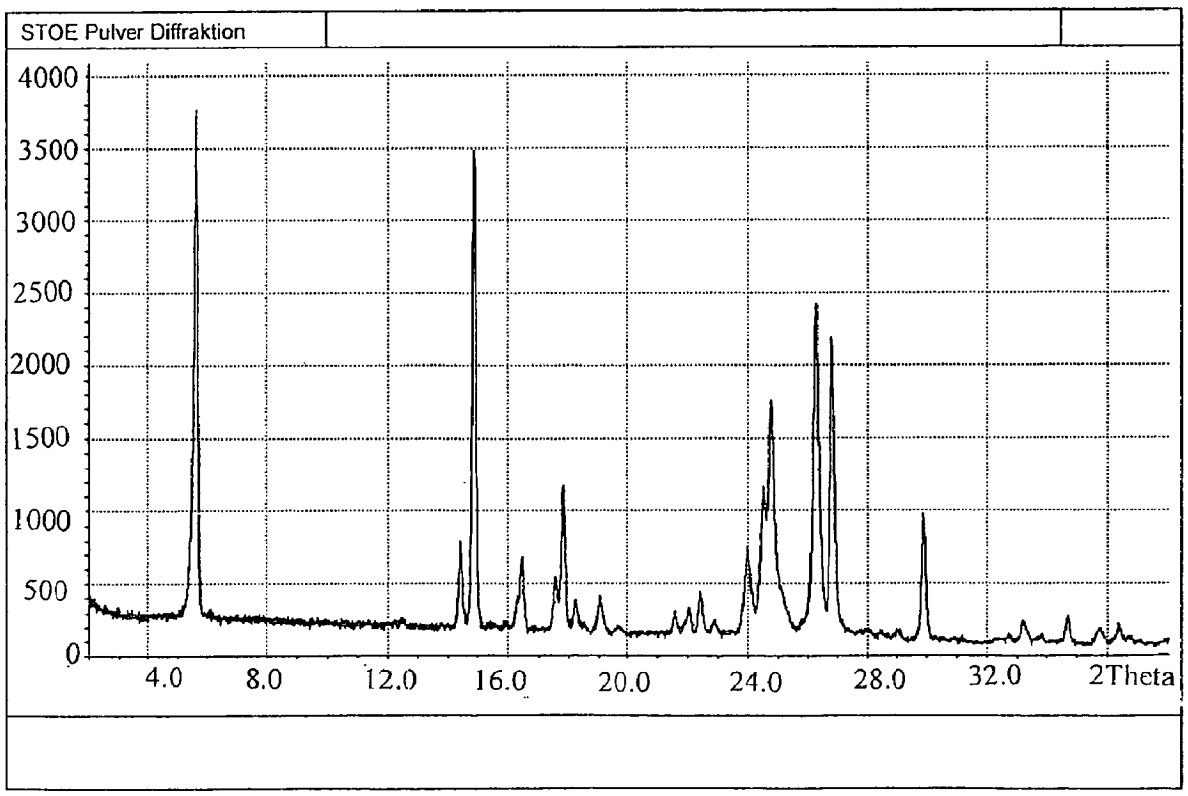


图 11