(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1897937 B
(45)授权公告日 2010.11.24

(21)申请号 200480038488.1

(22)申请日 2004.10.21

(30)优先权数据
60/513,481 2003.10.22 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2006.06.22

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2004/034944 2004.10.21

(87)PCT申请的公布数据
WO2005/041867 EN 2005.05.12

(73)专利权人 史密丝克莱恩比彻姆公司
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 克里斯托弗·S·布鲁克 平立仁

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 张平元 赵仁临

(51)Int.Cl.
A61K 31/41(2006.01)
C07D 257/04(2006.01)
C07D 403/10(2006.01)

(56)对比文件
CN 1444477 A,2003.09.24, 权利要求书第1-47,说明书第25页第25-31行、第26页第1-7行、第28页第5-25行、第29页,实施例12、实施例115-117.
杨洁等. 促血小板生成素(TPO). 中国实验动物学杂志6 3.1996,6(3), 全文.

审查员 樊华

权利要求书 3 页 说明书 11 页

(54)发明名称

2-(3,4-二甲基苯基)-4-{[2-羟基-3′-(1H-四唑-5-基)联苯-3-基]-亚肼基}-5-甲基-2,4-二氢吡唑-3-酮胆碱

(57)摘要

一种改善的血小板生成素拟似物,2-(3,4-二甲基苯基)-4-{[2-羟基-3′-(1H-四唑-5-基)联苯-3-基]-亚肼基)-5-甲基-2,4-二氢吡唑-3-酮的胆碱盐。

CN 1897937 B

1. 2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮胆碱的晶体，其具有如下的 X- 射线粉末峰值：

No.	峰位 [°2θ]	d-间距 [Å]
1	3.7251	23.71979
2	4.6611	18.95844
3	6.9016	12.80813
4	7.398	11.94973
5	8.631	10.24525
6	9.2935	9.51632
7	11.0789	7.98639
8	12.0073	7.37092
9	12.6611	6.99174
10	13.4261	6.59499
11	13.9252	6.35974
12	14.7822	5.9929
13	15.4472	5.73636
14	15.821	5.60168
15	16.0339	5.52779
16	16.3397	5.42501
17	16.827	5.26898
18	17.2645	5.13643
19	17.7	5.01104
20	18.4945	4.79752
21	18.617	4.76623
22	18.8171	4.71597
23	19.0441	4.66028
24	19.4943	4.55365
25	20.0493	4.42884
26	20.2993	4.37486
27	20.9924	4.23196
28	21.8349	4.07054
29	22.1116	4.02021
30	22.7938	3.90141
31	23.3318	3.81267
32	23.6942	3.75516
33	24.3066	3.66191
34	24.9588	3.56769

35	25.3337	3.51573
36	25.8945	3.44085
37	26.28	3.39125
38	26.8355	3.3223
39	28.0401	3.18225
40	28.8594	3.09375
41	29.1842	3.06005
42	29.9265	2.98582
43	30.4456	2.93608
44	30.887	2.89513
45	31.6721	2.82513
46	32.3596	2.76666
47	32.9388	2.71932
48	33.5777	2.66903
49	34.1496	2.62563
50	35.9386	2.49893
51	37.317	2.40973
52	38.1296	2.36023
53	38.8183	2.31992
54	39.4044	2.28676

。

2. 药物组合物，其含有权利要求 1 的晶体和药学上可接受的载体或稀释剂。

3. 根据权利要求 1 的晶体在制备用于治疗需要的哺乳动物中血小板减少症的药物中的用途。

4. 根据权利要求 3 的用途，其中所述哺乳动物是人。

5. 权利要求 1 所述的晶体在制备用于在需要的哺乳动物中增加血小板生成的药物中的用途。

6. 根据权利要求 5 的用途，其中所述哺乳动物是人。

7. 根据权利要求 3 的用途，其中所述晶体经口给予。

8. 根据权利要求 3 的用途，其中所述晶体经胃肠外给予。

9. 权利要求 1 所述晶体在制备用于促进血小板的生成及治疗血小板减少症的药物中的用途。

10. 制备药物组合物的方法，其中该药物组合物包含有效量的权利要求 1 所述的晶体以及药学上可接受载体或稀释剂，该方法包括使权利要求 1 所述晶体与药学上可接受载体或稀释剂相联合。

11. 权利要求 1 所述晶体在制备用于增加捐献者外周血干细胞数量的药物中的用途。

12. 提高刺激巨核细胞成熟和 / 或血小板生成的体外或离体的方法，其包括向干细胞、骨髓细胞、脐血细胞或外周血细胞的培养基中加入有效量的权利要求 1 所述的晶体。

13. 促进培养物中的干细胞、骨髓细胞、脐血细胞或外周血细胞的存活和 / 或增殖的体外或离体方法，其包括在含有有效量的权利要求 1 所述晶体的培养基中培养所述细胞。

14. 根据权利要求 1 的晶体在制备用于治疗需要的哺乳动物中的中性白细胞减少症的

药物中的用途。

15. 根据权利要求 14 的用途，其中所述哺乳动物是人。

16. 促进刺激中性粒细胞生成的体外或离体的方法，其包括向干细胞、骨髓细胞、脐血细胞或外周血细胞的培养基中加入有效量的权利要求 1 所述的晶体。

17. 根据权利要求 3 的用途，其中所述血小板减少症是由于由化疗或放疗引起的骨髓抑制导致的。

18. 根据权利要求 3 的用途，其中所述的血小板减少症是由于器官移植导致的。

19. 根据权利要求 3 的用途，其中所述的血小板减少症是由于骨髓、干细胞或肝移植导致的。

20. 根据权利要求 3 的用途，其中所述的血小板减少症是由于特发性血小板减少性紫癜导致的。

21. 根据权利要求 3 的用途，其中所述的血小板减少症是由于骨髓异常增生综合征、再生障碍性贫血或白血病导致的。

22. 根据权利要求 3 的用途，其中所述的血小板减少症是由于病毒、真菌、微生物或寄生虫感染导致的。

23. 根据权利要求 3 的用途，其中所述的血小板减少症是由于肝功能障碍导致的。

24. 根据权利要求 3 的用途，其中所述的血小板减少症是由于外科手术导致的。

25. 根据权利要求 3 的用途，其中所述的血小板减少症是药物 - 诱发的。

26. 制备权利要求 1 所述晶体的方法，该方法包括 ：

i) 将 1.1g 的 2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3'-(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基] 亚肼 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮在 7mL 乙酸乙酯和 12mL 190 酒精纯度的乙醇中于约 40℃进行搅拌 ；

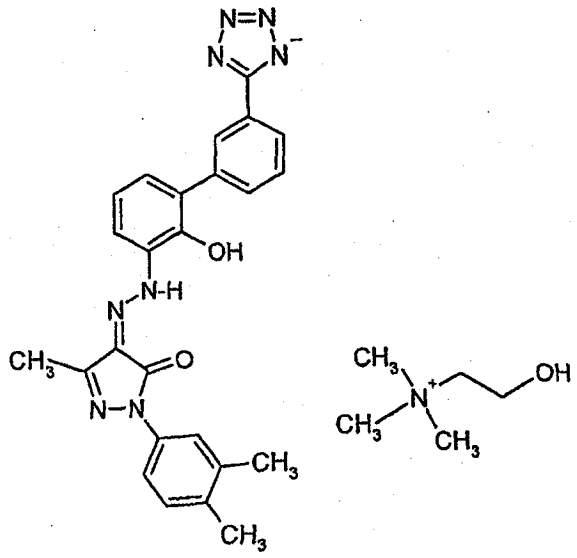
ii) 向该悬浮液中加入 2.5ml 的 1N 氢氧化胆碱的甲醇溶液得到深橙褐色溶液 ；以及

iii) 将 1ml 水加入该深色溶液并于约 35℃搅拌该混合物约 3 小时，期间，溶液中出现沉淀，再于约 20℃搅拌该悬浮液 72 小时，然后通过过滤分离固体。

2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮胆碱

[0001] 本发明涉及改善的血小板生成素 (此后简称为 TPO) 拟似物 (mimetic), 2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 (hydrazono)}-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮的胆碱盐。该化合物由式 I 表示 :

[0002]



(I)

[0003] 本发明化合物适用于作为 TPO 受体激动剂,具体是用于促进血小板的生成。

[0004] 发明详述

[0005] 用于 TPO 受体激动剂,特别是用于促进血小板生成及治疗血小板减少症的 2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮及其药学上可接受的盐、水合物、溶剂合物和酯,已经公开在国际申请 PCT/US01/16863 中并且要求保护,该申请的国际申请日为 2001 年 5 月 24 日,国际公开号为 WO 01/89457,国际公开日为 2001 年 11 月 29 日 (实施例 12 的化合物),其全部公开在此引入作为参考。国际申请 PCT/US01/16863 没有具体公开其中任何一个化合物的盐的形式。

[0006] 现在,我们惊奇地发现 2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮的胆碱盐比其游离酸具有许多优点。游离酸水溶性很差,其不利于被制备成药物剂型,并降低了化合物在体内的生物利用度和口服暴露率。

[0007] 然而,该游离酸作为 TPO 受体的激动剂特别有用,特别是用于促进血小板的生成及治疗血小板减少症。2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮的胆碱盐具有生物利用度和口服暴露率提高的其他优点。

[0008] 本发明化合物 2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮胆碱 (此后简称为 -“活性成分”或

“化合物 A”) 适用于作为 TPO 受体激动剂，特别是用于促进血小板的生成及治疗血小板减少症。活性成分可以按照常规剂型进行给药，所述剂型的制备可按照本领域已知的技术，如国际申请 PCT/US01/16863 所述，通过将活性成分与常用药用载体或稀释剂结合而进行。

[0009] 适当地，本发明在其范围内包括药物组合物，其含有作为活性成分的 2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮胆碱，并联合有药学上可接受的载体或稀释剂。本发明化合物 A 可通过经口、胃肠外、皮内或局部给药途径给药。本文所用术语胃肠外包括静脉内、肌内、皮下、鼻内、直肠内、阴道内或腹膜内给药。通常优选经口给药。化合物 A 可被配制成适于各种给药途径的剂型，包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂或颗粒剂。在这些固体剂型中，活性化合物通常与至少一种惰性稀释剂混合。经口剂型还可含有在通常实践中的除惰性稀释剂外的其它物质，如润滑剂、助流剂和抗氧化剂。在胶囊、片剂和丸剂中，其剂型还可含有缓冲剂。片剂和丸剂还可被制备为缓释剂型。

[0010] 本发明用于胃肠外给药的制剂包括无菌水溶液，也可采用无水悬浮乳剂。这些剂型还可包含助剂如防腐剂、润湿剂、等渗剂、缓冲剂、乳化剂和分散剂。它们可通过例如细菌截留过滤器过滤、向组合物中加入灭菌剂、射线照射组合物或加热组合物而灭菌。

[0011] 本文所用“胆碱”意指 (2- 羟基乙基) 三甲基铵。

[0012] 上述药物剂量单元中本发明活性成分的剂量为有效、无毒剂量，优选在 0.001-100mg/kg 总体重的范围，更优选 0.001-50mg/kg。当治疗需要 TPO 拟似物的患者时，优选每日 1-6 次地经口或非肠胃给药选定剂量。优选的非肠胃给药包括局部、直肠，经皮、注射或持续输液。人类经口给药剂量单元优选包括 0.05-3500mg 活性成分，最优选 0.5-1,000mg 活性成分。优选使用较低剂量的经口给药。然而，在对于患者是安全和方便的情况，也可以施用高剂量非肠胃给药。上述剂量涉及以游离酸表示的活性成分的优选量。

[0013] 本领域技术人员应当肯定，活性成分个体剂量的最佳给药数量及间隔视治疗疾病的性质及程度，给药剂型、途径及部位，治疗的具体患者而定，并且该最佳方案可通过常用技术确定。本领域技术人员也应当明白，最佳疗程，即既定时间内每天给予活性成分剂量的次数可经本领域技术人员使用常用的确定疗程的试验进行确定。

[0014] 一般而言，本发明化合物的制备可通过将游离酸 -2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮溶解于适当有机溶剂如乙醇和乙酸乙酯混合物中，过滤所得化合物以除去杂质，然后向该溶液中加入例如 1.5 当量氢氧化胆碱 (choline hydroxide) 在有机溶剂 (优选与水混溶的溶剂如 MeOH 或 THF) 中的溶液。通常经过 3-24 小时，将沉淀出本发明的化合物。然后过滤并干燥，例如真空干燥或高温空气干燥。

[0015] 氢氧化胆碱的 50wt. % 甲醇溶液购自 Aldrich Chemical Company，Milwaukee，Wisconsin。

[0016] 有机溶剂可购自 Aldrich Chemical Company，Milwaukee，Wisconsin。

[0017] 由于本发明的药学活性化合物具有 TPO 拟似物活性，其在治疗血小板减少症以及其它伴有血小板生成减少的病情中显示了治疗用途。

[0018] 如本文所述，血小板减少症的治疗伴随着提高血小板的产生。

[0019] 如本文所用的术语“血小板减少症”及其衍生疾病广义地解释为血小板低于所

认为的正常数目或健康个体所需数目的任何疾病。已知血小板减少症的许多诱发因素，包括但不限于放疗、化疗、免疫治疗、免疫血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenic purpura)(ITP,Bussel J.B.,Seminars inHematology,2000,37,Suppl 1,1-49)、脊髓发育不良综合征 (MDS)、再生障碍性贫血、AML、CML、病毒感染 (包括但不限于 :HIV、丙型肝炎、细小病毒)、肝病、脊髓切除 (myeloablation)、骨髓移植、干细胞移植、外周血干细胞移植、祖细胞缺乏 (progenitor cell defect)、干细胞和祖细胞中的多态性 (polymorphisms)、Tpo 缺乏、嗜中性白血球减少症 (Sawai, N.J.Leukocyte Biol.,2000,68,137-43)、树状细胞转移 (Kuter D.J.Seminars in Hematology,2000,37,Suppl 4,41-49)、增殖、激活或分化。无论引起疾病的单个因素或多个因素为何，本发明的药物活性化合物适用于治疗血小板减少症。本发明药物活性化合物也可在疾病起因未知或还未确认时，用于治疗血小板减少症。

[0020] 已证明 TPO 作为动员剂 (mobilizer) 促使干细胞分化为外周血 (NeumannT.A.etal., Cvtokines.Cell.& Mol.Ther.,2000,6,47-56)。该活性可以与干细胞动员剂如 G-CSF 产生协同作用 (Somolo et al., Blood,1999,93,2798-2806)。因此，本发明的化合物适用于在对接受脊髓切除化疗的患者进行用于造血干细胞移植的白细胞分离 (leukapheresis) 之前增加供体循环中干细胞的数量。

[0021] 同样地，TPO 刺激骨髓细胞，特别是粒细胞 / 巨噬细胞系 (lineage) 的生长 (Holly et al., US-5989537)。粒细胞 / 巨噬细胞祖细胞 (progenitor) 是骨髓细胞系的细胞，其成熟为嗜中性粒细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞 (basophils) 和嗜酸性粒细胞 (eosinophils)。本发明所述化合物因此在患嗜中性白细胞减少疾病的患者中具有刺激嗜中性白细胞增殖的治疗应用。

[0022] 本发明化合物的预防用途是在当血液或血小板预计要降低时而产生的用途。本发明化合物 A 的预防用途是在预计血液或血小板损失之前，产生血小板的积累或开始产生血小板。本发明化合物的预防用途包括但不限于外科移植、外科手术、在生孩子和肠保护前的麻醉。

[0023] 已经有显示人树状细胞 (human dendritic cells) 可表达 TPO 受体 (Kumamoto et al., Br.J.Haem,1999,105,1025-1033)，且 TPO 是树状细胞的有效动员剂。本发明的 TPO 拟似化合物由于可以增加树状细胞的活性和转移性，也可以用作疫苗佐剂 (vaccine adjuvant)。化合物 A 通过增加树状细胞的活性和转移力也可用作免疫佐剂，可以与经口、经皮或皮下递送的疫苗和 / 或免疫调节剂进行联合给药。

[0024] 已知 TPO 具有各种效果，包括对巨核细胞、血小板和干细胞的抗 - 细胞凋亡 / 生存的效果，以及对干细胞和巨核细胞的增殖的效果 (Kuter D.J.Seminars in Hematology, 2000,37,41-9)。这些 TPO 活性有效地增加了干细胞和祖细胞的数量，因此当将 TPO 与其它引导分化的细胞因子联合应用时，具有协同作用。

[0025] 本发明另一方面提供了在需要其的哺乳动物包括人体内治疗变性疾病的方法，其包括向该哺乳动物给予治疗有效量的本发明化合物 A。

[0026] 本文所用的术语变性疾病或其衍生词，意指选自下列的疾病状态 :神经系统病症，包括横贯性脊髓炎 (transverse myelitis)、多发性硬化 (multiplesclerosis)、脑或脊髓创伤后的脱髓鞘 (demyelination)、急性脑损伤 (acute braininjury)、头部创伤 (head trauma)、外周神经损伤 (peripheral nerve injury)、缺血性脑损伤 (ischaemic

brain injury)、脊髓损伤 (spinal cord injury)、CNS 的遗传性髓磷脂疾病 (hereditary myelin disorder of the CNS)、癫痫 (epilepsy)、围产期窒息 (perinatal asphyxia)、窒息 (asphyxia)、缺氧症 (anoxia)、癫痫持续状态 (status epilepticus) 和中风 (stroke)；神经变性疾病如阿尔茨海默病 (Alzheimer'sdisease)、帕金森病 (Parkinson disease)、亨延顿氏舞蹈病 (Huntington'sdisease)、肌萎缩性侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis)；在治疗、修复和 / 或再生组织中，例如：在心血管病症、心肌梗塞和心血管疾病 / 组织中，以及治疗、修复和 / 或再生肝疾病 / 组织、胃肠疾病 / 组织以及肾疾病 / 组织中；在治疗 AIDS 中；以及在治疗糖尿病 / 糖尿病症 (diabetes/diabetes mellitus) 中。

[0027] 中风是指脑血管意外 (cerebral vascular incident，CVI) 并包括急性血栓栓塞性中风。中风包括病灶式缺血或全身缺血。还包括暂时的脑缺血性发作和其它伴随脑缺血的脑血管问题。患者特别地经历了颈动脉内膜切除术，或经历了其它一般性脑血管或血管外科过程，或诊断血管过程包括脑血造影等。

[0028] 其它意外是头部创伤、脊髓创伤或一般性缺氧症、氧不足、低血糖、血压过低引起的损伤以及在内褶 (embole)、过融合 (hyperfusion) 和氧不足过程期间所见的类似损伤。

[0029] 化合物 A 适用于许多意外，例如在心脏旁路手术期间、在颅内出血意外中、在围产期窒息中、在心跳停止中以及癫痫持续状态。

[0030] 本发明由此提供了治疗下列疾病状态的方法，所述疾病选自：神经系统病症，包括横贯性脊髓炎、多发性硬化、脑或脊髓创伤后的脱髓鞘、急性脑损伤、头部创伤、脊髓损伤、外周神经损伤、缺血性脑损伤、CNS 的遗传性髓磷脂疾病、癫痫、围产期窒息、窒息、缺氧症、癫痫持续状态和中风；神经变性疾病如阿尔茨海默病、帕金森病、亨延顿氏舞蹈病、肌萎缩性侧索硬化；提供了例如在心血管病症、心肌梗塞和心血管疾病 / 组织中治疗、修复和 / 或再生组织的方法；以及治疗、修复和 / 或再生肝疾病 / 组织、胃肠疾病 / 组织以及肾疾病 / 组织的方法；治疗 AIDS 的方法；以及治疗糖尿病的方法；该方法包括给予有效量的化合物 A。

[0031] 如本文所述，变性疾病的治疗是通过给予化合物 A 而实现的，且不限于任何特别的作用机理。如本文所述的治疗变性疾病的作用机理是通过刺激存活和 / 或产生干细胞和 / 或提高干细胞功能和 / 或寿命而进行的。

[0032] 已知变性疾病具有许多诱发因素，包括但不限于，病毒感染 (包括但不限于 HIV、丙型肝炎，细小病毒) 和肝病、老年化、自身免疫疾病、神经疾病 / 损害、肝病 / 损害、肾病 / 损害、胃肠疾病 / 损害、心血管疾病 / 损害和胰病 / 损害。本发明涉及变性疾病的治疗，而不考虑引起病情的因素。本发明化合物，化合物 A，还适用于治疗病情未知或仍有待确定的变性疾病。

[0033] 当患者被怀疑或存在患变性疾病如中风的危险、或者正患有中风，通过本发明的方法，熟练的医师将能够确定给药的适当情况。

[0034] 无论何时预见到将患变性疾病时，均可以考虑本发明化合物在预防上的应用。

[0035] 化合物 A 在治疗变性疾病上的能力可以由在 CD34+ 祖细胞分化测试中的活性证明。

[0036] CD34+ 祖细胞分化测试

[0037] 测试化合物 A 在刺激来自人骨髓的早期 CD34+ 祖细胞存活和分化上的能力。在该

测试中，将纯化的人 CD34+ 祖细胞与化合物 A 一起在液体培养基中孵育 7 天，然后通过流式细胞仪测量表达早期干细胞标记物 CD34 的细胞数目，并与未处理的细胞进行比较（参见 Liu et al. Bone MarrowTransplantation. 24 :247-52, 1999）。

[0038] 本发明因此提供了一种治疗变性疾病的方法，包括向需要其的受试者给予有效量的化合物 A。由于化合物 A 具有治疗变性疾病的能力，因此其提供了治疗上述疾病状态的方法。

[0039] 作为该发现的一部分，在体内给予化合物 A 适用于治疗帕金森病、亨廷顿氏病、多发性硬化病和缺血性脑损伤。表明干细胞，包括成年骨髓干细胞，可有效治疗多发性硬化病 ;Stangel M. Et al., Progress in Neurobiology, 68(5) :361-76, 2002 Dec。神经干细胞及其在帕金森病、亨廷顿氏病、多发性硬化病和缺血性脑损伤中的应用描述于 Ostenfield T. et al., Advances &Technical standards in Neurosurgery, 28 :3-89, 2003 中。

[0040] 此外，作为该发现的一部分，在体内给予化合物 A 适用于再生和修复应答干细胞治疗的组织。本领域技术人员容易知晓或易于获知这些组织。例如，表明干细胞适用于治疗心肌梗塞、心血管病症和心血管疾病的患者 ;Stamm C. et al., Lancet. 361(9351) :45-6, 2003 and Semsarian C., InternalMedicine Journal. 32(5-6) :259-65, 2002。表明干细胞可治疗、修复和 / 或再生肝病 / 组织、胃肠疾病 / 组织和肾病 / 组织 ;Choi D. et al., Cell transplantation, 11(4) :359-68, 2002, Poulsom R. et al., Journal of Pathology, 197(4) :441-56, 2002 andAlison M. et al., Journal of Pathology. 197(4) :419-23, 2002。

[0041] 此外，作为该发现的一部分，在体内给予化合物 A 适用于治疗糖尿病。表明干细胞可治疗糖尿病，Berna G, et al., Biomedicine & Pharmacotherapy, 55(4) :206-12, 2001 and Beilhack GF., et al., Diabetes, 52(1) :59-68, 2003。

[0042] 本发明另一方面提供了将本发明化合物 A 与其它活性成分的联合给药 (co-administrating) 的方法，该其它活性成分例如其它已知的治疗变性疾病和 / 或血小板减少症的化合物，或已知的与 TPO 拟似物联合使用时有效的其它化合物，其中所述变性疾病和 / 或血小板减少症包括化疗诱发的血小板减少症以及骨髓移植和其它伴有抑制血小板生成的病情。

[0043] 本文所用术语“联合给药”或其衍生词，是指同时给予或以任何单独的相继方式给予化合物 A 和已知治疗变性疾病和 / 或血小板减少症的其它活性成分，其中所述的变性疾病和 / 或血小板减少症包括化疗诱发的血小板减少症以及骨髓移植和其它伴有抑制血小板生成的病情。如本文所用的术语其它活性成分包括在与 TPO 或 TPO 拟似物一起给药时，已知具有或证明具有优势的任何化合物或药物。优选地，如果不是同时给药时，将化合物在相互接近的时间内给药。此外，化合物是否以相同剂型给药并不重要，即一种化合物可以局部给药而另一种化合物可以经口给药。

[0044] 本发明的 TPO 拟似化合物还可以与其它已知的、在生存或增殖上对细胞有作用的药物联合，而用于在生存或增殖上对细胞发生作用。这些其它药剂包括但不限于 :G-CSF, GM-CSF, TPO, M-CSF, EPO, Gro-β, IL-11, SCF, FLT3 配体, LIF, IL-3, IL-6, IL-1, 祖细胞生成素 (Progenipoietin), NESP, SD-01 或 IL-5 或任何前述药物的生物活性衍生物，KT6352(Shiotsu Y. et al., Exp. Hemat. 1998, 26, 1195-1201), 子宫褐质 (uteroferrin)

(Laurenz JC.，et al.Comp.Biochem.& Phys.，Part A.Physiology.，1997，116，369-77)，FK23(Hasegawa T.，et al.Int.J.Immunopharm.，1996，8103-112)，和其它被认为对干细胞、祖细胞或其表达 TPO 受体的细胞具有抗细胞凋亡、生存或增殖特性的分子。

[0045] 用于与本发明化合物 A 联合的其它活性成分例如包括但不限于：化学保护或脊髓保护剂如 G-CSF，BB 10010(Clemons et al.，Breast Cancer Res.Treatment，1999，57，127)、依硫磷酸 (amifostine)(Ethyol)(Fetscher et al.，Current Opinion in Hemat.，2000，7，255-60)，SCF，IL-11，MCP-4，IL-1-β，AcSDKP(Gaudron et al.，Stem Cells，1999，17，100-6)，TNF-a，TGF-b，MIP-1a(Egger et al.，Bone Marrow Transi.，1998，22(Suppl.2)，34-35) 和其他被确认具有抗细胞凋亡、生存或增殖性能的分子。

[0046] 此外用于与本发明 TPO 拟似化合物联合用药的其它活性成分包括但不限于：干细胞 (stem cell)，巨核细胞 (mygakaryocyte)，嗜中性白细胞动员剂 (neutrophil mobilizer) 如化学治疗剂 (即，环磷酰胺 (cytoxan)，依托泊甙 (etoposide)，顺氯氨铂 (cisplatin)，Ballestrero A.et al.，Oncology，2000，59，7-13)，趋化因子，IL-8，Gro-β (King，A.G et al.J.Immun.，2000，164，3774-82)，受体激动剂或拮抗剂抗体，小分子的细胞因子或受体激动剂或拮抗剂，SCF，Flt3 配体，粘附分子抑制剂或抗体，如：抗 -VLA-4(Kikuta T.et al.，Exp.Hemat.，2000，28，311-7) 或抗 -CD44(Vermeulen M.et al.，Blood，1998，92，894-900)，细胞因子 / 趋化因子 / 白细胞介素或受体激动剂或拮抗剂抗体，MCP-4(Berkhout TA.，et al.，J.Biol.Chem.，1997，272，16404-16413；UguccioniM.et al.，J.Exp.Med.，1996，183，2379-2384)。

[0047] 本发明化合物 A 适用于在需要其的哺乳动物特别是人体内作为 TPO 拟似物。

[0048] 在包括人的哺乳动物中诱导 TPO 模拟活性的本发明方法，包括向需要该活性的受试者给予有效 TPO 模拟量的本发明化合物 A。

[0049] 本发明还提供了化合物 A 在制备用于治疗的药物中的应用。

[0050] 本发明还提供了化合物 A 在制备用作 TPO 拟似物的药物中的应用。

[0051] 本发明还提供了化合物 A 在制备用于增加血小板生成的药物中的应用。

[0052] 本发明还提供了化合物 A 在制备用于治疗血小板减少症的药物中的应用。

[0053] 本发明还提供了化合物 A 在制备用于治疗变性疾病的药物中的应用。

[0054] 本发明还提供了用于治疗变性疾病的药物组合物，其含有化合物 A 和药学上可接受的载体。

[0055] 本发明还提供了用作 TPO 拟似物的药物组合物，其含有化合物 A 和药学上可接受的载体。

[0056] 本发明还提供了用于治疗血小板减少症的药物组合物，其含有化合物 A 和药学上可接受的载体。

[0057] 本发明还提供了用于增加血小板生成的药物组合物，其含有化合物 A 和药学上可接受的载体。

[0058] 本发明还提供了用于治疗变性疾病的药物组合物，其含有化合物 A 和药学上可接受的载体。

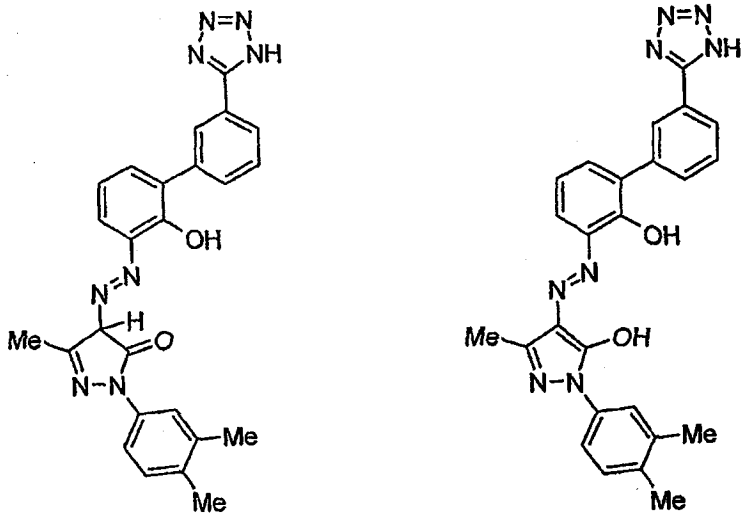
[0059] 本文所用术语“治疗”及其衍生词意指预防性和治疗性的治疗 (prophylactic and therapeutic therapy)。

[0060] 本说明书中所引用的所有出版物，包括但不限于专利和专利申请，在此被全文引入作为参考。

[0061] 当根据本发明给予本发明化合物时，预期没有不可接受的毒性作用。

[0062] 所考虑的等价物－本领域普通技术人员将理解为，化合物 A 还可存在互变异构体的形式。化合物 A 的互变形式可包括但不限于由下式 (II 和 III) 表示的结构：

[0063]



(II) (III).

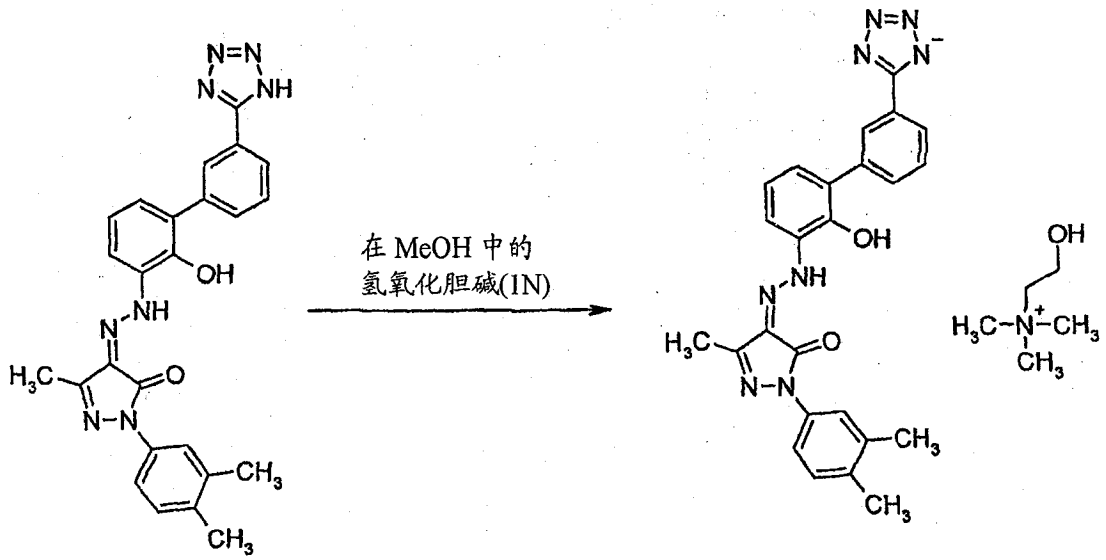
[0064] 所有这些化合物包括在本发明范围内并固有地包括在化合物 A 定义中。

[0065] 下面的实施例进一步举例说明本发明。这些实施例并非意在限制如上所定义的以及如权利要求所定义的本发明范围。

[0066] 实施例 1

[0067] 2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮胆碱的制备

[0068]

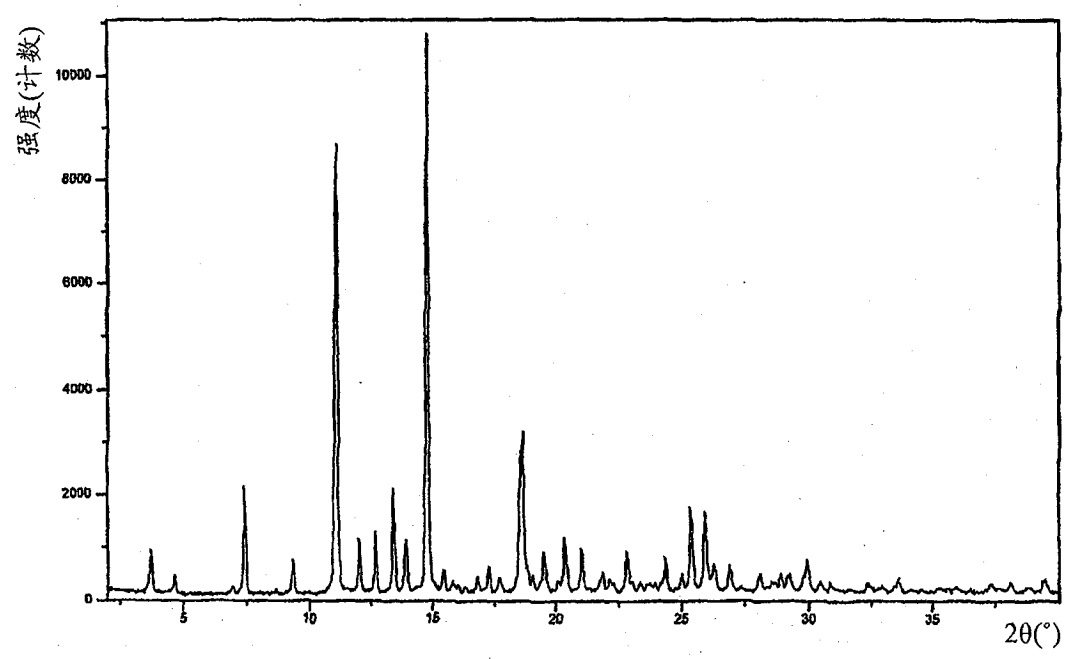


[0069] 将 2-(3,4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2,4- 二氢吡唑 -3- 酮，1.1g 粗橙色固体，在 7mL 乙酸乙酯和 12mL 乙醇

(190proof) 中于约 40℃进行搅拌。向该悬浮液中加入 2.5ml 氢氧化胆碱 (1N) 的甲醇溶液得到深橙褐色溶液。将水 (1ml) 加入该深色溶液并于约 35℃搅拌该混合物约 3 小时。期间，溶液中出现沉淀。再于约 20℃搅拌该悬浮液 72 小时，然后通过过滤分离固体并于约 40℃干燥 12 小时得到 1.2 克 (87％收率) 标题化合物，为浅橙色结晶固体。

[0070] 在 Philips X′ Pert Pro 衍射仪上通过 X- 射线粉末衍射证明该固体为结晶。样品经下面参数扫描 :扫描范围 :2-35° 2- θ ;发生器功率 :40kV,40mA ;射线源 :Cu Kα ;扫描类型 :持续扫描 ;每步时间 :10.16 秒 ;步径 :0.0167° 2- θ 每步 ;样品旋转速度 :25rpm。下面是 X- 射线粉末图样和峰值。

[0071]



[0072] 峰位 d- 间距 峰高 相对强度

[0073] No.	[° 2Th.]	[Å]	[cts]	[％]
[0074] 1	3.7251	23.71979	765.16	7.1
[0075] 2	4.6611	18.95844	281.32	2.61
[0076] 3	6.9016	12.80813	132.23	1.23
[0077] 4	7.398	11.94973	1973.41	18.32
[0078] 5	8.631	10.24525	79.49	0.74
[0079] 6	9.2935	9.51632	591.28	5.49
[0080] 7	11.0789	7.98639	8263.89	76.71
[0081] 8	12.0073	7.37092	1010.77	9.38
[0082] 9	12.6611	6.99174	1142.5	10.61
[0083] 10	13.4261	6.59499	1954.15	18.14
[0084] 11	13.9252	6.35974	935.82	8.69
[0085] 12	14.7822	5.9929	10773.16	100
[0086] 13	15.4472	5.73636	448.55	4.16
[0087] 14	15.821	5.60168	247.91	2.3

[0088]	15	16.0339	5.52779	187.08	1.74
[0089]	16	16.3397	5.42501	133.42	1.24
[0090]	17	16.827	5.26898	323.14	3
[0091]	18	17.2645	5.13643	503.18	4.67
[0092]	19	17.7	5.01104	303.14	2.81
[0093]	20	18.4945	4.79752	1781.54	16.54
[0094]	21	18.617	4.76623	3054.95	28.36
[0095]	22	18.8171	4.71597	523.32	4.86
[0096]	23	19.0441	4.66028	351.15	3.26
[0097]	24	19.4943	4.55365	759.39	7.05
[0098]	25	20.0493	4.42884	237.18	2.2
[0099]	26	20.2993	4.37486	976.47	9.06
[0100]	27	20.9924	4.23196	826.54	7.67
[0101]	28	21.8349	4.07054	401.19	3.72
[0102]	29	22.1116	4.02021	277.22	2.57
[0103]	30	22.7938	3.90141	772.82	7.17
[0104]	31	23.3318	3.81267	198.84	1.85
[0105]	32	23.6942	3.75516	194.32	1.8
[0106]	33	24.3066	3.66191	646.51	6
[0107]	34	24.9588	3.56769	361.6	3.36
[0108]	35	25.3337	3.51573	1565.54	14.53
[0109]	36	25.8945	3.44085	1500.67	13.93
[0110]	37	26.28	3.39125	464.38	4.31
[0111]	38	26.8355	3.3223	491.62	4.56
[0112]	39	28.0401	3.18225	379.9	3.53
[0113]	40	28.8594	3.09375	323.9	3.01
[0114]	41	29.1842	3.06005	347.59	3.23
[0115]	42	29.9265	2.98582	615.82	5.72
[0116]	43	30.4456	2.93608	205.95	1.91
[0117]	44	30.887	2.89513	209.21	1.94
[0118]	45	31.6721	2.82513	111.93	1.04
[0119]	46	32.3596	2.76666	186.65	1.73
[0120]	47	32.9388	2.71932	135.38	1.26
[0121]	48	33.5777	2.66903	266.78	2.48
[0122]	49	34.1496	2.62563	98.41	0.91
[0123]	50	35.9386	2.49893	127	1.18
[0124]	51	37.317	2.40973	197.26	1.83
[0125]	52	38.1296	2.36023	208.09	1.93
[0126]	53	38.8183	2.31992	140.58	1.3

[0127] 54 39.4044 2.28676 240.8 2.24

[0128] DSC 数据表明固体熔融分解的吸热端点约为 235.3℃。

[0129] 质子 NMR(400MHz，MeOH-d4 参照于 MeOH-d4 δ 3.32)：

[0130] δ 2.28(s，3H)，2.31(s，3H)，2.39(s，3H)，3.21(s，9H)，3.47-3.49(t，2H)，3.99-4.01(t，2H)，7.10-7.13(dd，1H)，7.17-7.18(d，1H)，7.20-7.21(dd，1H)，7.55-7.60(m，3H)，7.68(br.s，1H)，7.76-7.77(dd，1H)，8.06-8.07(dd，1H)，8.21(s，1H)

[0131] IR 数据 (DATR)

[0132] 3023，2920，2853，1648，1606，1541，1503，1457，1410，1367，1334，1267，1257，1224，1191，1155，1135，1117，1097，1054，1024，1000，958，920，904，874，851，806，784，773，760，726，708，681cm^{-1}

[0133] 实施例 2

[0134] 2-(3，4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2，4- 二氢吡唑 -3- 酮胆碱的制备

[0135] 将 2-(3，4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼 }-5- 甲基 -2，4- 二氢吡唑 -3- 酮 (2.0g，4.29mmole) 悬浮于乙醇 (17ml) 和水 (1.85ml) 中。在环境温度下用氢氧化胆碱 (2.68ml，2.2 当量)(以 45％ wt 甲醇溶液提供) 处理该棕色浆液，形成深紫色溶液，将该溶液搅拌 30 分钟。过滤该溶液，并经乙醇 (4ml) 漂洗。将三氟乙酸 (0.36ml，1 当量) 在水 (1.85ml) 中的溶液加入滤液中形成橙红色浆液，然后将该浆液于 78℃ (回流) 加热并搅拌 30 分钟。然后将该反应冷却至 60℃并经乙醇 (25ml，12.5 体积) 处理，于 60℃再搅拌 1 小时。将悬浮液冷至环境温度并搅拌 17 小时。过滤后，用乙醇 (8ml，4 体积) 洗涤滤饼。所得固体于 50℃真空干燥得到 2-(3，4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2，4- 二氢吡唑 -3- 酮胆碱，为橙色固体 (2.02g，83％)。

[0136] 质子 NMR 和 IR 数据与标题化合物一致。

[0137] 实施例 3

[0138] 片剂组合物

[0139] 将乳糖、微晶纤维素、羟基乙酸淀粉钠、硬脂酸镁和 2-(3，4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 -3- 基]- 亚肼 }-5- 甲基 -2，4- 二氢吡唑 -3- 酮胆碱按照下表 1 的比例掺合。然后将混合物压制成片剂。

[0140] 表 1

[0141] 成分	mg
[0142] 2-(3，4- 二甲基苯基)-4-{[2- 羟基 -3′ -(1H- 四唑 -5- 基) 联苯 [0143] -3- 基]- 亚肼基 }-5- 甲基 -2，4- 二氢吡唑 -3- 酮胆碱	8.45
[0144] 微晶纤维素	112
[0145] 乳糖	70
[0146] 羟基乙酸淀粉钠	8
[0147] 硬脂酸镁	2

[0148] 实施例 4

[0149] 可注射的胃肠外组合物

[0150] 用于给药的2-(3,4-二甲基苯基)-4-{[2-羟基-3′-(1H-四唑-5-基)联苯-3-基]-亚肼基}-5-甲基-2,4-二氢吡唑-3-酮胆碱的可注射形式，是通过在1.0ml生理盐水中搅拌5.0mg的该化合物而制备。

[0151] 本发明的优选实施方案如上所述地进行了举例说明，然而应当明白，本发明不局限于此处公开的具体说明，并保留所有在权利要求范围内修改的权利。