

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810000346.6

[51] Int. Cl.

C07D 231/46 (2006.01)

A61K 31/655 (2006.01)

A61K 31/4152 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月15日

[11] 公开号 CN 101481352A

[22] 申请日 2008.1.10

[21] 申请号 200810000346.6

[71] 申请人 上海恒瑞医药有限公司

地址 200245 上海市闵行区文井路 279 号

[72] 发明人 邓炳初 吕贺军

[74] 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

代理人 程伟

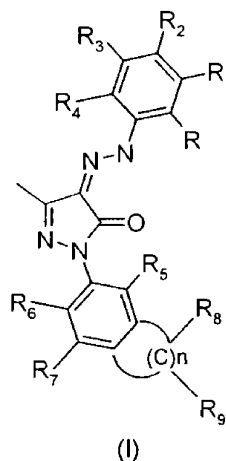
权利要求书 4 页 说明书 20 页

[54] 发明名称

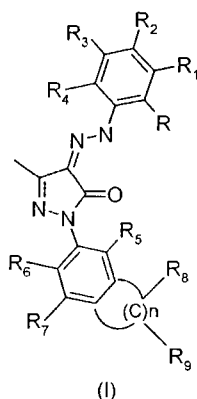
双环取代吡唑酮偶氮类衍生物、其制备方法及其在医药上的应用

[57] 摘要

本发明涉及一种由通式(I)表示的双环取代吡唑酮偶氮类衍生物或其药学上可以接受的盐、水合物、溶剂化合物或酯、其制备方法及其在医药上的应用。



1. 一种由通式(I)表示的化合物或其药学上可以接受的盐、水合物、溶剂化合物或酯:



其中:

R 选自羟基或羧酸酯;

R₁、R₂、R₃ 和 R₄ 各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、芳基或杂芳基, 其中芳基或杂芳基进一步被一个或多个选自烷基、卤素、羟基、四唑基、羧酸或羧酸酯的取代基所取代;

R₅、R₆ 和 R₇ 各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、羧酸或羧酸酯;

R₈ 和 R₉ 各自独立地选自氢原子或烷基;

n 是 2~4。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化合物或酯,

其中:

R 选自羟基或羧酸酯;

R₁ 是芳基或杂芳基, 其中芳基或杂芳基进一步被一个或多个选自烷基、卤素、羟基、四唑基、羧酸或羧酸酯的取代基所取代;

R₂ 是氢原子;

R₃ 和 R₄ 各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基或卤素;

R₅、R₆ 和 R₇ 各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、羧酸或羧酸酯;

R₈ 和 R₉ 各自独立地选自氢原子或烷基;

n 是 2~4。

3. 根据权利要求 2 所述的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化合物或

酯，

其中：

R 选自羟基；

R₁ 是芳基或杂芳基，其中芳基或杂芳基进一步被一个或多个选自烷基、卤素、羟基、四唑基、羧酸或羧酸酯的取代基所取代；

R₂ 是氢原子；

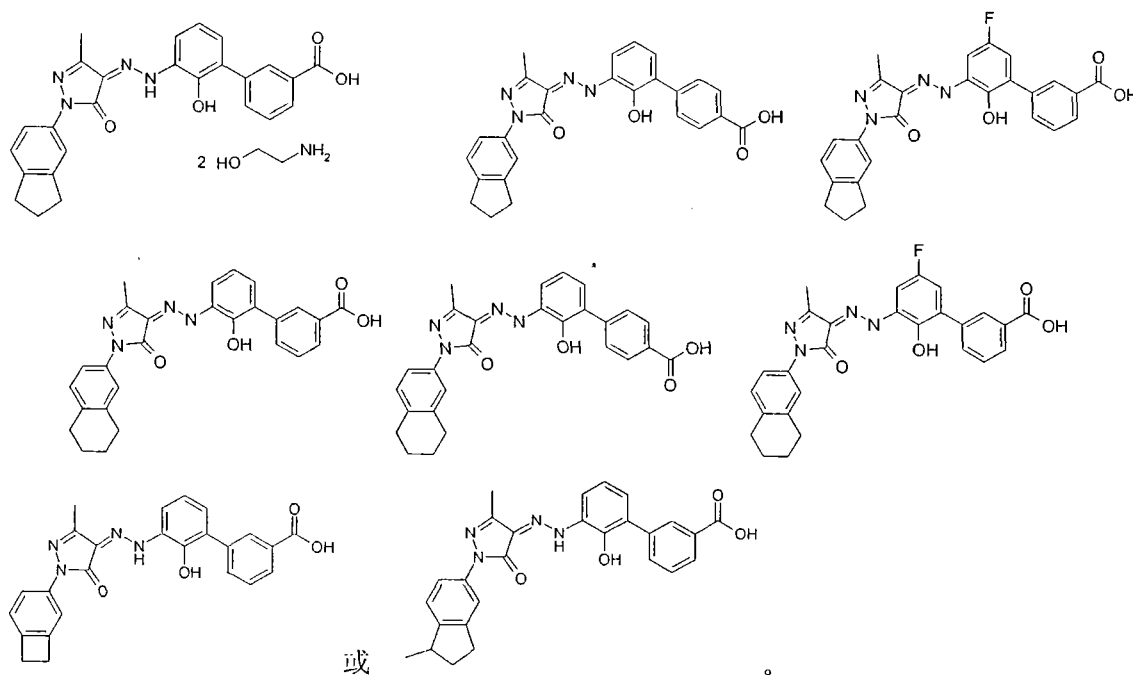
R₃ 和 R₄ 各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基或卤素；

R₅、R₆ 和 R₇ 各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、羧酸或羧酸酯；

R₈ 和 R₉ 各自独立地选自氢原子或烷基；

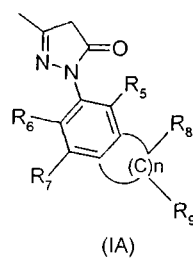
n 是 2~4。

4. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化合物或酯，其中该化合物选自：



5. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化合物或酯，所述的盐包括氨基乙醇盐和胆碱季胺盐。

6. 通式(IA)所示的化合物，其作为通式(I)化合物合成的中间体：



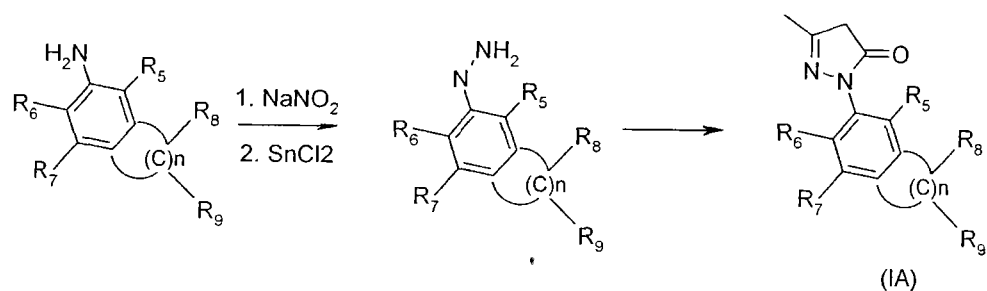
其中:

R_5 、 R_6 和 R_7 各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、羧酸或羧酸酯;

R_8 和 R_9 各自独立地选自氢原子或烷基;

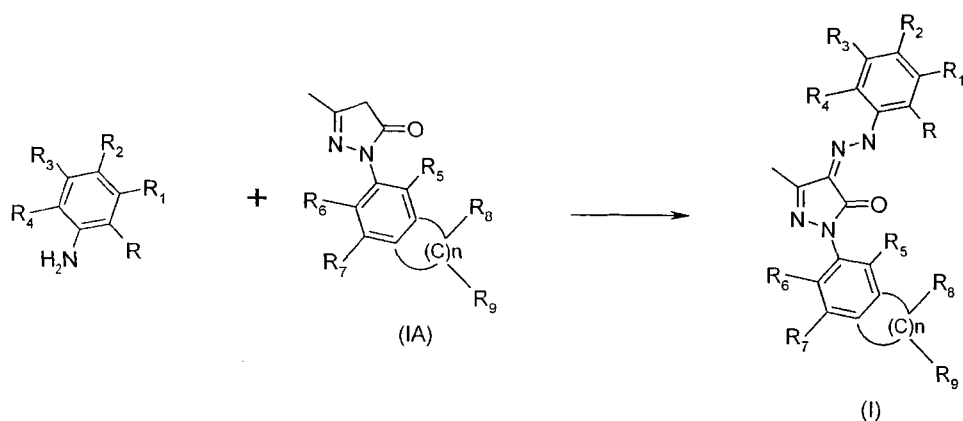
n 是 2~4。

7. 根据权利要求 6 所示的中间体(IA)的制备方法, 该方法包括:



取代的氨基苯并多元环在酸性溶液中与硝酸钠反应重氮化, 再通过二氯亚锡还原得到肼, 肼与羰基化合物在溶剂中加热下缩合得到通式(IA)化合物。

8. 根据权利要求 1 所示的通式(I)化合物的制备方法, 该方法包括:



通过将取代的苯胺类化合物与硝酸钠在酸中重氮化, 再与通式(IA)化合物在碱性溶液中发生偶联反应得到通式(I)化合物, 然后根据需要成盐。

9. 一种根据权利要求 1 所示的通式(I)化合物或其盐、水合物、溶剂化合物或酯在制备 TPO 调节剂中的用途。

10. 一种权利要求 1 所示的通式(I)化合物或其盐、水合物、溶剂化合物或酯在制备治疗有需要的哺乳动物血小板减少药物中的用途。
11. 一种药物组合物,其包括药物有效剂量的如权利要求 1 所示的通式(I)化合物及其药学上可以接收的盐、水合物、溶剂化合物或酯及药用载体和稀释剂。
12. 根据权利要求 10 所述的用途,其中所述哺乳动物为人。
13. 根据权利要求 10 所述的用途,其中所述药物进一步与选自下列的药物联合使用:集落刺激因子、细胞因子、趋化因子、白细胞介素或细胞因子受体激动剂或拮抗剂、可溶的受体、受体激动剂或拮抗剂抗体或与一个或多个与所述药物具有相同的作用机理的肽或小分子类物质。
14. 根据权利要求 11 所述的药物组合物,进一步含有共同服用的治疗有效量的选自下列的药物:集落刺激因子、细胞因子、趋化因子、白细胞介素或细胞因子受体激动剂。
15. 一种权利要求 1 所示的通式(I)化合物在制备免疫佐剂中的用途。
16. 根据权利要求 15 所述的用途,其中所述免疫佐剂与免疫调节剂联合使用。
17. 一种针对权利要求1所示的通式(I)化合物的筛选方法,包括:
 - 使用细胞处理不同浓度下的权利要求1所示的通式(I)化合物,
 - 收集并裂解细胞,定蛋白到相同的量,
 - 蛋白变性后,进行SDS-PAGE,转移到硝酸纤维素膜,分别与抗STAT3磷酸化抗体(一抗),抗兔IgG抗体(二抗)进行杂交,
 - 最后用ECL试剂盒检测,X光片曝光,
 - 根据相应蛋白条带的大小及密度,评价通式 (I) 化合物对STAT3的激活程度。

双环取代吡唑酮偶氮类衍生物、其制备方法及其在医药上的应用

技术领域

本发明涉及一种通式(I)所示新的双环取代吡唑酮偶氮类衍生物、其制备方法以及含有该衍生物的药物组合物、以及其作为治疗剂特血小板生成素(TPO)模拟物和它们用作血小板生成和巨核细胞生成促进剂的用途。

背景技术

血小板生成素(Thrombopoietin, TPO), 又称为巨核细胞生长发育因子(megakaryocyte growth and development factor, MGDF), 血小板生成刺激因子(thrombocytopoiesis stimulating factor, TSF), c-Mpl 配体(c-myeloproliferative leukemia ligand, c-Mpl), mpl 配体, megapoietin, 是一种与产生血小板有关的糖蛋白(Wendling, F., et al., *Biotherapy* 10(4):269-77 (1998); Kuter D.I. et al., *The Oncologist*; 1:98-106(1996); Metcalf, *Nature* 369: 519-520 (1994))。

在某些情况下, TPO的活性源自TPO与TPO受体(也称MPL)的结合。TPO受体已经被成功克隆, 也进行了氨基酸序列的测序(Vigon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:5640-5644(1992))。

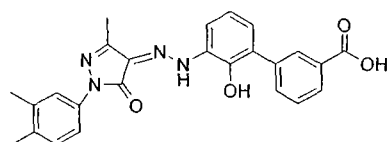
TPO是一种332-氨基酸糖基化多肽, 在调节巨核细胞生成和由骨髓巨核细胞产生血小板的过程中起着关键的作用(Kuter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11104-11108 (1994); Barley et al., *Cell* 77:1117-1124 (1994); Kaushansky et al., *Nature* 369:568-571 (1994); Wendling et al., *Nature* 369: 571-574 (1994); and Sauvage et al., *Nature* 369: 533-538 (1994))。TPO产生于肝脏但主要作用于骨髓, 刺激干细胞分化成为巨核细胞以及巨核细胞的增殖, 多倍体化, 最重要的是进入血小板身体循环分裂。TPO在血小板减少症和大量关于增加血小板数量、大小、增加实验动物同位素参入血小板的研究中是一种主要的调节剂(Metcalf *Nature* 369:519-520 (1994))。TPO被认为主要通过几个途径影响巨核细胞生成: (1)引起巨核细胞大小和数量的增加; (2)增加DNA内含物, 多倍体的形式, 巨核细胞; (3)增加巨核细胞的核内有丝分裂; (4)增加成熟的巨核细胞; (5)增加前体细胞的百分比, 小乙酰胆碱酶一阳性形式的细胞, 骨髓细胞。

血小板是血液凝固必需的, 当它的数量非常低时, 病人就有出血死亡的危险。因此, TPO已经被用于诊断和治疗多种血液疾病, 如主要由血小板缺陷引起的疾病。同时, TPO可以用于治疗血小板减少症, 尤其是为治疗癌症和淋巴瘤而进行的化疗、放疗和骨髓移植。

患者因血小板减少症而导致血小板水平恢复过慢是一个严重的问题, 因此希

望可以找到一种治疗血小板减少症的活性TPO类似物。几年前,多肽类TPO类似物的发展被报导。(WO96/4018, WO96/40750, WO98/25965) 这些多肽被设计结合并活化TPO受体,但是不具备天然TPO的序列同源性。最近几年,一些小分子的活性TPO类似物被报导。包括1,4-苯并二氮杂卓-2-酮类(JP11001477),由希夫碱配体得到的金属络合物(WO 99/11262),环多胺衍生物(WO00/28987),噻唑-2-基-苯酰胺类(WO01/07423, WO01/53267),偶氮-芳基衍生物(WO00/35446, WO1/17349),2-芳基-萘啶类(WO01/39773, WO01/53267)和缩氨基脲衍生物(WO01/34585)。在基于细胞的体系内,所有这些分子都能活化细胞膜上的TPO受体的信号转导途径,一些类型能直接作用于TPO受体本身。据介绍,取代缩氨基脲居然是非常有效的TPO受体激动剂。这一系列中一些最优先的化合物被发现可以刺激TPO-responsive人类细胞系和低于100nM的人类骨髓培养液中的TPO的增殖和分化。

GSK 公司在专利(WO-00189457/ WO-01089457/WO-2006064957)中报道血小板生成素类似物 eltrombopag, 并表现出了相当的活性。



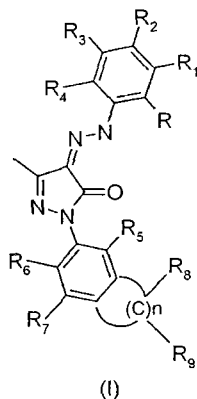
eltrombopag

本发明希望提供作为 TPO 模拟物而可以治疗血小板减少的化合物。

本发明公开了一系列化合物且更有效地用作 TPO 受体激动剂, 是有效的 TPO 模拟物。

发明内容

为了克服现有技术的不足之处, 本发明的目的在于提供一种通式(I)所示的羟基-1-偶氮苯化合物, 以及它们的互变异构体、对映体、非对映体、消旋体和药学上可接受的盐, 以及代谢产物和代谢前体或前药。



其中:

R 选自羟基或羧酸酯;

R₁、R₂、R₃ 和 R₄ 各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、芳基或杂芳

基，其中芳基或杂芳基进一步被一个或多个选自烷基、卤素、羟基、四唑、羧酸或羧酸酯的取代基所取代；

R₅、R₆和R₇各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、羧酸或羧酸酯；

R₈和R₉各自独立地选自氢原子或烷基；

n是2~4。

优选的，

R选自羟基或羧酸酯；

R₁是芳基或杂芳基，其中芳基或杂芳基进一步被一个或多个选自烷基、卤素、羟基、四唑、羧酸或羧酸酯的取代基所取代；

R₂是氢原子；

R₃和R₄各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基或卤素；

R₅、R₆和R₇各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、羧酸或羧酸酯；

R₈和R₉各自独立地选自氢原子或烷基；

n是2~4。

更优选的，

R选自羟基；

R₁是芳基或杂芳基，其中芳基或杂芳基进一步被一个或多个选自烷基、卤素、羟基、四唑、羧酸或羧酸酯的取代基所取代；

R₂是氢原子；

R₃和R₄各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基或卤素；

R₅、R₆和R₇各自独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、羧酸或羧酸酯；

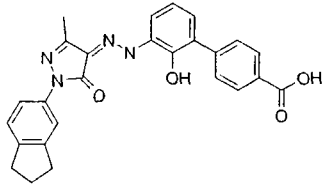
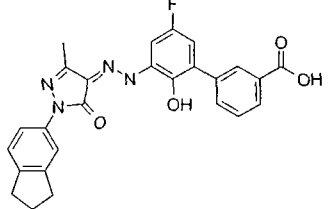
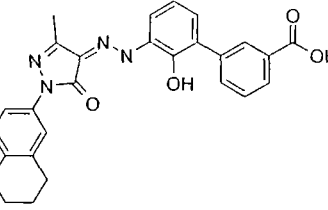
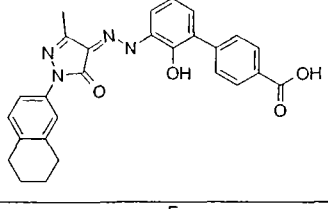
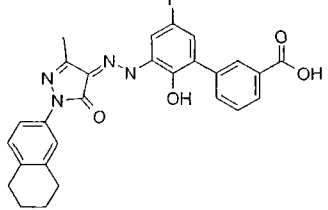
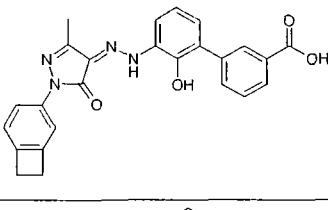
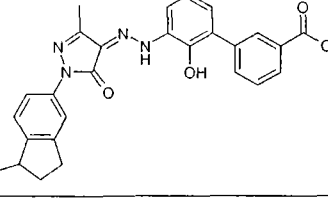
R₈和R₉各自独立地选自氢原子或烷基；

n是2~4。

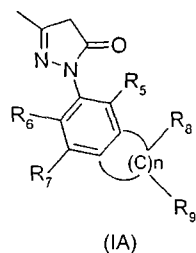
本发明中所述的药学上可接受的盐包括：氨基乙醇盐，胆碱季胺盐等。

本发明的典型化合物包括，但不限于：

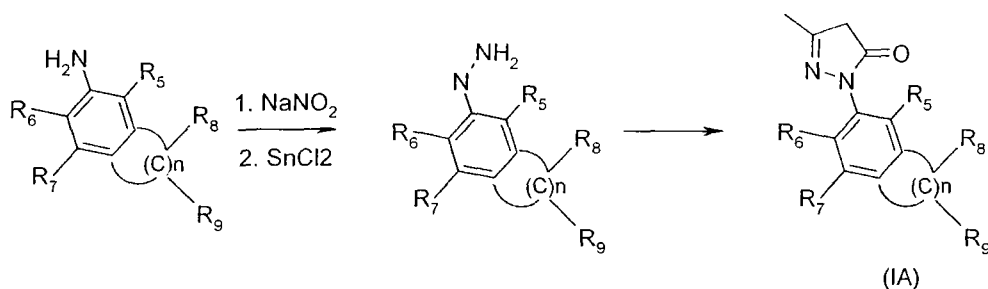
实施例	结构	命名
1		2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-萘满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡啶-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸二乙醇胺盐

2		2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-4-羧酸
3		5'-氟-2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-yl-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸
4		2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-3-羧酸
5		2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-4-羧酸
6		5'-氟-2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-oxo-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-3-羧酸
7		3'-[(2Z)N'-(1-双环[4.2.0]八碳-1(6),2,4-三烯-3-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-2'-羟基-联苯基-3-羧酸
8		2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-1-(1-甲基-茛满-5-基)-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-3-羧酸

进一步, 本发明包括通式(IA)所示的化合物, 其作为通式(I)化合物合成的中间体:

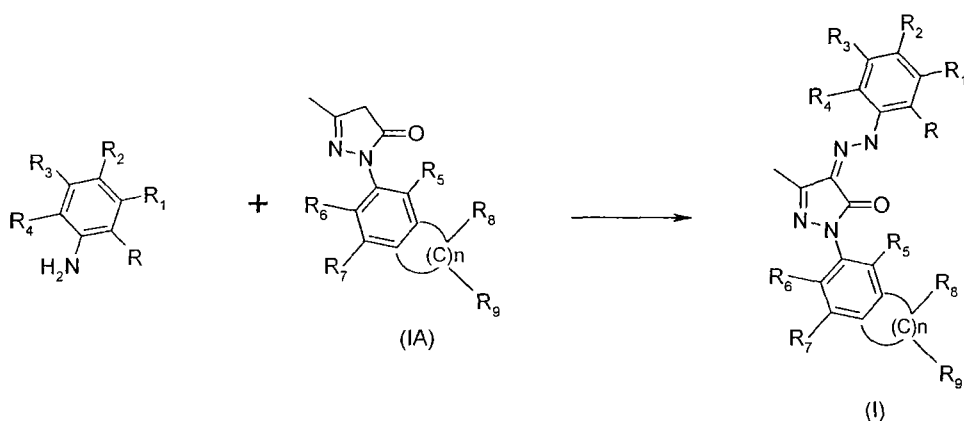


在本发明的另一个方面，是制备中间体(IA)所示化合物的制备方法，包括以下步骤：



取代的氨基苯并多元环在酸性溶液中与硝酸钠反应重氮化，再通过二氯亚锡还原得到肼，肼与亲电的羰基化合物如乙酰乙酸乙酯、在适宜的溶剂中(如乙酸、乙醇等)加热下缩合得到通式(IA)吡唑化合物。

进一步，本发明的另一方面是通式化合物(I)的制备方法，该方法包括：



通过将取代的苯胺类化合物与硝酸钠在适宜的酸(如硝酸、硫酸、盐酸中)重氮化，再与通式(IA)化合物在碱性(如碳酸氢钠、碳酸氢钾)溶液中发生偶联反应得到通式(I)化合物，并且接下来根据需要成盐。

本发明涉及通式(I)化合物在制备 TPO 调节剂中的用途，

本发明涉及制备治疗有需要的哺乳动物，包括人，血小板减少药物中的用途。包括共同服用治疗有效量的选自下列的药物：集落刺激因子、细胞因子、趋化因

子、白细胞介素或细胞因子受体激动剂或拮抗剂、可溶的受体、受体激动剂或拮抗剂抗体或与一个或多个所述药物具有相同的机理而起作用的肽或小分子类。

本发明涉及一种药用组合物、其包括药物有效剂量的通式(I)化合物及其药学上可以接收的盐、水合物、溶剂化合物和酯。进一步含有共同服用的治疗有效量的选自下列的药物：集落刺激因子、细胞因子、趋化因子、白细胞介素或细胞因子受体激动剂。

本发明涉及一种制备含有药用载体或稀释剂和有效量的通式(I)化合物及其药学上可以接收的盐、水合物、溶剂化合物和酯的药物组合物的方法，该方法包括将通式(I)化合物与药用载体和稀释剂相结合。

本发明涉及一种通式(I)化合物作为免疫佐剂的用途。其中免疫佐剂结合和/或免疫调节剂服用。

本发明还涉及一种针对通式(I)化合物的筛选方法，包括：使用细胞处理不同浓度下的权利要求1所示的通式(I)化合物，收集并裂解细胞，定蛋白到相同的量，蛋白变性后，进行SDS-PAGE，转移到硝酸纤维素膜，分别与抗STAT3磷酸化抗体(一抗)，抗兔IgG抗体(二抗)进行杂交，最后用ECL试剂盒检测，X光片曝光，根据相应蛋白条带的大小及密度，评价实施例1化合物对STAT3的激活程度。

发明的详细说明

除非有相反陈述，下列用在说明书和权利要求书中的术语具有下述含义。

“烷基”指饱和的脂族烃基团，包括 1 至 20 个碳原子的直链和支链基团。优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基，例如甲基、乙基、丙基、2-丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基等。更优选的是含有 1 至 4 个碳原子的低级烷基，例如甲基、乙基、丙基、2-丙基、正丁基、异丁基或叔丁基等。烷基可以是取代的或未取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个，独立地选自烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、芳基、杂芳基、羧酸或羧酸酯。

“芳基”指具有至少一个芳环结构的基团，即具有共轭的 π 电子体系的芳环，包括碳环芳基、杂芳基和联芳基。基团可以是取代的或未取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个，独立地选自烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、芳基、杂芳基、羧酸或羧酸酯。

“杂芳基”指具有 1 至 3 个杂原子作为环原子，其余的环原子为碳的芳基，杂原子包括氧、硫和氮。所述环可以是 5 元或 6 元环。杂环芳基基团的实例包括呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯、N-烷基吡咯基、咪唑基、吡嗪基、咪唑基等。杂芳基可以是取代的或未取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个，独立地选自烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、芳基、杂芳基、羧酸或羧酸酯。

“羟基”指-OH 基团。

“烷氧基”指-O-（烷基）和-O-（未取代的环烷基）。代表性实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基等。烷氧基可以是取代的或未取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个，独立地选自烷基、烷氧基、卤素、羟基、氨基、硝基、氰基、芳基、杂芳基、羧酸或羧酸酯。

“卤素”指氟、氯、溴或碘。

“氨基”指-NH₂。

“氰基”指-CN。

“硝基”指-NO₂。

“羧酸”指（烷基）C(=O)OH。

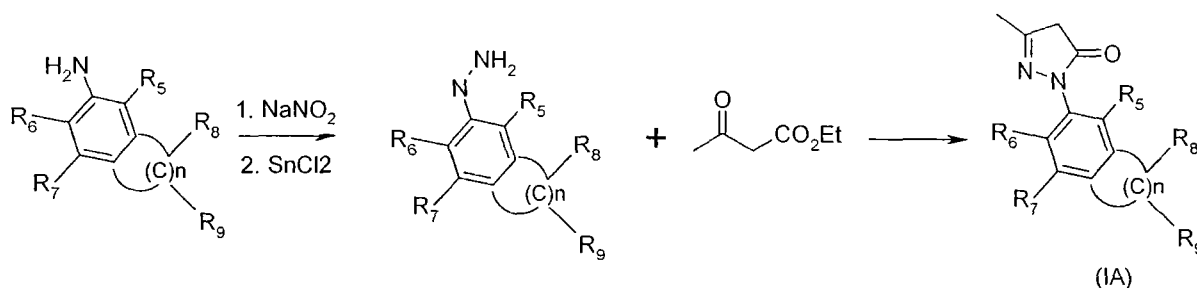
“羧酸酯”指（烷基）C(=O)O（烷基）。

“药物组合物”表示一种或多种本文所述化合物或其生理学上/药学上可接受的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，其他组分例如生理学/药学上可接受的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进化合物对生物体的给药。

本发明化合物的合成方法

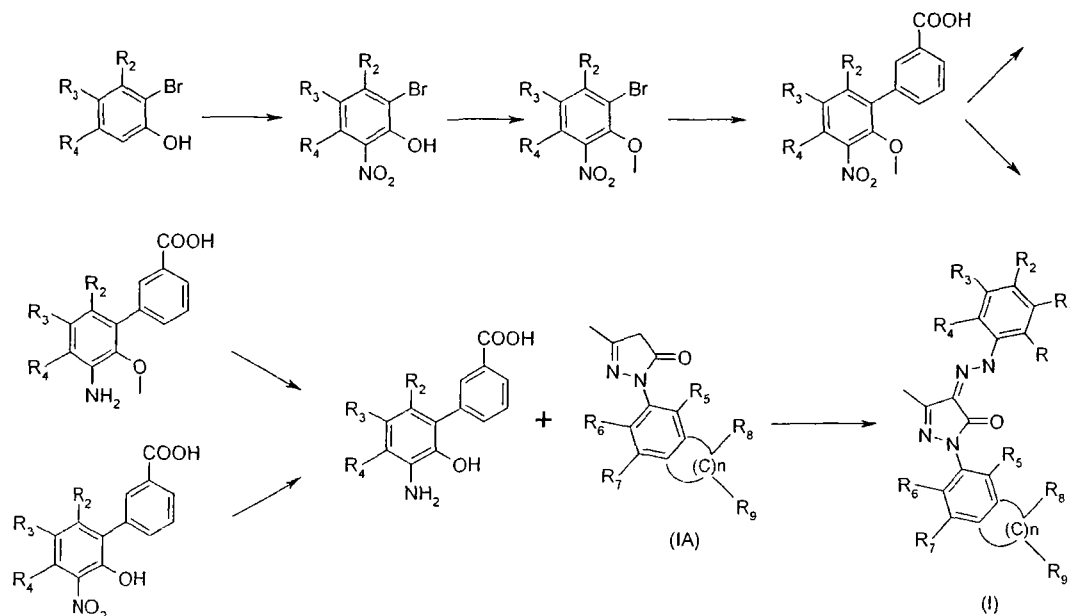
为了完成本发明的目的，本发明采用如下技术方案：

流程图 I



取代的氨基苯并多环在酸性溶液中与硝酸钠反应重氮化，再通过二氯亚锡还原得到肼，肼与亲电的羰基化合物如乙酰乙酸乙酯、在适宜的溶剂中(如乙酸、乙醇等)加热下缩合得到通式(IA)吡啶化合物。

流程图 II



取代的邻溴苯酚经硝酸钠硝化得到硝基苯酚，硝基苯酚在适宜的温度下与卤代甲烷发生烷基化反应得到羟基被保护的硝基苯酚，羟基被保护的硝基苯酚与取代的芳基硼酸在四(三苯基膦)钯催化下发生 Suzuki 偶联，得到取代的芳基化合物。取代的芳基化合物在氢气氛下，钯/碳还原得到芳基苯胺，芳基苯胺在溴化氢中去掉烷基得到去保护的苯胺。或者，取代的芳基化合物在溴化氢中去掉烷基得到去保护的硝基化合物，硝基化合物在氢气氛下，钯/碳还原得到去保护的芳基苯胺。

将取代的苯胺类化合物通过与硝酸钠在适宜的酸(如硝酸、硫酸、盐酸)中重氮化，再与通式(IA)化合物在碱性(如碳酸氢钠、碳酸氢钾)溶液中发生偶联反应得到通式(I)化合物。

本发明另一方面涉及针对本发明通式(I)化合物的筛选方法，包括：

使用细胞处理不同浓度下的通式(I)化合物，

收集并裂解细胞，定蛋白到相同的量，

蛋白变性后，进行SDS-PAGE，转移到硝酸纤维素膜，分别与抗STAT3磷酸化抗体(一抗)，抗兔IgG抗体(二抗)进行杂交，

最后用ECL试剂盒检测，X光片曝光，

根据相应蛋白条带的大小及密度，评价通式(I)化合物对STAT3的激活程度。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本发明，但这些实施例并非限制着本发明的范围。

实施例

化合物的结构是通过核磁共振(^1H NMR)或质谱(MS)来确定的。 ^1H NMR 位移(δ)

以百万分之一(ppm)的单位给出。¹HNMR 的测定是用 Bruker AVANCE-400 核磁仪, 测定溶剂为氘代甲醇(CD₃OD)、氘代氯仿(CDCl₃), 六氘代二甲基亚砜(DMSO-d₆) 内标为四甲基硅烷(TMS), 化学位移是以 10⁻⁶(ppm)作为单位给出;

MS 的测定用 FINNIGAN LCQAd (ESI)质谱仪(生产商: Therm, 型号: Finnigan LCQ advantage MAX;

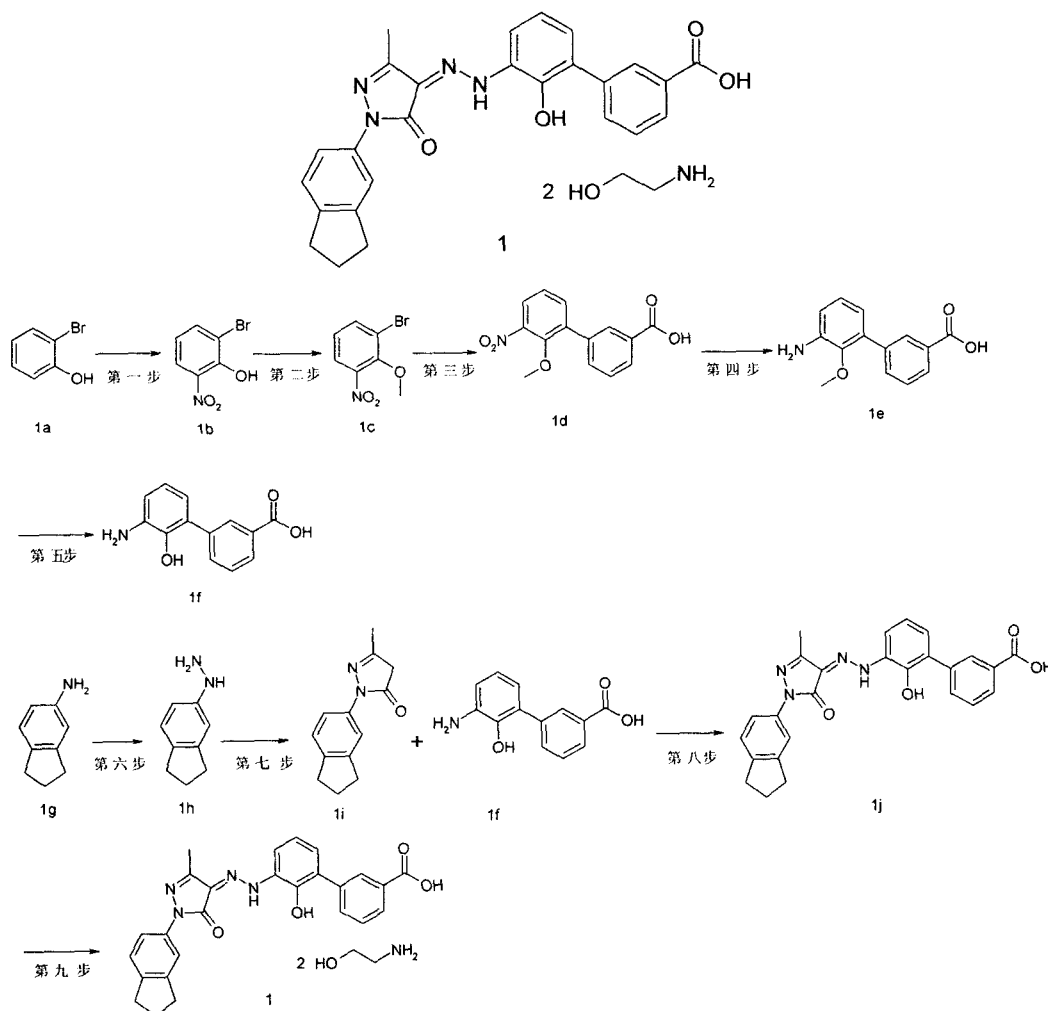
IC₅₀ 值的测定用 NovoStar 酶标仪(德国 BMG 公司);

薄层硅胶使用烟台黄海 HSGF254 或青岛 GF254 硅胶板;

柱层析一般使用烟台黄海硅胶 200~300 目硅胶为载体。

实施例 1

2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茚满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸二乙醇胺盐



第一步

2-溴-6-硝基-苯酚

将 60mL 浓硫酸稀释到 186mL 水中, 冷却至室温后加入硝酸钠(79.2 g, 0.932 mol), 保持 25℃ 以下, 滴加邻溴苯酚 **1a**(60 mL, 0.516 mol), 室温反应 2 小时。点

板跟踪至原料消失，加入 320mL 乙酸乙酯溶解析出的固体，分别用水和饱和氯化钠溶液洗涤，用无水硫酸镁干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法纯化所得残余物，得到标题产物 2-溴-6-硝基-苯酚 **1b**(48.2 g)。产率：42.8%。

MS m/z (ESI): 218[M+1]。

¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ6.88-7.02(m, 1H), 7.89-7.91(d, J=8Hz, 1H), 8.12-8.15(m, 1H), 11.18(s, 1H)。

第二步

1-溴-2-甲氧基-3-硝基-苯

将 2-溴-6-硝基-苯酚 **1b**(46.55 g, 0.214 mol)溶解于 500mL 丙酮中，加入碳酸钾(35.36 g, 0.256 mol)和碘甲烷(20.1 mL, 0.32 mol)，70℃加热回流 40 小时。点板跟踪至原料消失，减压浓缩，加入 1300mL 乙酸乙酯和 500mL 水，水相用乙酸乙酯萃取(300 mL×2)，合并有机相，分别用 4N 盐酸和饱和碳酸氢钠溶液洗涤，用无水硫酸镁干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法纯化所得残余物，得到标题产物 1-溴-2-甲氧基-3-硝基-苯 **1c**(44.59 g)。产率：90.0%。

MS m/z (ESI): 234[M+1]。

第三步

2'-甲氧基-3'-硝基-联苯基-3-羧酸

氮气氛下将 1-溴-2-甲氧基-3-硝基-苯 **1c** (23.25 g, 0.10 mol)、3-羧基苯基硼酸(19.5 g, 0.117 mol)和四(三苯基膦)钯(8.86 g, 7.7 mol)溶解于 100mL 2N 碳酸钠溶液和 500mL 1,4-二氧六环的混和溶剂中，105℃加热回流 43 小时。点板跟踪至原料消失，减压浓缩，加入 300mL 6N 盐酸溶液和 400mL 乙酸乙酯，水相用乙酸乙酯萃取(200 mL×2)，合并有机相，用无水硫酸镁干燥，过滤，滤液减压浓缩，得到标题产物 2'-甲氧基-3'-硝基-联苯基-3-羧酸 **1d**(53.93 g)。

MS m/z (ESI): 272[M-1]。

¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ3.44-3.46(d, J=8Hz, 3H), 7.42-7.46(m, 1H), 7.63-7.67(m, 1H), 7.21-7.75(m, 1H), 7.82-7.84(m, 1H), 7.90-7.92(m, 1H), 8.01-8.03(d, J=8Hz, 1H), 8.11(s, 1H)。

第四步

2'-甲氧基-3'-氨基-联苯基-3-羧酸

氮气氛下将 2'-甲氧基-3'-硝基-联苯基-3-羧酸 **1d** (0.48 g, 1.74 mmol)溶解于 60mL 乙醇中，加入 0.5g 钯-碳和甲酸铵(1.1 g, 17.4 mmol)，80℃加热回流 20 分钟。点板跟踪至原料消失，过滤，滤液减压浓缩，干燥，得到标题产物 2'-甲氧基-3'-氨基-联苯基-3-羧酸 **1e**(0.42 g)。产率：93.3%。

MS m/z (ESI): 242[M-1]。

第五步

2'-羟基-3'-氨基-联苯基-3-羧酸

将 2'-甲氧基-3'-氨基-联苯基-3-羧酸 **1e** (2.5 g, 10.3 mmol) 溶解于 100mL 溴化氢水溶液(40%)中, 120°C 加热回流过夜。点板跟踪至原料消失, 减压浓缩, 用硅胶柱色谱法纯化所得残余物, 得到标题产物 2'-羟基-3'-氨基-联苯基-3-羧酸 **1f**(2.4 g), 产率: 88.8%。

MS m/z (ESI): 230[M+1]。

[注: 参考文献: WO0189457]

第六步

5-胍基-茛满

冰浴下将 5-氨基-茛满 **1g** (3.59 g, 27.0 mmol) 溶解于 20mL 浓盐酸中, 搅拌 10 分钟。滴加入亚硝酸钠(1.86 g, 27.0 mmol)的 10mL 水溶液, 冰浴下继续搅拌 15 分钟备用。

冰盐浴下将二水合二氯化锡(24.4 g, 108.0 mmol)溶解于 10mL 浓盐酸中, 将备用中间体溶液加入其中, 升至室温反应 1.5 小时。冰浴下用 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 9, 加入 400mL 乙酸乙酯萃取, 减压浓缩, 干燥, 得到标题产物 5-胍基-茛满 **1h**(2.05 g)。产率: 51.3%。

MS m/z (ESI): 149[M+1]。

第七步

2-茛满-5-基-5-甲基-2,4-二氢-吡唑-3-酮

将 5-胍基-茛满 **1h** (2.05 g, 13.8 mmol) 溶解于 50mL 乙酸中, 加入乙酰乙酸乙酯 (1.76 mL, 13.8 mmol), 加热至 100°C 过夜。点板跟踪至原料消失, 减压浓缩, 用硅胶柱色谱法纯化所得残余物, 得到标题产物 2-茛满-5-基-5-甲基-2,4-二氢-吡唑-3-酮 **1i**(1.84 g)。产率: 62.3%。

MS m/z (ESI): 215[M+1]。

¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ7.69(s, 1H), 7.60(d, J=8.0Hz, 1H), 7.24(d, J=8Hz, 1H), 3.44(s, 2H), 2.90-2.97(m, 4H), 3.21(s, 3H), 2.07-2.14(m, 2H)。

第八步

2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸

冰浴下将 3'-氨基-2'-羟基-联苯基-3-羧酸 **1f** (267 mg, 1.16 mmol) 溶解于 10mL 盐酸(1N)中, 滴加入亚硝酸钠(88 mg, 1.28 mmol)的 10mL 水溶液, 再加入 2-茛满-5-基-5-甲基-2,4-二氢-吡唑-3-酮 **1i**(249 mg, 1.16 mmol), 用饱和碳酸氢钠溶液将反应液 pH 调至 8, 加入 10mL 乙醇, 升至室温过夜。点板跟踪至原料消失, 过滤, 干

燥,用甲醇重结晶,得到标题产物 2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸 **1j**(60 mg)。产率: 11.4%。

MS m/z (ESI): 453[M-1]

^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6): δ 2.03-2.10(m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.86-2.93(m, 4H), 7.13-7.17(m, 2H), 7.28-7.30(d, J = 8.1Hz, 1H), 7.60-7.82(m, 5H), 7.96-7.98 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 13.03 (s, 1H), 13.76 (s, 1H)。

第九步

2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸二乙醇胺盐

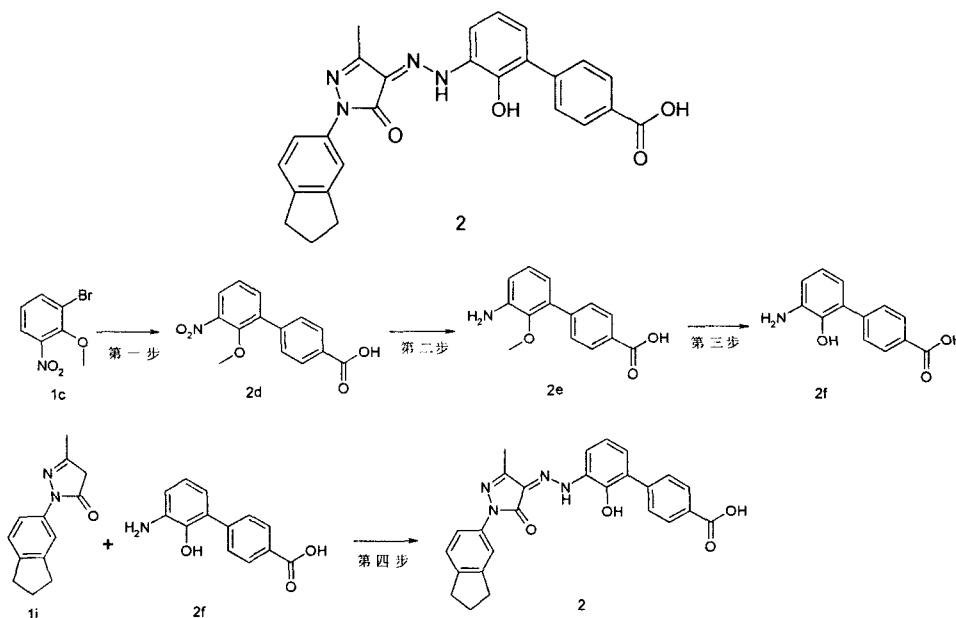
30°C将 2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸 **1j** (454 mg, 1.0 mmol)溶解于 16mL 四氢呋喃中, 缓慢加入 2mL 水使温度不低於 28°C, 过滤, 滤液冷却至室温。

氮气氛下将乙醇胺(143 mg, 2.35 mmol)溶解于 26mL 四氢呋喃中, 室温搅拌 3 小时。过滤, 干燥, 得到标题产物 2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸二乙醇胺盐 **1**(553 mg)。产率: 96.0%。

MS m/z (ESI): 453[M-1]。

实施例 2

2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-4-羧酸



第一步

2'-甲氧基-3'-硝基-联苯基-4-羧酸

氮气氛下将 1-溴-2-甲氧基-3-硝基-苯 **1c** (23.3 g, 0.10 mol)、4-羧基苯基硼酸

(19.5 g, 0.117 mol)和四(三苯基膦)钯(8.86 g, 7.7 mol)溶解于 100mL 碳酸钠溶液(2N)和 500mL 1,4-二氧六环的混和溶剂中, 105℃加热回流 43 小时。点板跟踪至原料消失, 减压浓缩, 加入 300mL 盐酸溶液(6N)和 400mL 乙酸乙酯, 水相用乙酸乙酯萃取(200 mL×2), 合并有机相, 用无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 2'-甲氧基-3'-硝基-联苯基-4-羧酸 **2d**(50.1 g)。

MS m/z (ESI): 272[M-1]。

第二步

2'-甲氧基-3'-氨基-联苯基-4-羧酸

氮气氛下将 2'-甲氧基-3'-硝基-联苯基-4-羧酸 **2d** (0.48 g, 1.75 mmol)溶解于 60mL 乙醇中, 加入 0.5g 钯-碳和甲酸铵(1.1 g, 17.5 mmol), 80℃加热回流 20 分钟。点板跟踪至原料消失, 过滤, 减压浓缩, 干燥, 得到标题产物 2'-甲氧基-3'-氨基-联苯基-3-羧酸 **2e**(0.40 g)。产率: 94.0%。

MS m/z (ESI): 242[M-1]。

第三步

3'-氨基-2'-羟基-联苯基-4-羧酸

将 2'-甲氧基-3'-氨基-联苯基-3-羧酸 **2e** (4.0 g, 16.4 mmol)溶解于 100mL 氢溴酸溶液(48%)中, 120℃加热回流 24 小时。点板跟踪至原料消失, 减压浓缩, 用硅胶柱色谱法纯化所得残余物, 得到标题产物 3'-氨基-2'-羟基-联苯基-4-羧酸 **2f**(3.50 g)。产率: 92.1%。

MS m/z (ESI): 228[M-1]。

第四步

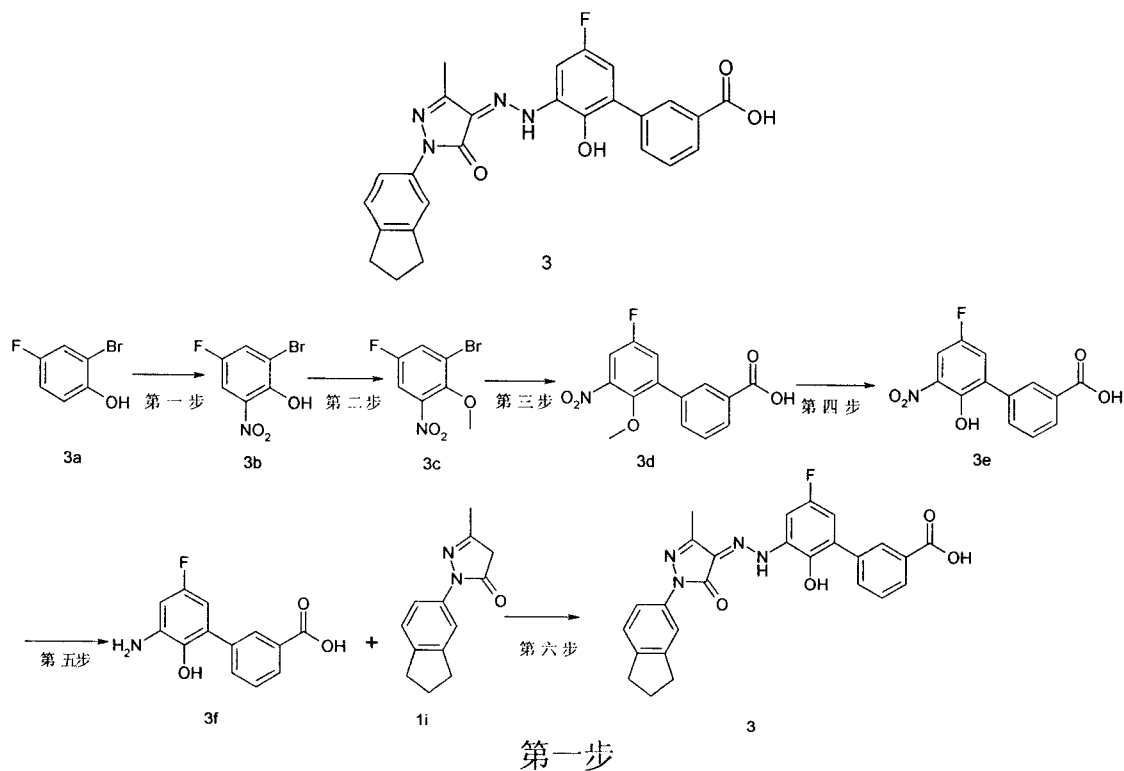
2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-4-羧酸

冰浴下将 3'-氨基-2'-羟基-联苯基-4-羧酸 **2f** (275 mg, 1.20 mmol)溶解于 10mL 盐酸(1N)中, 滴加入亚硝酸钠(91 mg, 1.32 mmol)的 10mL 水溶液, 再加入 2-茛满-5-基-5-甲基-2,4-二氢-吡唑-3-酮 **1i**(257 mg, 1.20 mmol), 用饱和碳酸氢钠溶液将反应液 pH 调至 8, 加入 10mL 乙醇, 升至室温过夜。点板跟踪至原料消失, 过滤, 干燥, 用甲醇重结晶, 得到标题产物 2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-4-羧酸 **2**(83 mg)。产率: 15.2%。

MS m/z (ESI): 453[M-1]。

实施例 3

5'-氟-2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-yl-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸



冰盐浴下将 2-溴-4-氟-苯酚 **3a** (8.0 g, 41.9 mmol) 溶解于 10mL 硫酸溶液(50%) 中, 滴加入硝酸钠(7.1 g, 83.5 mmol)的 24mL 的硫酸溶液(25%), 室温反应 1.5 小时。点板跟踪至原料消失, 加入 50mL 水, 用乙酸乙酯萃取(50 mL×2), 合并有机相, 乙酸乙酯层分别用水和饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 用无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 2-溴-4-氟-6-硝基-苯酚 **3b** (8.0 g), 直接用于下一步反应, 产率: 80.8%。

第二步

1-溴-5-氟-2-甲氧基-3-硝基-苯

将 2-溴-4-氟-6-硝基-苯酚 **3b** (24.7 g, 104.7 mmol) 和碳酸钾(17.34 g, 125.6 mmol) 溶解于 300mL 丙酮中, 快速加入碘甲烷(9.8 mL, 157.1 mmol), 80°C 加热回流 22 小时。点板跟踪至原料消失, 减压浓缩, 加入 200mL 乙酸乙酯和 200mL 水, 水相用乙酸乙酯萃取(100 mL×2), 合并有机相, 分别用 4N 盐酸和饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 用无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 用硅胶柱色谱法纯化所得残余物, 得到标题产物 1-溴-5-氟-2-甲氧基-3-硝基-苯 **3c** (16.18 g)。产率: 61.8%。

MS m/z (ESI): 252[M+1]。

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.99(s, 3H), 7.81 (d, J = 8.0Hz, 1H), 7.28 (q, J = 8.0Hz, 4.0Hz, 1H), 7.89 (q, J = 8.0Hz, 4.0Hz, 1H)。

第三步

5'-氟-2'-甲氧基-3'-硝基-联苯基-3-羧酸

氮气氛围下将 1-溴-5-氟-2-甲氧基-3-硝基-苯 **3c** (16.18 g, 64.7 mmol)、3-羧基苯基硼酸(13.88 g, 77.7 mmol)和四(三苯基膦)钯(3.73 g, 3.2 mmol)溶解于 65mL 碳酸钠溶液(2N)和 300mL 1,4-二氧六环的混和溶剂中, 120℃加热回流 24 小时。点板跟踪至原料消失, 减压浓缩, 加入 150mL 盐酸溶液(6N)和 200mL 乙酸乙酯, 水相用乙酸乙酯萃取(100 mL×2), 合并有机相, 用无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 5'-氟-2'-甲氧基-3'-硝基-联苯基-3-羧酸 **3d**(7.86 g)。产率: 41.7%。

MS m/z (ESI): 290[M-1]。

第四步

3'-硝基-5'-氟-2'-羟基-联苯基-3-羧酸

氮气氛围下将 5'-氟-2'-甲氧基-3'-硝基-联苯基-3-羧酸 **3d** (2.91 g, 10.0 mmol) 溶解于 10mL 溴化氢水溶液(40%)中, 120℃加热回流过夜。点板跟踪至原料消失, 减压浓缩, 用硅胶柱色谱法纯化所得残余物, 得到标题产物 3'-硝基-5'-氟-2'-羟基-联苯基-3-羧酸 **3e**(2.38 g), 直接用于下一步反应。产率: 85.7%。

MS m/z (ESI): 277[M-1]。

第五步

3'-氨基-5'-氟-2'-羟基-联苯基-3-羧酸

将 3'-硝基-5'-氟-2'-羟基-联苯基-3-羧酸 **3e** (417 mg, 1.5 mmol) 溶解于 60mL 乙醇中, 加入 0.5g 钯-碳和甲酸铵(0.95 g, 1.5 mmol), 80℃加热回流 20 分钟。点板跟踪至原料消失, 过滤, 减压浓缩, 干燥, 得到标题产物 3'-氨基-5'-氟-2'-羟基-联苯基-3-羧酸 **3f**(339 mg)。产率: 91.5%。

MS m/z (ESI): 246[M-1]。

第六步

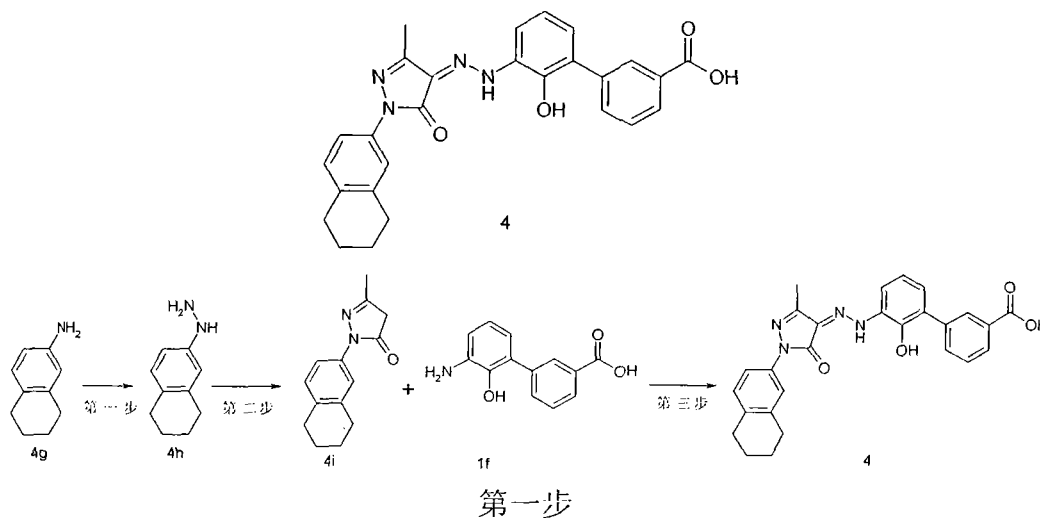
5'-氟-2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-yl-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸

冰浴下将 3'-氨基-5'-氟-2'-羟基-联苯基-3-羧酸 **3f** (296 mg, 1.20 mmol)溶解于 10mL 盐酸(1N)中, 滴加入亚硝酸钠(91 mg, 1.32 mmol)的 10mL 水溶液, 再加入 2-茛满-5-基-5-甲基-2,4-二氢-吡唑-3-酮 **1i** (257 mg, 1.20 mmol), 用饱和碳酸氢钠溶液将反应液 pH 调至 8, 加入 10mL 乙醇, 升至室温过夜。点板跟踪至原料消失, 过滤, 干燥, 用甲醇重结晶, 得到标题产物 5'-氟-2'-羟基-3'-[(2Z)N'-(1-茛满-5-yl-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-联苯基-3-羧酸 **3**(87 mg)。产率: 14.1%。

MS m/z (ESI): 471[M-1]。

实施例 4

2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-
胍基}-联苯基-3-羧酸



2-胍基-5,6,7,8-四氢-萘

冰浴下将2-氨基-5,6,7,8-四氢-萘 **4g** (3.68 g, 25.0 mmol)溶解于20mL 浓盐酸中，搅拌 10 分钟。滴加入亚硝酸钠(1.72 g, 25.0 mmol)的 10mL 水溶液，冰浴下继续搅拌 15 分钟备用。

冰盐浴下将二水合二氯化锡(22.6 g, 100 mmol)溶解于 10mL 浓盐酸中，将备用中间体溶液加入其中，升至室温反应 1.5 小时。冰浴下用 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 9，加入 400mL 乙酸乙酯萃取，减压浓缩，干燥，得到标题产物 2-胍基-5,6,7,8-四氢-萘 **4h**(2.19 g)。产率：53.7%。

MS m/z (ESI): 163[M+1]。

第二步

5-甲基-2-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-2,4-二氢-吡唑-3-酮

将 2-胍基-5,6,7,8-四氢-萘 **4h** (2.0 g, 12.3 mmol)溶解于 50mL 乙酸中，再加入乙酰乙酸乙酯(1.57 mL, 12.3 mmol)，加热至 100℃过夜。点板跟踪至原料消失，减压浓缩，用硅胶柱色谱法纯化所得残余物，得到标题产物 5-甲基-2-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-2,4-二氢-吡唑-3-酮 **4i**(1.58 g)。产率：56.2%。

MS m/z (ESI): 457[2M+1]。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7.54-7.58(m, 2H), δ 7.08-7.10(d, $J=8\text{Hz}$, 1H), δ 3.43(s, 2H), δ 2.77-2.81(m, 4H), δ 2.21(s, 3H), δ 1.80-1.83(m, 4H)。

第三步

2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-
胍基}-联苯基-3-羧酸

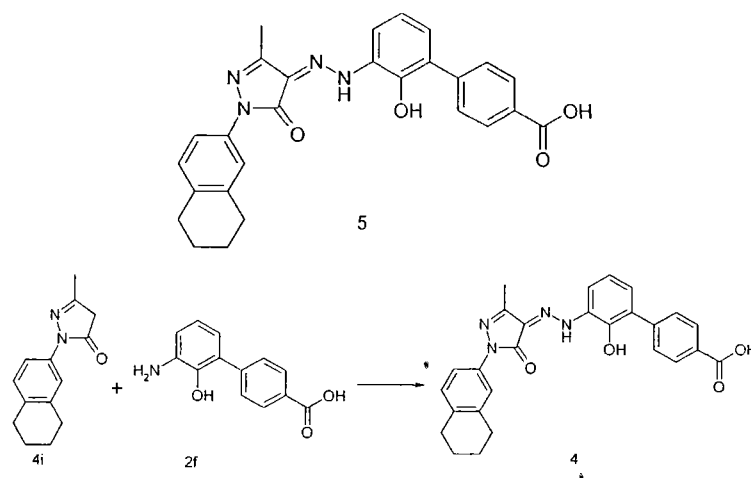
冰浴下将 3'-氨基-2'-羟基-联苯基-3-羧酸 **1f** (250 mg, 1.09 mmol)溶解于 10mL 盐酸(1N)中，滴加入亚硝酸钠(82 mg, 1.2 mmol)的 10mL 水溶液，再加入 5-甲基

-2-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-2,4-二氢-吡唑-3-酮 **4i** (249 mg, 1.09 mmol), 用饱和碳酸氢钠溶液将反应液 pH 调至 8, 加入 10mL 乙醇, 升至室温过夜。点板跟踪至原料消失, 过滤, 干燥, 用甲醇重结晶, 得到标题产物 2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-3-羧酸 **4** (59 mg)。产率: 11.6%。

MS m/z (ESI): 467[M-1]。

实施例 5

2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-4-羧酸



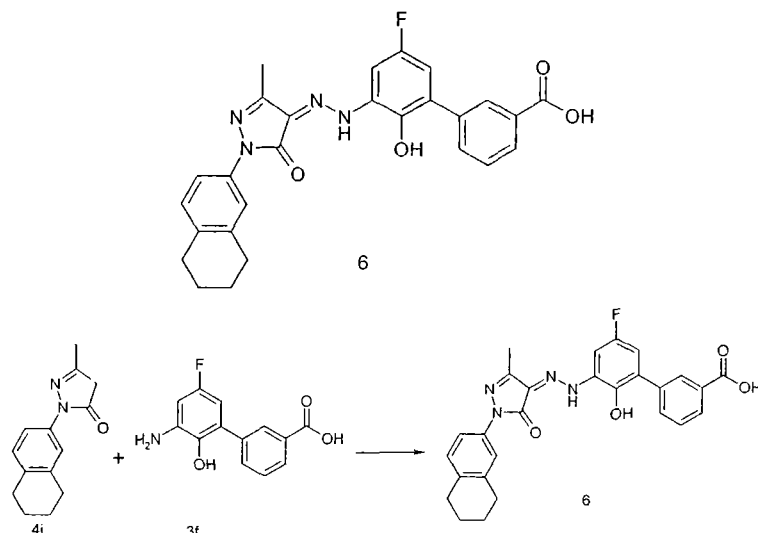
2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-4-羧酸

冰浴下将 3'-氨基-2'-羟基-联苯基-4-羧酸 **2f** (250 mg, 1.09 mmol) 溶解于 10mL 盐酸(1N)中, 滴加入亚硝酸钠(82 mg, 1.2 mmol)的 10mL 水溶液, 再加入 5-甲基-2-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-2,4-二氢-吡唑-3-酮 **4i** (249 mg, 1.09 mmol), 用饱和碳酸氢钠溶液将反应液 pH 调至 8, 加入 10mL 乙醇, 升至室温过夜。点板跟踪至原料消失, 过滤, 干燥, 用甲醇重结晶, 得到标题产物 2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-4-羧酸 **5** (63 mg)。产率: 12.4%。

MS m/z (ESI): 467[M-1]。

实施例 6

5'-氟-2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-oxo-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-3-羧酸



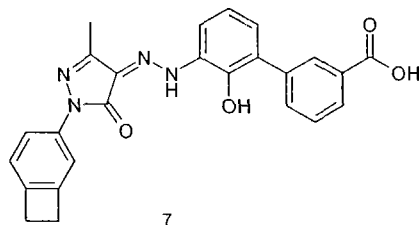
2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡啶-4-亚基]-
胍基}-联苯基-4-羧酸

冰浴下将 3'-氨基-5'-氟-2'-羟基-联苯基-3-羧酸 **3f** (250 mg, 1.01 mmol) 溶解于 10mL 盐酸(1N)中, 滴加入亚硝酸钠(77 mg, 1.12 mmol)的 10mL 水溶液, 再加入 5-甲基-2-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-2,4-二氢-吡啶-3-酮 **4i** (230 mg, 1.01 mmol), 用饱和碳酸氢钠溶液将反应液 pH 调至 8, 加入 10mL 乙醇, 升至室温过夜。点板跟踪至原料消失, 过滤, 干燥, 用甲醇重结晶, 得到标题产物 2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-5-羰基-1-(5,6,7,8-四氢-萘-2-基)-1,5-二氢-吡啶-4-亚基]-胍基}-联苯基-4-羧酸 **6** (64 mg)。产率: 13.1%。

MS m/z (ESI): 485[M-1]。

实施例 7

3'-[(2Z)N'-[1-双环[4.2.0]八碳-1(6),2,4-三烯-3-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡啶-4-亚基]-胍基]-2'-羟基-联苯基-3-羧酸



将原料双环[4.2.0]八碳-1(6),2,4-三烯(根据文献 Synthesis., 1970, 2(2), 82-3 制备而成)硝化后氢化还原得到 3-氨基-双环[4.2.0]八碳-1(6),2,4-三烯, 按照实施例 1 中第六步至第七步相同的方法得到化合物 2-双环[4.2.0]八碳-1(6),2,4-三烯-3-基-5-甲基-2,4-二氢-吡啶-3-酮。

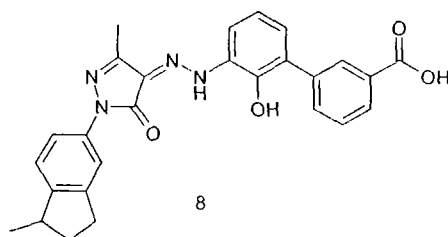
使用实施例 1 中第五步中所得到的化合物 2'-羟基-3'-氨基-联苯基-3-羧酸 **1f** 作原料, 按照本发明实施例 1 第八步所述相同方式进行该原料与 2-双环[4.2.0]八碳

-1(6),2,4-三烯-3-基-5-甲基-2,4-二氢-吡唑-3-酮的反应,则得到标题产物 3'-[(2Z)N'-(1-双环[4.2.0]八碳-1(6),2,4-三烯-3-基-3-甲基-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基)-胍基]-2'-羟基-联苯基-3-羧酸 7。

MS m/z (ESI): 439.5[M-1]。

实施例 8

2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-1-(1-甲基-茛满-5-基)-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-3-羧酸



将原料 1-甲基-茛满(根据文献 JOC., 1984, 49(22), 4226-37 制备而成)硝化后氢化还原得到 1-甲基-5-氨基-茛满,按照实施例 1 中第六步至第七步相同的方法得到化合物 5-甲基-2-(1-甲基-茛满-5-基)-2,4-二氢-吡唑-3-酮。

使用上述第五步中所得到的化合物 2'-羟基-3'-氨基-联苯基-3-羧酸 1f 作原料,按照本发明实施例 1 第八步所述相同方式进行该原料与 5-甲基-2-(1-甲基-茛满-5-基)-2,4-二氢-吡唑-3-酮的反应,则得到标题产物 2'-羟基-3'-{(2Z)N'-[3-甲基-1-(1-甲基-茛满-5-基)-5-羰基-1,5-二氢-吡唑-4-亚基]-胍基}-联苯基-3-羧酸 8。

MS m/z (ESI): 467.5[M-1]。

测试例:

生物学评价

实施例 9

TPO 系列化合物对 32D-Mpl 细胞中 STAT3 的激活作用

1. 摘要

观察TPO系列化合物(实施例1)对体外培养的已转染TPO受体Mpl的32D-Mpl小鼠前淋巴B细胞中STAT3的激活作用。实验用0.01 μM, 0.03μM, 0.1 μM, 0.3μM, 1 μM的实施例1化合物以及TPO-EoA处理细胞后,用Western blot 方法评价并比较各个化合物的作用大小。实验发现实施例1的活性与TPO-EoA相当。

2. 试验目的:

评价 TPO 系列化合物实施例 1 对 32D-Mpl 细胞中 STAT3 的激活作用大小。

3. 试验试剂、药物及仪器:

RPMI-1640购自Gibco BRL公司;胎牛血清购自Hyclone公司;抗STAT3磷酸化抗体购自Cell signaling公司;抗兔IgG二抗,硝酸纤维素膜,以及ECL检测试剂盒

购自Amershan公司；其他试剂购自Sigma公司

4. 试验方法:

32D-Mpl细胞用0.01 μM , 0.03 μM , 0.1 μM , 0.3 μM , 1 μM 的各个化合物处理, 然后, 收集并裂解细胞, 定蛋白到相同的量。蛋白变性后, 进行SDS-PAGE, 转移到硝酸纤维素膜, 分别与抗STAT3磷酸化抗体(一抗), 抗兔IgG抗体(二抗)杂交, 最后用ECL试剂盒检测, X光片曝光。根据相应蛋白条带的大小及密度, 评价实施例1化合物对STAT3的激活程度。

5. 结果:

化合物 TPO 活性 EC50 值

序号	实施例	EC50 值(uM)
1	TPO-EOA	0.11
2	实施例 1	0.032