

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2007年11月8日 (08.11.2007)

PCT

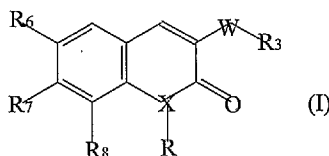
(10) 国际公布号
WO 2007/124617 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07D 311/08 (2006.01) A61K 31/4439 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C07D 401/06 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
C07D 405/06 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
C07D 215/20 (2006.01) A61P 13/08 (2006.01)
A61K 31/37 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2006/000839
(22) 国际申请日: 2006年4月28日 (28.04.2006)
(25) 申请语言: 中文
(26) 公布语言: 中文
(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国医学科学院药物研究所 (INSTITUTE OF MATARIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。
- (72) 发明人; 及
(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 谢平(XIE, Ping) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。陈晓光(CHEN, Xiaoguang) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。徐世平(XU, Shiping) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。李洪艳(LI, Hongyan) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。李兰敏(LI, Lanmin) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。周艳丽(ZHOU, Yanli) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。刘悦(LIU, Yue) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。罗志刚(LUO, Zhigang) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。焦晓臻(JIAO, Xiaozhen) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。郑旭光(ZHENG, Xuguang) [CN/CN]; 中国北京市宣

[见续页]

(54) Title: COUMARIN DERIVATIVES, THEIR PREPARATION METHODS AND THEIR PHARMACEUTIC COMPOSITIONS AND USES

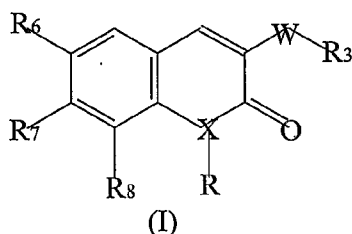
(54) 发明名称: 香豆素衍生物及其制法和其药物组合物与用途



(57) Abstract: The present application has disclosed some new structure coumarin derivatives, dihydro-quinolinone derivatives, their pharmaceutic salts, their preparation methods, as well as pharmaceutic compositions containing these compounds. The present application has also disclosed the uses of the present compounds in preparation of medicaments to treat chronic renal failure, diabetes, hypertension, cerebrovascular or cardiovascular diseases, liver cirrhosis or hypertrophy of the prostate.

(57) 摘要:

本发明公开了新结构类型的香豆素及二氢喹啉酮衍生物及其药用盐、这类化合物的制备方法、含有这类化合物的药物组合物,特别是用于制备治疗慢性肾衰、糖尿病、高血压和心脑血管疾患以及肝硬化和前列腺肥大药物中的应用。



WO 2007/124617 A1



武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。张福荣 (ZHANG, Furong) [CN/CN]; 中国北京市宣武区先农坛街1号, Beijing 100050 (CN)。

(74) 代理人: 北京三高永信知识产权代理有限公司 (BEIJING SAN GAO YONG XIN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD); 中国北京市海淀区学院路蓟门里和景园A-1-102, Beijing 100088 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

香豆素衍生物及其制法和其药物组合物与用途

技术领域

本发明公开了新结构类型的香豆素及二氢喹啉酮衍生物及其药用盐、这类化合物的制备方法、含有这类化合物的药物组合物，特别是用于制备治疗慢性肾衰、糖尿病、高血压和心脑血管疾患以及肝硬化和前列腺肥大药物中的应用。

背景技术

在以前的研究中合成了一系列香豆素衍生物（中国专利——徐世平等，申请号：02155525.7，申请日：2002年12月5日；国际专利(PCT)——国际申请号：PCT/CN03/01046，国际申请日：2003年12月5日，优先权日：2002年12月5日），具有较好的抗肾衰和降压作用，对某些器官的纤维化有治疗作用。基于上述结果我们在继续研究中证明，本发明合成的一系列新香豆素，和一系列二氢喹啉酮衍生物。本发明化合物具有显著的抑制转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)和降低血管紧张素 II(AngII)及肾素的作用，因此本发明的化合物具有潜在的治疗慢性肾衰、高血压、糖尿病、肝硬化和前列腺肥大及肺纤维化的作用。

药理试验表明，在我们研究的新一代的化合物中，部分化合物对顺铂 (Cisplatin) 引起体外培养的大鼠肾系膜细胞、人肾小管上皮细胞损伤具有保护作用；在体内可显著地降低 Cisplatin 所致急性大鼠肾损伤血清尿素氮 (BUN) 和肌酐 (Scr) 水平及尿蛋白 (UP) 水平，减小 Cisplatin 引起的肾水肿；同时亦可降低 5/6 肾切除模型大鼠血清 BUN 水平、Scr 水平及尿蛋白 (UP) 水平；降低链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病尿蛋白水平。其肾保护、降压以及降低糖尿病肾病尿蛋白水平可能不同于血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI) 及血管紧张素 II AT1 型受体拮抗剂 (AT1RA)。而与抑制 TGF- $\beta 1$ 和降低肾组织 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达以及抑制细胞分泌的基质金属蛋白酶活性有关。从而抑制肾小球硬化和肾间质纤维化。这些化合物将可能用于缓解 Cisplatin 肿瘤化疗的肾脏毒性；用于治疗由高血压和糖尿病所导致的慢性肾功能不全；预防和/或治疗各种原因引起的肾小球硬化和肾脏纤维化；用于 II 型糖尿病的治疗以预防进一步糖尿病肾病的发生。

为了活性测定方面的便利，在这里采用了，以药物对顺铂所致的肾毒性的保护作用，来初步评价化合物的活性和疗效。

为了进一步评价化合物的疗效，也采用了 5/6 肾切除模型大鼠，作进一步研究，以确定本发明化合物的疗效。

发明内容

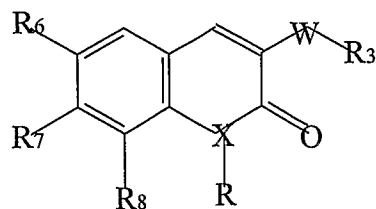
本发明要解决的技术问题是提供一类新的香豆素及二氢喹啉酮衍生物其异构体和其药用盐；

本发明要解决的另一个技术问题是提供这类化合物的制备方法；

本发明要解决的又一个技术问题是提供一类新的药物组合物，其含有本发明的化合物及制药领域常用的载体。

本发明要解决的再一个技术问题是提供这类新的化合物在制备治疗慢性肾衰、糖尿病、高血压和心脑血管疾患以及肝硬化和前列腺肥大药物中的应用。

为解决本发明的技术问题，本发明采用如下的技术方案，具体讲，本发明的化合物如通式(I)所示



(I)

其中：

X 选自 O、NH；

W 选自 CO、CH₂；

R 选自直链或支链的 C₁₋₆ 烷基；

R₆、R₇ 和 R₈ 独立地选自 H、OH、NO₂、羧基、卤素、C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷氧基；

R₃ 选自

取代或未取代的苯基（苯环上的取代基为 R₁₁）；

取代或未取代的苯基 C₁₋₄ 烷基（苯环上的取代基为 R₁₂，烷基上的取代基为 R''）；

取代或未取代的 N-吡咯基，（吡咯环上的取代基为 R₁₃）；

取代或未取代的咪唑基（咪唑基上的取代基为 R₁₅）；

取代或未取代的吡唑基（吡唑基上的取代基为 R₁₆）；

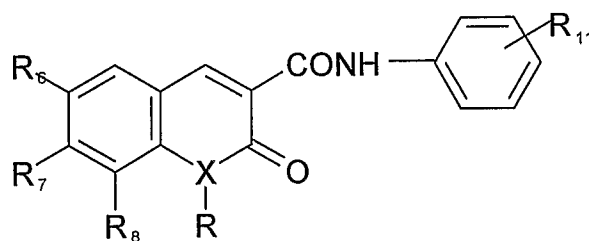
取代或未取代的 N-吡啶基（吡啶基上的取代基为 R₁₇）；

并且，R'' 选自 C₁₋₄ 烷氧羰基；

R₁₃ 表示单取代或多取代，取代基独立的选自 H、OH、卤素、NO₂、CO₂H、C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 卤代烷基、C₁₋₈ 羰烷基、C₁₋₈ 烷氧基、C₁₋₈ 羧基烷氧基、C₁₋₈ 酰基、C₁₋₈ 烷氧羰基、C₁₋₈ 酯基、四氮唑基，未取代或取代的苯羰基、苯环上的取代基为 R₁₄；

R₁₁、R₁₂、R₁₄、R₁₅、R₁₆ 和 R₁₇ 均表示单取代或多取代，取代基独立的选自 H、OH、卤素、NO₂、CO₂H、C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 卤代烷基、C₁₋₈ 羰烷基、C₁₋₈ 烷氧基、C₁₋₈ 羧基烷氧基、C₁₋₈ 酰基、C₁₋₈ 烷氧羰基、C₁₋₈ 酯基、四氮唑基。

优选的化合物包括但不限于如通式 (IA) 所示



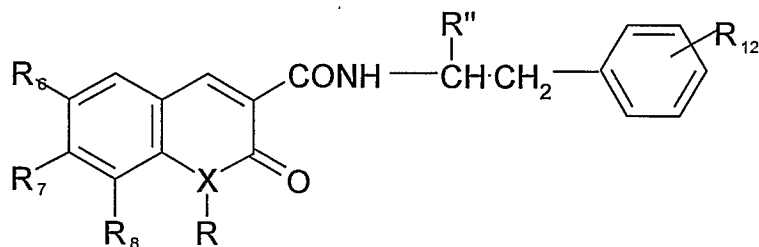
IA

其中，R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂；

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基；

R₁₁ 为单取代或多取代，取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

优选的化合物包括但不限于如通式 (IB) 所示



IB

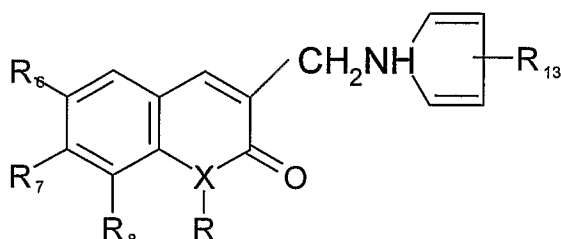
其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R'' 选自 CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et;

R₁₂ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

优选的化合物包括但不限于如通式 (IC) 所示



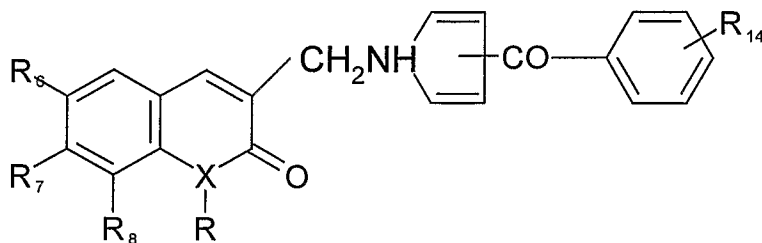
IC

其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₃ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')、取代的苯羰基。

更优选的化合物包括但不限于如通式 (IC1) 所示



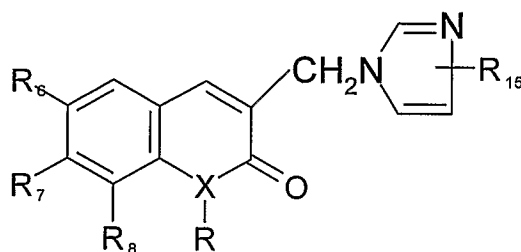
IC1

其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₄ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et。

优选的化合物包括但不限于如通式 (ID) 所示



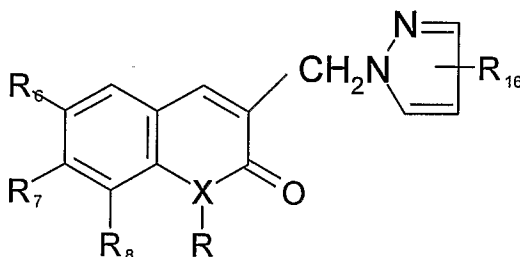
ID

其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₅ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

优选的化合物包括但不限于如通式 (IE) 所示



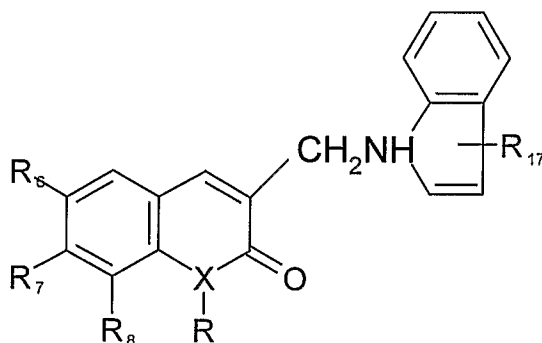
IE

其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₆ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

优选的化合物包括但不限于如通式 (IF) 所示











IF

其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₇ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

更优选的化合物包括但不限于化合物选自下列化合物的群组之一

33	O	6-NO ₂ , 7-OH, 8-C ₄ H ₉		210
34	O	6-NO ₂ , 7-OH, 8-C ₄ H ₉		288
35	O	7-OCH ₃ , 8-C ₄ H ₉		297
36	O	7-OCH ₃ , 8-C ₄ H ₉		290
37	O	7,8-(OCH ₃) ₂		294
38	O	6-NO ₂ ,7-OH, 8-CH ₃	W-R ₃ =CONHCH(CO ₂ CH ₃)CH ₂ C ₆ H ₄ -OH-4''	128
39	NH		W-R ₃ =CONHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ -OH-4''	285
40	NH	7-OCH ₃ 8-NO ₂		299
41	NH		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	275
42	NH		R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	234
43	NH		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	259
44	NH		R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	193
45	NH		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	280
46	NH		R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	208
47	NH		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₅	221
48	NH		R ₁₀ =2'-COCH ₃	202
49	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	265
50	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	298
51	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COCH ₃	246
52	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	262
53	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	203
54	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₅	208
55	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₅	176
56	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	295
57	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	205
58	NH	7-OCH ₃		253
59	NH			284
60	O		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₅	149
61	O		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	154
62	O		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	170
63	O		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	214
64	NH		R ₁₀ =2'-CHO	217
65	NH		R _{10a} =4'-CO ₂ H, R _{10b} =5'-CH ₃	237
66	NH		R _{10a} =4'-CO ₂ C ₂ H ₅ , R _{10b} =5'-CH ₃	228
67	NH		R _{10a} =2'-CO ₂ C ₂ H ₅ ,	142
68	NH		R _{10a} =2'-CO ₂ H,	236
69	NH		R _{10c} =3'-CF ₃ , R _{10d} =4'-CO ₂ C ₂ H ₅	256
70	NH		R _{10c} =3'-C ₃ H ₇ , R _{10d} =5'-CO ₂ C ₂ H ₅	208

71	NH		$R_{10}=2'-CO_2C_2H_5$	166
72	NH		$R_{10}=2'-CO_2H$	189

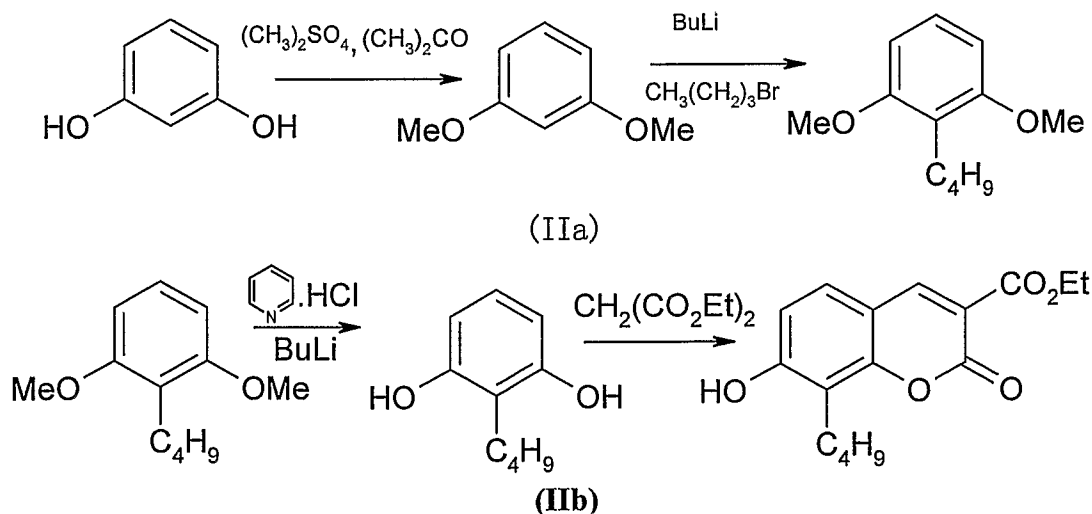
在本发明中，术语“卤素”是指氟、氯、溴、碘。根据本发明，本发明化合物可以异构体的形式存在，而且通常所述的“本发明化合物”包括该化合物的异构体。

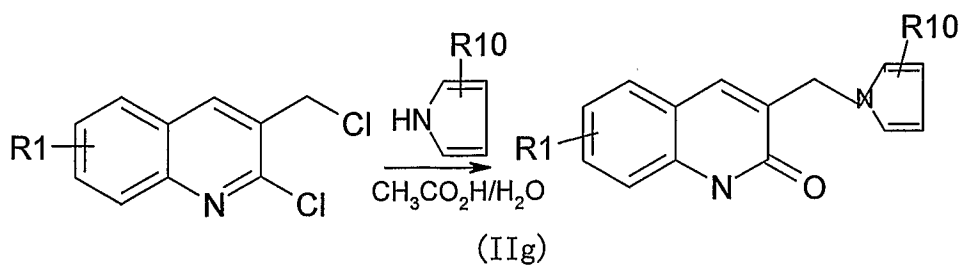
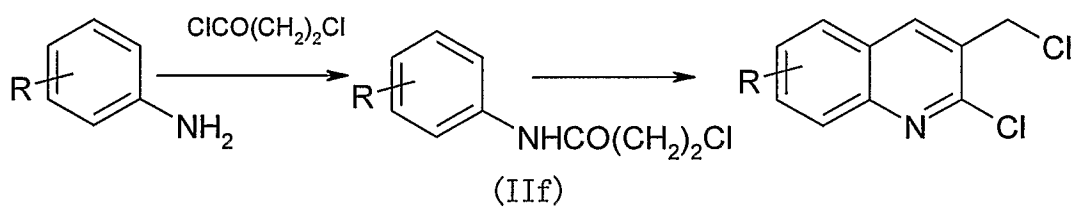
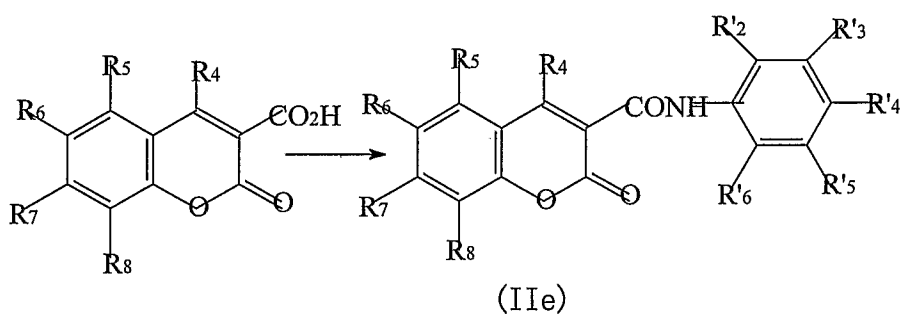
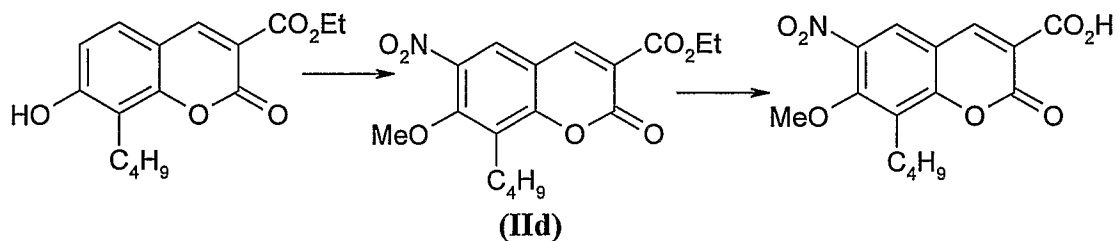
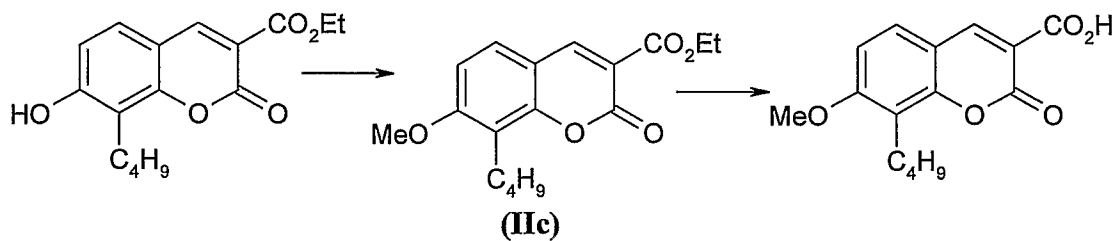
本发明化合物可存在双键的顺反异构体，不对称中心具有S构型或R构型，本发明包括所有可能的立体异构体以及两种或多种异构体的混合物。如果存在顺/反异构体，本发明涉及顺式形式和反式形式以及这些形式的混合物，如果需要单一异构体可根据常规方法分离或通过立体选择合成制备。

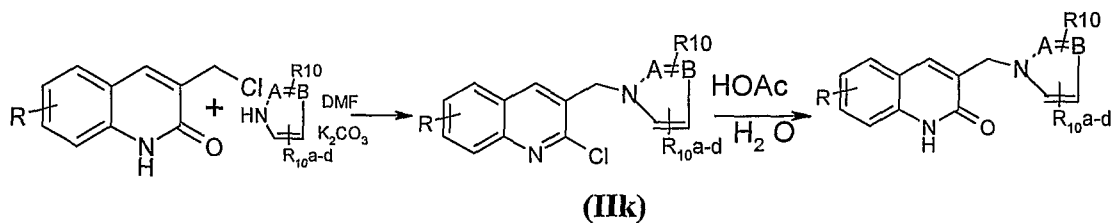
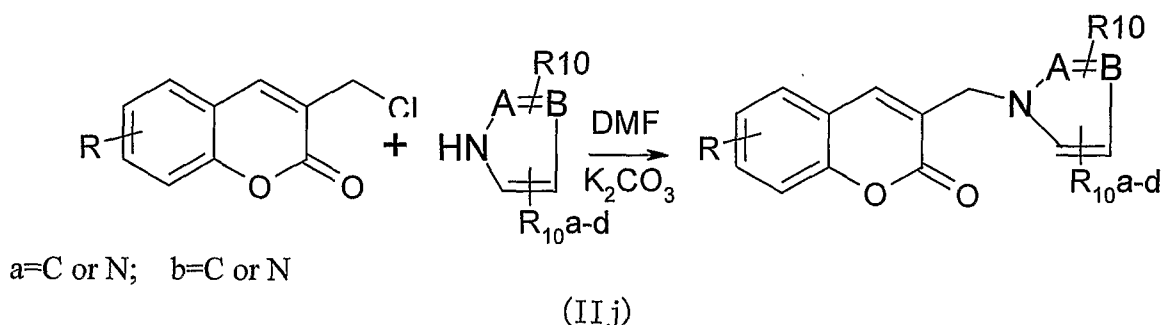
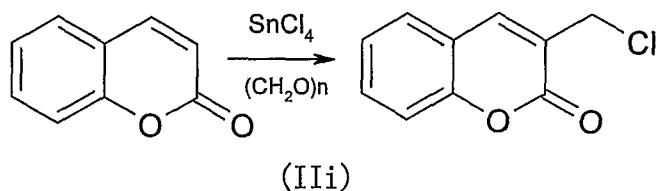
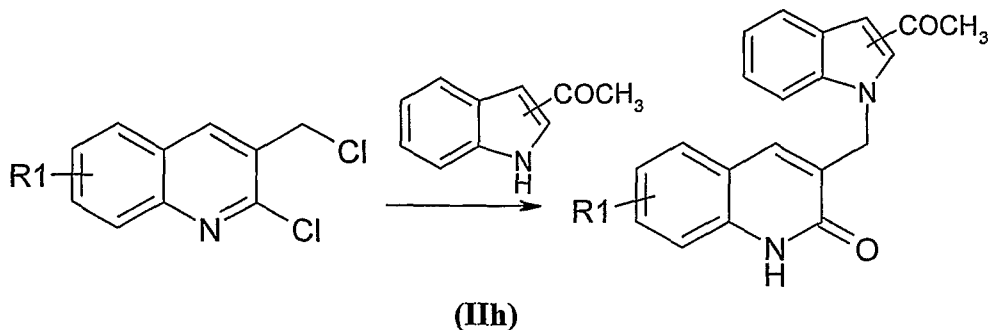
根据本发明的实施方案，所述的本发明化合物还包括其药效学上可接受的盐、盐的水合物、酯或前体药物。

根据本发明还涉及制备本发明化合物的方法，3-羧基的各种取代香豆素、与相应的各种取代氨基化合物反应制备。酰氨化反应是在合适的反应剂、催化剂及合适的溶剂条件下进行的。另外一类化合物的制备是，用各种取代的苯胺类化合物与氯代乙酰氯进行反应，得部分本发明化合物的中间体。以这些中间体与三氯氧磷及二甲基甲酰胺反应，生成取代的喹啉，然后与相应的各种取代吡咯化合物反应，所得产物水解后得各种目的化合物。这些反应是在合适的反应剂、催化剂以及合适的溶剂条件下进行的。这些反应剂包括三氯化磷、三氯氧磷、五氯化磷、二氯亚砷、草酰氯、乙酸酐以及硫酸二甲酯、碘甲烷、1,3-二环己基亚胺(DCC)、二吡啶碳酸酯(2-DPC)、1,3-二异丙基碳酰亚胺(DIPC)、1-(3-二甲胺丙基)-3-乙基碳酰亚胺(EDCI)等。其中优选的反应剂为五氯化磷、三氯氧磷、N,N-二甲基甲酰胺、三氯化磷和二氯亚砷、草酰氯，更优选五氯化磷、三氯氧磷、二氯亚砷。制备本发明化合物所使用的催化剂包括三级胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶和4-吡咯烷基吡啶等。其中优选为三级胺和吡啶。更优选为吡啶。反应在适宜的溶剂中或上述缩合剂中进行，如二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、乙二醇二甲醚、四氢呋喃和N,N-二甲基甲酰胺(DMF)等。其中优选为甲苯、DMSO和DMF，更优选甲苯和DMF。反应温度为10—110℃，优选为20—90℃，更优选为30—80℃，特别优选为50—70℃。

下列反应方程式具体说明







本发明因此还涉及含有作为活性成份的本发明化合物和常规药物赋形剂或辅剂的药物组合物。通常本发明药物组合物含有 0.1-95 重量%的本发明化合物。

本发明化合物的药物组合物可根据本领域公知的方法制备。用于此目的时，如果需要，可将本发明化合物与一种或多种固体或液体药物赋形剂和/或辅剂结合，制成可作为人药或兽药使用的适当的施用形式或剂量形式。

本发明化合物或含有它的药物组合物可以单位剂量形式给药，给药途径可为肠道或非肠道，如口服、肌肉、皮下、鼻腔、口腔粘膜、皮肤、腹膜或直肠等。

本发明化合物或含有它的药物组合物的给药途径可为注射给药。注射包括静脉注射、肌肉注射、皮下注射、皮内注射和穴位注射等。

给药剂型可以是液体剂型、固体剂型。如液体剂型可以是真溶液类、胶体类、微粒剂型、乳剂剂型、混悬剂型。其他剂型例如片剂、胶囊、滴丸、气雾剂、丸剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、栓剂、冻干粉针剂等。

本发明化合物可以制成普通制剂、也可以是缓释制剂、控释制剂、靶向制剂及各种微粒给药系统。

为了将单位给药剂型制成片剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如淀粉、糊精、硫酸钙、乳糖、甘露醇、蔗糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、碳酸钙、白陶土、微晶纤维素、硅酸铝等；湿润剂与粘合剂，如水、甘油、聚乙二醇、乙醇、丙醇、淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、紫胶、甲基纤维素、磷酸钾、聚乙烯吡咯烷酮等；崩解剂，例如干燥淀粉、海藻酸盐、琼脂粉、褐藻淀粉、碳酸氢钠与枸橼酸、碳酸钙、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等；崩解抑制剂，例如蔗糖、三硬脂酸甘油酯、可可脂、氢化油等；吸收促进剂，例如季铵盐、十二烷基硫酸钠等；润滑剂，例如滑石粉、二氧化硅、玉米淀粉、硬脂酸盐、硼酸、液体石蜡、聚乙二醇等。还可以将片剂进一步制成包衣片，例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片，或双层片和多层片。

例如为了将给药单元制成丸剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如葡萄糖、乳糖、淀粉、可可脂、氢化植物油、聚乙烯吡咯烷酮、Gelucire、高岭土、滑石粉等；粘合剂，如阿拉伯胶、黄耆胶、明胶、乙醇、蜂蜜、液糖、米糊或面糊等；崩解剂，如琼脂粉、干燥淀粉、海藻酸盐、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等。

例如为了将给药单元制成胶囊，将有效成分本发明化合物与上述的各种载体混合，并将由此得到的混合物置于硬的明胶胶囊或软胶囊中。也可将有效成分本发明化合物制成微囊剂，混悬于水性介质中形成混悬剂，亦可装入硬胶囊中或制成注射剂应用。

例如，将本发明化合物制成注射用制剂，如溶液剂、混悬剂溶液剂、乳剂、冻干粉针剂，这种制剂可以是含水或非水的，可含一种和/或多种药效学上可接受的载体、稀释剂、粘合剂、润滑剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂。如稀释剂可选自水、乙醇、聚乙二醇、1, 3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯等。另外，为了制备等渗注射液，可以向注射用制剂中添加适量的氯化钠、葡萄糖或甘油，此外，还可以添加常规的助溶剂、缓冲剂、pH调节剂等。这些辅料是本领域常用的

此外，如需要，也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂、甜味剂或其它材料。

为达到用药目的，增强治疗效果，本发明的药物或药物组合物可用任何公知的给药方法给药。

用已知体内外试验方法测定本发明化合物和/或组合物的活性和效果，继续合成的香豆素和二氢喹啉类化合物，具有明显地肾保护作用，本发明化合物对顺铂（Cisplatin）引起体外培养的大鼠肾系膜细胞、人肾小管上皮细胞损伤具有保护作用；在体内可显著地降低 Cisplatin 所致急性大鼠肾损伤血清尿素氮（BUN）和肌酐（Scr）水平及尿蛋白（UP）水平，减小 Cisplatin 引起的肾水肿；同时亦可降低 5/6 肾切除模型大鼠血清 BUN 水平、Scr 水平及尿蛋白（UP）水平；降低链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病尿蛋白水平。

初步作用机制研究表明，本发明化合物 31 其肾保护、降压以及降低糖尿病肾病尿蛋白水平不同于血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）及血管紧张素 II AT1 型受体拮抗剂（AT1RA）。而与抑制 TGF- β 1 和降低肾组织 TGF- β 1 mRNA 表达以及抑制细胞分泌的基质金属蛋白酶活性有关。其主要途径可能归结为对 TGF- β 1 的抑制，从而抑制肾小球硬化和肾间质纤维化。

本发明化合物将可能用于缓解 Cisplatin 肿瘤化疗的肾脏毒性；用于治疗由高血压和糖尿病所导致的慢性肾功能不全；预防和治疗各种原因引起的肾小球硬化和肾脏纤维化；用于 II 型糖尿病的治疗以预防进一步糖尿病肾病的发生。

另外的研究结果表明，本发明化合物给药 20 周在 STZ 诱发的雌性 SD 大鼠糖尿病动物模

型,可明显降低血尿素氮(BUN),血肌酐(Scr)和血中TGF- β 1水平,同时增加肌酐清除率(C.L),肾脏组织病理学结果表明,本发明化合物56对于STZ诱发大鼠糖尿病肾病所致的肾小球硬化、肾小管空泡变性和肾间质病变均具有明显的治疗作用。说明本发明化合物具有明显延缓或治疗糖尿病肾病的作用。

总而言之,本发明的化合物可以用于制备转化生长因子- β 1(TGF- β 1)抑制剂,血管紧张素II(AII)转化酶受体拮抗剂,可用于治疗心脑血管疾患、肾脏疾患、糖尿病、肝硬化以及前列腺肥大。上述所述的心脑血管疾患是高血压、心、脑栓塞、心肌梗塞、脑中风。

本发明化合物药物组合物的给药剂量取决于许多因素,例如所要预防或治疗疾病的性质和严重程度,患者或动物的性别、年龄、体重、性格及个体反应,给药途径、给药次数、治疗目的,因此本发明的治疗剂量可以有大范围的变化。一般来讲,本发明中药学成分的使用剂量是本领域技术人员公知的。可以根据本发明化合物组合中最后的制剂中所含有的实际药物数量,加以适当的调整,以达到其治疗有效量的要求,完成本发明的预防或治疗目的。本发明化合物的每天的合适剂量范围本发明的化合物的用量为0.001—150mg/Kg体重,优选为0.1—100mg/Kg体重,更优选为1—60mg/Kg体重,最优选为5—45mg/Kg体重。上述剂量可以单一剂量形式或分成几个,例如二、三或四个剂量形式给药这受限于给药医生的临床经验以及包括运用其它治疗手段的给药方案。

每一种治疗所需总剂量可分成多次或按一次剂量给药。本发明的化合物或组合物可单独服用,或与其他治疗药物或对症药物合并使用并调整剂量。

附图说明

图1 本发明化合物31对cisplatin引起大鼠肾系膜细胞(rMC)损伤的保护作用。

图2 本发明化合物31对cisplatin引起人肾小管上皮细胞(HKC)损伤的保护作用

图3 本发明化合物31对人肾小管上皮细胞(HKC)凋亡影响的形态学观察

A control

B cisplatin 2 μ mol/L

C cisplatin 2 μ mol/L+31 2 μ mol/L

D cisplatin 2 μ mol/L+31 10 μ mol/L

E cisplatin 2 μ mol/L+31 50 μ mol/L

图4 本发明化合物31对cisplatin诱导的HKC细胞染色体DNA断裂的影响

1 control

2 cisplatin 10 μ mol/L +31 50 μ mol/L

3 cisplatin 10 μ mol/L +31 10 μ mol/L

4 cisplatin 10 μ mol/L +31 2 μ mol/L

5 cisplatin 10 μ mol/L

6 marker

图5. 本发明化合物31对Fe²⁺-L-cys诱发肝微粒体脂质过氧化的影响

图6. 本发明化合物31对cisplatin所致急性肾损伤大鼠肾组织TGF- β 1 mRNA表达的影响

Lane 1. Control

Lane 2. Cisplatin+31 10mg/kg

Lane 3. Cisplatin+31 30mg/kg

Lane 4. Cisplatin+ Benazapril 10mg/kg

Lane 5. Cisplatin model

Lane 6. Marker

图 7. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠肾组织 TGF- β_1 mRNA 表达的影响统计分析

图 8. 本发明化合物 31 对 HT-1080 细胞分泌基质金属蛋白酶能力的影响

1 cisplatin 5 μ mol/L

2 cisplatin 5 μ mol/L+31 3.12 μ mol/L

3 cisplatin 5 μ mol/L+31 12.5 μ mol/L

4 cisplatin 5 μ mol/L+31 50 μ mol/L

5 control

图 9. 本发明化合物 31 对大鼠肾系膜细胞 (rMC) 分泌基质金属蛋白酶能力的影响

1 control

2 cisplatin 5 μ mol/L

3 31 3.12 μ mol/L

4 31 12.5 μ mol/L

5 31 50 μ mol/L

具体实施方式

下面的实施例用来进一步说明本发明，但是这并不意味着对本发明的任何限制。

实施例：

实施例 1 3-[4'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-6-硝基-7-羟基-8-甲基香豆素 (31) 的制备

将 3-羧基-6-硝基-7-羟基-8-甲基香豆素 10.6g(0.04Mol)与 30ml 二氯亚砷反应完成后，除去多余的二氯亚砷，加入 20ml 二甲基甲酰胺 (DMF)，40ml 吡啶和 7g(0.043Mol)4-氨基苯基 (1',2',3',4'-四唑-5') 搅拌均匀，在 50 $^{\circ}$ C 加热 4 小时。过滤，用乙醇、水洗涤、干燥

1 HNMR(300MHz,DMSO), δ (ppm): 10.78(s,1H,NH),8.8(s,1H,NH), 8.6 (b,2H, 4,5-H),8.0(d,2H,J=8.7Hz,Ar'H),7.9(d,2H,J=8.7Hz,Ar'H),2.23(s,3H,CH₃)

实施例 2 3-[3'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-6-硝基-7-羟基-8-甲基香豆素 (32) 的制备

根据实施例化合物 31 的制备方法，化合物 32 的制备，不同点在于以 3-氨基苯基 (1',2',3',4'-四唑-5') 进行反应得化合物 32

1 HNMR(300MHz,DMSO), δ (ppm): 10.70(s,1H,NH),8.92(s,1H,5-H),8.67(s,1H, 4-H),8.4(s,1H,Ar2'-H),7.89(d,1H,J=7.8Hz,Ar6'-H),7.70(d,1H,J=7.8Hz, Ar4'-H), 7.59(t,1H,J=7.8Hz,Ar5'-H),2.27 (s,3H,CH₃)

实施例 3 3-[3'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-6-硝基-7-羟基-8-丁基香豆素 (33)

根据实施例化合物 31 的制备方法，化合物 33 的制备，不同点在于以 3-羧基-6-硝基-7-羟基-8-丁基香豆素与 3-氨基苯基 (1',2',3',4'-四唑-5') 进行反应得化合物 33

1 HNMR(300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.914(s,1H,4-H),8.708(s,1H,5-H),8.483n (s,1H,Ar-H-2'),7.833

(m,2H,J=7.5Hz,4',6'-H),7.615(t,1H,J=7.8Hz,Ar-5'-H),2.828(t,2H,J=7.2,1''-CH₂),1.552(t,2H,J=7.5 Hz,2''-CH₂)1.372(q,2H,J=7.5Hz,3''-CH₂),0.929(t,3H,J=7.2Hz,4''-CH₃)

实施例 4 3-[4'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-6-硝基-7-羟基-8-丁基香豆素 (34)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 34 的制备, 不同点在于以 3-羧基-6-硝基-7-羟基-8-丁基香豆素与 4-氨基苯基 (1',2',3',4'-四唑-5') 进行反应得化合物 34

¹HNMR(300MHz,DMSO),δ(ppm): 10.747(s,1H,-NH),8.910(s,1H,4-H), 8.693 (s1H,5-H),8.051(d,2HJ=8.7Hz,2'', 6'-Ar-H)7.940(d,2H,J=8.7Hz3',5'-Ar-H)2.823(t,2H,7.2Hz,1''-CH₂),1.549(t,2H,J=7.5Hz,2''-CH₂),1.373(q,2H, J=7.2Hz,3''-CH₂),0.930(t,3H,J=7.2Hz,4''-CH₃)

实施例 5 3-[4'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-7-甲氧基-8-丁基香豆素 (35)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 35 的制备, 不同点在于以 3-羧基-7-甲氧基-8-丁基香豆素与 4-氨基苯基 (1',2',3',4'-四唑-5') 进行反应得化合物 35

¹HNMR(300MHz,DMSO),δ(ppm): 10.881 (s,1H,NH),8.890(s,1H,4-H), 8.051(d,2H,J=8.7Hz,2'', 6''-Ar-H),7.946(d,2H,J=8.7Hz,3'',5''-Ar-H), 7.908(d,1H,J=8.7Hz,5-H),7.218(d,1H,J=8.7Hz,6-H),3.957(s,3H,-OCH₃),2.760(q,2H,J=7.5Hz,1''-CH₂),1.515(t,2H,J=7.2Hz,2''-CH₂),1.334(q,2H,J=7.5Hz, 3''-CH₂), 0.917(t,3H,J=7.5Hz,4''-CH₃)

实施例 6 3-[3'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-7-甲氧基-8-丁基香豆素 (36)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 36 的制备, 不同点在于以 3-羧基-7-甲氧基-8-丁基香豆素与 3-氨基苯基 (1',2',3',4'-四唑-5') 进行反应得化合物 36

¹HNMR(300MHz,DMSO),δ(ppm):10.842(s,1H,NH), 8.888(s,1H,4-H), 8.470(s,1H,2'-Ar-H),7.922 -7.871(m,2H,4',6'-Ar-H), 7.789(d,1H,J=7.8Hz,5-H),7.610(t,1H,J=7.8Hz,5-Ar-H),7.216(d,1H,J=9Hz,6-Ar-H),3.995(s,3H,OCH₃),2.761(t,2H,J=7.5Hz,1''-CH₂),1.502(t,2H,J=7.2Hz,2''-CH₂),1.332(q,2H, J=7.5,3''-CH₂),0.915(t,3H,J=7.2, 4''-CH₃)

实施例 7 3-[4'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-7,8-甲氧基香豆素(37)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 37 的制备, 不同点在于以 3-羧基-7,8-二甲氧基香豆素与 4-氨基苯基 (1',2',3',4'-四唑-5') 进行反应得化合物 37

NMR(300MHz,DMSO),(ppm):10.83(s,1HNH),8.80(s,1H,4-H),8.00(d,2H,J=8.4Hz,3',5'-H),7.90(d, 2H,J=8.4Hz,2',6'-H),7.70(d,1H,J=9,5-H), 7.20(d,2H,J=9Hz,6-H),3.96(s,3H,OCH₃),3.87(s,3H,OCH₃)

实施例 8 3-苯氨羰基]-6-乙基-7-甲氧基香豆素(30)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 30 的制备, 不同点在于以 3-羧基-6-乙基-7-

甲氧基香豆素与苯氨进行反应得化合物 30

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):10.67 (br,1H,NH) ,8.87(s,1H,4-H),7.77 (s,1H, 5-H),7.69(d,2H, J=7.69Hz, 3',5'-H),7.36(t,2H,J=7.5Hz,2',6'-H), 7.18(s,1H,8-H),7.12(1H,J=7.2Hz,5'-H),3.93(t,3H, OCH₃),2.58(q,2H,J=7.5Hz,CH₂),1.15(t,3H,J=7.5,CH₃)

实施例 9 3-(1'-甲氧羰基-2'-羟苯乙氨羰基)-6-硝基-7-羟基-8-甲基香豆素 (38)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 38 的制备, 不同点在于以 3-羧基-6-硝基-7-羟基-8-甲基香豆素与 1'-甲氧羰基-2'-羟苯乙氨进行反应得化合物 38

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):9.26(br,1H,NH),8.80(br,1H,OH),8.63(s,1H,4-H),7.93(s,1H,5-H),6.90(d,2H,J=8.1Hz,Ar'H),6.60(d,2H,J=8.1Hz,ArH),4.70(m,1H,CH),3.66(s,3H,OCH₃),3.01(d,2H,J=6.9Hz,CH₂),2.23(s,3H,CH₃)

实施例 10 3-苯胺羰基-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (1)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 1 的制备, 不同点在于以 3-羧基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与苯氨进行反应得化合物 1

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):13.107(s,1HNH),11.764(s,1HNH), 9.177 (s,1H,4-H),9.060(d,1H, J=2.1Hz,5-H),8.46(dd,1H,J₁=2.4Hz,J₂=9Hz,7-H), 7.73(d,2H,J=8.1Hz,2',6'Ar-H),7.601(d,1H,J=9Hz, 8-H),7.39(t,2H,J=7.5Hz,3',5'Ar-H),7.14(t,1H,J=7.5Hz,4'-ArH),

实施例 11 3-(3'-羟基-4'-羧基苯胺羰基)-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (3)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 3 的制备, 不同点在于以 3-羧基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 4-氨基水杨酸进行反应得化合物 3

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):13.127 (s, 1H,NH), 11.976 (s, 1H,NH), 9.155 (s, 1H, 4-H) ,9.04(d,1H,J=2.7Hz,5-H), 8.46(dd,1H,J₁=2.4Hz, J₂=9.3Hz,7-H),7.77(d,1H,J=8.7 Hz,6'-H),7.59(d,1H,J=9.3Hz,8-H),7.56(d,1H,J=2.1,2'-H),7.06(dd,1H,J₁=2.1,J₂=8.7,5'-H)

实施例 12 3-(3'-羧基-4'-羟基苯胺羰基)-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (2)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 2 的制备, 不同点在于以 3-羧基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 5-氨基水杨酸进行反应得化合物 2

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):13.063(s,1H,NH),11.647(s,1H,NH),9.005(s,1H, 4-H),9.092(s,1H, 5-H),8.431(d,1H,J=9Hz,7-H),8.193(s,1H,2'-H),7.771(d,1H,J=9Hz,8-H),7.570(d,1H,J=9.3Hz,6'-H), 6.957(d,1H,J=9.3Hz,5'-H)

实施例 13 3-[4'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (4)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 4 的制备, 不同点在于以 3-羧基-6-硝基二氢

喹啉酮-2 与 4-(1',2'3',4'-四唑-5')苯氨进行反应得化合物 4

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO),(ppm):13.161(s,1H,NH)<12.033(s,1H,NH), 9.205(s,1H,4-H),9.086(d,1H,J=2.4Hz,5-H),8.49(dd,1H, $J_1=2.7\text{Hz}$, $J_2=9\text{Hz}$, 7-H),8.07-7.94(m,4H,苯四唑-Ar-H),7.61(d,1HJ=9.3Hz,8-H)

实施例 14 3-[3'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (5)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 5 的制备, 不同点在于以 3-羧基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 3-(1',2'3',4'-四唑-5')苯氨进行反应得化合物 5

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO),(ppm):13.142 (s, 1H,NH), 11.99 (s,1H,NH), 9.19 (s, 1H, 4-H)), 9.07 (d, 1H,J=2.7,5-H) ,8.47(dd,1H, $J_1=2.7$, $J_2=9.3$, 7-H), 8.44(s,1H,2'-H),7.97-7.59(m,4H,4',5', 6'-ArH,8-H)

实施例 15 3-(3'-氯-4'-羧基苯胺羰基)-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (6)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 6 的制备, 不同点在于以 3-羧基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 3-氯-4'-羧基苯胺进行反应得化合物 6

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO),(ppm):13.13(s,1H,NH),12.22(s,1H,NH),9.15(s,1H,4-H), 9.06(d, 1H,J=2.7Hz,5-H),8.46(dd,1H, $J_1=2.1\text{Hz}$, $J_2=9\text{Hz}$,7-H),8.07(d,1H, $J=1.8\text{Hz}$,2'-ArH),7.87(d,1H,J=8.7 Hz,6'-H),7.63(dd,1H, $J_1=2.1\text{Hz}$, $J_2=8.7\text{Hz}$, 5'-ArH), 7.581(d,1H,J=9,8-H)

实施例 16 3-苯胺羰基 -二氢喹啉酮-2 (11)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 11 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-2 与苯胺进行反应得化合物 11

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO),(ppm):12.628(s,1H,NH),12.11(s,1H,NH),8.97(s,1H, 4-H),7.99(d,1H,J=8.1Hz,ArH),7.71(d,2H,J=8.1Hz,ArH)<7.67(d,1H,J=7.8Hz, ArH),7.47(d,1H,J=8.4Hz,ArH),7.33(m, 4H,ArH),7.11(t1HJ=7.5,ArH)

实施例 17 3-(4'-羧基苯胺羰基) -二氢喹啉酮-2 (13)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 13 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-2 与对氨基苯甲酸进行反应得化合物 13

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO),(ppm):12.718(s,1H,NH),12.423(d,1H,J=3.6Hz,NH), 8.994(s,1H,4-H),8.016(d,1H,J=7.8Hz,5-H),7.96(d,2H,J=8.7Hz,3',5' Ar-H),7.838(d,2H,J=8.7Hz,2',6' Ar-H),7.708(t,1H, J=8.4Hz,7-H),7.475(d,1H, J=8.7Hz,8-H),7.337(t,1H,J=7.8Hz,6-H)

实施例 18 3-乙氧羰基苯胺羰基 -二氢喹啉酮-2 (12)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 12 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-

2 与对氨基苯甲酸乙酯进行反应得化合物 12

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):12.42(s,1H,NH),8.975(s,1H,4-H),8.012(d,1H,9.9Hz,5-H), 7.979 (d,2H, J=9.9Hz,Ar'H),7.861(d,2H,J=9Hz,Ar'H), 7.697 (t,1H, $J_1=7.8\text{Hz},J_2=7.2\text{Hz},7\text{-H}$),7.468(d,1H, $J=8.1\text{Hz},8\text{-H}$),7.325(t,1H, $J_1=7.8\text{Hz},J_2=7.2\text{Hz},6\text{-H}$),4.284(q,2H,OCH₂),1.305(t,3H,OC-CH₃)

实施例 19 3-(3'-羧基-4'-羟基苯胺羰基)-二氢喹啉酮-2 (15)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 15 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-2 与 5-氨基水杨酸进行反应得化合物 15

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):12.658(d,1H,J=2.4,Hz,OH),12.042(d,1H, J=3.3Hz,NH),8.974(s,1 H,4-H),8.236(d,1H,J=2.7Hz,2'-ArH),7.989(d,1H,J=8.1Hz,5-H),7.786(dd,1H,J_邻=8.7Hz,J_间=2.7Hz, Ar6'-H),7.689(d,1H J=7.5Hz, 7-H),7.465(d,1H,J=8.1Hz,8-H),7.323(t,1H,J=7.5Hz,6-H),6.984(d,1 H, J=8.7Hz,Ar5'-H)

实施例 20 3-(4'-羟基苯胺羰基)-二氢喹啉酮-2 (16)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 16 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-2 与 4-氨基苯酚进行反应得化合物 16

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):12.6(s,1H,NH),11.88(s,1H,NH),8.94(s,1H,4-H),8.94(s,1H,4-H),7.981(d,1H,J=8.7Hz,ArH),7.70(t,1H,J=7.5Hz,ArH),7.53(d,2H,J=8.7Hz,ArH),7.45(d,1H,J=7.8Hz,Ar H),7.32(t,1HJ=7.8Hz,ArH)

实施例 21 3-(3'-羟基-4'-羧基苯胺羰基)-二氢喹啉酮-2 (14)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 14 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-2 与 4-氨基水杨酸进行反应得化合物 14

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):11.894(s,1H,NH),9.127(s,1H,4-H),9.059(t,2H, J=3.6Hz,ArH),8.51(dd,1H, $J_1=2.7\text{Hz},J_2=9.9\text{Hz},\text{ArH}$),7.88(d,1H,ArH), 7.74(d,1H,J=8.7Hz,ArH),7.52(d,1H,J=21.8,Ar H),7.07(dd,1H, $J_1=1.8\text{Hz}, J_2=8.7,\text{ArH}$)

实施例 22 3-(4'-羟基苯乙胺羰基)-二氢喹啉酮-2 (39)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 39 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-2 与 4-羟基苯乙胺进行反应得化合物 39

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):12.426(s,1H,NH),9.798(t,1H, $J_1=5.4\text{Hz},J_2=5.4\text{Hz}, -\text{NH-C-}$),8.816 (s,1H,4-H),7.924(d,1H,J=8.1Hz,8-H),7.637(t,1H, $J_1=8.4\text{Hz}, J_2=6.9\text{Hz},7\text{-H}$),7.396(d,1H,J=9Hz,5-H), 7.275(t,1H, $J_1=7.2\text{Hz},J_2=7.5\text{Hz},6\text{-H}$),7.004(d,2H,J=8.4Hz,2',6'-H),6.672(d,2H,J=8.7Hz,3',5'-H),3.503 (q,2H, $J_1=13.2\text{Hz},J_2=13.2\text{Hz},\text{N-CH}_2$),2.(t,2H, $J_1=7.2\text{Hz},J_2=7.2\text{Hz},-\text{CH}_2-$)

实施例 23 3-[4'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-7-甲氧基-8-硝基二氢喹啉酮-2 (40)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 40 的制备, 不同点在于以 3-羧基-7-甲氧基-8-硝基二氢喹啉酮-2 与 4-(1',2'3',4'-四唑-5')苯氨进行反应得化合物 40

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):9.801(s,1H,NH),8.989(s,1H,4-H),8.273(d,1H, J=9.Hz,5-H),8.055(d,2H,J=9Hz,3',5'-H),7.953(d,2H,J=9Hz,2',6'-H), 7.378(d,1H,J=9Hz,6-H),4.015(s,3H,OCH₃)

实施例 24 3-[3'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-二氢喹啉酮-2 (18)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 18 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-2 与 3-(1',2'3',4'-四唑-5')苯氨进行反应得化合物 18

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):12.689(s,1H,NH),12.372(s,1H,NH),9.005(s,1H,4-H),8.429(s,1H,2'-H),8.03-7.32(m7H,ArH)

实施例 25 3-[4'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-二氢喹啉酮-2 (17)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 17 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-2 与 4-(1',2'3',4'-四唑-5')苯氨进行反应得化合物 17

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):12.704(s,1H,NH),12.414(s,1H,NH),8.993(s,1H,4-H),8.066-7.972(q,4H,J=11.1Hz,Ar'H),8.00(d,1H,J=8.1Hz,8-H), 7.703(t,1H,J₁=7.8Hz,J₂=7.5Hz,7-H),7.478(d,1H,J=8.1Hz,5-H),7.322(t,1H, J₁=7.5Hz,J₂=7.2Hz,6-H)

实施例 26 3-(3'-羧基亚甲氧基苯胺羰基)-二氢喹啉酮-2 (10)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 10 的制备, 不同点在于以 3-羧基二氢喹啉酮-2 与 3-(1',2'3',4'-四唑-5')苯氨进行反应得化合物 10

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):12.654(s,1H,NH),12.16(s,1H,NH),9.27(s,1H,4-H),8.0-6.61(m,8H,ArH),4.691(s,2H,OCH₂)

实施例 27 1-甲基-3-(乙氧羰基苯胺羰基)-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (19)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 19 的制备, 不同点在于以 1-甲基-3-羧基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 4-乙氧羰基苯胺进行反应得化合物 19

¹HNMR(300MHz,DMSO),(ppm):11.907(s,1H,NH),9.155(s,1H,4-H),9.07(d,1H, J=1.5Hz,5-H),8.54(dd,1H,J₁=1.5Hz,J₂=5.4Hz,7-H),8-7.88(m,5H,5-H,8-H, 2'-H,6'-H,3'-H,5'-H),4.33(q,2H,J=4.2Hz,-CH₂),3.85(s,3H,N-CH₃),1.34(t,3H,J=4.2Hz,C-CH₃)

实施例 28 1-甲基-3-(3'-羧基-4'-羟基苯胺羰基)-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (21)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 21 的制备, 不同点在于以 1-甲基-3-羧基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 5-氨基水杨酸进行反应得化合物 21

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):11.601(s,1H,NH),9.114(s,1H,4-H),9.08(d,1H, J=2.7,5-H),8.51(dd,1H, $J_1=2.4\text{Hz}$, $J_2=9.3\text{Hz}$,7-H),8.26(d,1H, $J=2.7\text{Hz}$,6'-H),7.87(d,1H, $J=4.3\text{Hz}$,8-H),7.77(dd,1H, $J_1=2.7\text{Hz}$, $J_2=9\text{Hz}$,3'-H),6.98(d,1H, J=9Hz,2'-H),3.81(s,3H,N-CH₃)

实施例 29 1-甲基-3-苯胺羰基-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (22)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 22 的制备, 不同点在于以 1-甲基-3-羰基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与苯胺进行反应得化合物 22

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):11.71(s,1H,NH),9.15(s,1H,4-H),9.08(d,1H, $J=2.7\text{Hz}$,5-H),8.52(dd,1H, $J_1=2.7\text{Hz}$, $J_2=9.3\text{Hz}$,7-H),7.87(d, $J=9.3\text{Hz}$,8-H), 7.73(d,2H, $J=8.4\text{Hz}$,2'-H,6'-H),7.38(t, $J=8.4\text{Hz}$,3'-H,5'-H),7.13(t, $J=7.5\text{Hz}$,4'-H),3.81(s,3H,N-CH₃)

实施例 30 1-甲基-3-(4'-羟基苯胺羰基)-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (24)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 24 的制备, 不同点在于以 1-甲基-3-羰基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与对氨基苯酚进行反应得化合物 24

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):11.51(s,1H,NH),9.12(s,1H,4-H),9.07(d,1H, $J=2.7\text{Hz}$,5-H),8.5(dd,1H, $J_1=2.4\text{Hz}$, $J_2=9.3\text{Hz}$,7-H),7.87(d,1H, $J=9.6\text{Hz}$,8-H),7.53(d,2H, $J=8.7\text{Hz}$,2'-H,6'-H),6.76(s,2H, $J=8.7\text{Hz}$,3'-H,5'-H),3.806(s,3H,N-CH₃)

实施例 31 1-甲基-3-(3'-羟基-4'-羰基苯胺羰基)-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (20)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 20 的制备, 不同点在于以 1-甲基-3-羰基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 4-氨基水杨酸进行反应得化合物 20

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):9.158(s,1H,CO₂H),9.092(d,1H,OH),8.532(dd,1H, $J_{\text{邻}}=2.4\text{Hz}$, $J_{\text{间}}=9.3\text{Hz}$,7-H),7.933-7.876(m,3H,ArH), 7.776(d,1H, J=8.4Hz, 8-H), 7.555(s,1H,4-H), 7.107(dd,1H, $J_{\text{邻}}=8.7\text{Hz}$, $J_{\text{间}}=1.8\text{Hz}$,Ar-5'H), 2.853(s,3H,N-CH₃)

实施例 32 1-甲基-3-(4'-羰基苯胺羰基)-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (23)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 23 的制备, 不同点在于以 1-甲基-3-羰基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与对氨基苯甲酸进行反应得化合物 23

^1H NMR(300MHz,DMSO),(ppm):11.94(s,1H,NH),9.14(s,1H,4-H),9.07(d,1H, J=2.7Hz,5-H),8.50(d,1H, $J_1=2.4$, $J_2=9.3$,7-H),7.95-7.81(m,5H,8-H,2'-H,3'-H,5'-H,6'-H),3.81(s,3H,NCH₃)

实施例 33 1-甲基-3-[4'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯胺羰基]-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (25)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 25 制备, 不同点在于以 1-甲基-3-羰基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 4-(1',2'3',4'-四唑-5')苯胺进行反应得化合物 25

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO),(ppm):11.985(s,1H,NH),9.20(s,1H,4-H),9.129(s,1H, 5-H),8.56(d,1H,J=9.3,7-H),7.94(m,5H,ArH), 3.84(s,3H,NCH₃)

实施例 34 1-异丙基-3-[4'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (28)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 28 的制备, 不同点在于以 1-异丙基-3-羧基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 4-(1',2'3',4'-四唑-5')苯氨进行反应得化合物 28

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO),(ppm):9.00(s,1H,5-H),8.89(d,1H,J=9.3Hz,7-H),8.47 (s,1H,4-H),8.07(d,2H,J=7.2Hz,Ar'H),7.9(d,2H,J=7.2Hz,Ar'H),7.59 (d,1H, J=9.3, 8-H),5.55(m,1H, 异丙基-CH),1.41(d,6H, 异丙基-(CH₃)₂)

实施例 35 1-异丙基-3-[3'-(1'',2''3'',4''-四唑-5'')苯氨羰基]-6-硝基-二氢喹啉酮-2 (29)

根据实施例化合物 31 的制备方法, 化合物 29 的制备, 不同点在于以 1-异丙基-3-羧基-6-硝基二氢喹啉酮-2 与 3-(1',2'3',4'-四唑-5')苯氨进行反应得化合物 29

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO),(ppm):9.00(d,1H,J=2.4Hz,5-H),8.80(m,1H,7-H),8.50 (s,1H,4-H),8.47(d, J=2.4,2'-H),7.96(m,1H,4'-H),7.79(m,2H,5',6'-H),7.60(m,1H,8-H),5.59(m,1H, 异丙基-CH),1.40(d, 6H, 异丙基-(CH₃)₂)

化合物 7、8、9、26、和 27 等按以上方法制备

实施例 36 3-[2'-(4''-硝基苯羰基)-吡咯-N-亚甲基]-二氢喹啉酮-2 (41)

将 0.464 克(2.20mmol)2-氯-3-氯甲基二氢喹啉置于 10ml 圆底瓶中,加入 0.475 克(2.37mmol) 2-对硝苯羰基吡咯及 0.910 克(6.60mmol)无水碳酸钾和 4 毫升 N,N-二甲基甲酰胺(分子筛干燥)于外浴 55℃ 反应,TLC 监测(石油醚: 乙酸乙酯 = 5: 1)5.5 小时后反应完全。

后处理:过滤,滤饼用乙酸乙酯充分洗涤,后用水溶解,乙酸乙酯提取,合并有机相,饱和食盐水洗,无水硫酸镁干燥,浓缩后用石油醚\乙酸乙酯重结晶的 0.397 克产物, 2-氯-3-[2'-(4''-硝基苯羰基)-吡咯-N-亚甲基]-二氢喹啉,产率 52.24%, mp.159.0~159.9℃

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,CDCl₃), δ (ppm): 8.292(d,2H,J=8.4Hz,3,5ArH)8.032(d,1H,J=8.4Hz,5H) 7.896(d,2H,J=8.7Hz,2,6-ArH),7.7447.478(m,4H),7.210(s,1H,QU4-H)6.862(d,1H,PY5-H)6.388(t,1H,PY3-H)5.879(s,2H,-CH₂N)

ESI-MS m/z(Intensity)392.5(100,M⁺)

将 0.350 克(0.895mmol) 2-氯-3-[2'-(4''-硝基苯羰基)-吡咯-N-亚甲基]-二氢喹啉置于 10ml 圆底瓶中,加入 2ml 醋酸和一滴水于外浴 120℃ 回流反应,原料在加热后全部溶解,TLC 监测(石油醚: 乙酸乙酯 = 1: 1, 2 滴醋酸),二天后反应完全,反应液冷却后,有灰色结晶析出。

后处理:过滤,用二氯甲烷充分洗涤灰色针晶,干燥得 0.275 克浅绿色针晶,产率 82.58%, mp. 275.0~276.9℃

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.301(d,2H,J=9Hz,3,5ArH),7.921(d,2H, J=9Hz,2,6rH),7.5637.

090(m,6H)6.807(m,1H,Py3-H),6.347(m,1H,Py4-H),5.497(s,2H,CH₂-N)

ESI-MS m/z(Intensity)374.5(8.3,M⁺)

实施例 37 3-(2'-乙氧羰基吡咯-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (71)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 71 的制备, 不同点在于以 2-乙氧羰基吡咯与 2-氯-3-氯甲基二氢喹啉进行反应得化合物 71

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃, δppm, JHz), 11.956 (s, 1H, N-H), 7.493 (d, 1H, J=8.1, H-5), 7.44 (d, 1H, J=7.8, H-8), 7.312 (s, 1H, H-4), 7.28 (t, 1H, J=8.1, H-6), 7.107 (t, 1H, J₁=7.8, J₂=7.2, H-7), 6.961 (dd, 1H, J₁=2.4, J₂=1.5, H-4'), 6.866 (s, 1H, H-5'), 6.227 (t, 1H, J₁=3.9, J₂=2.7, H-3'), 5.389 (s, 2H, -CH₂-), 4.115 (m, 2H, -OCH₂CH₃), 1.171 (t, 3H, J=7.2 - OCH₂CH₃).

EI-MS (%): 296(M⁺,47), 158(100), 250(78)

实施例 38 3-(2'-苯羰基吡咯-N-亚甲基)香豆素 (60)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 60 的制备, 不同点在于以 2-苯羰基吡咯与 3-氯甲基香豆素进行反应得化合物 60

¹H-NMR(300MHz,CDCl₃),(ppm):7.62(s,1H,4-H), 7.20-7.60(m,10H,ArH,Py5-H, Ar''H), 6.80(d,1H,J=3.3Hz,Py -3'-H),6.20(d,1H,J=3.3Hz, Py-4'-H), 5.55 (s,2H,N-CH₂)

实施例 39 3-[2'-(4''-氯苯羰基)吡咯-N-亚甲基]香豆素 (62)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 62 的制备, 不同点在于以 2-(4''-氯苯羰基吡咯)与 3-氯甲基香豆素进行反应得化合物 62

¹H-NMR(300MHz,CDCl₃),(ppm):7.70(d,2H,J=8.4Hz,2'',6''-H),7.60(s,1H,4-H),7.4(d,2H,J=8.4Hz,3'',5''-H),7.2-7.5(m,5H,ArH,Py3-H),6.70(d,1H,J=3.6Hz, Py5'-H),6.20(t,1H,J=3.6Hz,Py 4'-H),5.53(s,2H,N-CH₂)

实施例 40 3-[2'-(4''-甲氧苯羰基)吡咯-N-亚甲基]香豆素 (61)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 61 的制备, 不同点在于以 2-(4''-甲氧苯羰基吡咯)与 3-氯甲基香豆素进行反应得化合物 61

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃, δppm, JHz):7.70(d,2H,J=8.1Hz,2'',6''-H), 7.10-7.40(m,6H,4,5,6,7,8-H,Py3'-H),6.90(d,2H,J=8.1Hz,3'',5''-H),6.80(t,1H,J=3.1Hz,Py -4'-H),6.20(d,1H,J=3.1Hz, Py-5'-H), 5.52(s,2H,N-CH₂), 3.87 (s,3H,OCH₃)

实施例 41 3-(2'-苯羰基吡咯-N-亚甲基)-7-甲氧基-二氢喹啉酮-2 (54)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 54 的制备, 不同点在于以 2-苯羰基吡咯与 2-氯-3-氯甲基-7-甲氧基二氢喹啉进行反应得化合物 54

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz):10.843(br,1H,NH),7.798(d,2H,J=9Hz, 5,6-H),7.759(s,1H,4-H),7.523-7.354(m,5H,Ar'H),6.86-6.79(m,2H,Py-3,5-H), 6.73(s,1H,8-H),6.228(t,1H,J=3Hz,Py4-H),5.648(s,2H,NCH₂),3.888(s,3H,OCH₃)

实施例 42 3-(3'-苯羰基吡咯-N-亚甲基)-7 甲氧基-二氢喹啉酮-2 (55)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 55 的制备, 不同点在于以 3-苯羰基吡咯与 2-氯-3-氯甲基-7-甲氧基二氢喹啉进行反应得化合物 55

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz):8.835(d,2H,J=7.2Hz,5,6-H),7.502-7.403 (m,5H,Ar'H),7.358(s,1H,4-H),6.849-6.755(m,4H,8-H,Py2-H,Py4-H,Py5-H), 5.12(s,2H,NCH₂),3.872(s,3H,OCH₃)

实施例 43 3-[2'-(4"-氯苯羰基)吡咯-N-亚甲基]-7 甲氧基-二氢喹啉酮-2 (56)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 56 的制备, 不同点在于以 2-(4'-氯苯羰基)吡咯与 2-氯-3-氯甲基-7-甲氧基二氢喹啉进行反应得化合物 56

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz):8.724(d,2H,J=8.4Hz,Ar'-2,6-H), 7.541 (d,2H,J=8.4Hz,Ar'-3,5-H), 7.473-7.443(m,2H,4-H,Py3-H), 7.058 (s,1H,8-H), 6.791-6.756(m,2H,5-H,Py5-H), 6.727(dd,1H,J_邻=8.7Hz,J_间=2.4Hz, Py4-H), 6.300-6.280 (m,1H,6-H), 5.422(s,2H,NCH₂), 3.766(s,3H,OCH₃)

实施例 44 3-[2'-(4"-甲氧苯羰基)吡咯-N-亚甲基]-7-甲氧基-二氢喹啉酮-2 (52)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 52 的制备, 不同点在于以 2-(4'-甲氧苯羰基)吡咯与 2-氯-3-氯甲基-7-甲氧基二氢喹啉进行反应得化合物 52

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz):8.717(d,2H,J=9Hz,Ar'-2,6-H), 7.424 (d,1H,J=9Hz,5-H),7.377(s,1H,4-H),7.007(d,1H,J=2.7Hz,8-H),7.011-6.984(m,2H,Py3,5-H),6.770-6.697(m,3H,6-H,Ar'3,5-H),6.257(s,1H,Py4-H),5.390(s,2H,NCH₂),3.798(s,3H,7-OCH₃),3.751(s,3H,Ar'-OCH₃)

实施例 45 3-[3'-(4"-硝基苯羰基)吡咯-N-亚甲基]-7-甲氧基-二氢喹啉酮-2 (50)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 50 的制备, 不同点在于以 3-(4'-硝基苯羰基)吡咯与 2-氯-3-氯甲基-7-甲氧基二氢喹啉进行反应得化合物 50

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz):8.929(D,2h,j=9Hz,Ar'3,5-H), 7.951 (d,2H,J=9Hz, Ar'-2,6-H), 7.482 (d,2H,J=9Hz,5,6-H), 7.400(s,1H,4-H), 6.919-6.861(m,2H,Py2-H,8-H), 6.72(d,2H,J=1.8Hz,Py4,5-H), 5.114(s,2H,NCH₂), 3.897(s,3H,OCH₃)

实施例 46 3-(2'-乙氧羰基咪唑-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (67)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 67 的制备, 不同点在于以 2-乙氧羰基吡咯与 2-氯-3-氯甲基二氢喹啉进行反应得化合物 67

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz), 10.11 (S, 1H, N-H), 7.847 (S, 1H, H-4), 7.508-7.687 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 7.334 (d, 1H, J=8.4, H-5'), 7.217 (d, 1H, J=6.9, H-4'), 5.676 (S, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.476 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.465 (t, 3H, $J_1=7.2$, $J_2=6.9$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

EI-MS (%): 297(M^+ ,100), 158(77)

实施例 47 3-(3'-三氟甲基-4'-乙氧羰基吡啶-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (69)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 69 的制备, 不同点在于以 3-三氟甲基-4-乙氧羰基吡啶与 2-氯-3-氯甲基二氢喹啉进行反应得化合物 69

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz), 10.278 (S, 1H, N-H), 8.329 (S, 1H, H-5'), 7.889 (S, 1H, H-4), 7.635-7.552 (m, 2H, H-5, H-8), 7.26-7.376 (m, 2H, H-6, H-7), 5.36 (S, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.298 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.325 (t, 3H, $J_1=7.2$, $J_2=6.9$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

EI-MS (%): 365(M^+ ,100), 158(77)

实施例 48 3-(2'-甲酰基吡咯-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (64)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 64 的制备, 不同点在于以 2-甲酰基-吡啶与 2-氯-3-氯甲基二氢喹啉进行反应得化合物 64

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz), 10.412 (S, 1H, N-H), 9.55 (S, 1H, $-\text{CHO}$), 7.74 (S, 1H, H-4), 7.563-7.493 (m, 2H, H-5, H-8), 7.343-7.237 (m, 2H, H-6, H-7), 7.224 (d, 1H, J=7.8, H-5'), 6.989 (d, 1H, J=3.9, H-4'), 6.287 (S, 1H, H-3').

ESI-MS (%): 253[$\text{M}+1$] $^+$

实施例 49 3-(3'-正丙基-5'-乙氧羰基吡啶-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (70)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 70 的制备, 不同点在于以 3-正丙基-4-乙氧羰基吡啶与 2-氯-3-氯甲基二氢喹啉进行反应得化合物 70

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz), 10.904 (S, 1H, N-H), 7.563-7.480 (m, 2H, H-5, H-8), 7.340-7.219 (m, 3H, H-6, H-7, H-4), 6.706 (S, 1H, H-4'), 5.407 (S, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.421 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 2.612 (t, 2H, $J_1=6.9$, $J_2=7.8$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.684 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.406 (t, 3H, $J_1=7.8$, $J_2=6.9$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 0.971 (t, 3H, $J_1=6.9$, $J_2=7.8$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

EI-MS (%): 339(M^+ ,92), 158(100), 135(89)

实施例 50 3-(4'-乙氧羰基-5'-甲基咪唑-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (66)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 66 的制备, 不同点在于以 4-乙氧羰基 5'-甲基咪唑与 2-氯-3-氯甲基二氢喹啉进行反应得化合物 66

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz), 8.022 (s, 1H, H-2'), 7.605-7.496 (m, 3H, H-4, H-5, H-8), 7.260-7.147 (m, 2H, H-6, H-7), 5.643 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.407 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 2.689 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.397 (t, 3H, $J=7.2$ - OCH_2CH_3).

EI-MS (%): 311(M^+ ,48), 158(100), 265(80)

实施例 51 3-(2'-羧基吡咯-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (72)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 72 的制备, 不同点在于以 2-羧基吡咯与 2-氯-3-氯甲基二氢喹啉进行反应得化合物 72

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz), 11.947 (s, 1H, $-\text{COOH}$), 7.498-7.427 (m, 2H, H-5, H-6), 7.300 (d, 1H, $J=8.4$, H-8), 7.226 (t, 1H, $J_1=2.1$, $J_2=5.1$, H-5'), 7.109 (t, 1H, $J_1=7.5$, $J_2=7.8$, H-7), 6.920 (dd, 1H, $J_1=1.8$, $J_2=2.1$, H-4'), 6.851 (s, 1H, H-4), 6.198 (t, 1H, $J_1=3.9$, $J_2=2.7$, H-3'), 5.397 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

EI-MS (%): 268(M^+ ,23), 158(100), 224(70)

实施例 52 3-(2'-羧基咪唑-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (68)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 68 的制备, 不同点在于以 2-羧基咪唑与 2-氯-3-氯甲基二氢喹啉进行反应得化合物 68

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz), 11.973 (s, 1H, $-\text{COOH}$), 7.755 (s, 1H, H-4), 7.604 (d, 1H, $J=5.7$, H-5), 7.487 (t, 1H, $J_1=7.8$, $J_2=6.9$, H-6), 7.305 (d, 1H, $J=8.1$, H-8), 7.226 (s, 1H, H-5'), 7.164 (t, 1H, $J_1=7.5$, $J_2=7.8$, H-7), 6.922 (s, 1H, H-4'), 5.073 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

ESI-MS (%): 270[$\text{M}+1$] $^+$

实施例 53 3-(4'-羧基 5'-甲基咪唑-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (65)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 65 的制备, 不同点在于以 4-羧基 5'-甲基咪唑与 2-氯-3-氯甲基二氢喹啉进行反应得化合物 65

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δppm , JHz), 12.035 (s, 1H, $-\text{COOH}$), 9.068 (s, 1H, N-H), 7.696 (s, 1H, H-2'), 7.643 (d, 1H, $J=7.8$, H-5), 7.519 (m, 1H, H-6), 7.336 (d, 1H, $J=8.1$, H-8), 7.189 (t, 1H, $J_1=7.8$, $J_2=7.5$, H-7), 5.483 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.501 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

EI-MS (%): 283(M^+ ,10), 158(100), 239(65)

实施例 54 3-[2'-(4"-硝基苯羰基)吡咯-N-亚甲基]香豆素 (63)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 63 的制备, 不同点在于以 2-(4'-硝基苯羰基)吡咯与 3-氯甲基香豆素进行反应得化合物 63

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J(Hz), 8.30 (d, 2H, $J=7.8$, Ar-H-3,5), 7.89 (d, 2H, $J=7.8$, Ar-H-2,6), 7.703 (s, 1H, H-4), 7.196-7.606 (m, 4H, H-5,6,7,8), 6.908 (s, 1H, H-3'), 6.779 (s, 1H, H-4'), 6.296 (s, 1H, H-5'), 5.551 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

ESI-MS (%): 375[M+1] $^+$.

实施例 55 3-[3'-(4"-甲氧苯甲酰)吡咯-N-亚甲基]-二氢喹啉酮-2 (44)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 44 的制备, 不同点在于以 3-(4'-甲氧苯甲酰)吡咯与 2-氯-3-氯甲基-二氢喹啉进行反应得化合物 44

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.773(d,2H, $J=8.4\text{Hz}$,2,6-ArH),7.651(s,1H, QU4-H),7.616(d,1H, $J=7.8\text{Hz}$ QU5-H),7.563(s,1H,Pyr2-H),7.484(t,1H, $J=7.5\text{Hz}$,QU7-H),7.304(d,1H, $J=8.1\text{Hz}$,QU8-H)7.160(t,1H, $J=7.5\text{Hz}$,QU6-H)7.024(d,2H, $J=8.4\text{Hz}$,3,5-ArH)8.001(m,1H, $J=2.4\text{Hz}$,Pyr5-H),6.524(t,1H, $J=2.1\text{Hz}$,Pyr4-H)5.078(s,2H, $-\text{CH}_2\text{N}$),3.817(s,3H, $-\text{OCH}_3$)

ESI-MS:m/z(Intensity):359.6(5.0E5, M^+),74.4(5.5E6, M^+-285)

实施例 56 3-[2'-(4"-氯苯甲酰)吡咯-N-亚甲基]-二氢喹啉酮-2 (45)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 45 的制备, 不同点在于以 2-(4'-氯苯甲酰)吡咯与 2-氯-3-氯甲基-二氢喹啉进行反应得化合物 45

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.728(d,2H, $J=8.7\text{Hz}$,2,6-ArH),7.556~7.421 (m,5H),7.293(d,1H, $J=8.1\text{Hz}$,QU8-H)8.106(t,1H, $J=7.5\text{Hz}$,QU6-H)7.048(s,1H,Pyr2-H)6.792(d,1H, $J=3\text{Hz}$)6.318(t,1H, $J=3\text{Hz}$,Pyr4-H)5.466(s,2H, $-\text{CH}_2\text{N}$)

ESI-MS:m/z(Intensity):363.5(1.23E6, M^+)

实施例 57 3-[3'-(4"-氯苯甲酰)吡咯-N-亚甲基]-二氢喹啉酮-2 (46)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 46 的制备, 不同点在于以 3-(4'-氯苯甲酰)吡咯与 2-氯-3-氯甲基-二氢喹啉进行反应得化合物 46

$^1\text{HNMR}$ (300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.762(d,2H, $J=8.7\text{Hz}$,2,6-ArH),7.650~7.542 (m,5H),7.484(t,1H, $J=8.1\text{Hz}$,QU7-H)7.302(d,1H, $J=8.4\text{Hz}$,QU8-H)7.159(t,1H, $J=7.5\text{Hz}$,QU6-H)7.029(t,1H, $J=2.1\text{Hz}$,Pyr5-H),6.548(t,1H, $J=2.1\text{Hz}$,Pyr4-H),5.080(s,2H, $-\text{CH}_2\text{N}$)

ESI-MS:m/z(Intensity):363.5(3.2E5, M^+),219.4(2.5E5, M^+-144)

实施例 58 3-(2'-苯甲酰吡咯-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (47)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 47 的制备, 不同点在于以 2-苯甲酰吡咯与 2-氯-3-氯甲基-二氢喹啉进行反应得化合物 47

$^1\text{H NMR}$ (300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.715(d,2H,J=6.9Hz,QU5,8-H),7.598~7.281 (m,7H)7.106(t,1H,J=8.1Hz)7.038(s,1H,QU4-H)6.765(d,1H,J=4.2Hz,Pyr3-H)6.310(t,1H,J=3Hz,Pyr4-H)5.480(s,2H,-CH₂N)

ESI-MS:m/z(Intensity):329.5(1.9E6, M⁺),212.4(1.0E6, M⁺-117)

实施例 59 3-(2'-乙酰吡咯-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (48)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 48 的制备, 不同点在于以 2-乙酰苯甲酰吡咯与 2-氯-3-氯甲基-二氢喹啉进行反应得化合物 48

$^1\text{H NMR}$ (300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.453(q,2H,J=8.1Hz,QU5,8-H)7.303~7.279 (m,2H) 7.198(dd,1H,J_间=1.8Hz, J_邻=3.9Hz, Pyr3-H)7.104(t,1H,J=6.9Hz,QU6-H) 6.858(s,1H,QU4-H)6.247(t,1H,J=3.9Hz,Pyr4-H)5.371(s,2H,-CH₂N),3.367(s,3H,-COCH₃)

ESI-MS:m/z(Intensity):267.5(4.6E6, M⁺)

实施例 60 3-(3'-乙酰吡咯-N-亚甲基)二氢喹啉酮-2 (59)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 59 的制备, 不同点在于以 3-乙酰吡咯与 2-氯-3-氯甲基-二氢喹啉进行反应得化合物 59

$^1\text{H NMR}$ (300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.457(s,1H,QU4-H)8.190(t,1H,QU7-H)7.603(s, 1H,Ind2-H)7.556(d,2H,J=8.1Hz,QU5,8-H)7.468(t,1H,J=8.1Hz,QU6-H)7.320~7.097(m,4H,Ind4,5,6,7-H)5.363(s,2H,-CH₂N)2.361(s,3H,-COCH₃)

ESI-MS:m/z(Intensity):317.5(3.6E5, M⁺)275.5(1.6E54-42,M⁺+1-42)

实施例 61 3-(3'-乙酰吡咯-N-亚甲基)-7 甲氧基二氢喹啉酮-2 (58)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 58 的制备, 不同点在于以 3-乙酰吡咯与 2-氯-3-氯甲基-7 甲氧基二氢喹啉进行反应得化合物 58

$^1\text{H NMR}$ (300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.438(s,1H,QU4-H)8.184(q,1H,Ind6-H)7.588(m,2H)7.493(d,1H,QU5-H)7.244~7.167(m,2H)6.801(sd,1H,J=3.3Hz,QU8-H) 6.760(dd,1H,J_邻=9Hz,J_间=3Hz,QU6-H) 5.311(s,2H,-CH₂N)3.358(s,3H,-OCH₃) 2.491(s,3H,-COCH₃)

ESI-MS:m/z(Intensity):297.5(6.0E6, M⁺-49)

实施例 62 3-[2'-(4'-硝苯甲酰)吡咯-N-亚甲基]-7 甲氧基二氢喹啉酮-2 (49)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 49 的制备, 不同点在于以 2-(4'-硝苯羰基吡咯与 3-氯甲基-7 甲氧基二氢喹啉酮-2 进行反应得化合物 49

^1H NMR(300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.303(d,2H,J=9Hz,3,5-ArH),7.919(d,2H,J=9Hz, 2,6-ArH),7.520(s,1H,Pyr5-H)7.483(d,1H,J=8.7Hz,QU5-H)7.119(s,1H,QU4-H), 6.795(d,1H,J=2.7Hz,QU8-H),6.773(s,1H,Pyr3-H),6.739(dd,1H, $J_{\text{邻}}=8.7\text{Hz}$, $J_{\text{间}}=2.7\text{Hz}$,QU6-H)6.320(dd,1H, $J_{\text{邻}}=4.2\text{Hz}$, $J_{\text{间}}=2.7\text{Hz}$,Pyr4-H) 5.452(s,2H,-CH₂N) 3.771(s,3H,-OCH₃)

ESI-MS:m/z(Intensity):404.6(5.6E5, M⁺)219.4(1.3E5,)

实施例 63 3-(2'-乙酰吡咯-N-亚甲基)-7 甲氧基二氢喹啉酮-2 (51)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 51 的制备, 不同点在于以 2-乙酰吡咯与 3-氯甲基-7 甲氧基二氢喹啉酮-2 进行反应得化合物 51

^1H NMR(300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.409(d,1H,J=8.7Hz,QU5-H)7.273(t,1H, J=1.8Hz,Pyr4-H)7.174(dd,1H, $J_{\text{邻}}=3.6\text{Hz}$, $J_{\text{间}}=1.5\text{Hz}$,Pyr5-H)6.885(s,1H,QU4-H) 6.792(d,1H,J=2.7Hz,QU8-H)6.726(dd, $J_{\text{邻}}=8.7\text{Hz}$, $J_{\text{间}}=2.1\text{Hz}$,QU6-H)6.219 (dd, 1H, $J_{\text{邻}}=2.1\text{Hz}$, $J_{\text{间}}=3.3\text{Hz}$ Pyr3-H)5.330(s,2H,-CH₂N)3.771(s, 3H,-OCH₃) 2.341 (s,3H,-COCH₃)

ESI-MS:m/z(Intensity):297.5(1.8E6, M⁺)

实施例 64 3-[3'-(4"-甲氧苯羰基)吡咯-N-亚甲基]-7-甲氧基-二氢喹啉酮-2 (53)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 53 的制备, 不同点在于以 3-(4'-甲氧基苯羰基)吡咯与 2-氯-3-氯甲基-7-甲氧基二氢喹啉进行反应得化合物 53

^1H NMR(300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.763(d,2H,J=8.7Hz,2,6-ArH),7.646(s,1H, QU4-H)7.555~7.523(m,2H),7.024 (d,2H,J=9Hz,3,5-ArH) ,6.980(t,1H,Pyr5-H) 6.7996.765(m,2H,QU6,8-H),6.502(t, 1H,Pyr4-H)5.021(s,2H,-CH₂N)3.819(s,3H,QU-OCH₃)3.782(s,3H,Ar-OCH₃)

EI-MS:m/z(100%):388.5(M⁺)

实施例 65 3-[3'-(4"-氯苯羰基)吡咯-N-亚甲基]-7 甲氧基-二氢喹啉酮-2 (57)

根据实施例化合物 41 的制备方法, 化合物 57 的制备, 不同点在于以 3-(4'-氯苯羰基)吡咯与 2-氯-3-氯甲基-7-甲氧基二氢喹啉进行反应得化合物 57

^1H NMR(300MHz,DMSO), δ (ppm): 8.752(d,2H,J=8.1Hz2,6-ArH),7.640 (s,1H, QU4-H),7.569~7.522(m,4H),7.003(t,1H,J=2.1Hz,Pyr5-H)6.797~6.773 (m,2H),6.527(t,1H,J=2.1Hz,Pyr4-H)5.023(s, 2H,-CH₂N)3.782(s,3H,-OCH₃)

EI-MS(%):392(27,M⁺),188.2(100, M⁺-204)

化合物 42 和 43 按以上方法制备

药理实验:

实验例 1 本发明化合物对 cisplatin 所致小鼠急性肾损伤的保护作用

方法

取雄性昆明(KM)小鼠，16g~22g，按体重随机分为溶剂对照组和顺铂模型组、给药组，每组8只。对照组腹腔注射生理盐水，顺铂以生理盐水溶解，腹腔注射，按7mg/kg。以上各给药体积均为0.4ml/20g，于注射顺铂前2天开始给药，注射顺铂后第3天、5天、7天分别眼球取血，用试剂盒检测血清BUN、Scr，并称体重。

结果见表1、2、3、4、5、6和7。

表 1 化合物对顺铂造成小鼠肾损伤的保护作用(造模后 3 天)

样品	浓度 (mg/kg)	体重 (g)		Scr		BUN		WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
		开始	结束	(mg/dL)	降低 (%)	(mg/dL)	降低 (%)	
阴性对照组		22.7±1.2	28.7±2.7	1.59±0.17		28.11±5.24		7.1±0.52
顺铂	7	21.3±1.0	18.4±2.4	2.55±1.06	60.56↑	32.94±31.53	17.19↑	3.0±1.25
Losartan	25	21.5±1.9	17.8±2.0	2.13±0.68	16.37	49.23±37.99	-	2.8±0.92
	50	21.2±1.7	18.8±1.3	1.93±0.40	24.56	30.93±19.40	6.10	5.1±1.33
秦皮乙酸乙酯	50	21.2±1.2	18.5±2.1	2.31±0.93	9.65	35.16±18.63	-	ND
	100	20.3±1.6	17.8±1.7	2.52±0.51	1.40	28.17±6.43	14.47	ND
秦皮正丁醇	50	22.0±1.1	17.8±2.5	2.70±0.82	-	37.40±22.56	-	ND
	100	21.0±1.3	18.2±1.2	2.34±0.99	8.33	26.25±12.42	20.31	ND
25	25	20.5±1.8	19.5±1.4	2.15±0.57	15.79	54.58±33.43	-	ND
	50	21.7±2.6	18.5±2.7	2.79±0.55	-	24.55±9.79	25.47	ND
26	25	21.5±1.5	18.8±1.7	2.25±0.59	11.69	21.98±9.45	24.16	ND
	50	21.7±0.5	18.7±1.8	2.57±0.62	-	53.66±45.02	-	ND
27	25	21.5±1.0	18.8±0.4	2.35±0.40	7.96	21.21±4.04	35.61	4.2±2.05
	50	20.8±1.5	19.3±0.8	2.51±0.82	1.49	18.13±3.44	44.95	3.6±0.77
32	25	20.7±2.0	18.5±1.4	2.21±0.67	13.24	22.64±4.86	31.28	4.1±1.18
	50	20.8±1.2	19.3±2.4	2.33±0.48	8.58	21.94±8.00	33.39	4.9±0.61
31	25	21.0±1.7	19.2±1.6	1.86±0.31	27.23	16.57±5.31	49.69	4.4±1.34
	50	21.5±1.0	19.0±1.7	1.98±0.62	22.38	16.35±2.73	50.36	5.0±1.47

表 2 化合物对顺铂造成小鼠肾损伤的保护作用(造模后 5 天)

样品	浓度		体重 (g)		Scr		BUN	
	(mg/kg)		开始	结束	(mg/dL)	降低 (%)	(mg/dL)	降低 (%)
阴性对照组			22.7±1.2	28.7±1.9	1.71±0.49		35.15±6.63	
顺铂	7		21.3±1.0	17.3±1.2	2.48±0.75	44.94↑	72.10±13.63	105.08↑
Losartan	25		21.5±1.9	18.7±4.2	2.37±1.05	4.65	36.29±2.30	49.67
	50		21.2±1.7	18.4±3.0	2.21±0.67	11.05	46.70±9.01	35.22
秦皮乙酸乙酯	50		21.2±1.2	15.8±3.8	2.39±1.02	3.88	80.89±21.77	-
	100		20.3±1.6	19.0±3.6	2.39±0.84	3.88	39.45±11.73	45.28
秦皮正丁醇	50		22.0±1.1	16.8±3.8	2.86±0.45	-	33.92±0.44	52.96
	100		21.0±1.3	16.2±2.2	2.22±0.04	10.47	75.46±42.28	-
25	25		20.5±1.8	15.7±0.6	2.54±0.74	-	95.77±52.92	-
	50		21.7±2.6	17.3±3.8	2.27±0.99	8.53	56.80±33.68	21.21
26	25		21.5±1.5	17.0±2.4	1.68±0.76	32.38	30.21±6.95	59.10
	50		21.7±0.5	18.0±4.0	2.57±0.76	-	25.57±4.67*	64.54
27	25		21.5±1.0	16.8±1.2	1.28±0.33	48.58	24.26±3.16*	66.35
	50		20.8±1.5	18.2±2.0	1.45±0.76	41.76	31.60±6.12	56.17
32	25		20.7±2.0	16.0±2.0	0.98±1.13*	60.51	37.42±3.65	48.09
	50		20.8±1.2	19.3±1.3	1.30±0.73	47.56	30.58±3.92*	57.58
31	25		21.0±1.7	17.0±1.7	0.89±0.65*	64.21	22.47±2.04*	68.83
	50		21.5±1.0	18.6±3.0	1.85±1.13	25.34	20.31±2.77*	71.83

表 3 化合物对顺铂造成小鼠肾损伤的保护作用(造模后 3 天)

样 品	浓度 (mg/kg)	Scr		BUN	
		(mg/dL)	降低(%)	(mg/dL)	降低(%)
阴性对照组		1.68±0.29		30.52±2.52	
顺铂	7	1.54±0.32	7.9	39.71±5.86	30.1 ↑
Losartan	25	1.38±0.35	10.3	15.17±2.86	61.8
	50	1.45±0.49	5.9	16.80±8.28	57.7
XLF-III-43	12.5	1.54±0.84	-	17.17±3.44	56.8
	25	1.76±0.62	-	17.91±3.46	54.9
31	12.5	1.67±0.80	-	17.55±2.70	55.8
	25	1.42±0.32	7.9	19.79±4.56	50.2
32	12.5	2.20±0.25	-	26.38±4.50	33.6
	25	1.92±0.48	-	21.02±5.37	47.1

表 4 化合物对顺铂造成小鼠肾损伤的保护作用(造模后 5 天)

样 品	浓度 (mg/kg)	Scr		BUN	
		(mg/dL)	降低(%)	(mg/dL)	降低(%)
阴性对照组		1.26±0.21		28.15±4.13	
顺铂	7	1.13±0.15	10.4	32.02±5.65	13.7 ↑
Losartan	25	1.45±0.21	-	34.86±10.08	-
	50	1.42±0.38	-	42.68±17.80	-
XLF-III-43	12.5	1.14±0.07	-	18.87±3.28	41.1
	25	1.69±0.79	-	22.06±3.87	31.1
31	12.5	1.21±0.20	-	18.57±0.80	42.0
	25	1.21±0.27	-	19.60±4.69	38.8
32	12.5	1.33±0.42	-	30.98±7.87	3.2
	25	1.45±0.30	-	27.41±3.13	14.4

表 5 化合物对顺铂造成小鼠肾损伤的保护作用(造模后 7 天)

样 品	浓度 (mg/kg)	Scr		BUN	
		(mg/dL)	降低(%)	(mg/dL)	降低(%)
阴性对照组		0.85±0.14		26.27±5.55	
顺铂	7	0.78±0.17	8.8↓	47.44±7.38	80.6↑
Losartan	25	1.15±0.26	-	61.98±17.95	-
	50	1.17±0.30	-	40.50±19.03	14.6
XLF-III-43	12.5	0.91±0.42	-	26.46±6.32	44.2
	25	0.76±0.09	2.2	25.91±5.68	45.4
31	12.5	0.78±0.18	-	25.29±2.46	46.7
	25	0.83±0.21	-	25.65±6.16	45.9
32	12.5	0.58±0.14	25.0	35.65±5.79	22.7
	25	0.68±0.32	12.4	28.70±3.98	39.5

表 6 化合物对顺铂造成小鼠肾损伤的保护作用(造模后 5 天)

样 品	浓度 (mg/kg)	Scr		BUN	
		(mg/dL)	降低(%)	(mg/dL)	降低(%)
阴性对照组		0.22±0.15		25.56±0.77	
顺铂	7	0.15±0.08	-	28.32±1.89	10.8↑
45	12.5	0.16±0.19	-	24.70±8.28	12.78
	25	0.21±0.19	-	26.77±8.11	5.49
41	12.5	0.19±0.13	-	51.43±24.77	-
	25	0.29±0.10	-	26.32±5.01	7.06
46	12.5	0.59±0.24	-	33.96±7.91	-
	25	1.15±0.51	-	25.12±3.93	11.31

51	12.5	0.54±0.18	-	28.99±6.18	-
	25	0.38±0.11	-	26.91±7.08	4.96
58	12.5	0.69±0.14	-	117.85±53.96	-
	25	0.56±0.20	-	96.71±88.08	-
47	12.5	0.83±0.92	-	41.43±30.09	-
	25	0.59±0.37	-	64.35±47.70	-
60	12.5	0.28±0.17	-	31.11±3.11	-
	25	0.40±0.23	-	29.31±9.84	-
61	12.5	0.58±0.20	-	72.27±41.03	-
	25	0.33±0.11	-	86.86±44.42	-

表 7 化合物对顺铂造成小鼠肾损伤的保护作用(造模后 7 天)

样 品	浓度 (mg/kg)	Scr		BUN	
		(mg/dL)	降低(%)	(mg/dL)	降低(%)
阴性对照组		0.53±0.18		24.39±1.52	
顺铂	7	0.40±0.24	-	48.61±17.22 ^{##}	99.41 ↑
45	12.5	0.33±0.11	17.68	46.39±20.96	4.57
	25	0.46±0.16	-	21.15±6.69 ^{**}	56.49
41	12.5	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
46	12.5	0.52±0.06	-	42.88±21.80	11.78
	25	0.46±0.12	-	58.81±39.88	-
51	12.5	0.43±0.11	-	25.04±4.61	48.48
	25	0.50±0.04	-	63.71±40.78	-
58	12.5	-	-	-	-
	25	0.44±0.12	-	24.72±7.29 [*]	49.14

47	12.5	0.22±0.12	44.07	42.48±17.31	12.61
	25	0.28±0.06	30.51	24.17±6.45*	50.27
60	12.5	0.20±0.05	49.15	26.78±5.92*	44.90
	25	0.48±0.20	-	26.85±5.03*	44.76
61	12.5	0.45±0.21	-	16.70±4.43*	65.65
	25	0.20±0.06	49.15	48.17±0.25	0.89

#: P<0.05, 与对照相比; ##: P<0.01, 与对照相比

*: P<0.05, 与模型相比; **: P<0.01, 与模型相比

实验例 2 本发明化合物 31 在体外对 cisplatin 所引起肾脏细胞损伤的保护作用

(一) MTT 法观察本发明化合物 31 与 cisplatin 合用对大鼠肾系膜细胞 rMCs 生长的影响

取指数生长期的大鼠肾系膜细胞 (rat mesangial cell, rMC), 加入适量含 0.02%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶液消化细胞, 使贴壁细胞脱落。用 RPMI1640 培养基(含 20%小牛血清)制备成浓度为 10^4 /ml 的细胞悬液, 于 96 孔板中每孔接种 0.1ml。将平板置于 37°C、5%CO₂ 培养箱, 24 小时后加不同浓度药物。设对照组(n=6), cisplatin 0.12、0.37、1.0、3.0、10.0、30 μ mol/L 不同浓度组, 本发明化合物 31 在 0、33、100 μ mol/L 分别与顺铂上述不同浓度合用组, 每组设 3 个平行孔。

继续培养 72 或 96 小时, 弃去培养基, 每孔加入 0.1ml 无血清 RPMI1640 培养液配制的 MTT(0.5mg/ml), 37°C 温育 4 小时, 活细胞可将 MTT 还原为甲簪。弃上清液, 加入 150 μ l DMSO 溶解甲簪, 于平板振荡器上充分振摇。用酶标仪以 450nm 作参比波长, 于 570nm 检测波长测定吸光度(OD)。

细胞生长抑制率%=1-(加药组细胞 OD 值/对照组细胞 OD 值)×100%

结果如下:

MTT 实验的原理是根据活细胞能将溴化四氮唑蓝 (MTT) 还原为一蓝紫色的可溶于 DMSO 的甲簪化合物, 而死细胞则无此能力。溶于 DMSO 的甲簪在 570nm 处有较强的吸收峰, 且此吸收值与活细胞数成较好的线性关系。用 MTT 法观察了本发明化合物 31 对 cisplatin 作用下大鼠肾系膜细胞的保护作用。

在 cisplatin 浓度较低时, 本发明化合物 31 对于 cisplatin 造成的 rMC 毒性具有保护作用。0.12 μ mol/L cisplatin 对 对照组、33 μ mol/L 本发明化合物 31 组、100 μ mol/L 本发明化合物 31 组细胞生长的抑制率分别为 10.7%、8.3%、3.8%; 0.37 μ mol/L cisplatin 对 对照组、33 μ mol/L 本发明化合物 31 组、100 μ mol/L 本发明化合物 31 组细胞生长的抑制率分别为 19.0%、12.8%、7.6%; 1 μ mol/L cisplatin 对 对照组、33 μ mol/L 本发明化合物 31 组、100 μ mol/L 本发明化合物 31 组细胞生长的抑制率分别为 25.4%、18.2%、12.0%。本发明化合物 31 对于 3 μ mol/L cisplatin、10 μ mol/L cisplatin 以及 30 μ mol/L cisplatin 造成的 rMC 毒性未见明显的保护作用。(见表 8, 附图 1)

表 8. 本发明化合物 31 对 cisplatin 引起大鼠肾系膜细胞 (rMC) 损伤的保护作用

31	Control		33 μ mol/L		100 μ mol/L	
	Cisplatin (μ mol/L)	Inhibition (%)	Cisplatin (μ mol/L)	Inhibition (%)	Cisplatin (μ mol/L)	Inhibition (%)
	0.12	10.7	0.12	8.3	0.12	3.8
	0.37	19.0	0.37	12.8	0.37	7.6
	1.0	25.4	1.0	18.2	1.0	12.0
	3.0	41.4	3.0	31.8	3.0	35.9
	10	63.7	10	59.7	10	64.5
	30	89.3	30	89.3	30	90.1

(二) MTT 法观察本发明化合物 31 与 cisplatin 合用对人肾小管上皮细胞(HKC)生长的影响

取指数生长期的人肾小管上皮细胞(HKC), 加入适量含 0.02%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶液消化细胞, 使贴壁细胞脱落。用 DMEM/F12 培养基(含 20%小牛血清)制备成浓度为 10^4 /ml 的细胞悬液, 于 96 孔板中每孔接种 0.1ml。将平板置于 37°C、5%CO₂ 培养箱, 24 小时后加不同浓度药物。设对照组(n=6), cisplatin 0.12、0.5、2.5 μ mol/L 不同浓度组, 本发明化合物 31 在 0、2、10、50 μ mol/L 分别与顺铂上述不同浓度合用组每组设 3 个平行孔。

继续培养 72 或 96 小时, 弃去培养基, 每孔加入 0.1ml 1 无血清 RPMI1640 培养液配制的 MTT(0.5mg/ml), 37°C 温育 4 小时, 活细胞可将 MTT 还原为甲簪。弃上清液, 加入 150 μ l DMSO 溶解甲簪, 于平板振荡器上充分振摇。用酶标仪以 450nm 作参比波长, 于 570nm 检测波长测定吸光度(OD)。

细胞生长抑制率%=1 - (加药组细胞 OD 值/对照组细胞 OD 值) \times 100%

结果如下:

用 MTT 法观察了本发明化合物 31 对 cisplatin 作用下大鼠 HKC 细胞的保护作用本发明化合物 31 对于 cisplatin 造成的 HKC 毒性具有保护作用。0.12 μ mol/L cisplatin 对对照组、2 μ mol/L 本发明化合物 31 组、10 μ mol/L 本发明化合物 31、50 μ mol/L 本发明化合物 31 组细胞生长的抑制率分别为 5.9%、3.8%、0.1%、0.1%; 0.50 μ mol/L cisplatin 对对照组、2 μ mol/L 本发明化合物 31 组、10 μ mol/L 本发明化合物 31、50 μ mol/L 本发明化合物 31 组细胞生长的抑制率分别为 11.1%、5.5%、3.5%、6.7%; 2.5 μ mol/L cisplatin 对对照组、2 μ mol/L 本发明化合物 31 组、10 μ mol/L 本发明化合物 31 组、50 μ mol/L 本发明化合物 31 组细胞生长的抑制率分别为 78.0%、69.6%、47.7%、43.1%。(见表 9, 图 2)

表 9. 本发明化合物 31 对 cisplatin 引起人肾小管上皮细胞(HKC)损伤的保护作用

31	Control		2 μ mol/L		10 μ mol/L		50 μ mol/L	
	Cisplatin (μ mol/L)	Inhibition (%)	Cisplatin (μ mol/L)	Inhibition (%)	Cisplatin (μ mol/L)	Inhibition (%)	Cisplatin (μ mol/L)	Inhibition (%)
	0.12	5.9	0.12	3.8	0.12	0.1	0.12	0.1
	0.5	11.1	0.5	5.5	0.5	3.5	0.5	6.7
	2.5	78.0	2.5	69.6	2.5	47.7	2.5	43.1

实验例 3 本发明化合物 31 对 Cisplatin 所致大鼠急性肾损伤的保护作用

(一) 检测方法

1. 血清生化指标:

血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr) 采用北京化工厂生产的临床诊断用试剂盒检测。

2. 考马氏亮蓝 G-250 法测定尿蛋白含量

2.1 原理

考马氏亮蓝 G-250 在酸性溶液中呈棕红色 (游离态), 当它与蛋白通过疏水作用结合后, 变为蓝色, 最大吸收峰在 595nm。以小牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准蛋白, 建立标准曲线。根据标准曲线推测尿蛋白浓度。

2.2 试剂配制

100mg G-250 溶解于 50ml 95% 乙醇中, 加入 85% (w/v) 的磷酸 100ml, 加水定容至 1L。

2.3 方法与操作步骤

标准曲线: 取标准蛋白 (1mg/ml) 0、5、10、20、40、60、80 μ l, 用双蒸水补至 100 μ l, 使得终浓度为 0、50、100、200、400、600、800 μ g/ml。加 5ml G-250 染液, 混匀, 室温放置 15min, 在 595nm 处测量 OD 值。

测定: 取尿液样本 100 μ l, 同上操作。

(二) 实验方法

50 只雄性 Wistar 大鼠按体重随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为溶剂对照组、cisplatin 模型组、cisplatin 合用 Benazapril 10mg/kg 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 10mg/kg 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 30mg/kg 组。溶剂对照组腹腔注射 10ml/kg 生理盐水; cisplatin 模型组腹腔注射 cisplatin 6mg/kg 一次; cisplatin 合用 benazepril 10mg/kg 组于腹腔注射 cisplatin 6mg/kg 前 3 天灌胃给予 benazepril 10mg/kg 共计 3 天, 以后每日灌胃给予 benazapril 10mg/kg 一次, 共计 4 日, 总计给药 7 天; cisplatin 合用本发明化合物 31 10mg/kg 组及 cisplatin 合用本发明化合物 31 30mg/kg 组分别于腹腔注射 cisplatin 6mg/kg 前 3 天灌胃给予本发明化合物 31 10mg/kg、30mg/kg 共计 3 天。以后每日分别灌胃给药本发明化合物 31 10mg/kg、30mg/kg 一次, 共计 4 日, 总计给药 7 天。以上各给药体积均为 10ml/kg。

每日称体重, 末次给药后收集大鼠 24 小时尿量, 用 G-250 法检测 24 小时尿蛋白量。末次给药后 24 小时, 以戊巴比妥钠 30mg/kg 麻醉大鼠, 于眼眶取血。分别用试剂盒检测血清 BUN、Scr、TGF- β_1 和血浆 ANGI II 浓度。

处死动物, 取肾组织, 称重, 计算肾脏系数。将 1/2 左侧肾脏用磷酸缓冲液 (pH7.4) 制备 10% 组织匀浆, 测其脂质过氧化及谷胱甘肽水平; 其余部分用 Trizol 制备 10% 组织匀浆, 提取总 RNA, 进行 RT-PCR, 分析肾组织 TGF- β_1 mRNA 水平。右侧肾用中性福尔马林固定做病理检查。

(三) 检测指标

与对照组相比较, 观察模型组、cisplatin 合用 bennazapril 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 10mg/kg 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 30mg/kg 组大鼠各组间血清生化及体重、尿蛋白、脏器指数的变化, 并于给药后 4 天处死大鼠, 取肾脏作病理检查。

(四) 实验结果

1. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠血清生化 (BUN 及 Scr) 水平的影响

给药后 7 天, cisplatin 模型组大鼠 BUN 及 Scr 水平较溶剂对照组明显升高, 分别增加 747.3% 及 285.4% ($P < 0.01$); cisplatin 合用 bennazapril 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 10mg/kg 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 30mg/kg 组大鼠与 cisplatin 模型组相比, BUN 水平显著降低, 分别降低 23.2% ($P < 0.01$)、40.0% ($P < 0.01$) 及 46.9% ($P < 0.01$)。Scr 水平显著降低, 分别降低 24.3% ($P < 0.05$)、32.3% ($P < 0.05$) 及 35.8% ($P < 0.05$) (见表 10)

表 10. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠血清生化 (BUN 及 Scr) 水平的影响(n=10)

Parameters	Group	$\bar{x} \pm s$	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
BUN (mg/dL)	Control	27.98±4.01		
	Cisplatin model	237.10±24.34 ^{##}	747.3	
	Cisplatin + Benazapril	182.18±62.43 ^{**}		23.2
	Cisplatin + 31(10mg/kg)	142.19±53.06 ^{**}		40.0
	Cisplatin + 31(30mg/kg)	125.84±67.06 ^{**}		46.9
Scr (mg/dL)	Control	1.14±0.56		
	Cisplatin model	4.41±0.73 ^{##}	285.4	
	Cisplatin + Benazapril	3.33±1.02 [*]		24.3
	Cisplatin + 31(10mg/kg)	2.96±1.20 [*]		32.3
	Cisplatin + 31(30mg/kg)	2.83±1.16 [*]		35.8

##: P<0.01 vs control, *: P<0.05 vs cisplatin model, **: P<0.01 vs cisplatin model

2. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠尿蛋白 (UP) 水平的影响

给药后 7 天, cisplatin 模型组大鼠 24 小时尿蛋白量较对照组明显升高 354.6% (P<0.01), cisplatin 合用 bennazapril 组、cisplatin 合用本发明化合物 3110mg/kg 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 30mg/kg 组大鼠与 cisplatin 模型组相比, 24 小时尿蛋白量明显下降, 分别下降 59.8% (P<0.05)、48.8% (P<0.05)、63.6% (P<0.05)。(见表 11)

表 11. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠尿蛋白 (UP) 水平的影响(n=10)

Group	Uric-protein (mg/day, $\bar{x} \pm s$)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
Control	1.24±0.72		
Cisplatin model	5.65±3.43 ^{##}	354.6	
Cisplatin + Benazapril	2.27±1.40 [*]		59.8
Cisplatin + 31 (10mg/kg)	2.89±0.60 [*]		48.8
Cisplatin + 31 (30mg/kg)	2.06±1.41 [*]		63.6

##: P<0.01 vs control, *: P<0.05 vs cisplatin model

3. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠体重及肾脏指数的影响

给药后 7 天, 大鼠体重明显降低, 肾组织肥大, 色暗红或灰白。cisplatin 合用 bennazapril 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 10mg/kg 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 30mg/kg 组大鼠, 体重亦明显降低, 肾组织肥大较轻, 色鲜红或暗红。三组体重减轻较小, 肾脏指数增加较少。其中 cisplatin 合用本发明化合物 31 30mg/kg 组大鼠肾脏指数与 cisplatin 模型组大鼠相比有统计学意义 (p<0.05) (见表 12)

表 12. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠体重及肾脏指数的影响(n=10)

Group	Body weight (g)		Kidney/body weight ratio (mg/100g)
	Initial	Increased	
Control	254.50±10.66	6.50±4.12	0.73±0.08
Cisplatin model	251.50±4.12	-41.67±16.93 ^{##}	0.93±0.08 ^{##}

Cisplatin + Benazapril	254.50±8.96	-27.14±14.68	0.85±0.11
Cisplatin + 31(10mg/kg)	266.00±9.66	-33.50±14.15	0.87±0.09
Cisplatin + 31(30mg/kg)	259.50±4.38	-27.00±14.18	0.83±0.06*

###: P<0.01 vs control, *: P<0.05 vs cisplatin model

实验例 4 本发明化合物 31 对大鼠 5/6 肾切除所致慢性肾功能不全的影响

(一) 检测方法

血清生化检测 BUN、Src 试剂盒为北京北化精细化学品有限责任公司生产；血浆 ANG II 放免试剂盒为北京北方生物技术研究所产品；TGF-β1 ELISA kit 为 Biotech 产品上海森雄科技实业有限公司分装。

尿蛋白测定 将大鼠置于代谢笼中收集 24 小时尿,采用考马氏亮蓝 G-250 法测定尿蛋白含量。以小牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准蛋白,建立标准曲线。根据标准曲线推算尿蛋白浓度,计算 24 小时尿蛋白量 (UP•day⁻¹)。

(二) 实验方法

参照《新药临床前研究指导原则》建立大鼠部分肾脏切除引起的慢性肾功能不全模型

1. 模型建立

取体重 200g-240g 雄性 Wistar 大鼠,腹腔注射戊巴比妥钠 35mg/kg,待麻醉后,手术摘除右肾,切除左肾上下极肾实质,止血,关闭腹腔,缝合。

2. 分组给药

实验共设 6 组,每组 10 只鼠,设假手术组、模型组、benazepril(4mg/kg)阳性对照组, losartan(10mg/kg)阳性对照组,本发明化合物 31 10mg/kg、30mg/kg 两个剂量给药组。

手术 4 周后,检测大鼠血清尿素氮、肌酐指标,依据血清尿素氮、肌酐水平随机分组,并开始给药。本发明化合物 31 为灌胃给药,每周 6 次,持续给药到 16 周(给药 12 周);benazepril 和 losartan,均为灌胃给药每周 6 次,持续给药至 16 周(给药 12 周)。假手术组、模型组灌胃 0.5%羧甲基纤维素钠 (CMC) 混悬液,给予体积为 10ml •kg⁻¹,持续给予溶剂对照至 16 周(给药 12 周)。

3. 检测指标

于术后 8、12、16 周,乙醚麻醉动物,眼球后静脉丛取血,检测血清 BUN、Scr 水平,放免法测定血浆 ANG II 水平,ELISA 法测定血浆 TGF-β₁ 水平,将大鼠置于代谢笼中收集 24 小时尿,测尿蛋白量 (UP•day⁻¹);每周称体重观察大鼠生长状况;术后 16 周(给药 12 周),除测定上述指标,各组分别处死动物,称量心脏重量,计算心脏指数,取肾脏做病理。

(三) 实验结果

1. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠 BUN 水平的影响

结果见表 13。与假手术组相比,模型组大鼠 BUN 水平在术后一直维持较高水平,在术后 4 周升高 46.5%(P<0.01),术后 8 周升高 71.7%(P<0.01),术后 12 周升高 127.7%(P<0.01),术后 16 周升高 84.2%(P<0.01)。各给药组术后 8 周与模型组相比无明显差别。术后 12 周, losartan 组与模型组相比下降 26.8%, benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg、30mg/kg 两个剂量与模型组相比无明显差别;术后 16 周 losartan 组、benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg、本发明化合物 31 30mg/kg 组与模型组相比分别下降 22.1% (P<0.01)、14.7%、13.2%、19.9%(P<0.05)。

表 13. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠 BUN 水平的影响

Weeks after operation	Group	BUN (mg •dl-1)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
4	SM	31.13±2.73		
	Model	45.61±3.10 ^{##}	46.5	
	Losartan	47.88±3.89 ^{##}	53.8	
	Benazepril	47.68±2.51 ^{##}	53.2	
	31 10mg/kg	45.99±8.53 ^{##}	47.7	
	31 30mg/kg	45.41±3.51 ^{##}	45.8	
8	SM	16.43±1.68		
	Model	28.21±1.58 ^{##}	71.7	
	Losartan	29.81±6.59		-5.7
	Benazepril	27.93±3.88		1.0
	31 10mg/kg	32.12±6.87		-13.9
	31 30mg/kg	27.72±6.23		1.7
12	SM	17.07±2.44		
	Model	38.85±4.41 ^{##}	127.7	
	Losartan	28.44±2.93 ^{**}		26.8
	Benazepril	41.95±5.24		-8.0
	31 10mg/kg	32.13±14.27		17.3
	31 30mg/kg	40.02±7.74		-3.0
16	SM	25.34±4.52		
	Model	46.66±9.38 ^{##}	84.2	
	Losartan	36.36±4.90 ^{**}		22.1
	Benazepril	39.78±8.26		14.7
	31 10mg/kg	40.49±6.38		13.2
	31 30mg/kg	37.38±6.67 [*]		19.9

##: P<0.01 vs SM, *: P<0.05 vs model group, **: P<0.01 vs model group

2. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠 Scr 水平的影响

结果见表 14。与假手术组相比，模型组大鼠 Scr 水平在术后 4 周、术后 8 周无明显变化，术后 12 周升高 104.0%(P<0.01)，术后 16 周升高 68.2%(P<0.01)。与模型组相比，术后 12 周 losartan 组、benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg 组、本发明化合物 31 30mg/kg 组与模型组相比分别下降 13.2%、15.5%、7.3%、39.0%(P<0.01)。术后 16 周 losartan 组、benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg、本发明化合物 31 30mg/kg 组与模型组相比分别下降 21.4%(P<0.05)、14.9%、20.3%、34.9%(P<0.01)。

表 14. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠 Scr 水平的影响

Weeks after operation	Group	Scr (mg •dl ⁻¹)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
4	SM	1.35±0.38		
	Model	1.52±0.25	13.0	
	Losartan	1.52±0.27	12.9	
	Benazepril	1.52±0.21	13.2	
	31 10mg/kg	1.47±0.25	9.3	
	31 30mg/kg	1.50±0.16	11.6	
8	SM	1.41±0.30		
	Model	1.76±0.26	24.6	

12	Losartan	1.80±0.49		-2.2
	Benazepril	1.69±0.57		4.0
	31 10mg/kg	1.84±0.27		-4.7
	31 30mg/kg	1.55±0.30		11.9
	SM	0.88±0.31		
	Model	1.79±0.62 ^{##}	104.0	
16	Losartan	1.55±0.52		13.2
	Benazepril	1.51±0.39		15.5
	31 10mg/kg	1.66±0.63		7.3
	31 30mg/kg	1.09±0.19 ^{**}		39.0
	SM	0.98±0.36		
	Model	1.65±0.27 ^{##}	68.2	
	Losartan	1.29±0.37 [*]		21.4
	Benazepril	1.40±0.56		14.9
31 10mg/kg	1.31±0.49		20.3	
31 30mg/kg	1.07±0.40 ^{**}		34.9	

##: P<0.01 vs SM, *: P<0.05 vs model group, **: P<0.01 vs model group

3. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠尿蛋白 (UP) 水平的影响

结果见表 15。与假手术组相比，模型组大鼠 UP•day⁻¹ 水平明显升高，术后 8 周时升高 314.1%(P<0.01)，术后 12 周升高 280.3%(P<0.01)，术后 16 周升高 816.9%(P<0.01)。术后 8 周 losartan 组、benazepril 组、本发明化合物 31 30mg/kg 组与模型组相比分别下降 49.1%(P<0.05)、48.2% (P<0.05)、46.7% (P<0.05)，本发明化合物 31 10mg/kg 组与模型组相比未见下降；术后 12 周 losartan 组、benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg 组、本发明化合物 31 30mg/kg 组与模型组相比分别下降 27.3%(P<0.05)、26.6%、30.3%(P<0.05)、36.6%(P<0.05)；术后 16 周 losartan 组、benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg 组、本发明化合物 31 30mg/kg 组与模型组相比分别下降 61.0%(P<0.01)、51.4%(P<0.05)、40.1%(P<0.05)、72.3%(P<0.01)。

表 15. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠尿蛋白 (UP) 水平的影响

Weeks after operation	Group	UP (mg •day ⁻¹)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
8	SM	6.70±4.16		
	Model	27.74±11.88 ^{##}	314.1	
	Losartan	14.12±6.94 [*]		49.1
	Benazepril	14.37±6.61 [*]		48.2
	31 10mg/kg	29.22±22.93		-5.3
	31 30mg/kg	14.78±3.72 [*]		46.7
12	SM	14.56±3.91		
	Model	55.00±10.59 ^{##}	280.3	
	Losartan	39.97±18.76 [*]		27.3
	Benazepril	40.35±19.16		26.6
	31 10mg/kg	38.33±12.70 [*]		30.3
	31 30mg/kg	34.87±10.25 [*]		36.6
16	SM	11.49±5.12		
	Model	105.38±38.61 ^{##}	816.9	
	Losartan	41.06±21.61 ^{**}		61.0
	Benazepril	51.19±32.68 [*]		51.4
	31 10mg/kg	63.08±19.44 [*]		40.1
	31 30mg/kg	29.21±13.70 ^{**}		72.3

##: P<0.01 vs SM, *: P<0.05 vs model group, **: P<0.01 vs model group

4. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠体重的影响

结果见表 16。术后 4 周假手术组、模型组、losartan 组、benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg 组、本发明化合物 31 30mg/kg 组体重未见明显差异。与假手术组相比，术后 16 周模型组大鼠、losartan 组、benazepril 组体重下降约 35g(10%)；本发明化合物 31 10mg/kg、本发明化合物 31 30mg/kg 组下降约 10g(2%)。本发明化合物 31 10mg/kg、本发明化合物 31 30mg/kg 组体重下降幅度较小。

表16. 本发明化合物31对5/6肾切除模型大鼠体重的影响

Weeks after operation	Group	Body weight(g)
4	SM	272.5±6.9
	Model	284.1±16.5
	Losartan	282.0±18.1
	Benazepril	284.3±15.6
	31 10mg/kg	278.8±28.5
	31 30mg/kg	271.3±19.6
16	SM	389.0±25.6
	Model	352.7±19.8 [#]
	Losartan	359.3±33.8
	Benazepril	353.1±48.8
	31 10mg/kg	378.3±49.6
	31 30mg/kg	382.5±28.5 [*]

#: P<0.05 vs SM, *: P<0.05 vs model group

5. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠心脏指数的影响

结果见表 17。与假手术组相比，术后 16 周模型组大鼠心脏指数升高 17.8%(P<0.01)。losartan 组、benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg、本发明化合物 31 30mg/kg 组与模型组相比分别下降 18.0%(P<0.01)、6.4%、2.4%、13.7%(P<0.01)。其中 losartan 组、本发明化合物 31 30mg/kg 组心脏指数下降较为明显，与假手术组相近。

表17. 本发明化合物31对5/6肾切除模型大鼠心脏指数的影响

Weeks after operation	Group	Heart /Body weight Index (g/100g Body weight)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
16	SM	0.293±0.015		
	Model	0.345±0.030 ^{##}	17.8	
	Losartan	0.283±0.037 ^{**}		18.0
	Benazepril	0.323±0.060		6.4
	31 10mg/kg	0.337±0.076		2.4
	31 30mg/kg	0.298±0.032 ^{**}		13.7

##: P<0.01 vs SM, **: P<0.01 vs model group

实验例5 本发明化合物 31 对链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病模型的影响

(一) 检测方法:

血清生化检测 采用荷兰威同 selectra-E 全自动生化分析仪测定

尿蛋白测定 将大鼠置于代谢笼中收集 24 小时尿液,采用考马氏亮蓝 G-250 法测定尿蛋白含量。以小牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准蛋白,建立标准曲线。根据标准曲线推算尿蛋白浓度,计算 24 小时尿蛋白量 (UP•day⁻¹)。

(二) 实验方法:

1. 模型建立

取体重 200g-240g 雄性 Wistar 大鼠,腹腔注射链脲霉素 (streptozotocin STZ Sigma 公司产品) 60mg/kg (以 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH=7.4) 配成所需要的浓度)

2. 分组给药

实验共设 4 组,设对照组、模型组、losartan(10mg/kg)组,本发明化合物 31 10mg/kg 给药组。造模同时给药。本发明化合物 31 为灌胃给药,每周 6 次,持续给药到 24 周; losartan 为灌胃给药,每周 6 次,持续给药至 24 周。对照组、模型组灌胃 0.5%羧甲基纤维素钠 (CMC) 混悬液,给予体积为 10ml •kg⁻¹,持续给予至 24 周。

3. 检测指标

于造模后 4、8、12、16、24 周,乙醚麻醉动物,眼球后静脉丛取血,检测血清 BUN、Scr、Glu 水平,放免法测定血浆 ANG II 水平,将大鼠置于代谢笼中收集 24 小时尿,测定尿蛋白量 (UP•day⁻¹);每周称体重观察大鼠生长状况;术后 16 周、24 周,除测定上述指标,各组分别处死动物,取肾脏做病理。

(三) 实验结果

1. 造模后 4 周 (见表 18)

与对照组大鼠相比,模型组大鼠 Glu 水平升高 473.7%; BUN 水平升高 61.8%(P<0.05), Scr.水平升高 18.1%(P<0.05),说明糖尿病大鼠模型造模成功,且大鼠肾功能已出现损伤。各给药组大鼠 Glu、BUN、Scr.亦升高,肾功能未见明显改善。本发明化合物 31 组大鼠 ANGII 水平均较模型组低。

表 18. 本发明化合物 31 对链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病模型的各项指标的影响 (造模后 4 周 n=6)

Group	Glu (mmol/L)	BUN (mmol/L)	Scr (umol/L)	Ang (pg/ml)
Control	5.7±1.2	8.7±0.6	94.0±11.8	367.7±43
Model	32.7±1.8 [#] ↑ 473.7%	14±0.7 [#] ↑ 61.8%	111.0±8.5 [#] ↑ 18.1%	257.6±43.9
Losartan	26.4±4.9	11.6±1.4	106.0±15.8	308.1±79
31	27±6.3	12.9±2.6	107.8±11.9	191.6±35.4

#: P<0.05, vs control group

2. 造模后 8 周 (见表 19)

与对照组大鼠相比,模型组大鼠 Glu 水平升高 409.9%(P<0.05); BUN 水平升高 65.9%(P<0.05), Scr.水平升高 25.9%(P<0.05),各给药组大鼠 Glu、Scr.亦升高, losartan 组、本发明化合物 31 组大鼠 BUN 水平有所下降,分别较模型组降低 25.8%及 17.0%。

表 19. 本发明化合物 31 对链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病模型的各项指标的影响 (造模后 8 周 n=6)

Group	Glu (mmol/L)	BUN (mmol/L)	Scr (umol/L)
Control	6.5±0.5	8.8±0.4	80.1±7.2
Model	33.3±1.6 [#] ↑ 409.9%	14.7±1.8 [#] ↑ 65.9%	100.8±5.7 [#] ↑ 25.9%
Losartan	30.8±1.6	10.9±0.5 ↓ 25.8%	111.6±2.4

31	28.9±4.9	12.2±2.6 ↓17.0%	96.8±8.5
-----------	----------	-----------------	----------

#: P<0.05, vs control group

3. 造模后 12 周 (见表 20,21)

与对照组大鼠相比, 模型组大鼠 Glu 水平升高 484.2%(P<0.05); BUN 水平升高 88.2%(P<0.05), Scr.水平升高 21.1%。各给药组大鼠 Glu、BUN、Scr.亦升高。与对照组大鼠相比, 模型组大鼠尿蛋白水平升高 63.9%, losartan 组、本发明化合物 31 组大鼠分别较模型组降低 23.4%及 47.5%。

表 20. 本发明化合物 31 对链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病模型的各项指标的影响 (造模后 12 周)

Group	n	Glu (mmol/L)	BUN (mmol/L)	Scr (umol/L)	AII (pg/ml)
Control	6	5.5±0.9	8.5±0.5	88.1±23.8	144.4±75.2
Model	5	32.3±1.8 [#] ↑ 484.2%	15.9±1.1 [#] ↑ 88.2%	106.7±5.8 ↑ 21.1%	172.3±69.2
Losartan	6	28.9±4.1 ↓10.5%	14.8±2.0 ↓6.9%	105.6±5.9	137.1±53.7
31	6	30.4±9.8 ↓5.9%	13.8±2.8 ↓13.2%	113.9±13.5	156.8±32.5

#: P<0.05, vs control group

表 21. 本发明化合物 31 对链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病模型尿蛋白的影响 (造模后 12 周)

Group	n	UP (mg •day ⁻¹)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
Control	6	8.6±1.7		
Model	5	14.1±5.1 [#]	63.9	
Losartan	6	10.8±3.2		23.4
31	6	7.4±2.0*		47.5

#: P<0.05, vs control group *: P<0.05, vs model group

4. 造模后 16 周 (见表 22)

与对照组大鼠相比, 模型组大鼠 Glu 水平升高 512.5%(P<0.05); BUN 水平升高 127.7%(P<0.05), Scr.水平升高 42.6%。各给药组大鼠 Glu.亦升高, 本发明化合物 31 组大鼠 BUN 水平有所下降, 较模型组降低 19.1%; losartan 组 Scr.水平有所下降, 较模型组降低 27.1%; 血浆 ANGII水平, 各组无差异。与对照组大鼠相比, 模型组大鼠肾脏脏器指数升高 105.5%(P<0.05), 各给药组大鼠亦升高, 无显著差异。

表 22. 本发明化合物 31 对链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病模型的各项指标的影响 (造模后 16 周)

Group	n	Glu (mmol/L)	BUN(mmol/L)	Scr(umol/L)	AII (pg/ml)
Control	6	4.4±1.2	5.6±2.4	161.2±41.2	214.5±59.1
Model	5	27.4±1.1 [#] ↑ 512.5%	12.8±0.7 [#] ↑ 127.7%	229.9±66.1 ↑ 42.6%	195.2±41.0
Losartan	4	25.0±6.0	12.3±0.2	167.5±40.6 ↓ 27.1%	218.3±76.5
31	6	28.4±3.9	10.4±1.3 ↓ 19.1%	199.7±45.4 ↓ 13.1%	226.8±43.5

#: P<0.05, vs control group

5. 造模后 24 周 (见表 23, 24)

与对照组大鼠相比,模型组大鼠 Glu 水平升高 28.0%; BUN 水平升高 251.0%($P<0.05$), Scr 水平升高 12.6%。各给药组大鼠 Glu、BUN、Scr 亦升高;血浆 ANGI II 水平,各组无差异;与对照组大鼠相比,模型组大鼠肾脏脏指数升高 85%,各给药组大鼠亦升高。与对照组大鼠相比,模型组大鼠尿蛋白水平升高 119.3%, losartan 组、本发明化合物 31 组大鼠分别较模型组降低 34.9%及 47.0%。

表 23. 本发明化合物 31 对链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病模型的各项指标的影响(造模后 24 周)

Group	n	Glu (mmol/L)	BUN(mmol/L)	Scr(umol/L)	AII (pg/ml)
Control	5	5.3±0.6	4.2±1.6	94.8±8.1	155.1±77.3
Model	5	6.8±3.3 28.0%	↑ 17.6±7.1 [#] 251.0%	↑ 106.8±16.5 12.6%	↑ 122.6±59.3
Losartan	5	5.4±2.6	20.3±6.1	106.0±7.1	158.8±100.9
31	6	6.5±3.7	16.3±12.9	119.3±49.5	130.6±82.7

#: $P<0.05$, vs control group

表 24. 本发明化合物 31 对链脲霉素所致大鼠糖尿病肾病模型尿蛋白的影响(造模后 24 周)

GROUP	n	UP (mg •day ⁻¹)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
Control	5	6.11±1.02		
Model	5	13.4±10.2 [#]	119.3	
Losartan	5	8.72±1.75		34.9
31	6	7.1±3.2 [*]		47.0

#: $P<0.05$, vs control group, *: $P<0.05$, vs model group

本发明化合物 31 抗肾功能不全的作用机制研究

(一) 本发明化合物 31 对细胞凋亡的影响

1. 荧光显微镜检测凋亡细胞

方法:

取指数生长期的人肾小管上皮细胞(HKC),加入适量含 0.02%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶液消化细胞,使贴壁细胞脱落。用 DMEM/F12 培养基(含 20%小牛血清)制备成浓度为 10^4 /ml 的细胞悬液,于 24 孔板中每孔接种 0.5ml。将平板置于 37°C、5%CO₂ 培养箱,24 小时后加不同浓度药物。继续作用所需时间。收集 HKC 细胞, PBS 洗一次,离心,去上清,4°C,4%多聚甲醛固定细胞 20 分钟, PBS 洗一次,加入 Hoechst 33342 (终浓度为 10 μg/ml),37°C 染色 5-10 分钟。离心除去染液,滴片, Olympus 荧光显微镜下观察并照相。

结果:

细胞核形态变化为凋亡细胞最典型的特征,也是判断凋亡细胞的基本参数。凋亡细胞的主要形态学变化包括,细胞核固缩,染色体 DNA 广泛断裂,断片沿核膜浓聚成多型性高密度颗粒区;核膜皱缩,崩解后包裹染色体片段弥散于细胞浆。细胞全面皱缩,细胞膜皱缩外突,但细胞膜包裹细胞器或核片段形成凋亡小体。Hoechst 33342 是一种亲脂性染料,可跨膜进入细胞对 DNA 进行染色。本研究采用荧光染色方法观察了 cisplatin 合用不同浓度本发明化合物 31 (2-50 μmol/L) 作用 24 小时的 HKC 细胞形态变化。用荧光染料 Hoechst 33342 对细胞进行染色,在紫外光的激发下,发出蓝色荧光。从图可见 cisplatin 组凋亡细胞特征性形态明显,染色体 DNA 断裂并聚集成细小的凝聚块,并可见到凋亡小体。随着本发明化合物 31 药物浓度的加大,镜下调亡细胞比例逐渐减少,(见图 3)

2. 本发明化合物 31 对 cisplatin 诱导的 HKC 细胞染色体 DNA 断裂的影响

方法:

取指数生长期的人肾小管上皮细胞(HKC), 加入适量含 0.02%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶液消化细胞, 使贴壁细胞脱落。用 DMEM/F12 培养基(含 20%小牛血清)制备成浓度为 $10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液, 于培养瓶中接种 4ml。将培养瓶置于 37°C 、5% CO_2 培养箱, 24 小时后加不同浓度药物。继续作用所需时间。收集 2×10^6 个细胞, 用 PBS 洗涤两次, 重悬于 0.5ml 细胞消化液中(100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 25mmol/L EDTA pH8.0, 0.1mg/ml Proteinase K), 混匀后, 50°C 保温 12 小时, 消化后, 细胞用等体积苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提一次, 水相再用氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提两次除蛋白, 所得水相用 2.5 倍体积无水乙醇沉淀 DNA, 用醋酸钠(3mol/L)或醋酸铵(2.5mol/L)助沉, 12000g/min 取各管离心, 取上清 $18 \mu\text{l}$, 加 $5 \mu\text{l}$ 上样缓冲液, 在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 紫外光下观察并照相。

结果:

细胞凋亡最主要的生化标志是内源性钙-镁离子依赖性核酸内切酶被激活, 选择性降解染色体核小体间 DNA, 导致细胞 DNA 广泛断裂, 形成大小不一的 DNA 片段, 甚至单聚或寡聚核小体, 从而在琼脂糖凝胶电泳上呈现规则的、间隔 180~200bp 的“DNA 梯子”样条带。本文以 cisplatin 作为对照药, 用不同浓度的本发明化合物 31 (2-50 $\mu\text{mol/L}$) 合同 cisplatin 作用于 HKC 细胞 36 小时, 进行琼脂糖凝胶电泳, 由图可见随着本发明化合物 31 浓度的加大, cisplatin 诱导的“DNA 梯子”样条带逐渐减弱, 呈一定的剂量依赖性。本发明化合物 31 对 $10 \mu\text{mol/L}$ cisplatin 诱导的 HKC 凋亡具有明显的抑制作用。(见图 4)

(二) 抗氧化作用

1. 本发明化合物 31 对 Fe^{2+} -L-cys 诱发肝微粒体脂质过氧化的影响

方法:

取大鼠肝微粒体(蛋白含量约为 15mg/ml) 0.1ml; 加入不同浓度的药物和试剂 (1) 不同药物浓度 $10 \mu\text{l}$; (2) 1mmol/L FeSO_4 $50 \mu\text{l}$; (3) 10mmol/L L-半胱氨酸 $20 \mu\text{l}$; (4) PBS (pH7.4) 0.82ml。合计为 1ml。在 37°C 环境中反应 30min; 加 20%TCA 0.3ml 终止反应; 2000rpm 离心 15min; 取上清 1.0ml 加 0.67%硫代巴比妥酸 (TBA) 0.6ml, 沸水加热 10min; 冷却后, 在 532nm 处测 OD 值, 计算抑制率。

结果:

本发明化合物 31 在体外对 Fe^{2+} -L-半胱氨酸诱发的肝微粒体脂质过氧化作用具有一定的抑制作用, 且在 $10 \mu\text{g/ml}$ 达到最大抑制浓度, 抑制率为 32.3%。作用弱于酚羟基化合物 S-3-1。(见表 25, 图 5)

表 25. 本发明化合物 31 对 Fe^{2+} -L-cys 诱发肝微粒体脂质过氧化的影响

Group	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	OD value	$\bar{x} \pm s$	Inhibitory rate (%)
31	control	0.297	± 0.002	
	0.312	0.297	± 0.009	0.0%
	0.625	0.296	± 0.002	0.4%
	1.25	0.294	± 0.003	0.9%
	2.5	0.285	± 0.003	4.0%
	5	0.252	± 0.005	15.2%
	10	0.201	± 0.005	32.3%
	20	0.200	± 0.003	32.7%

S-3-1	control	0.297±0.002	
	0.25	0.149±0.002	49.8%
	0.5	0.046±0.001	84.4%
	1	0.025±0.002	91.5%
	2	0.021±0.001	92.9%
	4.00	0.024±0.002	91.8%

2. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠肾组织脂质过氧化水平的影响 方法:

上述药效学实验(本发明化合物 31 对顺铂所致大鼠急性肾损伤的保护实验)中大鼠,取肾组织匀浆(每克肾组织制备匀浆 10ml),按下述方法测定各组大鼠肾组织脂质过氧化水平,比较各给药组间差异。肾组织匀浆丙二醛(MDA, malondialdehyde)测定如下:取 0.1ml 匀浆,加入 0.1ml 10% SDS,室温静置 20min;加 2ml 0.1N HCl 和 1.0ml 1% TBA,混匀,100℃水浴,40min;冷却后加 4ml 正丁醇,振荡 3~5min,萃取,3000rpm 离心 10min;取上层正丁醇液 0.2ml 加至 96 孔板中,用酶标仪在 532nm 处测定 OD 值;标准曲线:以四乙氧基丙烷(TEP) 0、20、40、60、80、100 μmol/L 作为标准。

结果:

给大鼠腹腔单次注射 6mg/kg cisplatin 后 4 天,肾组织脂质过氧化水平明显高于对照组(P<0.05),cisplatin 合用本发明化合物 31 组、合用 Benazapril 组大鼠肾组织脂质过氧化水平降低,其中 cisplatin 合用本发明化合物 31 (30mg/kg)组大鼠肾组织脂质过氧化水平与 cisplatin 组相比下降 45.2%(P<0.05)。本发明化合物 31 在体内具有一定的抗脂质过氧化作用。(见表 26)

表 26. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠肾组织脂质过氧化水平的影响(n=10)

Group	MDA (μmol/L)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
Control	30.74±13.51		
Cisplatin	53.42±22.57 [#]	73.8	
Cisplatin + Benazapril	41.67±23.05		22.0
Cisplatin + 31 (10mg/kg)	42.03±18.84		21.3
Cisplatin + 31 (30mg/kg)	29.28±8.91 [*]		45.2

[#]: P<0.05 vs control, ^{*}: P<0.05 vs cisplatin model

3. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠肾组织谷胱甘肽水平的影响 方法:

上述药效学实验(本发明化合物 31 对 cisplatin 所致大鼠急性肾损伤的保护实验)中大鼠,取肾组织匀浆(每克肾组织制备匀浆 10ml),按下述方法测定各组大鼠肾组织谷胱甘肽水平,比较各给药组间差异。肾组织匀浆巯基(-SH)含量测定(DTNB 法)如下:

(1) 总 GSH(T-SH): 0.5ml 组织匀浆加入 1.5ml 的 0.2mol/L Tris 缓冲液(pH8.2), 0.1ml 0.01mol/L DTNB, 7.9ml 无水乙醇,使得总体积为 10ml;试剂空白同样制备;标准曲线:取还原型谷胱甘肽(GSH) 0、125、250、500、1000 μmol/L 作为标准;上述颜色反应 15min 后,在室温下 3000g 离心 15min;取上清 0.2ml 加至 96 孔板中,用酶标仪在 410nm 处测 OD 值。

(2) 非蛋白结合型 GSH (NP-SH): 2.5ml 组织匀浆加入 2ml 双蒸水, 0.5ml 50% TCA, 不断摇动 10~15min, 3000g 离心 15min;试剂空白同样制备;标准曲线:同上;1.0ml 滤液或上清液中加入 2.0ml 0.4mol/L Tris (pH8.9), 0.1ml 0.01mol/L DTNB, 摇匀;DTNB 加入后 5min 内,取上清 0.2ml 加至 96 孔板中,用酶标仪在 412nm 处测 OD 值。

(3) 蛋白结合型 GSH (PB-SH): 其值即为 T-SH 测量值减去 NP-SH 测量值。

结果:

给大鼠腹腔单次注射 6mg/kg cisplatin 后 4 天, 肾组织总 GSH (T-GSH)、蛋白结合型 GSH(PB-GSH)水平均低于对照组($P < 0.01$), 非蛋白结合型 GSH(NB-GSH)水平无明显变化。cisplatin 合用 Benazapril 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 组大鼠肾组织总 GSH (T-GSH)、蛋白结合型 GSH(PB-GSH)水平亦下降, 与 cisplatin 组相比无明显变化。(见表 27)

表 27. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠肾组织谷胱甘肽水平的影响(n=10)

Parameters	Group	GSH
		(μ mol/g kidney)
T-GSH	Control	21.32 \pm 2.64
	Cisplatin model	16.61 \pm 3.43 ^{##}
	Cisplatin + Benazapril	16.56 \pm 2.75
	Cisplatin + 31(10mg/kg)	15.82 \pm 2.49
	Cisplatin + 31(30mg/kg)	15.24 \pm 2.85
NB-GSH	Control	2.78 \pm 0.38
	Cisplatin model	2.96 \pm 0.25
	Cisplatin + Benazapril	3.86 \pm 1.51
	Cisplatin + 31(10mg/kg)	4.05 \pm 1.84
	Cisplatin + 31(30mg/kg)	2.80 \pm 0.34
PB-GSH	Control	18.54 \pm 2.49
	Cisplatin model	13.65 \pm 3.42 ^{##}
	Cisplatin + Benazapril	12.89 \pm 4.21
	Cisplatin + 31(10mg/kg)	11.84 \pm 3.33
	Cisplatin + 31(30mg/kg)	12.43 \pm 2.83

##: $P < 0.01$ vs control

(三) 与肾素-血管紧张素-TGF- β 通路相关的机制

1. 体外检测本发明化合物 31 对血管紧张素转化酶 (ACE) 的抑制作用

方法:

反应底物 HHL 以缓冲液 (HEPES 50mM, NaCl 300mM, pH=8.3) 配成 10mM, ACE 以缓冲液配成 80mU/ml, 每一药物浓度均设对照管, 依次如下表加药:

	HHL(10mM)	Drug or water	1N HCl	ACE(80mU/ml)
Test tube	125ul	10.4ul		125ul
Control tube	125ul	10.4ul	250ul	125ul

37°C, 振摇反应 30min 后加 125ul 1N HCl 终止反应; 各管 (实验管和对照管) 加入 1.5ml 乙酸乙酯振摇萃取, 取上层乙酸乙酯 1.0ml; 120°C、30min 挥发干乙酸乙酯, 加水 1ml 溶解, 紫外 228nm 处测吸收值。ACE 活性以如下公式 $(A_{228} - A_{228\text{control}}) \times 5.6 \times 10^{-3}$; 以加水管为对照计算各加药管的抑制率。

结果:

体外通过检测在血管紧张素转化酶作用下 HHL 反应生成马尿酸 (Hippuric acid) 的量

来判断血管紧张素转化酶的活性。本发明化合物 31 体外在 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L 浓度下对血管紧张素转化酶具有微弱的抑制作用。(见表 28)

表 28. 本发明化合物 31 在体外对血管紧张素转化酶 (ACE) 的抑制作用

Drugs	Concentration(mol/L)	Inhibitory rate (%)
Control	0	/
Captopril	10^{-9}	18.9
	10^{-8}	93.0
	10^{-7}	100
	10^{-6}	100
31	10^{-9}	16.1
	10^{-8}	15.2
	10^{-7}	0
	10^{-6}	0

2. 本发明化合物 31 对 TGF- β 1 受体结合试验的拮抗作用

方法:

将 Balb/c 3T3 或 NIH 3T3 细胞接种到 96 孔板, 培养条件为 37°C , 5% CO_2 , DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清)。培养 2—4 天后, 在细胞接近融合时, 将培养液换成结合缓冲液 (50mmol/L HEPES 中含有 NaCl, KCl, MgSO_4 和 CaCl_2), 加入 100 pmol/L [^{125}I]TGF- β 1 激发试验, 同时加入受试化合物。细胞培养 4 小时后, 弃去培养基, 用冰冷的结合缓冲液洗涤细胞。测定 10nmol/L TGF- β 1 的非特异性结合。细胞溶解在 Triton X-100 缓冲液中, 测定放射性。

结果:

实验结果见表 29, 本发明化合物 31 对 TGF- β 1 受体结合具有一定的抑制作用。

表 29. 本发明化合物 31 在体外对 TGF- β 1 受体结合试验的拮抗作用

Cell Lines	Concentration(μ mol/L)	Inhibitory rate (%)
NIH-3T3	0.1	15.0
	1.0	20.0
	10.0	25.6
Balb 3T3	0.1	0
	1.0	5.7
	10.0	12.2

3. 本发明化合物 31 对 cisplatin 致急性肾损伤大鼠血浆 TGF- β 1 升高的抑制作用

方法:

(1) 标准曲线制作: 设标准孔 8 孔, 每孔中各加入样品稀释液 $100\mu\text{l}$, 第一孔加标准品 $100\mu\text{l}$, 混匀后用加样器吸出 $100\mu\text{l}$, 移至第二孔。如此反复作对倍稀释至第七孔, 最后, 从第七孔中吸出 $100\mu\text{l}$ 弃去, 使之体积均为 $100\mu\text{l}$ 。第八孔为空白对照。

(2) 加样: 待测品孔中每孔各加入已激活的待测样品 $100\mu\text{l}$ 。将反应板置 37°C 120min。
洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次, 在滤纸上印干。

(3) 每孔中加入第一抗体工作液 50 μl。将反应板充分混匀后置于 37°C 60min。洗板：用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次，在滤纸上印干。

(4) 每孔加酶标抗体工作液 100 μl。将反应板置 37°C 60min。洗板：用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次，在滤纸上印干。

(5) 每孔加入底物工作液 100 μl，置于 37°C 暗处反应 5~10min。

(6) 每孔加入 1 滴终止液混匀。

(7) 在 492nm 处测定 OD 值。

(8) 结果计算：所有 OD 值均减去空白值后计算。以标准品 2000、1000、500、250、125、62.5、32 pg/ml 对 OD 值作标准曲线，根据该标准曲线计算相应的 TGF-β₁ 值。

结果：

上述 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠模型，腹腔注射 6mg/kg cisplatin 后 4 天，血浆 TGF-β₁ 水平较对照组动物增加 72.8% (P<0.05)，与 cisplatin 模型组相比，cisplatin 合用 bennazapril 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 10mg/kg 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 30mg/kg 组大鼠血浆 TGF-β₁ 水平分别下降 44.5% (P<0.05)、60.8% (P<0.01)、61.4% (P<0.01) (见表 30)

表 30. 本发明化合物 31 对 cisplatin 致急性肾损伤大鼠血浆 TGF-β₁ 水平的影响(n=10)

Group	TGF-β ₁ (ng/ml)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
Control	8.26±3.94		
Cisplatin model	14.28±6.35 [#]	72.8	
Cisplatin +Benazapril	7.92±3.70 [*]		44.5
Cisplatin + 31(10mg/kg)	5.60±2.03 ^{**}		60.8
Cisplatin + 31(30mg/kg)	5.52±1.84 ^{**}		61.4

#: P<0.05 vs control, *: P<0.05 vs cisplatin-model, **: P<0.01 vs cisplatin model

4. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠血浆 TGF-β₁ 水平的影响

方法：

同本发明化合物 31 对 cisplatin 致急性肾损伤大鼠血浆 TGF-β₁ 升高的抑制作用

结果：

结果见表 31。与假手术组相比，模型组大鼠血浆 TGF-β₁ 水平在术后 12 周无明显变化；术后 16 周开始升高，较假手术组升高 40.7%。术后 16 周 losartan 组、benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg、本发明化合物 31 30mg/kg 组与模型组相比分别下降 35.7%、9.3%、16.7%、39.9%。

表 31. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠血浆 TGF-β₁ 水平的影响

Weeks after operation	GROUP	TGF-β ₁ (ng • ml ⁻¹)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
12	SM	13.28±3.53		
	Model	12.24±4.44	-7.9%	
	Losartan	10.51±6.16		
	Benazepril	9.65±4.23		
	31 10mg/kg	12.57±4.61		
	31 30mg/kg	10.94±2.58		
16	SM	11.05±5.27		
	Model	15.54±5.67	40.7%	

Losartan	9.99±5.94	35.7%
Benazepril	14.10±6.07	9.3%
31 10mg/kg	12.94±3.44	16.7%
31 30mg/kg	9.34±1.07**	39.9%

**：P<0.01 vs model group

5. RT-PCR 观察本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠肾组织 TGF- β_1 mRNA 表达的影响

方法：

肾组织总 RNA 提取

(1) 在经过 DEPC 处理过的 50ml 离心管中放置 0.5g 液氮冻存的肾组织，加入 5ml Trizol 试剂，用匀浆器充分匀浆约 1~2min，随后 Vortex 振荡混匀，冰浴 10min。

(2) 加入 1.75ml 氯仿，充分振荡或上下来回颠倒数次，稍静止后出现分层，随即于 4 °C，12000rpm 离心 15min。

(3) 将上清（水相）转移于另一支干净 50ml 离心管中，注意不要吸到中间层的蛋白沉淀。加入等体积的异丙醇（4 °C 预冷）混匀。4 °C，12000rpm 离心 20min。

(4) 沉淀即所需要的总 RNA，倒掉上清后，加入 1.5ml 75% 乙醇，晃动洗涤一次并小心地倒掉乙醇。再 12000rpm 离心几秒钟，用 Tip 头吸干上清。然后加入 200 μ l DEPC 处理过的水溶解沉淀，储存于 -20°C 待用。

(5) 吸 20 μ l RNA 提取液加 DEPC 处理水至 400 μ l，于 260nm 及 280nm 测 OD 值。若 $OD_{260nm} : OD_{280nm} > 2$ ，则所测 RNA 较纯。由 $1 OD_{260nm} = 40 \mu g/ml$ RNA 推算 RNA 浓度。

大鼠 TGF- β_1 引物

Sense primer: 5' ATG GTG GAC CGC AAC AAC 3'

Anti-sense primer: 5' CCA AGG TAA CGC CAG GAA T

大鼠 β -actin 引物

Sense primer: 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3'

Anti-sense primer: 5' CTT CCT TAA TGT CAC GCA CGA TTT C 3'

RT-PCR

反应体系 (Add nuclease-free water to total volume 50 μ l):

	Volume(μ l)	Final concentration
AMV/Tf1 5 \times Buffer	10	1 \times
dNTP mix	1	0.2 mmol/L
Sense primer	1.2	50 pmol/L
Anti-sense primer	1.2	50 pmol/L
25mmol/L MgSO ₄	2	1 mmol/L
Tf1 DNA polymerase	1	0.1 U/ μ l
AMV reverse transcriptase	1	0.1 U/ μ l
RNA sample		4 μ g

反应条件：

1 cycle	48°C for 45min
1 cycle	94°C for 2min
35 cycles	94°C for 30second 55°C for 1min 68°C for 2min

1 cycle	68°C for 7min
1 cycle	4°C hold

电泳

取 RT-PCR 产物 40 μ l, 加 6 \times 上样缓冲液 8 μ l, 于 1.7% 琼脂糖凝胶电泳 (恒压 70V), 拍照。

结果:

上述药效学实验(本发明化合物 31 对 cisplatin 所致大鼠急性肾损伤的保护实验)中大鼠肾组织 RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 观察 DNA 条带强弱。结果 cisplatin 组大鼠的 DNA 条带强于对照组; cisplatin 合用 benazapril 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 组大鼠的 DNA 条带弱于 cisplatin 组大鼠, 通过半定量分析分别下降 42.0%、14.2%、44.5% (见图 6,7)。benazapril 和本发明化合物 31 均能不同程度地抑制 cisplatin 诱导的大鼠肾组织 TGF- β 1 mRNA 表达增高。

6. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠血浆 Ang II 水平的影响

方法:

血管紧张素 II (ANG II) 放免分析测定: 大鼠腹腔注射 35mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后, 用毛细玻璃管于眼底静脉丛取血 1ml, 置于冰水浴冷却的酶抑制剂抗凝管中, 摇匀, 即刻再置入冰水浴中冷却, 待离心时取出。4°C 1000rpm 离心 5min, 分离血浆 (在 -20°C 可保存 2 月)。

步骤:

在冰水浴中按下表加样:

	总管	NSB 管	标准管	样本管
缓冲液		150 μ l	—	—
ANG II 标准		—	100 μ l	—
样本血浆		—	—	100 μ l
¹²⁵ I-ANG II	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
ANG II 抗体		—	50 μ l	50 μ l
摇匀, 4°C 放置 15 小时以上				
分离剂		250 μ l	250 μ l	250 μ l

摇匀, 室温放置 15min、3500rpm 离心 15min, 吸去上清, 再测定各管沉淀物的放射性 Bi (cpm)。

结果计算: 结合百分率计算: 设 S₀ 管计数为 B₀, 各标准管或样品管计数为 B, 则计算公式如下: $\frac{B}{B_0} \% = \frac{B - NSB}{B_0 - NSB} \times 100\%$

Logit 计算: 公式如下: $\text{Logit} = \frac{B/B_0 \%}{100 - B/B_0 \%}$

以标准浓度取常用对数值为横坐标，对应的 logit 值为纵坐标作标准曲线。待测样品 ANG II 浓度即可根据标准曲线得出。

结果：

上述 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠模型，腹腔注射 6mg/kg cisplatin 后 4 天，血浆 ANG II 水平较对照组动物增加 279.6%(P<0.01)，与 cisplatin 单药组相比，cisplatin 合用 bennazapril 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 10mg/kg 组、cisplatin 合用本发明化合物 31 30mg/kg 组大鼠血浆 Ang II 水平分别下降 44.3%(P<0.05)、45.0% (P<0.01)、60.2% (P<0.01) (见表 32)。cisplatin 与本发明化合物 31 合用组大鼠的血浆 Ang II 水平亦升高，各实验组间血浆 Ang II 水平无显著性差异。

表 32. 本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠血浆 Ang II 水平的影响(n=10)

Group	Ang II (ng/ml)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
Control	138.82±83.46		
Cisplatin model	527.02±179.32 ^{##}	279.6	
Cisplatin + Benazapril	293.41±91.97 ^{**}		44.3
Cisplatin + 31(10mg/kg)	289.67±158.89 ^{**}		45.0
Cisplatin + 31(30mg/kg)	209.65±66.08 ^{**}		60.2

##: P<0.01 vs control, **: P<0.01 vs cisplatin model

7. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠血浆 AngII 水平的影响

方法：

同本发明化合物 31 对 cisplatin 所致急性肾损伤大鼠血浆 ANG II 水平的影响。

结果：

结果见表 33。与假手术组相比，模型组 ANGII 水平在术后 16 周升高 23.9%，术后 16 周 benazepril 组、本发明化合物 31 10mg/kg 组、本发明化合物 31 30mg/kg 组与模型组相比分别下降 18.3%、7.7%、39.8%；losartan 组与模型组相比有所升高。

表 33. 本发明化合物 31 对 5/6 肾切除模型大鼠血浆 AngII 水平的影响

Weeks after operation	GROUP	Ang II (pg •ml ⁻¹)	Increase rate (%)	Inhibitory rate (%)
16	SM	106.78±32.53		
	Model	140.32±66.86	23.9	
	Losartan	245.91±73.88		-75.3
	Benazepril	114.70±26.94		18.3
	31 10mg/kg	129.46±37.22		7.7
	31 30mg/kg	84.45±17.62		39.8

(四) 与胶原形成和分解相关的机制

1. 底物酶谱法分析本发明化合物 31 对 HT-1080 细胞分泌基质金属蛋白酶能力的影响

方法：

根据 Heussen 等的方法加以改进。取对数生长期的 HT-1080 细胞, 消化后进行细胞计数, 以 1×10^5 /孔的密度接种于 24 孔培养板中, 培养过夜。次日每孔加入含有一定浓度药物和对照溶剂的培养基培养 12h。弃培养上清, PBS 洗三次, 然后换无血清加药培养基 300 μ l 继续培养 12 小时。收集细胞培养上清, 4 $^{\circ}$ C, 200g 离心 10min 去除细胞碎片, 上清液于 -20 $^{\circ}$ C 储存备用, 细胞消化计数。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参考文献进行。配制一定体积的 8% 分离胶和 5% 浓缩胶, 分离胶中含 0.1% (w/v) 明胶。按细胞数折算出相同细胞数所对应的培养上清体积, 并按此体积加样电泳 (上样缓冲液中不含 DTT)。电泳完毕后, 剥离凝胶, 以蒸馏水漂洗后, 移入 100ml 2.5% TritonX-100 溶液中, 在摇床上低速摇动以洗脱 SDS。30min 后, 换新的 TritonX-100 溶液继续洗脱 30min。凝胶移入 100ml 明胶酶缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 10mmol/L CaCl₂, 200mmol/L NaCl, 1 μ mol/L ZnCl₂) 中, 37 $^{\circ}$ C 恒温温育 16 小时。蒸馏水漂洗后, 凝胶以 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染液染色 4 小时, 蒸馏水漂洗后, 在脱色液 (冰醋酸: 甲醇: 水: =10: 45: 45) 中脱色 1-2h, 至对照组出现明显、清晰的负染条带。凝胶扫描照相, 负染条带的宽度和亮度反映明胶酶的活性, 用 Gel-Pro Analyzer 3.1 软件对负染条带密度扫描并进行半定量分析。

结果:

IV 型胶原是细胞外基质的重要组成成分, 明胶酶 (gelatinase) 或称 IV 型胶原酶能降解组成基质膜的 IV 型胶原, 其活性是影响 IV 型胶原降解重要因素之一。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳可以将 HT1080 细胞分泌到培养上清中的明胶酶和它们的活性形式按分子量大小分开, 经 TritonX-100 去除和蛋白结合的 SDS 后, 明胶酶能恢复其蛋白降解活性。药物作用细胞后, 如果影响到明胶酶表达和分泌的调节通路, 则分泌到培养上清中的各种形式的明胶酶的含量将发生变化。如果把明胶掺入到凝胶液中使之与丙烯酰胺共价聚合, 在适宜的反应条件下, 明胶酶就能降解其周围的明胶, 蛋白降解区不能被考马斯亮蓝染色, 所以在明胶酶的活性区域附近就能出现一条负染带。肿瘤细胞分泌的明胶酶越多, 带的亮度和宽度也就越大。用这种底物酶谱法 (Zymography) 观察本发明化合物 31 对 HT-1080 细胞分泌基质金属蛋白酶能力的影响, 结果表明在 cisplatin 作用下 HT1080 细胞分泌明胶酶比对照组明显减少; cisplatin 合用本发明化合物 31 组明胶酶分泌增加, 且具有一定的浓度依赖关系。(见图 8)

2. 底物酶谱法分析本发明化合物 31 对大鼠肾系膜细胞 (rMC) 分泌基质金属蛋白酶能力的影响

方法:

细胞改用大鼠肾系膜细胞 (rat mesangial cell, rMC) 方法同底物酶谱法分析本发明化合物 31 对 HT-1080 细胞分泌基质金属蛋白酶能力的影响。

结果:

用底物酶谱法 (Zymography) 观察本发明化合物 31 对大鼠肾系膜细胞分泌基质金属蛋白酶能力的影响, 结果表明在 cisplatin 作用下 HT1080 细胞分泌明胶酶比对照组减少; 本发明化合物 31 组可使 rMC 明胶酶分泌增加, 且具有一定的浓度依赖关系。(见图 9)

实验例 6 本发明化合物 56 对链脲霉素致雌性 SD 大鼠糖尿病肾病模型的影响

实验方法

模型建立及分组给药

取雌性 SD 大鼠, 体重 180-200g, 除正常对照组外, 腹腔注射 60mg/kg 链脲霉素 (Streptozotocin, STZ), 3 天后可造成大鼠糖尿病。正常对照组腹腔注射 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH7.4)。

实验共设 6 组，每组 10-12 只。设正常对照组、模型对照组、氯沙坦(10mg/kg)阳性药组，本发明化合物 56 5、10、20mg/kg 三个剂量组。造模后 3 天按血糖水平分组，同时给药。均为灌胃给药，每周 6 次，持续给药至 20 周。正常对照组及模型对照组同时灌胃给予 0.5%羧甲基纤维素钠 (CMC) 混悬液。

于造模后 4 周，给糖尿病大鼠皮下注射胰岛素 3U/只，每周 2 次，以维持其体重。

检测指标

每周称体重观察大鼠生长状况；于造模后 16、20 周测定如下指标：

- 乙醚麻醉动物，眼球后静脉丛取血，检测血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr)、血糖(Glu)，及血清 TGF- β 1 水平；
- 将大鼠置于代谢笼中收集 24 小时尿液，测定尿白蛋白量 (Ualb)、尿肌酐 (Ucr) 水平，计算 24 小时尿白蛋白量及肌酐清除率(C.L)；
- 术后 20 周处死动物，计算各组动物肾脏指数、心脏指数，取肾脏做组织病理学检查。

检测方法：

- BUN、Glu，采用北京北化康泰临床试剂有限公司检测试剂盒检测；
- 血清 TGF- β 1 采用上海森雄科技实业有限公司生产的 ELISA 试剂盒检测；
- Scr、Ucr 和 Ualb，采用北京利德曼生化技术有限公司试剂盒检测。

肾组织病理学检查

标本经 10%甲醛固定，石蜡包埋，HE 和 PASM 染色，光镜检查，组织学照片。肾小球病变：每只动物计数 30 个小球，按未见异常；节段性硬化；弥漫性硬化和球囊渗出分类 (%)。肾小管空泡变性以 “—；+；++；+++” 号表示未见异常；轻、中、重病变更程度。

统计学处理

实验结果用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示，在 SPSS 软件中统计。多组间差异采用 One Way ANOVA 进行统计处理，肾组织病理学检验中肾小管空泡变性经 X^2 检验比较。当 $P < 0.05$ 时认为组间差异有统计学意义。

实验结果

1. 大鼠生长及血糖水平

与正常对照组大鼠相比，糖尿病大鼠体重明显较轻。糖尿病大鼠血糖水平一直维持较高水平，平均血糖值大于 300mg/dL。

2. 本发明化合物 56 对 STZ 所致糖尿病肾病大鼠血 BUN 水平的影响

结果见表 1。与对照组相比，模型组大鼠 BUN 水平在造模后 8 周开始升高，于造模后 16 周、20 周分别上升了 128.2%、137.0%(均 $P < 0.01$)。Losartan 可缓解糖尿病大鼠 BUN 升高，治疗后 16 周、20 周 BUN 水平较模型组下降 18.5%($P > 0.05$)、31.4%($P < 0.05$)。本发明化合物 56 三个剂量治疗组均可不同程度缓解糖尿病大鼠 BUN 升高，20mg/kg 治疗组作用较明显，治疗后 16 周、20 周 BUN 水平较模型组下降 27.0%($P < 0.05$)、31.3%($P < 0.05$)。

3. 本发明化合物 56 对 STZ 所致糖尿病肾病大鼠血 Scr 水平的影响

结果见表 2。与对照组相比，模型组大鼠 Scr 水平升高不明显。在治疗 20 周时，模型组 Scr 水平上升了 14.1%($P > 0.05$)，本发明化合物 56 20mg/kg 组大鼠 Scr 较模型组降低 25.3%，但无显著性差异。

4.本发明化合物 56 对 STZ 所致糖尿病肾病大鼠肌酐清除率(C.L)的影响

结果见表 3。与对照组相比,模型组大鼠 C.L 在造模后 20 周降低(-19.8%,P>0.05)。Losartan 及本发明化合物 56 20mg/kg 可升高糖尿病肾病大鼠的 C.L, C.L 分别较模型组大鼠升高 62.4% 及 44.3%(均 P>0.05)。

5.本发明化合物 56 对 STZ 所致糖尿病肾病大鼠尿白蛋白(Ualb)水平的影响

结果见表 4。与对照组相比,模型组大鼠 Ualb 水平在造模后 8 周开始升高,于造模后 16 周、20 周分别上升了 163.3%(P<0.05)、491.3%(P<0.05)。Losartan 于治疗 16 周、20 周时可缓解糖尿病大鼠 Ualb 升高, Ualb 水平较模型组下降 65.7%(P<0.05)、47.2%(P<0.05)。本发明化合物 56 20mg/kg 治疗组亦可缓解糖尿病大鼠 Ualb 升高,于治疗 16 周、20 周时 Ualb 水平较模型组下降 75.7%(P<0.01)和 35.3%(P>0.05)。

表 34. 化合物 56 对 STZ 致糖尿病肾病大鼠血 BUN 水平的影响

给药时间 (周)	组别	BUN (mg/dL)		抑制率 (%)
		X±SD		
16	正常对照组	15.1±1.6		
	模型组	34.5±8.2 [#]		128.2
	Losartan			
	10mg/kg	28.1±7.7		18.5
	56 5mg/kg	33.3±6.8		3.5
	10mg/kg	30.8±6.4		10.7
	20mg/kg	25.2±4.9 [*]		27.0
20	正常对照组	17.2±2.4		
	模型组	40.7±11.1 [#]		-137.0
	Losartan			
	10mg/kg	27.9±4.6		31.4
	56 5mg/kg	36.7±9.4		9.8
	10mg/kg	32.8±11.4		19.3
	20mg/kg	28.0±8.8 [*]		31.3

注: #P<0.05, ##P<0.01, 与正常对照组比较; *P<0.05, **P<0.01, 分别与模型组比较。

表 35 化合物 56 对 STZ 致糖尿病肾病大鼠血 Scr 水平的影响

给药时间 (周)	组别	Scr. (mg/dL)		抑制率 (%)
		X±SD		
16	正常对照组	0.26±0.03		
	模型组	0.26±0.10		0
	Losartan			
	10mg/kg	0.28±0.05		-10.0
	56 5mg/kg	0.24±0.05		5.8
	10mg/kg	0.27±0.09		6.3

	20mg/kg	0.14±0.04*	43.5
20	正常对照组	0.26±0.06	
	模型组	0.29±0.09	-14.1
	Losartan 10mg/kg	0.18±0.04	38.1
56	5mg/kg	0.25±0.10	14.6
	10mg/kg	0.24±0.07	17.5
	20mg/kg	0.22±0.04*	25.3

注：#P<0.05, ##P<0.01, 与正常对照组比较；*P<0.05, **P<0.01, 分别与模型组比较。

表 36. 化合物 56 对 STZ 致糖尿病肾病大鼠肌酐清除率(C.L)的影响

给药时间 (周)	组别	C.L(ml/min)	增加率 (%)
		X±SD	
16	正常对照组	1.47 ±0.56	
	模型组	3.43 ±2.16	134.0
	Losartan10mg/kg	3.24 ±1.89	-5.6
	56 5mg/kg	3.19 ±1.41	-7.1
	10mg/kg	2.68 ±1.46	-21.9
	20mg/kg	3.76 ±2.36	9.6
20	正常对照组	1.88±0.95	
	模型组	1.51±0.71	-19.8
	Losartan 10mg/kg	2.45±1.14	62.4
	56 5mg/kg	1.48±1.11	-1.5
	56 10mg/kg	1.86±1.01	23.2
	56 20mg/kg	2.18±1.66	44.3

注：#P<0.05, ##P<0.01, 与正常对照组比较；*P<0.05, **P<0.01, 分别与模型组比较。

表 37 化合物 56 对 STZ 致糖尿病肾病大鼠尿白蛋白(Ualb)水平的影响

给药时间 (周)	组别	Ualb(mg/day)	抑制率 (%)
		X±SD	
16	正常对照组	0.40±0.17	
	模型组	1.06±0.77#	163.3
	Losartan10mg/kg	0.36±0.31*	65.7
	56 5mg/kg	1.21±0.83	14.0
	10mg/kg	1.04±0.61	1.9
	20mg/kg	0.26 ±0.14 **	75.7
20	正常对照组	0.42±0.16	
	模型组	2.49±1.22#	491.3

Losartan10mg/kg	1.31±0.90*	47.2
56 5mg/kg	1.94±0.79	21.8
10mg/kg	2.16±0.70	13.1
20mg/kg	1.61±0.84*	35.3

注：#P<0.05, ##P<0.01, 与正常对照组比较；*P<0.05, **P<0.01, 分别与模型组比较。

6. 本发明化合物 56 对 STZ 所致糖尿病肾病大鼠 TGF-β1 水平的影响

本发明化合物 56 20mg/kg 可明显抑制糖尿病大鼠血中 TGF-β1 水平增高。

表 38. 化合物 56 对 STZ 致糖尿病肾病大鼠血中 TGF-β1 水平的影响

给药时间 (周)	组别	TGF-β1(ng/ml)	抑制率(%)
		X±SD	
16	正常对照组	35.2±8.7	
	模型组	37.1±9.6 [#]	-5.2
	Losartan10mg/kg	33.9±12.0	8.6
	56 5mg/kg	35.4±10.5	4.5
	10mg/kg	36.5±8.9	1.5
	20mg/kg	26.9±11.9	27.3
20	正常对照组	34.4±2.3	
	模型组	40.3±10.9 [#]	-17.2
	Losartan10mg/kg	32.4±8.2	19.6
	56 5mg/kg	40.6±7.1	-0.6
	10mg/kg	27.9±4.9 *	30.9
	20mg/kg	29.9±6.6 *	25.9

注：#P<0.05, ##P<0.01, 与正常对照组比较；*P<0.05, **P<0.01, 分别与模型组比较。

7. 本发明化合物 56 化合物对 STZ 所致糖尿病肾病大鼠心脏、肾脏肥大的缓解作用

结果见表 6 和表 7。与对照组相比，模型组大鼠肾脏指数、心脏指数分别升高 102.9%(P<0.05)、25.0%(P<0.05)。Losartan 治疗组大鼠肾脏指数、心脏指数较模型组降低，分别降低 11.3%(P>0.05)和 7.5%(P>0.05)。本发明化合物 56 治疗组大鼠肾脏指数亦较模型组降低，低、中、高三个剂量分别降低 11.3%、9.9%、9.9% (均 P>0.05)；本发明化合物 56 心脏指数较模型组低，低、中、高三个剂量分别下降 7.5%(P>0.05)、12.5%(P<0.05)和 10.0%(P<0.05)。

表 39. 化合物 56 对 STZ 致糖尿病肾病大鼠肾脏指数的影响

组别	肾指数 (g/100g 体重)	抑制率 (%)
	X±SD	
正常对照组	0.70±0.06	

模型组	1.42±0.19 [#]	102.9
Losartan10mg/kg	1.26±0.17	11.3
56 5mg/kg	1.26±0.09	11.3
10mg/kg	1.28±0.02	9.9
20mg/kg	1.28±0.03	9.9

注：#P<0.05, ##P<0.01, 与正常对照组比较；*P<0.05, **P<0.01, 分别与模型组比较。

表40. 化合物56对STZ致糖尿病肾病大鼠心脏指数的影响

组别	心脏指数(g/100g 体重)	抑制率 (%)
	X±SD	
正常对照组	0.32±0.03	
模型组	0.40±0.03 [#]	25.0
Losartan10mg/kg	0.37±0.05	7.5
56 5mg/kg	0.37±0.03	7.5
10mg/kg	0.35±0.02*	12.5
20mg/kg	0.36±0.03*	10.0

注：#P<0.05, ##P<0.01, 与正常对照组比较；*P<0.05, **P<0.01, 分别与模型组比较。

8. 本发明化合物 56 对 STZ 所致糖尿病肾病大鼠白内障的缓解作用

造模 20 周时白内障发生率，模型组大鼠为 80%，Losartan 组为 62.5%，本发明化合物 56 三剂量治疗组分别为 85.7%、62.5%和 50%。

9. 本发明化合物 56 对 STZ 所致糖尿病肾病大鼠肾脏病理的影响

- ①正常对照组：96.3%肾小球未见异常改变，个别肾小球发生节段性坏死，肾小管和肾间质未见异常改变。
- ②糖尿病动物模型：该动物模型肾脏主要病变在肾小球和肾小管以及肾间质。肾小球病变是以小球血管袢节段性硬化为主，即小球轻度系膜区增宽，系膜细胞增生，毛细血管基底膜增厚。肾小球弥漫性硬化，即小球系膜基质增多，系膜区增宽，毛细血管基底膜弥漫性增厚、硬化。这类病变偶见；在小球囊内未见纤维素样和小滴状物渗出。肾小管病变主要表现在近端小管上皮空泡变性（糖原沉积），胞核固缩，染色深。严重者满视野均可见这种病变。肾间质炎细胞浸润和肾盂黏膜上皮细胞增生等也明显增加。上述病变检查结果分别见表 8 和表 9。模型组肾小管和间质病变积分为 5.33±1.80。有 4 例动物肾小动脉硬化，中膜增厚，局部向血管腔内突出，管腔缩窄等。
- ③氯沙坦组：正常肾小球比例多于模型组(P<0.05)，肾小管空泡变性和间质病变也明显轻于模型组(P<0.05)。
- ④56 给药组：本发明化合物 56 各剂量组肾小球节段性硬化、系膜细胞增生的肾小球比例明

显少于模型组 ($P < 0.01$), 而肾小管空泡变性和间质病变积分中剂量组与模型组比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$), 大、小剂量组亦有些好转, 但与模型组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。结果见表 8 和 9。

结论: 本发明化合物 56 各剂量组对 STZ 诱导的雌性 SD 大鼠糖尿病动物模型肾小球硬化、肾小管空泡变性和肾间质病变具有明显的治疗作用。

表 41 化合物 56 对 STZ 致糖尿病肾病大鼠肾小球病变的影响 (%)

组别	例数	未见异常	节段性硬化
正常对照	9	96.30±3.52	3.70±3.52
模型组	9	62.20±9.57 ^{###}	37.76±9.57 ^{###}
氯沙坦组	8	74.76±10.68*	25.24±10.68**
56 (5mg/kg)	8	77.14±8.91*	22.91±8.99**
56 (10mg/kg)	8	87.49±6.61**	12.51±6.61**
56 (20mg/kg)	8	90.00±6.16**	9.17±6.09**

注: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与正常对照组比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 分别与模型组比较。

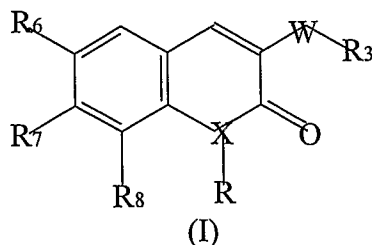
表 42 化合物 56 对 STZ 致糖尿病肾病大鼠肾小管空泡变性和肾间质病变积分

组别	例数	积分 (X±SD)
正常对照组	9	0
模型组	9	5.33±1.80
Losartan	8	3.42±1.81*
56 (5mg/kg)	8	4.57±1.62
56 (10mg/kg)	8	2.50±1.93**
56 (20mg/kg)	8	3.75±1.83

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 分别与模型组比较。

权 利 要 求

1、如通式(I)所示的化合物



其中：

X 选自 O、NH；

W 选自 CO、CH₂；

R 选自直链或支链的 C₁₋₆ 烷基；

R₆、R₇ 和 R₈ 独立地选自 H、OH、NO₂、羧基、卤素、C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷氧基；

R₃ 选自

取代或未取代的苯基（苯环上的取代基为 R₁₁）；

取代或未取代的苯基 C₁₋₄ 烷基（苯环上的取代基为 R₁₂，烷基上的取代基为 R''）；

取代或未取代的 N-吡咯基，（吡咯环上的取代基为 R₁₃）；

取代或未取代的咪唑基（咪唑基上的取代基为 R₁₅）；

取代或未取代的吡唑基（吡唑基上的取代基为 R₁₆）；

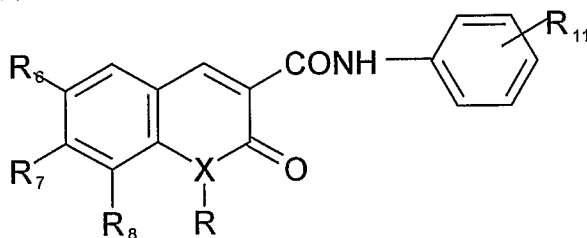
取代或未取代的 N-吡啶基（吡啶基上的取代基为 R₁₇）；

并且，R'' 选自 C₁₋₄ 烷氧羰基；

R₁₃ 表示单取代或多取代，取代基独立的选自 H、OH、卤素、NO₂、CO₂H、C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 卤代烷基、C₁₋₈ 羰烷基、C₁₋₈ 烷氧基、C₁₋₈ 羧基烷氧基、C₁₋₈ 酰基、C₁₋₈ 烷氧羰基、C₁₋₈ 酯基、四氮唑基，未取代或取代的苯羰基、苯环上的取代基为 R₁₄；

R₁₁、R₁₂、R₁₄、R₁₅、R₁₆ 和 R₁₇ 均表示单取代或多取代，取代基独立的选自 H、OH、卤素、NO₂、CO₂H、C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 卤代烷基、C₁₋₈ 羰烷基、C₁₋₈ 烷氧基、C₁₋₈ 羧基烷氧基、C₁₋₈ 酰基、C₁₋₈ 烷氧羰基、C₁₋₈ 酯基、四氮唑基。

2、根据权利要求 1 所述的化合物，其特征在于，如通式 (IA) 所示

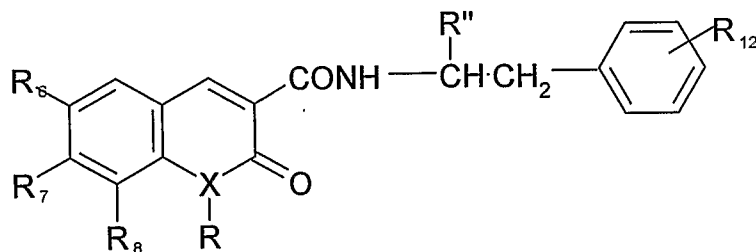


其中，R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂；

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基；

R₁₁ 为单取代或多取代，取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

3、根据权利要求 1 所述的化合物，其特征在于，如通式 (IB) 所示



IB

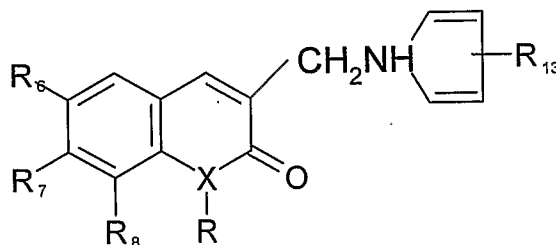
其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R'' 选自 CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et;

R₁₂ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

4、根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 如通式 (IC) 所示



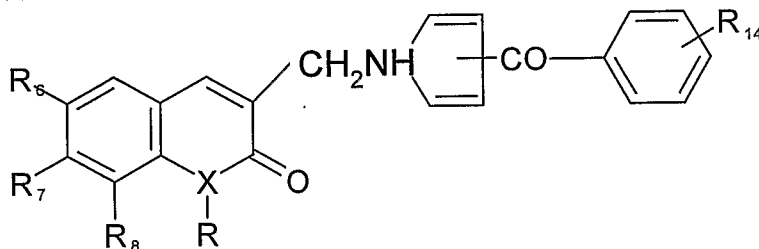
IC

其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₃ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')、取代的苯羰基。

5、根据权利要求 4 所述的化合物, 其特征在于, 如通式 (IC1) 所示



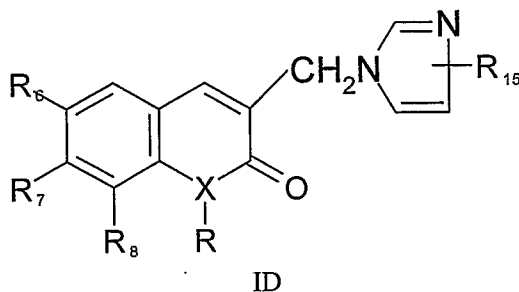
IC1

其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₄ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et。

6、根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 如通式 (ID) 所示

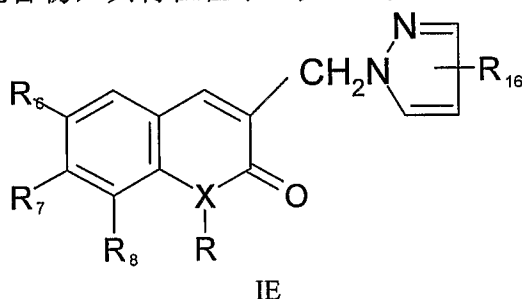


其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₅ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

7、根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 如通式 (IE) 所示

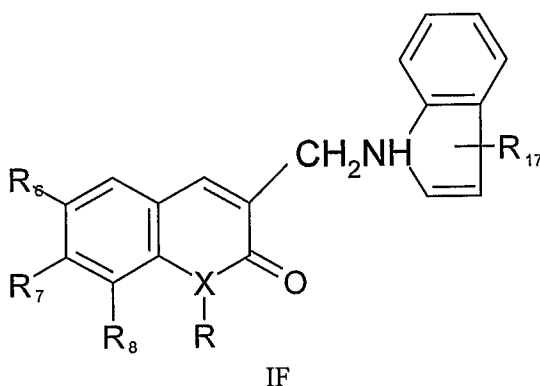


其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;

R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₆ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

8、根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 如通式 (IF) 所示















其中, R-X 选自 O、NH、NCH₃、NCH(CH₃)₂;







R₆、R₇ 和 R₈ 独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基;

R₁₇ 为单取代或多取代, 取代基独立的选自 H、OH、Cl、NO₂、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、CF₃、OCH₂CO₂H、甲酰基、乙酰基、CO₂H、CO₂CH₃、CO₂Et、(1'',2''3'',4''-四唑-5'')。

9、如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 所述的化合物选自下列化合物的群组之一

化合物			W-R ₃	
编号	XR	R ₆ —R ₈		MPC

1	NH	6-NO ₂	R ₁₁ =苯基	>300
2	NH	6-NO ₂	3'-CO ₂ H, 4'-OH	>300
3	NH	6-NO ₂	3'-OH, 4'-CO ₂ H	>300
4	NH	6-NO ₂		300
5	NH	6-NO ₂		295
6	NH	6-NO ₂	3'-Cl, 4'-CO ₂ H	>300
7	NH	6-NO ₂	4'-CO ₂ Et	285
8	NH	6-NO ₂	4'-CO ₂ H	>300
9	NH	6-NO ₂	4'-OH	275
10	NH		3'-OCH ₂ CO ₂ H	293
11	NH		R ₁₁ =苯基	>300
12	NH		4'-CO ₂ Et	>300
13	NH		4'-CO ₂ H	>285
14	NH		3'-OH, 4'-CO ₂ H	>300
15	NH		3'-CO ₂ H, 4'-OH	285
16	NH		4'-OH	>300
17	NH			>300
18	NH			>300
19	NCH ₃	6-NO ₂	4'-CO ₂ Et	>300
20	NCH ₃	6-NO ₂	3'-OH, 4'-CO ₂ H	>300
21	NCH ₃	6-NO ₂	3'-CO ₂ H, 4'-OH	>300
22	NCH ₃	6-NO ₂	R ₁₁ =苯基	205
23	NCH ₃	6-NO ₂	4'-CO ₂ H	>300
24	NCH ₃	6-NO ₂	4'-OH	275
25	NCH ₃	6-NO ₂		>300
26	NCH ₃	6-NO ₂		>300
27	NCH ₃	6-NO ₂	3'-Cl, 4'-CO ₂ H-	>300
28	NCH(CH ₃) ₂	6-NO ₂		>300
29	NCH(CH ₃) ₂	6-NO ₂		293
30	NCH ₃	6-C ₂ H ₅ , 7-OCH ₃	R ₁₁ =苯基	185
31	O	6-NO ₂ , 7-OH, 8-CH ₃		>300
32	O	6-NO ₂ , 7-OH, 8-CH ₃		>300
33	O	6-NO ₂ , 7-OH, 8-C ₄ H ₉		210
34	O	6-NO ₂ , 7-OH,		288

35	O	8-C ₄ H ₉ 7-OCH ₃ , 8-C ₄ H ₉		297
36	O	7-OCH ₃ , 8-C ₄ H ₉		290
37	O	7,8-(OCH ₃) ₂		294
38	O	6-NO ₂ ,7-OH, 8-CH ₃	W-R ₃ =CONHCH(CO ₂ CH ₃)CH ₂ C ₆ H ₄ -OH-4''	128
39	NH		W-R ₃ =CONHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ -OH-4''	285
40	NH	7-OCH ₃ 8-NO ₂		299
41	NH		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	275
42	NH		R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	234
43	NH		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	259
44	NH		R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	193
45	NH		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	280
46	NH		R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	208
47	NH		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₅	221
48	NH		R ₁₀ =2'-COCH ₃	202
49	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	265
50	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	298
51	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COCH ₃	246
52	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	262
53	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	203
54	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₅	208
55	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₅	176
56	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	295
57	NH	7-OCH ₃	R ₁₀ =3'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	205
58	NH	7-OCH ₃		253
59	NH			284
60	O		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₅	149
61	O		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -OCH ₃ -4''	154
62	O		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -Cl-4''	170
63	O		R ₁₀ =2'-COC ₆ H ₄ -NO ₂ -4''	214
64	NH		R ₁₀ =2'-CHO	217
65	NH		R _{10a} =4'-CO ₂ H, R _{10b} =5'-CH ₃	237
66	NH		R _{10a} =4'-CO ₂ C ₂ H ₅ , R _{10b} =5'-CH ₃	228
67	NH		R _{10a} =2'-CO ₂ C ₂ H ₅ ,	142
68	NH		R _{10a} =2'-CO ₂ H,	236
69	NH		R _{10c} =3'-CF ₃ , R _{10d} =4'-CO ₂ C ₂ H ₅	256
70	NH		R _{10c} =3'-C ₃ H ₇ , R _{10d} =5'-CO ₂ C ₂ H ₅	208
71	NH		R ₁₀ =2'-CO ₂ C ₂ H ₅	166
72	NH		R ₁₀ =2'-CO ₂ H	189

10、根据权利要求 1-9 所述的化合物，其特征在于，该化合物还包括其药用盐、水合物、酯

或前体药物。

- 11、制备如权利要求 1-10 所述的化合物的方法，其特征在于，
 - i) 用取代的 3-羧基香豆素、与相应的取代胺类化合物缩合；或
 - ii) 用各种取代的苯胺类化合物与氯代乙酰氯进行反应，得到的中间体与三氯氧磷及二甲基甲酰胺反应，生成取代的 3-氯甲基喹啉，然后其氯甲基与相应的各种取代吡咯类化合物 1-位氮反应，所得产物水解后得各种目的化合物。
- 12、根据权利要求 11 中任一制备方法，其特征在于，所述的反应所用的反应试剂包括三氯化磷、三氯氧磷、五氯化磷、二氯亚砷、草酰氯、乙酸酐、1,2-二环己基碳化亚胺、二吡啶碳酸酯、1,3-二异丙基碳酰亚胺、1-(3-二甲胺丙基)-3-乙基碳酰亚胺、乙酸酐、三氯氧磷和二甲基甲酰胺；所用的催化剂包括三级胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶和 4-吡咯烷基吡啶；所用的有机溶剂包括二甲基亚砷、甲苯、二氯甲烷、乙二醇二甲醚，1,2-二氯乙烷、四氢呋喃和 N,N-二甲基甲酰胺。
- 13、一种药物组合物，其特征在于，含有药物有效剂量的如权利要求 1-10 所述的任一化合物及药用载体。
- 14、根据权利要求 13 的药物组合物，其特征在于，所述的药物组合物可以是片剂、胶囊、液体口服液、丸剂、注射剂、缓释制剂、控释制剂及各种微粒给药系统。
- 15、如权利要求 1-10 任一化合物作为制备转化生长因子- β 1(TGF- β 1)抑制剂中的应用。
- 16、如权利要求 1-10 任一化合物作为制备血管紧张素 II (Ang II) 转化酶受体拮抗剂中的应用。
- 17、如权利要求 1-10 任一化合物在制备治疗心脑血管疾患的药物中的应用。
- 18、如权利要求 1-10 任一化合物在制备治疗肾脏疾患的药物中的应用。
- 19、如权利要求 1-10 任一化合物在制备治疗糖尿病的药物中的应用。
- 20、根据权利要求 13 的应用，其特征在于，所述的心脑血管疾患是高血压、心、脑栓塞、心肌梗塞、脑中风。
- 21、如权利要求 1-10 任一化合物在制备治疗肝硬化、前列腺肥大的药物中的应用。

1 / 5

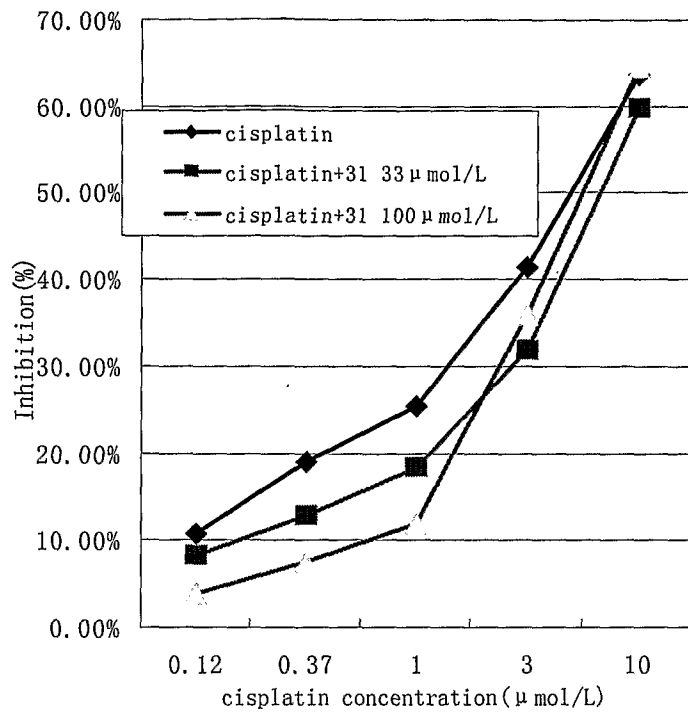


图 1

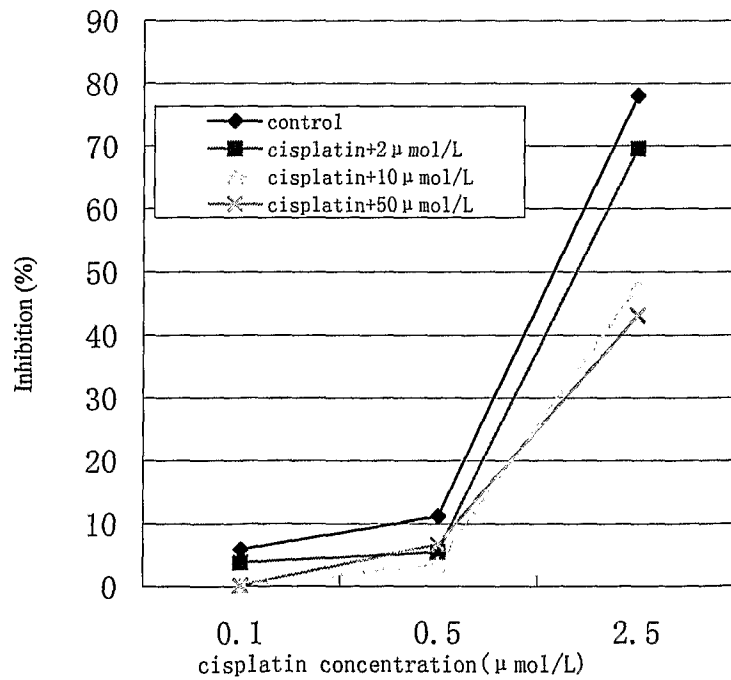
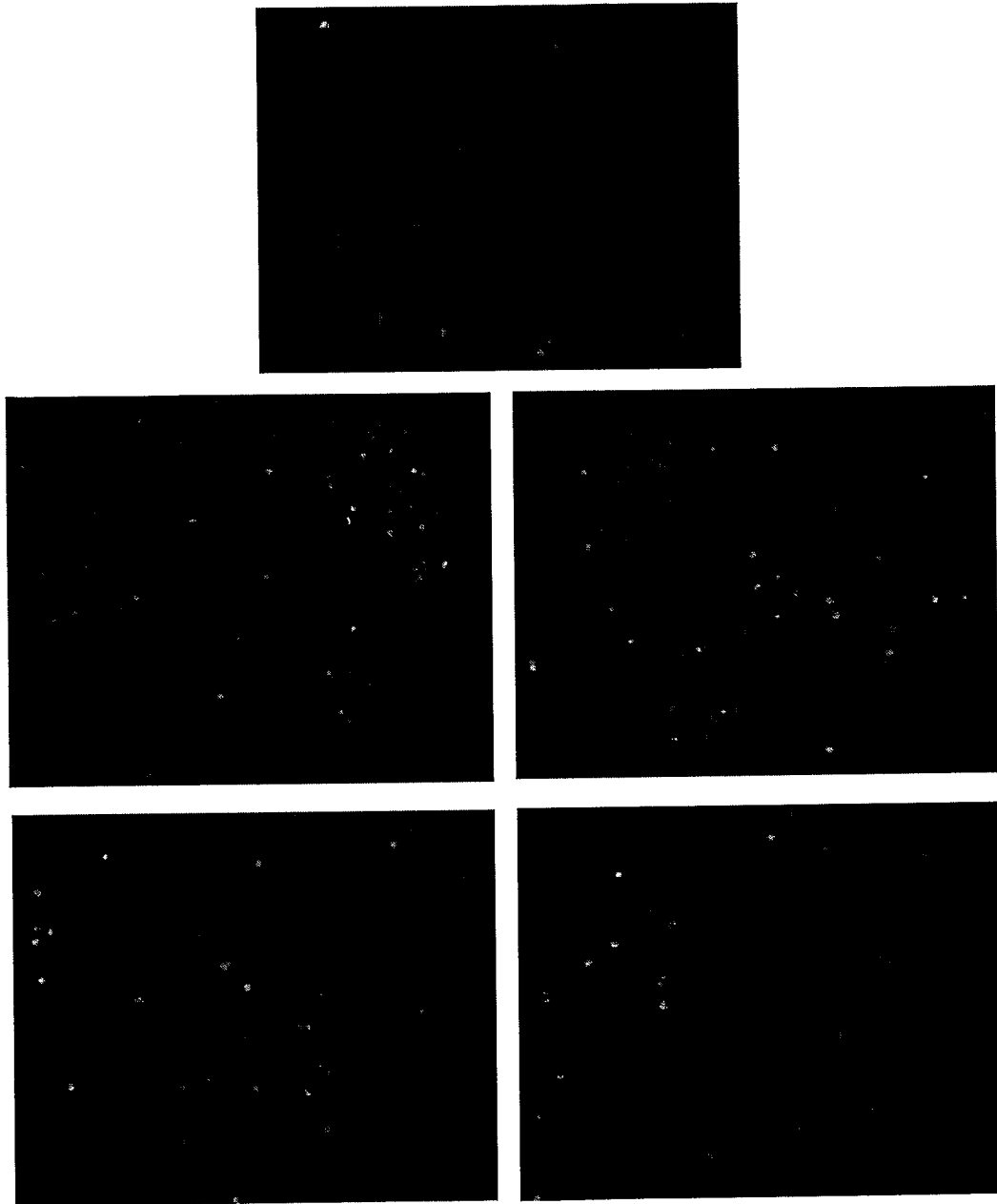


图 2

2 / 5



A	
B	C
D	E

图 3.

3 / 5

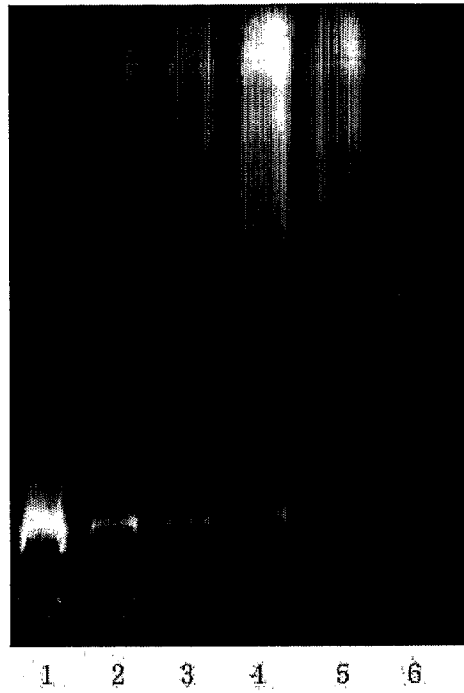


图 4.

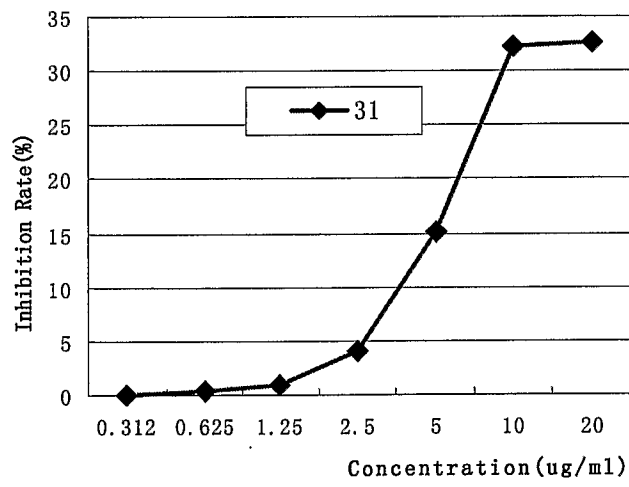


图 5.

4 / 5

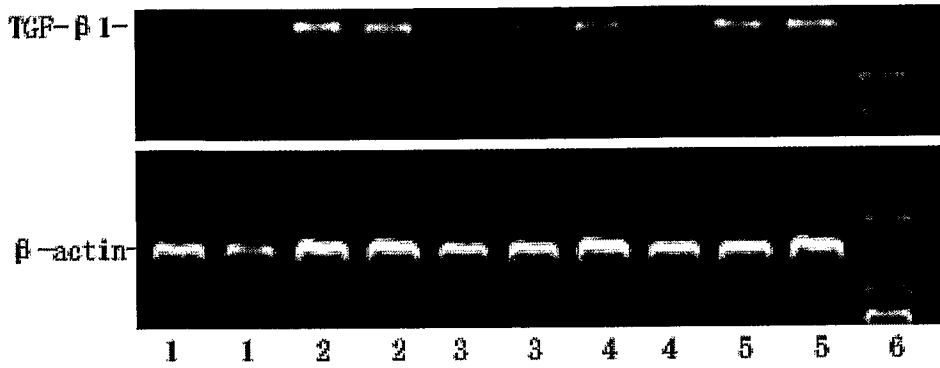


图 6.

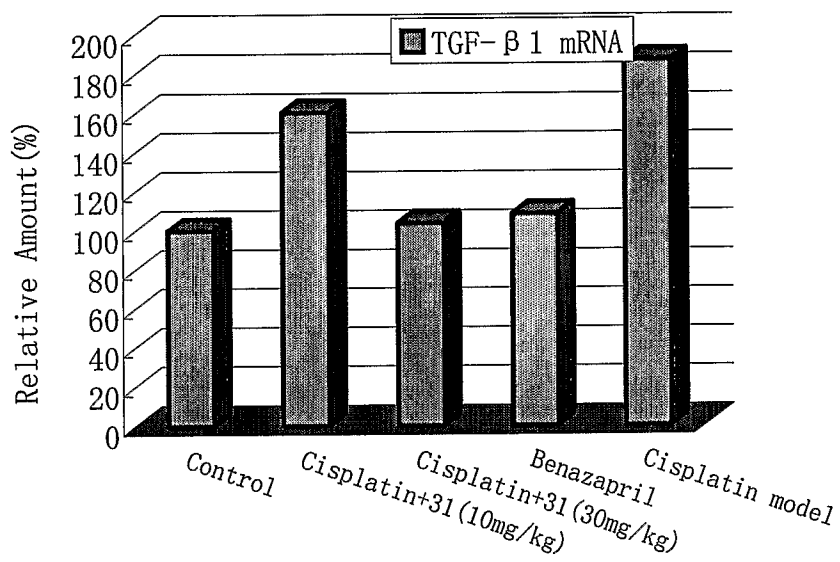


图 7.

5 / 5

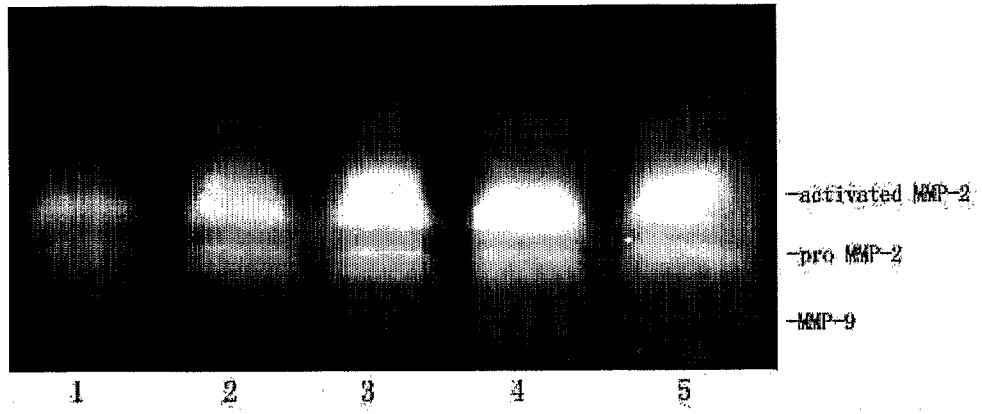


图 8.

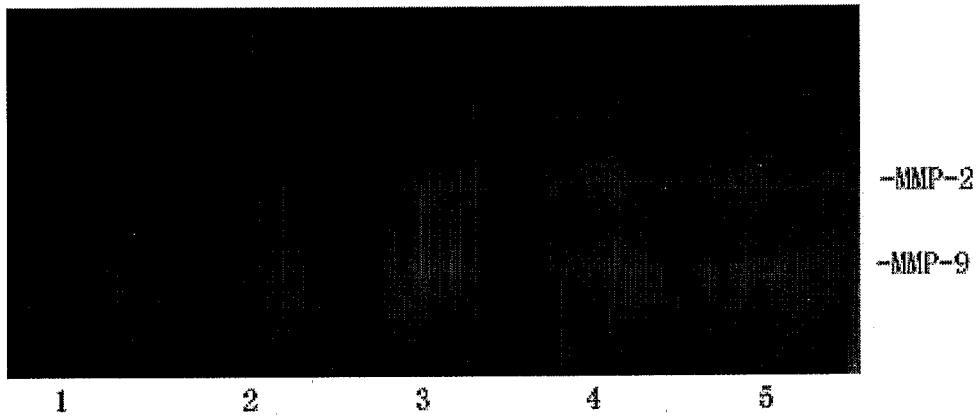



图 9.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/000839

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07D A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, CNKI, BEILSTEIN Data, CHEM ABS data, STN, CA:		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO2004050082A1 (INST MEDICAMENT CHINESE ACAD MEDICAL SCI), 17.June 2004 (17.06.2004), see the whole document, especially claims 1-17, compounds in table 1	1-20
X	CN1199963C(ORION CORP), 04.May 2005 (04.05.2005), see the whole document, especially claims 1-12, examples 1-13	1-14
X	WO8907939A2 (UPJOHN CO), 08.Sep. 1989 (08.09.1989), see the whole document, especially compounds of page 8	1,2,9-14
A	US4547511A(LEO AB), 15.Oct.1985(15.10.1985), see the whole document	1-21
X	Chemical Abstract, 1984, CAN 101:38327 CAS RN:14655-26-6 3-Quinolinecarboxamide, 1,2-dihydro-2-oxo-N-phenyl-	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16.Jan.2007 (16.01.2007)		Date of mailing of the international search report 08 · FEB 2007 (08 · 02 · 2007)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer HE Xiaoping Telephone No. 86-10-62085629 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/000839

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2004050082 A1	17.06.2004	CN1506359 A	23.06.2004
		CN1829506A	06.09.2006
		AU2003289641 A1	23.06.2004
		EP1570846 A1	07.09.2005
		BRPI0316595 A	04.10.2005
		JP2006512328T	13.04.2006
		KR20050084184 A	26.08.2005
		US2006148834 A1	06.07.2006
CN1199963C	04.05.2005	WO0202548 A1	10.01.2002
		AU7259701 A	14.01.2002
		NO20026095 A	03.03.2003
		EP1301503 A1	16.04.2003
		CZ20024202 A3	16.07.2003
		BRPI0111969 A	01.07.2003
		KR20030040225 A	22.05.2003
		US2003186975 A1	02.10.2003
		HU0301706 A2	29.09.2003
		CN1440399 A	03.09.2003
		JP2004502684T	29.01.2004
		EP1301503 B1	25.02.2004
		MXPA02012657 A	01.05.2003
		DE60102161E	01.04.2004
		SK18452002 A3	06.04.2004
		US2004110750 A9	10.06.2004
		ZA200210161 A	26.05.2004
		NZ523121 A	27.08.2004
		ES2215919T T3	16.10.2004
		AU2001272597B	21.07.2005
US6951870 B2	04.10.2005		
RU2282627 C2	27.08.2006		
US4547511 A	15.10.1985	EP0059698 A	08.09.1982
		NO820642 A	27.09.1982
		FI820728 A	29.10.1982

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/000839

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		JP57171975 A	22.10.1982
		PT74512 A	30.12.1982
		DK8200812 A	17.01.1983
		ZA8201210 A	29.11.1982
		HU26140 A	28.09.1983
		ES8400409 A	16.01.1984
		CA1182455 A	12.02.1985
		EP0059698 B	25.09.1985
		DE3266464G	31.10.1985
		IL65028 A	30.11.1986
		KR860001876B	24.10.1986
		US4738971 A	19.04.1988
		JP4009786B	21.02.1992
WO8907939 A2	08.09.1989	AU4074789 A	22.09.1989
		DK9001956 A	16.08.1990
		EP0403535 A	27.12.1999
		JP3503635T	15.08.1991

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.


PCT/CN2006/000839

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 311/08 (2006.01) i
C07D 401/12 (2006.01) i
C07D 401/06 (2006.01) i
C07D 405/12 (2006.01) i
C07D 405/06 (2006.01) i
C07D 215/20 (2006.01) i
A61K 31/37 (2006.01) i
A61K 31/4439 (2006.01) i
A61P 3/10 (2006.01) i
A61P 1/16 (2006.01) i
A61P 9/10 (2006.01) i
A61P 9/12 (2006.01) i
A61P 13/08 (2006.01) i
A61P 13/12 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/000839

<p>A. 主题的分类 参见附加页 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C07D A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p>																				
<p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, CNKI, BEILSTEIN Data, CHEM ABS data, STN, CA:</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO2004050082A1(中国医学科学院药物研究所), 17.6 月 2004 (17.06.2004), 参见全文, 特别是权利要求 1-17, 表 1 化合物</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN1199963C(奥赖恩公司), 04.5 月 2005 (04.05.2005), 参见全文, 尤其是权利要求 1-12, 实施例 1-13</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO8907939A2(UPJOHN CO), 08.9 月 1989 (08.09.1989), 参见全文, 特别是第 8 页的化合物</td> <td>1,2,9-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US4547511A(LEO AB), 15.10 月 1985(15.10.1985), 参见全文</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>化学文摘摘要 101:38327, 1984 年化合物 1,2-二氢-2-氧代-N-苯基-3-喹啉酰胺 CAS RN:14655-26-6</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO2004050082A1(中国医学科学院药物研究所), 17.6 月 2004 (17.06.2004), 参见全文, 特别是权利要求 1-17, 表 1 化合物	1-20	X	CN1199963C(奥赖恩公司), 04.5 月 2005 (04.05.2005), 参见全文, 尤其是权利要求 1-12, 实施例 1-13	1-14	X	WO8907939A2(UPJOHN CO), 08.9 月 1989 (08.09.1989), 参见全文, 特别是第 8 页的化合物	1,2,9-14	A	US4547511A(LEO AB), 15.10 月 1985(15.10.1985), 参见全文	1-21	X	化学文摘摘要 101:38327, 1984 年化合物 1,2-二氢-2-氧代-N-苯基-3-喹啉酰胺 CAS RN:14655-26-6	1
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	WO2004050082A1(中国医学科学院药物研究所), 17.6 月 2004 (17.06.2004), 参见全文, 特别是权利要求 1-17, 表 1 化合物	1-20																		
X	CN1199963C(奥赖恩公司), 04.5 月 2005 (04.05.2005), 参见全文, 尤其是权利要求 1-12, 实施例 1-13	1-14																		
X	WO8907939A2(UPJOHN CO), 08.9 月 1989 (08.09.1989), 参见全文, 特别是第 8 页的化合物	1,2,9-14																		
A	US4547511A(LEO AB), 15.10 月 1985(15.10.1985), 参见全文	1-21																		
X	化学文摘摘要 101:38327, 1984 年化合物 1,2-二氢-2-氧代-N-苯基-3-喹啉酰胺 CAS RN:14655-26-6	1																		
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>		<p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>																		
<p>国际检索实际完成的日期 16.1 月 2007 (16.01.2007)</p>		<p>国际检索报告邮寄日期 08.2月 2007 (08.02.2007)</p>																		
<p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451</p>		<p>受权官员 何小平 电话号码: (86-10) 62085629</p> 																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/000839

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO2004050082 A1	17.06.2004	CN1506359 A	23.06.2004
		CN1829506A	06.09.2006
		AU2003289641 A1	23.06.2004
		EP1570846 A1	07.09.2005
		BRPI0316595 A	04.10.2005
		JP2006512328T	13.04.2006
		KR20050084184 A	26.08.2005
		US2006148834 A1	06.07.2006
CN1199963C	04.05.2005	WO0202548 A1	10.01.2002
		AU7259701 A	14.01.2002
		NO20026095 A	03.03.2003
		EP1301503 A1	16.04.2003
		CZ20024202 A3	16.07.2003
		BRPI0111969 A	01.07.2003
		KR20030040225 A	22.05.2003
		US2003186975 A1	02.10.2003
		HU0301706 A2	29.09.2003
		CN1440399 A	03.09.2003
		JP2004502684T	29.01.2004
		EP1301503 B1	25.02.2004
		MXPA02012657 A	01.05.2003
		DE60102161E	01.04.2004
		SK18452002 A3	06.04.2004
		US2004110750 A9	10.06.2004
		ZA200210161 A	26.05.2004
		NZ523121 A	27.08.2004
		ES2215919T T3	16.10.2004
		AU2001272597B	21.07.2005
US6951870 B2	04.10.2005		
RU2282627 C2	27.08.2006		
US4547511 A	15.10.1985	EP0059698 A	08.09.1982
		NO820642 A	27.09.1982
		FI820728 A	29.10.1982
		JP57171975 A	22.10.1982
		PT74512 A	30.12.1982
		DK8200812 A	17.01.1983
		ZA8201210 A	29.11.1982

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/000839

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		HU26140 A	28.09.1983
		ES8400409 A	16.01.1984
		CA1182455 A	12.02.1985
		EP0059698 B	25.09.1985
		DE3266464G	31.10.1985
		IL65028 A	30.11.1986
		KR860001876B	24.10.1986
		US4738971 A	19.04.1988
		JP4009786B	21.02.1992
<hr/>			
WO8907939 A2	08.09.1989	AU4074789 A	22.09.1989
		DK9001956 A	16.08.1990
		EP0403535 A	27.12.199
		JP3503635T	15.08.1991
<hr/>			

主题的分类

C07D 311/08 (2006.01) i
C07D 401/12 (2006.01) i
C07D 401/06 (2006.01) i
C07D 405/12 (2006.01) i
C07D 405/06 (2006.01) i
C07D 215/20 (2006.01) i
A61K 31/37 (2006.01) i
A61K 31/4439 (2006.01) i
A61P 3/10 (2006.01) i
A61P 1/16 (2006.01) i
A61P 9/10 (2006.01) i
A61P 9/12 (2006.01) i
A61P 13/08 (2006.01) i
A61P 13/12 (2006.01) i