



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102149682 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 05

(21) 申请号 201080002558. 3

(22) 申请日 2010. 05. 24

(66) 本国优先权数据

200910043501. 7 2009. 05. 25 CN

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 03. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2010/073105 2010. 05. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02010/135972 ZH 2010. 12. 02

(73) 专利权人 中南大学

地址 410013 湖南省长沙市桐梓坡路 172 号

(72) 发明人 胡高云 陶立坚 陈军

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责

任公司 43113

代理人 卢宏

(51) Int. Cl.

C07D 213/63 (2006. 01)

A61K 31/4412 (2006. 01)

A61P 43/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101237869 A, 2008. 08. 06, 说明书第 1, 4, 18-22 页.

CN 101235030 A, 2008. 08. 06, 说明书第 6-8 页.

CN 1386737 A, 2002. 12. 25, 说明书第 1-6 页.

审查员 陈文瑞

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 1 页

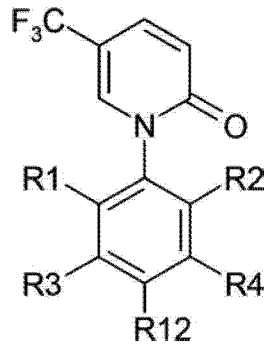
(54) 发明名称

1-(取代芳基)-5-三氟甲基-2-(1H)吡啶酮化合物及其盐的制备方法及其用途

(57) 摘要

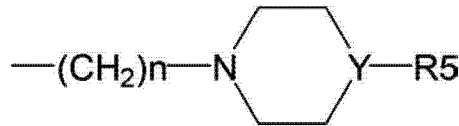
一种 1-取代芳基-5-三氟甲基-2-(1H)吡啶酮类化合物及其药学上可用的盐,以及所述化合物及其盐的制备方法和它们在制备治疗纤维化药物中的用途。

1. 1-取代苯基-5-三氟甲基-2-(1H)吡啶酮化合物,具有式(XIII)的结构,结构式 XIII



其中, R1~R4 中有一个是卤原子,其余为 H, R12 为 NR¹⁰R¹¹,且 R¹⁰、R¹¹ 选自 H、C₁-C₆ 羟烷基、C₁-C₆ 烷氧基烷基或结构式 XIV,且 R¹⁰、R¹¹ 不同时为 H;

结构式 XIV



结构式 XIV 中, R5 选自 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 羟烷基, Y 选自 N、CH, n 为 1~6;
及其药学上可用的盐。

2. 1-取代苯基-5-三氟甲基-2-(1H)吡啶酮化合物,其特征在于所说的化合物为:

1-(2-氯-4-((3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙基)胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(2-氯-4-((3-吗啉基丙基)胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(2-氯-4-((3-哌啶-1-基)丙基胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(4-((3-丁氧丙基)胺基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(2-氯-4-((2-羟基乙基)氨基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(4-(N,N-二(2-羟基乙基)氨基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(2-氯-4-(((3-哌啶-1-基)丙基)胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮
盐酸盐;

1-(2-氯-4-(((2-(2-羟基乙氧基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-((4-((哌嗪-1-基)乙基)氨基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(2-氯-4-((2-(哌啶基-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(2-氯-4-((2-吗啡啉乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(2-氯-4-((2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮;

1-(2-氯-4-((2-(4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2-(1H)-酮。

3. 抗纤维化药物,其特征在于含有权利要求 1—2 之一所述的化合物与药学上可接受的辅料。

1-(取代芳基)-5-三氟甲基-2-(1H)吡啶酮化合物及其盐的 制备方法及其用途

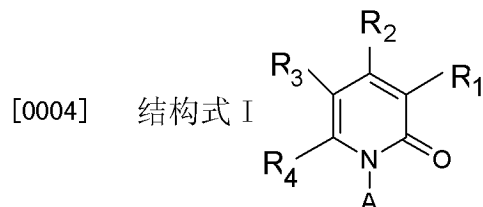
技术领域

[0001] 本发明涉及 1-取代芳基-5-三氟甲基-2-(1H)吡啶酮类化合物。本发明还涉及它们的制备方法以及医药用途。

背景技术

[0002] 纤维化 (fibrosis) 可发生于多种器官或组织,引起器官或组织内实质细胞减少,纤维结缔组织增多,最终可导致器官或组织结构破坏和功能减退,甚至器官衰竭。目前对器官或组织纤维化的发生机制、诊断方法和防治措施已进行了广泛的研究,现有技术中,在某些方面已取得了长足的进步,但仍有一些关键问题没有解决。

[0003] 美国专利 US3839346A, US4052509A, US4042699 公开了 29 个具有下列结构式 I 的吡啶酮类化合物。



[0005] 并公开了此类吡啶酮具有抗炎、解热、降低血清尿酸水平、止痛等作用。其中,1-苯基-5-甲基-2-(1H)吡啶酮 (5-methyl-1-phenyl-2(1H)-pyridone, Pirfenidone) 具有最好的活性和较低的毒性。

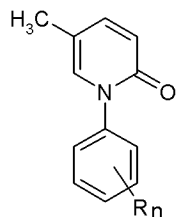
[0006] 美国专利 US5, 310, 562 在 1994 年第一次公布了 1-苯基-5-甲基-2-(1H)吡啶酮, [5-methyl-1-phenyl-2(1H)-pyridone] 又称吡非尼酮 (Pirfenidone, PFD) 具有抗纤维化的生物活性,随后美国专利 US5, 518, 729 和 US5, 716, 632 宣称 N-取代-2-(1H)-吡啶酮 [N-substituted-2-(1H)pyridone], 即结构式 I, 和 N-取代-3-(1H)-吡啶酮 [N-substituted-3-(1H)pyridone] 也具有吡非尼酮 (Pirfenidone) 一样的抗纤维化作用。并列出了 44 个化合物,其中的大部分都是引自美国专利 US4052509 的已知化合物,在这些化合物中, R₁、R₂、R₃、R₄ 都限定在甲基或乙基。

[0007] 吡非尼酮, (pirfenidone, PFD), 在抗纤维化方面的有效性得到了更多体外和动物实验的证实。实验表明,在肾纤维化、肺纤维化动物实验和特异性肺纤维化病人的临床治疗中,吡非尼酮均具有阻止甚至逆转 ECM 聚积的作用和防止甚至逆转纤维化发生和瘢痕形成 (Shimizu T, Fukagawa M, Kuroda T, et al. Pirfenidone prevents collagen accumulation in the remnant kidney in rats with partial nephrectomy. *Kidney Int*, 1997, 52 (Suppl 63) :S239-243 ;Raghu G, Johnson WC, Lockhart D, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159 :1061-1069)。

[0008] 本申请人申请了中国专利 ZL02114190. 8, 提供了一类吡啶酮化合物, 具有如下的

结构 II。

[0009] 结构式 II



[0010] 当 $n = 1$ 时,所述的取代基 R 表示 F、Br、I。

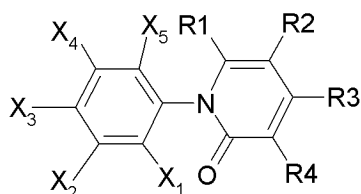
[0011] 当 $n = 2$ 时,所述的取代基 R 表示 F、Cl、Br、I,饱和直链烷基、氧代饱和直链烷基、卤代饱和直链烷基。

[0012] 所述的取代基团 R 在苯环上的位置具有邻位、间位、对位等方式。

[0013] 吡非尼酮已于 2008 年在日本以治疗肺纤维化的适应症上市。但吡非尼酮及其衍生物作用强度不大。吡非尼酮临床的日剂量达到了 2400mg。

[0014] W02007053685、W02006122154 公开了一类具有 p38 激酶抑制作用的化合物,这些化合物可用于纤维化疾病的治疗。其结构见结构 III:

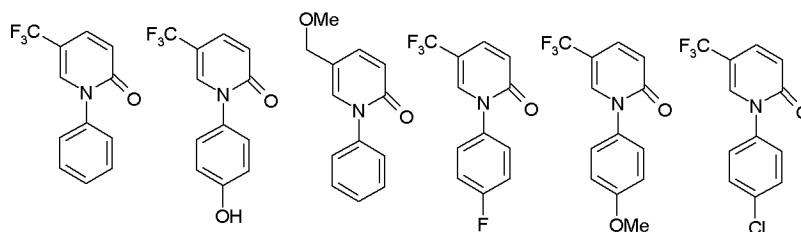
[0015] 结构 III



[0016] 其中:R1~4 为 H、烷基、取代烷基、烯基、卤烷基、硝基烷基、羟烷基、烷氧基、苯基、取代苯基、卤素、羟基、烷氧基烷基、羧基、烷氧基羰基等;X1~5 为 H、卤素、烷氧基、羟基。

[0017] W02007062167 也公开了一些具有 p38 激酶抑制作用的化合物,这些化合物也可用于各种纤维化的治疗。其中的一些结构如下:

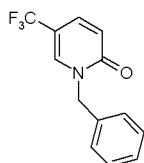
[0018]



[0019] 这些化合物的苯环上均为一些简单的取代基。

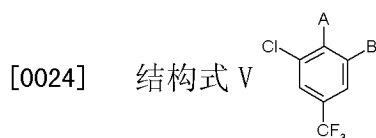
[0020] 中国专利 200710034357 也公开了具有一些上述结构的类似化合物化合物具有抗纤维化活性,同时还公开了具有结构 IV 的化合物具有抗纤维化活性。

[0021] 结构 IV

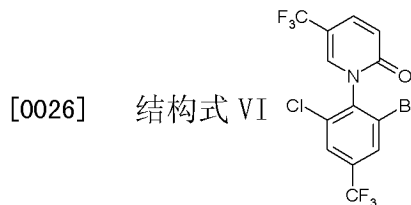


[0022] 这些化合物在吡啶酮环的 5 位引入了三氟甲基,可以改善吡非尼酮作用弱的缺点。但这些化合物的作用强度仍然不高。

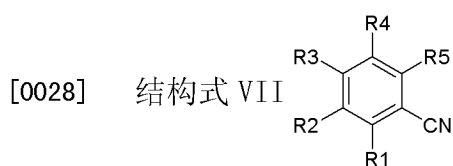
[0023] 德国专利 DE4343528 报道了一类化合物在农业上具有杀虫作用,具有如下的结构式 V。



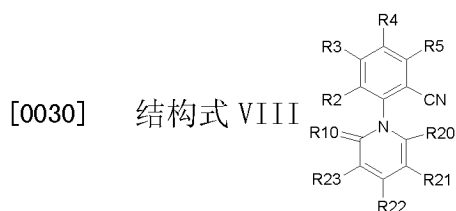
[0025] 结构 V 中 A、B 均为各类杂环如呋喃环、咪唑、吡啶、吡啶酮取代；其中包含了一类如结构式 VI 的化合物。



[0027] 欧洲专利 EP259048、EP367410、EP398499 报道了一类化合物在农业上具有杀虫作用，具有如下的结构式 VII。

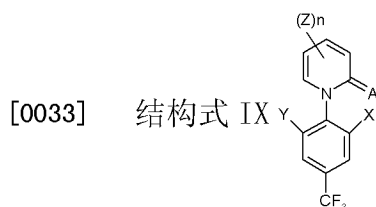


[0029] 其中包含了一类结构 R_1 为吡啶酮，具有结构式 VIII 的化合物。

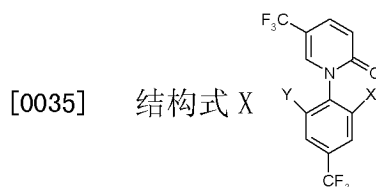


[0031] 其中的 R_{10} 为 O 或 S。

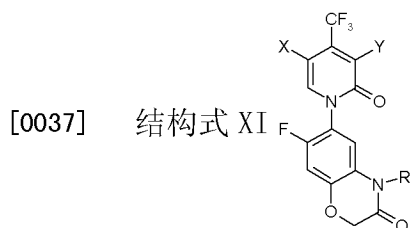
[0032] 欧洲专利 EP216541 报道了一类化合物在农业上具有杀虫作用，具有如下的结构式 IX。



[0034] 其中包含了一类结构式 X 的化合物：

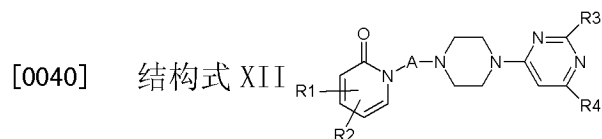


[0036] 欧洲专利 EP488220 报道了一类化合物具有除草剂作用，具有如下的结构式 XI。



[0038] 以上的这些化合物在结构中,无论是吡啶环还是吡啶环 1 位的苯环上均有多种、多个取代基,结构复杂,而且没有抗纤维化的报道。

[0039] DE102004027359 公开了一类能够调节多巴胺 3 受体的化合物,这些化合物可用于帕金森氏症和精神分裂症的治疗。具有如下的结构式 XII。



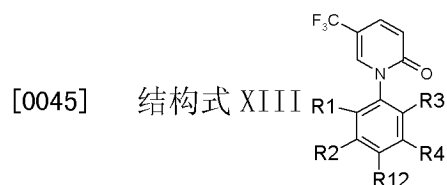
[0041] 其中:A 是:4~6 个原子数的碳氢链,碳链上可以有 1~2 个甲基取代。碳链中也可以有 1~2 个碳原子被氧、羰基、硫等其他原子取代。

[0042] R1 和 R2 是:H;CN;NO₂;卤原子;OR⁵;NR⁶R⁷;C(O)_NR⁶R⁷;O-C(O)_NR⁶R⁷;C₁-C₆ 的烷基;C₁-C₆ 的卤烷基等。

[0043] 由此可见,在已有的发明中,抗纤维化化合物活性仍然不高。且由于分子中引入了多个氟原子,化合物的脂溶性强。同时,由于分子中没有水溶性大的基团,不能做成溶液剂使用。

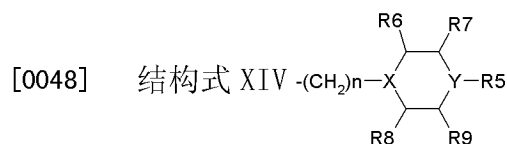
发明内容

[0044] 本发明提供的 1-取代苯基-5-三氟甲基-2-(1H)吡啶酮化合物具有式(XIII)的结构。



[0046] 其中,R1~R4,R12 选自:H,CN,NO₂,羟基,氨基,卤原子,C₁-C₆ 的烷氧基,NR¹⁰R¹¹,OR¹³,C(O)R¹⁴,O-C(O)R¹⁴R¹⁵,C₁-C₆ 的烷基,C₁-C₆ 的卤烷基,C₂-C₆ 的烯基,羧基,羧酸酯;其中,R¹⁴、R¹⁵ 为:C₁-C₆ 的烷基;R¹⁰ 和 R¹¹ 选自:H,C₁-C₆ 羟烷基,酯化的 C₁-C₆ 羟烷基,C₁-C₆ 烷氧基烷基,或结构式 XIV;

[0047] 且 R1~R4、R12 至少一个为 NR¹⁰R¹¹ 或 OR¹³,OR¹³ 为 C₁-C₆ 羟烷基,C₁-C₆ 烷氧基烷基;R¹⁰ 和 R¹¹ 不同时为 H;



[0049] 结构式 XIV 中,R5 选自:H,C₁-C₆ 的烷基,C₁-C₆ 的卤烷基,C₁-C₆ 羟烷基,酯化的 C₁-C₆ 羟烷基,C₂-C₆ 的烯基;R6~R9 选自:H,C₁-C₆ 的烷氧基,=O,C₁-C₄ 的烷基,C₁-C₄ 的卤烷基,C₁-C₄ 羟烷基,C₂-C₄ 的烯基;X 选自 N,CH₂;Y 选自 N,O,C;n 为:1~6;

[0050] 及其药学上可用的盐。

[0051] 更优选 R12 是 NR¹⁰R¹¹ 或 OR¹³。

[0052] 根据本发明的实施例,本发明进一步优选当 R12 是 NR¹⁰R¹¹ 或 OR¹³ 时,R1~R4 中有一个是卤原子,其余为 H。

[0053] 根据本发明的实施例,本发明优选下列化合物:

[0054] 1-(2-氯-4-((3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙基)胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物1)

[0055] 1-(2-氯-4-((3-吗啉基丙基)胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物2)

[0056] 1-(2-氯-4-((3-哌啶-1-基)丙基胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物3)

[0057] 1-(4-((3-丁氧丙基)胺基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物4)

[0058] 1-(2-氯-4-((2-羟基乙基)氨基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物5)

[0059] 1-(4-(N,N-二(2-羟基乙基)氨基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物6)

[0060] 1-(2-氯-4-((3-哌啶-1-基)丙基)胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮盐酸盐(化合物7)

[0061] 1-(2-氯-4-((2-(2-羟基乙氧基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备(化合物8)

[0062] 1-((4-((哌嗪-1-基)乙基)氨基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物9)

[0063] 1-(2-氯-4-((2-(哌啶基-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物10)

[0064] 1-(2-氯-4-((2-吗啡啉乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物11)

[0065] 1-(2-氯-4-((2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物12)

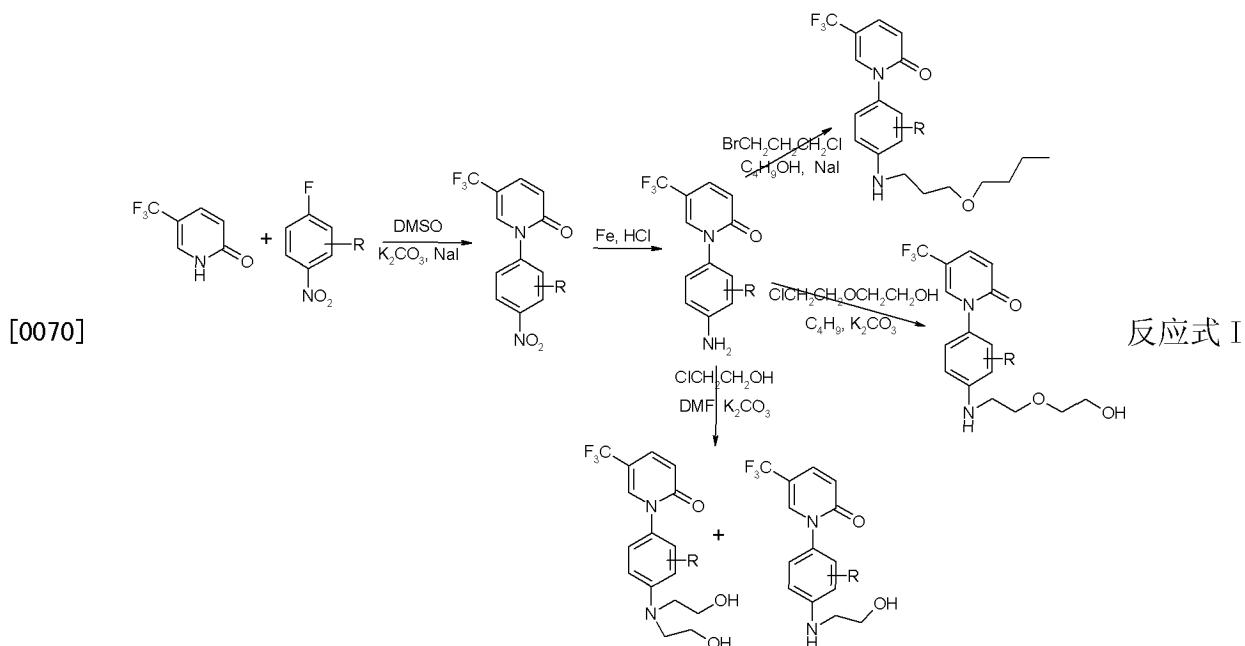
[0066] 1-(2-氯-4-((2-(4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮(化合物13)

[0067] 及其药学上可用的盐。

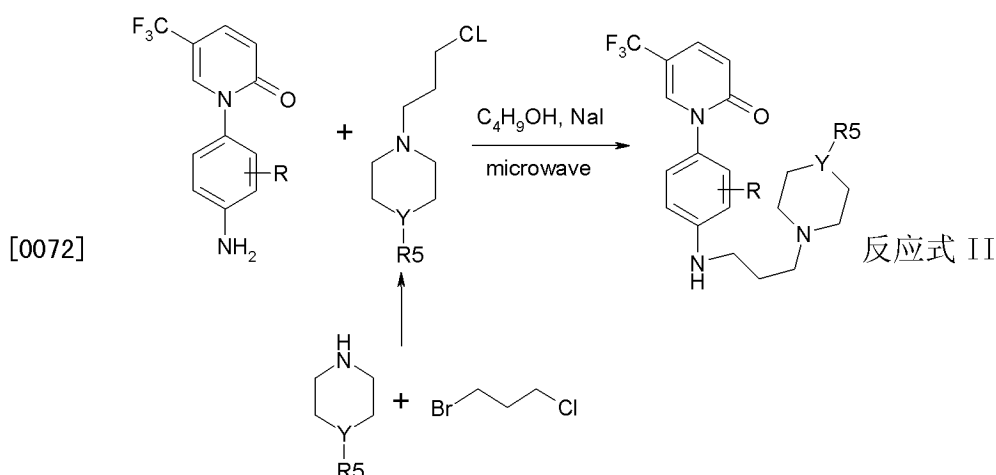
[0068] 所说的盐可以是盐酸盐、硫酸盐、磷酸盐、高氯酸盐、甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、马来酸盐、丁二酸盐、三氟乙酸盐、琥珀酸盐、水杨酸盐、DL-天冬氨酸盐、D-天冬氨酸盐、L-天冬氨酸盐、DL-谷氨酸盐、D-谷氨酸盐、L-谷氨酸盐、甘油酸盐、琥珀酸盐、硬脂酸盐、DL-酒石酸盐、D-酒石酸盐、L-酒石酸盐、(±)扁桃酸盐、(R)-(-)扁桃酸盐、(S)-(+)-扁桃酸盐、柠檬酸盐、粘酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐、DL-苹果酸盐、D-苹果酸盐、L-苹果酸盐、半苹果酸盐、1-金刚烷乙酸盐、1-金刚烷羧酸盐、黄安酸盐、磺基乙酸盐、(±)-乳酸盐、L-(+)-乳酸盐、D-(-)-乳酸盐、扑酸盐、D-α-半乳糖醛酸盐、甘油酸盐、DL-胱氨酸盐、D-胱氨酸盐、L-胱氨酸盐、DL-高胱氨酸盐、D-高胱氨酸盐、L-高胱氨酸盐、DL-半胱氨酸盐、D-半胱氨酸盐、L-半胱氨酸盐、(4S)-羟基-L-脯氨酸、环丙烷-1,1-二羧酸盐、2,2-甲基丙二酸盐、酪氨酸盐、脯氨酸盐、富马酸盐、1-羟基-2-萘甲酸盐、磷酸基乙酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、3-磷酸基丙酸盐、DL-焦谷氨酸盐、D-焦谷氨酸盐和L-焦谷氨酸盐、甲苯磺酸盐、苯磺酸盐、乙磺酸盐、(±)樟脑磺酸盐、萘磺酸盐、

1R-(-)-樟脑磺酸盐、1S-(+)-樟脑磺酸盐、1,5-萘二磺酸盐、1,2-乙烷二磺酸盐、1,3-丙烷二磺酸盐、3-(N-吗啉代)丙烷磺酸盐、联苯基磺酸盐、羟乙磺酸盐和1-羟基-2-萘磺酸盐、磷酸二氢盐、磷酸氢钾盐、磷酸二钾盐、磷酸钾盐、磷酸氢钠盐、磷酸二钠盐、磷酸钠盐、磷酸二氢钠盐、磷酸钙盐、三代磷酸钙盐和六氟代磷酸盐、乙烯基膦酸盐、2-羧基乙基膦酸盐和苯基膦酸盐。

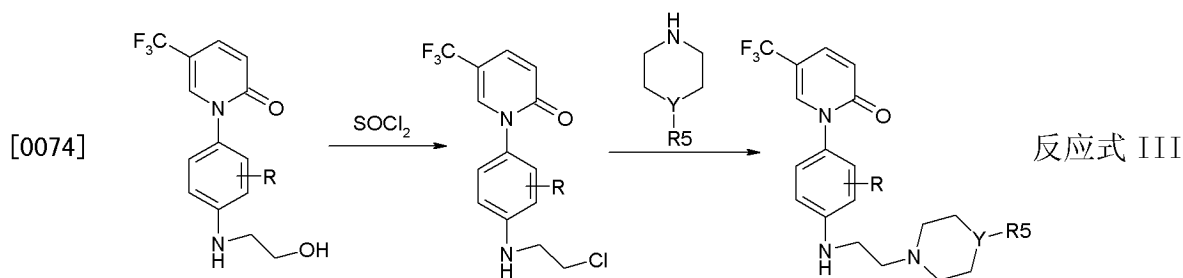
[0069] 本发明还提供式 XIII 化合物的合成方法,合成路线如下。对于简单氨基取代的化合物,使用 5-三氟甲基-2(1H)吡啶酮与硝基取代氟苯反应,DMSO 作溶剂,碳酸钾做缚酸剂,碘化钠做催化剂,制得硝基取代物,盐酸铁粉还原,制得氨基取代物,再根据不同化合物制得目标产物。见反应式 I。



[0071] 对于氨基通过脂肪侧链与杂环相连的化合物,首先使用溴氯丙烷与杂环化合物反应,得到氯烷基杂环化合物,再与按照反应式 I 制得的氨基取代物反应,得到目标产物,正丁醇做溶剂,碘化钠做催化剂,微波催化。见反应式 II。



[0073] 或者,按照反应式 I 制得羟乙基氨基取代物,与二氯亚砷反应制得氯乙基氨基取代物,再与杂环化合物反应制得目标产物。见反应式 III。



[0075] 合成起始物三氟甲基吡啶酮为商品化原料。

[0076] 上述化合物可以用于制备一种广谱纤维化的药物。

[0077] 本发明是在上述现有技术基础上,在吡啶酮 1 位的苯环上引入取代氨基,在该氨基上通过一个烷基链引入一个亲水性基团如羟基、杂环等,得到一类新的吡啶酮类化合物及其盐。这些化合物的活性也大大增加。

[0078] 本申请人发现,在 1-苯基-5-三氟甲基吡啶酮的基础上,对苯基再进行修饰,用取代氨基修饰苯基,取得了意想不到的效果,所获得的化合物具有比现有吡啶酮化合物具有相对高的药效。同时,这类含杂环的化合物可以做成各种盐,有利于做成各种液体制剂。

[0079] 本申请人通过实验发现,本发明提供的化合物,与现有技术中吡啶酮化合物一样具有好的抗纤维化的药理作用,但药效比现有技术中吡非尼酮明显强,最高可达 60 多倍。因此,本发明还提供式 XIII 所示的化合物在制备抗纤维化药物中的用途。

附图说明

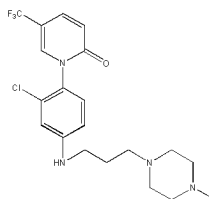
[0080] 图 1 实施例 15 中肾脏病理 HE 染色 ($\times 200$) ;

[0081] 图 2 实施例 15 中肾脏病理 Masson 染色 ($\times 200$)。

具体实施方式

[0082] 实施例 1 1-(2-氯-4-((3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙基)氨基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0083]



[0084] (化合物 1)

[0085] A、1-(2-氯-4-硝基苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0086] 8.2g(0.050mol)5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮,加 DMSO100mL 溶解,投入 13.1g(0.075mol)3-氯-4-氟硝基苯,11.0g(0.080mol)碳酸钾,1.4g 碘化钠,130℃ 下搅拌反应 4 小时,反应完毕冷却至 40℃,加入 100mL12%氨水,析出大量沉淀,过滤,滤渣乙酸乙酯溶解,活性炭脱色,过滤,滤液无水硫酸钠干燥,滤除硫酸钠,回收溶剂,过滤得产物 1-(2-氯-4-硝基苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮。棕黄色固体 12.0g。m. p. :217.7 ~ 218.3℃。MS(m/z) :318(M⁺)。¹H-NMR(CDC1₃,300MHz) δ ppm :6.769 ~ 6.800(d,1H,Ar-H,J = 3.3Hz),7.579 ~ 7.570(t,3H,Ar-H),8.296 ~ 8.333(dd,1H,J = 3.3Hz,8.7Hz,Ar-H),

8. 492(s, 1H, Ar-H)。

[0087] B、1-(4-氨基-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0088] 12.0g(0.035mol)1-(2-氯-4-硝基苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮, 200mL50%乙醇, 5.8g(0.105mol)还原铁粉, 加热至回流, 缓慢滴加0.42mL(0.004mol)浓HCl(用5mL50%乙醇稀释后滴加), 搅拌回流反应5小时, 反应完毕, 15%KOH乙醇溶液调pH至10, 过滤, 滤渣用95%乙醇洗涤(2*10mL), 滤液蒸干乙醇后用乙酸乙酯萃取(50mL*3), 有机相用无水硫酸钠干燥过夜, 过滤, 滤液蒸干得产物1-(4-氨基-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮, 土黄色粉末状固体10.2g。m.p.: 136~138°C。EI-MS(m/z): 288[M]⁺。¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ ppm: 3.559(br, 2H, -NH₂), 6.633~6.670(dd, 1H, J = 2.7 Hz, 8.7Hz Ar-H), 6.708~6.740(d, 1H, J = 9.6Hz, Ar-H), 6.820~6.828(d, 1H, 2.4Hz, Ar-H), 7.089~7.117(d, 1H, J = 2.4Hz, Ar-H), 7.503~7.544(dd, 1H, 2.7Hz, 9.6Hz, Ar-H), 7.595(s, 1H, Ar-H)。

[0089] C、1-(3-氯丙基)-4-甲基哌嗪的制备

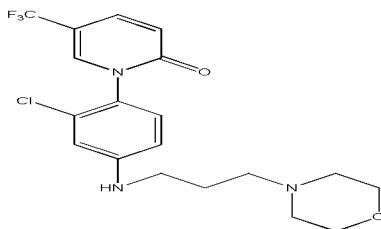
[0090] 0.1mol哌嗪, 100mL丙酮, 0.125mol氢氧化钠(25%), 冰浴控温在5°以下, 缓慢滴加0.1mol1-氯-3-溴丙烷, 滴加完毕, 室温25°C反应48小时, 反应完毕, 减压蒸干溶剂, 加入50mL水溶解, 用二氯甲烷萃取(3*50mL), 合并有机相, 硫酸钠干燥过夜, 过滤, 减压蒸干后得油状物, 滴加浓盐酸至pH = 1~2, 加二氯甲烷打浆除1-氯-3-溴丙烷, 滤渣加水适量溶解, 用25%氢氧化钠调pH = 12, 用二氯甲烷萃取(20mL*3), 硫酸钠干燥, 过滤减压蒸干得黄色油状物1.0g, 收率14.2%。¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ: 1.930~1.999(m, 2H, -CH₂-), 2.301(s, 3H, -CH₃), 2.470~2.517(m, 10H, -CH₂-), 3.575~3.619(t, 2H, -CH₂-)。

[0091] D、1-(2-氯-4-((3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙基)胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0092] 2.59g(0.003mol)1-(4-氨基-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮加15mL正丁醇溶解, 再加入0.528g(0.001mol)1-(3-氯)丙基-4-甲基哌嗪搅拌混匀, 催化量碘化钾, 170°C微波反应。反应完毕, 过滤, 滤液蒸去溶剂, 残渣柱层析分离, 石油醚: 乙酸乙酯 = 1:1(1%三乙胺)洗脱, 得0.15g黄色固体。m.p.: 129~132°C。ESI-MS(m/z): 429[M+H]⁺。¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ ppm: 1.805~1.845(m, 2H, -CH₂-), 2.369(s, 3H, -CH₃), 2.534~2.575(t, 10H, -CH₂-), 3.201(br, 2H, -CH₂-), 5.501(br, 1H, -NH-), 6.516~6.553(dd, 1H, J = 2.4Hz, 8.7Hz, Ar-H), 6.678~6.734(dd, 1H, J = 2.4Hz, 7.2Hz, Ar-H), 7.071~7.100(d, 1H, J = 8.7Hz, Ar-H), 7.491~7.532(dd, 1H, J = 2.7Hz, 9.6Hz, Ar-H), 7.604(s, 1H, Ar-H)。

[0093] 实施例2 1-(2-氯-4-((3-吗啉基丙基)胺基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0094]

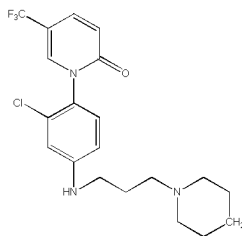


[0095] (化合物 2)

[0096] 0.54g(0.003mol)1-(4-氨基-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮加5mL正丁醇溶解,再加入0.528g(0.001mol)1-(3-氯)丙基-吗啉和催化量碘化钾搅拌均匀,180℃微波反应。反应完毕,过滤,滤液蒸干,残渣层析分离,石油醚:乙酸乙酯=1:1(1%三乙胺)洗脱,得0.16g黄色固体。m.p.:95~97℃。ESI-MS(m/z):416[M+H]⁺。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz) δ ppm:1.836~1.856(m,2H,-CH₂-),2.527(br,6H,-CH₂-),3.202~3.258(t,2H,-CH₂-),3.777(br,4H,-CH₂-),5.403(br,1H,-NH-),6.523~6.559(dd,1H,J=2.4Hz,8.7Hz,Ar-H),6.689~6.698(d,1H,J=2.7Hz,Ar-H),6.737(s,1H,Ar-H),7.078~7.138d,1H,J=8.7Hz,Ar-H),7.493~7.534(dd,1H,J=2.7Hz,9.9Hz,Ar-H),7.604(s,1H,Ar-H)。

[0097] 实施例3 1-(2-氯-4-((3-哌啶-1-基)丙基氨基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0098]

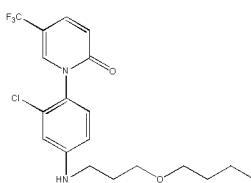


[0099] (化合物 3)

[0100] 3.50g(0.012mol)1-(4-氨基-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮加15mL正丁醇溶解,再加入0.528g(0.004mol)1-(3-氯)丙基哌啶搅拌均匀,催化量碘化钾,180℃微波反应。反应完毕,过滤,滤液蒸干,残渣柱层析分离,石油醚:乙酸乙酯=1:1(1%三乙胺)洗脱,得0.21g浅咖啡色固体。m.p.:112~115℃。EI-MS(m/z):413[M]⁺。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz) δ ppm:1.482~1.489(m,2H),1.607~1.642(m,4H),1.736~1.843(m,2H),2.425~2.491(m,6H),3.185(br,2H),6.011(br,1H-NH-),6.499~6.537(dd,1H,J=2.7Hz,8.7Hz,Ar-H),6.654~6.662(d,1H,J=2.4Hz,Ar-H),6.698~7.731(d,1H,J=9.9Hz,Ar-H),7.059~7.088(d,1H,J=8.7Hz,Ar-H),7.483~7.524(dd,1H,J=2.7Hz,9.9Hz,Ar-H),7.607(s,1H,Ar-H)。

[0101] 实施例4 1-(4-((3-丁氧丙基)氨基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0102]



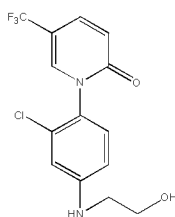
[0103] (化合物 4)

[0104] 2.88g(0.01mol)1-(4-氨基-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮加15mL正丁醇溶解,再加入3.14g(0.02mol)1-氯-3-溴丙烷搅拌均匀,催化量碘化钾,180℃微波反应。反应完毕,过滤,滤液蒸干,残渣柱层析分离,石油醚:乙酸乙酯=3:1(1%三

乙胺)洗脱,得0.20g类白色固体。m. p. :83.0 ~ 85.0 °C。ESI-MS(m/z) :425[M+Na]⁺。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz) δ ppm :0.921 ~ 0.970(t,3H,-CH₃),1.364 ~ 1.439(m,2H,-CH₂-),1.563 ~ 1.612(m,2H,-CH₂-),1.880 ~ 1.919(m,2H,-CH₂-),3.213 ~ 3.255(t,H,-CH₂-),3.415 ~ 3.458(t,2H,-CH₂-),3.542 ~ 3.579(t,2H,-CH₂-),4.696(br,1H,-NH-),6.508 ~ 6.545(dd,1H,J=2.4 Hz,2.4Hz,Ar-H),6.680 ~ 6.689(d,1H,J = 2.7Hz,Ar-H),.704 ~ 6.736(d,1H,J = 9.6Hz,Ar-H),7.070 ~ 7.099(d,1H,J = 8.7Hz,Ar-H),7.491 ~ 7.532(dd,1H,J = 2.7Hz,2.4Hz,Ar-H),7.606(s,1H,Ar-H)。

[0105] 实施例5 1-(2-氯-4-((2-羟基乙基)氨基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0106]

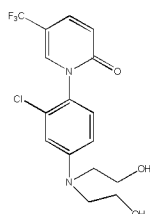


[0107] (化合物5)

[0108] 0.57g(0.002mol)1-(4-氨基-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮,12mL氯乙醇和12mLDMF溶解,再加入0.56g(0.004mol)碳酸钾,130°C下搅拌反应12小时,反应完毕,过滤,滤液蒸干,残渣柱层析分离,石油醚:乙酸乙酯=1:1洗脱,得棕褐色固体0.080g。m. p. :161.0 ~ 164.0 °C。EI-MS(m/z) :332[M]⁺。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz) δ ppm :3.504 ~ 3.543(t,2H,-CH₂-),3.658 ~ 3.709(t,2H-CH₂-),4.412(br,1H,-NH-),6.590 ~ 6.627(dd,1H,J = 2.7Hz,2.4Hz,Ar-H),7.10 ~ 6.742(d,1H,J = 9.6Hz,Ar-H),6.754 ~ 6.762(d,1H,J = 2.4Hz,Ar-H),7.128 ~ 7.157(d,1H,J = 8.7Hz,Ar-H),7.500 ~ 7.542(dd,1H,J = 2.7Hz,9.6Hz,Ar-H),7.597(s,1H,Ar-H)。

[0109] 实施例6 1-(4-(N,N-二(2-羟基乙基)氨基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0110]

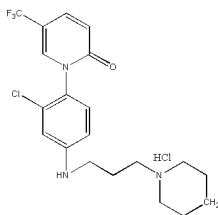


[0111] (化合物6)

[0112] 0.57g(0.002mol)1-(4-氨基-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮,12mL氯乙醇和12mLDMF溶解,再加入0.56g(0.004mol)碳酸钾,130°C下搅拌反应12小时,反应完毕,过滤,滤液蒸干,残渣柱层析分离,石油醚:乙酸乙酯=1:1洗脱,得棕红色固体0.070g。m. p. :169.0 ~ 172.0 °C。EI-MS(m/z) :376[M]⁺。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz) δ ppm :3.213 ~ 3.245(t,4H,-CH₂-),3.661 ~ 3.754(t,4H-CH₂-),6.714 ~ 6.746(d,1H,J = 9.6Hz,Ar-H),6.864 ~ 6.903(dd,1H,J = 2.7 Hz,9.6Hz,Ar-H),7.018 ~ 7.027(d,1H,J = 2.7Hz,Ar-H),7.214 ~ 7.244(d,1H,J = 9.0Hz,Ar-H),7.505 ~ 7.514(dd,1H,J = 2.7Hz,Ar-H)。

[0113] 实施例 71-(2-氯-4-(((3-哌啶-1-基)丙基)氨基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮盐酸盐的制备

[0114]

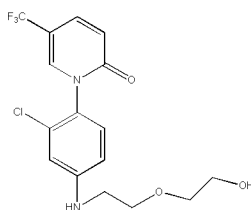


[0115] (化合物 7)

[0116] 2.9mmol 的 1-(4-(((3-哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮,用乙醇适量溶解,加入 2. mmol 的盐酸搅拌反应 2 小时,蒸干溶剂得 1-(2-氯-4-(((3-哌啶-1-基)丙基)氨基)苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮盐酸盐,类白色固体 0.12g, M.P :192 ~ 195 °C。EI-MS(m/z) :414[M+H]⁺。¹H-NMR(D₂O) δ ppm :1.343 ~ 1.718(m, 6H, -CH₂-), 1.857 ~ 1.905(2H, -H), 1.956 ~ 2.055(m, 2H, -CH₂-), 2.829 ~ 2.905(t, 2H, -CH₂-), 3.122 ~ 3.116(t, 2H, -CH₂-), 3.221 ~ 3.284(2H-CH₂-), 3.445 ~ 3.487(2H-CH₂-), 6.764 ~ 6.812(2H, Ar-H), 6.965 ~ 6.972(1H, Ar-H), 7.199 ~ 7.228(1H, Ar-H), 7.785 ~ 7.907(1H, Ar-H), 8.075(1H, Ar-H)。

[0117] 实施例 8 1-(2-氯-4-((2-(2-羟基乙氧基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0118]

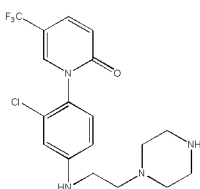


[0119] (化合物 8)

[0120] 1.9mmol 的 1-(4-氨基-2-氯)苯基-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮,28mmol 氯乙氧基乙醇和 50mL 正丁醇溶解,再加入 1.9mmol 碳酸钾,回流反应 72 小时,过滤,滤液制沙柱层析分离,石油醚:乙酸乙酯=1:1 洗脱,得黄色油状物 0.33g。EI-MS(m/z) :376[M]⁺, ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ ppm :3.320 ~ 3.355(t, 2H, -CH₂-), 3.607 ~ 3.637(t, 2H, -CH₂-), 3.714 ~ 6.748((t, 2H, -CH₂-), 3.768 ~ 3.798((t, 2H, -CH₂-), 6.609 ~ 6.646(dd, 1H, J = 2.4Hz, 8.4Hz, Ar-H), 6.710-6.742(d, 1H, J = 9.6Hz, Ar-H), 6.775 ~ 6.783(d, 1H, J = 2.4Hz, Ar-H), 7.107 ~ 7.136(d, 1H, J = 8.7Hz, Ar-H), 7.501 ~ 7.542(dd, 1H, J = 2.7Hz, 9.6Hz, Ar-H), 7.603(s, 1H, Ar-H)。

[0121] 实施例 91-((4-((哌嗪-1-基)乙基)氨基)-2-氯苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0122]



[0123] (化合物 9)

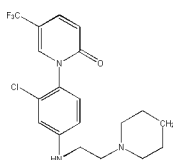
[0124] A 1-(2-氯-4-((2-氯乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0125] 3mmol 的 1-(2-氯-4-((2-羟基乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮和 120mL 的二氯甲烷, 4.5mmol 的二氯亚砷和 4.5mmol 的三乙胺室温搅拌反应 28 小时, 柱层析分离, 石油醚: 乙酸乙酯 = 3 : 1 洗脱, 得淡黄色固体 0.5g, M.P : 160.0 ~ 162.0°C。EI-MS(m/z) : 350 [M]⁺。¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ ppm : 3.502 ~ 3.541(t, 2H, -CH₂-), 3.713 ~ 3.752(t, 2H, -CH₂-), 6.909 ~ 6.647(dd, 1H, J = 2.7Hz, 8.7Hz, Ar-H), 6.716 ~ 6.777(2H, Ar-H), 7.135 ~ 7.164(d, 1H, J = 8.7Hz, Ar-H), 7.508 ~ 7.550(dd, 1H, J = 2.7Hz, 9.6Hz, Ar-H), 7.600(s, 1H, Ar-H)。B 1-(2-氯-4-((2-哌嗪-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0126] 1. 3mmol 的 1-(2-氯-4-((2-氯乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮, 7.8mmol 无水哌嗪和 50mL 乙腈溶解, 再加碘化钠适量, 回流反应 12 小时, 过滤, 滤液制沙柱层析分离, 乙酸乙酯: 甲醇 = 5 : 1 (2% 三乙胺) 洗脱, 得黄色胶状物 0.32g。EI-MS(m/z) : 400 [M]⁺, ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ ppm : 2.442(s, 4H, -CH₂-), 2.628(s, 2H, -CH₂-), 2.904(s, 4H, -CH₂-), 3.144 ~ 3.158(d, 2H, -CH₂-), 4.776(s, 1H, -NH-), 6.572 ~ 6.60(d, 1H, J = 8.4Hz, Ar-H), 6.707 ~ 6.736(d, 1H, J = 8.7Hz, Ar-H), 7.094 ~ 7.122(d, 1H, J = 8.4Hz, Ar-H), 7.500 ~ 7.530(d, 1H, J = 9.0Hz, Ar-H), 7.609(s, 1H, Ar-H)。

[0127] 实施例 10 1-(2-氯-4-((2-(哌啶基-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0128]

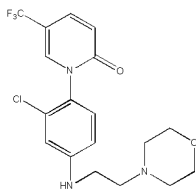


[0129] (化合物 10)

[0130] 1. 7mmol 的 1-(2-氯-4-((2-氯乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮和 10.3mmol 哌啶, 50mL 乙腈溶解, 再加碘化钠适量, 回流反应 17 小时, 过滤, 滤液制沙柱层析分离, 石油醚: 乙酸乙酯 = 1 : 1 洗脱, 得黄色胶状物 0.34g。EI-MS(m/z) : 399 [M]⁺, ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ ppm : 1.470 ~ 1.487(d, 2H, J = 5.1, -CH₂-), 1.576 ~ 1.647(m, 4H, -CH₂-), 2.436(s, 4H, -CH₂-), 2.604 ~ 2.644(t, 2H, -CH₂-), 3.152 ~ 3.165(d, 2H, -CH₂-), 4.941(s, 1H, -NH-), 6.568 ~ 6.605(dd, 1H, J = 2.4Hz, 8.7Hz, Ar-H), 6.708 ~ 6.734(t, 1H, Ar-H), 7.088 ~ 7.117(d, 1H, J = 8.7Hz, Ar-H), 7.493 ~ 7.502(d, 1H, J = 2.7Hz, Ar-H), 7.525 ~ 7.534(d, -H, J = 2.7Hz, Ar-H)。

[0131] 实施例 11 1-(2-氯-4-((2-吗啡啉乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0132]

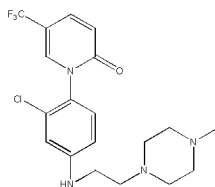


[0133] (化合物 11)

[0134] 1.7mmol 的 1-(2-氯-4-((2-氯乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮和 10.9mmol 吗啡啉, 50mL 乙腈溶解, 再加碘化钠适量, 回流反应 24 小时, 过滤, 滤液制沙柱层析分离, 石油醚: 乙酸乙酯 = 1 : 1 洗脱, 得黄色胶状物 0.67g。EI-MS(m/z) : 401[M]⁺, ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ ppm : 2.500(s, 4H, -CH₂-), 2.650 ~ 2.688(t, 2H, -CH₂-), 3.150 ~ 3.204(m, 2H, -CH₂-), 3.728 ~ 3.758(t, 4H, -CH₂-), 4.781(s, 1H), 6.573 ~ 6.610(dd, 1H, J = 2.4Hz, 6.0Hz, Ar-H), 6.703 ~ 6.743(t, 2H, Ar-H), 7.098 ~ 7.127(d, 1H, J = 8.7Hz, Ar-H), 7.494 ~ 7.535(dd, 1H, J = 2.7Hz, 9.6Hz, Ar-H), 7.603(s, 1H, Ar-H)。

[0135] 实施例 12 1-(2-氯-4-((2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0136]

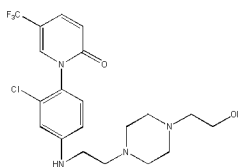


[0137] (化合物 12)

[0138] 1.7mmol 的 1-(2-氯-4-((2-氯乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮和 10.9mmol 的 N-甲基哌嗪, 50mL 乙腈溶解, 再加碘化钠适量, 回流反应 22 小时, 过滤, 滤液制沙柱层析分离, 石油醚: 乙酸乙酯 = 1 : 1 洗脱, 得黄色固体 0.70g。m. p. : 113.1 ~ 115.2, EI-MS(m/z) : 414[M]⁺, ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ ppm : 2.321(s, 3H, -CH₃), 2.511(br, 8H, -CH₂-), 2.639 ~ 2.678(t, 2H, -CH₂-), 3.126 ~ 3.181(q, 2H, -CH₂-), 4.736 ~ 4.765(t, 1H, -NH-), 6.566 ~ 6.603(dd, 1H, J = 2.4Hz, 8.7Hz, Ar-H), 6.708 ~ 6.740(t, 2H, Ar-H), 7.096 ~ 7.125(d, 1H, J = 9.6Hz, Ar-H), 7.496 ~ 7.537(dd, 1H, J = 2.7Hz, 9.6Hz, Ar-H), 7.609(s, 1H, Ar-H)。

[0139] 实施例 13 1-(2-氯-4-((2-(4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-基)乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮的制备

[0140]



[0141] (化合物 13)

[0142] 1.7mmol 的 1-(2-氯-4-((2-氯乙基)氨基)-苯基)-5-三氟甲基吡啶-2(1H)-酮和 10.9mmol 的羟乙基哌嗪, 50mL 乙腈溶解, 再加碘化钠适量, 回流反应 24 小时, 过滤, 滤液制沙柱层析分离, 石油醚: 乙酸乙酯 = 1 : 1 洗脱, 得黄色胶状物 0.51g。EI-MS(m/z) : 444[M]⁺。 ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ ppm : 2.567 ~ 2.691(m, 12H, -CH₂-), 3.139 ~ 3.192(t,

2H, -CH₂-), 3.632 ~ 3.667 (t, 2H, -CH₂-), 4.737 (br, 1H, -NH-), 6.563 ~ 6.600 (dd, 1H, J = 2.4Hz, 8.7Hz, Ar-H), 6.702 ~ 6.738 (t, 2H, Ar-H), 7.094 ~ 7.123 (d, 1H, J = 8.7Hz, Ar-H), 7.492 ~ 7.533 (dd, 1H, J = 2.7Hz, 9.0Hz, Ar-H), 7.603 (s, 1H, Ar-H)。

[0143] 实施例 14 化合物对 NIH3T3 成纤维细胞的抑制试验

[0144] 用噻唑蓝 (MTT) 方法。细胞用含 5% 小牛血清的 DMEM 培养基培养, 将细胞制成 3×10^4 /ml 的细胞悬液, 每孔 $100 \mu\text{l}$ 接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后换含不同浓度化合物和氟非尼酮的含 1% 小牛血清的培养基, 每个浓度设 3 个复孔。分别于加药后 48、72 小时后, 每孔加 MTT 溶液 (培养基配成 5mg/ml, 过滤后避光保存) $100 \mu\text{l}$, 4 小时后将 MTT 吸出, 每孔加 MTT 溶解液 DMSO $150 \mu\text{l}$, 10min 后待 MTT 完全溶解, 酶标仪测 OD 值。根据抑制率, 计算氟非尼酮和测定化合物的 IC₅₀ 值。以两者的 IC₅₀ 值求得测定化合物的活性与氟非尼酮活性的倍数。再根据倍数和某一块板上氟非尼酮的 IC₅₀ 值求得测定化合物的相对 IC₅₀ 值。

[0145] 被测化合物对 NIH3T3 成纤维细胞的抑制活性

被测化合物	48 小时		72 小时	
	相对 IC ₅₀ (mM)	倍数	相对 IC ₅₀ (mM)	倍数
氟非尼酮	4.43	-----	3.52	-----
化合物 1	0.286	15.50	0.163	21.60
化合物 2	0.241	18.36	0.161	21.87
化合物 3	0.238	18.60	0.065	54.0
化合物 4	0.702	6.31	0.311	11.31
化合物 5	1.380	3.21	0.632	5.57
化合物 6	0.641	6.91	0.587	6.00
化合物 7	0.259	17.09	0.049	71.17
化合物 8	0.487	9.09	0.332	10.59
化合物 10	0.214	20.73	0.062	56.50
化合物 11	0.174	25.50	0.056	62.50
化合物 12	0.330	13.42	0.106	33.33
化合物 13	0.100	44.14	0.062	57.20

[0147] 注: 倍数是指化合物 IC₅₀ 值与氟非尼酮 IC₅₀ 值

[0148] 实施例 15

[0149] 观察化合物 13 对大鼠单侧输尿管梗阻肾纤维化模型的治疗效果。

[0150] 一、材料与方法

[0151] 1、实验药品

[0152] 化合物 13 按本发明提供的方法制备。

[0153] 2、实验动物

[0154] 雄性 SD 大鼠 9 只, 体重 188-213g, 购自湖南斯莱克实验动物有限责任公司。实验动物每天予以 12 小时光照, 饲料购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 饮用水由中南大学实验动物学部提供。

[0155] 3、实验方法

[0156] (1) 随机分组: 9 只大鼠随机分为 3 组, 分别为: 正常组 (n = 3)、模型组 (n = 3)、化合物 13 15mg/kg 治疗组 (n = 3), 3 只老鼠归为一笼。实验动物适应性喂养 2 天。

[0157] (2) 单侧输尿管梗阻造模术：

[0158] 每只大鼠按 0.35ml/100g 的 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉，随后固定在大鼠固定板上。先用水浸润背部皮肤，然后将皮肤绷紧，用弯头手术剪紧贴皮肤去毛，常规消毒铺巾。

[0159] 取左肋缘下 1.0cm 与脊柱正中线旁开 0.8cm 交界处做一纵向长 1.0cm 的切口，逐层分离，暴露左肾和左侧输尿管，紧贴左肾下极用 4.0 丝线结扎左侧输尿管，在其下方 1cm 处再结扎一处，在两结扎点之间离断输尿管，用庆大霉素生理盐水溶液冲洗腹腔，检查无渗漏和出血后逐层缝合后腹膜腔各层及背部皮肤。

[0160] (3) 药物干预：造模手术前一天开始灌胃，每日一次，共 12 天。具体方法如下：

[0161] a) 用 CMCNa 粉剂加入适当 0.9% 的生理盐水，配制成浓度为 0.5% 的 CMCNa 溶液，以下各组药物均以 0.5% 的 CMCNa 溶液作为溶剂配制。

[0162] b) 正常组组：0.5% CMC-NA 6ml/kg. d 灌胃，每天一次。

[0163] c) 模型组：0.5% CMC-NA 6ml/kg. d 灌胃，每天一次。

[0164] d) 化合物 1315mg/kg 治疗组：6ml/kg. d 灌胃，每天一次。

[0165] (4) 动物处死及标本采集：

[0166] 各组大鼠分别于术后第 11 天腹腔内注射 10% 水合氯醛 (0.7-0.9ml/100g) 麻醉过量处死，取得的梗阻侧肾组织用 4% 甲醛固定、石蜡包埋、制成 4 μ m 厚切片，行 HE 染色和 Masson 染色。

[0167] (5) HE 染色评分标准

[0168] 取肾组织 HE 染色切片，低倍镜下单盲依序观察左上、右上、左下、右下、中间 5 个肾小管间质视野，按肾间质损伤 8 项指标评分：肾小管上皮细胞空泡变性、肾小管扩张、肾小管萎缩、红细胞管型、蛋白管型、间质水肿、间质纤维化、间质炎性细胞浸润，计算其均值，作为该标本的肾小管间质损伤指数。评分标准参考文献：Radford MG Jr, Donadio JV Jr, Bergstralh EJ, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol, 1997, 8(2):199-207。

[0169] (6) Masson 染色评分标准

[0170] 取肾组织 Masson 染色切片，在 400 倍光学显微镜下，每个标本随机观察 20 个视野，计算呈蓝染的胶原所占视野的百分比，进行半定量评分后取均值：无阳性染色，0 分；< 25%，1 分；25-50%，2 分；50-75%，3 分；> 75%，4 分。评分标准参考文献：Lin SL, Chen RH, Chen YM, et al. Pentoxifylline Attenuates Tubulointerstitial Fibrosis by Blocking Smad3/4-Activated Transcription and Profibrogenic Effects of Connective Tissue Growth Factor. J Am Soc Nephrol. 2005, 16:2702-2713。

[0171] 4、统计方法采用单因素方差分析方法

[0172] 二、实验结果

[0173] 1、HE 染色肾间质损伤病理评分结果

[0174] 表 1 各组大鼠梗阻肾脏肾小管间质损伤指数的比较

[0175]

分组	例数 (只)	评分 ($\bar{X} \pm S$)
正常组	3	0.33 ± 0.12
模型组	3	9.00 ± 1.00 ^{☆☆☆}
化合物 13 组	3	7.00 ± 0.35 ^{☆☆**}

[0176] 注：

[0177] 与正常组比较，[☆]p < 0.05, ^{☆☆}p < 0.01 ; ^{☆☆☆}p < 0.001 ;

[0178] 与模型组比较，^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01, ^{***}p < 0.001 ;

[0179] 2 MASSON 染色肾间质损伤病理评分结果

[0180] 表 2 各组大鼠左侧肾脏 Masson 染色肾间质胶原评分结果

[0181]

分组	例数 (只)	评分 ($\bar{X} \pm S$)
正常组	3	0.25 ± 0.00
模型组	3	2.45 ± 0.38 ^{☆☆☆}
化合物 13 组	3	1.52 ± 0.16 ^{☆☆**}

[0182] 注：

[0183] 与正常组比较，[☆]p < 0.05, ^{☆☆}p < 0.01 ; ^{☆☆☆}p < 0.001 ;

[0184] 与模型组比较，^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01, ^{***}p < 0.001 ;

[0185] 三、结论

[0186] 化合物 13 15mg/kg 能够有效治疗肾脏纤维化。

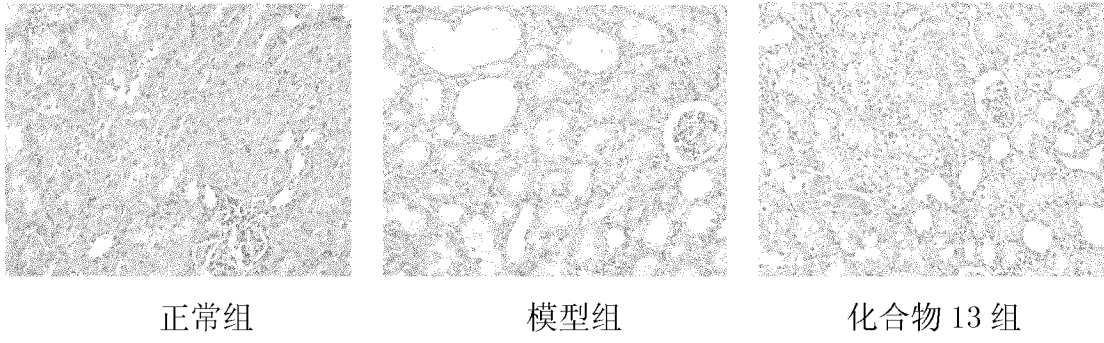


图 1

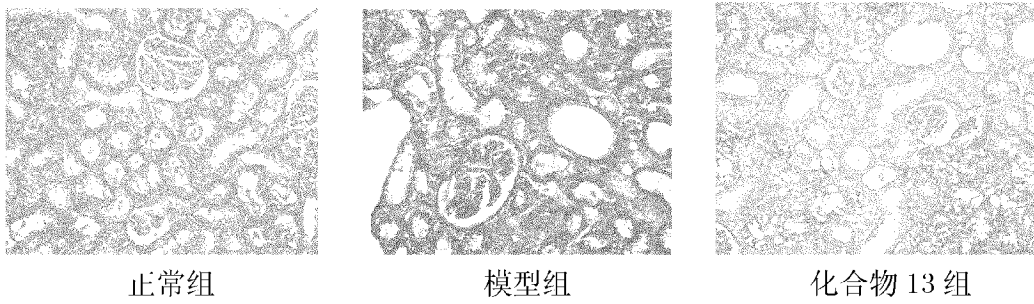


图 2