



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102617471 A

(43) 申请公布日 2012.08.01

(21) 申请号 201110033828.3

A61P 25/28(2006.01)

(22) 申请日 2011.01.31

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

(72) 发明人 郑伟 李娟 陈红专 谢琼

郑优丽 李炜 仇缀百

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C07D 223/04(2006.01)

A61K 31/55(2006.01)

A61P 25/16(2006.01)

A61P 25/14(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 4 页

### (54) 发明名称

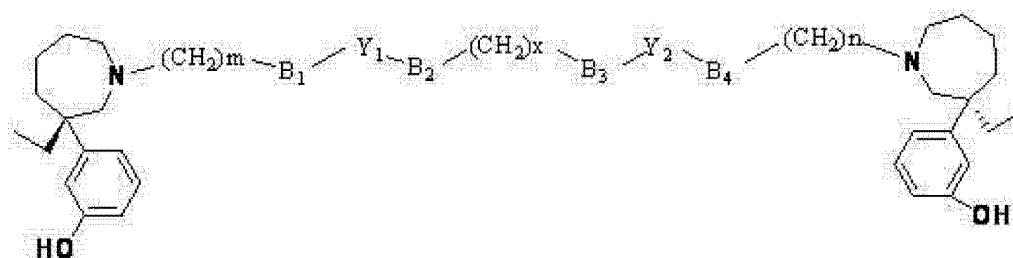
左旋美普他酚双分子衍生物和 / 或其盐及其制备方法和用途

### (57) 摘要

本发明属制药领域,涉及新的左旋美普他酚双分子衍生物和 / 或其盐及其制备方法和用途,本发明的左旋美普他酚双分子衍生物和 / 或其盐类具有通式(I)的结构。实验显示,本发明的化合物在体外实验中显示乙酰胆碱酯酶抑制活性和金属离子螯合活性,可进一步开发成具有双重作用的早老性痴呆治疗药物。另外,本发明化合物也可用于制备预防或治疗因自由基氧化损伤所致的神经退行性疾病的药物,所述神经退行性疾病包括帕金森病、亨廷顿氏病和老年性痴呆等。



1. 通式 (I) 的左旋美普他酚双分子衍生物：



(I)

其中：

$m$ 、 $n$  独立地选自 1 ~ 3 中的整数；

$Y_1$  和  $Y_2$  独立地选自 O、S 和 NR，所述 R 为氢、甲基、乙基或  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ；

$B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_3$ 、 $B_4$  独立地为  $-\text{CH}_2-$  或  $-\text{CO}-$ ；

$x$  为 0 或 1。

2. 根据权利要求 1 所述的左旋美普他酚双分子衍生物，其特征在于，所述  $m$  与  $n$  相同， $Y_1$  和  $Y_2$  相同， $B_1$  与  $B_4$  相同，且  $B_2$  与  $B_3$  相同。

3. 根据权利要求 2 所述的左旋美普他酚双分子衍生物，其特征在于，所述  $Y_1$  和  $Y_2$  为 NR，所述 R 为氢、甲基。

4. 根据权利要求 1~3 中任一项所述的左旋美普他酚双分子衍生物，其特征在于，所述  $B_1$ 、 $B_4$  为  $-\text{CH}_2-$ 。

5. 根据权利要求 4 所述的左旋美普他酚双分子衍生物，其特征在于，所述  $B_2$ 、 $B_3$  为  $-\text{CH}_2-$ 。

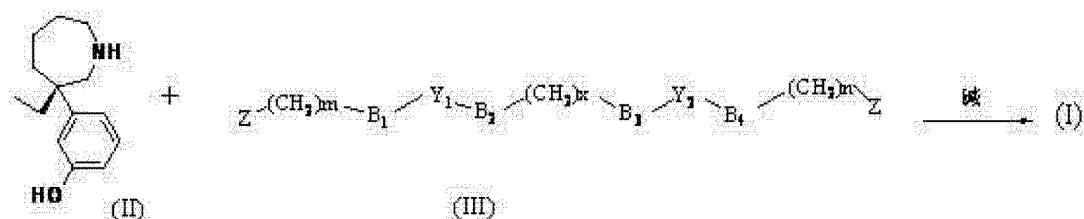
6. 根据权利要求 4 所述的左旋美普他酚双分子衍生物，其特征在于，所述  $x$  为 0。

7. 根据权利要求 5 所述的左旋美普他酚双分子衍生物，其特征在于，所述  $x$  为 0。

8. 根据权利要求 5~7 中任一项所述的左旋美普他酚双分子衍生物，其特征在于，所述  $m$ 、 $n$  为 2。

9. 一种权利要求 1~8 中任一项所述的左旋美普他酚双分子衍生物与无机酸或者有机酸形成的盐类，其特征在于，所述无机酸选自盐酸、硝酸、硫酸、磷酸、氢溴酸、氢碘酸或任意两者的混合酸；所述有机酸选自酒石酸、扁桃酸、柠檬酸、苹果酸、马来酸、富马酸或任意两者的混合酸。

10. 一种制备权利要求 1~8 中任一项所述的化合物的方法，其特征在于，其包括在碱性条件下将式 (II) 化合物与式 (III) 进行反应，



其中，Z 为 Br 或 Cl。

11. 一种权利要求 1-8 中任一项所述的左旋美普他酚双分子衍生物在制备治疗神经退行性疾病药物中的用途。

12. 根据权利要求 11 所述的用途,其特征在于,所述神经退行性疾病包括帕金森症、亨廷顿氏病和痴呆症。

13. 根据权利要求 12 所述的用途,其特征在于,所述神经退行性疾病为痴呆症。

## 左旋美普他酚双分子衍生物和 / 或其盐及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及制药领域,涉及新的左旋美普他酚双分子衍生物和 / 或其盐及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 阿尔茨海默病 (AD) 也称早老性痴呆,属严重威胁老年人生命健康的神经退行性疾病,以认知和记忆受损为主要症状乙酰胆碱酯酶抑制剂 (AChEIs) 是目前临床上治疗 AD 的主要药物,据报道,在美国 FDA 批准的五个 AD 治疗药物中有四个为 AChEIs,研究显示,该类抑制剂通过提高脑内乙酰胆碱水平,而有效改善患者的认知能力。

[0003] 专利申请 CN101037430 A 公开了一类以长碳链连接的左旋美普他酚双配基衍生物具有乙酰胆碱酯酶抑制作用。

[0004] 随着对 AD 发病机理和致病基因的深入研究,越来越多的证据表明:脑内  $\beta$ -淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) 的异常聚集和沉积造成的神经损伤是 AD 发病的核心机制。减少 A $\beta$  生成和聚集是有效的 AD 治疗策略和药物开发的最热点领域。令人信服的证据表明, A $\beta$  并不是自发地聚集,而是与脑中的过量金属离子发生了一种年龄依赖性的作用,它使 A $\beta$  沉淀为富含金属的斑块。近十余年来,研究者运用多种方法,诸如 EPR, NMR, Raman 光谱, CD 谱, 荧光光谱, 电位滴定和聚集度测定等技术,对金属离子,特别是  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  和 A $\beta$  的相互作用进行了深入研究(House, E.; Collingwood, J.; Khan, A, et al. Aluminium, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of Abeta42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dis 2004, 6(3), 291-301)。实验表明,金属离子能促进 A $\beta$  聚集体和淀粉样斑的形成,金属螯合剂能使 AD 脑的淀粉样斑块组织溶解,同时减轻 APP 转基因鼠的大脑 A $\beta$  沉淀负荷。根据已有的实验证据,金属异常也与加剧氧化损害有直接联系。过渡金属元素在许多生物反应中是不可少的,打破其平衡会导致自由基产生,自由基被铁、铜或其它微量氧化还原金属催化(Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). [J] Chem. Rev. 2006, 106, 1995 - 2044)、(Doraiswamy, P.M.; Finefrock, A.E. Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders[J]. Lancet Neurol. 2004, 3, 431 - 434);金属离子调节的氧化应激与线粒体功能障碍有关(Lin, M.T.; Beal, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature 2006, 443, 787 - 79)。因此,使用金属离子螯合剂调节患者脑内的金属平衡是治疗包括 AD 在内的神经退行性疾病的有效策略。

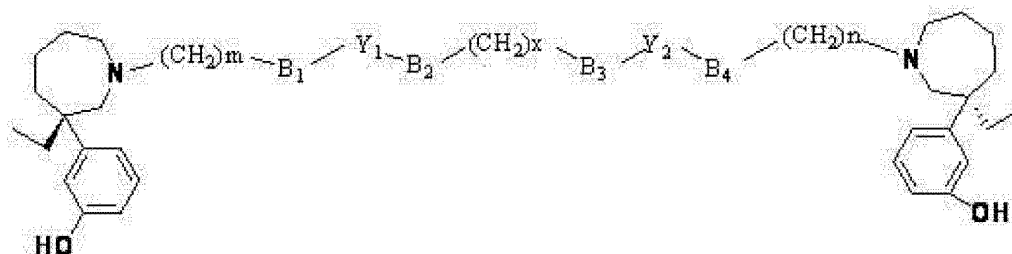
[0005] 金属离子螯合剂用于 AD 的治疗正走向临床(Liu, G; Garret, M.R.; Men,

P. et al. Nanoparticle and other metal chelation therapeutics in Alzheimer disease[J]. Biochim Biophys Acta 2005, 1741(3), 246-252), 它们可清除自由基和超氧化物, 有效地减轻 AD 患者脑内的氧化损伤、减少 A $\beta$  在脑中的聚积。氯碘羟喹 (clioquinol, PBT-1) 是临床应用的抗寄生虫病药物, 具有金属离子螯合作用。澳大利亚 Prana 生物技术公司有研究报道, 将氯碘羟喹用于转基因鼠, 发现可以透过血脑屏障, 且脑内 A $\beta$  沉淀斑块形成降低 49%。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供新的治疗阿尔茨海默病 (AD) 的药物。本发明对美普他酚双分子衍生物进行进一步研究, 提供了一种新的左旋美普他酚双分子衍生物和 / 或其盐。本发明的左旋美普他酚双分子衍生物和 / 或其盐同时具有乙酰胆碱酯酶抑制活性、金属离子螯合活性和抗 A $\beta$  聚集活性, 可进一步制成为治疗 AD 的多靶向配体药物。

[0007] 本发明的左旋美普他酚双分子衍生物的结构如通式 (I) 所述:



(I)

其中,  $m$ 、 $n$  独立地选自 1 ~ 3 中的整数,  $m$  与  $n$  可以相同也可以不同, 优选为相同, 更优选为 2;

$Y_1$  和  $Y_2$  独立地选自 O、S 和 NR,  $Y_1$  和  $Y_2$  相同或不同, 优选为相同, 更优选均为 NR, 所述 R 为氢、甲基、乙基或  $\text{CH}_2\text{COOH}$ , 优选为氢或甲基;

$B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_3$ 、 $B_4$  独立地为  $-\text{CH}_2$  或  $-\text{CO}-$ , 优选  $B_1$  与  $B_4$  相同, 且  $B_2$  与  $B_3$  相同;

$x$  为 0 或 1, 优选为 0。

[0008] 本发明中, 优选提供下述化合物:

$N, N'-(1, 3\text{-亚丙基})\text{-双}\{2\text{-}[(S)\text{-}3\text{-乙基-}3\text{-(}3'\text{-羟基苯基})\text{-氮杂环庚烷-1-基}]\text{-N-甲基-乙酰胺}\}$ ,

$N^1, N^2\text{-双}\{3\text{-}[(S)\text{-}3\text{-乙基-}3\text{-(}3'\text{-羟基苯基})\text{-氮杂环庚烷-1-基}]\text{-丙基}\text{-乙二酰胺}\}$ ,

$N, N'-(1, 3\text{-亚乙基})\text{-双}\{2\text{-}[(S)\text{-}3\text{-乙基-}3\text{-(}3'\text{-羟基苯基})\text{-氮杂环庚烷-1-基}]\text{-乙酰胺}\}$ ,

$N, N'-(1, 3\text{-亚丙基})\text{-双}\{2\text{-}[(S)\text{-}3\text{-乙基-}3\text{-(}3'\text{-羟基苯基})\text{-氮杂环庚烷-1-基}]\text{-乙酰胺}\}$ ,

$N, N'-(1, 3\text{-亚丙基})\text{-双}\{2\text{-}[(S)\text{-}3\text{-乙基-}3\text{-(}3'\text{-羟基苯基})\text{-氮杂环庚烷-1-基}]\text{-N-甲基-丁酰胺}\}$ ,

$N^1, N^2\text{-双}\{3\text{-}[(S)\text{-}3\text{-乙基-}3\text{-(}3'\text{-羟基苯基})\text{-氮杂环庚烷-1-基}]\text{-丙基}\text{-丙二酰胺}\}$ ,

$N^1, N^2$ -双{3-[ (S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-乙基}-乙二酰胺,

$N^1, N^2$ -双{3-[ (S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-乙基}-丙二酰胺,

(3S, 3'S)-1, 1'-{2, 2'-[1, 3-亚丙基-双(甲亚氨基)]-双(2, 1-亚乙基)}-双(3-乙基-3, 1-亚氮杂环庚基)二苯酚,

$N^1, N^2$ -双{3-[ (S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二胺。

[0009]

进一步, 本发明提供最优选的化合物:

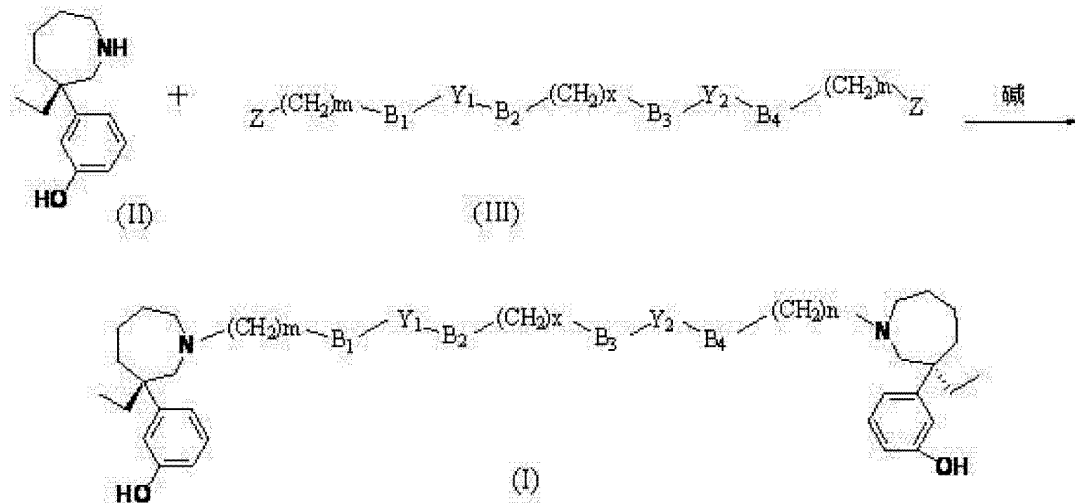
$N^1, N^2$ -双{3-[ (S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二酰胺;

$N^1, N^2$ -双{3-[ (S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二胺。

[0010]

本发明所述的盐类可以是左旋美普他酚双分子衍生物与无机酸或有机酸形成的盐, 其中, 所述无机酸是盐酸、硝酸、硫酸、磷酸、氢溴酸、氢碘酸或任意两者的混合酸; 所述有机酸是酒石酸、扁桃酸、柠檬酸、苹果酸、马来酸、富马酸或任意两者的混合酸。

[0011] 本发明提供了制备上述左旋美普他酚双分子衍生物的方法, 其特征在于, 其包括在碱性条件下将式 (II) 化合物与式 (III) 进行反应,



其中, Z 为 Br 或 Cl。

[0012] 所述碱选自吡啶、三乙胺、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、碳酸钾或钠、氢氧化钾或钠等, 优选三乙胺;

本发明中, 反应溶剂可采用乙醇、四氢呋喃、乙醚、二氧六环、乙腈、二氯甲烷、氯仿、苯、甲苯、N, N-二甲基甲酰胺(DMF)或者上述溶剂的混合物, 优选乙腈。

[0013] 本发明中, 式 (III) 化合物可自商业获得, 或者通过本领域熟练技术人员已知的方法制备得到。

[0014] 本发明的进一步目的是提供上述左旋美普他酚双分子衍生物及其盐类在治疗癫痫

呆症和其它神经退行性疾病中的用途。

[0015] 本发明的化合物同时具有乙酰胆碱酯酶抑制活性、金属离子螯合活性和抗 A $\beta$  聚集活性,这种多重作用是现有的美普他酚类衍生物所不具备的。因此,本发明所提供的新型化合物,有望被开发成为治疗 AD 的多靶向配体药物。另外,本发明化合物也可用于制备预防或治疗因自由基氧化损伤所致的其它神经退行性疾病的药物,这些神经退行性疾病包括帕金森病和亨廷顿氏病等。

## 附图说明

[0016] 图 1 是本发明 N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-双 {3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二酰胺盐酸盐与不同浓度的 Cu<sup>2+</sup> 混合的示差光谱图。

[0017] 图 2 是本发明 N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-双 {3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二酰胺盐酸盐与不同浓度的 Fe<sup>2+</sup> 混合的示差光谱图。

[0018] 图 3 是本发明 N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-双 {3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二酰胺盐酸盐与不同浓度的 Cu<sup>2+</sup> 混合的示差光谱图。

[0019] 图 4 是本发明 N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-双 {3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二酰胺盐酸盐与不同浓度的 Fe<sup>2+</sup> 混合的示差光谱图。

## 具体实施方式

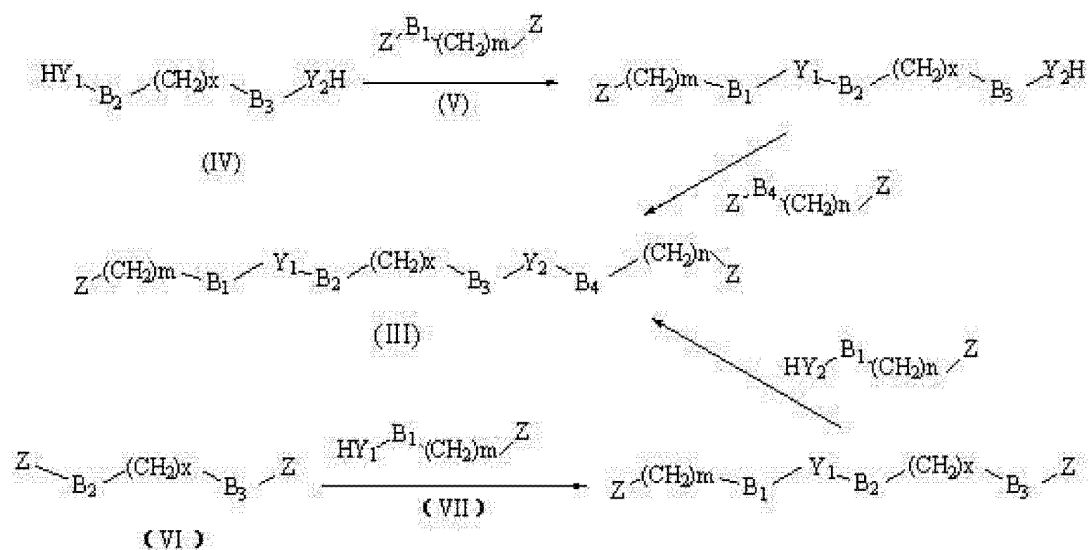
[0020] 以下结合具体的实施例来进一步说明本发明,下述实施例仅是示例性而非限制本发明。

[0021] (一) 通式 (II) 化合物的制备:

通式 (II) 化合物((3S)-N-去甲基美普他酚),由 (3S)-美普他酚去甲基制得,其制备方法参见中国专利申请(CN101037430 A);

其中,(3S)-美普他酚通过拆分美普他酚消旋体制得,其制备方法参见中国专利申请(CN1850804 A)。

[0022] (二) 通式 (III) 化合物的制备



方法一:

通式 (IV) 化合物和通式 (V) 化合物分别溶于适量的溶剂中。合适的溶剂包括四氢呋喃、乙醚、二氧六环、乙腈、二氯甲烷、氯仿、苯、甲苯或者上述溶剂的混合物,可以根据具体的反应情况,溶剂合适的量可以是在常温下能溶解化合物的最小溶剂量或更多。

[0023] 在碱性条件下,将通式 (V) 的化合物的上述溶液加到通式 (IV) 的化合物的上述溶液中,冷却下反应直至反应终点(反应终点的监控可采用本领域技术人员常用的方法,例如 TLC)。

[0024] 分离纯化得到通式 (III) 化合物,分离纯化的方法可采用本领域技术人员常用的分离方法,例如,萃取、柱层析、重结晶等。

[0025] 通式 (III) 化合物的可通过本领域常用的光谱分析手段确定,例如  $^1\text{H}$ NMR、MS 等。

[0026] 方法二:

通式 (VI) 化合物和通式 (VII) 化合物分别溶于适量的溶剂中,再在碱性条件下,将通式 (VI) 的化合物的溶液加到通式 (VII) 的化合物的溶液中,其它同方法一,得到通式 (III) 化合物。

[0027] 实施例 1  $\text{N}, \text{N}'-(1,3\text{-亚丙基})\text{-双}(2\text{-氯-N-甲基乙酰胺})$  (方法一)

$\text{N}, \text{N}'\text{-二甲基-1,3-丙二胺}$  2.42g (23.68mmol) 溶解在 20mL  $\text{CHCl}_3$  中,加入 NaOH 2g, 水 4 mL。冰浴冷却到 0 °C,缓慢滴加氯乙酰氯 5.37g (47.55mmol) 的 10mL  $\text{CHCl}_3$  液,0 °C 下继续搅拌反应 20min, TLC 监测反应终点(氯仿:乙醇=10:1), 加入水 10 mL,分出  $\text{CHCl}_3$  层,水层用  $\text{CHCl}_3$  15 mL $\times$ 2 提取,合并有机层,加入无水  $\text{MgSO}_4$  干燥。过滤后,减压浓缩,得到白色固体,用乙酸乙酯重结晶,得白色针晶 5.2g,收率 86.1%, mp 98-100 °C。

[0028]  $^1_3$  4.06(s, 4H,  $\text{Cl-CH}_2$ ), 3.45-3.33 (m, 4H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.10、3.07、2.96、2.94 (s, 6H,  $\text{N-CH}_3$ ), 1.94-1.80 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ );

MS (ESI): 255.1 (100.0%)、257.0 (64.4%)、256.1 (10.5%)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 277.0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; 531.1  $[\text{2M}+\text{Na}]^{2+}$ ;

采用相应的反应试剂,按照类似的方法制备下述化合物:

表 1

序号	通式(III)化合物	收率	MS(ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$
1	$\text{N}, \text{N}'-(1,2\text{-亚乙基})\text{-双}(2\text{-氯乙酰胺})$	87.2%	213.0
2	$\text{N}, \text{N}'-(1,3\text{-亚丙基})\text{-双}(2\text{-氯乙酰胺})$	81.9%	227.0
3	$\text{N}, \text{N}'-(1,3\text{-亚丙基})\text{-双}(4\text{-氯-N-甲基丁酰胺})$	74.0%	311.1

实施例 2  $\text{N}^1, \text{N}^2\text{-双}(3\text{-氯丙基})\text{-乙二酰胺}$  (方法二)

将 3-氯丙胺盐酸盐 2.6g (20.0mmol) 溶解在 20mL  $\text{CHCl}_3$  中,加入 NaOH 2g, 水 4mL。冰浴冷却到 0 °C,缓慢滴加乙二酰氯 1.27g (10.0mmol) 的 10mL  $\text{CHCl}_3$  液,0 °C 下继续搅拌反应 20min,有白色固体析出,抽滤,滤饼用少量水洗,干燥后,得白色固体 2.17g。滤液加入水 10 mL,分出  $\text{CHCl}_3$  层,水层用  $\text{CHCl}_3$  15 mL $\times$ 2 提取,合并有机层,加入无水  $\text{MgSO}_4$  干燥。过滤后,减压浓缩,又得到淡黄色固体 0.24g。粗品  $\text{N}^1, \text{N}^2\text{-双}(3\text{-氯丙基})\text{-乙二酰胺}$  收率 100%。取 1g 粗品用乙酸乙酯重结晶,得白色针晶 0.67g,收率 67.0%, mp 169-170 °C。

[0029]  $^1_3$  7.65(s, 2H,  $\text{NHCO}$ ), 3.59(t, 4H,  $\text{J}=6\text{Hz}$ ,  $\text{Cl-CH}_2$ ), 3.51 (dd, 4H,  $\text{J}_1=7\text{Hz}$ ,  $\text{J}_2=13\text{Hz}$ ,  $\text{N-CH}_2$ ), 2.08-2.02 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ );



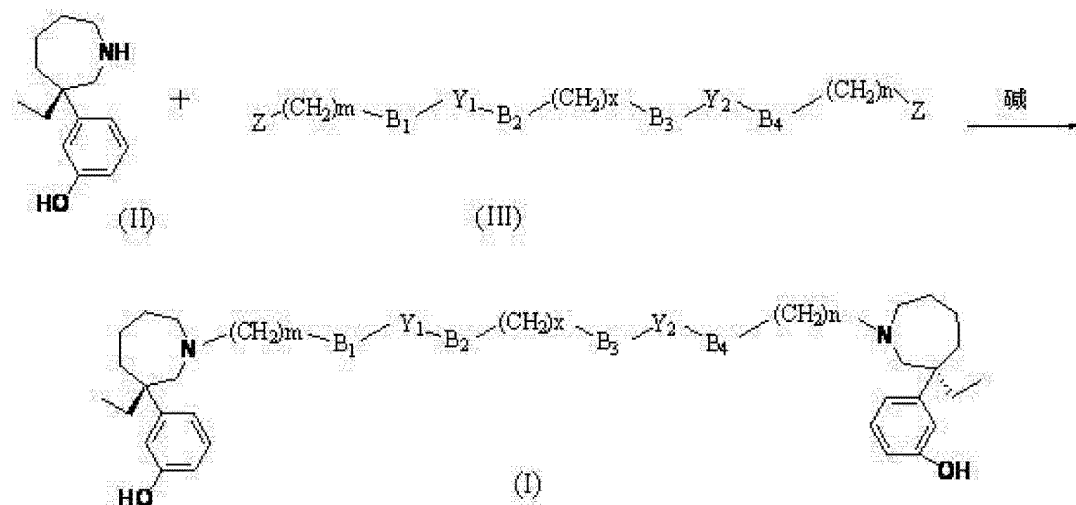
MS (ESI): 241.0  $[M+H]^+$ ; 263.0  $[M+Na]^+$

采用相应的反应试剂,按照类似的方法制备下述化合物:

表 2

序号	通式(III)化合物	收率	MS(ESI) $[M+H]^+$
1	$N^1, N^2$ -双(3-溴丙基)-丙二酰胺	75.1%	344.0
2	$N^1, N^2$ -双(2-氯乙基)-乙二酰胺	69.9%	213.0
3	$N^1, N^2$ -双(2-氯乙基)-丙二酰胺	73.4%	227.0

### (三) 通式 (I) 化合物的制备



其中, Z 为 Br 或 Cl。

[0030] 将上述制备的通式 (II) 化合物溶于适量的溶剂中。合适的溶剂包括四氢呋喃、乙醚、二氧六环、乙腈、二氯甲烷、氯仿、苯、甲苯或者上述溶剂的混合物,可以根据具体的反应情况,溶剂合适的量可以是在常温下或稍微加热能溶解化合物的最小溶剂量或更多。

[0031] 在碱性条件下,将上述制备的通式 (III) 的化合物加到通式 (II) 的化合物的上述溶液中,加热反应直至反应终点(反应终点的监控可采用本领域技术人员常用的方法,例如 TLC)。可加催化剂促进反应,例如加催化量的 KI。反应结束后,冷却,加适量的水,用氨水调节 pH 至 8 ~ 9,有机溶剂萃取(例如氯仿),干燥合并的有机相、柱层析分离得通式 (I) 化合物。

[0032] 通式 (I) 化合物的可通过本领域常用的光谱分析手段确定,例如  $^1\text{H}$ NMR、MS 等。

[0033] 实施例 3  $N, N'$ -(1, 3-亚丙基)-双{2-[ (S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-N-甲基-乙酰胺}

(3S)-N-去甲基美普他酚 (II) 1.5g (6.85 mmol) 微热溶解在 15 mL 乙腈中,加入三乙胺 1.9mL (13.7 mmol)。搅拌下加入实施例 1 化合物 0.75g (2.94mmol),回流反应 3 小时,冷却到室温,浓缩至干,加入 20 mL 饱和碳酸钠溶液,用氯仿 30mL×2、20mL×2 提取。合并有机层,无水硫酸钠干燥。过滤,浓缩到干,得黄色油状物,经硅胶柱层析(5% EtOH/  $\text{CHCl}_3$ ) 分离,得淡黄色固体 1.49g, 收率 81.6%。粗品 0.39g 用乙酸乙酯重结晶,得淡黄色晶体 0.26g, 收率 66.7%, mp68-71 °C。

[0034]  $^1_3$  7.11-7.08 (m, 2H, Ar-H), 6.94-6.64 (m, 6H, Ar-H), 3.28-3.21 (m, 5H, N-CH<sub>2</sub>), 3.18-3.16 (m, H, N-CH<sub>2</sub>), 3.05-2.95 (m, 3H, N-CH<sub>2</sub>), 2.76 (m, 3H, N-CH<sub>2</sub>), 2.70 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.68 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.57-2.52 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>), 2.18-2.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.61 (m, 10H, CH<sub>2</sub>), 1.48-1.37 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 0.49-0.45 (m, 6H, CH<sub>3</sub>); MS (ESI): 621.4 [M+H]<sup>+</sup>, 311.4 [M+2H]<sup>2+</sup>

实施例4 N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-双{3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二酰胺

(3S)-N-去甲基美普他酚(II) 0.79 g (3.60 mmol) 热溶解在 15 mL 乙腈中,加入三乙胺 0.8 mL (5.75mmol) 和实施例2化合物 0.35g(1.45 mmol),再加入催化量 KI, 回流反应 24 小时。冷却,蒸除溶剂,加水 20 mL,氯仿 20 mL, 用氨水调 pH= 8~9, 分出氯仿层,水层再用氯仿 20 mL×2 提取。合并氯仿层,无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。过滤,浓缩,得黄色油状物 1.17 g,硅胶柱层析分离(洗脱剂:氯仿:乙醇:氨水=93:6:1),得白色粉末 0.53 g,收率 59.7%。

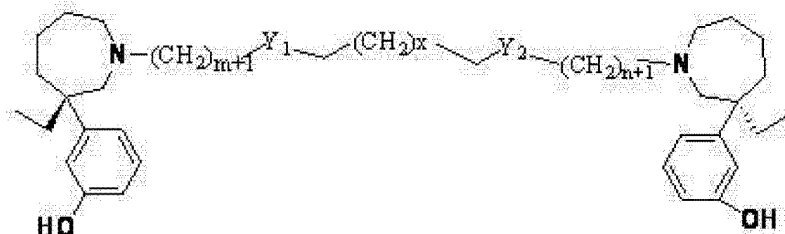
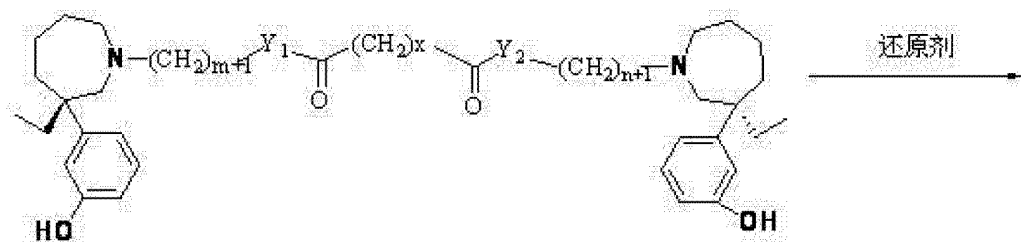
[0035] 607.5 [M+H]<sup>+</sup>

采用相应的反应试剂,按照类似的方法制备下述化合物:

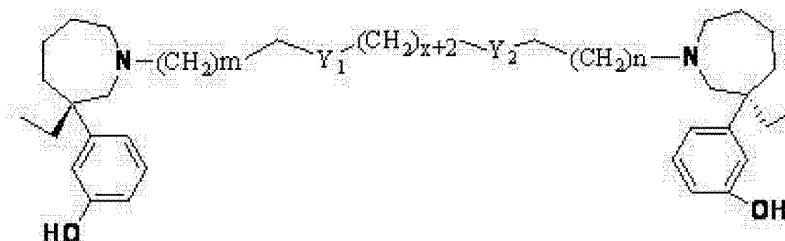
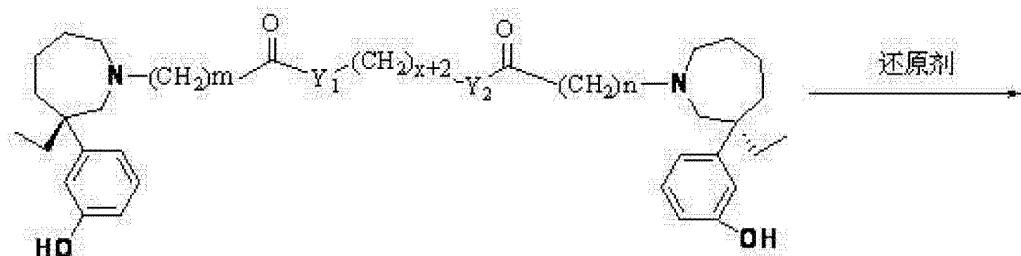
表 3

序号	通式(I)化合物	收率	MS(ESI) [M+H] <sup>+</sup>
1	N,N'-(1,3-亚乙基)-双(2-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-乙酰胺)	68.1%	579.4
2	N,N'-(1,3-亚丙基)-双(2-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-乙酰胺)	62.5%	593.5
3	N,N'-(1,3-亚丙基)-双(2-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-N-甲基-丁酰胺)	45.6%	677.4
4	N <sup>1</sup> ,N <sup>2</sup> -双(3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基)-丙二酰胺	70.9%	621.4
5	N <sup>1</sup> ,N <sup>2</sup> -双(3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-乙基)-乙二酰胺	60.3%	579.4
6	N <sup>1</sup> ,N <sup>2</sup> -双(3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-乙基)-丙二酰胺	43.0%	593.5

其中,B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、B<sub>4</sub>为CH<sub>2</sub>的通式(I')化合物也可通过还原相应的B<sub>1</sub>和B<sub>4</sub>(或者B<sub>2</sub>和B<sub>3</sub>)为CO的通式(I)化合物,合适的还原剂包括LiAlH<sub>4</sub>、NaBH<sub>4</sub>、KBH<sub>4</sub>或者KBH<sub>4</sub>/ZnCl<sub>2</sub>。



[0036] 或者



实施例 5 (3S, 3' S)-1, 1'-{2, 2'-[1, 3-亚丙基-双(甲亚氨基)]-双(2, 1-亚乙基)}-双(3-乙基-3, 1-亚氮杂环庚基)二苯酚

在无水 THF 5 mL 中加入  $\text{LiAlH}_4$  粉末 0.20 g (5.26 mmol), 冰水浴冷却下, 缓慢滴入实施例 3 制备的化合物 0.50 g (0.80 mmol) 的 10 mL 无水 THF 溶液, 回流反应 1 h, TLC 监测反应终点。冷却, 依次滴加水 0.10 mL、15% NaOH 水溶液 0.10 mL、水 0.30 mL。过滤, 滤饼用丙酮 20 mL 加热提取后, 再次过滤, 两次滤液合并后浓缩, 加水 15 mL, 氯仿 20 mL, 滴加 10%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  水溶液调节 pH 至 9。水层用氯仿 10 mL  $\times$  4 提取, 合并有机层, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。过滤, 浓缩, 得黄色油状物 0.42 g。硅胶柱层析, 得近无色油状物 0.28 g, 收率 29.4%。

[0037]  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.13 (t, 2H,  $J=7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 6.87 (s, 2H, Ar-H), 6.79 (d, 2H,  $J=7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 6.54 (d, 2H,  $J=8.0\text{Hz}$ , Ar-H), 2.93 (d, 2H,  $J=14.1\text{Hz}$ , N- $\text{CH}_2$ ), 2.75-2.57 (m, 8H, N- $\text{CH}_2$ ), 2.47-2.41 (m, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 2.36-2.26 (m, 8H, N- $\text{CH}_2$ ), 2.22 (s, 6H, N- $\text{CH}_3$ ), 2.11-2.07 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.64-1.54 (m, 16H,  $\text{CH}_2$ ), 0.55 (t, 6H,  $J=7.5\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ );

MS (ESI): 593.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 297.2  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

实施例 6  $\text{N}^1, \text{N}^2$ -双{3-[ (S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙

基}-乙二胺

在无水 THF 10 mL 中加入  $\text{LiAlH}_4$  粉末 0.23 g (6.05 mmol), 冰水浴冷却下, 缓慢滴入实施例 4 制备的化合物 0.53 g (0.87 mmol) 的 20 mL 无水 THF 溶液, 回流反应 24 h, TLC 监测反应终点。冷却, 依次滴加水 0.23 mL、15% NaOH 水溶液 0.23 mL、水 0.69 mL。过滤, 滤饼用丙酮 20 mL 加热提取后, 再次过滤, 两次滤液合并后浓缩, 加水 15 mL, 氯仿 20 mL, 滴加 10%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  水溶液调节 pH 至 9。水层用氯仿 10 mL  $\times$  4 提取, 合并有机层, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。过滤, 浓缩, 得黄色油状物 0.51 g。硅胶柱层析 (洗脱剂: 氯仿: 乙醇: 氨水 = 93:6:1), 得近无色油状物 122 mg, 收率 22.1%。MS (ESI): 579.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$

(四) 通式 (I) 化合物的盐的制备:

通式 (I) 化合物与各种无机酸或有机酸成盐制得其盐类。无机酸可以是盐酸、硝酸、硫酸、磷酸、氢溴酸或氢碘酸等, 有机酸可以是酒石酸、扁桃酸、柠檬酸、苹果酸、马来酸或富马酸等。

[0038] 实施例 7  $\text{N}^1, \text{N}^2$ -双 {3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二酰胺盐酸盐

实施例 4 制备的化合物 80 mg 溶解在 10 mL 无水乙醚中, 过滤, 滤液滴加无水 HCl-乙醚溶液调节 pH 至 4, 析出白色粉末盐酸盐, 过滤, 干燥后称重 59 mg, 收率 62.3%, mp. 154-157  $^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -7.7^{\circ}$  ( $c=0.390$ , MeOH)。

[0039]  $^1_{\text{H}}$  10.30 & 10.14 (br s, 4/3 H,  $\text{NH}^+$ ), 9.59, 9.50, (s, 2H, Ar-OH), 8.98-8.96 (m, 2H,  $\text{NHCO}$ ), 8.63 & 8.55 (br s, 2/3 H,  $\text{NH}^+$ ), 7.27-7.20 (m, 2H, Ar-H), 6.91-6.75 (m, 6H, Ar-H), 3.89 (d, 2/3 H,  $J=13.6$  Hz,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.57 (d, 4/3 H,  $J=14.1$  Hz,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.42 (m, 2H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.32-3.18 (m, 12H,  $\text{N-CH}_2$ ), 2.46-2.41 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.25-2.13 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ ), 2.08-2.01 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.98-1.79 (m, 9H,  $\text{CH}_2$ ), 1.61-1.48 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ ), 0.57 (t, 6H,  $J=7.3$  Hz,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{CNMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 160.08, 160.01, 157.55, 157.47, 144.82, 143.64, 129.42, 129.25, 117.23, 116.89, 114.10, 113.57, 113.49, 113.30, 63.68, 61.35, 58.63, 57.13, 56.58, 56.31, 43.70, 43.37, 36.39, 36.20, 35.33, 35.26, 34.43, 33.05, 26.33, 24.88, 22.84, 22.79, 20.76, 20.46, 8.10, 7.96;

MS (ESI): 607.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 304.3  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

实施例 8  $\text{N}^1, \text{N}^2$ -双 {3-[(S)-3-乙基-3-(3'-羟基苯基)-氮杂环庚烷-1-基]-丙基}-乙二胺盐酸盐

实施例 6 制备的化合物 69 mg 溶解在 10 mL 无水乙醚中, 过滤, 滤液滴加无水 HCl-乙醚溶液调节 pH 至 4, 析出白色粉末盐酸盐, 过滤, 干燥后称重 65 mg, 收率 75.6%, mp. 132-136  $^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -27.1^{\circ}$  ( $c=0.240$ , MeOH)。

[0040]  $^1_{\text{H}}$  10.26 & 10.19 & 9.94 & 9.83 (br s, 4H,  $\text{NH}^+$ ), 9.51, 9.43, (s, 2H, Ar-OH), 8.77 & 8.26 & 8.17 (s, 2H, NH), 7.22-7.13 (m, 2H, Ar-H), 6.90-6.69 (m, 6H, Ar-H), 3.94 (m, 2/3 H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.57 (m, 4/3 H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.32-2.80 (m, 14H,  $\text{N-CH}_2$ ), 2.41-2.01 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1.98-1.67 (m, 9H,  $\text{CH}_2$ ), 1.53-1.47 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ ), 0.51 (t, 6H,  $J=7.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{CNMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 157.55, 157.45, 144.77 & 144.70, 143.84, 129.56, 129.29,

117.34, 117.03, 113.94, 113.60, 113.50, 113.31, 63.99&63.85, 61.33, 58.59, 56.23, 55.97, 55.88, 43.98, 43.82, 43.43, 40.00, 36.16, 35.39, 35.09, 35.07, 33.14, 32.98, 26.38&26.34, 25.18, 21.22, 20.72&20.31, 19.93&19.49, 18.50, 10.91, 8.12&8.01

MS (ESI): 579.4  $[M+H]^+$ , 290.4  $[M+2H]^{2+}$

#### (五) AChE 抑制活性的测试

酶抑制活性采用 Ellman 比色法测定,根据乙酰胆碱酯酶水解乙酰胆碱,生成胆碱及乙酸,胆碱与巯基显色剂反应生成黄色化合物,比色法检测胆碱数量,从而以水解产物胆碱的数量反映乙酰胆碱酯酶活力的实验原理,按 AChE 试剂盒说明书测定胆碱酯酶活性。对照药选择上市药物利斯的明(Rivastigmine)。

[0041] AChE 酶源:取 250g 左右的大鼠颅内大脑,分离出前额叶皮质,称取重量后加 9 倍生理盐水制成 10% 组织匀浆,3500rpm 离心 10min,取上清待测。

[0042] 反应液内含 200  $\mu$ L 酶液 (0.415 U/mL, 0.1 M 磷酸钠缓冲液, pH 8.0), 300  $\mu$ L Ellman 显色剂 5, 5' - 二硫代双 (2- 硝基苯甲酸) (DTNB) 3.3 mM (0.1 M 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 含  $\text{NaHCO}_3$  6 mM) 和 30  $\mu$ L 酶抑制剂溶液。于 37 $^{\circ}$  C 保温 20 分种后,加入碘化硫代乙酰胆碱 (0.05 mM 水溶液 300  $\mu$ L) 作为底物。用紫外分光光度计在 25 $^{\circ}$  C 时 412 nm 波长下测定化合物的光密度,与不加待测化合物的空白管比较计算得出的降低百分率即为酶抑制率。每个化合物均测双管。

[0043] 胆碱酯酶活力 (U/mg 蛋白) =  $(\text{OD}_{\text{测定管}} - \text{OD}_{\text{对照管}}) / (\text{OD}_{\text{标准管}} - \text{OD}_{\text{空白管}}) * 1 \mu\text{mol/mL}$

胆碱酯酶活性抑制率 (%) =  $(\text{ChE 活力}_{\text{对照}} - \text{ChE 活力}_{\text{加药}}) / \text{ChE 活力}_{\text{对照}} * 100\%$

按照上述公式计算化合物的胆碱酯酶活性抑制率。每个化合物均配成  $10^{-6}$  mol/L 浓度进行初筛;对照药物为石杉碱甲。按照初筛结果选择化合物的七至九个浓度测定其酶抑制率,并以该化合物摩尔浓度的负对数与酶抑制率进行线性回归,求得 50% 抑制时的摩尔浓度即为该化合物的  $\text{IC}_{50}$  值。其中,实施例 7 和实施例 8 及对照药物的结果见表 4。

[0044] 表 4

Compound	AChE (Mice brain AChE)	
	% Inhibition at 100 $\mu$ M	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu$ M)
实施例 7	94.1 $\pm$ 7.6	1.8 $\pm$ 0.4
实施例 8	84.6 $\pm$ 6.8	1.5 $\pm$ 0.3
Rivastigmine	81.5 $\pm$ 4.6	5.4 $\pm$ 1.5

#### (六) 金属离子螯合活性测试

利用分光光度法测试目标化合物的金属离子螯合活性。目标化合物在 200~400nm 的近紫外区有明显吸收,而  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  在此波长范围内无明显吸收(即使浓度达到 500  $\mu$ M)。根据体系中各组分的吸光度具有加和性 ( $A = \varepsilon_1 C_1 + \varepsilon_2 C_2 + \dots + \varepsilon_n C_n$ ),本发明配制了不同配比的待测液:目标化合物的浓度为常数 30  $\mu$ M,而  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  离子的浓度逐渐提高 (1~40  $\mu$ M),混合 30min 后进行检测。利用示差光谱直观地显示化合物与金属离子混合前后紫外吸收光谱的变化,这种吸收峰的改变说明了体系中络合物的生成。其中,实施例 7 与不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  混合的示差光谱(图 1),与不同浓度的  $\text{Fe}^{2+}$  混合的示差光谱(图 2) 和实施例 8 分别与不同浓

度的 Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup> 混合的示差光谱(图 3 和 4) 说明了这两个化合物具有金属离子螯合活性。

[0045] (七) 对 AChE 诱导的 Aβ 聚集抑制活性测试

Aβ<sub>1-40</sub> 肽 (Biosource) 2 μL 于六氟异丙醇 (HFIP) 中冻干后溶解在 DMSO 中, 加 0.215 M 磷酸钠缓冲液 (pH 8.0) 配制成 230 μM 的 Aβ 试液; Aβ 试液中加入 16 μL 人重组 AChE (Sigma-Aldrich) 配制成 AChE 终浓度为 2.30 μM 的 AChE-Aβ 试液; AChE-Aβ 试液中加入 2 μL 供试抑制剂配制成抑制剂-AChE-Aβ 试液。上述试液室温孵育 48 h, 重复测试两次。Aβ 沉积纤维的形成用硫磺素 T 荧光法检测。

[0046] 孵育结束, 加入含 1.5 μM 硫磺素 T (Sigma-Aldrich) 的 50 mM 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 8.5) 稀释成 2.0 mL。荧光检测, 激发波长和发射波长分别为 446 nm 和 490 nm。计算抑制剂在不同浓度下对 AChE 诱导 Aβ 聚集的抑制百分率, 计算公式:  $100 \times (IF_i/IF_o - 1)$ , IF<sub>i</sub> 和 IF<sub>o</sub> 分别表示抑制剂-AChE-Aβ 试液和 AChE-Aβ 试液的荧光强度。记录抑制曲线, 进行回归分析, 并计算 IC<sub>50</sub> 值。对照药选择上市药物利斯的明 (Rivastigmine) 和已知的特异性 AChE 诱导的 Aβ 聚集抑制剂碘化丙啶 (Propidium iodide)。其中, 实施例 7 和实施例 8 及对照药物对 AChE 诱导的 Aβ 聚集抑制活性测试结果如表 5 所示。

[0047] 表 5

Compound	Human AChE-induced Aβ aggregation	
	IC <sub>50</sub> ± SEM (μM)	% Inhibition at 100 μM
实施例7	49.1 ± 5.0	53.2 ± 4.3
实施例8	44.2 ± 4.6	45.3 ± 4.0
Rivastigmine	—	1.1 ± 0.5
Propidium iodide	11.9 ± 0.4	80.2 ± 4.9

(八) 对 Cu<sup>2+</sup> 诱导的 Aβ 聚集抑制活性测试

应用浊度法检测目标化合物对 Cu<sup>2+</sup> 诱导的 Aβ 聚集的抑制活性。将 Aβ<sub>1-40</sub> (终浓度 10 μM) 与 Cu<sup>2+</sup> (终浓度为 20 μM) 和目标化合物 (终浓度为 100 μM) 在 37 °C 下孵育, 反应的缓冲体系为 20 mM Hepes, 150 mM NaCl 缓冲液, 体积为 100 μL。30 分钟后, 在 λ = 405nm 处测定吸光度。计算化合物在此浓度下对 Cu<sup>2+</sup> 诱导的 Aβ 聚集的抑制百分率。对照药选择已知的金属离子螯合剂二亚乙基三胺五乙酸 (diethylenetriamine pentaacetic acid, DTPA)。

[0048] 其中, 实施例 7 和实施例 8 及对照药物的测试结果如表 6 所示。

[0049] 表 6

Compound	% Inhibition of Cu <sup>2+</sup> -induced Aβ Aggregation at 100 μM
实施例 7	75.1 ± 8.4
实施例 8	76.4 ± 6.9
DTPA	85.6 ± 7.2

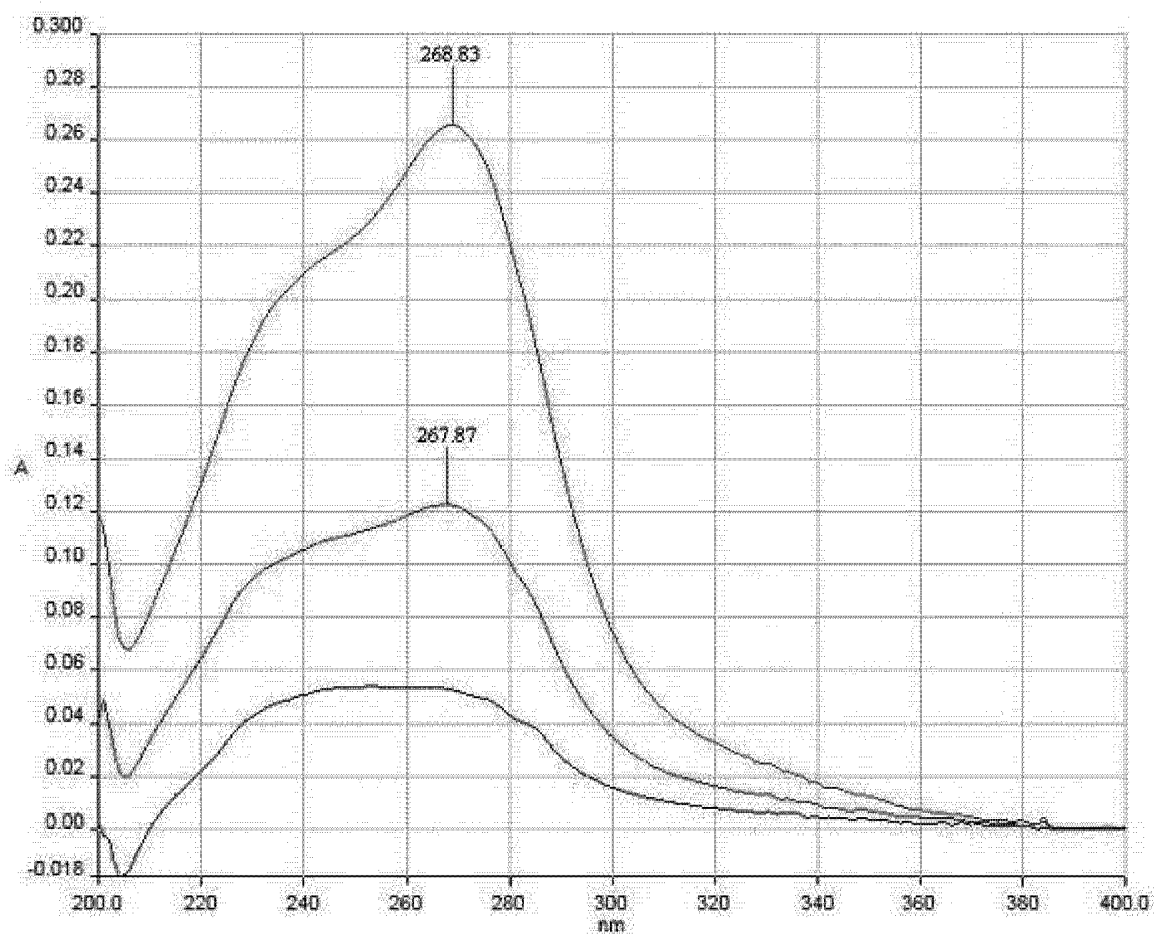


图 1

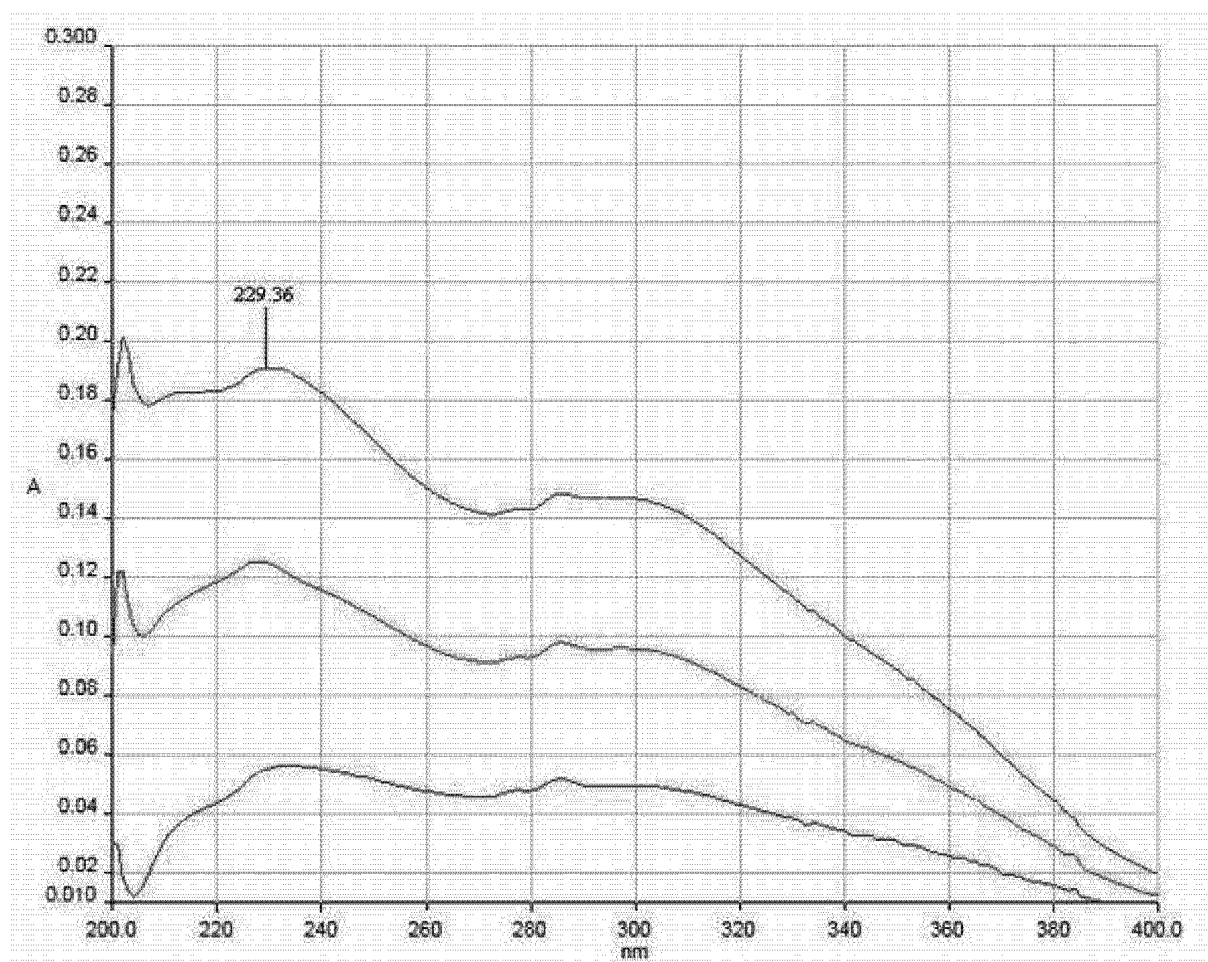


图 2



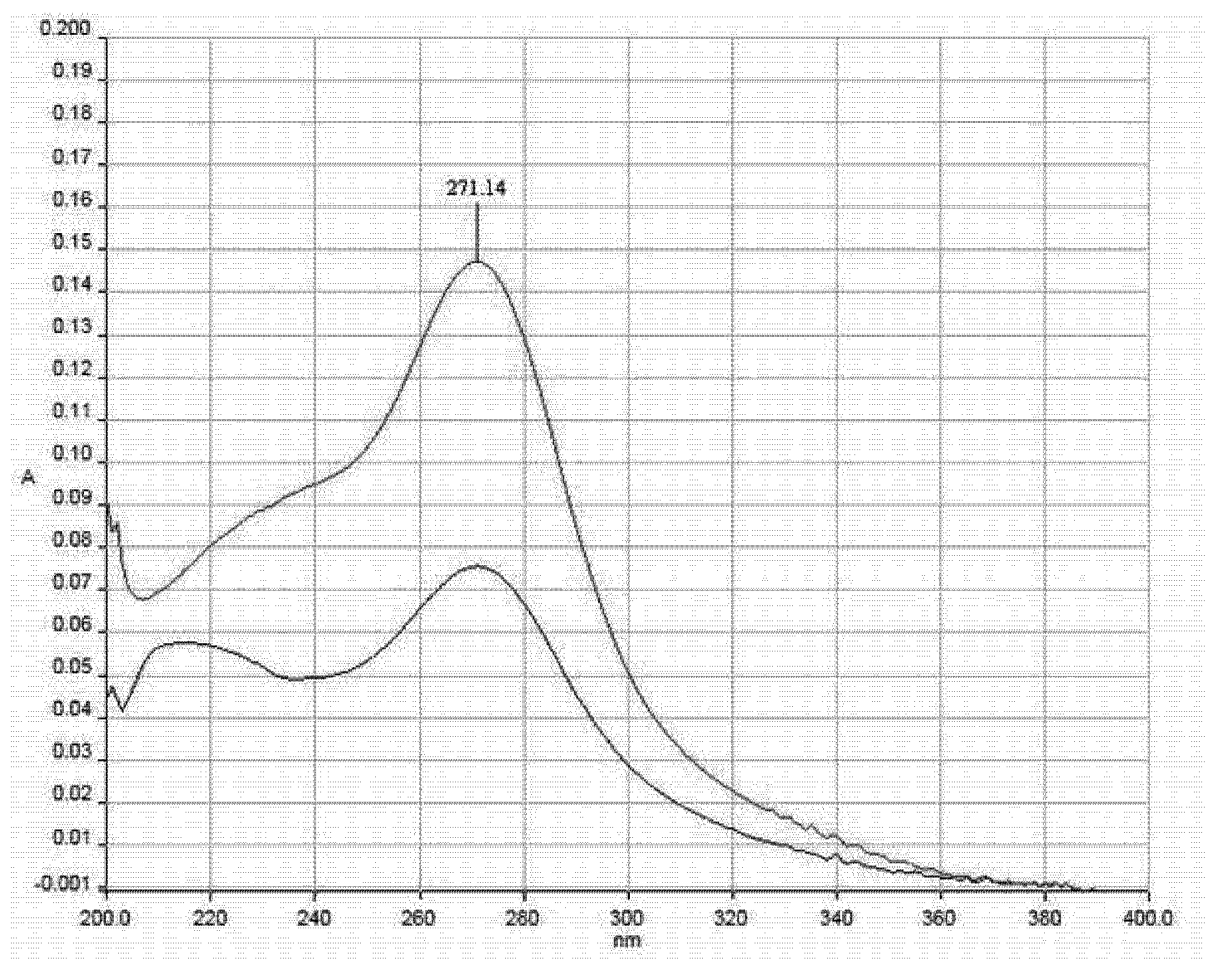


图 3

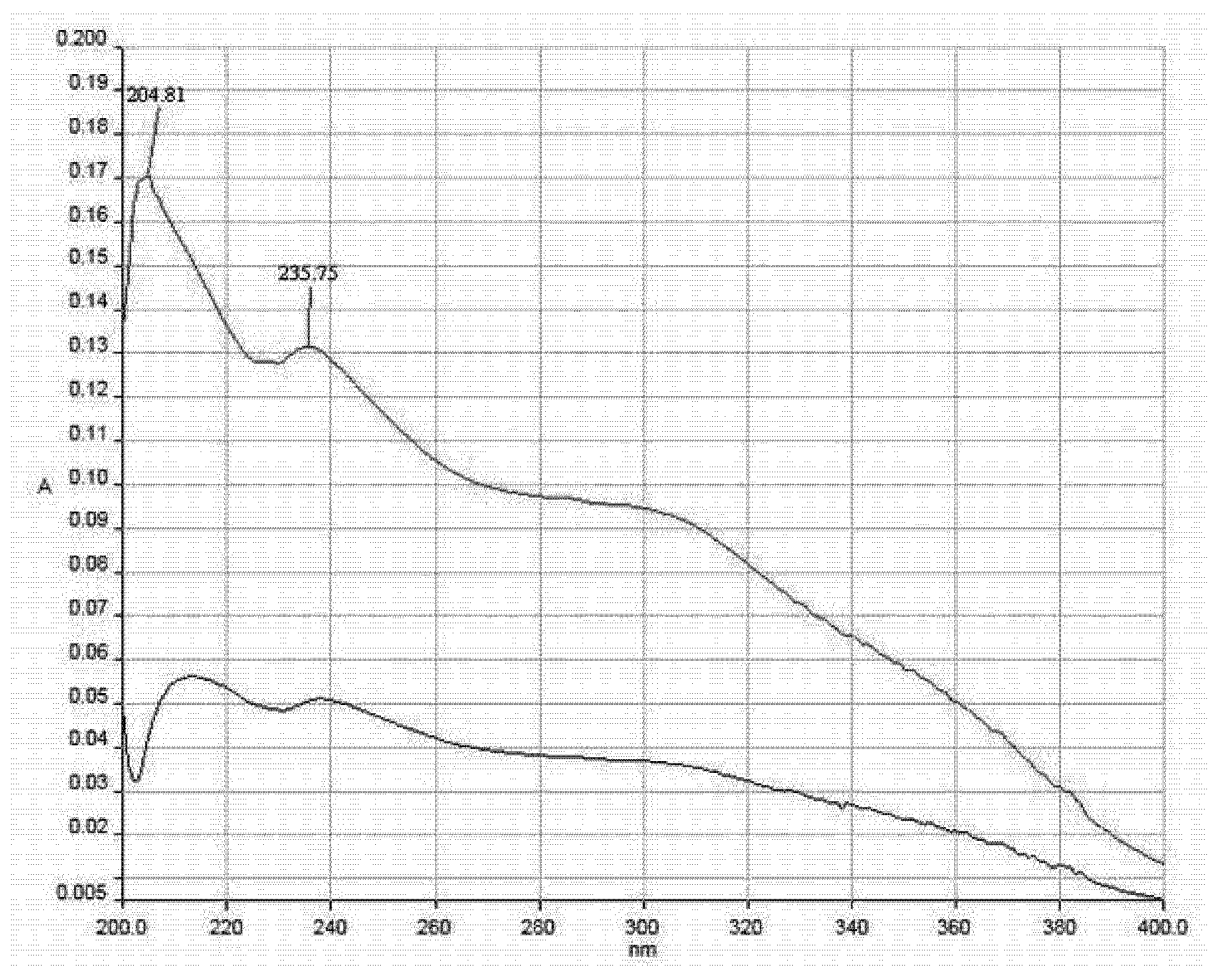


图 4