

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610134004.4

[51] Int. Cl.

C07C 217/20 (2006.01)
C07D 211/22 (2006.01)
C07D 295/088 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/138 (2006.01)
A61K 31/5375 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 4 月 18 日

[11] 公开号 CN 1948274A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/4965 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

[22] 申请日 2006.10.25

[21] 申请号 200610134004.4

[71] 申请人 沈阳药科大学

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路 103 号

[72] 发明人 陈国良 李 杰 王爱萍 陈 玲
景永奎 吴春福

[74] 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限公司
代理人 李宇彤

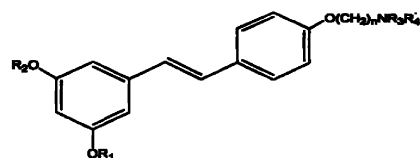
权利要求书 3 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

白藜芦醇衍生物及其制备方法和用途

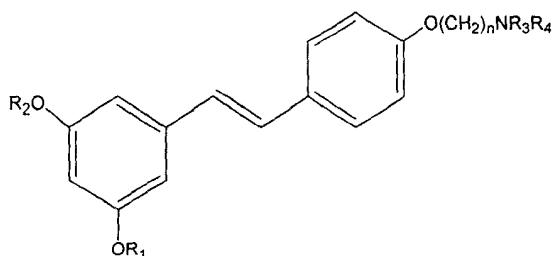
[57] 摘要

本发明属于医药技术领域，公开了白藜芦醇衍生物及其制备方法和用途。分别以 3, 5 - 二烷氧基 - 4' - 羟基二苯乙烯、对羟基苯甲醛为原料制备了化合物(I)，工艺简单易行。其可药用碱和可药用盐对肿瘤、心血管疾病、炎症等多种疾病具有良好的预防与治疗作用，其可药用盐，活性明显强于白藜芦醇和紫檀芪，且成盐可以提高白藜芦醇和紫檀芪的稳定性并可改善其药代动力学参数。(其中 R_1 和 R_2 为甲基或乙基或丙基； n 为 1 ~ 4； NR_3R_4 为常见的胺，如二甲胺、二乙胺、二丙胺、二异丙胺、四氢吡咯、哌啶、吗啉或取代的哌啶)。



(I)

1、白藜芦醇衍生物，其特征在于：由下列通式（I）表示的白藜芦醇衍生物或其可药用盐：

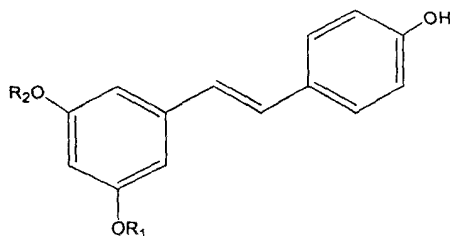


(I)

其中 R_1 和 R_2 为甲基或乙基或丙基； n 为 1~4； NR_3R_4 为常见的胺，如二甲胺、二乙胺、二丙胺、二异丙胺、四氢吡咯、哌啶、吗啉或取代的哌啶。

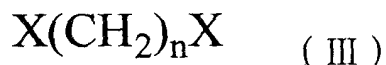
2、一种制备式 I 化合物白藜芦醇衍生物的方法，其特征在于：该方法包括：

A. 以 3,5-二羟基苯甲酸为原料，在碱的作用下与卤代烃或硫酸酯成醚同时成酯，然后经还原、卤代，与亚磷酸三乙酯反应后，立即与 4-苄氧基苯甲醛发生 Wittig-Horner 反应形成 3,5-二烷氧基-4'-苄氧基二苯乙烯，再在三氯化铝/*N,N*-二甲基苯胺的作用下脱去苄基制得 3,5-二烷氧基-4'-羟基二苯乙烯，成式 II 化合物

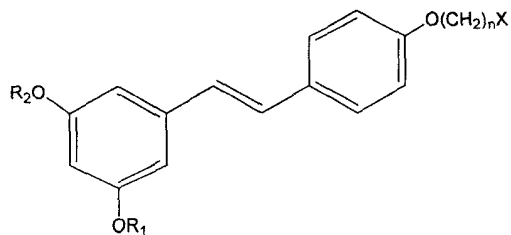


(II)

其中 R_1 和 R_2 具有权利要求 1 中的含义；碱为无机碱，如碳酸钠（钾、锂）、碳酸氢钠（钾）、氢氧化钠（钾、锂），或为有机碱，如三乙胺、吡啶、醇钠（钾）、氢化钠（钾、锂）、氨基钠（钾、锂）；与式 III 化合物缩合

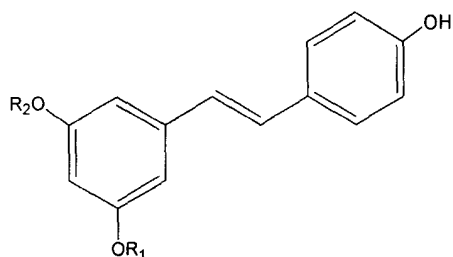


其中 X 为卤素， n 具有权利要求 1 中的含义；得到式 IV 化合物



式IV化合物与 HNR_3R_4 反应得到式 I 化合物；其中 NR_3R_4 具有权利要求 1 中的含义；

B. 在碱的作用下，式 II 化合物



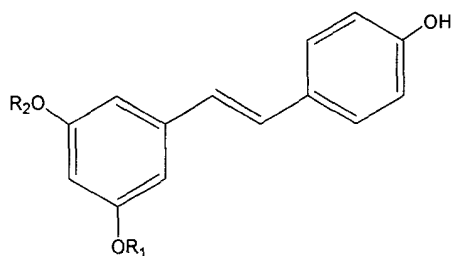
其中 R_1 和 R_2 具有权利要求 1 中的含义；碱为无机碱，如碳酸钠（钾、锂）、碳酸氢钠（钾）、氢氧化钠（钾、锂），或为有机碱，如三乙胺、吡啶、醇钠（钾）、氢化钠（钾、锂）、氨基钠（钾、锂）与式 V 化合物缩合



其中 X 为卤素，n 具有权利要求 1 中的含义； NR_3R_4 具有权利要求 1 中的含义；

得到式 I 化合物；

C. 在碱的作用下，式 II 化合物



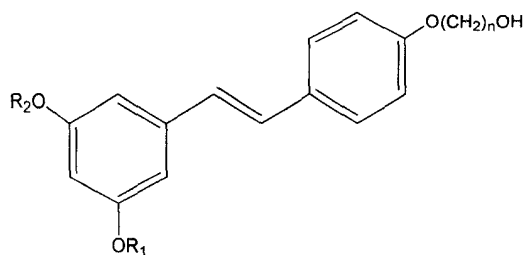
其中 R_1 和 R_2 具有权利要求 1 中的含义；碱为无机碱，如碳酸钠（钾、锂）、碳酸氢钠（钾）、氢氧化钠（钾、锂），或为有机碱，如三乙胺、吡啶、醇钠（钾）、氢化钠（钾、锂）、氨基钠（钾、锂）

与式 VI 化合物缩合

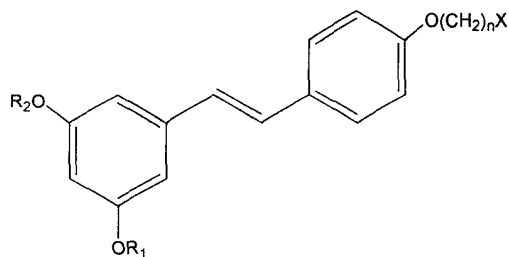


其中 X 为卤素，n 具有权利要求 1 中的含义；

得到式 VII 化合物

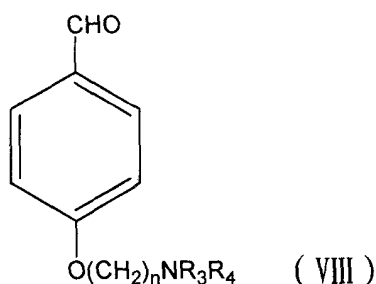


式VII化合物与卤化剂如二氯亚砷、三卤化磷、五氯化磷、三氯氧磷反应得到式IV化合物

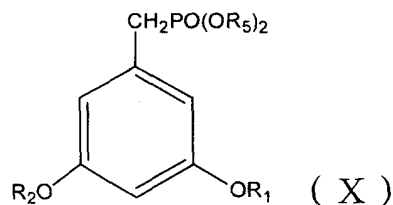
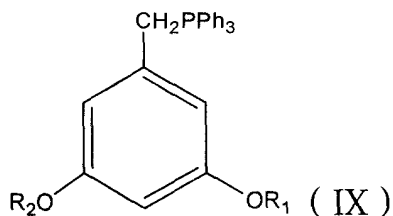


式IV化合物与 HNR_3R_4 反应得到式I化合物；其中 NR_3R_4 具有权利要求1中的含义；

D. 式VIII化合物，



其中 NR_3R_4 具有权利要求1中的含义；n具有权利要求1中的含义；与式IX或式X化合物



其中 R_1 和 R_2 具有权利要求1中的含义； R_5 为低级烷烃；经 Wittig 反应或 Wittig-Horner 反应制得式I化合物。

3、一种药物组合物，其特征在于：含有一种或多种可药用载体和有效量的权利要求1中式(I)表示的白藜芦醇衍生物或其可药用盐组成的化合物。

4、权利要求1化合物在制备治疗肿瘤、炎症、心血管疾病药物中的应用。

白藜芦醇衍生物及其制备方法和用途

技术领域:

本发明属于医药技术领域,涉及几种白藜芦醇的衍生物及其制备方法和用途。

背景技术:

白藜芦醇广泛存在于毛叶藜芦、虎杖、大黄等中药和葡萄等食物中。早在1939年,日本就从毛叶藜芦中提取分离得到了白藜芦醇(日本化学会志,1939,60:1090~1100)。上世纪八十年代末,WHO进行的流行病调查发现,尽管法国人爱吃奶酪这种高脂肪的食物,但法国人冠心病发病率较其他西方国家低(即所谓的“法国悖论”),究其原因便是法国人爱喝的葡萄酒中含有白藜芦醇。深入研究发现白藜芦醇对肿瘤、心血管疾病、炎症等多种疾病具有良好的预防与治疗作用。

白藜芦醇对心血管作用主要表现为抗动脉粥样硬化和抑制LDL氧化(*Biochem Pharmacol*, 1997, 53(9):1347~1355; *Life Sci*, 1997, 61(21):2103~2110; *Biochem Mol Biol Int*, 1999, 47(6):1089~1096; *Biochem Pharmacol*, 1998, 55(6):811~816)、抑制血小板聚集(JP 61-171427; *Planta Med*, 1992, 58(3):274~276)、抗缺血后再灌注损伤(*Cardiovasc Res*, 2000, 47:549~555; *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(1-2):160~169; *J Stud Alcohol*, 2001, 62(6):730~735)和促进血管松弛、保护和维持内皮完整性(*Gen Pharmacol*, 1996, 27(2):363~366; *J Hypertens*, 2000, 18(12):1833~1840)等多方面。

1997年, Jang M等(*Science*, 1997, 275:218~220)报道白藜芦醇具有很好的癌症预防作用,对致癌的三个阶段均有很强的抑制作用。研究发现,白藜芦醇通过抗氧化和抗突变作用抑制癌症的始发阶段,通过抗炎作用和抑制环氧化酶、过氧化酶活性来抑制癌促阶段,通过诱导癌细胞分化作用抑制癌症扩展阶段。在用DMBA作为诱变剂,TPA为促癌剂的小鼠的皮肤癌试验中,每周两次分别给予白藜芦醇1、5、10和25 μmol ,18周后,与对照组比较,肿瘤发生率分别降低50、63、63和88%,皮肤癌数分别降低68、81、76和98%,同时,未有任何毒性表现。因此,认为白藜芦醇是一个优良的癌症化学预防剂。研究发现白藜芦醇对肿瘤的作用与其抗氧化(*Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(8):775~783)、抗炎(*Science*, 1997, 275:218~220; *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(9):1185~1189)、抑制肿瘤细胞增殖(*Clin Cancer Res*, 2001, 7(5):1466~1473; *Cancer Lett*, 2001, 163(1):43~49; *Carcinogenesis*, 1999, 20(2):237~242; *Exp Cell Res*, 1999, 249:109~115; *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250:53~58等)、诱导肿瘤细胞凋亡与分化(*Blood*, 1998, 92(3):996~1002; *第四军医大学学报*, 2004, 25(19):1797~1799; *陕西医学杂志*, 2004, 33(11):1031~1033)等多方面的作用有关。

此外,白藜芦醇还具有预防老年痴呆症(*J Neurochemistry*, 2000, 75(1):141~150)、抑制 $\text{H}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶(*Biochem Pharmacol*, 1992, 44

(10):1947~1951)、抗菌等多种活性。

正因为白藜芦醇具有上述多种生物活性,引起人们对白藜芦醇及其衍生物、类似物的研究,大多为白藜芦醇的甲基衍生物、酯、羟基类似物等,其中白藜芦醇 3,5-双甲基化产物--3,5-二甲氧基-4'-羟基二苯乙烯(Pterostilbene, 紫檀芪)是受到广泛关注的白藜芦醇衍生物,其广泛存在于广西血竭(《中国中药杂志》,1998,23(10):616~618)、葡萄(*J Agric Food Chem*,2000,48(12):6103~6105)、蜂胶(*Experientia*,1978,34(2):157~159)等中,具有抗氧化、抗增殖、降血脂、中等强度抑制 COX-1 和 COX-2 的活性(IC_{50} 分别为 $19.8\mu M$ 和 $83.9\mu M$)、诱导 HL-60 细胞凋亡($IC_{50}70\mu M$)、预防 DMBA 诱发的癌变($ED_{50}4.8\mu M$)、降血糖作用(对 streptozotocen 致糖尿病的大鼠模型,其降糖作用与二甲双胍相近)和抗真菌活性(其抗真菌活性为白藜芦醇的五倍)(*J Agric Food Chem*,2002,50(12):3453~3457; *J Nat Prod*,1997,60(6):609~610; *J Agric Food Chem*,2005,53(9):3403~3407; *J Org Chem*,2004,69(21):7101~7107)。

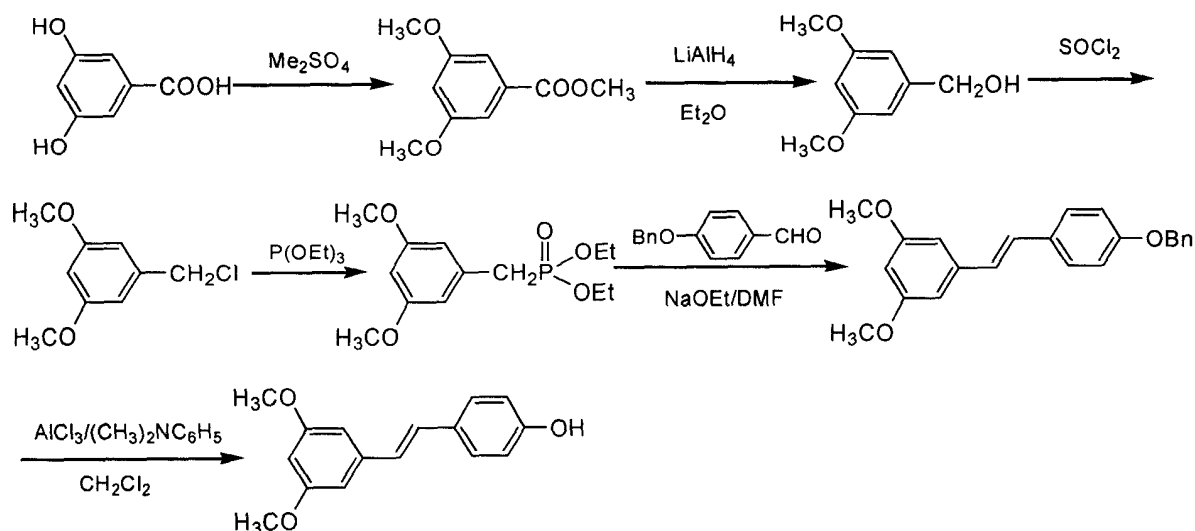
紫檀芪还有强大的抗增殖作用,较白藜芦醇作用强且选择性强,能抑制 α -和 λ -DNA 聚合酶,也能抑制 SV40 DNA 的复制,其抑制活性与 α -、 δ -和 ξ -DNA 三重聚合酶抑制剂蚜肠霉素(Aphidicolin)相近。对恶性黑色素瘤细胞 B16M-F10,每天用 $40\mu M$ 的紫檀芪处理 60 分钟具有显著的抑制作用,抑制率达 56%(*Neoplasia*,2005,7(1):37~47)。Tolomeo M 等(*Int J Biochem Cell Biol*,2005,37(8):1709~1726)报道紫檀能诱导耐多药和 BCR-ABL 表达的白血病细胞的显著凋亡,而对正常细胞几乎没有影响,研究者认为其分子结构中的 3,5-二甲氧基是其活性必需结构。

发明内容:

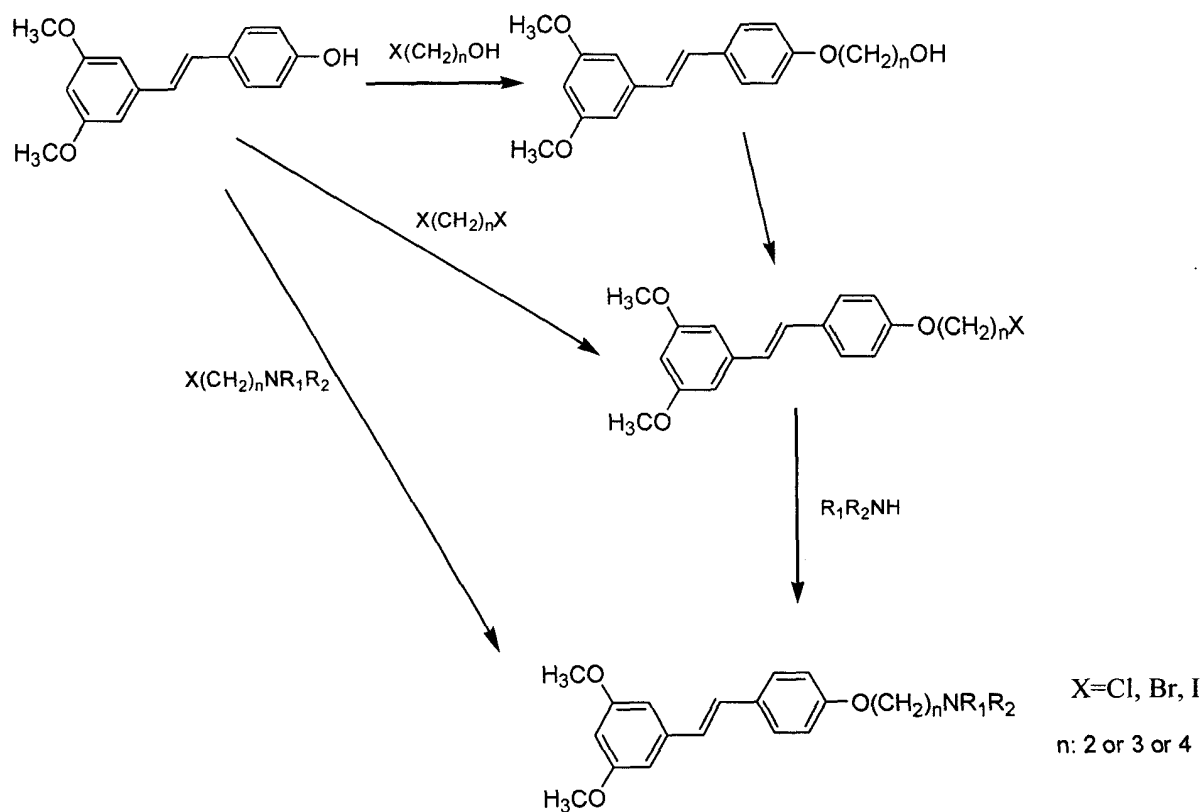
本发明以白藜芦醇和紫檀芪为先导化合物,提供了白藜芦醇的多种衍生物及其制备方法和用途。

本发明所述化合物,与白藜芦醇和紫檀芪一样,对肿瘤、心血管疾病、炎症等多种疾病具有良好的预防与治疗作用,一些化合物的活性明显强于白藜芦醇和紫檀芪。而且这些化合物因结构中存在取代胺基,能够成盐可以提高白藜芦醇和紫檀芪的稳定性并可改善其药代动力学参数。

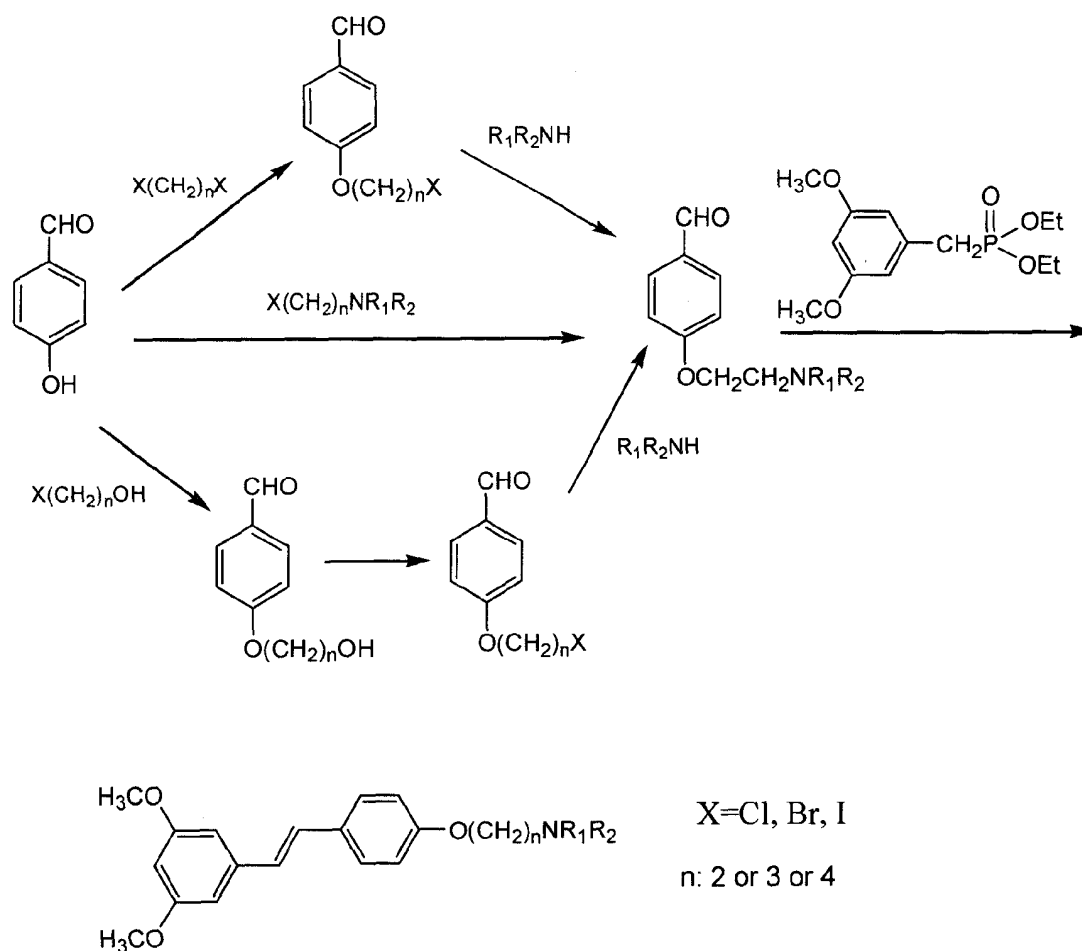
制备本发明所述化合物的起始原料 3,5-二甲氧基-4'-羟基二苯乙烯的制备,可以以 3,5-二羟基苯甲酸为原料,在碱的作用下与卤代烃或硫酸酯成醚同时成酯,然后经还原、卤代,与亚磷酸三乙酯反应后,立即与 4-苄氧基苯甲醛发生 Wittig-Horner 反应形成 3,5-二甲氧基-4'-苄氧基二苯乙烯,再在三氯化铝/*N,N*-二甲基苯胺的作用下脱去苄基制得 3,5-二甲氧基-4'-羟基二苯乙烯。以 3,5-二甲氧基-4'-羟基二苯乙烯为例,其合成路线如下:



本发明的化合物制备方法包括：以 3,5-二烷氧基-4'-羟基二苯乙烯为原料，在碱的作用下，与 1,2-二卤乙烷（或 1,3-二卤丙烷或 1,4-二卤丁烷）反应生成含卤素烷氧取代基的二苯乙烯，再与各种取代二级胺反应将卤素转化为各种取代胺基；或以 3,5-二烷氧基-4'-羟基二苯乙烯为原料，在碱的作用下，与 2-取代胺基卤乙烷（或 3-取代胺基卤丙烷或 4-取代胺基卤丁烷）反应制得；或以 3,5-二烷氧基-4'-羟基二苯乙烯为原料，在碱的作用下，与 2-卤乙醇（或 3-卤丙醇或 4-卤丁醇）反应制得含羟基烷氧取代基的二苯乙烯，再与卤化剂如二氯亚砷、三卤化磷、五氯化磷、三氯氧磷等反应将羟基卤代，再与各种取代二级胺反应将卤素转化为各种取代胺基。



本发明的化合物制备方法还包括：以对羟基苯甲醛为原料，在碱的作用下，与 1,2-二卤乙烷（或 1,3-二卤丙烷或 1,4-二卤丁烷）反应生成 4-(2-卤乙氧基)苯甲醛或 4-(3-卤丙氧基)苯甲醛或 4-(4-卤丁氧基)苯甲醛，再与各种取代二级胺反应将卤素转化为各种取代胺基，然后再发生 Wittig-Horner 反应制得目标化合物；或 2-卤乙醇（或 3-卤丙醇或 4-卤丁醇）与各种取代二级胺反应将卤素转化为各种取代胺基，再与卤化剂如二氯亚砷、三卤化磷、五氯化磷、三氯氧磷等反应将羟基卤代，在碱的作用下与对羟基苯甲醛反应生成 4-(2-卤乙氧基)苯甲醛或 4-(3-卤丙氧基)苯甲醛或 4-(4-卤丁氧基)苯甲醛，经 Wittig-Horner 反应制得目标化合物。



分别采用如上方法制备的白藜芦醇衍生物，其制备方法简单，工艺稳定，可操作性强。所述化合物，与白藜芦醇和紫檀芪一样，对肿瘤、心血管疾病、炎症等多种疾病具有良好的预防与治疗作用，一些化合物的活性明显强于白藜芦醇和紫檀芪。

具体实施方式：

实施例 1：3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯的合成

向 250 ml 三颈瓶中，加入 7.7 g (0.05 mol) 3,5-二羟基苯甲酸，20 g (0.15 mol) 无水碳酸钾，15 ml (0.15 mol) 硫酸二甲酯和 160 ml 丙酮，充分搅拌回流反应 5 小时。滤除碳酸钾，蒸馏除去丙酮。加入 160 ml 水和

160 ml 乙醚，分取有机层，再依次用氨水(16 ml × 2)，水(32 ml)，5%盐酸(32 ml × 2)，水(16 ml)洗，加入无水硫酸钠干燥，蒸除乙醚，自然析晶，干燥，得 9.53 g 产品，收率为 93.6%，mp 42 ~ 43℃。

实施例 2: 3,5-二甲氧基苯甲醇的合成

向 250 ml 三颈瓶中加入 4.0 g (0.04 mol) 四氢锂铝，30ml 无水乙醚。搅拌下滴加 4.0 g (0.02 mol) 3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯的 30 ml 无水乙醚溶液，滴完加热回流反应 4h。停止反应，滴加 10 ml 湿乙醚和 60 ml 水，再滴加稀硫酸(10 ml 浓硫酸溶于 30 ml 水)，反应剧烈，再滴加 80 ml 水，分取醚层，用少量乙醚萃取水层两次，合并醚层，加入无水硫酸钠干燥，蒸除乙醚，自然析晶，得 8.3 g 产品，收率为 96.8%，mp 47 ~ 49℃。

实施例 3: 二甲氧基氯苄的合成

16.8 g (0.1 mol) 3,5-二甲氧基苯甲醇置于三颈瓶中，加入 150 ml 无水乙醚，搅拌使其溶解，滴加 15 ml (0.2 mol) 二氯亚砷，滴完后，室温反应 3h，在冰水浴下往三颈瓶中滴加 100 ml 水，分取乙醚层，醚层水洗后加入无水硫酸钠干燥，过滤，蒸出乙醚，得白色固体 18.9 g，收率为 94.4%，mp 46 ~ 47℃。

实施例 4: (*E*)-3,5-二甲氧基-4'-苄氧基二苯乙烯的合成

3.7 g (0.02 mol) 3,5-二甲氧基苄氯和 7ml (0.04 mol) 亚磷酸三乙酯置于 50 ml 圆底烧瓶中，加热回流反应 3h，减压蒸馏除去过量的亚磷酸三乙酯，得橘红色油状物，向油状物中加入 15ml DMF，然后加入到乙醇钠(由 0.54 g 钠和 10 ml 无水乙醇制得)中，搅拌 5 min，滴加相应的 2.7 g 4-苄氧基苯甲醛的 10 ml DMF 溶液，滴加完毕室温搅拌 3 h，倒入冰水中析出固体，抽滤，干燥得产品白色固体 10.0 g，mp 120 ~ 122℃，收率 80%。
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.83 (6H, s, CH₃), 5.09 (2H, s, OCH₂Ph), 6.38 (1H, t, *J*=2.2 Hz), 6.65 (2H, d, *J*=2.2 Hz), 6.90 (1H, d, *J*=16.3 Hz, -CH=CH-), 6.97 (2H, d, *J*=8.7 Hz), 7.04 (1H, d, *J*=16.3 Hz, -CH=CH-), 7.39 (7H, m).

实施例 5: (*E*)-3,5-二甲氧基-4'-羟基二苯乙烯的制备

6.2 g (0.018 mol) (*E*)-3,5-二甲氧基-4'-苄氧基二苯乙烯溶于 50 ml 干燥的二氯甲烷中，加入 6.9 ml (0.054 mol) N,N-二甲基苯胺，冰浴下分次加入 9.6 g (0.072 mol) 无水三氯化铝，室温反应 10 小时，将反应液倾入到含适量盐酸的冰水中，分取有机层，水层用二氯甲烷萃取两次，合并有机层，分别用 5% 碳酸氢钠、水洗涤后，无水硫酸镁干燥，过滤，蒸去二氯甲烷，柱层析分离(洗脱剂石油醚-二氯甲烷 1:1)，得到(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-羟基二苯乙烯，白色固体 3.0 g，mp 87 ~ 89℃，收率 64%。
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.83 (6H, s, OCH₃), 4.80 (1H, brs, -OH), 6.38 (1H, br), 6.64 (2H, d), 6.82 (2H, d, *J*=8.6 Hz), 6.89 (1H, d, *J*=16.3 Hz, -CH=CH-), 7.03 (1H, d, *J*=16.3 Hz, -CH=CH-), 7.40 (2H, d, *J*=8.6 Hz).

实施例 6: (*E*)-3,5-二甲氧基-4'-(2-溴乙氧基)二苯乙烯的制备:

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-羟基二苯乙烯溶于乙醇中,加氢氧化钠、碘化钾和过量的1,2-二溴乙烷,70℃反应2天,过滤,滤液蒸干,柱层析,用二氯甲烷洗脱,得到化合物(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-(2-溴乙氧基)二苯乙烯,收率约37~44%,mp 99~101℃。

用同样的方法,以1,3-二卤丙烷/1,4-二卤丁烷替代1,2-二溴乙烷可制得化合物(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-(3-卤丙氧基)二苯乙烯/(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-(4-卤丁氧基)二苯乙烯。

实施例7: 胺基烷基醚类衍生物的制备

上述含卤素烷基取代基的二苯乙烯溶于四氢呋喃或乙醇,加入相应胺,回流反应2~3天,反应液减压蒸干,残留物用10%稀盐酸溶解,乙酸乙酯萃取后,酸层调pH10~11,析出沉淀,乙酸乙酯萃取三次,合并三次萃取液,水洗两次后,无水硫酸镁干燥,过滤,减压蒸去溶剂,得固体或半固体状物,柱层析分离(洗脱剂为二氯甲烷),得胺基烷基醚类目标化合物。

将胺基烷基醚类化合物溶于乙酸乙酯,冰浴下,通氯化氢气体,析出白色沉淀,过滤,干燥得到相应化合物得盐酸盐。

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-(2-二乙胺基乙氧基)二苯乙烯(RE9943),浅黄色半固体0.4g,收率43%。¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.09(6H, t, *J*=7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.66(4H, q, *J*=7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.90(2H, t, *J*=6.2 Hz, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 3.83(6H, s, OCH₃), 4.06(2H, t, *J*=6.3 Hz, OCH₂CH₂N), 6.37(1H, t, *J*=2.1 Hz), 6.64(2H, d, *J*=2.2 Hz), 6.90(1H, d, *J*=16.0 Hz, -CH=CH-), 6.89(2H, d, *J*=8.7 Hz), 7.03(1H, d, *J*=16.2 Hz, -CH=CH-), 7.42(2H, d, *J*=8.7 Hz). ESI-MS: 356.2 [M+H]⁺, 3530.9 [M-H]⁻.

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-(2-哌啶基乙氧基)二苯乙烯盐酸盐(RE9944),白色固体0.3g,mp 189~191℃,收率37%。¹H-NMR(300 MHz, D₂O): δ (ppm) 2.01(6H, m), 2.70(2H, brs), 3.38(4H, brs), 3.67(6H, s, OCH₃), 4.19(2H, brs), 6.31(1H, s), 6.57(2H, s), 6.74(1H, d, *J*=16.0 Hz, -CH=CH-), 6.83(2H, d, *J*=8.2 Hz), 6.92(1H, d, *J*=16.1 Hz, -CH=CH-), 7.30(1H, d, *J*=8.2 Hz). ESI-MS: 368.1 [M+H]⁺.

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-[2-(N-吗啉)乙氧基]二苯乙烯盐酸盐(RE9945),白色固体0.34g,mp 199~202℃,收率34%。¹H-NMR(300 MHz, D₂O): δ (ppm) 3.37(4H, brs), 3.55(2H, brs), 3.72(6H, s), 3.96(4H, brs), 4.29(2H, brs), 6.36(1H, s), 6.61(2H, s), 6.90(4H, m), 7.33(2H, brs).

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-[2-(N-四氢吡咯)乙氧基]二苯乙烯(RE9946),浅黄色半固体0.45g,收率45%。¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.84(4H, brs), 2.71(4H, brs), 2.96(2H, brs, OCH₂CH₂N), 3.82(6H, s, OCH₃), 4.17(2H, t, *J*=5.5 Hz, OCH₂CH₂N), 6.38(1H, t, *J*=2.2 Hz), 6.65(2H, d, *J*=2.1 Hz), 6.90(1H, d, *J*=16.2 Hz, -CH=CH-), 6.91(2H, d, *J*=8.7 Hz), 7.03(1H, d, *J*=16.1 Hz, -CH=CH-), 7.43(1H, d, *J*=8.7 Hz).

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-[2-N-(4-甲基哌嗪基)乙氧基]二苯乙烯盐酸盐(RE9947),白色固体0.50g,mp 194~197℃,收率37%。¹H-NMR(300

MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 2.81 (3H, s, N-CH₃), 3.62 (10H, m), 3.76 (6H, s, OCH₃), 4.39 (2H, brs, OCH₂CH₂N), 6.38 (1H, s), 6.73 (2H, d, $J=2.1$ Hz), 7.01 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 7.04 (1H, d, $J=16.3$ Hz, -CH=CH-), 7.22 (1H, d, $J=16.4$ Hz, -CH=CH-), 7.55 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 11.50 (1H, brs, HCl).

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'--(3-二甲氨基丙氧基)二苯乙烯盐酸盐 (RE9948), 白色固体 0.25 g, mp 126~130°C, 收率 28%。¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 2.13 (2H, m, OCH₂CH₂CH₂N), 2.77 (6H, s, N(CH₃)₂), 3.19 (2H, t, $J=7.5$ Hz, OCH₂CH₂CH₂N), 3.76 (6H, s, OCH₃), 4.07 (2H, t, $J=5.9$ Hz, OCH₂CH₂CH₂N), 6.38 (1H, s), 6.73 (2H, d, $J=2.1$ Hz), 6.94 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 7.02 (1H, d, $J=16.4$ Hz, -CH=CH-), 7.21 (1H, d, $J=16.4$ Hz, -CH=CH-), 7.53 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 10.33 (1H, brs, HCl). ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 23.97, 42.20, 54.16, 55.28, 64.95, 99.57, 104.29, 114.83, 126.42, 127.94, 128.56, 129.94, 139.46, 158.09, 160.73. ESI-MS: 342.2 [M+H]⁺.

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-[3-(N-哌啶基)丙氧基]二苯乙烯盐酸盐 (RE9949), 白色固体 0.30 g, mp 190~193°C, 收率 34%。¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 1.77 (5H, m), 2.17 (2H, m), 2.86 (2H, m), 3.14 (2H, m), 3.44 (3H, m), 3.76 (6H, s, OCH₃), 4.07 (2H, t, $J=5.9$ Hz, OCH₂CH₂CH₂N), 6.38 (1H, t, $J=2.0$ Hz), 6.73 (2H, d, $J=2.1$ Hz), 6.95 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 7.02 (1H, d, $J=16.4$ Hz, -CH=CH-), 7.21 (1H, d, $J=16.4$ Hz, -CH=CH-), 7.53 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 10.18 (1H, brs, HCl). ¹³C-NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 21.48, 22.51, 23.42, 52.13, 53.47, 55.29, 65.12, 99.57, 104.29, 114.83, 126.42, 127.96, 128.57, 129.93, 139.47, 158.10, 160.73. ESI-MS: 382.2 [M+H]⁺.

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-(3-N-吗啉丙氧基)二苯乙烯盐酸盐 (RE9950), 白色固体 0.32 g, mp 177~181°C, 收率 39%。¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 2.19 (2H, brs, OCH₂CH₂CH₂N), 3.07 (2H, m), 3.24 (2H, m), 3.42 (4H, m), 3.76 (6H, s, OCH₃), 3.96 (2H, m), 4.08 (2H, t, $J=5.6$ Hz, OCH₂CH₂CH₂N), 6.38 (1H, brs), 6.72 (2H, d, $J=2.1$ Hz), 6.95 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 7.02 (1H, d, $J=16.4$ Hz, -CH=CH-), 7.21 (1H, d, $J=16.4$ Hz, -CH=CH-), 7.53 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 10.96 (1H, brs, HCl). ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 23.11, 51.15, 53.57, 55.29, 63.31, 65.08, 99.59, 104.31, 114.86, 126.44, 127.96, 128.58, 129.96, 139.48, 158.10, 160.74. ESI-MS: 3384.2 [M+H]⁺.

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-[3-(N-四氢吡咯基)丙氧基]二苯乙烯盐酸盐 (RE9951), 白色固体 0.40 g, mp 139~142°C, 收率 41%。¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 1.86 (2H, m), 2.00 (2H, m), 2.13 (2H, m), 3.00 (2H, m), 3.25 (2H, m), 3.62 (2H, m), 3.76 (6H, s, OCH₃), 4.08 (2H, t, $J=6.0$ Hz, OCH₂CH₂CH₂N), 6.38 (1H, s), 6.73 (2, d, $J=2.2$ Hz), 6.95 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 7.02 (1H, d, $J=16.4$ Hz, -CH=CH-), 7.21 (1H, d, $J=16.5$ Hz, -CH=CH-),

7.53 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 10.35 (1H, brs, HCl). ^{13}C -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 22.76, 25.37, 51.40, 53.19, 55.12, 55.29, 64.91, 99.57, 104.30, 114.83, 126.42, 127.96, 128.57, 129.94, 139.47, 158.09, 160.74. ESI-MS: 368.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-[3-N-(4-甲基哌嗪基)丙氧基]二苯乙烯二盐酸盐 (RE9952), 白色固体 0.53 g, mp 194~197°C, 收率 44%。 ^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 2.16 (2H, brs, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.81 (4H, brs, 哌嗪环), 3.45 (3H, s, $\text{N}-\text{CH}_3$, 与水峰重合), 3.62 (4H, brs, 哌嗪环), 3.76 (6H, s), 4.08 (2H, brs, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.38 (1H, brs), 6.73 (2H, d, $J=2.0$ Hz), 6.96 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 7.02 (1H, d, $J=16.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.21 (1H, d, $J=16.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.53 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 11.5 (2H, brs, 2HCl). ^{13}C -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 23.60, 42.19, 48.44, 49.91, 53.32, 55.28, 64.97, 99.56, 104.29, 114.84, 126.41, 127.94, 128.57, 129.92, 139.46, 158.08, 160.73. ESI-MS: 397.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(*E*)-3,5-二甲氧基-4'-(3-二乙胺基丙氧基)二苯乙烯盐酸盐 (RE9953), 白色固体 0.15 g, mp 170~173°C, 收率 27%。 ^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 1.22 (6H, t, $J=7.2$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.13 (2H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.12 (6H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ and $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.76 (6H, s, $\text{O}(\text{CH}_3)_2$), 4.09 (2H, t, $J=6.0$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.38 (1H, t, $J=2.0$ Hz), 6.73 (2H, d, $J=2.1$ Hz), 6.95 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 7.03 (1H, d, $J=16.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.21 (1H, d, $J=16.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.53 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 10.44 (1H, brs, HCl). ^{13}C -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 8.55, 23.15, 46.24, 47.83, 55.28, 64.94, 99.57, 104.29, 114.84, 126.42, 127.96, 128.57, 129.93, 139.48, 158.08, 160.73. ESI-MS: 370.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 8: 部分目标化合物诱导人急性早幼粒白血病细胞凋亡实验

1. 实验方法

1.1 细胞培养

人急性早幼粒白血病细胞株 (NB4) 购于美国 ATCC, 培养于含有 10% 经加热灭活的胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素及 1 mmol/l L 谷氨酰胺 RPMI1640 培养液中, 37°C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中孵育。

1.2 细胞活力的测定

细胞活力通过台盼蓝排斥法测定。称取台盼蓝, 加少量蒸馏水研磨, 加双蒸水稀释到 4%, 用滤纸过滤, 4°C 保存。使用时, 将该母液用 PBS 稀释至 0.4% 工作浓度。取 NB4 细胞 ($1 \times 10^5/\text{ml}$) 接种于 12 孔板, 每孔 2 ml。加入不同浓度药物孵育后制备单个细胞悬液, 取 50 μl 细胞悬液加入 50 μl 的 0.4% 台盼蓝溶液, 混匀, 在 3 分钟内, 于显微镜下观察, 死细胞被染成蓝色, 而活细胞拒染。用血球计数板分别计数活细胞和死细胞 (共约 300 个细胞)。活细胞数占总细胞数的百分率即为细胞存活率。

1.3 细胞凋亡的形态学检测

利用吖啶橙 (AO) 和溴化乙啶 (EB) 双染法考察凋亡细胞的形态学变

化。取对数生长期的 NB4 细胞，以每孔 1×10^5 个/ml 的细胞密度接种于 12 孔板中，每孔 2 ml。药物处理后，取 1 ml 细胞悬液，离心，弃取上清液，重悬于 25 μ l PBS 中，然后加入 AO/EB 等体积混合液 3 μ l (100 μ g/ml AO, 100 μ g/ml EB)，混匀。吸一滴混合液点于洁净载玻片上，用盖玻片封片，在荧光显微镜下观察并拍照。

EB 拒染并出现核皱缩、发芽、发泡以及凋亡小体的细胞被认为是凋亡细胞。在镜下不同区域随机选择 300 个细胞，凋亡细胞占其百分比为细胞凋亡率。

化合物	浓度 (μ M)	抑制率 (%)	存活率 (%)	凋亡率 (%)
对照组	0	0	96	2.4
RE9943	25	94	12	/
RE9944	25	88	6	/
RE9945	25	69	60	40.8
RE9945·HCl	25	82	22	67.8
RE9946	25	90	15	100
RE9949	25	91	9	/

经实验证明，所述化合物对肿瘤、炎症、心血管疾病均有较好的治疗效果。