



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113135907 B

(45) 授权公告日 2022.02.22

(21) 申请号 202110468008.0

(22) 申请日 2021.04.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113135907 A

(43) 申请公布日 2021.07.20

(73) 专利权人 山东大学
地址 250012 山东省济南市历下区文化西路44号

(72) 发明人 刘兆鹏 贾聪聪 孙天雪 吴琪 孙硕

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221
代理人 宋海海

(51) Int. Cl.

C07D 417/06 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/5415 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2009325942 A1,2009.12.31

US 2018258040 A1,2018.09.13

DE 102007005045 A1,2008.08.07

CN 109020921 A,2018.12.18

CN 108794398 A,2018.11.13

John M. Hatcher et al..Discovery of Inhibitors That Overcome the G1202R Anaplastic Lymphoma Kinase Resistance Mutation.《J. Med. Chem.》.2015,第58卷 (续)

审查员 董静楠

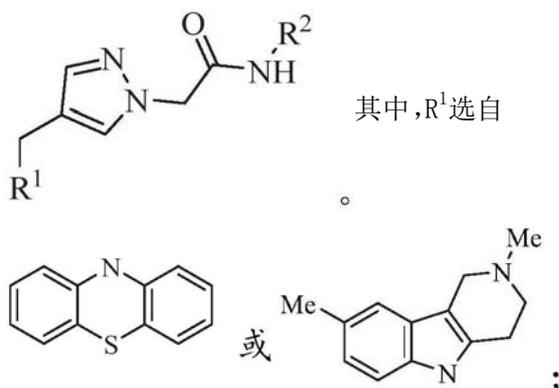
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

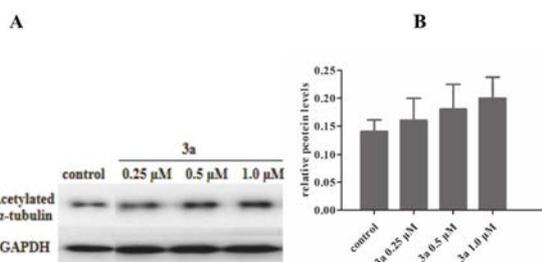
一种提高 α -微管蛋白乙酰化水平的化合物及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供一种提高 α -微管蛋白乙酰化水平的化合物及其制备方法与应用,属于医药技术领域。所述化合物具有如下所示的结构通式:



R^2 独立地选自 Me, Et, 或 n-Pr。本发明提供的该化合物虽然并不能抑制 HDAC6 活性,但是其仍以剂量依赖的方式增加 SH-SY5Y 细胞 α -微管蛋白的乙酰化水平,因此有望用于阿尔茨海默症及相关神经性退化疾病的预防与治疗,因此具有良好的实际应用之价值。



CN 113135907 B

[接上页]

(56) 对比文件

汪秀秀.组蛋白去乙酰化酶HDAC6抑制剂的合成与抗阿尔茨海默症的初步活性研究.《中国学位论文全文数据库》.2018,

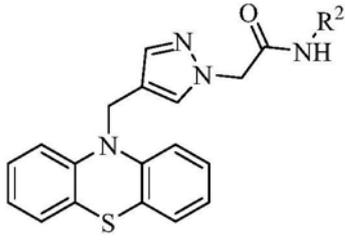
Xiaolong Jiang et al..Novel tetracyclic benzo[b]carbazolones as highly potent and orally bioavailable ALK inhibitors: Design, synthesis, and structuredactivity relationship study.

《European Journal of Medicinal Chemistry》.2015,第105卷

贾聪聪.组蛋白去乙酰化酶6抑制剂的设计合成及抗AD活性评价.《中国学位论文全文数据库》.2021,

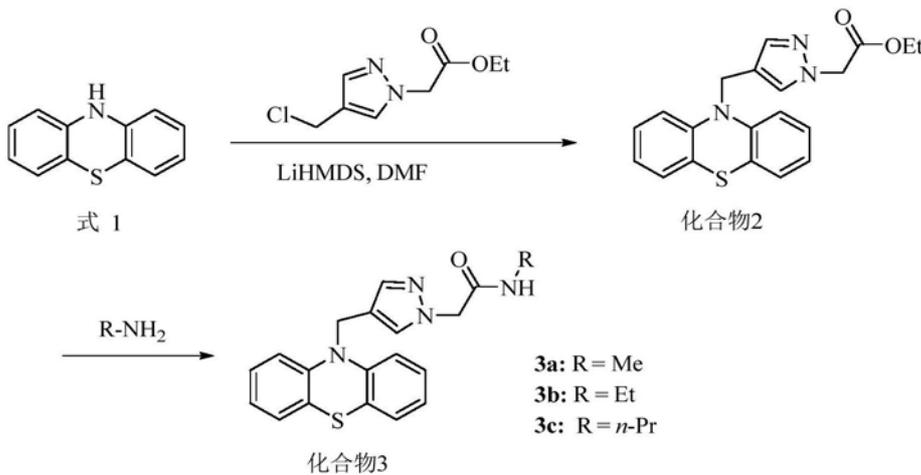
李锋.新型吩噻嗪类衍生物的设计、合成及体外抗肿瘤活性评价.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)医药卫生科技辑》.2017,(第12期),E079-14.

1. 一种化合物,其特征在于,所述化合物具有如下结构:



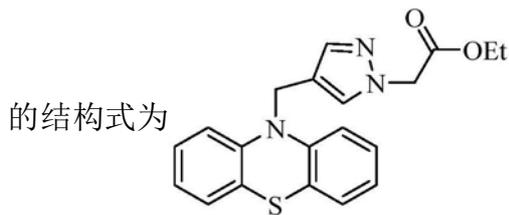
其中, R^2 独立地选自Me,Et,或n-Pr;
或其药学上可接受的盐。

2. 权利要求1所述化合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括:



3. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述化合物3的合成方法包括:

(1) 将吩噻嗪溶于N,N-二甲基甲酰胺中,低温条件下,加入双三甲基硅基氨基锂进行反应,然后加入4-氯甲基吡啶-1-乙酸乙酯,低温条件下反应;分离纯化,得化合物2,化合物2



(2) 将步骤(1)所得的化合物2,溶于脂肪胺溶液中,室温下搅拌反应;分离纯化,得化合物3;

低温条件控制为零下。

4. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,低温条件控制为不高于 -20°C ;

吩噻嗪、双三甲基硅基氨基锂和4-氯甲基吡啶-1-乙酸乙酯的摩尔比为:1-3:1-3:1-5;

所述步骤(2)中,化合物2与脂肪胺的摩尔比为:1:2-5;

所述脂肪胺溶液选自甲胺水溶液,乙胺水溶液和正丙胺溶液。

5. 如权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,吩噻嗪、双三甲基硅基

氨基锂和4-氯甲基吡啶-1-乙酸乙酯的摩尔比为1:1.3:1.5。

6. 一种药物组合物,其特征在于,其包含权利要求1所述化合物或其药学上可接受的盐。

7. 一种药物制剂,其特征在于,其包含权利要求1所述化合物或其药学上可接受的盐。

8. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐或者权利要求6中所述的药物组合物在制备提高 α -微管蛋白乙酰化水平药物或试剂中的应用。

9. 权利要求7所述的药物制剂在制备提高 α -微管蛋白乙酰化水平药物或试剂中的应用。

10. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐或者权利要求6中所述的药物组合物在制备治疗与 α -微管蛋白异常去乙酰化相关疾病的药物中的应用。

11. 权利要求7所述的药物制剂在制备治疗与 α -微管蛋白异常去乙酰化相关疾病的药物中的应用。

12. 权利要求10或11所述的应用,其特征在于,所述疾病为阿尔茨海默症。

一种提高 α -微管蛋白乙酰化水平的化合物及其制备方法与 应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及一种提高 α -微管蛋白乙酰化水平的化合物及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 公开该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

[0003] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种常见的慢性神经退行性疾病,临床表现为记忆障碍、失语、失用、失认、视空间技能损害、执行功能障碍以及人格和行为改变等,也是最常见的失智症种类,发病率占65岁以上人口的5%—10%。AD、心血管疾病、癌症并称为老年人健康的“三大杀手”,但与心脏疾病及癌症不同,目前已有的阿尔茨海默病药物临床效果不尽人意,只能暂时、最低限度地改善患者记忆及进行日常行为的能力、缓解部分症状,不能延缓疾病的进程,不仅治疗、护理成本昂贵,同时也给护理者、病人家属等造成严重的精神负担。因此,阿尔茨海默病是全球面临的重大健康挑战之一,亟需发展更有效的新型抗AD药物。

[0004] AD的病因及发病机制尚未完全阐明,主要病理改变为 β 淀粉样蛋白($A\beta$)在患者脑中沉积形成淀粉样斑块,tau蛋白过度磷酸化形成的胞内神经原纤维缠结(NFTs),以及胶质细胞增生伴随神经元丢失等。除了衰老和遗传因素之外,AD的形成不仅与 $A\beta$ 过度生成与聚集相关,而且还与tau蛋白过度磷酸化、神经元退行性病变、慢性神经炎症、金属离子内稳态失衡、氧化应激等多种因素密切相关。

[0005] 蛋白去乙酰化酶6(HDAC6)属于HDACs IIb家族,主要定位于细胞质。HDAC6的主要底物有 α -微管蛋白、 β -链蛋白、热休克蛋白90、皮肌动蛋白和过氧化物氧化还原酶等。 α -微管蛋白是首个被证实的HDAC6去乙酰化底物,在体内去乙酰化的 α -微管蛋白快速解聚,而乙酰化的 α -微管蛋白易于聚集而有利于微管的稳定。微管是神经细胞骨架的主要成分,HDAC6能使 α -微管蛋白的赖氨酸去乙酰化,导致 α -微管稳定性下降,影响轴突传导、突触形成、神经元运输等,造成突触降解。提高 α -微管乙酰化水平,能增强微管稳定性,阻止突触的丢失。

[0006] $A\beta$ 能改变微管稳定性和胞内信号通路,影响细胞内囊泡运输,造成线粒体运输功能异常和神经递质传输紊乱,导致突触降解。 $A\beta$ 寡聚体及淀粉样沉积也能引起神经炎症和氧化应激,造成神经损害。通过提高 α -微管蛋白乙酰化水平,可以提高抗氧化应激能力等,部分挽救 $A\beta$ 引起的线粒体轴突运输的损害,缓解 $A\beta$ 产生的损伤,促进损伤后神经元的存活和再生。

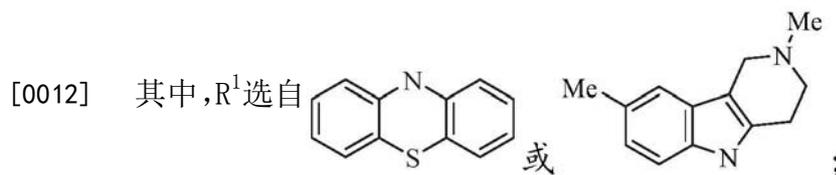
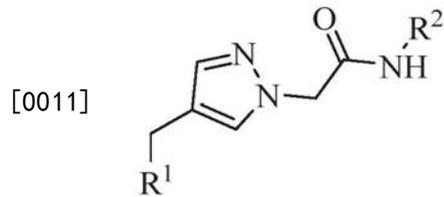
[0007] 因此,通过抑制HDAC6活性或通过其它机制提高 α -微管蛋白乙酰化水平,在防治阿尔茨海默病方面具有潜在应用前景。

发明内容

[0008] 针对现有技术存在的问题,本发明提供一种提高 α -微管蛋白乙酰化水平的化合物及其制备方法与应用。本发明提供的该化合物虽然并不能抑制HDAC6活性,但是其仍以剂量依赖的方式增加SH-SY5Y细胞 α -微管蛋白的乙酰化水平,因此有望用于阿尔茨海默症及相关神经性退化疾病的预防与治疗。

[0009] 具体的,本发明涉及以下技术方案:

[0010] 本发明的第一个方面,提供一种化合物,所述化合物具有如下所示的结构通式:

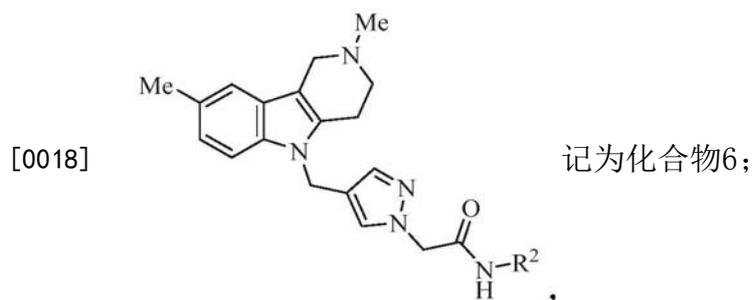
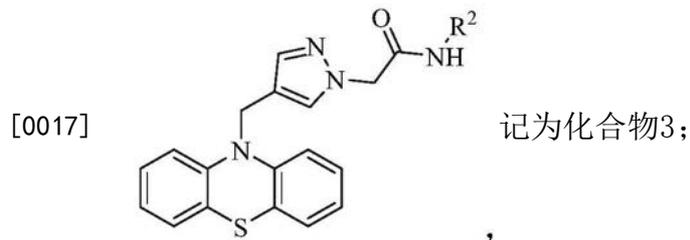


[0013] R^2 独立地选自Me,Et,或n-Pr;

[0014] 或所述化合物的异构体或其溶剂化物或其药学上可接受的盐。

[0015] 关于取代基,本发明所述独立地是指当可能存在多于一个的取代基时,所述取代基可彼此相同或不同的情况。

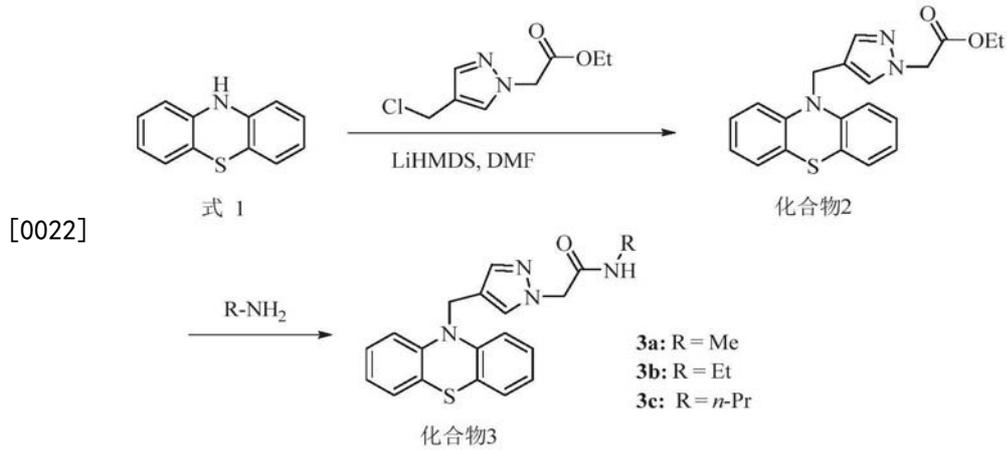
[0016] 在本发明的又一具体实施方式中,所述化合物具有如下结构:



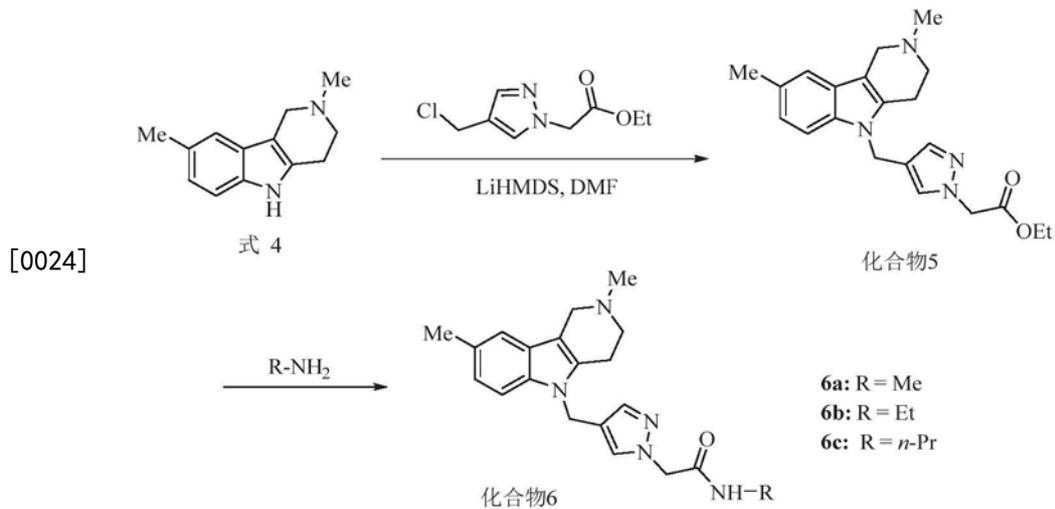
[0019] 其中, R^2 独立地选自Me,Et,或n-Pr。

[0020] 本发明的第二个方面,提供上述化合物的制备方法,所述制备方法包括:

[0021] a) 当所述化合物为化合物3时,其合成路线如下:



[0023] b) 当所述化合物为化合物6时,其合成路线如下:



[0025] 本发明的第三个方面,提供一种药物组合物,其包含上述第一方面中所述化合物或其异构体或其溶剂化物或其药学上可接受的盐。

[0026] 以及,一种药物制剂,其包含上述第一方面中所述化合物或其异构体或其溶剂化物或其药学上可接受的盐,和至少一种药学上可接受的辅料和/或载体。

[0027] 本发明的第四个方面,提供上述第一方面中所述的化合物或其异构体或其溶剂化物或其药学上可接受的盐或者上述第三方面中所述的药物组合物或药物制剂在制备提高 α -微管蛋白乙酰化水平药物或试剂中的应用。

[0028] 本发明的第五个方面,本发明提供了上述第一方面中所述的化合物或其异构体或其溶剂化物或其药学上可接受的盐或者上述第三方面中所述的药物组合物或药物制剂在制备治疗与 α -微管蛋白异常去乙酰化相关疾病的药物中的应用;优选地,所述疾病为阿尔茨海默症。

[0029] 本发明的第六个方面,本发明提供了一种治疗阿尔兹海默症的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本发明第一方面所述的化合物或本发明第三方面所述的药物组合物或药物制剂。

[0030] 以上一个或多个技术方案的有益技术效果:

[0031] (1) 上述技术方案设计的化合物,对HDAC6没有抑制活性,但能提高 α -微管蛋白乙酰化水平;

[0032] (2) 上述技术方案设计的化合物虽然对HDAC6并没有直接抑制活性,但其仍以剂量依赖的方式增加SH-SY5Y细胞 α -微管蛋白乙酰化水平。因此,本发明的化合物对 α -微管蛋白去乙酰化具有保护作用,可用于阿尔茨海默症及相关神经性退化疾病的预防与治疗,因此具有良好的实际应用之价值。

附图说明

[0033] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0034] 图1为本发明实施例6中化合物3a对 α -微管蛋白乙酰化水平的影响实验结果。A. SH-SY5Y细胞与3a (0.25, 0.5, 1.0 μ M), tubastatin A (1.0 μ M), SAHA (1.0 μ M) 孵育24h, Western blotting分析Acetylated- α -tubulin的表达。GAPDH为加载对照。所示数据是三次独立实验中每种蛋白质的代表性图像。B. 定量分析: 采用密度扫描法检测蛋白的相对水平。数据为三次独立实验的平均值 \pm 标准差(SD)。

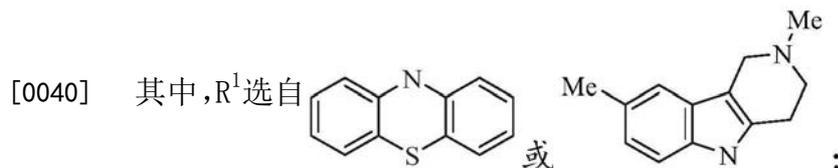
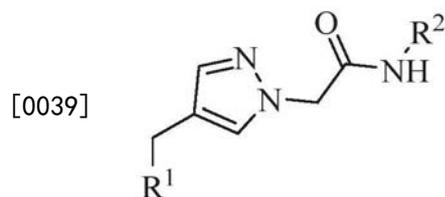
具体实施方式

[0035] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0036] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本申请的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0037] 结合具体实例对本发明作进一步的说明,以下实例仅是为了解释本发明,并不对其内容进行限定。如果实施例中未注明的实验具体条件,通常按照常规条件,或按照销售公司所推荐的条件;实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可通过商业途径购买得到。

[0038] 本发明的一个典型具体实施方式中,提供一种化合物,所述化合物具有如下所示的结构通式:



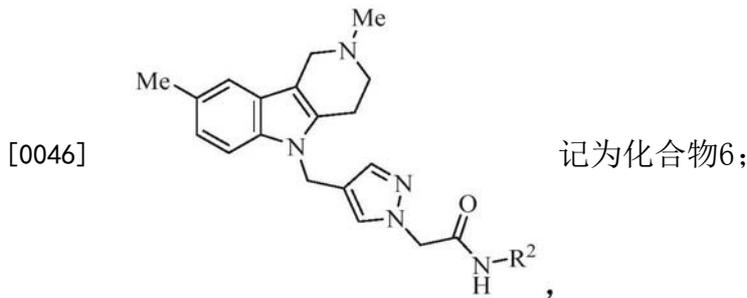
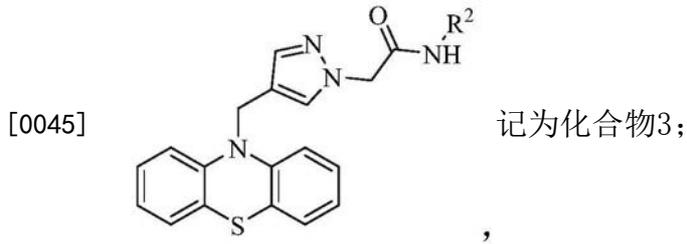
[0041] R^2 独立地选自 Me, Et, 或 n-Pr。

[0042] 或所述化合物的异构体或其溶剂化物或其药学上可接受的盐。

[0043] 关于取代基,本发明所述独立地是指当可能存在多于一个的取代基时,所述取代

基可彼此相同或不同的情况。

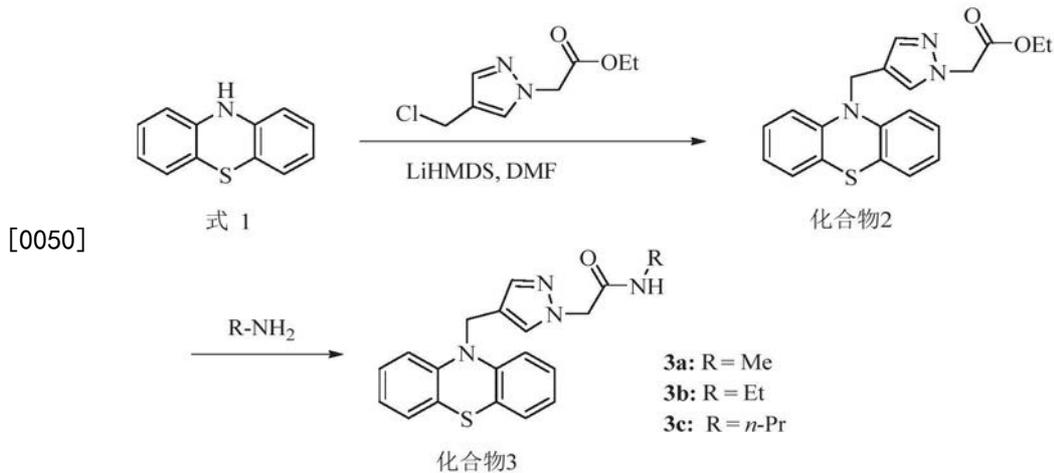
[0044] 在本发明的又一具体实施方式中,优选地,所述化合物具有如下结构:



[0047] 其中, R^2 独立地选自Me,Et,或n-Pr。

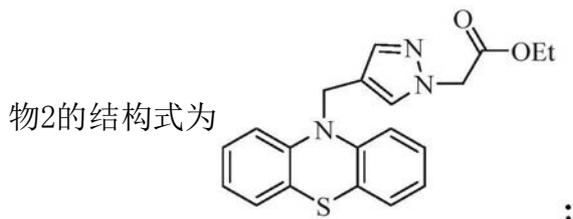
[0048] 在本发明的又一具体实施方式中,提供上述化合物的制备方法,所述制备方法包括:

[0049] a) 当所述化合物为化合物3时,其合成路线如下:



[0051] 本领域技术人员可根据上述路线经过实验摸索获取较佳的反应条件。作为示意,本发明进一步提供了一些具体地实施方式。所述化合物3的合成方法包括:

[0052] (1) 将吩噻嗪溶于N,N-二甲基甲酰胺中,低温条件下,加入双三甲基硅基氨基锂进行反应,然后加入4-氯甲基吡唑-1-乙酸乙酯,低温条件下反应;分离纯化,得化合物2,化合物2的结构式为



[0053] (2) 将步骤(1)所得的化合物2,溶于脂肪胺溶液中,室温下搅拌反应;分离纯化,得

化合物3;

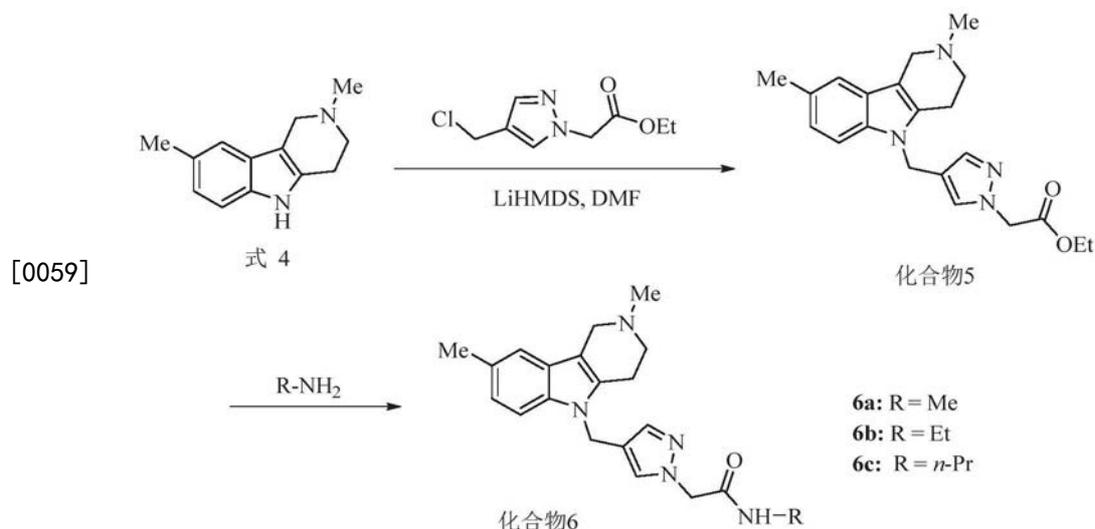
[0054] 其中,所述步骤(1)中,低温条件控制为零下,进一步优选为不高于-20℃;

[0055] 吩噻嗪、双三甲基硅基氨基锂和4-氯甲基吡唑-1-乙酸乙酯的摩尔比为:1-3:1-3:1-5;优选为1:1.3:1.5;

[0056] 所述步骤(2)中,化合物2与脂肪胺的摩尔比为:1:2-5;

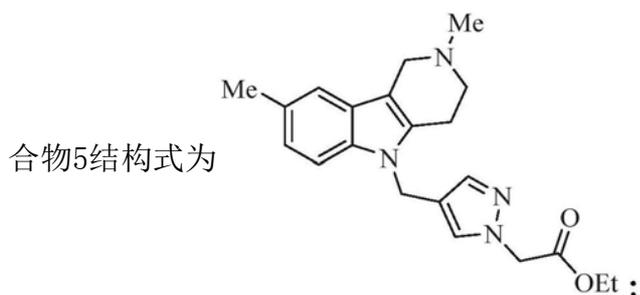
[0057] 所述脂肪胺溶液包括甲胺水溶液,乙胺水溶液和正丙胺溶液。

[0058] b) 当所述化合物为化合物6时,其合成路线如下:



[0060] 本领域技术人员可根据上述路线经过实验摸索获取较佳的反应条件。作为示意,本发明进一步提供了一些具体地实施方式。所述化合物6包括以下步骤:

[0061] (1) 将2,8-二甲基-2,3,4,5-四氢-1H-吡啶并[4,3-b]吲哚溶于N,N-二甲基甲酰胺中,加入氢化钠,然后加入4-氯甲基吡唑-1-乙酸乙酯,室温反应;分离纯化,得化合物5;化



[0062] (2) 将步骤(1)所得的化合物5,溶于脂肪胺溶液中,室温下搅拌反应;分离纯化,得化合物6;

[0063] 其中,所述步骤(1)中,2,8-二甲基-2,3,4,5-四氢-1H-吡啶并[4,3-b]吲哚、氢化钠和4-氯甲基吡唑-1-乙酸乙酯的摩尔比为:1-3:1-4:1-3,优选为1:1.2:1;所述卤代烃包括4-溴甲基苯甲酸甲酯、6-溴甲基烟酸甲酯和4-溴甲基苯丙烯酸甲酯;

[0064] 所述步骤(2)中,化合物5与脂肪胺的摩尔比为:1:2-5;所述脂肪胺溶液包括甲胺水溶液,乙胺水溶液和正丙胺溶液。

[0065] 在本发明的又一具体实施方式中,提供一种药物组合物,其包含上述第一方面中所述化合物或其异构体或其溶剂化物或其药学上可接受的盐。

[0066] 以及,一种药物制剂,其包含上述第一方面中所述化合物或其异构体或其溶剂化

物或其药学上可接受的盐,和至少一种药学上可接受的辅料和/或载体。

[0067] 本发明所述辅料是指药物组合物或药物制剂中除有效成分之外的成分,其对受试者无毒。本领域常用的辅料比如缓冲剂、稳定剂、防腐剂或赋型剂,常用的赋形剂例如粘合剂、填充剂、润湿剂、崩解剂等。

[0068] 作为示例,本发明的所述制剂中可选用的赋形剂包括但不限于:所述赋形剂选自磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、糊精、淀粉、凝胶纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠盐和聚乙烯吡咯烷酮。

[0069] 本发明所述药物载体可以是药学上可接受的溶剂、悬浮剂、囊泡、纳米材料等,用于将本发明上述第一方面所述的化合物递送至动物或人体内。载体可以是液体或固体,并按照计划的给药方式进行选择。蛋白和脂质体也是药物载体。

[0070] 本领域技术人员可采用公知的技术将本发明的化合物配制成药物组合物或制剂。比如将本发明上述第一方面中披露的任意化合物(至少一种化合物)与药用辅料混合,然后如果需要,使所得混合物形成所需的形状。除本发明提到的除外,也可根据已知药物制剂进行药物制剂的制备。以及,除本发明提到的以外,合适的药用辅料是本领域已知的,例如参见2005年版的药用辅料手册(原著第四版),作者(英)R.C.罗(RaymondCRowe)(美)P.J.舍斯基(PaulJSheskey)。

[0071] 在本发明的又一具体实施方式中,提供上述第一方面中所述的化合物或其异构体或其溶剂化物或其药学上可接受的盐或者上述第三方面中所述的药物组合物或药物制剂在制备提高 α -微管蛋白的乙酰化水平药物或试剂中的应用。

[0072] 在本发明的又一具体实施方式中,提供上述第一方面中所述的化合物或其异构体或其溶剂化物或其药学上可接受的盐或者上述第三方面中所述的药物组合物或药物制剂在制备治疗与 α -微管蛋白异常去乙酰化相关疾病的药物中的应用;优选地,所述疾病为阿尔茨海默症。

[0073] 在本发明的又一具体实施方式中,提供一种治疗阿尔兹海默症的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本发明第一方面所述的化合物或本发明第三方面所述的药物组合物或药物制剂。

[0074] 本发明所述受试者是指已经是治疗、观察或实验的对象的动物,优选指哺乳动物,最优选指人。

[0075] 本发明所述治疗有效量是指包括本发明化合物在内的活性化合物或药物制剂的量,该量可引起研究者、兽医、医生或其他医疗人员所追求的组织系统、动物或人的生物学或医学响应,所述响应包括减轻或部分减轻所述治疗疾病、综合征、病症或障碍的症状。

[0076] 本领域的研究者、兽医、医生或其他医疗人员可根据临床试验或者本领域其他公知的手段获知可使用的治疗有效量的范围。

[0077] 以下通过实施例对本发明做进一步解释说明,但不构成对本发明的限制。应理解这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0078] 实施例1:化合物2的制备

[0079] (1) 将吩噻嗪(式1)(125mg,0.61mmol)溶于2mL N,N-二甲基甲酰胺中,-20℃条件下滴加双三甲基硅基胺基锂(0.8mL,0.82mmol),搅拌30min。之后,先将4-氯甲基吡啶-1-乙酸乙酯(190mg,0.94mmol)溶于2mL N,N-二甲基甲酰胺中,再滴入反应液中。-20℃条件下搅

拌3h。用乙酸乙酯萃取,合并有机相,饱和NaCl洗涤,无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩。硅胶柱层析,得2-[4-((10H-吩噻嗪-10-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]乙酸乙酯(2),黄色油状物,100mg,收率56%。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.45(s,1H),7.25(s,1H),7.04-6.93(m,4H),6.84-6.68(m,4H),4.91(s,2H),4.76(s,2H),4.12(q,J=7.1Hz,2H),1.17(t,J=6.0Hz,3H);ESI-MS m/z:388.06[M+Na]⁺。

[0080] 实施例2:化合物3的制备

[0081] (1) 将2-[4-((10H-吩噻嗪-10-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]乙酸乙酯(2)(50mg,0.14mmol)溶于2mL甲胺水溶液中,室温反应5h。加水淬灭,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,饱和NaCl洗涤,无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩。硅胶柱层析,得N-甲基-2-[4-((10H-吩噻嗪-10-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]酰胺(3a),白色固体,32mg,收率78%。熔点:150-152℃;¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.51(s,1H),7.27(s,1H),7.04(d,J=7.6,Hz,2H),7.01-6.93(m,2H),6.82(t,J=7.5Hz,2H),6.68(d,J=7.9Hz,2H),6.02(s,1H),4.90(s,2H),4.64(s,2H),2.66(d,J=4.8Hz,3H);ESI-MS m/z:373.05[M+Na]⁺。

[0082] (2) 将2-[4-((10H-吩噻嗪-10-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]乙酸乙酯(2)(50mg,0.14mmol)溶于2mL乙胺水溶液中,室温反应5h。加水淬灭,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,饱和NaCl洗涤,无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩。硅胶柱层析,得N-乙基-2-[4-((10H-吩噻嗪-10-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]酰胺(3b),白色固体,35mg,收率70%。熔点:132-134℃;¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.51(s,1H),7.27(s,1H),7.09-6.94(m,4H),6.82(t,J=7.1Hz,2H),6.68(d,J=8.0Hz,2H),5.96(s,1H),4.90(s,2H),4.63(s,2H),3.19-3.09(m,2H),0.96(t,J=7.3Hz,3H);ESI-MS m/z:387.05[M+Na]⁺。

[0083] (3) 将2-[4-((10H-吩噻嗪-10-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]乙酸乙酯(2)(50mg,0.14mmol)溶于2mL正丙胺中,室温反应5h。加水淬灭,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,饱和NaCl洗涤,无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩。硅胶柱层析,得N-丙基-2-[4-((10H-吩噻嗪-10-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]酰胺(3c),白色固体,45mg,收率67%。熔点:130-132℃;¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.51(s,1H),7.27(s,1H),7.04(d,J=7.5Hz,2H),6.96(t,J=7.7Hz,2H),6.82(t,J=7.4Hz,2H),6.68(d,J=8.1Hz,2H),6.02(s,1H),4.90(s,2H),4.64(s,2H),3.09-3.04(m,2H),1.39-1.28(m,2H),0.74(t,J=7.4Hz,3H);ESI-MS m/z:401.15[M+Na]⁺。

[0084] 实施例3:化合物5的制备

[0085] (1) 将2,8-二甲基-2,3,4,5-四氢-1H-吡啶并[4,3-b]吡啶(式4)(100mg,0.50mmol)溶于0.6mL DMF中,加入NaH(23mg,0.58mmol),室温反应30min。之后,加入4-氯甲基吡唑-1-乙酸乙酯(101mg,0.50mmol),继续反应6h。加水淬灭,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,饱和NaCl洗涤,无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩。硅胶柱层析,得2-[4-((2,8-二甲基-1,2,3,4-四氢-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-5-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]乙酸乙酯(5),黄色油状物,45mg,收率60%。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.32(s,1H),7.18(d,J=6.7Hz,1H),7.02(d,J=8.1Hz,2H),6.88(d,J=9.2Hz,1H),4.69(s,2H),4.60(s,2H),4.12(q,J=7.1Hz,2H),3.78(s,2H),2.87(s,4H),2.48(s,3H),2.34(s,3H),1.17(t,J=7.1Hz,3H);ESI-MS m/z:367.21[M+H]⁺。

[0086] 实施例4:化合物6的制备

[0087] (1) 将2-[4-((2,8-二甲基-1,2,3,4-四氢-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-5-基)甲基)-

1H-吡唑-1-基]乙酸乙酯(5)(100mg,0.27mmol)溶于6mL甲胺水溶液中,室温反应2h。加水淬灭,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,饱和NaCl洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,浓缩。硅胶柱层析,得N-甲基-2-[4-((2,8-二甲基-1,2,3,4-四氢-5H-吡啶并[4,3-b]吡唑-5-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]酰胺(6a),白色固体,50mg,收率53%。熔点:80-82℃; ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 7.87(s,1H),7.39(s,1H),7.21(dd,J=9.1,5.7Hz,3H),6.86(d,J=8.1Hz,1H),4.64(s,2H),4.63(s,2H),3.75(s,2H),2.90(dd,J=9.8,4.6Hz,4H),2.59(d,J=4.6Hz,3H),2.46(s,3H),2.36(s,3H);ESI-MS m/z:352.16[M+H] $^+$ 。

[0088] (2)将2-[4-((2,8-二甲基-1,2,3,4-四氢-5H-吡啶并[4,3-b]吡唑-5-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]乙酸乙酯(5)(100mg,0.27mmol)溶于6mL乙胺水溶液中,室温反应2h。加水淬灭,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,饱和NaCl洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,浓缩。硅胶柱层析,得N-乙基-2-[4-((2,8-二甲基-1,2,3,4-四氢-5H-吡啶并[4,3-b]吡唑-5-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]酰胺(6b),白色固体,55mg,收率56%。熔点:106-108℃; ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 7.96(s,1H),7.38(s,1H),7.21(dd,J=10.6Hz,6.9,3H),6.86(d,J=8.2Hz,1H),4.63(s,2H),4.62(s,2H),3.75(s,2H),2.92-3.08(m,2H),2.88-2.91(m,4H),2.46(s,3H),2.36(s,3H),1.01(t,J=7.2Hz,3H);ESI-MS m/z:366.54[M+H] $^+$ 。

[0089] (3)将2-[4-((2,8-二甲基-1,2,3,4-四氢-5H-吡啶并[4,3-b]吡唑-5-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]乙酸乙酯(5)(100mg,0.27mmol)溶于5mL正丙胺中,室温反应2h。加水淬灭,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,饱和NaCl洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,浓缩。硅胶柱层析,得N-丙基-2-[4-((2,8-二甲基-1,2,3,4-四氢-5H-吡啶并[4,3-b]吡唑-5-基)甲基)-1H-吡唑-1-基]酰胺(6c),白色固体,75mg,收率74%。熔点:114-116℃; ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 7.94(s,1H),7.38(s,1H),7.21(dd,J=11.3,7.5Hz,3H),6.86(d,J=8.2Hz,1H),4.64(s,4H),3.75(s,2H),3.02-3.92(m,2H),2.91-2.88(m,4H),2.45(s,3H),2.36(s,3H),1.45-1.34(m,2H),0.82(t,J=7.4,3H);ESI-MS m/z:380.79[M+H] $^+$ 。

[0090] 实施例5:HDACs抑制活性实验

[0091] 1、实验方法:

[0092] 将化合物(实施例2、实施例4制备得到的化合物)用DMSO溶解,稀释后配成不同浓度的溶液,转移至384孔板。将组蛋白去乙酰化酶6(HDAC6)溶于Tris缓冲溶液中,配成酶溶液。将底物溶于缓冲液中,配成底物溶液。向实验组加入15 μL 酶溶液,空白组则加15 μL 缓冲液。室温孵育15min后,每孔加入10 μL 底物溶液。室温孵育60分钟后,在激发波长355nm下,测定在460nm波长处的发射光强度,评价化合物对HDAC6的抑制活性。

[0093] 2、实验结果

[0094] 表1、化合物对HDAC6的抑制活性(IC₅₀)

化合物	IC ₅₀ (nM)
	HDAC6
3a	> 1000
3b	> 1000
3c	> 1000
6a	> 1000
6b	> 1000
6c	> 1000
tubastatin A ^a	11
SHAH ^a	15

[0096] ^a表示阳性对照药; IC₅₀:抑制HDAC6酶活性50%的浓度。

[0097] 从表1可以看出,除了阳性对照化合物外,所测试化合物对HDAC6没有抑制活性。

[0098] 实施例6:化合物3a对 α -微管蛋白乙酰化水平的影响

[0099] 1、实验方法:

[0100] 将SH-SY5Y细胞接种于6孔板中,每孔 1.5×10^4 个细胞,恒温孵育24小时。加入不同浓度的化合物3a,继续孵育24小时。弃去培养基,用冷PBS洗,离心,用冷PBS洗,加入Lysis Buffer (10 μ L磷酸酶抑制剂,1 μ L蛋白酶抑制剂,5 μ L 100mM PMSF),置于4 $^{\circ}$ C摇床,剧烈振荡30秒后,离心。取全蛋白提取物,对蛋白进行定量。将每个样品中的蛋白(25 μ g),在100 $^{\circ}$ C加入缓冲液,静置。用10% SDS-PAGE凝胶电泳后,转膜,用封闭液封闭,用含5%脱脂奶粉的TBST洗膜。将膜放入含一抗的溶液,孵育24h。室温振荡30分钟,吸弃一抗,用TBST洗,室温二抗孵育2h, TBST洗, ECL试剂显色、成像,用Gel-Pro32软件对结果进行灰度分析。

[0101] 2、实验结果:

[0102] 为了评价3a对 α -微管蛋白乙酰化水平的影响,选用SH-SY5Y细胞进行了蛋白免疫印迹实验。实验结果见图1,在SH-SY5Y细胞中,化合物3a以剂量依赖的方式,提高 α -微管蛋白乙酰化水平。

[0103] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

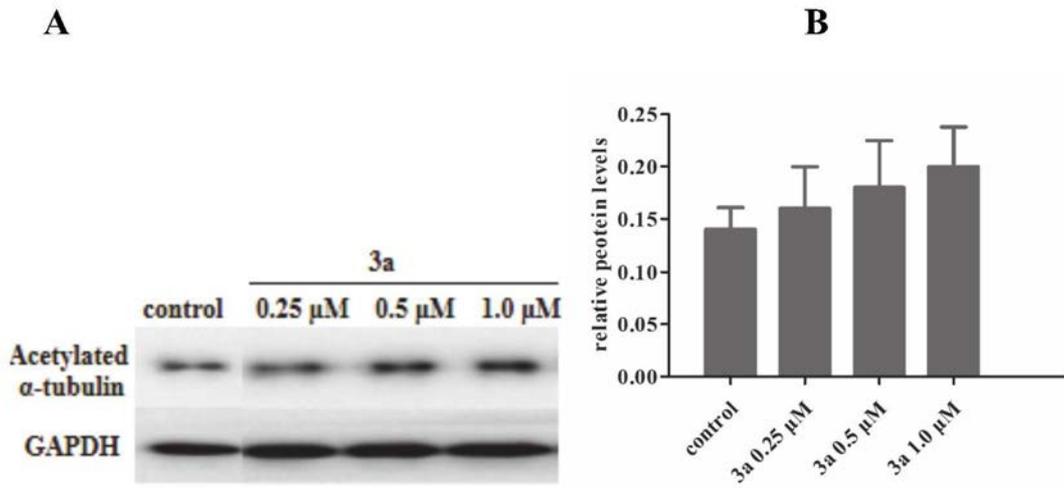


图1