

[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 200910023299.1

[51] Int. Cl.

C07C 203/04 (2006.01)

C07D 493/04 (2006.01)

C07C 201/02 (2006.01)

A61K 31/216 (2006.01)

A61K 31/222 (2006.01)

A61K 31/235 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月9日

[11] 公开号 CN 101597231A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/34 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

[22] 申请日 2009.7.10

[21] 申请号 200910023299.1

[71] 申请人 中国人民解放军第四军医大学

地址 710032 陕西省西安市长乐西路17号

[72] 发明人 姜茹 孙晓莉 王平安 陈惠
王愉臻

[74] 专利代理机构 西安西达专利代理有限责任公
司

代理人 谢钢

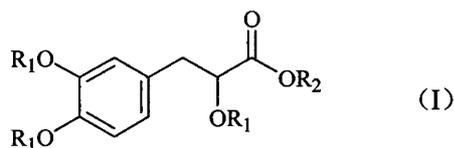
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

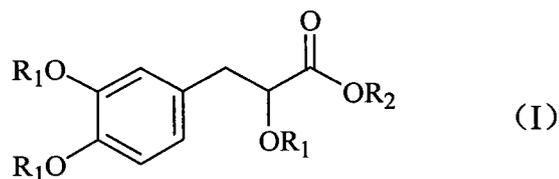
NO 供体药物及其合成方法

[57] 摘要

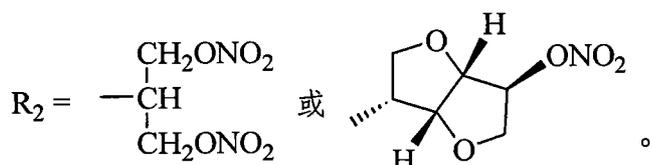
本发明公开了一种结构通式(I)表示的 NO 供体药物及其合成方法。本发明将具有抗脂质过氧化、清除自由基作用的丹参素与 NO 供体结构键合,形成新型药物,这些药物分子兼具有释放 NO 又能清除氧自由基的特征,对缺血/再灌注损伤有明显防治作用,可以有效地缩小心肌梗死范围,使血清中 CK、LDH 活性和 MDA 浓度显著降低。



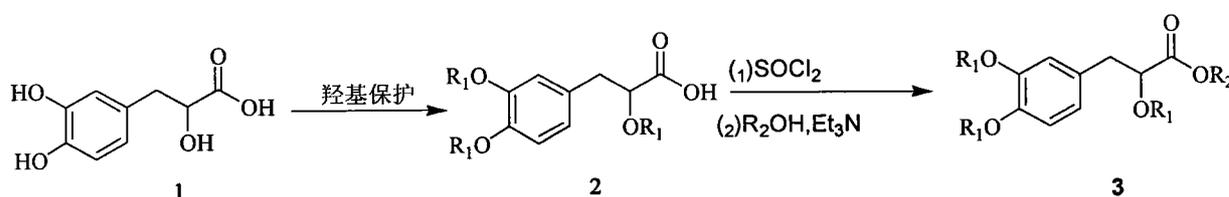
1、一种由通式 (I) 表示的化合物，



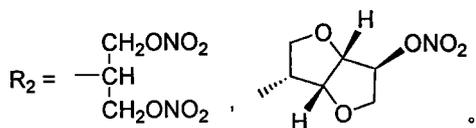
其中 $R_1 = H, \text{PhC}(=\text{O})-$, $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ 的酰基, PhCH_2- 或 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 的烃基



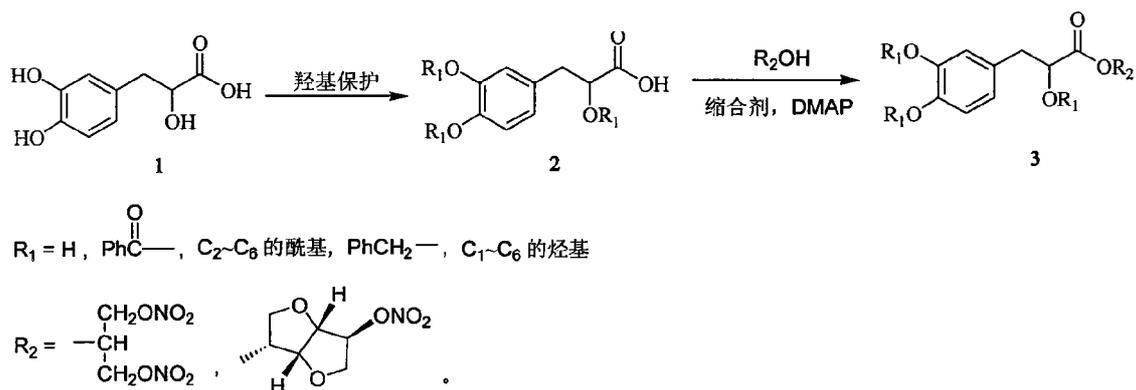
2、权利要求 1 所述化合物的合成方法，其特征在于：以丹参素为原料，将其酚羟基及醇羟基用酰基或烃基进行保护，羟基保护的丹参素与二氯亚砷反应制备酰氯，酰氯与单硝酸异山梨醇酯或甘油 1,3-二硝酸酯反应得到目标化合物；目标化合物羟基脱保护得到 R_1 为 H 的产物，具体合成路线如下：



$R_1 = H, \text{PhC}(=\text{O})-$, $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ 的酰基, PhCH_2- , $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 的烃基



3、权利要求 1 所述化合物的合成方法，其特征在于：以丹参素为原料，将其酚羟基及醇羟基用酰基或烃基进行保护，羟基保护的丹参素与单硝酸异山梨醇酯或甘油 1,3-二硝酸酯在 DMAP 和缩合剂存在下进行缩合反应得到目标化合物；目标化合物羟基脱保护得到 R_1 为 H 的产物，具体合成路线如下：



4、根据权利要求3所述化合物的合成方法，其特征在于：缩合剂是1,3-二环己基碳二亚胺，1,3-二异丙基碳二亚胺或1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺。

5、权利要求1所述化合物在制备预防和治疗缺血/再灌注损伤药物中的应用。

6、根据权利要求5所述应用，其特征在于：该药物是由含有有效应用量的权利要求1所示化合物和药学上的载体或者赋形剂组成的药物组合物。

7、根据权利要求5所述应用，其特征在于：该药物是片剂、胶囊剂、散剂、丸剂、颗粒剂或乳剂。

NO 供体药物及其合成方法

技术领域

本发明涉及既能释放 NO 又能清除氧自由基的抗缺血/再灌注损伤的药物及其合成方法，属于医药技术领域。

背景技术

心脏病是人类头号杀手，据统计，心脏病是排名首位的死亡原因，每年死于心脏病的人数占死亡总人数的 1/3。而心肌缺血再灌注损伤是引发多种心脏病的重要原因。因此，研发预防和治疗心肌缺血再灌注药物具有非常重要的意义。

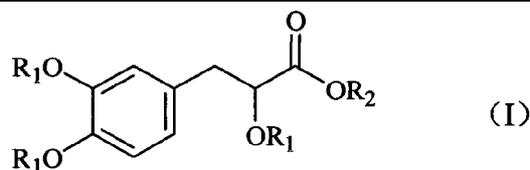
发明人所在课题组从分子水平对心肌缺血再灌注的发病机理做了系统深入研究，发现缺血心脏再灌注时会爆发产生大量活性氧自由基，其中超氧阴离子自由基 (O_2^-) 可与保护因子 NO 反应迅速生成过氧亚硝基阴离子 ($ONOO^-$)，并直接参与了缺血心肌损伤病理过程。上述研究结果提示使用 NO 供体药物时，需要同时清除体内过量的氧自由基。

发明内容

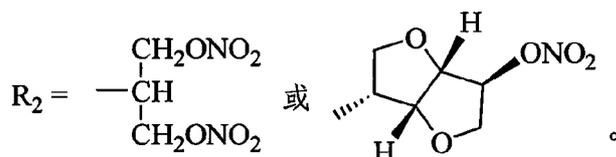
本发明的目的是提供一类抗缺血/再灌注损伤的药物及其合成方法，该药物将具有抗脂质过氧化、清除氧自由基作用的丹参素与 NO 供体结构键合，形成新型药物，这些药物既能释放 NO 又能清除氧自由基，对缺血/再灌注损伤有明显防治作用。

本发明实现过程如下：

通式 (I) 表示的化合物，



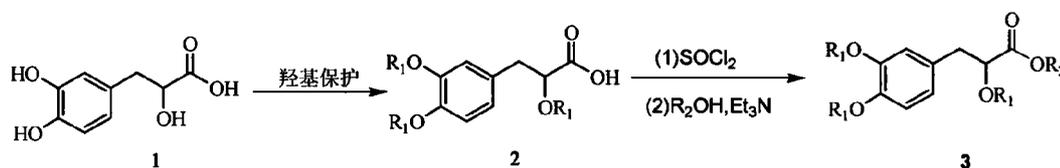
其中 $R_1 = \text{H}$, $\text{PhC}(=\text{O})-$, $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ 的酰基, PhCH_2- 或 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 的烃基



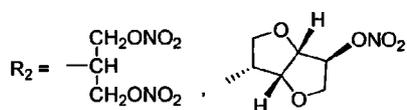
本发明药物的合成方法:

合成方法 1:

以丹参素 1 为原料, 将其酚羟基及醇羟基进行保护 (保护基可以是酰基或烃基), 羟基保护的丹参素 2 与二氯亚砷 (SOCl_2) 反应得到酰氯, 酰氯再与单硝酸异山梨醇酯或甘油 1,3-二硝酸酯在三乙胺的存在下反应得到目标化合物 3。所需目标产物 $R_1 = \text{H}$ 时, 则需要将化合物 3 再进行羟基脱保护即可。具体合成路线如下:



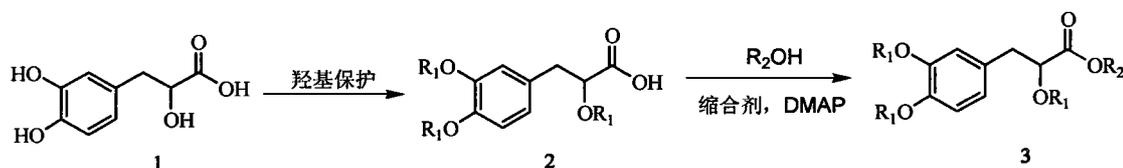
$R_1 = \text{H}$, $\text{PhC}(=\text{O})-$, $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ 的酰基, PhCH_2- , $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 的烃基



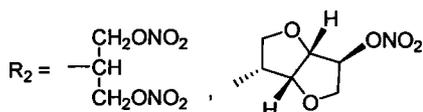
合成方法 2:

以丹参素 1 为原料, 将其酚羟基及醇羟基进行保护 (保护基可以是酰基或烃基), 羟基保护的丹参素 2 与单硝酸异山梨醇酯或甘油 1,3-二硝酸酯在 DMAP (N,N -二甲氨基吡啶) 和缩合剂 (可以是 1,3-二环己基碳二亚胺 DCC, 1,3-二异丙基碳二亚胺 DIC, 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺

EDC) 存在下发生缩合反应得到目标化合物 3。所需目标产物 $R_1=H$ 时, 则需要将化合物 3 再进行羟基脱保护即可。具体合成路线如下:



$R_1 = H, \text{PhC}(=\text{O})-, \text{C}_2\sim\text{C}_6$ 的酰基, $\text{PhCH}_2-, \text{C}_1\sim\text{C}_6$ 的烃基



缩合剂: DCC, DIC, EDC

本发明合成的化合物药理学试验证明: 该类药物对缺血心肌有保护作用, 可减少 MI/R 对心肌细胞的损伤, 使心肌的抗氧化能力提高, 对抗缺血/再灌注损伤有明显防治作用。

说明书附图

图 1 为不同药物治疗组对心肌缺血/再灌注大鼠心肌损伤指标的影响

其中, A: 心肌梗塞面积 (MIS); B: 血清肌酸激酶 (CK) 活性; C: 血清乳酸脱氢酶 (LDH) 活性; $\bar{x} \pm s, n = 8$; 与溶剂对照组比较, $**P < 0.01$; 与 ISMN 组比较, $^{##}P < 0.01, ^{\#}P < 0.05$ 。

图 2 为不同药物治疗组对心肌缺血/再灌注大鼠心功能指标的影响

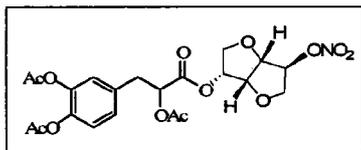
其中, A: 左室发展压 (LVDP); B: 左室等容收缩期压力上升最大速率 ($+dP/dt_{\max}$); C: 左室等容舒张期压力下降最大速率 ($-dP/dt_{\max}$); $\bar{x} \pm s, n = 8$; 与溶剂对照组比较, $**P < 0.01$; 与 ISMN 组比较, $^{##}P < 0.01$ 。

图 3 为不同药物治疗组对心肌缺血/再灌注大鼠血清一氧化氮 (NO) 生成量和丙二醛 (MDA) 含量的影响

$\bar{x} \pm s, n = 8$; 与溶剂对照组比较, $**P < 0.01$; 与 ISMN 组比较, $^{##}P < 0.01$ 。

具体实施方式

实施例 1: 乙酰丹参素单硝酸异山梨醇酯 (AcDI-302) 的合成



(1) 乙酰丹参素 (AcDSS) 的合成

将 2.97 g (15 mmol) 丹参素和 60 mL 醋酸酐置于 250 mL 圆底单口烧瓶中，加入催化量高氯酸，搅拌反应 2.5 h，薄层层析 (TLC) 监控反应。待反应结束后，将反应液小心倾倒入置有碎冰的烧杯中，待冰全部溶化后，用乙酸乙酯萃取，依次用水和饱和食盐水洗涤有机层，合并，用无水硫酸钠干燥。蒸除溶剂后，得亮黄色油状残余物，将其用适量二氯甲烷溶解，快速柱层析，得无色透明蜡状物 4.29 g，产率 88%。

(2) AcDI-302 的合成

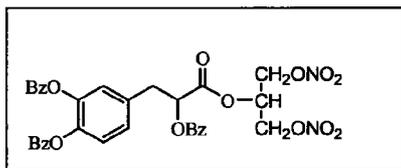
方法 1:

将 3.24 g (10 mmol) AcDSS 置于 100 mL 圆底烧瓶中，缓慢加入二氯亚砷 20 mL，回流 3 h。减压除去残余的二氯亚砷，析出固体，即为酰氯。称单硝酸异山梨醇酯 (ISMN) 2.02 g (10.6 mmol)，加入 THF 100 mL，室温搅拌至全溶，同时加入 4.2 mL 三乙胺。将上述酰氯溶解于 10 mL THF 中，缓慢滴入到上述 ISMN 溶液中，室温反应 8~12 h，TLC 检测反应完毕后，将反应液过滤后除去溶剂，柱层析分离得白色粉末 3.88 g，总产率 78%。

方法 2:

将 3.24 g (10 mmol) AcDSS 和 1.91 g (10 mmol) ISMN 溶于 150 mL 干 CH_2Cl_2 中，室温搅拌下加入 2.46 g (12 mmol) 二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 0.12 g (1.0 mmol) 二甲氨基吡啶 (DMAP)，室温搅拌 1.5 h，TLC 监控反应。待反应结束后，滤除不溶物，减压除去溶剂，柱层析分离得白色至无色透明蜡状物 4.52 g，真空干燥后成白色粉末为 AcDI-302，称重为 4.47 g，产率为 90%。

实施例 2: 3-(3',4'-二苄氧苯基)-2-苄氧基丙酸二硝酸甘油酯 (BzDG-403) 的合成



(1) 3-(3',4'-二苄氧苯基)-2-苄氧基丙酸 (BzDSS) 的合成

将 2.97 g (15 mmol) 丹参素溶于 100 mL 氯仿/甲醇混合液 (2:1), 加入无水 K_2CO_3 14.07 g (90 mmol), $60^\circ C$ 搅拌 15min, 缓慢滴加苄基溴 6.6 mL (56 mmol), $60^\circ C$ 搅拌 6~12 h, TLC 监控。待反应结束后, 减压除去溶剂, 剩余物中加入 200 mL 水, 用乙酸乙酯萃取 (3×200 mL), 萃取液用无水硫酸钠干燥。蒸除溶剂后, 快速柱层析, 得白色固体 3.93 g, 产率 56%。

(2) BzDG-403 的合成

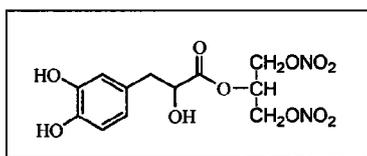
方法 1:

将 2.34 g (5 mmol) BzDSS 置于 100mL 圆底烧瓶中, 缓慢加入二氯亚砷 10 mL, 回流 3 h。减压除去残余的二氯亚砷, 析出固体, 即为酰氯。将 0.97 g (5.3 mmol) 甘油 1,3-二硝酸酯 (1,3-GDN) 溶于 50 mL THF, 并加入 2.1 mL 三乙胺。将上述酰氯溶解于 5 mL THF 中, 缓慢滴入到上述 1,3-GDN 溶液中, 室温下反应 8~12 h, TLC 检测反应完毕后, 过滤, 将滤液减压蒸去溶剂, 柱层析分离得目标产物 2.02 g, 总产率 64%。

方法 2:

将 2.34 g (5 mmol) BzDSS 和 0.91 g (5 mmol) 甘油 1,3-二硝酸酯溶于 75 mL CH_2Cl_2 中, 室温搅拌下加入 1.23 g (6 mmol) DCC 和 0.06 g (0.5 mmol) DMAP, 室温搅拌 3~5 h, TLC 监控反应。待反应结束后, 滤除不溶物, 减压除去溶剂, 柱层析分离得目标产物 2.21 g, 产率为 70%。

实施例 3: 丹参素二硝酸甘油酯 (DSDG-103) 的合成



将实施例 2 中得到的 BzDG-403 1.90 g (3 mmol) 溶于 300mL 甲醇, 加

入 1.2 g 10% Pd-C 催化剂，以 N₂ 置换体系中的空气，再以氢气置换 N₂。剧烈搅拌下氢解约 4~8 h，滤去催化剂，减压除溶剂得目标产物 0.96 g，产率 88%。

实施例 4: AcDI-302 的药效学实验

(1) 心肌缺血模型的制备及实验方案

将 SD 大鼠以 30g/L 戊巴比妥钠（40mg/kg）经腹腔注射麻醉后，按常规方法制备大鼠 MI/R（30min/3h）模型：颈正中切口气管插管，连接呼吸机行正压人工呼吸。经右颈总动脉插管至左心室记录左室压及其微分。开胸暴露心脏，5-0 丝线结扎左冠状动脉前降支中上 1/3 处，心电图 ST 段抬高为结扎成功指标。缺血 30 分钟后松开丝线，再灌注 3 小时。将大鼠随机分为以下 4 组：(1) 假手术组（SHAM）；(2) 溶媒对照组（MI/R）；(3) ISMN 组给药（MI/R + ISMN）；(4) AcDI-302 组给药（MI/R + AcDI-302）。ISMN 手术前 15 min、30mg/kg 给药，AcDI-302 组手术前 2 h、9.47mg/kg 给药。

心脏功能检测：

通过多导生理记录仪（RM-4200）持续监测大鼠心电及血流动力学各指标。心电图、左室发展压（LVDP）、左室等容收缩/舒张期压力上升或下降最大速率（ $\pm dp/dt_{max}$ ）等均通过数据分析系统由计算机自动采集、记录并计算。

CK、LDH 活性及 MDA 水平检测：

于再灌注 3h 后由颈动脉取血 2mL，常温静置 30min 后，3000r/min 离心 20min，取血清严格按照试剂盒说明书操作检测 CK、LDH 的活性。MDA 的含量用硫代巴比妥酸比色法测得（过氧化脂质主要降解产物 MDA 在酸性条件下与二分子硫代巴比妥缩合生成红色物质）。

NO 水平检测：

利用硝酸还原酶法检测 NO 含量。NO 在生物体内经历一系列化学反应，最终形成相对稳定的氧化产物亚硝酸盐 NO₂⁻和硝酸盐 NO₃⁻，利用硝酸还

原酶法先把血清 NO_3^- 还原为 NO_2^- ，在 pH 7.5~8.1 条件下， NO_2^- 与对氨基苯磺酸发生重氮化，再与 N-(1-萘基)-乙二胺偶联生成一深紫红色的偶氮化合物，用酶标仪（Molecular Devices 公司 SpectraMAX190）测定其吸光度以确定 NO 浓度。

心肌梗死范围测定：

按本室建立的方法检测心肌梗死范围。简述如下：再灌注 3h 结束后，再次结扎冠脉，向左心室腔注入 2% 伊文蓝（1~2 mL）。速取出心脏，冻存于 -20°C 。用心脏切片器垂直于心脏长轴将其切成 1mm 厚的薄片，分片置于含 2 mL 1%TTC (pH 7.4) 的 12 孔培养皿中， 37°C 孵育 15min。用数码相机拍照并输入计算机。采用单盲法分别将伊文蓝染色区（非缺血区）、TTC 染色区（红染，缺血但仍存活组织）以及非 TTC 染色区（梗死心肌），用 SigmaScan 占总缺血区面积（AAR）的百分比表示。

统计学处理：

采用 GraphPad Prism software 5.0 统计软件进行统计学分析和曲线拟合，实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 。多组间数据比较采用方差分析（ANOVA），若总体差异显著，再以 t 检验分析相应两组间的显著性差别。以 $P < 0.05$ 为差异显著的界限。

（2）心肌梗死范围、血清 CK、LDH 活性结果

从减小 MIS 方面，观察 AcDI-302 对缺血心肌的保护作用。AcDI-302 三组间总缺血范围（AAR/LV %）无明显差异。缺血 30 min 再灌 3 h 造成大鼠明显心肌梗死，ISMN 及 AcDI-302 组较溶媒对照组有明显缩小 [$(35.5 \pm 3.9) \%$ 和 $(18 \pm 5.6) \%$ vs. $(56 \pm 6) \%$, $n = 8$, $P < 0.01$], 而 ACDI-302 组 MIS 较 ISMN 组也有明显缩小 ($P < 0.05$)。不同处理组大鼠 MI/R 3 h 后心肌梗死情况见图 1A。当心肌细胞膜损伤，细胞膜完整性遭到破坏，导致膜通透性增加，心肌细胞内 CK 和 LDH 大量外漏。发明人检测了大鼠缺血 30 min 再灌 3 h 血清中 LDH、CK 活性。结果显示，MI/R 使血

清中 CK 活性较假手术组组明显增加 (11 ± 1.3 vs. 1.5 ± 0.5 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.01$), 与溶媒对照剂组比, ISMN 组 (6.3 ± 0.8 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$)、AcDI-302 组 (3.4 ± 0.7 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) 血清中 CK 活性都明显降低 ($n = 8$, $P < 0.01$), AcDI-302 组也明显低于 ISMN 组 ($n = 8$, $P < 0.05$)。不同处理组大鼠 MI/R 3 h 血清中 CK 活性见图 1B。血清中 LDH 活性也有相似趋势: MI/R 使血清中 LDH 活性较假手术组组明显增加 (5677 ± 738 vs. 606 ± 227 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.01$), 与溶媒对照剂组比, ISMN 组 (3765 ± 526 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.01$) 和 ACIDI-302 组 (2691 ± 216 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.01$) 都明显降低。不同处理组大鼠 MI/R 3 h 血清中 LDH 活性见图 1C。上述结果提示, ACIDI-302 可减少缺血心肌细胞死亡, 且这种作用强于 ISMN。

(3) 心功能检测结果

发明人监测了大鼠血流动力学指标。缺血前各指标 Baseline 值无明显差异。再灌注后, 各组间心率 (HR) 无统计学差异; LVDP 值正常对照组为 136 ± 29 mmHg, 溶媒对照剂组比假手术组组有显著降低 (58 ± 10 vs. 136 ± 29 mmHg, $n = 8$, $P < 0.01$), ISMN (93 ± 4 mmHg, $n = 8$, $P < 0.05$) 和 AcDI-302 (106 ± 6 mmHg, $n = 8$, $P < 0.01$) 均使 LVDP 较溶媒对照剂组有显著升高; 左室内压微分也有相似趋势, 正常对照组 $+dP/dt_{\max}$ 值为 3970 ± 275 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $-dP/dt_{\max}$ 值为 -4042 ± 245 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, 溶媒对照剂组 $+dP/dt_{\max}$ 较假手术组组有显著降 (1052 ± 288 vs. 3686 ± 288 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.01$), $-dP/dt_{\max}$ (-1286 ± 314 vs. -3487 ± 284 $\text{kPa}\cdot\text{s}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.01$), ISMN (1793 ± 185 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, -2212 ± 95 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) 和 AcDI-302 (2638 ± 224 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, -2842 ± 163 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) 均使 $\pm dP/dt_{\max}$ 较溶媒对照剂组有显著升高 ($n = 8$, P 均小于 0.01)。不同处理组大鼠心肌缺血再灌注 3h 心功能恢复情况见图 2。可见, AcDI-302 可以改善缺血心肌的心功能, 而且保护作用强于 ISMN。

(4) 血清 NO 释放量和 MDA 含量

缺血 30 min 再灌 3 h 造成大鼠血清中 NO 含量较假手术组组有升高

(21 ± 3 vs. $7.2 \pm 2.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.01$), ISMN 组 ($312 \pm 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及 AcDI-302 组 ($355 \pm 31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较溶媒对照剂组也有明显升高 ($n = 8$, 各组 P 均小于 0.01)。不同处理组大鼠 MI/R 3 h 后血清中 NO 含量见图 3-3A。由结果可见, 当 AcDI-302 组摩尔用药量仅为是 ISMN 的八分之一时, 血清中 NO 含量即大于 ISMN 组的 1/2。MDA 是细胞膜脂质过氧化产物, 其含量增加反应细胞膜经过氧化反应后的破坏程度。MI/R 使血清中 MDA 含量较假手术组明显增加 (11.9 ± 1.2 vs. $2.6 \pm 0.8 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.01$), 与溶媒对照剂组比, ISMN 组 ($10.0 \pm 0.7 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.05$) 和 AcDI-302 组 ($4.7 \pm 0.6 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, $n = 8$, $P < 0.01$) 血清中 MDA 含量都明显降低。不同处理组大鼠 MI/R 3 h 血清中 MDA 含量见图 3B。NO 与 MDA 检测结果提示, AcDI-302 保护缺血心肌可能与其释放 NO 并减少 ROS 对细胞损伤有关。

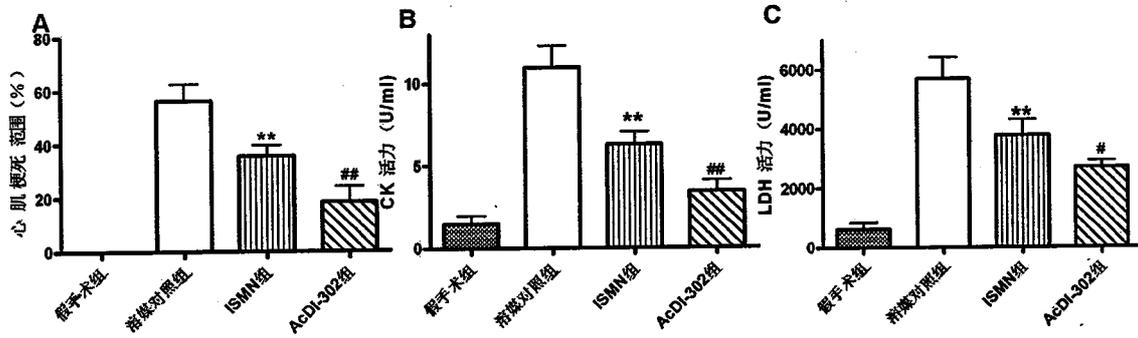


图 1

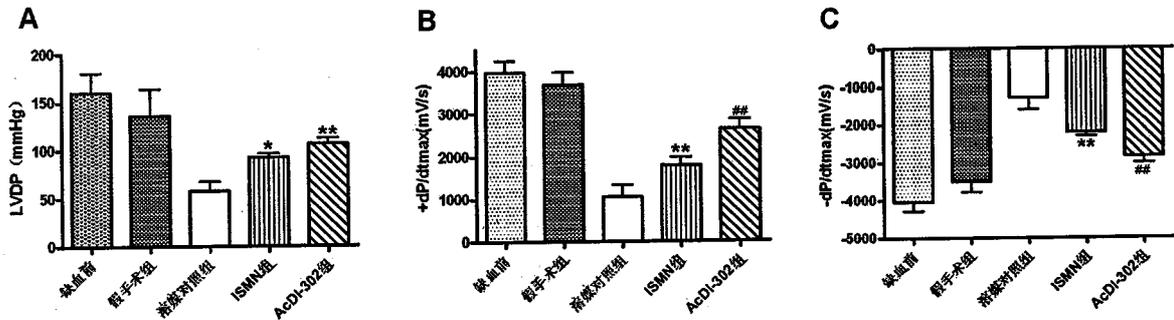


图 2

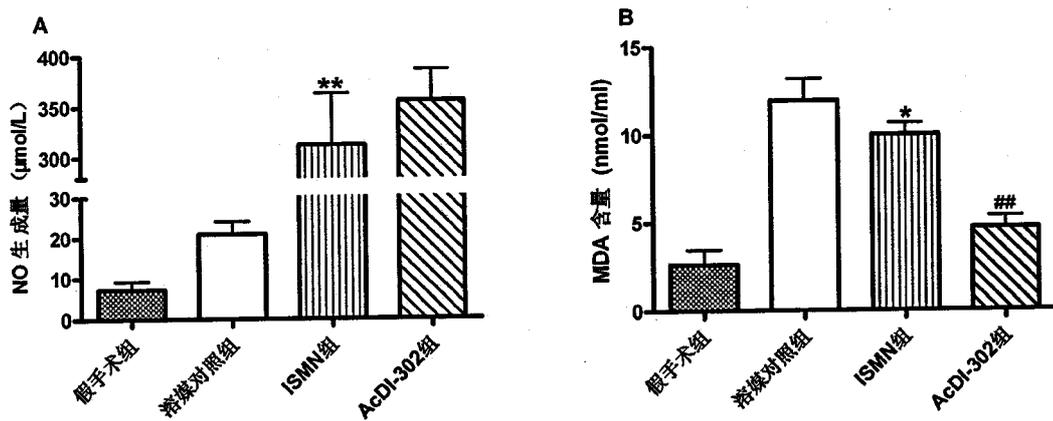


图 3