



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102985407 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201180033524. 5

(22) 申请日 2011. 05. 06

(30) 优先权数据

P1000243 2010. 05. 06 HU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 01. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/HU2011/000043 2011. 05. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/148208 EN 2011. 12. 01

(73) 专利权人 阿维丁研究开发和商业有限责任公司
公司

地址 匈牙利塞格德

专利权人 尤比化学研究有限责任公司

(72) 发明人 L. 普斯卡斯 C. 斯扎博

I. 卡尼兹赛 M. 久里斯 R. 马达赛

B. 奥兹瓦里 L. 费赫 G. 塔马斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张平元

(51) Int. Cl.

C07D 215/26(2006. 01)

C07D 401/06(2006. 01)

C07D 401/12(2006. 01)

C07D 401/14(2006. 01)

C07D 413/12(2006. 01)

A61K 31/4709(2006. 01)

A61K 31/47(2006. 01)

A61P 9/10(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101611009 A, 2009. 12. 23, 说明书第
1-57 页, 权利要求 1-25.Petra Brozic et al.. Discovery of
new inhibitors of aldo-keto reductase
1C1 by structure-based virtual
screening. 《Molecular and Cellular
Endocrinology》. 2009, 第 301 卷 (第 1-2
期), 245-250.

审查员 郝小燕

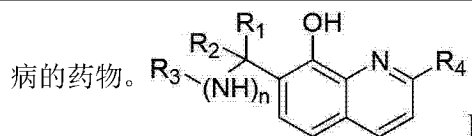
权利要求书2页 说明书21页 附图4页

(54) 发明名称

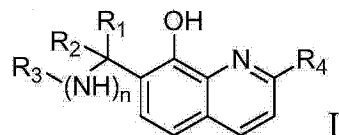
8- 羟基 - 喹啉衍生物

(57) 摘要

本发明涉及通式 (I) 的化合物及其药学上可接受的盐 (其中 R_1 表示氢原子、低级烷基、低级烯基、低级环烷基、芳基、芳烷基或杂环基, 其中上述基团任选在邻位、间位和 / 或对位上被 1、2、3 或 4 个吸电子基团或供电子基团取代; R_2 表示氢原子、低级烷基、芳基、芳烷基或杂环基, 其中上述基团任选被一个或多个卤原子取代; R_3 表示低级烷基、芳基、芳烷基或杂环基, 其中上述基团任选在邻位、间位和 / 或对位上被 1、2、3 或 4 个吸电子基团或供电子基团取代; R_4 表示氢原子、低级烷基或任一酸官能基; n 是 1 或 2)。本发明的化合物可主要用于治疗与神经学和 / 或氧化性应激相关的疾



1. 通式 (I) 的化合物及其药学上可接受的盐,



在该式中

R_1 表示任选在邻位、间位和 / 或对位被 1、2、3 或 4 个羟基、三氟甲基、硝基取代的苯基，或任选在邻位、间位和 / 或对位上被 1、2、3 或 4 个卤素原子、三氟甲基、硝基或低级烷基取代的吡啶基；

R_2 表示氢原子；

R_3 表示嘧啶基，其中上述基团任选在邻位、间位或对位上被 1、2、3 或 4 个卤素原子、三氟甲基、硝基或低级烷基取代；

R_4 表示氢原子或甲基；

n 是 1；

其中低级烷基指的是具有 1-4 个碳原子的支链或非支链烷基。

2. 根据权利要求 1 的通式 (I) 的下述化合物：

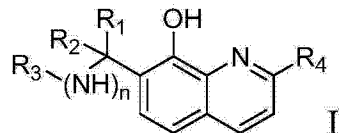
7-((4-甲基嘧啶-2-基氨基)(4-硝基苯基)甲基)喹啉-8-醇；

7-((4-甲基嘧啶-2-基氨基)(4-(三氟甲基)苯基)甲基)喹啉-8-醇；

7-[(2-羟基苯基)-(4-甲基-嘧啶-2-基氨基)-甲基]-喹啉-8-醇；

7-[(4,6-二甲基-嘧啶-2-基氨基)-(4-三氟甲基-苯基)-甲基]-喹啉-8-醇。

3. 制备通式 (I) 的化合物的方法，



其中

R_1 表示任选在邻位、间位和 / 或对位被 1、2、3 或 4 个羟基、三氟甲基、硝基取代的苯基，或任选在邻位、间位和 / 或对位上被 1、2、3 或 4 个卤素原子、三氟甲基、硝基或低级烷基取代的吡啶基；

R_2 表示氢原子；

R_3 表示嘧啶基，其中上述基团任选在邻位、间位或对位上被 1、2、3 或 4 个卤素原子、三氟甲基、硝基或低级烷基取代；

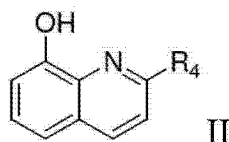
R_4 表示氢原子或甲基；

n 是 1，

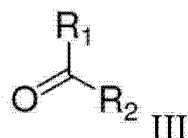
其中低级烷基指的是具有 1-4 个碳原子的支链或非支链烷基；

其特征在于

通式 (II) 的 8-羟基喹啉衍生物



与通式 (III) 的氧代化合物



和通式 (IV) 的胺反应



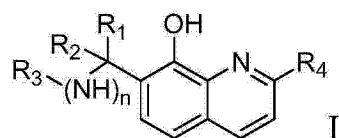
IV

其中取代基如上述所定义, R_3' 独立地选自 R_3 的含义, 且 R_3' 也可作为氢原子; 且 R_3 和 R_3' 可相互连接形成环仲胺, 所得到的通式 (I) 的化合物任选转化成药学上可接受的酸加成盐和 / 或由其盐释放。

4. 药物组合物, 其含有根据权利要求 1 或 2 中任一项的化合物或其与药学上可接受的酸或碱形成的盐, 和药学上可接受的固体或液体载体和 / 或赋形剂。

5. 权利要求 4 所述药物组合物的制备方法, 其特征在于根据权利要求 1 或 2 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐, 与药学上可接受的惰性固体或液体载体和 / 或赋形剂混合。

6. 治疗有效量的通式 (I) 的化合物及其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗与神经学和 / 或氧化性应激相关的疾病的药物中的用途,



在该式 (I) 中

R_1 表示任选在邻位、间位和 / 或对位被 1、2、3 或 4 个羟基、三氟甲基、硝基取代的苯基, 或任选在邻位、间位和 / 或对位上被 1、2、3 或 4 个卤素原子、三氟甲基、硝基或低级烷基取代的吡啶基;

R_2 表示氢原子;

R_3 表示嘧啶基, 其中上述基团任选在邻位、间位或对位上被 1、2、3 或 4 个卤素原子、三氟甲基、硝基或低级烷基取代;

R_4 表示氢原子或甲基;

n 是 1;

其中低级烷基指的是具有 1-4 个碳原子的支链或非支链烷基。

7. 根据权利要求 6 所述的化合物用途, 其中所述与神经学和 / 或氧化性应激相关的疾病选自下述疾病: 缺血、再灌注损伤、心血管疾病、神经变性疾病、创伤、神经精神疾病以及肝、肾和肺损伤。

8. 根据权利要求 6 所述的化合物用途, 其中所述疾病选自阿尔茨海默病、亨廷顿病、抑郁或焦虑症。

8- 羟基 - 喹啉衍生物

[0001] 本发明涉及新颖的喹啉衍生物、这些化合物的合成、含有这些化合物的药物组合物、这些药物组合物的制备,也涉及本发明的新颖的 8- 羟基 - 喹啉衍生物在治疗和预防不同疾病方面的用途,主要是与神经学和 / 或氧化性应激相关的那些疾病。

[0002] 本发明公开了细胞保护剂和金属螯合形成剂及其医疗用途。而且,本发明的目的是治疗缺血、再灌注损伤、心血管疾病、神经变性疾病(包括阿尔茨海默病和亨廷顿病)和创伤。而且,本发明的目的是治疗抑郁及其它神经精神疾病,包括焦虑症。本发明的另一目的是治疗肝、肾或肺损伤。本发明的化合物可用作神经保护性和心脏保护性药物,并用于治疗神经精神疾病。

[0003] 本专利说明书中提及的出版物和所引用的专利作为参考包含于说明书中。

[0004] 各种病原学细胞损伤和细胞死亡是许多心血管、神经学和炎症疾病的主要特征。细胞损伤可作为细胞低氧或缺血、各种氧化剂或自由基的形成和 / 或不同生物调节剂(细胞因子、趋化因子、脂质调节剂)的过度生成的结果而出现。这些过程经常是相互依赖的;因此这些过程作为自身放大(“自杀性”)细胞内循环的一部分而出现,并形成许多人类疾病的决定性基础。虽然细胞死亡一般被描述为细胞凋亡或坏死,但这两种形式仅表示细胞损伤形式的范围的两端。参与上述细胞死亡过程的细胞间机理是复杂的,但经常激活称为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的细胞死亡效应器家族,并刺激线粒体功能障碍、活性氧的产生以及使线粒体组分释放到胞液中(综合性文献: Szabó, 2005 ; Duprez 等, 2009 ; Degterevs Yuan, 2008 ; Wang 等, 2009)。细胞死亡的路径包括聚(ADP- 核糖)聚合酶(PARP)的活化。后一种酶在细胞核中表达(综合性文献: Jagtap and Szabó, 2005)。

[0005] 预防细胞损伤和细胞死亡的化合物一般称为“细胞保护性”化合物。可通过许多药理学和生物化学方法得到细胞保护。本文提到了它们的下述实例:氧化剂和自由基的清除剂、某些“死亡效应器路径”的抑制剂、细胞膜的稳定等。在缺血或几个相关疾病过程中,由组织释放的铁和铜阳离子以 Haber-Weiss 路径通过已知方式催化羟基自由基的形成而引起细胞损伤。这些金属阳离子的失活或螯合物的形成可产生细胞保护作用。因此以给药形成铁载体(如去铁胺)的铁螯合物的形式进行试验,以减缓铁和铜阳离子的催化效率(Lewen 等, 2000 ; Britton 等, 2002)。

[0006] 已知的是,谷氨酸盐与锌阳离子一起由神经系统细胞的突触体利用谷氨酸盐作为化学信使进行释放。通常,在神经联合会释放的锌很快再次在突触体中建立。由于缺血、持久攻击和大脑损伤,由突触体释放的锌在环绕神经元的细胞外液体中蓄积。当过量的锌进入细胞体,锌可通过细胞凋亡和坏死引起细胞死亡。通过该机理形成的锌螯合物可形成神经性保护并影响不同神经精神性疾病的结果(Regland 等, 2001 ; Koh 等, 1996)。

[0007] 因此,锌螯合剂也可用于治疗阿尔茨海默病,所述治疗通过结合出现在斑块中的锌,因而削弱了斑块的结构(Frederickson 等, 2005 ; Schäfer 等, 2007)。锌螯合剂也可用于治疗亨廷顿病(Nguyen 等, 2005)。

[0008] 根据细胞保护的另一方式,诱导了调节保护效应的细胞内路径。该方法的原型是所谓的“缺血预适应”,其中使细胞或器官短时间缺血以诱导细胞保护基因(如抗氧化酶、

热休克蛋白及其他的基因) 的过调节。酶(HO-1) 的血红素氧化酶表达已经在几个试验体系中证实了细胞保护作用(如Li 等,2007;Idris 等,2008)。

[0009] 涉及细胞保护方法的先前的专利申请与下述相关:不同细胞凋亡路径或效应器的抑制剂(如US 6,949,516;US 6,737,511;US 6,544,972;US 6,521,617;US 6,495,522;US 7,604,989;US 7,601,846;US 7,533,852);在细胞损伤期间维持线粒体功能(如US 6,552,076;US 6,511,966;US 7,550,439;US 7,528,174);PARP 酶催化活性的直接抑制(如US 6,476,048;US 6,531,464;US 7,601,719;US 7,595,406;US 7,550,603;US 7,449,464;US 7,217,709;US 6,956,053;US 6,534,651);细胞保护基因(包括血红素氧化酶) 的过调节(如US 7,524,819;US 7,364,757)。

[0010] 用于内质网应激抑制的化合物已经公开于美国专利申请公开号 2008/293699 中。

[0011] 最近已经进行了基于细胞的筛选测试以用于细胞保护作用化合物的系统鉴定。在该测试中,模拟某种形式的细胞损伤并筛选化学库以鉴定预防或延缓细胞损伤的化合物(如Gero 等,2007)。该筛选测试没有鉴定所述效果的机理,然而,其能通过辅助测试的方式进行鉴定。

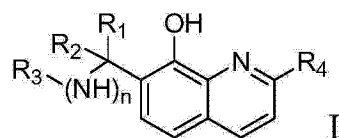
[0012] 通过基于细胞筛选方法的方式,我们已经发现并确定了新颖的羟基-喹啉衍生物。这些化合物保护细胞免遭由氧化性应激诱导的损伤,因此其可能用于治疗许多疾病。本发明的化合物发挥了多种细胞效果如铁整合、PARP 活化的抑制、线粒体功能障碍的抑制、血红素氧化酶的活化和与铁离子形成的螯合物。在实现本发明的过程中,以不含铁、锌和铜阳离子的形式添加螯合剂,因此当与生理学体系接触时,这些化合物与上述阳离子形成络合物。

[0013] 本发明的药物组合物包含作为活化剂的螯合剂,其不与铁、铜或锌阳离子形成络合物键。

[0014] 本发明的另一目的是针对患有与细胞死亡相关症状患者的神经保护和/或心脏保护方法。根据本发明,以向有此需要的患者给药本发明化合物的方式获得神经保护和/或心脏保护,所述化合物能保护细胞免于细胞毒性攻击。

[0015] 一方面,本发明的目的是通式(I) 的化合物及其药学上可接受的盐

[0016]



[0017] 在该式中

[0018] R_1 表示氢原子、低级烷基、低级烯基、低级环烷基、芳基、芳烷基或杂环基,其中上述基团任选在邻位、间位和/或对位上被1、2、3或4个吸电子基团或供电子基团取代;

[0019] R_2 表示氢原子、低级烷基、芳基、芳烷基或杂环基,其中上述基团任选被一个或多个卤原子取代;

[0020] R_3 表示低级烷基、芳基、芳烷基或杂环基,其中上述基团任选在邻位、间位和/或对位上被1、2、3或4个吸电子基团或供电子基团取代;

[0021] R_4 表示氢原子、低级烷基或任一酸官能基;

[0022] n 是1或2。

[0023] 优选的一组通式 (I) 的化合物是衍生物, 其中

[0024] R_1 表示在对位上被吸电子基取代的基团, 或在间位上被吸电子基取代的基团, 或在邻位、间位或对位上被供电子基取代的上述基团; 或 R_1 表示在间位和对位上被吸电子基双取代的基团; 或 R_1 表示在邻位和对位上被吸电子基双取代的基团; 或 R_1 表示取代或未取代的杂环基;

[0025] R_3 表示在对位上被吸电子基取代的芳香基; 或 R_3 表示未取代的或在邻位、间位或对位上被烷基和 / 或吸电子基取代的杂芳基或脂环基;

[0026] R_2 和 R_4 表示氢原子; 和

[0027] n 是 1。

[0028] 在通式 (I) 的本发明化合物的特别优选衍生物中,

[0029] R_1 表示任选被硝基、三氟甲基、羟基、氟原子、异丙氧基单取代或双取代的苯基; 或吡啶基;

[0030] R_2 表示氢原子;

[0031] R_3 表示任选被三氟甲基或甲氧基羰基单取代或双取代的苯基, 或任选被甲基、氟原子、硝基单取代或双取代的吡啶基, 或嘧啶基、吡咯烷基、噁唑烷基或吡唑基;

[0032] R_4 表示氢原子; 和

[0033] n 是 1。

[0034] 特别优选的是作为实施例的标题化合物提及的 8- 羟基 - 喹啉衍生物。

附图说明

[0035] 图 1a、1b 和 1c 说明了心脏移植之后, 实施例 1 的化合物再灌注损伤减少的效果;

[0036] 图 2 说明了在体外肝细胞中, 本发明的几种化合物对过氧化氢引起的细胞死亡的效果;

[0037] 图 3 说明了在体外混合神经元和星形细胞中, 本发明的几种化合物对过氧化氢引起的细胞死亡的效果;

[0038] 图 4 说明了实施例 1 化合物在高架十字迷宫试验中的效果; 和

[0039] 图 5 说明了实施例 1 化合物在强迫游泳试验中的效果。

[0040] 说明书中使用的术语应如下述解释:

[0041] “低级烷基”指的是具有 1-4 个碳原子的支链或非支链烷基 (如甲基、乙基、异丙基等)。

[0042] 术语“低级烯基”指的是具有 2-4 个碳原子的支链或非支链烯基 (如烯丙基或丙烯基)。

[0043] 术语“环烷基”指的是具有 3-8 个碳原子的环状基团 (如环丙基、环丁基、环己基等)。

[0044] 术语“芳基”指的是单环或双环芳香烃基 (如苯基、萘基等)。

[0045] 术语“芳烷基”指的是被满足上述定义的上述芳基单取代或双取代的烷基 (如苄基、 β 苯乙基等)。

[0046] 术语“杂环基”指的是具有 3 至 7 元, 优选 5 或 6 元的含有一个或多个氧、氮和 / 或硫原子的芳香基 (如吡啶基、嘧啶基、吡咯基、噁唑基等)。

[0047] 术语“卤原子”指的是溴、氟、氯或碘原子；优选氟和氯原子。

[0048] 术语“吸电子基团”取代基优选卤原子、三氟甲基或硝基。

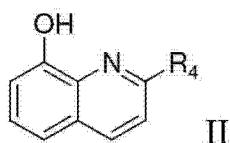
[0049] 在“供电子”取代基中，可提及低级烷基（如甲基）。

[0050] “酸官能基”可以是任一酯基（低级烷氧羰基，优选甲氧羰基）或腈或酰胺基。

[0051] 通式 (I) 的化合物与碱在羟基上或与酸在氮原子上形成盐。对于盐的形成，可使用药学上可接受的碱（例如碱金属氢氧化物，如氢氧化钠或氢氧化钾）或药学上可接受的无机或有机酸（例如盐酸、氢溴酸、乙酸、富马酸、马来酸、苹果酸、琥珀酸、酒石酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、甲磺酸等）。

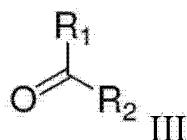
[0052] 本发明的另一目的是通式 (I) 的化合物及其药学上可接受盐的制备方法，其特征在于将通式 (II) 的 8-羟基喹啉衍生物

[0053]



[0054] 与通式 (III) 的氧化化合物

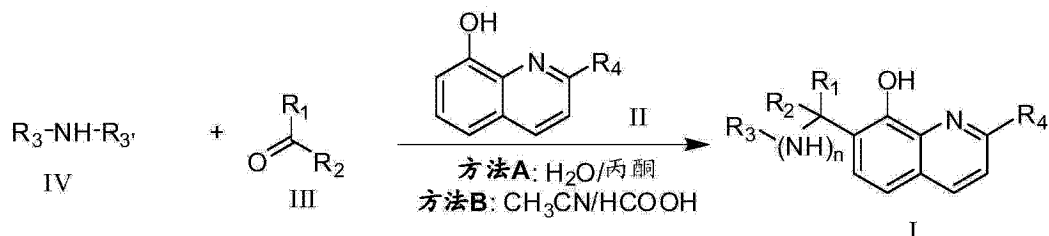
[0055]



[0056] 和通式 (IV) 的胺反应

[0057] R_3-NH-R_3' IV

[0058]



[0059] （式中的取代基如上述所定义， R_3 独立地选自 R_3 的可能含义，且 R_3' 也可作为氢原子；且 R_3 和 R_3' 可相互连接形成环仲胺），接着得到的式 (I) 化合物任选转化成其药学上可接受的盐或由其盐释放出。

[0060] 利用改良的 Betti 反应（其为已知的方法）进行所述反应（Betti, 1900 ;Betti, 1903 ;Phillips 等, 1954 ;Phillips 等, 1956 ;Phillips, 1956）。

[0061] 反应在溶剂中进行。水或有机溶剂（如乙腈）可用作反应媒介。任选地，反应在酸性催化剂（如甲酸）存在下进行。

[0062] 对于本发明化合物的制备，取决于起始原料，使用下述方法 A 或 B：

[0063] 方法 A：

[0064] 将 1mmol 的醛悬浮或溶解于 2 倍体积的水中并向反应混合物中添加 1.1 当量的伯胺。在 60℃ 保持 1 小时，并向热混合物中滴加溶解于体积为水两倍的乙腈或丙酮中的 0.6 当

量的 8-羟基-喹啉溶液。接着将反应混合物冷却到室温并搅拌直到出现沉淀。通过 HPLC 和 TLC 的方式监测反应。过滤沉淀,用乙腈洗涤并干燥。

[0065] 方法 B:

[0066] 将 1mmol 的醛溶解于 3 倍体积的乙腈中并向反应混合物中添加 1 当量的胺、0.6 当量的 8-羟基-喹啉和 1V/V% 的甲酸。搅拌混合物直到出现沉淀或起始喹啉点消失。通过过滤、用乙腈洗涤来处理混合物,利用己烷(异构体混合物)/乙酸乙酯的混合物进行色谱分离并由醇或乙腈重结晶。

[0067] 反应完成,利用一般方法(如过滤或离心)从反应混合物分离所需产物并且如果需要的话,通过已知方法纯化(重结晶或色谱法)。

[0068] 本发明的另一目的是含有作为活化剂的通式(I)的化合物或其药学上可接受的盐和惰性固体或液体药物载体和/或赋形剂的药物组合物。

[0069] 本发明的药物组合物可为固体(如片剂、胶囊)、半固体(如栓剂)或液体(如可注射溶液)制剂。所述制剂可通过口服、直肠给药或胃肠外给药。本发明的组合物可包含通常适合治疗的载体和/或赋形剂(如淀粉、纤维素或纤维素衍生物、乳糖、甘露醇、氯化钠、碳酸钠、蔗糖、麦芽糖、碳酸钙等)。

[0070] 本发明的药物组合物可用于治疗与神经学和/或氧化性应激相关的疾病,其中向有此需要的患者给药治疗有效量的通式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。根据本发明的优选实施方式,与神经学或氧化性应激相关的疾病选自下述疾病:缺血、再灌注损伤、心血管疾病、神经变性疾病(特别是包括阿尔茨海默病和亨廷顿病)、创伤、神经精神疾病(特别是包括抑郁和焦虑症)以及肝、肾和肺损伤。

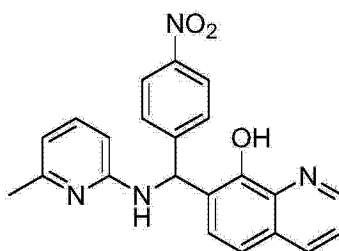
[0071] 根据上述,本发明的药物组合物在肝、肾和肺损伤情况下可用作神经保护和心脏保护试剂,并可用于治疗或预防抑郁、焦虑症、阿尔茨海默病和亨廷顿病。

[0072] 本发明的其它细节以下述实施例公开,并非将保护范围限于实施例中。

[0073] 化学实施例

[0074] 实施例 1:7-((6-甲基吡啶-2-基氨基)(4-硝基苯基)甲基)喹啉-8-醇

[0075]



[0076] 方法 A:

[0077] 向 10.1 g (18.5mmol, Sigma) 的 4-硝基-苯甲醛中,滴加水 (20ml),接着在强烈搅拌下向该柠檬黄色悬浮液中加入 2-氨基-6-甲基吡啶 (7.95g, 1.1 当量, Aldrich)。颜色变化后(从柠檬黄到橙黄),将 5.82g 的 8-羟基-喹啉 (0.6 当量, Sigma) 与 20mL 丙酮 (Molar) 的溶液加入到该悬浮液中,且反应容器在 60°C 加热 4 小时,接着将该溶液冷却到室温。过滤黄色粉末沉淀 (7.87g 50.8%),用少量丙酮洗涤;其纯度通过 HPLC 检测 ($\geq 99.5\%$)。

[0078] 方法 B:

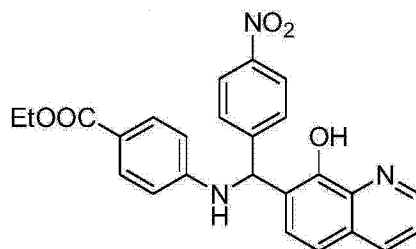
[0079] 将 4-硝基-苯甲醛 (2.8g, 18.5mmol, Sigma) 溶于无水乙腈 (15ml, Molar) 中,且

在搅拌下向该柠檬黄色溶液中加入 2-氨基-6-甲基吡啶 (2g, 1 当量, Aldrich)。将 1.61g 的 8-羟基-喹啉 (0.6 当量, Sigma) 加入到混合物中并在室温搅拌四天。过滤沉淀出的产物 (4.2g, 27.1%), 通过质谱确定产物的分子量, 其结构通过 NMR 确定 (MW : 386.1), 纯度通过 HPLC 检测 ($\geq 99.6\%$)。

[0080] $C_{22}H_{18}N_4O_3$ (MW : 386.1) ; 熔点 : 157-160 °C ; HPLC (CH₃CN/H₂O 70:30 Phenomenex C18 282nm) : $T_r = 7.14$ 分钟 ¹H NMR 1 (DMSO) δ 2.2 (3H, s, CH₃), 6.37 (1H, d, J = 7.0Hz), 6.49 (1H, d, J = 7.9Hz), 6.98 (1H, d, J = 8.8Hz, NHCH), 7.28 (1H, t, J = 7.9Hz), 7.40 (2H, t, J = 7.9 和 8.8Hz), 7.50-7.55 (1H, m), 7.59-7.66 (3H, m), 8.16 (2H, d, J = 8.8Hz), 8.28 (1H, d, J = 7.9Hz), 10.1 (1H, 宽 s, OH) ¹³C NMR 1 (DMSO) δ 24.2 (CH₃), 51.5 (CH), 105.6 (CH), 111.6 (CH), 117.7 (CH), 121.9 (CH), 123.5 (2xCH), 124.5 (Cq), 126.7 (CH), 127.7 (Cq), 128.2 (2xCH), 136.1 (CH), 137.3 (CH), 138.2 (Cq), 146.2 (Cq), 148.4 (CH), 149.8 (Cq), 152.0, 155.7 和 157.3 (Cq)。

[0081] 实施例 2 : 4-((8-羟基喹啉-7-基)-(4-硝基苯基)-甲基氨基)-苯甲酸乙酯

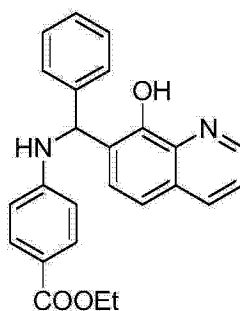
[0082]



[0083] 以用于实施例 1 化合物的方法 A 和方法 B 制备标题化合物, 其中所用起始原料改变为苯佐卡因 (Sigma)、4-硝基-苯甲醛 (Sigma) 和 8-羟基喹啉。通过柱色谱纯化产物 : $C_{25}H_{21}N_3O_5$ (MW : 443.2) ; 产率 : 50mg (30.9%, 方法 A)。HPLC (CH₃CN/H₂O 70:30 Phenomenex C-18 254nm) : $T_r = 8.82$ 分钟。

[0084] 实施例 3 : 4-[(8-羟基喹啉-7-基)-苯基-甲基]-氨基)-苯甲酸乙酯

[0085]

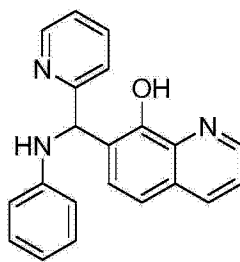


[0086] $C_{25}H_{22}N_2O_3$ (MW : 398.1)

[0087] 以实施例 1 的方法 A 制备。

[0088] 实施例 4 : 7-(苯基氨基-吡啶-2-基-甲基)-喹啉-8-醇

[0089]

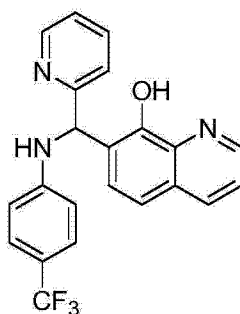


[0090] $C_{21}H_{17}N_3O$; (MW :327. 1)

[0091] 以实施例 1 的方法 A 制备。

[0092] 实施例 5 :7-[吡啶-2-基-(4-三氟甲基-苯基氨基)-甲基]-喹啉-8-醇

[0093]

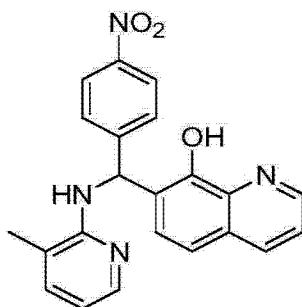


[0094] 以用于实施例 1 化合物的方法 A 和方法 B 制备实施例 5 的标题化合物,改变在于:将吡啶-2-甲醛 (Molar) 用作起始醛,并将 4-三氟甲基-苯胺 (Sigma) 用作伯胺。产物通过柱色谱纯化: $C_{22}H_{16}F_3N_3O$ (MW :395. 1) ;产率:151mg, (42. 1%, 方法 B) ;熔点:158-161℃; HPLC(CH_3CN/H_2O 70:30Phenomenex C18 254nm) : T_r = 10. 39 分钟。

[0095] 1H NMR 5 (DMSO) δ 6. 31 (1H, d, J = 7. 1Hz), 6. 79 (1H, d, J = 7. 6Hz), 7. 27 (1H, t, J = 5. 1Hz), 7. 29-7. 37 (4H, m), 7. 47-7. 54 (3H, m), 7. 75 (1H, t, J = 7. 2Hz), 7. 74 (1H, d, J = 8. 5Hz), 8. 24 (1H, d, J = 8. 3Hz), 8. 55 (1H, d, J = 4. 1Hz), 8. 85 (1H, d, J = 3. 2Hz), 10. 24 (1H, 宽 s)。

[0096] 实施例 6 :7-[(3-甲基-吡啶-2-基氨基)-(4-硝基-苯基)-甲基]-喹啉-8-醇

[0097]

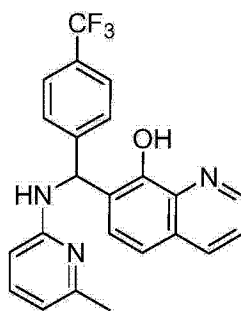


[0098] $C_{22}H_{18}N_4O_3$; (MW+1 :386, 1)

[0099] 以实施例 1 的方法 A 制备。

[0100] 实施例 7 :7-[(6-甲基-吡啶-2-基氨基)-(4-三氟甲基-苯基)-甲基]-喹啉-8-醇

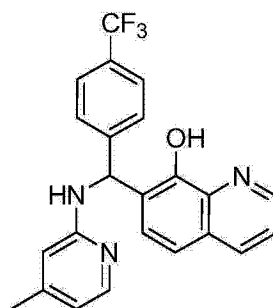
[0101]



[0102] 以用于实施例 1 化合物的方法 A 和方法 B 制备标题化合物,其中所用起始原料改变为 4-三氟甲基苯甲醛 (Sigma)、2-氨基-6-甲基吡啶和 8-羟基-喹啉。所得产物 (方法 B): $C_{23}H_{18}F_3N_3O$ (MW:409.1); (229mg, 32.5 %); 熔点: 136-138 °C; HPLC (CH_3CN/H_2O 70:30Phenomenex C18 254nm): $T_r = 10.18$ 分钟。

[0103] 实施例 8: 7-[(4-甲基-吡啶-2-基氨基)-(4-三氟甲基苯基)-甲基]-喹啉-8-醇

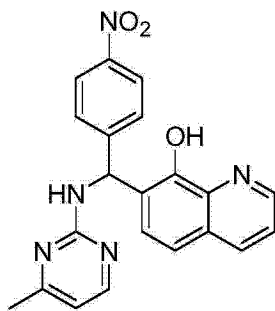
[0104]



[0105] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物,其中所用起始原料改变为 2-氨基-4-甲基-吡啶 (Molar)、4-三氟甲基-苯甲醛 (Sigma) 和 8-羟基-喹啉 (Sigma)。所得产物: $C_{23}H_{18}F_3N_3O$ (MW:409.1); 产率: 230mg, (29.6 %) 熔点: 104-107 °C; HPLC (CH_3CN/H_2O 70:30Phenomenex C18 282nm): $T_r = 7.61$ 分钟。 1H NMR 8 (DMSO) δ 2.18 (3H, s, CH_3), 6.41 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 6.44 (1H, s, NH), 6.49 (1H, d, $J = 4.9$ Hz), 7.07 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.39 (1H, d, $J = 8.9$ Hz), 7.49-7.54 (1H, m), 7.58 (2H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.63 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.73 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.85 (2H, d, $J = 7.9$ Hz), 8.03-8.08 (1H, m), 8.12 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 8.27 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 8.81-8.86 (1H, m); ^{13}C -NMR 8 (DMSO) δ 23.5 (CH_3), 51.8 (NHCH), 109.5 (CH), 117.6 (CH), 121.8 (CH), 124.5 (Cq), 125.1 (CH), 125.6 (2xCH), 126.8 (CH), 127.7 (2xCH), 127.8 (Cq), 130.1 (CH), 134.7 (Cq), 136.1 (CH), 138.1 (Cq), 148.2 (Cq), 148.5 (CH), 149.6 (Cq), 157.7 (CH), 161.6 (Cq), 166.3 (Cq)。

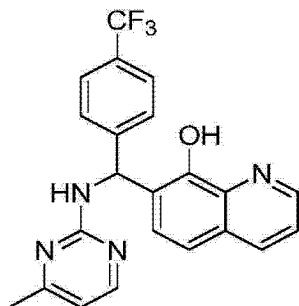
[0106] 实施例 9: 7-((4-甲基吡啶-2-基氨基)-(4-硝基苯基)-甲基)-喹啉-8-醇

[0107]



[0108] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物,其中所用起始原料改变为 2-氨基-4-甲基-嘧啶 (Sigma)、4-硝基-苯甲醛和 8-羟基-喹啉。所得产物: $C_{21}H_{17}N_5O_3$, (MW: 387.1); 产率: 344mg, (49.6%); 熔点: 136-145 $^{\circ}C$; HPLC(CH_3CN/H_2O 70:30Phenomenex C18 282nm): T_r = 5.21 分钟。 1H NMR 9 (DMSO) δ 2.14 (3H, s, CH_3), 6.35 (1H, d, J = 5.8Hz), 6.55 (1H, s), 7.00 (1H, d, J = 8.0Hz), 7.36-7.43 (2H, m), 7.50-7.55 (1H, m), 7.56 (1H, d, J = 7.5Hz), 7.60 (1H, d, J = 8.5Hz), 7.79 (1H, d, J = 5.5Hz), 8.15 (2H, d, J = 8.5Hz), 8.28 (1H, d, J = 8.5Hz), 8.84 (s, 1H), 10.1 (s, 1H); ^{13}C NMR 9 (DMSO) δ 20.6 (CH_3), 51.6 (NHCH), 109.0 (CH), 114.2 (CH), 117.7 (CH), 121.9 (CH), 123.5 (2xCH), 124.6 (Cq), 126.7 (CH), 127.7 (Cq), 128.2 (2xCH), 136.1 (CH), 138.2 (Cq), 146.2 (Cq), 147.1 (Cq), 147.2 (CH), 148.5 (CH), 149.8, 152.0 和 157.9 (3Cq)。

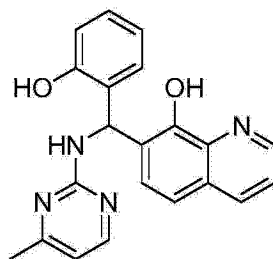
[0109] 实施例 10: 7-((4-甲基嘧啶-2-基氨基)(4-(三氟甲基)苯基)甲基)喹啉-8-醇
[0110]



[0111] 以用于实施例 1 化合物的方法 A 和方法 B 制备标题化合物,改变在于将 4-三氟甲基-苯甲醛和 2-氨基-4-甲基-嘧啶用作醛和氨源 (Molar)。所得产物 (方法 B), 产率: 1.7g, (34.8%); $C_{22}H_{17}F_3N_4O$; (MW: 410.1), 熔点: 144-147 $^{\circ}C$; HPLC(CH_3CN/H_2O 70:30Phenomenex C18 254nm): T_r = 7.75 分钟。 1H NMR 10 (DMSO) δ 2.24 (3H, s, CH_3), 6.49 (1H, d, J = 5.1Hz), 7.07 (1H, d, J = 9.0Hz, NHCH), 7.39 (1H, d, J = 8.5Hz), 7.49-7.55 (1H, m), 7.58 (2H, d, J = 7.7Hz), 7.64 (2H, d, J = 7.9Hz), 7.74 (1H, d, J = 8.5Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.9Hz), 8.14 (1H, d, J = 4.9Hz), 8.28 (1H, d, J = 7.7Hz), 8.83 (1H, s), 10.08 (1H, 宽 s)。

[0112] ^{13}C NMR 10 (DMSO) δ 23.6 (CH_3), 51.7 (NHCH), 110.4 (CH), 117.6 (CH), 121.8 (CH), 124.6 (Cq), 125.2 (2xCH), 126.8 (CH), 127.2 (Cq), 127.4 (Cq), 127.7 (Cq), 127.8 (2xCH), 136.1 (CH), 138.1 (Cq), 148.2 (Cq), 148.4 (CH), 149.8, 149.6, 161.6 和 167.6 (4Cq)。

[0113] 实施例 11: 7-[(2-羟基苯基)-(4-甲基-嘧啶-2-基氨基)-甲基]-喹啉-8-醇
[0114]

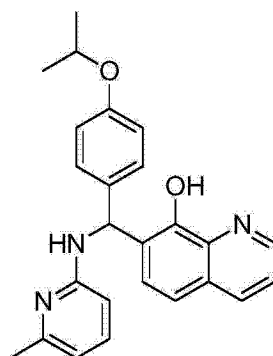


[0115] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物,其中所用起始原料改变为 2-羟基-苯甲醛 (Molar) 和 2-氨基-4-甲基-嘧啶 (Sigma)。沉淀出的产物,产率:45mg;
 $C_{21}H_{18}N_4O_2$; (MW:358.1)。

[0116] 1H NMR 11 (DMSO) δ 2.21 (3H, s, CH_3), 6.39-6.46 (2H, m), 6.69 (1H, t, $J = 6.4$ Hz), 6.75 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.23 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 7.32 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.44-7.51 (2H, m), 7.57 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.09 (1H, d, $J = 5.4$ Hz), 8.25 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.79 (1H, 宽 s), 9.47 (1H, 宽 s, OH), 9.80 (1H, 宽 s, OH)。

[0117] 实施例 12:7-[(4-异丙氧基苯基)-(6-甲基-吡啶-2-基氨基)-甲基]-喹啉-8-醇

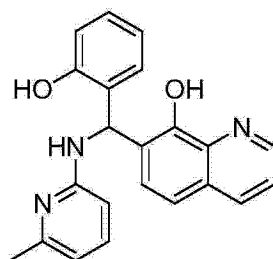
[0118]



[0119] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物,其中所用醛成分改变为 4-异丙基-氧基-苯甲醛 (Molar)。产物通过柱色谱纯化, $C_{25}H_{25}N_3O_2$; (MW+1:399.2), 产率 135mg, (63.1%), 熔点:132-134°C; HPLC (CH_3CN/H_2O 70:30 Phenomenex C18 282nm): $T_r = 9.23$ 分钟。

[0120] 实施例 13:7-[(2-羟基苯基)-(6-甲基-吡啶-2-基氨基)-甲基]-喹啉-8-醇

[0121]



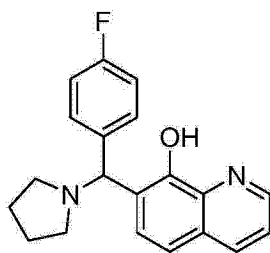
[0122] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物,其中所用起始原料改变为水杨醛 (Molar)、2-氨基-6-甲基吡啶 (1 当量) 和 8-羟基-喹啉 (0.6 当量) 来进行反应。沉淀产物: $C_{22}H_{19}N_3O_2$; (MW:357.1), 产率 1.6g, (50.9%); 熔点:189-191°C; HPLC (CH_3CN/H_2O 70:30 Phenomenex C18 282nm): $T_r = 5.05$ 分钟。

[0123] ^1H NMR 13 (DMSO) δ 2.23 (3H, s), 6.34 (1H, d, $J = 6.0\text{Hz}$), 6.38 (1H, d, $J = 7.1\text{Hz}$), 6.69 (1H, t, $J = 7.2\text{Hz}$), 6.80 (2H, m), 7.02 (2H, m), 7.18 (1H, d, $J = 6.2\text{Hz}$), 7.25 (1H, d, $J = 6.8\text{Hz}$), 7.36 (1H, d, $J = 7.4\text{Hz}$), 7.42-7.54 (1H, m), 7.64 (1H, d, $J = 7.9\text{Hz}$), 8.25 (1H, d, $J = 7.1\text{Hz}$), 8.80 (1H, s), 9.85 (1H, s)

[0124] ^{13}C NMR 13 (DMSO) δ 23.9 (CH₃), 47.8 (CHNH), 111.1 (CH), 115.7 (CH), 116.7 (CH), 118.7 (CH), 121.5 (CH), 125.3 (Cq), 127.2 (CH), 127.4 (Cq), 127.8 (CH), 128.3 (CH), 129.2 (Cq), 135.9 (CH), 137.5 (CH), 138.2 (Cq), 148.1 (CH), 149.7, 155.1, 155.6 和 157.6 (4xCq)。

[0125] 实施例 14 : 7-[(4-氟苯基)-(吡咯烷-1-基)-甲基]-喹啉-8-醇

[0126]

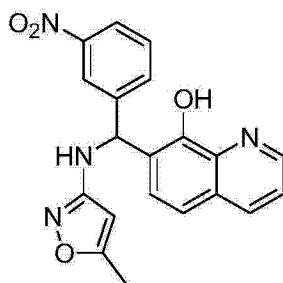


[0127] C₂₀H₁₉FN₂O; (MW :322.2)

[0128] 以实施例 1 的方法 A 制备标题化合物。

[0129] 实施例 15 : 7-[(5-甲基-1,2-噁唑-3-基)氨基](3-硝基苯基)甲基)喹啉-8-醇

[0130]

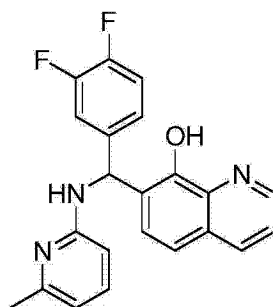


[0131] C₂₀H₁₆N₄O₄; (MW :376.1)

[0132] 以实施例 1 的方法 A 制备标题化合物。

[0133] 实施例 16 : 7-((6-甲基吡啶-2-基氨基)(3,4-二氟苯基)甲基)喹啉-8-醇

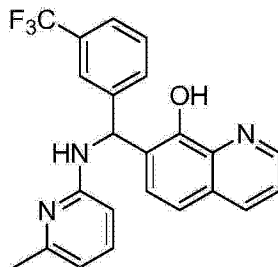
[0134]



[0135] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物, 改变为 : 将 3,4-二氟苯甲醛与

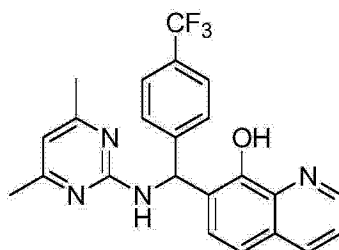
2-氨基-6-甲基吡啶和 8-羟基-喹啉反应。沉淀出白色粉末： $C_{22}H_{17}F_2N_3O$ ，(MW:377.1)；产率：275mg(53.3%)。熔点：162-165℃；HPLC(CH_3CN/H_2O 70:30Phenomenex C18 282nm)：7.97 分钟。

[0136] 实施例 17：7-((6-甲基吡啶-2-基氨基)(3-(三氟甲基苯基)甲基)喹啉-8-醇
[0137]



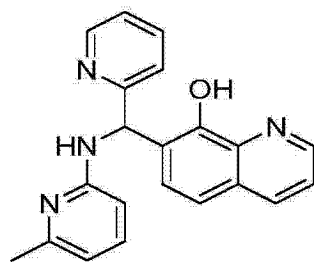
[0138] 以实施例 1 化合物提供的具有更高产率的方法 B 制备标题化合物。沉淀出白色粉末： $C_{23}H_{18}F_3N_3O$ (MW:409.1)；产率：356mg, 57.3%。熔点：140-143℃，HPLC(MeOH/ H_2O 80:20Phenomenex C18 254nm)：10.21 分钟。

[0139] 实施例 18：7-[(4,6-二甲基-嘧啶-2-基氨基)-(4-三氟甲基-苯基)-甲基]-喹啉-8-醇
[0140]



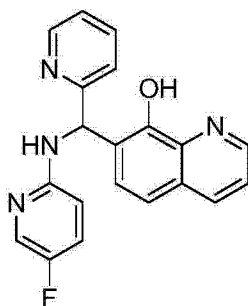
[0141] 以实施例 1 化合物提供的具有更高产率的方法 B 制备标题化合物。沉淀出白色粉末： $C_{23}H_{19}F_3N_4O$ ；(MW:424.2)；产率：255mg, (54.6%)。

[0142] 实施例 19：7-[(6-甲基-吡啶-2-基氨基)-吡啶-2-基-甲基]-喹啉-8-醇
[0143]



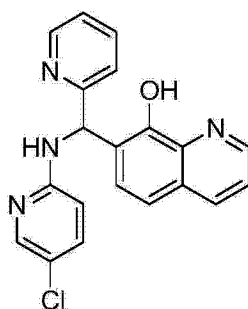
[0144] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物。沉淀出淡黄白色粉末： $C_{21}H_{18}N_4O$ (MW:342.2)；产率：1.2g, (70.5%)。熔点：155-157℃。

[0145] 实施例 20：7-[(5-氟-吡啶-2-基氨基)-吡啶-2-基-甲基]-喹啉-8-醇
[0146]



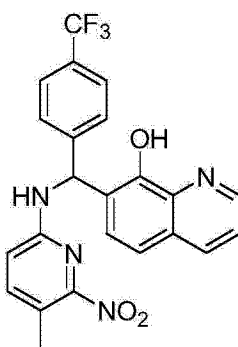
[0147] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物。骨色粉末,通过柱色谱纯化。 $C_{20}H_{15}FN_4O$; (MS :346, 1), 产率 45mg, (18.4 %)。熔点 :165-168 °C, HPLC(CH_3CN/H_2O 70:30Phenomenex C18 282nm) :4.44 分钟。

[0148] 实施例 21 :7-[(5-氯-吡啶-2-基氨基)-吡啶-2-基-甲基]-喹啉-8-醇
[0149]



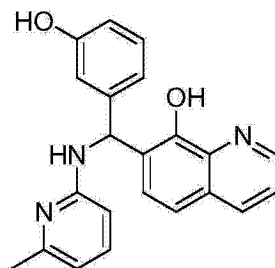
[0150] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物 ;2-氨基-5-氯-吡啶、2-吡啶-甲醛和 8-羟基-喹啉用于反应中 ;反应混合物在 60°C 加热 3 天。灰白色粉末,产物通过柱色谱纯化。 $C_{20}H_{15}ClN_4O$; (MW :362.1) ;产率 :55mg, (23.7 %)。熔点 :160-162 °C, HPLC(CH_3CN/H_2O 70:30Phenomenex C18 282nm) :5.69 分钟。

[0151] 实施例 22 :7-[(5-甲基-6-硝基-吡啶-2-基氨基)-(4-三氟甲基-苯基)-甲基]-喹啉-8-醇
[0152]



[0153] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物,改变在于使用 2-氨基-5-甲基-6-硝基-吡啶、4-三氟甲基-苯甲醛和 8-羟基-喹啉,且反应混合物在 60°C 加热 7 天。淡黄白色粉末。 $C_{23}H_{17}F_3N_4O_3$; (MW :454.1), 产率 :26mg, (10 %)。熔点 $\geq 300^\circ C$, HPLC(CH_3CN/H_2O 70:30Phenomenex C18 282nm) : T_r = 5.60 分钟。

[0154] 实施例 23 :7-[(3-羟基-苯基)-(6-甲基-吡啶-2-基氨基)-甲基]-喹啉-8-醇
[0155]



[0156] 以用于实施例 1 化合物的方法 B 制备标题化合物,改变在于 3- 羟基 - 苯甲醛与 2- 甲基 -6- 甲基吡啶和 8- 羟基 - 喹啉反应。白色粉末,通过柱色谱纯化。 $C_{22}H_{19}N_3O_2$; (MW : 357. 2), 产率 : 211mg, (80. 2%)。熔点 : 187-189℃, HPLC (CH_3CN/H_2O 70:30 Phenomenex C18 282nm) : $T_r = 3.97$ 分钟。

[0157] 生物学实施例

[0158] 实施例 24 : 7-((6- 甲基吡啶 -2- 基氨基) (4- 硝基苯基) 甲基) 喹啉 -8- 醇对基质金属蛋白酶 2 (MMP-2, 72kDa 明胶酶) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9, 92kDa 明胶酶) 的活性抑制

[0159] 将 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞 (来自 ATCC, Rockville, MD, USA) 在含有 10% 牛血清、4mM L- 谷氨酰胺 (Sigma-Aldrich, Hungary)、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中培养。电泳前, 向 H9c2 上清液样品中, 加入来自含 30mM DMSO (1000 倍稀释) 的 30uM 的实施例 1 化合物 (7-((6- 甲基吡啶 -2- 基氨基) (4- 硝基苯基) 甲基) 喹啉 -8- 醇) 的储备溶液。向对照组中, 加入不含实施例 1 化合物的 DMSO。电泳后, 将凝胶切成两份随后复性; 一份以最终浓度向其中加入 30uM 的实施例 1 化合物进行孵育, 而第二份 (对照组) 在无该化合物的情况下进行孵育。如果在孵育过程中存在底物, 则实施例 1 的化合物完全抑制 72kDa 明胶酶 (MMP-2)。其也抑制 92kDa 明胶酶 (MMP-9), 但与 72kDa 明胶酶相比抑制的程度更小。

[0160] 在缺氧再充氧后, MMP-9 和 MMP-2 通过破坏细胞基质相互作用和稳态整联蛋白信号, 促成了半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶介导的内皮细胞死亡。MMP-2 和 MMP-9 抑制剂显著减少了半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -3 的活性并减少了内皮细胞死亡 (Lee 等, 2004)。

[0161] 实施例 25: 实施例 1 化合物 (7-((6- 甲基吡啶 -2- 基氨基) (4- 硝基苯基) 甲基) 喹啉 -8- 醇) 在心脏移植后减少再灌注损伤。

[0162] 以早期公开的方法 (聚 (ADP- 核糖) 建立异向心脏移植试验模型; 聚合酶的抑制减少了心脏移植之后出现的再灌注损伤 (Szabó 等, 2002)。简言之: 供体心脏从 Lewis 大鼠移植。在 4℃ 进行缺血保护 1 小时之后, 通过使受体大鼠的腹主动脉或腔静脉的供体心脏的主动脉和肺动脉吻合而在腹内植入心脏。按照 “Principles of Laboratory Animal Care”; National Society of Medical Research and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Academy of Sciences; publisher: National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, revised 1996) 的要求饲养所有动物。

[0163] 按如下方式进行移植的功能性测评: 通过 Millar 微压计 (Millar Instruments, Inc.), 使用心室内球对不同左心室 (LV) 测量左心室心脏收缩压 (LVSP)、左心室舒张末期压 (LVEDP)、血压变化率 (dP/dt) 和弛豫时间常数 (TE)。用血管周围超声流量样品在供体

主动脉上测量总冠状动脉血流量 (CBF)。确定基线之后,将内皮依赖性血管舒张剂乙酰胆碱 (ACH, 1nmol/l, 0.2ml) 和缓激肽 (BK 0.1nmol/l, 0.2ml), 和内皮非依赖性血管舒张剂硝普钠 (SNP, 10nmol/l, 0.2ml) 通过供体主动脉直接加入到移植的冠状动脉中。在灌注之间,使 CBF 回到基线水平。血管舒张剂响应表示为由基线的 CBF 最大百分数变化。

[0164] 研究了两个移植组 (n = 6/ 每组中)。在即将松开主动脉钳之前,开始缓慢注射普通盐溶液 (对照组) 或实施例 1 化合物 (3mg/kg), 并在再灌注期间的头 5 分钟期间继续进行。

[0165] 再灌注之后 1 小时,在组 A (对照) 和组 B (实施例 1 的化合物) 中进行心脏收缩和舒张功能以及 CBF 的测量。

[0166] 再灌注 60 分钟之后,确定血液动力学参数和心肌血流量。每组中受体的心率和主动脉压相同。与对照值相比,用实施例 1 化合物处理的组心脏收缩功能的恢复显著更好。在用实施例 1 化合物处理的组中, LVSP 和峰正值 dp/dt 显著更高 ($P = 0.05$)。

[0167] 与用载体处理的组相比,用实施例 1 化合物处理的组中心脏收缩心功能曲线向左表现出显著位移 (图 1a 和图 1b)。在组间, LVEDP 没有显示出改变值。心脏舒张协同曲线 (舒张末期压 - 体积关系) 在每组中是相似的 (图 1c)。

[0168] 实施例 26: 用通式 (I) 的化合物进行处理,预防了由过氧化氢在体外心脏、神经元和肝细胞中引起的细胞死亡

[0169] 将 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞 (来自 ATCC, Rockville, MD, USA) 在含有 10% 牛血清、4mM L- 谷氨酰胺 (Sigma-Aldrich, Hungary)、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中培养。将细胞置于 96 孔微量滴定板中 (10000 细胞 / 孔), 24 小时之后,用 1% H_2O_2 (Sigma) 溶液 (0.2mM 最终浓度) 处理。处理 30 分钟之后,将通式 (I) 的不同化合物以不同浓度置于其上,在 3 和 24 小时之后,通过 MTT (3-(4, 5- 二甲基 -2- 噻唑基) -2, 5- 二苯基 -2H- 溴化四唑鎓) 试验的方式确定细胞活性。

[0170] 将 3-(4, 5- 二甲基 -2- 噻唑基) -2, 5- 二苯基 -2H- 溴化四唑鎓 (MTT, Serva) 以 0.5mg/ml 的最终浓度加入到细胞中,并在 37°C 孵育 1 小时。用 PBS 洗涤细胞,并将甲臞染料溶解于异丙醇中。在 570nm 通过 Powerwave 读数器 (Biotek, Winooski, VT) 的方式测量甲臞染料的转化量;背景测量 690nm。以下述方式得到校准曲线:测量细胞的系列稀释液转化 MTT 的能力并利用 Gen5 软件计算活细胞数。在每个系列试验暴露于 H_2O_2 影响 3 小时和 24 小时之后进行测量。

[0171] 实施例 27: 用通式 (I) 的不同化合物处理,预防了由过氧化氢在体外肝细胞中引起的细胞死亡

[0172] 将 10% 的 Hep3B 人血肿细胞 (ATCC, Rockville, MD, USA) 在含有 10% 牛血清、4mM L- 谷氨酰胺 (Sigma-Aldrich, Hungary)、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中培养。在含潮湿空气和 5% CO_2 的 37°C 空间的孵育器中,将细胞放置在 100mm TC 皿 (Orange Scientific, Belgium) 中。

[0173] 将细胞置于 96 孔 E-plate (Roche) 微量滴定板中,该滴定板用明胶 (10000 细胞 / 孔) 预处理,并培养 16 小时。处理 30 分钟之后,将不同浓度的通式 (I) 的不同化合物置于

其上,并利用 Excelligence 设备通过 RT-CES 方法 (Roche),每 2 分钟测量确定细胞指数以持续测量细胞活性。结果示于图 2 中。曲线 "A" 表示未处理的对照,曲线 "I" 表示化合物 PJ34 (一种已知的 PARP 抑制剂),而曲线 "J" 表示用过氧化物处理的对照。

[0174] 在该试验中,测试通式 (I) 的下述化合物 (其中图 2 中的曲线表示给定化合物对正常细胞指数的影响):

[0175] 7-((4-硝基苯基氨基)(苯基)甲基)喹啉-8-醇(曲线 "B"),

[0176] 4-[(8-羟基喹啉-7-基)-苯基-甲基]-氨基)-苯甲酸乙酯(曲线 "C",实施例 3),

[0177] 7-((4-苯基哌嗪-1-基)(噻吩-2-基)甲基)喹啉-8-醇(曲线 "D"),

[0178] 7-((6-甲基吡啶-2-基氨基)(4-(三氟甲基)苯基)甲基)喹啉-8-醇(曲线 "E"),

[0179] 7-((4-氟苯基)(噻唑-2-基氨基)甲基)喹啉-8-醇(曲线 "F"),

[0180] 7-(苯基氨基-吡啶-2-基-甲基)-喹啉-8-醇(曲线 "G",实施例 4)和

[0181] 7-[(4-氟苯基)-(吡咯烷-1-基)-甲基]-喹啉-8-醇(曲线 "H",14)。

[0182] 进行测试以确定 H_2O_2 处理 30 分钟之后,对 Hep3B 人血肿细胞的细胞保护作用。将 250uM 的过氧化氢用于这些细胞中。在施用过氧化氢的过程中,细胞生长是线性的。用本发明的通式 (I) 的不同化合物处理 30 分钟之后,细胞指数曲线的斜率显著改变,基于此建立了本发明化合物的不同细胞保护效果。

[0183] 实施例 28:用通式 (I) 的不同化合物处理,预防了由过氧化氢在体外对混合的主要神经元和星形细胞上引起的细胞死亡

[0184] 在含潮湿空气和 5% 二氧化碳的 37°C 空间的孵育器中,将细胞放置在 100mm TC 皿 (Orange Scientific, Belgium) 中。按照 Griffin S 等 (Griffin 等,2005) 的方法制备大脑神经元和星形细胞的联合培养物。将细胞培养物放置在含有 10% 胎牛血清和 1% 非必需氨基酸溶液 (Sigma-Aldrich, Hungary) 的 Eagle 最低必需培养基中。结果示于图 3 中。曲线 "K" 表示未处理的对照,曲线 "P" 表示用 PJ34 处理的对照,曲线 "Q" 表示用过氧化氢处理的对照。

[0185] 将细胞置于 96 孔 E-plate (Roche) 微量滴定板中,其用明胶 (10000 细胞 / 孔) 预处理,并培养 16 小时。在处理前 5 分钟,将通式 (I) 的本发明下述化合物以 5uM 的浓度置于其上:

[0186] 7-((6-甲基吡啶-2-基氨基)(4-硝基苯基)甲基)喹啉-8-醇(曲线 "L",实施例 1),

[0187] 7-[(6-甲基-吡啶-2-基氨基)-(4-三氟甲基-苯基)-甲基]-喹啉-8-醇(曲线 "M",实施例 7),

[0188] 4-((8-羟基喹啉-7-基)(4-硝基苯基)甲基氨基)苯甲酸乙酯(曲线 "N",实施例 2)和

[0189] 7-((4-甲基嘧啶-2-基氨基)(4-(三氟甲基)苯基)甲基)喹啉-8-醇(曲线 "O",实施例 10)。

[0190] 然后利用 Excelligence 设备通过 RT-CES 方法 (Roche),每 2 分钟测量确定细胞指数以连续测量细胞活性。处理以加入 100uM H_2O_2 开始,其引起不含通式 (I) 化合物的对照

孔中总细胞的 90% 的破坏。

[0191] 实施例 29 : 实施例 1 化合物 (7-((6- 甲基吡啶 -2- 基氨基) (4- 硝基苯基) 甲基) 喹啉 -8- 醇) 对大鼠行为的影响

[0192] 测试动物

[0193] 将来自 Charles River Laboratories (Budapest, Hungary) 的 Wistar 大鼠用作测试动物。使用约 2 个月的大鼠 (体重 200-300g)。饲养动物约 1 周。动物接受标准实验室食物 (Charles River Laboratories, Budapest, Hungary) 并自由饮用自来水。温度和湿度分别保持在 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $60 \pm 10\%$ 。大鼠以每组 5 只放置于 45x35x25cm 的 Makrolon 笼中。使用 12 小时的日 / 夜循环 ; 在 19:00 时切断光。在白昼期间进行试验。根据 1986 年 11 月 24 日的 European Communities Council Directive (86/609/EEC, 根据 Animal Welfare Committee of the Institute of Experimental Medicine 的管理和批准) 进行试验。

[0194] 实施例 29.1 : 通过高架十字迷宫测试确认实施例 1 化合物的抑制焦虑效果

[0195] 高架十字迷宫测试

[0196] 将黑色金属盒用于高架十字迷宫测试。设备的尺寸按照如下所述 : 臂长 : 40cm, 臂宽 : 12cm, 壁高 : 30cm 和台高 : 70cm。开放的臂以 0.5cm 的突出环绕。根据下述出版物进行测试 : Pellow 等, 1985。

[0197] 在白昼阶段的较早几小时, 用载体、实施例 1 化合物 (2mg/kg)、实施例 1 化合物 (8mg/kg) 和氯氮䓬 (8mg/kg) (每组中 $n = 10$) 处理大鼠。在该测试的早期, 氯氮䓬剂量减轻了焦虑。处理 2 小时之后, 将动物置于设备中心, 它们的头直接朝向闭合臂。暴露时间是 5 分钟。进入到闭合臂是运动活力的指示, 而开放臂的使用是焦虑程度的指示。开放臂的使用以两个变量为特征 : 开放臂中花费时间的百分比份额和进入开放臂的百分比频率 (100x 开放臂的进入 / 臂的总进入) (Pellow 等, 1985 ; Hogg, 1996)。

[0198] 结果示于图 4 中。在该图中, “实施例 1” 指的是实施例 1 的化合物, CDP 指的是氯氮䓬。

[0199] 实施例 29.2 : 实施例 1 化合物对抑郁的效果

[0200] 强迫游泳试验

[0201] 如下述出版物 : Porsolt 等, 1978 所述, 强迫大鼠游泳两次。在第一天, 将每只大鼠置于 15cm 宽, 35cm 高的玻璃圆筒中, 其中注入水到 30cm。在该水深度, 大鼠尾没有接触到圆筒底部。水温是 $24 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。在接下来的一天, 用载体、2mg/kg 实施例 1 化合物、8mg/kg 实施例 1 化合物和 30mg/kg 丙咪嗪处理动物。该剂量的丙咪嗪在以前的试验中可靠地减少了漂浮 ; 在该试验中, 其为抑郁样行为的主要特征。休息 2 小时之后, 强迫大鼠再游泳 5 分钟。在距圆筒 2 米处设置摄像机记录动物行为。记录下述行为因素 : 挣扎 (动物通过攀爬壁试图离开圆筒) ; 游泳 (在圆筒中巡回游泳) 和漂浮 (动物仅仅做出必须的移动以保持其头在水面之上)。在该测试中, 漂浮的时间指示似抑郁行为的程度。

[0202] 结果示于图 5 中。在该图中, “图 1” 指的是实施例 1 的化合物。

[0203] 实施例 30 : 本发明化合物对不同肿瘤细胞株的细胞毒性效果

[0204] 在我们的试验中, 使用 HepG2 和 Hep3B (人类肝细胞癌)、SUM149PT (人类乳腺癌)、K562 (人类红细胞白血病)、U87 (人类神经胶质瘤)、CCRF-CEM (人类白血病) 细胞培养物 ;

将这些培养于下述培养基中：

[0205] U87、CCRF-CEM :Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (D-MEM) (高葡萄糖) (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)、青霉素 (50IU/ml) - 链霉素 (50mg/ml)、10%胎牛血清。

[0206] HepG2、Hep3B、SUM149PT 的 1:1 混合物 :Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (D-MEM) (高葡萄糖) (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) 和营养混合物 F-12Ham (Sigma, St. Louis, MO, USA)、青霉素 (50IU/ml) - 链霉素 (50mg/ml)、10%胎牛血清。

[0207] CCRF-CEM :RPMI 1640 培养基 (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)、青霉素 (50IU/ml) - 链霉素 (50mg/ml)、10%胎牛血清。

[0208] 将细胞置于 96-孔微量滴定板中 (10000 细胞/孔), 24 小时之后, 利用不同的底物孵育细胞。孵育后, 以 0.5mg/ml 的最终浓度将 (3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲氧苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑鎓) (Promega, Madison, WI, USA) 加入到细胞中进行 MTS 试验, 接着在 37℃ 孵育 1 小时。用 PBS 洗涤细胞, 将甲臯染料溶解于异丙醇中。用 Powerwave 读数器 (Biotek, Winooski, VT) 在 570nm 测量甲臯染料的转化量; 背景测量 690nm。测量细胞的系列稀释液转化 MTT 的能力并利用 Gen5 软件计算活细胞数, 得到校准曲线。

[0209] 利用不同细胞的试验结果示于表 1 中。在该表中, 提供了每种底物的 EC50 值 (基于 MTS 测试的结果, 使一半细胞死亡的浓度)。

[0210] 可以很好地看出本发明的化合物对不同肿瘤细胞株显示出细胞毒性效应。

[0211] 表 1: 不同喹啉衍生物对不同人类肿瘤细胞株的抑制细胞效应

[0212]

化合物名 (实施例号)	细胞株 (类型)					
	CCRF-CEM (白血病)	Hep3B (肝)	HepG2 (肝)	K562 (白血病)	SUM149PT (乳房)	U87 (神经胶质瘤)
7-((6-甲基吡啶-2-基氨基)(4-硝基苯基)甲基)喹啉-8-醇 (实施例 1)	1.0		0.5	1.0	10.0	2.5
7-[(6-甲基-吡啶-2-基氨基)(4-三氟甲基-苯基)-甲基]-喹啉-8-醇 (实施例 7)	0.3	5.0	0.5	15.0		
4-((8-羟基喹啉-7-基)(4-硝基苯基)甲基氨基)苯甲酸乙酯 (实施例 2)	1.0	5.0	2.5			4.0
7-[吡啶-2-基-(4-三氟甲基-苯基氨基)-甲基]-喹啉-8-醇 (实施例 5)	0.1	2.0	2.0			3.5
7-((4-甲基嘧啶-2-基氨基)(4-(三氟甲基)苯基)甲基)喹啉-8-醇 (实施例 10)			1.0	7.0	5.0	5.0

[0213] (表 1, 续)

[0214]

7-[(2-羟基苯基)-(4-甲基-噻啉-2-基氨基)-甲基]-喹啉-8-醇 (实施例 11)			1.0	5.0		
7-[(4-甲基-吡啶-2-基氨基)-(4-三氟甲基苯基)-甲基]-喹啉-8-醇 (实施例 8)				8.0	10.0	
7-[(6-甲基吡啶-2-基氨基)(3,4-二氟苯基)甲基]-喹啉-8-醇 (实施例 16)			5.0	1.5		2.5
7-[(6-甲基吡啶-2-基氨基)(2-氟-4-(三氟甲基)苯基)甲基]-喹啉-8-醇			1.0	1.5		2.5

[0215] 参考文献:

[0216] Betti, 1900 :Betti, M. Gazz. Chim. Ital. 1900, 30II, 301 ;

[0217] Betti, 1903 :Betti, M. Gazz. Chim. Ital. 1903, 33II, 2 ;

[0218] Britton et al., 2002 :Britton RS, Leicester KL, Bacon BR. Iron toxicity and chelation therapy. Int J Hematol. 2002 Oct ;76(3):219-228 ;

[0219] Duprez et al., 2009 :Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. Microbes Infect. 2009 Nov ;11(13):1050-1062 ;

[0220] Degterev és Yuan, 2008 :Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 May ;9(5):378-390 ;

[0221] Frederickson et al., 2005 :Nature Reviews Neuroscience, Vol. 6, 449-462 ;

[0222] Gero et al., 2007 : Gerő D, Módos K, Nagy N, Szoleczky P, Tóth ZD, Dormán G, Szabó C. Oxidant-induced cardiomyocyte injury :identification of the cytoprotective effect of a dopamine 1 receptor agonist using a cell-based high-throughput assay. Int J Mol Med. 2007 Nov ;20(5):749-761 ;

[0223] Griffin et al., 2005 :Griffin S, Clark JB és Canevari L :J Neurochem 95 :1015-1022, 2005,

- [0224] Hogg,1996 :Hogg S.A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety.Pharmacol Biochem Behav.1996May ;54(1):21-30 ;
- [0225] Idris et al.,2008 :Idriss NK, Blann AD, Lip GY.Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease.J Am Coll Cardiol.2008 Sep 16 ;52(12):971-978.
- [0226] Jagtap és Szabó,2005 :Jagtap P, Szabó C.Poly(ADP-ribose)polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors.Nat Rev Drug Discov.2005May ;4(5):421-440 ;
- [0227] Koh et al.,1996 :Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW.The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia.Science.1996 May 17 ;272(5264):1013-1016 ;
- [0228] Koh et al.,2001 :Science, Vol.272,1013-1016 ;
- [0229] Lewen et al.,2000 :Lewén A,Matz P,Chan PH.Free radical pathways in CNS injury.J Neurotrauma.2000 Oct ;17(10):871-890 ;
- [0230] Lee et al.,2004 :S. R. Lee, E. H. Lo :J.Cereb.Blood Flow Metab.2004Jul ;24(7):720-727 ;
- [0231] Li et al.,2007 :Li C, Hossieny P, Wu BJ, Qawasmeh A, Beck K, Stocker R.Pharmacologic induction of heme oxygenase-1.Antioxid Redox Signal.2007Dec ;9(12):2227-2239 ;
- [0232] Nguyen et al.,2005 :PNAS, Vol.102(33),11840 - 11845 ;
- [0233] Pellow et al.,1985 :Pellow, S., Chopin, P., File, S.E.&Briley, M. (1985) J. Neurosci. Methods, Vol.14,149 - 167 ;
- [0234] Phillips et al.,1954 :J.P.Phillips, R.W.Keown, Q.Fernando ;J.Org.Chem., 1954,19(6),907 ;
- [0235] Phillips et al.,1956 :J.P.Phillips, E.M.Barrall ;J.Org.Chem.1956,21, 692 ;
- [0236] Phillips,1956 :J.P.Phillips, Chem. Rev. 1956,56,286 ;
- [0237] Porsolt et al.,1978 :Porsolt RD, Anton G, Deniel M, Jalfre M(1978) :Eur J Pharmacol, Vol.47,379 - 391 ;
- [0238] Regland et al.,2001 :Regland B,Lehmann W,Abedini I,Blennow K,Jonsson M, Karlsson I, **Sjögren** M,Wallin A,Xilinas M,Gottfries CG.Treatment of Alzheimer's disease with clioquinol.Dement Geriatr Cogn Disord.2001Nov-Dec ;12(6):408-414 ;
- [0239] **Schäfer** et al.,2007 :J Mol Med, Vol.85,405 - 413 ;
- [0240] Szabó et al.2002 :Szabó G, **Bährle** S, Stumpf N, Sonnenberg K, Szabó E E, Pacher P,Csont T,Schulz R,Dengler TJ,Liaudet L,Jagtap PG,Southan GJ,Vahl CF, Hagl S, Szabó C. :Circ. Res. 2002 Jan 11 ;90(1):100-106 ;
- [0241] Szabó,2005 :Szabó C.Mechanisms of cell necrosis.Crit Care Med.2005Dec ;33(12 Suppl):S530-534 ;

[0242] Wang et al., 2009: Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly (ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. Exp Neurol. 2009 Aug; 218(2):193-202.

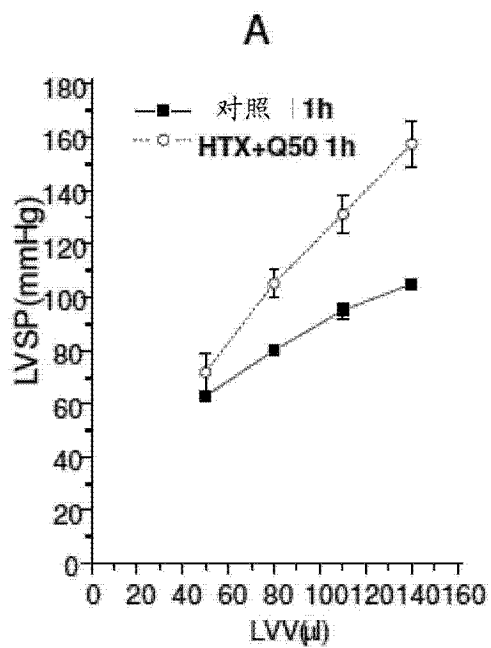


图 1a

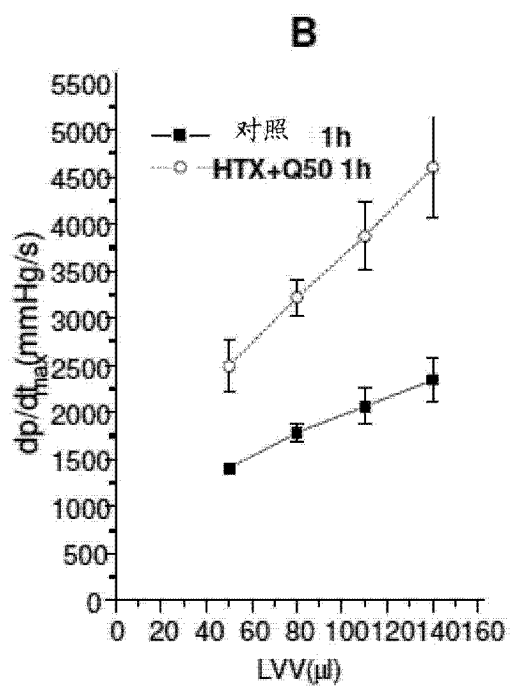


图 1b

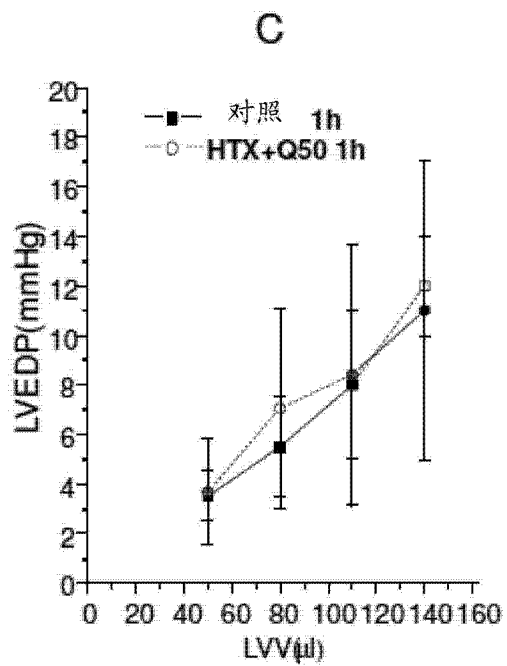


图 1c

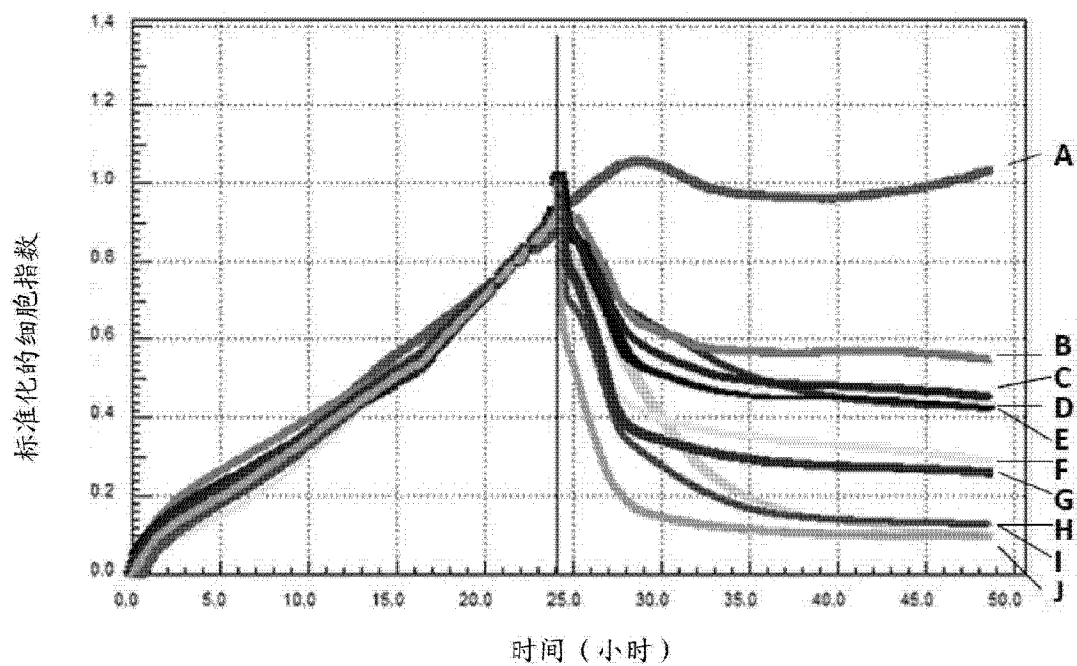


图 2

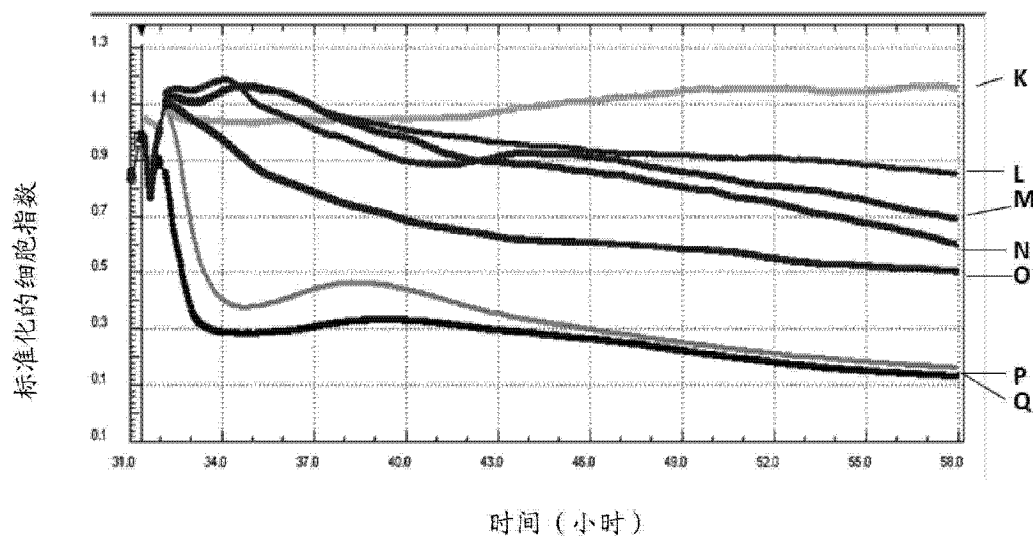


图 3

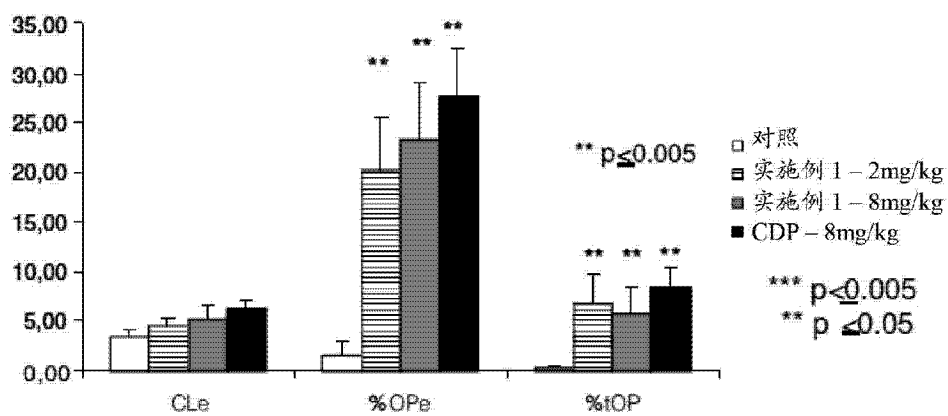


图 4

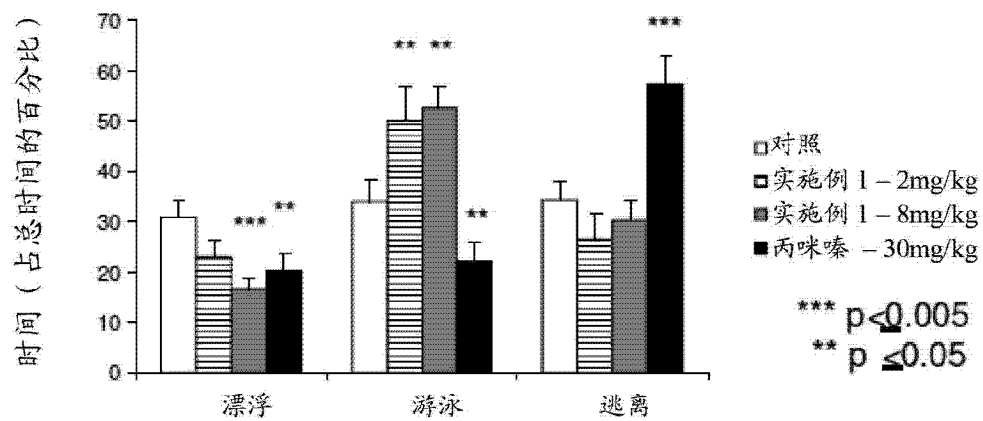


图 5