

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99811038.8

[51] Int. Cl.

C07D 213/80 (2006.01)

C07D 213/82 (2006.01)

C07D 213/87 (2006.01)

C07D 409/14 (2006.01)

C07D 409/06 (2006.01)

A61K 31/4425 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100355731C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/4436 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

[22] 申请日 1999.10.15 [21] 申请号 99811038.8

[30] 优先权

[32] 1999.10.6 [33] IN [31] 828/CAL/99

[86] 国际申请 PCT/IB1999/001683 1999.10.15

[87] 国际公布 WO2001/025208 英 2001.4.12

[85] 进入国家阶段日期 2001.3.16

[73] 专利权人 托伦脱药品有限公司

地址 印度古吉拉特邦

[72] 发明人 A·桑卡兰拉亚安

审查员 姚云

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 余颖

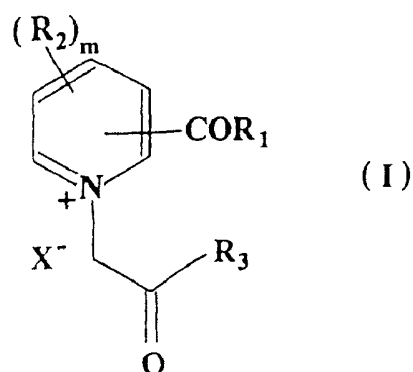
权利要求书 4 页 说明书 18 页

[54] 发明名称

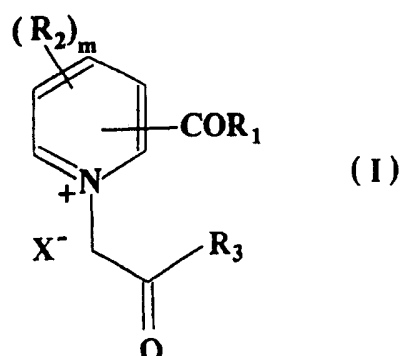
吡啶鎓衍生物及其用途

[57] 摘要

本发明揭示一种具有通式 I 的吡啶鎓系列化合物及其医学上认可的盐，它们可以通过破坏已形成的 AGE 来治疗与糖尿病及衰老相关的血管性并发症，包括：肾病、神经损伤、动脉粥样硬化、视网膜病、皮肤病和牙齿褐变，其中的 R_1 , R_2 , R_3 , X 和 m 如说明书所述。本发明还揭示制备以上化合物的方法和含一种或多种以上化合物作为活性成分的药物组合物。本发明还揭示通过单独给予以上化合物，或将其与抗糖尿病药物联合给予来治疗糖尿病患者的方法。



1. 治疗与糖尿病及衰老相关疾病的血管性并发症的通式 I 所示吡啶鎓系列化合物或其药学上认可的盐,



其中,

R_1 选自: $-R_4-R_5$ 或 $-N(R_7)N(R_7)R_9$;

R_4 选自: $-N(R_7)R_6O-$ 或 $-OR_6O-$, 其中 R_6 为 C_{2-8} 亚烷基;

R_5 是 $-COR_7$;

R_2 选自 F、Cl、Br 或 I, m 等于 0 或 1;

R_3 选自 R_7 或 $O-C_{1-8}$ 烷基;

$R_7 = H$, $-C_{1-8}$ 烷基, 苯基, F、Cl、Br 或 I 取代的苯基或 2-噻吩基;

R_9 选自 H, $-SO_2R_{10}$, 2-吡啶基或 $-COR_{10}$;

R_{10} 选自 $-C_{1-8}$ 烷基, 苯基, 1 位上与苯基羰基甲基、乙氧基羰基甲基、2,4-二氯苯基羰基甲基、2-噻吩基羰基甲基形成吡啶鎓的 3-吡啶基;

X 选自卤素;

条件是:

当 R_1 是 $-NHNH_2$ 时, R_3 不是 $O-C_{1-8}$ 烷基。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中, $-C(O)R_1$ 基团在 3 或 4 位。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的化合物, 其中, $-C(O)R_1$ 基团在 3 位。

4. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中的 m 是 0。

5. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中的 m 是 0。

6. 根据权利要求 3 所述的化合物, 其中的 m 是 0。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物, 它选自:

(a) 二溴化 N,N' -二[3-羰基-1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)吡啶鎓]肼或其药学上认可的盐,

(b) 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-(2-吡啶基)肼基羰基)吡啶鎓或其药学上

认可的盐,

(c) 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-苯甲酰基)乙基氨基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐,

(d) 二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-吡啶鎓]肼或其药学上认可的盐,

(e) 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(肼基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐,

(f) 溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基肼基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐,

(g) 二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-(2,4-二氯苯基)-2-氧乙基)吡啶鎓]肼或其药学上认可的盐,

(h) 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基肼基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐,

(i) 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基肼基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐,

(k) 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-2-氯-3-(苯基磺酰基肼基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐,

(l) 溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-4-(2-(苯甲酰基)乙基氨基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐,

(m) 溴化 1-(2-(2,4-二氯苯基)-2-氧乙基)-3-(2-苯甲酰基)乙基氨基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐,

(o) 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-苯甲酰基)乙氧基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐。

8. 一种制备权利要求 1 所述吡啶鎓化合物的方法, 包括: 根据所需的目标产物制备适当取代的吡啶衍生物, 在醇溶剂和/或高沸点溶剂中回流 6-48 小时, 以相应的试剂将该取代吡啶衍生物季铵化成所需的产物; 所述醇溶剂选自: 甲醇, 乙醇, 或丙醇; 所述高沸点溶剂选自甲苯或二甲苯。

9. 一种用于治疗糖尿病并发症和与衰老相关的疾病的药物组合物, 含有药理学有效量的一种或多种权利要求 1 所述通式 I 化合物或其药学上认可的盐, 与药学上认可的载体、稀释剂、溶剂或赋形剂形成混合物。

10. 根据权利要求 9 所述的药物组合物, 其形式是口服制剂。

11. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 所述药学上认可的载体选自淀粉, 乳糖, 聚乙烯吡咯烷酮 K-30, 滑石粉和硬脂酸镁其中一种或多种。

12. 根据权利要求 9 所述的药物组合物，其形式是肠胃外给药制剂。

13. 一种制备权利要求 12 所述肠胃外给药制剂的方法，包括将权利要求 1 所述通式 I 所示的活性成分溶于聚乙二醇 400，然后用等渗盐水稀释到要求的浓度。

14. 根据权利要求 9 所述的药物组合物，其形式是擦剂、漱口液或牙膏。

15. 权利要求 1 所述化合物用于制备通过破坏糖尿病性或衰老相关性并发症中 AGE 来抑制 AGE 累积并降低 AGE 浓度的药物的用途，所述药物可与药学上认可的载体、稀释剂或赋形剂一起使用。

16. 根据权利要求 15 所述的用途，其中所述药物可用于治疗肾病，神经损伤，动脉粥样硬化，视网膜病，皮肤病，非酶所致口腔褐变。

17. 根据权利要求 15 所述的用途，所述化合物选自：

(a) 二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)吡啶鎓]胍或其药学上认可的盐，

(b) 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-(2-吡啶基)胍基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐，

(c) 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-苯甲酸基)乙基氨基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐，

(d) 二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-吡啶鎓]胍或其药学上认可的盐，

(e) 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(胍基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐，

(f) 溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基胍基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐，

(g) 二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-(2,4-二氯苯基)-2-氧乙基)吡啶鎓]胍或其药学上认可的盐，

(h) 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基胍基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐，

(i) 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基胍基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐，

(k) 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-2-氯-3-(苯基磺酰基胍基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐，

(l) 溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-4-(2-(苯甲酸基)乙基氨基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐，

(m) 溴化 1-(2-(2,4-二氯苯基)-2-氧乙基)-3-(2-苯甲酸基)乙基氨基羰基)吡啶

鎓或其药学上认可的盐，

(o) 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-苯甲酰基)乙氧基羰基)吡啶鎓或其药学上认可的盐。

吡啶鎓衍生物及其用途

发明领域

本发明涉及一类新的吡啶鎓系列化合物以及它们在治疗糖尿病及相关疾病中的用途。更具体地说，本发明涉及这一系列的化合物，其制备方法，含此类化合物的药物组合物和它们在治疗糖尿病并发症中的用途。这些化合物表现出破坏 AGE 的活性，这对于治疗与糖尿病和衰老相关的并发症十分重要，这些疾病包括肾病、神经损伤、动脉粥样硬化、视网膜病和皮肤病。本发明还涉及一种逆转牙齿因非酶作用口腔褐变引起的发黄，该方法包括给予有效量的药物来逆转已形成的晚期糖基化交联键。

发明背景

1912 年，Maillard 发现例如葡萄糖和核糖等还原糖与蛋白质反应会形成棕色色素。进一步研究显示，这是一个不可逆的非酶反应，会在多种自然系统中发生，包括储存的食品中。Maillard 反应分为早期和晚期两阶段。起先，蛋白质与葡萄糖反应形成稳定的 Amadori 产物，该产物接着交联形成晚期糖基化终产物(AGE)。大多数情况下，AGE 的形成还伴随着蛋白质褐变和荧光度提高。

糖尿病患者的血糖水平显著高于正常人，葡萄糖与血红蛋白、晶状体蛋白和胶原等多种蛋白质的反应形成了 AGE，AGE 继而引起糖尿病并发症，诸如肾病、毛细血管病、内皮机能不良和其他器官机能不良。此外，基础成纤维细胞生长因子等多种生长因子的活性也受到损害。不象组织内的正常蛋白，AGE 产物的周转速度和补充速度很慢。据报道，实际上，AGE 可能引发一种有 RAGE(晚期糖基化终产物受体)参与的复杂的免疫反应，以及激活一些尚不完全清楚的免疫过程。据报道，有毛细血管病和大血管病症状的糖尿病还表现有氧化性应激，其机制尚不清楚。

在试验室内将葡萄糖或核糖等还原糖与牛血清白蛋白共培养，可研究 AGE 的体外形成。可以根据荧光度提高或与抗 AGE 抗体交叉反应性提高来检测 AGE 的形成。荧光度提高似乎先于 AGE 特异性抗原表位形成。这一荧光度提高被用于检测体外 AGE 形成(Brownlee, M.等, 科学 1986, 232: 1629-1632)。除此之外，

体外 AGE 形成的重要特征之一是 AGE 特异性而非天然蛋白特异性的抗原表位的形成。所以，可以激发产生抗某蛋白质晚期糖基化终产物的抗体，然后用它们检测其他蛋白质中 AGE 的形成。这已经成为 AGE 研究中的重要分析工具。

因为 AGE 形成重要的临床意义，目前有多种方法用于诊断、预防或逆转体内 AGE 的形成。通过与靶蛋白质与葡萄糖之间初期反应产生的早期糖基化产物反应可抑制 AGE 的形成。这一抑制作用被认为是因为抑制剂与早期糖基化产物之间的反应可能中断了该糖基化蛋白质接着与其他蛋白质形成晚期交联产物的反应。氨基胍之类化合物可以通过这一机制抑制 AGE 的形成。

长寿蛋白质上 AGE 的产生也与这些蛋白质的交联有关。已知，AGE 衍生蛋白交联键可被溴化 N-苯甲酰甲基噻唑鎓(PTB)切断，此类化合物与 AGE 衍生蛋白交联键反应并将其切断(Vasan 等，自然，1996，382：275-278；1998 年 12 月 29 日的 US5,853,703)。氨基胍因其作用机制的特性作用缓慢，该机制减少组织内的 AGE 则相对迅速。本发明涉及吡啶鎓类化合物，它们和 PTB 一样破坏已形成的 AGE，但在某些情况下比 PTB 更有效。

发明概述

本发明的主要目的是提供一类新的吡啶鎓系列化合物，它们可用于治疗与糖尿病和衰老相关的血管性并发症，特别是糖尿病并发症和其他衰老相关疾病，包括肾病、神经损伤、动脉粥样硬化、视网膜病和皮肤病。本发明还涉及一种逆转非酶作用口腔褐化引起的牙黄，该方法包括有效量的给药来逆转已形成的晚期糖基化交联键等。

本发明的目的还在于提供表现出 AGE 破坏活性的吡啶鎓系列化合物。

本发明的目的还在于提供一种制备表现出 AGE 破坏活性的吡啶鎓系列化合物的方法。

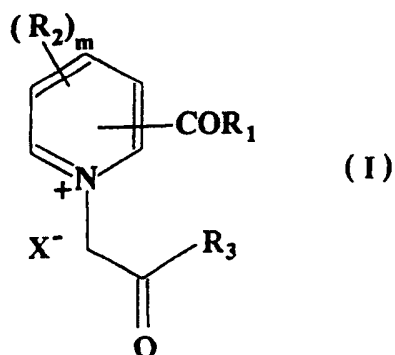
本发明的目的还在于提供一种含本发明吡啶鎓系列化合物及其药学上认可的盐和合适的载体、溶剂、赋形剂、稀释剂等药物组合物常用介质形成的混合物的药物组合物。

本发明的目的还在于提供一种治疗糖尿病患者的方法，包括将要求剂量的本发明化合物或其药学上认可的盐单独或与抗糖尿病药物一起与药学上认可的稀释剂、溶剂、赋形剂、载体或其他适用介质混合给予患者。

本发明的目的还在于提供一种制备肠胃外给药制剂的方法，包括将本发明通式 I 所示的活性成分溶于聚乙二醇 400，然后用等渗盐水稀释到要求的浓度。

详细描述

本发明提供一种通式 I 所示的 AGE 破坏剂，

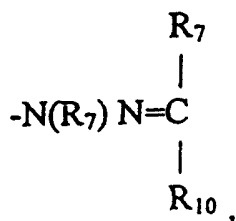


其中，

R_1 是 $-R_4-R_5$ 或 $-N(R_7)N(R_7)R_9$;

R_4 选自: $-N(R_7)R_6O$, $-N(R_7)R_6N(R_7)-$, OR_6O , $-OR_6N(R_7)-$, 其中 R_6 为烃基;

R_5 选自: 烃基, 包括杂芳基的芳基, $-COR_7$, SO_2R_7 , $-C(S)NHR_7$, $-C(NH)NHR_7$, $-COR_{10}$, $-C(O)NHR_7$ 和



其中的 R_7 选自 H, 烃基或包括杂芳基的芳基;

R_2 选自 F, Cl, Br, I, OR_7 , NO_2 , 烃基, 包括杂芳基的芳基, 甲酰基, 酰基, $C(O)NR_7R_{10}$, $C(O)OR_7$, NR_7R_{10} , $N=C(R_7)(R_{10})$, SR_7 , SO_2NH_2 , SO_2 烃基和 SO_2 芳基, m 等于 0、1 或 2,

R_3 选自 R_7 , O-烷基, O-芳基, $N(R_7)(R_{10})$, $N=C(R_7)(R_{10})$, $N(R_7)N(R_7)(R_{10})$, $N(R_7)N=C(R_7)(R_{10})$ 和 $CH(R_7)C(O)R_8$,

其中的 R_8 选自 R_7 , OR_7 , 和 $N(R_7)(R_{10})$;

R_9 选自 H, 烃基, 包括杂芳基的芳基, $C(O)R_{10}$, $-SO_2R_{10}$, $-C(S)NHR_{10}$, $-C(NH)NH(R_{10})$, $-C(O)NHR_{10}$,

R_{10} 选自 H, 烃基, 包括杂芳基的芳基, 可以与 R_7 不同;

X 选自卤离子, 乙酸根离子, 高氯酸根离子, 磺酸根离子, 草酸根离子, 柠檬酸根离子, 甲苯磺酸根离子, 马来酸根离子, 甲磺酸根离子, 碳酸根离子, 亚硫酸根离子, 磷酸氢根离子, 膦酸根(phosphonate)离子, 磷酸根(phosphate)离子, BF_4^- , PF_6^- , 条件是:

- (i)当同一碳原子或氮原子上连有两个烃基时，它们可以连接成环结构，
- (ii)如果杂芳环 R_{10} 含有氮原子，它可以与 $X-CH_2C(O)-R_3$ 类化合物形成季氮，
- (iii)当 R_3 是 OR_7 且 R_1 是 $-NHNH_2$ 时， R_7 不是烷基。

本文中，“烃基”指以碳碳键连接的，含 1-8 个碳原子的取代或非取代的烃基。烃基可以是直链、支链或环状的，饱和或不饱和的。取代基选自 F, Cl, Br, I 和芳基。取代基以最多不超过 3 个为宜。

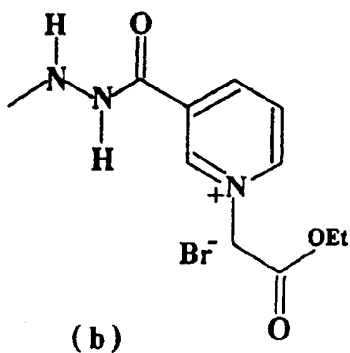
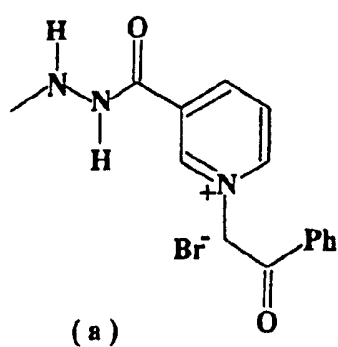
“芳基”在此指取代或非取代的，至少有一个具有共轭 π 电子系统的环，含有至多两个共轭或稠环系统的芳香基。芳基包括碳环，杂环和联芳基，它们都可以被取代。取代基选自 F, Cl, Br, I 和直链或支链 C_{1-6} 烃基。

表 1A 列举的是物通式 I 中 m 为 0， $-COR_1$ 在 3 位的本发明新化合，表 1B 列举的是物通式 I 中 m 为 0， $-COR_1$ 在 4 位的本发明新化合。以下列出的化合物只是上述本发明通式 I 化合物的代表性例子，它们不限定本发明的范围。

- 二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-吡啶鎓]肼(化合物 1)，
- 二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-乙氧基-2-氧乙基)吡啶鎓]肼(化合物 2)，
- 二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-(2,4-二氯苯基)-2-氧乙基)吡啶鎓]肼(化合物 3)，
- 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-(2-吡啶基)肼基羰基)吡啶鎓(化合物 4)
- 溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基肼基羰基)吡啶鎓(化合物 5)
- 二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)吡啶鎓]肼(化合物 6)，
- 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-苯甲酰基)乙基氨基羰基)吡啶鎓(化合物 7)
- 溴化 1-(2-(2,4-二氯苯基)-2-氧乙基)-3-(2-(苯甲酰基)乙基氨基羰基)吡啶鎓(化合物 8)
- 溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-3-(2-(2-吡啶基)肼基羰基)吡啶鎓(化合物 9)
- 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(2-(2-吡啶基)肼基羰基)吡啶鎓(化合物 10)
- 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(肼基羰基)吡啶鎓(化合物 11)
- 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基肼基羰基)吡啶鎓(化合物 12)
- 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基肼基羰基)吡啶鎓(化合物 13)
- 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(苯基磺酰基肼基羰基)吡啶鎓(化合物 14)
- 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-2-氯-3-(苯基磺酰基肼基羰基)吡啶鎓(化合物 15)
- 溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(2-(甲氧基)羰基)乙氧基羰基)吡啶鎓(化合物 16)
- 溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-(苯甲酰基)乙氧基羰基)吡啶鎓(化合物 17)
- 溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-4-(2-(苯甲酰基)乙基氨基羰基)吡啶鎓(化合物 18)

表 1A—代表性吡啶鎓衍生物
(m 为 0, -COR₁ 在 3 位)

化合物	-R ₁	-R ₂	-R ₃	X
1	结构(a)	-	苯基	Br
2	结构(b)	-	OEt	Br
3	结构(c)	-	2,4-二氯苯基	Br
4	NHNH-(2-吡啶基)	-	OEt	Br
5	NHNHSO ₂ CH ₃	-	2-噻吩基	Br
6	结构(d)	-	2-噻吩基	Br
7	NHCH ₂ CH ₂ OCOPh	-	OEt	Br
8	NHCH ₂ CH ₂ OCOPh	-	2,4-二氯苯基	Br
9	NHNH-(2-吡啶基)	-	2-噻吩基	Br
10	NHNH-(2-吡啶基)	-	苯基	Br
11	NHNH ₂	-	苯基	Br
12	NHNHSO ₂ CH ₃	-	苯基	Br
13	NHNHSO ₂ CH ₃	-	OEt	Br
14	NHNH-SO ₂ 苯基	-	苯基	Br
15	NHNH-SO ₂ 苯基	2-Cl	苯基	Br
16	OCH ₂ CH ₂ OCOCH ₃	-	苯基	Br
17	OCH ₂ CH ₂ OCOPh	-	OEt	Br



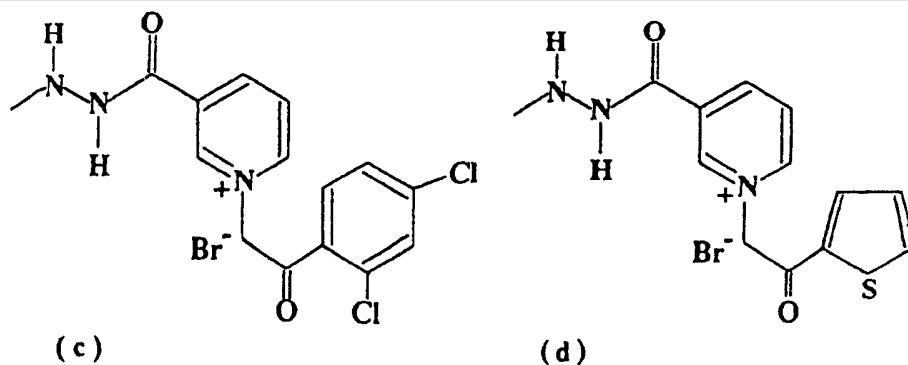


表 1B—代表性吡啶鎓衍生物

(m 为 0, -COR₁ 在 4 位)

化合物	-R ₁	-R ₂	-R ₃	X
18	NHCH ₂ CH ₂ OCOPh	-	2-噻吩基	Br

根据本发明实施例, 本发明化合物可用于治疗已形成 AGE 水平过高所致包括肾病、神经损伤、动脉粥样硬化、视网膜病、皮肤病和牙齿发黄等糖尿病并发症及衰老相关性并发症。可用本发明化合物破坏 AGE 产物, 从而降低过高的已形成 AGE 的水平。

本发明还提供一种制备这些吡啶鎓化合物的方法。

所述制备化合物 1 的方法包括, 将苯甲酰甲基溴的异丙醇溶液加入 N,N'-二-(烟酰基)肼的甲醇溶液中, 回流 6 小时, 冷却, 滤出沉淀, 用热乙酸乙酯洗涤固体, 最后用 20ml 甲醇:乙酸乙酯(3:1)纯化固体, 得到所需化合物。

类似的, 可用相应的取代吡啶衍生物, 在甲醇、乙醇、丙醇等醇溶剂和甲苯或二甲苯等高沸点溶剂中回流 6-48 小时, 以相应的试剂进行季铵化, 从而得到所需化合物。

在实验室中, 将还原糖核糖与牛血清白蛋白共培养引起的体外 AGE 形成, 使溶液褐变, 荧光度升高。用荧光度为指标来检测 AGE 形成的增加。

实施例 1

以下筛选方法证实 AGE 破坏剂活性:

材料:

牛血清白蛋白(组分 V)(BSA)

核糖, 分析级

磷酸盐缓冲液(PBS)

设备:

微滴板 ELISA 读数仪-Spectramax Plus(Molecular Devices, USA)

微滴板洗涤仪(Bio-Tec Instruments, USA)

pH 计

方法:

将 160mg/ml 蛋白质即牛血清白蛋白(BSA)和 1.6M 葡萄糖溶解在磷酸盐缓冲液(PBS)中。加入 0.02%叠氮钠作为防腐剂。用 0.02 μ m 的滤膜对溶液进行除菌过滤, 在 37℃老化 16 周。16 周后, 用 PBS 透析该溶液, 分成等份, -20℃保存。

为了测定 AGE 破坏活性, 10 μ g/ml 和 100 μ g/ml 16 周的 AGE-BSA 与不同浓度的试验化合物 37℃共培养 24 小时, 用 ELISA 测定其 AGE 破坏活性。

如下进行 ELISA:

1. 将不同浓度的 16 周 AGE-BSA 涂在微滴板上作为标准。每一浓度涂三份。
2. 将 5-20ng 的试验样品涂在微滴板的各孔内, 一式三份。
3. 微滴板 37℃培养 1 小时。
4. 培养后, 用 PBST(PBS 含 0.05% Tween20)洗涤微滴板。
5. 以 5%脱脂乳 PBS 溶液在 37℃封闭 1 小时。
6. 用 PBST 洗涤微滴板。
7. 加入抗 AGE-BSA 的第一抗体, 微滴板在 37℃培养 1 小时。
8. 用 PBST 洗涤微滴板。
9. 加入第二抗体抗兔 HRPO(辣根过氧化物酶)偶联物, 37℃培养 1 小时。
10. 用 PBST 洗涤微滴板。
11. 加入 OPD(二盐酸邻苯二胺)和过氧化氢显色。
12. 37℃培养 15 分钟后, 用微滴板 ELISA 读数仪读取 OD(光密度)(450nm-620nm)。

用以下公式计算化合物的破坏剂活性:

$$\%破坏剂活性 = \frac{OD_{450-620} \text{ 对照} - OD_{450-620} \text{ 试验}}{OD_{450-620} \text{ 对照}} \times 100$$

$OD_{450-620} \text{ 对照}$ = 20ng AGE-BSA 不与试验化合物一起而是单独在 37℃培养 24 小时后的吸光度

$OD_{450-620} \text{ 试验}$ = 20ng AGE-BSA 与所需浓度试验化合物一起在 37℃培养 24 小时后的吸光度

表 2 记录了用特定实施例算得的%AGE 破坏活性。

表 2

样品	浓度	%破坏性
PTB	10mM	27
	20mM	47
化合物 1	5mM	13
化合物 4	10mM	30
化合物 6	5mM	53
化合物 7	20mM	36
化合物 16	10mM	16
化合物 17	10mM	19

可见，化合物 6 具有显著的 AGE 破坏活性，即其效率比 PTB 高得多。

以下实施例提供制备表 1 中本发明新化合物的方法。以下化合物只是举例，不限定本发明的范围。

实施例 2

制备二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-吡啶鎓]胍(化合物 1):

向沸腾的 N,N'-二-(烟酰基)胍(1.21g, 0.005mol)甲醇(20ml)溶液中加入苯甲酰甲基溴(1.99g, 0.01mol)的异丙醇(10ml)溶液，反应混合物回流 6 小时。真空浓缩反应混合物至 10ml 左右，并过滤。所得残留物用热乙酸乙酯洗涤，然后将分离出的固体粉碎。用甲醇:乙酸乙酯(3:1, 20ml)混合物重结晶，得浅黄色固体。

得率：60%

m.p. : 260 - 262°C (分解)

IR(KBr, cm^{-1}): 1696 和 1680

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400MHz) δ : 11.65(2H,s), 9.56(2H,s), 9.21-9.16(4H,m), 8.49-8.45 (2H,m), 8.08-8.05 (4H,d), 7.81-7.77(2H,m), 7.68-7.64 (4H,m), 6.58 (4H,s)

质谱 (m/z): 479, 480

按照上述方法，用相应的吡啶衍生物与适合的试剂反应，通过在甲醇、乙醇、丙醇、甲苯或二甲苯中回流 6-48 小时，合成以下所需化合物：

实施例 3**二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-乙氧基-2-氧乙基)吡啶鎓]胍(化合物 2):**

得率: 47%

m.p.: 180 - 182°C (分解)

IR(KBr, cm^{-1}): 1744, 1664

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400MHz) δ : 11.65 (2H,s), 9.62 (2H,s), 9.28-9.26 (2H,d), 9.17-9.15 (2H,d), 8.47-8.44 (2H,m), 5.77 (4H,s), 4.26 (4H,q), 1.27 (6H,t)

质谱 (m/z): 415, 416

实施例 4**二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-(2,4-二氯苯基)-2-氧乙基)吡啶鎓]胍(化合物 3):**

得率: 24%

m.p.: 225 - 227°C (分解)

IR(KBr, cm^{-1}): 1702, 1666

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 11.69 (2H,s), 9.58 (2H,bs), 9.20-9.18 (4H,m), 8.49-8.47 (2H,m), 8.17-8.15 (2H,d), 7.92 (2H,bs), 7.78-7.76 (2H,d), 6.50 (4H,s)

质谱 (m/z): 615, 617, 618, 620.

实施例 5

溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-(2-吡啶基)胍基羰基)吡啶鎓(化合物 4):

得率: 16%

m.p.: 210-212°C

IR (KBr, cm^{-1}): 3140, 3005, 1732 和 1690

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400MHz) δ : 9.63 (1H,s), 9.27 (2H,d), 8.49-8.45 (1H,m), 8.13-8.07 (2H,m), 7.32-7.30 (1H,m), 7.12-7.11(1H,m), 5.77 (2H,s), 4.23 (2H,q), 1.25 (3H,t)

质谱 (m/z): 301, 302

实施例 6

溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基胍基羰基)吡啶鎓(化合物 5):

得率: 30 %

m.p.: 199 – 200 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 1714, 1673

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 11.38 (1H,s), 9.97 (1H,s) 9.51 (1H,s), 9.16 (1H,d), 9.06 – 9.04 (1H,m), 8.43 – 8.39 (1H,m), 8.25 – 8.21 (2H,m), 7.43 – 7.41 (1H,t), 6.45 (2H,s), 3.08 (3H,s).

质谱 (m/z): 340, 341, 342

实施例 7**二溴化 N,N'-二[3-羰基-1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)吡啶鎓]胼(化合物 6):**

得率: 33%

m.p.: 259 - 261°C (分解)

IR (KBr, cm^{-1}): 3330, 1702, 1674, 1655 和 1626

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 11.59 (2H,s), 9.50 (2H,s), 9.15-9.08 (4H,m),
8.40-8.36 (2H,m), 8.17-8.14 (4H,m), 7.33(2H,t), 6.42 (4H,s)

质谱 (m/z): 491, 492.

实施例 8**溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-苯甲酸基)乙基氨基羰基)吡啶鎓(化合物 7):**

得率: 85%

m.p.: 132-134°C

IR (KBr, cm^{-1}): 3210, 3067, 1726, 1687, 1656

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 9.46 (1H,s), 9.37 (1H,t), 9.11(1H,t), 8.97
(1H,d), 8.33-8.29 (1H,m) 7.95-7.93 (2H,m), 7.63-7.59 (1H,m), 7.49-7.45 (2H,m),
5.65 (2H,s), 4.39 (2H,t), 4.19 (2H,q), 3.70-3.69 (2H,m), 1.20 (3H,t)

质谱 (m/z): 357, 358, 359

实施例 9

溴化 1-(2-(2,4-二氯苯基)-2-氧乙基)-3-(2-(苯甲酰基)乙基氨基羰基)吡啶鎓(化合物 8):

得率: 75%

m.p.: 102-104°C

IR(KBr, cm^{-1}): 1703, 1685, 1675

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 9.41-9.37 (2H,m), 9.03-8.98 (2H,m), 8.34-8.30 (1H,m), 8.04 (1H,d), 7.91-7.89 (2H,m), 7.82 (1H,d), 7.68-7.65 (1H,m), 7.58-7.55 (1H,m), 7.43 (2H,t), 6.35 (2H,s), 4.36 (2H,t), 3.68-3.64 (2H,m)

质谱 (m/z): 457, 458, 459, 460, 461, 462

实施例 10

溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-3-(2-(2-吡啶基)胍基羰基)吡啶鎓(化合物 9):

得率: 10%

m.p.: 212-214°C (分解)

IR(KBr, cm^{-1}): 1685, 1649

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 11.21 (1H,bs), 9.59 (1H,s), 9.19 (2H,d), 8.44 (1H,t), 8.27-8.24 (2H,m), 8.08 (1H,bs), 7.62 (1H,bs), 7.44 (1H,t), 6.85-6.79 (2H,m), 6.50 (2H,s)

质谱 (m/z): 339, 340, 341

实施例 11**溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(2-(2 吡啶基)胍基羰基)吡啶鎓(化合物 10):**

得率: 4%

m.p.: 190°C (分解)

IR(KBr, cm^{-1}): 1683, 1670, 1648

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 11.14 (1H,bs), 9.53 (1H,s), 9.18-9.13 (2H,m), 8.45-8.42 (1H,t), 8.08-8.06 (3H,m), 7.80 (1H,t), 7.67 (2H,t), 7.62-7.55 (1H,m), 6.83-6.76 (2H,m), 6.54 (2H,s)

质谱 (m/z): 333, 334, 335

实施例 12**溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(胍基羰基)吡啶鎓(化合物 11):**

得率: 15%

m.p.: 215 – 216 °C

IR(KBr, cm^{-1}): 1695, 1680

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 10.25 (1H,s) 9.65 (1H,s), 9.35 – 9.32 (2H,m), 8.90 – 8.88 (1H,m) 8.50 – 8.46 (2H,d), 8.21 – 8.17 (1H,m), 8.05 – 8.07 (2H,m), 6.50 (2H,s), 4.45 (2H,s).

质谱 (m/z): 256, 257.

实施例 13**溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基胍基羰基)吡啶鎓(化合物 12):**

得率: 35%

m.p.: 227 – 228 °C

IR(KBr, cm^{-1}): 1710, 1702

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 11.30, (1H,s), 9.88 (1H,s), 9.41 (1H,s), 9.06 – 9.05 (1H,d) 8.98 – 8.96 (1H,d), 8.34 – 8.31 (1H,m), 7.97 (2H,d), 7.72 – 7.69 (1H,t), 7.59 – 7.56 (2H,t), 6.44 (2H,s), 2.99 (3H,s)

质谱 (m/z): 334, 335

实施例 14**溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(甲磺酰基胍基羰基)吡啶鎓(化合物 13):**

得率: 38%

m.p: 75- 76 °C

IR(KBr, cm^{-1}): 1739, 1697

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 11.39 (1H,s), 9.96 (1H,s), 9.56 (1H,s), 9.23 (1H,d), 9.06 (1H,d), 8.40 (1H,t), 5.75 (2H,s), 4.27 – 4.22 (2H,q), 3.08 (3H,s), 1.26 (3H,t)

质谱 (m/z): 301, 302, 303

实施例 15

溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(苯基磺酰基胍基羰基)吡啶鎓(化合物 14):

得率: 28%

实施例 16

溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-2-氯-3-(苯基磺酰基胍基羰基)吡啶鎓(化合物 15):

得率 : 23%

m.p. : 247 - 250°C (分解)

IR(KBr, cm⁻¹): 1685 , 1679,

¹HNMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 11.12 (1H,s), 9.49 (1H,s), 9.07 – 9.03(1H,m),

8.44 (1H, t), 8.07 (2H,d), 7.80 (1H,t), 7.67 (2H,t), 7.18 (2H,t), 6.87 (2H,d), 6.77

(1H,t), 6.50 (2H,s).

实施例 17

溴化 1-(2-苯基-2-氧乙基)-3-(2-乙酰基)乙氧基羰基吡啶鎓(化合物 16):

得率: 40%

实施例 18

溴化 1-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3-(2-(苯甲酰基)乙氧基羰基)吡啶鎓(化合物 17):

得率: 35%

m.p.: 142-143 °C

¹HNMR (DMSO-d₆, 400MHz)δ: 9.60(1H,s), 9.20-9.18(1H,d), 9.04-9.02(1H,d), 8.33-8.29(1H,m), 7.90-7.88(2H,d), 7.58-7.57(1H,m), 7.46-7.42(2H,m), 5.67(2H,s), 4.71-4.68(2H,m), 4.58-4.56(2H,m), 4.15(2H,q), 1.16(3H,t)

质谱: 358, 359, 360

实施例 19**溴化 1-(2-噻吩-2'-基-2-氧乙基)-4-(2-(苯甲酰基)乙基氨基羰基)吡啶鎓(化合物 18)**

m.p. : 210 – 211°C

IR(KBr, cm^{-1}) : 1723, 1680, 1668

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 9.52 (1H,t), 9.14 (2H,d), 8.50 (2H,d), 8.25 – 8.21 (2H,m), 8.01 – 7.99 (2H,d), 7.67 (1H,t), 7.55 – 7.51 (2H,m), 7.42 – 7.40 (1H,m), 6.42 (1H,s), 4.47 – 4.45 (2H,t), 3.77 – 3.73 (2H, m).

质谱 (m/z) : 395, 396

药物组合物

可用药理学有效量的一种或多种通式 I 化合物制备药物组合物。以下药物制剂只是举例，不限定它们的使用形式。

口服制剂

口服制剂可以丸剂、粉剂、囊剂或片剂或胶囊剂之类定量单位等固体剂型给予。其他口服药物制剂有单相和双相液体剂型，或者是即用型的，或者是适合重溶后使用的，例如混合物、糖浆、悬浮剂或乳剂。这些制剂还含有稀释剂、分散剂、缓冲液、稳定剂、助溶剂、表面活性剂、防腐剂、螯合剂等药物添加剂。可以使用水性或非水性的一种或多种运载体，而且，其中可以根据需要包含合适的甜味剂、香精之类物质。如果是悬浮剂或乳剂，可以加入合适的增稠剂或悬浮剂或乳化剂。或者，可以给予胶囊剂或小囊剂形式的纯化合物，即不与其他添加剂混合。还可以用运载体来给予。在用基质或扩散控制系统给药时，药物制剂可缓慢地、延期或有控地释放出活性成分。

当本发明化合物或其盐或合适的配合物是片剂之类定量剂型时，其中可含有本领域常用的药学惰性赋形剂。也可使用淀粉、乳糖、磷酸氢钙、滑石粉、硬脂酸镁、聚合物(例如甲基纤维素)、脂肪酸及其衍生物、乙醇酸淀粉钠等稀释剂。

实施例 20**口服剂型的制备：**

一种典型的片剂具有以下组成：

通式 I 活性成分

乳糖	135mg
淀粉	76mg
聚乙烯吡咯烷酮(K-30)	2mg
滑石粉	1.5mg
硬脂酸镁	1.0mg

肠胃外制剂

用于肠胃外给药，可将本发明化合物或其盐或合适的配合物包含在无菌运载体中，所述运载体可以是一种或多种水性或非水系运载体。运载体的例子是水、油酸乙酯、油和多元醇的衍生物，乙二醇及其衍生物。其中可以含有注射剂中常用的添加剂，例如稳定剂、助溶剂、pH 调节剂、缓冲液、抗氧化剂、共溶剂、络合剂、渗透压调节剂等。

合适的添加剂例如酒石酸、柠檬酸之类缓冲液，醇，氯化钠，葡萄糖和高分子聚合物。另一选择是无菌粉剂的重溶。化合物的给予可以是每日一次以上的注射，或静脉输液/点滴，或使用其他合适的贮存制剂。

实施例 21**适合肠胃外给药的制剂具有以下组成：**

通式 I 活性成分

聚乙二醇 400	0.75ml
偏亚硫酸氢钠	0.01%
等渗盐水/WFI	余量

其他制剂

适合用于皮肤和牙齿的制剂是含适量通式 I 化合物的擦剂、漱口液和牙膏。

提供以上实施例只是为了说明本发明，绝对不是限定本发明的范围。