

一种异噻啉类衍生物及其合成方法和应用

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种异噻啉类衍生物及其合成方法和应用。

背景技术

脑组织糖代谢降低是多种神经退行性疾病发生的重要致病因素。

人体 20-25%葡萄糖 (glucose) 是由脑组织消耗的，但脑组织的重量只占体重的 2%左右，说明脑组织对能量需求巨大，是葡萄糖代谢(glucose metabolism, 简称糖代谢)非常活跃的器官。然而，在老年脑组织中，葡萄糖代谢功能显著降低。大量研究表明，脑组织糖代谢降低早于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 患者出现临床症状 10-15 年。脑组织葡萄糖代谢降低是多种神经退行性疾病的共有的病理特征。为什么葡萄糖代谢对脑组织非常重要？首先，糖代谢是细胞产生能量(ATP)的主要通路，神经元作为身体中最活跃的细胞类型，需要大量 ATP 维持各种生理活动，如蛋白合成、蛋白或细胞器的长距离运输、产生动作电位、神经递质释放、胞饮、胞吐等。其次，ATP 具有防止蛋白非特异性聚集的作用，称为“水溶助长剂”(hydrotrope)。在老年人群中，糖代谢降低将导致神经元 ATP 浓度显著下降，可低至 1-2 mM；而正常人群的 ATP 水平处在 8-10 mM；低浓度的 ATP 导致多种蛋白质发生病理性聚集，而高浓度的 ATP 可防止蛋白质非特异性聚集。因此，糖代谢降低是脑衰老的重要原因。提高糖代谢水平有望改善脑健康，预防、缓解、甚至逆转脑衰老。然而世界上尚未出现获得国际认可的、可提高糖代谢的临床药物。研究发现，白藜芦醇(Resveratrol)、二甲双胍(Metformin)、雷帕霉素(Rapamycin)、维生素 B3 (Vitamin B3)、辅酶 Q10 (Coenzyme Q10)、肌酸 (creatine)、胰岛素 (Insulin)等只产生无效或少数人群中的临床效果。目前医学上广泛认可的脑和肌肉保护方式是运动和节食。运动、节食产生有益效果的原理主要是改善线粒体功能、增加多种器官中的糖代谢水平。

肌肉组织糖代谢降低是老年人群高发胰岛素抵抗的重要因素。

全球成年人糖尿病发病率在 10%左右。糖尿病是一种老年相关疾病。一项研究显示，在 20-39 岁、40-59 岁、60-74 岁、及≥75 岁人群中，糖尿病发病率分别为 21.1%、47.0%、66.7% 及 75.7%。为什么老年人易患糖尿病？众所周知，人体中 80%以上的血糖是由骨骼肌消耗的；而全身肌肉质量在 40 岁后每十年降低 8%，70 岁后每十年降低 15%，导致高龄人群普遍患有肌少症。即使胰岛素水平正常，肌少症患者也无法通过骨骼肌代谢掉血糖，从而产生胰岛素抵抗。有研究发现，人体骨骼肌比重每增加 10%，胰岛素抵抗风险可降低 11%。除了肌少症，糖代谢功能降低可由线粒体损伤介导。多种因素可导致线粒体损伤，如脂肪酸堆积、氧化应激、基因突变、线粒体呼吸抑制剂等，这些因素皆可增加 II 型糖尿病风险。

事实上，糖代谢功能降低往往同时出现在患者的多种器官中，包括脑和肌肉组织。因此，神经退行性疾病和胰岛素抵抗常出现在同一患者身上。有研究发现，80%的阿尔茨海默病及58%帕金森病患者伴有糖尿病或胰岛素抵抗。

唑嗪类药物可通过靶向 P_{gk}1、激活糖代谢，对神经退行性疾病具有预防和治疗作用。

唑嗪类(Quinazoline)药物是一类 α 1 肾上腺素受体抑制剂，用于治疗前列腺增生或高血压。市场上常见的唑嗪类药物包括特拉唑嗪(terazosin, TZ)、阿夫唑嗪(alfuzosin)、及多沙唑嗪(dosazosin)。本团队前期研究发现，特拉唑嗪可结合磷酸甘油激酶(phosphoglycerate kinase 1, P_{gk}1)。糖酵解通路(glycolysis)一共有十个酶，P_{gk}1 是第七个，也是第一个产生 ATP 的酶。特拉唑嗪可激活 P_{gk}1，进而激活糖酵解通路。糖酵解通路产生的丙酮酸(Pyruvate)进入线粒体三羧酸循环(TCA cycle)引起线粒体氧化磷酸化代谢增加，细胞生成大量 ATP。糖酵解通路与线粒体三羧酸循环的级联构成糖代谢途径。

研究表明，特拉唑嗪具有预防和治疗帕金森病、阿尔茨海默病和多系统萎缩症(multiple system atrophy)等小鼠及大鼠模型药效。这种药效获得了患者数据的支持。通过对多项流行病学进行分析，发现长期使用唑嗪类药物的人群发生帕金森病及帕金森病相关疾病的发病率显著降低；而其它类型的 α 1 肾上腺素受体抑制剂，如坦索罗辛(tamsulosin)等，没有类似药效。

唑嗪类药物存在安全隐患，改造唑嗪类药物具有研究意义。

从原理上讲，一个激活糖代谢的药物应具有降血糖效果。多项临床试验结果显示，特拉唑嗪或多沙唑嗪确实可改善糖尿病患者的血糖血脂水平，但药效极为有限或无效。此外，没有报道观察到唑嗪类可降低小鼠或大鼠血糖。联合使用 α 1 肾上腺素受体抑制剂(特拉唑嗪)和 β 肾上腺素受体抑制剂(普萘洛尔, propranolol)，不能影响大鼠血糖。这些结果说明，唑嗪类药物激活骨骼肌中的糖代谢药效较弱或无效。

特拉唑嗪、阿夫唑嗪、多沙唑嗪、坦索罗辛等肾上腺素受体抑制剂类药物，可产生多种副作用，如虹膜松弛综合征(intraoperative floppy iris syndrome, IFIS)、低血压、乏力、头晕、昏厥、视力模糊等，导致10-20%的患者终止用药。有研究发现，特拉唑嗪结合 α 1 肾上腺素受体依赖于唑嗪啉环上的一个氮原子，如果将该氮原子置换为碳原子，对 α 1 肾上腺素受体的亲和力可降低1000倍以上。目前的研究显示，改造后的特拉唑嗪(TZ-md)依然具有激活 P_{gk}1 的作用，但不具有抑制 α 1 肾上腺素受体的作用。

另外，低浓度特拉唑嗪可激活 P_{gk}1、高浓度特拉唑嗪可抑制 P_{gk}1。这个现象的原理是：特拉唑嗪结合到 P_{gk}1 蛋白的位点与底物 ADP 和产物 ATP 重合，因为特拉唑嗪与 P_{gk}1 的亲和力高于 ADP 10 倍以上，高剂量的特拉唑嗪更多结合到 P_{gk}1 蛋白上，从而抑制底物 ADP 的结合，因此抑制 P_{gk}1 酶活性。P_{gk}1 酶反应的限速步骤是 ATP 从 P_{gk}1 蛋白上的解离，该

解离过程占酶反应近 96% 的时间，特拉唑嗪与 Pgk1 的亲和力高于 ATP 100 倍以上。因此，低剂量特拉唑嗪可竞争掉 ATP 结合、加速 Pgk1 酶反应，产生激活 Pgk1 作用。最近的一项前瞻性临床试验发现，个别帕金森病患者使用特拉唑嗪治疗以后，出现脑组织和血液中的血红蛋白的 ATP 水平下降的现象，不同于多数患者的 ATP 水平上升。这一结果说明，特拉唑嗪可能在这类患者中产生了抑制 Pgk1 的药效，可能性在血脑屏障被破坏的患者中容易产生。同时，现有的研究表明，在平均年龄 70 岁的人群中，13.5% 的患者存在血脑屏障破坏现象。

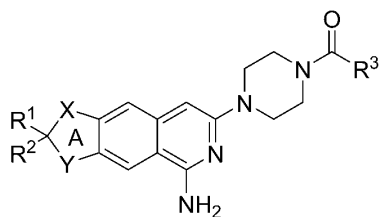
综上所述，唑嗪类药物作为 Pgk1 激活剂，存在三方面弱点：1) 激活骨骼肌糖代谢能力不足、缺乏降血糖疗效。也许唑嗪类药物不是激活 Pgk1 的最佳化合物。2) 唑嗪类药物抑制 α_1 肾上腺素受体的作用具有多种不良副作用，导致部分患者终止用药。3) 唑嗪类药物存在抑制 Pgk1 风险，导致治疗相关疾病无效。

发明内容

基于上述唑嗪类药物的三点不足，本发明提供了一种异喹啉类衍生物及其合成方法和应用。所述异喹啉类衍生物作为一类新型的 Pgk1 激活剂，具有较高的 Pgk1 激活活性，临床上具有预防或治疗神经退行性疾病及代谢性疾病的潜力。

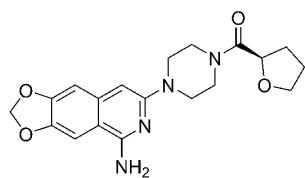
为实现上述目的，本发明提供了如下技术方案：

本发明技术方案之一：提供一种异喹啉类衍生物，所述异喹啉类衍生物的结构通式如下：

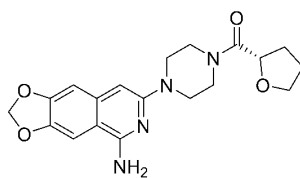


上式中，A 环代表一个可选被取代的五元含氧杂环；X 为 O 或 C，Y 为 O 或 C，且 X 和 Y 中至少含有一个 O；R¹ 代表氢原子或甲基；R² 代表氢原子或甲基；R³ 为五元环烷基或含 1 个杂原子的五元杂环基团，杂原子选自氧原子、氮原子；

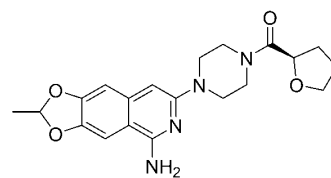
所述异喹啉类衍生物的结构具体如下：



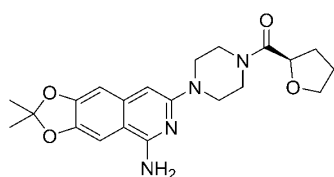
T1



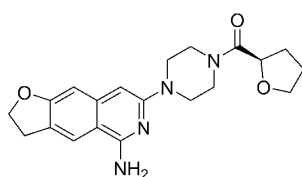
T2



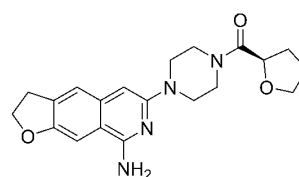
T3



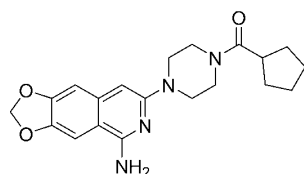
T4



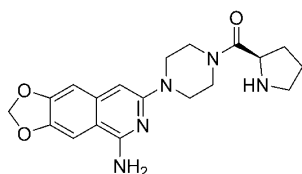
T5



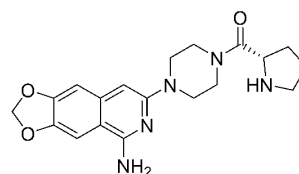
T6



T7



T8



T9

本发明技术方案之二：提供一种基于上述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐。

优选地，所述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐包括盐酸盐、硫酸盐、氢溴酸盐、硝酸盐、三氟乙酸盐、醋酸盐、磷酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、草酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁二酸盐、苹果酸盐、苯甲酸、柠檬酸盐或乳酸盐。

本发明验证了盐酸盐、硫酸盐、三氟乙酸盐均与异喹啉类衍生物具有相同功效，其他药学上可接受的盐与所述异喹啉类衍生物应当同样具备相同的功效。

本发明技术方案之三：提供一种异喹啉类衍生物制剂，活性成分为上述异喹啉类衍生物和/或上述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐。

优选地，所述制剂为上述异喹啉类衍生物或上述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐与药学上可接受的辅料，如：水、酒精、植物油、淀粉、微晶纤维素、乳糖、明胶、硬脂酸镁、海藻酸钠、麦芽糊精、滑石、交联聚维酮、树胶和凡士林等辅料共同制备的各种类型的药物制剂。

本发明技术方案之四：提供一种磷酸甘油激酶激活剂，所述激活剂为：上述异喹啉类衍生物、上述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐或上述异喹啉类衍生物制剂。

本发明技术方案之五：提供一种用于治疗或预防神经退行性疾病的药物，所述药物为：上述异喹啉类衍生物、上述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐或上述异喹啉类衍生物制剂。

优选地，所述神经退行性疾病包括但不限于老年痴呆症、帕金森病、渐冻症或舞蹈症等。

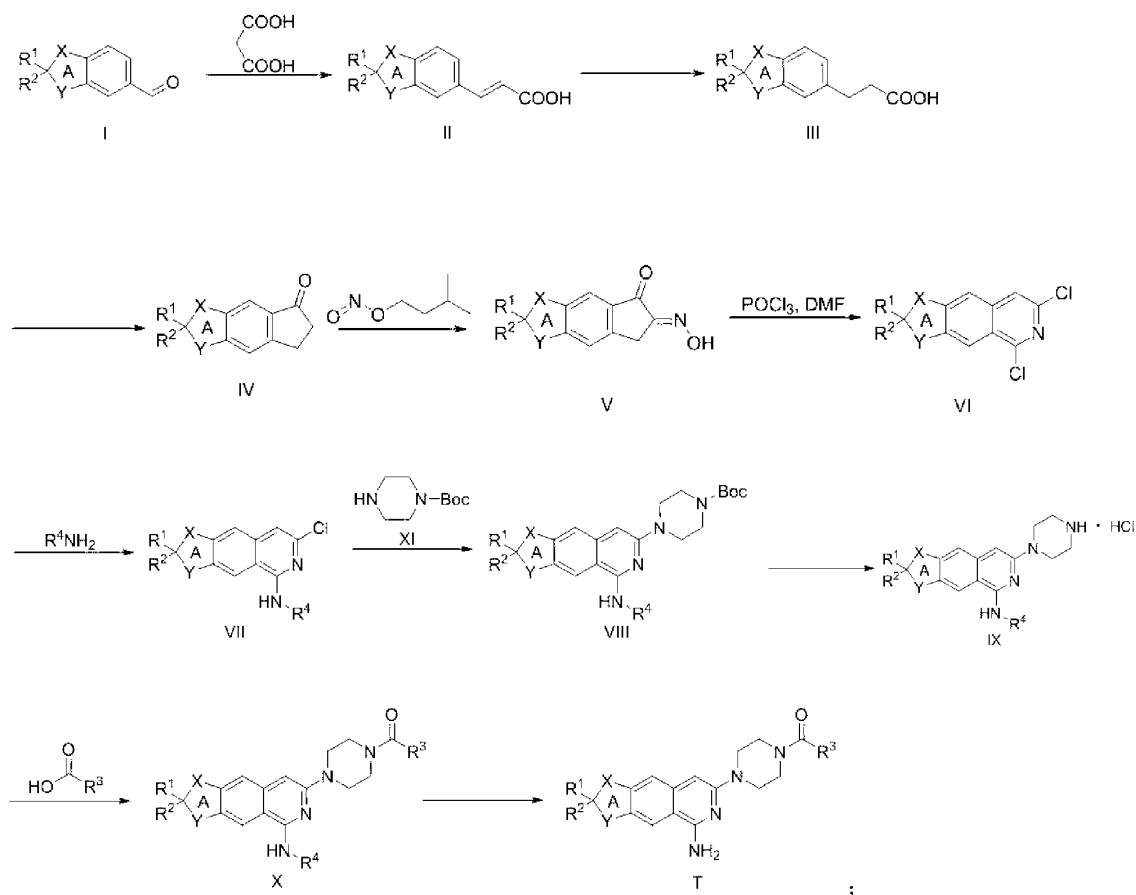
本发明技术方案之六：提供一种用于治疗或预防代谢性疾病的药物，所述药物为：上述异喹啉类衍生物、上述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐或上述异喹啉类衍生物制剂。

优选地，所述代谢性疾病包括但不限于糖尿病或肥胖等。

本发明技术方案之七：提供一种上述异喹啉类衍生物的制备方法，包括以下合成路线：

合成路线 A:

向化合物 I 的溶液中加入丙二酸和哌啶，反应后得到化合物 II；化合物 II 在催化剂和 H_2 氛围下发生反应，制得化合物 III；化合物 III 先与草酰氯反应生成酰氯，再于三氯化铝催化作用下得到化合物 IV；化合物 IV 在酸性条件下与亚硝酸异戊酯反应后得到化合物 V；化合物 V 与三氯氧磷反应，得到化合物 VI；化合物 VI 在 N-甲基吡咯烷酮中与氨基保护试剂反应，制得化合物 VII；化合物 VII、化合物 XI、二氧六环、 $Pd_2(dba)_3$ 、RuPhos 和碳酸铯共同反应，制得化合物 VIII；化合物 VIII 脱去 Boc 保护基得到化合物 IX；化合物 IX 与 R^3 -COOH 反应制得化合物 X；化合物 X 与三氟乙酸反应脱除氨基保护，制得所述异喹啉类衍生物化合物 T；反应路线如下：

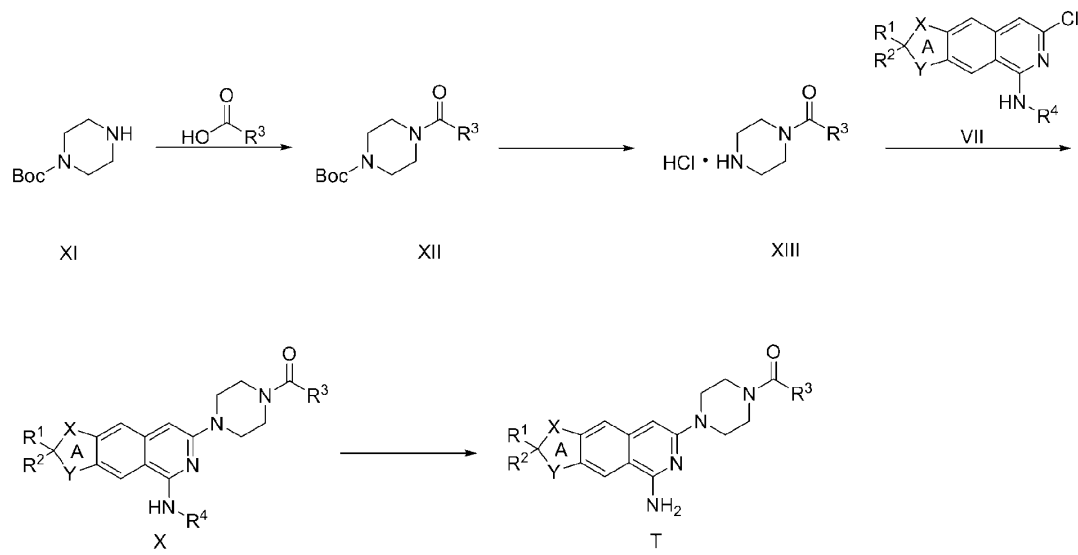


优选地，合成路线 A 中各步骤的反应温度和反应时间满足反应物的原料能够得到目标产物即可，并无特殊限定；

合成路线 B:

化合物 XI 在溶剂中与 R^3 -COOH、O-(7-氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和 N,N-二异丙基乙胺反应制得化合物 XII；化合物 XII 脱去 Boc 保护基得到化合物 XIII；化合物

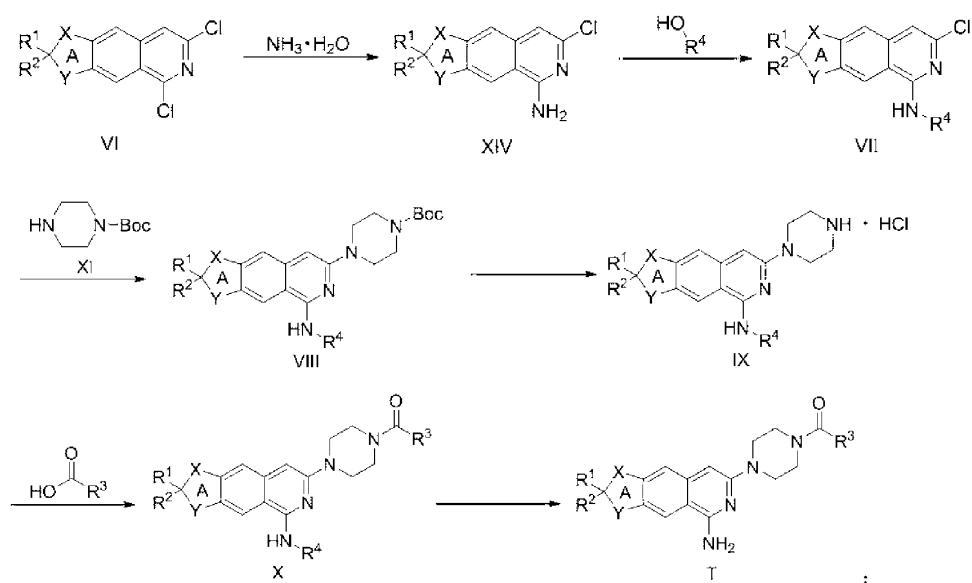
XIII 与参照合成路线 A 制备的化合物 VII、二氧六环、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、RuPhos 和碳酸铯共同反应，制得化合物 X；化合物 X 与三氟乙酸反应脱除氨基保护，制得所述异喹啉类衍生物化合物 T；反应路线如下：



优选地，合成路线 B 中各步骤的反应温度和反应时间满足反应物的原料能够得到目标产物即可，并无特殊限定；

合成路线 C：

参照合成路线 A 制备的化合物 VI 和氨水反应制得化合物 XIV；化合物 XIV 与氨基保护试剂反应得到化合物 VII；化合物 VII 参照合成路线 A 的方法制得所述异喹啉类衍生物化合物 T；反应路线如下：



优选地，合成路线 C 中各步骤的反应温度和反应时间满足反应物的原料能够得到目标产物即可，并无特殊限定；

所述合成路线 A、合成路线 B 和合成路线 C 中涉及化合物的 R⁴ 基为氨基保护基团。

本发明的有益技术效果如下：

本发明合成的异喹啉类衍生物及其盐经验证，可以通过靶向作用于 P_{gk}1，进而激活 P_{gk}1，达到治疗或预防神经退行性疾病及代谢性疾病的目的。效果强于特拉唑嗪，且不会出现抑制 P_{gk}1 的情况。

附图说明

图 1 为本发明实施例制备的各异喹啉类衍生物及特拉唑嗪对细胞 ATP 活性的影响。

图 2 为药物对 P_{gk}1 酶活性的体外生化实验结果，其中，A 为阳性对照，不同浓度特拉唑嗪对 P_{gk}1 酶活性的影响；B 为实验组，不同浓度 T6 对 P_{gk}1 酶活性的影响。

图 3 为不同浓度的化合物 T6 和特拉唑嗪对细胞中 P_{gk}1 酶活性的影响，其中，A 为特拉唑嗪对细胞中 P_{gk}1 酶活性的影响，B 为化合物 T6 对细胞中 P_{gk}1 酶活性的影响。

图 4 为不同浓度的化合物 T6 和特拉唑嗪对细胞中 ATP 水平的影响。

图 5 为本发明实施例制备的各异喹啉类衍生物及特拉唑嗪对小鼠血糖的影响。

图 6 为利拉鲁肽及不同浓度化合物 T6 对糖尿病模型小鼠血糖的影响。

图 7 为二甲双胍、特拉唑嗪及化合物 T6 对糖尿病模型小鼠血液中糖化血红蛋白、胰岛素含量及体重的影响，其中，A 为糖化血红蛋白含量，B 为胰岛素含量，C 为体重变化。

图 8 为特拉唑嗪及不同浓度化合物 T2 对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠的运动能力及体内酪氨酸羟化酶含量的影响，其中，A 为各药物对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠的运动能力的影响，B 为特拉唑嗪对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠体内酪氨酸羟化酶含量的影响，C 为剂量 0.1 mg/Kg 的化合物 T2 对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠体内酪氨酸羟化酶含量的影响。

具体实施方式

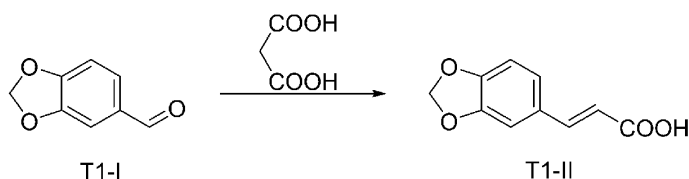
现详细说明本发明的多种示例性实施方式，该详细说明不应认为是对本发明的限制，而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。应理解本发明中所述的技术语仅仅是为描述特别的实施方式，并非用于限制本发明。

另外，对于本发明中的数值范围，应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值，以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

除非另有说明，否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解相同含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料，但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。

关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等，均为开放性的用语，即意指包含但不限于。

实施例 1：化合物 T1-II 的合成

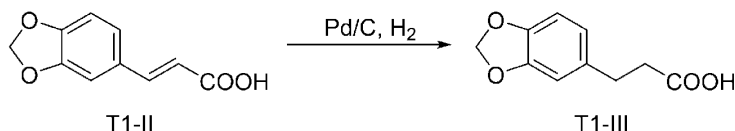


将 35 mL DMF 加入 250 mL 茄形瓶中，搅拌下加入胡椒醛 9.01 g (60 mmol) 和丙二酸 8.74 g (84.0 mmol)，然后加入哌啶 0.66 g (7.8 mmol)。将所得淡棕色溶液于 90℃ 油浴中搅拌 10 h。降温至室温，加入纯水 60 mL 搅拌 1 h，过滤，滤饼用纯水洗涤，并于室温下真空干燥，得 8.67 g 淡棕色中间体 T1-II，收率：75.2 %。NMR 解析如下：

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12.24 (brs, 1H), 7.52 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.16 (dd, J₁ = 8.1 Hz, J₂ = 1.6 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.08 (s, 2H).

MS (C₁₀H₈O₄): 191.67 [M-H]⁻, 383.85 [2M-H]⁻.

实施例 2：化合物 T1-III 的合成

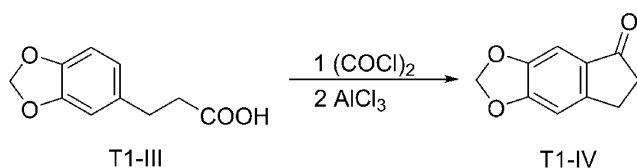


将 250 mL 四氢呋喃加入 500 mL 茄形瓶中，搅拌下加入 4.19 g (2.18 mmol) 中间体 T1-II 和 0.84 g 钯炭，将所得混合物于室温下在氢气气氛中搅拌反应 20h。反应混合物通过硅藻土过滤，滤液减压浓缩，残余物用乙酸乙酯/石油醚重结晶，得 2.97 g 白色中间体 T1-III，收率：70.1 %。NMR 解析如下：

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 11.81 (brs, 1H), 6.74 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.66 (dd, J₁ = 7.9 Hz, J₂ = 1.7 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 2.88 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.64 (t, J = 7.8 Hz, 2H).

MS (C₁₀H₁₀O₄): 193.57 [M-H]⁻, 387.79 [2M-H]⁻.

实施例 3：化合物 T1-IV 的合成

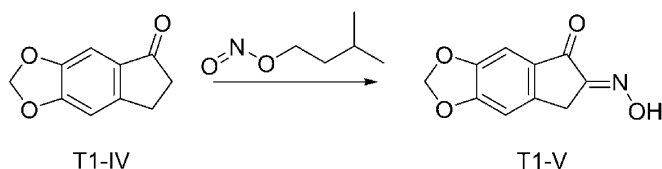


将 50 mL 二氯甲烷加入 250 mL 茄形瓶中，搅拌下加入 4.40 g (22.66 mmol) 中间体 T1-III 和 0.17 mL DMF。将所得淡棕色溶液于冰浴中搅拌。搅拌下将 5.75 g (45.32 mmol) 草酰氯滴加入上述反应液。所得反应液逐渐升至室温，搅拌过夜（约 12h）。将反应液真空旋蒸浓缩，得棕黄色油状物。在冰浴中再次加入 80 mL 二氯甲烷，并加入 4.53 g (33.99 mmol) 三氯化铝（分 3 次等量加入），所得红棕色混合物于冰浴中搅拌反应 3h。加入 80 g 冰水（分 3 次等量加入），并搅拌 0.5 h，分液，水相用二氯甲烷（40 mL）萃取两次（括号中的体积为每次萃取或洗涤的溶液用量，在后面的实施例中表示相同的含义）。合并有机相，依次用饱和碳酸氢钠（100 mL）洗三次，饱和氯化钠（50 mL）洗一次，无水硫酸钠干燥，真空旋蒸除去溶剂，所得残留物经柱层析纯化（二氯甲烷:甲醇=200:1-150:1-100:1）得 2.37 g 中间体 T1-IV，收率：59.4 %。NMR 解析如下：

^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.03 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.02 (s, 2H), 2.97 (m, 2H), 2.62 (m, 2H).

MS ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$): 176.96 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 4：化合物 T1-V 的合成

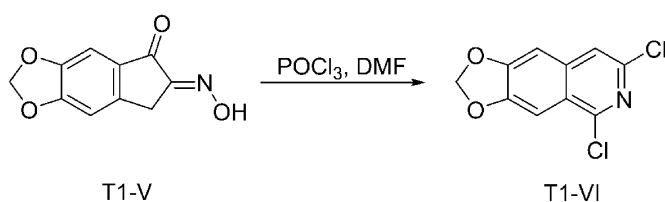


将 65 mL 甲醇加入 100 mL 茄形瓶中，搅拌下加入 6.52 g (37.01 mmol) 中间体 T1-IV 和 1.08 mL (12.95 mmol) 浓盐酸。向所得近无色溶液中逐滴加入 6.50 g (55.51 mmol) 亚硝酸异戊酯，室温下搅拌 8h。将所得反应混合物过滤，滤饼用甲醇（15 mL）洗，并于室温下真空干燥，得 7.43g 黄色中间体 T1-V，收率：97.8 %。NMR 解析如下：

^1H NMR: (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.44 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.17 (s, 2H), 3.62 (s, 2H).

MS ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_4$): 223.11 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$, 411.17 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 433.11 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

实施例 5：化合物 T1-VI 的合成

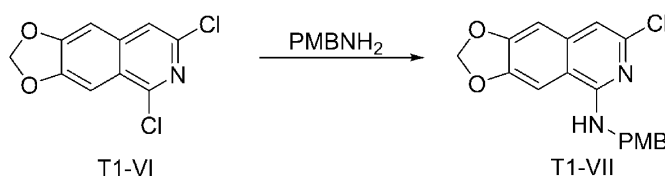


将 7.43 g 中间体 T1-V 加入 250 mL 茄形瓶中, 加入 75 mL 三氯氧磷和 0.75 mL DMF, 所得黄色混合物于 100 °C 油浴中搅拌反应 4 h, 反应结束后真空旋蒸除去三氯氧磷。残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇=400:1) 得 6.47 g 中间体 T1-VI, 收率: 73.8 %。NMR 解析如下:

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.86 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.30 (s, 2H).

MS (C₁₀H₅Cl₂NO₂): 241.99 [M+H]⁺.

实施例 6: 化合物 T1-VII 的合成

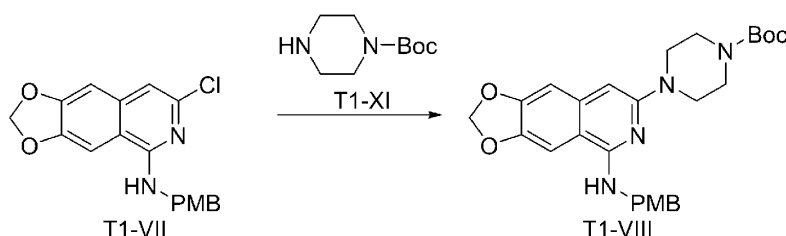


将 4.63 g (19.12 mmol) 中间体 T1-VI、7.87 g (57.35 mmol) 对甲氧基苄胺和 46 mL N-甲基吡咯烷酮加入 250 mL 反应管中, 所得反应混合物在氮气保护下于 120 °C 油浴中反应 3 h。反应结束后加入 150 mL 水和 150 mL 乙酸乙酯, 收集有机相。水相用乙酸乙酯 (50 mL) 萃取两次, 合并有机相用饱和氯化钠 (50 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。真空旋蒸除去溶剂, 所得残留物经柱层析纯化 (乙酸乙酯: 石油醚=1:20-1:10-1:5-1:3-1:2) 得 5.51 g 中间体 T1-VII, 收率: 84.0 %。NMR 解析如下:

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.87 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.31 (brs, 1H), 7.28 (brs, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.89-6.88 (m, 1H), 6.86-6.85 (m, 2H), 6.15 (s, 2H), 4.58 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H).

MS (C₁₈H₁₅ClN₂O₃): 343.09 [M+H]⁺.

实施例 7: 化合物 T1-VIII 的合成



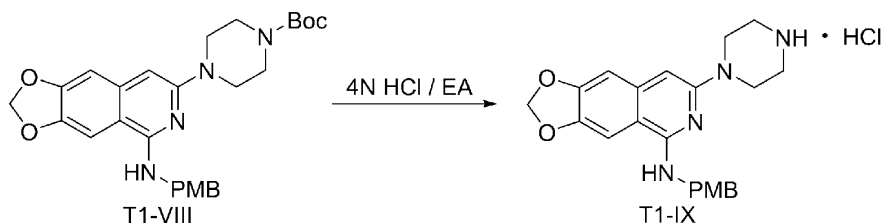
在 200 mL 反应管中加入二氧六环 (50 mL)、3.43 g (10.00 mmol) 中间体 T1-VII、N-Boc-哌嗪 3.73 g (20.00 mmol)、Pd₂(dba)₃ 0.73 g (0.80 mmol)、RuPhos 0.56 g (1.2 mmol) 和碳酸铯 6.52

g (20.00 mmol), 所得反应混合物在氮气保护下于 100℃ 搅拌反应 12h。反应结束后降至室温。反应混合物通过硅藻土过滤, 加 150 mL 水和 150 mL 乙酸乙酯到滤液中, 收集有机相, 水相用乙酸乙酯 (50 mL) 萃取两次, 合并有机相用饱和氯化钠 (50 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。真空旋蒸除去溶剂, 所得残留物经柱层析纯化 (乙酸乙酯: 石油醚=1:40-1:20-1:10-1:5-1:3) 得 3.46 g 中间体 T1-VIII, 收率: 70.2%。NMR 解析如下:

^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.35-7.33 (m, 1H), 7.32-7.30 (m, 1H), 6.90-6.89 (m, 2H), 6.87-6.85 (m, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.96 (s, 2H), 4.98 (m, 1H), 4.68-4.66 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.58-3.53 (m, 4H), 3.46-3.43 (m, 4H), 1.49 (s, 9H).

MS ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5$): 493.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

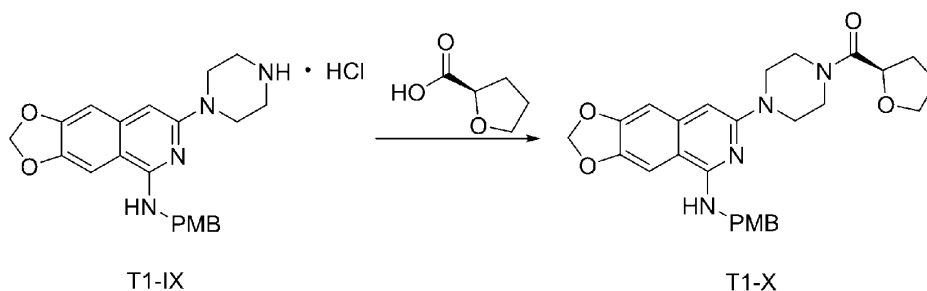
实施例 8: 化合物 T1-IX 的合成



将 1.38 g (2.80 mmol) 中间体 T1-VIII 和 27 mL 4N 盐酸/乙酸乙酯溶液加入 100 mL 茄形瓶中, 所得反应混合物于室温搅拌反应 7 h。真空旋蒸除去溶剂, 所得残留物用乙酸乙酯 (10 mL) 洗, 过滤并于室温下真空干燥得 1.10 g 中间体 T1-IX。所得产物不经进一步纯化, 直接进行下一步反应。

MS ($\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O}_3$): 393.32 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCl}]^+$.

实施例 9: 化合物 T1-X 的合成



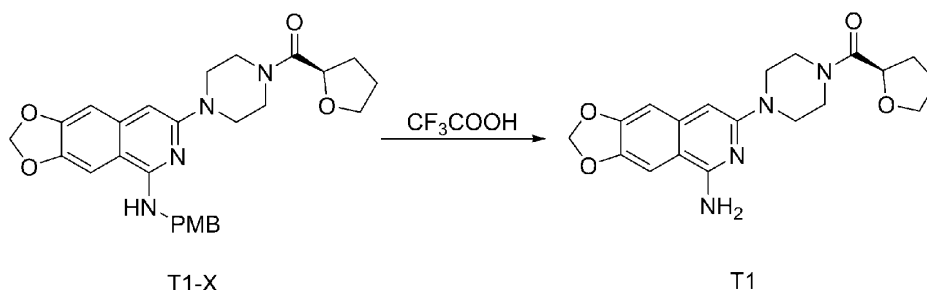
在 50 mL 茄形瓶中加入 536 mg (1.25 mmol) 中间体 T1-IX、175 mg (1.5 mmol) (R)-(+)-四氢呋喃-2-甲酸、713 mg (1.875 mmol) HATU、485 mg (3.75 mmol) DIEA 和 10 mL DMF, 所得反应混合物在氮气保护下于室温搅拌过夜。加入水 (100 mL) 和乙酸乙酯 (100 mL), 收集有机相, 水相用乙酸乙酯 (30 mL) 萃取两次, 合并有机相用饱和氯化钠 (30 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。减压浓缩, 所得残留物经柱层析纯化 (乙酸乙酯: 石油醚=1:20-1:10-1:5-1:3-1:1-2:1-3:1)

得 324 mg 中间体 T1-X, 收率: 52.9 %。NMR 解析如下:

^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.34-7.33 (m, 1H), 7.31 (m 1H), 6.89-6.85 (m, 3H), 6.82 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.97 (s, 2H), 5.01 (brs, 1H), 4.67 (m, 3H), 3.98-3.86 (m, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.76-3.67 (m, 3H), 3.53-3.47 (m, 4H), 2.32-2.28 (m, 1H), 2.08-1.92 (m, 3H).

MS ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$): 491.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 10: 化合物 T1 的合成

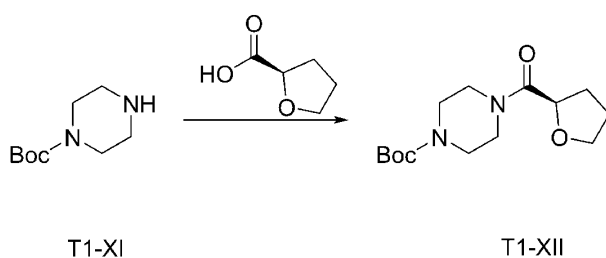


将 200 mg (0.41 mmol) 中间体 T1-X 和 2 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中, 所得反应混合物于 45°C 油浴中搅拌反应 3 h, 真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO_3 溶液, 用二氯甲烷 (15 mL) 萃取三次。合并有机相, 用饱和氯化钠 (15 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。减压浓缩, 所得残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇=100:1-80:1-50:1-20:1-10:1) 得 62 mg 化合物 T1, 收率: 41.1 %。NMR 解析如下:

^1H NMR: (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.60 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.55 (brs, 2H), 6.25 (s, 1H), 6.10 (s, 2H), 4.68 (m, 1H), 3.81-3.70 (m, 4H), 3.65-3.45 (m, 6H), 2.09-1.98 (m, 2H), 1.88-1.79 (m, 2H).

MS ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$): 371.05 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 11: 化合物 T1-XII 的合成

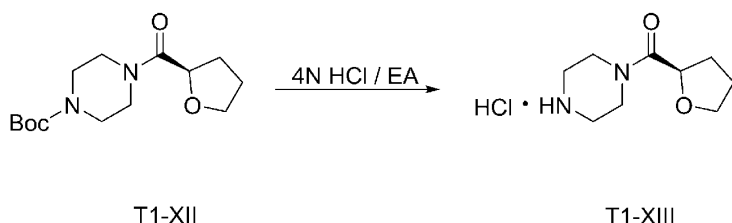


将 1.16 g (10.0 mmol) (R)-(+)-四氢呋喃-2-甲酸和 20 mL DMF 加入 100 mL 反应管中, 向所得反应液中加入 1.86 g (10.0 mmol) 中间体 T1-XI、4.56 g (12.0 mmol) HATU 和 2.59 g (20.0 mmol) N,N-二异丙基乙胺。所得反应溶液于室温下搅拌 12 h。反应结束后加入 100 mL 水和 100 mL 乙酸乙酯, 收集有机相。水相用乙酸乙酯 (50 mL) 萃取两次, 合并有机相用饱和氯化钠 (50 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。真空旋蒸除去溶剂, 所得残留物经柱层析纯化 (乙酸乙酯: 石油醚=1:20-1:10-1:7-1:5-1:2) 得 1.95 g 中间体 T1-XII, 收率: 68.7 %。NMR 解析如下:

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 4.56-4.52 (m, 1H), 3.90-3.75 (m, 2H), 3.63-3.59 (m, 2H), 3.44-3.28 (m, 6H), 2.32-2.21 (m, 1H), 1.99-1.87 (m, 3H), 1.41 (s, 9H).

MS (C₁₄H₂₄N₂O₄): 285.14 [M+H]⁺.

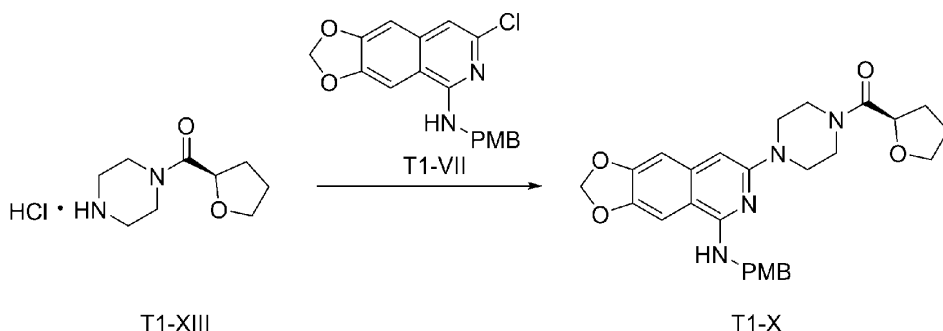
实施例 12: 化合物 T1-XIII 的合成



将 1.42 g (5.0 mmol) 中间体 T1-XII 和 28 mL 4N 盐酸/乙酸乙酯溶液加入 100 mL 茄形瓶中, 所得反应混合物于室温搅拌反应 5h。真空旋蒸除去溶剂, 所得残留物用乙酸乙酯(10 mL)洗, 过滤并于室温下真空干燥得 0.95 g 中间体 T1-XIII。所得产物不经进一步纯化, 直接进行下一步反应。

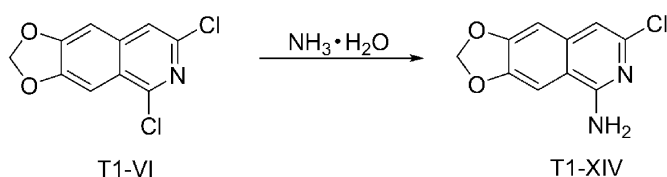
MS (C₉H₁₇ClN₂O₂): 185.17 [M+H-HCl]⁺.

实施例 13: 化合物 T1-X 的合成



在 200 mL 反应管中加入二氧六环(40 mL)、2.58 g (7.50 mmol)中间体 T1-VII、3.3 g (15.00 mmol)中间体 T1-XIII、0.55 g (0.60 mmol) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、0.42 g (0.90 mmol) RuPhos 和 4.89 g (15.00 mmol)碳酸铯, 所得反应混合物在氮气保护下于 100℃搅拌反应 12h。反应结束后降至室温。反应混合物通过硅藻土过滤, 加 120 mL 水和 120 mL 乙酸乙酯到滤液中, 收集有机相, 水相用乙酸乙酯 (50 mL) 萃取两次, 合并有机相用饱和氯化钠 (50 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。真空旋蒸除去溶剂, 所得残留物经柱层析纯化 (乙酸乙酯:石油醚=1:20-1:10-1:5-1:3-1:1-2:1-3:1) 得 1.85 g 中间体 T1-X, 收率: 50.1 %。

实施例 14: 化合物 T1-XIV 的合成

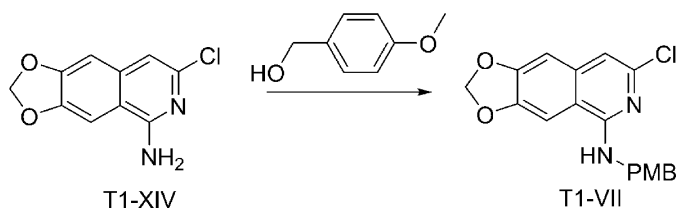


向 100 mL 水热反应釜中加入 1.09 g (4.50 mmol) 中间体 T1-VI、30 mL 二氧六环和 30 mL 氨水, 所得反应混合物于 150℃ 搅拌反应 48h。反应结束后降至室温。向反应混合物中加入 30 mL 水和 30 mL 二氯甲烷, 收集有机相, 水相用二氯甲烷 (15 mL) 萃取两次, 合并有机相用饱和氯化钠 (30 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。真空旋蒸除去溶剂, 所得残留物经乙酸乙酯(20mL)室温打浆两次, 得 0.64 g 中间体 T1-XIV, 收率: 64.0 %。¹H NMR 解析如下:

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.61 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.94 (brs, 2H), 6.84 (s, 1H), 6.14 (s, 2H).

MS (C₁₀H₇ClN₂O₂): 223.08 [M+H]⁺.

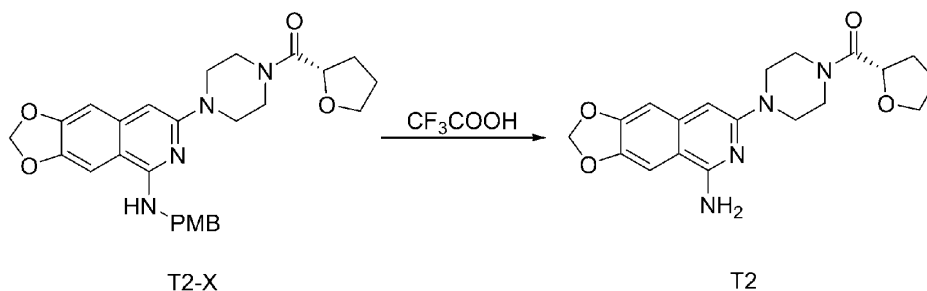
实施例 15: 化合物 T1-VII 的合成



向 100 mL 水热反应釜中加入 520 mg (2.34 mmol) 中间体 T1-XIV、79 mg (0.35 mmol) 醋酸钨、256 mg (0.70 mmol) 3-二苯膦基苯磺酸钠、1.29 g (9.36 mmol) 对甲氧基苄醇和 15 mL 水, 所得反应混合物于 140℃ 搅拌反应 24h。反应结束后将反应混合物通过硅藻土过滤, 加入 30 mL 水和 30 mL 乙酸乙酯, 收集有机相。水相用乙酸乙酯 (15 mL) 萃取两次, 合并有机相用饱和氯化钠 (30 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。真空旋蒸除去溶剂, 所得残留物经柱层析纯化 (乙酸乙酯:石油醚=1:20-1:10-1:7-1:5-1:2) 得 592 mg 中间体 T1-VII, 收率: 74.0 %。

实施例 16: 化合物 T2 的合成

起始原料 T2-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



将 180 mg (0.37 mmol) 中间体 T2-X 和 1.8 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中, 所得反

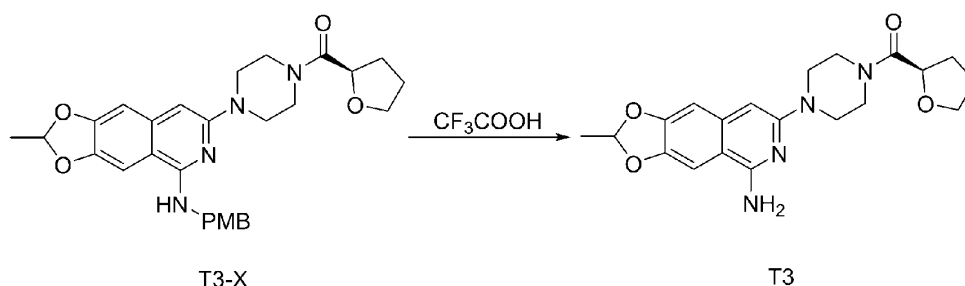
应混合物于 45℃油浴中搅拌反应 3 h，真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液，用二氯甲烷（15 mL）萃取三次。合并有机相，用饱和氯化钠（15 mL）洗一次，无水硫酸钠干燥。减压浓缩，所得残留物经柱层析纯化（二氯甲烷:甲醇=100:1-80:1-50:1-20:1-10:1）得 65 mg 化合物 T2，收率：47.8 %。NMR 解析如下：

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.46 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.44 (brs, 2H), 6.10 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 4.71 (m, 1H), 3.82-3.70 (m, 4H), 3.66-3.56 (m, 6H), 2.07-1.99 (m, 2H), 1.88-1.80 (m, 2H).

MS (C₁₉H₂₂N₄O₄): 371.20 [M+H]⁺.

实施例 17: 化合物 T3 的合成

起始原料 T3-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



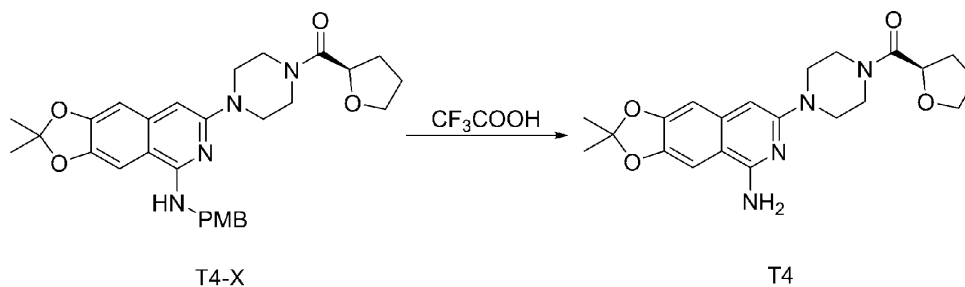
将 200 mg (0.37 mmol) 中间体 T3-X 和 2.0 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中，所得反应混合物于 45℃油浴中搅拌反应 3 h，真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液，用二氯甲烷（15 mL）萃取三次。合并有机相，用饱和氯化钠（15 mL）洗一次，无水硫酸钠干燥。减压浓缩，所得残留物经柱层析纯化（二氯甲烷:甲醇=100:1-80:1-50:1-20:1-15:1）得 78 mg 化合物 T3，收率：51.3 %。NMR 解析如下：

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.42 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.52 (brs, 2H), 6.30 (q, J = 5.0 Hz, 1H), 6.19 (s, 1H), 4.75 (m, 1H), 3.85-3.68 (m, 4H), 3.72-3.60 (m, 6H), 2.05-1.98 (m, 2H), 1.90-1.80 (m, 2H), 1.67 (d, J = 5.0 Hz, 3H).

MS (C₂₀H₂₄N₄O₄): 385.23 [M+H]⁺.

实施例 18: 化合物 T4 的合成

起始原料 T4-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



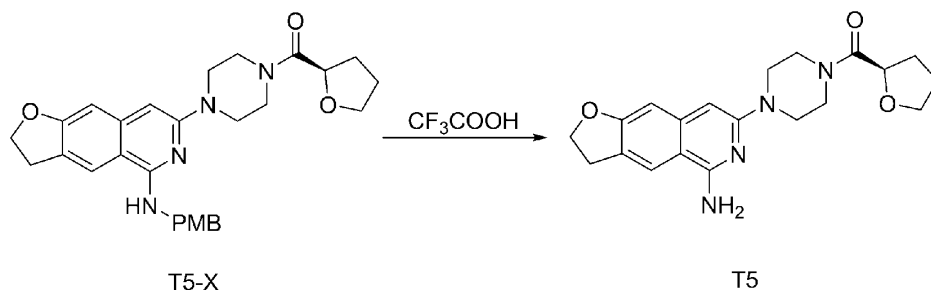
将 182 mg (0.35 mmol) 中间体 T4-X 和 1.9 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中, 所得反应混合物于 45°C 油浴中搅拌反应 3 h, 真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液, 用二氯甲烷 (15 mL) 萃取三次。合并有机相, 用饱和氯化钠 (15 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。减压浓缩, 所得残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇 = 100:1-80:1-50:1-20:1-15:1) 得 78 mg 化合物 T4, 收率: 55.7 %。NMR 解析如下:

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.53 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.56 (brs, 2H), 6.15 (s, 1H), 4.76 (m, 1H), 3.80-3.66 (m, 4H), 3.70-3.55 (m, 6H), 2.10-1.99 (m, 2H), 1.86-1.78 (m, 2H), 1.72 (s, 6H).

MS (C₂₁H₂₆N₄O₄): 399.25 [M+H]⁺.

实施例 19: 化合物 T5 的合成

起始原料 T5-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



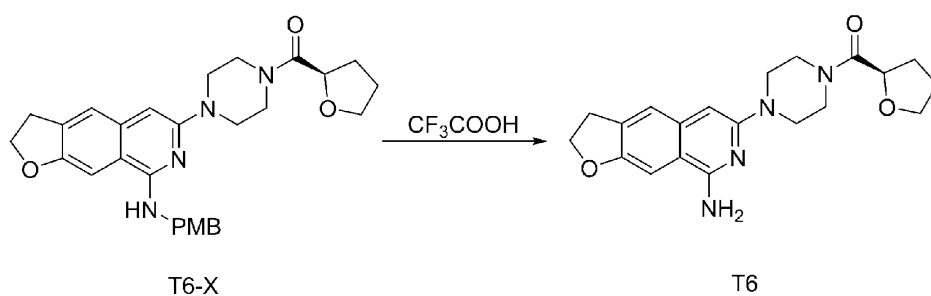
将 245 mg (0.50 mmol) 中间体 T5-X 和 2.5 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中, 所得反应混合物于 45°C 油浴中搅拌反应 3 h, 真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液, 用二氯甲烷 (15 mL) 萃取三次。合并有机相, 用饱和氯化钠 (15 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。减压浓缩, 所得残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇 = 100:1-80:1-50:1-20:1-15:1) 得 85 mg 化合物 T5, 收率: 45.9 %。NMR 解析如下:

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.98 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.50 (s, 2H), 6.29 (s, 1H), 4.62 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 3.26 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 4.72 (m, 1H), 3.84-3.71 (m, 4H), 3.66-3.48 (m, 6H), 2.10-2.00 (m, 2H), 1.90-1.80 (m, 2H).

MS (C₂₀H₂₄N₄O₃): 369.15 [M+H]⁺.

实施例 20: 化合物 T6 的合成

起始原料 T6-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



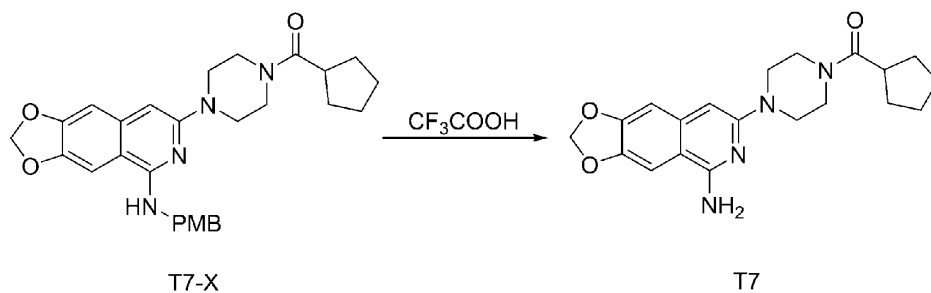
将 220 mg (0.45 mmol) 中间体 T6-X 和 2.2 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中, 所得反应混合物于 45℃ 油浴中搅拌反应 3 h, 真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液, 用二氯甲烷 (15 mL) 萃取三次。合并有机相, 用饱和氯化钠 (15 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。减压浓缩, 所得残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇 = 100:1-80:1-50:1-20:1-15:1) 得 80 mg 化合物 T6, 收率: 48.2 %。NMR 解析如下:

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.92 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.53 (s, 2H), 6.25 (s, 1H), 4.64 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 3.24 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 4.75 (m, 1H), 3.88-3.70 (m, 4H), 3.69-3.52 (m, 6H), 2.11-2.00 (m, 2H), 1.88-1.80 (m, 2H).

MS (C₂₀H₂₄N₄O₃): 369.21 [M+H]⁺.

实施例 21: 化合物 T7 的合成

起始原料 T7-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



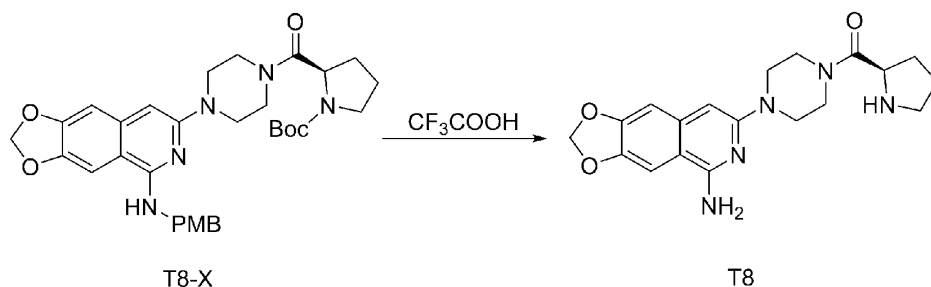
将 115 mg (0.24 mmol) 中间体 T7-X 和 1.2 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中, 所得反应混合物于 45℃ 油浴中搅拌反应 3 h, 真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液, 用二氯甲烷 (15 mL) 萃取三次。合并有机相, 用饱和氯化钠 (15 mL) 洗一次, 无水硫酸钠干燥。减压浓缩, 所得残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇 = 100:1-80:1-50:1-20:1) 得 34 mg 化合物 T7, 收率: 39.2 %。NMR 解析如下:

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.58 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.82-6.76 (m, 2H), 6.21 (s, 1H), 6.11 (s, 2H), 3.61-3.60 (m, 4H), 3.30-3.25 (m, 4H), 3.08-2.98 (m, 1H), 1.79-1.52 (m, 8H).

MS (C₂₀H₂₄N₄O₃): 369.22 [M+H]⁺.

实施例 22: 化合物 T8 的合成

起始原料 T8-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



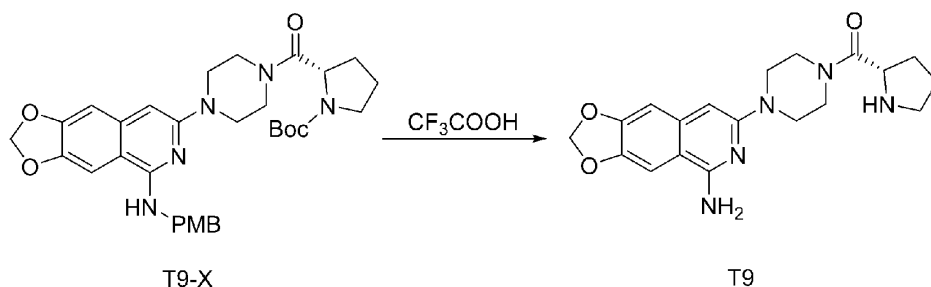
将 79 mg (0.13 mmol) 中间体 T8-X 和 1.6 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中，所得反应混合物于 45℃ 油浴中搅拌反应 3 h。真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液，用二氯甲烷 (15 mL) 萃取三次。合并有机相，用饱和氯化钠 (15 mL) 洗一次，无水硫酸钠干燥。减压浓缩，所得残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷：甲醇 = 100:1-80:1-50:1-20:1-8:1) 得 34 mg 化合物 T8，收率：68.7 %。NMR 解析如下：

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.72 (brs, 1H), 8.53 (brs, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.17 (s, 1H), 6.08 (s, 2H), 4.67 (m, 1H), 3.71-3.61 (m, 4H), 3.39-3.18 (m, 7H), 2.44-2.36 (m, 1H), 1.95-1.81 (m, 3H).

MS (C₁₉H₂₃N₅O₃): 370.27 [M+H]⁺.

实施例 23: 化合物 T9 的合成

起始原料 T9-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



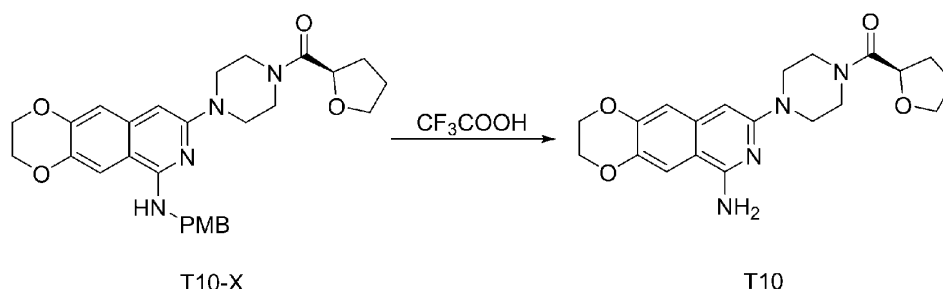
将 120 mg (0.20 mmol) 中间体 T9-X 和 2.4 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中，所得反应混合物于 45℃ 油浴中搅拌反应 3 h。真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液，用二氯甲烷 (15 mL) 萃取三次。合并有机相，用饱和氯化钠 (15 mL) 洗一次，无水硫酸钠干燥。减压浓缩，所得残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷：甲醇 = 100:1-80:1-50:1-20:1-8:1) 得 55 mg 化合物 T9，收率：73.3 %。NMR 解析如下：

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.69 (brs, 1H), 8.55 (brs, 1H), 7.55 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.11 (s, 2H), 4.61 (m, 1H), 3.80-3.65 (m, 4H), 3.45-3.21 (m, 7H), 2.52-2.33 (m, 1H), 2.00-1.80 (m, 3H).

MS (C₁₉H₂₃N₅O₃): 370.25 [M+H]⁺.

实施例 24：化合物 T10 的合成

起始原料 T10-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



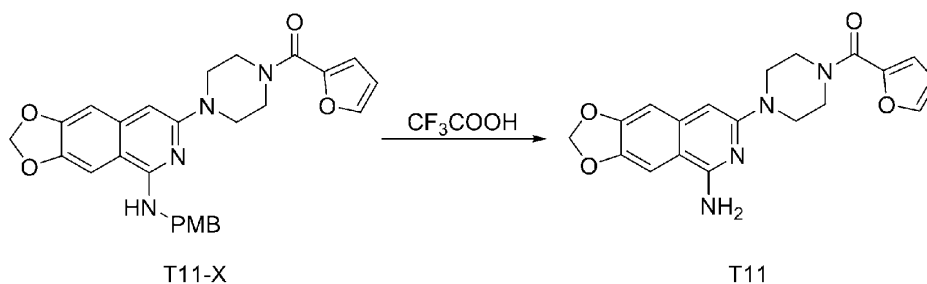
将 170 mg (0.34 mmol) 中间体 T10-X 和 1.7 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中，于 45 °C 油浴中搅拌反应 3 h。真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液，用二氯甲烷 (15 mL) 萃取三次。合并有机相，用饱和氯化钠 (15 mL) 洗一次，无水硫酸钠干燥。减压浓缩，所得残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇=100:1-80:1-50:1-20:1-10:1) 得 48 mg 化合物 T10，收率：37.1 %。NMR 解析如下：

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.50 (br, 2H), 7.91 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 4.75-4.72 (m, 1H), 4.42-4.35 (m, 4H), 3.83-3.76 (m, 2H), 3.73-3.56 (m, 4H), 3.26-3.10 (m, 4H), 2.14-1.97 (m, 2H), 1.90-1.79 (m, 2H).

MS (C₂₀H₂₄N₄O₄): 385.05 [M+H]⁺.

实施例 25：化合物 T11 的合成

起始原料 T11-X 的合成参照 T1-X 的合成方法。



将 77 mg (0.16 mmol) 中间体 T11-X 和 1.5 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中，所得反应混合物于 45 °C 油浴中搅拌反应 3 h，真空旋蒸除去溶剂。向所得残留物中加入 15 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液，用二氯甲烷 (15 mL) 萃取三次。合并有机相，用饱和氯化钠 (15 mL) 洗一次，无水硫酸钠干燥。减压浓缩，所得残留物经柱层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇=100:1-80:1-50:1-20:1-10:1) 得 38 mg 化合物 T11，收率：65.5 %。NMR 解析如下：

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.87-7.86 (m, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.21-7.18 (m, 1H), 7.05-7.04 (m, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.93-6.79 (m, 1H), 6.65-6.64 (m, 1H), 6.19 (s, 1H), 6.10 (s, 2H),

3.80 (br, 4H), 3.41-3.39 (m, 4H).

MS ($C_{19}H_{18}N_4O_4$): 367.23 $[M+H]^+$.

实施例 26: 化合物 T1 三氟乙酸盐的制备

将 250 mg (0.51 mmol) 中间体 T1-X 和 2.5 mL 三氟乙酸加入到 4 mL 反应管中, 所得反应混合物于 45°C 油浴中搅拌反应 3 h, 真空旋蒸除去溶剂。所得残留物用甲醇(2.5 mL)洗两次, 过滤并于室温下真空干燥得 112 mg 化合物 T1 三氟乙酸盐, 收率: 45.3 %。NMR 解析如下:

1H NMR: (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.44 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.32 (brs, 2H), 6.08 (s, 1H), 6.03 (s, 2H), 4.71 (m, 1H), 3.82-3.70 (m, 4H), 3.66-3.55 (m, 6H), 2.08-1.99 (m, 2H), 1.88-1.80 (m, 2H).

MS ($C_{21}H_{23}F_3N_4O_6$): 371.14 $[M+H-TFA]^+$.

实施例 27: 化合物 T1 盐酸盐的制备

将 120 mg 化合物 T1 和 2.4 mL 甲醇加入到 4 mL 反应管中, 所得混合物于冰水浴中搅拌冷却。向其中加入 0.054 mL 浓盐酸。所得混合物于冰浴中搅拌 1 h 后过滤, 滤饼用冰甲醇淋洗, 真空干燥后得 103 mg 化合物 T1 盐酸盐, 收率: 78.0 %。NMR 解析如下:

1H NMR: (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.78 (brs, 3H), 7.48 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.05 (s, 2H), 4.74 (m, 1H), 3.84-3.71 (m, 4H), 3.70-3.57 (m, 6H), 2.10-2.01 (m, 2H), 1.90-1.80 (m, 2H).

MS ($C_{19}H_{23}ClN_4O_4$): 371.19 $[M+H-HCl]^+$.

实施例 28: 化合物 T1 硫酸盐的制备

将 200 mg 化合物 T1 和 4.0 mL 甲醇加入到 4 mL 反应管中, 所得混合物于冰水浴中搅拌冷却。向其中加入 0.058 mL 浓硫酸。所得混合物于冰浴中搅拌 1 h 后过滤, 滤饼用冰甲醇淋洗, 真空干燥后得 213 mg 化合物 T1 硫酸盐, 收率: 84.2 %。 1H NMR 解析如下:

1H NMR: (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.89 (brs, 2H), 7.46 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 6.06 (s, 2H), 4.75 (m, 1H), 3.83-3.69 (m, 4H), 3.68-3.55 (m, 6H), 2.10-1.99 (m, 2H), 1.86-1.78 (m, 2H).

MS ($C_{19}H_{24}N_4O_8S$): 371.25 $[M+H-H_2SO_4]^+$.

实施例 29: 确定化合物对细胞糖代谢的影响

化合物对细胞 ATP 水平的影响。

实验条件:

SK-N-SH (Human Neuroblastoma Cell Line), 是一种人源神经瘤细胞系。在 6 空板中植入 SK-N-SH 细胞, 密度为 6×10^4 。在 5% O_2 条件下培 12 小时。加入 10 μM 各种药物。48 小时后, 收取细胞。用 Promega ATP 检测试剂盒测细胞 ATP 水平。实验重复 6-10 次。实验结果如图 1 所示。未加药组(对照)的 ATP 水平定义为 1, 特拉唑嗪处理组为阳性对照。T1 至 T11 为实验组。

实验结果: T1-T9 具有提高细胞 ATP 活性; 而 T10 和 T11 没有提高 ATP 活性。

实施例 30：确定化合物对 P_{gk1} 蛋白的亲和力

实验条件：

纯化的 P_{gk1} 蛋白（浓度 1 mg/mL），加入 Biacore T200 芯片，测试确定蛋白偶联后，加入不同浓度的药物。获得的曲线可计算出亲和力及 R_{max} 等参数。

实验结果如表 1 所示。

表 1

分析药物	亲和力 (μM)	R _{max} (RU)
特拉唑嗪	1.4	62
T1	496.4	116
T2	448.8	122
T3	683.8	93
T4	725.4	75
T5	272.8	86
T6	375.5	106
T7	878.1	159
T8	473.4	87
T9	811.3	87
T10	>1000	无
T11	>1000	无
ADP	337.4	35
特拉唑嗪 + ADP	2.9	62
T6 + ADP	>1000	无

实验结果：表 1 列出了各种药物与 P_{gk1} 的亲和力。其中，特拉唑嗪的亲和力最高，达到 1.4 μM。T1-T9 与 P_{gk1} 蛋白皆有亲和力，但远低于特拉唑嗪。T10 及 T11 未检测到与 P_{gk1} 蛋白的亲和力（KD 值大于 1000 μM）。R_{max}（RU）是指在检测到亲和力时，小分子药物结合到靶蛋白的数量。我们已发表的研究表明，特拉唑嗪通过干扰 ATP，促进 ATP 从 P_{gk1} 蛋白上解离，使 ATP 对 P_{gk1} 酶反应的抑制作用被解除。R_{max} 数值越高暗示干扰 ATP 解离的潜力越大。ADP 是 P_{gk1} 的底物，KD 值为 337.4。在测定特拉唑嗪亲和力时，加入饱和的 ADP，可降低特拉唑嗪的 KD 值从 1.4 μM 至 2.9 μM，表明特拉唑嗪结合在 P_{gk1} 蛋白上的位点与 ADP/ATP 是重叠的。T6 的 KD 值在加入 ADP 后也被显著降低。说明 T6 与 P_{gk1} 的结合可以被 ADP 干扰，说明 T6 在 P_{gk1} 蛋白上的结合位点与特拉唑嗪类似。这一结果揭示，多个异

喹啉类衍生物与 P_{gk1} 具有亲和力，但亲和力弱于特拉唑嗪。

实施例 31：确定化合物对线粒体呼吸的影响

实验条件：

使用 Seahorse XFe 分析仪（XFe-24, Seahorse Bioscience, Billerica, MA, UAS）检测细胞线粒体压力，测量氧消耗率（OCR）。将 SH-SKN 细胞系接种在 Seahorse XFe 分析仪配套的 24 孔细胞板中。24 小时后，分别给予 DMSO（0.01 %）或者各种药物处理(10 μM)。药物处理 12 小时后进行细胞线粒体压力检测。对于线粒体压力测试，分出 97.2mL 的 Seahorse 基础培养基（Seahorse Bioscience, Billerica, MA, UAS）水浴加热至 37 °C 后加入 1 mL 母液，该母液由下列溶液混合而成（1 mL 浓度为 200 mM 的 L-谷氨酰胺溶液（sigma）、1 mL 为 100 mM 的丙酮酸溶液（sigma）和 800 μL 浓度为 2.5 M 的葡萄糖溶液，用 1M NaOH 溶液调节 pH 值为 7.4）。检测前取出探针板，向探针板中加入 1 mL XF Carlibrant 溶液（Seahorse Bioscience），放置于无 CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中孵育过夜。药物处理后，取出细胞，用 37 °C 预热的 seahorse 基础培养基洗细胞两次，保证每孔剩余 500 μL 的 seahorse 基础培养基，将细胞放入无 CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中孵育 1 h。在此期间，将探针板从培养箱中取出，向探针板中加入 oligomycin、FCCP 和 Rotenone/antimycin A，之后将探针板放入 Seahorse XFe 分析仪中进行校准。药物皆使用 10 μM。实验重复 3-5 次。

实验结果如表 2 所示。

表 2

分析药物	线粒体最大呼吸增加程度（%）
特拉唑嗪	16.3±2.7*
T1	22.1±3.1**
T2	17.8±2.2*
T3	15.3±0.9*
T4	18.1±0.7*
T5	16.6±0.8*
T6	26.3±3.6***
T7	21.5±4.1*
T8	19.2±3.8**
T9	20.1±0.8**
T10	6.3±0.4

T11	8.6±0.6
-----	---------

表 2 列出了药物对细胞基础呼吸的影响，以对照组（DMSO 处理）为 1。有统计学差异的用星号标出。该结果显示，特拉唑嗪及 T1-T9 皆具有提高线粒体呼吸的活性。T10 及 T11 没有激活线粒体的活性。该实验结果与图 1 的结果是一致的。皆说明新合成的异喹啉类衍生物（T1-T9）具有激活 P_{gk1}，增加线粒体呼吸的活性。

实施例 32：确定化合物是否通过 P_{gk1} 产生药效

实验条件：

为了进一步确定新合成的异喹啉类衍生物通过靶向 P_{gk1} 产生激活线粒体的活性，本发明构建了在 SK-N-SH 细胞中稳定敲低 P_{gk1} 细胞系。人源 P_{gk1} 的 target 序列：GAGCTAAAGTTGCAGACAA。将敲低序列 5'端加入 BamHI 酶切位点，3'端加入 XbaI 酶切位点，中间接入 loop 环，合成 top 链 5'-gatccGAGCTAAAGTTGCAGACAATTCAAGAGATTGTCTGCAACTTTAGCTCt-3'，bottom 链：5'-ctagaGAGCTAAAGTTGCAGACAATCTCTTGAATTGTCTGCAACTTTAGCTCg-3'。将两条 DNA oligo 经过 5'端磷酸化后插入 plenti-u6 载体中。将所得到的 Lenti-shP_{gk1} 载体，与 pCAG-dR8.9 和 pCMV-VSV-G 按摩尔比 1:1:1 的比例分别转染到 HEK293T 细胞中，72 小时后收取上清。将所得的上清经过超速离心得到病毒沉淀，用 1/100 体积的 PBS 重悬病毒沉淀，静置 24 小时后，感染到经过 polybrene 处理的 SH-SKN 细胞中。感染 48 小时后将所得到的经病毒感染的细胞通过有限稀释法接种到 96 孔板中获得单克隆细胞系。将所得到的单克隆细胞系继续扩增培养。最后利用 western blot 进一步鉴定 P_{gk1} 的敲低效率。结果见图 2，其中，A 为免疫印迹实验，B 为线粒体呼吸生理学实验（seahorse assay）。图 2 中 A 显示，在稳定表达 shP_{gk1} 的细胞系中，P_{gk1} 蛋白被显著敲低。该蛋白质免疫印迹结果中，GAPDH 是蛋白上样量的对照，确保上样量相同。图 2 中 B 为利用该细胞系，比较 T6 对线粒体呼吸的影响。Seahorse 的实验条件、给药时间等与实施例 31 相同。结果显示，T6（10 μM）对正常细胞（对照）的基础呼吸率及最大呼吸率皆具有激活作用；但在 shP_{gk1} 敲低的细胞中，活性消失。说明 T6 激活线粒体代谢依赖于 P_{gk1}。其它化合物也具有类似结果。

实施例 33：体外生化实验中，确定化合物的量效关系

实验条件：

人源 P_{gk1} cDNA 克隆到含有 His 标签的 pEASYTM-E2 载体（TransGen Biotech）中。用 0.5 mM IPTG 在 BL21（DE3）化学感受态细胞（TransGen Biotech）中诱导蛋白质表达。在提取缓冲液（20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 5% glycerol, protease inhibitor cocktail, pH 7.9）中裂解细胞后，用镍珠（AdarBiotech）纯化上清液。使用洗脱缓冲

液（20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 80 mM imidazole, protease inhibitor cocktail, pH 7.9）洗脱 His 标记的 Pgk1。Pgk1 活性可通过监测 NADH 的产生速率来测量，因为 NADH 应该随着反应的进行而积累。将纯化的 Pgk1-His 蛋白（2 $\mu\text{g/mL}$ ）加入在反应缓冲液中（20 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1 mM MgSO_4 , 10 mM NaHPO_4 , pH 8.6）中加入底物（1.6 mM GAP, 1 mM $\beta\text{-NAD}$, 1 mM ADP, 20 ng/ μL GAPDH）。在该反应体系中分别加入不同浓度的特拉唑嗪（阳性对照）、T6，在室温下反应 10 分钟后，用酶标仪（Molecular Devices, SpectraMax i3x）设定检测 339 nm 吸收波长，该波长可检测 NADH 水平。

实验结果见图 3，其中，A 为特拉唑嗪对细胞中 Pgk1 酶活性的影响，B 为化合物 T6 对细胞中 Pgk1 酶活性的影响。

如图 3 中 A 所示，作为阳性对照，检测了特拉唑嗪 100 μM 、20 μM 、1 μM 、0.1 μM 及 0.01 μM 对 Pgk1 酶活性的影响。结果显示，高浓度（100 μM ）特拉唑嗪可抑制 Pgk1 酶活性，而低浓度（1 μM ）激活 Pgk1 效果最佳。图 3 中 B 比较了不同浓度 T6 对 Pgk1 的影响，发现各种浓度都不能抑制 Pgk1。激活 Pgk1 的最佳浓度是 0.1 μM 。这一结果说明，T6 没有抑制 Pgk1 风险。可能在患者身上不会产生降低脑组织 ATP 的作用，该药效降低了唑嗪类药物的风险。T1-9 皆有类似结果。

实施例 34：培养细胞中，确定化合物的量效关系

实验条件：

在六空板中植入 SK-N-SH 细胞，密度为 6×10^4 。在 5% O_2 条件下培养 12 小时，加入药物。48 小时后，收取细胞。用 Promega ATP 检测试剂盒测细胞 ATP 水平。实验重复 5-7 次。

实验结果见图 4。

如图 4 所示，阳性对照特拉唑嗪（TZ）和 T6 的使用剂量皆为 5、10 和 50 μM 。TZ 的最佳剂量为 10 μM ；T6 的最佳剂量为 50 μM 。但 50 μM 的 TZ 和 T6 有抑制细胞生长的趋势，T6 的生物学有效浓度应接近 10 μM 。

实施例 35：在小鼠体内，确定化合物对血糖的影响

实验条件：

正常饲养条件 3 至 4 月龄的野生型小鼠（C57BL/6）腹腔注射不同药物，0.1 mg/Kg，注射生理盐水为对照组。给药后，禁食 6 小时。取小鼠尾部血液，测血糖值。每组实验 9 只小鼠。

实验结果见图 5。

如图 5 所示，特拉唑嗪（TZ）组未表现出降血糖作用。而 T1-9 具有显著降血糖作用。说明这类新型异唑啉类衍生物具有更高的激活糖代谢活性。

实施例 36：在糖尿病模型小鼠，确定化合物的降血糖作用**实验条件：**

基因敲除的 db/db 小鼠，是经典的高血糖和肥胖模型。在正常饲养条件下，3 月龄以上的小鼠已产生高血糖和肥胖。只提供小鼠饮用水（禁食）6 小时后，取小鼠尾部血液，测血糖值。然后腹腔注射不同药物，包括生理盐水（control）、利拉鲁肽（liraglutide）0.6 mg/Kg、低浓度 T6（T6 low, 0.1 mg/Kg）及高浓度 T6（T6 high, 0.5 mg/Kg）；4 小时后，取小鼠尾部血液，测血糖值。每组实验 6 只小鼠。每只小鼠获得给药前血糖值（ V_{before} ）及给药后血糖值（ V_{after} ）。药物对血糖的影响（%）进行下列计算：

$$(V_{\text{before}} - V_{\text{after}}) \times 100 / V_{\text{before}}。$$

实验结果见图 6。

如图 6 所示，利拉鲁肽作为阳性对照，表现出最佳降血糖药效。T6 的低浓度（0.1 mg/Kg）、高浓度（0.5 mg/Kg）也具有显著的降血糖药效。该结果进一步确定了腹腔注射新型异喹啉类衍生物作为给药途径时，具有降血糖药效。

腹腔注射新型异喹啉类衍生物具有降血糖药效只能持续不超过 6 个小时。为了确定 T6 长效降血糖作用，我们将 T6 加入饮用水中，持续喂给小鼠一周时间。图 7 为饮用水给药途径对小鼠血糖的长期影响。

实施例 37：在糖尿病模型小鼠，确定化合物的长期降血糖及减肥作用**实验条件：**

正常饲养的基因敲除的 db/db 小鼠，在饮用水中加入二甲双胍（二甲双胍，350 mg/Kg）、特拉唑嗪（0.3 mg/Kg）或 T6（1.5 mg/Kg）。处理 7 天后，测小鼠血液中糖化血红蛋白及胰岛素含量变化及体重变化。

实验结果见图 7，其中，A 为糖化血红蛋白含量，B 为胰岛素含量，C 为小鼠体重变化。

如图 7 所示，与对照组比较，只有 T6 处理组的糖化血红蛋白（HbA1c）含量出现降低。各处理组的胰岛素含量皆没有变化。T6 处理组的小鼠体重呈显著下降状态，对体重的影响不同于特拉唑嗪及二甲双胍处理组。上述结果说明，口服给药途径长期处理，T6 降血糖的药效好于特拉唑嗪及二甲双胍、并具有减低体重作用。

实施例 38：在 MPTP 诱导的帕金森病小鼠模型中，确定化合物对多巴胺神经元的影响**实验条件：**

取 3 月龄雄性小鼠，正常饲养。采用急性 MPTP 造模方式（见 Sonsalla PK, Heikkila RE. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol* 1986; **129**(3): 339-45.）。腹腔注射，共给药 4 次。每次给药剂量是 20 mg/kg 体重，

每次间隔 2 小时。MPTP 溶解在生理盐水中，对照组给与等剂量的生理盐水。T2 溶于 DMSO 中，并用生理盐水稀释至所需浓度，故给药处理时给与等剂量的 DMSO 和生理盐水。MPTP 模型建立当天给予 T2（处理组）或 DMSO（对照组）治疗，随后各组小鼠每天给予药物处理。使用转棒（E103，UGO BASILE）测试小鼠行为。首先，在每分钟 15 转（15 rpm）固定速度下，对小鼠进行连续两天的预训练，直到它们能够在杆上停留 60 秒以上。在 MPTP 注射后的第 7 天，在加速模式（2-45 rpm）下在旋转杆上测试小鼠。记录小鼠持续在转棒上的时间。该行为由摄像机监控。实验结束后，处死小鼠、取纹状体脑组织，进行免疫印记（Western Blot）实验。多巴胺神经元特异表达的蛋白是酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase, TH）。用 TH 抗体进行免疫印记实验，可确定多巴胺神经元是否损伤。特拉唑嗪（TZ，0.1 mg/Kg）设为阳性对照，T2 尝试了三个剂量：0.1 mg/Kg、0.3 mg/Kg、及 1 mg/Kg。

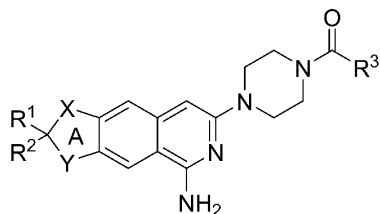
实验结果见图 8，其中，A 为各药物对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠的运动能力的影响，B 为特拉唑嗪对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠体内酪氨酸羟化酶含量的影响，C 为 0.1 mg/Kg 剂量的化合物 T2 对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠体内酪氨酸羟化酶含量的影响。

如图 8 中 A 所示，特拉唑嗪（TZ）处理，可改善 MPTP 损伤状态下小鼠运动能力。T2 的三个剂量皆有保护作用。图 8 中 B 比较了对照组、MPTP 处理组及特拉唑嗪处理组的酪氨酸羟化酶蛋白含量。每组随机取 4 只小鼠的纹状体蛋白。进行免疫印记实验。右侧为统计结果。该结果显示，特拉唑嗪具有保护多巴胺神经元的作用。该组实验为阳性对照。图 8 中 C 为多巴胺神经元，与图 8 中 B 的方法类似。该结果显示，T2 具有保护多巴胺神经元的作用。

以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述，并非对本发明的范围进行限定，在不脱离本发明设计精神的前提下，本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进，均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

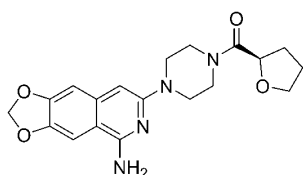
权利要求

1.一种异喹啉类衍生物，其特征在于，所述异喹啉类衍生物的结构通式如下：

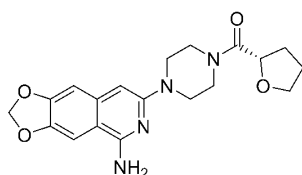


上式中，A 环代表一个可选被取代的五元含氧杂环；X 为 O 或 C，Y 为 O 或 C，且 X 和 Y 中至少含有一个 O；R¹ 代表氢原子或甲基；R² 代表氢原子或甲基；R³ 为五元环烷基或含 1 个杂原子的五元杂环基团，杂原子选自氧原子、氮原子；

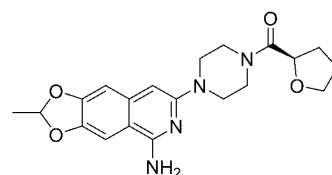
所述异喹啉类衍生物的结构具体如下：



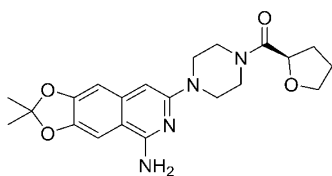
T1



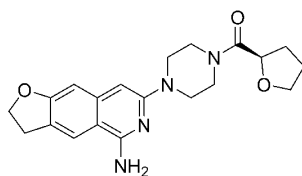
T2



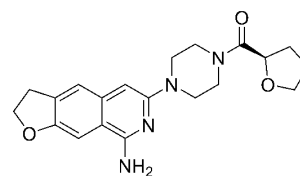
T3



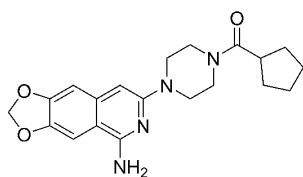
T4



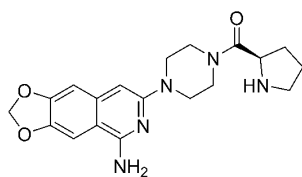
T5



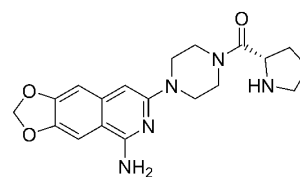
T6



T7



T8



T9

2.一种权利要求 1 所述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐，包括盐酸盐、硫酸盐、氢溴酸盐、硝酸盐、三氟乙酸盐、醋酸盐、磷酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、草酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁二酸盐、苹果酸盐、苯甲酸、柠檬酸盐或乳酸盐。

3.一种异喹啉类衍生物制剂，其特征在于，活性成分为权利要求 1 所述异喹啉类衍生物和/或权利要求 2 所述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐。所述制剂为上述异喹啉类衍生物或上述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐与药学上可接受的辅料，如：水、酒精、植物油、淀

粉、微晶纤维素、乳糖、明胶、硬脂酸镁、海藻酸钠、麦芽糊精、滑石、交联聚维酮、树胶和凡士林等辅料共同制备的各种类型的药物制剂。

4.一种磷酸甘油激酶激活剂，其特征在于，所述激活剂为：权利要求1所述异喹啉类衍生物、权利要求2所述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐或权利要求3所述异喹啉类衍生物制剂。

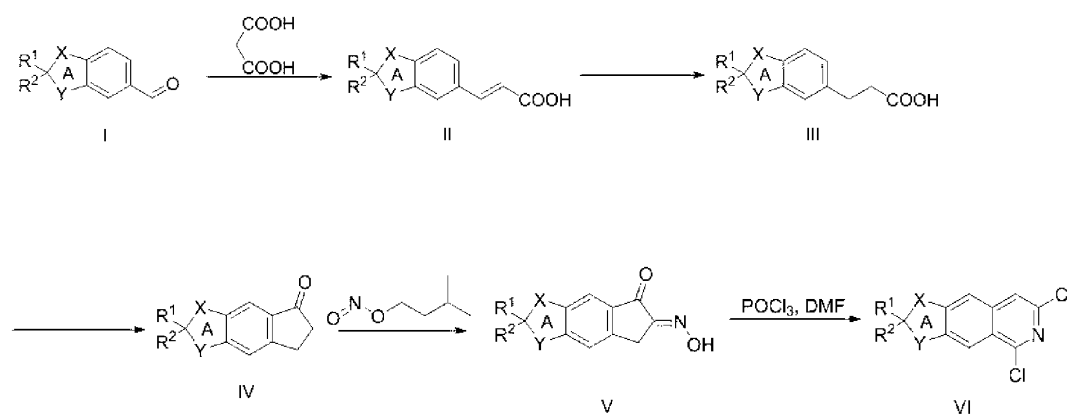
5.一种用于治疗或预防神经退行性疾病的药物，其特征在于，所述药物为：权利要求1所述异喹啉类衍生物、权利要求2所述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐或权利要求3所述异喹啉类衍生物制剂。

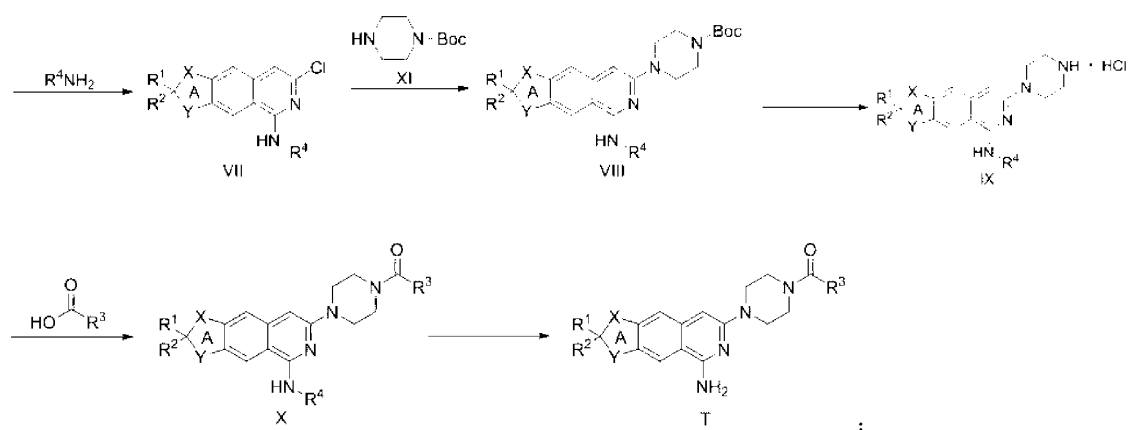
6.一种用于治疗或预防代谢性疾病的药物，其特征在于，所述药物为：权利要求1所述异喹啉类衍生物、权利要求2所述异喹啉类衍生物药学上可接受的盐或权利要求3所述异喹啉类衍生物制剂。

7.一种权利要求1所述异喹啉类衍生物的制备方法，其特征在于，包括以下合成路线或它们的组合：

合成路线 A:

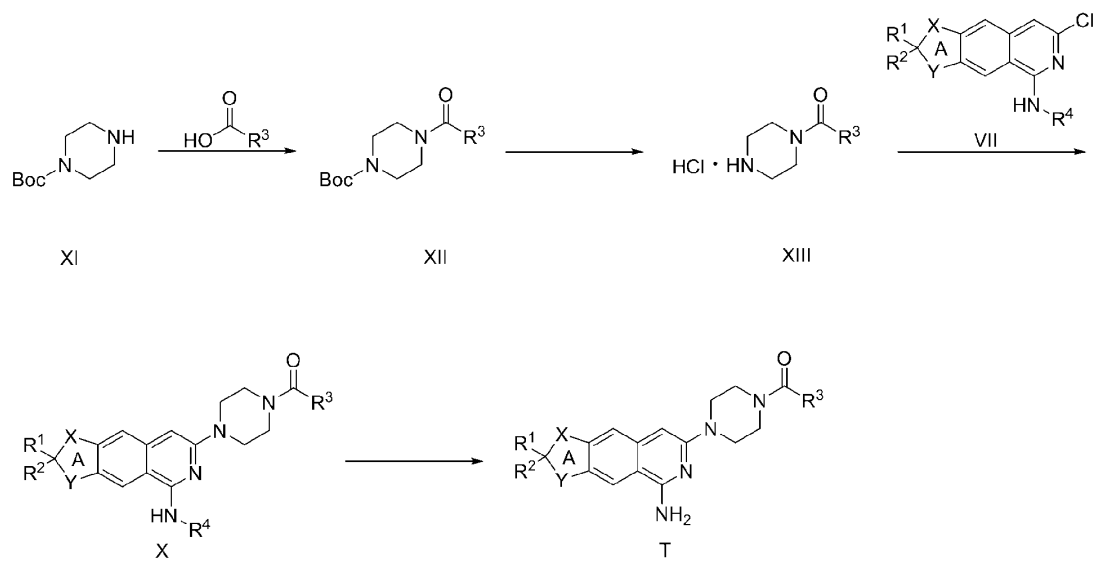
向化合物 I 的溶液中加入丙二酸和哌啶，反应后得到化合物 II；化合物 II 在催化剂和 H_2 氛围下发生反应，制得化合物 III；化合物 III 先与草酰氯反应生成酰氯，再于三氯化铝催化作用下得到化合物 IV；化合物 IV 在酸性条件下与亚硝酸异戊酯反应后得到化合物 V；化合物 V 与三氯氧磷反应，得到化合物 VI；化合物 VI 在 N-甲基吡咯烷酮中与氨基保护试剂反应，制得化合物 VII；化合物 VII、化合物 XI、二氧六环、 $Pd_2(dba)_3$ 、RuPhos 和碳酸铯共同反应，制得化合物 VIII；化合物 VIII 脱去 Boc 保护基得到化合物 IX；化合物 IX 与 R^3-COOH 反应制得化合物 X；化合物 X 与三氟乙酸反应脱除氨基保护，制得所述异喹啉类衍生物化合物 T；反应路线如下：





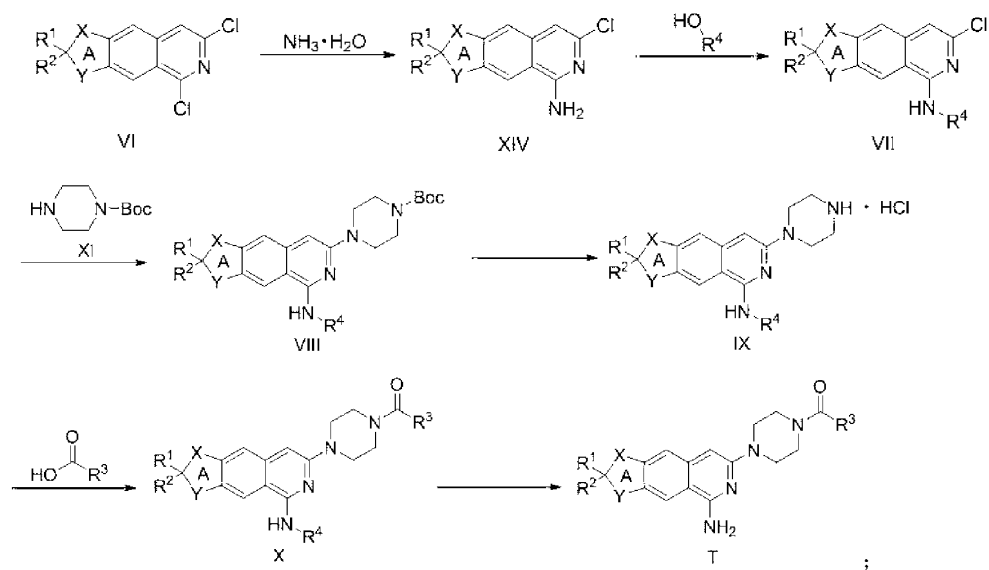
合成路线 B:

化合物 XI 在溶剂中与 R^3-COOH 、O-(7-氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和 N,N-二异丙基乙胺反应制得化合物 XII；化合物 XII 脱去 Boc 保护基得到化合物 XIII；化合物 XIII 与参照合成路线 A 制备的化合物 VII、二氧六环、 $Pd_2(dba)_3$ 、RuPhos 和碳酸铯共同反应，制得化合物 X；化合物 X 与三氟乙酸反应脱除氨基保护，制得所述异喹啉类生物化合物 T；反应路线如下：



合成路线 C:

参照合成路线 A 制备的化合物 VI 和氨水反应制得化合物 XIV；化合物 XIV 与氨基保护试剂反应得到化合物 VII；化合物 VII 参照合成路线 A 的方法制得所述异喹啉类生物化合物 T；反应路线如下：



所述合成路线 A、合成路线 B 和合成路线 C 中涉及化合物的 R^4 基为氨基保护基团。