

## 邻苯二甲酰亚胺-多奈哌齐杂合物的合成及活性评价

王军杰<sup>1,2</sup>, 穆叶舒<sup>2,3</sup>, 洪琛<sup>1\*</sup>, 罗稳<sup>2\*</sup>

(1. 河南大学淮河医院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学天然药物与免疫工程重点实验室, 河南 开封 475004;  
3. 河南大学药学院, 河南 开封 475004)

**摘要:** 本文设计合成了一系列邻苯二甲酰亚胺-多奈哌齐杂合物 (**5a~e**, **6a~l**) 作为选择性的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂。结果表明, 部分化合物具有较强的 AChE 抑制活性, 半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 达到纳摩尔范围, 优于对照药物加兰他敏和他克林, 与多奈哌齐相近。其中 **6k** 对 AChE 的抑制活性最强,  $IC_{50}$  值为  $0.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。酶动力学及分子对接结果表明化合物 **6k** 能够同时作用于 AChE 的催化活性位点和外周结合位点。部分化合物能够抑制 AChE 诱导的  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集。另外, 吸收、分布、代谢和排泄预测结果显示化合物 **6k** 符合 Lipinski 类药五规则且具有较高的油水分配系数。这些化合物特别是 **6k** 可以作为双功能的先导物进行更加深入的活性研究。

**关键词:** 邻苯二甲酰亚胺; 多奈哌齐; 胆碱酯酶;  $\beta$ -淀粉样蛋白; 阿尔茨海默症

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)03-0651-10

## Synthesis and biological activity evaluation of phthalimide-donepezil hybrids

WANG Jun-jie<sup>1,2</sup>, MU Ye-shu<sup>2,3</sup>, HONG Chen<sup>1\*</sup>, LUO Wen<sup>2\*</sup>

(1. Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Key Laboratory of Natural Medicine and Immuno-Engineering, Henan University, Kaifeng 475004, China; 3. School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** A series of phthalimide-donepezil (PTA-DPZ) hybrids (**5a-e**, **6a-l**) were designed, synthesized and evaluated as selective inhibitors of acetylcholinesterase (AChE). The results showed that some hybrids had strong AChE inhibitory activity with half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) at nanomolar range, which was better than the control drugs galanthamine and tacrine, and equivalent to DPZ. Compound **6k** exhibited the strongest inhibition to AChE with an  $IC_{50}$  value of  $0.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Kinetic and molecular modeling studies showed that **6k** targeted both catalytic active site and peripheral anionic site of AChE. Moreover, some compounds could inhibit AChE-induced  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) aggregation. In addition, absorption, distribution, metabolism and excretion prediction results showed **6k** conforms to the Lipinski's rule of five and had high partition coefficient  $P$  value. These compounds, especially **6k**, may be considered as a dual-functional lead compound for in-depth research.

**Key words:** phthalimide; donepezil; cholinesterase;  $\beta$ -amyloid; Alzheimer's disease

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种严重且不可逆、进行性的神经系统退行性脑疾病, AD 随

着年龄的增加发病率显著增高, 因此在老年人群中十分常见<sup>[1]</sup>。AD 的临床表现为记忆认知功能障碍、失语失用、视空间技能损害和人格行为改变等<sup>[2,3]</sup>。目前, 低水平的乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh)、 $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid,  $A\beta$ ) 沉积、 $\tau$ -蛋白聚集、氧化应激、炎症和生物金属稳态失调等因素, 在 AD 发病机制中起着重要作用<sup>[4-7]</sup>。迄今为止, 有五种胆碱酯酶抑制剂在临床上

收稿日期: 2023-07-13; 修回日期: 2023-09-26.

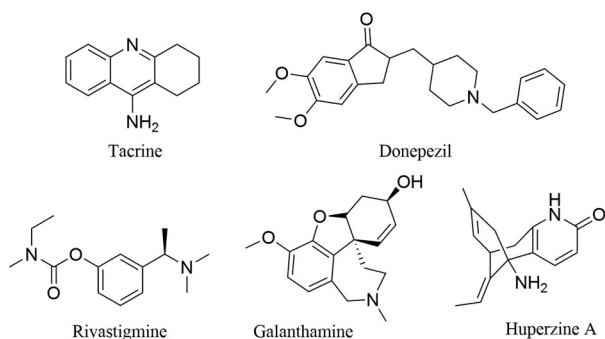
基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20230429); 河南省重点研发与推广专项 (212102311030).

\*通讯作者 Tel: 13783788708, E-mail: hongchenbest@163.com;

Tel: 15225477220, E-mail: luowen83@henu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0863

用于治疗 AD 患者, 分别是他克林 (tacrine, TAC)、多奈哌齐 (donepezil, DPZ)、利凡斯的明、加兰他敏 (galanthamine, GTA) 和石杉碱甲<sup>[8]</sup> (图 1), 它们通过抑制乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 的活性, 提高患者脑内 ACh 水平从而缓解患者的症状<sup>[9,10]</sup>。然而这些药物只能在一定时期内提高患者生存质量, 却无法逆转病情。并且最早获批的 TAC, 由于肝毒性, 会导致 30%~50% 的患者转氨酶升高<sup>[11,12]</sup>, 已经退出临床使用。其他抑制剂如 GTA 和石杉碱甲会产生胃肠道等不良反应, 因此在临床使用中受到一定的限制<sup>[13,14]</sup>。

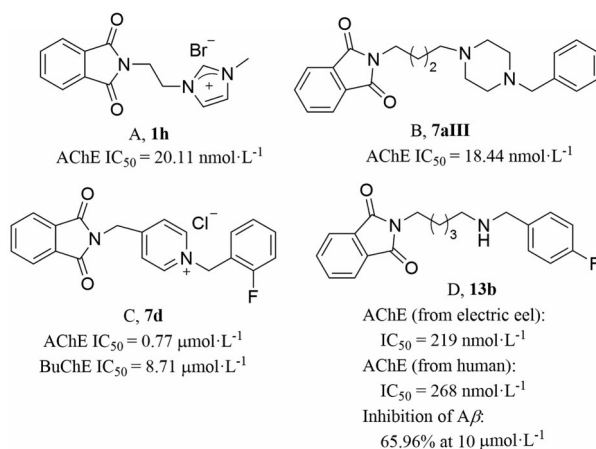


**Figure 1** Structure of the acetylcholinesterase (AChE) inhibitors in clinical use, tacrine (TAC), donepezil (DPZ), rivastigmine, galanthamine (GTA) and huperzine A

DPZ 作为第二代混合型可逆 AChE 抑制剂, 对 AChE 具有高亲和力<sup>[15]</sup>, 在 AD 患者中耐受性良好, 并且可用于肝肾损伤的患者<sup>[16,17]</sup>。由于其安全系数高, 不良反应小, 是治疗轻中度 AD 的一线用药<sup>[18]</sup>。从 AChE 和 DPZ 的共晶结构中可以发现, DPZ 的茛菪酮结构结合在 AChE 的外周结合位点 (peripheral anionic site, PAS), *N*-苄基哌啶结构结合催化活性位点 (catalytic active site, CAS)<sup>[19]</sup>, 是临床上唯一的双位点 AChE 抑制剂。并且 DPZ 的化学结构简单, 易于修饰, 可以与其他活性片段链接构建出丰富的多功能 AChE 抑制剂, 引起了药物化学家的浓厚兴趣和广泛研究<sup>[20-25]</sup>。

邻苯二甲酰亚胺 (phthalimide, PTA) 具有平面芳环和疏水性, 其衍生物表现出广泛的生物活性<sup>[26]</sup>, 如抗炎<sup>[27]</sup>、镇痛<sup>[28]</sup>、抗肿瘤<sup>[29,30]</sup>、单胺氧化酶 B 抑制活性<sup>[31]</sup>等。除此之外, 也有一些文献报道了 PTA 衍生物的胆碱酯酶抑制活性。例如, 2022 年, Yiğit 等<sup>[32]</sup>设想以 PTA 为 PAS 结合单元, 咪唑鎓盐为 CAS 结合单元, 合成了一些 AChE 抑制剂, 部分化合物的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 达到了纳摩尔级 (图 2A, **1h**)。Si 等<sup>[33]</sup>根据 AChE 的双位点结构, 将 PTA 和苄基哌啶通过脂肪烷相连, 得到一系列新的 AChE 抑制剂, 显示出了较强的抑制作用 (图 2B, **7aIII**)。Saeedi 等<sup>[34]</sup>合成了一系列含有 PTA 的 *N*-苄基

吡啶类化合物, 其中 (图 2C, **7d**) 对 AChE 抑制显示出良好的选择性。Guzior 等<sup>[35]</sup>通过脂肪烷基连接 PTA 和含不同取代基的苄胺, 得到了一些具有 AChE 和 Aβ 自聚集抑制活性的化合物 (图 2D, **13b**)。以上研究结果表明, PTA 能够作用于 AChE 的 PAS 位点, 并实现 AChE 的选择性抑制。



**Figure 2** Chemical structures of reported phthalimide-donepezil (PTA-DPZ) derivatives (A-D)

本课题组多年以来一直从事抗 AD 药物研发, 前期作者合成了一系列以 DPZ 结构为基础的萘内酰胺与萘酰亚胺衍生物作为 AChE 抑制剂<sup>[36,37]</sup>。这些化合物在抑制 AChE 活性方面表现出良好的潜力, 部分化合物对 AChE 的 IC<sub>50</sub> 值达到了纳摩尔范围。PTA 与 DPZ 中的茛菪酮具有结构相似性, 因此, 本文设计合成了一系列 PTA-DPZ 衍生物, 并评价了其生物活性, 包括 AChE 和丁酰胆碱酯酶 (butyrylcholinesterase, BuChE) 的抑制活性、酶动力学、分子对接和 AChE 诱导的 Aβ 聚集抑制活性。

## 结果与讨论

### 1 目标化合物的合成

PTA-DPZ 衍生物 **5a~e** 和 **6a~l** 的合成路线如路线 1 所示。中间体 **2a**、**2b** 以 *N*-Boc-4-哌啶甲醇或 *N*-Boc-4-哌啶乙醇、三苯基膦和四溴化碳为起始原料, 三苯基膦和四溴化碳反应被活化, 醇的氧原子进攻卤代三苯基膦得到氧磷鎓盐中间体, 卤离子进行 SN2 反应, 三苯氧磷基团离去, 从而得到中间体 **2a**、**2b**, 此步反应条件温和, 并且由于 P=O 双键的形成利于反应进行, 产率较高<sup>[38]</sup>。PTA 经氢化钠 (60%) 拔氢后, 在无水 *N,N*-二甲基甲酰胺体系中与中间体 **2a**、**2b** 发生取代反应得到中间体 **3a**、**3b**, 中间体 **3a**、**3b** 在 4 mol·L<sup>-1</sup> 氯化氢 1,4-二氧六环溶液中脱 Boc, 生成对应的盐酸盐 **4a**、**4b**。

**4a**、**4b**与带有不同取代基的醛缩合生成席夫碱,再经过三乙酰氧基硼氢化钠还原得到目标产物**5a~e**和**6a~l**,为室温连续反应,条件温和且操作简单。其中**5b~e**、**6b~l**为新化合物,未见文献报道。所有目标产物的结构均通过 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 和HRMS确证。

## 2 胆碱酯酶抑制活性

采用Ellman法<sup>[39]</sup>测试了目标化合物**5a~e**、**6a~l**的胆碱酯酶抑制活性,DPZ、TAC和GTA作为阳性对照药物。首先进行了活性初筛,化合物终浓度为 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,结果见表1。所有化合物(除了**5c**)对AChE的抑制活性均强于BuChE,显示出了选择性抑制作用,与DPZ相同。由于AChE主要存在于中枢神经系统,而BuChE主要存在于外周系统,如肝脏、肾脏、肌肉和肠道等,因此,AChE的选择性抑制剂不良反应更小。此外,由于AChE在AD患者前中期的调控中起主导作用<sup>[40]</sup>,其选择性抑制剂在治疗轻中度患者中可能更具有优势<sup>[41]</sup>。

通过构效关系分析,可得出以下结论:①当取代基相同时,链长( $n$ )为2的化合物对AChE的抑制作用明显强于链长( $n$ )为1的化合物。例如,**6a**(98.47%)>**5a**(41.68%),**6b~e**>**5b~e**。②当链长和取代基相同,但取代位置不同时,对AChE的抑制活性顺序为,邻位(**6k**、**6l**)>间位(**6i**、**6j**)>对位(**6g**、**6h**)。③当链长与取代基位置相同时,取代基不同时,苯环上体积小的基团对活性更为有利,例如4-位取代活性顺序为,H和F(**6a**、**6g**)> $\text{CH}_3$ (**6b**)> $\text{CN}$ , $\text{NO}_2$ ,Cl和 $\text{OCH}_3$ (**6d~f**和**6h**)> $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (**6c**)。

由于链长( $n$ )为2的化合物,**6a**、**6b**、**6g**、**6i~l**对AChE抑制率大于80%,进一步测试了这些化合物对胆碱酯酶的 $\text{IC}_{50}$ 值(表2)。由表2可看出,这7个化合物对AChE抑制活性较强,其中**6a**、**6g**、**6i**、**6k**的 $\text{IC}_{50}$ 值均在纳摩尔范围,优于TAC和GTA,略弱于DPZ。其中2-位F取代的化合物**6k**对AChE抑制活性最强, $\text{IC}_{50}$ 值为 $0.13\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。值得注意的是,F原子取代时,对

**Table 1** Inhibition rate of AChE and butyrylcholinesterase (BuChE).

<sup>a</sup>Inhibition rate were tested at a concentration of  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;

<sup>b</sup>AChE from electric eel; <sup>c</sup>BuChE from equine serum.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

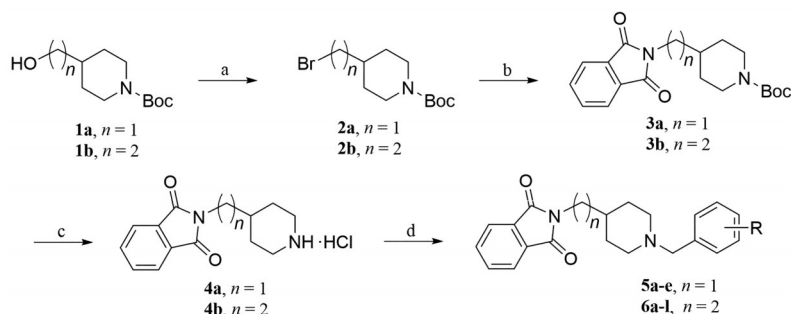
Compd.	Chain length	R	Inhibition rate/% <sup>a</sup>	
			AChE <sup>b</sup>	BuChE <sup>c</sup>
<b>5a</b>	1	4-H	41.68 ± 0.90	29.27 ± 1.10
<b>6a</b>	2	4-H	98.47 ± 1.22	45.59 ± 2.35
<b>5b</b>	1	4-CH <sub>3</sub>	49.44 ± 2.03	5.85 ± 0.24
<b>6b</b>	2	4-CH <sub>3</sub>	93.36 ± 0.71	<5
<b>5c</b>	1	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	12.49 ± 1.04	23.28 ± 1.65
<b>6c</b>	2	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	32.40 ± 1.65	29.01 ± 2.08
<b>5d</b>	1	4-CN	19.37 ± 1.45	10.58 ± 0.53
<b>6d</b>	2	4-CN	51.63 ± 0.65	<5
<b>5e</b>	1	4-NO <sub>2</sub>	41.07 ± 0.90	13.27 ± 1.24
<b>6e</b>	2	4-NO <sub>2</sub>	54.01 ± 1.16	11.88 ± 0.49
<b>6f</b>	2	4-Cl	74.79 ± 2.84	<5
<b>6g</b>	2	4-F	97.57 ± 0.48	51.21 ± 1.11
<b>6h</b>	2	4-OCH <sub>3</sub>	57.85 ± 2.35	<5
<b>6i</b>	2	3-F	98.67 ± 0.62	42.49 ± 0.45
<b>6j</b>	2	3-OCH <sub>3</sub>	89.18 ± 1.02	21.60 ± 0.41
<b>6k</b>	2	2-F	98.78 ± 1.44	40.85 ± 1.66
<b>6l</b>	2	2-OCH <sub>3</sub>	93.02 ± 0.46	14.51 ± 1.34
DPZ	-	-	99.23 ± 0.15	64.22 ± 0.89
TAC	-	-	95.04 ± 2.41	99.18 ± 1.47
GTA	-	-	88.72 ± 0.86	55.65 ± 1.22

**Table 2** Inhibitory activity of cholinesterases and selectivity index.  $\text{IC}_{50}$ : Half maximal inhibitory concentration, values are

mean of the three independent experiments; SI: Selectivity index =  $(\text{IC}_{50}\ \text{AChE}/\text{IC}_{50}\ \text{BuChE})$ .  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Compd.	Chain length	R	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		SI
			AChE	BuChE	
<b>6a</b>	2	4-H	0.16 ± 0.02	31.03 ± 1.16	0.005
<b>6b</b>	2	4-CH <sub>3</sub>	1.25 ± 0.10	>100	<0.013
<b>6g</b>	2	4-F	0.57 ± 0.03	24.76 ± 0.18	0.023
<b>6i</b>	2	3-F	0.14 ± 0.01	36.32 ± 1.37	0.004
<b>6j</b>	2	3-OCH <sub>3</sub>	3.02 ± 0.01	87.58 ± 0.44	0.034
<b>6k</b>	2	2-F	0.13 ± 0.01	46.31 ± 0.80	0.003
<b>6l</b>	2	2-OCH <sub>3</sub>	1.78 ± 0.08	>100	<0.018
DPZ	-	-	0.05 ± 0.01	7.46 ± 0.32	0.007
TAC	-	-	0.18 ± 0.02	0.03 ± 0.004	6.0
GTA	-	-	3.42 ± 0.23	13.23 ± 1.55	0.26

AChE的 $\text{IC}_{50}$ 值均保持在纳摩尔范围。因此,今后的结构修饰可以围绕增加分子长度和F取代数量进行。



**Scheme 1** Synthetic route of the target compounds. Reagents and conditions: (a)  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{CBr}_4$ , DCM, r.t., 24 h, 80%–82%; (b) PTA, NaH, DMF, 90 °C, 4 h; (c)  $4\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl dioxane, 86%–88%; (d) aldehyde, MeOH, r.t., 8 h, 61%–88%

### 3 酶动力学研究

为研究化合物对 AChE 的作用模式, 选择活性最好的化合物 **6k** 对 AChE 抑制动力学进行了研究。图 3A 中所有直线交于坐标轴的第二象限, 这是典型的混合型抑制作用类型, 表明 **6k** 可能同时作用于 AChE 的 CAS 和 PAS 双位点。以图 3A 中直线斜率-化合物浓度作图, 得到图 3B, 直线与 X 轴交点的绝对值为  $K_i$  值, 为  $0.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 4 分子对接研究

运用 Autodock 对接程序<sup>[42]</sup>与 PyMol 软件对活性最强的化合物 **6k** 与 AChE (PDB code: 1EVE) 进行了分子对接, 结果见图 4。由图 4A 可以看到, 酶的表面有一个阴离子洞口, **6k** 中的 PTA 部分位于其入口处, 苜基深入洞口并向谷底方向延伸 (图 4A)。细节图 (图 4B) 可以看出, **6k** 结构中氟取代的苜基和 PTA 分别占据了 AChE 的 CAS 和 PAS 位点。在 CAS 处, 苜基与 Trp84 通过经典的  $\pi$ - $\pi$  相互作用, 苜基与 Trp84 的吡啶环中心的距离分别为  $3.8 \text{ \AA}$  和  $4.1 \text{ \AA}$ 。哌啶环上的氮原子与 Phe330 形成阳离子- $\pi$  相互作用, 距离为  $4.0 \text{ \AA}$ 。在 PAS 处, PTA 羰基上的氧原子与 Tyr121 具有氢键作用, 氢键的长度为  $3.0 \text{ \AA}$ 。PTA 的苯环与 Trp279 形成  $\pi$ - $\pi$  堆叠作用, 可能通过疏水作用与 PAS 部位结合。**6k** 的双位点作用模式与阳性药物 DPZ 十分相似 (图 4C)。不同的是, DPZ 的羰基与 Phe288 形成了氢键。以上结

果表明, 化合物 **6k** 与 AChE 是双位点结合模式, 与酶动力学研究结果一致。

### 5 $A\beta$ 聚集抑制活性

有文献<sup>[43]</sup>报道 PTA 衍生物能够抑制  $A\beta$  聚集<sup>[35]</sup>, 且 AChE 的 PAS 位点能够与  $A\beta$  结合并促进其聚集。因此, 采用硫磺素 T (thioflavin T, ThT) 法测试了表 2 中化合物对 AChE 诱导的  $A\beta_{1-42}$  聚集抑制活性, 以姜黄素 (curcumin, Cur)、DPZ 和 TAC 为对照, 结果见图 5。由图 5 可以看出, 测试化合物、Cur 和 DPZ 在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下对 AChE 诱导的  $A\beta_{1-42}$  聚集均有较强的抑制活性, 抑制率从 14.7% 到 31.3%, 其中化合物 **6a**、**6i** 和 **6k** 的活性最强, 抑制率分别为 25.3%、27.1% 和 24.8%, 与 DPZ 相近 (26.4%), 略低于 Cur (31.3%)。而作用于 CAS 位点的抑制剂 TAC 抑制率很弱 (4.2%)。因此, 这些双位点抑制剂可能通过占据 PAS 位点从而抑制了 AChE 诱导的  $A\beta$  聚集。

### 6 ADME 预测

药物能够穿过血脑屏障 (BBB) 对于靶向中枢神经系统的药物十分必要, 亲脂性也是穿过 BBB 的关键因素。使用预测系统对活性较好的化合物 **6a**、**6i**、**6k** 进行 BBB 渗透预测<sup>[44]</sup>。同时使用吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 预测网站进行脂水分配系数 (Log  $P$ ) 及其他物理化学性质的预测<sup>[45]</sup>。Log  $P$  等值预测结果见表 3。结果显示, 化合物 **6a**、**6i**、**6k** 透过分数分别为

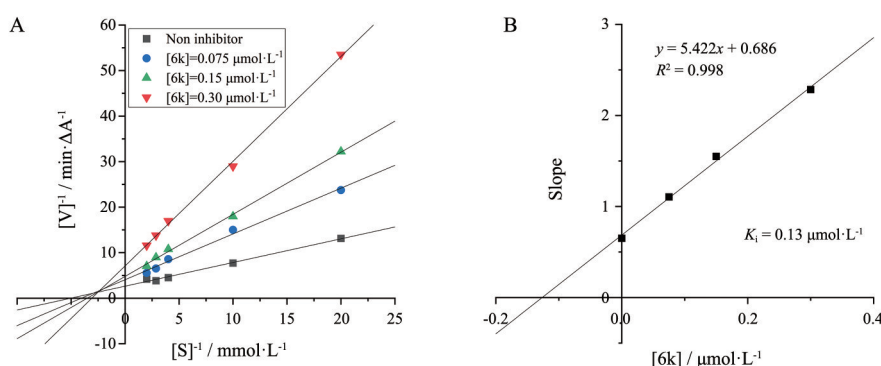


Figure 3 Kinetics study of **6k** with AChE. Lineweaver-Burk plots (A) and Dixon plot (B) for **6k**

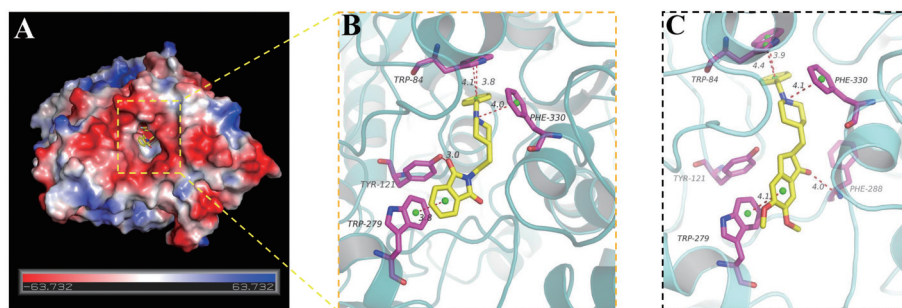
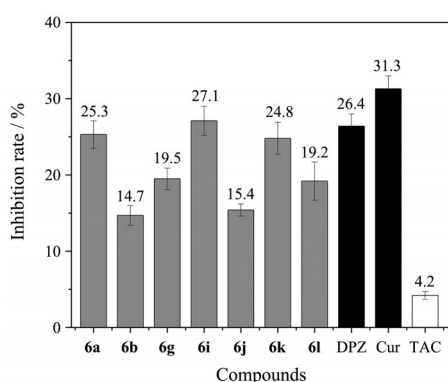


Figure 4 Docking results of **6k** and DPZ. The potential distribution surface diagram of AChE for **6k** (A); docking model for **6k** (B) and DPZ (C) with AChE



**Figure 5** Inhibition of AChE (0.06 U) induced Aβ<sub>1-42</sub> (20 μmol·L<sup>-1</sup>) aggregation by tested compounds (10 μmol·L<sup>-1</sup>). Cur: Curcumin

**Table 3** Calculated parameters of Lipinski's rule of five, its violation and drug-likeness for **6a**, **6i**, **6k** and DPZ. <sup>a</sup>Log *P*: Calculated lipophilicity; <sup>b</sup>TPSA: Total polar surface area; <sup>c</sup>MW: Molecular weight; <sup>d</sup>*n*HBA: Number of hydrogen bond acceptor; <sup>e</sup>*n*HBD: Number of hydrogen bond donor; <sup>f</sup>*n*RB: Number of rotatable bonds; <sup>g</sup>*n*Vs: Number of violations from Lipinski's rule of five

Compd.	Parameter of Lipinski's rule of five							Drug-likeness
	Log <i>P</i> <sup>a</sup>	TPSA <sup>b</sup>	MW <sup>c</sup>	<i>n</i> HBA <sup>d</sup>	<i>n</i> HBD <sup>e</sup>	<i>n</i> RB <sup>f</sup>	<i>n</i> Vs <sup>g</sup>	
<b>6a</b>	3.46	40.62	348.44	3	0	5	0	Yes
<b>6i</b>	3.62	40.62	366.43	4	0	5	0	Yes
<b>6k</b>	3.54	40.62	366.43	4	0	5	0	Yes
DPZ	3.92	38.77	379.49	4	0	6	0	Yes

0.140、0.117、0.117, DPZ 得分为 0.135, 数值高于 0.02 表示该化合物具有 BBB 透过能力, 并且 **6a**、**6i**、**6k** 符合类药五规则, 具有作为口服药物的潜力。

## 结论

综上所述, 本文合成了一系列新的 PTA-DPZ 杂合物作为双位点 AChE 抑制剂。结果表明这些化合物均表现出了 AChE 选择性抑制, 其中链长为 2 的系列化合物对 AChE 抑制作用更强。活性最好的是 **6k**, IC<sub>50</sub> 值为 0.13 μmol·L<sup>-1</sup>。酶动力学和分子对接研究表明化合物 **6k** 能够同时作用于 AChE 的 CAS 和 PAS 双位点。AChE 抑制活性较强的化合物在 10 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度下对 AChE 诱导的 Aβ<sub>1-42</sub> 聚集均有较强的抑制活性。代表化合物 **6a**、**6i** 和 **6k** 的 ADME 预测结果表明它们具有良好的亲脂性和 BBB 透过性, 符合类药五规则。以上结果为进一步设计新型双位点 AChE 抑制剂提供重要依据。

## 实验部分

### 1 仪器与试剂

Bruker AV-300 型超导核磁共振仪, TMS 为内标、Esquire3000 型 LC-MS 质谱仪 (德国 Bruker 公司); X-4

显微熔点仪 (上海康华生化公司); WFH-204B 型手提式紫外灯 (上海精科实业公司); PowerWave XS 全波长酶标仪 (美国伯腾公司); 薄层层析板和硅胶 (200~300 目, 青岛海洋硅胶厂); AChE (E.C. 3.1.1.7, 来源于电鳗)、BuChE (E.C. 3.1.1.8, 来源于马血清)、硫代乙酰胆碱 (acetylthiocholine, ATC)、硫代丁酰胆碱 (butylthiocholine, BTC)、5,5'-二硫代双 (2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB]、TAC、DPZ 和 GTA 购于 Sigma-Aldrich 公司; 其他试剂均为市售分析纯, 未作进一步处理。

## 2 化学合成

### 2.1 中间体 2a、2b

称取三苯基膦 (3.93 g, 15 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 0 °C 下, 将其滴加到 *N*-Boc-4-哌啶甲醇或 *N*-Boc-4-哌啶乙醇 (10 mmol) 和四溴化碳 (4.97 g, 15 mmol) 的二氯甲烷溶液中。滴加完毕, 升至室温, 搅拌 24 h。反应停止, 抽滤, 蒸除溶剂, 柱色谱 (石油醚-乙酸乙酯 50:1), 得中间体 **2a**、**2b**。

**2.1.1 4-(溴甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (2a)** 无色油状液, 产率 80%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.13 (dt, *J* = 12.0, 3.0 Hz, 2H), 3.28 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.68 (t, *J* = 12.0 Hz, 2H), 1.83~1.78 (m, 2H), 1.78~1.69 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.27~1.05 (m, 2H); ESI-MS *m/z*: 278.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**2.1.2 4-(2-溴乙基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (2b)** 无色油状液, 产率 83%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.03 (dt, *J* = 15.0, 3.0 Hz, 2H), 3.38 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 12.9 Hz, 2H), 1.79~1.69 (m, 2H), 1.66~1.56 (m, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.13~0.98 (m, 2H); ESI-MS *m/z*: 292.1 [M+H]<sup>+</sup>。

### 2.2 中间体 3a、3b

称取 60% 的氢化钠 (0.60 g, 15 mmol) 于 250 mL 圆底烧瓶中, 称取邻苯二甲酰亚胺 (1.76 g, 12 mmol) 溶于 30 mL 无水 *N,N*-二甲基甲酰胺中, 在 0 °C 滴加到烧瓶内, 并搅拌 30 min。搅拌停止后, 升至室温, 将中间体 **2a** 或 **2b** (10 mmol) 加入到烧瓶中, 升温至 90 °C, 反应 4 h。反应停止, 用水淬灭, 蒸除溶剂, 加水, 乙酸乙酯萃取 3 次, 收集有机层, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥后蒸除溶剂, 得白色糊状固体, 即中间体 **3a**、**3b**, 无需提纯直接进行下一步反应。

### 2.3 中间体 4a、4b

将上述中间体 **3a** 或 **3b** 用 10 mL 二氯甲烷溶解, 加入 10 mL 4 mol·L<sup>-1</sup> 氯化氢的 1,4-二氧六环溶液, 室温搅拌过夜, 反应完毕, 过滤, 滤饼用二氯甲烷洗涤并干燥, 得中间体 **4a**、**4b**。

**2.3.1 2-(哌啶-4-基甲基)异吲哚啉-1,3-二酮盐酸盐 (4a)** 白色固体, 产率 86%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.60 (s, 4H), 3.39 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.27 (dt,  $J = 12.0, 3.0$  Hz, 2H), 2.79 (t,  $J = 11.7$  Hz, 2H), 1.95~1.85 (m, 1H), 1.82~1.72 (m, 2H), 1.39~1.24 (m, 2H); ESI-MS  $m/z$ : 245.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**2.3.2 2-(2-(哌啶-3-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮盐酸盐 (4b)** 白色固体, 产率 88%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.72 (s, 4H), 3.62 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 3.40 (d,  $J = 12.6$  Hz, 2H), 2.93 (t,  $J = 12.6$  Hz, 2H), 2.00 (d,  $J = 13.6$  Hz, 2H), 1.65~1.53 (m, 3H), 1.47~1.34 (m, 2H); ESI-MS  $m/z$ : 259.1 [M+H]<sup>+</sup>。

#### 2.4 目标化合物的合成通法

在 100 mL 的圆底烧瓶中加入中间体 **4a** 或 **4b** (0.8 mmol)、相应的醛 (1 mmol) 和 15 mL 甲醇, 室温搅拌 8 h。反应停止, 蒸干溶剂后, 残余物中加入 15 mL 甲醇, 分批加入三乙酰氧基硼氢化钠 (0.85 g, 4 mmol), 室温搅拌过夜。反应完毕, 蒸除溶剂, 加水, 乙酸乙酯水萃取 3 次, 合并有机层, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 蒸除溶剂, 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 50:1), 得目标化合物。

**2.4.1 2-((1-苄基哌啶-4-基)甲基)异吲哚啉-1,3-二酮 (5a)** 白色固体, 产率 80%; 熔点 118.4~120.1 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.89 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.79 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.45~7.30 (m, 5H), 3.66 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.61 (s, 2H), 2.99 (dt,  $J = 9.0, 3.0$  Hz, 2H), 2.05 (t,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 1.93~1.81 (m, 1H), 1.76~1.64 (m, 2H), 1.57~1.43 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  168.6, 137.9, 134.0, 132.0, 129.3, 128.2, 127.1, 123.2, 63.0, 53.0, 43.3, 35.4, 29.8; HRMS (ESI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup> 计算值 335.175 4; 测量值 335.176 4。

**2.4.2 2-((1-(4-甲基苄基)哌啶-4-基)甲基)异吲哚啉-1,3-二酮 (5b)** 白色固体, 产率 82%; 熔点 65.7~67.6 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.83 (t,  $J = 3.0$  Hz, 2H), 7.71 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.19 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.11 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 3.59 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.50 (s, 2H), 2.91 (dt,  $J = 12.0, 3.0$  Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.97 (t,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 1.85~1.73 (m, 1H), 1.68~1.62 (m, 2H), 1.50~1.36 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  168.6, 136.8, 134.0, 132.0, 129.3, 128.9, 123.2, 62.7, 52.9, 43.3, 35.3, 29.7, 21.1; HRMS (ESI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup> 计算值 349.191 1; 测量值 349.191 7。

**2.4.3 2-((1-(4-(叔丁基)苄基)哌啶-4-基)甲基)异吲哚啉-1,3-二酮 (5c)** 白色固体, 产率 85%; 熔点 98.7~100.2 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.82 (dd,  $J = 5.4, 3.0$  Hz, 2H), 7.68 (dd,  $J = 5.4, 3.0$  Hz, 2H), 7.32 (dt,

$J = 9.0, 3.0$  Hz, 2H), 7.23 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 3.60 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.47 (s, 2H), 2.89 (dt,  $J = 9.0, 3.0$  Hz, 2H), 1.94 (t,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 1.83~1.77 (m, 1H), 1.67~1.60 (m, 2H), 1.47~1.40 (m, 2H), 1.32 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  168.5, 149.7, 135.2, 133.9, 132.0, 128.9, 125.0, 123.2, 62.8, 53.1, 43.3, 35.5, 34.4, 31.5, 30.0; HRMS (ESI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup> 计算值 391.238 0; 测量值 391.239 0。

**2.4.4 4-((1-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)甲基)哌啶-1-基)甲基)苯腈 (5d)** 白色固体, 产率 68%; 熔点 142.3~143.7 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.85 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 7.83 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.71 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.60 (dt,  $J = 6.0, 3.0$  Hz, 2H), 7.47 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 3.60 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 2.87 (dt,  $J = 9.0, 3.0$  Hz, 2H), 2.04 (t,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 1.88~1.78 (m, 1H), 1.71~1.65 (m, 2H), 1.52~1.38 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  168.6, 134.1, 132.2, 132.0, 129.7, 123.3, 119.0, 62.3, 53.1, 43.1, 35.1, 29.6; HRMS (ESI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup> 计算值 360.170 7; 测量值 360.171 6。

**2.4.5 2-((1-(4-硝基苄基)哌啶-4-基)甲基)异吲哚啉-1,3-二酮 (5e)** 白色固体, 产率 63%; 熔点 179.8~180.4 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.15 (dt,  $J = 9.0, 3.0$  Hz, 2H), 7.84 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 7.82 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 3.61 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 2.85 (dt,  $J = 12.0, 3.0$  Hz, 2H), 2.02 (t,  $J = 10.5$  Hz, 2H), 1.88~1.76 (m, 1H), 1.70~1.64 (m, 2H), 1.50~1.37 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  168.7, 147.1, 146.5, 134.0, 132.0, 129.5, 123.5, 123.3, 62.2, 53.3, 43.2, 35.2, 29.8; HRMS (ESI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sup>+</sup> 计算值 380.160 5; 测量值 380.161 3。

**2.4.6 2-(2-(1-苄基哌啶-4-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮 (6a)** 白色固体, 产率 88%; 熔点 79.5~81.2 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.82 (dd,  $J = 4.8, 3.3$  Hz, 2H), 7.76~7.62 (m, 2H), 7.37~7.29 (m, 3H), 7.27 (d,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 3.70 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.93 (d,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 2.00 (t,  $J = 10.5$  Hz, 2H), 1.77 (d,  $J = 11.7$  Hz, 2H), 1.62 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 1.45~1.29 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  168.4, 133.9, 132.2, 129.5, 128.3, 127.3, 123.2, 63.1, 53.4, 35.8, 35.0, 33.2, 31.6; HRMS (ESI):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup> 计算值 349.191 1; 测量值 349.191 1。

**2.4.7 2-(2-(1-(4-甲基苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮 (6b)** 白色固体, 产率 81%; 熔点 62.7~

64.1 °C;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.87~7.77 (m, 2H), 7.77~7.63 (m, 2H), 7.21 (d,  $J=7.8$  Hz, 2H), 7.12 (d,  $J=7.8$  Hz, 2H), 3.70 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 2.94 (d,  $J=10.8$  Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.06~1.95 (m, 2H), 1.77 (d,  $J=12.0$  Hz, 2H), 1.62 (q,  $J=6.9$  Hz, 2H), 1.46~1.34 (m, 2H), 1.33~1.28 (m, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.4, 136.9, 133.9, 132.2, 129.5, 129.0, 123.2, 62.8, 53.3, 35.8, 35.0, 33.2, 31.6, 21.2; HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2^+$ ) 计算值 363.206 7; 测量值 363.207 2。

**2.4.8 2-(2-(1-(4-(叔丁基)苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮 (6c)** 白色固体, 产率 70%; 熔点 83.2~84.1 °C;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.83 (d,  $J=7.8$  Hz, 2H), 7.71 (t,  $J=4.5$  Hz, 2H), 7.33 (d,  $J=7.8$  Hz, 2H), 7.24 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H), 3.71 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 3.50 (s, 2H), 2.92 (dt,  $J=12.0, 3.0$  Hz, 2H), 1.97 (t,  $J=10.8$  Hz, 2H), 1.77 (d,  $J=11.2$  Hz, 2H), 1.67~1.58 (m, 2H), 1.31 (s, 9H), 1.29~1.22 (m, 3H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.4, 150.0, 134.6, 133.9, 132.2, 129.2, 125.1, 123.2, 62.9, 53.6, 35.8, 35.1, 34.5, 33.3, 31.8, 31.4, 29.7; HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2^+$ ) 计算值 405.253 7; 测量值 405.252 7。

**2.4.9 4-((4-(2-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)乙基)哌啶-1-基)甲基)苯腈 (6d)** 白色固体, 产率 63%; 熔点 142.7~143.8 °C;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.81 (d,  $J=3.0$  Hz, 2H), 7.69 (t,  $J=3.0$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J=7.8$  Hz, 2H), 7.41 (d,  $J=7.8$  Hz, 2H), 3.69 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 3.49 (s, 2H), 2.79 (d,  $J=10.5$  Hz, 2H), 1.94 (t,  $J=9.6$  Hz, 2H), 1.78~1.68 (m, 2H), 1.64~1.52 (m, 2H), 1.36~1.24 (m, 3H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.4, 144.7, 133.9, 132.1, 129.5, 123.2, 119.0, 110.7, 62.8, 53.8, 35.8, 35.1, 33.2, 32.0; HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2^+$ ) 计算值 374.186 3; 测量值 374.187 0。

**2.4.10 2-(2-(1-(4-硝基苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮 (6e)** 白色固体, 产率 62%; 熔点 141.9~142.6 °C;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.16 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 7.83 (d,  $J=7.8$  Hz, 2H), 7.71 (t,  $J=7.8$  Hz, 2H), 7.51 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H), 3.71 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.85 (d,  $J=10.8$  Hz, 2H), 2.01 (t,  $J=10.5$  Hz, 2H), 1.78 (d,  $J=9.3$  Hz, 2H), 1.69~1.54 (m, 2H), 1.43~1.26 (m, 3H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.4, 147.1, 146.6, 132.1, 129.5, 123.5, 123.2, 62.4, 53.8, 35.8, 35.1, 33.2, 32.0; HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4^+$ ) 计算值 394.176 1; 测量值 394.176 5。

**2.4.11 2-(2-(1-(4-氯苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚**

**啉-1,3-二酮 (6f)** 白色固体, 产率 61%; 熔点 107.6~108.2 °C;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.87 (s, 2H), 7.82~7.63 (m, 2H), 7.30 (s, 4H), 3.75 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 3.50 (s, 2H), 2.90 (d,  $J=10.5$  Hz, 2H), 1.99 (t,  $J=10.2$  Hz, 2H), 1.80 (d,  $J=9.3$  Hz, 2H), 1.72~1.60 (m, 2H), 1.45~1.32 (m, 3H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.4, 136.6, 133.9, 132.8, 132.2, 130.6, 128.3, 123.2, 62.5, 53.5, 35.8, 35.1, 33.3, 31.8; HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_2^+$ ) 计算值 383.152 1; 测量值 383.152 6。

**2.4.12 2-(2-(1-(4-氟苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮 (6g)** 白色固体, 产率 85%; 熔点 76.1~77.4 °C;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.82 (dd,  $J=5.1, 2.7$  Hz, 2H), 7.77~7.58 (m, 2H), 7.29 (d,  $J=6.3$  Hz, 2H), 6.98 (t,  $J=8.4$  Hz, 2H), 3.70 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 3.49 (s, 2H), 2.89 (d,  $J=11.1$  Hz, 2H), 1.97 (t,  $J=10.8$  Hz, 2H), 1.77 (d,  $J=10.8$  Hz, 2H), 1.61 (q,  $J=6.6$  Hz, 2H), 1.42~1.27 (m, 3H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.4, 133.9, 132.1, 130.9, 123.2, 115.2, 114.9, 62.3, 53.4, 35.7, 35.0, 33.2, 31.7, 29.7; HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{FN}_2\text{O}_2^+$ ) 计算值 367.181 6; 测量值 367.181 8。

**2.4.13 2-(2-(1-(4-甲氧基苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮 (6h)** 米色油状液, 产率 80%;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.85~7.76 (m, 2H), 7.69 (dd,  $J=5.1, 3.0$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H), 6.84 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.69 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.00 (d,  $J=11.4$  Hz, 2H), 2.04 (d,  $J=13.2$  Hz, 2H), 1.79 (d,  $J=12.6$  Hz, 2H), 1.62 (q,  $J=6.9$  Hz, 2H), 1.52~1.38 (m, 2H), 1.35~1.27 (m, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.4, 159.2, 133.9, 132.1, 131.2, 123.2, 113.8, 61.9, 55.3, 52.9, 35.7, 34.9, 32.9, 31.0; HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3^+$ ) 计算值 379.201 6; 测量值 379.201 8。

**2.4.14 2-(2-(1-(3-氟苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮 (6i)** 米色油状液, 产率 86%;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.94~7.77 (m, 2H), 7.76~7.60 (m, 2H), 7.23 (d,  $J=6.9$  Hz, 1H), 7.07 (t,  $J=6.3$  Hz, 2H), 6.92 (t,  $J=6.9$  Hz, 1H), 3.71 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H), 3.48 (s, 2H), 2.87 (d,  $J=9.3$  Hz, 2H), 1.96 (t,  $J=10.5$  Hz, 2H), 1.76 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H), 1.67~1.53 (m, 2H), 1.46~1.28 (m, 3H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.4, 133.9, 132.2, 129.5, 124.7, 123.2, 116.0, 115.7, 114.0, 113.8, 62.7, 53.6, 35.8, 35.1, 33.3, 31.9; HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{FN}_2\text{O}_2^+$ ) 计算值 367.181 6; 测量值 367.182 1。

**2.4.15 2-(2-(1-(3-甲氧基苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚**

**啉-1,3-二酮 (6j)** 白色固体, 产率81%; 熔点71.2~72.4 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.81 (t, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.69 (t, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.21 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.01~6.84 (m, 2H), 6.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 2.95 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.02 (t, *J* = 10.8 Hz, 2H), 1.77 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 1.62 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.49~1.26 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.4, 159.6, 133.9, 132.1, 129.2, 123.2, 121.8, 114.9, 113.0, 62.9, 55.3, 53.4, 35.7, 35.0, 33.1, 31.4; HRMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>) 计算值379.201 6; 测量值379.200 9。

**2.4.16 2-(2-(1-(2-氟苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮 (6k)** 白色固体, 产率82%; 熔点74.3~76.2 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82 (s, 2H), 7.70 (s, 2H), 7.36 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.00 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.70 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.89 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 2.00 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 1.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 1.68~1.53 (m, 2H), 1.42~1.25 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.4, 133.9, 132.2, 131.7, 131.6, 128.7, 128.6, 123.2, 115.3, 115.0, 55.5, 53.4, 35.8, 35.1, 33.2, 32.0, 29.7; HRMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>) 计算值367.181 6; 测量值367.182 4。

**2.4.17 2-(2-(1-(2-甲氧基苄基)哌啶-4-基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮 (6l)** 米色油状液, 产率86%; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.89~7.82 (m, 2H), 7.81~7.70 (m, 2H), 7.47 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.85 (s, 5H), 3.74 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.16 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 11.4 Hz, 2H), 2.06 (s, 1H), 1.86 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.68 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.61~1.48 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.4, 158.0, 134.0, 132.1, 129.4, 123.2, 120.6, 110.6, 55.5, 54.9, 52.5, 35.6, 34.8, 32.4, 30.5; HRMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>) 计算值379.201 6; 测量值379.201 9。

### 3 胆碱酯酶抑制活性

在96孔板中选取6个孔, 每孔加入10 μL胆碱酯酶溶液, 以及0、5、10、20、35、50 μL待测化合物溶液, 加入0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH = 8.0磷酸缓冲溶液使总体积为100 μL, 37 °C孵育15 min, 加入ATC (10 μL)、DTNB (10 μL)及缓冲液(80 μL)的混合液共计100 μL, 混匀后测其在λ = 412 nm处的A值(A<sub>样本</sub>), 参比用磷酸缓冲溶液。ATC的自发水解为A<sub>自发</sub>, 以未加样品所测得的A<sub>control</sub>作为100个活力单位。相对酶活力=(A<sub>样本</sub> - A<sub>自发</sub>)/ (A<sub>control</sub> - A<sub>自发</sub>) × 100, 然后以酶的相对活力对抑制剂浓

度作图, 根据抑制曲线求得化合物的IC<sub>50</sub>值。实验重复3次, 取平均值。

### 4 酶动力学研究

酶的动力学研究使用Ellman方法进行, 用PBS将底物ATC稀释备用。对于每种浓度的待测化合物, 使用五种不同浓度的ATC测定。平行对照实验组在不含抑制剂的情况下进行。动力学利用AChE催化ATC水解来进行, 记录412 nm处的紫外吸收。抑制类型通过Lineweaver-Burk图进行判定。

### 5 分子对接

采用Autodock 4.2软件进行分子对接, 选取对AChE抑制活性最好的化合物6k为代表化合物, AChE晶体结构文件从PDB中下载, 编码为1EVE。对接之前首先对蛋白质和化合物进行预处理: 将蛋白质中的抑制剂和水分子删除, 将氨基酸残基加氢, 赋予Gasteiger电荷等; 对化合物进行电荷计算, 设定可旋转键。得到的蛋白质结构是由AUOTOGGRID为配体上的每个原子类型进行原子亲和性的格点计算, 每个网格点相距0.375 Å, 网格盒子分别置于酶活性的底部, 中心坐标为[2.781 64.383 67.971], 格子的大小设定为50×46×46 Å, 包含了活性口袋中的所有残基。对接计算使用拉马克遗传算法(LGA), 随机个体群为150, 能量评估系数为2 500 000, 其他参数为软件默认参数。

### 6 AChE诱导的Aβ<sub>1-42</sub>聚集抑制活性

采用硫磺素T法对化合物进行Aβ<sub>1-42</sub>聚集抑制测定<sup>[46]</sup>。化合物用二甲基亚砷溶解为10 mmol·L<sup>-1</sup>的母液, 使用前用PBS稀释。AChE用超纯水溶解为母液并用PBS稀释。取Aβ<sub>1-42</sub>蛋白10 μL与化合物10 μL于离心管中, 加入AChE溶液或PBS, 使化合物、Aβ<sub>1-42</sub>和AChE的终浓度分别为10 μmol·L<sup>-1</sup>、20 μmol·L<sup>-1</sup>和0.06 U, 混匀在37 °C孵育48 h。空白对照为Aβ<sub>1-42</sub>与AChE, 阳性对照为Aβ<sub>1-42</sub>与DPZ、TAC或Cur。孵育后将其转移至5 mL离心管中, 加入10 μmol·L<sup>-1</sup> ThT溶液480 μL, 混匀并避光反应10 min。最后加入2 mL的50 mmol·L<sup>-1</sup>甘氨酸-NaOH缓冲液, 混匀后测量荧光吸收值(λ<sub>ex</sub> = 450 nm, λ<sub>em</sub> = 482 nm)。

**作者贡献:** 王军杰完成了大部分目标化合物的合成、结构鉴定和活性评价; 穆叶舒完成小部分化合物合成和结构鉴定; 洪琛完成了细胞实验, 撰写活性部分内容并提供经费支持; 罗稳负责化合物的设计、指导实验和审校稿件等工作。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

### References

- [1] Morató X, Pytel V, Jofresa S, et al. Symptomatic and disease-modifying therapy pipeline for Alzheimer's disease: towards a

- personalized polypharmacology patient-centered approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 9305.
- [2] Si ZZ, Zou CJ, Mei X, et al. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease: from mechanisms to clinical applications [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18: 708-715.
- [3] Wang Q, Yuan W, Yang X, et al. Role of cofilin in Alzheimer's disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 584898.
- [4] Zhou LL, Qian K, Yang P, et al. Research progress on mitochondrial oxidative stress and corresponding targeted delivery systems in Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1630-1640.
- [5] Mary A, Eysert F, Checler F, et al. Mitophagy in Alzheimer's disease: molecular defects and therapeutic approaches [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28: 202-216.
- [6] Lei P, Ayton S, Bush AI. The essential elements of Alzheimer's disease [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100105.
- [7] Thakral S, Yadav A, Singh V, et al. Alzheimer's disease: molecular aspects and treatment opportunities using herbal drugs [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 88: 101960.
- [8] Zhang P, Ji H, Hu QH. Research progress in clinical treatment of Alzheimer's disease and potential drugs from natural products [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1954-1961.
- [9] Kumar B, Dwivedi AR, Arora T, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of *N*-propargylated diphenylpyrimidines as multitarget directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2022, 13: 2122-2139.
- [10] Zhang Z, Lv J, Wang Y, et al. Static binding and dynamic transporting-based design of specific ring-chain-ring acetylcholinesterase inhibitor: from galantamine to natural product [J]. *Chemistry*, 2023, 29: e202203363.
- [11] Bublely A, Erofeev A, Gorelkin P, et al. Tacrine-based hybrids: past, present, and future [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 1717.
- [12] Farlow M, Gracon SI, Hershey LA, et al. A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. The tacrine study group [J]. *JAMA*, 1992, 268: 2523-2529.
- [13] Lockhart IA, Mitchell SA, Kelly S. Safety and tolerability of donepezil, rivastigmine and galantamine for patients with Alzheimer's disease: systematic review of the 'real-world' evidence [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2009, 28: 478-492.
- [14] Zhang L, Song Y, Lu C, et al. The effects of huperzine A on gastrointestinal acetylcholinesterase activity and motility after single and multiple dosing in mice [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5: 793-796.
- [15] Silva MA, Kiametis AS, Treptow W. Donepezil inhibits acetylcholinesterase *via* multiple binding modes at room temperature [J]. *J Chem Inf Model*, 2020, 60: 3463-3471.
- [16] Shigeta M, Homma A. Donepezil for Alzheimer's disease: pharmacodynamic, pharmacokinetic, and clinical profiles [J]. *CNS Drug Rev*, 2001, 7: 353-368.
- [17] Prvulovic D, Schneider B. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of donepezil for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014, 10: 1039-1050.
- [18] Liang J, Li J, Jia R, et al. Identification of the optimal cognitive drugs among Alzheimer's disease: a Bayesian meta-analytic review [J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 2061-2073.
- [19] Kryger G, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs [J]. *Structure*, 1999, 7: 297-307.
- [20] Makarian M, Gonzalez M, Salvador SM, et al. Synthesis, kinetic evaluation and molecular docking studies of donepezil-based acetylcholinesterase inhibitors [J]. *J Mol Struct*, 2022, 1247: 131425.
- [21] Eissa KI, Kamel MM, Mohamed LW, et al. Development of new Alzheimer's disease drug candidates using donepezil as a key model [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2023, 356: e2200398.
- [22] Zhou Y, He Y, Teng X, et al. Development of novel salicylic acid-donepezil-rivastigmine hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2023, 38: 2231661.
- [23] Wan D, Wang FQ, Xie J, et al. Design, synthesis, and biological activity of donepezil: aromatic amine hybrids as anti-Alzheimer's drugs [J]. *ACS Omega*, 2023, 8: 21802-21812.
- [24] Eissa KI, Kamel MM, Mohamed LW, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of thienopyrimidine derivatives as multifunctional agents against Alzheimer's disease [J]. *Drug Dev Res*, 2023, 84: 937-961.
- [25] Qin P, Ran Y, Xie F, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel *N*-benzyl piperidine derivatives as potent HDAC/AChE inhibitors for Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Med Chem*, 2023, 80: 117178.
- [26] Almeida ML, Oliveira M, Pitta IR, et al. Advances in synthesis and medicinal applications of compounds derived from phthalimide [J]. *Curr Org Synth*, 2020, 17: 252-270.
- [27] Donarska B, Świtalska M, Wietrzyk J, et al. Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24: 110.
- [28] Dos Santos WH, Yoguim MI, Daré RG, et al. Development of a caffeic acid-phthalimide hybrid compound for NADPH oxidase inhibition [J]. *RSC Adv*, 2021, 11: 17880-17890.
- [29] El-Aarag B, Kasai T, Masuda J, et al. Anticancer effects of novel thalidomide analogs in A549 cells through inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 549-555.
- [30] Saravanan K, Elancheran R, Divakar S, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-(4-phenylthiazol-2-yl) isoindoline-1,3-dione derivatives as anti-prostate cancer agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 1199-1204.

- [31] Carradori S, Silvestri R. New frontiers in selective human MAO-B inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 6717-6732.
- [32] Yiğit M, Demir Y, Barut CD, et al. Phthalimide-tethered imidazolium salts: synthesis, characterization, enzyme inhibitory properties, and *in silico* studies [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2022, 355: e2200348.
- [33] Si W, Zhang T, Zhang L, et al. Design, synthesis and bioactivity of novel phthalimide derivatives as acetylcholinesterase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 2380-2382.
- [34] Saeedi M, Golipoor M, Mahdavi M, et al. Phthalimide-derived *N*-benzylpyridinium halides targeting cholinesterases: synthesis and bioactivity of new potential anti-Alzheimer's disease agents [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2016, 349: 293-301.
- [35] Guziar N, Bajda M, Skrok M, et al. Development of multifunctional, heterodimeric isoindoline-1,3-dione derivatives as cholinesterase and  $\beta$ -amyloid aggregation inhibitors with neuroprotective properties [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 92: 738-749.
- [36] Wang J, Zhou H, Li Y, et al. Design, synthesis and evaluation of benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-one-donepezil hybrids as cholinesterase inhibitors and living cell imaging agents [J]. *J Mol Struct*, 2023, 1285: 135511.
- [37] Zhao YM, Mu YS, Luo W, et al. Synthesis of naphthalimide derivatives as cholinesterase inhibitors with aggregation induced emission properties [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2022, 42: 819-829.
- [38] Garcia AD, Leech MC, Petti A, et al. Anodic oxidation of dithiane carboxylic acids: a rapid and mild way to access functionalized orthoesters [J]. *Org Lett*, 2020, 22: 4000-4005.
- [39] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7: 88-95.
- [40] Pasięka A, Panek D, Zaręba P, et al. Novel drug-like fluorenyl derivatives as selective butyrylcholinesterase and  $\beta$ -amyloid inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Med Chem*, 2023, 88-89: 117333.
- [41] Marucci G, Buccioni M, Ben DD, et al. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 190: 108352.
- [42] Seeliger D, de Groot BL. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2010, 24: 417-422.
- [43] Castro A, Martinez A. Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12: 4377-4387.
- [44] Liu H, Wang L, Lv M, et al. AlzPlatform: an Alzheimer's disease domain-specific chemogenomics knowledgebase for polypharmacology and target identification research [J]. *J Chem Inf Model*, 2014, 54: 1050-1060.
- [45] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42717.
- [46] Tang H, Zhao LZ, Zhao HT, et al. Hybrids of oxoisoaporphine-tacrine congeners: novel acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced  $\beta$ -amyloid aggregation inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46: 4970-4979.