

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

四、六位取代 coumarin 衍生物之合成及其抑制乙醯膽鹼酯 滾滾乙醯膽鹼酯滾滾滾 beta-amyloid 凝集活性之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2113-M-038-002-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：臺北醫學大學醫學系

計畫主持人：林美香

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 24 日

計畫名稱中文：四、六位取代 coumarin 衍生物之合成及其抑制乙醯膽鹼酯酶和乙醯膽鹼酯酶誘導 beta-amyloid 凝集活性之研究

計畫名稱英文：Synthesis of 4,6-Disubstituted coumarin derivatives and inhibit both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation

計畫編號：NSC 94-2113-M-038-002

執行期限：94 年 8 月 1 日 至 95 年 7 月 31 日

主持人姓名：林美香 執行機關：台北醫學大學 醫學系 生化學科

e-mail address：mhl00001@tmu.edu.tw

一、中英文摘要

中文摘要

阿茲海默症 (Alzheimer's disease) 已被認為是一個主要的社會大眾健康問題，其臨床治療用藥的效力 (potency) 及選擇性尚不佳。新化合物的合成及結構之修飾在 drug design 上有相當重要的地位。個人曾研究 Ochrocarpin B 之全合成，Ochrocarpin B 為一具有抗癌活性之 coumarin 天然物 (A2780 ovarian cancer cell line; IC₅₀ 為 3.8 ± 0.3 μg/mL)，coumarin 天然物曾有報告指出具有乙醯膽鹼酯酶的抑制作用，因此，擬合成一系列含母核 coumarin 之四、六位取代衍生物 **1-6** 作為新 bivalent ligands 並探討其抑制乙醯膽鹼酯酶及乙醯膽鹼酯酶誘導 Aβ凝集活性。

標的物 **1** 之合成，以起始物 **9** 與 isovaleryl chloride (**10**) 進行 Friedel-Craft acylation，得到之化合物 **11** 再與 ethyl 4-methylbenzoylacetate (**12**) 進行 Pechmann 反應，可得到 coumarin **13** (Scheme 1)。coumarin **13** 接著與 N-bromosuccinimide (NBS) 進行溴化反應，得到之溴化 coumarin **15** 再與 N-benzylmethylamine (**17**) 進行 S_N2 反應製得標的物 **1**。因溴化反應無法進行而無法製得四、六位取代 coumarin 衍生物 **1-6**。去除六位醯基之四位取代 coumarin

衍生物 **20** 和 **21**，依上法順利合成之。

合成之標的物四位取代 coumarin 衍生物 **20** 和 **21**，首先將依據 Elmann 等人所用之方法測試對乙醯膽鹼酯酶之選擇性，再採 Inestrosa 等人所發表之 thioflavin-based fluorometry assay 做抑制乙醯膽鹼酯酶誘導 Aβ凝集活性試驗，以了解結構與活性之間的相關性。

關鍵詞：阿茲海默症、Ochrocarpin B、coumarin、Friedel-Craft acylation、Pechmann 反應

英文摘要

Alzheimer's disease is a major health problem in mass society. In medicinal chemistry, new bivalent ligand is a successful approach for improving drug potency and selectivity. The synthesis of new compounds and structure modification are important role in drug design. Our laboratory have been researched the total synthesis of Ochrocarpin B, the structure of Ochrocarpin B is composed of a core 4-phenylfuranocoumarin moiety with 5-hydroxyl and 6-isovaryl substitution on the phenyl group of furanocoumarin. The inhibition of acetylcholinesterase (AChE) by coumarins has been reported recently, thus, we want to synthesis of 4,

6-substituted coumarin derivatives **1-6** as new bivalent ligands and evaluate their potential AChE inhibition and AChE-induced β -amyloid aggregation.

The synthesis of coumarin derivatives **1-6** is started from **9**. **9** was Friedel-Craft acylation with isovaleryl chloride to obtain **11**, and then **11** reacted with ethyl 4-methylbenzoylacetate (**12**) by Pechman reaction to give compounds **13**. Intermediate **13** reacted with N-bromosuccinimide (NBS), then reacted with N-benzylmethylamine (**17**) to give **1**. However, we didn't synthesize the target compounds **1-6**, because the benzylic bromination couldn't work. Now we have synthesized 4-substituted coumarin derivatives **20 & 21**.

The coumarin derivatives **20 & 21** against recombinant human AChE and isolated serum BuChE were evaluated by studying the hydrolysis of acetylcholine (ATCh) following the method of Ellman. The ability of derivatives to inhibit the proaggregation action of AChE toward $A\beta$ was assessed through a thioflavin T-based fluorometric assay reported by Inestrosa. From these activity results, we will understand the structure-activity relationships and further to modify the structure to obtain a good bivalent ligand.

Keywords: Alzheimer's disease, bivalent ligand, Ochrocarpin B, coumarin, thioflavin, acetylcholinesterase (AChE), Friedel-Craft acylation, β -amyloid, Pechman reaction

二、緣由與目的

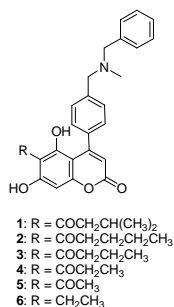
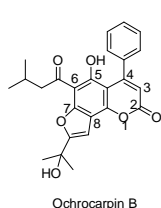
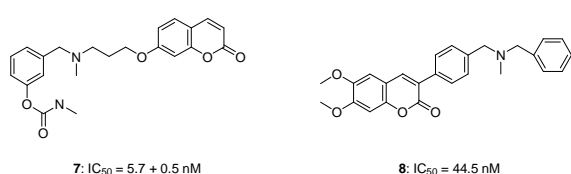
阿茲海默症是一種漸進式、慢性、腦神經退化之疾病；除了病患本身會嚴重喪失能力，對家庭成員的精神和經濟以及社會付出的社會成本是非常驚人的。其病患特徵是認知功能 (cognitive function) 的喪失、嚴重行為異常如判斷力、語言能力的退化，人格之改變 (偏執和幻覺的行為)，最後死亡。其神經病理學上特徵是在大腦皮質區出現許多由 $A\beta$ 組成之老化斑、神經纖維叢 (neurofibrillary tangles) 及前腦基部膽鹼神經元退化或萎智。前腦基部膽鹼神經元之喪失導致乙醯膽鹼含量的減少，而乙醯膽鹼含量的不足被認為是造成阿茲海默症之認知能力喪失的主因。⁹⁻¹¹ 依據此理論，倘若增加腦內乙醯膽鹼之含量將是改善阿茲海默症症狀之最佳方法之一。目前美國食品藥物管理局及台灣衛生署核准上市之治療藥有四種為 galanthamine, donepezil, rivastigmine, 和 tacrine，它們皆為乙醯膽鹼酯酶抑制劑 (acetylcholinesterase inhibitors, AChE inhibitors)。

最近已證實乙醯膽鹼酯酶在加速 $A\beta$ 斑沉積扮演主要角色。乙醯膽鹼酯酶與 $A\beta$ 之作用及其促進 amyloid fibril 生成是藉由此酶位於末稍陰離子作用部位 (peripheral anionic binding site, PAS) 之胺基酸池之作用。coumarin 天然物具有許多生物活性如抗癌、抗病毒、抗發炎及抑制乙醯膽鹼酯酶之活性，其乙醯膽鹼酯酶之抑制作用最為令人興奮，最近之報告，coumarin 衍生物 **7** 及 **8** 具有很好之抑制乙醯膽鹼酯酶之作用 (Chart 3)， IC_{50} 分別為 5.7 和 44.5 nM。**7** 對乙醯膽鹼酯酶的選擇性不佳 ($IC_{50, AChE} =$

5.7 ± 0.5 nM, $IC_{50, BuChE} = 3.6 \pm 0.2$ nM), **8** 對乙醯膽鹼酯酶有高的選擇性 ($IC_{50, AChE} = 44.5 \pm 6.5$ nM, $IC_{50, BuChE} = 48900 \pm 3700$ nM), 也有抑制乙醯膽鹼酯酶誘導 A β 凝集活性 (在 100 μ M 有 35% 抑制作用), 是屬於 bivalent ligand 之作用。

由 coumarin 衍生物 **7** 及 **8** 其 coumarin 母核與氮之距離約四個碳, 氮上之甲基及苄基是必須基團, 負責作用在乙醯膽鹼酯酶之催化部位; 含氮鏈接在 coumarin 母核結構之第三位特別具有高乙醯膽鹼酯酶選擇性。基於個人對 coumarin 天然物 Ochrocarpin B (Chart 1) 全合成之經驗, 我們相信母核 coumarin 第四位接上含氮鏈和第六位接上醯基或苄基對乙醯膽鹼酯酶之選擇性及抑制乙醯膽鹼酯酶誘導 A β 凝集活性有影響, 第六位醯基選擇來自 Ochrocarpin B 之結草酸基 isovaleryl (或苄基), 所以, 個人擬合成一系列含 coumarin 母核結構之四、六位取代衍生物 **1-6** (Chart 1) 當作新 bivalent ligands 並探討其抑制乙醯膽鹼酯酶及乙醯膽鹼酯酶誘導 A β 凝集活性。

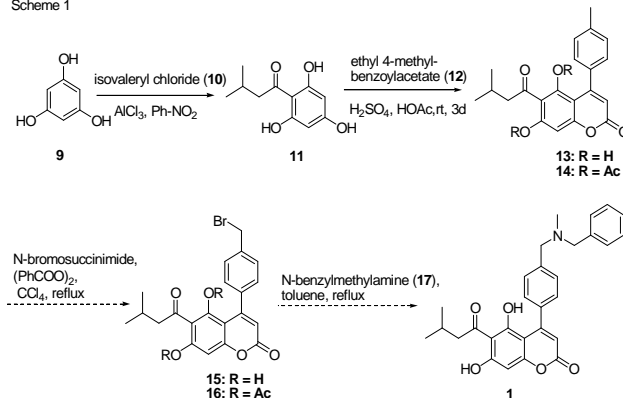
Chart 1



三、結果與討論

標的物 **1** 之合成, 依據本實驗室製備 coumarin 衍生物之經驗 (Scheme 1), 以起始物 phloroglucinol (**9**) 與 isovaleryl chloride (**10**) 進行 Friedel-Craft acylation, 得到之化合物 **11** 再與 ethyl 4-methylbenzoylacetate (**12**) 在溶劑 glacial acetic acid 下, 加入 conc. H₂SO₄ 當催化劑, 室溫下反應 72 小時, 可得到 coumarin **13**。coumarin **13** 接著與 N-bromosuccinimide (NBS) 和 benzoyl peroxide 以 CCl₄ 當溶劑, 迴流 12 小時, 進行溴化反應, 期望得到之溴化 coumarin **15** 再與 N-benzylmethylamine (**17**) 進行 S_N2 反應製得標的物 **1**。但是在此, 溴化反應無法進行, 也嘗試把 phenolic-OH 以 acetate 保護起來得到 **14** 再行溴化反應, 溴化反應仍未進行。**13** 以 Br₂/HOAc, 80°C 反應 2 小時得到 8-溴化 coumarin 衍生物, 而沒得到溴化 coumarin **15**。

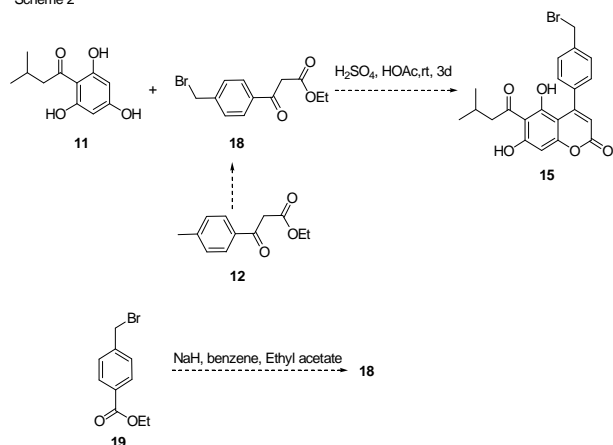
Scheme 1



嘗試以 **11** 與 β -dicarbonyl compound **18** 進行 Pechman reaction 來製備溴化 coumarin **15** (Scheme 2)。化合物 **18** 之合成預期以 ethyl 4-methylbenzoylacetate (**12**) 行 benzylic bromination 得到之, 試了三種方法: 1. NBS, benzoyl peroxide, 以 CCl₄ 當溶劑, 迴流 12 小時; 2. Br₂/MnO₂,

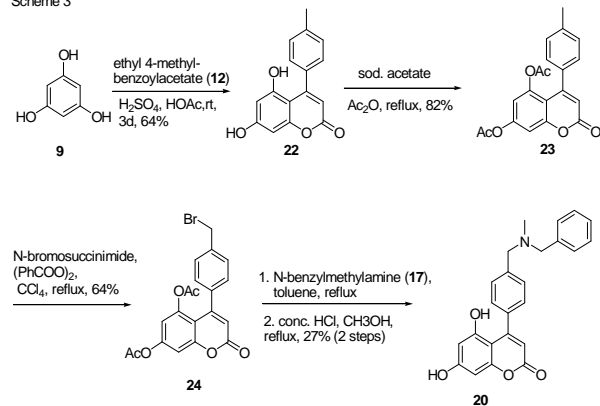
rt ; 3. NaBrO₃/NaHSO₃, EtOAc, rt 皆無法合成化合物 **15**。改以 ester (**19**) 在 NaH 及 benzene 當溶劑下，加入 ethyl acetate 來合成 β-dicarbonyl compound **18**，此條件是無反應，是以無法製得化合物 **18**。

Scheme 2

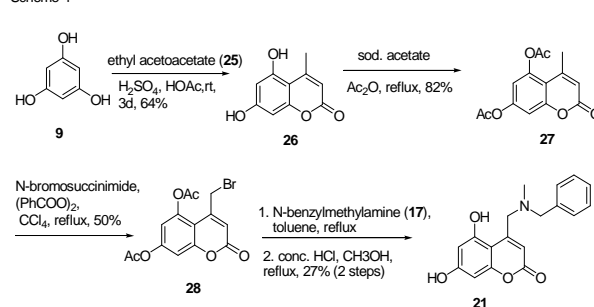


既然四、六位取代 coumarin 衍生物 **1-6** 無法製備，更改標的物為四位取代衍生物 **20** 和 **21**，其合成方法同上述條件 (Scheme 3 & 4)，本實驗室很順利的合成出標的物 **20** 和 **21**。

Scheme 3



Scheme 4



合成製得的四位取代 coumarin 衍生物 **20** 和 **21**，目前正在測試其對乙醯膽鹼酯酶之抑制活性及是否具有選擇性，若有乙醯膽鹼酯酶之抑制作用，接著做 thioflavin-based fluorometry assay 以得知其抑制乙醯膽鹼酯酶誘導 Aβ凝集之活性。

四、計畫成果自評

由六位醯基四位取代 coumarin 衍生物 **1-6** 之合成中，我們了解六位醯基之有無會影響 benzylic bromination 之進行。有六位醯基 coumarin 衍生物是無法進行 benzylic bromination，故沒有合成出六位醯基四位取代 coumarin 衍生物 **1-6**，今已製備得四位取代 coumarin 衍生物 **20** 和 **21**。

五、參考文獻

1. Chun-Mao Lin, Sheng-Tung Huang, Fu Wei Lee, Hsien-Saw Kuo, Mei-Hsiang Lin. 6-Acyl-4-aryl/alkyl-5,7-dihydroxy-coumarins as anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 4402-4409, **2006**.