

· 论著 ·

新型四氢-2-萘醇类化合物的合成、晶体结构及抗肿瘤活性

孙囡囡, 刘嘉, 郑灿辉, 周有骏 (第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 合成(E)-6-甲氧基-1-(3,4,5-三甲氧基苯亚甲基)-1,2,3,4-四氢-2-萘醇及其对映异构体,测定其晶体结构,并考察其生物活性。方法 以2,6-二甲氧基萘为起始原料,经还原及Knoevenael缩合制得中间体萘酮,再以CBS不对称催化还原分别制得R,S构型的目标化合物。采用单晶X-衍射测定其晶体结构,并测试其微管蛋白的抑制活性及体外抗肿瘤活性。结果 目标化合物结构经MS、NMR及X-单晶衍射等确证。目标化合物的不对称还原反应收率达90.3%,e.e.%达99.04%,体外药理活性数据显示,S-构型目标化合物对微管蛋白聚合、HCT116和CCRF-CEM肿瘤细胞的抑制活性优于R-构型异构体及先导化合物22b,其IC₅₀分别达到0.41,0.14和0.001 μmol/L。结论 采用CBS不对称催化还原的方法是一条制备高光学纯度的手性目标化合物的合成方法;高活性的S-构型异构体具有进一步研究的价值。

[关键词] 不对称合成;抗肿瘤;微管蛋白

[中图分类号] R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2014)03-0191-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.03.007

Synthesis, XRD analysis and anti-tumor activity of novel compounds containing tetrahydronaphthalen-2-ol

SUN Nannan, LIU Jia, ZHENG Canhui, ZHOU Youjun (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize the enantiomers of (E)-6-methoxy-1-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-ol, determine their structures by XRD and evaluate their anti-tumor activity *in vitro*. **Methods** The target compounds were prepared from 2,6-Dimethoxybenzoyl chloride. The key intermediate, (E)-6-methoxy-1-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-one, was obtained through Cornforth reduction and Knoevenael reaction, and the final R,S compounds were got by CBS asymmetric reduction. The structure of the target compounds were determined by XRD. The target compounds were tested by anti-tubulin and anti-tumor assay. **Results** The structure of the target compounds were determined by ¹H NMR, ¹³C NMR, MS, and XRD analysis. The yield of asymmetric reduction reaction was 90.3%, e. e. % was 99.04%, *in vitro* anti-tumor assay showed all of the S isomer had stronger anticancer activity than the R isomer, especially on CCRF-CEM cell (IC₅₀ = 1 nmol/L), HCT-116 cell (IC₅₀ = 0.14 μmol/L) and inhibition of tubulin polymerization (IC₅₀ = 0.41 μmol/L). **Conclusion** The CBS asymmetric reduction was a good way to get high-yield and high optical purity compound. The S isomer with outstanding anticancer activity was worth further research.

[Key words] asymmetric synthesis; anti-tumor activity; microtubulin

癌症是严重威胁人类健康的多发病,据第3次全国居民死亡原因抽样调查结果显示,恶性肿瘤是城市居民的首位死因,占城市死亡总数的25.0%,农村居民的第二位死因^[1]。化学药物治疗是我们对抗癌症的有力武器,研发抗肿瘤药物刻不容缓。

微管蛋白是抗肿瘤研究的重要靶点^[2,3],一直是抗肿瘤药物的重要研究领域。已有多个作用于微管蛋白的药物(如紫杉醇、长春新碱等)用于临床治疗。研究发现微管蛋白的药物作用部位主要有紫杉

醇、长春新碱及秋水仙碱等位点。其中秋水仙碱位点较优,因为其活性腔较小,更适合设计小分子药物,因而近年来受到广泛重视,成为目前的研究热点领域之一。

本课题组刘嘉等在前期研究中设计合成了一类全新骨架的微管抑制剂:新型四氢萘酮类化合物。其中化合物22b(图1)的微管蛋白和人白血病肿瘤细胞(CEM)的抑制活性分别达3.93 μmol/L、1 nmol/L,对移植人体肿瘤肠癌HT-29的裸鼠肿瘤抑制活性达66%。最大耐受剂量为300 mg/kg,结果显示化合物22b抗肿瘤活性强、毒性低^[4],具有深入研究的价值。

但研究发现此类化合物不稳定,随着放置时间

[基金项目] 国家自然科学基金(21172260)。

[作者简介] 孙囡囡,女,硕士研究生。E-mail: nysnn@126.com。

[通讯作者] 周有骏。Tel: (021) 81871231, E-mail: zhouyoujun2005@aliyun.com。

延长其活性逐渐下降。结构分析认为,化合物 22b 结构中四氢萘环 1 位双键与 2 位羰基形成了 α, β -不饱和酮共轭结构。该结果易形成激发态,由激发态到基态的跃迁有可能引起了双键的构型翻转,这可能是该化合物结构不稳定及活性下降的原因。因此,将结构中羰基还原成醇,破坏 α, β -不饱和酮共轭结构,将有助于提高化合物稳定性而提高活性。因而设计合成了(E)-6-甲氧基-1-(3,4,5-三甲氧基苯亚甲基)-1,2,3,4-四氢-2-萘醇的消旋体及其对映异构体。采用 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 、MS 确定其结构,采用 X-单晶衍射确定其立体构型,并考察不同对映异构体对微管蛋白、HCT-116 和 CCRF-CEM 肿瘤细胞的抑制活性。目标化合物的合成路线见图 2:

以 2,6-二甲氧基萘为起始原料,经还原、Knoevenagel 缩合制得中间体萘酮,再以 CBS 不对称催化还原分别制得 R-、S-构型的目标化合物^[5]。

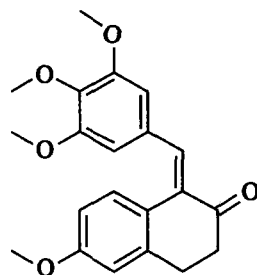


图 1 22b 的结构

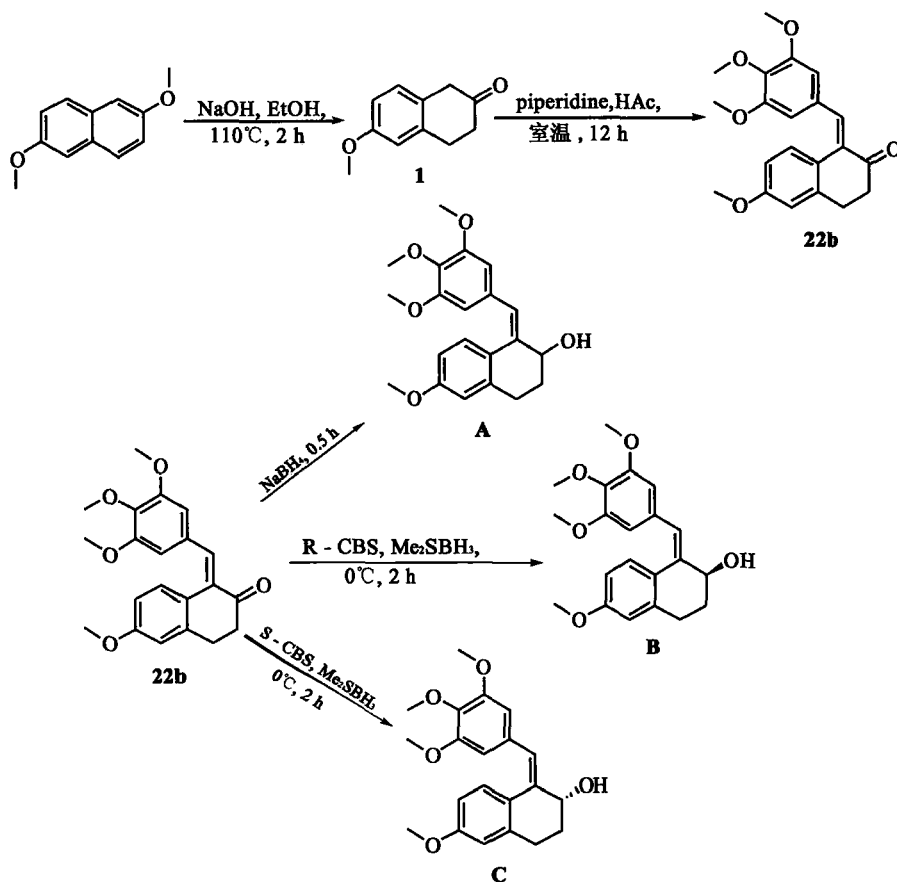


图 2 目标化合物合成路线

1 化学部分

1.1 仪器和材料 Bruker SMART APEX DUO 型双光源微焦斑结构分析仪,85-1 型磁力搅拌器;KE-20-5 型旋转蒸发仪;SHB-III 型循环水式多用真空泵;RK-Z 型熔点仪,温度未校正。质谱以 Hewlett. Pack-

ard 5988 型质谱仪测定,EI 源,70 eV 直接进样;核磁共振氢谱用 Bruker AC-300P 型仪器测定。所有试剂皆为市售分析纯。

1.2 试剂干燥 无水甲苯:甲苯中加入 CaH_2 (5 g/L),回流 5 h,蒸馏后分子筛(4Å)保存。

1.3 目标化合物的合成与结果

1.3.1 6-甲氧基-3,4-二氢-2-萘酮(1)的合成 按参考文献[6]制备,收率75%,mp 38~40℃。

1.3.2 (E)-6-甲氧基-1-(3,4,5-三甲氧基苯亚甲基)-3,4-二氢-2-萘酮(22b)的合成 按参考文献[7]制备,产率47%。mp 102℃~103℃。

1.3.3 (E)-6-甲氧基-1-(3,4,5-三甲氧基苯亚甲基)-1,2,3,4-四氢-2-萘酚(A)的合成 化合物22b(2 g, 5.65 mmol)溶于30 ml 10%的二氯甲烷甲醇溶液中,加入硼氢化钠(5 mg, 0.13 mmol),室温搅拌20 min,浓缩反应液,加入水50 ml,乙酸乙酯50 ml,萃取。乙酸乙酯层用水、饱和NaCl溶液洗,无水NaSO₄干燥。蒸干乙酸乙酯。重结晶[石油醚-乙酸乙酯(1:5)],得白色针晶1.7 g,收率85%。mp 128℃。

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 7.60(d, J = 9 Hz, 1H), 7.00(s, 1H), 6.77~6.81(m, 3H), 6.68(d, J = 2.7 Hz, 1H), 5.05(t, J = 2.44 Hz, 1H), 3.93(m, 10H), 3.82(s, 3H), 3.10~3.22(m, 1H), 2.68~2.76(m, 1H), 2.01~2.15(m, 1H), 1.95~2.09(m, 1H)。

¹³C NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 201.78, 159.42, 152.91, 140.23, 138.68, 133.21, 132.59, 130.60, 130.46, 124.86, 112.73, 111.81, 106.86, 60.89, 55.93, 55.25, 36.98, 28.05。

HRMS(ES⁺) m/z: 379.1518(M + Na⁺)。

1.3.4 S-(E)-6-甲氧基-1-(3,4,5-三甲氧基苯亚甲基)-1,2,3,4-四氢-2-萘酚(B)的合成 硼烷二甲硫醚络合物(6 ml, 8.47 mmol)、(R)-2-甲基-CBS-噁唑硼烷(3.6 ml, 1.69 mmol)溶于4 ml无水甲苯中, -20℃,氮气保护,搅拌10 min,滴加化合物22b(3 g, 8.472 mmol),再搅拌30 min,滴加12 ml甲醇、36 ml 1 mol/L盐酸。加入甲苯20 ml,萃取。甲苯层用饱和NH₄Cl溶液、饱和NaHCO₃溶液、饱和NaCl溶液洗后用无水NaSO₄干燥。减压蒸馏,重结晶[石油醚-乙酸乙酯(1:5)],得无色针状结晶2.9 g,收率90.3%, HPLC: 97.26%, e. e. % = 99.04%。mp: 123℃。[α]_D²² = +25°。

1.3.5 R-(E)-6-甲氧基-1-(3,4,5-三甲氧基苯亚甲基)-1,2,3,4-四氢-2-萘酚(C)的合成 制备方法同化合物B,还原剂为硼烷二甲硫醚络合物,催化剂为(S)-2-甲基-CBS-噁唑硼烷。得无色针状结晶1 mg,收率99.4%, HPLC: 93.71%, e. e. % = 95.18%。mp 123℃。[α]_D²² = -26°。

1.4 结果与讨论 合成了(E)-6-甲氧基-1-(3,4,5-三甲氧基苯亚甲基)-1,2,3,4-四氢-2-萘醇的消旋体及其对映异构体,并经¹H NMR、¹³C NMR、MS确证结构。所合成的目标化合物均未见文献报道。

对不对称还原的反应条件进行了探索。结果表明在硼烷二甲硫醚络合物、CBS催化剂、化合物22b的投料比例为5:1:5,溶剂为无水甲苯,温度为-20℃时为最佳反应条件。同时溶剂干燥与否,以及滴加化合物22b的速度直接影响产率;滴加化合物22b的速度过快将导致反应产物的光学纯度降低。因此滴加速度应控制在0.1 ml/min。CBS催化剂的投料比例降低、温度升高都不利于得到高光学纯度的产物。

1.5 化合物C晶体结构测定及结果 将C(0.230 mm × 0.090 mm × 0.080 mm)单晶置于结构分析仪上,采用石墨单色化的CuKα射线(λ = 1.541 78 Å),以φ-ω扫描方式在173(2)收集衍射数据。在2.583° ≤ θ ≤ 67.972°(h: -4~5, k: -11~12, l: -41~37)收集9 057个强反射数据。其中独立衍射点3 167个[R_{int} = 0.052 2]。强度数据进行了经验吸收校正和LP校正。化合物C的晶体结构解析采用直接法,结构解析和计算使用SHELXS-97和SHELXL-97程序。

分子结构解析表明,C的组成为C₂₁H₂₄O₅,相对分子质量为356.40,属斜方晶体,P2(1)/c空间群,晶体参数a = 4.965 3(1) Å, b = 10.622 8(2) Å, c = 34.212 9(6) Å, α = β = γ = 90°, V = 1 804.57(6) Å³, Z = 4, D_c = 1.312 mg/m³, μ = 0.759 mm⁻¹, F(000) = 760,最终偏振因子0.044 6, wR₂ = 0.116 7。

化合物C的分子结构见图3,主要晶体学数据见表1。晶体学数据表明根据CBS反应机制所合成的光学异构体立体结构正确。

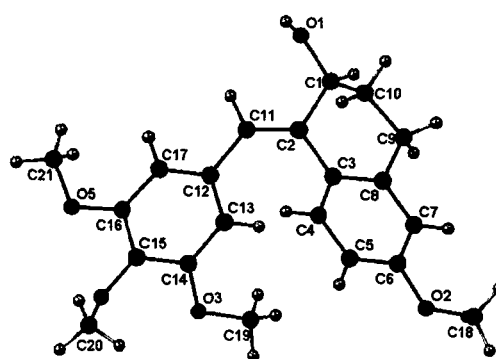


图3 化合物C的分子结构图

2 生物活性测试

2.1 抑制微管聚合活性实验

2.1.1 材料与方法 材料:牛微管蛋白(生产厂家:Cytoskeleton)。缓冲液 General Tubulin Buffer: 80 mmol/L PIPES pH = 6.9, 2 mmol/L MgCl₂, 0.5

表 1 化合物 C 的主要晶体学数据

参数	化合物 C
分子式	C ₂₁ H ₂₄ O ₅
相对分子质量	356.40
颜色	无色
温度(K)	173(2)
衍射源/波长(CuKα)Å	1.541 78
晶系	斜方晶
空间群	P2(1)
晶体粒度(mm)	0.23 × 0.09 × 0.08
a(Å)	4.965 3(1)
b(Å)	10.622 8(2)
c(Å)	34.212 9(6)
α(°)	90
β(°)	90
γ(°)	90
Z	4
F(000)	760
F ²	1.103
R1/wR2	0.044 6/0.116 7
R1/wR2 (all data)	0.046 2/0.116 3

mmol/L EGTA。Tubulin Glycerol Buffer: 60% glycerol。GTP:100 mmol/L。96 孔半面积培养板。仪器: Synergy 4 型全自动酶标仪。方法:采用文献[8]及微管蛋白试剂盒方法。通过测定每分钟 340 nm 处的 OD 值绘制消光度曲线,由公式计算 IC₅₀。

$$\text{微管蛋白聚合抑制率}(\%) = \frac{(\text{空白孔 OD}_{\text{max}} - \text{测试孔 OD}_{\text{max}})}{\text{空白孔 OD}_{\text{max}}} \times 100\%$$

2.1.2 抑制微管聚合结果,见表 2。

表 2 化合物 A、B、C 的微管蛋白抑制活性

化合物	微管蛋白抑制活性 IC ₅₀ (μmol/L)
A	2.47
B	0.41
C	19.3
22b	3.93

2.2 体外抑制肿瘤细胞增殖活性实验

2.2.1 材料与amp;方法 采用 MTT 法,对所有目标化合物进行人白血病细胞(CCRF-CEM)、人肠癌细胞(HCT-116)瘤株进行体外抗肿瘤活性增值实验,并以化合物 22b 为阳性对照。通过测定 570 nm 处测定 OD 值,用 Bliss 法计算 IC₅₀值^[4]。

2.2.2 抑制肿瘤增殖结果,见表 3。

2.3 结果与amp;讨论 微管蛋白抑制活性结果显示,目标化合物消旋体(A)和 S-构型异构体(B)的微管蛋白抑制活性优于先导化合物 22b,其中 S-构型异构体(B)的抑制活性最强,其 IC₅₀值达 0.41 μmol/L,为化合物 22b 的 9.6 倍。体外抑瘤活性结果显示,

S-构型异构体(B)对人肠癌细胞(HCT-116)的抑瘤最强,IC₅₀值为 0.14 μmol/L,分别为消旋体(A)的 1.5 倍和 22b 的 3.4 倍。S-构型异构体(B)对人白血病细胞(CCRF-CEM)的抑制活性与消旋体(A)和化合物 22b 相当,大大优于其 R-构型异构体(C)。其对 CCRF-CEM 的抑制活性是 R-构型异构体(C)的 3 940 倍。生物活性评价结果表明,S-构型异构体(B)对微管蛋白及两种测试肿瘤细胞均有很强的抑制活性,具有进一步研究的价值。

表 3 化合物 A、B、C 的体外抑制肿瘤细胞增殖活性 IC₅₀(μmol/L)

化合物	HCT-116	CCRF-CEM
A	0.21	0.001
B	0.14	0.001
C	>1	3.940
22b	0.47	0.001

本设计合成了一类新骨架的具有抗肿瘤活性的小分子微管蛋白抑制剂。研究提出了制备高收率及高光学纯度目标化合物的不对称合成方法,为该化合物的不对称合成提供了新的研究途径。研究发现高活性的 S-构型目标化合物,为深入开展抗肿瘤药物研究提供了候选化合物。

【参考文献】

- [1] 刘嘉,周有骏.基于微管蛋白的小分子肿瘤血管阻断剂的设计、合成及抗肿瘤活性研究[D].第二军医大学博士论文,2012.
- [2] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs [J]. Nat Rev Cancer,2004,4(4):253-265.
- [3] Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy[J]. Curr Med Chem Anticancer Agents,2005,5(1):65-71.
- [4] Liu J, Zheng CH, Zhou YJ, et al. Synthesis and biological evaluation of 1-benzylidene-3,4-dihydronaphthalen-2-one as a new class of microtubule-targeting agents[J]. J Med Chem,2012,55(12):5720-5733.
- [5] Yao B, Ji H, Cao Y. Synthesis and antifungal activities of novel 2-aminotetralin derivatives[J]. J Med Chem,2007,50(22):5293-5300.
- [6] Sun L, Tran N, Tang F. Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones; a novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosine kinases[J]. J Med Chem,1998,41(14):2588-2603.
- [7] Corey EJ, Azimioara M, Sarshar S. X-ray crystal structure of a chiral oxazaborolidine catalyst for enantioselective carbonyl reduction[J]. Tetrahedron Lett,1992,33(24):3429-3430.
- [8] Hamel E. Evaluation of antimetabolic agents by quantitative comparisons of their effects on the polymerization of purified tubulin[J]. Cell Biochem Biophys,2003,38(1):1-21.

[收稿日期] 2014-03-25 [修回日期] 2014-04-11

[本文编辑] 顾文华