

## ·論文·

**3-苯基-3-吡咯基戊烷类化合物的合成及体外生物活性**

许梦, 葛执信, 郝玫茜, 张灿\*

(中国药科大学新药研究中心, 江苏省代谢性疾病药物重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 以非开环甾体类维生素D受体(VDR)激动剂LG190155为先导物,通过结构改造设计合成了一系列3-苯基-3-吡咯基戊烷类化合物。通过测定目标化合物对HL-60细胞的促分化能力间接测定其对VDR的激动能力。结果表明,化合物**13a, 13c, 13d, 13h, 13i, 13j**表现出较好的HL-60促分化活性( $EC_{50} < 50 \mu\text{mol/L}$ ),提示这6个化合物具有较好的VDR激动能力。其中以化合物**13j**的促分化活性最高( $EC_{50} = 0.10 \mu\text{mol/L}$ ),且优于先导化合物LG190155。采用MTT法评价目标化合物对VDR高表达的肿瘤细胞(人前列腺癌细胞PC-3、人乳腺癌细胞MCF-7、人结肠癌细胞Caco-2、人肝癌细胞HepG2)和人肝正常细胞(L02)的增殖抑制活性。结果表明,化合物**13a**在HepG2细胞株中的增殖抑制活性最好( $IC_{50} = 0.11 \mu\text{mol/L}$ ),且对普通肝细胞L02的抑制作用较低( $IC_{50} = 15.24 \mu\text{mol/L}$ ),说明化合物**13a**对肝肿瘤细胞具有一定选择性。此外还发现所合成化合物的促分化活性与抑制增殖活性成正相关。

**关键词** 3-苯基-3-吡咯基戊烷衍生物; 非开环甾体类激动剂; 合成; 维生素D受体激动活性; 肿瘤; 增殖抑制

中图分类号 R914; R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)01-0030-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160104

**引用本文** 许梦, 葛执信, 郝玫茜, 等. 3-苯基-3-吡咯基戊烷类化合物的合成及体外生物活性[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(1):30–37.  
**Cite this article as:** XU Meng, GE Zhixin, HAO Meixi, et al. Synthesis and *in vitro* biological activity of 3-phenyl-3-pyrrolylpentane derivatives[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(1):30–37.

**Synthesis and *in vitro* biological activity of 3-phenyl-3-pyrrolylpentane derivatives**

XU Meng, GE Zhixin, HAO Meixi, ZHANG Can\*

Jiangsu Key Laboratory of Drug Discovery for Metabolic Diseases, Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** A new series of 3-phenyl-3-pyrrolylpentane derivatives were synthesized through modifying the structure of the lead compound LG19055, which has been the first nonsecosteroidal vitamin D receptor(VDR) agonist reported. The VDR-agonistic ability of target compounds was measured indirectly by evaluating the differentiation ability of HL-60 cell. The results showed that compounds **13a, 13c, 13d, 13h, 13i, 13j** had excellent VDR-agonistic ability ( $EC_{50} < 50 \mu\text{mol/L}$ ), especially for compound **13j** ( $EC_{50} = 0.10 \mu\text{mol/L}$ ), which was more potential than that of lead compound LG190155. Their proliferation inhibitory activities *in vitro* were evaluated by MTT assay in MCF-7, PC-3, Caco-2, HepG2 and L02 cell lines. Compound **13a** exhibited significant inhibitory effects on HepG2 cell line ( $IC_{50} = 0.11 \mu\text{mol/L}$ ). Moreover, the inhibitory effect of compound **13a** on non-tumor liver L02 cell line was relatively weak ( $IC_{50} = 15.24 \mu\text{mol/L}$ ), suggesting that compound **13a** had selective inhibitory effects on liver cancer cells. Additionally, HL-60 cell differentiation-inducing activity and the inhibitory effect of cancer cells were positively related.

**Key words** 3-phenyl-3-pyrrolylpentane derivatives; nonsecosteroidal agonist; synthesis; VDR-agonistic ability;

tumor; proliferation inhibition

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China( No. 81273468)

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  是维生素 D 在体内的活性代谢产物,也是维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)的天然配体,其在体内与 VDR 结合发挥多种生理功能<sup>[1]</sup>。体内外实验证明, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  对多种肿瘤细胞有诱导分化、抑制增殖的作用<sup>[2]</sup>。但是随着剂量增加, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  会引起血钙升高,从而导致高血钙症的不良反应,限制了其在临床上的应用<sup>[2-4]</sup>。

为了把这类化合物的升血钙活性和抗增殖活性分开,研究者对天然配体 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  进行结构改造,目前合成了约 3 000 多种开环甾体类激动剂。这类化合物虽然实现了抗增殖活性和升血钙活性的部分分离,但是仍然不能用于肿瘤等需要长期或大剂量口服给药治疗的疾病。因此寻找能够实现升血钙能力与抗增殖活性分离的高效低毒 VDR 激动剂成为研究的重点<sup>[5]</sup>。

Boehm 等<sup>[6]</sup>于 1999 年报道了一类非开环甾体类 VDR 激动剂——二苯基戊烷类化合物。这类激动剂完全摒弃了 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  的开环甾体结构,不会引起血钙的升高。本课题组以非开环甾体类 VDR 激动剂 LG190155 为先导物,用吡咯环代替二苯基戊烷衍生物的一个苯环,得到了一系列以 3-苯基-3-吡咯基戊烷为母核结构的化合物。并且进一步对所设计的化合物进行生物活性测试以评价其 VDR 激动活性和体外抗肿瘤活性。

本研究期望通过对侧链的进一步修饰,提高化合物的维生素 D 受体激动能力,增强对肿瘤的抑制效果。首先在侧链引入能与 VDR 氨基酸残基发生氢键作用的官能团,如酯基、腈基、吗啉环等,研究不同亲水基团对化合物活性的影响。其次参考艾尔骨化醇与 VDR 的相互作用模式<sup>[7]</sup>,在酰胺键的氮原子上引入甲基小侧链,希望通过与 VDR 上水通道的相互作用,提高化合物的活性。最后受三环类化合物<sup>[8]</sup>的启发,通过酰胺键或酯键连接不同的芳环,并引入不同的取代基合成一系列三环类化合物,并对其生物活性进行研究。

## 1 合成路线

化合物 **12** 是合成 3-苯基-3-吡咯基戊烷类化

合物的重要中间体,其合成见路线 1。首先以 3-溴丙酸乙酯为原料,在乙醚溶液中与乙基格式试剂反应制得母核片段 1-溴-3-乙基-3 戊醇(**1**)。另一母核片段 2-吡咯羧酸乙酯(**3**)是以吡咯为起始原料,和三氯乙酰氯反应得到化合物 **2**,再经过乙醇钠处理得到。然后以 4-羟基-3-甲基苯甲酸为原料,通过甲酯化,酚羟基苄基保护得到化合物 **6**,用乙基格氏试剂进攻 **6** 的酯基得到苄醇中间体 **7**。在三氟化硼乙醚条件下 **7** 与 **3** 生成母核中间体 **8**,然后在钠氢条件下和碘乙烷发生亲核取代反应,在钯碳/甲酸铵条件下脱除苄基得化合物 **10**,随后在氢氧化钾/甲醇条件下水解,得到化合物 **11**,最后与化合物 **1** 在钠氢的作用下成醚得到重要中间体 **12**。

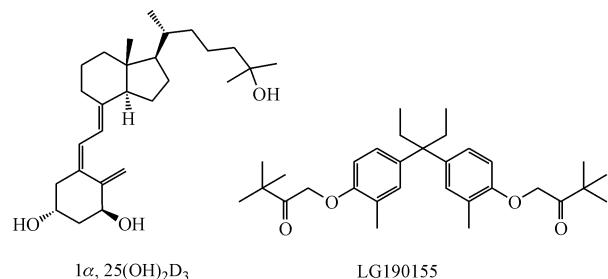


Figure 1 Structure of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and LG190155

目标化合物 **13a~13j** 的合成见路线 2,其都可由重要中间体 **12** 与不同的胺和醇通过酰化或酯化得到。

## 2 实验部分

### 2.1 材 料

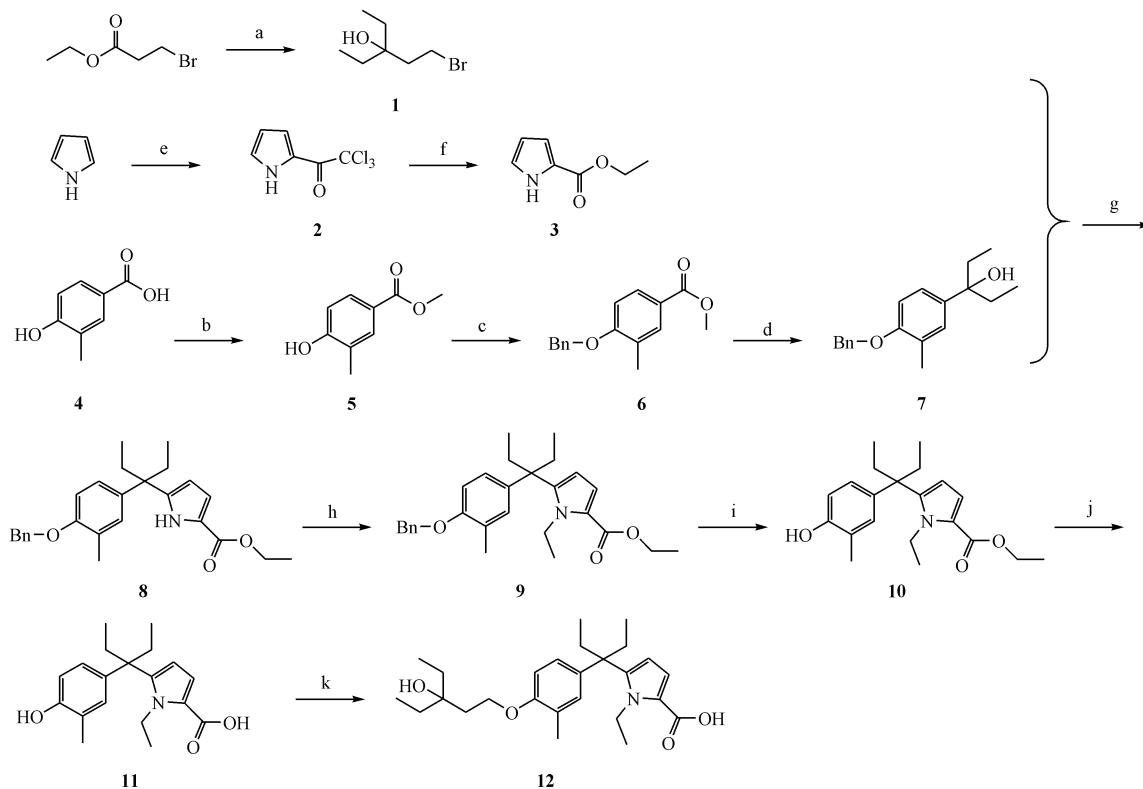
AV-300 核磁共振光谱仪(以 TMS 为内标,德国 Bruker 公司);MAT95XP 型高分辨质谱仪(美国 Thermo 公司)。

胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素 + 链霉素双抗(美国 Gibco 公司);RPMI-1640 细胞培养基、DMEM 细胞培养液、DMEM/F-12 细胞培养基(美国 HyClone 公司);非必需氨基酸(美国 Thermo 公司);二甲亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司);骨化三醇(大连美仑生物技术有限公司);LG-190155(自制,纯度大于 99%)。所

用化学试剂均为市售分析纯产品。

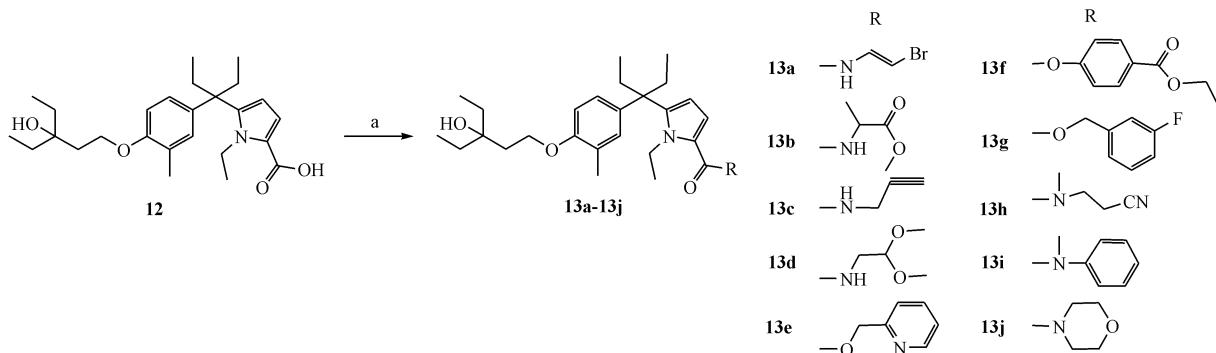
人前列腺癌细胞 PC-3 细胞株、人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞株、人结肠癌细胞 Caco-2 细胞株、人肝

癌细胞 HepG2 细胞株、人肝正常细胞 L02 细胞株 (中国科学院上海细胞生物学研究所)。



**Scheme 1** Synthetic route of compound 12

Reagents and reaction conditions: a) EtMgBr, Et<sub>2</sub>O, 30 °C, 2 h; b) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>OH, 70 °C, 5 h; c) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, BnBr, Reflux 6 h; d) EtMgBr, Et<sub>2</sub>O, 25 °C, 1 h; e) Trichloroacetyl chloride, Et<sub>2</sub>O, 25 °C, 2 h; f) EtONa, EtOH, 25 °C, 3 h; g) BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, 0 °C, 0.5 h; h) CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br, NaH, 25 °C, 4 h; i) H<sub>2</sub>/Pd, HCOONH<sub>4</sub>, 25 °C, 12 h; j) KOH, CH<sub>3</sub>OH, 80 °C, 12 h; k) 1, NaH, 25 °C, 3 h



**Scheme 2** Synthesis of the target compounds 13a-13j

Reagents and reaction conditions: a) HOBr, EDCI, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>Cl/EDCI, DMAP, CH<sub>3</sub>Cl/ *p*-nitrobenzenesulfonyl, DMAP, CH<sub>3</sub>Cl

## 2.2 化学合成

母核片段 3 和中间体 11 参考课题组前期报道的方法<sup>[9]</sup>合成。

1-溴-3-乙基-3-戊醇 (1) 按常规方法制备乙基格式试剂在 0 °C 下,滴加溴代巴豆酸甲酯 (15 g,

89.80 mmol) 的乙醚溶液 (50 mL), 0.5 h 滴加完毕后, 升温至 30 °C 继续反应 2 h。反应结束后, 缓慢加入氯化铵的饱和水溶液至无气泡生成, 充分搅拌后分层, 分出有机层, 水层加入乙醚萃取 (20 mL × 2), 合并有机层, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干

燥,减压蒸馏得白色油状物,应用柱色谱(石油醚-乙酸乙酯,20:1)纯化,最终得淡黄色液体6 g,收率:42.92%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.62 (2H, t, J = 6.9 Hz, 1-H), 1.90 (2H, t, J = 6.9 Hz, 2-H), 1.35 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.90 (6H, t, J = 2.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。

### 3'-(4-(3-乙基-3-戊醇氧基)-3-甲基苯基)-3-(5-羧基-1-乙基吡咯)戊烷(**12**)

将化合物**11**(7.70 g, 24.4 mmol)溶于DMF 30 mL中,冰浴下分批加入NaH(1.92 g, 0.08 mol)并保温搅拌0.5 h,缓慢加入1-溴-3-乙基-3-戊醇(6.0 g, 0.03 mol),室温反应3 h。反应结束后,加入水30 mL以除去过量的NaH,用稀盐酸调节pH至7左右,乙酸乙酯萃取(20 mL × 3),合并有机层,水洗DMF(30 mL × 5),饱和食盐水洗涤(20 mL × 2),无水硫酸钠干燥,减压蒸馏得红棕色油状物,经柱色谱(二氯甲烷-甲醇,50:1)纯化,得淡黄色油状物7.88 g,收率:75.26%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.03 (1H, d, J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.01 (1H, s, Ar-H), 6.73 (1H, d, J = 8.4 Hz, Pyr-H), 6.55 (1H, d, J = 2.1 Hz, Ar-H), 6.50 (1H, d, J = 2.1 Hz, Pyr-H), 4.34 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.13 (2H, t, J = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 2.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.96 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.58 (4H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.91 (6H, t, J = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.66 (6H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。

### 2-(5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3-羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲酰胺基)溴乙烷(**13a**)

将化合物**12**(0.5 g, 1.16 mmol)溶解于氯仿20 mL,依次加入HOBr(0.17 g, 1.25 mmol)和EDCI(0.24 g, 1.28 mmol),搅拌30 min,加入溴乙胺盐酸盐(0.23 g, 1.2 mmol)和三乙胺(0.58 g, 5.7 mmol),然后室温反应过夜。反应结束后,加入水20 mL,用乙酸乙酯萃取,分出有机层,水层用乙酸乙酯萃取(10 mL × 3),合并有机层,用适量饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,蒸去溶剂得黄色油状物,经柱色谱纯化(乙酸乙酯-石油醚,1:2)得白色固体0.53 g,收率:77%。HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): Calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M + H-Br]<sup>+</sup> 455.35 Found 455.32。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.03 (1H, d,

J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.01 (1H, s, Ar-H), 6.73 (1H, d, J = 8.4 Hz, Pyr-H), 6.55 (1H, d, J = 2.1 Hz, Ar-H), 6.50 (1H, d, J = 2.1 Hz, Pyr-H), 4.34 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.13 (2H, t, J = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>-Br), 4.00 (2H, t, J = 8.7 Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 2.17 (3H, s, Ar-CH<sub>3</sub>), 1.96 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.58 (4H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.91 (6H, t, J = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.66 (6H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 158.75, 154.37, 140.29, 131.76, 13.27, 125.87, 125.01, 124.48, 114.82, 109.57, 65.94, 55.09, 44.91, 43.50, 36.91, 31.28, 30.93, 16.82, 8.58, 8.00。

### 2-(5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3-羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲氧羰基)甘氨酸甲酯(**13b**)

制备方法同化合物**13a**,将溴乙胺盐酸盐换成甘氨酸甲酯,得到无色油状物,收率86%。HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): Calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup> 515.34 Found 515.34。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.03 (1H, d, J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.01 (1H, s, Ar-H), 6.75 (1H, d, J = 8.4 Hz, Pyr-H), 6.57 (1H, d, J = 1.8 Hz, Ar-H), 6.27 (1H, d, J = 1.8 Hz, Pyr-H), 4.66 (1H, m, CH-NH), 4.35 (2H, q, J = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.15 (2H, t, J = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 3.75 (3H, s, CH<sub>3</sub>-OCO), 2.19 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.94 (6H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.58 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.45 (3H, d, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.36 (3H, t, J = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.93 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.65 (6H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 172.19, 161.34, 154.47, 140.17, 131.28, 130.27, 125.93, 125.13, 111.84, 109.56, 74.35, 64.68, 52.41, 47.79, 44.90, 43.77, 36.89, 36.89, 30.26, 18.60, 16.85, 8.54, 8.01。

### 2-(5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3-羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲酰胺基)乙胺(**13c**)

制备方法同化合物**13a**,将溴乙胺盐酸盐换成氨基丙炔,得到无色油状物,收率85%。HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): Calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 467.32 Found 467.32。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$ : 7.02 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, Ar-H), 7.00 (1H, s, Ar-H), 6.74 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, Pyr-H), 6.59 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, Ar-H), 6.21 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, Pyr-H), 4.34 (2H, q,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.12 (4H, m, CH<sub>2</sub>-N), 2.95 (1H, m, 烷氢), 2.18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.95 (6H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.59 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, t,  $J$  = 6.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.91 (6H, t,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.65 (6H, t,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 161.40, 154.49, 140.11, 131.36, 130.27, 125.92, 125.15, 111.82, 109.56, 74.35, 71.35, 64.68, 44.92, 53.78, 36.89, 30.95, 30.27, 28.83, 17.22, 8.52, 8.01。

2-(5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲酰胺基)乙醛缩二甲醇(**13d**)

制备方法同化合物**13a**, 将溴乙胺盐酸盐换成乙醛缩二甲醇, 得到白色固体, 收率78%。HRMS (ESI<sup>+</sup>,  $m/z$ ): Calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup> 517.36 Found 517.36。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.03 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, Ar-H), 7.01 (1H, s, Ar-H), 6.74 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, Pyr-H), 6.57 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, Ar-H), 6.20 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, Pyr-H), 4.28 (1H, t,  $J$  = 5.4 Hz, CH-OCH<sub>3</sub>), 4.32 (2H, q,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.14 (2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 3.47 (2H, d,  $J$  = 5.4 Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 3.41 (6H, s, CH<sub>3</sub>-O), 2.21 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.94 (6H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.54 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.37 (3H, t,  $J$  = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.91 (3H, t,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.65 (6H, t,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 162.01, 154.26, 140.67, 131.13, 130.28, 125.91, 125.12, 124.74, 111.49, 109.55, 74.35, 64.68, 54.46, 44.91, 43.72, 40.67, 36.89, 30.94, 30.31, 17.24, 8.51, 8.00。

5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲酸-2-吡啶甲酯(**13e**)

制备方法同化合物**13a**, 将溴乙胺盐酸盐换成间三氟甲基苯胺, 得到白色固体, 收率76%。HRMS (ESI<sup>+</sup>,  $m/z$ ): Calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> 521.33 Found 521.33。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz,

CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.59 (1H, m, Py-H), 7.70 (1H, m, Py-H), 7.42 (1H, m, Py-H), 7.22 (1H, m, Py-H), 7.03 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, Ar-H), 7.01 (1H, s, Ar-H), 6.81 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, Pyr-H), 6.73 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, Ar-H), 6.61 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, Pyr-H), 5.35 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Py), 4.30 (2H, q,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.13 (2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 2.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.96 (6H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.55 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.90 (6H, t,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.66 (6H, t,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 160.07, 154.48, 149.25, 139.94, 136.78, 131.96, 130.23, 127.06, 125.87, 121.63, 117.92, 109.61, 74.35, 65.93, 64.69, 44.90, 43.99, 36.90, 30.43, 17.06, 8.56, 8.01。

4-(5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲酰氧基)苯甲酸乙酯(**13f**)

将化合物**12**(0.50 g, 1.16 mmol)溶于氯仿(10 mL), 在0℃下加入4-甲基吡啶(0.59 g, 4.8 mmol), 搅拌10 min, 依次加入EDCI(0.24 g, 1.28 mmol)、4-羟基苯甲酸乙酯(0.21 g, 1.28 mmol)升温至70℃回流反应过夜, 加入水10 mL, 乙酸乙酯20 mL萃取。水层用乙酸乙酯(15 mL×3)洗涤合并有机层, 用适量饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 蒸去溶剂, 经柱色谱纯化(二氯甲烷-甲醇, 10:1)得无色油状物0.52 g, 收率77%。HRMS (ESI<sup>+</sup>,  $m/z$ ): Calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>6</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 600.34 Found 600.32。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.09 (1H, s, Ar-H), 8.06 (1H, s, Ar-H), 7.26 (1H, s, Ar-H), 7.23 (1H, s, Ar-H), 7.05 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, Ar-H), 7.03 (1H, s, Ar-H), 6.94 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, Pyr-H), 6.76 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, Ar-H), 6.71 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, Pyr-H), 4.34 (4H, m, CH<sub>2</sub>-O), 4.14 (2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 2.19 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.97 (6H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.56 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.39 (6H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.91 (6H, t,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.69 (6H, t,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 165.58, 158.37, 154.49, 139.76, 139.76, 132.60, 130.99, 130.19, 128.22, 125.26, 121.88, 119.13, 109.67, 64.70, 61.00, 44.92, 44.16, 30.95, 30.38, 16.97, 14.33,

8.56,8.01。

3-(5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲酰胺基)丙基吗啉(**13g**)

制备方法同化合物**13f**,将4-羟基苯甲酸乙酯换成3-氟苯甲醇,得到无色油状物,收率69%。HRMS(ESI<sup>+</sup>,*m/z*):Calcd. for C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>FNO<sub>3</sub>[M+Na]<sup>+</sup>560.33 Found 560.31。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.34(1H, m, Ar-H), 7.15(1H, m, Ar-H), 7.01(3H, m, Ar-H), 6.73(2H, m, Ar-H, Pyr-H), 6.60(1H, d, *J*=1.8 Hz, Pyr-H), 5.22(2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-O), 4.29(2H, q, *J*=7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.14(2H, *J*=6.0 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 2.18(3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.96(6H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.54(4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.36(3H, t, *J*=7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.91(6H, t, *J*=7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.66(6H, t, *J*=7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 163.15, 162.24, 154.46, 139.93, 131.98, 130.23, 127.05, 125.87, 125.14, 123.45, 114.98, 114.71, 109.58, 74.37, 64.69, 44.88, 44.01, 36.88, 30.92, 30.41, 17.07, 8.56, 8.02。

*N*-甲基-3-(5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲酰胺基)丙腈(**13h**)

将化合物**12**(0.50 g, 1.16 mmol)溶于乙腈(10 mL),加入4-甲基吡啶(0.59 g, 4.8 mmol)在40 °C反应10 min,升温至70 °C加入4-硝基苯磺酰氯(0.28 g, 1.3 mmol)。回流反应2.0 h,加入*N*-甲基烯丙胺(0.09 g, 1.3 mmol)。回流过夜加入水10 mL,乙酸乙酯20 mL萃取。水层用乙酸乙酯(10 mL×3)洗涤合并有机层,用适量饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,蒸去溶剂,经柱色谱纯化(乙酸乙酯-石油醚,1:5)得白色固体,收率83%。HRMS(ESI<sup>+</sup>,*m/z*):Calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup>496.35 Found 496.35。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.01(1H, d, *J*=8.1 Hz, Ar-H), 7.01(1H, s, Ar-H), 6.73(1H, d, *J*=8.1 Hz, Pyr-H), 6.55(1H, d, *J*=1.5 Hz, Ar-H), 6.08(1H, d, *J*=1.5 Hz, Pyr-H), 4.13(4H, m, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-N), 3.72(2H, t, *J*=6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 3.24(3H, s, CH<sub>3</sub>-N), 2.70(2H, t, *J*=6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-CN), 2.17(3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.95(6H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.56(4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.35(3H, t, *J*=7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.91(6H, t, *J*=7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.66(6H, t, *J*=7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。

<sup>13</sup>C NMR(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 164.62, 154.19, 139.99, 130.66, 125.98, 125.03, 123.38, 113.69, 109.53, 74.35, 64.68, 45.07, 43.13, 36.89, 30.95, 29.69, 17.02, 8.65, 8.01。

*N*-甲基-3-(5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲酰胺基)苯胺(**13i**)

制备方法同化合物**13h**,将*N*-甲基烯丙胺换成*N*-甲基苯胺,得到白色固体,收率86%。HRMS(ESI<sup>+</sup>,*m/z*):Calcd. for C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup>519.34 Found 519.35。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.23(2H, m, Ar-H), 7.13(1H, m, Ar-H), 7.04(2H, m, Ar-H), 6.79(2H, m, Ar-H), 6.65(2H, m, Ar-H, Pyr-H), 6.35(1H, d, *J*=1.8 Hz, Pyr-H), 4.23(2H, q, *J*=6.9 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.12(2H, t, *J*=6.0 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 3.40(3H, s, CH<sub>3</sub>-N), 2.13(3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.97(2H, t, *J*=6.0 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.62(8H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.39(3H, t, *J*=7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.91(6H, t, *J*=7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.44(6H, t, *J*=7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 164.35, 154.23, 146.05, 140.14, 130.08, 128.92, 126.68, 126.15, 125.78, 122.79, 116.49, 109.36, 74.35, 64.66, 44.72, 43.31, 37.82, 36.89, 30.94, 17.44, 8.49, 8.02。

*N*-(5-(1-乙基-1-(4-(3-乙基-3羟基-正戊基氧基)-3-甲基苯基)-丙基)-1-乙基吡咯-2-甲酰胺基)吗啉(**13j**)

制备方法同化合物**13h**,将*N*-甲基烯丙胺换成吗啉,得到无色油状物,收率78%。HRMS(ESI<sup>+</sup>,*m/z*):Calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>[M+H]<sup>+</sup>499.35 Found 499.35。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.02(1H, d, *J*=8.1 Hz, Ar-H), 7.01(1H, s, Ar-H), 6.72(1H, d, *J*=8.1 Hz, Pyr-H), 6.53(1H, d, *J*=1.8 Hz, Ar-H), 5.97(1H, d, *J*=1.8 Hz, Pyr-H), 4.13(4H, m, CH<sub>2</sub>-O), 3.69(8H, m, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-N), 2.17(3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.95(6H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.56(4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.35(3H, t, *J*=7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.91(6H, t, *J*=7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.66(6H, t, *J*=7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 163.57, 154.44,

140.03, 130.60, 125.97, 125.00, 123.06, 112.87, 109.49, 74.35, 67.05, 64.68, 45.06, 42.93, 36.89, 30.79, 17.28, 8.67, 8.01。

### 2.3 对维生素D受体激动能力的研究

文献已证实 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可诱导人早幼粒白血病细胞(HL-60)向成熟单核细胞分化,并且证明促HL-60细胞分化能力在一定程度上与此类化合物的VDR激动能力有关<sup>[10]</sup>,因此本研究通过测试目标化合物对HL-60细胞的促分化能力来间接测定其对VDR的激动能力。并以 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (骨化三醇)、LG190155(先导化合物)为阳性对照药。结果见表1。

**Table 1** HL-60 cell differentiation inducing activity of the target compounds **13a-13j** ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Compd.	EC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol/L}$ )	Compd.	EC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>13a</b>	2.20 ± 0.20	<b>13g</b>	>50
<b>13b</b>	>50	<b>13h</b>	5.38 ± 0.52
<b>13c</b>	10.34 ± 1.21	<b>13i</b>	1.19 ± 0.31
<b>13d</b>	7.56 ± 0.63	<b>13j</b>	0.10 ± 0.023
<b>13e</b>	>50	LG190155	0.59 ± 0.048
<b>13f</b>	>50	Calcitriol	0.0090 ± 0.00033

其中共有6个化合物(**13a**, **13c**, **13d**, **13h**, **13i**, **13j**)表现出较好的HL-60促分化活性( $\text{EC}_{50} < 50 \mu\text{mol/L}$ ),表明这6个化合物具有较

好的VDR激动能力。化合物**13j**的促分化活性最高( $\text{EC}_{50} = 0.10 \mu\text{mol/L}$ ),优于先导化合物LG190155。当化合物的吡咯环侧链末端含有极性基团,例如吗啉环时,活性较高,说明极性基团能与VDR的氨基酸残基形成氢键作用,对受体的激动能力增强,其诱导HL-60细胞分化的能力也会增加。而当侧链中仅含有酯基、苯基等形成氢键能力稍差或不能形成氢键的基团时,受体激动能力大大降低。在侧链中引入芳香环之后,由于吡咯环侧的侧链空间位阻较大,化合物不能很好的与受体结合,化合物的VDR激动能力较差。而在酰胺键的氮原子上引入甲基小侧链(**13h**, **13i**)时,化合物活性增强,说明可以通过增加化合物与水通道的相互作用,来提高化合物的VDR激动能力。

### 2.4 肿瘤细胞增殖抑制活性测试

根据文献报道<sup>[11]</sup>,采用MTT法评价本文所设计的10个目标化合物**13a~13j**对VDR过表达的人前列腺癌细胞(PC-3)、人乳腺癌细胞(MCF-7)、人结肠癌细胞(Caco-2)和人肝癌细胞(HepG2)的增殖抑制活性,同时考察了目标化合物对人肝正常细胞(L02)的影响,以骨化三醇和LG190155为阳性对照,结果见表2。

**Table 2** IC<sub>50</sub> values ( $\mu\text{mol/L}$ ) of the target compounds **13a-13j** against cancer cells and normal cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Compd.	PC-3	MCF-7	Caco-2	HepG2	L02
<b>13a</b>	18.38 ± 1.56	>50	37.28 ± 3.52	0.11 ± 0.076	15.24 ± 1.18
<b>13b</b>	>50	14.43 ± 2.56	14.95 ± 0.25	5.35 ± 0.67	8.64 ± 0.096
<b>13c</b>	17.73 ± 0.60	5.23 ± 0.37	11.85 ± 0.27	>50	>50
<b>13d</b>	15.17 ± 0.58	>50	>50	>50	>50
<b>13e</b>	29.01 ± 0.36	>50	>50	>50	>50
<b>13f</b>	>50	>50	>50	>50	>50
<b>13g</b>	>50	>50	>50	>50	>50
<b>13h</b>	10.88 ± 1.34	2.82 ± 0.18	11.83 ± 1.02	>50	2.28 ± 0.17
<b>13i</b>	15.87 ± 1.47	>50	>50	>50	>50
<b>13j</b>	11.12 ± 1.11	4.55 ± 1.06	17.44 ± 0.72	40.25 ± 5.15	4.77 ± 0.38
LG190155	>50	7.87 ± 0.12	16.99 ± 1.06	>50	5.14 ± 0.56
Calcitriol	17.25 ± 0.23	5.59 ± 0.57	4.46 ± 0.76	>50	0.67 ± 0.065

除了化合物**13f**和**13g**外,其余化合物对这4株细胞增殖抑制活性有一定的选择性。化合物**13a**在HepG2细胞株中的增殖抑制活性最好( $\text{IC}_{50} = 0.11 \mu\text{mol/L}$ ),且对普通肝细胞L02的抑制作用较低( $\text{IC}_{50} = 15.24 \mu\text{mol/L}$ ),说明化合物**13a**对肝肿瘤细胞具有一定选择性。化合物**13h**在PC-3、MCF-7和Caco-2细胞株中的增殖抑制活

性最好( $\text{IC}_{50} = 2.83 \sim 11.82 \mu\text{mol/L}$ ),优于阳性对照,但是对普通肝细胞L02有较强的抑制作用( $\text{IC}_{50} = 2.29 \mu\text{mol/L}$ ),说明化合物**13h**的选择性不高。

化合物**13j**不仅促分化活性较高而且对4株细胞的增殖抑制活性较好,分析原因可能是由于其吡咯环侧链含有的吗啉环,不仅能与VDR形成氢

键作用,同时又有一定的疏水能力,提高了VDR的激动能力,使得化合物的促分化活性和增殖抑制活性都增强。

而化合物**13f**和**13g**的促分化活性和增殖抑制活性都较低。这是由于吡咯环上的侧链引入芳香环结构时,吡咯环部分的侧链空间位阻较大,化合物不能很好地与受体结合,化合物的VDR激动能力较差,对肿瘤细胞的增殖抑制活性降低甚至消失。而化合物**13i**的促分化活性和增殖抑制活性都较高,这说明酰胺键的氮原子上引入甲基,能与VDR上空的水通道相互作用,从而减少了芳香环空间位阻带来的影响。

化合物**13b**的促分化活性虽然很低,但对MCF-7、Caco-2和HepG2体现出较好的抑制活性,提示可能此化合物还激活其他分子机制共同起效。

本研究推断3-苯基-3-吡咯基戊烷类衍生物与文献报道的二苯基戊烷类衍生物相似,都是通过疏水作用力和氢键作用与受体相结合。其疏水母核能够与构成VDR的疏水性氨基酸残基产生疏水作用力,而两侧含有亲水性基团的侧链则与VDR的氨基酸残基形成氢键。并且在侧链上酰胺键的氮原子上引入甲基,可与VDR上空的水通道相互作用。

#### 参考文献

- [1] Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action [J]. *Calcif Tissue Int*, 2013, **92**(2):77–98.
- [2] Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications [J]. *Chem Biol*, 2014, **21**(3):319–329.
- [3] Feldman D, Krishnan AV, Swami S, et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, **14**(5):342–357.
- [4] Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancertherapeutics [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, **7**(9):684–700.
- [5] Yamada S, Makishima M. Structure-activity relationship of nonsecosteroidal vitamin D receptormodulators [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, **35**(7):324–337.
- [6] Boehm MF, Fitzgerald P, Zou A, et al. Novel nonsecosteroidal vitamin D mimics exert VDR-modulating activities with less calcium mobilization than 1,25-dihydroxyvitamin D3 [J]. *Chem Biol*, 1999, **6**(5):265–275.
- [7] Konno K, Maki S, Fujishima T, et al. A novel and practical route to A-ring enyne synthon for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 analogs: synthesis of A-ring diastereomers of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D2 and 3-methyl-1, 25-dihydroxyvitamin D3 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, **8**(2):151–156.
- [8] Ciesielski F, Sato Y, Chebaro Y, et al. Structural basis for the accommodation of bis- and tris-aromatic derivatives in vitamin D nuclear receptor [J]. *J Med Chem*, 2012, **55**(19):8440–8449.
- [9] Shen W, Xue J, Zhao Z, et al. Novel nonsecosteroidal VDR agonists with phenyl-pyrrolyl pentaneskeleton [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, **69**:768–778.
- [10] Garay E, Donnelly R, Wang X, et al. Resistance to 1,25D-induced differentiation in human acute myeloid leukemia HL60-40AF cells is associated with reduced transcriptional activity and nuclear localization of the vitamin D receptor [J]. *J Cell Physiol*, 2007, **213**(3):816–825.
- [11] Akhter J, Lu Y, Finlay I, et al. 1α,25-Dihydroxyvitamin D3 and its analogues, EB1089 and CB1093, profoundly inhibit the *in vitro* proliferation of the human hepatoblastoma cell line HepG2 [J]. *ANZ J Surg*, 2001, **71**(7):414–417.