

## 新型 CDDO 衍生物的合成及抗肿瘤活性

裴江鸿, 肖余, 李其星, 赵子豪, 陈莉\*

(中国药科大学天然药物化学教研室, 南京 210009)

**摘要** 对 2-氰基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸(CDDO)进行结构修饰,通过不同连接臂将几种含氮杂环分别引入 C-17 位羧基,设计并合成了 12 个未见文献报道的新化合物(9a~9l),其结构经 ESI-MS、IR 和  $^1\text{H}$  NMR 确认。采用 MTT 法评价了化合物对 HCT-116、A549 及 HepG2 肿瘤细胞的抑制活性。实验结果表明,部分化合物对肿瘤细胞具有较强的抑制活性,其中化合物 9c 的活性最强,高于 CDDO 咪唑啉酮衍生物(CDDO-Im)。血浆稳定性实验表明,化合物 9c 的血浆稳定性较高,显著高于 CDDO-Im。

**关键词** 2-氰基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸;衍生物;合成;抗增殖活性;血浆稳定性

**中图分类号** R914.2 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)05-0548-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170507

**引用本文** 裴江鸿,肖余,李其星,等. 新型 CDDO 衍生物的合成及抗肿瘤活性[J]. 中国药科大学学报,2017,48(5):548-553.

**Cite this article as:** PEI Jianghong, XIAO Yu, LI Qixing, et al. Synthesis and antitumor activity of novel CDDO derivatives[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(5):548-553.

## Synthesis and antitumor activity of novel CDDO derivatives

PEI Jianghong, XIAO Yu, LI Qixing, ZHAO Zihao, CHEN Li\*

Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Twelve novel 2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oic acid(CDDO) derivatives were designed and synthesized(9a-9l) by introducing different heterocyclic rings to 17-COOH of CDDO through various linkers. Their structures were determined by ESI-MS, IR and  $^1\text{H}$  NMR. The antiproliferative activity of the synthetic derivatives against human cancer cells HCT-116, A549 and HepG2 was evaluated by MTT assay. Several compounds showed potent inhibitory activities against test cell lines. Among them, compound 9c showed more potent antiproliferative activity than the CDDO-imidazolide (CDDO-Im). Moreover, rat plasma stability assay showed that compound 9c was more stable than CDDO-Im.

**Key words** CDDO; derivative; synthesis; antiproliferative activity; plasma stability

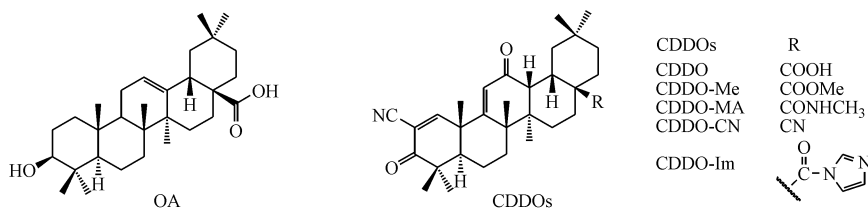
齐墩果酸(oleanolic acid, OA)是一种五环三萜类化合物,在植物界广泛分布。OA 及其衍生物具有多种药理活性,如抗炎、抗氧化、抗肿瘤等<sup>[1]</sup>,但作用较弱。为提高 OA 的抗炎和抗肿瘤活性,研究者对其进行了大量的结构修饰改造,其中,美国达特茅斯学院的 Honda 课题组合成的 2-氰基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸及其衍生物(CDDOs)为此类工作的突出代表(图 1)<sup>[2-3]</sup>。CDDO 的 17-羧酸甲酯(CDDO-Me)、17-酰基咪唑(CDDO-Im)等表现出显著增强的抗炎和抗肿瘤活性,能够作用于细

胞内多条信号转导通路,是迄今为止抗炎和抗肿瘤活性最强的半合成三萜化合物<sup>[2-4]</sup>。构效关系研究表明,五环三萜母体中 A 环  $\alpha$ -氰基烯酮和 C 环烯酮结构是 CDDOs 的关键药效团,且 C-17 位羧基的结构修饰对化合物活性具有显著的影响<sup>[2]</sup>。

已报道的 CDDOs 中 CDDO-Im 活性最强、且毒性较低,但因为稳定性差而未能进入临床研究<sup>[5]</sup>。CDDO-Me 具有良好的活性和稳定性,先后多次进入肿瘤及慢性炎症的临床研究,商品名为甲基巴多索隆<sup>[6-8]</sup>。但在临床研究发现,

CDDO-Me 具有一定的心血管不良反应和致死风险,严重影响其临床应用<sup>[9]</sup>。因此,设计、合成新

型活性强、不良反应低、稳定性高的 CDDO 衍生物成为该类药物深入研究的主要策略。



**Figure 1** Structures of oleanolic acid (OA) and 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic acid (CDDO) derivatives

含氮杂环化合物具有多种生物活性,普遍存在于活性天然产物及合成小分子中。Taylor 等<sup>[10]</sup>总结了各类环状结构在 FDA 批准药物中的出现频率,发现哌啶、哌嗪、吡咯烷、吗啡啉等含氮杂环在临床药物中最为常见。因此,本论文以 OA 为起始原料,采用本研究前期发现的高效合成方法制备了 CDDO<sup>[11]</sup>,并进一步对其进行结构修饰,即保留 CDDO 的 A 环氰基烯酮及 C 环烯酮结构,将 CDDO-Im 中 C-17 不稳定的酰基咪唑替换为稳定性较强的酯键,并通过不同长度的连接臂分别引入吗啉、4-甲基哌嗪、吡咯烷、吡唑等含氮杂环,合成了 12 个目标化合物(**9a~9l**);采用 MTT 法对所有目标化合物进行了体外抗人结肠癌 HCT-116 细胞、人肺癌 A549 细胞及人肝癌 HepG2 细胞增殖活性评估;最后,对其中活性最优的化合物 **9c** 进行了血浆稳定性测试。

## 1 合成路线

参照本课题组前期发现的母体化合物 CDDO 的高效合成方法<sup>[11]</sup>,以 OA 为原料,分别经羧基苄酯化保护、A 环 IBX 氧化构建烯酮、C 环 mCPBA 氧化和 Br<sub>2</sub>/HBr 作用构建烯酮、A 环 2 位氰基化、脱苄基、DDQ 氧化重构 A 环烯酮等 7 步反应高效制得 CDDO,总产率接近 40%。在碳酸钾的作用下,CDDO 分别与 1,2-二溴乙烷、1,3-二溴丙烷和 1,4-二溴丁烷反应得到中间体 **6~8**;以碘化钾为催化剂、碳酸钾为缚酸剂,中间体 **6~8** 分别与吗啉、N-甲基哌嗪、四氢吡咯、吡唑反应,制得目标化合物 **9a~9l**。目标化合物的结构均经 ESI-MS、IR 和 <sup>1</sup>H NMR 确证。

## 2 化学实验

### 2.1 仪器及试剂

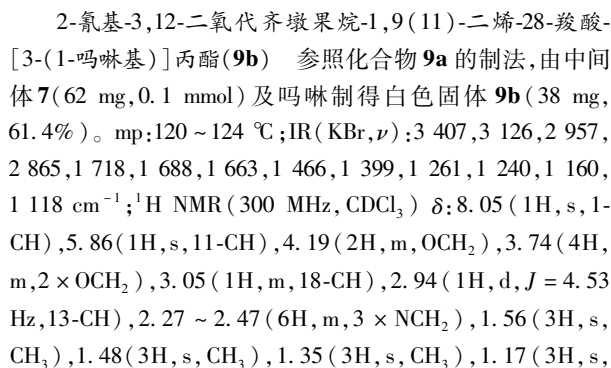
<sup>1</sup>H NMR 采用 Bruker AV-300 型核磁共振仪

测定(TMS 为内标);IR 光谱采用 Nicolet Impact 410 型红外光谱仪;MS 采用 HP1100LC/MSD 质谱仪测定;熔点采用毛细管法在 RY-1 型熔点仪中测定(温度未校正);齐墩果酸购于武汉远成共创科技有限公司;薄层色谱板硅胶 GF<sub>254</sub> 为青岛海洋化工有限公司生产;所用试剂均为化学纯或分析纯;石油醚的沸程为 60~90℃;无水试剂均经常规无水处理。

### 2.2 化学合成

2-氰基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-(2-溴)-乙酯(**6**) 取 CDDO(1.00 g, 2.04 mmol) 和 1,2-二溴乙烷(1.14 g, 6.11 mmol) 溶于无水 DMF 20 mL,加入 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.84 g, 6.11 mmol) 和 KI(0.10 g, 0.61 mmol),室温条件下搅拌反应 4 h, TLC 监测显示反应结束。反应液过滤,滤液加入水 200 mL,用乙酸乙酯萃取(100 mL×3),合并有机相,分别用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液(100 mL×2),饱和 NaCl 水溶液(100 mL×2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,硅胶柱色谱得白色固体 **1**(1.13 g, 93%)。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.05(1H, s, 1-CH), 5.98(1H, s, 11-CH), 4.44(2H, t, J = 5.61 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.55(2H, t, J = 5.61 Hz, BrCH<sub>2</sub>), 3.01(1H, m, 18-CH), 2.97(1H, d, J = 4.65 Hz, 13-CH), 1.49(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.26(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.02(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.01(3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91(3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS m/z: 620.2, 622.2[M + Na]<sup>+</sup>。

2-氰基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-(3-溴)-丙酯(**7**) 参照中间体 **6** 的制法,由 CDDO 1 g 制得白色固体 **7**(1.18 g, 95%)。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.05(1H, s, 1-CH), 5.98(1H, s, 11-CH), 4.25(2H, t, J = 5.92 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.48(2H, t, J = 6.25 Hz, BrCH<sub>2</sub>), 3.05(1H, m, 18-CH), 2.94(1H, d, J = 4.53 Hz, 13-CH), 2.20(2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.49(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.26(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.18(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.02(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.01(3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91(3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS m/z: 634.2, 636.2[M + Na]<sup>+</sup>。



CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 641.8 [M + Na]<sup>+</sup>。

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[4-(1-吗咪基)]丁酯(**9c**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**8**(63 mg, 0.1 mmol)及吗咪制得白色固体**9c**(30 mg, 47.4%)。mp: 123 ~ 128 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 399, 3 129, 2 952, 2 866, 1 718, 1 688, 1 664, 1 617, 1 466, 1 399, 1 240, 1 160, 1 118 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.04 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.12 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 3.74 (4H, m, 2 × OCH<sub>2</sub>), 3.04 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d,  $J$  = 4.59 Hz, 13-CH), 2.37 ~ 2.47 (6H, m, 3 × NCH<sub>2</sub>), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 655.8 [M + Na]<sup>+</sup>。

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[2-[1-(*N*-甲基哌嗪基)]]乙酯(**9d**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**6**(60 mg, 0.1 mmol)及*N*-甲基哌嗪制得白色固体**9d**(28 mg, 45.3%)。mp: 79 ~ 83 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 126, 2 963, 1 663, 1 400, 1 261, 1 097, 1 020, 864, 800 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.12 (2H, t,  $J$  = 5.94 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.08 (1H, m, 18-CH), 2.97 (1H, d,  $J$  = 4.65 Hz, 13-CH), 2.41 ~ 2.56 (10H, m, 5 × NCH<sub>2</sub>), 2.36 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 640.8 [M + Na]<sup>+</sup>。

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[3-[1-(*N*-甲基哌嗪基)]]丙酯(**9e**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**7**(62 mg, 0.1 mmol)及*N*-甲基哌嗪制得白色固体**9e**(33 mg, 52.3%)。mp: 82 ~ 86 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 401, 3 127, 2 960, 1 719, 1 686, 1 663, 1 464, 1 400, 1 260, 1 163, 1 078, 1 039, 1 015, 800 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.16 (2H, t,  $J$  = 6.02 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.05 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d,  $J$  = 4.53 Hz, 13-CH), 2.42 ~ 2.57 (10H, m, 5 × NCH<sub>2</sub>), 2.35 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 654.8 [M + Na]<sup>+</sup>。

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[4-[1-(*N*-甲基哌嗪基)]]丁酯(**9f**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**8**(63 mg, 0.1 mmol)及*N*-甲基哌嗪制得白色固体**9f**(31 mg, 48.1%)。mp: 75 ~ 80 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 402, 3 126, 2 950, 2 870, 1 718, 1 686, 1 662, 1 465, 1 399, 1 240, 1 161, 1 122, 1 078, 1 013, 804 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.12

(2H, t,  $J$  = 6.20 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.04 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d,  $J$  = 4.59 Hz, 13-CH), 2.41 ~ 2.56 (10H, m, 5 × NCH<sub>2</sub>), 2.38 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 668.8 [M + Na]<sup>+</sup>。

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[2-(1-四氢吡咯基)]乙酯(**9g**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**6**(60 mg, 0.1 mmol)及四氢吡咯得白色固体**9g**(27 mg, 45.6%)。mp: 100 ~ 103 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 398, 3 131, 2 955, 1 723, 1 660, 1 400, 1 237, 1 157, 1 123, 1 041 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.15 (2H, t,  $J$  = 5.91 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.08 (1H, m, 18-CH), 2.97 (1H, d,  $J$  = 4.65 Hz, 13-CH), 2.45 ~ 2.53 (6H, m, 3 × NCH<sub>2</sub>), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 611.8 [M + Na]<sup>+</sup>。

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[3-(1-四氢吡咯基)]丙酯(**9h**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**7**(62 mg, 0.1 mmol)及四氢吡咯得白色固体**9h**(25 mg, 41.5%)。mp: 99 ~ 105 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 398, 3 126, 1 718, 1 661, 1 400, 1 159 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.13 (2H, t,  $J$  = 6.03 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.05 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d,  $J$  = 4.53 Hz, 13-CH), 2.38 ~ 2.46 (6H, m, 3 × NCH<sub>2</sub>), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 625.8 [M + Na]<sup>+</sup>。

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[4-(1-四氢吡咯基)]丁酯(**9i**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**8**(63 mg, 0.1 mmol)及四氢吡咯得白色固体**9i**(22 mg, 35.7%)。mp: 93 ~ 96 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 400, 3 126, 1 718, 1 660, 1 400, 1 261, 1 038, 803 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.13 (2H, t,  $J$  = 6.25 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.04 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d,  $J$  = 4.59 Hz, 13-CH), 2.37 ~ 2.47 (6H, m, 3 × NCH<sub>2</sub>), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 617.8 [M + H]<sup>+</sup>。

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[2-(1-吡唑基)]乙酯(**9j**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**6**(60 mg, 0.1 mmol)及吡唑得白色固体**9j**(22 mg, 37.6%)。mp: 158 ~ 162 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 400, 3 133, 2 952, 2 168, 1 720, 1 660, 1 511, 1 466, 1 400, 1 159 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 7.49 (1H, s,

NCH = ), 7.40 (1H, s, N = CH), 6.15 (1H, s, CH = ), 5.78 (1H, s, 11-CH), 4.17 (2H, t,  $J = 5.92$  Hz, OCH<sub>2</sub>), 4.10 (2H, t,  $J = 6.04$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.08 (1H, m, 18-CH), 2.97 (1H, d,  $J = 4.65$  Hz, 13-CH), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 608.8 [M + Na]<sup>+</sup>.

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[3-(1-吡唑基)]丙酯(**9k**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**7**(62 mg, 0.1 mmol)及吡唑得白色固体**9k**(20 mg, 33.3%)。mp: 202 ~ 206 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 397, 3 126, 2 962, 2 923, 2 850, 1 721, 1 660, 1 467, 1 400, 1 261, 1 093, 1 039, 801 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 7.49 (1H, s, NCH = ), 7.40 (1H, s, N = CH), 6.15 (1H, s, = CH), 5.78 (1H, s, C11-H), 4.23 (2H, t,  $J = 6.03$  Hz, OCH<sub>2</sub>), 4.13 (2H, t,  $J = 6.06$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.05 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d,  $J = 4.53$  Hz, 13-CH), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 622.8 [M + Na]<sup>+</sup>.

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[4-(1-吡唑基)]丁酯(**9l**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**8**(63 mg, 0.1 mmol)及吡唑得白色固体**9l**(21 mg, 34.3%)。mp: 174 ~ 178 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 398, 3 126, 2 957, 1 719, 1 661, 1 619, 1 467, 1 399, 1 218, 1 157 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 7.49 (1H, s, NCH = ), 7.40 (1H, s, N = CH), 6.15 (1H, s, = CH), 5.78 (1H, s, 11-CH), 4.46 (2H, t,  $J = 6.24$  Hz, OCH<sub>2</sub>), 4.13 (2H, t,  $J = 6.02$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.04 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d,  $J = 4.59$  Hz, 13-CH), 1.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 636.8 [M + Na]<sup>+</sup>.

### 3 体外抗肿瘤活性

采用 MTT 法分别测试目标化合物**9a**~**9l**对人结肠癌 HCT-116 细胞、人肺癌 A549 细胞及人肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制活性<sup>[12]</sup>, 阳性对照药为 CDDO-Im。取对数生长期状态良好的肿瘤细胞, 加入质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶消化液使贴壁细胞脱落。稀释细胞悬液, 制成每毫升含  $5 \times 10^4$  个 (A549 和 HCT116 细胞) 或  $4 \times 10^4$  个 (HepG2 细胞) 细胞的悬液。取细胞悬液接种于 96 孔板上, 每孔 200  $\mu$ L, 37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养过夜。换液, 加入受试化合物或阳性对照药 (化

合物先用 DMSO 溶解, 再用 PBS 稀释, 配成一定浓度的母液), 每孔 200  $\mu$ L, 每个浓度设立 4 个复孔, 设立不含药物的空白对照组, 培养 44 h, 加 MTT 溶液 10  $\mu$ L 继续培养 4 h。吸去上清液, 每孔加 DMSO 150  $\mu$ L, 平板摇床上振摇 10 min, 用酶联免疫检测仪在波长 490 nm 处测定每孔的吸收度。计算细胞生长抑制率。

根据同一个化合物在不同浓度下对肿瘤细胞的生长抑制率作图, 使用 GraphPad Prism5 软件计算得受试化合物的半数抑制浓度, 即 IC<sub>50</sub>。目标化合物**9a**~**9l**及对照药 CDDO-Im 的 IC<sub>50</sub>见表 1。

**Table 1** Antiproliferative activities of target compounds in cancer cells (IC<sub>50</sub>,  $\mu$ mol/L)

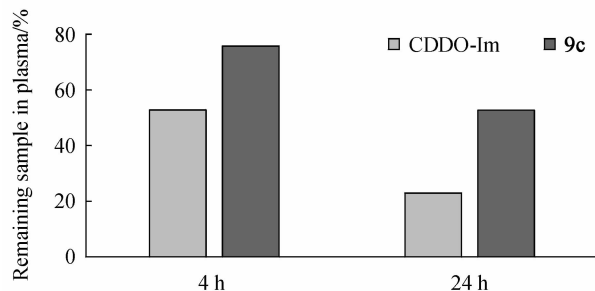
Compd.	HCT-116	A549	HepG2
<b>9a</b>	4.00	3.04	8.15
<b>9b</b>	8.45	10.04	15.71
<b>9c</b>	1.61	1.16	2.19
<b>9d</b>	5.11	8.87	37.06
<b>9e</b>	18.07	12.53	7.14
<b>9f</b>	6.25	6.31	20.60
<b>9g</b>	5.89	7.44	8.09
<b>9h</b>	11.43	3.26	16.20
<b>9i</b>	13.58	6.18	2.03
<b>9j</b>	8.84	8.89	19.13
<b>9k</b>	61.16	14.47	23.66
<b>9l</b>	10.35	9.54	12.83
CDDO-Im	2.82	1.14	2.86

### 4 血浆稳定性

对活性最高的化合物**9c**进行了血浆稳定性测试。取清洁级雄性 SD 大白鼠, 禁食 24 h 但保持自由饮水, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (2 mL/kg) 麻醉, 颈动脉插管取血并用 3.8% 柠檬酸钠抗凝, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤备用。精密称取 CDDO-Im 与化合物**9c**适量, 甲醇溶解, 分别稀释得 500, 250, 125, 62.5, 31.25  $\mu$ mol/L 的系列溶液, 以 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。各精密吸取 100  $\mu$ L, 经 HPLC 进样分析, 测定峰面积, 并以峰面积为  $Y$  与相应浓度  $c$  进行线性回归处理得 CDDO-Im 的标准曲线方程  $Y = 0.076 9c + 0.147 8$  ( $r = 0.999 9$ ), 及化合物**9c**的标准曲线方程  $Y = 0.347 4c + 0.165 3$  ( $r = 0.999 9$ )。

分别将 3  $\mu$ mol/L 样品溶于甲醇 6 mL, 各取 100  $\mu$ L 加入血浆 900  $\mu$ L 中, 置于 37 °C 恒温振荡

器中,分别于配制后 4、24 h 取样 100  $\mu\text{L}$ ,同时补充空白血浆 100  $\mu\text{L}$ ,立即于取出的样品中加甲醇 500  $\mu\text{L}$  沉淀蛋白,4 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,取 100  $\mu\text{L}$  供 HPLC 分析,根据标准曲线得出血浆中化合物的剩余含量,结果见图 2。



**Figure 2** Rat plasma stability of CDDO-Im and compound **9c** incubated at 37 °C

## 5 结果与讨论

### 5.1 体外抗肿瘤活性及初步构效关系

从表 1 中的数据可见,此类目标化合物具有显著的抗肿瘤活性,其中化合物 **9c** 的活性尤为突出,对 3 种肿瘤细胞株的抑制活性均高于阳性对照药 CDDO-Im。初步构效关系分析表明,当含氮杂环相同时,连接臂碳链的长度为 2 和 4 的化合物活性优于碳链长度为 3 的化合物(**9a**、**9c** > **9b**; **9d**、**9f** > **9e**; **9g**、**9i** > **9h**; **9j**、**9l** > **9k**)。且此类化合物对 HCT-116 细胞及 A549 细胞的选择性优于 HepG2 细胞。

### 5.2 化合物 **9c** 的血浆稳定性

如图 2 所示,CDDO-Im 在 37 °C 的大鼠血浆中孵育 4 h 后剩余 53%,化合物 **9c** 剩余 76%;24 h 后,CDDO-Im 仅余 23%,而化合物 **9c** 仍剩余 53%,残余量显著高于对照品 CDDO-Im。初步实验结果表明,所设计合成的目标化合物 **9c** 血浆稳定性较对照品 CDDO-Im 有显著提高。

本文共合成 12 个具有含 N 杂环边链的新型 CDDO 酯类目标化合物,其中,化合物 **9c** 表现出良好的体外抗肿瘤活性和血浆稳定性,优于阳性对照

药 CDDO-Im。其体内活性及作用机制等值得深入研究,以发现活性和成药性更佳的抗肿瘤候选化合物。

## 参考文献

- [1] Pollier J, Goossens A. Oleanolic acid[J]. *Phytochemistry*, 2012, **77**(5): 10–15.
- [2] Sporn MB, Liby KT, Yore MM, *et al.* New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress[J]. *J Nat Prod*, 2011, **74**(3): 537–545.
- [3] Liby KT, Sporn MB. Synthetic oleanane triterpenoids: multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease[J]. *Pharmacol Rev*, 2012, **64**(4): 972–1003.
- [4] Liby KT, Yore MM, Sporn MB. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, **7**(5): 357–369.
- [5] Liby K, Yore MM, Roebuck BD, *et al.* A novel acetylenic tricyclic bis-(cyano enone) potently induces phase 2 cytoprotective pathways and blocks liver carcinogenesis induced by aflatoxin[J]. *Cancer Res*, 2008, **68**(16): 6727–6733.
- [6] Hong DS, Kurzrock R, Supko JG, *et al.* A phase I first-in-human trial of bardoxolone methyl in patients with advanced solid tumors and lymphomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, **18**(12): 3396–3406.
- [7] Pergola PE, Raskin P, Toto RD, *et al.* Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2011, **365**(4): 327–336.
- [8] Chartoumpekis DV, Sykietis GP. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and advanced chronic kidney disease[J]. *N Engl J Med*, 2014, **370**(18): 1767–1769.
- [9] de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, *et al.* Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, **369**(26): 2492–2503.
- [10] Taylor RD, MacCoss M, Lawson ADG. Rings in drugs[J]. *J Med Chem*, 2014, **57**(14): 5845–5859.
- [11] Xiao Y, Luo QF, Li QX, *et al.* Improved synthesis of 2-cyano-3, 12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic acid[J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2016, **26**(2): 131–135.
- [12] Liu Y, Wang TT, Chen L. Synthesis and antitumor activity of isosteviol derivatives[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, **47**(1): 48–53.