

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¹H 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-dioxooleana-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 ¹H 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-imidazolidine (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^[1],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)^[2-3]。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^[2-4]。构效关系研究表明,五环三萜母体中A环α-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^[2]。

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^[5]。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^[6-8]。但在临床研究中发现,

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^[9]。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。

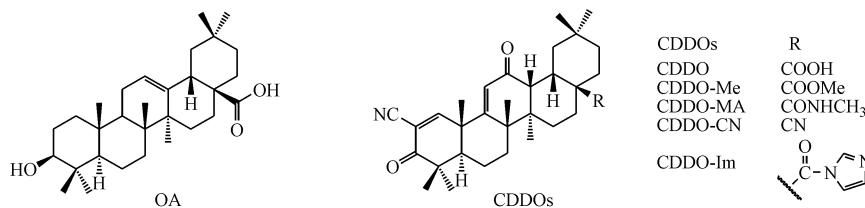


Figure 1 Structures of oleanolic acid (OA) and 2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oic acid (CDDO) derivatives

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^[10]总结归纳了各类环状结构在 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^[11],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^[11],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 Br₂/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 ¹H NMR 确证。

2 化学实验

2.1 仪器及试剂

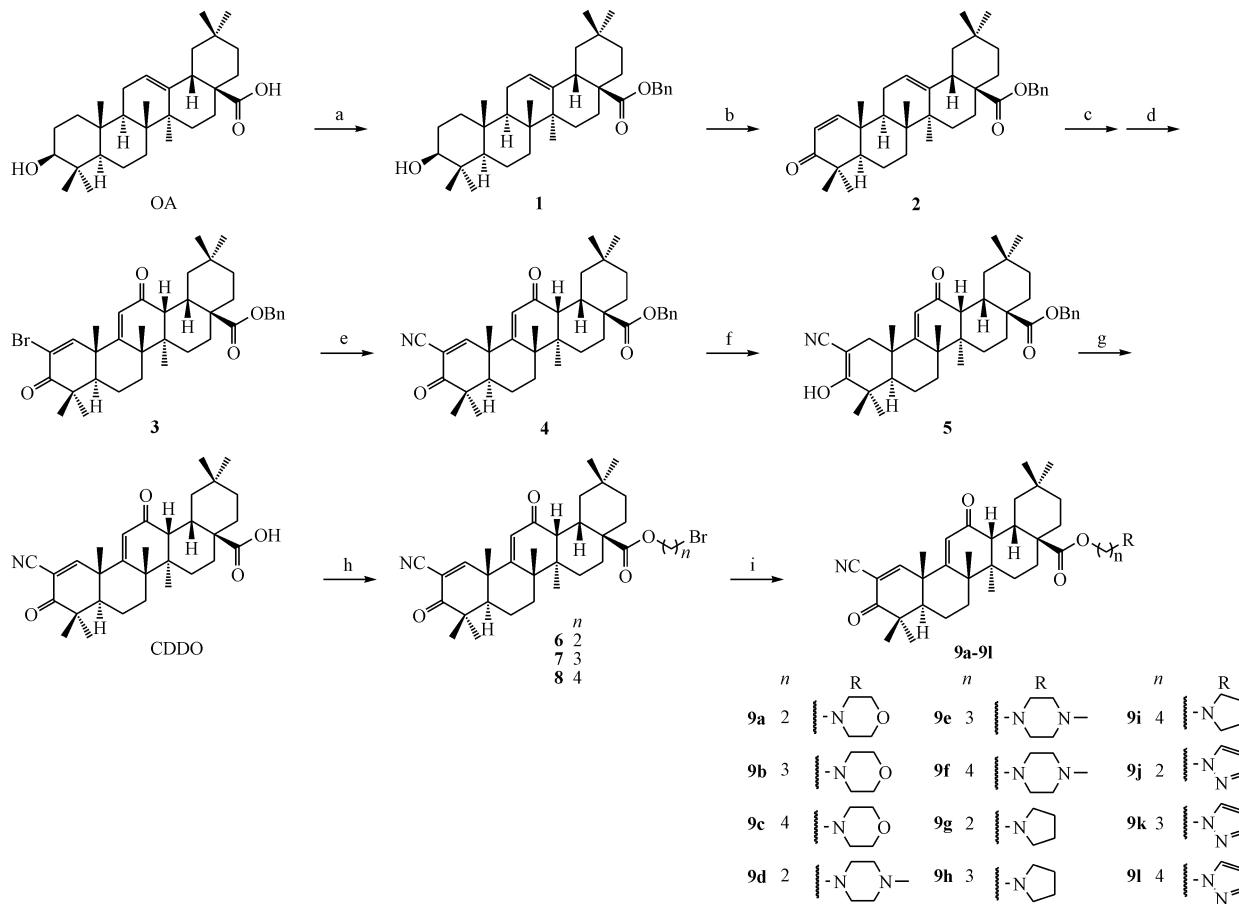
¹H NMR 采用 Brucker AV-300 型核磁共振仪

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 GF₂₅₄ 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 °C;无水试剂均经常规无水处理。

2.2 化学合成

2-氟基-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 K₂CO₃(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 NaHCO₃ 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%)。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 8.05(1H, s, 1-CH), 5.98(1H, s, 11-CH), 4.44(2H, t, J = 5.61 Hz, OCH₂), 3.55(2H, t, J = 5.61 Hz, BrCH₂), 3.01(1H, m, 18-CH), 2.97(1H, d, J = 4.65 Hz, 13-CH), 1.49(3H, s, CH₃), 1.35(3H, s, CH₃), 1.26(3H, s, CH₃), 1.17(3H, s, CH₃), 1.02(3H, s, CH₃), 1.01(3H, s, CH₃), 0.91(3H, s, CH₃); ESI-MS *m/z*: 620.2, 622.2[M + Na]⁺。

2-氟基-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%)。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 8.05(1H, s, 1-CH), 5.98(1H, s, 11-CH), 4.25(2H, t, J = 5.92 Hz, OCH₂), 3.48(2H, t, J = 6.25 Hz, BrCH₂), 3.05(1H, m, 18-CH), 2.94(1H, d, J = 4.53 Hz, 13-CH), 2.20(2H, m, CH₂), 1.49(3H, s, CH₃), 1.35(3H, s, CH₃), 1.26(3H, s, CH₃), 1.18(3H, s, CH₃), 1.02(3H, s, CH₃), 1.01(3H, s, CH₃), 0.91(3H, s, CH₃); ESI-MS *m/z*: 634.2, 636.2 [M + Na]⁺。



Scheme 1 Synthetic route of CDDO and the target compounds **9a-9l**

Reagents and conditions: (a) $\text{BnCl}, \text{K}_2\text{CO}_3, \text{DMF}, 55^\circ\text{C}, 6\text{ h}$; (b) $\text{IBX}, \text{PhF}, \text{DMSO}, 85^\circ\text{C}, 8\text{ h}$; (c) $\text{mCPBA}, \text{DCM}, \text{r. t.}, 24\text{ h}$; (d) $\text{AcOH}, 40\% \text{HBr}, \text{Br}_2, 35^\circ\text{C}, 24\text{ h}$; (e) $\text{CuCN}, \text{KI}, \text{dry DMF}, 120^\circ\text{C}, 36\text{ h}$; (f) $\text{H}_2, \text{Pd-C}, \text{THF}, \text{r. t.}, 15\text{ h}$; (g) $\text{DDQ}, \text{toluene, reflux}, 0.5\text{ h}$; (h) $\text{dibromoalkane}, \text{K}_2\text{CO}_3, \text{DMF}, \text{r. t.}, 4\text{ h}$; (i) amine, $\text{K}_2\text{CO}_3, \text{KI}, \text{CH}_3\text{CN, reflux}, 12\text{ h}$

2-氨基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-(4-溴)-丁酯(8) 参照中间体**6**的制法,由CDDO 1 g制得白色固体**8**(1.20 g, 92%)。¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05(1H, s, 1-CH), 5.98(1H, s, 11-CH), 4.15(2H, t, $J = 6.22$ Hz, OCH_2), 3.44(2H, t, $J = 6.42$ Hz, BrCH_2), 3.04(1H, m, 18-CH), 2.94(1H, d, $J = 4.59$ Hz, 13-CH), 1.49(3H, s, CH_3), 1.34(3H, s, CH_3), 1.26(3H, s, CH_3), 1.18(3H, s, CH_3), 1.02(3H, s, CH_3), 1.01(3H, s, CH_3), 0.91(3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 648.3, 650.3 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

2-氨基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[2-(1-吗啉基)]乙酯(9a) 取中间体**6**(60 mg, 0.1 mmol)和吗啉(14 mg, 0.15 mmol)溶于乙腈 5 mL,加入 K_2CO_3 (44 mg, 0.3 mmol)和 KI (4 mg, 0.02 mmol), 50 °C下加热回流,搅拌反应12 h, TLC 监测显示反应结束。反应液过滤,滤液减压旋干,硅胶柱色谱得白色固体**9a**(35 mg, 58%)。mp: 135~139 °C; IR(KBr, ν): 3 412, 3 164, 2 952, 2 863, 2 360,

1 720, 1 689, 1 663, 1 617, 1 513, 1 455, 1 399, 1 236, 1 159, 1 118 cm^{-1} ; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05(1H, s, 1-CH), 5.97(1H, s, 11-CH), 4.13(2H, m, OCH_2), 3.74(4H, m, 2 \times OCH_2), 3.08(1H, m, 18-CH), 2.97(1H, d, $J = 4.65$ Hz, 13-CH), 2.37~2.47(6H, m, 3 \times NCH_2), 1.56(3H, s, CH_3), 1.48(3H, s, CH_3), 1.35(3H, s, CH_3), 1.17(3H, s, CH_3), 1.00(3H, s, CH_3), 0.91(3H, s, CH_3), 0.85(3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 627.8 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

2-氨基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[3-(1-吗啉基)]丙酯(9b) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**7**(62 mg, 0.1 mmol)及吗啉制得白色固体**9b**(38 mg, 61.4%)。mp: 120~124 °C; IR(KBr, ν): 3 407, 3 126, 2 957, 2 865, 1 718, 1 688, 1 663, 1 466, 1 399, 1 261, 1 240, 1 160, 1 118 cm^{-1} ; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05(1H, s, 1-CH), 5.86(1H, s, 11-CH), 4.19(2H, m, OCH_2), 3.74(4H, m, 2 \times OCH_2), 3.05(1H, m, 18-CH), 2.94(1H, d, $J = 4.53$ Hz, 13-CH), 2.27~2.47(6H, m, 3 \times NCH_2), 1.56(3H, s, CH_3), 1.48(3H, s, CH_3), 1.35(3H, s, CH_3), 1.17(3H, s, CH_3), 0.91(3H, s, CH_3), 0.85(3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 627.8 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.85 (3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 641.8 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

2-氟基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-羧酸-[4-(1-吗啉基)]丁酯(**9c**) 参照化合物**9a**的制法,由中间体**8**(63 mg, 0.1 mmol)及吗啉制得白色固体**9c**(30 mg, 47.4%)。mp: 123 ~ 128 °C; IR(KBr, ν): 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⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.04 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.12 (2H, m, OCH_2), 3.74 (4H, m, 2 \times OCH_2), 3.04 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d, J = 4.59 Hz, 13-CH), 2.37 ~ 2.47 (6H, m, 3 \times NCH_2), 1.56 (3H, s, CH_3), 1.48 (3H, s, CH_3), 1.35 (3H, s, CH_3), 1.17 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.85 (3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 655.8 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

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, ν): 3 126, 2 963, 1 663, 1 400, 1 261, 1 097, 1 020, 864, 800 cm⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.12 (2H, t, J = 5.94 Hz, OCH_2), 3.08 (1H, m, 18-CH), 2.97 (1H, d, J = 4.65 Hz, 13-CH), 2.41 ~ 2.56 (10H, m, 5 \times NCH_2), 2.36 (3H, s, NCH_3), 1.56 (3H, s, CH_3), 1.48 (3H, s, CH_3), 1.35 (3H, s, CH_3), 1.17 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.85 (3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 640.8 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

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, ν): 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⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.16 (2H, t, J = 6.02 Hz, OCH_2), 3.05 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d, J = 4.53 Hz, 13-CH), 2.42 ~ 2.57 (10H, m, 5 \times NCH_2), 2.35 (3H, s, NCH_3), 1.56 (3H, s, CH_3), 1.48 (3H, s, CH_3), 1.35 (3H, s, CH_3), 1.17 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.85 (3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 654.8 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

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, ν): 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⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.12

(2H, t, J = 6.20 Hz, OCH_2), 3.04 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d, J = 4.59 Hz, 13-CH), 2.41 ~ 2.56 (10H, m, 5 \times NCH_2), 2.38 (3H, s, NCH_3), 1.56 (3H, s, CH_3), 1.48 (3H, s, CH_3), 1.35 (3H, s, CH_3), 1.17 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.85 (3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 668.8 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

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)及四氢吡咯制得白色固体**9g**(27 mg, 45.6%)。mp: 100 ~ 103 °C; IR(KBr, ν): 3 398, 3 131, 2 955, 1 723, 1 660, 1 400, 1 237, 1 157, 1 123, 1 041 cm⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.15 (2H, t, J = 5.91 Hz, OCH_2), 3.08 (1H, m, 18-CH), 2.97 (1H, d, J = 4.65 Hz, 13-CH), 2.45 ~ 2.53 (6H, m, 3 \times NCH_2), 1.56 (3H, s, CH_3), 1.48 (3H, s, CH_3), 1.35 (3H, s, CH_3), 1.17 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.85 (3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 611.8 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

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)及四氢吡咯制得白色固体**9h**(25 mg, 41.5%)。mp: 99 ~ 105 °C; IR(KBr, ν): 3 398, 3 126, 1 718, 1 661, 1 400, 1 159 cm⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.13 (2H, t, J = 6.03 Hz, OCH_2), 3.05 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d, J = 4.53 Hz, 13-CH), 2.38 ~ 2.46 (6H, m, 3 \times NCH_2), 1.56 (3H, s, CH_3), 1.48 (3H, s, CH_3), 1.35 (3H, s, CH_3), 1.17 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.85 (3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 625.8 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。

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)及四氢吡咯制得白色固体**9i**(22 mg, 35.7%)。mp: 93 ~ 96 °C; IR(KBr, ν): 3 400, 3 126, 1 718, 1 660, 1 400, 1 261, 1 038, 803 cm⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05 (1H, s, 1-CH), 5.97 (1H, s, 11-CH), 4.13 (2H, t, J = 6.25 Hz, OCH_2), 3.04 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d, J = 4.59 Hz, 13-CH), 2.37 ~ 2.47 (6H, m, 3 \times NCH_2), 1.56 (3H, s, CH_3), 1.48 (3H, s, CH_3), 1.35 (3H, s, CH_3), 1.17 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.85 (3H, s, CH_3); ESI-MS m/z : 617.8 [$\text{M} + \text{H}$]⁺。

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)及吡唑制得白色固体**9j**(22 mg, 37.6%)。mp: 158 ~ 162 °C; IR(KBr, ν): 3 400, 3 133, 2 952, 2 168, 1 720, 1 660, 1 511, 1 466, 1 400, 1 159 cm⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 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, OCH₂), 4.10 (2H, t, $J = 6.04$ Hz, NCH₂), 3.08 (1H, m, 18-CH), 2.97 (1H, d, $J = 4.65$ Hz, 13-CH), 1.56 (3H, s, CH₃), 1.48 (3H, s, CH₃), 1.35 (3H, s, CH₃), 1.17 (3H, s, CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.91 (3H, s, CH₃), 0.85 (3H, s, CH₃); ESI-MS m/z : 608.8 [M + Na]⁺。

2-氨基-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, ν): 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⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 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, OCH₂), 4.13 (2H, t, $J = 6.06$ Hz, NCH₂), 3.05 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d, $J = 4.53$ Hz, 13-CH), 1.56 (3H, s, CH₃), 1.48 (3H, s, CH₃), 1.35 (3H, s, CH₃), 1.17 (3H, s, CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.91 (3H, s, CH₃), 0.85 (3H, s, CH₃); ESI-MS m/z : 622.8 [M + Na]⁺。

2-氨基-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, ν): 3 398, 3 126, 2 957, 1 719, 1 661, 1 619, 1 467, 1 399, 1 218, 1 157 cm⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 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, OCH₂), 4.13 (2H, t, $J = 6.02$ Hz, NCH₂), 3.04 (1H, m, 18-CH), 2.94 (1H, d, $J = 4.59$ Hz, 13-CH), 1.56 (3H, s, CH₃), 1.48 (3H, s, CH₃), 1.35 (3H, s, CH₃), 1.17 (3H, s, CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.91 (3H, s, CH₃), 0.85 (3H, s, CH₃); ESI-MS m/z : 636.8 [M + Na]⁺。

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^[12],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 5×10^4 个(A549和HCT116细胞)或 4×10^4 个(HepG2细胞)细胞的悬液。取细胞悬液接种于96孔板上,每孔200 μL,37 °C、饱和湿度、5% CO₂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 μL,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 μL继续培养4 h。吸去上清液,每孔加DMSO 150 μL,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IC₅₀。目标化合物**9a**~**9l**及对照药CDDO-Im的IC₅₀见表1。

Table 1 Antiproliferative activities of target compounds in cancer cells (IC₅₀, μmol/L)

Compd.	HCT-116	A549	HepG2
9a	4.00	3.04	8.15
9b	8.45	10.04	15.71
9c	1.61	1.16	2.19
9d	5.11	8.87	37.06
9e	18.07	12.53	7.14
9f	6.25	6.31	20.60
9g	5.89	7.44	8.09
9h	11.43	3.26	16.20
9i	13.58	6.18	2.03
9j	8.84	8.89	19.13
9k	61.16	14.47	23.66
9l	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 μm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 μmol/L的系列溶液,以0.22 μm微孔滤膜过滤。各精密吸取100 μL,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 $Y = 0.0769c + 0.1478$ ($r = 0.9999$),及化合物**9c**的标准曲线方程 $Y = 0.3474c + 0.1653$ ($r = 0.9999$)。

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

器中,分别于配制后4、24 h取样100 μ L,同时补充空白血浆100 μ L,立即于取出的样品中加甲醇500 μ L沉淀蛋白,4 000 r/min离心10 min,上清液经0.22 μ m微孔滤膜过滤,取100 μ 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。

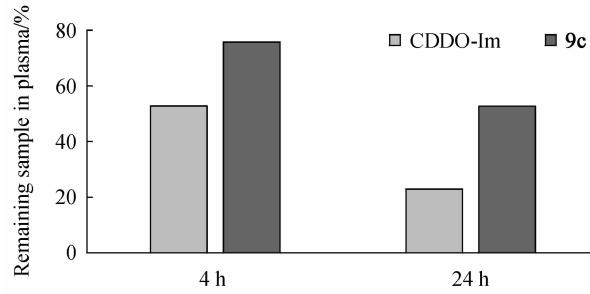


Figure 2 Rat plasma stability of CDDO-Im and compound 9c incubated at 37 $^{\circ}$ C

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 $^{\circ}$ 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] Chartoumpakis DV, Sykiotis 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-dioxoleana-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.