

• 实验研究 •

苯并咪唑类衍生物的合成及其对 X 连锁凋亡抑制蛋白抑制活性的研究

王太禹¹, 韩开林^{2,3*}, 王国成^{1,3}

1. 天士力控股集团有限公司研究院 化学药物研究所, 天津 300410
2. 南京大学 生命科学学院, 江苏 南京 210046
3. 江苏天士力帝益药业有限公司, 江苏 淮安 223003

摘要: 目的 合成苯并咪唑类衍生物并研究其对 X 连锁凋亡抑制蛋白的抑制活性。方法 以 1-Boc-2-氨基甲酰吡咯烷为起始原料, 依次通过硫代、烷基化、环合、还原、氧化、环合、脱保护、缩合、脱保护等 11 步反应合成苯并咪唑类衍生物, 采用荧光偏振法对目标化合物进行了体外 XIAP 抑制活性测试。结果 合成得到 4 个目标产物, 其结构经 ¹H-NMR 和 ESI-MS 确证。活性测试结果显示, 所设计化合物均具有一定的 XIAP 抑制活性, 其中, 10a~10c 的 IC₅₀ 为 1.2~2.7 μmol/L。结论 苯并咪唑芳环上电子效应及 NH 基团为重要活性位点, 值得进一步研究。

关键词: IAP 抑制剂; Smac-拟态物; XIAP; 荧光偏振法

中图分类号: R914.2; R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)11-2065-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.11.003

Synthesis of benzimidazole derivatives and their XIAP inhibitory activities

WANG Tai-yu¹, HAN Kai-lin^{2,3}, WANG Guo-cheng^{1,3}

1. Chemical Medicine Department of Tasly R&D Institute, Tasly Holding Group Co., Ltd, Tianjin 300410, China
2. Jiangsu Tasly Diyi Pharmaceutical Co., Ltd, Huaian 223003, China
3. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To synthesize benzimidazole derivatives and study the inhibitory activities of benzimidazole against X inhibitor of apoptosis proteins (XIAP). **Methods** 1-Boc-L-prolinamide was used as the starting materials to synthesize benzimidazole derivatives by a eleven-step route reaction of sulpho-reaction, alkylation, cyclized, reduction, oxidation, cyclized, de-protection, condensation, and de-protection, etc. The XIAP inhibitor activities were tested with fluorescence polarization method *in vitro*. **Results** Four novel compounds were synthesized and their structures were confirmed by ¹H-NMR and ESI-MS. The activity experiments showed that the target compounds exhibited potent IAP inhibitor activities. Among them, IC₅₀ of compounds 10a — 10c were 1.2 — 2.7 μmol/L. **Conclusion** The electronic effect and NH group of benzimidazole ring is the important active site, which merits further study.

Key words: inhibitor of apoptosis proteins; Smac-mimic; X-linked inhibitor of apoptosis protein; fluorescence polarization

细胞程序性死亡的过程称为细胞凋亡, 其在维持体内平衡和调节高等生物细胞数量方面起关键作用^[1]。研究发现非正常的细胞凋亡调节将会导致癌症^[2-3]、神经退行性疾病的产生^[4], 针对凋亡途径的调控成为药物研究的热点。凋亡的起始和执行阶段主要依赖于受 IAP 家族调控的 Caspase 激酶的

活化^[5-6]。IAP 是机体中一类重要的细胞凋亡因子, 其家族成员 XIAP、cIAP1 和 cIAP2 的明显特征是 N 端都存在一个或几个 BIR 结构域(杆状病毒 IAP 重复序列)和 C 末端的 RING 结构域, 并具有 E3 泛素连接酶活性^[7]。基于 IAP 结构和功能开发的 IAP 抑制剂主要应用于抗肿瘤药物的研发, 已报道的

收稿日期: 2017-08-04

作者简介: 王太禹, 工作于天士力控股集团有限公司研究院。

*通信作者 韩开林 (1984—), 男, 研究方向为有机合成、药物化学和生物制药。Tel: (022)26735103 E-mail: hankl2011@hotmail.com

IAP 抑制剂, 从其结构特点上来分主要为 Smac 拟态物和非肽类小分子两类。Smac 拟态物按其结构类型又可分为单体和二聚体, 具有代表性的单体抑制剂有 LCL161^[8]、GDC0152^[9]和 AT-406^[10]; 二聚体主要是 birinapant^[11]。非肽类小分子抑制剂是基于 BIR3 的结构进行分子设计或虚拟筛选得到的化合物; 其代表性的抑制剂为 ASTX-660 和 ASTX-50^[12]。

目前在研的 IAP 抑制剂 90% 为 Smac 类似物, 其作用机制主要通过使其过表达失活来促进凋亡蛋白酶的释放, 从而促进恶性细胞的凋亡^[13-15]。IAP 蛋白的口袋状表面活性区 N 末端存在一个 AVPI 四肽序列, AVPI 四肽序列是结合 IAPs 并发挥凋亡作用的重要结构域, 通过对 AVPI 四肽的修饰已开发出许多 Smac 类似物^[16], Smac 类似物是比 AVPI 四肽更有效和活性更强的拮抗剂。因此, AVPI 四肽模拟结构片段是当前 IAP 抑制剂研发的热点, 针对 AVPI 四肽模拟片段的研究主要集中在 A 片段的修饰上, 通过对现有 IAP 抑制剂的结构分析可知, AVPI 四肽模拟片段的 A 片段仍有很大的修饰空间。本研究在保留 AVPI 四肽片段的基础上, 以现有 IAP 抑制剂为依据, 应用分子杂交的药物设计原理, 在 A 片段上引入药物活性分子苯并咪唑, 设计合成出一系列新型苯并咪唑类衍生物, 期望从中筛选出活性更高的 IAP 抑制剂。

1 仪器与试剂

布鲁克 AVANCE III HD 400M 型核磁共振波谱仪; 赛默飞世尔 LCQ 型质谱仪; ZF-7 型紫外分析仪; SB100D 型超声波清洗机; KQ-C 型玻璃仪器气流烘干器; JJ224BC 型电子天平; S10-3 型恒温磁力搅拌器; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器; Hei-VAP 型旋转蒸发仪; SHB-III A 循环水式多用真空泵; DLSB-20130 型低温冷却液循环泵; YRT-3 型数字熔点仪; Leopard 70-4 微孔板恒温孵育器 (莱普特科学仪器有限公司); Envision 2014 型多模式微孔板检测仪 (珀金埃尔默企业管理有限公司)。

合成部分所用试剂均为市售化学纯或分析纯, 除特别说明外, 不经处理直接使用。X 连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP, 895-XB-050, 50 μg)、生物素 Biotin 标记的人 Biotin-Smac-N7-peptide (100 μg) 均购于美国 RD 公司。阳性对照药物 LCL161 购于美国 MedChem Express 公司, 质量分数为 99.53%。

2 合成部分

以 1-Boc-2-氨基甲酰吡咯烷为原料, 通过硫代、

烷基化、环合、还原、氧化、环合、脱保护、缩合、脱保护等 11 步反应合成苯并咪唑类衍生物, 所得目标化合物其结构经 ¹H-NMR 和 ESI-MS 确证。目标化合物的合成路线见图 1。

2.1 (S)-2-硫代羰基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯 (1) 的合成

将 *N*-Boc-*L*-脯氨酸 (10.0 g, 46.7 mmol)、劳森试剂 (13.2 g, 32.7 mmol) 在 0 °C 下溶解于无水四氢呋喃中, 室温反应 5~10 h, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 为展开剂, TLC 检测反应完全后, 将其倒入冰水中, 反应液用醋酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 所得粗品用石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 洗脱, 柱色谱分离得固体产物 9.5 g, 收率 89%。ESI-MS *m/z*: 231.19 [M+H]⁺。

2.2 (S)-2-((2-乙氧基-2-氧代乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-羧酸叔丁酯 (2) 的合成

将化合物 1 (9.0 g, 39.1 mmol)、无水碳酸氢钾 (7.8 g, 78.2 mmol)、3-溴丙酮醋酸乙酯 (9.2 g, 47.0 mmol) 在 0 °C 下依次加入到 *N,N*-二甲基甲酰胺中, 室温反应 5~10 h, 石油醚-醋酸乙酯 (4:1) 为展开剂, TLC 检测反应完全后, 将其倒入冰水中, 反应液用醋酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 得化合物 2 的粗品, 未经纯化直接投入下步反应。

2.3 (R)-2-(1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)噻唑-4-羧酸乙酯 (3) 的合成

将上述反应得到的化合物 2、2,6-二甲基吡啶 (0.63 g, 5.9 mmol) 在 0 °C 下依次加入到三氟乙酸酐中, 回流反应 4~8 h, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 为展开剂, TLC 检测反应完全后, 将其倒入冰水中, 向其中加入饱和碳酸氢钠至不再产生气泡为止, 反应液用醋酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 所得粗品用石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱, 柱色谱分离得油状液体 8.16 g, 收率 80%。ESI-MS *m/z*: 327.20 [M+H]⁺。

2.4 (R)-2-(4-(羟甲基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-羧酸叔丁酯 (4) 的合成

将化合物 3 (8.0 g, 24.5 mmol) 在 0 °C 下加入到无水四氢呋喃中, 然后再向其中缓慢加入四氢铝锂 (3.73 g, 98 mmol), 室温过夜反应, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 为展开剂, TLC 检测反应完全后, 低温下向反应液中加入 4 mL 水, 再加入 4 mL

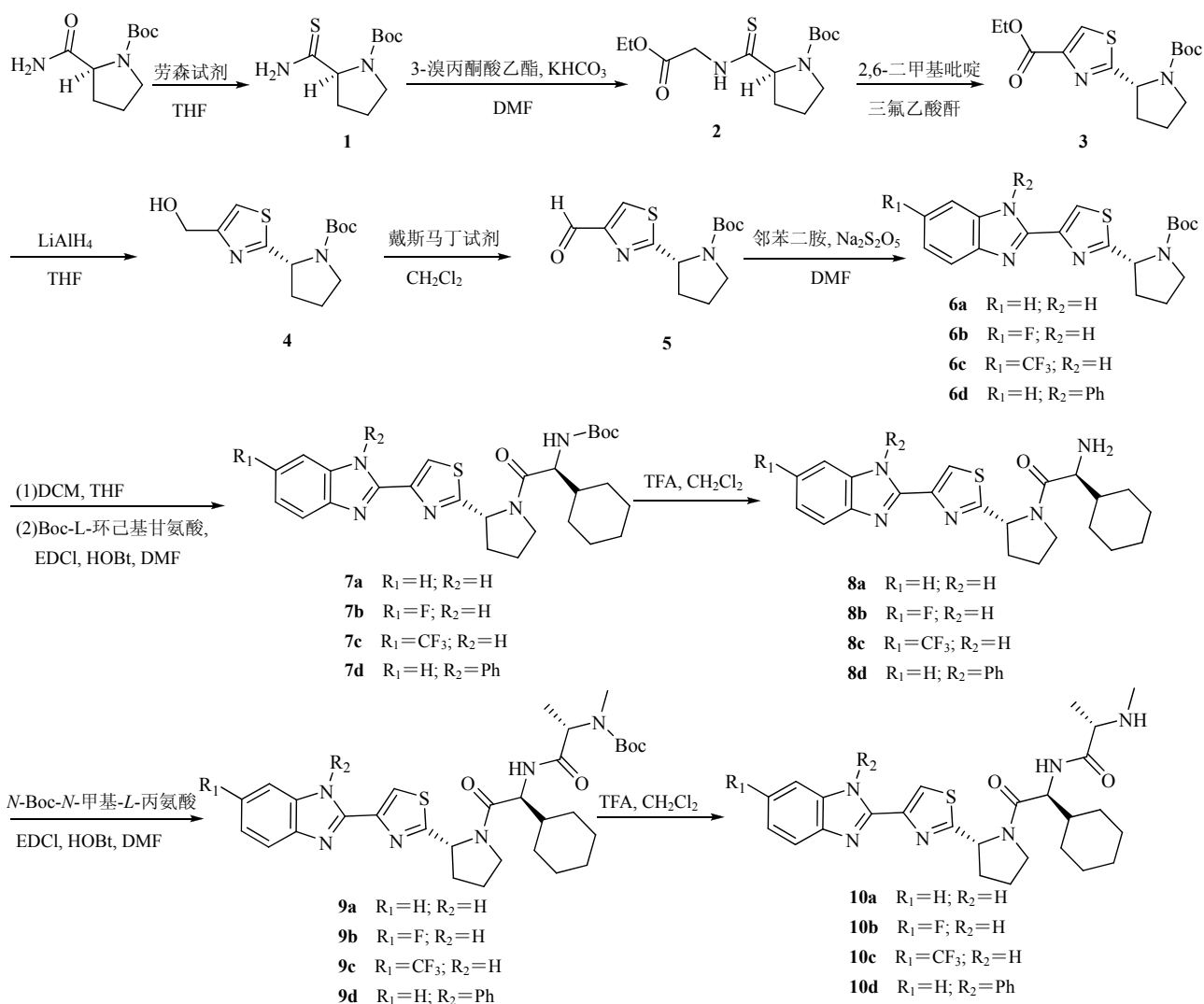


图 1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of target compounds

15% NaOH 水溶液, 最后加入 8 mL 水淬灭反应, 硅藻土滤过, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 所得粗品用石油醚 - 醋酸乙酯 (5 : 1) 洗脱, 柱色谱分离得油状液体 4.5 g, 收率 65%。ESI-MS m/z : 285.21 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

2.5 (R)-2-(4-甲酰基噻唑-2-基)吡咯烷-1-羧酸叔丁酯 (5) 的合成

将化合物 4 (4.0 g, 14.1 mmol) 在 0 °C 下加入到无水二氯甲烷中, 然后再向其中缓慢加入戴斯马丁试剂 (8.9 g, 21.1 mmol), 室温反应 4~8 h, 石油醚 - 醋酸乙酯 (5 : 1) 为展开剂, TLC 检测反应完全后, 用饱和碳酸氢钠溶液和硫代硫酸钠溶液淬灭反应, 二氯甲烷萃取, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 所得粗品用石油醚 - 醋酸乙酯 (5 : 1)

洗脱, 柱色谱分离得黄色固体 3.1 g, 收率 78%。mp 104~105 °C; ESI-MS m/z : 305.11 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.00 (s, 1H, CHO), 8.17 (s, 1H, CH-S), 5.26~5.19 (m, 1H, pyrrolidine-CH), 3.64~3.49 (m, 2H, pyrrolidine- CH_2), 2.37~2.24 (m, 2H, pyrrolidine- CH_2), 2.02~1.96 (m, 2H, pyrrolidine- CH_2), 1.35 (s, 9H, *N*-Boc)。

2.6 (R)-2-(4-(1*H*-取代苯并咪唑-2-基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-羧酸叔丁酯 (6a~6d) 的合成

将化合物 5 (0.5 g, 1.8 mmol) 置于反应瓶中, 加入 10 mL *N,N*-二甲基甲酰胺, 加入取代苯二胺 (1.8 mmol)、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0.67 g, 3.6 mmol), 120 °C 反应 4~6 h, 石油醚 - 醋酸乙酯 (2 : 1) 为展开剂, TLC 检测反应完全后, 将其倒入冰水中, 反应液用

醋酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 所得粗品用石油醚 - 醋酸乙酯 (3:1) 洗脱, 柱色谱分离得固体产物。

化合物 **6a**: 产率 81%, mp 132~131 °C; ESI-MS m/z : 371.24 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.13 (s, 1H, CH-S), 7.71 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, PhCH), 7.35 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, PhCH), 4.47 (t, $J=11.2$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 2.94~2.90 (m, 2H, pyrrolidine-CH₂), 2.30~2.12 (m, 4H, pyrrolidine-CH₂), 1.51 (s, 9H, *N*-Boc)。

化合物 **6b**: 产率为 83%, mp 129~128 °C; ESI-MS m/z : 389.27 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.12 (s, 1H, CH-S), 7.61 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhCH), 7.38~7.33 (m, 2H, PhCH), 4.32 (t, $J=12.0$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 2.88~2.84 (m, 2H, pyrrolidine-CH₂), 2.27~2.04 (m, 4H, pyrrolidine-CH₂), 1.43 (s, 9H, *N*-Boc)。

化合物 **6c**: 产率为 78%, mp 141~140 °C; ESI-MS m/z : 439.20 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.09 (s, 1H, =CH-S), 7.57 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhCH), 7.41 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhCH), 7.32 (s, 1H, PhCH), 4.51 (t, $J=10.8$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 2.82~2.79 (m, 2H, pyrrolidine-CH₂), 2.37~2.15 (m, 4H, pyrrolidine-CH₂), 1.47 (s, 9H, *N*-Boc)。

化合物 **6d**: 产率为 72%, mp 153~152 °C; ESI-MS m/z : 447.30 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.11 (s, 1H, CH-S), 7.89~7.86 (m, 1H, PhCH), 7.62~7.57 (m, 5H, PhCH), 7.37~7.34 (m, 2H, PhCH), 7.21~7.19 (m, 1H, PhCH), 4.41 (t, $J=13.2$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 2.78~2.71 (m, 2H, pyrrolidine-CH₂), 2.23~2.10 (m, 4H, pyrrolidine-CH₂), 1.35 (s, 9H, *N*-Boc)。

2.7 ((*S*)-2-((*R*)-2-(4-(1*H*-取代苯并咪唑-2-基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-基)-1-环己基-2-氧代乙基)氨基甲酸叔丁酯 (7a~7d) 的合成

将化合物 **6a~6d** (1.08 mmol) 置于反应瓶中, 加入 5 mL 二氯甲烷, 0 °C 下缓慢加入 5 mL 二氯甲烷 - 三氟乙酸 (4:1) 的混合溶剂, 室温反应 1~2 h, 二氯甲烷 - 甲醇 (20:1) 为展开剂, TLC 检测反应完全后, 将其倒入冰水中, 饱和碳酸氢钠中和至中性, 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 蒸干,

得粗品。产率 93%, ESI-MS m/z : 271.22 [M+H]⁺。

将上述所得粗品 (0.93 mmol) 置于反应瓶中, 加入 5 mL 无水吡啶, 再加入 EDC·HCl (0.20 g, 1.02 mmol)、HOBt (0.15g, 1.02 mmol)、Boc-*L*-环己基甘氨酸 (0.29 g, 1.11 mmol), 室温反应 6~8 h, 石油醚 - 醋酸乙酯 (2:1) 为展开剂, TLC 检测反应完全后, 将其倒入冰水中, 反应液用醋酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用 1mol/L HCl 水洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 所得粗品用二氯甲烷 - 甲醇 (30:1) 洗脱, 柱色谱分离得油状产物。

化合物 **7a**: 产率 64%, ESI-MS m/z : 510.30 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.02 (s, 1H, CH-S), 7.56 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, PhCH), 7.31 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, PhCH), 4.65 (t, $J=9.6$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.52 (s, 1H, NH-CH), 2.63~2.58 (m, 2H, CH₂), 2.41~2.35 (m, 5H, CH, CH₂), 2.28~2.23 (m, 2H, CH₂), 1.57 (s, 9H, *N*-Boc), 1.55~1.49 (m, 8H, CH₂)。

化合物 **7b**: 产率 57%, ESI-MS m/z : 528.29 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.22 (s, 1H, CH-S), 7.58 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhCH), 7.41~7.38 (m, 2H, PhCH), 4.67 (t, $J=10.2$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.48 (t, $J=9.6$ Hz, 1H, NH-CH), 2.97~2.92 (m, 2H, CH₂), 2.64~2.60 (m, 2H, CH₂), 2.33~2.29 (m, 5H, CH, CH₂), 1.53 (s, 9H, *N*-Boc), 1.49~1.42 (m, 8H, CH₂)。

化合物 **7c**: 产率 60%, ESI-MS m/z : 578.31 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.17 (s, 1H, CH-S), 7.61 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhCH), 7.39 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhCH), 7.35 (s, 1H, PhCH), 4.66 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.37~4.33 (m, 1H, NH-CH), 3.33~3.30 (m, 1H, CH₂), 2.98~2.91 (m, 3H, CH₂), 2.42~2.37 (m, 5H, CH, CH₂), 1.49 (s, 9H, *N*-Boc), 1.32~1.25 (m, 8H, CH₂)。

化合物 **7d**: 产率 51%, ESI-MS m/z : 586.35 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.15 (s, 1H, CH-S), 7.92~7.89 (m, 1H, PhCH), 7.66~7.58 (m, 5H, PhCH), 7.43~7.37 (m, 2H, PhCH), 7.25~7.21 (m, 2H, PhCH), 4.71 (t, $J=9.2$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.55 (m, 1H, NH-CH), 3.08~3.02 (m, 2H, CH₂), 2.67~2.59 (m, 2H, CH₂), 2.23~2.10 (m, 4H, CH, CH₂), 1.41 (s, 9H,

N-Boc), 1.35~1.22 (m, 8H, CH₂)。

2.8 ((*S*)-1-((*S*)-2-((*R*)-2-(4-(1*H*-苯并咪唑-2-基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-基)-1-环己基-2-氧代乙基)氨基-1-氧代丙烷-2-基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯 (9a~9d) 的合成

将化合物 7a~7d (0.59 mmol) 置于反应瓶中, 加入 5 mL 二氯甲烷, 0 °C 下缓慢加入 5 mL 二氯甲烷-三氟乙酸(4:1)的混合溶剂, 室温反应 1~2 h, 二氯甲烷-甲醇(20:1)为展开剂, TLC 检测反应完全后, 将其倒入冰水中, 饱和碳酸氢钠中和至中性, 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 得粗品 8a~8d。

将化合物 8a~8d (0.49 mmol) 置于反应瓶中, 加入 3 mL 无水吡啶, 再加入 EDC·HCl (0.10 g, 0.54 mmol)、HOBt (82mg, 0.54 mmol)、*N*-Boc-*N*-甲基-*L*-丙氨酸 (0.12 g, 0.59 mmol), 室温反应 6~8 h, 二氯甲烷-甲醇(20:1)为展开剂, TLC 检测反应完全后, 将其倒入冰水中, 反应液用醋酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用 1 mol/L HCl 水洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 所得粗品用二氯甲烷-甲醇(30:1)洗脱, 柱色谱分离得油状产物。

化合物 9a: 产率 57%, ESI-MS *m/z*: 595.41 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.13 (s, 1H, CH-S), 7.62 (d, *J*=8.4 Hz, 2H, PhCH), 7.38 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, PhCH), 5.55 (d, *J*=7.2 Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.59 (t, *J*=10.2 Hz, 1H, CH₃-CH), 4.44 (m, 1H, NH-CH), 3.88~3.85 (m, 1H, CH₂), 3.23~3.17 (m, 1H, CH₂), 2.83~2.79 (m, 2H, CH₂), 2.29~2.21 (m, 5H, CH₂、CH₃), 2.09~2.00 (m, 4H, CH、CH₂), 1.51 (s, 9H, *N*-Boc), 1.43~1.32 (m, 10H, CH₂、CH₃)。

化合物 9b: 产率 49%, ESI-MS *m/z*: 613.40 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.15 (s, 1H, CH-S), 7.64 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, PhCH), 7.47~7.40 (m, 1H, PhCH), 6.95~6.90 (m, 1H, PhCH), 5.58 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.60 (t, *J*=9.2 Hz, 1H, CH₃-CH), 4.41 (t, *J*=7.2 Hz, 1H, NH-CH), 3.83~3.78 (m, 1H, CH₂), 3.05~2.99 (m, 1H, CH₂), 2.66~2.60 (m, 2H, CH₂), 2.40~2.31 (m, 5H, CH₂、CH₃), 2.07~1.99 (m, 5H, CH、CH₂), 1.59 (s, 9H, *N*-Boc), 1.40~1.24 (m, 9H, CH₂、CH₃)。

化合物 9c: 产率 60%, ESI-MS *m/z*: 663.38 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.08 (s, 1H, CH-S), 7.59~7.55 (m, 1H, PhCH), 7.47~7.42 (m, 1H, PhCH), 7.33~7.29 (m, 1H, PhCH), 5.57 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.70 (t, *J*=9.6 Hz, 1H, CH₃-CH), 4.51~4.47 (m, 1H, NH-CH), 3.62~3.59 (m, 1H, CH₂), 3.20~3.17 (m, 1H, CH₂), 2.47~2.34 (m, 1H, CH), 2.22~2.05 (m, 6H, CH₂、CH₃), 1.99~1.82 (m, 6H, CH₂、CH₃), 1.43 (s, 9H, *N*-Boc), 1.35~1.10 (m, 8H, CH₂)。

化合物 9d: 产率 53%, ESI-MS *m/z*: 671.42 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.01~7.99 (m, 1H, CH-S), 7.90~7.88 (m, 1H, PhCH), 7.61~7.55 (m, 5H, PhCH), 7.47~7.42 (m, 2H, PhCH), 7.24~7.20 (m, 1H, PhCH), 5.56 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.63 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, CH₃-CH), 4.27~4.20 (m, 1H, NH-CH), 3.19~3.13 (m, 1H, CH₂), 2.91~2.87 (m, 2H, CH₂), 2.56~2.45 (m, 1H, CH₂), 2.27~2.22 (m, 3H, CH、CH₂), 2.19~2.03 (m, 5H, CH₂、CH₃), 1.89~1.74 (m, 3H, CH₂), 1.47 (s, 9H, *N*-Boc), 1.33~1.12 (m, 8H, CH₂、CH₃)。

2.9 目标化合物 10a~10d 的合成

将化合物 9a~9d (0.25 mmol) 置于反应瓶中, 加入 5 mL 二氯甲烷, 0 °C 下缓慢加入 5 mL 二氯甲烷-三氟乙酸(4:1)的混合溶剂, 室温反应 1~2 h, 二氯甲烷-甲醇(20:1)为展开剂, TLC 检测反应完全后, 将其倒入冰水中, 饱和碳酸氢钠中和至中性, 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 所得粗品用二氯甲烷-甲醇(30:1)洗脱, 柱色谱分离得白色固体产物。

化合物 10a: 产率 89%, mp 69~70 °C; ESI-MS *m/z*: 495.30 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.11 (s, 1H, CH-S), 7.71~7.68 (m, 3H, PhCH), 7.30~7.29 (m, 1H, PhCH), 5.56 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.57 (t, *J*=8.6 Hz, 1H, CH₃-CH), 4.38 (s, 1H, NH-CH), 3.74~3.70 (m, 1H, CH₂), 2.99~2.97 (m, 1H, CH₂), 2.38~2.33 (m, 2H, CH₂), 2.15~2.11 (m, 5H, CH₂、CH₃), 1.97~1.70 (m, 6H, CH、CH₂), 1.33~1.01 (m, 8H, CH₂、CH₃)。

化合物 **10b**: 产率 82%, mp 80~81 °C; ESI-MS m/z : 513.26 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.12 (s, 1H, =CH-S), 7.73 (d, $J=8.9$ Hz, 1H, PhCH), 7.61 (dd, $J=8.2, 4.6$ Hz, 1H, PhCH), 7.36 (d, $J=8.9$ Hz, 1H, PhCH), 5.56 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.58 (t, $J=8.7$ Hz, 1H, CH_3 -CH), 4.37 (t, $J=8.8$ Hz, 1H, NH-CH), 3.75~3.70 (m, 1H, CH_2), 2.97 (q, $J=6.8$ Hz, 1H, CH_2), 2.40~2.31 (m, 2H, CH_2), 2.24~2.00 (m, 6H, CH_2, CH_3), 1.96~1.68 (m, 5H, CH, CH_2), 1.48~0.76 (m, 8H, CH_2, CH_3).

化合物 **10c**: 产率 76%, mp 69~70 °C; ESI-MS m/z : 563.28 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.9 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, NH), 8.06~8.02 (m, 1H, CH-S), 7.73~7.71 (m, 1H, PhCH), 7.64~7.52 (m, 1H, PhCH), 7.52~7.50 (m, 1H, PhCH), 5.57 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.57 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, CH_3 -CH), 4.41~4.38 (m, 1H, NH-CH), 3.73~3.71 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, CH_2), 2.90 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, CH_2), 2.39~2.34 (m, 1H, CH_2), 2.18~2.09 (m, 5H, CH_2, CH_3), 1.95~1.66 (m, 7H, CH, CH_2), 1.28~1.06 (m, 8H, CH_2, CH_3).

化合物 **10d**: 产率 70%, mp 89~90 °C; ESI-MS m/z : 571.30 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.91~7.88 (m, 1H, CH-S), 7.58~7.50 (m, 5H, PhCH), 7.40~7.37 (m, 2H, PhCH), 7.20~7.14 (m, 1H, PhCH), 7.05~7.02 (m, 1H, PhCH),

5.34 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, pyrrolidine-CH), 4.56 (t, $J=16.0$ Hz, 1H, CH_3 -CH), 3.83 (t, $J=16.0$ Hz, 1H, NH-CH), 3.14~3.09 (m, 1H, CH_2), 2.28 (s, 3H, CH_2), 2.20 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, CH_2), 2.15~1.99 (m, 5H, CH_2, CH_3), 1.93~1.90 (m, 2H, CH, CH_2), 1.36~1.33 (m, 5H, CH_2, CH_3), 1.21~0.90 (m, 5H, CH_2).

2.10 XIAP 体外抑制活性实验

采用荧光偏振法评价 4 个目标化合物针对 XIAP-BIR3 的体外抑制活性, 以 LCL-161 作为阳性对照品^[17]。逐渐稀释抑制剂的浓度, 使不同浓度的抑制剂分别与固定浓度的荧光示踪剂 Biotin-Smac-N7-peptide 对固定浓度的靶蛋白展开竞争性结合。向 96 孔荧光检测微孔板的每个孔中加入 50、12.5、3.125、0.78、0.19、0.049 $\mu\text{mol/L}$ 目标化合物和 Assay 缓冲液, 然后再向每个孔中加入 20 nmol/L XIAP-BIR3 蛋白, 室温下孵育 30 min, 再向每个孔中加入 Biotin 标记的 Biotin-Smac-N7-peptide 5 μL , 用 Detection 缓冲液稀释至工作浓度; 室温混匀后避光孵育 1 h; 酶标仪激发波长和发射波长分别为 485、535 nm, 测定吸光度 (A) 值, 计算目标化合物的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{测定值}} - A_{\text{min}}) / (A_{\text{max}} - A_{\text{min}})$$

使用 GraphPad Prism 5.0 软件通过拟合 S 型剂量-依赖 FP 增加值作为蛋白浓度的函数进行回归分析和数据处理, 计算目标化合物的半数抑制浓度 (IC_{50}), 目标化合物对 XIAP-BIR3 的抑制活性结果见表 1。

表 1 目标化合物对 XIAP-BIR3 的抑制活性

Table 1 Inhibitory activities of target compounds against XIAP-BIR3

化合物	抑制率/%						$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	3.125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.78 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.049 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
10a	96.72	90.34	53.48	21.57	12.85	15.34	1.80
10b	100.10	93.20	57.82	27.35	14.32	2.53	1.20
10c	100.40	89.22	54.24	22.45	16.11	5.22	2.70
10d	53.70	11.20	-20.00	-13.50	-7.53	-21.7	30.00
LCL161	101.60	98.62	97.78	86.38	50.75	27.69	0.15

结果显示所合成化合物均具有一定的 XIAP 抑制活性, 其中化合物 **10a**~**10c** 的 IC_{50} 达到了 1.2~2.7 $\mu\text{mol/L}$, 当苯并咪唑的 NH 位上连接基团后, 活性较 NH 显著降低, 因此 NH 位为保持其高活性的关键位点, 为进一步结构修饰提供了理论依据。

3 讨论

通过对已有 IAP 抑制剂 LCL-161 的结构和活性位点研究, 以 1-Boc-2-氨基甲酰吡咯烷为原料, 通过 11 步反应合成了 4 个未见文献报道的新型苯并咪唑类化合物, 采用荧光偏振法评价了目标化合物针

对 XIAP-BIR3 的抑制活性, 结果表明所获得的目标化合物均具有一定的 XIAP 抑制活性, 其中化合物 **10a~10c** 的活性与阳性对照 LCL-161 相当, 由 **10a~10c** 的结构可以看出, 苯并咪唑芳环上电子效应对活性具有一定影响, **10d** 较 **10a~10c** 抑制活性显著降低, 表明苯并咪唑 NH 基团为关键活性位点, 为后续研究提供了参考。

参考文献

- [1] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239-257.
- [2] Ghobrial I M, Witzig T E, Adjei A A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(3): 178-194.
- [3] Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy [J]. *Cancer*, 2005, 103(8): 1551-1560.
- [4] Okouchi M, Ekshyyan O, Maracine M, et al. Neuronal apoptosis in neurodegeneration [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(8): 1059-1096.
- [5] Deveraux Q L, Reed J C. IAP family proteins: suppressors of apoptosis [J]. *Gene Dev*, 1999, 13(3): 239-252.
- [6] LaCasse E C, Baird S, Korneluk R G, et al. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer [J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3247-3259.
- [7] Jin H S, Park H S, Shin J H, et al. A novel inhibitor of apoptosis protein (IAP)-interacting protein, Vestigial-like (Vgl)-4, counteracts apoptosis-inhibitory function of IAPs by nuclear sequestration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412(3): 454-459.
- [8] Houghton P J, Kang M H, Reynolds C P, et al. Initial testing (stage 1) of LCL161, a SMAC mimetic, by the Pediatric Preclinical Testing Program [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2012, 58(4): 636-639.
- [9] Flygare J A, Beresini M, Budha N, et al. Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152) [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(9): 4101-4113.
- [10] DiPersio J F, Erba H P, Larson R A, et al. Oral Debio1143 (AT406), an antagonist of inhibitor of apoptosis proteins, in combination with daunorubicin and cytarabine in patients with poor-risk acute myeloid leukemia-results of a phase I dose escalation study [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2015, 15(7): 443-449.
- [11] Krepler C, Chunduru S K, Halloran M B, et al. The novel SMAC mimetic birinapant exhibits potent activity against human melanoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(7): 1784-1794.
- [12] Tamanini E, Buck I M, Chessari G, et al. Discovery of a potent non-peptidomimetic, small-molecule antagonist of cellular inhibitor of apoptosis protein 1(cIAP1) and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(11): 4611-4625.
- [13] Li L, Thomas R M, Suzuki H, et al. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL-and TNF alpha-mediated cell death [J]. *Science*, 2004, 305(5689):1471-1474.
- [14] Zobel K, Wang L, Varfolomeev E, et al. Design, synthesis, and biological activity of a potent Smac-mimetic that sensitizes cancer cells to apoptosis by antagonizing IAPs [J]. *ACS Chem Biol*, 2006, 1(8): 525-533.
- [15] Chessari G, Buck I M, Day J E, et al. Fragment-based drug discovery targeting inhibitor of apoptosis proteins: discovery of a non-alanine lead series with dual activity against cIAP1 and XIAP [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(16): 6574-6588.
- [16] Nikolovska-Coleska Z, Wang R, Fang X, et al. Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization [J]. *Anal Biochem*, 2004, 332(2): 261-273.
- [17] Cai Q, Sun H, Peng Y, et al. A potent and orally active antagonist of multiple inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) (SM-406/AT-406) in clinical development for cancer treatment [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(8): 2714-2726.