

• 实验研究 •

异噁唑衍生物的合成、抗肿瘤活性及分子对接研究

刘冰妮, 刘 默, 刘登科, 刘 巍

(天津药物研究院 天津新药设计与发现重点实验室, 天津 300193)

摘要:目的 合成具有抗肿瘤活性的异噁唑类化合物。方法 采用回流、氮气保护等条件,以中间体 N -[[3-[3-氟-4-(1-噁嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑]甲基]乙酰胺的噁嗪基对位进行不同基团取代,合成异噁唑系列衍生物,并检测所得化合物的抗肿瘤活性。通过分子对接方法考察了合成化合物与 Hsp90 蛋白酶结合的模式。结果 12 个新化合物的结构经 $^1\text{H-NMR}$ 确证。有 6 个化合物的肿瘤抑制率 $>30\%$,根据分子对接结合模式找出了取代基的结构改造方向。结论 合成的部分化合物具有抑制肿瘤的活性。

关键词: 异噁唑化合物; 化学合成; 抗肿瘤; 分子对接

中图分类号: R914.5; R979.19

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)02-0130-04

Study on synthesis, antitumor activity and molecular docking of isoxazole derivatives

LIU Bing-ni, LIU Mo, LIU Deng-ke, LIU Wei

(Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To synthesize the isoxazole compounds with antitumor activity. **Methods** The isoxazole derivatives were synthesized under the conditions of backflow and nitrogen protection. At the same time, the antitumor activities were tested. The interaction mode between synthetical compounds and Hsp90 protein was investigated by the molecular docking method. **Results** A total of 12 new compounds were obtained, and their structures were elucidated by $^1\text{H-NMR}$ technique. There were 6 compounds with tumor inhibitory rate exceeded 30% . A way of modifying substituent structure was shown on the basis of molecular docking model. **Conclusion** Some of the new compounds have antitumor activities.

Key words: isoxazole derivatives; synthesis; antitumor activity; molecular docking

热休克蛋白 90 (Hsp90) 是一组高度保守的蛋白质家族, 在所有真核细胞中均有表达, 它们参与蛋白分子的转运、跨膜、组装等功能, 起调节靶点蛋白但不改变其结构的作用, 故 Hsp90 又称“分子伴侣”。近年研究认为, Hsp90 是很多肿瘤基因通路的重要组成部分, 因此, 以 Hsp90 为分子靶点开发的抗肿瘤药物可通过多种途径产生阻断肿瘤生长的效应, 有较好的应用前景^[1-3]。20 世纪 90 年代发现的格尔德霉素^[4] (geldanamycin, GA) 的衍生物 17-烯丙胺基脱甲氧格尔德霉素 (17-allylamino-demethoxygeldanamycin, 17-AAG) 属于第一代 Hsp90

抑制剂, 已进入 II 期临床试验, 但其存在肝脏、视觉等毒性问题。英国科学家合成的新一代 Hsp90 抑制剂异噁唑类小分子化合物 NVP-AUY922 (图 1) 有较好的药代、药效活性, 对肿瘤抑制率 $>50\%$, 并已经进入 I 期临床试验^[5-7]。为了寻找活性高的异噁唑类抗肿瘤先导化合物, 进行了与 NVP-AUY922 结构相似的异噁唑系列化合物的合成、抗肿瘤活性及模拟分子对接等研究。

在前期研究中以 3,4-二氟苯甲醛(1)为起始原料, 依次合成了 3,4-二氟苯肟(2)、3,4-二氟苯肟氯化物(3)、 N -5-(乙酰胺甲基)-3-(3,4-二氟苯基)异噁

作者简介 刘冰妮(1978—), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 助理研究员。主要从事创新药物的设计、合成等研究工作。

Tel: (022)23006856, E-mail: liubn@tjpr.com

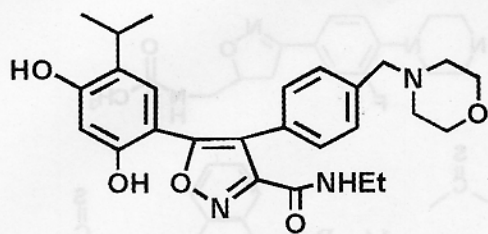


图1 NVP-AUY922的结构

唑啉(4)及 N -[[3-[3-氟-4-(1-哌嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑]甲基]乙酰胺等中间体(5),合成方法见文献[8]。笔者设计合成的12个化合物(6~17)是将中间体 N -[[3-[3-氟-4-(1-哌嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑]甲基]乙酰胺的哌嗪基对位进行不同基团取代得到的。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Bruker AV400 型核磁共振仪,德国 Bruker 公司;Schrodinger/glide 分子对接模块, Schrodinger 公司;LCQ AD MAX 质谱仪, Thermo 公司; Sunrise 型酶联免疫检测仪, TECAN 公司; Heraeus 离心机, Kerdro 公司。

1.2 中间体与试剂

中间体: N -[[3-[3-氟-4-(1-哌嗪基)苯基]-4,5-二氢-5-异噁唑]甲基]乙酰胺(化合物5),自制,质量分数99.1%(HPLC);无水乙醇、DMSO等所用试剂均为分析纯;MTT、胰蛋白酶均为 Amresco 公司产品;DMEM 培养基, Gibco 公司产品。

1.3 细胞株

结肠癌 SW-480 细胞,中国科学院上海细胞研究所提供。

2 方法

2.1 目标化合物的合成

化合物6的制备:向装有冷凝器的100 mL三口圆底烧瓶中加入1 g(0.003 mol)化合物5、1.22 g(0.005 mol) N -[S-甲基-(苯并环己叉基)氨基]异硫脲、40 mL 无水乙醇,搅拌,同时充氮气保护,并在冷凝器上端接导气管,导气管末端接一个玻璃漏斗,将玻璃漏斗倒置悬在装有无水乙醇的烧杯中,保持漏斗边缘与液面之间有一定距离。加热至回流,反应10~20 h, TLC 检测反应进程至反应终点,自然冷却,滤过,得到的黄色固体为粗品。黄色粗品经硅胶柱色谱分离(流动相:无水甲醇-二氯甲烷,1:10)、减压蒸馏除去溶剂、干燥,得浅黄色粉末状固体,即为目标化合物6, HPLC 分析其质量分数为99.7%。

物6, HPLC 分析其质量分数为99.7%。

化合物7~17的合成方法与化合物6相似,只是使用的原料 R_1 -SCH₃ 中的取代基 R_1 不同。化合物6~17的合成及取代基的结构见图2。

2.2 化合物6~17体外抗肿瘤细胞增殖的活性

采用 MTT 法检测化合物6~17抑制肿瘤细胞增殖的作用。分别取化合物6~17适量用 DMSO 助溶,再用无血清 DMEM 细胞培养基稀释到质量浓度10 μ g/mL 的药液。将对数生长期的结肠癌 SW-480 细胞经胰蛋白酶消化后置于 DMEM 培养液中制成单细胞悬液,以 $6 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ /mL 的密度接种于96孔板,每孔90 μ L。在37 $^{\circ}$ C、100%相对湿度、5% CO₂、95%空气的培养箱中培养24 h后,每孔加10 μ L 化合物6~17药液,每组设6个复孔,另设空白组(不加细胞)和阴性对照组(加等浓度 DMSO)。药物作用24 h后,每孔加5 mg/mL MTT 溶液10 μ L,置培养箱中培养4 h后,每孔加入 DMSO 100 μ L,在酶标仪上于492 nm 测吸光度(A)值,计算细胞生长抑制率并以此作为评价指标。

抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 A 均值} - \text{空白组 A 均值}) / (\text{对照组 A 均值} - \text{空白组 A 均值})] \times 100\%$ 。

2.3 分子对接分析

从 PDB 晶体蛋白库中下载 ID 号为 1UYD^[9]、2UWD、2VCI^[7] 的人类 Hsp 90 蛋白酶作为对接受体,化合物6~17的三维结构采用 Chemoffice 软件构建,保存成 mol2 格式。分子对接采用 Schrodinger/glide 模块, Gscore 为受体与配体静电作用、范德华作用等各种作用参数的综合评价函数,取每个分子与 1UYD、2UWD、2VCI 受体分别对接得到的 Gscore 值的平均值。

3 结果

3.1 目标化合物的合成

多数目标物的合成反应在开始回流时为黄色透明液体,反应一段时间后有黄色固体析出, TLC 分析表明有新化合物生成。为了使化合物5尽量反应完全, R_1 -SCH₃ 要过量加入,根据多次实验确定反应物料比在1:1.5左右较合适。反应时间的控制与取代基 R_1 的结构有关,如化合物6和14含有四氢苯结构,易过氧化,即便在有氮气保护情况下反应时间也不宜太长,当有固体析出时应随时采用 TLC 监控反应进程并注意观察反应液颜色变化。一旦发现反应液颜色有变深的趋势,立即停止反应,抽滤,得到粗品。否则,将因有较多副产物生成而可能得不到目标化合物。

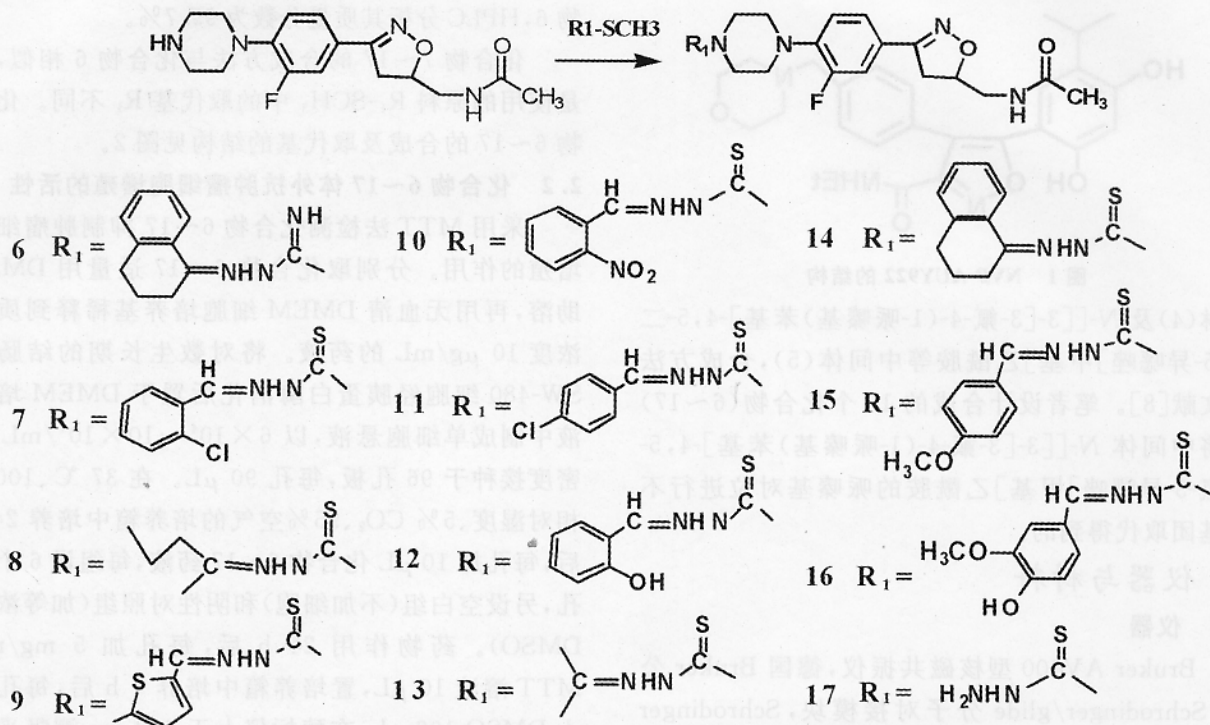


图2 化合物6~17的合成及取代基结构

目标产物的产率及质谱等数据见表1。由于化合物6~17有共同骨架结构,即哌嗪取代的异噻唑化合物1,所以它们的核磁谱图都具有以下特征吸收峰:¹H-NMR(DMSO, 400 HMz) δ : 1.81(s, 3H, -CH₃), 2.65~3.12(m, 4H, piperazinyl-H), 3.95(m, 4H, piperazinyl-H), 3.21(m, 2H, N=CCH₂), 4.63(m, 1H, N-O-CH), 6.97~7.76(m, 3H, Ar-H), 8.06(s, 1H, C=NHN), 8.10(t, 1H, NHC=O)。化合物6~17取代基R₁的主要官能团特征峰归属情况(氢谱)见表2,可见化合物主要官能团特征峰基本找到归属,结肠能够得到确证。

3.2 化合物6~17体外抗肿瘤细胞增殖的活性

化合物6~17体外抑制结肠癌SW-480细胞增

表1 化合物6~17分子对接评分、产率及质谱数据

化合物	Gscore 平均值	产率/%	质谱(<i>m</i> +1/ <i>z</i>)
6	-9.5	72.6	506.3
7	-8.5	60.3	517.1
8	-9.1	28.6	463.0
9	-8.8	55.2	503.2
10	-8.6	73.3	528.2
11	-7.9	36.7	517.0
12	-7.0	51.0	499.2
13	-6.0	36.8	435.2
14	-6.8	54.5	523.2
15	-6.4	58.0	513.3
16	-7.6	41.9	529.2
17	-4.5	33.3	395.2

殖活性的检测结果显示,化合物6~11、16抑制率约在30%以上,化合物7、10抑制率超过50%,而化合物9高达77%,见表3。

表2 化合物6~17的取代基R₁主要官能团氢谱特征峰归属

化合物	R ₁ 主要官能团特征峰
6, 14	1.65(m, 2H, cyclohexane), 7.24~7.68(m, 4H, Ar-H)
7, 10, 11	8.30(m, 1H, CH=N), 7.08~7.76(m, 4H, Ar-H)
8	0.91~1.55(m, 7H, C ₃ H ₇), 1.95(s, 3H, CH ₃)
9	2.31(m, 1H, CH-S), 8.28(m, 1H, CH=N), 6.77~7.01(m, 2H, CH=CH)
12	8.33(m, 1H, CH=N), 11.55(br s, 1H, OH)
13	1.94(s, 6H, CH ₃)
15	8.31(m, 1H, CH=N), 3.77(s, 3H, OCH ₃)
16	8.46(m, 1H, CH=N), 3.82(s, 3H, OCH ₃), 11.54(br s, 1H, OH)

表3 化合物6~17体外对结肠癌SW-480细胞增殖的抑制率(*n*=6)

化合物	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率 /%	化合物	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率 /%
6	10	40.2	12	10	23.1
7	10	57.7	13	10	22.6
8	10	29.9	14	10	9.6
9	10	77.7	15	10	22.9
10	10	53.4	16	10	33.3
11	10	41.2	17	10	12.3

3.3 分子对接分析

采用分子对接方法初步分析了异噻唑系列化合物与Hsp90蛋白酶的结合模式。对接分数的平均

值(表1)表示的活性趋势(Gscore 绝对值越高,预测活性越强)与抗肿瘤细胞增殖实验结果相近。由对接模拟图可见,活性腔最里面空间狭小,延伸至外面空间开阔,多数化合物的异噻唑环进入到里面与受体结合,环上各取代基与活性位点残基都有氢键结合作用。如化合物8的异噻唑环深入到里面结合,该分子与受体结合构象为长线形,异噻唑环3位上大体积的取代基通过氢键结合等方式占据了活性腔

的部分空间,而异噻唑环4位上无取代基,但附近同样有较大结合空间(图3),这对活性化合物的结构改造有所提示,即在异噻唑环无取代基团的4位进行适合空腔大小的基团取代的改造,有可能提高化合物的抗肿瘤活性。

4 结论

作为中间体的化合物5在回流、氮气保护下与含甲硫基有机物发生取代反应,粗产物经柱色谱分

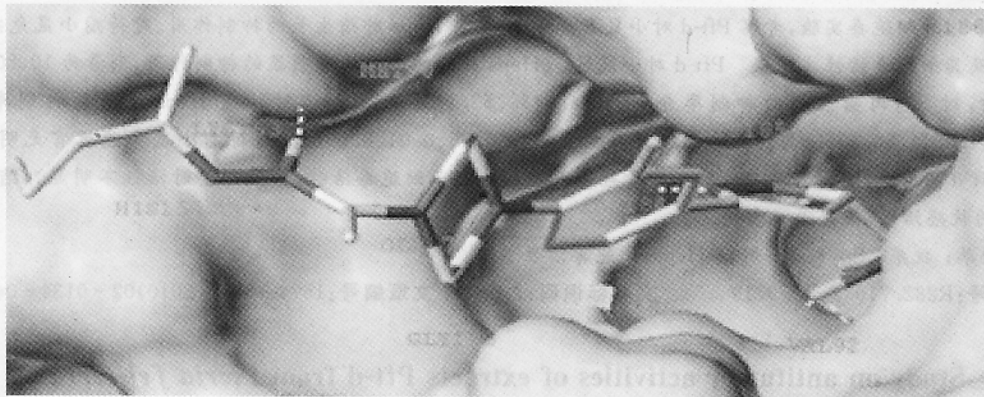


图2 化合物8在2VCI活性腔中的结合模拟图

离得淡黄色固体,经¹H-NMR结构确证为目标化合物。检测目标化合物的抗肿瘤细胞增殖的活性,发现部分异噻唑化合物的增殖抑制率>30%,说明这类化合物具有一定抑瘤活性;模拟分子结合模式提示,在异噻唑环的4位进行基团取代的改造可能有助于化合物抗肿瘤活性的提高。

参考文献

- [1] 赵鑫,陈晓光. 肿瘤治疗分子靶点 Hsp90 研究进展 [J]. 国外医学:肿瘤学分册, 2004, 31(8): 594-597.
- [2] 崔琨明,胡振平,邱世宇,等. HSP90 抑制剂与肿瘤的研究进展 [J]. 中国现代临床医学, 2008, 7(8): 45-50.
- [3] 刘毅,王颖,刘晓丹. 热休克蛋白 90 抑制剂 17-AAG 诱导 K562 细胞凋亡作用的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(12): 809-812.
- [4] Charles E, Alicia A, Christine S, *et al.* Crystal structure of an Hsp90-Geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent [J]. Cell, 1997, 89(2): 239-250.
- [5] Ge J, Normant E, Porter J R, *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of hydroquinone derivatives of 17-amino-17-demethoxygeldanamycin as potent, water-soluble inhibitors of Hsp90 [J]. J Med Chem, 2006, 49(17): 4606-4615.
- [6] Brough P A, Aherne W, Barril X, *et al.* 4, 5-Diarylisoxazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer [J]. J Med Chem, 2008, 51(2): 196-218.
- [7] Suzanne A E, Andy M, Florence I R, *et al.* NVP-AUY922: A novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis [J]. Cancer Res, 2008, 68(8): 2850-2860.
- [8] 张智强,刘冰妮,刘默,等. 5-乙酰胺甲基-3-[3-氟-4-(1-哌嗪基苯基)]异噻唑啉的合成 [J]. 精细化工中间体, 2009, 39(3): 31-33.
- [9] Wright L, Barril X, Dymock B, *et al.* Structure-activity relationships in purine-based inhibitor binding to hsp90 isoforms [J]. Chem Biol, 2004, 11(6): 775-785.

(收稿日期 2009-10-26)

本刊启事

本刊入编“中国核心期刊(遴选)数据库”和“CNKI 中国期刊全文数据库”,作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付,不再另行发放。作者如不同意将文章入编上述数据库,投稿时敬请说明,我们将另行处理。

《现代药物与临床》编辑部