具噻吩环 8-去氮杂叶酸类似物的合成及生物活性研究

周受辛^a 田超^a 郭莹^a 王孝伟^a 刘俊义^{a,b} 张志丽^{*,a}^(a) 北京大学药学院化学生物学系 北京 100191^(b) 北京大学药学院 天然药物与仿生药物国家重点实验室 北京 100191

摘要 根据叶酸代谢中蛋氨酸合成酶的作用机理和二氢叶酸还原酶抑制剂的结构特点, 设计噻吩取代苯环的 8-去氮杂叶酸类似物作为双靶点抑制剂。以噻吩-2-甲酸为原料, 与谷氨酸二乙酯连接后经过硝化、还原、缩合、水解, 得到两个目标化合物, 经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 MS 对化合物的结构进行了表征。初步生物活性结果表明, 此类化合物对两种酶都有一定的抑制作用, 其中一个化合物对蛋氨酸合成酶的抑制 IC₅₀ 为 25.2 μmol/L, 对二氢叶酸还原酶的抑制 IC₅₀ 为 2.3 μmol/L。

关键词 具噻吩 8-去氮杂叶酸类似物; 蛋氨酸合成酶; 二氢叶酸还原酶; 硝化; 生物活性

Synthesis and Bioactivity of 8-Deaza Folic Acid Analogues of Thiophene

Zhou, Shouxin^a Tian, Chao^a Guo, Ying^a Wang, Xiaowei^a
Liu, Junyi^{a,b} Zhang, Zhili^{*,a}^(a) Department of Chemical Biology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191^(b) State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191

Abstract Based on the action mechanism of methionine synthase and structures of inhibitors against dihydrofolic reductase, thiophene derivatives of 8-deaza folic acid were designed as dual-target inhibitors. Two target compounds were obtained by nitration, reduction, condensation, and hydrolysis with 2-thiophenecarboxylic acid as starting material, and were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR and MS techniques. The inhibitory activities against methionine synthase and recombinant human dihydrofolate reductase were determined. The target compounds showed inhibitory activity on both two enzymes. The IC₅₀s of one compound were 25.2 and 2.3 μmol/L against methionine synthase and recombinant human dihydrofolate reductase, respectively.

Keywords thiophene derivatives of 8-deaza folic acid; methionine synthase; dihydrofolate reductase; nitration; bioactivity

钴氨素依赖的蛋氨酸合成酶(MS)是叶酸在体内代谢的第一个酶, 将 N⁵-甲基四氢叶酸(CH₃-THF)分子中的甲基转移到 MS 酶分子中, 形成甲基钴(I)胺素蛋氨酸合成酶(CH₃-MS)和四氢叶酸(THF)的三元复合物, 然后再将甲基转移到高半胱氨酸(Hcy)分子中, 生成蛋氨酸(Met), 同时酶恢复为 MS。即 MS 通过两次 S_N2 甲基转移, 把 CH₃-THF 的甲基转移到 Hcy 分子中, 生成 THF 和 Met^[1]。其产物 THF 在 N⁵ 或(和)N¹⁰ 结合甲基、亚甲基、甲酰基等一碳单位, 成为嘌呤、嘧啶合成的必需前体, 另一产物蛋氨酸在肿瘤细胞中的需求量是正常细胞

中的 5~6 倍, 因此 MS 成为叶酸代谢中的抗肿瘤靶点, 抑制 MS 就会抑制肿瘤细胞快速生长所需要的嘌呤、嘧啶和蛋氨酸^[2]。二氢叶酸还原酶(DHFR)是叶酸代谢中的另一重要靶酶, 从 20 世纪 50 年代 MTX (Scheme 1) 被发现并应用于临床, 科学家们已对二氢叶酸还原酶抑制剂已进行了深入研究^[3]。结合蛋氨酸合成酶底物甲基四氢叶酸的结构和二氢叶酸还原酶的必要官能团, 设计双靶点抑制剂, 使目标化合物代替甲基四氢叶酸竞争性的与 MS 结合, 阻止四氢叶酸和蛋氨酸的合成, 同时抑制 DHFR, 发展双靶点抗叶酸肿瘤抑制剂, 对解决当前

* E-mail: lilybmu@bjmu.edu.cn

Received March 12, 2012; revised May 11, 2012; published online June 4, 2012.

Project supported by the National Science Foundation of China (Nos. 21042009, 21172014) and the Ministry of Science and Technology of China (No. 2009ZX09301-010).

国家自然科学基金(Nos. 21042009, 21172014)和国家科技部(No. 2009ZX09301-010)资助项目。

抗肿瘤临床药物的毒性和耐药性有重要意义。

Scheme 1

针对上述双靶点设计的目标化合物 *N*-[4-(2,4-二氨基吡啶并[3,2-*d*]嘧啶-6-甲氨基)-噻吩-2-甲酰]-*L*-谷氨酸(12)和 *N*-[5-(2,4-二氨基吡啶并[3,2-*d*]嘧啶-6-甲氨基)-噻吩-2-甲酰]-*L*-谷氨酸(13)与 *N*⁵ 甲基四氢叶酸相比, 其 8 位氮原子换为碳原子, 是为了提高化合物的稳定性; 用 8 位碳原子代替氮原子, 是因为六氢吡嗪在与 MS 结合时基本为平面结构, 改为吡啶环不影响与 MS 酶的作用, 同时能满足 DHFR 抑制剂的结构特点; 用电子更加丰富的噻吩环代替苯环, 是为了能增强化合物的水溶性, 降低肝肾毒性, 提高转运进入细胞的能力; 4 位氨基代替

羟基是为了 4 位取代基能与 MS 形成氢键, 同时符合 DHFR 抑制剂的结构特点. 设计的合成路线见 Scheme 2, 以噻吩-2-甲酸为原料, 与 *L*-谷氨酸二乙酯连接后进行噻吩的硝化、还原, 然后与喋啶基甲基溴缩合等反应合成目标化合物.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

熔点测定用 SGW® X4 显微熔点仪测定(温度计未经校正); ¹H NMR 用 Jeol JNM-AL-300, Bruker avance III 400 型和 Varian INOVA-500 型核磁共振仪测定, TMS 为内标, CDCl₃ 或 DMSO-*d*₆ 为溶剂; 氢气发生器为中惠普 GCD-300A 型; 质谱用 Quattro micro 2000 型质谱仪; 酶标仪为 BioRed Benchmark plus 型. 所用试剂均为市售化学纯或分析纯, 并按要求进行纯化处理. 二氢叶酸还原酶试剂盒购于 Sigma 公司, 蛋氨酸合成酶从 HL-60 细胞提取. *L*-谷氨酸二乙酯盐酸盐按照文献[4]方法自行制备. 2,4-二氨基-6-溴甲基吡啶并[3,2-*d*]嘧啶(9)按照文献[5]方法制备.

1.2 化学合成部分

1.2.1 *N*-(2-噻吩甲酰)-*L*-谷氨酸二乙酯(3)的合成

方法 A: 向 16.16 g (126.10 mmol) 化合物噻吩-2-甲

Scheme 2

酸(1)中加入 138 mL SOCl_2 , 50 °C 加热搅拌 2 h, 蒸干反应液得到粘稠液体噻吩-2-甲酰氯(2), 加 50 mL 二氯甲烷摇匀后备用. 将 32 g *L*-谷氨酸二乙酯盐酸盐(133.50 mmol)溶于 300 mL 二氯甲烷中, 冰水浴冷却搅匀, 加入 62 mL Et_3N (444.54 mmol). 通过恒压滴液漏斗滴入已备好的化合物 2 的二氯甲烷溶液, 0.5 h 滴完. 反应转移至常温下继续反应 15 h. 将反应液倒入冰水中, 有机层依次用 5 mol/L 盐酸、饱和 NaHCO_3 水溶液、饱和食盐水洗涤, Na_2SO_4 干燥后过滤减压浓缩, 所得粘液用正己烷研磨析出固体, 干燥后得 34.03 g 化合物 3, 白色固体, 收率 86.1%. m.p. 47~48 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.57 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, Ar-5-H), 7.49 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, Ar-3-H), 7.09~7.07 (m, 1H, Ar-4-H), 7.03~7.01 (m, 1H, NH), 4.79~4.72 (m, 1H, CH), 4.24 (q, $J=6.9$ Hz, 2H, CHCOOCH_2), 4.12 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_2$), 2.55~2.44 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 2.40~2.07 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 1.30 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 1.23 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 173.16 (CHCO), 171.79 (CH_2CO), 161.61 (CONH), 138.25 (Ar-2-C), 130.39 (Ar-3-C), 128.36 (Ar-5-C), 127.55 (Ar-4-C), 61.65 (CHCOOCH_2), 60.72 ($\text{CH}_2\text{COOCH}_2$), 52.22 (CH), 30.42 (CHCH_2CH_2), 27.05 (CHCH_2CH_2), 14.04 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 14.02 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); MS (ESI) m/z : 314.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 336.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 649.4 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{S}$ (M^++1) 314.10567, found 314.10554.

方法 B: 将 390 mg (3.04 mmol) 化合物 1 溶于 5 mL 无水 THF 中混合均匀备用, 750 mg (3.13 mmol) *L*-谷氨酸二乙酯盐酸盐中加入 8 mL 无水 THF, 冰盐浴冷却搅拌, 加入 DCC 620 mg (3.00 mmol), 搅拌片刻后滴入化合物 1 的 THF 溶液, 转移至室温搅拌 12 h, 过滤并用 THF 洗涤滤饼, 将滤液和洗液合并蒸干后硅胶柱层析 [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=3:1] 分离纯化, 得 620 mg 化合物 3, 白色固体, 收率 65.01%, m.p. 47~48 °C.

1.1.2 *N*-(4-硝基-2-噻吩甲酰)-*L*-谷氨酸二乙酯(4)和 *N*-(5-硝基-2-噻吩甲酰)-*L*-谷氨酸二乙酯(5)的合成

混酸硝化法: 1.60 g (5.11 mmol) 化合物 3 溶于 5 mL 醋酐中, 在冰盐浴冷却条件下搅拌, 慢慢滴入 1 mL (约 15 mmol) 发烟硝酸, 保持反应温度在 0 °C 以下, 滴完后自然升至室温, 反应 30 min 后, TLC 检测原料消失. 将反应液倒入冰水中, 搅拌均匀后用二氯甲烷(100 mL $\times$ 3)萃取, 合并二氯甲烷层并用饱和 NaHCO_3 水溶液以及饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后过滤蒸干, 硅胶柱层析 [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=4:1] 分离纯化, 得 412 mg 化合物 4, 淡黄色固体, 收率 22.5%. 得 745

mg 化合物 5, 淡黄色粘液, 收率 40.7%.

化合物 4: m.p. 82~84 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.42 (d, $J=1.0$ Hz, 1H, Ar-5-H), 8.06 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, Ar-3-H), 7.56 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, NH), 4.73~4.69 (m, 1H, CH), 4.29~4.22 (m, 2H, CHCOOCH_2), 4.19~4.13 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_2$), 2.57~2.44 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 2.33~2.13 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 1.31 (t, $J=7.25$ Hz, 3H, $\text{CHCOOCH}_2\text{CH}_3$), 1.26 (t, $J=7.25$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); MS (ESI) m/z : 359.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 381.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 739.5 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ (M^++1) 359.09075, found 359.09100.

化合物 5: 淡黄色粘液. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.87 (d, $J=4.2$ Hz, 1H, Ar-4-H), 7.73 (d, $J=6.9$ Hz, 1H, NH), 7.48 (d, $J=4.5$ Hz, 1H, Ar-3-H), 4.73~4.66 (m, 1H, CH), 4.25 (q, $J=6.9$ Hz, 2H, CHCOOCH_2), 4.15 (qd, $J=7.2$, 1.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_2$), 2.61~2.43 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 2.34~2.05 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 1.31 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 1.26 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); MS (ESI) m/z : 359.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ (M^++1) 359.09075, found 359.09034.

Claycop 硝化法: 1.5 g (4.8 mmol) 化合物 3 溶于 25 mL 二氯甲烷中, 加入 claycop 2.4 g, 滴入醋酐 5 mL (52.5 mmol), 常温搅拌反应, TLC 检测, 168 h 后反应基本完成. 反应完成后用装有硅藻土的布氏漏斗过滤、二氯甲烷洗涤, 滤液和洗液蒸干后用硅胶柱层析分离 [V (环己烷): V (乙酸乙酯)=9:1], 得 370 mg 化合物 4, 淡黄色固体, 收率 21.6%, m.p. 82~84 °C; 得 650 mg 化合物 5, 淡黄色粘液, 收率 37.9%.

1.1.3 *N*-(4-氨基-2-噻吩甲酰)-*L*-谷氨酸二乙酯(6)的合成

460 mg (1.26 mmol) 化合物 4 溶于 4.8 mL 无水乙醇中, 全部溶解后加入 8 mL 去离子水, 继续搅拌 10 min 后将 2.47 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (14.2 mmol) 分三批加入, 常温反应 2 h. 反应液通过装有硅藻土的布氏漏斗过滤, 并用少量乙醇洗涤, 将滤液合并后旋蒸蒸干, 加二氯甲烷搅拌, 再次过滤后蒸干滤液, 再用减压柱 [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=1:1] 纯化可得 400 mg 化合物 6, 淡黄色粘液, 收率 94.9%. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.08 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, Ar-3-H), 6.79 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, NH), 6.32 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, Ar-5-H), 4.70 (td, $J=7.8$, 4.8 Hz, 1H, CH), 4.20 (qd, $J=6.9$, 1.2 Hz, 2H, CHCOOCH_2), 4.09 (q, $J=6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_2$), 2.53~2.39 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 2.36~2.02 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 1.27 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, $\text{CHCOOCH}_2\text{CH}_3$), 1.20 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ :

172.65 (CHCO), 172.17 (CH₂CO), 162.20 (CONH), 143.26 (Ar-4-C), 136.40 (Ar-2-C), 123.52 (Ar-3-C), 108.29 (Ar-5-C), 60.99 (CHCOOCH₂), 60.37 (CH₂COOCH₂), 52.25 (CH), 30.63 (CHCH₂CH₂), 26.07 (CHCH₂CH₂), 14.51 (CHCOOCH₂CH₃), 14.51 (CH₂COOCH₂CH₃); MS (ESI) *m/z*: 329.0 [M+H]⁺, 350.9 [M+Na]⁺, 657.3 [2M+H]⁺, 678.8 [2M+Na]⁺. HRMS calcd for C₁₄H₂₀N₂O₅S (M⁺+1) 329.11657, found 329.11630.

1.1.4 *N*-(5-氨基-2-噻吩甲酰)-*L*-谷氨酸二乙酯(**7**)的合成

1.48 g (4.13 mmol)化合物**5**溶于15 mL无水乙醇中,全部溶解后加入40 mL去离子水,继续搅拌10 min后将6.8 g Na₂S₂O₄ (39.06 mmol)分三批加入,常温反应2 h.后处理方法同化合物**6**,用减压柱纯化[V(石油醚):V(乙酸乙酯)=1:1]可得1.24 g化合物**7**,淡黄色粘液,收率91.4%. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 7.18 (d, *J*=4.2 Hz, 1H, Ar-3-H), 6.74 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, NH), 6.03 (d, *J*=3.9 Hz, 1H, Ar-4-H), 4.70 (td, *J*=7.8, 4.8 Hz, 1H, CH), 4.54 (brs, 2H, NH₂), 4.21 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, CHCOOCH₂), 4.11 (q, *J*=6.9 Hz, 2H, CH₂COOCH₂), 2.52~2.36 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2.29~2.01 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1.28 (td, *J*=7.2, 2.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.23 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 172.66 (CHCO), 172.50 (CH₂CO), 162.77 (CONH), 153.95 (Ar-5-C), 128.87 (Ar-2-C), 123.88 (Ar-3-C), 108.32 (Ar-4-C), 60.89 (CHCOOCH₂), 60.36 (CH₂COOCH₂), 52.06 (CH), 30.61 (CHCH₂CH₂), 26.35 (CHCH₂CH₂), 14.52 (OCH₂CH₃), 14.52 (OCH₂CH₃). HRMS calcd for C₁₄H₂₀N₂O₅S (M⁺+1) 329.11657, found 329.11620.

1.1.5 *N*-[4-(2,4-二氨基吡啶并[3,2-*d*]嘧啶-6-甲氨基)-噻吩-2-甲酰]-*L*-谷氨酸二乙酯(**10**)的合成

150 mg (0.59 mmol)化合物**9**与395 mg (1.2 mmol)化合物**6**, 320 mg (2.31 mmol)无水K₂CO₃粉末溶于12 mL无水DMF中,常温搅拌72 h.将反应液减压浓缩至小体积,加入50 mL水,搅拌后用饱和NaHCO₃水溶液调节pH至7~8,过滤后固体用硅胶柱层析[洗脱液:V(二氯甲烷):V(甲醇)=12:1]纯化.干燥后可得140 mg化合物**10**,黄色固体,收率47.5%. m.p. 120~122 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.62 (brs, 1H, =CH-8), 7.47 (brs, 1H, =CH-7), 7.22 (s, 1H, Ar-3-H), 7.02 (d, *J*=12.8 Hz, 1H, CONH), 6.13 (s, 1H, Ar-5-H), 5.18~4.81 (m, 2H, CH₂NH), 4.77~4.72 (m, 1H, NHCH), 4.36 (brs, 1H, CH₂NH), 4.22 (q, *J*=6.8 Hz, 2H, CHCOOCH₂), 4.10 (q, *J*=6.8 Hz, 2H, CH₂COOCH₂), 2.52~2.41 (m, 2H,

CHCH₂CH₂), 2.33~2.09 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1.29 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.22 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃); MS (ESI) *m/z*: 502.5 [M+H]⁺, 524.4 [M+Na]⁺, 1003.7 [2M+H]⁺. HRMS calcd for C₂₂H₂₇N₇O₅S (M⁺+1) 502.18671, found 502.18623.

1.1.6 *N*-[5-(2,4-二氨基吡啶并[3,2-*d*]嘧啶-6-甲氨基)-噻吩-2-甲酰]-*L*-谷氨酸二乙酯(**11**)的合成

同化合物**10**的制备方法,由266 mg (1.04 mmol)化合物**9**与约690 mg (2.10 mmol)化合物**7**, 600 mg (4.34 mmol)无水K₂CO₃得到化合物**11**约270 mg,黄色固体,收率51.7%. m.p. 104~106 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.77 (s, 2H, =CH-8, =CH-7), 7.44 (d, *J*=4.1 Hz, 1H, Ar-3-H), 6.02 (d, *J*=4.2 Hz, 1H, Ar-4-H), 4.55 (s, 2H, CH₂NH), 4.53~4.50 (m, 1H, NHCH), 4.18 (q, *J*=7.1 Hz, 2H, CHCOOCH₂), 4.10 (q, *J*=7.1 Hz, 2H, CH₂COOCH₂), 2.45 (t, *J*=7.2 Hz, 2H, CHCH₂CH₂), 2.27~2.20 (m, 1H, CHCH_aH_bCH₂), 2.08~2.02 (m, 1H, CHCH_aH_bCH₂), 1.26 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CHCOOCH₂CH₃), 1.22 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, CH₂COOCH₂CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ: 173.17 (CH₂COO), 172.24 (CHCOO), 163.91 (CONH), 163.22 (C-4), 161.04 (C-2), 136.45 (C-8a), 130.44 (Ar-5-C), 127.67 (Ar-2-C), 126.67 (C-6), 125.96(C-8), 119.33 (Ar-3-C), 108.29 (C-7), 105.24 (C-4a), 103.13 (Ar-4-C), 61.02 (CHCOOCH₂CH₃), 60.33 (CH₂COOCH₂CH₃), 52.50 (NHCH), 50.71 (CH₂NH), 30.23 (CHCH₂CH₂CO), 26.16 (CHCH₂CH₂CO), 13.06 (CH₃×2); MS (ESI) *m/z*: 502.4 [M+H]⁺, 524.4 [M+Na]⁺, 1003.7 [2M+H]⁺. HRMS calcd for C₂₂H₂₇N₇O₅S (M⁺+1) 502.18671, found 502.18650.

1.1.7 *N*-[4-(2,4-二氨基吡啶并[3,2-*d*]嘧啶-6-甲氨基)-噻吩-2-甲酰]-*L*-谷氨酸(**12**)的合成

0.16 g NaOH溶于2 mL无水甲醇与18 mL二氯甲烷组成的混合溶液中,于超声仪中振荡溶解完全,配成0.1 mol/L NaOH的二氯甲烷/无水甲醇溶液,备用.52 mg (0.10 mmol)化合物**10**中加入1 mL 0.1 mol/L NaOH的二氯甲烷/无水甲醇溶液,常温搅拌反应1 h,加0.5 mol/L盐酸小心调节pH至中性,然后加丙酮约10 mL,超声振荡均匀后过滤即得产物.干燥后可得45 mg化合物**12**,黄色粉末,收率97.4%. m.p. >300 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 7.53~7.52 (m, 2H, =CH-8, =CH-7), 7.39 (s, 1H, Ar-3-H), 6.20 (s, 1H, Ar-5-H), 6.15~6.10 (m, 2H, CH₂NH), 4.32~4.31 (m, 1H, NHCH), 4.23~4.19 (m, 2H, CHCOOCH₂), 4.05~3.98 (m, 2H, CH₂COOCH₂), 2.33~2.21 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2.09~1.91 (m, 2H, CHCH₂CH₂); MS (ESI⁻) *m/z*: 444.2 [M-

$\text{H}]^-$. HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ ($\text{M}^+ + 1$) 446.12411, found 446.12378.

1.1.8 *N*-[5-(2,4-二氨基吡啶并[3,2-*d*]嘧啶-6-甲氨基)-噻吩-2-甲酰]-*L*-谷氨酸(**13**)的合成

50 mg (0.10 mmol) 化合物 **11** 中加入 1 mL 同上配制的 0.1 mol/L NaOH 的二氯甲烷/无水甲醇溶液, 常温搅拌反应. 1 h 后点样显示原料已消耗完, 后处理方法同化合物 **12**. 干燥后可得到化合物 **13** 约 40 mg, 黄色粉末, 收率 90.1%. m.p. > 300 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 8.08~7.93 (m, 2H, =CH-8, =CH-7), 7.74~7.47 (m, 1H, Ar-3-H), 5.97~5.96 (m, 1H, Ar-4-H), 4.49 (s, 2H, CH_2NH), 4.45 (m, 1H, NHCH), 4.27~4.21 (m, 4H, CHCOOCH_2 , $\text{CH}_2\text{COOCH}_2$), 2.31~2.29 (m, 2H, CHCH_2 - CH_2), 2.01~1.91 (m, 2H, CHCH_2CH_2); MS (ESI^-) m/z : 444.2 [$\text{M}-\text{H}]^-$. HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ ($\text{M}^+ + 1$) 446.12411, found 446.12379.

1.2 活性测定部分

1.2.1 二氢叶酸还原酶的抑制活性测定

测定原理: 二氢叶酸与 NADPH 在二氢叶酸还原酶催化下反应生成四氢叶酸, 同时消耗 NADPH. 反应体系在 340 nm 处有较高的吸光度, 反应中消耗掉的底物量可用 340 nm 处吸光度的降低来, 由此可以测定二氢叶酸还原酶抑制剂的抑制率^[6].

测定方法: 分别配置六个浓度的抑制剂溶液, 设有一个空白对照组和一个加酶不加抑制剂的对照组. 按照规定顺序分别加入定量的抑制剂、NADPH、二氢叶酸和二氢叶酸还原酶, 利用酶标仪在 340 nm 波长下, 分别测定加入不同浓度抑制剂 20 min 内体系的 OD 值(吸光度值), 通过与加酶的对照计算得到 OD 值的变化率, 数据拟合得到 OD 值变化率与抑制剂浓度的线性关系, 利用线性关系可计算得到抑制剂的 IC_{50} 值^[7].

1.2.2 蛋氨酸合成酶的抑制活性测定

测定原理: 酶促反应的产物之一 THF, 在强酸性和加热条件下, 可以定量的与甲酸溶液反应, 衍生化生成 $\text{CH}^+ = \text{FH}_4$, 在 340 nm 处有强紫外吸收. 而反应底物 MeTHF 反应体系中其他化合物均不与甲酸发生反应, 且在 340 nm 处的紫外吸收均很小. 340 nm 处测得酶促反应生成的产物四氢叶酸的量越少, 待测化合物对蛋氨酸合成酶的抑制作用越强^[8].

测定方法: 取对数生长期 HL-60 细胞, 无血清培养后加入不同浓度的待测化合物, 继续培养 3 h, 加入细胞裂解液, 吹打贴壁细胞至其悬浮于细胞裂解液, 收集于 EP 管中离心后, 上清作为酶提取物用于酶促反应. 按照规定顺序加入蒸馏水, 磷酸缓冲液, DTT, MeTHF, SAM, 酶粗提取物, OH-cbl 溶液, 立即于 37 °C 孵育 5

min, 再加入 Hcy, 37 °C 孵育 10 min, 最后加入酸混合液 (1 mol/L HCl + 12% HCOOH), 于 80 °C 反应 10 min 终止反应. 用酶联免疫检测仪在 340 nm 处测定各孔吸光度 (OD) 值, 计算抑制率^[9].

2 结果与讨论

2.1 化学合成

在关键化合物 **4** 的合成中, 最初实验的是先硝化、后与谷氨酸酯链相接的如下方法 (Scheme 3), 化合物 **1** 的浓硫酸溶液加入到浓硫酸-发烟硝酸的混合溶液中, 可得 4-硝基化合物 **14**, 收率为 40%. 化合物 **14** 与谷氨酸二乙酯缩合时, 尝试用 DCC 直接脱水法或是先转化为酰氯再与谷氨酸二乙酯缩合的方法都未得到化合物 **4**. 推测可能的理由是强吸电性的硝基取代使噻吩环电子云密度降低, 化合物 **14** (或化合物 **15**) 中的羟基 (或氯) 原子未用电子对向羰基碳原子部分迁移、与噻吩环及羰基形成较强的共轭效应, 从而阻碍了亲核取代反应的发生. 因此本合成路线采用先与谷氨酸酯缩合、后硝化的方法 (Scheme 2).

Scheme 3

化合物 **1** 与谷氨酸酯链缩合形成化合物 **3** 时, 最初采用的是化合物 **1** 在 DCC (二环己基碳二亚胺) 条件下与 *L*-谷氨酸二乙酯直接一步缩合, 柱层析分离纯化后收率为 65%. 后改进为化合物 **1** 与二氯亚砷反应生成酰氯 **2** 后, 再与 *L*-谷氨酸二乙酯缩合. 此方法虽然是两步反应, 但第一步得到酰氯后不需纯化, 减压蒸去二氯亚砷后即可使用, 第二步反应得到的产物单一, 在正己烷中研磨即可析出高纯度化合物 **3** 固体, 两步反应总收率达 92%.

芳香环的硝化方法主要有混酸硝化法 (硝酸和五氧化二磷、硝酸和醋酐)、Claycop 硝化法等. 对化合物 **3** 硝化反应产物及收率如表 1 所示. 由表可知, 当使用 98% H_2SO_4 作为脱水剂时, 选择性生成 4-硝基取代产物 **4** 较多, 而使用较弱的脱水剂 Ac_2O 时, 生成的 5-硝基取代产物 **5** 则占主导地位, Claycop 硝化方法结果与 $\text{HNO}_3/\text{Ac}_2\text{O}$ 混酸法类似, 但所需要的反应时间很长, 可达 7 d 以上. 由于化合物 **4** 和 **5** 都是合成目标产物需要

的结构, 因此本实验选择 $\text{HNO}_3/\text{Ac}_2\text{O}$ 法来制备这两种化合物。

表 1 化合物 3 硝化反应的选择性及收率

Table 1 The selectivity and yield of the nitration on compound 3

方法	收率/%	
	4	5
$\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$	38.3	13.7
$\text{HNO}_3 + \text{Ac}_2\text{O}$	22.5	40.7
Claycop	21.6	37.9

化合物 4 的 ^1H NMR 结果显示除谷氨酸部分的 H 原子峰之外, 还有三组 d 峰: 8.42 ($J=1.0$ Hz), 8.07~8.06 ($J=1.5$ Hz) 和 7.56 ($J=7.5$ Hz)。从位移值和偶合常数判断, 前两组是噻吩环上 3 位和 5 位的 H 原子, 发生远程偶合, 后一组是酰胺 N 上的 H 原子, ESI-MS 结果显示 359.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 所以化合物 4 应该是 4-硝基化合物。化合物 5 的 ^1H NMR 结果与化合物 4 类似, 除谷氨酸部分的 H 原子峰之外也有三组 d 峰: 7.87 ($J=4.2$ Hz), 7.48 ($J=4.5$ Hz) 和 7.73 ($J=6.9$ Hz), 前两组的偶合常数比化合物 5 明显要大, 发生的是 3 位和 4 位 H 原子的邻位偶合, 后一组仍是酰胺 N 上的 H 原子, ESI-MS 结果为 359.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 所以化合物 5 应是 5-硝基取代产物。

硝基还原反应包括催化氢化法^[10]、铁粉还原法^[11]、低亚硫酸钠法^[12]、甲酸铵/Pd-C 法、水合肼/Pd-C 法等。以催化氢化法对化合物 4 和 5 进行硝基还原反应时, 在大极性溶剂如甲醇和乙醇中容易生成复杂的混合物, 在小极性溶剂如二氯甲烷中反应速度很慢甚至不反应, 在乙酸乙酯中能反应得到较单一的产物, 但需要严格控制反应时间, 且收率低于 50%。用还原铁粉与冰醋酸混合加热反应或与七水合硫酸亚铁加热反应^[13]时, 收率不高且后处理繁琐, 不适于大量制备。用甲酸铵/Pd-C 法、水合肼/Pd-C 法反应时, 原料转化率均不理想。最后采用低亚硫酸钠法, 以乙醇为溶剂, 常温反应 12 h, 滤去沉淀、萃取、洗涤、干燥浓缩后可得到油状产物, 收率约 60%。文献报道此产物可直接应用, 但放置时容易变质^[14]。改进后处理方法为, 通过装有硅藻土的布氏漏斗过滤、用少量乙醇洗涤, 将滤液减压蒸干后加二氯甲烷搅拌均匀, 再次过滤后蒸干即得淡黄色固体。此固体中除产物外, 还含有少量无机盐以及产物的硫酸氢盐等, 可在后续反应直接使用, 能在干燥器中长期保存。也可将此粉末用减压柱纯化(洗脱剂为 $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 1 : 1$), 纯产物收率约 90%。

含杂环侧链化合物 6 和 7 分别与 2,4-二氨基-6-溴甲基吡啶并[3,2-*d*]嘧啶溶于 DMF (*N,N*-二甲基甲酰胺)或 DMAc (*N,N*-二甲基乙酰胺)中, 加无水 K_2CO_3 常温搅拌反应 72 h, 经后处理可分别得到化合物 10 和 11。

化合物 10 和 11 进行二乙酯基的水解反应, 最初采用条件是 NaOH 水溶液, 因为产物在水中有一定溶解性, 影响收率。后参照 Theodorou 等^[15]提出的在无水环境中温和水解酯基的方法, 用二氯甲烷和甲醇为溶剂, 加入 NaOH, 可在室温下高收率得到化合物 12, 13 (>90%)。

2.2 活性测定结果

对化合物 12 和 13 进行了蛋氨酸合成酶和人重组二氢叶酸还原酶抑制活性的测定, 结果如表 2。

表 2 化合物对 MS 和 DHFR 的半数抑制浓度(IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$)

Table 2 Half inhibitory concentration against TS (IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$)

Compd.	MS	DHFR
10	>100	87.5
11	>100	64.6
12	40.5	4.4
13	25.2	2.3
MTX	Nd ^a	0.017

^a Nd: no determined.

从以上活性结果可以看出, 乙酯基水解前化合物 10 和 11 对蛋氨酸合成酶和二氢叶酸还原酶活性较弱, 说明在体外实验中, 二乙酯基的水解是十分必要的, 与蛋氨酸合成酶和二氢叶酸还原酶作用时都需要谷氨酸的游离结构。乙酯基水解后化合物 12 和 13 对二氢叶酸还原酶和蛋氨酸合成酶都有一定抑制作用, 对二氢叶酸还原酶的抑制作用低于 MTX, 对 MS 酶的抑制活性比同实验室合成的对应苯环化合物($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$)比较, 活性提高。化合物 12 和 13 对两种酶的抑制活性基本相当, 说明 N^{10} 位在噻吩环 4 位或 5 位的取代位置对两种酶活性基本没有影响。目标化合物对肿瘤细胞的抑制活性正在进一步研究中。

References

- [1] Stubbe, J. *Science* **1994**, 266, 1663.
- [2] Kokkinakis, D. M.; Hoffman, R. M.; Frenkel, E. P.; Wick, J. B.; Han, Q.; Xu, M.; Tan, Y.; Schold, S. C. *Cancer Res.* **2001**, 61, 4017.
- [3] Yoshihiko, K.; Tatsuo, O.; Iijima, A.; Yoshimatsu, K.; Hiroaki, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, 43(5), 829.
- [4] Huang, S.-B.; Nelson, J. S.; Weller, D. D. *Synth. Commun.* **1989**, 19, 3485.
- [5] Zhang, Z. L.; Wu, J.; Ran, F. X.; Guo, Y.; Tian, R.; Zhou, S. X.; Wang, X. W.; Liu, Z. M.; Zhang, L. R.; Cui, J. R.; Liu, J. Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 764.
- [6] Urakawa, K.; Mihara, M.; Takagi, N.; Kawamura, A.; Akamatsu, K.; Takeda, Y. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, 435, 237.
- [7] Kaufman, B. T.; Gardiner, R. C. *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 1319.
- [8] Persa, C.; Pierce, A.; Ma, Z.; Kabil, O.; Lou, M. F. *Exp. Eye Res.* **2004**, 79, 875.
- [9] Paola, M. C.; Marcella, R.; Donatella, T.; Piergiorgio, P.; Daniela,

- B.; Stefano, G.; Robert, M. S.; Daniel, V. S.; Thomas, J. S.; Chiara, M.; Elena, M. M.; Alessandra, P.; Donatella, C.; Giulia, A. L.; Paolo, L. C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2112.
- [10] Marques, M. A.; Doss, R. M.; Urbach, A. R.; Dervan, P. B. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4485.
- [11] Yu, X.-H.; Mao, Q.-H.; Sun, L.-Y. *J. East China Univ. Sci. Technol. (Nat. Sci. Ed.)* **2005**, *31*(2), 184 (in Chinese).
(虞心红, 毛庆华, 孙乐盈, 华东理工大学学报(自然科学版), **2005**, *31*(2), 184.)
- [12] Scheuerman, R. A.; Tumelty, D. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6531.
- [13] Marsham, P. R.; Hughes, L. R.; Jackman, A. L.; Hayter, A. J.; Oldfield, J.; Wardleworth, J. M.; Bishop, J. A. M.; O'Connor, B. M.; Calvert, A. H. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1594.
- [14] Fu, M. M.; Nikolic, D.; Van, B. R. B.; Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7751.
- [15] Theodorou, V.; Skobridis, K.; Tzakos, A. G.; Ragoussis, V. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8230.

(Li, L.; Lu, Z.)