10-羟基喜树碱氨基酸缀合物的合成及抗肿瘤活性研究

孟光荣^a 李嘉俊^a 王国林^b 董孟杰^b 张倩^{*,a}^(a) 复旦大学药学院药物化学教研室 上海 201203^(b) 浙江大学附属一院 PET 中心 杭州 310003

摘要 以 10-羟基喜树碱为原料, 通过两碳边链链接, 合成了一系列 10-羟基喜树碱氨基酸缀合物和 9-硝基-10-羟基喜树碱氨基酸缀合物. 采用 CCK-8 法测试了合成化合物体外对人口腔癌细胞 KB、人肝癌细胞 HepG2 和小鼠结肠癌细胞 C26 三组细胞株的增殖抑制活性, 结果表明部分目标化合物对所选肿瘤细胞株显示了潜在的抑制活性, 其中 10-羟基喜树碱氨基酸缀合物的体外活性明显优于 9-硝基-10-羟基喜树碱氨基酸缀合物的体外活性.

关键词 喜树碱; 氨基酸缀合物; 抗肿瘤活性

Synthesis and Cytotoxic Activities of the Amino Acid-Conjugates of 10-Hydroxycamptothecin

Meng, Guangrong^a Li, Jiajun^a Wang, Guolin^b Dong, Mengjie^b Zhang, Qian^{*,a}^(a) Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203^(b) Positron Emission Tomography Center, First Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310003

Abstract A series of amino acid-conjugates of 10-hydroxycamptothecin and 9-nitro-10-hydroxycamptothecin were synthesized by means of a two-carbon side chain from 10-hydroxycamptothecin. The cytotoxic activities of all the synthetic compounds on KB, HepG2 and C26 *in vitro* were evaluated by CCK-8 assay. The results revealed that part of the conjugates exhibit potent anti-proliferative activities against selected tumor cell lines. Among them, the amino acid-conjugates of 10-hydroxycamptothecin show more potent activities than those of 9-nitro-10-hydroxycamptothecin *in vitro* as antitumor agents.

Keywords camptothecin; amino acid-conjugates; cytotoxic activities

喜树碱(Camptothecin, CPT)是 1966 年由 Wall 和 Wani 等^[1]首次从中国特有珙桐科植物喜树(*Camptotheca acuminata*)中提取得到的一种具有拼合五环结构的生物碱. 该类化合物主要通过 DNA 及拓扑异构酶 I 作用形成三元复合物, 阻滞 DNA 复制, 导致细胞死亡, 从而显示出显著的抗肿瘤活性^[2~6]. 其中, 10-羟基喜树碱(10-Hydroxycamptothecin, HCPT, **1**)是天然的喜树碱衍生物之一, 20 世纪 60 年代末我国即开展对 10-喜树碱类化合物的研究工作, 70 年代 10-羟基喜树碱的临床试验在国内开始, 1988 年获准上市^[7,8], 主要用于胃癌、肝癌、头颈部癌及白血病治疗. 目前已被列入国家基本药物及医保用药目录, 是我国特有的自行研制开发的天然抗肿瘤药物.

但是, 10-羟基喜树碱溶解性较差和毒副作用较大等缺点严重影响了其临床应用^[9~12]. 为克服这些缺点, 我们利用前药原理^[13,14], 通过两碳边链连接, 引入不同的氨基酸片段, 设计了一系列 10-羟基喜树碱氨基酸缀合物(图 1). 期望氨基酸片段的引入, 不仅可以改善喜树碱类化合物的水溶性, 同时也能够提高化合物对肿瘤细胞的靶向性.

喜树碱 E 环开环是引起该类化合物毒副作用的主要原因, 有文献报道^[15], 9 位基团的引入有益于 E 环的稳定性, 因此, 我们也尝试合成了一系列 9-硝基-10-羟基喜树碱的氨基酸缀合物.

* E-mail: zhangqian511@shmu.edu.cn

Received August 4, 2013; revised August 30, 2013; published online September 17, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30870730).

国家自然科学基金(No. 30870730)资助项目.

图1 10-羟基喜树碱氨基酸缀合物的设计

Figure 1 Design of amino acid-conjugates of camptothecin

1 结果与讨论

微波催化条件下, 10-羟基喜树碱与 1,2-二溴乙烷反应生成 10-(2-溴乙氧基)喜树碱(2), 化合物 2 分别与脯氨酸、酪氨酸甲酯、苯丙氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸甲酯以及甘氨酸乙酯的氨基发生亲核取代反应, 相应地生成 4a~4g 等 7 个 10-羟基喜树碱的氨基酸缀合物; 10-(2-溴乙氧基)喜树碱(2)在混酸作用下, 引入 9-硝基, 9-硝基-10-(2-溴乙氧基)喜树碱(3)分别与脯氨酸和酪氨酸甲酯缩合, 生成 5a 和 5b (Scheme 1)。

在分离和纯化化合物 4a, 4c~4e 的过程中, 同时分离得到了这类化合物的水解产物 10-(2-羟乙氧基)喜树碱(6)。我们推测其原因, 认为与氨基酸片段以内盐形式存在相关, 氮正离子的形成增加了碳氮键断裂的可能

性, 从而促进了水解反应发生, 导致这类化合物的收率普遍较低。

而对于氨基酸酯缀合物 4b, 4f, 4g 以及 5b, 反应过程中并未获得水解产物, 反应收率也相对较高(19%~40%), 从而进一步验证了氨基酸片段内盐对化合物稳定性影响的推理。

我们利用 Molinspiration 软件(网络版)^[16,17]对所得目标化合物的脂水分分配系数(Log*P*)进行了预测, 计算值见表 1。计算结果显示, (1)目标分子中, 羧基游离的氨基酸缀合物的 Log *P* 均小于 10-羟基喜树碱的 Log *P* 值, 说明氨基酸的引入可以明显增强该类化合物的水溶性, 这与我们在实验操作过程中对化合物的认识是一致的。(2)羧基末端成酯的氨基酸缀合物的 Log *P* 明显大于羧基游离的氨基酸缀合物, 同时也大于 10-羟基喜树碱, 预测羧基末端成酯后可能会降低化合物的水溶性。(3)通过 5a 与 4a, 5b 与 4b 的预测值对比可以发现, 9 位硝基的引入, 可能对化合物的溶解性影响不大。

以 10-羟基喜树碱为阳性对照, 分别测试了 9 个目标分子、2 个中间体以及化合物 6 的体外抗肿瘤细胞增殖活性(见表 2)。IC₅₀ 数据显示, (1) 10-(2-溴乙氧基)喜树碱(2)和 10-(2-羟乙氧基)喜树碱(6)体外活性与 10-羟基喜

Reagents and conditions: (i) BrCH₂CH₂Br, K₂CO₃, DMSO, MW, 60 °C, 52.8%; (ii) H₂SO₄ (98%), HNO₃ (65%), 60.9%; (iii) Amino acid, DMSO, 80 °C, 6.5%~40.2%.

Scheme 1

图 2 10-羟基喜树碱氨基酸缀合物的水解

Figure 2 Hydrolysis of amino acid-conjugates of 10-hydroxycampothecin

表 1 10-羟基喜树碱-氨基酸缀合物 Log *P* 计算值Table 1 Calculated Log *P* for amino acid-conjugates of 10-hydroxycampothecin

Compd.	HCPT	2	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	3	5a	5b	6
Log <i>P</i>	1.53	2.80	0.27	3.02	1.43	0.42	0.74	3.50	1.73	2.99	0.46	3.02	1.43

树碱相当; (2) 10-羟基喜树碱的氨基酸缀合物 **4a~4g** 均保持了喜树碱类化合物显著的抗肿瘤活性, 其中羧基游离的氨基酸缀合物的活性略高于羧基成酯的氨基酸酯缀合物的活性, 尤其是缬氨酸缀合物 **4e** 活性水平与 10-羟基喜树碱相近; (3) 9-位引入硝基的化合物活性均有丧失, 对 C26 细胞株的抑制活性, **3** 比 **2** 降低了近 8 倍, 化合物 **5a** 和 **5b** 与 10-羟基喜树碱比较, 活性降低了近 100 倍, 从而说明在该类结构中, 9 位硝基对目标化物的抑制肿瘤细胞增殖活性不利。

表 2 10-羟基喜树碱氨基酸缀合物的体外细胞毒活性

Table 2 Cytotoxic activities of the amino acid-conjugates of 10-hydroxycampothecin *in vitro*

Compd.	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)		
	C26	HepG2	KB
HCPT	0.042	0.553	1.475
2	0.079	0.544	6.656
4a	0.101	0.883	3.670
4b	1.636	4.514	2.416
4c	0.138	0.813	4.069
4d	0.155	1.109	1.947
4e	0.076	0.580	1.388
4f	0.950	3.918	5.556
4g	0.438	2.694	4.760
3	0.664	2.499	10.659
5a	6.065	85.90	71.02
5b	6.719	60.45	29.62
6	0.095	0.395	1.506

2 结论

通过 10-羟基醚化形成的两碳边链, 将 10-羟基喜树碱和不同氨基酸链接起来, 合成了一系列 10-羟基喜树碱氨基酸缀合物和 9-硝基-10-羟基喜树碱氨基酸缀合物。部分缀合物显示了体外对人口腔鳞癌细胞 KB、人肝癌细胞 HepG2 和小鼠结肠癌细胞 C26 显著的抑制活性, 其中缬氨酸与 10-羟基喜树碱的缀合物 **4e** 不仅保持

了与 10-羟基喜树碱相当的抑制肿瘤增殖活性, 同时其水溶性也较 10-羟基喜树碱有了明显的提高, 值得进一步深入研究。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

10-羟基喜树碱购自成都天源天然产物有限公司, 其他所有实验用试剂均为市售国产分析纯; ¹H NMR 谱用 Bruker-DPX 400 MHz 核磁共振仪测定(以 DMSO-*d*₆ 为溶剂, 以 TMS 为内标); 质谱用 Agilent G1946D 质谱仪测定; 高分辨质谱用 Bruker APEXIII 7.0 TESLA FTMS 测定; 熔点用 SGW X-4 显微熔点仪测定; TLC 用板为青岛海洋 0.2 mm GF254 高效薄层层析硅胶板; 微波反应仪为祥鹄 XH-100B 型微波催化合成仪。

3.2 化合物合成

3.2.1 10-(2-溴乙氧基)喜树碱(**2**)的合成

10-羟基喜树碱 50 mg 于 10 mL 微波反应瓶中, 加入 2 mL DMSO 微加热溶解, 依次加入 3 倍量无水碳酸钾和 7 倍量 1,2-二溴乙烷, 置于微波反应仪中。磁力搅拌下于 600 W 和 60 °C 下反应 5 min, 自然冷却至室温, 将反应液慢慢滴加到 40 mL 冰水中, 过滤得到淡黄色固体粗品。粗品用甲醇/氯仿混合溶剂溶解, 柱层析[Silica Gel H, 洗脱剂: *V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=35:1], 分得淡黄色粉末状固体 **2** 34.1 mg, m.p. 262~264 °C, 收率 52.8%^[18]. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 0.86 (t, *J*=7.24 Hz, 3H, 18-CH₃), 1.84~1.86 (m, 2H, 19-CH₂), 3.90 (t, *J*=5.28 Hz, 2H, Br-CH₂), 4.49 (t, *J*=5.28 Hz, 2H, 10-O-CH₂), 5.23 (s, 2H, 5-CH₂), 5.40 (s, 2H, 17-CH₂), 6.50 (s, 1H, 20-OH), 7.26 (s, 1H, 14-CH), 7.51 (dd, *J*=9.39, 2.74 Hz, 1H, 11-CH), 7.54 (d, *J*=2.74 Hz, 1H, 9-CH), 8.12 (d, *J*=9.39 Hz, 1H, 12-CH), 8.50 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS *m/z*: 471.0 (M+H⁺), 473.0 (M+2+H⁺).

3.2.2 9-硝基-10-(2-溴乙氧基)喜树碱(**3**)的合成

冰水浴条件下, 100 mg (0.21 mmol) **2** 缓慢加至 4 mL 98%硫酸中, 搅拌 15 min 后底物溶清, 缓慢滴加冷却的混酸 0.8 mL [$V(98\% \text{硫酸}) : V(65\% \text{硝酸}) = 1 : 1$]^[19]. 25 min 后将反应液滴加到 40 mL 冰水中并剧烈搅拌. 氯仿/甲醇萃取, 有机相水洗至中性、饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液蒸除溶剂后, 得到 98.3 mg 粗品. 粗品用甲醇/氯仿混合溶剂溶清, 柱层析[Silica Gel H, 洗脱剂: $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{甲醇}) = 40 : 1$], 分得化合物 **3**, 黄色固体, m.p. 270~273 °C, 收率 60.9%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.86 (t, $J = 7.14$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.82~1.89 (m, 2H, 19-CH₂), 3.84 (t, $J = 5.16$ Hz, 2H, Br-CH₂), 4.74 (t, $J = 4.96$ Hz, 2H, 10-OCH₂), 5.26 (s, 2H, 5-CH₂), 5.42 (s, 2H, 17-CH₂), 6.54 (s, 1H, 20-OH), 7.32 (s, 1H, 14-CH), 8.03 (d, $J = 9.51$ Hz, 1H, 11-CH), 8.42 (d, $J = 9.52$ Hz, 1H, 12-CH), 8.46 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS m/z : 514.1 ($M - H^+$), 516.1 ($M + 2 - H^+$).

3.2.3 10-喜树碱氨基酸缀合物 **4a~4g** 的合成

100 mg (0.21 mmol) 化合物 **2** 于圆底烧瓶中, 溶于 2 mL DMSO, 加入 1.5 倍量 *L*-氨基酸类试剂, 外浴 80 °C 下反应, 反应时间 3~8 h 不等. 反应完全后, 自然冷却至室温, 将反应液慢慢滴加到 40 mL 冰水中, 过滤得到黄色固体粗品. 粗品用甲醇/氯仿混合溶剂溶清, 柱层析[Silica Gel H, 洗脱剂: $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{甲醇}) = 30 : 1$], 分得目标化合物 **4a~4g**.

10-羟基喜树碱脯氨酸缀合物(**4a**): 黄色固体, m.p. 227~230 °C; 收率 22.20%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.87 (t, $J = 7.24$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.80~1.92 (m, 4H, 19-CH₂ and 4'-CH₂), 1.94~1.99 (m, 1H, 3'-CH₂'), 2.17~2.25 (m, 1H, 3'-CH₂'), 3.06~3.34 (m, 2H, 5'-CH₂ and OCH₂CH₂), 4.30 (t, $J = 7.82$ Hz, 1H, 2'-CH), 4.43 (brs, 2H, 5'-CH₂' and O-CH₂CH₂'), 4.55~4.63 (m, 2H, OCH₂CH₂), 5.26 (s, 2H, 5-CH₂), 5.41 (s, 2H, 17-CH₂), 6.52 (s, 1H, 20-OH), 7.27 (s, 1H, 14-CH), 7.50 (d, $J = 9.39$ Hz, 1H, 11-CH), 7.58 (s, 1H, 9-CH), 8.08 (d, $J = 9.39$ Hz, 1H, 12-CH), 8.53 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS m/z : 506.0 ($M + H^+$); HRMS calcd for C₂₇H₂₈N₃O₇ [$M + H$]⁺ 506.1922, found 506.1940.

10-羟基喜树碱酪氨酸甲酯缀合物(**4b**): 黄色固体, m.p. 128~132 °C; 收率 30.40%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.86 (t, $J = 7.24$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.81~1.88 (m, 2H, 19-CH₂), 2.21 (brs, 1H, NH), 2.76 (brs, 2H, NHCH₂), 2.87~2.95 (m, 2H, PhCH₂), 3.52 (s, 4H, NHCH₂-COOCH₃), 4.13 (brs, 2H, 10-OCH₂), 5.24 (s, 2H, 5-CH₂), 5.40 (s, 2H, 17-CH₂), 6.49 (s, 1H, 20-OH), 6.62

(d, $J = 8.22$ Hz, Ph-3',5'-CH), 6.94 (d, $J = 8.22$ Hz, Ph-2',6'-CH), 7.26 (s, 1H, 14-CH), 7.43~7.47 (m, 2H, 11-CH and 9-CH), 8.04 (d, $J = 9.39$ Hz, 1H, 12-CH), 8.50 (s, 1H, 7-CH), 9.18 (s, 1H, Ph-OH); ESI-MS m/z : 586.2 ($M + H^+$); HRMS calcd for C₃₂H₃₂N₃O₈ [$M + H$]⁺ 586.2184, found 586.2175.

10-羟基喜树碱苯丙氨酸缀合物(**4c**): 淡黄色固体, m.p. 178~181 °C; 收率 27.15%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.83 (t, $J = 7.05$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.81~1.90 (m, 2H, 19-CH₂), 2.31 (brs, 1H, NH), 2.81~2.84 (m, 2H, NHCH₂), 4.16 (t, $J = 5.08$ Hz, 1H, NHCH), 4.30~4.32 (m, 2H, PhCH₂), 4.40~4.42 (m, 2H, 10-OCH₂), 5.25 (s, 2H, 5-CH₂), 5.40 (s, 2H, 17-CH₂), 6.50 (s, 1H, 20-OH), 7.10~7.13 (m, 5H, CH₂Ph), 7.27 (s, 1H, 14-CH), 7.48~7.52 (m, 2H, 9-CH, 11-CH), 8.06 (d, $J = 9.00$ Hz, 1H, 12-CH), 8.52 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS m/z : 556.2 ($M + H^+$); HRMS calcd for C₃₁H₃₀N₃O₇ [$M + H$]⁺ 556.2078, found 556.2076.

10-羟基喜树碱甲硫氨酸缀合物(**4d**): 黄色固体, m.p. 175~178 °C, 收率 18.80%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.86 (t, $J = 7.04$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.81~1.88 (m, $J = 7.05$ Hz, 2H, 19-CH₂), 1.96 (brs, 2H, S-CH₂CH₂), 2.02 (s, 3H, SCH₃), 2.48 (brs, 4H, S-CH₂, NHCH₂), 4.14 (t, $J = 6.26$ Hz, 1H, NHCH), 4.58~4.64 (m, 2H, 10-OCH₂), 5.27 (s, 2H, 5-CH₂), 5.41 (s, 2H, 17-CH₂), 6.52 (s, 1H, 20-OH), 7.27 (s, 1H, 14-CH), 7.46~7.50 (m, 2H, 9-CH, 11-CH), 8.09 (d, $J = 9.39$ Hz, 1H, 12-CH), 8.54 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS m/z : 540.2 ($M + H^+$); HRMS calcd for C₂₇H₃₀N₃O₇S [$M + H$]⁺ 540.1799, found 540.1802.

10-羟基喜树碱缬氨酸缀合物(**4e**): 黄色固体, m.p. 209~211 °C, 收率 11.12%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.84~0.88 (m, 9H, 18-CH₃, CH(CH₃)₂), 1.81~1.88 (m, 2H, 19-CH₂), 2.04~2.07 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 3.80 (t, $J = 4.70$ Hz, 2H, NCH₂), 4.15 (t, $J = 4.69$ Hz, 2H, OCH₂), 4.97 (t, $J = 5.09$ Hz, 1H, NHCH), 5.26 (s, 2H, 5-CH₂), 5.40 (s, 2H, 17-CH₂), 6.51 (s, 1H, 20-OH), 7.27 (s, 1H, 14-CH), 7.51~7.54 (m, 2H, 9-CH, 11-CH), 8.07 (d, $J = 9.00$ Hz, 1H, 12-CH), 8.52 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS m/z : 508.2 ($M + H^+$); HRMS calcd for C₂₇H₂₉N₃O₇ [$M + H$]⁺ 508.2078, found 508.2079.

10-羟基喜树碱苯丙氨酸甲酯缀合物(**4f**): 淡黄色固体, m.p. 186~189 °C, 收率 40.17%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.86 (t, $J = 7.24$ Hz, 3H, 18-CH₃), 1.81~1.88 (m, 2H, 19-CH₂), 2.31 (brs, 1H, NH), 2.84~2.88 (m, 4H, NHCH₂, PhCH₂), 3.53 (s, 3H, COOCH₃), 3.61 (brs,

1H, NHCH), 4.14 (brs, 2H, 10-OCH₂), 5.25 (s, 2H, 5-CH₂), 5.40 (s, 2H, 17-CH₂), 6.53 (s, 1H, 20-OH), 7.17~7.25 (m, 5H, CH₂Ph), 7.26 (s, 1H, 14-CH), 7.44~7.48 (m, 2H, 9-CH, 11-CH), 8.05 (d, *J*=9.00 Hz, 1H, 12-CH), 8.51 (s, 1H, 7-CH). ESI-MS *m/z*: 570.2 (M+H)⁺; HRMS calcd for C₃₂H₃₂N₃O₇ [M+H]⁺ 570.2235, found 570.2230.

10-羟基喜树碱甘氨酸乙酯缀合物(**4g**): 淡黄色固体, m.p. 168~170 °C, 收率 19.40%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 0.86 (t, *J*=7.24 Hz, 3H, 18-CH₃), 1.82~1.86 (m, 2H, 19-CH₂), 2.99 (t, *J*=5.28 Hz, 2H, NHCH₂), 3.43 (s, 2H, NHCH₂CO), 3.53~3.57 (m, 3H, COO-CH₂CH₃), 4.04~4.10 (m, 2H, COOCH₂), 4.18 (t, *J*=5.29 Hz, 2H, 10-OCH₂), 5.25 (s, 2H, 5-CH₂), 5.41 (s, 2H, 17-CH₂), 6.52 (s, 1H, 20-OH), 7.26 (s, 1H, 14-CH), 7.47~7.51 (m, 2H, 9-CH, 11-CH), 8.06 (d, *J*=9.00 Hz, 1H, 12-CH), 8.52 (s, 1H, 7-CH); ESI-MS *m/z*: 494.1 (M+H)⁺; HRMS calcd for C₂₆H₂₈N₃O₇ [M+H]⁺ 494.1922, found 494.1930.

3.2.4 9-硝基-10-羟基喜树碱氨基酸缀合物 **5a**~**5b** 的合成

100 mg (0.19 mmol) 化合物 **3** 于圆底烧瓶中, 溶于 3 mL DMSO, 加入 1.5 倍量 *L*-氨基酸类试剂, 外浴 80 °C 下反应 8 h. 反应完全后, 自然冷却至室温, 将反应液慢慢滴加到 40 mL 冰水中, 过滤得到黄色固体粗品. 粗品用甲醇/氯仿混合溶剂溶清, 柱层析[Silica Gel H, 洗脱剂: *V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=30:1], 分得目标化合物 **5a** 和 **5b**^[13].

9-硝基-10-羟基喜树碱脯氨酸缀合物(**5a**): 淡黄色固体, m.p. 229~232 °C, 收率 6.50%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 0.86 (t, *J*=7.24 Hz, 3H, 18-CH₃), 1.80~2.20 (m, 6H, 19-CH₂, 4'-CH₂ and 3'-CH₂), 3.11~3.23 (m, 2H, 5'-CH₂ and OCH₂CH₂), 4.30 (t, *J*=7.82 Hz, 1H, 2'-CH), 4.48~4.66 (m, 2H, 5'-CH₂' and OCH₂CH₂'), 4.68 (brs, 2H, OCH₂CH₂), 5.25 (s, 2H, 5-CH₂), 5.41 (s, 2H, 17-CH₂), 6.54 (s, 1H, 20-OH), 7.32 (s, 1H, 14-CH), 8.07 (d, *J*=9.78 Hz, 1H, 11-CH), 8.44 (d, *J*=9.39 Hz, 1H, 12-CH), 8.44 (s, 1H, 7-CH), 8.95 (brs, 1H, COOH); ESI-MS *m/z*: 551.8 (M+H)⁺; HRMS calcd for C₂₇H₂₇N₄O₉ [M+H]⁺ 551.1773, found 551.1775.

9-硝基-10-羟基喜树碱酪氨酸甲酯缀合物(**5b**): 淡黄色固体, m.p. 137~143 °C, 收率 26.30%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 0.86 (t, *J*=7.04 Hz, 3H, 18-CH₃), 1.83~1.87 (m, 2H, 19-CH₂), 2.21 (brs, 1H, NH), 2.72 (brs, 2H, NHCH₂), 2.77~2.91 (m, 2H, PhCH₂), 3.51 (s, 4H, NHCHCOOCH₃), 4.37 (brs, 2H, 10-OCH₂), 5.25

(s, 2H, 5-CH₂), 5.41 (s, 2H, 17-CH₂), 6.54 (s, 1H, 20-OH), 6.59 (d, *J*=7.82 Hz, Ph-3',5'-CH), 6.91 (d, *J*=8.21 Hz, Ph-2',6'-CH), 7.31 (s, 1H, 14-CH), 7.99 (d, *J*=9.39 Hz, 1H, 11-CH), 8.39 (d, *J*=9.39 Hz, 1H, 12-CH), 8.43 (s, 1H, 7-CH), 9.15 (s, 1H, PhOH); ESI-MS *m/z*: 631.3 (M+H)⁺; HRMS calcd for C₃₂H₃₀N₄NaO₁₀ [M+Na]⁺ 653.1854, found 653.1841.

3.3 生物活性测试

以 10-羟基喜树碱作为阳性对照物, 采用 CCK-8 法, 分别测试了 10-羟基喜树碱氨基酸缀合物 **4a**~**4g** 和 9-硝基-10-羟基喜树碱氨基酸缀合物 **5a**~**5b** 对人口腔鳞癌细胞 KB、人肝癌细胞 HepG2 和小鼠结肠癌细胞 C26 三组细胞株的生长抑制情况.

取对数生长期的肿瘤细胞, 用 0.25%胰酶消化, 离心后加培养基调整细胞浓度为 4 万个/mL, 然后接种入 96 孔培养板, 每孔 100 μL. 待测化合物用 DMSO 稀释, 取 1 μL 加入 96 孔板后得以下梯度浓度: 50000, 5000, 500, 50, 5 和 0.5 nmol/L 等 6 个受试浓度, 每个浓度均设 3 个复孔, 阴性对照为等体积(1 μL)药物溶剂(DMSO), 同时设清零孔对照. 细胞于接种 12 h 待其贴壁后加药, 每孔 1 μL(阴性对照组和清零孔加 1 μL DMSO). 加药后细胞置 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度培养 48 h, 然后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂后继续培养 4 h. 酶标仪检测各孔在 450 nm 处吸光度 A₄₅₀. 按公式: 细胞增殖抑制率(%)=(对照组 A₄₅₀-给药组 A₄₅₀/对照组 A₄₅₀)×100%, 应用 SPSS 软件计算半数抑制浓度(IC₅₀ 见表 1).

References

- [1] Wall, M. E.; Wani, M. C.; Cook, C. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3888.
- [2] Bart, L. S.; Kathryn, H.; Michael, D. F.; Craig, A. B.; Alex, B. B.; Lance, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15387.
- [3] Raffaella, C.; Loana, M.; Sabrina, D.; Roberto, A.; Stella, T.; Donato, C.; Franco, Z.; Michelandrea, D. C.; Giovanni, L. B.; Nadia, Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 387.
- [4] Inhee, C.; Choonmi, K.; Sun, C. *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 1526.
- [5] John, E. K.; Daniel, S. P. *Biochemistry* **2001**, *40*, 9792.
- [6] Fan, Y.; Weinstein, J. N.; Kohn, K. W.; Shi, L. M.; Pommier, Y. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2216.
- [7] Chu, W. *China New Med.* **2003**, *2*, 76 (in Chinese). (褚伟, 中国新医药, **2003**, *2*, 76.)
- [8] William, G.; Vishal, P.; Joshua, C. C.; Li, P. Y.; Rebecca, H.; Adegbeyega, K. O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3283.
- [9] Yang, C. H.; Schneider, E.; Kuo, M. L.; Volk, E. L. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 831.
- [10] Ye, D. Y.; Shi, Q.; Leung, C. H.; Kim, S. W.; Park, S. Y.; Elizabeth, A. G.; Jiang, Z. L.; Zhu, H.; Morris-Natschke, S. L.; Cheng, Y. C.; Lee, K. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4489.
- [11] Song, Y. L.; Zhang, W. N.; Ji, H. T. *Chin. Pharm. J.* **2002**, *37*, 646 (in Chinese). (宋云龙, 张万年, 季海涛, 中国药学杂志, **2002**, *37*, 646.)

- [12] Venditto, V. J.; Simanek, E. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 307.
- [13] Joan, B.; Tomas, R.; Josep, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1859.
- [14] Stella, V. J.; Himmelstein, K. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 1275.
- [15] Naka, T.; Kubo, Y.; Nishikawa, K. *Drug Des. Discovery* **1999**, *16*, 95.
- [16] <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
- [17] Penta, A.; Ganguly, S.; Murugesan, S. *Inter. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *5*, 659.
- [18] Meng, G. R.; Li, J. J.; Zhang, Q.; Ma, H. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 2378 (in Chinese).
(孟光荣, 李嘉俊, 张倩, 马红梅, 有机化学, **2012**, *32*, 2378.)
- [19] Wani, M. C.; Nicholas, A. W.; Wall, M. E. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2358.

(Zhao, X.)