

作用于酪氨酸激酶的抗肿瘤小分子抑制剂 γ -氟代 Goniotalamin 类似物的设计与合成

杨 义¹, 李建章¹, 程纯儒¹, 卿凤翎², 杨先桃³, 杨振军³

(1. 四川理工学院化学与制药工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 中国科学院上海有机化学研究所有机氟化学实验室, 上海 200032; 3. 北京大学医学部药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘 要:蛋白酪氨酸激酶在肿瘤细胞的增殖、分化、转移、侵蚀等信号通路中具有重要的调控功能, 已成为肿瘤靶向治疗的重点研究对象。基于靶点导向原则和构效关系研究基础, 以抗肿瘤活性天然产物 Goniotalamin 为母体化合物, 修饰合成了一系列 γ, γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物(4a-4i, 6a-6i)和 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物(7a, 7b, 7h)。 γ, γ -二氟取代的 Goniotalamin 类似物可从具有光学活性的二氟亚甲基取代的锡试剂出发, 经 Stille 偶联和 1,5-氧化关环两步关键反应合成。 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物则经 Sharpless 不对称环氧化、环氧开环亲核氟化、Lindlar 氢化、HWE 反应和 1,5-氧化关环等反应制备。对所合成的这两类 Goniotalamin 含氟类似物进行了体外肿瘤细胞抑制活性和酪氨酸激酶抑制活性评估研究, 结果表明在 Goniotalamin 分子的 γ 位引入一个氟原子进行修饰是较为合理的修饰方式。

关键词: Goniotalamin; α, β -不饱和 δ 内酯; 含氟化合物; 蛋白酪氨酸激酶; 抗肿瘤活性

中图分类号: O64

文献标志码: A

引 言

酪氨酸激酶作为一类重要的蛋白激酶, 在肿瘤细胞的增殖、分化、转移和侵蚀等信号通路中具有关键的调控功能, 是肿瘤靶向治疗的重要研究位点之一^[1-3]。以酪氨酸激酶为靶标已发现一系列具有良好抗肿瘤效果的小分子抑制剂, 其中吉非替尼(Gefitinib)、厄洛替尼(Erlotinib)和拉帕替尼(Lapatinib)等近十个化合物成功上市并在临床中取得了良好效果。值得指出的是, 靶向酪氨酸激酶的小分子抑制剂只作用于过度表达激酶的癌变细胞, 对正常细胞没有影响, 不产生全身性毒副作用, 相较于传统的外科手术、放射治疗等治疗手段具有安全、无痛苦、费用低等明显优势。因此, 以酪氨酸激酶为靶点进行抗肿瘤小分子抑制剂研究已成为高效、低毒和特异性强的新型抗肿瘤药的重要方向。

(R)-Goniotalamin 是从番荔枝科哥纳香属植物分

离出的第一例苯乙烯型 α, β -不饱和 δ 内酯^[4]。该化合物具有良好的抗肿瘤活性, 对宫颈癌(Hela)、胃癌(HGC-27)、乳腺癌(MCF-7, T47D, MDA-MB-231)、白血病(HL-60)、卵巢癌(Caov-3)等多种癌细胞具有抑制增殖的作用^[5]。构效关系研究表明: 分子结构中 α, β -不饱和 δ 内酯是关键的药效基团, 它作为优良的 Michael 受体, 能和生物分子中很多亲核性的官能团发生作用, 进而起到调节靶物质生理活性的作用; 分子中 C-5 位的立体构型也对生理活性起到重要影响, 例如与天然构型相反构型的(S)-Goniotalamin 则对 786-O、NCI-ADR、NCI-460 和 UACC62 等肿瘤细胞起到选择性抑制效果(图 1)^[5]。鉴于 Goniotalamin 良好的生理活性, 药物化学家对 Goniotalamin 分子展开了修饰研究工作并从中发现了一些具有强效抑制肿瘤细胞增殖的分子^[5]。已有文献报道主要集中于苯环上的取代基的修饰变换^[6]、立体构型的翻转^[7]和苯基的替换^[8]

收稿日期: 2013-06-01

基金项目: 国家自然科学基金(2107028, 20832008); 国家重大基础研究发展计划(2012CB821600); 四川理工学院人才引进项目(2012RC17, 2012RC15)

作者简介: 杨 义(1985-), 男, 四川乐山人, 讲师, 博士, 主要从事药物设计修饰及绿色化学转化反应方面的研究, (E-mail) yangyiyong@163.com

三个方面,而对药效基团 α, β -不饱和 δ 内酯的修饰及生理活性研究还未深入展开。氟原子具有强吸电子能力,将氟原子或含氟基团选择性地引入有机分子能显著改变原有分子的生理活性,从而被广泛应用于具有生理活性天然产物的修饰中^[9-13]。本文设计将氟原子引入至 Goniotalamin 药效基团 α, β -不饱和 δ 内酯的 γ 位,期望通过这样的修饰可以获得具有更加良好抗肿瘤活性的分子,并对这类分子的体外肿瘤细胞抑制活性和酪氨酸激酶抑制活性进行评估。

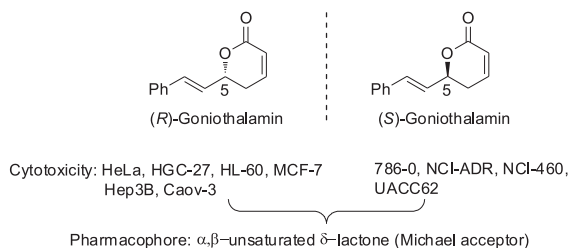


图1 Goniotalamin 的分子结构与抗肿瘤活性图

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

^1H NMR 谱用 Bruker AM-300 (300 MHz), Bruker AM-400 (400 MHz) 以及 Varian VXR (300 MHz) 型核磁共振仪测定, TMS 作内标。 ^{13}C NMR 谱用 Bruker AM-300 (75.5 MHz), Varian VXR (75.5 MHz), Varian Mercury-300 (75.5 MHz), Bruker AM-400 (100 MHz) 型核磁共振仪测定, TMS 作内标。 ^{19}F NMR 谱用 Bruker AM-300 (282 MHz) 和 Varian VXR (282 MHz) 型核磁共振仪测定, FCCl_3 为外标, 高场为负。IR 谱用 Shimadzu IR-440 型红外分光光度仪测定。MS 谱用 HP-5989A 型质谱仪测定。HRMS 谱用 Finnigan MAT 8430 型质谱仪测定。比旋光用 Perkin-Elmer 241 型自动旋光仪测定; 测熔点所用温度计未经校正。

所用化学试剂均购买于 Aldrich 公司。柱层析使用烟台化工厂生产的硅胶 H。所用溶剂和试剂(分析纯)除特殊说明外,其纯化均参考 Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. in Purification of Laboratory Chemicals, Pergamon: Oxford, 1980。

1.2 γ -氟代 Goniotalamin 类似物的合成

1.2.1 γ, γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物的合成

典型合成操作:

氮气氛围下, $\text{Pd}_2\text{dba}_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (13.7 mg, 13.2 μmol)、三苯基砷(16.2 mg, 52.8 μmol)、氯化锂(45 mg, 1.06 mmol)溶解于 NMP (2 mL), 依次加入碘苯 a (0.396 mmol) 和化合物 1 (150 mg, 0.264 mmol) 的 NMP 溶液 (2 mL), 室温反应 10 小时, 加入饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应, 乙醚萃取, 有机相依次使用水、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤蒸除溶剂, 粗产物 2a 溶解于 THF (2 mL), 将配制的 HF/

Py 的 THF 溶液 (1 mL) 滴入, 室温反应 24 小时, 加入饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应, 乙酸乙酯萃取, 有机相依次使用饱和碳酸氢钠溶液、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤蒸除溶剂, 经柱层析分离 (PE:EA = 2:1) 得到粗产物 3a。粗产物 3a 溶解于二氯甲烷 (3 mL), 依次加入二乙酸碘苯 (242 mg, 0.75 mmol)、TEMPO (8 mg, 5 μmol), 室温反应 5 小时, 饱和硫代硫酸钠溶液淬灭反应, 二氯甲烷萃取, 有机相依次使用水、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤蒸除溶剂, 粗产物经柱层析分离 (PE:EA = 10:1) 得到产物 4a。

(*R, E*)-5,5-difluoro-6-styryl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (4a) (known compound): White solid, m. p. 90—91 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -100.7^\circ$ (*c* 3.54, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.45—7.44 (m, 2H), 7.38—7.30 (m, 3H), 6.89 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 6.88—6.83 (m, 1H), 6.34 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 15.6 Hz, 6.8 Hz, 1H), 5.21—5.13 (m, 1H); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ : -106.5—-108.7 (m, 2F)。

(*R, E*)-5,5-difluoro-6-(4-fluorostyryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (4b): White solid, m. p. 105—107 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -90.6^\circ$ (*c* 3.35, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.42 (dd, *J* = 8.4 Hz, 5.2 Hz, 2H), 7.05 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.90—6.85 (m, 1H), 6.86 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.19 (dd, *J* = 16.0 Hz, 6.8 Hz, 1H), 5.16 (dt, *J* = 16.4 Hz, 6.8 Hz, 1H); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ : -107.3 (dm, *J* = 285.7 Hz, 1F), -108.2 (dm, *J* = 285.7 Hz, 1F), -112.0—-112.1 (m, 1F); ^{13}C NMR (100.7 MHz, CDCl_3) δ : 164.3, 161.8, 160.3, 137.8 (dd, *J* = 31.9 Hz, 27.0 Hz), 136.7, 131.3 (d, *J* = 2.8 Hz), 128.8, 128.7, 126.6 (t, *J* = 9.0 Hz), 116.7, 115.7 (d, *J* = 21.2 Hz), 112.0 (dd, *J* = 245.3 Hz, 239.6 Hz), 80.0 (dd, *J* = 33.0 Hz, 28.4 Hz); IR (KBr) *v*: 3080, 2921, 2848, 1747, 1510, 1234, 1106, 1076, 989, 820 cm^{-1} ; MS (EI) *m/z* 254 (M^+); HRMS Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{O}_2\text{F}_3$ 254.0550, found 254.0551。

(*R, E*)-6-(4-chlorostyryl)-5,5-difluoro-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (4c): White solid, m. p. 160—161 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -98.2^\circ$ (*c* 3.14, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.91—6.86 (m, 1H), 6.86 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 16.0 Hz, 6.8 Hz, 1H), 5.22—5.14 (m, 1H); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ : -107.2 (ddd, *J* = 287.6 Hz, 15.2 Hz, 3.7 Hz, 1F), -108.2 (dt, *J* = 287.6 Hz, 6.8 Hz, 1F); ^{13}C NMR (100.7 MHz, CDCl_3) δ : 160.2 (t, *J* = 2.3 Hz), 137.8 (dd, *J* = 26.8 Hz, 32.2 Hz), 136.5, 134.7, 133.6, 129.0, 128.2, 126.6 (t, *J* = 8.8 Hz), 117.6 (d, *J* = 3.2 Hz), 112.0 (dd, *J*

=245.2 Hz, 239.4 Hz), 79.8 (dd, $J=32.7$ Hz, 28.1 Hz); IR (KBr) ν : 3083, 2927, 2851, 1744, 1491, 1100, 1073, 975, 814 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 270 (M^+); HRMS Calcd for $C_{13}H_9O_2F_2Cl$ 270.0259, found 270.0262.

(*R,E*) -6-(3,4-dichlorostyryl)-5,5-difluoro-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (4d): White solid, m. p. 126—128 °C; $[\alpha]_D^{25} = -92.8^\circ$ (c 4.25, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.51 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.27—7.25 (m, 1H), 6.91—6.86 (m, 1H), 6.81 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.37 (d, $J=10.0$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=16.0$ Hz, 6.4 Hz, 1H), 5.22—5.15 (m, 1H); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ : -106.9 (dm, $J=288.5$ Hz, 1F), -108.5 (dt, $J=288.5$ Hz, 6.5 Hz, 1F); ^{13}C NMR (100.7 MHz, CDCl_3) δ : 159.9, 137.7 (dd, $J=32.3$ Hz, 26.6 Hz), 135.1, 135.0, 132.9, 132.7, 130.6, 128.6, 126.5 (t, $J=8.6$ Hz), 126.1, 118.9 (d, $J=3.3$ Hz), 101.9 (dd, $J=245.5$ Hz, 238.7 Hz), 79.4 (dd, $J=32.8$ Hz, 27.6 Hz); IR (KBr) ν : 3074, 2921, 2851, 1749, 1473, 1264, 1106, 1074, 1029, 817 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 304 (M^+); HRMS Calcd for $C_{13}H_8O_2F_2Cl_2$ 303.9869, found 303.9865.

(*R,E*) -5,5-difluoro-6-(3-nitrostyryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (4e): Light yellow solid, m. p. 92—93 °C; $[\alpha]_D^{25} = -87.6^\circ$ (c 3.55, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.29 (s, 1H), 8.16 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.55 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.94—6.89 (m, 1H), 6.41 (dd, $J=16.0$ Hz, 6.4 Hz, 1H), 6.38 (d, $J=10.4$ Hz, 1H), 5.24 (dt, $J=17.2$ Hz, 5.6 Hz, 1H); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ : -106.6 (ddd, $J=288.2$ Hz, 16.1 Hz, 2.3 Hz, 1F), -108.6 (dt, $J=288.2$ Hz, 5.6 Hz, 1F); ^{13}C NMR (100.7 MHz, CDCl_3) δ : 159.8, 148.5, 137.7 (dd, $J=32.7$ Hz, 26.4 Hz), 136.8, 134.9, 132.8, 129.7, 126.6 (t, $J=9.6$ Hz), 123.4, 121.5, 120.3 (d, $J=3.5$ Hz), 111.9 (dd, $J=246.1$ Hz, 239.6 Hz), 79.2 (dd, $J=33.4$ Hz, 27.9 Hz); IR (KBr) ν : 3083, 2924, 2851, 1747, 1529, 1352, 1272, 1106, 1072, 732 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 281 (M^+); HRMS Calcd for $C_{13}H_9NO_4F_2$ 281.0500, found 281.0502.

(*R,E*) -methyl-2-(2-(3,3-difluoro-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)vinyl)benzoate (4f): Clear oil; $[\alpha]_D^{25} = -50.2^\circ$ (c 3.84, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.93 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.38 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.89—6.84 (m, 1H), 6.35 (d, $J=10.0$ Hz, 1H), 6.12 (dd, $J=16.0$ Hz, 7.6 Hz, 1H), 5.26—5.19 (m, 1H), 3.89 (s, 3H); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ : -107.6—-107.7 (m, 2H); ^{13}C NMR (100.7 MHz, CDCl_3) δ : 167.3, 160.3, 137.6 (dd, $J=56.2$ Hz, 29.5

Hz), 137.5, 132.4, 130.7, 128.8, 128.5, 127.8, 126.6 (t, $J=9.4$ Hz), 119.7, 112.2 (t, $J=242.2$ Hz), 80.1 (t, $J=30.4$ Hz), 52.2; IR (KBr) ν : 3074, 2950, 2845, 1747, 1716, 1260, 1105, 1075, 818 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 294 (M^+); HRMS Calcd for $C_{15}H_{12}O_4F_2$ 294.0704, found 294.0705.

(*R,E*) -5,5-difluoro-6-(4-(trifluoromethyl)styryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (4g): Clear oil; $[\alpha]_D^{25} = -79.8^\circ$ (c 3.20, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.69 (s, 1H), 7.62 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.49 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.92—6.87 (m, 1H), 6.38 (d, $J=10.4$ Hz, 1H), 6.36 (dd, $J=16.0$ Hz, 6.8 Hz, 1H), 5.22 (dt, $J=16.8$ Hz, 6.4 Hz, 1H); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ : -62.8 (s, 3F), -107.0 (ddd, $J=288.5$ Hz, 15.8 Hz, 2.5 Hz, 1F), -108.4 (dt, $J=288.5$ Hz, 5.1 Hz, 1F); ^{13}C NMR (100.7 MHz, CDCl_3) δ : 160.0, 137.8 (d, $J=32.0$ Hz), 137.6 (d, $J=32.0$ Hz), 136.1, 135.8, 131.1 (dd, $J=65.4$ Hz, 32.8 Hz), 130.1, 129.2, 126.5 (t, $J=9.0$ Hz), 125.4 (dd, $J=3.7$ Hz, 3.4 Hz), 123.8 (q, $J=273.0$ Hz), 119.0 (d, $J=2.5$ Hz), 111.9 (dd, $J=245.7$ Hz, 239.2 Hz), 79.5 (dd, $J=32.5$ Hz, 27.6 Hz); IR (KBr) ν : 3074, 2921, 2848, 1749, 1645, 1332, 1167, 1072, 803 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 304 (M^+); HRMS Calcd for $C_{14}H_9O_2F_5$ 304.0523, found 304.0520.

(*R,E*) -5,5-difluoro-6-(4-methoxystyryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (4h): Light yellow solid, m. p. 122—123 °C; $[\alpha]_D^{25} = -94.9^\circ$ (c 3.20, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.38 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.87—6.83 (m, 1H), 6.82 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.34 (d, $J=10.0$ Hz, 1H), 6.12 (dd, $J=16.0$ Hz, 7.2 Hz, 1H), 5.17—5.10 (m, 1H), 3.82 (s, 3H); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ : -107.6—-107.7 (m, 2H); ^{13}C NMR (100.7 MHz, CDCl_3) δ : 160.5, 160.2, 137.9 (t, $J=28.9$ Hz), 137.7, 128.4, 127.8, 126.6 (t, $J=9.0$ Hz), 114.5, 114.1, 112.1 (t, $J=242.3$ Hz), 80.5 (t, $J=30.6$ Hz), 55.3; IR (KBr) ν : 3083, 2964, 2929, 2848, 1741, 1512, 1175, 1072, 1024, 829 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 266 (M^+); HRMS Calcd for $C_{14}H_{12}O_3F_2$ 266.0755, found 266.0756.

(*R,E*) -5,5-difluoro-6-(2-methoxystyryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (4i): Light yellow solid, m. p. 62—63 °C; $[\alpha]_D^{25} = -64.2^\circ$ (c 2.85, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.46 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.95 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.86—6.82 (m, 1H), 6.33 (d, $J=10.0$ Hz, 1H), 6.31 (dd, $J=16.0$ Hz, 8.0 Hz, 1H), 5.19—5.11 (m, 1H), 3.85 (s, 3H); ^{19}F NMR

(282 MHz, CDCl₃) δ : -107.6—-107.7 (m, 2F); ¹³C NMR (100.7 MHz, CDCl₃) δ : 160.5, 157.2, 137.9 (t, J = 30.1 Hz), 133.5, 130.1, 127.7, 126.6 (t, J = 8.7 Hz), 124.0, 120.6, 117.4, 112.2 (t, J = 240.9 Hz), 111.0, 80.8 (t, J = 30.9 Hz), 55.4; IR (KBr) ν : 3071, 2941, 2837, 1742, 1642, 1490, 1246, 1108, 753 cm⁻¹; MS (EI) m/z 266 (M⁺); HRMS Calcd for C₁₄H₁₂O₃F₂ 266.0755, found 266.0752.

(*S,E*)-5,5-difluoro-6-styryl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (6a): White solid, m. p. 92—94 °C; [α]_D²⁵ = 104.4° (c 2.65, CHCl₃); MS (ESI) m/z 254 (M + NH₄)⁺, 259 (M + Na)⁺, 291 (M + MeOH + Na)⁺; HRMS Calcd for C₁₃H₁₀O₂F₂Na: 259.0547; Found: 259.0541. ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectrum was the same as compound 4a.

(*S,E*)-5,5-difluoro-6-(4-fluorostyryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (6b): White solid, m. p. 100—102 °C; [α]_D²⁵ = 95.8° (c 2.70, CHCl₃); MS (ESI) m/z 255 (M + H)⁺, 272 (M + NH₄)⁺, 277 (M + Na)⁺, 309 (M + CH₃OH + Na)⁺; HRMS Calcd for C₁₄H₁₃F₃O₃Na 309.0714, found 309.0709. ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectrum was the same as compound 4b.

(*S,E*)-6-(4-chlorostyryl)-5,5-difluoro-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (6c): White solid, m. p. 160—162 °C; [α]_D²⁵ = 103.5° (c 3.40, CHCl₃); MS (ESI) m/z 271 (M + H)⁺, 288 (M + NH₄)⁺, 293 (M + Na)⁺, 325 (M + MeOH + Na)⁺; HRMS Calcd for C₁₃H₉ClF₂O₂Na: 293.0157; Found: 293.0151. ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectrum was the same as compound 4c.

(*S,E*)-6-(3,4-dichlorostyryl)-5,5-difluoro-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (6d): White solid, m. p. 123—124 °C; [α]_D²⁵ = 99.3° (c 2.85, CHCl₃); MS (ESI) m/z 322 (M + NH₄)⁺, 359 (M + CH₃OH + Na)⁺; HRMS Calcd for C₁₄H₁₂Cl₂F₂O₃Na 359.0029, found 359.0024. ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectrum was the same as compound 4d.

(*S,E*)-5,5-difluoro-6-(3-nitrostyryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (6e): Light yellow solid, m. p. 92—93 °C; [α]_D²⁵ = 86.0° (c 3.40, CHCl₃); MS (ESI) m/z 282 (M + H)⁺, 314 (M + MeOH + H)⁺, 352 (M + MeOH + Na)⁺, 352 (M + MeOH + K)⁺; HRMS Calcd for C₁₃H₉F₂NO₄Na 304.0397, found 304.0392. ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectrum was the same as compound 4e.

(*S,E*)-methyl-2-(2-(3,3-difluoro-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)vinyl)benzoate (6f): Clear oil; [α]_D²⁵ = 49.5° (c 3.65, CHCl₃); MS (ESI) m/z 295 (M + H)⁺, 312 (M + NH₄)⁺, 317 (M + Na)⁺, 349 (M + CH₃OH + Na)⁺; HRMS Calcd for C₁₅H₁₂O₄F₂Na 317.0601, found 317.0596. ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectrum was the same as compound 4f.

(*S,E*)-5,5-difluoro-6-(4-(trifluoromethyl)styryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (6g): Clear oil; [α]_D²⁵ = 76.0° (c 4.10, CHCl₃); MS (ESI) m/z 327 (M + Na)⁺; 359 (M + MeOH + Na)⁺; HRMS Calcd for C₁₄H₉F₅O₂Na 327.0420, found 327.0415. ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectrum was the same as compound 4g.

(*S,E*)-5,5-difluoro-6-(4-methoxystyryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (6h): Light yellow solid, m. p. 120—121 °C; [α]_D²⁵ = 106.3° (c 2.30, CHCl₃); MS (ESI) m/z 267 (M + H)⁺, 289 (M + Na)⁺, 321 (M + CH₃OH + Na)⁺; HRMS Calcd for C₁₄H₁₂F₂O₃Na 289.0652, found 289.0647. ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectrum was the same as compound 4h.

(*S,E*)-5,5-difluoro-6-(2-methoxystyryl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (6i): White solid, m. p. 60—62 °C; [α]_D²⁵ = 59.6° (c 2.85, CHCl₃); MS (ESI) m/z 267 (M + H)⁺, 289 (M + Na)⁺, 321 (M + MeOH + Na)⁺; HRMS Calcd for C₁₄H₁₂F₂O₃Na 289.0652, found 289.0647. ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectrum was the same as compound 4i.

1.2.2 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物的合成

参照文献[15]方法对化合物 7a、7b 和 7h 进行了合成。

(5*R*,6*S*)-5-Fluoro-5,6-dihydro-6-styrylpyran-2-one (7a): White solid, m. p. 43—45 °C; [α]_D²⁵ = 145° (c 0.30, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42—7.28 (m, 5H), 6.93 (tdd, J = 8.7, 5.7, 3.0 Hz, 1H), 6.82 (dd, J = 15.9, 5.6 Hz, 1H), 6.20 (dd, J = 15.8, 6.3 Hz, 1H), 6.20—6.16 (m, 1H), 5.23—5.16 (m, 1H), 5.09 (dddd, J = 46.8, 7.1, 3.0, 1.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 161.3 (d, J = 2.9 Hz), 141.7 (d, J = 21.0 Hz), 135.4 (d, J = 8.9 Hz), 128.8, 126.9, 123.5, 123.4, 121.8, 121.8, 84.0 (d, J = 176 Hz), 80.2 (d, J = 24.9 Hz); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -186.4 ~ -186.7 (m, 1F); IR (KBr) ν : 3060, 3027, 2924, 2856, 1739, 1626, 1576, 1438, 1382, 1232, 1012 cm⁻¹; MS (ESI) m/z 241 [M + Na]⁺; HRMS Calcd for C₁₃H₁₁FNaO₂, 241.0641, found 241.0641.

(5*R*,6*S*)-6-(4-Fluorostyryl)-5-fluoro-5,6-dihydropyran-2-one (7b): White solid, m. p. 93—94 °C; [α]_D²⁵ = 226° (c 0.12, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41—7.36 (m, 2H), 7.07—7.01 (m, 2H), 6.94 (td, J = 9.7, 2.8 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.18 (dt, J = 10.0, 1.4 Hz, 1H), 6.13 (dd, J = 16.0, 6.1 Hz, 1H), 5.16 (dddd, J = 47.6, 7.3, 2.8, 1.3 Hz, 1H), 5.19—5.12 (m, 1H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 163.0 (d, J = 248 Hz), 161.3, 141.9 (d, J = 20.9 Hz), 134.3, 131.5 (d, J = 3.6 Hz), 128.5 (d,

$J = 8.2$ Hz), 123.3 (d, $J = 8.1$ Hz), 121.6, 115.8 (d, $J = 21.8$ Hz), 84.1 (d, $J = 176$ Hz), 80.0 (d, $J = 25.2$ Hz); ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -112.35 ~ -112.44 (m, 1F), -187.34 (dt, $J = 49.4, 9.1$ Hz, 1F); IR (KBr) ν : 3065, 2921, 2851, 1731, 1633, 1594, 1510, 1415, 1378, 1232, 1014 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 236 [M] $^+$; HRMS Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_2$, 236.0649, found 236.0648.

(5*R*,6*S*)-6-(4-Methoxystyryl)-5-fluoro-5,6-dihydropyran-2-one (7h): White solid, m. p. 108-110 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 135^{\circ}$ (c 0.21, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.32 (m, 2H), 6.94 (td, $J = 9.2, 3.0$ Hz, 1H), 6.89-6.86 (m, 2H), 6.76 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.18 (ddd, $J = 10.0, 1.8, 1.3$ Hz, 1H), 6.05 (dd, $J = 15.9, 6.4$ Hz, 1H), 5.16 (dddd, $J = 48.3, 7.0, 3.0, 1.2$ Hz, 1H), 5.14 (dddd, $J = 13.5, 9.8, 6.8, 1.2$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3) δ 160.1, 141.7 (d, $J = 20.9$ Hz), 135.2, 128.2, 128.0, 123.5 (d, $J = 8.1$ Hz), 119.4, 119.4, 114.1, 84.0 (d, $J = 176.0$ Hz), 80.5 (d, $J = 25.5$ Hz), 55.3; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -186.15 ~ -186.40 (m, 1F); IR (KBr) ν : 2923, 2849, 1730, 1642, 1597, 1508, 1238, 1009 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 248.1 [M] $^+$; HRMS Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{FO}_3$, 248.0849, found 248.0853.

1.3 体外肿瘤细胞抑制活性测试

细胞培养: HL-60、Bel7402、BGC-823 和 KB 细胞株从美国典型培养物保藏中心获得。以上细胞株均生长于含 10% 小牛血清及 1% P/S (青霉素/链霉素) 的 RPMI1640 培养基中, 放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

肿瘤细胞毒性测试: 在 96 孔培养板中每孔接种 5000 个对应肿瘤细胞培养 24 小时, 分别加入不同浓度水平 (0.5, 5, 50 mM) 的各受试及阳性药物作用 72 小时。随后向每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 小时, 弃去上清液。向每孔加入 100 μL 分析纯 DMSO 振荡 10 分钟, 酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度 OD 值。根据下列公式计算各浓度药物对四种肿瘤细胞株的抑制率: 抑制率 = (1 - 给药组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。半数抑制浓度 (IC_{50}) 由抑制率进行线性回归计算得出。

1.4 酪氨酸激酶抑制活性测试

细胞培养: BaF₃ WT 细胞培养在 RPMI 1640 培养基中, 包含 10% 胎牛血清 (FBS), 100 units/mL 的 penicillin, 100 units/mL 的 streptomycin, 100 ng/mL 的 IL-3。BaF₃/TKs (FGFR3, IGF1R, PDGFR β , TRKB) 细胞培养在 RPMI 1640 培养基中, 包含 10% 胎牛血清 (FBS), 100 units/mL

的 penicillin, 100 units/mL 的 streptomycin (Invitrogen), 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418。以上过度表达的细胞均于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

抑制活性测试: 将 4000 个细胞铺到 96 孔培养板中, 分别加入不同浓度水平 (0.5, 5, 50 mM) 的各受试及阳性药物作用 48 小时。加入 Alamar Blue, 在 485 nm 激发光, 590 nm 发射光下检测细胞活性。根据抑制率公式计算各浓度药物对四种肿瘤细胞株的抑制率, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 由抑制率进行线性回归计算得出。

抑制率 = (1 - 给药组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%

2 结果与讨论

2.1 目标分子的设计

在 Goniotalamin 结构修饰的一系列工作基础上^[14-17], 对目标分子进行设计 (图 2), 设计基于以下考虑: (1) 在 Goniotalamin 的 γ 位引入氟原子, 考察具有强吸电子性质的氟原子对关键药效基团 α, β -不饱和 δ 内酯的影响; (2) 向苯环引入不同的取代基, 考察苯环结构对生物活性的影响; (3) 进一步探究目标分子中的手性中心变化与抗肿瘤活性的关系。此外, 还将通过 γ, γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物和 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物的生物活性比较 (图 3), 系统研究 γ 位氟原子对内酯环电子性质、构象以及生物活性的影响。

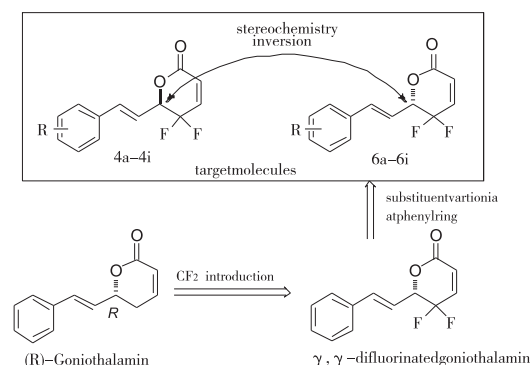
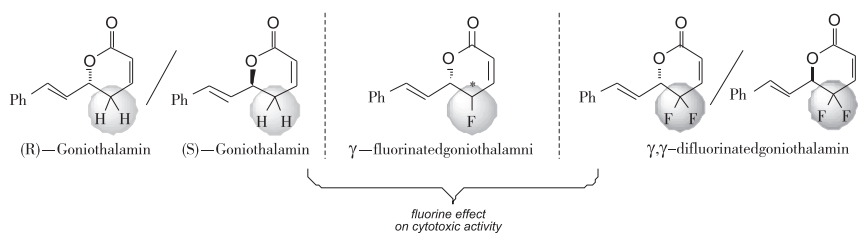
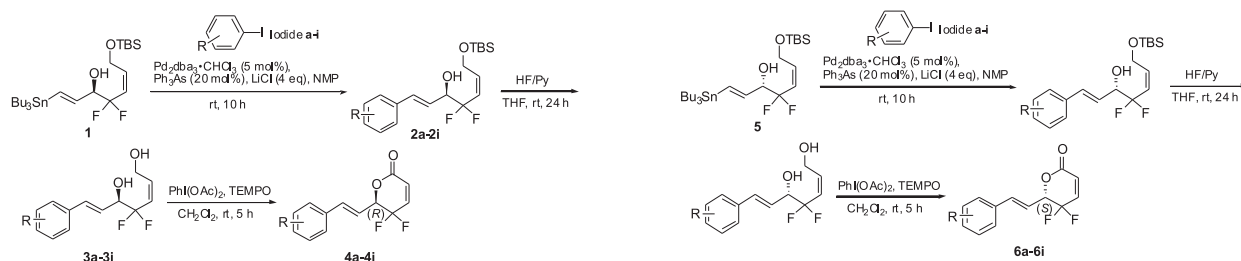


图 2 γ, γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物的设计

2.2 目标分子的合成

2.2.1 γ, γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物的合成

γ, γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物可由具有光学活性的二氟亚甲基取代的锡试剂出发, 经 Stille 偶联反应、去除硅保护基、1,5-氧化关环三步反应制备^[17] (表 1 和表 2)。目标分子中的手性中心由酶不对称拆分获得的高光学活性的锡试剂来引入^[16], 同时目标分子中苯环上取代基的多样性可以通过 Stille 偶联反应中采用含有不同取代基的碘苯 a-i 实现。

图3 Goniotalamin 分子 γ 位引入不同数目的氟原子表1 γ,γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物
4a-4i(R 构型) 的合成

Entry	R Substituent	Compound	Yield ^a	Optical Rotation
1	H		66%	$[\alpha]_{25}^D = -100.7$ (c 3.54, CHCl ₃) [文献值: -108.2 (c 2.00, CHCl ₃)] ^b
2	4-F		74%	$[\alpha]_{25}^D = -90.6$ (c 3.35, CHCl ₃)
3	4-Cl		76%	$[\alpha]_{25}^D = -98.2$ (c 3.14, CHCl ₃)
4	3,4-dichloro		79%	$[\alpha]_{25}^D = -92.8$ (c 4.25, CHCl ₃)
5	3-NO ₂		80%	$[\alpha]_{25}^D = -87.6$ (c 3.55, CHCl ₃)
6	2-CO ₂ Me		81%	$[\alpha]_{25}^D = -50.2$ (c 3.84, CHCl ₃)
7	4-CF ₃		70%	$[\alpha]_{25}^D = -79.8$ (c 3.20, CHCl ₃)
8	4-MeO		80%	$[\alpha]_{25}^D = -94.9$ (c 3.20, CHCl ₃)
9	2-MeO		71%	$[\alpha]_{25}^D = -64.2$ (c 2.85, CHCl ₃)

a: Yield over three successive manipulations.

b: The optical rotation value was reported in literature 14.

表2 γ,γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物
6a-6i(S 构型) 的合成

Entry	R Substituent	Compound	Yield ^a	Optical Rotation
1	H		75%	$[\alpha]_{25}^D = 104.4$ (c 2.65, CHCl ₃) [文献值: 111.7 (c 0.98, CHCl ₃)] ^b
2	4-F		79%	$[\alpha]_{25}^D = 95.8$ (c 2.70, CHCl ₃)
3	4-Cl		86%	$[\alpha]_{25}^D = 103.5$ (c 3.40, CHCl ₃)
4	3,4-dichloro		69%	$[\alpha]_{25}^D = 99.3$ (c 2.85, CHCl ₃)
5	3-NO ₂		88%	$[\alpha]_{25}^D = 86.0$ (c 3.40, CHCl ₃)
6	2-CO ₂ Me		87%	$[\alpha]_{25}^D = 49.5$ (c 3.65, CHCl ₃)
7	4-CF ₃		88%	$[\alpha]_{25}^D = 76.0$ (c 4.10, CHCl ₃)
8	4-MeO		68%	$[\alpha]_{25}^D = 106.3$ (c 2.30, CHCl ₃)
9	2-MeO		81%	$[\alpha]_{25}^D = 59.6$ (c 2.85, CHCl ₃)

a: Yield over three successive manipulations.

b: The optical rotation value was reported in literature 14.

2.2.2 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物的合成

γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物相较于 γ, γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物具有新增的 γ 位氟代手性碳原子,因而成功构建此手性中心是整个合成的关键。依据开发的合成路线^[15],从化合物 A 出发,经关键的 Sharpless 不对称环氧化、环氧开环亲核氟化、Lindlar 氢化、HWE 反应和 1,5-氧化关环等反应即可合成 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物 7a、7b 和 7h(图 4)。

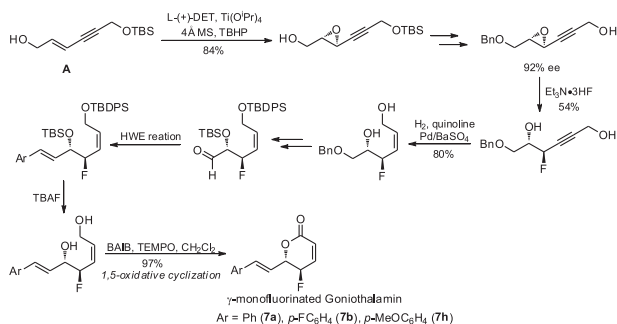


图 4 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物 X 的合成

2.3 体外肿瘤细胞抑制活性研究

对 21 种 γ -氟代 Goniotalamin 类似物(4a-4i, 6a-6i, 7a, 7b, 7h)进行了体外肿瘤细胞毒性测试(表 3)。测试方法为 MTT 法。测试的细胞株包括:HL-60(早幼粒细胞白血病, promyelocytic leukemia), Bel7402(肝癌, hepatocarcinoma), BGC-823(胃癌, human gastric carcinoma), KB(口腔上皮癌, human oral epidermoid carcinoma)。依托泊苷(VP-16)作为阳性对照。

表 3 γ -氟代 Goniotalamin 类似物的体外肿瘤细胞抑制活性

Entry	Compound No./structure	IC ₅₀ /μM			
		HL-60	Bel7402	BGC-823	KB
1	(R)-Goniotalamin	2.9	20.6	40.2	13.5
2	4a-4i	>100	>100	>100	>100
3	6a-6c	>100	>100	>100	>100
4	6d	29.2	>100	76.2	>100
5	6e-6f	>100	>100	>100	>100
6	6g	25.1	>100	>100	>100
7	6h-6i	>100	>100	>100	>100
8	7a	60.4	44.5	>100	>100
9	7b	>100	>100	>100	>100
10	7h	5.0	24.7	24.3	34.8
11	VP-16 ^a	0.8	25.4	7.0	0.4

a: VP-16 as positive control.

从表 3 测试数据可以发现,大多数的 γ, γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物无肿瘤细胞抑制活性(其中构型为 R 的化合物 4a-4i 均丧失肿瘤细胞毒性, entry 2)。构型为 S 且苯环上 3,4 位为氯取代的化合物 6d 对 HL-60 和 BGC-823 细胞具有中等抑制活性, IC₅₀ 值分别为

29.2 和 76.2 μM (entry 4)。苯环上 4 位为三氟甲基取代的化合物 6g 表现出选择性抑制 HL-60 细胞的功能, IC₅₀ 值为 25.1 μM (entry 6)。对于 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物,化合物 7a 对 HL-60 和 Bel7402 细胞的抑制活性稍低于母体(R)-Goniotalamin (entry 8),而苯环 4 位为甲氧基的类似物 7h 则表现出对 HL-60 和 Bel7402 细胞较好的抑制效果(entry 10, 活性可与母体(R)-Goniotalamin 相当)。出乎意料的是,当 7h 苯环上的给电子甲氧基替换为吸电子的氟原子时(entry 9, 化合物 7b),肿瘤细胞毒性完全消失,再次印证了苯环上取代基对生理活性的重要影响^[5]。

以上活性数据表明在 Goniotalamin 分子的 γ 位引入两个氟原子进行修饰通常难以带来抗肿瘤生理活性的改善。推测肿瘤细胞抑制活性下降的原因可能是由于两个氟原子引入后,氟取代的 Michael 受体与靶酶的亲核氨基酸残基发生共轭加成的难度加大导致。氟原子外围具有刚性的孤对电子,同时亲核氨基酸残基亲核基团也具有较高的电子云密度,两者相互靠近时会产生强烈的电荷排斥作用^[10],从而两者之间难以发生共轭加成(无论靶酶亲核基团从氟代 Michael 受体的 Re 面还是 Si 面进攻,电荷排斥作用都会存在)。而对 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物来说,靶酶亲核基团仍可从其 Re 面进攻(图 5),因此其肿瘤细胞抑制活性与母体保持在同一浓度水平。

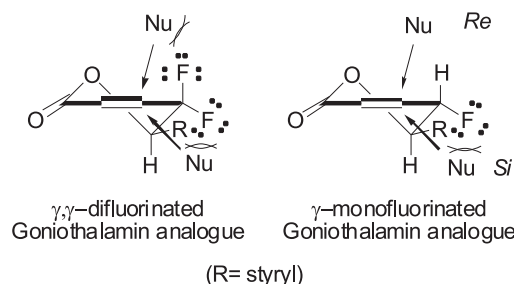


图 5 两类氟代 Goniotalamin 类似物与靶酶亲核基团相互作用比较

2.4 酪氨酸激酶抑制活性研究

肿瘤发生发展机制研究表明超过 50% 的原癌基因和癌基因产物都具有酪氨酸激酶活性。该酶的过度表达或激活会导致肿瘤细胞无限增殖。由于以上测试的一些化合物表现出良好的体外肿瘤细胞抑制效果,因此拟对这些化合物进行酪氨酸激酶抑制活性研究,并探讨解释两类抑制作用之间的联系。

在此选取了几种具有代表性的酪氨酸激酶 FGFR3, IGF1R, PDGFR β , TRKB 以及正常细胞靶标 WT 进行抑制活性初步筛选研究(表 4)。

从表 4 初步筛选数据可以发现,在给药浓度为 10 μg/mL

表4 γ -氟代 Goniotalamin 类似物的酪氨酸激酶抑制活性^a

Entry	Compound No.	Inhibition ratio ^b				
		FGFR3	IGF1R	PDGFR β	TRKB	WT
1	4a	-0.21	0.14	-0.01	-0.18	-0.13
2	4b	-0.05	-0.19	-0.09	-0.26	-0.22
3	4c	-0.19	0.12	-0.03	-0.20	-0.05
4	4d	-0.13	-0.30	-0.29	-0.28	-0.30
5	4e	-0.03	0.37	-0.15	0.23	0.05
6	4f	-0.01	0.28	-0.06	0.03	0.04
7	4g	-0.09	0.31	-0.15	0.07	0.10
8	4h	0.01	0.15	0.05	-0.03	-0.03
9	4i	0.20	0.69	0.06	0.54	0.17
10	6a	0.29	0.72	-0.20	0.18	0.01
11	6b	-0.23	0.19	-0.30	-0.30	-0.27
12	6c	0.67	0.87	0.68	0.59	0.25
13	6d	-0.30	-0.10	-0.28	-0.27	-0.19
14	6e	-0.30	0.10	-0.27	-0.30	-0.18
15	6f	-0.30	0.28	-0.30	-0.02	-0.16
16	6g	0.54	0.82	0.27	0.47	0.28
17	6h	-0.04	0.50	-0.01	0.38	-0.15
18	6i	0.15	0.76	-0.14	0.56	0.08
19	7a	0.95	0.95	0.96	0.96	0.06
20	7b	0.96	0.96	0.95	0.95	0.39
21	7h	0.89	0.92	0.46	0.76	0.23

a: The above compounds were tested at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

b: Effective inhibition of target enzyme was described as positive sign.

时,化合物4a-4h对四种酪氨酸激酶靶标的抑制率均小于0.5,未表现出良好的酪氨酸激酶抑制活性(若抑制率大于0.5,则表明具有较为确切的抑制活性)(entries 1-8)。化合物4i对IGF1R靶标具有一定抑制活性(抑制率为0.69)(entry 9)。对于构型相反的 γ,γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物,化合物6a对IGF1R靶标也具有一定抑制活性(抑制率为0.72)(entry 10);化合物6c对四种酪氨酸激酶均显示出抑制活性(抑制率依次为0.67,0.87,0.68,0.59)(entry 12);化合物6g除了对IGF1R具有抑制活性外,也对FGFR3起到抑制效果(抑制率分别为0.82和0.54)(entry 16);化合物6i则对IGF1R和TRKB具有抑制能力,抑制率分别为0.76和0.56(entry 18)。对于 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物而言,7a,7b和7h均具有较为良好的酪氨酸激酶抑制活性,抑制率普遍达到了0.9以上(entries 19-21),并且化合物7a对正常靶标WT几乎没有抑制作用,体现出选择性抑制肿瘤靶标的性质(entry 19)。由于化合物7a同时具有良好的抗肿瘤活性和酪氨酸激酶抑制活性,通过测试7a在不同的浓度水平下的酪氨酸激酶抑制率,线性回归计算了其半数抑制浓度(IC_{50} 值)(表5)。化合物7a对四种酪氨酸激酶的抑制活性分别为1.53 μM , 0.55 μM , 0.70 μM 和 1.81 μM ,抑制活性虽稍弱于抗癌药

表5 γ -氟代 Goniotalamin 类似物7a的酪氨酸激酶抑制活性半数抑制浓度

Entry	Compound No.	$\text{IC}_{50}/\mu\text{M}$				
		FGFR3	IGF1R	PDGFR β	TRKB	WT
1	7a	1.526	0.551	0.703	1.808	>20
2	Staurosporine ^a	0.283	0.119	0.010	0.005	0.113

a: Staurosporine as positive control.

物十字孢碱(Staurosporine),但在正常靶标WT的安全性方面具有明显优势($\text{IC}_{50} > 20 \mu\text{M}$)。

2.5 肿瘤细胞毒性与酪氨酸激酶抑制活性的数据结合分析

结合表3和表4数据,可以发现:(1)对于 γ,γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物,仅化合物6g同时表现出肿瘤细胞毒性与酪氨酸激酶抑制活性。化合物4i,6a,6c,6h和6i虽然都对酪氨酸激酶具有抑制效果,但它们均未对肿瘤细胞产生抑制作用;(2)对于 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物,化合物(7a,7b,7h)均表现出良好的酪氨酸激酶抑制活性,其中化合物7a,7h还同时对HL-60和Bel7402细胞株具有较好抑制作用,这说明7a和7h对肿瘤细胞的抑制能力与其酪氨酸激酶抑制活性可能存在一定关联。

3 结束语

本文合成了一系列 γ,γ -二氟取代 Goniotalamin 类似物(4a-4i,6a-6i)和 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物(7a,7b,7h),并对其体外肿瘤细胞毒性和酪氨酸激酶抑制活性进行了评估,其中 γ -单氟取代 Goniotalamin 类似物7a表现出了良好的体外肿瘤细胞抑制活性、酪氨酸激酶抑制活性和对正常靶标WT的低毒性(毒性远低于抗癌药物十字孢碱)。体外肿瘤细胞毒性和酪氨酸激酶抑制活性数据综合分析表明引入一个氟原子而非两个氟原子到 Goniotalamin 分子的 γ 位进行修饰是较为合理的修饰方式。以上所合成的 Goniotalamin 含氟类似物还有待于深入进行结构优化和药理性质研究,为相关抗癌药物研发提供参考。

参考文献:

- [1] Thomas S,William B,Patricia P,et al.Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase [J].Science,2000,289(5486):1938-1942.
- [2] 郑友广,李铭东,吉明.酪氨酸激酶及其小分子抑制剂研究进展[J].药品评价,2006,3(2):137-140.
- [3] 庞素华,郭宗儒.酪氨酸蛋白激酶抑制剂的研究进展[J].药学学报,1996,31(1):75-80.
- [4] Bllázquez M A,Bermejo A,Zafra-polo M C,et al.Styryl-

- lactones from Goniiothalamus species-A review[J]. *Phytochem Anal*,1999,10(4):161-170.
- [5] DE fátima Â,Modolo L V,Conegero L S,et al.Styryl lactones and their derivatives:Biological activities,mechanisms of action and potential leads for drug design[J]. *Curr Med Chem*,2006,13(28):3371-3384.
- [6] Zhou F S,Tang W D,Mu Q,et al.Semisynthesis and antitumor activities of new styryl - lactone derivatives [J].*Chem Pharm Bull*,2005,53(11):1387-1391.
- [7] DE fátima Â,Kohn L K,DE carvalho J E,et al.Cytotoxic activity of (*S*)-goniiothalamin and analogues against human cancer cells[J].*Biog Med Chem*,2006,14(3):622-631.
- [8] Dumitrescu L,Mai H D, Van H N,et al. Synthesis and cytotoxic activity of fluorinated analogues of Goniiothalamus lactones.Impact of fluorine on oxidative processes[J].*Eur J Med Chem*,2010,45(7):3213-3218.
- [9] Müller K,Faeh C,Diederich F.Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition[J]. *Science*, 2007, 317 (5846):1881-1886.
- [10] O'hagan D.Understanding organofluorine chemistry:an introduction to the C-F bond[J].*Chem Soc Rev*,2008, 37(2):308-319.
- [11] Purser S,Moore P R,Swallow S,et al. Fluorine in medicinal chemistry[J]. *Chem Soc Rev*,2008,37 (2): 320-330.
- [12] Kirk K L.Fluorination in medicinal chemistry:methods, strategies,and recent developments[J].*Org Process Res Dev*,2008,12(2):305-321.
- [13] 王江,柳红.氟原子在药物分子设计中的应用[J].*有机化学*,2011,31(11):1785-1798.
- [14] You Z W,Jiang Z X,Wang B L,et al.An efficient and general route to gem -difluoromethylenated α,β -unsaturated δ -lactones:high enantioselective synthesis of gem-Difluoromethylenated goniiothalamins[J]. *J Org Chem*, 2006,71(19):7261-7267.
- [15] Chen J L, Zheng F, Huang Y, et al. Synthesis of γ -monofluorinated goniiothalamin analogues via regio- and stereoselective ring-opening hydrofluorination of epoxide[J].*J Org Chem*,2011,76(16):6525-6533.
- [16] 杨义,游正伟,卿凤翎.含有二氟亚甲基的 Fostriecin 类似物的设计和合成研究[J].*化学学报*,2012,70 (22):2323-2336.
- [17] Yang Y,Yang Z J,Cheng C R,et al.Synthesis and anti-tumor activity evaluation of γ -monofluorinated and γ,γ -difluorinated Goniiothalamin analogues[J]. *Chin J Chem*,2013,31(6):805-812.

Design and Synthesis of γ -fluorinated Goniiothalamin Analogues: The Antitumor Small-molecule Inhibitor Act on Protein Tyrosine Kinase

YANG Yi¹, LI Jian-zhang¹, CHEN Chun-ru¹, QING Feng-ling², YANG Xian-tao³, YANG Zhen-jun³

(1. School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China; 2. Key Laboratory of Organofluorine Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 3. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: Protein tyrosine kinases which have an important regulatory function in the proliferation, differentiation, metastasis and corrosion of cancer cells have become one of the most important target enzymes in the study of tumor treatment. Based on the target-oriented principle and structure-activity relationship, the fluorine atoms are introduced at the γ position of Goniiothalamin (a potent antitumor natural product) in order to obtain more promising anti-proliferative agents. The γ,γ -difluorinated Goniiothalamin analogues 4a-4i and 6a-6i are synthesized through two key steps-*Stille* coupling and 1,5-oxidative cyclization, from the optically active difluorinated stannanes. The γ -monofluorinated Goniiothalamin analogues 7a, 7b and 7h, are obtained through Sharpless asymmetric epoxidation, ring-opening hydrofluorination, Lindlar hydrogenation, HWE reaction, 1,5-oxidative cyclization and so on. The proliferative activity *in vitro* and the tyrosine kinases inhibitory activity of these fluorinated analogues are biologically evaluated, and the results show that adding one fluorine atom at the γ position of Goniiothalamin is a better modification than introducing two fluorine atoms.

Key words: Goniiothalamin; α,β -unsaturated δ lactone; fluorinated compound; protein tyrosine kinase; anti-tumor activity