

磷酸胺类化合物的合成及抗 K562 细胞活性研究

杜芬, 黄剑雄, 黄睿, 周茵, 熊远珍* (南昌大学药学院, 南昌 330006)

摘要: 目的 合成并评价磷酸胺类化合物体外对白血病细胞株 K562 生物活性的抑制作用。方法 以芳氨基为药效基团, 羟脯氨酸为载体设计目标物, 通过几步亲核取代反应合成一系列新化合物, 并表征其结构。MTT 法测定它们对人慢性髓性白血病细胞株 K562 细胞的抑制作用。结果 发现了 10 个新化合物有一定的生物活性。结论 发现了一类新的具有一定抗肿瘤活性的磷酸胺类先导化合物。

关键词: 慢性髓性白血病; 酰胺类化合物; 合成; K562 细胞

中图分类号: R914.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)15-1857-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.15.001

引用本文: 杜芬, 黄剑雄, 黄睿, 等. 磷酸胺类化合物的合成及抗 K562 细胞活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1857-1860.

Synthesis and Anti-K562 Cell Activity of Phosphoramidate Compounds

DU Fen, HUANG Jianxiong, HUANG Rui, ZHOU Yin, XIONG Yuanzhen* (Medical School of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesis and evaluate a series of novel phosphoramidate compounds, and to evaluate their *in vitro* inhibitory activity of leukemia in K562 cells. **METHODS** The target compounds were designed by using aryl amino as active group while hydroxyproline as carrier moiety, they were synthesized by several nucleophilic substitution reaction, whose structures were characterized, the inhibitory effects of which on human chronic myeloid leukemia cell line K562 were determined by MTT assay. **RESULTS** Ten new compounds exhibited certain biological activity against K562 cells. **CONCLUSION** A new class of phosphoramidate leading compounds with certain anti-tumor activity is found.

KEYWORDS: chronic myeloid leukemia; phosphoramidate compounds; synthesis; K562 cells

慢性髓性白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是首个被发现有固定细胞遗传学异常的恶性肿瘤, 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)已应用于 CML 的临床治疗, 如伊马替尼、达沙替尼和尼罗替尼等^[1-4], 它们结构中都具有芳氨基、酰氨基团, 是其中的药效基团, 而磷酸胺类化合物是否具有类似活性未见报道。考虑到通常情况下肿瘤细胞磷酸胺酶的活性高于正常细胞, 磷酸胺在肿瘤组织中能被相应酶催化水解发挥靶向作用, 综合磷酸酯抗病毒活性, 本实验以具有生物亲合作用的羟脯氨酸作为载体, 将芳氨基、磷酸胺、磷酸酯连为一体, 从而设计了系列磷酸胺类化合物, 进而合成了这些新目标物, 表征了其结构, 测定了它们抗人 CML 细胞株

K562 细胞的活性, 为进一步的研究提供基础。

1 合成路线

1.1 仪器与材料

所有化学品和溶剂均为试剂级, 并在使用前通过标准方法纯化。RY-1G 熔点仪(天津天光光学仪器科技有限公司); ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR(内标 TMS)测定用 600 MHz 的 ACF-600 Q 核磁共振仪(德国 Bruker); 质谱测定运用 MS/5975 质谱仪(美国 Agilent)。

1.2 合成路线

合成路线见图 1, 具体结构见表 1。

1.2.1 N-(O,O-二烷氧基磷酸胺基)-反式-4-羟基-L-脯氨酸(4a, 4b)的合成^[5] 磷酸二乙酯(**1a**, 23.0 g, 152 mmol)或磷酸二异丙基酯(**1b**, 29.8 g,

基金项目: 国家自然科学基金项目(81260470); 南昌大学研究生创新基金资助项目(CX2018233)

作者简介: 杜芬, 女, 硕士生 Tel: 13807039622 E-mail: 812229561@qq.com *通信作者: 熊远珍, 女, 博士, 教授, 硕导 Tel: 18970005802 E-mail: xyz16262@163.com

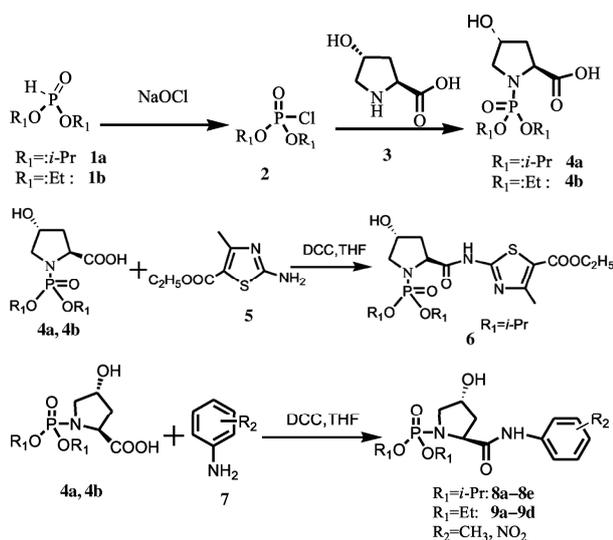


图1 目标化合物的合成

Fig. 1 Synthesis of target compounds

152 mmol)和反式-4-羟基-L-脯氨酸(**3**, 20.0 g, 152 mmol)一并加入水(50 mL)中,冰浴下,用30%氢氧化钠溶液(1.5 mL)调节pH至9,搅拌下滴入次氯酸钠(20%, 70 mL),滴毕继续反应30 min后,过量的次氯酸钠用亚硫酸氢钠(3 g, 28 mmol)淬灭,将反应混合物的pH调至2,加入20 g氯化钠后用乙酸乙酯萃取(100 mL, 2次),合并有机相,无水MgSO₄干燥,减压浓缩,残留物用石油醚/乙酸乙酯重结晶得无色晶体**4a**或**4b**(产率54%)。TLC监测,展开剂为氯仿-甲醇(4:1),用碘熏染色,目标点R_f=0.7。

Mp: 94~95 °C; [α]_D=-45; ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃): 7.16(s, 1H, -COOH), 4.79~4.60(m, 2H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂), 4.46(t, J=6.7 Hz, 1H, -C(CO)H-), 4.39(m, 1H, -CH(OH)-), 3.37~3.23(m, 2H, -CH₂-), 2.35~2.15(m, 2H, -CH₂-), 1.32(m, 12H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂)仲醇的活泼氢在CDCl₃中被屏蔽。

1.2.2 4-甲基-2-氨基-5-噻唑甲酸乙酯(**5**)的合成 将乙酰乙酸乙酯(4.0 g, 0.03 mol)、1,4-二氧六环(35 mL)和35 mL水置于三颈烧瓶,在冰浴下搅拌15 min后,加入溴代乙酰亚胺(5.5 g, 0.03 mol),继续反应0.5 h,待升至室温搅拌2.5 h后加入硫脲(2.6 g, 0.03 mol),回流1 h,反应结束后,在冰浴下加入氨水使pH为8~9,抽滤,干燥,乙酸乙酯重结晶,得白色絮状物4-甲基-2-氨基-5-噻唑甲酸乙酯。

Mp: 173~175 °C。 ¹H-NMR(600 MHz,

CD₃CD₂OD): 4.26(q, 2H, CH₃CH₂-), 2.52(s, 3H, CH₃-), 1.32(t, 3H, CH₃CH₂-); MS(*m/z*): 462(M⁺)^[6]。

1.2.3 2-[1-(二异丙氧基磷酰基)-4-羟基吡咯-2-酰胺基]-4-甲基噻唑-5-乙酸乙酯(**6**)的合成 将**4a**(4.0 g, 13 mmol)和4-甲基-2-氨基-5-噻唑甲酸乙酯(**5**, 2.2 g, 12 mmol)溶于无水四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)中,搅拌下滴加二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)的THF溶液,反应2 h后,旋去THF,用乙酸乙酯溶解,抽滤,滤液分别用2 mol·L⁻¹ H₂SO₄、5% NaHCO₃、以及饱和氯化钠溶液洗涤,无水MgSO₄干燥,过滤,减压蒸除大部分乙酸乙酯,得白色块状固体,乙酸乙酯重结晶,得白色固体。

Mp: 112~114 °C。 ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃): 8.20(s, H, -CONH), 1.76(s, 3H, -CH₃), 4.18(q, J=7.3 Hz, 2H, -CH₂CH₃), 1.13(t, J=7.6 Hz, 3H, -CH₂CH₃), 4.68(m, 1H, -CH(OH)-), 4.68(m, 1H, -C(CO)H-), 4.56(m, 2H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂), 3.40~3.71(m, 2H, -CH₂-), 1.91~2.22(m, 2H, -CH₂-), 1.25~1.40(m, 12H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂); MS(*m/z*): 186(M⁺)。

1.2.4 4-羟基-2-芳胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二异丙酯(**8a~8e**)的合成 将**4a**(4.0 g, 13 mmol)和芳氨(**7**, 1.3 g, 12 mmol)溶于THF中,搅拌下滴加DCC的THF溶液,继续反应大约2 h后抽滤,旋去THF,乙酸乙酯溶解,抽滤,先后分别用2 mol·L⁻¹ H₂SO₄、5% NaHCO₃以及氯化钠饱和溶液洗涤,无水MgSO₄干燥,过滤,减压蒸除大部分乙酸乙酯,得白色块状固体,乙酸乙酯重结晶分别得白色固体粉末**8a~8e**。

1.2.4.1 4-羟基-2-苯胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二异丙酯(**8a**) Mp: 108~110 °C。 ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃): 9.41(s, 1H, -CONH), 7.57(s, 1H, ArH), 7.56(s, 1H, ArH), 7.41(m, 1H, ArH), 7.31(m, 1H, ArH), 7.09(m, 1H, ArH), 4.13(m, 1H, -CH(OH)-), 4.13(m, 1H, -C(CO)H-), 4.42~4.52(m, 4H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂), 3.22~3.66(m, 2H, -CH₂-), 2.22~2.42(m, 2H, CH₂-), 1.28~1.38(m, 6H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂)。 ¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃): 170.32, 138.16, 128.85, 123.96, 119.43, 72.52, 72.15, 71.59, 60.21, 55.21, 37.70, 23.84, 23.77, 23.56, 23.53; MS(*m/z*): 340(M⁺)。

1.2.4.2 4-羟基-2-间甲基苯胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二异丙酯 (**8b**) Mp: 84~86 °C。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 9.48(s, 1H, -CONH), 7.41(s, 1H, ArH), 7.36(m, 1H, ArH), 7.18(m, 1H, ArH), 6.90(m, 1H, ArH), 4.66(m, 1H, -CH(OH)-), 4.65(m, 1H, -C(CO)H-), 4.45(dd, 2H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂), 3.21~3.38(m, 2H, -CH₂-), 2.32(s, 3H, -CH₃), 2.18~2.64(m, 2H, -CH₂-), 1.26~1.38(m, 12H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂)。 ¹³C-HMR(150 MHz, CDCl₃): 170.23, 138.72, 138.08, 124.75, 120.02, 116.49, 72.48, 72.15, 71.62, 60.16, 55.21, 37.65, 23.81, 23.77, 23.56, 23.54, 21.39; MS(*m/z*): 383(M⁺)。

1.2.4.3 4-羟基-2-邻甲基苯胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二异丙酯 (**8c**) Mp: 120~122 °C。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 9.48(s, 1H, -CONH), 7.41(s, 1H, ArH), 7.36(m, 1H, ArH), 7.18(m, 1H, ArH), 6.92(m, 1H, ArH), 4.66(m, 1H, -CH(OH)-), 4.65(m, 1H, -C(CO)H-), 4.45(dd, 2H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂), 3.21~3.38(m, 2H, -CH₂-), 2.322(s, 3H, -CH₃), 2.18~2.64(m, 2H, -CH₂-), 1.26~1.38(m, 12H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂)。 ¹³C-HMR (150 MHz, CDCl₃): 170.18, 135.55, 133.49, 129.32, 119.41, 72.40, 72.07, 60.19, 55.17, 37.77, 23.79, 23.76, 23.56, 23.53, 20.77。 MS(*m/z*): 383(M⁺)。

1.2.4.4 4-羟基-2-对甲基苯胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二异丙酯 (**8d**) Mp: 125~127 °C。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 9.33(s, 1H, -CONH), 7.41(s, 1H, ArH), 7.44(s, 1H, ArH), 7.11(s, 1H, ArH), 7.10(s, 1H, Ar), 4.64(m, 1H, -CH(OH)-), 4.66(m, 1H, -C(CO)H-), 4.41(dd, 2H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂), 3.25~3.38(m, 2H, -CH₂-), 2.298(s, 3H, -CH₃), 2.20~2.55(m, 2H, -CH₂-), 1.25~1.38(m, 12H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂)。 ¹³C-HMR(150 MHz, CDCl₃): 170.18, 135.55, 133.49, 129.32, 122.26, 119.41, 72.40, 72.07, 60.19, 55.17, 37.77, 23.79, 23.76, 23.56, 23.53, 20.77; MS(*m/z*): 383(M⁺)。

1.2.4.5 4-羟基-2-邻硝基苯胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二异丙酯 (**8e**) Mp: 113~115 °C。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 11.18(s, 1H, -CONH), 8.75(m, 1H, ArH), 8.20(m, 1H, ArH), 7.65(m, 1H, ArH), 7.15(m, 1H, ArH), 4.68(m, 1H, -CH(OH)-), 4.79(m, 1H, -C(CO)H-), 4.45(m, 2H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂), 3.41~3.57(m, 2H, -CH₂-),

2.2~2.52(m, 2H, -CH₂-), 1.31~1.38(m, 12H, -P(O)[OCH(CH₃)₂]₂)。 ¹³C-HMR(150 MHz, CDCl₃): 177.40, 130.46, 128.89, 126.00, 124.77, 122.26, 72.61, 72.131, 71.99, 60.30, 55.45, 38.35, 23.84, 23.62; MS(*m/z*): 414(M⁺)。

1.2.5 化合物 **9a~9d** 的合成 将 **4b**(4.0 g, 13 mmol) 和苯胺或取代苯胺(**7**, 1.1 g, 12 mmol)溶于 THF 中, 搅拌下滴加 DCC 的 THF 溶液, 反应大约 2 h 后旋去 THF, 抽滤, 乙酸乙酯溶解后分别用 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄、5% NaHCO₃、氯化钠饱和溶液洗涤, 无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 乙酸乙酯重结晶, 得白色固体粉末 **9a~9d**。

1.2.5.1 4-羟基-2-苯胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二乙酯的合成 (**9a**) Mp: 98~100 °C。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 9.41(s, 1H, -CONH), 7.57(s, 1H, ArH), 7.56(s, 1H, ArH), 7.31(m, 1H, ArH), 7.32(m, 1H, ArH), 7.09(m, 1H, ArH), 4.13(m, 1H, -CH(OH)-), 4.14(m, 1H, -C(CO)H-), 4.42~4.52(m, 4H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂), 3.22~3.66(m, 2H, -CH₂-), 2.22~2.42(m, 2H, CH₂-), 1.28~1.38(m, 6H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂)。 ¹³C-HMR(150 MHz, CDCl₃): 170.35, 138.08, 128.89, 124.07, 119.50, 71.48, 63.48, 63.20, 55.28, 37.98, 16.12, 16.08; MS(*m/z*): 340(M⁺)。

1.2.5.2 4-羟基-2-间甲基苯胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二乙酯 (**9b**) Mp: 204~206 °C; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 9.34(s, 1H, -CONH), 7.41(s, 1H, ArH), 7.37(m, 1H, ArH), 7.19(m, 1H, ArH), 6.91(m, 1H, ArH), 4.463(m, 1H, -CH(OH)-), 4.46(m, 1H, -C(CO)H-), 4.47~4.49(m, 4H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂), 3.23~3.41(m, 2H, -CH₂-), 2.32(s, 3H, -CH₃), 2.19~2.65(m, 2H, -CH₂-), 1.29~1.36(m, 6H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂)。 ¹³C-HMR (150 Hz, CDCl₃): 170.01, 135.54, 128.89, 133.67, 130.37, 129.41, 71.71, 63.53, 63.24, 60.35, 55.27, 37.90, 20.83, 16.19, 16.09; MS(*m/z*): 355(M⁺)。

1.2.5.3 4-羟基-2-邻甲基苯胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二乙酯(**9c**) Mp: 194~196 °C, ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃): 8.81(s, 1H, -CONH), 7.86(s, 1H, ArH), 7.19(m, 1H, ArH), 7.17(m, 1H, ArH), 7.05(m, 1H, ArH), 4.14(m, 1H, -CH(OH)-), 4.13(m, 1H, -C(CO)H-), 4.46~4.51(m, 4H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂), 3.27~3.45(m, 2H, -CH₂-), 2.32~2.53(m, 2H,

-CH₂-), 2.31(s, 3H, -CH₃), 1.29~1.35(m, 6H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂); ¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃): 170.40, 136.00, 130.46, 128.89, 126.00, 124.77, 122.26, 72.61, 72.13, 71.99, 60.30, 55.45, 38.35, 23.84, 23.62, 17.84; MS(*m/z*): 355(M⁺).

1.2.5.4 4-羟基-2-对甲基苯胺甲酰基吡咯-1-基-磷酸二乙酯(**9d**) Mp: 122~124 °C. ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃): 9.33(s, 1H, -CONH), 7.47(s, 1H, ArH), 7.45(s, 1H, ArH), 7.13(s, 1H, ArH), 7.12(s, 1H, ArH), 4.5(m, 1H, -CH(OH)-), 4.47(m, 1H, -C(CO)H-), 4.5~4.62(m, 4H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂), 3.38~3.42(m, 2H, -CH₂-), 2.31(s, 3H, -CH₃), 2.23~2.28(m, 2H, -CH₂-), 1.32~1.35(m, 6H, -P(O)[OCH₂CH₃]₂); ¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃): 170.01, 135.54, 128.89, 133.67, 130.37, 129.41, 71.71, 63.53, 63.24, 60.35, 55.27, 37.90, 20.83, 16.19, 16.09; MS(*m/z*): 355(M⁺).

1.3 生物活性

RMPI-1640 加 3 mL 10% FBS 置入预先培养好的 K562 细胞中, 于 37 °C 的 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 将细胞悬液移入离心管离心去除上清液后, 加入新 RMPI-1640(含 10% FBS) 传代培养, 取处于指数生长期生长状态良好的细胞 1 瓶, 制成每毫升含 1.5×10⁴ 细胞的悬液, 接种于 96 孔板中, 置于 5% CO₂ 培养箱中, 于 37 °C 培养 24 h 备用。

在 96 孔板中的实验组加入不同浓度化合物溶液, 每个化合物设 4 个浓度, 分别为 1×10⁻⁵, 0.5×10⁻⁵, 0.25×10⁻⁵, 0.125×10⁻⁵ mol·L⁻¹, 每组设 3 个复孔, 同时配备阴性对照药, 置于 5% CO₂ 培养箱中, 于 37 °C 培养 72 h, 分别加入 1% MTT 液 20 μL, 用微量振荡器混匀后, 继续孵育 4 h 后用酶标仪于 490 nm 处测定光密度(OD)。计算化合物对肿瘤细胞生长的抑制率, 并通过作图法求得化合物的 IC₅₀。

2 结果和讨论

2.1 合成

2.1.1 磷酸二异丙酯取代的 *L*-羟脯氨酸的合成 用次氯酸钠与磷酸二异丙酯反应, 氯原子取代磷酸酯上的氢, 这里采用的是一锅法合成, 产率为 50%~54%。

2.1.2 酰胺键的合成 将磷酸二异丙酯取代的 *L*-羟脯氨酸与一些用氨基芳环、氨基芳杂环通过酰胺键连起来, 用 DCC 做脱水剂, 常温下反应即得

终产物。

2.2 生物活性

10 个新化合物对 K562 细胞均具抑制作用, 虽然活性均未能超过达沙替尼, 目标物 **8d** 活性比伊马替尼活性高; 化合物 **6** 抗 K562 细胞活性弱, 说明用五元噻唑环取代芳香苯环未必见效, 说明异丙基磷酸酯优于乙基磷酸酯, 结果见表 1。细胞平行试验发现羟基脯氨酸和苯胺没有活性, 说明磷酰胺片段具有重要作用。综上, 本实验发现了一类新的具有一定抗肿瘤活性的磷酰胺类先导化合物。

表 1 新化合物抗 K562 的 IC₅₀

Tab. 1 IC₅₀ of novel compounds against K562 cell

编号	R ₁	R ₂	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
8a	<i>i</i> -Pr	H	0.383±0.021
8b	<i>i</i> -Pr	<i>m</i> -CH ₃	0.340±0.007
8c	<i>i</i> -Pr	<i>o</i> -CH ₃	0.193±0.021
8d	<i>i</i> -Pr	<i>p</i> -CH ₃	0.076±0.020
8e	<i>i</i> -Pr	NO ₂	0.990±0.068
9a	Et	H	0.493±0.022
9b	Et	<i>m</i> -CH ₃	1.050±0.056
9c	Et	<i>o</i> -CH ₃	1.080±0.041
9d	Et	<i>p</i> -CH ₃	1.130±0.033
6			0.998±0.024
达沙替尼			0.050±0.006
伊马替尼			0.079±0.006

REFERENCES

- [1] GONG L B. Protein tyrosine kinase inhibitors: progress and evaluation [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China(中国医院用药评价与分析), 2006, 6(6): 329-332.
- [2] CAI Z Q, HUANG C J, YUAN J, et al. Action mechanisms and structure-activity relationships of commercial tyrosine kinase inhibitors: research advances [J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2011, 38(3): 177-181, 211.
- [3] SHI H P, ZHENG Z H, JIN J, et al. Improved synthesis of the key intermediate of biapenem [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2005, 15(1): 45-47.
- [4] DAS J, CHEN P, NORRIS D, et al. 2-Aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies toward the discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent pan-Src kinase inhibitor [J]. J Med Chem, 2006, 49(23): 6819-6832.
- [5] HAN S, XIONG Y Z, HUANG R, et al. A convenient synthesis of carbapenem antibiotic ertapenem sodium [J]. Asian J Chem, 2014, 26(12): 3464-3466.
- [6] HUANG R. The design and synthesis of amino-aiyl compounds and their preliminary study related to anti-tumor activity [D]. Nanchang: Nanchang University, 2013.

收稿日期: 2018-09-18

(本文责编: 曹粤锋)