



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20200165

新型白三烯 A4 水解酶抑制剂的合成及体外活性评价

郝甜甜¹, 杨尧¹, 付颖¹, 吕洪彬¹, 苗爱¹, 郭娜^{1,2}, 郁彭¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;

2. 中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 白三烯 A4 水解酶(LTA₄H)是抑制炎症和肿瘤的一个潜在靶点. 本研究基于 LTA₄H 晶体结构和前期研究基础,以吲哚为母核,在其 1,5 位分别进行取代,设计合成了两个系列共计 30 个吲哚衍生物,通过高分辨质谱、核磁氢谱和碳谱确认了结构,上述化合物均为新化合物. 通过体外测试评价了其对于 LTA₄H 的抑制活性,结果表明上述衍生物对 LTA₄H 均表现出一定的抑制活性,其中部分化合物的抑制活性优于阳性药 Bestatin. 选取活性较好又有合适连接基团的两个化合物与紫杉醇通过丁二酰连接桥共价偶联为“孪前药”,并对偶联物体外活性进行评价,结果发现与紫杉醇连接的两个偶联物在体外仍保留了一定的 LTA₄H 抑制活性和肿瘤细胞抑制活性,其中对人结肠癌细胞 HCT116 的抑制效果尤为明显,这可能与结肠癌与炎症因子的密切联系有关. 本研究设计合成的新型吲哚类衍生物在 LTA₄H 相关的疾病方面有潜在应用,其与紫杉醇的偶联物在与炎症高度相关的肿瘤治疗方面具有重要的研究价值.

关键词: 白三烯 A4 水解酶; 吲哚衍生物; 炎症; 抗肿瘤

中图分类号: R914.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2021)01-0009-10

Synthesis and Biological Evaluation in Vitro of Novel Leukotriene A4 Hydrolase Inhibitors

HAO Tiantian¹, YANG Yao¹, FU Ying¹, LÜ Hongbin¹, MIAO Ai¹, GUO Na^{1,2}, YU Peng¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Leukotriene A4 hydrolase(LTA₄H)is a potential target for inhibiting inflammation and tumor. Based on crystal structure of LTA₄H and previous research, indole was chosen as the skeleton in this study and 30 indole derivatives were designed and synthesized by substituting 1,5 positions respectively. Their novel structures were confirmed by high-resolution mass spectrometry, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopy. The inhibitory activity of the derivatives against LTA₄H was evaluated in vitro. Most of the above derivatives showed significant inhibitory activity against LTA₄H in vitro, some of them even better than that of positive drug Bestatin. Two derivatives with good activity and proper functional group as coupling group were selected to covalently couple with paclitaxel via succinyl bridge, which are called twin drugs or "mutual prodrugs". The in vitro activity of the conjugates was evaluated. The results showed that the conjugates retained certain LTA₄H inhibitory activity and tumor cell proliferation inhibitory activity in vitro, especially for HCT116, which may be related to the close relationship between colorectal cancer and inflammatory factors. The new indole derivatives designed and synthesized in this study have potential applications in LTA₄H related diseases, and the conjugates with paclitaxel have important research value in tumor therapy highly related to inflammation.

Key words: LTA₄H; indole derivatives; inflammation; antitumor

早在 19 世纪中叶,德国病理学家 Rudolf Virchow 就已经证明恶性肿瘤组织中有白细胞浸润,认

为肿瘤可能源自慢性炎症^[1]. 肿瘤微环境中存在大量炎症细胞和炎症因子,对肿瘤细胞的增生、生存、转

收稿日期: 2020-10-16; 修回日期: 2020-12-07

基金项目: 天然药物活性物质与功能国家重点实验室开放基金(GTZK201910)

作者简介: 郝甜甜(1992—),男,安徽人,博士研究生;通信作者: 郭娜,副研究员, guona@tust.edu.cn

移发挥重要作用,是肿瘤形成、发展和转移过程中的重要促进因素^[2].能够证明炎症与癌症间存在确定关系的证据之一是抗炎药物能降低各种癌症的发生风险、减慢肿瘤发展进度、降低患者死亡率.例如流行病学研究表明,使用非甾体抗炎药可将结肠癌风险降低 40% ~ 50%^[3].

白三烯 A4 水解酶(LTA₄H)是炎症通路中的一个关键酶,其在多种人类恶性肿瘤中高表达,包括结直肠癌、食管癌、肺癌和甲状腺癌等^[4].因此,LTA₄H 是抑制炎症和肿瘤的一个潜在靶点.人类白细胞的 LTA₄H 在 1984 年首次被纯化,并被鉴定为相对分子质量为 $6.8 \times 10^4 \sim 7.0 \times 10^4$ 的胞质单体环氧水解酶(EH),具有 EH 活性和依赖锌离子的氨肽酶(AP)活性.两种活性位点和底物结合口袋大部分重叠,因此很难设计高选择性的抑制剂.尽管 LTA₄H 的上述两种活性有各自的生理作用,但两种活性都促进肿瘤发生发展,即抑制两种活性均有益于抗肿瘤^[4].从 21 世纪初期开始,对 LTA₄H 抑制剂的大部分研究主要涉及天然底物白三烯 A4(LTA₄)的类似物,深入研究发现其水解酶与氨肽酶的双重活性均依赖锌离子,由此开发了锌离子螯合剂作为抑制剂.随着对 LTA₄H 晶体结构^[5-7]的解析,人们开始基于计算机模拟来设计新型的 LTA₄H 抑制剂,其中 DG-051 是曾进行至二期临床研究的一个抑制剂^[8-9],其水解酶活性的 IC₅₀ 达到 70 nmol/L^[10-11],其与 LTA₄H 结合的共晶 X 射线图清晰展示了二者的作用模式^[11].

新型 LTA₄H 抑制剂在抗炎和炎症相关的肿瘤治疗领域具有重要研究价值,而抗炎药物和传统抗癌药物的组合更有望在癌症治疗中发挥作用.本研究拟以吲哚为母核,在前期构效关系和 DG-051 相关研究基础上,设计合成一系列新型 LTA₄H 抑制剂.挑选 LTA₄H 抑制活性较好的化合物与抗癌药物紫杉醇共价偶联,所制备的偶联物可以看作“李药”和“前药”

的结合体. LTA₄H 的抑制剂既可以通过抑制炎症改善肿瘤治疗效果,还有望通过与肿瘤部位高表达的 LTA₄H 相结合起到靶向肿瘤部位的作用,使紫杉醇在肿瘤部位富集,起到增效减毒的效果.

1 材料与方法

1.1 材料

癌细胞来自国家实验细胞资源共享服务平台(北京).生物试剂,赛默飞世尔科技公司;白三烯 B4(LTB₄)检测试剂盒,Cayman 公司;化学试剂均为分析纯,安耐吉化学试剂有限公司;溶剂均为分析纯,天津市江天化工技术有限公司;infinite F50 型基础酶标仪,帝肯(上海)贸易有限公司;AV400 型核磁共振波谱仪,布鲁克光谱仪器公司.

1.2 方法

1.2.1 吲哚衍生物的合成

共设计合成两类吲哚衍生物,两类衍生物的合成方法相似,仅 1 位和 5 位取代基修饰类型、反应顺序及反应条件略有差异.

第一类吲哚衍生物是以 5-羟基吲哚为原料,先用 Boc 基团保护 1 位,在碱性条件下 1 位酚羟基与芳香取代基生成醚键,再将 1 位脱除保护基,通过亲核取代反应分别连接各种极性基团,生成化合物 2-10 至 2-17,其中 2-10 和 2-11 通过硼氢化钠还原可得化合物 2-18 和 2-19.

第二类吲哚衍生物是在将 1 位用 Boc 保护后,先通过亲核取代在 5 位连接氯乙酰基基团,再用各种极性取代基分别取代氯原子,生成 5 位取代的吲哚,再脱除 1 位保护基,最后在 1 位连接各类疏水性芳香取代基,得到化合物 2-29 至 2-46.

所有化合物经 NMR、HRMS 确认结构,并用 HPLC 分析纯度,其合成路线图及反应条件如图 1 和图 2 所示.

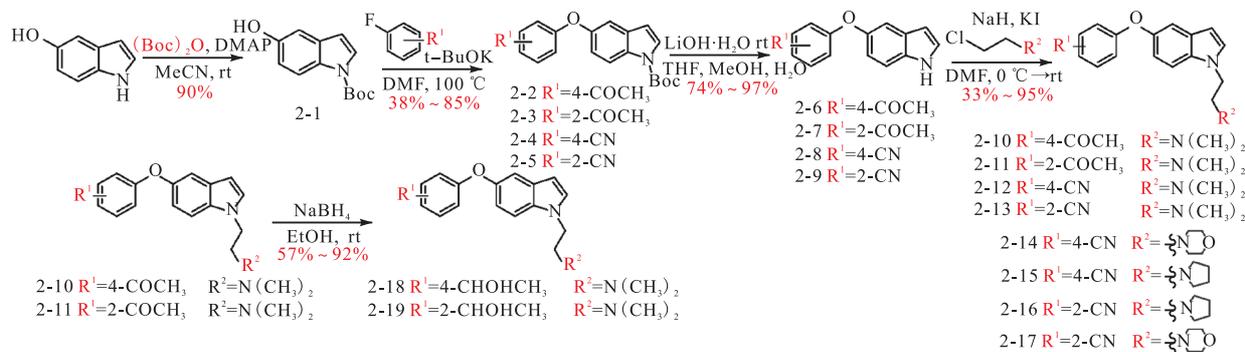


图 1 第一类吲哚衍生物的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of the first type of indole derivatives

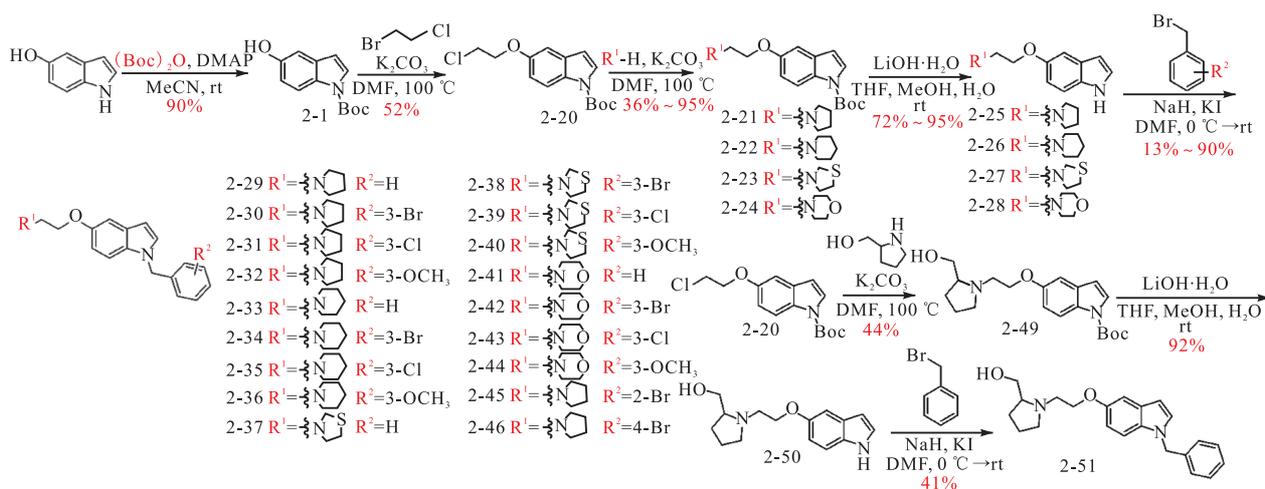


图2 第二类吲哚衍生物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of the second type of indole derivatives

1.2.2 吲哚衍生物与紫杉醇偶联物的合成

从上述两个系列的吲哚衍生物中分别选择了两个 LTA_4H 抑制活性较好的化合物 (2-18 和 2-51) 用于与紫杉醇进行偶联, 第一类衍生物中的 2-18 可以通过分子中的羟基与紫杉醇进行偶联, 而选择 2-51 是

由于其结构最类似的化合物 2-29 具有很好的活性, 但分子中缺少可反应的基团, 因此在 2-20 结构中引入羟甲基获得了化合物 2-51 (图 2). 通过图 3 和图 4 的合成路线, 2-18 和 2-51 分别与紫杉醇偶联制备了 2-48 和 2-53.

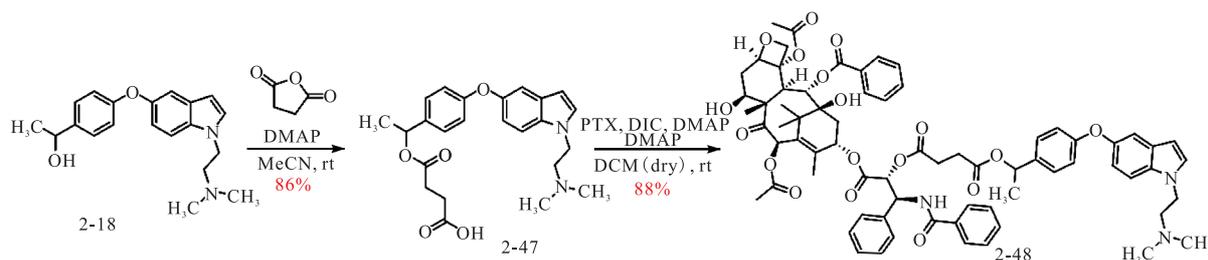


图3 偶联化合物 2-48 的合成路线

Fig. 3 Synthetic route of the conjugate 2-48

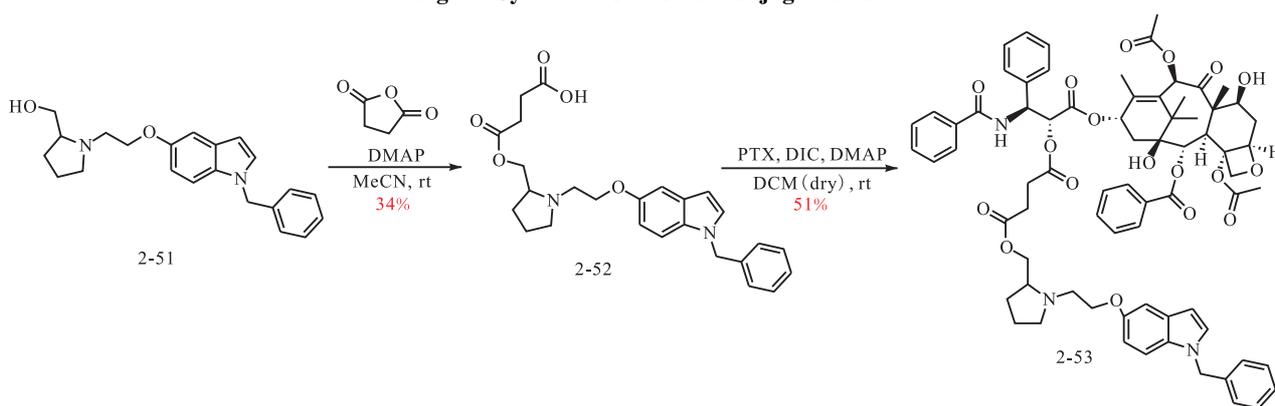


图4 偶联化合物 2-53 的合成路线

Fig. 4 Synthetic route of the conjugate 2-53

1.2.3 LTA_4H 水解酶抑制活性实验

在化合物抑制 LTA_4H 水解酶活性实验中以 DMSO 作为阴性对照, Bestatin 为阳性对照, 化合物浓度设置为 $1\ \mu\text{mol/L}$ 和 $10\ \mu\text{mol/L}$. 使用 LTB_4

ELISA kit, 检测 LTA_4H 作用于 LTA_4 时 LTB_4 的生成量. 当加入 LTA_4H 抑制剂后, 抑制剂抑制酶活性, 故可用 LTB_4 生成减少的量评价抑制剂的抑制效果. 以化合物组 LTB_4 的生成量相对于 DMSO 组 LTB_4 生成

量的百分比衡量化合物组对 LTA₄H 水解酶活的抑制效果,并计算出相应的抑制率。

1.2.4 LTA₄H 氨肽酶抑制活性实验

在 LTA₄H 的氨肽酶活性检测时以 DMSO 作为阴性对照, Bestatin 为阳性对照, 化合物浓度设置为 1 μmol/L 和 10 μmol/L。使用 L-丙氨酸-对硝基苯胺为底物, LTA₄H 能使底物的 C—N 键断裂, 生成丙氨酸和对硝基苯胺, 在 405 nm 下测定对硝基苯胺的吸光度。在一定范围内, 对硝基苯胺的生成量与酶浓度呈正比。当加入 LTA₄H 抑制剂后, 抑制剂抑制酶活性, LTA₄H 降解底物的能力下降, 用对硝基苯胺减少量评价抑制剂的抑制活力。

1.2.5 肿瘤细胞增殖抑制活性实验

采用 MTT 法检测合成的 2 个偶联化合物以及其分别的前体化合物、PTX 对 HCT116(结肠癌细胞)和 H460(肺癌细胞)两种肿瘤细胞的增殖抑制活性。以正常细胞为对照, 检测在不同浓度化合物处理下肿瘤细胞的存活率, 计算化合物抑制肿瘤细胞生长的 IC₅₀ 值。

2 结果与讨论

2.1 两类吡啶衍生物的特征

上述两条合成路线制备的吡啶衍生物, 经 HPLC 检测纯度均达到 95% 以上, 其结构经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 鉴定, 均与预期结构一致, 其中终产物的结构表征数据如下:

化合物 2-10 为无色油状物, 收率 69%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.18 (s, 6H), 2.50 (s, 3H), 2.61 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.26 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 6.41 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.93 ~ 6.97 (m, 2H), 7.28 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.90 ~ 7.93 (m, 2H)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 196.8, 163.6, 148.0, 133.8, 131.3, 131.1, 131.0, 129.2, 116.5, 115.0, 112.0, 111.6, 101.1, 59.2, 45.8, 44.3, 28.0。HRMS (ESI-TOF) *m/z*. C₂₀H₂₃N₂O₂⁺[M+H]⁺理论值 323.175 4, 实测值 323.173 8。

化合物 2-11 为无色油状物, 收率 95%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.19 (s, 6H), 2.60 ~ 2.63 (m, 5H), 4.26 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 6.39 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.12 ~ 7.16 (m, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.43 ~ 7.48 (m, 2H), 7.54 (d, *J* =

8.8 Hz, 1H), 7.70 (dd, *J* = 1.6 Hz, *J* = 6 Hz, 1H)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 199.0, 158.2, 149.2, 134.2, 133.5, 130.9, 130.2, 129.8, 129.2, 122.8, 118.2, 114.5, 111.5, 110.9, 101.0, 59.2, 45.8, 44.3, 31.8。HRMS (ESI-TOF) *m/z*. C₂₀H₂₃N₂O₂⁺[M+H]⁺理论值 323.175 4, 实测值 323.175 1。

化合物 2-12 为无色油状物, 收率 70%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.19 (s, 6H), 2.62 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 6.42 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.99 ~ 7.03 (m, 2H), 7.31 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 7.75 ~ 7.79 (m, 2H)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.9, 147.0, 134.4, 133.5, 130.6, 128.7, 118.9, 117.0, 114.5, 111.7, 111.2, 103.9, 100.7, 58.7, 45.3, 43.8。HRMS (ESI-TOF) *m/z*. C₁₉H₂₀N₃O⁺[M+H]⁺理论值 306.160 1, 实测值 306.159 7。

化合物 2-13 为无色油状物, 收率 33%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.19 (s, 6H), 2.62 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 6.43 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.96 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.16 ~ 7.20 (m, 1H), 7.33 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.54 ~ 7.58 (m, 2H), 7.83 ~ 7.86 (m, 1H)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.8, 147.3, 135.0, 133.9, 133.4, 130.6, 128.6, 122.4, 116.3, 115.9, 114.2, 111.2, 111.2, 101.5, 100.7, 58.7, 45.3, 43.8。HRMS (ESI-TOF) *m/z*. C₁₉H₂₀N₃O⁺[M+H]⁺理论值 306.160 1, 实测值 306.160 2。

化合物 2-14 为无色油状物, 收率 34%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.44 (s, 4H), 2.67 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.55 (t, *J* = 4.4 Hz, 4H), 4.31 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 6.43 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.3, 147.5, 134.9, 133.9, 131.1, 129.2, 119.4, 117.5, 115.0, 112.2, 111.8, 104.4, 101.2, 66.7, 58.3, 53.8, 43.5。HRMS (ESI-TOF) *m/z*. C₂₁H₂₂N₃O₂⁺[M+H]⁺理论值 348.170 7, 实测值 348.169 0。

化合物 2-15 为无色油状物, 收率 75%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.64 ~ 1.68 (m, 4H), 2.48 ~ 2.50 (m, 4H), 2.80 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.30 (t, *J* =

6.8 Hz, 2H), 6.43(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.92(dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.99 ~ 7.02(m, 2H), 7.31(d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.48(d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.56(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.75 ~ 7.79(m, 2H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 163.3, 147.5, 134.9, 133.9, 131.1, 129.2, 119.4, 117.5, 115.0, 112.2, 111.7, 104.4, 101.2, 55.8, 54.1, 45.5, 23.6. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 332.1757, 实测值 332.1740.

化合物 2-16 为无色油状物, 收率 46%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.65 ~ 1.67(m, 4H), 2.49 ~ 2.50(m, 4H), 2.80(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.30(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 6.43(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.77(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.96(dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.16 ~ 7.20(m, 1H), 7.33(d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.49(d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.54 ~ 7.58(m, 2H), 7.85(dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 161.3, 147.8, 135.6, 134.4, 133.9, 131.1, 129.2, 123.0, 116.8, 116.4, 114.7, 111.8, 111.7, 102.0, 101.2, 55.8, 54.1, 45.5, 23.6. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 332.1757, 实测值 332.1749.

化合物 2-17 为无色油状物, 收率 50%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.43(s, 4H), 2.67(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.54 ~ 3.56(m, 4H), 4.31(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 6.44(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.77(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.97(dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.19(t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.33(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.49(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.55 ~ 7.60(m, 2H), 7.85(dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 161.6, 147.9, 134.1, 133.7, 133.7, 129.7, 129.1, 121.8, 116.5, 115.8, 115.2, 112.3, 110.4, 102.5, 101.5, 67.0, 58.2, 53.9, 53.5, 44.3. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 348.1707, 实测值 348.1700.

化合物 2-18 为无色油状物, 收率 92%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.30(d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 2.19(s, 6H), 2.60(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.24(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.68(m, 1H), 5.08(d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 6.37(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.86(dd, $J = 8.8$ Hz, 3H), 7.16(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.28(d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.41(d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.48(d, $J = 8.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 157.9, 149.8, 141.6, 133.2, 130.6, 129.1, 127.2, 117.2, 114.7, 111.3,

110.8, 100.8, 68.1, 59.2, 45.8, 44.3, 26.4. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 325.1911, 实测值 325.1910.

化合物 2-19 为无色油状物, 收率 57%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.36(d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 2.19(s, 6H), 2.61(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.24(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 5.12(m, 1H), 6.35(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.66(dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.84(dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.05 ~ 7.08(m, 2H), 7.11 ~ 7.15(m, 1H), 7.39(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.47(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.58(dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 154.2, 149.9, 137.5, 132.5, 130.0, 128.6, 127.4, 126.2, 122.5, 116.9, 113.6, 110.7, 109.3, 100.3, 62.6, 58.6, 54.9, 45.2, 43.8, 25.0. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 325.1911, 实测值 325.1898.

化合物 2-29 为无色油状物, 收率 51%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.67 ~ 1.70(m, 4H), 2.55(d, $J = 5.2$ Hz, 4H), 2.82(t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.05(d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 5.36(s, 2H), 6.39(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.74(dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.07(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.16 ~ 7.18(m, 2H), 7.21 ~ 7.31(m, 4H), 7.44(d, $J = 3.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.1, 138.8, 131.5, 130.0, 129.2, 128.9, 127.7, 127.4, 112.2, 111.3, 103.7, 101.1, 67.5, 55.0, 54.5, 49.7, 23.6. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{OH}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 321.1961, 实测值 321.1947.

化合物 2-30 为无色油状物, 收率 29%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.67 ~ 1.70(m, 4H), 2.57(s, 4H), 2.83(t, $J = 6$ Hz, 2H), 4.05(t, $J = 6$ Hz, 2H), 5.38(s, 2H), 6.40(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.75(dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.07(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.15(d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.25(t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.31(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.35(s, 1H), 7.43(d, $J = 8$ Hz, 1H), 7.46(d, $J = 3.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.1, 141.7, 131.4, 131.1, 130.6, 130.0, 130.0, 129.2, 126.4, 122.2, 112.3, 111.2, 103.8, 101.3, 67.4, 54.9, 54.4, 48.9, 23.5. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OBr}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 399.1067, 实测值 399.1073.

化合物 2-31 为无色油状物, 收率 64%. ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 1.87(s, 4H), 2.73(s, 4H), 3.00(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.22(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 5.21(s,

2H), 6.52(s, 1H), 6.91 ~ 6.95(m, 2H), 7.10 ~ 7.14(m, 3H), 7.19 ~ 7.26(m, 3H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.2, 141.5, 133.6, 131.5, 130.9, 130.1, 129.3, 127.7, 127.1, 126.1, 112.3, 111.2, 103.8, 101.4, 67.5, 54.9, 54.5, 49.0, 23.6. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OCl}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 355.1572, 实测值 355.1555.

化合物 2-32 为无色油状物, 收率 71%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.67 ~ 1.70(m, 4H), 2.54(s, 4H), 2.80(t, $J = 6$ Hz, 2H), 3.68(s, 3H), 4.04(t, $J = 6$ Hz, 2H), 5.33(s, 2H), 6.38(d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.70 ~ 6.75(m, 3H), 6.80(dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.07(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.20(t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.30(d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.43(d, $J = 3.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 159.8, 153.1, 140.5, 131.6, 130.08, 130.06, 129.2, 119.5, 113.4, 112.8, 112.2, 111.3, 103.7, 101.1, 67.5, 55.4, 55.0, 54.5, 49.6, 23.6. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 351.2067, 实测值 351.2084.

化合物 2-33 为无色油状物, 收率 90%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.39(d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.49 ~ 1.54(m, 4H), 2.50(d, $J = 1.6$ Hz, 4H), 2.71(s, 2H), 4.05(t, $J = 6$ Hz, 2H), 5.36(s, 2H), 6.38(d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.73(dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.07(d, $J = 2$ Hz, 1H), 7.16(d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.21 ~ 7.24(m, 1H), 7.29(m, 3H), 7.44(d, $J = 2.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.1, 138.9, 131.5, 130.1, 129.2, 128.9, 127.7, 127.4, 112.2, 112.3, 103.8, 101.1, 66.3, 57.9, 54.8, 49.7, 25.8, 24.2. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 357.1937, 实测值 357.1940.

化合物 2-34 为无色油状物, 收率 34%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.38(t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.47 ~ 1.53(m, 4H), 2.46(s, 4H), 2.68(t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 4.04(t, $J = 6$ Hz, 2H), 5.38(s, 2H), 6.39(d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.75(dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.07(d, $J = 2$ Hz, 1H), 7.15(d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.25(t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.31(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.36(s, 1H), 7.43(d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.46(d, $J = 3.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.2, 141.8, 131.4, 131.2, 130.6, 130.04, 130.02, 129.2, 126.4, 122.3, 112.3, 112.2, 103.8, 101.4, 66.4, 58.0, 54.8, 48.9, 25.9, 24.3. HRMS(ESI-TOF) m/z .

$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{OBr}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 413.1223, 实测值 413.1207.

化合物 2-35 为无色油状物, 收率 57%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.34 ~ 1.40(m, 2H), 1.47 ~ 1.52(m, 4H), 2.45(s, 4H), 2.67(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.04(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 5.38(s, 2H), 6.39(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.74(dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.07(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.11(d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.20(s, 1H), 7.28 ~ 7.34(m, 3H), 7.46(d, $J = 3.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.2, 141.5, 133.6, 131.4, 130.9, 130.1, 129.2, 127.7, 127.1, 126.1, 112.4, 112.2, 103.8, 101.4, 66.4, 58.0, 54.9, 49.0, 26.0, 24.4. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{OCl}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 369.1728, 实测值 369.1713.

化合物 2-36 为无色油状物, 收率 13%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.53(s, 2H), 1.74(s, 4H), 2.50(t, $J = 1.6$ Hz, 2H), 3.45(d, $J = 4$ Hz, 4H), 3.68(s, 3H), 4.30(t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 5.35(s, 2H), 6.41(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.71(d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.74(s, 1H), 6.79 ~ 6.83(m, 2H), 7.16(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.20(t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.36(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.49(d, $J = 3.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ 159.7, 151.5, 138.9, 131.9, 129.7, 129.3, 128.9, 118.8, 112.5, 112.5, 111.8, 110.6, 104.1, 101.2, 62.9, 56.1, 55.1, 53.7, 50.1, 29.5, 22.5, 21.4. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 365.2224, 实测值 365.2206.

化合物 2-37 为无色油状物, 收率 36%. ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 2.91(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.02(t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.27(t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.24(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.28(s, 2H), 5.36(s, 2H), 6.57(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.96(dd, $J = 2$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.18 ~ 7.24(m, 5H), 7.33 ~ 7.40(m, 3H). ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ 153.2, 137.6, 131.9, 129.1, 129.0, 128.8, 127.6, 126.78, 112.7, 110.5, 104.0, 101.3, 68.2, 61.3, 58.7, 52.4, 50.3, 29.7. HRMS(ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{OS}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 339.1526, 实测值 339.1511.

化合物 2-38 为无色油状物, 收率 80%. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.68(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.81(t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.07(t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.07(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.11(s, 2H), 5.38(s, 2H), 6.40(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.76(dd, $J = 8.8$ Hz, $J =$

2.0 Hz, 1H), 7.08(d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.15(d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.26(t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.32(d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.35(s, 1H), 7.43(d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.47(d, $J = 2.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.1, 141.7, 131.4, 131.1, 130.6, 130.03, 129.99, 129.2, 126.4, 122.2, 112.3, 112.2, 103.8, 101.3, 68.0, 61.4, 58.6, 51.9, 48.9, 29.3. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{OSBr}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 439.045 0, 实测值 439.042 9.

化合物 2-39 为无色油状物, 收率 65%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.68(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.81(t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.07(t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.07(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.11(s, 2H), 5.39(s, 2H), 6.40(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.76(dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.08(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.11(d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.20(s, 1H), 7.31(t, $J = 2$ Hz, 1H), 7.33(d, $J = 2$ Hz, 1H), 7.47(d, $J = 3.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.2, 141.5, 133.6, 131.5, 130.9, 130.1, 129.2, 127.7, 127.1, 126.1, 112.3, 112.2, 103.8, 101.4, 68.0, 61.4, 58.6, 52.4, 51.9, 49.0, 29.4. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{OSCl}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 373.113 6, 实测值 373.112 4.

化合物 2-40 为无色油状物, 收率 76%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.68(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.81(t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.07(t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.68(s, 3H), 4.06(t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.11(s, 2H), 5.33(s, 2H), 6.38(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.71(d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.74 ~ 6.76(m, 2H), 6.80(dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.07(d, $J = 2$ Hz, 1H), 7.20(t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.31(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.44(d, $J = 2.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 160.0, 153.2, 139.3, 131.9, 129.8, 129.1, 129.0, 119.1, 112.8, 110.5, 104.0, 101.3, 68.2, 61.2, 58.6, 55.2, 52.4, 50.2, 29.6. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 369.163 1, 实测值 369.162 9.

化合物 2-41 为无色油状物, 收率 64%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.47(t, $J = 4.4$ Hz, 4H), 2.68(t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.57(t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 4.05(d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 5.36(s, 2H), 6.38(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.74(dd, $J = 2$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.07(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.16(d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.22 ~ 7.24(m, 1H), 7.27 ~ 7.31(m, 3H), 7.44(d, $J =$

3.2 Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.1, 138.9, 131.5, 131, 129.2, 128.9, 127.7, 127.4, 112.2, 111.3, 103.8, 101.1, 66.7, 66.3, 57.7, 54.1, 49.7. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 337.191 1, 实测值 337.189 5.

化合物 2-42 为无色油状物, 收率 73%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.47(t, $J = 4.0$ Hz, 4H), 2.68(t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.58(t, $J = 4.4$ Hz, 4H), 4.06(d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 5.38(s, 2H), 6.40(d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.75(dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.08(d, $J = 2$ Hz, 1H), 7.15(d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.25(t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.31(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.36(s, 1H), 7.43(d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.46(d, $J = 2.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 153.3, 140.0, 131.6, 130.7, 130.3, 129.6, 129.1, 128.7, 125.2, 122.8, 112.7, 110.3, 103.0, 101.6, 66.9, 66.5, 57.8, 54.1, 49.6. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 415.101 6, 实测值 415.100 5.

化合物 2-43 为无色油状物, 收率 82%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.47(s, 4H), 2.68(t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.57(t, $J = 4.4$ Hz, 4H), 4.06(d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 5.38(s, 2H), 6.40(d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.75(dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.08(d, $J = 2$ Hz, 1H), 7.11(d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.20(s, 1H), 7.29(d, $J = 8$ Hz, 1H), 7.33(d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.46(d, $J = 2.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 153.2, 141.5, 133.6, 131.5, 130.9, 130.1, 129.2, 127.7, 127.1, 126.0, 112.4, 111.2, 103.9, 101.4, 66.7, 66.3, 57.7, 54.1, 49.0. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 371.152 1, 实测值 371.150 5.

化合物 2-44 为无色油状物, 收率 54%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.47(t, $J = 4.4$ Hz, 4H), 2.68(t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.58(t, $J = 4.4$ Hz, 4H), 3.68(s, 3H), 4.05(t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 5.32(s, 2H), 6.38(d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.71(d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.73 ~ 6.75(m, 2H), 6.80(dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.07(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.20(t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.30(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.43(d, $J = 2.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 159.8, 153.1, 140.5, 131.6, 130.1, 130.1, 129.2, 119.5, 113.4, 112.8, 112.2, 111.3, 103.8, 101.1, 66.7, 66.3, 57.7, 55.4, 54.2, 49.6. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3^+$

$[M+H]^+$ 理论值 367.1977, 实测值 367.2012.

化合物 2-45 为无色油状物, 收率 34%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.71 (t, $J = 3.6$ Hz, 4H), 2.62 (s, 4H), 2.88 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.07 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 5.42 (s, 2H), 6.43 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.51 ~ 6.53 (m, 1H), 6.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.20 ~ 7.23 (m, 2H), 7.39 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.65 ~ 7.67 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 153.2, 137.6, 133.1, 131.6, 13.2, 129.8, 129.7, 128.6, 128.5, 122.2, 112.4, 111.1, 103.9, 101.5, 67.3, 54.9, 54.5, 49.9, 23.5. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OBr}^+ [M+H]^+$ 理论值 399.1067, 实测值 399.1061.

化合物 2-46 为无色油状物, 收率 46%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.68 (s, 4H), 2.62 (s, 4H), 2.81 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.04 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 5.34 (s, 2H), 6.39 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.74 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 153.2, 138.3, 131.8, 131.4, 130.0, 129.6, 129.3, 120.8, 112.3, 111.2, 103.8, 101.3, 67.5, 54.9, 54.5, 49.0, 23.6. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OBr}^+ [M+H]^+$ 理论值 399.1067, 实测值 399.1060.

化合物 2-51 为无色油状物, 收率 41%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.50 ~ 1.56 (m, 1H), 1.58 ~ 1.68 (m, 2H), 1.75 ~ 1.84 (m, 1H), 2.30 (dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 16.4$ Hz, 1H), 2.53 ~ 2.55 (m, 1H), 2.65 ~ 2.71 (m, 1H), 3.09 ~ 3.19 (m, 2H), 3.22 ~ 3.27 (m, 1H), 3.39 ~ 3.42 (m, 1H), 4.02 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.37 (s, 1H), 5.36 (s, 2H), 6.38 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.73 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.21 ~ 7.24 (m, 1H), 7.27 ~ 7.31 (m, 3H), 7.43 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 153.1, 138.9, 131.5, 130.0, 129.2, 129.0, 127.7, 127.4, 112.2, 111.3, 103.8, 101.1, 68.0, 65.9, 64.8, 55.2, 54.3, 28.3, 23.4. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2^+ [M+H]^+$ 理论值 351.2028, 实测值 351.2062.

2.2 吡啶衍生物的体外 LTA_4H 抑制活性

对两类吡啶衍生物分别进行了 LTA_4H 氨肽酶抑制活性测试, 结果见表 1 和表 2.

从表 1 可以看出: 在两个浓度下, 化合物 2-10、2-12、2-15、2-18 氨肽酶抑制活性与 Bestatin 相当甚至更优, 分析其结构发现吡啶 1 位的亲水基团为四氢吡咯环或 N, N-二甲胺基时, 吡啶 5 位疏水端的苯环有对位取代基团, 尤其是氰基、羟乙基时氨肽酶抑制活性较好.

表 1 第一类化合物 LTA_4H 氨肽酶抑制活性

Tab. 1 The LTA_4H aminopeptidase inhibitory activity of the first type compound

化合物 编号	抑制率/%	
	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
Bestatin	31.15 \pm 3.97	78.14 \pm 0.24
2-10	30.93 \pm 2.95	63.67 \pm 2.74
2-11	23.96 \pm 0.43	19.42 \pm 1.01
2-12	46.20 \pm 1.33	80.25 \pm 0.82
2-13	18.22 \pm 0.62	21.70 \pm 2.01
2-14	30.45 \pm 1.28	58.85 \pm 3.04
2-15	46.18 \pm 3.66	79.19 \pm 0.84
2-16	30.95 \pm 5.83	32.60 \pm 3.66
2-17	25.23 \pm 6.74	26.62 \pm 3.34
2-18	38.41 \pm 2.73	76.21 \pm 0.93
2-19	25.43 \pm 1.69	32.13 \pm 3.91

表 2 第二类化合物 LTA_4H 氨肽酶抑制活性

Tab. 2 The LTA_4H aminopeptidase inhibitory activity of the second type compound

化合物 编号	抑制率/%	
	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
Bestatin	31.15 \pm 3.97	78.14 \pm 0.24
2-29	42.48 \pm 3.15	78.53 \pm 2.03
2-30	30.49 \pm 3.81	48.73 \pm 2.18
2-31	27.88 \pm 4.28	54.32 \pm 2.91
2-32	39.27 \pm 4.26	37.45 \pm 1.71
2-33	45.84 \pm 3.13	79.84 \pm 0.71
2-34	12.53 \pm 1.39	44.09 \pm 2.50
2-35	21.55 \pm 1.92	25.30 \pm 2.20
2-36	33.42 \pm 1.88	16.45 \pm 2.34
2-37	48.05 \pm 3.80	55.79 \pm 2.79
2-38	33.36 \pm 4.30	44.38 \pm 2.62
2-39	34.77 \pm 0.06	32.85 \pm 1.48
2-40	34.86 \pm 4.04	26.65 \pm 2.15
2-41	47.47 \pm 4.59	47.61 \pm 3.31
2-42	42.13 \pm 2.17	48.36 \pm 1.62
2-43	27.19 \pm 4.74	41.48 \pm 1.79
2-44	43.62 \pm 1.86	37.55 \pm 1.99
2-45	27.74 \pm 1.50	62.47 \pm 4.00
2-46	43.43 \pm 3.54	78.45 \pm 0.14
2-51	28.91 \pm 1.25	64.44 \pm 5.88

从表 2 可以看出: 大部分化合物都具有和 Bestatin 类似的活性, 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 化合物 2-29、2-33、2-37、2-41、2-44、2-46 的抑制率均高于

Bestatin, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 化合物 2-29、2-33、2-46 抑制率高于 Bestatin. 结构分析发现: 当吡啶 5 位的亲水基团为吡咯烷或哌啶环, 吡啶 1 位的苯环上无取代或间位甲氧基取代、对位溴取代时, 化合物对 LTA_4H 氨肽酶抑制活性较好.

对于抗肿瘤作用来说, LTA_4H 的氨肽酶活性和水解酶活性是一致的, 即两种活性的抑制效果越好, 其对抗肿瘤的预期效果也越好. 因此, 选取部分氨肽酶抑制活性较好的化合物进行 LTA_4H 水解酶抑制活性测试, 结果见表 3.

表 3 化合物 LTA_4H 水解酶抑制活性

Tab. 3 The LTA_4H hydrolase inhibitory activity of the compound

化合物 编号	抑制率/%	
	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
Bestatin	83.64 \pm 0.78	91.62 \pm 0.99
2-10	75.31 \pm 0.97	83.62 \pm 0.49
2-18	22.55 \pm 4.67	87.14 \pm 0.31
2-12	67.58 \pm 2.79	84.86 \pm 1.66
2-14	1.83 \pm 1.29	75.66 \pm 1.57
2-15	25.10 \pm 5.95	89.95 \pm 0.61
2-29	48.58 \pm 5.18	77.06 \pm 0.29
2-33	56.20 \pm 2.70	86.88 \pm 0.92

从表 3 可看出: 所选化合物也同样具备 LTA_4H 水解酶抑制活性, 尤其是 10 $\mu\text{mol/L}$ 下活性基本与 Bestatin 相似或稍差, 而化合物 2-10、2-12、2-29、2-33 在低浓度下也有较好的水解酶抑制活性.

2.3 吡啶衍生物与紫杉醇偶联物的表征

在与紫杉醇偶联形成季药时, 选择了 LTA_4H 氨肽酶抑制活性和水解酶抑制活性均较好且结构中有合适官能团进行连接的两个吡啶衍生物(2-18 和 2-51), 通过丁二酰基与紫杉醇侧链羟基相偶联, 制备得到两个偶联物, 分别为 2-48 和 2-53, 结构表征如下:

化合物 2-48 为白色固体, 收率 88%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.00(s, 3H), 1.03(s, 3H), 1.08 ~ 1.14(m, 1H), 1.23 ~ 1.27(m, 3H), 1.50(s, 3H), 1.77(d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.09(s, 3H), 2.21 ~ 2.23(m, 9H), 2.29 ~ 2.33(m, 1H), 2.59 ~ 2.66(m, 6H), 3.58 ~ 3.59(m, 1H), 3.98 ~ 4.04(m, 2H), 4.10 ~ 4.12(m, 1H), 4.24 ~ 4.28(m, 2H), 4.63(d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.85 ~ 4.92(m, 2H), 5.34 ~ 5.37(m, 1H), 5.42(d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 5.52 ~ 5.58(m, 1H), 5.69 ~ 5.74(m, 1H), 5.80 ~ 5.86(m, 1H), 6.30(s, 1H), 6.38(d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.89(dd, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 3H), 7.18 ~ 7.20(m, 2H), 7.26 ~ 7.29(m,

2H), 7.42 ~ 7.55(m, 9H), 7.64 ~ 7.67(m, 2H), 7.71 ~ 7.73(m, 1H), 7.84 ~ 7.87(m, 2H), 7.98(d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 9.22(dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 202.9, 172.0, 171.3, 170.1, 169.5, 169.5, 169.3, 167.0, 166.9, 165.7, 159.1, 158.9, 157.3, 149.4, 149.3, 140.0, 137.8, 135.6, 135.4, 134.8, 134.7, 134.0, 133.9, 133.39, 133.36, 132.0, 130.7, 130.5, 130.1, 129.2, 128.8, 128.7, 128.1, 128.1, 128.0, 127.9, 117.3, 117.2, 115.0, 114.9, 111.4, 111.3, 111.2, 101.1, 84.1, 80.8, 77.2, 75.8, 75.2, 75.0, 72.2, 71.3, 70.9, 58.9, 58.0, 57.9, 55.4, 54.5, 46.6, 45.6, 44.1, 43.5, 41.2, 26.8, 23.8, 23.0, 22.5, 22.3, 21.9, 21.1, 14.4, 10.3. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{71}\text{H}_{78}\text{N}_3\text{O}_{18}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 1 260.527 5, 实测值 1 260.526 3.

化合物 2-53 为白色固体, 收率 51%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.00(s, 3H), 1.02(s, 3H), 1.09 ~ 1.15(m, 1H), 1.23 ~ 1.27(m, 1H), 1.50(s, 4H), 1.61 ~ 1.67(m, 3H), 1.77(s, 3H), 1.80 ~ 1.84(m, 1H), 2.08(s, 3H), 2.23(s, 3H), 2.31 ~ 2.33(m, 2H), 2.54 ~ 2.57(m, 2H), 2.62 ~ 2.64(m, 2H), 2.71(s, 2H), 3.08(s, 2H), 3.58(d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.75 ~ 3.82(m, 1H), 3.94 ~ 3.95(m, 1H), 3.98 ~ 4.04(m, 1H), 4.63(s, 1H), 4.89 ~ 4.91(m, 2H), 5.34 ~ 5.36(m, 3H), 5.42(d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.55(t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.84(t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.30(s, 1H), 6.37(s, 1H), 6.72(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.05(s, 1H), 7.15 ~ 7.20(m, 3H), 7.22 ~ 7.24(m, 1H), 7.26 ~ 7.30(m, 3H), 7.44 ~ 7.50(m, 7H), 7.53 ~ 7.55(m, 1H), 7.64 ~ 7.68(m, 2H), 7.71 ~ 7.75(m, 1H), 7.86(d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.98(d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 9.23(d, $J = 8.0$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 202.9, 171.9, 170.1, 169.5, 169.2, 166.9, 165.7, 139.9, 138.9, 137.8, 134.7, 134.0, 133.9, 132.0, 131.5, 130.4, 130.1, 129.2, 129.0, 128.8, 128.7, 128.1, 127.9, 127.7, 127.4, 112.2, 111.3, 103.8, 101.1, 84.1, 80.7, 77.2, 75.8, 75.2, 75.0, 71.2, 70.9, 67.9, 67.3, 57.9, 55.4, 54.9, 54.4, 54.1, 49.7, 46.5, 43.4, 28.9, 28.3, 26.8, 23.8, 23.5, 23.0, 21.9, 21.1, 14.4, 10.3. HRMS (ESI-TOF) m/z . $\text{C}_{73}\text{H}_{80}\text{N}_3\text{O}_{18}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 1 286.539 2, 实测值 1 286.543 7.

2.4 吡啶衍生物与紫杉醇偶联物的体外活性

体外评价 2 个偶联物及其前体化合物对两种肿瘤细胞增殖的抑制活性, 结果见表 4. 偶联前化合物

2-18 和 2-51 对 HCT116 细胞均显示一定抑制活性. 化合物 2-18 对 H460 细胞未表现出明显活性, 而化合物 2-51 则有一定的抑制活性, 两个吡啶衍生物分别与紫杉醇偶联后所得到的化合物 2-48 和 2-53 有同样的趋势, 即对 HCT116 细胞的抑制作用更强. 对结肠癌细胞 HCT116 的这种选择性可能与已报道的 LTA₄H 在结肠癌细胞中的高表达有关, 因为结直肠癌通常是由长期的慢性炎症和溃疡导致, 因此本文所设计合成的吡啶衍生物以及与紫杉醇的偶联物对与炎症高度相关的肿瘤具有重要的研究价值.

表 4 化合物抑制肿瘤增殖活性

Tab. 4 The antitumor activity of compounds

化合物 编号	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	
	HCT116	H460
Bestatin	>100	>100
PTX	<0.01	<0.01
2-18	24.15 ± 2.51	>100
2-48	0.04 ± 0.05	0.89 ± 0.12
2-51	13.62 ± 2.42	29.53 ± 1.28
2-53	0.09 ± 0.05	0.26 ± 0.15

3 结 论

根据 LTA₄H 抑制剂的研究进展以及炎症与癌症的联系, 结合 DG-051 的结构和 LTA₄H 的晶体结构, 设计合成两类共计 30 个 1,5-二取代吡啶衍生物, 均为全新化合物. LTA₄H 抑制活性测试结果表明, 大部分化合物都显示出较好的 LTA₄H 抑制活性, 其中化合物 2-12、2-15、2-18、2-29 和 2-33 抑制活性尤为显著. 初步构效分析发现: 以吡啶为母核结构, 吡啶环的 1 位选择 N,N-二甲胺基作为亲水基团, 5 位选择苯环、对位羟乙基或氨基取代的苯环作为疏水基团时, 或者 5 位选择四氢吡咯环、哌啶环作为亲水基团, 1 位选择苯环取代时, 对 LTA₄H 的抑制活性更高. 为了探索该类化合物在抗肿瘤领域的应用, 选取 LTA₄H 抑制活性较好的 2 个化合物与 PTX 共价偶联并进行体外抗肿瘤活性测试, 偶联化合物 2-48 和 2-53 表现出对结肠癌细胞 HCT116 较好的抑制效果, 与预期一致.

参考文献:

[1] Clevers H. At the crossroads of inflammation and can-

cer[J]. Cell, 2004, 118(6): 671-674.

- [2] 吴克复. “炎症与肿瘤”的研究现状及其对肿瘤防治的启示[J]. 白血病·淋巴瘤, 2005, 14(5): 257-261.
- [3] Thun M J, Henley S J, Carlo P. Nonsteroidal antiinflammatory drugs as anticancer agents: Mechanistic, pharmacologic, and clinical issues[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2002, 94: 252-266.
- [4] Haeggström J Z. Leukotriene A4 hydrolase/ aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B4 biosynthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(49): 50639-50642.
- [5] Stsiapanava A, Samuelsson B, Haeggström J Z. Capturing LTA₄ hydrolase in action: Insights to the chemistry and dynamics of chemotactic LTB₄ synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(36): 9689-9694.
- [6] Caroline M L, Akthar S, Dhiren F P. The development of novel LTA₄H modulators to selectively target LTB₄ generation[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44449.
- [7] Sandanayaka V, Mamat B, Bhagat N, et al. Discovery of novel leukotriene A4 hydrolase inhibitors based on piperidine and piperazine scaffolds[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010, 20(9): 2851-2854.
- [8] Enache L A, Kennedy I, Sullins D W, et al. Development of a scalable synthetic process for DG-051B, a first-in-class inhibitor of LTA₄H[J]. Organic Process Research & Development, 2009, 13(6): 1177-1184.
- [9] Whatling C, McPheat W, Hersl M. The potential link between atherosclerosis and the 5-lipoxygenase pathway: Investigational agents with new implications for the cardiovascular field[J]. Expert Opinion On Investigational Drugs, 2007, 16(12): 1879-1893.
- [10] Davies D R, Mamat B, Magnusson O T, et al. Discovery of leukotriene A4 hydrolase inhibitors using metabolomics biased fragment crystallography[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2009, 52(15): 4694-4715.
- [11] Sandanayaka V, Mamat B, Mishra R K, et al. Discovery of 4-[(2S)-2-{[4-(4-Chlorophenoxy)phenoxy]methyl}-1-pyrrolidinyl]butanoic acid (DG-051) as a novel leukotriene A4 hydrolase inhibitor of leukotriene B4 biosynthesis[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53(2): 573-585.

责任编辑: 郎婧