

1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮类化合物的合成及生物活性

赵方振, 庄春林, 郭子照, 盛春泉, 姚建忠, 缪震元, 张万年 (第二军医大学药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 研究 5 位连有取代苯基的 1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮类化合物生物活性。方法 在吡咯酮的 5 位引入各种取代苯基, 合成出目标化合物, 所有化合物¹H NMR 和 MS 等谱确证; 通过荧光偏振法测定化合物对蛋白的抑制常数 K_i 。结果 所有 13 个目标化合物都能抑制蛋白的结合, 其中化合物 4e 的 K_i 达到阳性对照药的 5 倍。结论 5 位苯环的取代基对活性影响很大, 吸电子基团取代活性高于亲电子基团, 其中硝基取代活性最强。

[关键词] 1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮; 化学合成; 生物活性

[中图分类号] R914 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)06-0430-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.06.009

Synthesis and biological activity of 1*H*-pyrrol-2(5*H*)-ones

ZHAO Fang-zhen, ZHUANG Chun-lin, GUO Zi-zhao, SHENG Chun-quan, YAO Jian-zhong, MIAO Zhen-yuan, ZHANG Wan-nian (Department of Medicinal Chemistry, Second Military Medicinal University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the biological activity of 1*H*-pyrrol-2(5*H*)-ones which introduced substituted phenyl group as side chain. **Methods** By introduction of 5-substituted phenyl group, a serial 1*H*-pyrrol-2(5*H*)-ones were synthesized and their structures were confirmed by ¹H NMR and MS. The binding constant K_i was assayed by the fluorescence polarization binding assay method. **Results** Thirteen title compounds exhibited stronger protein binding activities and compound 4e showed five times higher than positive drug. **Conclusion** The introduction of electron-attracting groups was beneficial to improve their activities. Among them, the nitro group was preferred group.

[Key words] 1*H*-pyrrol-2(5*H*)-one; chemical synthesis; biological activity

p53 蛋白是一种抑癌蛋白, 它的失活与 50% ~ 60% 的癌症发生密切相关。编码的 p53 蛋白在细胞周期调控、DNA 修复和诱导细胞凋亡等方面均具有关键性作用, 癌症病人出现 p53 基因的功能缺失性突变, 是导致肿瘤细胞迅速生长的主要原因。分子生物学研究表明细胞中存在的 MDM2 (murine double minute 2) 蛋白是 p53 主要的负性调节子之一, p53 能激活 MDM2 转录, MDM2 反过来又能抑制 p53 活性, 形成自动调节反馈环, 以保持正常情况下 p53 和 MDM2 都处于低水平状态。而肿瘤细胞内 MDM2 的异常表达会导致 p53 因其泛素化而快速降解, 从而影响 p53 对肿瘤细胞生长的抑制^[1]。p53-MDM2 复合物晶体结构阐明了 p53 与 MDM2 的作用模式, p53 的关键性氨基酸 Phe¹⁹、Trp²³ 和 Leu²⁶ 插入 MDM2 的活性腔形成 3 个疏水性作用力, 这一发现使得以 p53-MDM2 结合为靶标的抗肿瘤药物研究成为近年来抗肿瘤药物研究的热点^[2]。多肽及其类似物是最早发现的一类抑

制剂, 合成的八肽 AP 和天然产物环九肽 chlorofusin 都具有优异的抑制活性, 但由于肽类化合物的细胞渗透能力差致使体外肿瘤细胞活性并不理想^[3,4]。近年来非肽类小分子 p53-MDM2 结合抑制剂成为该靶点研究的热点领域, 国内外研究者采用虚拟高通量筛选先后获得多类全新结构的小分子抑制剂, 其中顺式咪唑啉类 (nutlins)、螺吡啶酮类 (spiro-oxindoles)、1,4-苯并二氮革-2,5-二酮类 (benzodiazepinediones) 三类研究最多, 活性最好, 目前已有 3 个化合物分别进入 I 期临床研究^[5-7]。

笔者采用国外研究者相同的虚拟高通量筛选方法从商业化化合物库中筛选并验证了吡咯酮类化合物具有小分子 p53-MDM2 结合抑制作用, 为进一步进行构效关系研究, 设计合成了 5-取代苯基吡咯酮类化合物 4a ~ 4m, 合成路线如图 1。

1 仪器与试剂

所用仪器为 XT4A 显微熔点测定仪、MAT-212 型质谱仪、Bruker-AC-P400 型核磁共振仪 (TMS 为内标)。柱色谱用硅胶 H、薄层色谱用硅胶 GF25 均为青岛海洋化工厂产品, 所用试剂均为市售分析纯。

[基金项目] 上海市科委生物医药重点项目资助 (09431901700)。

[作者简介] 赵方振 (1990-) 男, 第二军医大学生物技术本科 2008 级学员。

[通讯作者] 缪震元. Tel: (021) 81871241, E-mail: miaozhenyuan@hotmail.com.

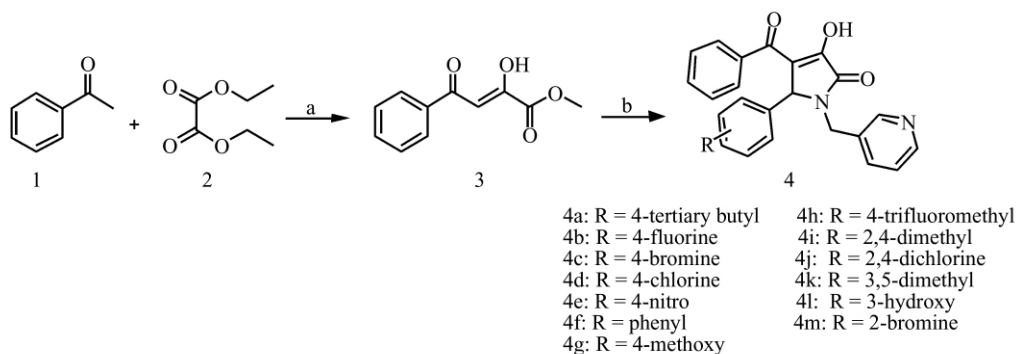


图1 目标化合物的合成路线

反应条件: a-CH₃OH, CH₃ONa, 70 °C, 3 h; b-substituted benzaldehyde, pyridin-3-ylmethanamine, dioxane, rt, 24 h.

2 方法和结果

2.1 2-羟基-4-苯基-4-氧代-2-丁烯酸甲酯 3 的合成 在室温下将 29.2 g (0.2 mol) 草酸二乙酯、12.0 g (0.1 mol) 苯乙酮混合液缓慢滴加到 2 mol/L 的甲醇钠/甲醇溶液中,滴加完毕后升温至 70 °C 反应 3 h,冷却至室温,将反应液倒入 2 L 水中,过滤。滤液冰水浴下用浓盐酸调 pH 至 3~4,析出大量淡黄色固体,过滤,水洗,干燥得 15.0 g 淡黄色固体 3,收率 72.8%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 14.83 (s, 1H), 8.06 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.70 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz), 7.57 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.11 (s, 1H), 3.85 (s, 3H)。ESI-MS (*m/z*): 207.29 [M + 1]⁺。

2.2 目标化合物 4a~4m 的合成 将 0.1 mol 取代苯甲醛与 1.1 g (0.1 mol) 3-氨基吡啶加入到 2 ml 1,4-二氧六环中,室温搅拌 30 min。然后将溶于 2 ml 1,4-二氧六环的 0.21 g (0.1 mol) 化合物 3 缓慢滴入反应液中,滴加完毕后继续室温反应 24 h。加入 100 ml 水,析出固体,过滤,得化合物 4a~4m。

4-苯甲酰-5-(4-叔丁基苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮 (4a): 白色固体,收率 90.7% mp 275~279 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.80 (s, 1H), 8.42 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz), 8.26 (s, 1H), 7.72 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.55 (m, 1H), 7.44 (m, 3H), 7.26 (m, 3H), 7.19 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 5.35 (s, 1H), 4.71 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 4.07 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 1.21 (s, 9H)。ESI-MS (*m/z*): 426.28 [M - 1]⁻。

4-苯甲酰-5-(4-氟苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮 (4b): 白色固体,收率 56.5% mp 265~269 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.98 (s, 1H), 8.45 (d, 1H, *J* = 4.7

Hz), 8.28 (s, 1H), 7.71 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.30~7.55 (m, 7H), 7.07 (m, 2H), 5.38 (s, 1H), 4.74 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.10 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz)。ESI-MS (*m/z*): 388.05 [M - 1]⁻。

4-苯甲酰-5-(4-溴苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮 (4c): 白色固体,收率 66.9% mp 262~264 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.11 (s, 1H), 8.45 (d, 1H, *J* = 4.6 Hz), 8.30 (s, 1H), 7.70 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.41~7.54 (m, 5H), 7.30 (m, 3H), 5.35 (s, 1H), 4.76 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 4.08 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz)。ESI-MS (*m/z*): 451.65 [M + 1]⁺。

4-苯甲酰-5-(4-氯苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮 (4d): 白色固体,收率 61.9% mp 262~264 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.10 (s, 1H), 8.45 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 8.29 (s, 1H), 7.70 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.30~7.56 (m, 4H), 7.28 (m, 5H), 5.37 (s, 1H), 4.76 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 4.09 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz)。ESI-MS (*m/z*): 403.77 [M - 1]⁻。

4-苯甲酰-5-(4-硝基苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮 (4e): 黄色固体,收率 69.9% mp 260~263 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.30 (s, 1H), 8.43 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz), 8.29 (s, 1H), 8.09 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.70 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz), 7.51~7.58 (m, 4H), 7.26~7.43 (m, 3H), 5.53 (s, 1H), 4.74 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 4.18 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz)。ESI-MS (*m/z*): 387.84 [M + 1]⁺。

4-苯甲酰-5-(1-萘基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮 (4f): 白色固体,收率 71.4% mp 266~270 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.85 (s, 1H), 8.43 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz), 8.29

(s, 1H), 7.90 (s, 2H), 7.81 (m, 2H), 7.71 (d, 2H, $J=7.5$ Hz), 7.31~7.53 (m, 7H), 5.52 (s, 1H), 4.84 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 4.04 (d, 1H, $J=15.5$ Hz)。ESI-MS (m/z): 422.44 [$M+1$]⁺。

4-苯甲酰-5-(4-甲氧基苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮(4g): 白色固体, 收率 67.3% mp 248~251 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.78 (s, 1H), 8.46 (d, 1H, $J=4.7$ Hz), 8.29 (s, 1H), 7.70 (d, 2H, $J=8.2$ Hz), 7.31~7.55 (m, 5H), 7.19 (d, 2H, $J=8.6$ Hz), 6.83 (d, 2H, $J=8.6$ Hz), 5.29 (s, 1H), 4.76 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 3.99 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 3.33 (s, 3H)。ESI-MS (m/z): 401.72 [$M+1$]⁺。

4-苯甲酰-5-(4-三氟甲基苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮(4h): 白色固体, 收率 82.2% mp 265~269 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.10 (s, 1H), 8.42 (m, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.70 (d, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, $J=8.2$ Hz), 7.48~7.54 (m, 4H), 7.41~7.44 (m, 3H), 5.49 (s, 1H), 4.73 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 4.15 (d, 1H, $J=15.5$ Hz)。ESI-MS (m/z): 439.63 [$M+1$]⁺。

4-苯甲酰-5-(2,4-二甲基苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮(4i): 白色固体, 收率 72.9% mp 227~230 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.85 (s, 1H), 8.45 (d, 1H, $J=4.7$ Hz), 8.26 (s, 1H), 7.69 (d, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.33~7.54 (m, 5H), 6.92 (m, 3H), 5.51 (s, 1H), 4.83 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 3.80 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 2.18 (s, 3H), 2.15 (s, 3H)。ESI-MS (m/z): 399.73 [$M+1$]⁺。

4-苯甲酰-5-(2,4-二氯苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮(4j): 白色固体, 收率 25.1% mp 228~232 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.30 (s, 1H), 8.45 (d, 1H, $J=4.2$ Hz), 8.32 (s, 1H), 7.73 (d, 2H, $J=7.7$ Hz), 7.42~7.56 (m, 5H), 7.24~7.34 (m, 3H), 5.82 (s, 1H), 4.73 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 4.11 (d, 1H, $J=15.5$ Hz)。ESI-MS (m/z): 440.14 [$M+1$]⁺。

4-苯甲酰-5-(3,5-二甲基苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮(4k): 白色固体, 收率 70.4% mp 241~243 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.90 (s, 1H), 8.45 (d, 1H, $J=4.7$ Hz), 8.28 (s, 1H), 7.68 (d, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.31~7.55 (m, 5H), 6.85 (m, 3H), 5.26 (s, 1H), 4.74 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 4.03 (d, 1H, $J=15.5$ Hz),

2.18 (s, 6H)。ESI-MS (m/z): 399.73 [$M+1$]⁺。

4-苯甲酰-5-(3-羟基苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮(4l): 淡黄色固体, 收率 51.8% mp 266~268 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.10 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.42 (m, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.69 (d, 2H, $J=7.1$ Hz), 7.31~7.55 (m, 6H), 7.41~7.44 (m, 3H), 5.23 (s, 1H), 4.80 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 3.96 (d, 1H, $J=15.5$ Hz)。ESI-MS (m/z): 387.84 [$M+1$]⁺。

4-苯甲酰-5-(2-溴苯基)-3-羟基-1-(3-吡啶甲基)-1*H*-吡咯-2(5*H*)-酮(4m): 白色固体, 收率 33.4% mp 227~228 °C, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.11 (s, 1H), 8.43 (d, 1H, $J=4.7$ Hz), 8.31 (s, 1H), 7.73 (d, 2H, $J=7.3$ Hz), 7.43~7.57 (m, 5H), 7.15~7.30 (m, 3H), 5.88 (s, 1H), 4.75 (d, 1H, $J=15.5$ Hz), 4.09 (d, 1H, $J=15.5$ Hz)。ESI-MS (m/z): 451.65 [$M+1$]⁺。

3 p53-MDM2 蛋白结合抑制活性

参考国外文献^[5,6], 采用荧光偏振法测定目标化合物对 p53-MDM2 蛋白结合抑制常数, 以阳性对照药 nutlin-3a (Sigma 公司) 试验结果见表 1。

表 1 目标化合物对 p53-MDM2 蛋白结合抑制活性

化合物	K _i (μM)	化合物	K _i (μM)
4a	26.049	4h	12.938
4b	0.156	4i	1.425
4c	2.222	4j	0.767
4d	0.337	4k	36.842
4e	0.051	4l	0.944
4f	1.698	4m	3.221
4g	2.291	nutlin-3a	0.230

4 讨论

从表 1 中可以看出, 所有的目标化合物对 p53-MDM2 蛋白结合均有明显抑制活性, 其中 5 个化合物的抑制常数 K_i 在 1 μM 以下, 化合物 4b 和 4e 的抑制常数分别达到了 0.156 和 0.051 μM, 优于阳性对照药 nutlin-3a 的 0.230 μM。分析目标化合物的结构和活性关系发现, 5 位苯环上取代基团对活性影响很大, 吸电子基团取代化合物活性优于供电子基团取代化合物, 其中苯环对位硝基取代化合物 4e 活性最强, 达到了阳性对照药 nutlin-3a 的 5 倍以上。当苯环上有多取代基团时也显示出相同的构效关系, 二氯取代化合物 4j 活性明显高于二甲基取代化合物 4i 和 4k。

(下转第 456 页)

2.6 精密度试验 取混合对照品溶液按上述色谱条件平行进样 6 次,结果甲醇、异丙醇、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、三氯甲烷、苯、甲基异丁酮、甲苯峰面积的 RSD 分别为 0.9%、0.8%、2.6%、0.8%、0.5%、2.5%、3.2%、0.8%、0.6%,均符合《中国药典》2010 年版二部规定的残留溶剂外标法精密度的要求 (RSD 不大于 10%)^[3] 表明方法重现性良好。

2.7 回收率试验 精密称取批号为 10091013 的供试品 9 份 (其中含乙酸乙酯 0.01%、四氢呋喃 0.001%、未检出其他溶剂) 置 20 ml 顶空瓶,每份 0.5 g,分 3 组,每组 3 份,分别精密加入“2.5”线性项下的 2、3、4 号浓度对照品溶液 5.0 ml,按上述色谱条件分析,计算各组分回收率,结果平均回收率 ($n=9$) 甲醇为 96.0% (RSD = 1.2%)、异丙醇为 97.4% (RSD = 0.8%)、正己烷为 95.2% (RSD = 2.6%)、乙酸乙酯为 99.4% (RSD = 1.7%)、四氢呋喃为 97.6% (RSD = 1.8%)、三氯甲烷为 96.2% (RSD = 2.9%)、苯为 102.3% (RSD = 2.8%)、甲基异丁酮为 98.5% (RSD = 0.9%)、甲苯为 95.9% (RSD = 0.8%)。

2.8 检测限 逐步稀释混合对照品溶液,按上述色谱条件进样,结果甲醇、异丙醇、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、三氯甲烷、苯、甲基异丁酮、甲苯的最低检测限 ($S/N=3$) 分别为 0.326、0.616、0.007、0.086、0.0502、3.19、0.132、0.124、0.136 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.9 样品测定 取 3 批盐酸洛哌丁胺供试品按“2.3”项下制备供试品溶液进行顶空进样分析,结果见表 2。

3 小结

本文选用中等极性的 DB-624 毛细管柱^[4-6] 采

用程序升温可使 9 种有机溶剂到完全分离,提高效率,可用于盐酸洛哌丁胺中残留溶剂的控制。

表 2 3 批盐酸洛哌丁胺样品残留溶剂的分析结果 ($n=2$)

组分	10091011	10091012	10091013
甲醇	/	/	/
异丙醇	/	/	/
正己烷	/	/	/
乙酸乙酯	0.02%	$\leq 0.01\%$ ¹⁾	$\leq 0.01\%$ ¹⁾
四氢呋喃	$\leq 0.004\%$ ¹⁾	$\leq 0.004\%$ ¹⁾	$\leq 0.004\%$ ¹⁾
三氯甲烷	/	/	/
苯	/	/	/
甲基异丁酮	/	/	/
甲苯	/	/	/

注: ¹⁾ 浓度低于线性第一点。

三氯甲烷与苯的规定限度较低且在检测器中响应值较弱。鉴于残留溶剂为限度检查,方法学中未考察定量限。

【参考文献】

- [1] 陶 寅,蔡锡明. 盐酸洛哌丁胺的合成[J]. 四川化工, 1996, 17(3): 22.
- [2] 谷高强,周 坤,黄淑萍,等. 气相色谱法测定盐酸洛哌丁胺中四种有机溶剂残留量[J]. 中国医药, 2009, 4(7): 528.
- [3] 中国药典 2010 年版. 二部[S]. 2010: 附录 61.
- [4] 戴寿洋,陈贵斌,陈 悦. 顶空毛细管气相色谱法测定注射用头孢哌酮舒巴坦钠中残留溶剂[J]. 海峡药学, 2012, 24(2): 53.
- [5] 姚 静,吴建敏,高家敏,等. 顶空 GC 测定缙沙坦原料有机溶剂残留量[J]. 中国药事, 2009, 23(7): 681.
- [6] 龚爱琴. 顶空毛细管气相色谱法测定氟苯尼考中残留溶剂[J]. 海峡药学, 2011, 23(7): 79.

[收稿日期]2012-03-18

[修回日期]2012-07-06

(上接第 432 页)

综上所述,本合成通过吡咯酮 5 位苯环上取代基团对活性影响的研究,从中发现了一个活性高于阳性对照药 5 倍以上的衍生物 4e,值得进一步深入研究其体内外抗肿瘤活性。

【参考文献】

- [1] Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 Interaction [J]. Mol Cancer Res, 2003, 1: 1001.
- [2] Kussie PH, Gorina S, Marechal V, et al. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain [J]. Science, 1996, 274: 948.
- [3] Garcia-Echeverria C, Chene P, Blommers MJJ. Discovery of potent antagonists of the interaction between human double minute

2 and tumor suppressor p53 [J]. J Med Chem, 2000, 43: 3205.

- [4] Baek S, Kutchukian PS, Verdine GL, et al. Structure of the stapled p53 peptide bound to Mdm2 [J]. J Am Chem Soc, 2012, 134: 103.
- [5] Lyubomir T, Vassilev BT, Bradford G, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 [J]. Science, 2004, 303: 844.
- [6] Yu S, Qin D, Shangary S, et al. Potent and orally active small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction [J]. J Med Chem, 2009, 52: 7970.
- [7] Marugan JJ, Leonard K, Raboisson P, et al. Enantiomerically pure 1,4-benzodiazepine-2,5-diones as MDM2 antagonists [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16: 3115.

[收稿日期]2012-05-11

[修回日期]2012-06-20