

α -倒捻子素衍生物合成 及其抑制磷酸二酯酶 4 活性研究*

邓金辉¹, 黄悦², 梁津豪¹, 朱嘉琪¹, 于思¹,
刘昊柏¹, 罗海彬², 黄仪有², 何细新¹

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006
2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

摘要: 以 α -倒捻子素为先导化合物设计合成一系列衍生物并测试其对磷酸二酯酶 4 (PDE4, phosphodiesterase 4) 的抑制活性。首先 α -倒捻子素在 DDQ 作用下氧化环合得到中间体 **1**, 然后经烷基化、还原、水解、酰化等化学反应合成 6-位取代的目标化合物; 采用 [³H] 标记液体闪烁计数法测试了衍生物体外抑制 PDE4 活性。最终设计、合成了 11 个目标化合物, 其结构经 ¹H NMR、¹³C NMR、HRMS 等波谱数据分析确证。活性测试结果表明 7 个化合物 (**4a**、**4b**、**5**、**6**、**8**、**11** 和 **13**) 的 PDE4 抑制活性强于 α -倒捻子素, 其中化合物 **5** 的活性最强 (IC₅₀=247 nmol/L)。

关键词: α -倒捻子素; 衍生物; 磷酸二酯酶 4; 抑制剂

中图分类号: R914.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137 (2022) 03-0053-09

Synthesis of α -mangostin derivatives and evaluation of their inhibitory activities towards phosphodiesterase 4

DENG Jinhui¹, HUANG Yue², LIANG Jinhao¹, ZHU Jiaqi¹, YU Si¹,
LIU Haobai¹, LUO Haibin², HUANG Yiyou², HE Xixin¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China
2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Derivatives of α -mangostin were designed and synthesized in this study, and their phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitory activities were evaluated *in vitro*. The initial substrate α -mangostin was converted into the cyclized compound **1**, followed by eleven desired compounds were prepared by alkylation, hydrolysis, acylation reaction and other methods. The structures of the desired compounds were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-(HR)MS. The PDE4 inhibitory activities of these compounds were evaluated *in vitro* by [³H] liquid scintillation counting method. Among the desired compounds, compounds **4a**, **4b**, **5**, **6**, **8**, **11** and **13** showed stronger PDE4 inhibition activity than α -mangostin. Compound **5** exhibited potential PDE4 inhibitory activity with the IC₅₀ values of 247 nmol/L.

Key words: α -mangostin; derivatives; phosphodiesterase 4 (PDE4); inhibitor

* 收稿日期: 2021-02-08 录用日期: 2021-04-28 网络首发日期: 2021-06-05
基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (82003576); 广东省自然资源厅广东省海洋经济发展 (海洋六大产业) 专项资金 (粤自然资合[2020]039)
作者简介: 邓金辉 (1994年生), 男; 研究方向: 天然药物活性成分的结构修饰; E-mail: 2946291608@qq.com
通信作者: 黄仪有 (1989年生), 男; 研究方向: 药物化学与结构生物学; E-mail: huangyy287@mail.sysu.edu.cn
何细新 (1972年生), 男; 研究方向: 天然药物化学; E-mail: mark07@gzucm.edu.cn
(黄仪有、何细新为共同通信作者)

磷酸二酯酶(PDEs, phosphodiesterase)是水解细胞内第二信使环腺苷酸(cAMP)或(和)环鸟苷酸(cGMP)的超级酶家族,共包括11个酶家族(PDE1~11)^[1]。由于cAMP和cGMP在生理活动中的重要作用,磷酸二酯酶已成为多种疾病,如心衰、银屑病、肺动脉高血压、认知障碍等的重要治疗靶点^[2]。磷酸二酯酶4(PDE4s, phosphodiesterase 4)是PDE家族的一种同工酶,有PDE4A、PDE4B、PDE4C和PDE4D四种亚型,可特异性水解cAMP^[3],广泛分布于炎性细胞、免疫细胞及中枢神经系统组织中,对细胞内cAMP浓度及其下游信号传导具有重要的调控作用^[4-6]。PDE4型抑制剂药物已被广泛研究用于多种疾病治疗。Rolipram作为第一代PDE4抑制剂,被广泛研究用于哮喘等疾病治疗,但因对其他亚型选择性差,常伴有头晕、头痛、恶心和呕吐等副作用,因此常被用作PDE4抑制剂研究的阳性对照药物^[7]。Roflumilast是首个上市的PDE4抑制剂(PDE4B IC₅₀: 0.84 nmol/L; PDE4D IC₅₀: 0.68 nmol/L),2010年和2011年先后被欧洲药物管理局(EMA)和FDA批准用于严重慢性阻塞性肺病(COPD)治疗,以减少突然发作的次数或防止COPD症状恶化^[8]; Apremilast是一种口服的选择性PDE4抑制剂(IC₅₀: 74 nmol/L),2014年被FDA批准用于中至重度斑块型银屑病、银屑病关节炎的治疗^[9-10]。2016年, FDA批准了首个外用PDE4抑制剂Crisaborole(IC₅₀: 490 nmol/L)用于特应性皮炎的治疗^[11]。然而, PDE4抑制剂通常伴有呕吐、恶心等不良作用,很大程度上阻碍了临床应用^[12]。因此,寻找新型PDE4抑制剂具有重要意义。

α -倒捻子素,一种来自藤黄科藤黄属植物山竹 *Garcinia mangostana* L. 中的异戊烯基型氧杂蒽酮骨架类化合物,具有抗炎、神经保护等多种药理活性^[13-16]。前期研究证实, α -倒捻子素是一种中等活性的PDE4D2抑制剂(IC₅₀=1 310 nmol/L),对其2-位异戊烯基氧化环合后所得中间体进一步修饰,发现在6-位酚羟基上引入烷基羧酸或烷基吡咯烷基团后可显著提高其抑制PDE4活性^[17]。为进一步比较6-位含氮碱性侧链及其他基团对PDE4抑制活性的影响,本研究设计合成了11个 α -倒捻子素衍生物,并初步探讨其抑制PDE4构效关系。

1 合成路线

按照本课题组报道的合成方法^[17], α -倒捻子素经DDQ氧化环合得到 α -倒捻子闭环衍生物**1**,然后在6-位酚羟基上经烷基化、还原、水解、酰化等方法合成目标化合物。目标化合物合成路线见图1~图4。

图1中,化合物**1**与不同链长的二溴烷烃反应得到中间体**2a**和**2b**,接着与叠氮化钠反应得到化合物**3a**和**3b**,将**3a**和**3b**经三苯基膦还原得到目标化合物**4a**和**4b**,**4b**与1*H*-吡唑-1-甲脒盐酸盐反应制得含胍基目标化合物**5**。

图2中,化合物**1**与乙酰氯反应得到**6**,**6**与4-溴巴豆酸乙酯烷基化得到**7**,最后**7**水解得到目标化合物**8**。

图3中,化合物**1**与相应的羧酸化合物在DCC和DMAP反应条件下得到化合物**9**、**10**和**11**。化合物**1**与相应的溴代化合物发生烷基化反应得到化合物**12**和**13**。

图4中,按照本课题组前期报道的合成方法^[17],化合物**1**与7-溴庚酸乙酯经烷基化、水解反应得到化合物**14**,**14**与单溴甲基川芎嗪反应得到目标化合物**15**。

2 合成实验

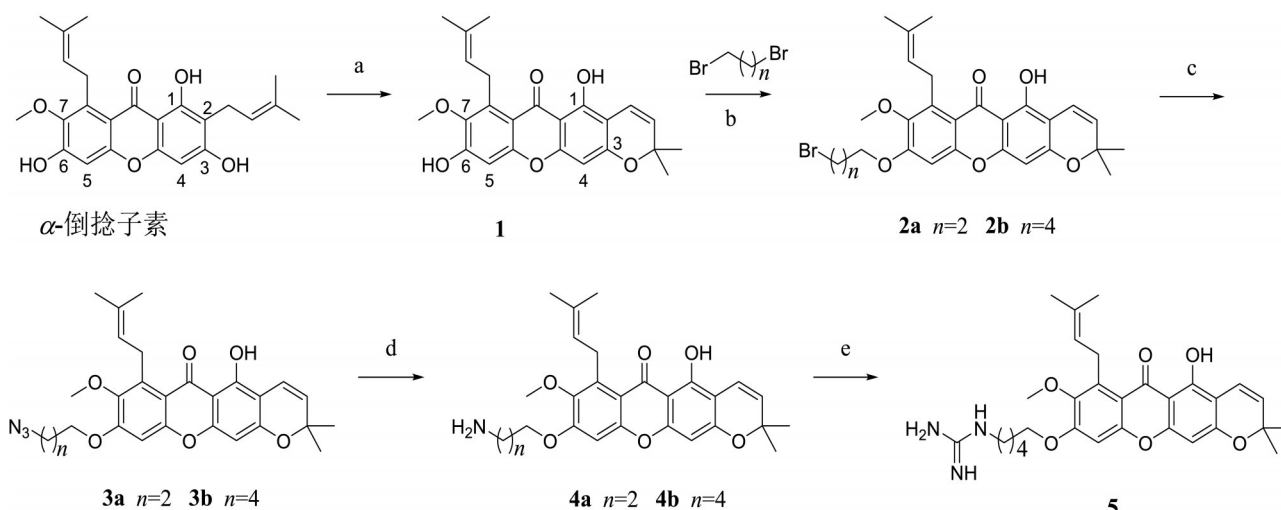
¹H NMR(400 MHz)和¹³C NMR(100 MHz)谱采用瑞士Bruker AV400核磁共振仪测定(以TMS为内标);ESI-MS采用安捷伦科技有限公司1260-6460三重四极杆液质联用仪;HR-MS(ESI)采用美国AB SCIEX TripleTOF[®] 5600+质谱仪测定;柱色谱硅胶(200~300目)为青岛海洋化工公司产品,高效硅胶GF254板(20 cm × 20 cm)为德国默克公司;除溴甲基川芎嗪外其他化学反应试剂均通过商业途径购置,反应溶剂均为分析纯。

2.1 化合物**1**、**2a**、**2b**的合成

化合物**1**、**2a**、**2b**的合成参考文献^[17]。

2.2 化合物**3a**、**3b**的合成

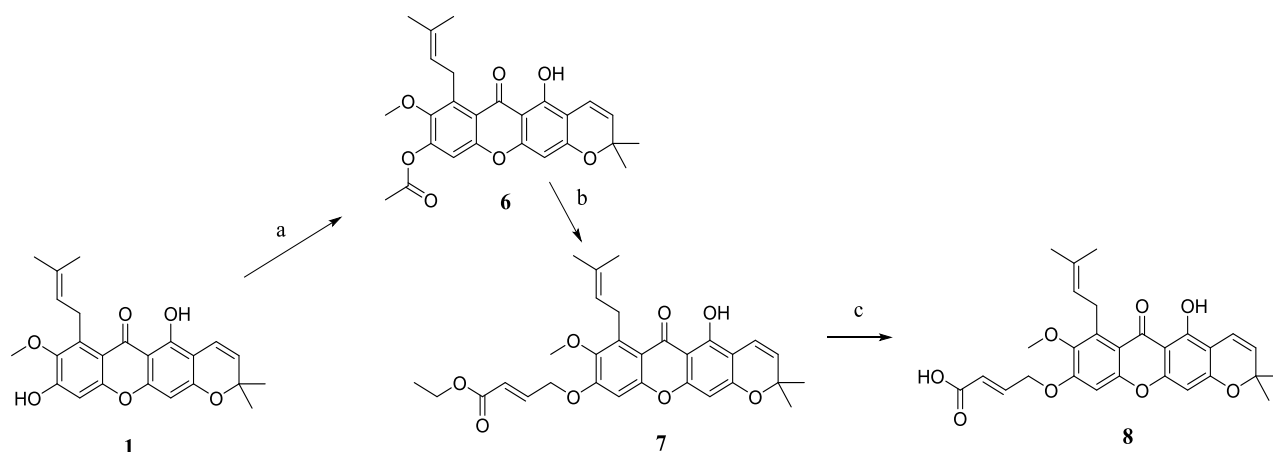
以**3a**的合成作为例。将**2a**(300 mg, 0.57 mmol)加入至3 mL干燥DMF中,依次加入叠氮化钠(111 mg, 1.70 mmol)和碘化钠(9 mg, 0.06 mmol)。60 °C下反应5 h后,加入10 mL冰水,二氯甲烷(10 mL×3)萃取。合并二氯甲烷相,无水硫酸钠干燥,过滤,减压蒸除溶剂。粗产物经硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯-石油醚,体积比1:19),得黄色固体**3a**(268.2 mg),收率为96%。¹H NMR(400



a: DDQ, PhH, reflux; b: K_2CO_3 , acetone, reflux; c: NaN_3 , NaI, DMF, 60 °C;
 d: Ph_3P , THF, 60 °C; e: 1*H*-Pyrazole-1-carboxamidinehydro-chloride, DIPEA, DMF, rt.

图1 化合物4a、4b和5的合成

Fig. 1 The synthesis of compounds 4a, 4b and 5



a: CH_3COCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , ice bath; b: Ethyl 4-bromocrotonate, K_2CO_3 , acetone, reflux;
 c: NaOH, $NH_2OH \cdot HCl$, acetone, reflux.

图2 化合物6和8的合成

Fig. 2 The synthesis of compounds 6 and 8

MHz, $CDCl_3$) δ 13.73 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.73 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.23 (s, 1H), 5.57 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.26~5.20 (m, 1H), 4.17 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.11 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.59 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.16 (p, $J = 6.2$ Hz, 2H), 1.85 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.47 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 182.1, 159.9, 158.1, 157.2, 156.3, 155.4, 144.2, 137.5, 132.0, 127.3, 123.2, 115.9, 112.2, 104.6, 104.0, 99.2, 94.1, 78.1, 65.6, 61.1, 48.2, 28.7, 28.5, 26.3, 26.1, 18.3. ESI-MS m/z 514.1

$[M + Na]^+$.

同法, 化合物**2b**与叠氮化钠反应, 得目标化合物**3b**: 黄色固体, 收率为90%。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 13.76 (s, 1H), 6.73 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.56 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.27~5.20 (m, 1H), 4.11 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 4.08 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.33 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.97~1.89 (m, 2H), 1.85 (s, 3H), 1.75~1.69 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.66~1.60 (m, 2H), 1.46 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 182.2, 159.8,

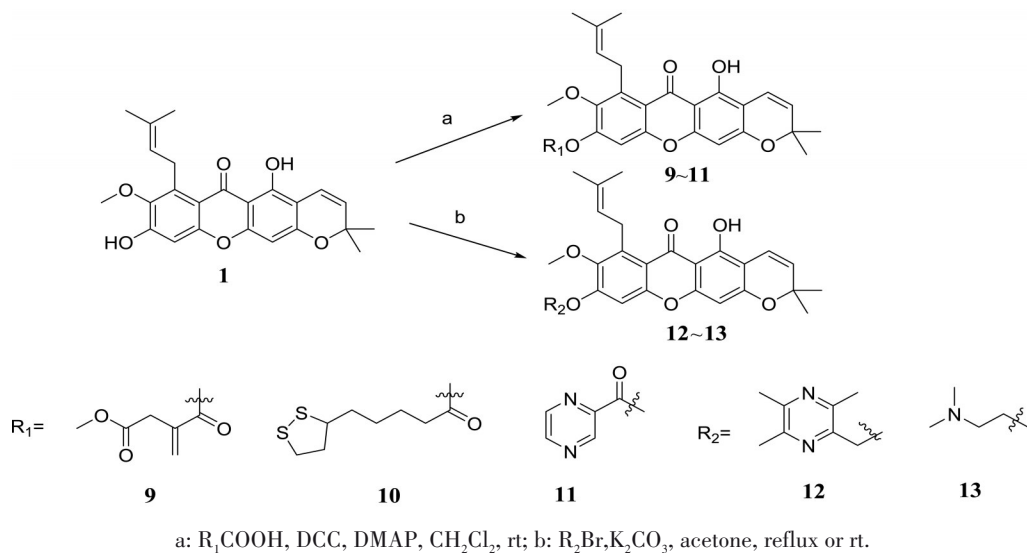


图3 化合物9~13的合成

Fig. 3 The synthesis of compounds 9-13

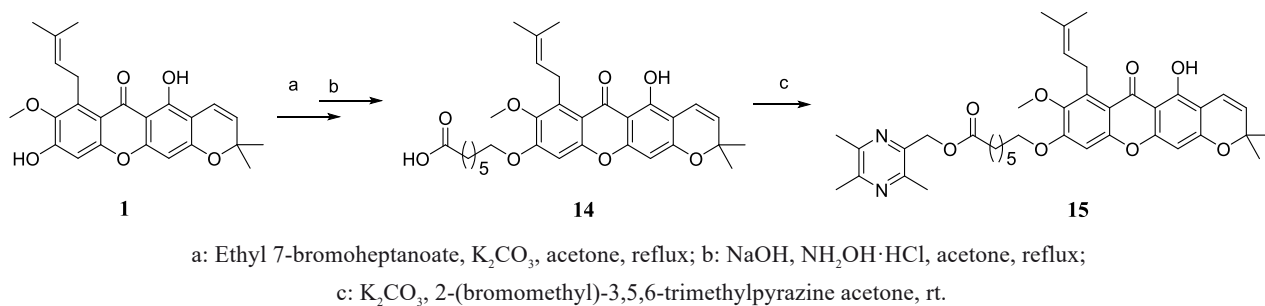


图4 化合物15的合成

Fig. 4 The synthesis of compound 15

158.1, 157.6, 156.3, 155.4, 144.2, 137.3, 132.0, 127.2, 123.3, 115.9, 111.9, 104.6, 104.0, 99.0, 94.1, 78.0, 68.6, 61.0, 51.4, 28.7, 28.7, 28.4, 26.3, 26.1, 23.5, 18.3。ESI-MS m/z 520.3 [M + H]⁺。

2.3 目标化合物4a、4b的合成

以4a的合成作为例。三苯基膦(174 mg, 0.66 mmol)缓慢加入至3a(251 mg, 0.51 mmol)的四氢呋喃(3 mL)溶液中, 60 °C回流反应2 h后, 加入1.5 mL蒸馏水, 继续反应7.5 h。反应完毕, 减压蒸除四氢呋喃, 加入20 mL蒸馏水, 乙酸乙酯萃取(20 mL×2)。合并乙酸乙酯相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂。粗产物经硅胶柱纯化(甲醇-二氯甲烷, 体积比1:9), 得到黄色固体4a(163.8 mg), 收率为69%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.72 (s, 1H), 6.71 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.55 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.29~5.19 (m, 1H), 4.16 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H),

4.10 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.98 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.04 (p, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.46 (s, 6H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 182.1, 159.8, 158.1, 157.6, 156.3, 155.4, 144.2, 137.2, 131.9, 127.2, 123.3, 115.9, 111.9, 104.6, 104.0, 99.1, 94.1, 78.0, 67.0, 61.0, 39.2, 32.6, 28.4, 26.3, 26.0, 18.3。ESI-HRMS m/z : 488.203 4 [M+Na]⁺ (488.204 4, calcd for C₂₇H₃₁NNaO₆)。

同法, 化合物3b和三苯基膦反应, 得目标化合物4b: 黄色固体, 收率为69%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.72 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.55 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.26~5.20 (m, 1H), 4.10 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.07 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.76 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.95~1.87 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.60~1.57 (m, 2H), 1.57~1.54 (m, 2H), 1.46 (s, 6H)。¹³C NMR (100

MHz, CDCl_3) δ 182.2, 159.8, 158.1, 157.7, 156.3, 155.4, 144.2, 137.2, 131.9, 127.2, 123.3, 115.9, 111.8, 104.6, 104.0, 99.0, 94.1, 78.0, 68.8, 61.0, 41.9, 32.8, 28.9, 28.4, 26.3, 26.1, 23.5, 18.3。ESI-HRMS m/z : 494.2527 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (494.2537, calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{NO}_6$)。

2.4 目标化合物5的合成

向化合物4b(110 mg, 0.22 mmol)的干燥DMF(1.2 mL)溶液中依次加入1*H*-吡啶-1-甲脒盐酸盐(96.7 mg, 0.66 mmol)、*N,N'*-二异丙基乙胺(DIPEA, 110 μL , 0.66 mmol), 室温反应15 h。反应完毕, 向反应液中加入20 mL蒸馏水, 少许碳酸氢钠调pH至碱性, 过滤。残留物经硅胶柱层析纯化(甲醇-二氯甲烷, 体积比1:9 \rightarrow 氨水-甲醇, 体积比1:1), 得到黄色固体5(55.0 mg), 收率为47%。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.54 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.43 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.25~5.14 (m, 1H), 4.09~3.92 (m, 2H), 3.88~3.73 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.19~2.94 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.75~1.67 (m, 2H), 1.64 (s, 3H), 1.62~1.53 (m, 2H), 1.46~1.33 (m, 2H), 1.39 (s, 6H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 181.5, 168.8, 159.7, 157.7, 157.0, 156.1, 155.1, 143.6, 137.0, 131.6, 127.0, 123.4, 115.7, 111.8, 104.6, 103.8, 98.9, 94.0, 78.0, 68.7, 60.9, 41.2, 29.8, 28.9, 28.4, 26.2, 26.0, 23.6, 18.3。ESI-MS m/z : 536.2758 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (536.2755, calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$)。

2.5 化合物6的合成

化合物1(700 mg, 1.71 mmol)和三乙胺(1.36 mL, 10.28 mmol)依次加入到20 mL干燥二氯甲烷中, 然后在冰浴条件下缓慢注入乙酰氯(0.73 mL, 10.28 mmol)。冰浴条件下反应5 h后, 常温反应10.5 h。减压旋干溶剂, 粗产物经硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯-石油醚, 体积比1:19), 得到黄色固体6(538.5 mg), 收率为70%。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 13.49 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.72 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.58 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.27~5.18 (m, 1H), 4.13 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.47 (s, 6H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 182.2, 168.2, 160.5, 158.1, 156.4, 153.9, 149.0, 146.7, 139.0, 132.3, 127.4, 123.0, 117.0, 115.7, 110.7, 104.7,

104.1, 94.4, 78.3, 61.8, 28.5, 26.5, 26.0, 21.0, 18.3。ESI-HRMS m/z : 451.1755 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (451.1751, calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{O}_7$)。

2.6 化合物7的合成

化合物6(500 mg, 1.22 mmol)加入至20 mL干燥丙酮中, 然后依次加入碳酸钾(230 mg, 1.66 mmol)和4-溴巴豆酸乙酯(0.18 mL, 1.33 mmol), 55 $^\circ\text{C}$ 加热回流反应12 h。减压蒸除溶剂后, 水(10 mL)-乙酸乙酯(10 mL \times 3)萃取。合并乙酸乙酯相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂。粗产物经硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯-石油醚, 体积比1:19), 得到黄色固体7(56.3 mg), 收率为10%。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 13.70 (s, 1H), 7.11 (dt, J = 15.8, 4.1 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.27~6.20 (m, 2H), 5.57 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.28~5.20 (m, 1H), 4.84 (dd, J = 4.0, 1.9 Hz, 2H), 4.24 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.14 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.47 (s, 6H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 182.1, 165.9, 160.0, 158.1, 156.5, 156.4, 155.3, 144.3, 140.8, 138.0, 132.2, 127.3, 123.1, 122.9, 115.9, 112.6, 104.7, 104.1, 99.6, 94.2, 78.1, 67.4, 61.2, 60.9, 28.5, 26.4, 26.1, 18.3, 14.4。ESI-MS m/z : 521.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

2.7 目标化合物8的合成

将盐酸羟胺(13 mg, 0.19 mmol)和氢氧化钠(19 mg, 0.48 mmol)依次加入5 mL干燥丙酮中。室温搅拌10 min后, 将化合物7(50 mg, 0.10 mmol)加入反应中, 与50 $^\circ\text{C}$ 中反应7 h。反应完毕, 减压蒸除溶剂, 加水10 mL, φ =5%稀硫酸溶液调pH至1, 乙酸乙酯(10 mL \times 3)萃取。合并乙酸乙酯相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂。粗产物经硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯-石油醚, 体积比1:4), 得到黄色固体8(20.1 mg), 收率为41%。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 13.62 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.73 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.62 (dt, J = 5.9, 1.5 Hz, 1H), 6.23 (s, 1H), 5.57 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.32~5.25 (m, 1H), 5.24~5.19 (m, 1H), 4.14 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.40 (dd, J = 7.1, 1.4 Hz, 2H), 1.85 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.46 (s, 6H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 182.2, 175.9,

160.2, 158.1, 156.4, 154.9, 154.8, 144.4, 141.4, 138.6, 132.3, 127.4, 123.0, 115.8, 114.0, 106.4, 104.7, 104.1, 102.3, 94.2, 78.2, 61.5, 29.6, 28.5, 26.4, 26.1, 18.3。ESI-HRMS m/z : 493.186 7 $[M+H]^+$ (493.186 7, calcd for $C_{28}H_{29}O_8$)。

2.8 目标化合物 9~11 的合成

以化合物 9 的合成为例。将化合物 1 (100 mg, 0.24 mmol)、衣康酸单甲酯 (54 mg, 0.38 mmol) 和 DMAP (6 mg, 0.05 mmol) 依次加入 5 mL 干燥二氯甲烷溶液中, 然后将环己基碳二亚胺 (68 mg, 0.33 mmol) 的二氯甲烷 (1 mL) 溶液滴入, 常温反应 21.5 h。反应完毕, 减压蒸除溶剂, 水 (10 mL) - 二氯甲烷 (10 mL \times 3) 萃取。合并二氯甲烷相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂。粗产物经硅胶柱层析纯化 (乙酸乙酯-石油醚, 体积比 1:19), 得到黄色固体 9 (65.4 mg), 收率为 51%。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 13.49 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.72 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.57 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.23 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.14 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.49 (s, 2H), 1.83 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.46 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 182.2, 170.8, 163.7, 160.5, 158.1, 156.4, 153.9, 148.9, 146.8, 139.0, 133.0, 132.3, 131.2, 127.4, 123.0, 117.0, 115.7, 110.7, 104.7, 104.1, 94.4, 78.3, 62.0, 52.4, 37.5, 28.5, 26.5, 26.0, 18.3。ESI-HRMS m/z : 557.178 6 $[M+Na]^+$ (557.178 2, calcd for $C_{30}H_{30}NaO_9$)。

同法, 化合物 1 与硫辛酸反应, 得目标化合物 10: 黄色固体, 收率为 23%。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 13.48 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.71 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.23 (s, 1H), 5.57 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.21 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.12 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.60 (p, $J = 7.7$ Hz, 1H), 3.25~3.15 (m, 1H), 3.15~3.07 (m, 1H), 2.66 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.54~2.42 (m, 1H), 1.99~1.88 (m, 1H), 1.82 (s, 3H), 1.78~1.71 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.64~1.57 (m, 2H), 1.46 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 182.2, 170.8, 160.4, 158.0, 156.4, 153.9, 149.0, 146.7, 138.9, 132.2, 127.4, 123.0, 116.9, 115.6, 110.7, 104.7, 104.1,

94.3, 78.2, 61.8, 56.4, 40.4, 38.6, 34.7, 34.1, 28.8, 28.5, 26.5, 26.0, 24.6, 18.3。ESI-HRMS m/z : 597.197 0 $[M+H]^+$ (597.197 5, calcd for $C_{32}H_{37}O_7S_2$)。

同法, 化合物 1 和 2-吡嗪羧酸反应, 得目标化合物 11: 黄色固体, 收率为 32%。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 13.47 (s, 1H), 9.50 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 8.89 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.85 (dd, $J = 2.3, 1.5$ Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.59 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 5.29~5.21 (m, 1H), 4.17 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.47 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 182.2, 161.6, 160.6, 158.1, 156.4, 154.0, 148.8, 148.7, 147.1, 146.6, 144.9, 142.4, 139.4, 132.6, 127.5, 122.8, 117.6, 115.7, 110.6, 104.8, 104.2, 94.4, 78.4, 62.2, 28.5, 26.6, 26.0, 18.4。ESI-HRMS m/z : 515.182 6 $[M+H]^+$ (515.181 3, calcd for $C_{29}H_{27}N_2O_7$)。

2.9 目标化合物 12~13 的合成

以化合物 12 的合成为例。将化合物 1 (100 mg, 0.24 mmol)、碳酸钾 (39.8 mg, 0.29 mmol) 和 2-溴甲基-3, 5, 6-三甲基吡嗪 (51.6 mg, 0.24 mmol) 依次加入至 5 mL 干燥丙酮中, 室温反应 15 h。反应完毕, 减压蒸除溶剂, 水 (10 mL) - 乙酸乙酯 (10 mL \times 3) 萃取。合并乙酸乙酯相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂。粗产物经硅胶柱层析纯化 (乙酸乙酯-石油醚, 体积比 1:9), 得到白色固体 12 (65.0 mg), 收率为 50%。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 13.73 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.73 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.57 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.28 (s, 2H), 5.22 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.11 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.47 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 182.2, 159.9, 158.1, 157.2, 156.4, 155.3, 151.9, 150.0, 149.1, 144.6, 144.4, 137.6, 132.1, 127.2, 123.2, 115.9, 112.4, 104.6, 104.0, 100.0, 94.2, 78.1, 70.7, 61.2, 28.5, 26.3, 26.1, 21.9, 21.5, 20.7, 18.3。ESI-HRMS m/z : 543.248 7 $[M+H]^+$ (543.249 0, calcd for $C_{32}H_{35}N_2O_6$)。

同法, 化合物 1 与 2- (二甲氨基) 溴乙烷氢溴

酸盐反应, 得目标化合物 **13**: 黄色固体, 收率为 56%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.72 (s, 1H), 6.71 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.20 (s, 1H), 5.55 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.25~5.18 (m, 1H), 4.17 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 4.09 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.84 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.36 (s, 6H), 1.83 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.45 (s, 6H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 182.1, 159.8, 158.0, 157.3, 156.3, 155.3, 144.2, 137.3, 131.9, 127.2, 123.3, 115.8, 112.0, 104.5, 103.9, 99.1, 94.1, 78.0, 67.3, 61.0, 57.8, 46.0, 28.4, 26.3, 26.0, 18.3。ESI-HRMS m/z : 502.220 7 [M + Na]⁺ (502.220 0, calcd for C₂₈H₃₃NNaO₆)。

2.10 化合物 14 的合成

化合物 **14** 的合成参考文献 [17]。

2.11 目标化合物 15 的合成

将 **14** (100 mg, 0.19 mmol)、2-溴甲基-3, 5, 6-三甲基吡嗪 (40 mg, 0.19 mmol) 和碳酸钾 (26.3 mg, 0.19 mmol) 依次加入至 5 mL 干燥丙酮中, 常温反应 6.5 h。反应完毕, 减压蒸除溶剂, 水 (10 mL) - 乙酸乙酯 (10 mL \times 3) 萃取。合并乙酸乙酯相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂。粗产物经硅胶柱层析纯化 (乙酸乙酯-石油醚, 体积比 3:17), 得到黄色油状物 **15** (29.6 mg), 收率为 23%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.77 (s, 1H), 6.72 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.56 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.26~5.20 (m, 1H), 5.19 (s, 2H), 4.10 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.52 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 2.40 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.92~1.86 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.74~1.68 (m, 2H), 1.67 (s, 3H), 1.57~1.49 (m, 2H), 1.46 (s, 6H), 1.45~1.39 (m, 2H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 182.2, 173.4, 159.8, 158.1, 157.7, 156.3, 155.4, 151.4, 149.1, 149.0, 144.9, 144.2, 137.2, 131.9, 127.2, 123.3, 115.9, 111.8, 104.6, 104.0, 99.0, 94.1, 78.0, 68.8, 65.1, 61.0, 34.1, 29.8, 28.9, 28.9, 28.4, 26.3, 26.1, 25.9, 24.9, 21.8, 21.6, 20.6, 18.3。ESI-MS m/z : 671.4 [M + H]⁺。

3 目标化合物抑制 PDE4 活性

离心机 (Sigma, 6K15), 涡旋仪 (Vortexgenie), BioPhotomer 分光光度计 (德国 Eppendorf 公司), Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA) 亲和色谱柱, 蛋白质自动纯化系统 (GE Akta Purifier 100), 液体闪烁计数器 (PerkinElmer Tricarb 2910)。所用试剂均为分析纯。

靶标蛋白 PDE4 的表达、纯化及活性测定参照本课题组已发表论文 [17]。所有的化合物均用 DMSO 溶解, 化合物梯度稀释, 加到最终的反应体系中, 保证 DMSO 的浓度应当比 1% 更低。

先将表达质粒 pET15b-PDE4D2 (催化结构域, 86~413) 转化入大肠杆菌 *E. coli* 菌株 BL21 携带重组质粒的 CodonPlus 中。*E. coli* 细胞在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素、20 μ g/mL 氯霉素和 w = 0.4% 葡萄糖的 LB 培养基中在 37 $^{\circ}$ C 下生长至 A_{600} = 0.7, 后加入 0.1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 并在 15 $^{\circ}$ C 培养 20~40 h。重组的 PDE4D2 催化结构域通过 Ni-NTA 亲和柱纯化。经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测试可知 PDE4D2 (催化结构域) 蛋白质的纯度达到 95% 以上。

[³H]-cAMP (20 000~30 000 cpm, GE Healthcare) 溶液中加入缓冲液 (50 mmol/L Tris pH8.0, 10 mmol/L 氯化镁, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇), 待测化合物溶液, 混匀。然后加入已测定浓度的上述纯化的蛋白质溶液, 在 25 $^{\circ}$ C 下静置反应 15 min。加入 0.2 mol/L ZnSO₄ 和 0.2 mol/L Ba(OH)₂ 终止反应, [³H]-AMP 沉淀析出, 而上清液中保留未反应的 [³H]-cAMP。取上清液, 加入 2.5 mL 闪烁液, 振荡混合后用 PerkinElmer 2910 液体闪烁计数器测定。每次测量至少重复 3 次, 至少 8 个浓度。采用非线性回归方法计算 IC₅₀ 值。化合物对 PDE4D2 的抑制活性见表 1。

结果表明, 化合物 **4a**、**4b**、**5**、**6**、**8**、**11** 和 **13** 对 PDE4 有较高的抑制活性 (IC₅₀ < 1 000 nmol/L), 且优于 α -倒捻子素。其中化合物 **5** 的抑制活性最高 (IC₅₀ = 247 nmol/L), 为 α -倒捻子素抑制活性的 5 倍。

在 α -倒捻子素 2, 3 位形成吡喃环的基础上, 与引入长链烷基吡咯烷相比较 [17], 引入脂肪胺 (**4a**、**4b**、**13**)、胍基 (**5**) 同样可提高 PDE4 抑制活性。比较脂肪胺化合物 (**4a**、**4b**、**13**) 的 PDE4 抑制活性可知, 一定长度的烷基链对活性的保持是必需的, 本研究所合成的脂肪胺化合物中以胺基和 α -倒捻

表 1 目标化合物对 PDE4D2 的抑制活性

Table 1 Inhibitory rates of the target compounds towards PDE4D2

Compound	R	IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹)	Compound	R	IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹)
4a		608 ± 22	11		421 ± 22
4b		323 ± 2	12		> 10 000
5		247 ± 4	13		710 ± 70
6		980 ± 40	14		16 ± 3 ^[17]
8		281 ± 29	15		> 1 000
9		> 1 000	α-倒捻子素		1 310 ± 230
10		> 1 000	Rolipram ¹⁾		590 ± 50

1) Rolipram (略利普兰) 为阳性对照药物。

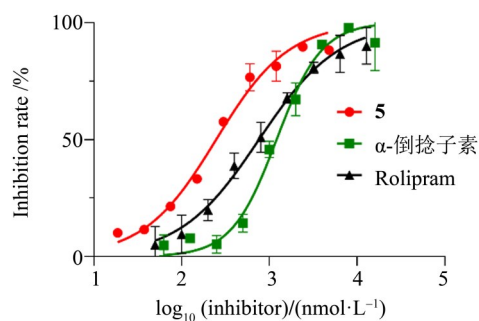


图 5 化合物 5 对 PDE4D2 的抑制曲线

Fig. 5 Inhibition curves of compound 5 towards PDE4D2

子素母核相隔 5 个碳原子时活性最好。与长链脂肪酸相比, 胍基取代物 5 可进一步提高对 PDE4 的抑制活性。对比前期研究中的羧酸类化合物尤其是化合物 14, 胺基类化合物和胍基类化合物活性较弱。但因其烷基链长不一样, 是否因取代基团不同所致尚需进一步研究。

6 位羧酸酯类化合物 (6、9、10、11) 中, 吡嗪

羧酸酯化合物 (11, IC₅₀=421 nmol/L) 的抑制活性是乙酸酯化合物 (6) 的两倍, 而化合物 9、10 则对 PDE4 无活性。与化合物 11 相比, 当吡嗪羧酸酯部分替换为川芎嗪基团 (12) 时, 对 PDE4 无活性, 这可能与甲基的位阻有关。

当 6 位引入羧基时, 抑制 PDE4 活性显著增强 (化合物 8), 但末端羧基成酯后则活性显著下降 (9、15), 可能由于羧基可增强化合物与 PDE4 蛋白催化域中金属离子相互作用所致。化合物 8 (IC₅₀=281 nmol/L) 与前期研究中具有相同链长饱和烷基羧酸 (丁酸) 取代化合物 (IC₅₀=44 nmol/L) 比较^[17], 活性下降近 7 倍, 说明双键不利于抑制 PDE4 活性。与链长为 7 个碳的化合物 14 (IC₅₀=16 nmol/L) 比较, 化合物 8 活性更低, 说明更长的烷基链, 有利于羧基与 PDE4 催化域金属区的相互作用提高活性, 这与文献 [17] 结论一致。

4 结 论

本文在本课题组前期研究的基础上, 进一步对 α -倒捻子素2,3-位闭环产物的6-位酚羟基进行修饰, 设计合成了11个衍生物; 体外PDE4抑制活

性结果显示7个化合物(4a、4b、5、6、8、11和13)的活性强于 α -倒捻子素($IC_{50} < 1\ 000\ \text{nmol/L}$), 其中6位长链烷基胍类化合物5的PDE4抑制活性最强($IC_{50} = 247\ \text{nmol/L}$), 为 α -倒捻子素活性的5倍, 且优于阳性对照药物Rolipram。

参考文献:

- [1] BENDER A T, BEAVO J A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use[J]. *Pharmacological Reviews*, 2006, 58(3): 488-520.
- [2] KERAIVIS T, LUGNIER C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2012, 165(5): 1288-1305.
- [3] CONTI M, RICHTER W, MEHATS C, et al. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(8): 5493-5496.
- [4] LI H, ZUO J, TANG W. Phosphodiesterase-4 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 1048.
- [5] SAKKAS L I, MAVROPOULOS A, BOGDANOS D P. Phosphodiesterase 4 inhibitors in immune-mediated diseases: mode of action, clinical applications, current and future perspectives[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2017, 24(28): 3054-3067.
- [6] BLOKLAND A, HECKMAN P, VANMIERLO T, et al. Phosphodiesterase type 4 inhibition in CNS diseases [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2019, 40(12): 971-985.
- [7] ESKANDARI N, MIRMOSAYYEB O, BORDBARI G, et al. A short review on structure and role of cyclic-3', 5'-adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase 4 as a treatment tool [J]. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, 2015, 4(4): 175-181.
- [8] PINNER N A, HAMILTON L A, HUGHES A. Roflumilast: A phosphodiesterase-4 inhibitor for the treatment of severe chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clinical Therapeutics*, 2012, 34(1): 56-66.
- [9] PEREZ-ASO M, MONTESINOS M C, MEDIERO A, et al. Apremilast, a novel phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor, regulates inflammation through multiple cAMP downstream effectors [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2015, 17: 249.
- [10] KEATING G M. Apremilast: A review in psoriasis and psoriatic arthritis [J]. *Drugs*, 2017, 77(4): 459-472.
- [11] CHEAPE A C, MURRELL D F. 2% Crisaborole topical ointment for the treatment of mild-to-moderate atopic dermatitis [J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2017, 13(5): 415-423.
- [12] LIPWORTH B J. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *The Lancet*, 2005, 365(9454): 167-175.
- [13] WANG M, ZHANG K, QINLAN G U, et al. Pharmacology of mangostins and their derivatives: A comprehensive review [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2017, 15(2): 81-93.
- [14] YIN Q, WU Y J, PAN S, et al. Activation of cholinergic anti-inflammatory pathway in peripheral immune cells involved in therapeutic actions of α -mangostin on collagen-induced arthritis in rats [J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2020, 14: 1983-1993.
- [15] YANG Z, YIN Q, OLATUNJI O J, et al. Activation of cholinergic anti-inflammatory pathway involved in therapeutic actions of α -mangostin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2020, 34: 1-12.
- [16] YAO L, GU X, SONG Q, et al. Nanoformulated alpha-mangostin ameliorates Alzheimer's disease neuropathology by elevating LDLR expression and accelerating amyloid-beta clearance [J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 226: 1-14.
- [17] LIANG J, HUANG Y Y, ZHOU Q, et al. Discovery and optimization of α -mangostin derivatives as novel PDE4 inhibitors for the treatment of vascular dementia [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 63(6): 3370-3380.