

二氢乳清酸脱氢酶抑制剂前药的合成和稳定性及活性评价

单继伟, 齐甜甜, 李洪林, 朱丽丽, 赵振江*

(华东理工大学药学院, 上海市新药设计重点实验室, 上海 200237)

摘要: 本文以课题组前期发现的高活性 DHODH 抑制剂 **A** 为基础, 依据前药合成策略, 对其羧基进行酯化修饰得到 12 个前药分子, 旨在优化化合物 **A** 的稳定性。分子水平抑制活性显示 12 个前药分子中只有 **A1**~**A5** 有微弱活性, 与其作用机制和前药设计相符; 随后评价了 **A1**~**A12** 在有机溶剂甲醇和 pH 为 2.0、9.0 的缓冲液中的稳定性, 结果显示 **A12** 在甲醇中能较好的抑制先导分子内成环, **A1**~**A8** 在酸性条件下易于水解, **A9**~**A12** 在碱性条件易于水解; 最后评价了 **A1**~**A12** 的细胞增殖抑制活性, 其中 **A12** 表现出很好活性, 其 IC_{50} 值为 $0.63 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与布奎那相当。这些结果为开展进一步体内活性研究奠定了基础。

关键词: 二氢乳清酸脱氢酶抑制剂; 前药设计; 药物稳定性; 活性评价

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 03-0410-06

Synthesis, stability and activity of the prodrugs of dihydroorotate dehydrogenase inhibitors

SHAN Ji-wei, QI Tian-tian, LI Hong-lin, ZHU Li-li, ZHAO Zhen-jiang*

(Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: This study was conducted to improve structural instability of a highly active DHODH inhibitor **A** found in our group. Twelve prodrugs were synthesized by modifying the carboxyl group. The enzyme activity test of 12 prodrugs **A1**–**A12** demonstrated that **A1**–**A5** displayed weak inhibitory activity, and **A6**–**A12** displayed no activity, which met the action mechanism of designed prodrug. The structural stability of **A1**–**A12** in methanol and pH 2.0, 9.0 buffers were tested, and the results showed that **A12** could avoid intramolecular ring-formation in CH_3OH , **A1**–**A8** were easily hydrolyzed under acidic conditions, and **A9**–**A12** were inclined to hydrolyze under alkaline conditions. The cell proliferation inhibitory activity of 12 prodrugs were evaluated, in which compound **A12** displayed excellent activity ($IC_{50}=0.63 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) similar to brequinar. These results laid a good foundation for conducting further *vivo* studies.

Key words: dihydroorotate dehydrogenase inhibitor; prodrug design; drug stability; inhibitory activity evaluation

二氢乳清酸脱氢酶 (dihydroorotate dehydrogenase, DHODH) 是嘧啶从头合成的关键酶^[1]。它是一种含铁的黄素依赖性线粒体酶, 对细胞内嘧啶合

成起决定作用。细胞内的嘧啶来源主要有两个途径: 从头合成途径和补救合成途径。从头合成途径所需的氮源来自谷氨酰胺和天冬氨酸, 碳源来自二氧化碳^[2]。补救合成途径是细胞内已有的嘧啶或自身代谢的嘧啶核苷、碱基的重复利用从而保证细胞的正常运转。对于恶性增殖的细胞或癌细胞来说, 补救合成途径生成的嘧啶核苷酸的量无法维持细胞生存, 细胞

收稿日期: 2017-10-12; 修回日期: 2018-01-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21372078).

*通讯作者 Tel: 86-21-64253962, E-mail: zhjzhao@ecust.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0992

只能依赖嘧啶的从头合成途径^[3]。因此,抑制了DHODH的活性即可阻止DNA和RNA的合成,进一步抑制活化细胞的增殖和代谢,从而起到治疗疾病的作用。DHODH已被确证是多种疾病的治疗靶点,如癌症、病毒、自身免疫性疾病(类风湿关节炎和多发性硬化)等^[3]。

1998年,来氟米特(leflunomide,图1)被美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市^[4]。来氟米特是一个含有异恶唑环的前体药物,自身没有生物活性,它的体内代谢产物A771726(特立氟胺,图1)是其药物活性的来源^[5]。来氟米特的作用机制是通过抑制DHODH的活性来抑制细胞呼吸链的电子传递,致使嘧啶合成受阻,阻断了DNA复制,从而导致细胞凋亡^[6]。布奎那(brequinar,图1)是以喹啉为母核的化合物,其作用机制和来氟米特相同,均是作用于CoQ结合通道^[7]。起初布奎那是用来治疗多种人类实体瘤,但是人们在研究过程中发现布奎那有很强的不良反应,因此其在肿瘤方面的研究已被FDA叫停。人们进一步研究发现布奎那可以用来治疗自身性免疫疾病和病毒性感染^[8]。

本课题组前期发现并合成了高活性的DHODH抑制剂:(*E*)-4-(2-氯苯基)-2-(2-羧基苄叉胍基)噻唑(A),化合物A的IC₅₀值为29 nmol·L⁻¹,并表现出较好的开发前景,随后课题组得到了A-DHODH复合物

的晶体结构并阐明其作用机制^[9]。化合物A的羧基可以与酶口袋内部质子化的Arg136的胍基形成很好的氢键相互作用,这是化合物A具有高活性的决定因素。

在进一步的研究中发现化合物A在特定环境下羧基与胍基的NH之间有分子内成环形成哒嗪环B的可能性^[9]。为此,本文以羧基为切入点,依据前药策略设计合成了12个前药分子,并探究了12个前药分子的酶抑制活性、化学环境稳定性和细胞增殖抑制活性,为进一步的前药体内药效研究奠定基础。前药分子的合成路线如合成路线1所示。

结果与讨论

1 前药化合物的设计合成

根据前药设计方法对母体分子A的羧基进行修饰得到一系列酯类化合物,期望改善药物的稳定性等理化性质。

本文先合成了8个不同取代基的脂肪酯A1~A8。为了探究引入苯环对化合物活性的影响,合成了化合物A的苯甲酯A9和苯乙酯A10;参考双酯前药的合成策略,合成了化合物A的特戊酰氧基甲酯A11和异丙氧基羰氧基甲酯A12。

2 前药分子的表征

前药分子的表征见表1。

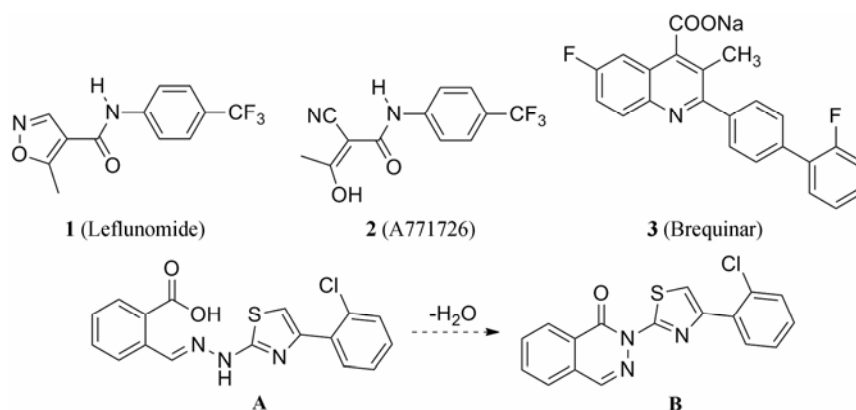
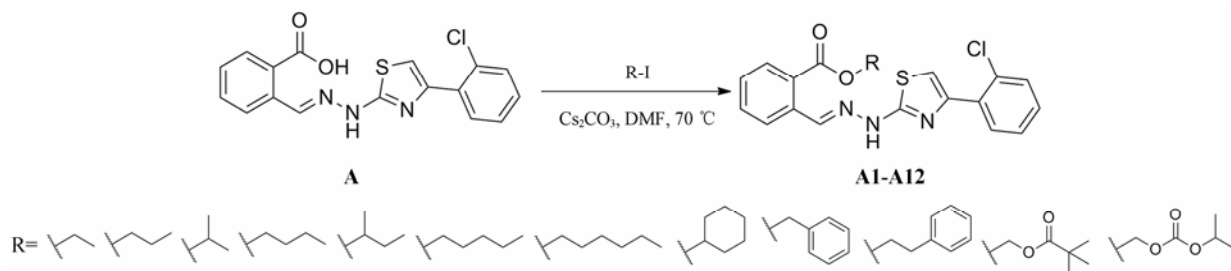


Figure 1 Typical hDHODH inhibitors and compound A



Scheme 1 Synthetic route of prodrugs A1-A12

Table 1 Physical properties and ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), HR-MS data of compounds **A1**–**A12**

| Prodrug | Appearance | Yield/% | mp/°C | ^1H NMR, ^{13}C NMR, HR-MS |
|------------|--------------|---------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A1 | Yellow solid | 57 | 172.2–172.9 | ^1H NMR δ 13.30 (br, 1H), 12.05 (br, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.02 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.91 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.66 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.38–7.34 (m, 2H). ^{13}C NMR δ 167.92, 167.01, 147.26, 141.03, 134.55, 133.23, 131.94, 131.82, 131.06, 130.70, 130.34, 128.80, 128.74, 128.60, 127.22, 125.96, 109.26, 61.23, 14.10. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 386.073 0, Found 386.073 8. |
| A2 | Yellow solid | 58 | 170.1–171.2 | ^1H NMR δ 12.40 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J = 7.6, 2.4$ Hz, 2H), 7.67 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.52 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.46–7.32 (m, 3H), 4.26 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.76 (h, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR δ 167.68, 167.03, 147.63, 140.16, 134.95, 133.6, 132.71, 131.53, 131.22, 130.85, 130.59, 129.52, 129.4, 129.38, 127.73, 126.74, 109.35, 67.06, 21.96, 10.87. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 400.080 8, Found 400.088 8. |
| A3 | Yellow solid | 60 | 159.5–160.3 | ^1H NMR δ 12.40 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.90–7.81 (m, 2H), 7.65 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.55–7.46 (m, 2H), 7.44–7.32 (m, 3H), 5.16 (hept, $J = 6.3$ Hz, 1H), 1.35 (d, $J = 6.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR δ 205.55, 167.21, 166.04, 147.14, 139.59, 134.28, 133.20, 132.07, 131.02, 130.72, 130.35, 130.07, 129.35, 129.00, 128.84, 127.21, 126.11, 108.82, 68.85, 21.53. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 400.080 8, Found 400.086 8. |
| A4 | Yellow solid | 55 | 144.3–145.4 | ^1H NMR δ 12.40 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.00 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.89–7.84 (m, 2H), 7.67 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 7.56–7.48 (m, 2H), 7.42 (td, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H), 7.39–7.33 (m, 2H), 4.30 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.72 (p, 2H), 1.42 (h, 2H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR δ 167.68, 167.02, 147.63, 140.16, 134.95, 133.70, 132.70, 131.53, 131.22, 130.85, 130.58, 129.52, 129.40, 129.37, 127.73, 126.77, 109.35, 65.32, 30.57, 19.23, 14.09. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 414.096 5, Found 414.104 4. |
| A5 | Yellow solid | 52 | 137.4–138.2 | ^1H NMR δ 12.41 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.00 (dd, $J = 7.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.90–7.84 (m, 2H), 7.69–7.64 (m, 1H), 7.56–7.48 (m, 2H), 7.42 (td, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H), 7.39–7.33 (m, 2H), 5.03 (h, $J = 6.3$ Hz, 1H), 1.77–1.63 (m, 2H), 1.33 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR δ 167.71, 166.60, 147.64, 140.09, 134.89, 133.70, 132.64, 131.53, 131.22, 130.86, 130.52, 129.74, 129.52, 129.39, 127.73, 126.67, 109.35, 73.65, 28.66, 19.65, 10.07. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 414.096 5, Found 414.098 8. |
| A6 | Yellow solid | 52 | 98.1–99.0 | ^1H NMR δ 12.39 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.99 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.86 (ddd, $J = 7.8, 6.1, 1.6$ Hz, 2H), 7.66 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H), 7.55–7.48 (m, 2H), 7.42 (td, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H), 7.38–7.33 (m, 2H), 4.29 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.74 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.42–1.30 (m, 4H), 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR δ 167.68, 167.02, 147.63, 140.19, 134.95, 133.70, 132.69, 131.52, 131.22, 130.85, 130.57, 129.52, 129.40, 129.38, 127.73, 126.80, 109.33, 65.60, 28.21, 28.14, 22.29, 14.34. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 428.112 1, Found 428.120 1. |
| A7 | Yellow solid | 59 | 92.3–93.1 | ^1H NMR δ 12.45 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.96–7.87 (m, 2H), 7.72 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.62–7.53 (m, 2H), 7.51–7.37 (m, 3H), 4.34 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.79 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.49–1.28 (m, 6H), 0.92 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR δ 167.56, 166.92, 147.53, 140.10, 134.85, 133.60, 132.56, 131.41, 131.12, 130.74, 130.44, 129.39, 129.30, 129.27, 127.60, 126.71, 109.20, 65.51, 31.27, 28.36, 25.52, 22.36, 14.22. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 442.127 8, Found 442.135 5. |
| A8 | Yellow solid | 50 | 153.4–154.6 | ^1H NMR δ 12.42 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.90–7.83 (m, 2H), 7.66 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.56–7.47 (m, 2H), 7.42 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 7.39–7.33 (m, 2H), 5.00–4.91 (m, 1H), 1.98–1.89 (m, 2H), 1.78–1.68 (m, 2H), 1.64–1.49 (m, 3H), 1.47–1.25 (m, 3H). ^{13}C NMR δ 167.72, 166.37, 140.10, 134.84, 132.62, 131.52, 131.22, 130.86, 130.60, 129.80, 129.52, 129.39, 127.73, 126.67, 109.34, 73.85, 31.44, 25.34, 23.69. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 440.112 1, Found 440.110 1. |
| A9 | Yellow solid | 46 | 168.3–169.2 | ^1H NMR δ 12.41 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.92–7.86 (m, 2H), 7.70–7.65 (m, 1H), 7.56–7.49 (m, 4H), 7.45–7.40 (m, 3H), 7.39–7.34 (m, 3H), 5.38 (s, 2H). ^{13}C NMR δ 166.20, 147.14, 139.61, 135.86, 134.72, 133.20, 132.41, 131.04, 130.73, 130.35, 130.21, 129.01, 128.92, 128.51, 128.37, 128.16, 128.08, 127.22, 126.35, 108.87, 66.59. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 448.080 8, Found 448.088 8. |
| A10 | Yellow solid | 51 | 116.1–117.0 | ^1H NMR δ 12.46 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.71 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.54 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.46–7.34 (m, 6H), 7.32–7.25 (m, 1H), 4.57 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.14 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H). ^{13}C NMR δ 167.58, 166.74, 147.55, 140.03, 138.30, 134.93, 133.61, 132.66, 131.43, 131.13, 130.75, 130.45, 129.41, 129.24, 129.03, 128.78, 127.62, 126.80, 126.67, 109.25, 65.98, 34.61. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 462.096 5, Found 462.104 1. |
| A11 | Yellow solid | 49 | 114.4–115.6 | ^1H NMR δ 12.43 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.03 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.89–7.83 (m, 2H), 7.74–7.68 (m, 1H), 7.56–7.51 (m, 2H), 7.42 (td, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.39–7.33 (m, 2H), 5.98 (s, 2H), 1.18 (s, 9H). ^{13}C NMR δ 167.13, 164.91, 139.23, 135.19, 133.04, 131.04, 130.73, 130.35, 130.31, 129.04, 129.02, 127.24, 127.06, 126.51, 108.96, 80.13, 38.26, 26.47. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 472.102 0, Found 472.109 6. |
| A12 | Yellow solid | 53 | 110.3–111.0 | ^1H NMR δ 12.44 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.04 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.93–7.85 (m, 2H), 7.73 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 7.57–7.51 (m, 2H), 7.43 (td, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H), 7.40–7.33 (m, 2H), 5.96 (s, 2H), 4.85 (hept, $J = 6.2$ Hz, 1H), 1.26 (d, $J = 6.2$ Hz, 6H). ^{13}C NMR δ 167.62, 165.32, 153.25, 147.67, 139.76, 135.83, 133.66, 131.54, 131.23, 131.01, 130.85, 129.54, 129.49, 127.74, 127.30, 126.99, 109.47, 83.02, 73.24, 21.80. HR-MS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 474.081 2, Found 474.088 9. |

3 前药分子的活性评价

3.1 前药分子的酶活 根据表 2 中酶活数据可以看出,除了 A1~A5 有微弱抑制活性,其余 7 个前药均未表现出对 DHODH 的抑制活性。DHODH 的 CoQ 结合口袋可分为两个区域—内部的亲水区和外部的疏水区,化合物 A 的羧基可以与口袋内部亲水区的 Arg136 的质子化胍基形成氢键,这是化合物 A 生物活性的来源。较小体积的烷基酯 A1~A5 的活性较化合物 A 降低明显,原因在于酯基虽然能与 Arg136 形成氢键,却不能形成作用力更强的盐桥作用。随着取代基的增大,前药不能占据 DHODH 的亲水结合口袋,因此 A6~A12 均没表现出对 DHODH 的抑制活性。

Table 2 Activities of compounds A–A12 against DHODH *in vitro* enzyme assays. $^{a}IC_{50}$ values were determined from the results of at least three independent tests, and attempts to determine IC_{50} values were made if the inhibition rate at $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was larger than 50%

| Compd. | Inhibition rate/% | $^{a}IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|-----------|-------------------|-----------------------------------------------|
| A | 94.60 | 0.02 ± 0.00 |
| A1 | 73.08 | 2.34 ± 0.05 |
| A2 | 91.04 | 1.41 ± 0.07 |
| A3 | 75.96 | 1.86 ± 0.02 |
| A4 | 61.82 | 3.53 ± 0.15 |
| A5 | 61.32 | 4.65 ± 0.03 |
| A6 | 29.53 | >50.00 |
| A7 | 28.62 | >50.00 |
| A8 | 36.82 | >50.00 |
| A9 | 30.25 | >50.00 |
| A10 | 34.80 | >50.00 |
| A11 | 20.22 | >50.00 |
| A12 | 21.52 | >50.00 |
| Brequinar | 92.91 | 0.01 ± 0.00 |

3.2 前药分子的稳定性 本文随后测量了 12 个前药分子和化合物 A 在甲醇中的稳定性,主要是为了探究前药对化合物 A 的分子内成环的抑制,结果见表 3。化合物 A 在甲醇中 72 h 内会有 13.87% 的环化产物 B 生成, A1~A11 在 72 h 内也有不同程度的环化,但 A12 未发生任何变化。这表明化合物 A 成不同的酯后在醇体系中的稳定性区别很大。

为了探究前药分子的水解趋势,本文选取 pH 为 2.0、9.0 的两个缓冲体系来探究其在 24 h 内的水解情况(表 4、5)。综合比较两个表中的数据: A1~A8 为化合物 A 的脂肪酯。在酸性条件下,8 个分子在 24 h 时有 7 个完全水解为化合物 A, A7 也仅有 1.26% 未水解,对比 A1~A8 在 pH=9.0 的缓冲体系中分别有

Table 3 The test results of the compound stabilities in methanol. The unchanged compounds at 0 h is 100%

| Compd. | Percent of unchanged compounds/% | | |
|--------|----------------------------------|--------|--------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| A | 98.64 | 97.85 | 86.13 |
| A1 | 91.64 | 82.91 | 81.26 |
| A2 | 92.83 | 85.94 | 83.27 |
| A3 | 92.94 | 84.97 | 82.55 |
| A4 | 93.64 | 86.93 | 84.62 |
| A5 | 95.66 | 87.71 | 84.26 |
| A6 | 89.03 | 75.62 | 72.75 |
| A7 | 90.12 | 88.26 | 82.73 |
| A8 | 89.13 | 85.62 | 81.45 |
| A9 | 90.03 | 88.62 | 82.75 |
| A10 | 88.03 | 74.93 | 70.18 |
| A11 | 94.11 | 87.54 | 85.91 |
| A12 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

Table 4 The test results of the compound stabilities in the buffer of pH = 2.0. The unchanged compounds at 0 h is 100%

| Compd. | Percent of unchanged compounds/% | | | |
|--------|----------------------------------|-------|-------|-------|
| | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
| A1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| A2 | 22.24 | 11.90 | 0.00 | 0.00 |
| A3 | 31.53 | 19.36 | 9.43 | 0.00 |
| A4 | 29.42 | 17.92 | 9.10 | 0.00 |
| A5 | 32.24 | 16.50 | 6.22 | 0.00 |
| A6 | 36.62 | 19.56 | 10.30 | 0.00 |
| A7 | 41.25 | 22.78 | 12.36 | 1.26 |
| A8 | 40.12 | 18.91 | 11.51 | 0.00 |
| A9 | 88.24 | 77.90 | 56.36 | 45.26 |
| A10 | 95.32 | 91.80 | 89.62 | 58.22 |
| A11 | 99.38 | 98.30 | 96.19 | 87.26 |
| A12 | 99.76 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

Table 5 The test results of the compound stabilities in the buffer of pH = 9.0. The unchanged compounds at 0 h is 100%

| Compd. | Percent of unchanged compounds/% | | | |
|--------|----------------------------------|-------|-------|-------|
| | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
| A1 | 76.48 | 58.48 | 39.36 | 17.69 |
| A2 | 80.96 | 66.09 | 47.08 | 25.11 |
| A3 | 88.25 | 76.08 | 60.17 | 36.32 |
| A4 | 82.92 | 69.28 | 57.18 | 35.71 |
| A5 | 85.13 | 70.29 | 55.04 | 33.18 |
| A6 | 81.42 | 67.19 | 49.68 | 26.13 |
| A7 | 78.37 | 63.14 | 45.03 | 23.52 |
| A8 | 83.92 | 71.05 | 52.08 | 26.12 |
| A9 | 65.96 | 47.09 | 37.68 | 19.11 |
| A10 | 55.18 | 33.05 | 14.65 | 3.12 |
| A11 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| A12 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

17.69%、25.11%、36.32%、35.71%、33.18%、26.13%、23.52%、26.12% 的剩余, 表明 **A1**~**A8** 在酸性条件下易于水解为化合物 **A**; **A9**~**A12** 分别为 **A** 的苯甲酯、苯乙酯、特戊酸甲酯、异丙氧基羰基氧基甲酯, 对比两个表中的数据, 发现这 4 个化合物在碱性条件下更易于水解为化合物 **A**。

3.3 前药分子的细胞增殖抑制活性 本文对 12 个前药分子进行了细胞增殖抑制活性的评价。根据表 6 所示: 在 BXPC-3 细胞测试中 **A12** 表现出较好抑制活性, 其 IC_{50} 值为 $0.63 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与阳性对照 brequinar 的 IC_{50} 值 $0.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相当, 同时与先导物 **A** 比较活性也有改善, 这表明化合物 **A12** 可以有效的改善化合物 **A** 的理化性能以便更好发挥细胞抑制增殖作用。化合物 **A12** 为化合物 **A** 的异丙氧基羰基氧基甲酯, 为双酯前药, 其水解可分为两个过程, 先是末端酯键位阻较小易于水解, 随后得到羟甲酯可以自行水解到 **A**。这表明前药 **A12** 在进入肿瘤细胞的过程中, 酯基可以在较好的时机释放出原药。

Table 6 The cell proliferation inhibitory activity of compounds **A**–**A12** in BXPC-3 cell

| Compd. | $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|------------|-------------------------------------------|
| Brequinar | 0.50 ± 0.01 |
| A | 1.52 ± 0.01 |
| A1 | >50.00 |
| A2 | >50.00 |
| A3 | >50.00 |
| A4 | >50.00 |
| A5 | >50.00 |
| A6 | >50.00 |
| A7 | >50.00 |
| A8 | >50.00 |
| A9 | >50.00 |
| A10 | >50.00 |
| A11 | 14.23 ± 0.63 |
| A12 | 0.63 ± 0.01 |

小结

本文基于课题组前期发现的高活性 DHODH 抑制剂 **A**, 依据前药合成策略, 针对母体分子 **A** 的结构特征, 对其活性基团羧基进行修饰得到了 12 个酯类前药。首先对 12 个前药分子进行了酶活测试, 结果显示 12 个前药分子中除了 **A1**~**A5** 有些许活性, 其余 7 个前药分子均没有酶抑制活性, 结果与其作用机制和前药设计符合; 进一步对 12 个前药分子的稳定性做了测试, 发现羧基成不同的酯后可以调控化合

物水解及分子内成环; 对 12 个前药分子开展了细胞增殖抑制活性评价, 结果显示化合物 **A12** 的细胞增殖抑制活性较好, 与布奎那活性相当。为进一步的体内活性研究奠定了基础。

实验部分

实验中用到的化学试剂均为市售分析纯, 纯度符合实验要求, 无需纯化, 可直接使用; 柱色谱硅胶 (300~400 目) 为泰坦科技售出; 薄层硅胶制备板由青岛海洋化工厂生产; 化合物的核磁氢谱 (^1H NMR) 数据和核磁碳谱 (^{13}C NMR) 数据均由 Bruker AM-400 (400 MHz) 测定, TMS 为内标; 化合物质谱数据由 Micromass GCT CA 055 质谱仪测定。

1 合成部分 [前药的合成 (以 **A1** 为例)]

(*E*)-4-(2-氯苯基)-2-(2-乙氧基甲酰基苄基)嘧啶 (**A1**): 称取化合物 **A** (0.2 g, 0.5 mmol) 于 50 mL 两口瓶中, 加入碳酸铯 (0.4 g, 1.1 mmol) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 10 mL, 电磁搅拌下加入碘乙烷 (0.2 g, 1.1 mmol), 加热升温至 70 °C, 反应过程中用 TLC 检测, 反应 5 h 后原料反应完全, 停止加热, 向反应瓶中加入 20 mL 水, 用二氯甲烷 (DCM) 萃取反应液, 静置分层取有机相, 水相用 DCM 萃取 3 次, 合并有机相, 干燥, 旋干溶剂, 过柱纯化, 得到黄色粉末固体 123.0 mg。

2 前药分子的稳定性及体外活性测试

2.1 前药分子的 DHODH 抑制活性 二氢乳清酸脱氢酶 (DHODH) 抑制剂前药的酶活测试方法为 DCIP 比色法, 其作用机制是: 将纯化酶、CoQ 和 DCIP 三者混合后点进 96 孔板内, 25 °C 下孵育 10 min, 随后加入原料二氢乳清酸开始反应。正常态的 DCIP 在 600 nm 处有最大吸收, 而还原态的 DCIP 在 600 nm 处无吸收^[10]。根据这个特性, 可以通过检测反应液在 600 nm 处吸光度的减弱速率大小来衡量二氢乳清酸的氧化程度, 进一步推测化合物的活性强弱。速率越大说明反应进行越快, 酶的受抑制程度越小, 相对应的抑制剂活性就低。实验以 brequinar 为阳性对照, 将 12 个前药分子和母体分子 **A** 共 13 个样品稀释为 8 个浓度梯度, 每组均设 3 个平行组。

2.2 前药分子的稳定性 稳定性测试采用的是 HPLC 测试的方法。稳定性测试的化学环境是甲醇、pH=2.0 的盐酸溶液、pH=9.0 的缓冲液 (氢氧化钠和磷酸氢二钾)。甲醇溶液的配制: 前药分子 **A1**~**A12** 和化合物 **A** 各取 0.5 mg 溶于 1 mL 甲醇中得到甲醇溶液。甲醇溶液分别在 0、24、48 和 72 h 的时间段

HPLC 进样 10 μL , 根据溶液中化合物的峰面积变化, 进而推测其结构稳定性; 酸性溶液和碱性溶液的配制: 称取化合物 1 mg 配制成 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液。母液各取 1 mL 加入 0.5 mL 的缓冲溶液配制样品, 分别在 0、3、6、12 和 24 h 的时间段取样, 最后比较其在缓冲溶液中的峰面积变化, 进而推测其结构稳定性。测试条件: 色谱柱为 Zorbax XDB-C18 (4.6 mm \times 250 mm); 流动相为纯化水 (0.1% TFA) 与 99% 甲醇; 洗脱时间 10 min; 流速为 0.85 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 254 nm。

2.3 前药分子的 BXPC-3 细胞抑制活性 实验选用的细胞为原位胰腺腺癌细胞 (BXPC-3), 采用了 MTT 比色法^[10], 用于检测细胞存活和生长。MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐]是一种黄颜色的染料, 其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。二甲基亚砜 (DMSO) 能溶解细胞中的甲瓚, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。检测化合物对 BXPC-3 细胞的增殖抑制能力, 即对 BXPC-3 细胞的半数致死率。具体操作步骤为使用含有 10% FBS 的 1640 培养基培养细胞, 并以每孔 5 000 个细胞接种至 96 孔板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 孵育 24 h, 分别加入不同浓度梯度的药物, 继续孵育 48 h; 之后每孔加入终浓度为 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液混匀, 最后在 490 nm 波长下测定各孔光吸收值。使用 Origin 软件处理实验数据并计算化合物的 IC_{50} 值。实验过程采用 brequinar 为阳性对照, 每次实验 3 次平行。

References

[1] Singh A, Maqbool M, Mobashir M, et al. Dihydroorotate

- dehydrogenase: an inevitable drug target for the development of antimalarials [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 125: 640–651.
- [2] Jones ME. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis [J]. *Annu Rev Biochem*, 1980, 49: 253–279.
- [3] Liu S, Neidhardt EA, Grossman TH, et al. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents [J]. *Structure*, 2000, 8: 25–33.
- [4] Breedveld FC, Dayer JM. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59: 841–849.
- [5] Baumann P, Mandlweber S, Völkl A, et al. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor A771726 (leflunomide) induces apoptosis and diminishes proliferation of multiple myeloma cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8: 366–375.
- [6] Hansen M, Le Nours J, Johansson E, et al. Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain [J]. *Protein Sci*, 2004, 13: 1031–1042.
- [7] Thomson AW, Lemster B, Fung JJ, et al. Potentiation of the antiproliferative activity of brequinar sodium for murine lymphocytes by exogenous cytidine [J]. *Transplant Proc*, 1993, 25: 704–705.
- [8] Makowka L, Sher LS, Cramer DV. The development of brequinar as an immunosuppressive drug for transplantation [J]. *Immunol Rev*, 1993, 136: 51–70.
- [9] Song W, Li SL, et al. Structure based design of potent human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors as anticancer agents [J]. *Med Chem Commun*, 2016, 7: 1441–1448.
- [10] Diao Y, Lu W, Jin H, et al. Discovery of diverse human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors as immunosuppressive agents by structure based virtual screening [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 8341–8349.