

以 mTOR 激酶为靶点的齐墩果酸衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性研究

宋艳玲*, 李玲, 刘忠岩, 李杰, 张蓬勃

(沈阳化工大学制药与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142)

摘要: 本文以齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 为先导化合物进行结构优化, 通过引入 mTOR 小分子抑制剂的重要药效基团脲基或硫脲基, 同时拼合多种生物活性片段, 设计并合成了 10 个新的衍生物, 其结构经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HR-MS 确证。对所合成的目标化合物以人肝癌细胞 (HepG2) 和人胃癌细胞 (SGC7901) 进行体外抗肿瘤活性测试, 结果表明目标化合物对两种肿瘤细胞的抑制活性均明显强于 OA, 其中 **I₃** 和 **II₃** 对 HepG2 细胞显示出较强的活性 ($\text{IC}_{50} = 9.4$ 和 $5.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。分子模拟对接研究表明, 目标化合物和 mTOR 激酶均具有较好的结合能力。对化合物 **I₃** 和 **II₃** 进行 mTOR 激酶的抑制活性测试, 结果表明化合物 **I₃** 和 **II₃** 对 mTOR 激酶具有较强的抑制作用 ($\text{IC}_{50} = 0.83$ 和 $0.26 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

关键词: 齐墩果酸衍生物; 合成; 分子对接; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)02-0335-08

Design, synthesis and anticancer activity studies of oleanolic acid derivatives targeting mTOR

SONG Yan-ling*, LI Ling, LIU Zhong-yan, LI Jie, ZHANG Peng-bo

(Institute of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China)

Abstract: Ten novel oleanolic acid (OA) derivatives containing urea or thiourea group were designed and synthesized, the chemical structures were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HR-MS. All of these compounds were evaluated for the inhibitory activity against growth of HepG2 and SGC7901 cells. The results showed that compounds **I₃** and **II₃** exhibited significant antitumor activities with IC_{50} of 9.4 and $5.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Molecular docking studies showed that all these compounds exhibit inhibitory ability against mTOR kinase. Compounds **I₃** and **II₃** were further evaluated for the inhibitory activity against mTOR kinase. The results showed that **I₃** and **II₃** exhibited strong inhibitory effect on mTOR kinase with IC_{50} values of 0.83 and $0.26 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: oleanolic acid derivative; synthesis; molecular docking; anti-tumor activity

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 其介导的 PI3K-Akt-mTOR 信号通路在肿瘤细胞增殖、分化、凋亡及蛋白质合成、血管生成过程中发挥重要作用^[1,2]。目前, 通过与 ATP 竞争

mTOR 的催化靶位从而抑制 mTOR 激酶的小分子抑制剂已成为抗肿瘤药物的研究热点^[3-5]。齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 是一种五环三萜类天然产物, 具有独特的手性刚性骨架及良好的生物活性和生物相容性^[6-9]。近年来的研究发现, OA 具有诱导肿瘤细胞分化、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成和肿瘤转移等作用^[10-12], 但分子作用机制尚未明确。也有研究表明 OA 能够抑制人前列腺癌细胞 PC-3 和乳腺癌细胞

收稿日期: 2018-09-30; 修回日期: 2018-10-29.

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (2015020687).

*通讯作者 Tel: 13840387750, E-mail: yanlingsong521@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0890

MCF-7 中激活状态的 mTOR^[13], 并且 OA 对人白血病 HL-60 细胞的 PI3K 表达也具有抑制作用^[14]。因此, mTOR 信号通路可能是齐墩果酸抗肿瘤作用的重要靶点。

通过对 mTOR 小分子抑制剂构效关系研究发现, PKI587、PKI179、PF-05139962、L64 和 NVP-BEZ235 等结构中的脲基是重要的药效基团, 结构式见图 1^[15]。PDB 数据库中 L64 与 mTOR 激酶 (PDB: 3IBE) 的共晶结构分析表明, L64 可插入靶蛋白活性口袋并与周围的氨基酸残基紧密结合, 其结构中脲基上的氧原子和氢原子分别与 LYS83、ASP964 和 ASP841 各形成一个牢固的氢键, 进一步说明脲基是其抗肿瘤作用的重要药效基团 (图 2)。已有的 OA 构效关系研究表明 C-3 位羰基和 C-28 位酰胺化能显著提高抗肿瘤活性^[16]; C-28 位引入哌嗪基团, 其水溶性和生物活性也会明显增强^[17]。本研究以 C-3 位羰基 OA 为先导化合物, 通过 C-28 引入哌嗪基团作为连接臂, 再利用拼合原理引入

脲基及疏水性芳环基团, 设计并合成 5 个衍生物 **I**₁~**I**₅, 通过将脲基置换成硫脲基设计并合成 5 个衍生物 **II**₁~**II**₅, 见图 3。同时对目标化合物进行体外抗肿瘤活性测试和分子模拟对接研究。

结果与讨论

1 化学部分

以 OA 为起始原料, 经过 C-3 位氧化、C-28 位酰氯化反应和取代反应得到重要中间体化合物 **3**, 化合物 **3** 进一步和取代的异氰酸酯或异硫氰酸酯反应, 合成了 10 个齐墩果酸衍生物, 见合成路线 1。目标化合物结构经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HR-MS 确证, 数据见实验部分。

2 分子对接

以 PDB 数据库中 mTOR 为靶点 (PDB 编号: 3IBE), 作为分子对接受体模型。将 3IBE 导入计算机

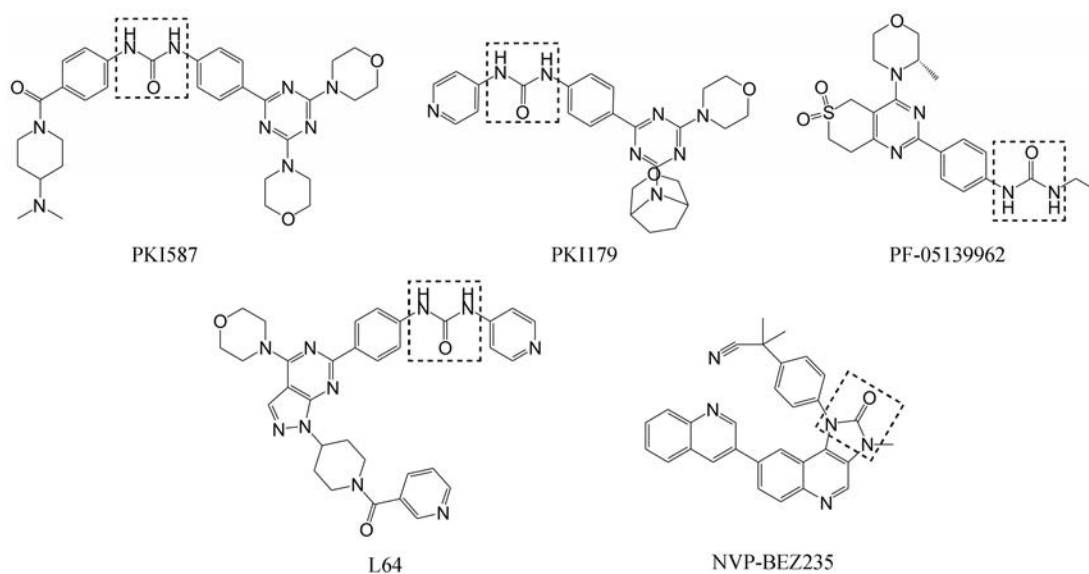


Figure 1 The structures of mTOR inhibitors including urea group

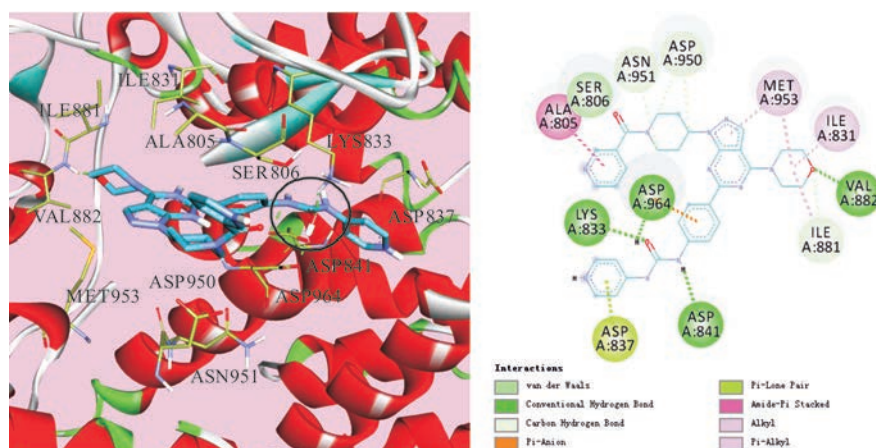


Figure 2 Analysis of the interaction of L64 with 3IBE

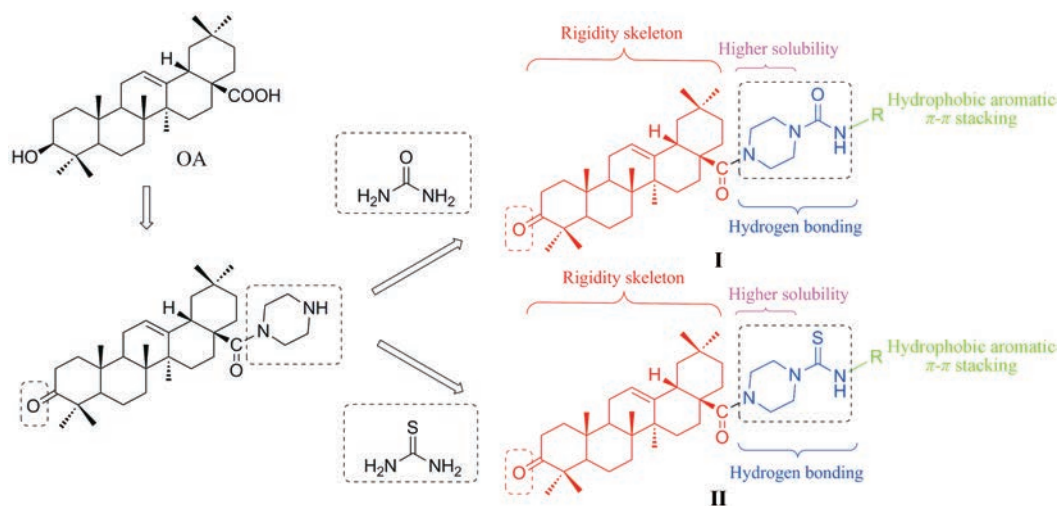
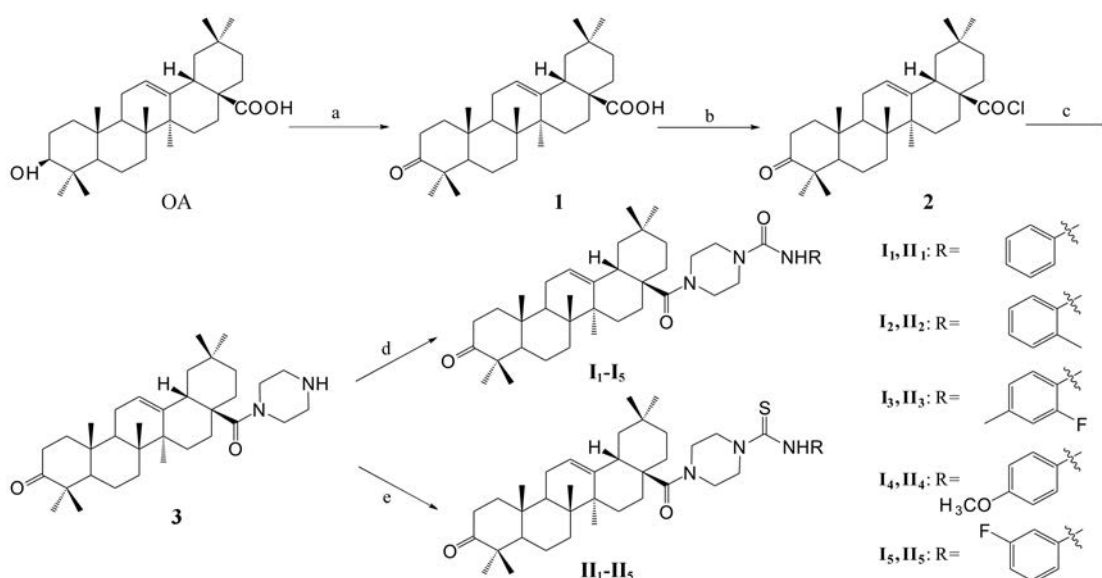


Figure 3 The design of OA derivatives



Reagent and conditions: (a) Jones' reagent, acetone, rt, 2 h; (b) $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , $40\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; (c) Piperazine, CH_2Cl_2 , Py, DMAP, rt, 3 h; (d) Substituted phenyl isocyanates, CH_2Cl_2 , Et_3N , rt, overnight; (e) Substituted phenyl isothiocyanates, CH_2Cl_2 , Et_3N , rt, overnight.

Scheme 1 Synthetic route of target compounds

辅助药物设计软件 Molegro Virtual Docker (MVD 6.0), 根据 cavity 的探测选择最佳对接区域 (center x: 42.33 y: 15.87 z: 32.79, radius: 15)。将受体蛋白中原有配体替换为目标化合物, 利用 Docking wizard 向导设定配体的对接运算次数后, 选择打分函数 MolDock Score [GRID] 与构象搜寻 MolDock SE^[18], 分别对化合物 ($\text{I}_1\sim\text{I}_5$ 和 $\text{II}_1\sim\text{II}_5$) 与受体对接的结合能进行评分, 评分结果见表 1。结果表明, 目标化合物的结合能均明显高于 OA, 其中化合物 I_3 、 II_3 和 II_4 高于 L64。选取 MD score 绝对值最高的分子构象作为与靶点的模拟对接模型, 利用 Discovery studio 4.0 分析配体与氨基酸残基作用的图像。目标化合物均能较好的插入到 mTOR-ATP 催化区域, 并与周围多个氨基酸紧密连接。

Table 1 Comparison of energy scores for different compounds with mTOR

| Compd. | MolDock Score /kcal·mol ⁻¹ | Compd. | MolDock Score /kcal·mol ⁻¹ |
|--------------|---------------------------------------|---------------|---------------------------------------|
| I_1 | -141.137 | II_1 | -133.509 |
| I_2 | -145.932 | II_2 | -148.026 |
| I_3 | -155.361 | II_3 | -157.754 |
| I_4 | -140.963 | II_4 | -154.117 |
| I_5 | -147.076 | II_5 | -141.312 |
| L64 | -140.016 | OA | -108.186 |

对比化合物 I_3 、 II_3 和 L64 与靶蛋白的分子对接图 (图 4), 结果表明化合物 I_3 、 II_3 和 L64 与靶蛋白具有相同的氢键结合位点, 分子结构中的脲基或硫脲基能与靶蛋白氨基酸残基 LYS833\ASP841 和 ASP964 形成氢键。

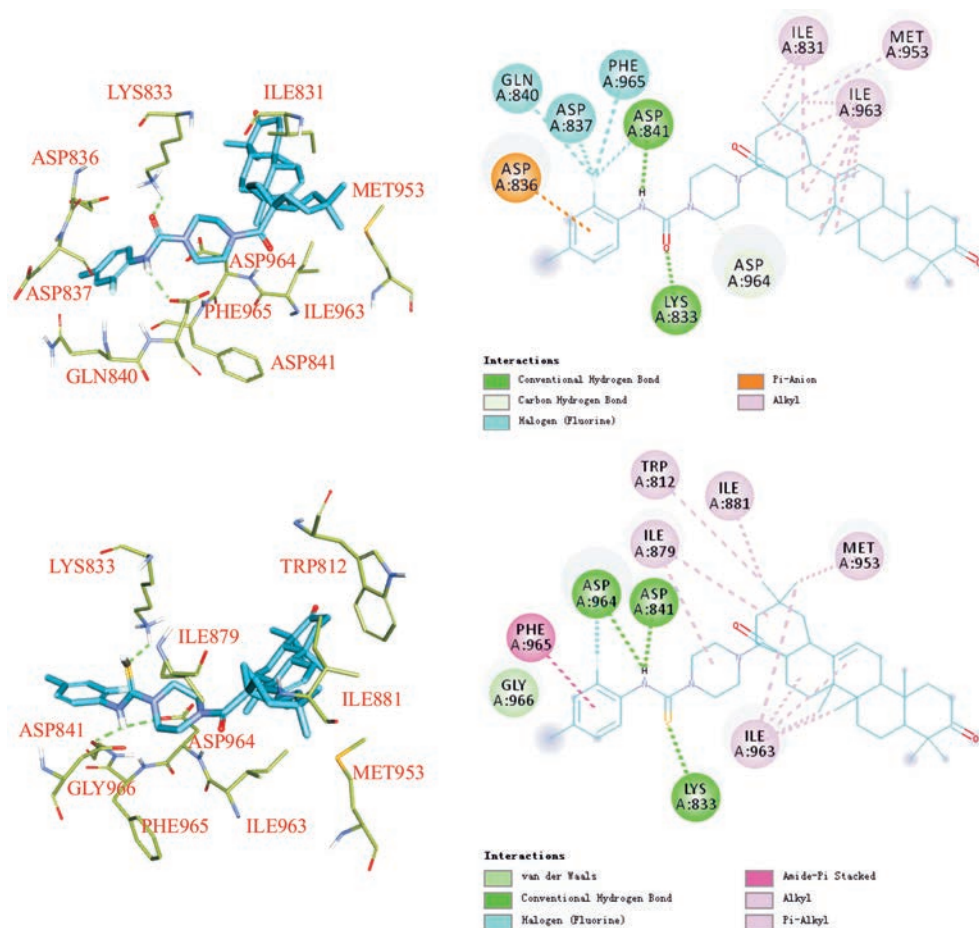


Figure 4 Binding of compounds **I**₃ and **II**₃ to the active site of mTOR

3 生物活性评价

3.1 目标化合物对人癌细胞株的体外增殖抑制实验

选取 HepG2 和 SGC7901 细胞, 采用 MTT 法, 以 AZD8055 作为阳性对照药物, 测试目标化合物 **I**₁~**I**₅ 和 **II**₁~**II**₅ 的体外抗肿瘤活性, 测试结果见表 2。结果表明目标化合物对两种肿瘤细胞的抑制活性均明显强于 OA, 其中 **I**₃ 和 **II**₃ 对 HepG2 细胞显示出较强的活性, IC_{50} 值分别是 9.4 和 $5.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Table 2 Inhibitory activity of the target compounds on HepG2 and SGC7901 cell lines

| Compd. | Inhibition rate /% | | $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | |
|------------------------|--------------------|---------|---|---------|
| | HepG2 | SGC7901 | HepG2 | SGC7901 |
| OA | 19.7 | 15.3 | >50 | >50 |
| I ₁ | 38.6 | 39.1 | 32.8 | 35.2 |
| I ₂ | 43.3 | 40.0 | 30.1 | 36.6 |
| I ₃ | 59.5 | 50.4 | 9.4 | 12.6 |
| I ₄ | 38.1 | 41.2 | 37.5 | 30.4 |
| I ₅ | 41.6 | 40.2 | 35.5 | 39.1 |
| II ₁ | 40.4 | 38.5 | 34.9 | 41.7 |
| II ₂ | 31.5 | 36.9 | 31.5 | 45.8 |
| II ₃ | 63.5 | 53.2 | 5.5 | 10.6 |
| II ₄ | 50.4 | 45.5 | 19.3 | 25.2 |
| II ₅ | 42.5 | 36.9 | 29.5 | 45.5 |
| AZD8055 | 60.3 | 52.8 | 10.7 | 13.5 |

3.2 mTOR 激酶抑制实验

选取化合物 **I**₃ 和 **II**₃ 进行 mTOR 激酶抑制实验, 实验由 Invitrogen 公司完成。结果表明化合物 **I**₃ 和 **II**₃ 对 mTOR 激酶具有较好的抑制作用, IC_{50} 值分别为 0.83 和 $0.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 小结

本文以 OA 为起始原料, 通过在 OA-28 位引入哌嗪基团, 并以此为连接臂, 引入 mTOR 小分子抑制剂的药效基团脲基, 再用硫脲基替换脲基, 设计并合成了 10 个新的 OA 衍生物, 目标化合物结构经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HR-MS 确证。通过计算机辅助药物设计分子对接方法预测目标化合物和 mTOR 激酶的结合能, 结果表明目标化合物的结合能均明显高于 OA, 其中化合物 **I**₃、**II**₃ 和 **II**₄ 的结合能高于化合物 L64, 且化合物 **I**₃、**II**₃ 和 L64 与 mTOR 激酶具有相同的氢键结合位点。采用 MTT 法考察目标化合物的体外抗肿瘤活性, 结果表明目标化合物对人肝癌细胞 (HepG2) 和人胃癌细胞 (SGC7901) 的抑制活性明显高于 OA, 说明以哌嗪作为连接臂, 连入脲基或硫脲基, 其抗肿瘤活性显著增强。mTOR 激酶抑制活性测试结果表明化合物 **I**₃ 和 **II**₃

具有较强的mTOR激酶抑制活性。实测活性与分子模拟对接预测的结果相关性较好,本研究结果对进一步优化设计齐墩果酸衍生物作为mTOR激酶抑制剂的研究具有参考价值。

实验部分

Büchi B-540熔点测定仪; Bruker ARX-600型核磁共振分析仪(DMSO- d_6 为溶剂, TMS为内标); Autospec Ultima-TOF质谱测定仪; WZZ-1S(2s)自动旋光仪; 齐墩果酸(质量分数>98%)购于陕西慈缘生物技术有限公司; 柱色谱200~300目硅胶、薄层色谱硅胶GF254, 购于青岛海洋化工厂; 显色剂为10%硫酸-乙醇溶液; 体外抗肿瘤活性测试所用的RPMI-1640培养基(含10%胎牛血清、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素)、溴化四氮唑盐(MTT)、胰蛋白酶(Trypsin)和标准胎牛血清(FBS)、活性测试所用HepG2和SGC7901细胞由沈阳药科大学药理教研室提供。所有试剂均为市售分析纯或化学纯。

1 化合物的合成

1.1 3-氧代-齐墩果烷型-12-烯-28-羧酸(1)的制备

将齐墩果酸(0.500 g, 1.095 mmol)溶解于30 mL丙酮中, 冰盐浴下缓慢滴加30滴新配置的Jones试剂, 室温反应2 h, TLC监测反应终点。加入异丙醇15 mL淬灭, 继续反应30 min。乙酸乙酯萃取3次, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤3次, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 蒸干溶剂, 得到白色固体0.483 g, 产率为96%, mp 218.7~221.3 $^{\circ}\text{C}$ (文献值mp 220.3~222.1 $^{\circ}\text{C}$ ^[19])。

1.2 3-氧代-齐墩果烷型-12-烯-28-酰氯(2)的制备

将化合物1(0.500 g, 1.020 mmol)溶解于30 mL无水二氯甲烷中, 加热至40 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌下缓慢滴加草酰氯(0.698 g, 5.499 mmol), 回流反应2 h, TLC监测反应终点。减压蒸干溶剂, 加入环己烷(10 mL \times 2)洗涤, 蒸干溶剂, 得到白色固体0.488 g, 产率为97%, 密闭备用。

1.3 化合物(3)的制备

在25 mL茄形瓶中加入哌嗪(1.455 g, 16.889 mmol), 冰盐浴冷却。将化合物2(1.000 g, 2.114 mmol)溶解于10 mL无水二氯甲烷中, 缓慢滴加到降至0 $^{\circ}\text{C}$ 的哌嗪溶液中, 再依次加入无水DMAP(0.013 g, 0.106 mmol)和无水吡啶(0.248 g, 3.135 mmol), 室温反应3 h, TLC监测反应终点。二氯甲烷萃取3次, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤3次, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到淡黄色固体。经硅胶柱色谱分离纯化[洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:150(V/V)]得到白色固体0.864 g, 产率为86%, mp 149.9~151.2 $^{\circ}\text{C}$ 。HR-MS(m/z): 523.402 8 [M+H]⁺; ¹H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ

5.21(t, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-12), 3.38~3.30(m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 2.86~2.78(m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 1.15(s, 3H, CH₃), 1.13~1.11(m, 1H, piperazinyl-H-4'), 1.09(s, 3H, CH₃), 1.04(s, 6H, 2CH₃), 0.93(d, $J = 3.2$ Hz, 3H, CH₃), 0.90(s, 3H, CH₃), 0.78(s, 3H, CH₃); ¹³C NMR(101 MHz, CDCl₃) δ 127.62, 174.55, 151.61, 144.45, 139.87, 129.34, 129.26, 128.58, 123.49, 121.92, 121.85, 55.26, 51.86, 51.67, 49.71, 49.38, 47.60, 47.45, 46.32, 43.85, 43.33, 41.96, 40.15, 39.42, 37.68, 34.29, 33.97, 33.08, 31.15, 30.73, 28.84, 28.45, 27.32, 27.08, 26.12, 23.94, 22.07, 20.86, 20.75, 17.46, 16.22。

1.4 化合物I₁~I₅的制备

1.4.1 化合物I₁的制备 将苯基异氰酸酯(0.054 g, 0.453 mmol)溶于10 mL无水1,2-二氯乙烷中, 置于常温下搅拌; 将溶于5 mL无水1,2-二氯乙烷的化合物3(0.158 g, 0.302 mmol)加入三乙胺(0.183 g, 1.808 mmol), 混合均匀后, 缓慢滴入苯基异氰酸酯中, 常温, 过夜反应, TLC跟踪监测反应终点。二氯甲烷萃取3次, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤3次, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到淡黄色固体。粗品经硅胶色谱纯化分离[洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80(V/V)]得到白色固体0.118 g, 产率为75%, mp 159.6~160.8 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 40.5$ (c 0.50, CHCl₃); HR-MS(m/z): 642.455 2 [M+H]⁺; ¹H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.54~7.50(m, 2H, ph-H-2',6'), 7.39~7.35(m, 2H, ph-H-3',5'), 7.06~7.04(m, 1H, ph-H-4'), 5.24(t, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-12), 3.62~3.54(m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.50~3.42(m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 1.08(s, 3H, CH₃), 0.97(s, 3H, CH₃), 0.91(s, 6H, 2CH₃), 0.86(s, 6H, 2CH₃), 0.70(s, 3H, CH₃); ¹³C NMR(101 MHz, CDCl₃) δ 217.62, 174.55, 151.61, 144.45, 139.87, 129.34, 129.26, 128.58, 123.49, 121.92, 121.85, 55.26, 51.86, 51.67, 49.71, 49.38, 47.60, 47.45, 46.32, 43.85, 43.33, 41.96, 40.15, 39.42, 37.68, 34.29, 33.97, 33.08, 31.15, 30.73, 28.84, 28.45, 27.32, 27.08, 26.12, 23.94, 22.07, 20.86, 20.75, 17.46, 16.22。

1.4.2 化合物I₂的制备 按照I₁的制备方法, 由化合物3(0.158 g, 0.302 mmol)与邻甲苯异氰酸酯(0.060 g, 0.453 mmol)反应。粗品经硅胶色谱纯化分离[洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80(V/V)]得到白色固体0.114 g, 产率为72%, mp 170.5~171.8 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 48.6$ (c 0.55, CHCl₃); HR-MS(m/z): 656.471 4 [M+H]⁺; ¹H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.30(d, $J = 6.2$ Hz, 1H, ph-H-3'), 7.28~7.24(m, 2H, ph-H-5',6'), 7.06~7.04(m, 1H, ph-H-4'), 3.59~3.51(m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.47~

3.39 (m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 2.23 (s, 3H, ph-CH₃), 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.08 (s, 3H, CH₃), 1.03 (s, 3H, CH₃), 1.00 (s, 3H, CH₃), 0.88 (s, 3H, CH₃), 0.84 (s, 3H, CH₃), 0.78 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 217.65, 174.57, 151.66, 144.42, 134.97, 131.85, 130.98, 129.54, 126.13, 123.26, 114.79, 55.24, 51.88, 51.67, 49.73, 49.40, 47.58, 47.47, 46.32, 43.82, 43.33, 41.95, 40.13, 39.40, 37.64, 34.32, 33.97, 33.04, 31.15, 30.78, 28.79, 28.35, 26.88, 26.80, 26.24, 23.93, 21.91, 21.78, 20.65, 17.47, 17.08, 16.17。

1.4.3 化合物 I₃ 的制备 按照 I₁ 的制备方法, 由化合物 3 (0.158 g, 0.302 mmol) 与 2-氟-4-甲基苯基异氰酸酯 (0.068 g, 0.453 mmol) 反应。粗品经硅胶色谱纯化分离 [洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80 (V/V)] 得到白色固体 0.118 g, 产率为 75%, mp 171.3~173.1 °C; [α]_D²⁵ +58.9 (c 0.90, CHCl₃); HR-MS (*m/z*): 674.461 9 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.46 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, ph-H-6'), 7.05 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, ph-H-5'), 6.95 (s, 1H, ph-H-3'), 5.24 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-12), 3.60~3.52 (m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.48~3.40 (m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 2.29 (s, 3H, ph-CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.08 (s, 3H, CH₃), 1.03 (s, 3H, CH₃), 1.00 (s, 3H, CH₃), 0.88 (s, 3H, CH₃), 0.84 (s, 3H, CH₃), 0.79 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 217.58, 174.84, 163.16, 155.63, 144.47, 134.54, 125.38, 123.35, 123.18, 116.54, 116.29, 55.26, 51.67, 51.42, 49.79, 49.64, 47.81, 47.65, 46.28, 43.84, 43.35, 41.94, 39.88, 39.27, 37.62, 34.03, 33.93, 32.75, 31.24, 30.81, 28.79, 28.53, 27.08, 26.64, 26.27, 23.99, 21.91, 21.77, 21.54, 20.82, 17.41, 16.15。

1.4.4 化合物 I₄ 的制备 按照 I₁ 的制备方法, 由化合物 3 (0.158 g, 0.302 mmol) 与对甲氧基苯基异氰酸酯 (0.062 g, 0.453 mmol) 反应。粗品经硅胶色谱纯化分离 [洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80 (V/V)] 得到白色固体 0.120 g, 产率为 76%, mp 165.0~166.4 °C; [α]_D²⁵ +46.5 (c 0.55, CHCl₃); HR-MS (*m/z*): 672.466 2 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.32~7.28 (m, 2H, ph-H-2',6'), 6.95~6.91 (m, 2H, ph-H-3'), 5.25 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-12), 3.78 (s, 3H, ph-OCH₃), 3.61~3.53 (m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.51~3.43 (m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 1.00 (s, 3H, CH₃), 0.99 (s, 3H, CH₃), 0.96 (s, 3H, CH₃), 0.95 (s, 3H, CH₃), 0.87 (s, 6H, 2CH₃), 0.70 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 217.61, 174.87, 159.34, 155.65, 144.45, 131.98, 123.38, 120.34, 120.17, 114.82, 114.73, 56.03, 55.24, 51.79, 51.68,

49.86, 49.73, 47.51, 47.46, 46.34, 43.76, 43.34, 41.95, 39.81, 39.38, 37.65, 34.42, 33.93, 32.76, 31.28, 30.75, 28.80, 28.39, 26.72, 26.70, 26.29, 23.97, 21.77, 21.65, 20.96, 17.48, 16.13。

1.4.5 化合物 I₅ 的制备 按照 I₁ 的制备方法, 由化合物 3 (0.158 g, 0.302 mmol) 与 3-氟苯基异氰酸酯 (0.062 g, 0.453 mmol) 反应。粗品经硅胶色谱纯化分离 [洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80 (V/V)] 得到白色固体 0.099 g, 产率为 63%, mp 158.6~159.2 °C; [α]_D²⁵ +47.6 (c 0.55, CHCl₃); HR-MS (*m/z*): 660.446 2 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.79 (s, 1H, ph-H-2'), 7.41~7.39 (m, 1H, ph-H-5'), 7.35 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, ph-H-6'), 7.03 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, ph-H-4'), 5.23 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-12), 3.60~3.52 (m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.50~3.42 (m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 1.05 (s, 3H, CH₃), 0.97 (s, 3H, CH₃), 0.92 (s, 3H, CH₃), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.85 (s, 6H, 2CH₃), 0.70 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 217.60, 174.58, 163.73, 155.67, 144.64, 137.91, 130.84, 123.51, 117.67, 116.83, 116.44, 55.27, 51.73, 51.68, 49.85, 49.62, 47.69, 47.51, 46.28, 43.79, 43.33, 41.94, 40.15, 39.34, 37.57, 34.26, 33.96, 32.86, 30.72, 30.81, 28.63, 28.35, 26.74, 26.79, 26.28, 23.90, 21.96, 21.72, 20.93, 17.39, 16.17。

1.5 化合物 II₁~II₅ 的制备

1.5.1 化合物 II₁ 的制备 将苯基异硫氰酸酯 (0.061 g, 0.453 mmol) 溶于 10 mL 无水 1,2-二氯乙烷中, 置于常温下搅拌; 将溶于 5 mL 无水 1,2-二氯乙烷的化合物 3 (0.158 g, 0.302 mmol) 加入三乙胺 (0.183 g, 1.808 mmol), 混合均匀后, 缓慢滴入苯基异硫氰酸酯中, 常温, 过夜反应, TLC 跟踪监测反应终点。二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤 3 次, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 得到淡黄色固体。粗品经硅胶色谱纯化分离 [洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80 (V/V)] 得到白色固体 0.118 g, 产率为 75%, mp 134.6~136.4 °C; [α]_D²⁵ +42.3 (c 0.55, CHCl₃); HR-MS (*m/z*): 658.432 8 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.42~7.38 (m, 2H, ph-H-3',5'), 7.33~7.29 (m, 2H, ph-H-2',6'), 7.10~7.08 (m, 1H, ph-H-4'), 5.24 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-12), 3.90~3.82 (m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.52~3.44 (m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 1.08 (s, 3H, CH₃), 0.97 (s, 3H, CH₃), 0.91 (s, 6H, 2CH₃), 0.86 (s, 6H, 2CH₃), 0.70 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 217.57, 182.15, 174.84, 144.68, 138.91, 129.68, 129.54, 128.63, 126.84, 126.65, 56.94, 56.58, 55.67, 50.71, 50.52, 47.86, 47.72, 46.43, 43.84, 43.58, 41.93, 40.18,

39.56, 37.64, 34.33, 33.72, 32.97, 31.20, 30.68, 28.97, 28.43, 27.05, 26.87, 26.19, 23.71, 22.07, 21.83, 20.84, 17.27, 16.11。

1.5.2 化合物 II₂ 的制备 按照 II₁ 的制备方法, 由化合物 **3** (0.158 g, 0.302 mmol) 与邻甲苯异硫氰酸酯 (0.068 g, 0.453 mmol) 反应。粗品经硅胶色谱纯化分离 [洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80 (V/V)] 得到白色固体 0.114 g, 产率为 72%, mp 142.5~143.9 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 49.8$ (*c* 0.58, CHCl₃); HR-MS (*m/z*): 672.446 8 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.23 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, ph-H-3'), 7.18~7.16 (m, 1H, ph-H-5'), 7.16 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ph-H-6'), 7.12~7.10 (m, 1H, ph-H-4'), 5.24 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-12), 3.87~3.79 (m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.48~3.40 (m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 2.25 (s, 3H, ph-CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.08 (s, 3H, CH₃), 1.04 (s, 3H, CH₃), 1.03 (s, 3H, CH₃), 0.93 (s, 3H, CH₃), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.75 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 217.58, 182.26, 174.94, 144.48, 137.02, 136.27, 131.33, 130.18, 127.49, 126.56, 56.92, 56.88, 55.56, 50.81, 50.63, 47.79, 47.60, 46.52, 43.93, 43.58, 42.05, 40.21, 39.36, 37.67, 34.34, 33.92, 32.76, 30.83, 30.68, 28.84, 28.51, 27.09, 26.86, 26.23, 23.97, 21.84, 21.65, 20.63, 18.19, 17.51, 16.18。

1.5.3 化合物 II₃ 的制备 按照 II₁ 的制备方法, 由化合物 **3** (0.158 g, 0.302 mmol) 与 2-氟-4-甲基苯基异硫氰酸酯 (0.076 g, 0.453 mmol) 反应。粗品经硅胶色谱纯化分离 [洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80 (V/V)] 得到白色固体 0.117 g, 产率为 75%, mp 144.2~145.4 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 60.5$ (*c* 0.95, CHCl₃); HR-MS (*m/z*): 690.438 6 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.41~7.39 (m, 1H, ph-H-6'), 7.05 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, ph-H-5'), 6.96 (s, 1H, ph-H-3'), 5.20 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-12), 3.88~3.80 (m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.46~3.38 (m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 2.31 (s, 3H, ph-CH₃), 1.11 (s, 3H, CH₃), 1.00 (s, 3H, CH₃), 0.97 (s, 3H, CH₃), 0.95 (s, 3H, CH₃), 0.89 (s, 6H, 2CH₃), 0.72 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 217.60, 182.36, 174.95, 167.89, 144.70, 134.88, 128.34, 125.26, 123.35, 117.62, 116.56, 56.93, 56.78, 55.65, 50.69, 50.41, 47.88, 47.64, 46.52, 43.95, 43.35, 41.94, 40.27, 39.33, 37.78, 34.36, 34.17, 32.92, 31.26, 30.76, 28.84, 28.46, 27.18, 26.76, 26.54, 24.25, 21.97, 21.62, 21.44, 20.85, 17.46, 16.14。

1.5.4 化合物 II₄ 的制备 按照 II₁ 的制备方法, 由化合物 **3** (0.158 g, 0.302 mmol) 与对甲氧基苯异硫氰酸酯 (0.075 g, 0.453 mmol) 反应。粗品经硅胶色谱纯化

分离 [洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80 (V/V)] 得到白色固体 0.119 g, 产率为 76%, mp 135.8~137.4 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 48.5$ (*c* 0.55, CHCl₃); HR-MS (*m/z*): 688.443 6 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.44~7.40 (m, 2H, ph-H-2',6'), 6.92~6.88 (m, 2H, ph-H-3',5'), 5.25 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-12), 3.88~3.80 (m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.75 (s, 3H, ph-OCH₃), 3.45~3.37 (m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 1.01 (s, 3H, CH₃), 0.99 (s, 3H, CH₃), 0.96 (s, 3H, CH₃), 0.95 (s, 3H, CH₃), 0.87 (s, 6H, 2CH₃), 0.70 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 217.56, 182.49, 174.68, 159.65, 144.59, 127.84, 127.67, 123.40, 114.91, 114.65, 113.54, 56.97, 56.75, 55.98, 55.64, 50.46, 50.18, 47.86, 47.62, 46.43, 43.98, 43.52, 42.05, 40.26, 39.57, 37.88, 34.64, 33.98, 32.61, 31.16, 30.92, 28.89, 28.67, 27.16, 26.78, 26.42, 23.63, 21.64, 21.58, 20.96, 17.44, 16.10。

1.5.5 化合物 II₅ 的制备 按照 II₁ 的制备方法, 由化合物 **3** (0.158 g, 0.302 mmol) 与 3-氟苯基异硫氰酸酯 (0.069 g, 0.453 mmol) 反应。粗品经硅胶色谱纯化分离 [洗脱剂: 甲醇-二氯甲烷=1:80 (V/V)] 得到白色固体 0.098 g, 产率为 63%, mp 136.6~138.2 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 51.5$ (*c* 0.60, CHCl₃); HR-MS (*m/z*): 676.423 6 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.66 (s, 1H, ph-H-2'), 7.38~7.36 (m, 1H, ph-H-5'), 7.21 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, ph-H-6'), 6.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ph-H-4'), 5.23 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-12), 3.87~3.79 (m, 4H, piperazinyl-H-3',5'), 3.46~3.38 (m, 4H, piperazinyl-H-2',6'), 1.08 (s, 3H, CH₃), 0.97 (s, 3H, CH₃), 0.92 (s, 3H, CH₃), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.85 (s, 6H, 2CH₃), 0.69 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 217.52, 182.26, 174.85, 163.57, 144.53, 139.02, 130.95, 123.41, 122.56, 121.85, 116.76, 56.97, 56.65, 55.64, 50.68, 50.49, 47.88, 47.63, 46.25, 43.84, 43.67, 41.94, 40.22, 39.54, 37.61, 34.32, 33.98, 32.67, 31.22, 30.74, 28.91, 28.34, 26.75, 26.65, 26.54, 23.60, 21.97, 21.62, 20.95, 17.55, 16.09。

2 生物活性测试

以 AZD8055 为阳性对照药, 采用 MTT 法对合成的目标化合物进行体外抗肿瘤活性测试, 所选用的肿瘤细胞为人肝癌细胞 HepG2 和人胃癌细胞 SGC7901。将对数生长期肿瘤细胞培养在 96 孔培养板中, 各细胞株每孔接种 5×10^3 个, 每组 3 个复孔, 置于 CO₂ 恒温培养箱中, 培养 24 h 备用。给药组药品浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CO₂ 恒温培养箱中继续培养 72 h。每孔 20 μL ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) MTT 溶液加入, 在 37 °C 下孵育 4 h, 弃上清液, 加入二甲基亚砷 200 μL , 振荡溶解。在酶标

仪波长 570 nm 条件下测定各孔光密度 (OD) 值, 计算所测化合物对细胞的抑制率和 IC_{50} 。实验重复 3 次, 结果取平均值, 计算各组细胞的抑制率, 抑制率 = (对照组 OD 值 - 药物组 OD 值) / 对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

References

- [1] Yang H, Rudge DG, Koos JD, et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation [J]. Nature, 2013, 497: 217-223.
- [2] Dobbin ZC, Landen CN. The importance of the PI3K/AKT/mTOR pathway in the progression of ovarian cancer [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14: 8213-8227.
- [3] Karunakar T, Bandi MR, Lalitha G. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis and molecular docking of ATP-competitive triazine analogs of human mTOR inhibitors [J]. Med Chem Res, 2012, 21: 1207-1217.
- [4] Cho DC. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in malignancy: rational and clinical outlook [J]. BioDrugs, 2014, 28: 373-381.
- [5] Li XC, Song YR, Zhang P, et al. Oleanolic acid inhibits cell survival and proliferation of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* through the PI3K/Akt pathway [J]. Tumor Biol, 2016, 37: 7599-7613.
- [6] Chen L, Kong XW, Lan E, et al. Design, synthesis, and antihepatocellular carcinoma activity of nitric oxide releasing derivatives of oleanolic acid [J]. J Med Chem, 2008, 51: 4834-4838.
- [7] Yan W, Zhang C, Li B, et al. A series of oleanolic acid derivatives as anti-hepatitis B virus agents: design, synthesis, and *in vitro* and *in vivo* biological evaluation [J]. Molecules, 2016, 21: 402-412.
- [8] Gutiérrez RM. Hypolipidemic and hypoglycemic activities of an oleanolic acid derivative from *Malva parviflora* on streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Arch Pharm Res, 2017, 40: 550-562.
- [9] Cheng KG, Su CH, Huang JY, et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of several oleanolic acid uracil/thymine conjugates [J]. MedChemComm, 2016, 7: 972-981.
- [10] Wu J, Bao BH, Shen Q, et al. Novel heterocyclic ring-fused oleanolic acid derivatives as osteoclast inhibitors for osteoporosis [J]. MedChemComm, 2016, 7: 371-377.
- [11] Zhao XM, Liu M, Li DT. Oleanolic acid suppresses the proliferation of lung carcinoma cells by miR-122/Cyclin G1/MEF2D axis [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 400: 1-7.
- [12] Banno N, Kihisa T, Tokuda H, et al. Triterpene acids from the leaves of and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68: 85-90.
- [13] Wang DD, Zhu GM, Zhang PX. Effect of oleanolic acid on the expression of PI3k and Akt genes in leukaemia HL-60 cells [J]. Antitumor Pharm, 2013, 4: 64-65.
- [14] Liu J, Wu N, Ma LN, et al. Oleanolic acid suppresses aerobic glycolysis in cancer cells by switching pyruvate kinase type M isoforms [J]. PLoS One, 2014, 9: e91606/1-e91606/9.
- [15] Tang Y, Gong YS, Xu YG, et al. A review of research on mTOR inhibitors [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2011, 31: 1144-1154.
- [16] Meng YQ, Feng CQ, Zhang LF, et al. Synthesis and anti-tumor activity of oleanolic acid derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 469-474.
- [17] Nie W, Luo JG, Wang XB, et al. Synthesis of new α -glucosidase inhibitors based on oleanolic acid incorporating cinnamic amides [J]. Chem Pharm Bull, 2011, 59: 1051-1056.
- [18] Weng Y, Zhang LJ, Lu Q, et al. Molecular design and computer simulation of small molecule thrombin inhibitor [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2013, 11: 565-568.
- [19] Meng YQ, Nie HH, Wang XC, et al. Synthesis and antitumor activity of oleanolic acid derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 1215-1220.