

具有抗白血病活性的曼尼希碱

冯计周[†], 刘红萍[†], 范莉, 黄敏, 杨大成^{*}

(西南大学化学化工学院, 重庆市高校应用化学重点实验室, 生物有机与药物化学研究所, 重庆 400715)

摘要: 为寻找抗白血病活性化合物, 本研究以对甲基苯乙酮、芳香醛和芳香胺为原料, 借助 Mannich 反应一锅法合成了 33 个曼尼希碱, 其结构经 ¹H NMR、IR、MS 确证; 体外活性测试结果表明, 在 1×10^{-4} mol·L⁻¹ 浓度下, 所有化合物对 P338 肿瘤细胞生长显示抑制作用, 在测试浓度为 1×10^{-8} mol·L⁻¹ 时, 化合物 TM33 抑制活性最好, 其抑制率依然高达 60.3%、半数抑制浓度 IC₅₀ 低至 0.45 nmol·L⁻¹。本研究为新型抗白血病药物的研发提供了新的分子类型。

关键词: 白血病; Mannich 碱; 对甲苯乙酮; 芳香醛; 芳香胺

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0766-07

A serial of Mannich bases with anti-leukemia activity

FENG Ji-zhou[†], LIU Hong-ping[†], FAN Li, HUANG Min, YANG Da-cheng^{*}

(Key Laboratory of Applied Chemistry of Chongqing Municipality, Institute of Bioorganic and Medicinal Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Thirty-three compounds were designed and synthesized directly from three-component, one-pot condensation of 1-(4-methylphenyl)ethanone and aromatic amines with some aromatic aldehydes. The chemical structures of the Mannich bases were confirmed by ¹H NMR, IR and MS. The screening results of bioactivity indicated that all of these title compounds possessed the inhibitory activity at the concentration of 1×10^{-4} mol·L⁻¹. Among them, the compound TM33 displayed the strongest bioactivity with the inhibition percentage of 60.3% against P338 cancer cell line at the concentration of 1×10^{-8} mol·L⁻¹, and the value of the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was as low as 0.45 nmol·L⁻¹. This study suggests a new type of potential anti-leukemia molecules.

Key words: leukemia; Mannich base; 1-(4-methylphenyl)ethanone; aromatic amine; aromatic aldehyde

白血病 (leukemia) 也称作“血癌”, 是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病。病因是由于细胞内 DNA 变异形成的骨髓中造血组织生成大量不成熟、无法正常工作的白细胞, 妨碍骨髓的其他功能, 使正常白细胞、红细胞、血小板减少进而导致其他生理功能失调。2016 年, 美国约有 60 140 人被诊断为白血

病患者, 死于这种恶性肿瘤的有 24 400 人^[1]。在所有白血病患者中, 成年人约占 90%^[2]。白血病在儿科恶性肿瘤的发病率中占居首位, 其死亡率在导致儿童及 20 岁以下成年人死亡的恶性肿瘤中高居首位^[3]。

白血病按照病程进展的速度分为急性和慢性, 主要有慢性骨髓性白血病 (CML)、慢性淋巴性白血病 (CLL)、急性骨髓性白血病 (AML) 和急性淋巴性白血病 (ALL) 4 种类型。Radotinib 是第二代 Bcr-Abl 融合蛋白酪氨酸激酶和血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 抑制剂^[4], 2012 年由韩国食品药品管理局批准上市, 用于 imatinib 难治的“费城染色体阳性 (Ph⁺)”

收稿日期: 2017-01-04; 修回日期: 2017-01-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21542003).

[†]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 13640566978, E-mail: hxydc@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0011

CML 的二线治疗。Omacetaxine mepesuccinate^[5]是从粗榧 (*Cephalotaxus harringtonia*) 中提取的一种生物碱, 也可由三尖杉碱半合成制得, 2012 年获 FDA 批准用于治疗对 2 种以上酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 耐药或不可耐受的 CML 患者。Bosutinib^[6]是一种 TKI, 2012 年获 FDA 批准上市, 主要用于治疗 CML。Ponatinib 是一种多靶点 TKI, 用于治疗成人 CML、Ph⁺型 ALL, 2012 年获 FDA 批准上市, 2013 年 10 月 FDA 警示其具有致死性血凝块和严重血管狭窄风险, 随后要求暂停其销售^[7]。2013 年 FDA 批准 ibrutinib 用于治疗套细胞淋巴瘤 (MCL), 2014 年批准用于治疗 CLL^[8], 是第一种布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK) 抑制剂。Idelalisib 是 2014 年 FDA 批准上市的首个口服、选择性的磷酸肌醇 3-激酶 δ (PI3K δ) 抑制剂, 和 rituximab 联合治疗复发的 CLL^[9], 但其常伴有肝脏毒性、严重腹泻或肠炎、以及肺炎和肠穿孔等不良反应。2016 年 4 月 FDA 批准 venetoclax 上市, 用于治疗 CLL^[10], 成为第一个特异性针对 Bcl-2 蛋白的新型口服靶向药物。这些上市药物的化学结构见图 1。

虽然近年来陆续上市的新药使得白血病在全球范围内的病情得到一定程度的遏制, 但是白血病治疗的最大威胁是由于疾病本身的进化和诱导化疗引起的骨髓抑制以及疾病的耐药及复发, 所以临床上依旧迫切需要具有全新化学结构的白血病治疗新药。

Mannich 碱是很多合成药物及天然产物的关键中间体, 同时还存在于许多生物碱、核苷酸、甾族化合物、肽、抗生素和维生素等化合物中。Mannich 碱具有非甾体雄激素受体调节^[11]、抗糖尿病^[12]、抗结核^[13]、抗真菌^[14]、抗疟^[15]、抗炎^[16]等生物活性, 但是未见 Mannich 碱具有抗白血病活性的文章报道。为了寻找新型抗白血病药物, 期望在具有广泛生物活性的 Mannich 碱中有所发现。作为一种尝试, 设计了含有对甲苯乙酮的 Mannich 碱; 借助高原子经济性的 Mannich 反应, 以对甲基苯乙酮、芳香醛和芳香胺为原料, 一锅法制备了所设计的曼尼希碱 (合成路线 1)。生物活性测试发现, 该类结构中某些分子具有很强的抗白血病活性, 为新型白血病药物的研发提供了新的结构类型。

结果与讨论

1 化合物的合成及鉴定

Mannich 反应是有机化学中构筑 C-C 键的重要反应^[17]。 β -氨基酮型 Mannich 碱的合成, 既有直接合成法也有间接合成法。间接合成法有查尔酮与胺的 Michael 加成、胺交换法、胺盐酸盐法、酮交换法、Schiff 碱与酮的缩合等方法^[18]。直接 Mannich 反应有“可烯醇化的酮和预合成的纯净 Schiff 碱缩合的二步法”以及“醛酮胺三组分一锅煮”两种比较常见的方法^[17]。借鉴本研究室以往的经验^[19, 20], 本研究

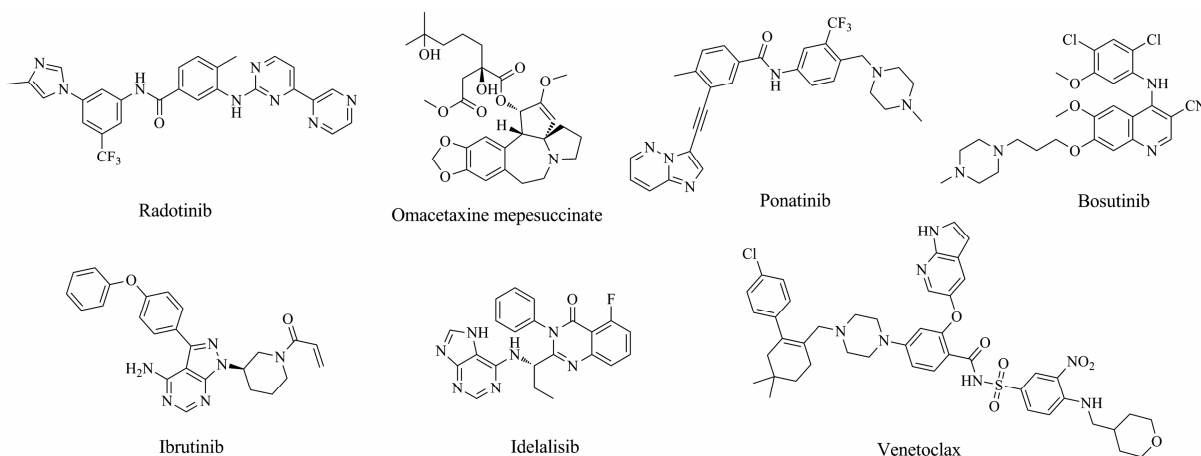
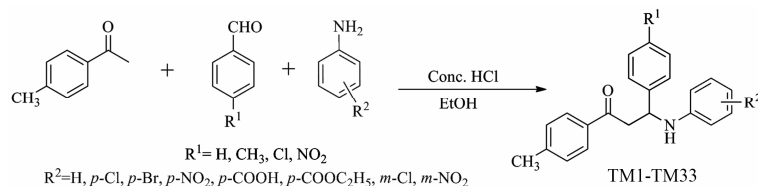


Figure 1 Structures of the marketed anti-leukemia drugs



Scheme 1 Synthesis of the target compounds

以对甲基苯乙酮、芳香醛和芳香胺为原料,借助 Mannich 反应,按照合成路线 1,一锅法合成了 33 个 Mannich 碱(表 1),所有合成的化合物的结构经 $^1\text{H NMR}$ 、IR、MS 确证(表 2,其中, TM17~TM33 的表征信息见文献 21)。IR 结果显示,所有化合物中含有的特征吸收峰在 $3\,410\sim 3\,300\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,710\sim 1\,650\text{ cm}^{-1}$, 分别是 N-H 和 C=O 的伸缩振动。

Table 1 Experimental results of target compounds

Compd.	R ¹	R ²	T/°C	t/h	Yield/%	mp/°C
TM1	NO ₂	<i>p</i> -CH ₃	20.5	28	60.0	138–140
TM2	NO ₂	H	13	26	57.8	132–134
TM3	NO ₂	<i>m</i> -Cl	13	22.1	50.7	134–136
TM4	NO ₂	<i>p</i> -Cl	13	22.3	56.8	146–148
TM5	NO ₂	<i>p</i> -Br	12.5	24.4	60.0	154–156
TM6	NO ₂	<i>p</i> -CO ₂ C ₂ H ₅	15	22.3	57.3	158–160
TM7	NO ₂	<i>p</i> -CO ₂ H	15	19.3	51.9	208–210
TM8	NO ₂	<i>p</i> -NO ₂	15	22	60.5	182–184
TM9	Cl	<i>p</i> -CH ₃	18	24.4	30.0	144–146
TM10	Cl	H	9	22	68.6	100–102
TM11	Cl	<i>m</i> -Cl	9.5	39.6	80.4	122–124
TM12	Cl	<i>p</i> -Cl	9.5	41.1	55.7	126–128
TM13	Cl	<i>p</i> -Br	9–11	41.4	71.1	139–141
TM14	Cl	<i>p</i> -CO ₂ C ₂ H ₅	12	20.7	82.3	138–140
TM15	Cl	<i>p</i> -CO ₂ H	11	23	50.2	196–198
TM16	Cl	<i>p</i> -NO ₂	18	24.6	62.6	146–148
TM17	H	<i>p</i> -CH ₃	32	22	59.9	149–150
TM18	H	H	26	21	62.7	139–140
TM19	H	<i>m</i> -Cl	26	20	61.0	129–130
TM20	H	<i>p</i> -Cl	26	20	73.2	152–153
TM21	H	<i>p</i> -Br	26	20	71.1	147–149
TM22	H	<i>p</i> -CO ₂ C ₂ H ₅	32	20	85.1	144–145
TM23	H	<i>p</i> -CO ₂ H	32	20	85.1	208–210
TM24	H	<i>p</i> -NO ₂	32	24	88.9	157–159
TM25	H	<i>m</i> -NO ₂	32	17	77.8	130–131
TM26	CH ₃	H	32	21	73.0	131–132
TM27	CH ₃	<i>m</i> -Cl	31	18	66.0	134–135
TM28	CH ₃	<i>p</i> -Cl	31	14	60.5	152–153
TM29	CH ₃	<i>p</i> -Br	31	18	58.8	158–159
TM30	CH ₃	<i>p</i> -CO ₂ C ₂ H ₅	28	21	72.0	123–125
TM31	CH ₃	<i>p</i> -CO ₂ H	28	20	75.0	199–200
TM32	CH ₃	<i>p</i> -NO ₂	28	20	96.3	143–144
TM33	CH ₃	<i>m</i> -NO ₂	32	17	77.8	121–123

2 体外对 P338 肿瘤细胞生长的抑制活性

测试了 TM1-TM33 对 P338 肿瘤细胞生长的体外抑制活性(表 3)。在 $1\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 测试浓度下,所有化合物对 P338 肿瘤细胞生长显示抑制作用;在测试浓度为 $1\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,多数化合物表现出较弱的抑制作用,但 TM33 的抑制作用依然很强,高达

60.3%。

从目标化合物的结构来看,分子之间的差别主要是取代基 R¹ 和 R² 的位置、电性和空间体积,目标化合物对 P338 肿瘤细胞生长的抑制活性强弱应该是既取决于分子的整体性质,也取决于取代基 R¹ 和 R²。按照 $\text{IC}_{50}<6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准, R¹ 为 H、NO₂ 及 Cl 的化合物,其生物活性总体比 R¹ 为 CH₃ 的好,但 TM33 是例外。

R¹=NO₂ (TM1~TM8) 时, R² 在对位比在间位生物活性好,如 TM4 (*p*-Cl)>TM3 (*m*-Cl); R² 为 H (TM2) 或者 CH₃ (TM1) 的生物活性好于 R² 为 CO₂C₂H₅ (TM6) 及 NO₂ (TM8) 的化合物,而 R²=*p*-COOH (TM7) 时生物活性居中, $\text{IC}_{50}=5.18\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

R¹=Cl (TM9~TM16) 时, R² 在对位与在间位的生物活性相当,如 TM11 (*m*-Cl) 和 TM12 (*p*-Cl) 的 IC_{50} 分别为 5.84 和 $5.86\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; R² 为 H 或者为强吸电子基团 (*p*-COOH, *p*-NO₂) 对生物活性总体有利,虽然 R²=*p*-CO₂C₂H₅ (TM14) 的生物活性较低。

R¹=H (TM17~TM25) 时, R² 在间位比在对位的生物活性好,如 TM19 (*m*-Cl)>TM20 (*p*-Cl), TM25 (*m*-NO₂)>TM24 (*p*-NO₂); R² 在对位,取代基不同,其生物活性也不同,如 TM22 (*p*-CO₂C₂H₅)>TM21 (*p*-Br)>TM18 (H)>TM24 (*p*-NO₂)>TM20 (*p*-Cl)>TM17 (*p*-CH₃)>TM23 (*p*-CO₂H)。

R¹=CH₃ (TM26~TM33) 时,生物活性普遍较弱,但是 TM33 (R²=*m*-NO₂) 是例外,不仅生物活性好,而且是 33 个化合物中生物活性最好的,测试浓度为 $1\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其抑制率高达 60.3%, IC_{50} 低至 $0.45\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 化合物理化性质和毒性的计算

药物的化学结构决定药物的理化性质,药物的理化性质与药物活性密切相关,是药物类药性的具体体现。因此,对 IC_{50} 值小于 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高活性化合物,使用 Eli Lilly and Company 提供的计算平台 Plexus 进行了理化性质的计算,结果见表 4。 $\text{clog}P$ 是化合物疏水性的重要指标, $\text{clog}P$ 值越大,化合物的疏水性越好;高活性化合物的 $\text{clog}P$ 在 5~6,说明这些化合物脂溶性较强。 tPSA 是化合物内极性原子的总表面积,通常可用于作为药物透膜性的评价指标,目前认为 tPSA 值 ≤ 140 较好^[22];本研究合成的高活性化合物的 tPSA 都小于 80,都有较好的透膜性。

此外,使用凡默谷公司 (PharmoGo) 的毒性预测软件 ADMET Predictor 7.0 预测了高活性化合物的

Table 2 ^1H NMR, MS and IR data of compounds TM1–TM16

Compd.	^1H NMR (CDCl_3 , * $\text{DMSO}-d_6$)	MS	IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$	
			N-H	C=O
TM1	2.19 (3H, s, $-\text{NHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 2.41 (3H, s, CH_3), 3.48 (2H, d, $J=6.2$ Hz, CH_2), 5.05 (1H, t, $J=6.2$ Hz, CH), 6.45 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Ar-H), 6.92 (2H, d, $J=8.1$ Hz, Ar-H), 7.25 (2H, d, $J=7.5$ Hz, Ar-H), 7.63 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 7.80 (2H, d, $J=8.3$ Hz, Ar-H), 8.17 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H)	374 $[\text{M}]^+$	3 397	1 668
TM2	2.41 (3H, s, CH_3), 3.50 (2H, d, $J=6.2$ Hz, CH_2), 5.09 (1H, t, $J=6.1$ Hz, CH), 6.56 (2H, d, $J=7.6$ Hz, Ar-H), 6.73 (1H, t, $J=7.3$ Hz, Ar-H), 7.09 (2H, d, $J=8.2$ Hz, Ar-H), 7.25 (2H, d, $J=6.8$ Hz, Ar-H), 7.64 (2H, d, $J=8.7$ Hz, Ar-H), 7.79 (2H, d, $J=8.2$ Hz, Ar-H), 8.18 (2H, d, $J=8.7$ Hz, Ar-H)	361 $[\text{M}+\text{H}]^+$	3 393	1 668
TM3	2.40 (3H, s, CH_3), 3.47 (2H, d, $J=6.1$ Hz, CH_2), 5.04 (1H, t, $J=6.0$ Hz, CH), 6.35–6.40 (1H, m, Ar-H), 6.49 (1H, t, $J=4.1$ Hz, Ar-H), 6.63–6.68 (1H, m, Ar-H), 6.99 (1H, t, $J=8.0$ Hz, Ar-H), 7.24 (2H, d, $J=8.2$ Hz, Ar-H), 7.60 (2H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H), 7.78 (2H, d, $J=8.3$ Hz, Ar-H), 8.18 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H)	395 $[\text{M}+\text{H}]^+$	3 396	1 672
TM4	2.41 (3H, s, CH_3), 3.49 (2H, d, $J=6.0$ Hz, CH_2), 5.04 (1H, t, $J=6.1$ Hz, CH), 6.45 (2H, d, $J=8.5$ Hz, Ar-H), 7.04 (2H, d, $J=8.5$ Hz, Ar-H), 7.25 (2H, d, $J=7.9$ Hz, Ar-H), 7.61 (2H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H), 7.79 (2H, d, $J=8.1$ Hz, Ar-H), 8.18 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Ar-H)	394 $[\text{M}]^+$	3 396	1 672
TM5	2.41 (3H, s, CH_3), 3.48 (2H, d, $J=6.1$ Hz, CH_2), 5.03 (1H, t, $J=6.0$ Hz, CH), 6.39 (2H, d, $J=8.7$ Hz, Ar-H), 7.17 (2H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H), 7.25 (2H, d, $J=7.9$ Hz, Ar-H), 7.60 (2H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H), 7.79 (2H, d, $J=8.1$ Hz, Ar-H), 8.18 (2H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H)	440 $[\text{M}+\text{H}]^+$	3 396	1 672
TM6	1.33 (3H, t, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.42 (3H, s, CH_3), 3.52 (2H, d, $J=5.3$ Hz, CH_2), 4.23–4.34 (2H, m, $-\text{OCH}_2-$), 5.17 (1H, t, $J=6.2$ Hz, CH), 6.49 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 7.26 (2H, d, $J=8.2$ Hz, Ar-H), 7.61 (2H, d, $J=8.7$ Hz, Ar-H), 7.82 (4H, Ar-H), 8.19 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H)	432 $[\text{M}]^+$	3 389	1 690
TM7*	2.38 (3H, s, CH_3), 3.42 (2H, d, $J=4.1$ Hz, CH_2), 5.22 (1H, s, CH), 6.54 (2H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H), 7.12 (1H, d, $J=7.0$ Hz, NH), 7.34 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Ar-H), 7.60 (2H, d, $J=8.5$ Hz, Ar-H), 7.75 (2H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H), 7.88 (2H, d, $J=8.1$ Hz, Ar-H), 8.20 (2H, d, $J=8.5$ Hz, Ar-H), 12.01 (1H, s, $-\text{COOH}$)	404 $[\text{M}]^+$	3 385	1 689
TM8	2.42 (3H, s, CH_3), 3.56 (2H, d, $J=6.3$ Hz, CH_2), 5.19 (1H, t, $J=5.5$ Hz, CH), 6.50 (2H, d, $J=9.1$ Hz, Ar-H), 7.26 (2H, d, $J=8.1$ Hz, Ar-H), 7.60 (2H, d, $J=8.7$ Hz, Ar-H), 7.78 (2H, d, $J=8.3$ Hz, Ar-H), 8.03 (2H, d, $J=9.2$ Hz, Ar-H), 8.21 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H)	406 $[\text{M}+\text{H}]^+$	3 381	1 682
TM9	2.20 (3H, s, $-\text{NHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 2.40 (3H, s, CH_3), 3.49 (2H, d, $J=6.0$ Hz, CH_2), 4.92 (1H, t, $J=6.5$ Hz, CH), 6.54 (2H, d, $J=8.3$ Hz, Ar-H), 6.92 (2H, d, $J=8.1$ Hz, Ar-H), 7.21–7.28 (4H, m, Ar-H), 7.39 (2H, d, $J=8.5$ Hz, Ar-H), 7.79 (2H, d, $J=8.3$ Hz, Ar-H)	363 $[\text{M}]^+$	3 406	1 668
TM10	2.43 (3H, s, CH_3), 3.55 (2H, d, $J=6.3$ Hz, CH_2), 4.97 (1H, t, $J=6.4$ Hz, CH), 6.47 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 6.79 (1H, t, $J=15.1$ Hz, Ar-H), 7.09–7.47 (8H, m, Ar-H), 7.79 (2H, d, $J=8.2$ Hz, Ar-H)	349 $[\text{M}]^+$	3 393	1 663
TM11	2.42 (3H, s, CH_3), 3.42–3.45 (2H, m, CH_2), 4.93 (1H, t, $J=6.5$ Hz, CH), 6.40–6.44 (1H, m, Ar-H), 6.54 (1H, t, $J=4.2$ Hz, Ar-H), 6.64–6.68 (1H, m, Ar-H), 7.00 (1H, t, $J=8.0$ Hz, Ar-H), 7.23–7.39 (6H, m, Ar-H), 7.80 (2H, d, $J=8.2$ Hz, Ar-H)	384 $[\text{M}]^+$	3 364	1 657
TM12	2.41 (3H, s, CH_3), 3.41–3.45 (2H, m, CH_2), 4.90 (1H, t, $J=6.6$ Hz, CH), 6.48 (2H, t, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 7.02–7.06 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 7.23–7.39 (6H, m, Ar-H), 7.79 (2H, d, $J=8.2$ Hz, Ar-H)	383 $[\text{M}-\text{H}]^-$	3 397	1 665
TM13	2.41 (3H, s, CH_3), 3.45 (2H, t, $J=5.3$ Hz, CH_2), 4.90 (1H, t, $J=6.5$ Hz, CH), 6.43–6.47 (2H, m, Ar-H), 7.15–7.38 (8H, m, Ar-H), 7.78 (2H, d, $J=8.2$ Hz, Ar-H)	429 $[\text{M}+\text{H}]^+$	3 397	1 666
TM14	1.33 (3H, t, $J=7.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.40 (3H, s, CH_3), 3.45 (2H, d, $J=6.0$ Hz, CH_2), 4.22–4.33 (2H, m, $-\text{OCH}_2-$), 5.03 (1H, t, $J=6.1$ Hz, CH), 5.32 (1H, br, NH), 6.50 (2H, d, $J=8.5$ Hz, Ar-H), 7.22–7.37 (6H, m, Ar-H), 7.79 (2H, d, $J=8.1$ Hz, Ar-H)	421 $[\text{M}]^+$	3 389	1 703
TM15*	2.40 (3H, s, CH_3), 3.39 (1H, dd, $J=7.8, 16.2$ Hz, CH_2), 3.44 (1H, dd, $J=4.8, 16.2$ Hz, CH_2), 4.87–4.91 (1H, m, CH), 6.42 (2H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H), 7.16 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 7.24 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Ar-H), 7.28 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Ar-H), 7.34 (2H, d, $J=8.3$ Hz, Ar-H), 7.78 (2H, d, $J=8.1$ Hz, Ar-H)	394 $[\text{M}+\text{H}]^+$	3 393	1 666
TM16	2.41 (3H, s, CH_3), 3.49 (2H, d, $J=6.0$ Hz, CH_2), 5.05 (1H, t, $J=5.8$ Hz, CH), 6.51 (2H, d, $J=9.1$ Hz, Ar-H), 7.24–7.33 (6H, m, Ar-H), 7.78 (2H, d, $J=8.1$ Hz, Ar-H), 8.01 (2H, d, $J=9.0$ Hz, Ar-H)	394 $[\text{M}]^+$	3 364	1 684

毒性 (表4)。TOX-hERG 定量预测化合物的心脏毒性, 规定 $\text{TOX-hERG} \leq 6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 才是正常值; 根据表 4 中的预测结果可知, 高活性化合物的 $\text{TOX-hERG} < 6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。TOX-RAT 预测化合物的急性毒性, 以半数致死浓度 LC_{50} (大鼠动物模型) 表示, 要求大多数药物分子的 LC_{50} 预测值都应该 $\geq 300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 高活性化合物 $\text{LC}_{50} > 300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 除 TM15 的 $\text{LC}_{50} = 394 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 外, 其他化合物的 $\text{LC}_{50} > 1 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, TM33 的 LC_{50} 高达 $2 069 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。TOX-BRM-Rat (大鼠动

物模型) 和 TOX-BRM-Mouse (小鼠动物模型) 预测化合物的致癌性, 大多数药物分子半数致癌浓度 TD_{50} 的预测值应该 $\geq 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $\geq 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 而高活性化合物 TOX-BRM-Rat 的 $\text{TD}_{50} > 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, TOX-BRM-Mouse 的 $\text{TD}_{50} > 70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 可能没有相关毒性或者毒性较小。TOX-MUT-Risk 是对化合物致突变性预测结果进行综合打分, 对于大多数药物分子, $\text{TOX-MUT-Risk} \leq 2$; 预测结果显示, 高活性化合物 TOX-MUT-Risk 符合规定范围, 致突变性较低。

Table 3 Inhibition of compounds TM1-TM33 against P388 cancer cell line

Compd.	Inhibition at the given concentration (mol·L ⁻¹)/%					IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Compd.	Inhibition at the given concentration (mol·L ⁻¹)/%					IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
	1×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁸			1×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁸	
TM1	99.1	40.6	4.1	3.2	10.3	3.97	TM18	96.6	14.5	1.6	0	0	6.52
TM2	98.4	16.1	14.1	11.8	18.1	3.47	TM19	97.9	5.4	14.5	0.9	0.7	5.56
TM3	99.9	13.9	0	0	0	5.86	TM20	93.9	8.3	1.3	0	0	7.11
TM4	98.6	30.4	9.1	9.5	0	4.91	TM21	91.1	27.2	24.9	6.3	2.3	5.82
TM5	96.6	41.1	2.8	0	0	5.30	TM22	95.9	9.5	12.7	9.6	1.8	5.40
TM6	58.8	21.8	21.1	8.6	4.6	62.07	TM23	78.1	0	0	0	0	12.60
TM7	100.0	16.8	6.0	4.2	2.7	5.18	TM24	83.8	30.5	24.1	16.4	6.2	6.67
TM8	55.9	11.6	9.4	0	0	94.03	TM25	97.7	15.5	12.8	6.9	4.8	5.02
TM9	96.6	7.4	11.8	2.5	0	5.96	TM26	84.1	3.0	0	0	0	10.05
TM10	100.0	19.0	10.1	5.3	4.8	4.80	TM27	15.7	12.5	20.2	4.8	2.5	>100
TM11	99.4	21.7	0	0	0	5.84	TM28	73.7	16.4	0	0	0	19.27
TM12	99.4	16.1	4.4	0	0	5.86	TM29	74.6	6.7	16.2	2.6	0	15.35
TM13	98.2	14.0	11.1	0	0	5.89	TM30	28.0	12.9	5.6	0.9	0.1	>100
TM14	70.5	10.9	3.7	0	0	23.49	TM31	90.9	6.3	6.6	0	0	7.73
TM15	99.0	21.9	11.4	7.1	4.4	4.82	TM32	59.3	32.9	6.8	0	0	50.59
TM16	97.4	42.0	14.4	0	0	4.76	TM33	97.9	96.5	90.2	85.2	60.3	0.000 45
TM17	85.0	31.2	2.5	0.5	0.4	9.45							

Table 4 Physicochemical properties and toxicity prediction data. *OM: Omacetaxine mepesuccinate

Compd.	clogP	tPSA	hERG/mol·L ⁻¹	RAT/mg·kg ⁻¹	BRM-Rat/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	BRM-Mouse/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	MUT-Risk	TOX-Risk
TM1	5.67	72.24	5.45	2 049	24	121	1	2
TM2	5.15	72.24	5.64	1 990	41	87	1	2
TM4	5.76	72.24	5.83	1 845	46	141	1	3
TM10	5.82	29.10	5.61	2 000	50	94	0	3
TM15	5.47	66.40	5.38	394	190	369	0	2
TM16	5.76	72.24	5.58	2 156	30	139	1	3
TM33	5.67	72.24	5.64	2 069	43	73	0	3
Ibrutinib	3.63	99.16	5.25	789	7	11	0	3
Idelalisib	3.32	99.16	5.11	1 054	101	47	0	2
Venetoclax	6.76	172.03	6.19	114	149	574	2	3
Radotinib	4.48	108.29	5.64	1 614	1	22	1	5
OM*	1.88	123.99	5.00	498	3	134	0	2
Ponatinib	4.97	65.77	5.39	663	3	9	0	4
Bosutinib	4.09	82.88	6.14	796	14	28	3	5

对于大多数药物, TOX-Risk ≤ 3, 高活性化合物也是符合要求的。值得高兴的是, 相较于表 4 中的上市药物分子, 本研究的高活性化合物的毒性可能更小。

4 结论

本研究设计合成了 33 个对甲基苯乙酮、芳香醛和芳香胺的 Mannich 碱; 生物活性测试发现, TM33 活性最好, IC₅₀ 低至 0.45 nmol·L⁻¹; 毒性预测显示, TM33 比多数上市药物的毒性低。因此, TM33 可作为新型抗白血病先导化合物进一步研究。

实验部分

所有实验材料除另外说明外, 均为市售 AR 或

CP。PK-6000FT-IR 仪 (美国 Mattson 公司产品, KBr 压片); ACE-200 核磁共振仪 (Bruker, USA; TMS 为内标); ESI 质谱仪 (1946B, Agilent); 电热熔点测定仪 (英国生产, 未经校正)。

1 目标化合物 TM1~TM33 的合成通法

于圆底烧瓶中加入芳香胺 (0.1 mol)、芳香醛 (0.1 mol)、无水乙醇 150 mL, 室温搅拌 10 min 后, 加入对甲基苯乙酮 (0.1 mol) 和催化量的浓 HCl, 然后于环境温度搅拌反应。TLC 监测反应结束后, 将反应液冷却过夜, 抽滤析出的固体, 并用无水乙醇洗涤。所得固体悬浮于 180 mL 95% 乙醇中, 室温搅拌 1.5 h, 用饱和 NaHCO₃ 中和溶液至碱性, 抽滤, 用少

量无水乙醇洗涤滤饼, 粗品经乙醇/水混合溶剂 (体积比 1:1) 重结晶, 得到纯品。

2 生物活性测试——四氮唑盐 (MTT) 还原法

取对数生长期细胞, 调整适当浓度接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL , 悬浮生长细胞 (P338) 接种后即加入待测化合物。每孔加入 10 μL (被测化合物母液用 RPMI1640 培养液稀释至所需浓度), 每个浓度设 3 个平行孔, 并设一组不加药而加等体积培养液的癌细胞悬液为阴性对照组, 同时以阳性对照药物设立一组阳性对照。加药后细胞置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24~48 h 后, 加入 MTT 20 μL , 继续培养 4 h, 离心倾去上清液, 加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测定 570/630 nm 双波长吸光度 (A) 值, 以 Excel Forecast 函数计算 IC_{50} 值。

致谢: 感谢本学院老师在红外、质谱、核磁共振测试中提供支持和帮助, 上海国家新药筛选中心在活性测试方面提供帮助。

References

- [1] The Leukemia & Lymphoma Society. Leukemia [EB/OL]. <http://www.lls.org/http%3A//llsorg.prod.acquia-sites.com/facts-and-statistics/facts-and-statistics-overview/facts-and-statistics#Leukemia>. 2016/2016-12-17.
- [2] National Cancer Institute. A Snapshot of Leukemia [EB/OL]. <http://www.cancer.gov/researchandfunding/snapshots/leukemia>. 2014-06-18/2016-12-17.
- [3] The Leukemia & Lymphoma Society. Blood cancer facts 2015–2016 [EB/OL]. http://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/PS13%20-%20FactsCard2015_2016_english.pdf. 2016-06-01/2016-12-17.
- [4] Bronson J, Black A, Murali Dhar TG, et al. “Radotinib (Anti-cancer)” [J]. *Annu Rep Med Chem*, 2013, 48: 523–524.
- [5] Wu L, Li X, Su J, et al. Effect of low-dose cytarabine, homoharringtonine and granulocyte colony-stimulating factor priming regimen on patients with advanced myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndrome [J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50: 1461–1467.
- [6] Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30: 3486–3492.
- [7] The U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA Drug Safety Communication: FDA asks manufacturer of the leukemia drug Iclusig (ponatinib) to suspend marketing and sales [EB/OL]. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm373040.htm>. 2013-10-31/2016-12-17.
- [8] Azvolinsky A. FDA Approves Ibrutinib for Chronic Lymphocytic Leukemia [EB/OL]. <http://www.cancernetwork.com/news/fda-approves-ibrutinib-chronic-lymphocytic-leukemia>. 2014-02-13/2016-12-17.
- [9] Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370: 997–1007.
- [10] The U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves new drug for chronic lymphocytic leukemia in patients with a specific chromosomal abnormality [EB/OL]. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm495253.htm>. 2016-04-11/2016-12-17.
- [11] Zhou C, Wu G, Feng Y, et al. Discovery and biological characterization of a novel series of androgen receptor modulators [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154: 440–450.
- [12] Zhou ZW, Yan JF, Tang XM, et al. Synthesis and preliminary evaluation of antidiabetic activity for β -amino ketone containing isoxazole moiety [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2010, 30: 582–589.
- [13] Ji L, Long QX, Yang DC, et al. Identification of Mannich base as a novel inhibitor of mycobacterium tuberculosis isocitrate by high-throughput screening [J]. *Int Biol Sci*, 2011, 7: 376–382.
- [14] Karthikeyan MS, Prasadasad DJ, Poojar YB. Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14: 7482–7489.
- [15] Lopes F, Capela R, Goncaves JO, et al. Amidomethylation of amodiaquine: antimalarial *N*-Mannich base derivatives [J]. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45: 7663–7666.
- [16] Liu D, Yu W, Li J, et al. Novel 2-(*E*)-substituted benzylidene-6-(*N*-substituted aminomethyl)cyclohexanones and cyclohexanols as analgesic and anti-inflammatory agents [J]. *Med Chem Res* 2013, 22: 3779–3786.
- [17] Yu ZM, Liao XL, Wei JY, et al. Advances in the Mannich reaction of aromatic aldehydes, aromatic ketones with aromatic amines [J]. *J Org Chem Res (有机化学研究)*, 2016, 4: 61–68.
- [18] Tang GX, Yan JF, Fan L, et al. Synthesis of novel β -amino ketones containing a *p*-aminobenzoic acid moiety and evaluation of their antidiabetic activities [J]. *Sci China Chem*, 2013, 56: 490–504.
- [19] Yang DC, Fan L. The Mannich reaction of 4-aminobenzoic acid and acetophenone with aromatic aldehydes [J]. *J Southwest China Norm Univ (Nat Sci)* (西南师范大学学报 (自然

- 科学版)), 1996, 21: 585–589.
- [20] Yang DC, Yan JF, Xu J, et al. Synthesis and investigation on antidiabetic activity of 4-(1-aryl-3-oxo-5-phenylpentylamino) benzenesulfonamide [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 66–71.
- [21] Yang DC, Zhang GL, Yang Y, et al. The Mannich reaction of 4-methylacetophenone with aromatic aldehydes and aromatic amines [J]. Chem Res Chin Univ (高等学校化学学报), 2000, 21: 1694–1696.
- [22] Lu SY, Jessen B, Strock C, et al. The contribution of physicochemical properties to multiple *in vitro* cytotoxicity endpoints [J]. Toxicol In Vitro, 2012, 26: 613–620.

· 消息 ·

《药学报》英文刊 (Acta Pharmaceutica Sinica B) 被 PubMed Central 全文数据库收录

《药学报》英文刊 (Acta Pharmaceutica Sinica B, APSB) 已被 PubMed Central (PMC) 全文数据库收录, 目前 2014 年和 2015 年发表的文章已经上线, 读者可以使用 PubMed 检索。

PubMed Central (PMC) 是由美国国家生物技术信息中心 (National Centre for Biotechnology Information, NCBI) 于 2000 年 2 月建立的生命科学期刊文献数据库, 保存生命科学期刊主要研究论文全文, 免费供公众使用。NCBI 同时是 GenBank 和 PubMed 的创立者, PMC 的所有全文在 PubMed 中都可以检索, 检索结果可以在网上免费获得全文。

PMC 目前已收录全文论文 370 万篇。收录期刊 5 549 种, 其中完整收录的期刊 1 767 种 (即期刊所有论文均被收录, 但在时间上有可能滞后), 收录 NIH 资助论文的期刊 317 种 (即至少收录了发表在这些期刊上的有 NIH 资助的论文), 提供选择性论文的期刊 3 465 种 (即选择性地提供少量论文的期刊); 《药学报》英文刊属于完整收录的期刊。