

天然蕈毒碱类似物 1',2'-二-O-异亚丙基二氧乙基异噁唑啉衍生物的合成及其对 Cdc25B 和 CD45 体外抗癌和白细胞共同抗原活性筛选

穆赫塔尔·伊米尔艾山*, 萨特瓦尔迪·赫力力, 王 婷

(新疆大学化学与化工学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要: 从蘑菇中提取的活性物质捕蝇蕈 (muscimol)、环丝氨酸 (cycloserin) 和鹅膏蕈氨酸 (ibotenic acid) 都含有异噁唑啉药效团结构, 本文以捕蝇蕈 (蕈毒碱) 为结构模型, 采用分子重组法, 通过 1,3-偶极环加成反应, 合成了 3-(1',2'-二-O-异亚丙基二氧乙基)-5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并 [3',4'-d] 异噁唑啉的蕈毒碱类似物, 其结构经 UV-Vis、¹H NMR、IR 和元素分析进行了表征。对合成的化合物进行了体外药物活性筛选, 发现结构中的药效团作为潜在的非共价 DNA 结合体, 显示了不同程度的抗癌、抗炎及免疫性疾病活性。初步体外抗癌活性结果表明, 当样品浓度为 20 μg·mL⁻¹ 时, 化合物 3a~3o 对细胞分裂周期 25B 磷酸酯酶 (Cdc25B) 的抑制率为 56.99%~99.94%, 甚至当样品浓度为 5 μg·mL⁻¹ 时, 除了 3f、3h、3i、3m、3o 无活性外, 其余化合物的抑制率仍为 66.85%~99.84%, 值得进一步研究。此外, 体外白细胞共同抗原 (CD45) 活性实验结果表明, 当样品浓度为 20 μg·mL⁻¹ 时, 除了 3i 无活性外, 其余化合物对白细胞共同抗原 CD45 蛋白酪氨酸磷酸酶 A 具有良好的抑制活性, 其抑制率为 63.08%~92.09%。这些具有活性的目标化合物是潜在的 Cdc25B 和 CD45 蛋白酪氨酸磷酸酶 A 抑制剂, 在癌症、炎性及免疫性疾病治疗方面具有很好的应用前景。

关键词: 1',2'-二-O-异亚丙基二氧乙基异噁唑啉; 合成; 体外抗癌活性; 白细胞共同抗原活性

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 04-0585-07

Synthesis of 1',2'-O-isopropylidenedioxyethyl isoxazoline derivatives of natural muscarinic analogs and screening its anti-cancer and leukocyte common antigen activity on Cdc25B and CD45 *in vitro*

IMERHASAN Mukhtar*, HELIL Setiwaldi, WANG Ting

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Muscimol, cycloserin and ibotenic acid which are extracted from mushroom contain isoxazole pharmacophore structure. By using muscarinic structure as a model compound and molecular recombination method, we synthesized muscarinic analogues compounds 3-(1',2'-di-O-isopropylidenedioxyethyl)-5-aryl-3a,6a-dihydro-4,6-dioxypyrrolino[3',4'-d]isoxazoline derivatives through 1,3-dipolar cycloaddition reaction. The structures of the target compounds were confirmed by UV-Vis, ¹H NMR, IR and elemental analysis. The drug activities of obtained compounds were screened *in vitro*. The pharmacophore in the structure is a potential non-covalent DNA binding, the compounds have anticancer activity and the leukocyte common antigen activity in a different extent. The preliminary results of *in vitro* anticancer test suggest that the inhibitory rates of compounds 3a–3o to Cdc25A phosphatase in cell division cycle ranged from 56.99%–99.94%; at the test

收稿日期: 2017-12-25; 修回日期: 2018-03-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21462043, 21062019).

*通讯作者 Tel: 13999251745, E-mail: imerhasan@xju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1280

concentration of $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, **3f**, **3h**, **3i**, **3m**, **3o** were no inhibition activity, and the rest of the compounds shows moderate to good excellent inhibition rate from 66.85% to 99.84%, even at the concentration as low as $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. At the test concentration of $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, except compound **3i**, the rest compounds' inhibition activity of against leukocyte common antigen (LCA) CD45 protein tyrosine phosphatase A, are 63.08%–92.09%. These active compounds are potential inhibitors against Cdc25A and CD45 protein tyrosine phosphatase A, which have great application prospects in the treatment of cancers and Inflammatory and immune diseases.

Key words: 1',2'-*O*-isopropylidendioxyethyl isoxazole; synthesis; *in vitro* anticancer activity; leukocyte common antigen activity

第一个从蘑菇捕蝇蕈 (瓢蕈) 中提取的蝇蕈醇 (蕈毒碱)^[1]是天然存在的异噁唑的蝇蕈醇 (muscimol)、环丝氨酸(cycloserin)、鹅膏蕈氨酸 (ibotenic acid) 等 3 个衍生物之一, 其中蝇蕈醇 (muscimol) 具有较强的精神治疗作用。蘑菇中的有效成分蕈毒碱以异噁唑环为基本结构单元, 对其结构进行修饰所合成的类似物, 作为一类重要的杂环化合物, 不仅成了合成中的重要中间体, 且表现出了广谱药理活性和生物活性。其主要的药理活性有止痛、消炎、抗癆、抗惊厥、抗菌^[2]和治疗心血管病^[3]、阿尔茨海默病^[4]等; 异噁唑类化合物也是农药化学家研究的热点, 现在有很多已被开发成杀菌剂、除草剂、杀虫剂等多种农用化学品。腈氧化合物与烯烃的 1,3-偶极环加成反应是制备异噁唑啉的一种非常有用的方法^[5–11]。近年的研究表明, 将几个不同骨架的杂环引入同一分子中所形成的稠杂环类化合物会表现出更多样的生物活性^[12–14], 如抑制细胞分裂周期磷酸酯酶 Cdc25A (cell division cycle25A)、抑制人白血病细胞的生长和抗炎症性及免疫性疾病活性^[15]、抗-HIV^[16]等。因此对异噁唑类化合物的结构改进研究一直没有停止过。细胞分裂周期蛋白 Cdc25 (cell division cyclin 25) 是调控细胞周期的重要蛋白, 主要有 Cdc25A、Cdc25B 和 Cdc25C 3 种亚型。大量研究证实, 在多种人类肿瘤中细胞分裂周期 25B 磷酸酶 (Cdc25B) 是过度表达的, 因此, Cdc25B 被认为是新的很有潜力的抗癌治疗药物靶点。高活性、高选择性的小分子抑制剂能为研究 Cdc25B 在细胞通路中的生物功能和作用机制提供工具化合物, 为抗肿瘤药物研究提供药物先导物。CD45 分子是第一个被确认的典型的受体型蛋白酪氨

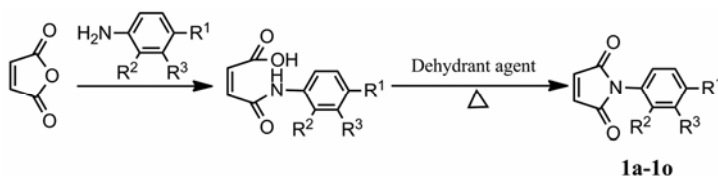
酸磷酸酶 A (receptor protein tyrosine phosphatase alpha, RPTPA), 是白细胞共同抗原, 而在非造血组织细胞无表达, 并且它几乎在所有的有核白细胞表面均有表达^[17], 抗 CD45 抑制剂的研制为白血病的靶向治疗提供新的手段, 因此, 设计、合成并开发小分子 Cdc25B 和 CD45 抑制剂已经引起了人们广泛的关注。为了更好的研究具有生物活性的两个杂环聚集在同一个分子而形成的二元稠杂环化合物的构效关系, 本研究通过 *N*-取代苯基马来酰亚胺与 α -氯代-2,3-*O*-异亚丙基-*D*-甘油醛酐的 1,3-偶极环加成反应得到了 15 种新的 3-(1',2'-二-*O*-异亚丙基二氧乙基)-5-芳基-3a,6a-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并 [3',4'-*d*] 异噁唑啉衍生物, 未见文献报道, 化合物结构经 UV、¹HNMR、IR 和元素分析确证。原料及目标化合物的合成见合成路线 1~3。

结果与讨论

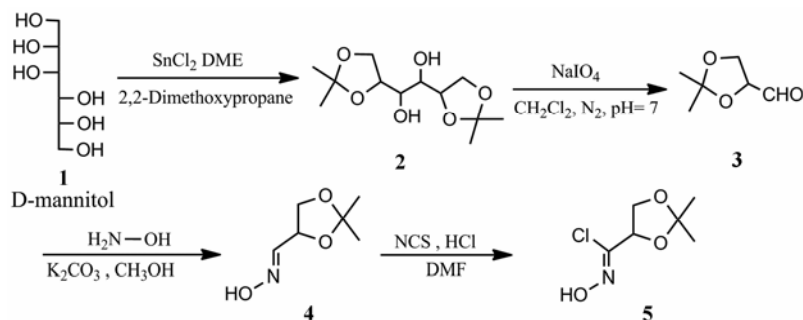
1 化合物的合成

参照文献^[12,18]合成 *N*-取代苯基马来酰亚胺 (**1a**~**1o**); 参照文献^[18–21]以 *D*-甘露醇 (**1**) 为起始原料分别合成 1,2:5,6-二-*O*-2-异亚丙基-*D*-甘露醇 (**2**)、2,3-*O*-异亚丙基甘油醛 (**3**)、2,3-*O*-异亚丙基甘油醛酐 (**4**) 和 α -氯代-1',2'-二-*O*-异亚丙基甘油醛酐 (**5**)。

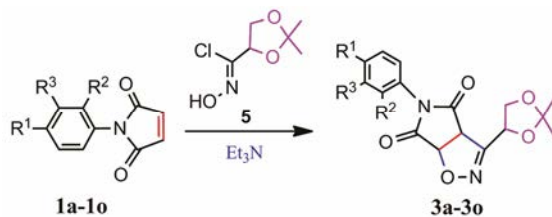
在三乙胺的作用下, *N*-芳基马来酰亚胺作为亲偶体, α -氯代-1',2'-二-*O*-异亚丙基甘油醛酐作为偶极体, 通过 1,3-偶极环加成反应, 得到以异噁唑啉环为基本环的二元稠杂环化合物 **3a**~**3o**。由实验可以看出, 亲偶体 *N*-芳基马来酰亚胺, 因其取代基不同, 导致与偶极体的环加成反应速度不同。理论上, 亲偶体结构



Scheme 1 Synthetic route of **1a**–**1o**



Scheme 2 Synthetic route of 5



	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
R ¹ :	H	CH ₃	OCH ₃	Cl	Br	F	H	CO ₂ H	H	H	H	NO ₂	H	H	H
R ² :	H	H	H	H	H	H	Br	H	CH ₃	NO ₂	H	H	Cl	H	CO ₂ H
R ³ :	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	CH ₃	H	H	Cl	H

Scheme 3 Synthetic route of 3a-3o

中存在 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{OCH}_3$ 等供电子基时, 致使 *N*-芳基马来酰亚胺环碳-碳双键上电子云密度增高。另外由于偶极体带有二氧杂环的强吸电子基团, 使氧化脲上电子密度减少, 增强偶极体的极性, 有利于与偶极体的 1,3-偶极环加成反应。若亲偶体结构中存在 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 和 $-\text{Br}$ 等吸电子效应的基团, 致使 *N*-芳基马来酰亚胺环碳-碳双键上电子云密度降低, 不利于加成反应的进行。但反应结果表明, 芳环上的取代基供电子性越强, 反应速度越慢。而亲偶体的芳环上连有 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 和 $-\text{Br}$ 等吸电子基团, 反应速度快且产率高。推测原因可能是 α -氯代脲上二氧乙基推电子效应的影响, 偶极体的碳正离子不易生成, 所以当亲偶体苯环上取代基为吸电子基时, 反应速率快; 当苯环上取代基为给电子基时, 反应速率慢。同时, 我们对不同位置的同一取代基的 *N*-芳基马来酰亚胺进行实验, 结果表明, 取代基在邻位的异噁唑啉反应产率较低, 可能是因为邻位位阻大, 不利于反应进行。

2 波谱数据分析

在 $^1\text{H NMR}$ 中, 化合物 3a~3o 在 δ 1.50 和 1.10 是化合物中异亚丙基的甲基氢的吸收; 化合物 3a~3o 在 δ 7.27~4.26 和 5.64~3.95 处出分别现了由桥头 6a-H 和 3a-H 氢的相互偶合而产生的双重峰, 偶合常数为 10.8~4.0 Hz 和 11.6~4.8 Hz, 在 δ 8.41~6.83 处出现芳环的吸收峰。若分子中带有 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、

$-\text{X}$ 等较强吸电子的芳基时, 双杂环联合环系中桥头两个氢的相互偶合而产生的两个双重峰的位置向低场移。在 IR 谱中, 化合物 3a~3o 在 3109~3036 cm^{-1} 范围内出现了芳氢的吸收峰, 在 2986~2923 cm^{-1} 范围内出现了饱和碳氢的吸收峰, 在 1711~1745 cm^{-1} 范围内出现了酰胺的 $\nu_{\text{C=O}}$ 的伸缩振动, 在 1635~1604 cm^{-1} 范围内出现了 $\nu_{\text{C=N}}$ 的吸收峰, 在 1411~1380 cm^{-1} 和 695~622 cm^{-1} 出现异噁唑啉上 O-N 的特征吸收, Ar-O-C 键的特征吸收峰分别在 1173~1199 cm^{-1} 和 1257~1302 cm^{-1} 范围内。

为了研究供电子基和吸电子基的引入对化合物紫外吸收的影响, 对 3a~3o 进行了测定。化合物 3a 的 λ_{max} 为 252 nm。以 3a 为参照, 当分子中含有 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 等吸电子基的芳基时, 由于 π - π 共轭产生更强的共轭体系, λ_{max} 发生较大范围的红移。若苯环上取代基为卤素, 体系产生 p- π 共轭, λ_{max} 红移。实验数据表明, 卤素基团在对位时, λ_{max} 红移 34~35 nm; 卤素基团在邻间位时, λ_{max} 未发生红移。若苯环上对位取代不同供电子基 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCH}_3$, λ_{max} 均发生蓝移。

3 生物活性和构效关系

经国家新药筛选中心对化合物 3a~3o 进行细胞分裂周期磷酸酯酶 Cdc25B 抑制活性测试和白细胞共同抗原 CD45 抑制活性测试。表 1 是目标化合物 3a~3o 和正砷酸钠对 Cdc25A 磷酸酯酶的抑制率。阳性

Table 1 Inhibition rate of target compounds **3a–3o** against Cdc25B phosphatase. ^aThe positive control is sodium vanadate Na₃VO₄, concentration (μmol·mL⁻¹)

Compd.	Inhibition rate/%		Compd.	Inhibition rate /%	
	20 μg·mL ⁻¹	5 μg·mL ⁻¹		20 μg·mL ⁻¹	5 μg·mL ⁻¹
3a	97.98	73.24	3i	56.99	31.63
3b	99.27	98.19	3j	99.94	99.24
3c	98.19	78.18	3k	99.36	66.85
3d	99.43	93.53	3l	99.78	99.84
3e	99.25	94.39	3m	85.66	39.57
3f	86.36	38.44	3n	99.60	99.34
3g	99.20	98.87	3o	88.59	29.37
3h	73.6	16.84	Na ₃ VO ₄	9.821 ± 0.838 ^a	

对照物为正矾酸钠 (Na₃VO₄), 其 IC₅₀ 为 9.821 ± 0.838 μmol·mL⁻¹。若化合物 **3a~3o** 分子中带有 -Br、-Cl、-NO₂ 等吸电子基团时, 该类化合物具有较强的 Cdc25B 抑制活性。同一个较强吸电子的基团如 -Cl, 在苯环的不同位置时, 间位取代的 Cdc25B 抑制活性大于邻位取代衍生物; 同一个较强供电子的基团如 -CH₃, 在苯环的不同位置时, 间位取代的 Cdc25B 抑制活性大于邻位取代衍生物; 不同间位取代的基团, 基团吸电子性越强, Cdc25B 抑制活性越强。

表 2 是目标化合物 **3a~3o** 和正矾酸钠对 CD45 蛋白酪氨酸磷酸酶 A 的抑制率。阳性对照物为正矾酸钠 (Na₃VO₄), 其 IC₅₀ 为 18.88 ± 1.41。14 个化合物都具有一定的生物活性。若化合物 **3a~3o** 苯环上取代基为吸电子基团, 其生物活性要高于取代基为供电子基的化合物。同一个较强吸电子的基团如 -Cl, 在苯环的不同位置时, 间位取代的 CD45 抑制活性大于邻位取代衍生物; 同一个较强供电子的基团如 -CH₃, 在苯环的不同位置时, 间位取代的 CD45 抑制活性大于邻位取代衍生物。

4 小结

本文合成的 3-(1',2'-二-*O*-异亚丙基乙基)-5-芳

Table 2 Inhibition rate of target compounds **3a–3o** against CD45 protein tyrosine phosphatase A. The concentration of target compounds is 20 μg·mL⁻¹. ^aExperimental concentration of sodium vanadate Na₃VO₄ (μmol·mL⁻¹). *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

Compd.	Inhibition rate/%	Compd.	Inhibition rate/%
3a	67.65 ± 7.01	3i	48.01 ± 0.09
3b	79.89 ± 6.01	3j	89.26 ± 6.18
3c	63.64 ± 3.73	3k	82.79 ± 3.66
3d	77.73 ± 4.32	3l	92.09 ± 5.11
3e	84.22 ± 6.95	3m	63.08 ± 1.08
3f	72.22 ± 3.22	3n	81.17 ± 10.51
3g	83.52 ± 9.89	3o	71.18 ± 12.99
3h	75.02 ± 12.6	Na ₃ VO ₄	18.88 ± 1.41 ^a

基-**3a,6a**-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并 [3',4'-*d*] 异噻唑啉衍生物 (**3a~3o**), 对细胞分裂周期 25B 磷酸酯酶 (Cdc25B) 和体外白细胞共同抗原 (CD45) 活性筛选结果表明, 如芳环上带有吸电子基团则对 Cdc25B 磷酸酯酶和 CD45 蛋白酪氨酸磷酸酶 A 的抑制活性大于带有推电子基团芳环的衍生物, 如芳环上带有吸电子基团, 特别是对位 -Br、-NO₂ 取代的衍生物对 Cdc25B 磷酸酯酶和 CD45 蛋白酪氨酸磷酸酶 A 的活性具有较显著的抑制作用。

实验部分

核磁共振仪: Inona-400 (内标 TMS, 溶剂 CDCl₃ 与 DMSO-*d*₆); 红外光谱仪: Bruker Equinox 55 FT-IR (KBr 压片); 元素分析仪: Perkin-Elmer 2400 型; 熔点仪: Buchi B-540 型 (温度计未经校正); 紫外可见分光光度计: 岛津 UV-2450。TLC 选用青岛海洋化工厂硅胶 GF₂₅₄, 加 0.5% CMC 溶液自制, 未经活化直接使用, 于紫外灯下观察或碘蒸气显色。柱色谱硅胶 100~200 目, 展开剂: *V* (二氯甲烷): *V* (甲醇) = 8:2~9:1。试剂均为分析纯, 三乙胺、DMSO、DMF 用前重蒸处理。

1 3-(1',2'-二-*O*-异亚丙基二氧乙基)-5-芳基-**3a,6a**-二氢-4,6-二氧代氮杂茂并 [3',4'-*d*] 异噻唑啉衍生物 **3a~3o** 的合成

将 13 mmol α-氯代-1',2'-二-*O*-异亚丙基甘油醛肟 (**5**) 和 14.3 mmol (1.1 eq.) *N*-芳基马来酰亚胺 **1a~1o** 溶于二氯甲烷 (或者 DMF) 中, 在室温电磁搅拌下, 将 13 mmol 三乙胺用 30 mL 二氯甲烷 (或者 DMF) 稀释后滴加至反应瓶中, 滴加速度 30 s 一滴, 反应搅拌 48~90 h [用 TLC 鉴别反应, *N*-芳基马来酰亚胺的斑点变小或消失, 展开剂为: *V* (二氯甲烷): *V* (甲醇) = 9:1], 反应完毕后, 在反应液中加入 1 mol·L⁻¹ 盐酸至中性, 分离有机层后依次用 10% NaHCO₃ (3×30 mL)、H₂O (3×20 mL) 洗涤, 有机层用硫酸钠干燥, 浓缩, 真空干燥, 所得到的固体用石油醚重结晶, 柱色谱分离 [洗脱剂: *V* (二氯甲烷): *V* (甲醇) = 8:2~9:1], 得相应化合物 **3a~3o**。

3a: 淡褐色固体, 444 mg, 产率 29.6%。mp 154~155 °C; *R*_f = 0.52 (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1); [*α*]_D²⁰ -5.56 (*c* 0.036, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max}: 252、283 nm; IR (KBr) *v*: 3067、2986、1714、1617、1598、1499、1456、1386、1290、1196、1072、756、695 cm⁻¹; ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.41~7.36 (m, 5H, ArH), 5.54 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, 6a-H), 5.18 (dd, *J* = 14.0, 12.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.99 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 3a-H), 4.27 (dd, *J* =

14.0, 6.8 Hz, 1H, 2'-H_a), 4.11 (dd, $J = 14.0, 6.8$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.47, 1.45 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₆N₂O₅: C 60.75, H 5.10, N 8.86; Found: C 61.04, H 4.82, N 8.52.

3b: 棕红色固体, 371 mg, 产率 37.1%。mp 144~146 °C; $R_f = 0.57$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9 : 1); $[\alpha]_D^{20} +2.38$ (*c* 0.042, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 249、283 nm; IR (KBr) ν : 3036、2924、1712、1619、1514、1454、1387、1287、1171、1039、775、663 cm⁻¹; ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.21~6.84 (m, 4H, ArH), 4.26 (m, 1H, 6a-H), 4.12 (dd, $J = 6.8, 7.2$ Hz, 1H, 1'-H), 3.95 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, 3a-H), 3.93 (dd, $J = 5.2, 9.2$ Hz, 1H, 2'-H_a), 3.64 (m, 1H, 2'-H_b), 2.38 (s, 3H, CH₃) 1.42, 1.41 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₅: C 61.81, H 5.49, N 8.48; Found: C 62.00, H 5.32, N 8.23。

3c: 红褐色固体, 404 mg, 产率 33.7%。mp 113~114 °C; $R_f = 0.53$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9 : 1); $[\alpha]_D^{20} -5.26$ (*c* 0.038, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 251、282 nm; IR (KBr) ν : 3079、2935、1711、1609、1514、1466、1443、1393、1301、1252、1109、775、666 cm⁻¹; ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.38~6.83 (m, 4H, ArH), 5.21 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 6a-H), 4.25 (dd, $J = 10.0, 7.2$ Hz, 1H, 1'-H), 3.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 3a-H), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.19 (dd, $J = 9.6, 10.0$ Hz, 1H, 2'-H_a), 3.00 (dd, $J = 5.2, 10.0$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.44, 1.42 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₆: C 58.96, H 5.24, N 8.09; Found: C 59.29, H 5.33, N 8.23。

3d: 粉红色固体, 348 mg, 产率 31.6%。mp 144~145 °C; $R_f = 0.48$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9 : 1); $[\alpha]_D^{20} +21.15$ (*c* 0.052, DMSO); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 286 nm; IR (KBr) ν : 3101、2923、1715、1615、1535、1494、1459、1385、1277、1194、1092、759、675 cm⁻¹; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.95~7.33 (m, 4H, ArH), 6.12 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, 6a-H), 5.95 (dd, $J = 5.6, 6.8$ Hz, 1H, 1'-H), 5.04 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, 3a-H), 4.46 (dd, $J = 6.8, 8.8$ Hz, 1H, 2'-H_a), 4.26 (dd, $J = 6.0, 9.6$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.50, 1.42 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₅ClN₂O₅: C 54.79, H 4.31, N 7.99; Found: C 54.39, H 4.24, N 7.61。

3e: 红褐色固体, 298 mg, 产率 37.2%。mp 207~208 °C; $R_f = 0.44$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 8.5 : 1.5); $[\alpha]_D^{20} -15.79$ (*c* 0.038, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 249、282 nm; IR (KBr) ν : 3097、2923、1716、1614、1534、1491、1462、1382、1302、1188、1070、720、635 cm⁻¹; ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.63~7.15 (m, 4H, ArH),

5.54 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, 6a-H), 5.07 (dd, $J = 6.4, 6.8$ Hz, 1H, 1'-H), 4.38 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, 3a-H), 4.26 (dd, $J = 6.4, 6.4$ Hz, 1H, 2'-H_a), 3.87 (dd, $J = 5.2, 6.4$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.46, 1.42 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₅Br N₂O₅: C 48.63, H 3.83, N 7.09; Found: C 48.20, H 4.00, N 7.17。

3f: 砖红色固体, 323 mg, 产率 29.4%。mp 85~86 °C; $R_f = 0.47$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 8.5 : 1.5); $[\alpha]_D^{20} -77.08$ (*c* 0.048, DMSO); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 287 nm; IR (KBr) ν : 3085、2929、1715、1604、1512、1458、1389、1292、1199、1097、758、666 cm⁻¹; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.95~7.15 (m, 4H, ArH), 6.11 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 6a-H), 5.97 (dd, $J = 6.8, 6.8$ Hz, 1H, 1'-H), 5.04 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, 3a-H), 4.63 (dd, $J = 7.2, 7.2$ Hz, 1H, 2'-H_a), 4.45 (dd, $J = 5.2, 6.4$ Hz, 1H, 2'-H_b), 2.85, 2.73, [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₅FN₂O₅: C 57.48, H 5.38, N 8.38; Found: C 56.96, H 5.20, N 8.50。

3g: 红褐色固体, 322 mg, 产率 24.8%。mp 163~164 °C; $R_f = 0.561$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9 : 1); $[\alpha]_D^{20} -2.778$ (*c* 0.038, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 252、283 nm; IR (KBr) ν : 3067、2924、1718、1617、1479、1438、1385、1284、1184、1049、753、688 cm⁻¹; ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.33~7.26 (m, 4H, ArH), 5.34 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, 6a-H), 5.30 (dd, $J = 6.0, 7.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.32 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, 3a-H), 4.22 (dd, $J = 5.6, 8.8$ Hz, 1H, 2'-H_a), 3.88 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.39, 1.35 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₅BrN₂O₅: C 48.63, H 3.83, N 7.09; Found: C 48.27, H 3.72, N 6.84。

3h: 红褐色固体, 456 mg, 产率 30.4%。mp 138~139 °C; $R_f = 0.83$ (C₆H₆/CH₃OH/HAc, 2 : 2 : 1); $[\alpha]_D^{20} +12.500$ (*c* 0.008, DMSO-*d*₆); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 294 nm; IR (KBr) ν : 3367、3054、2957、1717、1605、1568、1411、1272、1173、1051、778、662 cm⁻¹; ¹HNMR (400 MHz, CF₃COOD) δ : 8.41~7.71 (m, 4H, ArH), 7.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, 6a-H), 6.66 (dd, $J = 6.8, 5.6$ Hz, 1H, 1'-H), 5.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, 3a-H), 4.53 (dd, $J = 6.4, 6.4$ Hz, 1H, 2'-H_a), 4.34 (m, 1H, 2'-H_b), 2.50, 2.30 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₇H₁₆N₂O₇: C 56.67, H 4.48, N 7.77; Found: C 57.27, H 4.26, N 7.50。

3i: 粉红色固体, 295 mg, 产率 16.4%。mp 139~141 °C; $R_f = 0.53$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 8 : 2); $[\alpha]_D^{20} -10.870$ (*c* 0.046, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 254、283 nm; IR (KBr) ν : 3063、2925、1712、1610、1495、1462、1380、1287、1199、1089、751、680 cm⁻¹; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.40~7.22 (m, 4H, ArH), 6.18 (d,

$J = 7.6$ Hz, 1H, 6a-H), 5.92 (dd, $J = 7.6, 6.4$ Hz, 1H, 1'-H), 5.03 (m, 1H, 3a-H), 4.67 (dd, $J = 7.6, 10$ Hz, 1H, 2'-H_a), 3.76 (dd, $J = 6.4, 10.8$ Hz, 1H, 2'-H_b), 2.11 (s, 3H, CH₃), 1.26, 1.24 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₅: C 61.81, H 5.49, N 8.48; Found: C 61.57, H 5.29, N 8.13。

3j: 黑色固体, 281 mg, 产率 18.7%。mp 213~214 °C; $R_f = 0.59$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 8 : 2); $[\alpha]_D^{20} -25.000$ (c 0.008, DMSO); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 292 nm; IR (KBr) ν : 3109、2923、1720、1608、1589、1489、1438、1384、1274、1183、1104、738、658 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.95~7.34 (m, 4H, ArH), 6.62 (m, 1H, 6a-H), 5.36 (m, 1H, 1-H), 4.72 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, 3a-H), 4.02 (dd, $J = 5.6, 20$ Hz, 1H, 2'-H_a), 3.34 (dd, $J = 19.6, 20$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.16, 1.15 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₅N₃O₇: C 53.19, H 4.18, N 11.63; Found: C 53.43, H 4.09, N 11.93。

3k: 粉红色固体, 312 mg, 产率 20.8%。mp 169~171 °C; $R_f = 0.55$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9 : 1); $[\alpha]_D^{20} -9.091$ (c 0.044, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 252、283 nm; IR (KBr) ν : 3050、2923、1714、1610、1592、1492、1458、1381、1285、1195、1064、780、691 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.37~7.14 (m, 4H, ArH), 5.22 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 6a-H), 4.79 (dd, $J = 7.2, 9.2$ Hz, 1H, 1'-H), 4.16 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 3a-H), 3.97 (dd, $J = 7.2, 6.4$ Hz, 1H, 2'-H_a), 3.79 (dd, $J = 9.2, 6.4$ Hz, 1H, 2'-H_b), 2.38 (s, 3H, CH₃), 1.30, 1.25 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₅: C 61.81, H 5.49, N 8.48; Found: C 61.36, H 5.74, N 8.80。

3l: 棕红色固体, 381 mg, 产率 25.4%。mp 172~174 °C; $R_f = 0.59$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 8.1 : 1.5); $[\alpha]_D^{20} -12.500$ (c 0.008, DMSO); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 303 nm; IR (KBr) ν : 3084、2924、1718、1613、1525、1497、1380、1257、1175、1014、749 (m)、688 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.75~7.66 (m, 4H, ArH), 5.32 (m, 1H, 6a-H), 4.24 (m, 1H, 1-H), 4.16 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, 3a-H), 3.72 (m, 1H, 2'-H_a), 3.34 (dd, $J = 20.4, 19.6$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.35, 1.31 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₅N₃O₇: C 53.19, H 4.18, N 11.63; Found: C 53.38, H 4.23, N 11.32。

3m: 砖红色固体, 269 mg, 产率 17.9%。mp 140~142 °C; $R_f = 0.49$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 8.5 : 1.5); $[\alpha]_D^{20} -11.9050$ (c 0.042, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 252 nm; IR (KBr) ν : 3060、2924、1721、1620、1593、1485、1442、1386、1290、1196、1063、754、688 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.43~7.26 (m, 4H, ArH), 5.35

(m, 1H, 6a-H), 5.24 (dd, $J = 11.2, 14.8$ Hz, 1H, 1'-H), 4.30 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, 3a-H), 4.20 (dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, 1H, 2'-H_a), 3.88 (dd, $J = 15.6, 4.8$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.25, 1.00 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₅ClN₂O₅: C 54.79, H 4.31, N 7.99; Found: C 54.43, H 4.11, N 7.42。

3n: 红褐色固体, 403 mg, 产率 40.3%。mp 150~151 °C; $R_f = 0.471$ (CH₂Cl₂/CH₃OH, 4.5 : 1); $[\alpha]_D^{20} +4.762$ (c 0.042, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 252、282 nm; IR (KBr) ν : 3074、2923、1714、1618、1540、1480、1435、1381、1272、1188、1072、741、622 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.97~7.31 (m, 4H, ArH), 5.35 (m, 1H, 1'-H), 4.29 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 6a-H), 4.08 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 3a-H), 2.85 (dd, $J = 17.2, 12.6$ Hz, 1H, 2'-H_a), 2.04 (dd, $J = 6.8, 13.2$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.46, 1.43 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₅ClN₂O₅: C 54.79, H 4.31, N 7.99; Found: C 54.40, H 4.49, N 7.69。

3o: 土黄色固体, 369 mg, 产率 28.4%。mp 170~171 °C; $R_f = 0.80$ (CH₃OH/H₂O, 2 : 8); $[\alpha]_D^{20} -17.544$ (c 0.006, CHCl₃); UV-vis (CH₃OH) λ_{max} : 304 nm; IR (KBr) ν : 3405、3080、2927、1745、1635、1511、1454、1385、1264、1089、1061、760、670 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.04~7.87 (m, 4H, ArH), 7.09 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, 6a-H), 6.36 (dd, $J = 20.0, 12.8$ Hz, 1H, 1'-H), 5.64 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, 3a-H), 4.23 (dd, $J = 20.8, 18$ Hz, 1H, 2'-H_a), 3.76 (dd, $J = 12.4, 18.0$ Hz, 1H, 2'-H_b), 1.39, 1.37 [2s, 3H, each C(CH₃)₂]; Anal. Calcd. for C₁₇H₁₆N₂O₇: C 56.67, H 4.48, N 7.77; Found: C 56.40, H 4.77, N 7.34。

2 生物活性测试

Cdc25B 磷酸酯酶是蛋白酪氨酸磷酸酯酶中一类双特异性磷酸酯酶, 它在许多肿瘤细胞中过度表达, 是有效的抗癌药物靶点。实验中邻甲基荧光磷酸酯 OMFP (*o*-methyl fluorescence phosphate) 作为荧光底物使用, 观察化合物 **3a**~**3o** 对重组酶活性的抑制。OMFP 水解产物邻甲基荧光素 OMF (*o*-methyl fluorescence) 在被 485 nm 激发光激发后可发射波长为 530 nm 的可检测荧光信号, 从而观察酶的活性变化, 化合物对其活性的抑制率按公式 (1) 计算。首先计算酶初速度期内单位时间光吸收强度的增量 (单位: O.D./min), 以此代表酶的初速度, 然后依据公式 (1) 分别计算样品 (**3a**~**3o**) 对酶活性的抑制率 (%)。

CD45 又称为白细胞共同抗原 (leukocyte common antigen, LCA), 是蛋白酪氨酸磷酸酯酶 (PTPase) 家族成员。它是一种单链跨膜糖蛋白, 广泛存在于造血系

细胞中, CD45 已成为炎性及免疫性疾病潜在的新型药物作用分子靶点。实验中对硝基苯磷酸二钠(*p*-nitrophenyl phosphate, pNPP) 为底物使用, 采用光吸收法, 在 96 孔透明平底微孔板中检测酶活性。底物 pNPP 经 CD45 水解得到的产物 pNP 在 405 nm 处有最大光吸收。通过微孔板检测器监测 405 nm 处光吸收强度的变化, 反映化合物对酶活性的抑制效果, 按公式 1 分别计算样品 (3a~3o) 对酶活性的抑制率 (Inhibition, %)。

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{n_{\text{DMSO}} - n_{\text{Sample}}}{n_{\text{DMSO}}} \times 100\% \quad (1)$$

其中 v_{Sample} 表示加药组的初速度, v_{DMSO} 表示 DMSO 组 (即不加药组) 的初速度, 初步筛选选择的纯化合物浓度为 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

致谢: 本工作中化合物的体外抗肿瘤活性, 与白细胞共同抗原 CD45 酶的抑制活性测试由国家新药筛选中心完成。

References

- [1] Dannhardt G, Kiefer W, Lambrecht G, et al. Regioisomeric 3-, 4- and 5-aminomethyl isoxazoles: synthesis and muscarinic activity [J]. *Eur J Med Chem*, 1995, 30: 839–850.
- [2] Lin ST, Kuo SH, Yang FM. Reaction of halogenated cyclopropanes and nitrosyl cation: preparation of isoxazoles [J]. *J Org Chem*, 1997, 62: 5229–5231.
- [3] Wittenberger SJ. An efficient synthesis of the cholinergic channel activator ABT2418 [J]. *J Org Chem*, 1996, 61: 356–358.
- [4] Rerine R, Michael S, Sabine L. Short access to 3-alkoxy isoxazole-5-carbaldehydes and 3-hydroxy isoxazole 5-carbaldehyde [J]. *Eur J Org Chem*, 1998, 3: 473–476.
- [5] Bathich Y, Imerhasan M, Henneboehle M. *N*-Methylisoxazolinium Salts—an Inconspicuous Class of Compounds with High Potential for Organic Synthesis [C]. Germany: The 6th Iminiumsals-Tagung, Stimpfach-Rechenberg, 2003: 99–107.
- [6] Chiachio U, Casuscelli F. Stereoselective control in 1,3-dipolar cycloaddition of nitrones to substituted system [J]. *Tetrahedron*, 1994, 50: 6671–6680.
- [7] Jaeger V, Colinas PA. In *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products* [M]. Vol. 59. New York: John Wiley & Sons Inc Press, 2002: 361–472.
- [8] Fisera F, Ondrus V, Kuban J, et al. Stereoselective 1,3-dipolar cycloadditions to heterocyclic compounds [J]. *J Heterocycl Chem*, 2000, 37: 551–556.
- [9] Frey W, Imerhasan M, Bathich Y, et al. Crystal structure of (5*S*,8*S*)-8-hydroxymethyl-1-methyl-2,7-dioxo-1-aza-spiro [4,4] nonan-6-one [J]. *New Cryst Struct*, 2005, 220: 153–154.
- [10] Huisgen R. Kinetics and mechanism of 1,3-dipolar cycloaddition [J]. *Angew Chem (Int Ed Engl)*, 1963, 2: 633–645.
- [11] Jaeger V, Grund H, Buss W. Isoxazolines—key intermediates for syntheses of some naturally occurring amino compounds [J]. *Bull Soc Chem Belg*, 1983, 92: 1039–1054.
- [12] Hudabergen A, Abdurashid A, Imerhasan M, et al. Inhibitory activity of dioxy-pyrrolino [3',4'-*d*]isoxazoline derivatives containing (1',2'-*O*-cyclohexylidendioxyethyl) against Cdc25A and CD45 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 1209–1214.
- [13] Abdurexit A, Imerhasan M, Osman K, et al. Synthesis of novel dioxy-pyrrolino[3,4-*d*]isoxazole derivatives [J]. *Chin J Syn Chem (合成化学)*, 2009, 17: 337–341.
- [14] Agirbas H, Güner S, Budak F, et al. Synthesis and structure antibacterial activity relationship investigation of isomeric 2,3,5-substituted perhydropyrrolo[3,4-*d*] isoxazole-4,6-diones [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 2322–2333.
- [15] Imerhasan M, Osman K, Muhammad T, et al. Synthesis and bioactivity of containing carboxyl or ester groups of novel pyrrolino[3',4'-*d*] isoxazole derivatives [J]. *Chin J Appl Chem (应用化学)*, 2008, 25: 931–936.
- [16] Xiang Y, Schinazi RF, Zhao K. Synthesis of [3.3.0] bicyclic isoxazolidinyl nucleosides [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1996, 13: 1475–1478.
- [17] Pagel JM, Appelbaum FR, Eary JF, et al. I-anti-CD45 antibody plus busulfan and cyclophosphamide before allogeneic hematopoietic cell transplantation for treatment of acute myeloid leukemia in first remission [J]. *Blood*, 2006, 107: 2184–2191.
- [18] Wang T. Synthesis and Bioactive Research of Novel Isoxazoline and *N*-methylisoxazolinium Salts (新型异噁唑啉和 *N*-甲基异噁唑啉盐衍生物的合成和生物活性的研究) [D]. Urumqi: Xinjiang University, 2010.
- [19] Zarbin PG, Princival JL, dos Santos AA, et al. Synthesis of (*S*)-(+)-2-methyl-4-octanol: male-specific compound released by sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) [J]. *J Braz Chem Soc*, 2004, 15: 331–334.
- [20] Schmid CR, Bryant JD. Synthesis of 2,3-*O*-isopropylidene-*D*-glyceraldehyde in high chemical and optical purity: observations on the development of a practical bulk process [J]. *J Org Chem*, 1991, 56: 4056–4058.
- [21] Liu KC, Shalton BR, Howe RK. A particularly convenient preparation of benzohydroximinoyl chlorides (nitrile oxide precursors) [J]. *J Org Chem*, 1980, 45: 3916–3918.