

·化学合成·

本文引用:傅榕庚,杨辰枝子,严建业,翁臻,周鑫,李林和,熊广华,廖端芳.水杨酰苯胺类 mglu5 拮抗剂的设计、合成及活性研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(5):489-492.

水杨酰苯胺类 mglu5 拮抗剂的设计、合成及活性研究

傅榕庚¹,杨辰枝子²,严建业¹,翁臻¹,周鑫¹,李林和¹,熊广华³,廖端芳^{1*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学人文社科学院,湖南长沙410208;

3.国家重点学科国家中医药管理局病理生理实验室,湖南长沙410208)

[摘要] 目的 利用骨架跃迁思想设计并合成新型水杨酰苯胺类代谢型谷氨酸受体5 (metabotropic glutamate receptor 5, mglu5)拮抗剂。方法 将取代水杨酸与二取代苯胺缩合得目标化合物 I-IV,用核磁共振和质谱进行结构确证,荧光测钙流法进行拮抗 mglu5 活性测定。结果 设计的目标化合物对 mglu5 具有明显的拮抗活性,其中化合物 I 拮抗活性最好,IC₅₀ 为 0.079 μmol/L。结论 水杨酰苯胺类化合物为潜在的新型 mglu5 拮抗剂,值得进一步研究。

[关键词] 水杨酰苯胺;代谢型谷氨酸受体5拮抗剂;骨架跃迁

[中图分类号]R284.3;R914.5

[文献标识码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.05.007

Design, Synthesis, and Activity Screening of New Potent Mglu5 Receptor Antagonists Based on the Salicylanilide Structure

FU Ronggeng¹, YANG Chenzhizi², YAN Jianye¹, WENG Zhen¹, ZHOU Xin¹, LI Linhe¹,

XIONG Guanghua³, LIAO Duanfang^{1*}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. School of Humanities, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostics of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To design, synthesis and activity screening of salicylanilides as new mglu5 receptor antagonist. **Methods** A scaffold hopping approach has been exploited to design a novel class of mglu5 receptor antagonists I-IV. The design compounds were synthesized by using salicylic acids and anilines. The structures of target compounds were identified by NMR and MS. The activity of mglu 5 was screened by Ca²⁺ mobilization assay. **Results** The designed salicylanilides show potent antagonistic activity to mglu5 receptor in vitro. Among them, compound I was the best, and IC₅₀ of compound I was 0.079 μmol/L. **Conclusion** The salicylanilides were new potent mglu5 receptor antagonist and worth to be further studied.

[Keywords] salicylanilide; mglu5 receptor antagonist; scaffold hopping

代谢型谷氨酸受体5 (metabotropic glutamate receptor5, mglu5)属于G蛋白偶联受体家族的成员,在中枢神经系统广泛存在,在神经系统的发育、突出功能发挥、神经系统疾病如Alzheimer's disease等方面均发挥了至关重要的作用^[1]。近年来的研究发现,mglu5不仅存在于脑组织,在许多外周器官和

组织中也有表达,mglu5其表达及活性的异常还与恶性肿瘤(如肝癌)的发生发展关系密切^[2]。因此,mglu5已成为相关疾病新药研究的热门靶点。

1 水杨酰苯胺类 mglu5 拮抗剂的设计

目前 mglu5 拮抗剂代表骨架主要有二芳基

[收稿日期]2016-09-23

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2015JJ6085);湖南省教育厅资助科研项目(13B080);2015 药学湖南省重点学科开放基金项目;2015 中医药国际合作专项基金资助项目(ZYGZ201502);湖南中医药大学本科教学质量工程项目(ZY-005)。

[作者简介]傅榕庚,男,博士,讲师,研究方向:药物化学研究。

[通讯作者]*廖端芳,男,教授,博士研究生导师,E-mail:dfliao@hnetcm.edu.cn。

类直线型分子,如图1所示,二芳基乙烯(SIB-1893)、二芳基乙炔(MPEP)以及二芳基偶氮化合物(SIB-1757)^[3-4]。其中MPEP为目前最常用的工具药

之一。除了直线型骨架外,近年来还报道了一类以4-苯胺基喹唑啉为骨架的mglu5拮抗剂如化合物1^[5]。

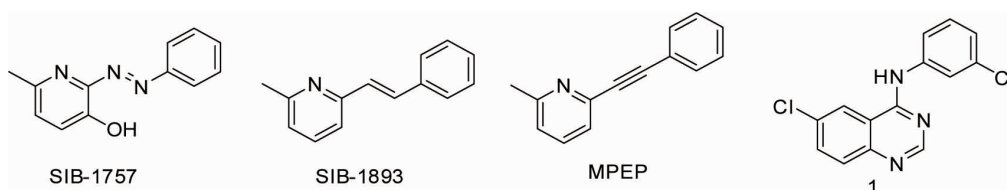


图1 代表性 mglu5 受体拮抗剂

基于骨架跃迁的药物设计是近年来迅速发展的寻找新结构先导化合物的有效方法。为了寻找新型 mglu5 拮抗剂,本课题组发现水杨酰苯胺类化合物结构中的2位羟基与酰胺羰基通过分子内氢键形成一个六元环构型,该构型与母核为4-苯胺基喹唑啉的 mglu5 拮抗剂空间构型具有相似性(如图2所示)。此外,水杨酰苯胺结构与SIB-1757结构中两个疏水芳环在化学空间上具有一定的重叠,水杨酰苯

胺中的羟基与SIB-1757结构中的羟基能都重叠。因此,本文将水杨酰苯胺这一分子骨架与4-苯胺基喹唑啉分子骨架进行骨架跃迁,考虑到水杨酰苯胺的分子柔性度较4-苯胺基喹唑啉高,采用二取代的苯胺作为取代基,以期提高 mglu5 的结合,设计并合成了4个水杨酰苯胺类新型的 mglu5 拮抗剂。以MPEP为阳性对照,采用荧光测钙流法筛选化合物对 mglu5 的体外拮抗活性。

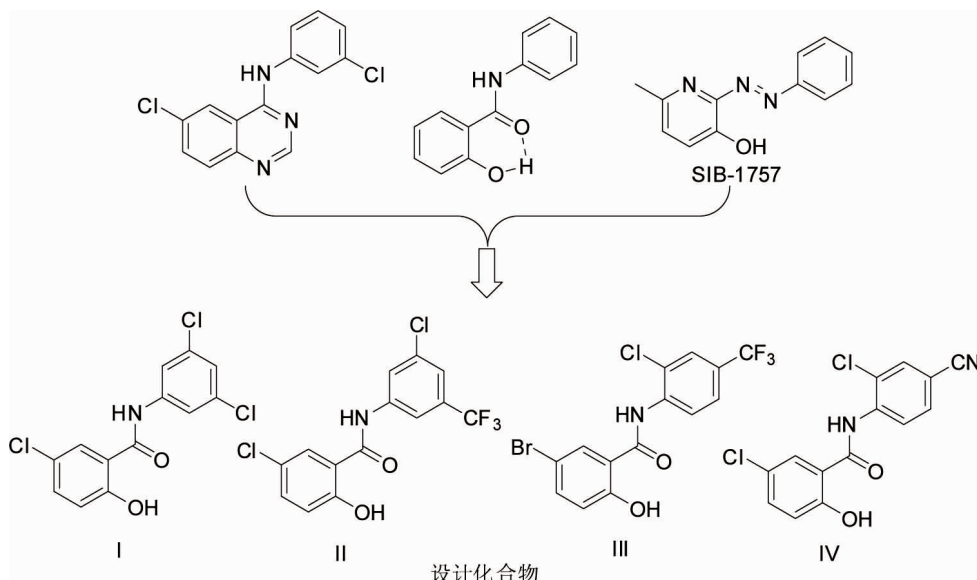


图2 水杨酰苯胺 mglu5 拮抗剂的设计

如图3所示,4个目标化合物均以5-氯水杨酸或5-溴水杨酸为原料,经酚羟基乙酰化后与二取代

苯胺缩合制备目标化合物。

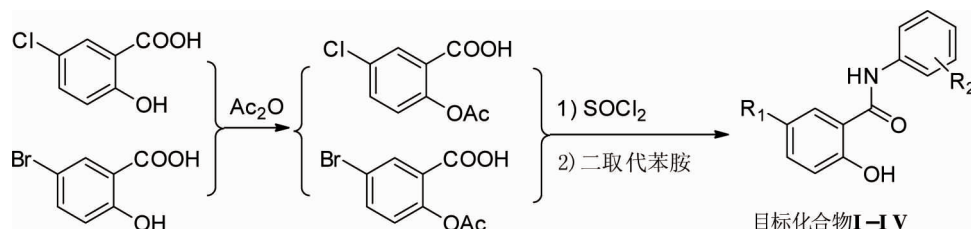


图3 目标化合物的合成路线

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

X-4 数字显示微熔点测定仪(上海精科仪器有限公司);Varian inova-400 型核磁共振谱仪(美国 Varian 公司);TMS 为内标,DMSO-d₆ 为溶剂;Agilent 1946B ESI-MS 型质谱仪(美国 Agilent 公司) 5-氯水杨酸、5-溴水杨酸、2-氯-4-三氟甲基苯胺、2-氯-4-氰基苯胺、3,5-二氯苯胺、3-氯-5-三氟甲基苯胺为化学纯,购自元素商城;其他试剂均为分析纯。

2.2 化合物的合成步骤

2.2.1 5-溴乙酰水杨酸的合成 将 2 g 5-溴水杨酸、7 mL Ac₂O、3 滴吡啶加入 100 mL 圆底烧瓶,升温搅拌至回流,回流反应 1 h,将反应液缓慢倾倒入冰水中,搅拌 2 h,抽滤,干燥得白色固体(2.4 g,收率 100%)即为 5-溴乙酰水杨酸。无需纯化即可投入下一步反应。

2.2.2 5-氯乙酰水杨酸的合成 参照“2.2.1”方法制备,得白色粉末固体 5-氯乙酰水杨酸。无需纯化即可投入下一步反应。

2.2.3 目标化合物 **I** 的合成 将 0.5 g 5-氯乙酰水杨酸和 5 mL 氯化亚砷滴加入圆底烧瓶,升温至 80 °C,搅拌反应 2 h。将所得溶液浓缩至干,浓缩液溶于 5 mL 二氯甲烷,冰浴下缓慢滴加入含有吡啶、3,5-二氯苯胺的二氯甲烷溶液,搅拌反应 1 h。TLC 确定反应终点,反应液浓缩后溶于 THF,并加入 NaOH 调至 pH 为 10,搅拌 10 min,后将溶液调至 pH 为 7 抽滤得固体即为目标化合物 **I**。收率:15%,mp: 245~246 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ :11.44 (s, 1H, OH), 10.56 (s, 1H, NH), 7.83 (d, J=2.4 Hz, 3H,Ar-H), 7.47 (dd, J=2.4, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.36 (s, 1H, Ar-H), 7.03 (d, J=8.8, 1H, Ar-H)。ESI-MS (*m/z*): 314.9610 (M-H)⁻。

2.2.4 目标化合物 **II** 的合成 将 5-氯乙酰水杨酸和 3-氯-5-三氟甲基苯胺作为反应物。制备方法同“2.2.3”,得白色固体,收率:17%,mp:203~205 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 11.41 (s, 1H, OH), 10.71 (s, 1H, NH), 8.13 (d, J=7.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.84 (d, J=2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.61 (s, 1H, Ar-H), 7.48 (dd, J=2.8, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.03 (d, J=8.6 Hz, 1H, Ar-H)。ESI-MS (*m/z*): 348.986

0 (M-H)⁻。

2.2.5 目标化合物 **III** 的合成 将 5-溴乙酰水杨酸和 2-氯-4-三氟甲基苯胺作为反应物。制备方法同“2.2.3”,得白色固体,收率:23%,mp:201~203 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 11.47 (s, 1H, NH), 8.59 (s, 1H, OH), 8.59 (s, 1H, Ar-H), 7.74 (d, J=2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.65 (d, J=2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.62 (dd, J=8.2, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.59 (dd, J=8.6, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.97 (d, J=4.0 Hz, 1H, Ar-H)。ESI-MS (*m/z*): 392.9451 (M-H)⁻。

2.2.6 目标化合物 **IV** 的合成 将 5-氯乙酰水杨酸和 2-氯-4-氰基苯胺作为反应物。制备方法同“2.2.3”,得白色固体,收率:25%,mp:263~265 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.45 (s, 1H, OH), 11.25 (s, 1H, NH), 8.71 (d, J=8.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.19 (d, J=1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.96 (d, J=2.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.88 (dd, J=1.6, 1.6Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (dd, J=2.8, 2.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (d, J=8.8 Hz, 1H, Ar-H)。ESI-MS (*m/z*): 306.992 1 (M-H)⁻。

2.3 目标化合物 **I-IV** 的 mglu5 拮抗活性测定^[9]

检测拮抗剂活性时,将激动剂 L-Glu 和拮抗剂分别配制成 10×测试浓度,并将其等体积混合成 5×测试浓度,以 25 μL/s 的速度将 25 μL 的化合物加入到表达 mglu5 的 HEK-293 细胞中,在加入化合物 16 s 之后,采集荧光染料 Fluo-3/AM 标记的钙流变化数据直至 120 s。

化合物的 IC₅₀ 值使用软件 GraphPad Prism 5 进行非线性曲线拟合计算得到。

3 结果与讨论

目标化合物经核磁共振和质谱进行结构确证。目标化合物 **I-IV** 对 mglu5 具不同程度的 mglu5 拮抗活性,IC₅₀ 值分别为 0.079、0.23、0.19 和 11.5 μmol/L。阳性对照化合物 MPEP 的 IC₅₀ 值为 0.015 μmol/L。结果如图 4 所示:化合物 **I** 的活性最强,化合物 **II** 与 **III** 活性相当,化合物 **IV** 活性最弱。化合物 **I**、**II**、**III** 活性达到 nM 级。初步构效关系为:(1)3,5 二取代苯胺的活性强于 2,4-二取代苯胺;(2)双卤素取代苯胺活性强于卤素与三氟甲基取代的苯胺,如化合物 **I** 与 **II**。出现上述活性差异的原因推测与取代基

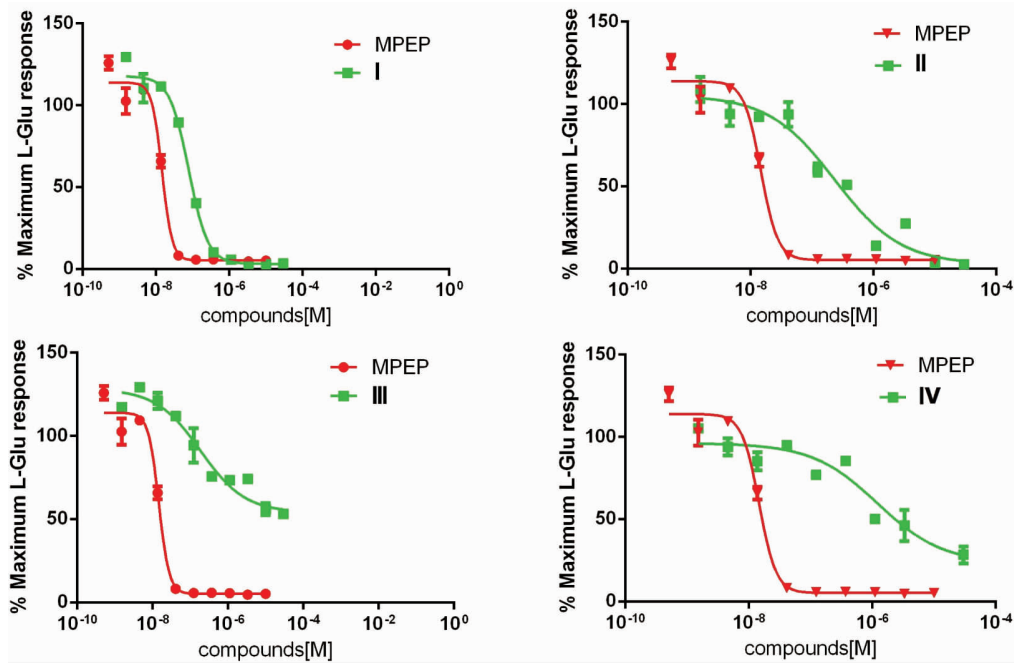


图4 化合物 I-IV 对 mglu5 的拮抗活性

和 mglu5 结合口袋的空间相互作用有关。从活性结果看,水杨酰苯胺类化合物是潜在的 mglu5 拮抗剂。本研究利用骨架跃迁这一新药设计思想,设计了四个水杨酰苯胺类 mglu5 拮抗剂,首次报道了四个化合物对 mglu5 的拮抗活性,为发现新型 mglu5 拮抗剂提供新的研究方向。

参考文献:

- [1] Wijetunge LS, Till SM, Gillingwater TH, et al. mGluR5 regulates glutamate-dependent development of the mouse somatosensory cortex[J]. *J Neurosci*, 2008, 28 (49): 13028-13037.
- [2] Wu YL, Wang NN, Gu L, et al. The suppressive effect of metabotropic glutamate receptor 5 (mGlu5) inhibition on hepatocarcinogenesis[J]. *Biochimie*, 2012, 94 (11): 2366-2375.

- [3] Varney MA, Cosford ND, Jachee C, et al. SIB-1757 and SIB-1893: selective, noncompetitive antagonists of metabotropic glutamate receptor type 5[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 290(1): 170-181.
- [4] Cosford ND, Tehrani L, Roppe J, et al. 3-[(2-Methyl-1, 3-thiazol-4-yl) ethynyl]-pyridine: a potent and highly selective metabotropic glutamate subtype 5 receptor antagonist with anxiolytic activity[J]. *J Med Chem*, 2003, 46(2): 204-206.
- [5] Felts AS, Saleh SA, Le U, et al. Discovery and SAR of 6-substituted-4-anilinoquinazolines as non-competitive antagonists of mGlu5 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(23): 6623-6626.
- [6] 石榴,蒋亚琴,白艳秋.代谢型谷氨酸受体 5 亚型高通量筛选模型的建立[J].*中国生物工程杂志*,2010,30(5):81-86.

(本文编辑 苏维)