

新型抑制破骨细胞生成的化合物合成与活性研究

王德心^{1*}, 戴晨林², 赵承¹, 邱明才², 田桂杰¹, 林浩¹

(1. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050; 2. 天津医科大学内分泌研究所, 天津 300070)

摘要: 目的 寻找有抑制破骨细胞活性的苄膦酸型先导化合物。方法 用类似 Arbuzov 型反应合成 α -烷氨基苄膦酸化合物。以体外培养大鼠骨髓液中的破骨细胞样细胞(osteoclast-like cells, OLC)生成作为模型, 筛选上述合成产物, 化合物结构经 MS 或 ¹H NMR 得到证明。结果 得到 10 个 α -烷氨基苄膦酸化合物, 均为新化合物。生物活性筛选表明, 化合物 2, 8 及 9 对体外大鼠的 OLC 的生成有显著抑制活性($P < 0.01$)。结论 增强分子的芳香性及亲脂性(9)可提高抑制生成破骨细胞的活性。

关键词: 苄膦酸; 合成; 破骨细胞

中图分类号: R916.4; R962.1

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2001)09 - 0657 - 03

老龄人口的增加及某些药物的副作用导致的骨质疏松(osteoporosis, OP)已成为我国多发病、常见病。形成 OP 的主要病因是破骨细胞(osteoclast, OC)的过度生成。迄今, 临床上用于抑制 OC 生成及 OC 活性的治疗剂有雌激素类、异黄酮类及双膦盐类等, 但均存在副作用、疗效不肯定或吸收差等问题^[1,2]。因此本文据文献^[3]以苄基膦酸化合物为母核, 利用

类似 Arbuzov 反应原理, 以环丁砜为溶剂, 一锅缩合反应合成了 9 个 α -烷氨基苄基膦酸化合物(1-9)(图 1), 并用其中的化合物 5 与小肽缀合, 制备了化合物 10, 共合成了 10 个化合物均为新化合物, 并对其进行了生物活性研究。其理化性质和结构确证数据见表 1。

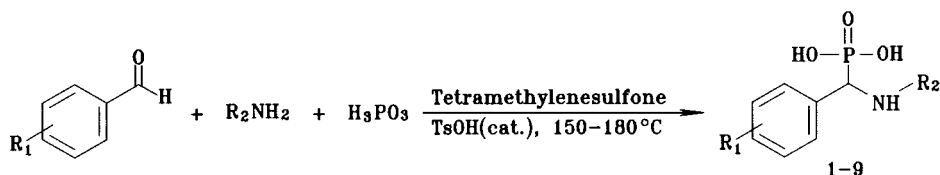
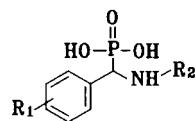


Figure 1 Route of synthesis of the α -alkylaminobenzyl-phosphonic acids

从表 1 可见, 产物的收率均在中等以下。这可能与反应的较高温度导致副反应的发生有关。但此方法操作及后处理较简便, 有一定制备意义。在所合成的 10 个化合物中, 化合物 10 的结构更新颖一些。合成中以二溴乙烷为缀合试剂, 把小肽的氨基及烷氨基苄基膦酸的氨基分别键合上(图 2)。本文自行设计的这种合成路线为活性小肽分子与其他类型分子的缀合提供了一种可行的制备方式。

用体外培养大鼠骨髓液中的 OLC(破骨细胞样细胞)法对所合成化合物进行体外大鼠骨髓 OLC 活性的实验, 计数值分别为 2: 7.0 ± 2.2 , 8: $6.9 \pm$

Table 1 Physical properties and spectral data of the compounds 1 - 9



| No | R ₁ | R ₂ | MP/ °C | Yield/ % | MS by | M/e |
|----|--|-------------------------|-----------|----------|-------|-------------|
| 1 | <i>p</i> -NO ₂ | -CH ₃ | 213 - 216 | 20 | ESI | 245 (M - 1) |
| 2 | <i>p</i> -OCH ₃ | -CH ₃ | 255 - 256 | 42 | FAB | 232 (M + 1) |
| 3 | <i>m</i> -OH | -CH ₃ | 282 - 285 | 34 | FAB | 218 (M + 1) |
| 4 | 3,4-OCH ₂ O | -CH ₃ | 256 - 257 | 33 | FAB | 246 (M + 1) |
| 5 | 3,4-(OCH ₃) ₂ | -CH ₃ | > 300 | 62 | ESI | 260 (M - 1) |
| 6 | 2,4-(OCH ₃) ₂ | -CH ₃ | > 300 | 12 | ESI | 260 (M - 1) |
| 7 | <i>o</i> -OH | -CH ₃ | 292 - 294 | 29 | ESI | 216 (M - 1) |
| 8 | <i>p</i> -N(CH ₃) ₂ | -CH ₃ | 233 - 235 | 31 | FAB | 245 (M + 1) |
| 9 | <i>p</i> -OCH ₃ | -CH(CH ₃)Bn | 160 - 162 | 15 | FAB | 336 (M + 1) |

收稿日期: 2000-12-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770871).

作者简介: 王德心(1943-), 男, 研究员.

* Tel: (010) 63165251, Fax: (010) 63017757,

E-mail: wangdx@imm.ac.cn

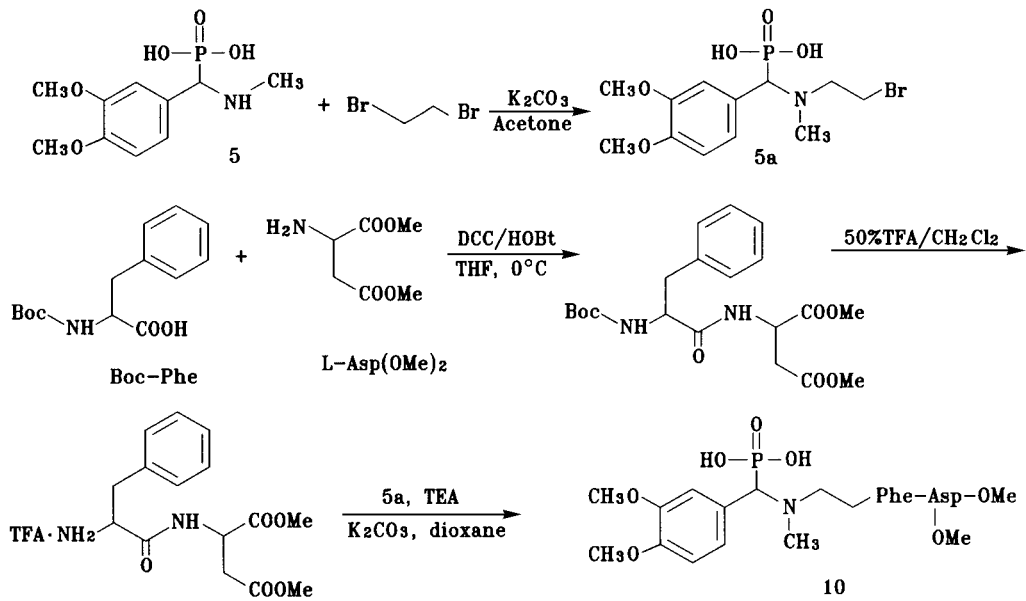


Figure 2 Route of synthesis of dipeptide and ligation with 5

1.8, 9: 3.9 ± 2.4; 其他 7 个化合物: 8.9 - 12.6; 空白对照为 13 ± 7。表明化合物 2, 8, 9 对外体大鼠的 OLC 生成具有显著的抑制作用 ($P < 0.01$)。由于这些化合物中 R_1 及 R_2 取代基的结构多样性尚少, 很难归纳出准确的结构与活性之间的关系。化合物 9 的活性较突出, 因 9 的分子中 R_2 为苯异丙基 (其他化合物的 R_2 均为甲基) 具有较强的芳香性及亲脂性。推测以 9 为先导结构, 可能开发出更多有活性的衍生物。

实验部分

合成产物 10 所需的 Boc-Phe-OH, TFA (三氟乙酸) 及 HOBt (*N*-羟基苯并三唑) 为 Aldrich 公司产品; 其他所有试剂及溶剂均为国产分析纯。显微熔点仪为日本 Yanaco MP-500D 型, $^1\text{H NMR}$ 由 MERCURY300 型完成, FAB-MS 及 ESI-MS 测定用 Autospec-Ultima ETOF 型仪。

实验用细胞取自 Wistar 大鼠, ♀, 平均体重 85 g, 由中国医学科学院实验动物繁育场提供。

1 α -烷氨基苄基亚磷酸(1-9)的合成

以芳香醛、伯胺及亚磷酸为原料, 环丁砜为溶剂。加热至 120 °C, 搅拌 10 min 后再热至 150 - 180 °C, 回流 3 - 4 h, 放至室温。加入适量 50% EtOH 后放冰箱。24 h 后滤集沉淀。经 $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ 重结晶得产物。

2 肽- α -烷氨基苄基亚磷酸缀合物(10)的合成

将化合物 5 261 mg (1 mmol) 与过量的二溴乙烷、碳酸钾混于丙酮中, 回流 4 d, 滤除沉淀, 将滤液浓缩后加入乙醚研磨, 得到淡黄色粉末状固体, 用 95% 乙醇重结晶。TLC 检测为纯点。称重得 5a 196 mg, 产率 55%, $\text{mp} > 300\text{ }^\circ\text{C}$ 。

将 5a 196 mg (0.55 mmol) 溶于二氧六环 (部分溶解), 加入二肽的 TFA 盐酸盐 232 mg (0.55 mmol), 再加入过量的 *N*-甲基吗啉及碳酸钾回流 3 d, TLC 检测, 5a 消失, 停止反应, 滤除不溶物, 浓缩后, 加入乙醚, 有淡黄色粉末状固体析出。称重得 10 135 mg, 产率 46%, $\text{mp} 181 - 183\text{ }^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ_{H} : 7.2 - 7.8 (m, 8H, ArH), 4.2 - 4.4 (m, 5H, -NH-CH-CO-, -NCH₂CH₂N), 3.2 - 3.7 (m, 12H, 2Ar-OCH₃, 2COOCH₃), 2.8 (d, 2H, -CH₂C₆H₅), 2.0 (br, 6H, -NCH₃, -CHCH₂COOCH₃)。

3 体外骨髓 OLC 筛选

将 4 周龄 Wistar ♀ 大鼠拉颈处死。置于 75% 酒精中, 浸泡 10 min。取股骨切除两端骨髓, 用 MEM 培养液冲洗骨髓腔。用无菌试管收集骨髓冲洗液, 经 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 - 3 min。去除上清液后沉淀的细胞用 MEM 培养液洗涤、离心。加入含 10% 胎牛血清、 $10^{-8}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、 $10^{-7}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松的 αMEM 培养液, 使细胞密度达 $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将此混悬液移入 96 孔培养板内, 各孔分别再加入相应的被筛化合物溶液, 使每孔的试液体积为 0.1 mL。把培养板置于 37 °C、含 5% CO_2 的培养箱中恒温培养。每 3 天更换各孔的 80% 的培养液, 至

第 6 - 7 天将培养的细胞进行固定染色,光镜下记数细胞,其中含有 ≥ 3 核的细胞被认为是生成的 OLC。

REFERENCES:

- [1] Shi WB. Drug therapy of osteoporosis [J]. *Foreign Med Sci , Geriatrics Section* (in Chinese) , 1996 ,17(3) :177 - 181 .
- [2] Zeng JC. Drug therapy of osteoporosis and their evaluation [J]. *Chin New Drugs J* (in Chinese) , 1997 ,6(1) :33 - 36 .
- [3] Burke Jr TR, Zhang ZY. Protein-tyrosine phosphatases : structure , mechanism and inhibitor discovery [J]. *Peptide Sci* , 1998 ,47(3) :225 - 241 .
- [4] Zhu CF, Xiao HY, Li ZH. Studies on synthesis of nitriloalkylenephosphonic acids (IV) [J]. *Chin J Appl Chem* (in Chinese) , 1997 ,14(3) :107 - 180 .

STUDIES ON THE SYNTHESIS AND BIOACTIVITY OF α -ALKYLAMINO BENZYL PHOSPHONIC ACIDS

WANG De-xin¹ , DAI Chen-lin² , ZHAO Cheng¹ , QIU Ming-cai² , TIAN Gui-jie¹ , LIN Hao¹

(1 . *Institute of Materia Medica , Chinese Academy of Medical Sciences , Beijing 100050 China ;*
2 . *Institute of Endocrinology , Tianjin Medical University , Tianjin 300070 , China*)

ABSTRACT: **AIM** To search for some substituted benzyl phosphonic acids as leading compounds with inhibiting effect on osteoclast formation. **METHODS** Target compounds were prepared from aromatic aldehydes , primary amine and phosphorous acid using tetramethylenesulfone as solvent *via* Arbuzov type reaction. The effect on inhibiting the formation of osteoclast-like cells (OLC) of related compounds was studied by incubating the extract of rat femur marrow. **RESULTS** Ten compounds of α -alkylaminobenzyl phosphonic acids have been synthesized and identified by MS or ¹HNMR analysis . Three (**2** , **8** and **9**) of them were found to have notable effect on the inhibition of OLC formation ($P < 0.01$) . **CONCLUSION** Among the present substituted benzyl phosphonic acids , the increased aromaticity and hydrophobicity (such as compound **9**) can remarkably enhance the ability to inhibit OLC formation .

KEY WORDS: benzylphosphonic acid ; synthesis ; osteoclast