

含有替加氟的卵磷脂类似物设计、合成及抗癌活性

许新华^{1,2*}, 陈茹玉²

(1. 湖南大学化学化工学院, 湖南 长沙 410082; 2. 南开大学元素有机国家重点实验室, 天津 300071)

摘要: 目的 合成含有替加氟的以卵磷脂类似物作载体的缀合物, 并测定其生物活性。方法 将替加氟转化为羟烷基衍生物, 六乙基亚磷酰三胺作磷酰化试剂, 与羟烷基替加氟、1-十六烷基甘油及硫作用, 经一锅法合成得到环甘油硫代磷脂羟烷基替加氟缀合物, 通过三乙胺对环甘油硫代磷脂替加氟缀合物开环得到标题产物。结果 得到新化合物 9 个(2a~c, 3a~c, 4a~c), 其结构经 IR, NMR 和元素分析确证。结论 体外活性测定表明, 化合物 4a 对人体膀胱癌细胞的抑制效果比替加氟好。

关键词: 核苷; 卵磷脂; 抗癌活性

中图分类号: R916.41; R962.1

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)11 - 0858 - 05

磷脂对癌组织具有靶向载体的作用^[1]。核苷类药物对癌症和艾滋病有很好的疗效, 目前已广泛应用于临床^[2,3]。为提高疗效, 降低毒性, 其结构修饰一直是研究的热点^[4]。而将它转化为以磷脂作载体的缀合物前药是研究的重点, 被认为是新世纪抗癌药物发展的战略之一。近几年有对其合成、活性及构效关系的报道^[5], 卵磷脂是一类具有重要生理活性的天然产物, 它的类似物有抗癌活性, 但是分子中同时包含卵磷脂结构及磷脂核苷缀合物结构的化合物未见文献报道。由于它的分子中有多种功能基,

合成并研究它们的活性, 对磷脂核苷类新药的创制将会有一定的指导意义。本文报道以卵磷脂类似物作载体的替加氟前药的合成与活性。

开环是重要有机反应之一, 在合成天然产物及其衍生物方面被广泛应用。卵磷脂的合成是通过 1,3,2-二氧磷杂环戊烷的开环, 本文设计以卵磷脂类似物作载体的替加氟前药通过环甘油磷脂的开环来合成。合成路线见图 1。

新化合物(2~4)的理化数据和元素分析见表 1, 经核磁共振氢谱, 红外光谱确证其结构(表 2)。

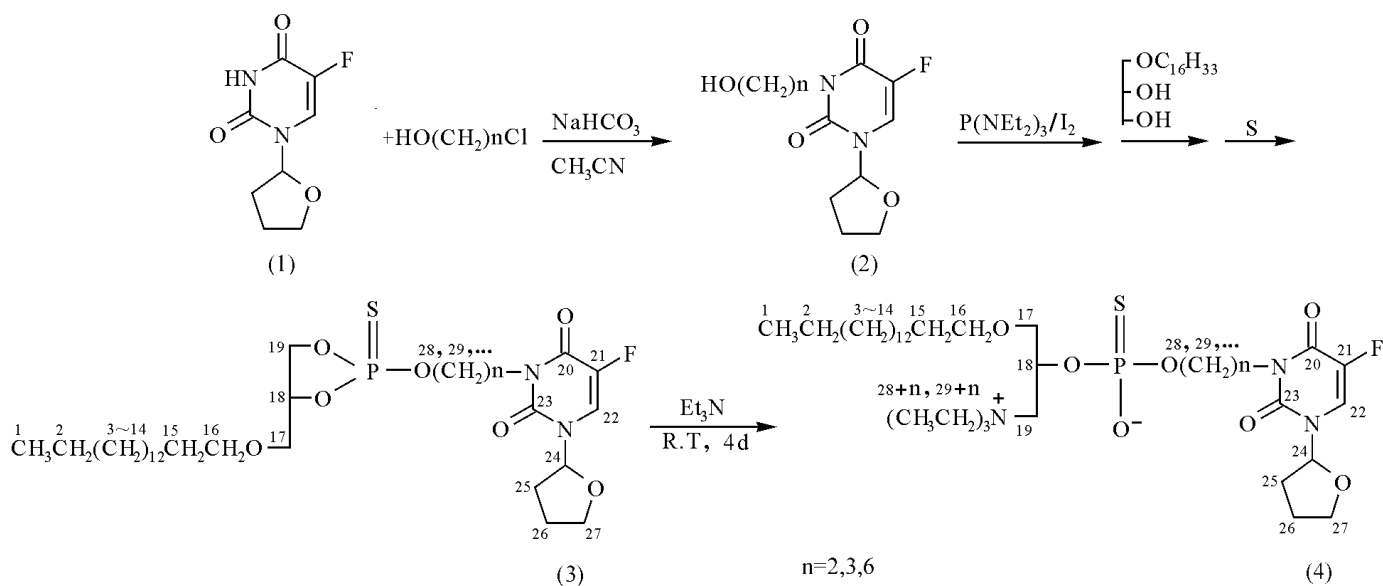


Figure 1 Route of synthesis of compounds 2 ~ 4

收稿日期: 2001-10-30.

基金项目: 教育部高等学校重点实验室访问学者基金资助.

* 通讯作者 Tel: (0731)8821581, Fax: (0731)8824704, E-mail: xhx1581@21.cn.com

Table 1 Physical constants and elemental analysis of compounds 2a ~ 4c

No.	Formula	n	Rf [*]	MP/ °C	Yield/ % ^{**}	Elemental analysis / %		
						Found (Calcd)		
						C	H	N
2a	C ₁₀ H ₁₃ FN ₂ O ₄	2	0.34	89 ~ 90	93	49.00(49.14)	5.39(5.33)	11.19(11.45)
2b	C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ O ₄	3	0.34	67 ~ 68	94	50.71(50.80)	5.81(5.76)	10.62(10.70)
2c	C ₁₄ H ₂₁ FN ₂ O ₄	6	0.36	55 ~ 56	94	55.71(55.70)	6.60(6.67)	9.40(9.42)
3a	C ₂₉ H ₅₀ FN ₂ O ₄ PS	2	0.65	Oil	58	56.13(56.40)	8.06(8.13)	4.52(4.43)
3b	C ₃₁ H ₅₂ FN ₂ O ₄ PS	3	0.67	Oil	60	56.78(56.82)	8.20(8.16)	4.42(4.38)
3c	C ₃₃ H ₅₈ FN ₂ O ₄ PS	6	0.67	Oil	50	58.58(58.69)	8.58(8.62)	4.14(4.09)
4a	C ₃₅ H ₆₅ FN ₃ O ₄ PS	2	0.40	Syrup	48	58.25(58.43)	9.02(9.07)	5.83(5.81)
4b	C ₃₆ H ₆₇ FN ₃ O ₄ PS	3	0.42	Syrup	40	58.77(58.76)	9.14(9.20)	5.73(5.70)
4c	C ₃₉ H ₇₃ FN ₃ O ₄ PS	6	0.42	Syrup	46	60.23(61.17)	9.40(9.50)	5.42(5.37)

* The mobile phases : ethyl acetate-dichloromethane (1:1) for **2a ~ 2c**, petroleum ether-ethyl acetate (5:1) for **3a ~ 3c**, chloroform-methanol (9:1) for **4a ~ 4c**; ** Yields of isolated pure compounds

Table 2 ¹H NMR, ¹³C NMR, ³¹P NMR and IR spectral data of compounds 2a ~ 4c

No.	IR (KBr) cm ⁻¹	¹ H NMR (δ)	¹³ C NMR (δ)	³¹ P NMR (δ)
2a	3 450, 1 695, 1 665, 1 513, 1 480, 1 421, 1 370, 1 257, 1 075, 1 053	7.41 (d, 1H), 5.98 (d, 1H), 4.17 (m, 3H), 3.96 (m, 3H), 2.66 ~ 2.00 (m, 5H)		
2b	3 430, 3 078, 1 688, 1 667, 1 638, 1 476, 1 366, 1 076	7.42 (d, 1H), 5.94 (d, 1H), 3.90 (m, 4H), 3.50 (m, 2H), 2.70 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.10 ~ 1.80 (m, 5H)		
2c	3 461, 3 070, 1 705, 1 636, 1 420, 1 366, 1 074	7.36 (d, 1H), 5.97 (d, 1H), 4.10 ~ 4.20 (m, 1H), 3.98 ~ 3.80 (m, 3H), 3.63 ~ 3.56 (m, 2H), 2.20 ~ 2.10 (m, 1H), 2.05 ~ 1.95 (m, 3H), 1.65 ~ 1.34 (m, 9H)		
3a	2 908, 1 713, 1 654, 1 466, 1 262, 1 075, 1 045, 996	0.85 (t, 3H, J = 6.0 Hz, CH ₃), 1.20 (brs, 26H, (CH ₂) ₁₃), 1.50 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂), 1.79 ~ 2.6 (m, 4H, 3', 4'-(CH ₂) ₂), 3.20 ~ 3.50 (m, 6H, CH ₂ CHCH ₂ , OCH ₂ (CH ₂) ₁₄), 3.71 ~ 4.23 (m, 6H, 5'-CH ₂ , OCH ₂ CH ₂ N), 4.60 (q, 1/21 H, CH ₂ CHCH ₂), 4.70 (q, 1/21 H, CH ₂ CHCH ₂), 5.96 (d, 1H, 2'-H), 7.40 (d, 1H, J = 5.4 Hz, 6-H)	13.8 (C-1), 22.4 (C-2), 29.1 (C-3 to 14), 25.5 (C-15), 68.2 (C-16), 69.7 (C-17), 76.8, 77.5 (C-18), 70.1 (C-19), 158 (C-20), 138 (C-21), 122.2, 121.5 (C-22), 148 (C-23), 87.9 (C-24), 32.6 (C-25), 31.6 (C-26), 71.6 (C-27), 70.1 (C-28), 65.3 (C-28)	83.80, 83.51
3b	2 908, 1 710, 1 651, 1 464, 1 260, 1 075	0.85 (t, 3H, J = 6.0 Hz, CH ₃), 1.20 ~ 1.50 (m, 30H, (CH ₂) ₁₄ , -NCH ₂ CH ₂ CH ₂ O), 1.74 ~ 2.46 (m, 4H, 3', 4'-CH ₂ CH ₂), 3.19 ~ 3.48 (m, 6H, CH ₂ CHCH ₂ OCH ₂ (CH ₂) ₁₄), 3.70 ~ 4.20 (m, 6H, 5'-CH ₂ , OCH ₂ CHCH ₂ N), 4.50 (q, 1/21 H, CH ₂ CHCH ₂), 4.70 (m, 1/21 H, CH ₂ CHCH ₂), 5.98 (d, 1H, 2'-H), 7.36 (d, 1H, J = 5.4 Hz, 6-H)		82.34, 82.56
3c	2 907, 1 713, 1 654, 1 463, 1 325, 1 074	0.85 (3H, t, J = 6.0 Hz, -CH ₃), 1.20 ~ 1.69 (m, 36H, (CH ₆) ₁₄ , -NC ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ O), 1.70 ~ 2.40 (m, 4H, 3', 4'-CH ₂ CH ₂), 3.20 ~ 3.61 (m, 6H, CH ₂ CHCH ₂ , OCH ₂ C ₁₅ H ₃₁), 3.70 ~ 4.20 (m, 6H, 5'-CH ₂ , OCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ N), 4.50 (m, 1/21 H, CH ₂ CHCH ₂), 4.70 (m, 1/21 H, CH ₂ CHCH ₂), 5.98 (d, 1H, 2'-H), 7.39 (d, 1H, d = 5.4 Hz, 6-H)		83.78, 83.51
4a		0.80 (t, 3H, C ₁₅ H ₃₀ CH ₃), 1.12 (t, 9H, (CH ₃ CH ₂) ₃ N), 1.13 ~ 1.22 (brs, 28H, OCH ₂ (CH ₂) ₁₄ CH ₃), 1.80 ~ 2.62 (m, 4H, 3', 4'-CHCH ₂), 3.07 ~ 3.17 (q, 6H, (CH ₃ CH ₂) ₃ N), 3.39 ~ 3.60 (m, 6H, OCH ₂ CHCH ₂ O, OCH ₂ (CH ₂) ₁₄), 3.80 ~ 4.30 (m, 7H, 5'-CH ₂ , OCH ₂ CH ₂ N, OCH ₂ CHCH ₂ O), 5.96 (brs, 1H, 2'-H), 7.35 (d, 1H, 6-H)	13.8 (C-1), 22.4 (C-2), 29.1 (C-3 to 14), 25.7 (C-15), 68.2 (C-16), 66.5 (C-17), 76.0, 76.7 (C-18), 68.5 (C-19), 158 (C-20), 138 (C-21), 122.2, 121.5 (C-22), 148 (C-23), 87.9 (C-24), 32.6 (C-25), 31.6 (C-26), 71.6 (C-27), 70.1 (C-28), 65.3 (C-29), 8.32 (C-30), 45.2 (C-31)	62.5
4b		0.85 (t, 3H, J = 6.0 Hz, CH ₃), 1.20 ~ 1.50 (m, 30H, (CH ₂) ₁₄ , -NCH ₂ CH ₂ CH ₂ O), 1.74 ~ 2.46 (m, 4H, 3', 4'-CH ₂ CH ₂), 3.07 ~ 3.17 (q, 6H, (CH ₃ CH ₂) ₃ N), 3.18 ~ 3.56 (m, 6H, CH ₂ CHCH ₂ OCH ₂ (CH ₂) ₁₄), 3.70 ~ 4.21 (m, 7H, 5'-CH ₂ , OCH ₂ CHCH ₂ N, CH ₂ CHCH ₂), 5.98 (d, 1H, 2'-H), 7.36 (d, 1H, J = 5.4 Hz, 6-H)		62.3
4c		0.85 (3H, t, J = 6.0 Hz, -CH ₃), 1.21 ~ 1.70 (m, 36H, (CH ₆) ₁₄ , -NCH(CH ₂) ₄ CH ₂ O), 1.70 ~ 2.40 (m, 4H, 3', 4'-CH ₂ CH ₂), 3.05 ~ 3.16 (q, 6H, (CH ₃ CH ₂) ₃ N), 3.21 ~ 3.62 (m, 6H, CH ₂ CHCH ₂ , OCH ₂ C ₁₅ H ₃₁), 3.71 ~ 4.20 (m, 7H, 5'-CH ₂ , -OCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ N, CH ₂ CHCH ₂), 5.98 (d, 1H, 2'-H), 7.39 (d, 1H, d = 5.4 Hz, 6-H)		62.7

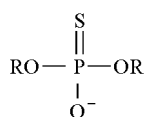
六乙基亚磷酰三胺作磷酰化试剂由于反应条件温和、选择性高而在磷脂化合物合成中得到广泛地应用^[6]。我们试图用它与替加氟及1-十六烷基甘油来合成替加氟环甘油磷脂。但是,实验表明它们在回流的苯中,以碘作催化剂不反应,这是由于氟脲嘧啶环上的 N³ 位置有较大空间位阻。为此,我们将替加氟转化为含有官能团羟基的衍生物。以乙腈作溶剂,在 NaHCO₃ 存在下,过量氯代醇与替加氟在 80 °C 时反应 12 h,几乎得到定量的羟烷基替加氟。

TLC 跟踪分析表明,羟烷基替加氟与六乙基亚磷酰三胺在上述条件下能进行有效的反应,继而与1-十六烷基甘油及硫作用,经一锅法合成得到环甘油硫代磷脂羟烷基替加氟缀合物。化合物(3a~e)的³¹P NMR表现为强度相等的双峰,甘油骨架 CH 的¹H NMR也表现为两组,这是因为反应产物是由两组非对映异构体组成。这与文献^[7]报道的类似物是一致的。

化合物(3a~e)与三乙胺发生开环反应在室温下即能进行,得目标分子(4a~e)。

开环反应的位置在甘油骨架上位阻较小的 C₁₉ 上,通过比较化合物(3a~e)与(4a~e)的 DEPT 图谱证实,因为在反应前后¹³C₁₈ NMR几乎一致。在上述化合物中的氟脲嘧啶环上¹H 与¹⁹F 及¹⁹F 与¹³C 发生耦合,耦合常数分别为 J_{F-H} = 6.07 Hz, J_{F-C} = 140 Hz。

目标分子中的其他部分结构可通过下列事实得到确证:①磷硫双键的确定:目标分子的³¹P NMR值为 δ 62.5,表明产物为典型的下列结构

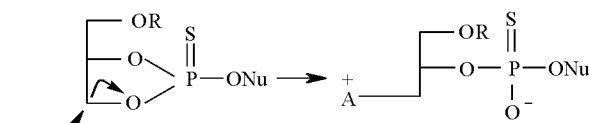


②(CH₃CH₂)₃N 基团的确定:从产物的¹H NMR谱可知,它除了具有与原料相同的¹H NMR值外,在 δ 1.15 处有一个三重峰,在 δ 2.47 处有一个四重峰;对照产物与原料的¹³C NMR谱可知,产物在 δ 8.34 处有一条谱线,在 δ 45.34 处有一条谱线;从产物的 DEPT 谱可见,除了具有与原料相同的(CH₂)₁₅CH₃ 和 CHOP, 还有 CH₃CH₂N (δ 8.325) 和 CH₃CH₂N (45.231)。表明目标分子中含有(CH₃CH₂)₃N 基团。

推测其反应机理(图 2)是亲核试剂(A)进攻甘油骨架上位阻较小碳原子的侧面而形成目标产物。

化合物(3a~e)与(4a~e)相比,性质有较大区别:(3a~e)不溶于水而仅溶于有机溶剂,而(4a~e)室温下在 100 g 水中可溶解 1.2 g,可与乙醇、CH₂Cl₂

和苯等有机溶剂混溶。



A: Triethylamine; Nu: Hydroxyalkyl tegafur

Figure 2 Mechanism of ring-opening reaction

将化合物(2a),(3a)和(4a)进行了对人体膀胱癌细胞 PGA₁ 的抑制作用的体外试验,以 5-氟尿嘧啶及替加氟作参照,化合物(4a)以水作溶剂,其余化合物以 DMSO 作溶剂。从表 3 可知,化合物(2a),(3a)和(4a)对 PGA₁ 的抑制作用是(4a) > 替加氟 > (3a) > (2a),上述结果表明,通过对化合物(3a~e)结构修饰,所得化合物(4a~c)的抗癌活性增强了。

Table 3 Antitumor activities of the title compounds against PGA₁ cells *in vitro*

Compd.	5-Flourouracil	Tegafur	2a	3a	4a
IC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	1.0	100	250	125	66

实 验 部 分

¹H NMR(以 TMS 为内标)和³¹P NMR(85% H₃PO₄ 为外标)用 Bruker AC P200 HE 型测定仪, Yanaco CHN Corder MF-3 型自动元素分析仪, Yanaco 熔点仪。硅胶为青岛海洋化工厂产品,溶剂乙腈和 THF 为分析纯,未加处理。替加氟由济南鲁药集团生产,六乙基亚磷酰三胺及 3-十六烷基氧基-1,2-丙二醇按文献^[7]方法制备。

细胞株:本试验选用膀胱癌细胞系 PGA₁ 细胞株。细胞株由天津肿瘤研究所引进。细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基(37 °C, 5% CO₂)。细胞倍增时间为 24~30 h。

样品 5-氟尿嘧啶, 2a, 3a, 4a。阳性对照样品为替加氟,正常对照为完全培养基。

1 化合物(2)的合成(以 2a 为例)

替加氟(5.0 mmol) 1.0 g, NaHCO₃ 0.7 g, 氯乙醇(30 mmol) 2.0 mL 及乙腈 10 mL 的混和物,在 80 °C 下搅拌 12 h,冷却到室温,过滤,滤液在减压下旋转去掉溶剂(温度小于 50 °C),将残余物进行快速柱色谱分离(乙酸乙酯-CH₂Cl₂ = 1:1)得 2a。

2 化合物(3)的合成(以 3a 为例)

六乙基亚磷酰三胺 (2.1 mmol) 0.55 mL 溶于无水苯 50 mL 中, 加入碘 0.025 g (0.1 mmol), 加热回流直到生成的白色沉淀消失, 加入 **2a** 0.48 g (2 mmol), 在 65 °C 下搅拌 8 h, 加入 3-十六烷氧基-1,2-丙二醇 0.71 g (2.1 mmol), 搅拌 5 h, 加入硫 0.066 g (2.1 mmol), 搅拌 0.5 h, 旋转蒸发去掉溶剂, 将残余物进行快速柱色谱分离 (石油醚-乙醚 = 1:1), 得 **3a**。

3 化合物(4)的合成

将无水三乙胺 150 mmol, 化合物 **3** 1.0 mmol, 无水苯 10 mL 混合, 在室温下搅拌 4 d, 旋转去掉溶剂苯和剩余的三乙胺, 将残余物进行快速色谱分离 ($\text{CH}_3\text{Cl}-\text{CH}_3\text{OH} = 9:1$)。

4 抗肿瘤活性测定

以 DMSO 为溶剂将样品分别稀释为 10, 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 再分别取 10 μL 加入到完全培养基 1 mL 中, 使之在实验中的终浓度分别为: 0.1 和 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同时以不加样品的 DMSO 为阳性对照。

以完全培养基为溶剂, 将样品分别配制成 100, 10 和 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 供实验使用。同时以完全培养基作为阴性对照。

细胞铺板与观察计数: 取正常生长处于对数期的 PGA_1 细胞, 用 0.02% EDTA 消化液将细胞从种子瓶中消化下来, 制备成细胞浓度为 $1.5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 将细胞悬液接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 正常培养 24 h 后, 吸取培养基, 换入各组含有测试样品的培养基继续培养。

分别于给药后 24, 48, 72, 96 和 120 h 观察细胞生长状态, 同时消化各组仍处于生长状态的活细胞, 进行细胞计数, 得出样品对癌细胞的抑制作用结果。不同时段, 在倒置显微镜下, 可清晰的观察到: 对照组细胞生长正常, 排列紧密, 呈对数生长状态; 细胞

分裂指数相为恶性肿瘤细胞分裂指数状态。以 DMSO 为溶剂组, 由于 DMSO 对细胞有一定的毒副作用, 在实验中设置空白组。在给药组, 细胞分裂指数相下降。随药物浓度的增加, 其下降趋势增大, 死亡细胞增加, 存活细胞出现缩圆、胞质浓缩、精糙、颗粒性内涵物增加。

致谢: 承蒙南开大学分子生物所进行药物活性试验。

REFERENCES:

- [1] a. Herrmann D, Zilch H. Preparation of liponucleotides from seco nucleosides as viricides [P]. *DE pat*, 4226279, 1994-02-10;
b. Herrmann D, Zilch H. Preparation of liponucleotides as drugs [P]. *DE pat*, 4321978, 1995-01-12.
- [2] Shuto S, Itoh H, Sakai A. Nucleosides and nucleotides CXXXV antitumor phospholipids with 5-fluorouridines as a cytotoxic polar head synthesis of 5-phosphatidy-5-fluorouridine by phospholipase D catalyzed transphosphatidylolation [J]. *Bioorg Med Chem*, 1995, 3(2):235 - 243.
- [3] Hong CI. Nucleoside conjugates 14, Synthesis and antitumor activity of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine conjugates of ether lipids with improved water solubility [J]. *J Med Chem*, 1995, 38(8):1629 - 1634.
- [4] Hostetler KY, Stuhmiller LM, Lenting HBM. Synthesis and antitumor activity of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine conjugates of thioether lipids [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(31):6112 - 6225.
- [5] Wei YM, Yan YF, Pei DH, *et al.* A photoactivated prodrug [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8(11):2419 - 2422.
- [6] Stephan DS. Bis(N, N-diethylamido)-thio and selenophosphate of some sterols [J]. *Chem Phys Lipids*, 1989, 50(1):79 - 82.
- [7] Stephan DS, Gronowitz S. The synthesis of 1, 2-cyclic monoalkyl rac-glycerothiophosphates [J]. *Chem Phys Lipids*, 1991, 58(2):193 - 197.

DESIGN, SYNTHESIS AND ANTITUMOR ACTIVITY OF PHOSPHOCHOLINE ANALOGS CONTAINING TEGAFUR

XU Xir-hua^{1,2}, CHEN Rui-yu²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China;
2. The State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

ABSTRACT: AIM To synthesize the phosphocholine analogs containing tegafur and test their antitumor activity. **METHODS** N^1 -(2-furanidyl)-5-fluorouracil reacted with multimethylene chlorohydrin in the presence of NaHCO_3 in acetonitrile at 80 °C to give N^1 -(2-furanidyl)- N^3 -(hydroxyalkyl)-5-fluorouracil in high yield ($\geq 93\%$). Its cyclic

glycerothiophospholipid conjugate was synthesized by reaction of hexaethylphosphorous triamide, activated by a catalytic amount of iodine, as the phosphorylating reagent with N^1 -(2-furanyl)- N^3 -(hydroxyalkyl)-5-fluorouracil and 1- α -hexadecyl glycerol as well as sulfur in a one-pot. Cyclic glycerothiophospholipid nucleosides conjugate readily reacted with triethylamine to give the title compounds. **RESULTS** Nine new compounds (**2a ~ c**, **3a ~ c** and **4a ~ c**) have been synthesized. Their structures were confirmed by IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR and elemental analysis. **CONCLUSION** The title compounds (**4a ~ c**) showed antitumor activity against human urinary bladder cancer cell and more effective than the tegafur.

KEY WORDS: nucleoside; phosphocholine analogs; antitumor activity