

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2021.04.004

苯甲酰胺类磷酸二酯酶(IV)抑制剂的设计、 合成与生物活性研究

冯筱晴¹, 陈意发¹, 宋国强¹, 唐 龙¹, 柯衡明²

(1. 常州大学 药学院, 江苏 常州 213164; 2. 美国北卡罗莱纳州立大学教堂山分校 生物物理与生物化学系, 教堂山 27514)

摘要:设计并合成磷酸二酯酶(IV)(PDE4)抑制剂, 研究其酶水平的抑制活性, 筛选活性较好的化合物进一步研究。通过 Discovery Studio 2019 设计了系列苯甲酰胺类新型小分子抑制剂; 以 3,4-二羟基苯甲醛为起始原料, 通过醚化、氯化 and 氨基化等反应, 合成得到了 11 个目标化合物; 化合物经初筛后测定了其 IC₅₀ 值。共合成 11 个衍生物, 目标化合物的结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR 谱图确证。目标化合物的酶水平测试结果表明, 化合物 Cy01, Cy03, Cy04, Cy06, Cy10 和 Cy11 均显示了微量水平的抑制活性。其中, Cy06 的抑制活性 IC₅₀ 值(PDE4)达到 0.219 μmol/L, 值得进一步深入研究。

关键词:磷酸二酯酶 IV 型(PDE4)抑制剂; Discovery Studio 2019; 生物活性检测

中图分类号:R 914.5

文献标志码:A

文章编号:2095-0411(2021)04-0021-09

Design, Synthesis and Biological Evaluation of Benzoyl Analogues as PDE4 Inhibitors

FENG Xiaoping¹, CHEN Yifa¹, SONG Guoqiang¹, TANG Long¹, KE Hengming²

(1. School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. Department of Biochemistry and Biophysics and Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill 27514, America)

Abstract: A series of new PDE4 inhibitors were designed with the aid of Discovery Studio 2019. Then the target compounds were prepared through the etherification, chlorination and ammonification reaction with 3, 4-dihydroxybenzaldehyde as initial material. All of the derivatives were evaluated for their anti-PDE4 activities. After preliminary screening of the 11 newly synthesized PDE4 inhibitors, the compounds (Cy01, Cy03, Cy04, Cy06, Cy10 and Cy11) which showed activity were further tested for

收稿日期:2020-11-21。

基金项目:2020 年度常州大学创新创业基金资助项目(2020-c-21)。

作者简介:冯筱晴(1974—), 女, 山东青岛人, 博士, 讲师。E-mail:fxqfw@163.com

引用本文:冯筱晴, 陈意发, 宋国强, 等. 苯甲酰胺类磷酸二酯酶(IV)抑制剂的设计、合成与生物活性研究[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2021, 33(4): 21-29.

their IC_{50} value by kit method. Among them, Cy06 indicated the best activity with the IC_{50} (PDE4) = 0.219 $\mu\text{mol/L}$ which needed to be further investigated. The preliminary structure-activity relationship was summarized.

Key words: phosphodiesterase IV (PDE4) inhibitors; Discovery Studio 2019; activity evaluation

环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)是负责细胞内信号传导的关键第二信使。体内 cAMP 和 cGMP 浓度水平的调节主要通过核苷酸环化酶的合成和磷酸二酯酶(Phosphodiesterases, PDEs)的水解来实现^[1-2]。PDEs 能够选择性水解 cAMP 和 cGMP 中的磷酸二酯键使之水解为相应的单磷酸 5'-AMP 和 5'-GMP,从而终止第二生理过程的传导,是体内唯一能够水解 cAMP 和 cGMP 的酶^[3]。

根据 PDE 对底物的特异性、酶动力学特征、抑制剂的敏感性和氨基酸的序列不同,可将 PDE 家族分为 11 个,其中 PDE4, PDE7 及 PDE8 是特异作用于 cAMP 的水解酶, PDE4 对 cAMP 的亲合力较高。PDE4 有 4 个亚型,分别为 PDE4A, PDE4B, PDE4C 和 PDE4D。PDE4A, PDE4B 和 PDE4D 在中枢神经系统表达, PDE4C 则主要在外周表达^[4-7]。PDE4 通过与其他蛋白如抑制蛋白、A 激酶锚定蛋白(AKAP)以及活化的 C 激酶 1 受体(RACK1)等相互作用使 cAMP 浓度区域化,选择性地调节各种细胞功能^[8]。PDE4 作为一个治疗靶点,研究其选择性抑制剂具有重要的意义,可以用于治疗由炎症引起的疾病,如哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)和中风等由潜在的炎症引起神经元受损造成的中枢神经系统疾病^[9]。

目前市场上使用的 PDE4 抑制剂主要有儿茶酚醚类、喹唑啉二酮类、黄嘌呤类、苯并咪唑类和苯甲酰胺类,其他还有苯并二氮类和三嗪类等^[10]。

1994 年 ASHTON 等^[11]报道了苯甲酰胺类 PDE4 抑制剂。2011 年,美国食品药品监督管理局(FDA)批准苯甲酰胺类 PDE4 抑制剂罗氟司特(Roflumilast)用于治疗慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD),它是第一个通过 FDA 批准上市的 PDE4 抑制剂。但是, PDE4 抑制剂目前还存在引起腹泻、恶心、头痛、失眠和食欲减退等副作用,研究和开发主要集中在寻找口服有效、具有抗炎活性和低致吐副作用的新型化合物^[12]。课题组利用计算机辅助药物软件 Discovery Studio 2019(DS2019)设计和筛选了系列新型 PDE4 抑制剂,合成且进行了酶活性测试,研究了其初步的构效关系,化合物的合成路线如图 1 所示。

1 系列 PDE4 抑制剂的设计

Discovery Studio 是基于 Pipeline Pilot 构建的面向生命科学领域的综合分子建模和模拟平台。交互式强,易于使用的视窗操作界面和经过多年验证的科学算法和集成环境使得 Discovery Studio 被广泛地用于生命科学的各个研究领域,如实验生物学、药物化学、结构生物学、计算生物学和计算化学等。使用 Discovery Studio 软件包的 CDOCKER 分子对接模块,对所设计的系列小分子抑制剂打分。计算过程中使用的蛋白为罗氟司特的复合物晶体结构 1XOQ,即 PDE4 蛋白与 PDE4 抑制剂罗氟司特的复合物晶体结构。

分子对接过程为:

1)准备蛋白。打开蛋白,删除 B 链,进行去水加氢等预处理(Macromolecules→Prepare protein→Run),计算结束后保存文件。

2)准备配体。建立罗氟司特, Cy 对接配体库,加氢,3D 结构等优化(Small molecules→ Prepare or filter ligands→Prepare ligands→Run),计算结束后保存文件。

3)定义活性位点。以化合物罗氟司特配体建立活性位点(Receptor-ligand interactions→Define and

256.28 kJ/mol)。其结合位点模式也与罗氟司特类似,结构中的 3,4 位上的 2 个 O 分别与 PDE4D 的蛋白残基 Gln369 形成氢键,苯环则是与 PDE4 之间形成 π - π 共轭。因而证明了系列小分子理论上对 PDE4D 有较高的抑制活性,结合模式显示效果较好,可以进行系列化合物的合成。

2 系列 PDE4 抑制剂的合成

2.1 主要仪器与试剂

Bruker AVANCE III 400M NMR(DMSO- d_6 为溶剂,TMS 为内标);日本岛津公司岛津 LC-MS-2020 液质联用仪;SGW®X-4B 型显微熔点仪;LC-3000 型液相色谱仪;ZF-20D 型暗箱式紫外分析仪;Envision® 多标记微孔板检测仪(PerKinElmer);Vortex,Genie2T 涡旋仪(上海迈旗环保科技有限公司)。

生物素化-cAMP 示踪剂(PerKinElmer);链霉亲和素包被的供体珠(PerKinElmer);抗-cAMP 受体珠(PerKinElmer)。

2.2 系列化合物的合成

2.2.1 4-(二氟甲氧基)-3-羟基苯甲醛(2)的合成

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 4.14 g(30.00 mmol) 3,4-二羟基苯甲醛,4.2 g 碳酸钾作催化剂,22.5 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)作溶剂,加热至 70 °C 回流搅拌,缓慢滴加 6.30 g(39.10 mmol)氯代二氟乙酸甲酯, n (3,4-二羟基苯甲醛): n (氯代二氟乙酸甲酯)=1:1.3,回流温度下反应 3 h,HPLC 监测反应完全后停止反应。将反应液倒入水中,使用 2 mol/L 稀盐酸调节 pH 至中性,乙酸乙酯萃取。保留合并有机相,盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥。减压旋干溶剂,经柱层析得到白色固体产物(化合物 2)的质量为 3.53 g,HPLC 纯度为 96.37%,收率为 62.19%,mp 173.5~175.1 °C。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.980 (s, 1H), 9.886 (s, 1H), 7.434~7.424 (t, J = 3 Hz, 2H), 7.339~7.318 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.239~7.053 (m, 1H)。

2.2.2 4-(二氟甲氧基)-3-(四氢呋喃-3-基氧基)苯甲醛(3)的合成

在 50 mL 单口烧瓶中,加入 1.35 g(5.58 mmol)偶氮二甲酸二叔丁酯(DBAD),加入 5 mL 二氯甲烷,冰浴搅拌溶解,根据 n (DBAD): n (三苯基磷)=1:1.2, n (化合物 2): n (3-羟基四氢呋喃)=1:1.3 投料,加入三苯基磷 1.76 g(6.7 mmol),3-羟基四氢呋喃 383.4 μL (4.74 mmol),冰浴搅拌 15 min,加入 744 mg(3.95 mmol)的化合物 2,TLC 监控反应,当检测化合物 2 反应完全后,停止反应。减压旋干溶剂,经柱层析得到白色固体产物(化合物 3)的质量为 876.42 mg,HPLC 纯度为 98.25%,收率为 86.28%,mp 203.7~204.1 °C。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.96 (s, 1H), 7.61~7.59 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.43~7.41 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.24~7.06 (d, 1H), 5.20 (t, 1H), 3.92~3.22(m, 4H), 2.28~2.26 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 2.03~2.02 (d, 1H)。

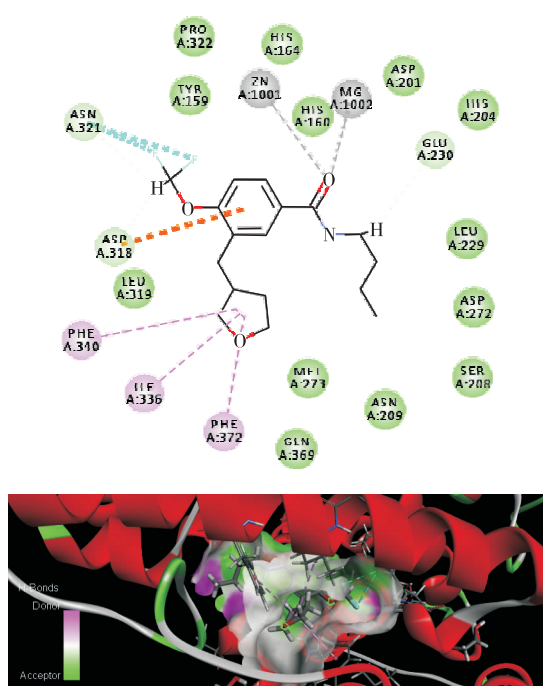


图 2 化合物 Cy10 和磷酸二酯酶 4D(PDB: 1XOQ)的对接模型

Fig.2 Compound Cy10 binding to the PDE4D(PDB: 1XOQ)

2.2.3 4-(二氟甲氧基)-3-(四氢呋喃-3-基氧基)苯甲酰氯(**4**)的合成

在 25 mL 单口烧瓶中,加入 351 mg(1.36 mmol)化合物 **3**, 5 mL 丙酮, 5 mL 高锰酸钾水溶液, 40 °C 乙酯萃取, 合并有机相, 盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到羧酸, 向其中加入 5 mL 二氯亚砷, 将混合物加热至 50 °C, 回流反应 3 h。真空蒸去二氯亚砷, 得到粗酰氯(化合物 **4**), 不经过进一步纯化直接用于下一步反应。

2.2.4 4-(二氟甲氧基)-N-正丁基-3-(四氢呋喃-3-基氧基)苯甲酰胺(Cy10)的合成

在单口烧瓶中, 加入三乙胺(183 μ L, 1.30 mmol)和正丁胺(105 μ L, 1.22 mmol)的四氢呋喃溶液, 在 0 °C 的条件下中滴加 239 mg(0.82 mmol)化合物 **3** 的四氢呋喃溶液。将混合物缓慢加热至室温并搅拌 0.5 h。减压蒸去四氢呋喃, 残余物用乙酸乙酯稀释, 用饱和碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤。无水硫酸钠干燥, 经柱层析, 得目标产物 Cy10, 质量为 105 mg。

相同方法合成中间体 Cy01~Cy11, 并检测了 11 个目标化合物的理化性质及波谱数据。

目标化合物 Cy01: HPLC 纯度 94.21%, mp: 145.4~147.1 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.70~8.67 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 7.54 (d, 1H), 7.50~7.49 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.36~7.34 (d, 1H), 7.29~7.27 (d, 1H), 6.99~6.92 (m, 3H), 5.15~5.12 (t, 1H), 3.94~3.77 (m, 4H), 3.52~3.48 (t, 2H), 3.09~3.06 (t, 2H), 2.28~2.21 (s, 1H), 2.04~1.99 (m, 1H), 1.27~1.24 (m, 1H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 164.97 (t, s, 2C), 148.51 (s, 1C), 142.93 (s, 1C), 133.40 (s, 1C), 128.73 (d, 1C), 126.14 (d, 1C), 121.12 (d, 1C), 117.03 (d, 1C), 114.81 (t, 1C), 113.61 (t, 1C), 79.03 (s, 1C), 72.61 (d, 1C), 66.37 (d, 1C), 45.27 (s, 1C), 32.57 (s, 1C), 21.21 (d, 1C)。

目标化合物 Cy02: HPLC 纯度 92.47%, mp: 178.5~181.0 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.57 (s, 1H), 8.47~8.46 (d, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.77 (t, 1H), 7.35 (dd, 4.8 Hz, 1H), 4.09 (d, 2H), 4.01 (s, 2H), 1.78 (dt, 1H), 1.26~1.08 (m, 4H), 0.83~0.72 (m, 6H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 160.65 (t, s, 2C), 157.71 (s, 1C), 153.11 (s, 1C), 150.52 (s, 1C), 136.87 (d, 1C), 134.56 (d, 1C), 131.00 (d, 1C), 123.54 (d, 1C), 103.78 (t, 1C), 99.99 (t, 1C), 76.37 (s, 1C), 50.34 (d, 1C), 41.21 (d, 1C), 38.75 (s, 1C), 23.25 (s, 1C), 10.51 (d, 1C)。

目标化合物 Cy03: HPLC 纯度 94.19%, mp: 186.3~187.0 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.63~8.60 (t, 1H), 7.51~7.50 (d, 1H), 7.48~7.45 (d, 1H), 7.33~7.19 (m, 5H), 7.13~6.94 (d, 1H), 5.15~5.12 (t, 1H), 3.94~3.77 (m, 4H), 3.51~3.46 (m, 2H), 2.87~2.83 (t, 2H), 2.29~2.20 (m, 1H), 2.04~1.98 (d, 1H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 165.56 (t, s, 2C), 148.51 (s, 1C), 142.98 (s, 1C), 141.92 (s, 1C), 132.98 (d, 1C), 127.39 (s, 1C), 125.70 (d, 1C), 124.58 (s, 1C), 121.21 (d, 1C), 120.78 (d, 1C), 117.02 (d, 1C), 113.60 (s, 1C), 79.03 (d, 1C), 72.60 (d, 1C), 66.86 (s, 1C), 32.88 (d, 1C), 29.62 (t, 1C)。

目标化合物 Cy04: HPLC 纯度 91.29%, mp: 271.0~272.0 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28~8.26 (d, 1H), 7.55~7.51 (m, 1H), 7.31~6.94 (m, 5H), 5.17 (s, 1H), 4.04~3.34 (m, 3H), 2.65~2.51 (m, 1H), 2.23 (d, 1H), 2.03~2.00 (m, 1H), 1.89~1.74 (m, 2H), 1.31~1.07 (m, 3H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 165.56 (t, s, 2C), 148.51 (s, 1C), 142.98 (s, 1C), 141.92 (s, 1C), 132.98 (d, 1C), 127.39 (s, 1C), 125.70 (d, 1C), 124.58 (s, 1C), 121.21 (d, 1C), 120.78 (d, 1C), 117.02 (d, 1C), 113.60 (s, 1C), 79.03 (d, 1C), 72.60 (d, 1C), 66.86 (s, 1C), 40.25 (t, 1C), 32.88 (d, 1C), 29.62 (t, 1C)。

目标化合物 Cy05: HPLC 纯度 91.32%, mp: 225.7~231.7 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.96 (s, 1H), 8.63~8.60 (d, 7H), 8.25~8.16 (d, 2H), 7.65~7.41 (t, 4H), 5.21 (s, 1H), 3.92~3.76 (m, 4H), 2.51~2.50 (s, 3H), 1.25~1.09 (d, 5H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 160.55 (t, s, 2C), 157.14 (s, 1C), 152.67 (s, 1C), 150.39 (s, 1C), 148.74 (d, 1C), 136.92 (s, 1C), 134.56 (d, 1C), 131.06 (s, 1C), 123.63 (d, 1C), 103.94 (d, 1C), 47.48 (d, 1C), 38.78 (t, 1C), 29.27 (t, 1C), 22.13 (t, 1C), 13.93 (t, 1C)。

目标化合物 Cy06: HPLC 纯度 97.33%, mp: 261.0~262.2 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.96 (s, 1H), 8.63~8.60 (d, 7H), 8.26~8.16 (d, 2H), 7.65~7.25 (m, 5H), 5.21 (d, 1H), 3.92~3.76 (m, 4H), 2.05 (d, 2H), 1.55~0.99 (m, 5H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 164.53 (t, s, 2C), 157.24 (s, 1C), 152.72 (s, 1C), 150.42 (s, 1C), 148.79 (d, 1C), 141.88 (s, 1C), 136.83 (d, 1C), 134.65 (s, 1C), 128.38 (d, 1C), 123.86 (s, 1C), 123.61 (s, 1C), 103.95 (d, 1C), 47.20 (d, 1C), 38.75 (t, 1C), 35.21 (t, 1C), 29.08 (t, 1C), 28.22 (t, 1C)。

目标化合物 Cy07: HPLC 纯度 94.82%, mp: 213.7~215.9 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.73 (d, 1H), 8.51 (d, $J = 4.8, 1.4$ Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.76 (d, 1H), 7.28~7.23 (m, 2H), 7.19 (d, 6.1 Hz, 2H), 7.13 (d, 2H), 4.36 (t, 2H), 4.13~4.05 (m, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.01~1.88 (m, 2H), 1.66~1.53 (m, 2H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 160.58 (t, s, 2C), 157.20 (s, 1C), 152.63 (s, 1C), 150.51 (s, 1C), 148.83 (d, 1C), 136.86 (s, 1C), 134.93 (d, 1C), 130.97 (s, 1C), 123.57 (d, 1C), 103.91 (s, 1C), 45.80 (s, 1C), 38.77 (d, 1C), 25.41 (d, 1C), 22.27 (t, 1C)。

目标化合物 Cy08: HPLC 纯度 98.19%, mp: 236.1~237.5 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.65 (s, 1H), 8.78~8.76 (s, 1H), 7.71~7.64 (m, 2H), 7.48~7.35 (m, 1H), 7.24~6.69 (d, 1H), 4.00~3.98 (d, 2H), 1.32~1.23 (m, 1H), 0.63~0.58 (m, 2H), 0.41~0.36 (m, 2H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 164.26 (t, s, 2C), 150.14 (s, 1C), 148.81 (s, 1C), 143.46 (s, 1C), 141.57 (d, 1C), 131.17 (s, 1C), 130.81 (d, 1C), 121.33 (s, 1C), 120.89 (d, 1C), 120.37 (s, 1C), 116.95 (s, 1C), 114.15 (d, 1C), 72.76 (d, 1C), 40.27 (s, 1C), 10.41 (t, 1C), 3.52 (t, 1C)。

目标化合物 Cy09: HPLC 纯度 92.01%, mp: 231.5~233.0 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.41 (s, 1H), 8.06~8.03 (d, 1H), 7.77~7.59 (m, 3H), 7.47~7.34 (m, 2H), 7.18 (s, 1H), 5.22~5.18 (d, 1H), 4.07~3.76 (m, 4H), 2.32~2.20 (d, 1H), 2.08~1.99 (m, 1H), 1.31~1.15 (m, 1H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 165.01 (t, s, 2C), 148.61 (s, 1C), 136.68 (s, 1C), 132.85 (s, 1C), 122.40 (d, 1C), 121.37 (s, 1C), 121.30 (d, 1C), 121.18 (s, 1C), 122.40 (d, 1C), 121.37 (s, 1C), 119.37 (s, 1C), 116.95 (d, 1C), 115.14 (d, 1C), 79.22 (d, 1C), 72.61 (t, 1C), 66.87 (t, 1C), 32.88 (t, 1C)。

目标化合物 Cy10: HPLC 纯度为 92.57 %。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.49~8.46 (t, 1H), 7.55~7.47 (m, 2H), 7.31~7.25 (m, 1H), 7.12~6.94 (d, 1H), 5.16~5.13 (t, 1H), 3.94~3.76 (m, 4H), 3.34~3.23 (t, 2H), 2.27~2.20 (m, 1H), 2.04~1.98 (d, 1H), 1.55~1.47 (d, 2H), 1.37~1.18 (m, 4H), 0.93~0.85 (m, 4H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 165.34 (t, s, 2C), 148.49 (s, 1C), 142.88 (s, 1C), 133.19 (s, 1C), 120.76 (d, 1C), 117.02 (d, 1C), 114.52 (d, 1C), 79.02 (d, 1C), 72.60 (t, 1C), 66.86 (t, 1C), 39.97 (t, 1C), 32.88 (t, 1C), 31.73 (t, 1C), 20.14 (t, 1C), 14.19 (q, 1C)。

目标化合物 Cy11: HPLC 纯度 94.16%, mp: 216.5~218.1 °C。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.48~8.45 (t, 1H), 7.54~7.47 (m, 2H), 7.30~3.25 (m, 1H), 7.12~6.93 (d, 1H), 5.16~5.13 (t, 1H), 3.94~3.76 (m, 4H), 3.32~3.22 (d, 2H), 2.29~2.13 (m, 1H), 2.05~1.91 (d, 1H), 1.54~1.50 (t, 2H), 1.32~1.14 (m, 12H), 0.90~0.84 (t, 4H)。¹³C NMR (300 MHz, DMSO) δ 165.31 (t, s, 2C), 148.49 (s, 1C), 142.89 (s, 1C), 133.19 (s, 1C), 120.76 (d, 1C), 117.01 (d, 1C), 114.52 (d, 1C), 79.02 (d, 1C), 72.60 (t, 1C), 66.85 (t, 1C), 40.26 (t, 1C), 32.88 (t, 2C), 31.71 (t, 1C), 29.57 (t, 1C), 29.22 (t, 1C), 26.98 (t, 1C), 22.56 (t, 1C), 14.41 (q, 1C)。

3 系列 PDE4 抑制剂的生物活性测试

3.1 化合物初筛实验步骤

1) 配制 1×反应缓冲液: 取 1 mL 10×反应缓冲液, 加入约 5 mL 超纯水, 0.01 g 牛血清白蛋白, 使其自然溶解(不混摇), 再用超纯水定容至 10 mL, 放在冰上;

2) 配制 PDE4 溶液: 取 1×反应缓冲液 799 μ L 加入离心管中, 再加入 1 μ L 脱盐 PDE4, 混匀, 即稀释 800 倍;

3) 配制梯度浓度的 Cy01 溶液: 反应缓冲液作溶剂, 配制浓度为 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5, 0.031 25, 0.015 625, 0.007 812 5, 0.003 906 25 mmol/L 的溶液, 编号 C₁~C₉;

4) 取离心管编号 A₁~A₁₃, 在 A₁~A₁₂ 中分别加入 20 μ L 的 PDE4 溶液, A₁₃ 中加入 20 μ L 的 1×反应缓冲液。从 C₁~C₉ 中取 10 μ L 溶液放入对应离心管 A₁~A₉ 中, A₁₀ 中加入 10 μ L 的 LOF(罗氟司特) 标样(0.02 mmol/L), A₁₁ 和 A₁₃ 中加入 10 μ L 的二甲亚砷, A₁₂ 中加入 1×缓冲液, 混匀后反应 0.5 h;

5) 反应 0.5 h 后, 在 A₁~A₁₃ 中分别加入 20 μ L 配置好的 Bio-cAMP 溶液, 混匀后分别取 10 μ L 到微孔板中, 平行 3 组, 离心(1 000 r/min, 30 s)后反应 1 h;

6) 按反应量配制受体和配体:(避光条件下配制)取 638.41 μ L 的 1×免疫分析缓冲液, 加入 4.3 μ L 的 Anti-cAMP 受体微珠, 2.29 μ L 的供体微珠, 混匀, 待步骤 5) 反应 1 h 结束后, 每个孔加入 15 μ L 混合液, 离心(1 000 r/min, 30 s)后避光反应 1 h;

7) 反应结束后用多标记微孔板检测仪检测 Alpha 信号, 结果见表 2;

8) 根据检测结果, 计算抑制率, 用 GraphPad Prism 5 作图计算化合物 Cy01 的 IC₅₀ 值。其他样品参照检测。

总反应体系: ①不同浓度抑制剂(2 μ L)+ PDE4(4 μ L), 反应 0.5 h; ②Bio-cAMP 溶液(4 μ L), 反应 1 h; ③受体和配体(15 μ L), 避光反应 1 h。

3.2 系列化合物 IC₅₀ 值的测定

采用试剂盒法^[13-14], 按照 3.1 所述实验过程, 检测初筛结果较好的化合物 Cy01, Cy03, Cy04, Cy06, Cy10, Cy11。根据检测结果, 通过实验体系的稀释倍数相关公式来计算系列化合物对蛋白的抑制率, 用 GraphPad Prism 5 作图计算化合物 Cy01, Cy03, Cy04, Cy06, Cy10, Cy11 的 IC₅₀ 值, 见表 3。

表 2 化合物 Cy01 检测信号值

Table 2 Preliminary testing data of compound Cy01

| 编号 | 信号值 | | |
|--|--------|---------|---------|
| | 平行组 1 | 平行组 2 | 平行组 3 |
| A ₁ | 97 332 | 111 433 | 110 966 |
| A ₂ | 74 798 | 76 331 | 75 167 |
| A ₃ | 55 501 | 53 200 | 54 963 |
| A ₄ | 43 928 | 41 981 | 43 365 |
| A ₅ | 25 295 | 24 391 | 24 754 |
| A ₆ | 16 810 | 16 588 | 17 510 |
| A ₇ | 14 392 | 13 612 | 14 250 |
| A ₈ | 7 128 | 8 730 | 7 731 |
| A ₉ | 5 219 | 6 379 | 6 631 |
| A ₁₀ (EHNA+Bio-cAMP+PDE4) | 83 451 | 82 948 | 87 130 |
| A ₁₁ (DMSO+Bio-cAMP+PDE4) | 4 212 | 4 751 | 4 419 |
| A ₁₂ (Buffer+Bio-cAMP+PDE4) | 3 251 | 3 477 | 2 922 |
| A ₁₃ (DMSO+Bio-cAMP+Buffer) | 93 374 | 92 290 | 94 243 |

从上述结果中可以看出,系列苯甲酰胺类化合物在 C-3 位侧链含有四氢呋喃-3-基氧基时对 PDE4 的抑制活性普遍较好,N 上连有直链的化合物活性弱于芳香环,且直链化合物中,长直链的活性弱于短直链。

4 结 论

以 3,4-二羟基苯甲醛为原料,DMF 为溶剂,与氯代二氟乙酸甲酯烷基化反应,产物与带羟基的芳香环进行醚化反应(如 3-羟基四氢呋喃),之

后氧化成羧酸,然后在氯化亚砷中酰氯化,之后以二氯甲烷为溶剂酰胺化,引入不同侧链,合成相关系列目标产物。共合成 11 个苯甲酰胺类化合物(Cy01~Cy11)。

合成的 11 个新化合物对 PDE4 都有一定抑制作用,其中部分化合物抑制作用相对较弱,属于弱抑制。发现一个活性较好的化合物 Cy06(IC₅₀ 值为 0.219 $\mu\text{mol/L}$),其对 PDE4 具有较好的抑制作用。

参考文献:

- [1]柳丽,郑静,黄险峰,等.磷酸二酯酶及其抑制剂在神经退行性疾病中的研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2018,32(12):953-958.
- [2]MAURICE D H, KE H M, AHMAD F, et al. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2014, 13(4): 290-314.
- [3]HUANG X F, JIANG W T, LIU L, et al. A novel PDE9 inhibitor WYQ-C36D ameliorates corticosterone-induced neurotoxicity and depression-like behaviors by cGMP-CREB-related signaling[J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2018, 24(10): 889-896.

表 3 化合物 Cy01~Cy11 的 IC₅₀ 值Table 3 The IC₅₀ value of compound Cy01—Cy11 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

| 化合物 | IC ₅₀ 值 | 化合物 | IC ₅₀ 值 |
|------|--------------------|------|--------------------|
| Cy01 | 5.42 | Cy07 | — |
| Cy02 | — | Cy08 | — |
| Cy03 | 4.68 | Cy09 | — |
| Cy04 | 4.94 | Cy10 | 10.51 |
| Cy05 | — | Cy11 | 17.99 |
| Cy06 | 0.219 | | |

- [4] VENTER J C, ADAMS M D, MYERS E W, et al. The sequence of the human genome[J]. *Science*, 2001, 291: 1304-1351.
- [5] FRANCIS S H. Molecular properties of mammalian proteins that interact with cGMP: protein kinases, cation channels, phosphodiesterases, and multi-drug anion transporters[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10(1/2/3): 2097-2117.
- [6] WU Y N, LI Z, HUANG Y Y, et al. Novel phosphodiesterase inhibitors for cognitive improvement in Alzheimer's Disease[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(13): 5467-5483.
- [7] GUO H B, CHENG Y F, WANG C M, et al. FFPM, a PDE4 inhibitor, reverses learning and memory deficits in APP/PS₁ transgenic mice via cAMP/PKA/CREB signaling and anti-inflammatory effects[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 116: 260-269.
- [8] CASTRO A, JEREZ M J, GIL C, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in immunomodulatory responses: advances in the development of specific phosphodiesterase inhibitors[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2005, 25(2): 229-244.
- [9] 唐波, 傅榕庚, 盛文兵, 等. PDE-4 抑制剂的研究进展[J]. *化学试剂*, 2015, 37(9): 803-808.
- [10] BLOKLAND A, VAN DUINEN M A, SAMBETH A, et al. Acute treatment with the PDE4 inhibitor roflumilast improves verbal word memory in healthy old individuals: a double-blind placebo-controlled study[J]. *Neurobiology of Aging*, 2019, 77: 37-43.
- [11] ASHTON M J, COOK D C, FENTON G, et al. Selective type IV phosphodiesterase inhibitors as antiasthmatic agents, the syntheses and biological activities of 3-(cyclopentyloxy)-4-methoxybenzamides and analogs[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1994, 37(11): 1696-1703.
- [12] DAL PIAZ V, GIOVANNONI M P. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 35(5): 463-480.
- [13] 姜松周, 吕金鹏, 付莹, 等. 查尔酮类衍生物的合成及其抑制酪氨酸酶活性评价[J]. *常州大学学报(自然科学版)*, 2021, 33(1): 35-40.
- [14] 杨林松, 钟慧, 王璐瑶, 等. 怀牛膝多糖对 RAW264.7 细胞吞噬活性、表型和细胞因子表达的调节[J]. *常州大学学报(自然科学版)*, 2020, 32(4): 55-62.

(责任编辑:谭晓荷)