

· 药物化学 ·

新型喹唑啉酮类先导物的设计、合成及抑制人顶体酶活性研究

宁微微, 刘雪飞, 张晓梦, 郑灿辉, 盛春泉, 周有骏, 章玲, 吕加国, 朱驹 (第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 基于人精子顶体酶活性位点的三维结构设计并合成新型 3-取代喹唑啉酮类化合物。方法 计算机模拟设计及化学合成。结果 设计并合成了 7 个 3-取代喹唑啉酮类先导物, 进行了抑酶活性测试。结论 所有合成的化合物具有较好的抑酶活性, 其中化合物 3 g 是对照物 Na-对甲苯磺酰-L-赖氨酸氯甲基酮 (TLCK) 的 229 倍。

[关键词] 精子顶体酶; 抑制剂; 设计; 合成; 抑酶; 喹唑啉酮

[中图分类号] R914 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)04-0296-04

Design, synthesis of novel quinazolinon compounds as human anti-acrosin inhibitor

NING Weiwei LIU Xuefei ZHANG Xiaomeng ZHENG Canhui SHENG Chunquan ZHOU Youjun ZHANG Ling LV Jianguo ZHU Ju (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** Novel 3-substituted quinazolinon compounds were designed and synthesised on the base of the active site of human acrosin. **Methods** The compounds were designed by computer and chemically synthesised. **Results** Seven 3-substituted quinazolinon compounds were designed and synthesised, subsequently carried out *in vitro* anti-acrosin test. **Conclusion** The results of anti-acrosin test *in vitro* exhibited that all the compounds showed potent anti-acrosin activities. Particularly, compounds 3 g displayed much stronger anti-acrosin activities (229 times) than that of TLCK.

[Key words] acrosin inhibitor; design; synthesis; anti-acrosin activity; quinazolinon

精子顶体酶位于精子顶体内层浆膜上, 属膜结合性酶, 是一种类似于胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶, 以酶原形式储存在顶体内。顶体反应发生后, 顶体酶原自动激活成 β-顶体酶 (β-acrosin)。β-顶体酶是一种多功能的蛋白质, 它可以分散顶体基质, 也能作为次级配位分子维持精子结合在卵子透明带 (ZP) 上进行顶体反应^[3]。顶体酶释放后能将卵细胞的透明带水解出一条通道, 便于精子穿过透明带与卵细胞融合。抑制顶体酶的活性便可以阻止受精, 从而避孕^[1-4]。因此人精子顶体酶成为了公认的避孕药物新作用靶点之一^[5]。

吕加国等^[6]构建了人精子顶体酶活性位点的三维结构并分析了活性位点重要氨基酸残基性质。人精子顶体酶活性位点大体分为三个区域: P1, P2, G。P1区口袋深但开口小, 是配体结合最重要的极性区域; P2区口袋浅但开口较大; G槽是腔右侧一个狭长的浅凹槽。P1含有 T216, C217, Q218, S221,

W243等残基; P2中有 R252, R199, Y196, G198等关键残基; 而 G槽分布有 E120, H69, W243等 (图 1)。基于上述关键残基的分布、活性腔极性与立体结构大小, 本研究设计了喹唑啉酮类先导化合物。

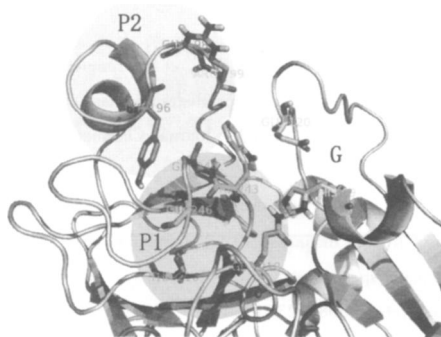


图 1 人精子顶体酶活性腔关键残基

我们在喹唑啉酮母核的 3 位分别引入长链和短链的取代基团, 同时根据 P1 腔关键残基的分布, 引入含多个 N 原子的基团与残基作用, 兼顾合成的可能性, 采用氨基作为连接子, 设计并合成了喹唑啉酮类新型人精子顶体酶抑制剂。合成路线见图 2。

[作者简介] 宁微微 (1984), 女, 硕士研究生. E-mail: weiw@foxmail.com.

[通讯作者] 吕加国. E-mail: lg20060508@yahoo.com.
朱驹. E-mail: zhuj@smmu.edu.cn.

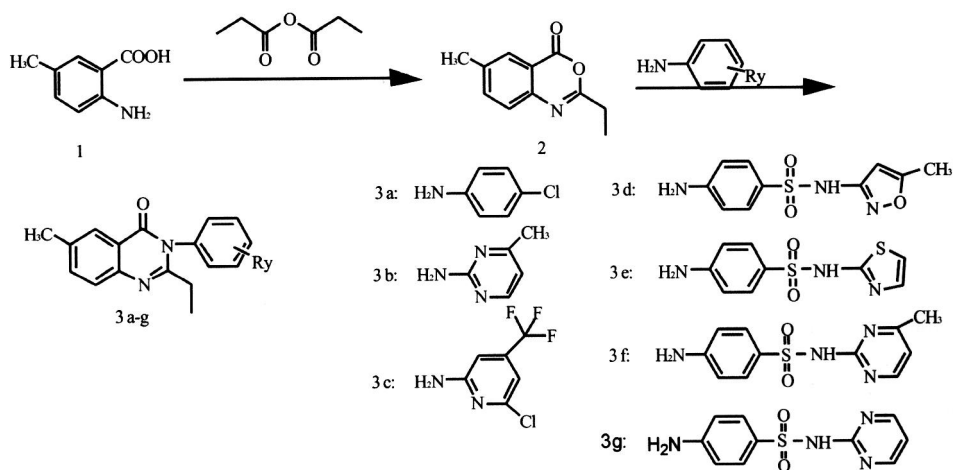


图 2 化合物 3a~ 3g 的制备

1 材料与方法

1.1 化合物的设计

1.1.1 材料与方法 本实验采用的人精子顶体酶三维分子模型及活性腔性质取自我们前期研究, 分子模拟采用 InsightII 和 SYBYL 软件包, AutoDock3.05 完成; 所有计算机工作都在 SG1 服务器 (Origin300) 上完成。所有参数除特别指明外均为默认值。

1.1.2 化合物设计 在 Sybyl 9 中构建抑制剂分子结构, 进行分子力学优化和模拟退火计算, 选取代表性低能构象用于进一步的分子对接研究。分子对接采用 AutoDock3.05, 对接过程采用 Lamarckian 遗传算法, 将局部能量搜索与遗传算法相结合, 以半经验势函数作为能量打分函数, 对小分子构象和位置进行全局搜索。每个分子根据柔性键的多少进行 30~50 次独立的对接计算, 对结果进行成簇分析, 最后依据结合自由能和成簇分析的情况来选取合理的结合模式。

1.2 化学合成

1.2.1 仪器及试剂 熔点采用天津市分析仪器厂 RY-2 熔点仪测定 (温度计未经校正); 核磁共振氢谱采用 Bruker AC-300P 型仪器测定 (溶剂为 DMSO- d_6 , 300 MHz)。MS (ESI) 采用 DECA XP-MAX LCQ 型质谱仪; 其它所有试剂均为市售分析纯 (使用前未纯化)。硅胶薄层板使用烟台海洋化工厂的产品。

1.2.2 2-乙基-6-甲基苯并噁嗪-4 酮 (化合物 2) 的制备 取 2-氨基-6-甲基苯甲酸 (6.0 g 0.04 mol), 丙酸酐 50 mL 加热搅拌回流 5 h 停止反应, 放冷至室温后冰箱内放置过夜, 滤集析出白色片状晶体, 得粗品。

用无水乙醇重结晶得淡黄色化合物 2.524 g 收率 69.3%, mp 100.0~100.5 °C。文献值: 99.1~99.9 °C。

1.2.3 6-甲基-2-乙基-3-取代-4(3H) 喹唑啉酮化合物的制备 取化合物 2 (1.5 g 0.008 mol) 与含氨基的化合物 a-g 投料比为 1.5:1, 加入缩合剂二环己基碳二亚胺 (DCC) 0.2 g 在溶剂 N,N-二甲基甲酰胺中常温搅拌反应 10 h, 薄层板检测反应完全后为浑浊溶液, 过滤, 取滤液, 油泵除去溶剂, 得粗品化合物^[8,9], 无水乙醇重结晶。所有化合物均按此法制备, 目标化合物结构表征如下。

3-(4-氯苯胺)-2-乙基-6-甲基-4(3H) 喹唑啉酮 (3a): 0.60 g 收率: 36.0%, mp 185~186 °C。¹H NMR δ 1.219 (t 3H, CH₃), 2.446 (q 2H, CH₂CH₃), 2.488 (s 3H, CH₃), 7.205 (dd $J_1 = 2.1$ Hz $J_2 = 2.1$ Hz 2H, Ph-2H, 6H), 7.533 (dd $J_1 = 2.1$ Hz $J_2 = 2.1$ Hz 2H, Ph-3H, 5H), 7.602~7.651 (m, 2H, quinazolinon-7H, 8H), 8.042 (s H, quinazolinon-5H)。ESI-MS m/z 297.7 [M-H]⁺

2-乙基-6-甲基-3-(4-甲基嘧啶)-4(3H) 喹唑啉酮 (3b): 0.68 g 收率: 39.4%, mp 212~214 °C。¹H NMR δ 1.099 (t 3H, C-CH₃), 2.192 (s 3H, CH₃), 2.271 (s 3H, CH₃), 2.371 (q 2H, CH₂), 6.420 (d $J = 5.1$ Hz H, pyrimidin-4H), 7.375 (dd $J_1 = 2.1$ Hz $J_2 = 2.1$ Hz, H, quinazolinon-7H), 7.767 (d $J = 1.5$ Hz H, quinazolinon-8H), 8.052 (d $J = 5.1$ Hz H, quinazolinon-5H), 8.384 (d $J = 8.4$ Hz H, pyrimidin-5H)。ESI-MS m/z 279.8 [M-H]⁺

3-(6-氯-4-三氟甲基吡啶)-2-乙基-6-甲基-4(3H) 喹唑啉酮 (3c): 0.47 g 收率: 23.3%, mp 187~188 °C。¹H NMR: 1.100 (t 3H, C-CH₃), 2.073 (s

3H, CH₃), 2.372 (q 2H, CH₂), 6.772 (q H, pyrimidin-4H), 7.185 (t H, pyrimidin-6H), 7.379 (dd J_{HH} = 1.8 Hz, J₂ = 1.8 Hz H, quinazolinon-7H), 7.767 (d J = 1.5 Hz H, quinazolinon-8H), 8.381 (d J = 8.7 Hz, H, quinazolinon-5H). ESI-MS: m/z 366.9 [M-H]⁺

3-(4-甲基异噻唑)苯磺酰胺-2-乙基-6-甲基-4(3H)噻唑啉酮 (3d): 0.46g 收率: 20.2%, mp 260~261 °C. ¹H NMR δ 1.096 (t 3H, C-CH₃), 2.277 (q 2H, CH₂), 2.490 (s 3H, CH₃), 6.884 (d J = 4.5 Hz H, isoxazol-4H), 7.305 (d J = 4.5 Hz quinazolinon-8H), 7.582~7.686 (m, 3H, Ph-3H, 5H, quinazolinon-7H), 7.876 (s H, quinazolinon-5H), 7.947 (d J = 8.4 Hz 2H, Ph-2H, 6H) 12.892 (s H, NH). ESI-MS: m/z 423.7 [M-H]⁺

3-噻唑-苯磺酰胺-2-乙基-6-甲基-4(3H)噻唑啉酮 (3e): 0.72g 收率: 31.8%, mp 214~216 °C. ¹H NMR δ 1.498 (t 3H, C-CH₃), 2.284 (q 2H, CH₂), 2.437 (s 3H, CH₃), 5.565 (d J = 7.8 Hz H, 2H, thiazol-4H, 5H), 6.884 (d J = 4.8 Hz H, quinazolinon-8H), 7.303 (d J = 4.5 Hz H, quinazolinon-7H), 7.581~7.659 (m, 3H, quinazolinon-5H, Ph-3H, 5H), 7.951 (d J = 6.6 Hz 2H, Ph-2H, 6H), 12.896 (s H, NH). ESI-MS: m/z 425.7 [M-H]⁺

3-(3-甲基嘧啶)苯磺酰胺-2-乙基-6-甲基-4(3H)噻唑啉酮 (3f): 1.02g 收率: 44.2%, mp 216~217 °C. ¹H NMR δ 1.223 (t 3H, CH₃), 2.316 (s 3H, CH₃), 2.490 (s 3H, CH₃), 2.682 (q 2H, CH₂), 5.575 (d J = 5.562 Hz H, pyrimidin-4H), 5.983 (s 2H, pyrimidin-5H, quinazolinon-8H), 6.537 (d J = 8.7 Hz 2H, Ph-3H, 5H), 6.869 (d J = 5.1 Hz H, quinazolinon-7H), 7.606 (d J = 8.7 Hz 2H, Ph-2H, 6H), 8.292 (d J = 4.8 Hz H, quinazolinon-5H), 11.106 (s H, NH). ESI-MS: m/z 434.6 [M-H]⁺

3-嘧啶-苯磺酰胺-2-乙基-6-甲基-4(3H)噻唑啉酮 (3g): 1.89g 收率: 84.5%, mp 218~220 °C. ¹H NMR δ 1.222 (t H, C-CH₃), 2.426 (s 3H, CH₃), 2.668 (q 2H, CH₂), 6.002 (s H, pyrimidin-5H), 6.534 (dd J₁ = 2.7 Hz, J₂ = 2.7 Hz 2H, Ph-3, 5), 7.487 (d J = 8.1 Hz H, quinazolinon-8H), 7.665 (dd J₁ = 2.1 Hz, J₂ = 2.1 Hz 2H, Ph-2H, 6H), 7.728 (d J = 1.5 Hz H, quinazolinon-7H), 8.467 (d J = 4.8 Hz 2H, pyrimidin-4H, 6H), 11.255 (s H, NH). ESI-MS: m/z 420.3 [M-H]⁺

1.3 抗生育活性实验 本实验以 Na-苯甲酰-DL-精氨酸-O-硝磺基苯胺 (BAPNA) 为底物, 与精子释放

的顶体酶反应, 采用改良 Kennedy 法测定所得化合物对人精子顶体酶的抑制能力。试剂盒购自江苏省南京欣迪生物药业工程有限公司, 试剂盒包括: 分离剂、顶体酶激活剂、抑制剂、反应底物剂。方法参见文献 10。抑酶活性见表 1。

表 1 化合物的抑酶活性 (IC₅₀ μmol/ml)

编号	IC ₅₀ (μmol/ml)	编号	IC ₅₀ (μmol/ml)
3 a	6.8	3 e	1.2
3 b	6.5	3 f	2.6
3 c	1.4	3 g	0.62
3 d	3.9	TLCK	142.6

2 结果与讨论

我们采用分子对接方法研究了化合物 3b 和 3g 与人顶体酶的作用模式。结果显示: 化合物均插入 P1 腔, 与 P1 腔形成两对以上氢键作用。化合物 3b 母核进入 P1 腔内, 母核及取代的嘧啶环上的 N 原子与 Q218、G246 有氢键作用, 噻唑啉酮母核与 W243 具有疏水作用 (图 3)。化合物 3g 的母核深入 P1 腔内, 其取代的嘧啶苯磺酰胺与 S221、T216、Q218 形成三对氢键, 噻唑啉酮母核与 G244 有氢键作用, 与 W243 形成疏水作用 (图 4)。

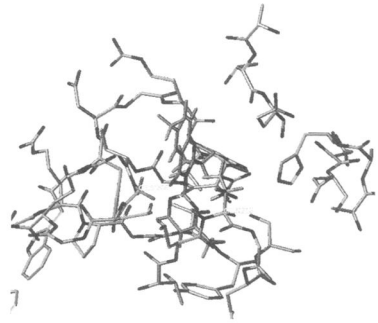


图 3 化合物 3b 与顶体酶对接

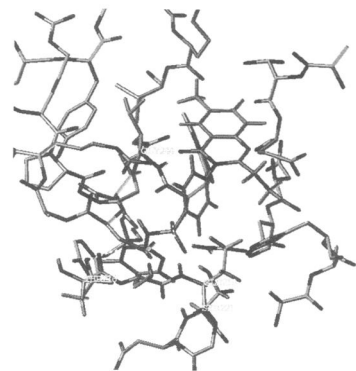


图 4 化合物 3g 与顶体酶对接

上皮细胞分化、抑制肺血管形成、刺激纤维细胞增殖等有关。Takano等^[5]发现ILD与肺部基础疾病、既往肺纤维化、放疗史相关,伴肺纤维化者发生率高达33%。ILD主要症状为急性发作的呼吸困难,并有低热、咳嗽等症状。Okamoto等^[6]报道第1例间质性肺炎病人,在服药后8d出现呼吸困难症状,X线及CT证实肺内出现片状阴影,而排除感染等疾病,虽给予大剂量激素治疗,但于13d后死亡。所以如果病人在服药过程中出现进行性的呼吸困难,并有咳嗽及发热症状,应暂时停药观察,若诊断为间质性肺炎应立即停药,并给予相应处理。本例患者未发生ILD不良反应。

本文为临床药师如何在临床找到工作切入点提供了一定启示,供同行参考。

【参考文献】

[1] Herbst RS, Maddox AM, Rothberg ML, et al. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well tolerated and has activity in non-small cell lung

cancer and other solid tumors: results of a phase I trial [J]. Clin Oncol 2002, 20 (18): 3815
 [2] 许建萍,张湘茹. 吉非替尼治疗晚期肺癌的疗效和毒副作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(1): 60
 [3] Ritter CA, Artega CL. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase: a promising therapeutic target in solid tumors [J]. Sem in Oncol 2003 30(1 Suppl 1): 3.
 [4] Thatcher N, Chang A, Parikh P, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small cell lung cancer: results from a randomized, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer) [J]. Lancet, 2005, 366 (9496): 1527.
 [5] Takano T, Ohe Y, Kusumoto M, et al. Risk factors for interstitial lung disease and predictive factors for tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib [J]. Lung Cancer, 2004, 45(1): 93.
 [6] Okamoto I, Fujii K, Matsumoto M, et al. Diffuse alveolar damage after ZD1839 therapy in a patient with non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2003, 40(3): 339.

[收稿日期] 2009-11-19
 [修回日期] 2010-01-20

(上接第 298 页)

我们考察了先导化合物和部分衍生物的体外抑酶作用。结果显示所有测试化合物均具有抑酶活性;尤其是化合物3e和3g活性远远高于阳性对照品TLCK。

化合物与靶酶作用模式及抑酶实验结果显示,化合物3a取代基较短,其活性远不及化合物3g,这提示了化合物3位侧链的长短对抑酶活性有较大的影响:3位侧链短,与靶酶氢键作用少,则抑酶活性弱;3位侧链长,则与活性腔氨基酸残基有较多结合,活性大大增强。化合物与靶酶通过氢键作用,提示在3位侧链引入羟基、氨基等氢键形成基团,能增加与靶酶氢键结合,将提高分子与靶酶的亲和力,有利于提高抑酶活性。此外,含有磺酰嘧啶基团形成环状胍结构的长链取代基活性较高,这也暗示侧链含环状胍结构的取代基能加强与靶酶的氢键结合作用。

本研究基于人精子顶体酶三维结构设计了喹唑啉酮类化合物,该类化合物主要与靶酶活性腔氨基酸残基以氢键、疏水作用产生抑酶活性。进一步对该类化合物结构优化,可发现高效、低毒的抑制人精子顶体酶活性的化合物。本研究为男性抗生育研究提供了新的结构类型。

【参考文献】

[1] Sipila P, Jalkanen J, Huhtaniemi I, et al. Novel epididymal

proteins as targets for the development of post-testicular male contraception [J]. Reproduction, 2009 137: 379.
 [2] Moreno RD, Alvarado CP. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence [J]. Mol Reprod Dev, 2006 73(11): 1430.
 [3] Rave VY, Diaz ES, Chemes HE, et al. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans [J]. Hum Reprod, 2008 23(3): 573.
 [4] Mishra PK, Manivannan B, Pathak N, et al. Status of spermatorogenesis and sperm parameters in langur monkeys following long-term vas occlusion with styrene maleic anhydride [J]. Androl 2004, 24(4): 501.
 [5] Jones R, Pany R, Leggio L, et al. Inhibition of sperm-zona binding by suramin: a potential 'lead' compound for design of new anti-fertility agents [J]. Mol Human Reprod, 1996 2: 597.
 [6] 吕加国,盛春泉,张珺,等. 人顶体酶三维结构的同源模建及其与KF950的分子对接研究 [J]. 化学学报, 2006 64(10): 1073.
 [7] Parkanyi C, Duran S. Synthesis of 5-chloro-2-methyl-3-(5-methylthiazol-2-yl)-4(3H)-quinazolinone and related compounds with potential biological activity [J]. Heterocyclic Chem, 2000, 37: 725.
 [8] Ioannis K, Abdelhakim E, Elisabeth S, et al. Rapid synthesis of 2,3-disubstituted quinazolin-4-ones enhanced by microwave assisted decomposition of formamide [J]. Tetrahedron Letters 2007, 48: 6609.
 [9] 宋桂红,张珺,张晓梦,等. 南德士抑制人精子顶体酶活性的实验研究 [J]. 中华男科学杂志, 2009, 15(8): 700.

[收稿日期] 2010-01-19
 [修回日期] 2010-03-09