



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101072764 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 10

(21) 申请号 200580035478. 7

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 08. 15

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

10/921, 332 2004. 08. 19 US

60/649, 569 2005. 02. 04 US

JP 特开平 10-254087 A, 1998. 09. 25, 说明书第 3-4, 17-18 栏.

WO 9922728 A1, 1999. 05. 14, 说明书第 7-9、26 页和附图 5.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2007. 04. 17

DANNE A ET AL.: Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from Cistus salvifolius. PHYTOCHEMISTRY 2. 1994, 37(2), pages 553 - 538.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/CN2005/001262 2005. 08. 15

LAM W H ET AL.: A potential prodrug for a green tea polyphenol proteasome inhibitor: evaluation of the peracetate ester of (-)-epigallocatechin gallate [(-)-EGCG]. BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY 12 21. 2004, 12(21), pages 5587 - 5596.

(87) PCT 申请的公布数据

W02006/017981 EN 2006. 02. 23

DE GROOT A ET AL.: Advantages of long range INEPT measurement for structuredetermination of catechin esters. BULLETIN OF MAGNETIC RESONANCE 17 1-4. 1995, 17(1-4), pages 242-243.

(73) 专利权人 香港理工大学

地址 中国香港

专利权人 韦恩州立大学

南佛罗里达州大学

麦吉尔大学

FREUDENBERG, K., et. al. SYNTHESE DES 3-GALLOYL-CATECHIN-ACETATS. LIEBIGS ANN. CHEM. 603. 1957, 603pages 177-182.

(72) 发明人 陈德恒 林惠霞 周铭祥 窦庆平

德博拉·乔伊斯·库恩

阿斯拉姆扎曼·卡齐 万升标

克里斯廷·R·兰迪斯-比沃华尔

审查员 夏凤娟

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51) Int. Cl.

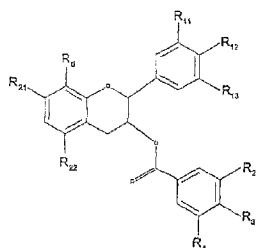
C07D 311/62(2006. 01)

权利要求书3页 说明书33页 附图21页

(54) 发明名称

抑制蛋白酶体的 (-)-表没食子儿茶素没食子酸酯衍生物

(57) 摘要

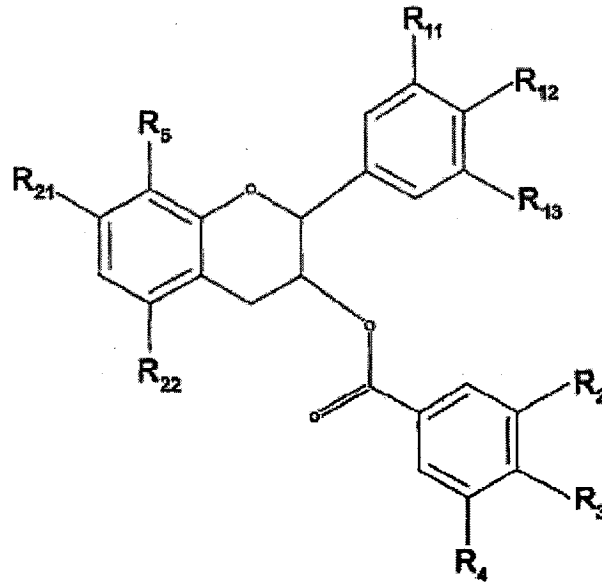


(*) (-)-EGCG 是最丰

度差。本发明提供了具有下列通式的化合物, 其中 R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₂₁、R₂₂、R₂、R₃和 R₄均各自独立地选自 -H 和 C₁-C₁₀酰氧基; 以及 R₅选自 -H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、C₃-C₇环烷基、苯基、苯甲基和 C₃-C₇环烯基, 同时, 最后提到的 7 个基团中的每一个都可用 1 到 6 个卤素原子的任意组合取代; R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₂₁、R₂₂、R₂、R₃和 R₄中至少有一个是 -H, 这些化合物被证实比其用作蛋白酶体抑制剂以减少肿瘤细胞生长的未被保护对应物更有效。

富的儿茶素, 其被认为是化学预防及抗癌剂。然而, (-)-EGCG 具有至少一个局限性: 其生物利用

1. 一种用于抑制蛋白酶体的下式化合物：



其中，

- R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 均各自独立地选自 $-H$ 和 C_1 - C_{10} 酰氧基；以及
- R_5 选自 $-H$ 、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_{10} 烯基、 C_2 - C_{10} 炔基、 C_3 - C_7 环烷基、苯基、苯甲基和 C_3 - C_7 环烯基，同时，最后提到的 7 个基团中的每一个都可用 1 到 6 个卤素原子的任意组合取代；
- R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中至少有一个是 C_1 - C_{10} 酰氧基；以及
- R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中至少有一个是 $-H$ ，其中上式满足下列条件 (1)-(2) 之一：

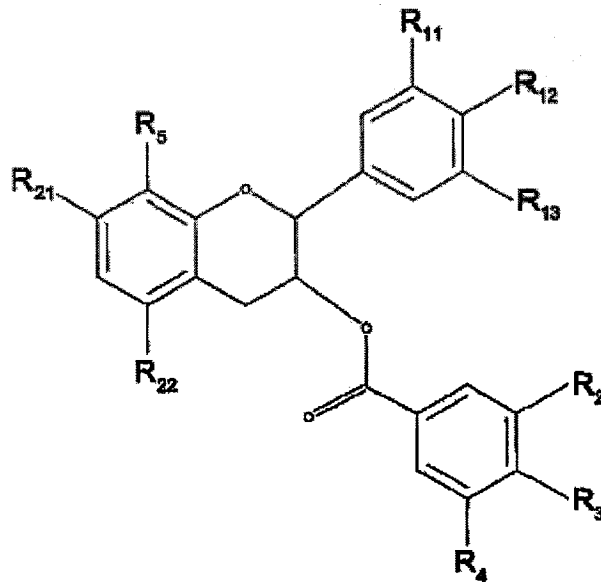
(1) R_5 是 $-H$ ， R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自均为乙酸酯基团， R_2 是乙酸酯基团，并且 R_3 和 R_4 各自均为 $-H$ ；或者

(2) R_5 是 $-H$ ，并且 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自均为乙酸酯基团， R_2 和 R_4 各自均为乙酸酯基团，且 R_3 是 $-H$ 。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 R_5 是 $-H$ ， R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自均为乙酸酯基团， R_2 是乙酸酯基团，并且 R_3 和 R_4 各自均为 $-H$ 。

3. 权利要求 1 的化合物，其中 R_5 是 $-H$ ， R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自均为乙酸酯基团， R_2 和 R_4 各自均为乙酸酯基团，并且 R_3 是 $-H$ 。

4. 下式化合物在制造通过抑制蛋白酶体减少肿瘤细胞生长的药物中的应用：



其中，

- R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 均各自独立地选自 $-H$ 和 C_1-C_{10} 酰氧基；以及
- R_5 选自 $-H$ 、 C_1-C_{10} -烷基、 C_2-C_{10} -烯基、 C_2-C_{10} -炔基、 C_3-C_7 -环烷基、苯基、苯甲基和 C_3-C_7 -环烯基，同时，最后提到的 7 个基团中的每一个都可用 1 到 6 个卤素原子的任意组合取代；以及

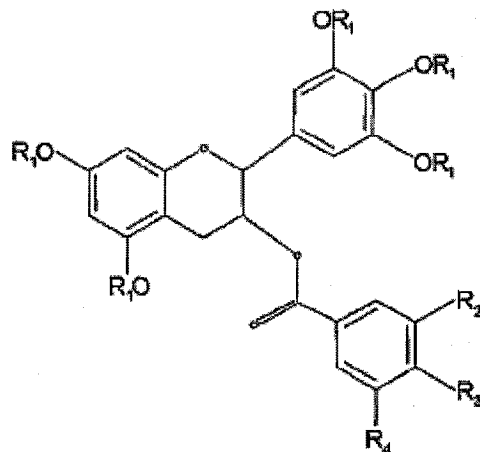
- R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中至少有一个是 C_1-C_{10} 酰氧基，

其中上式满足下列条件 (1) 和 (2) 之一：

(1) R_5 是 $-H$ ， R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自均为乙酸酯基团， R_2 是乙酸酯基团，并且 R_3 和 R_4 各自均为 $-H$ ；或者

(2) R_5 是 $-H$ ，并且 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自均为乙酸酯基团， R_2 和 R_4 各自均为乙酸酯基团，且 R_3 是 $-H$ 。

5. 用于抑制蛋白酶体的下式化合物：



其中，

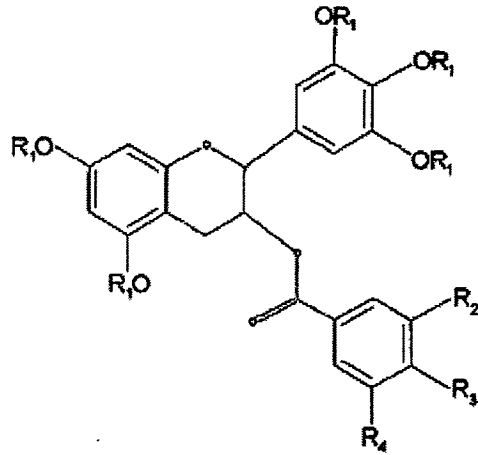
上式满足下列条件 (1)-(2) 之一：

(1) R_1 是 $-H$ ， R_2 是 $-OH$ ，并且 R_3 和 R_4 各自均为 $-H$ ；或者

(2) R_1 是 $-H$ ， R_2 和 R_4 各自均为 $-OH$ ，并且 R_3 是 $-H$ 。

6. 权利要求 5 的化合物，其中 R_2 是 $-OH$ ，并且 R_3 和 R_4 各自均为 $-H$ 。

7. 权利要求 5 的化合物, 其中 R_2 和 R_4 各自均为 $-OH$, 并且 R_3 是 $-H$ 。
8. 下式化合物在制造通过抑制蛋白酶体减少肿瘤细胞生长的药物中的应用:



其中,

上式满足下列条件 (1)-(2) 之一:

- (1) R_1 是 $-H$, R_2 是 $-OH$, 并且 R_3 和 R_4 各自均为 $-H$; 或者
- (2) R_1 是 $-H$, R_2 和 R_4 各自均为 $-OH$, 并且 R_3 是 $-H$ 。

抑制蛋白酶体的 (-)-表没食子儿茶素没食子酸酯衍生物

发明领域

[0001] 本发明涉及 (-)-表没食子儿茶素没食子酸酯的衍生物,尤其是用作蛋白酶体抑制剂和 / 或用于抑制癌细胞生长。

[0002] 发明背景

[0003] 从绿茶提取物中发现的多酚有 (-)-表儿茶素 (EC), (-)-表没食子儿茶素 (EGC), (-)-表儿茶素-3-没食子酸酯 (ECG) 和 (-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (EGCG)。尤其是, (-)-EGCG 作为最丰富的儿茶素,被认为是绿茶儿茶素 (GTCs) 中的化学预防及抗癌剂 (4. Fujiki, H. J Cancer Res Clin Oncol. 1999, 125, 589-97)。

[0004] 蛋白酶体是具有多相催化活性的大蛋白复合体,不仅负责老化蛋白和错误折叠蛋白的降解,而且负责与细胞周期和凋亡相关调控蛋白的降解。在蛋白酶体依赖的蛋白水解过程中,泛素先与底物结合,然后底物降解,氨基酸和泛素再循环。泛素 / 蛋白酶体依赖的降解途径在细胞增殖上调、细胞死亡下调,以及人肿瘤细胞耐药性的发展过程中起着至关重要的作用。因此,蛋白酶体抑制剂显示了作为新型抗癌药物的巨大潜力 (Dou, Q. P. ;Li, B. Drug Resist Update 1999, 2, 215-23)。据显示,天然的 (-)-EGCG 和合成得到的 (+)-EGCG 都是蛋白酶体糜蛋白酶活性的强效抑制剂,从而引起生长停滞和 / 或细胞凋亡 (Smith, D. M. ;Wang, Z. ;Kazi, A. ;Li, L. ;Chan, T. H. ;Dou, Q. P. Mol Med 2002, 8 :382-92.)。美国专利公开 20040110790 (Zaveri 等) 描述了合成的绿茶多酚类似物作为化学治疗和化学预防剂,但是该合成方法仅提供了外消旋的化合物,并没有采用从绿茶中得到的天然形成的儿茶素。

[0005] P13K/Akt 信号转导是广为人知的肿瘤细胞存活途径 (Vanhaesebroeck, B. ; Alessi, D. R. Biochem J 2000, 346, 561-76)。阻断这种途径被视为抑制肿瘤生长的重要机制。磷酸化 Akt (p-Akt) 是 Akt 的活化形式。一旦被活化, Akt 可通过磷酸化和随后抑制周期素依赖性激酶抑制剂 p27. 24 而介导细胞周期进程。最近,已证实 (-)-EGCG 可通过减弱 MMTV-Her-2/neu 小鼠乳腺肿瘤 NF639 细胞中的磷脂酰肌醇 3- 激酶信号而抑制 Akt 激酶活性,从而使肿瘤细胞生长受到抑制 (Pianetti, S. ;Guo, S. ;Kavanagh, K. T. ;Sonenshein, G. E. Cancer Res 2002, 62, 652-5)。

[0006] 但是, (-)-EGCG 具有至少一个局限性:其生物利用度差。Nakagawa 等的一项研究表明,使大鼠口服 56mg (-)-EGCG, 仅 0. 012% 的 (-)-EGCG 可被吸收 (Nakagawa, K. ; Miyazawa, T. Anal Biochem. 1997, 248, 41-9)。这样低的吸收率被认为是由于 (-)-EGCG 在中性或碱性溶液中稳定性差而造成的。当肠道和体液的 pH 值为中性或微碱性时, GTCs 在人体中不稳定,从而导致生物利用度降低。

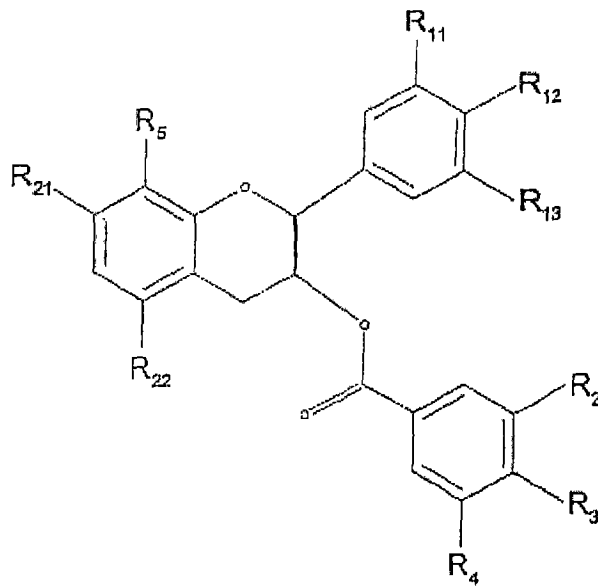
[0007] 发明目的

[0008] 因此,本发明的目的之一是提供可解决上述至少一个或多个现有技术问题的 (-)-EGCG 衍生物。至少,本发明的目的之一是给公众提供一种有益的选择。

发明概要

[0009] 因此,本发明提供抑制蛋白酶体的下式化合物:

[0010]



[0011] 其中,

[0012] ● R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₂₁、R₂₂、R₂、R₃ 和 R₄ 均各自独立地选自 -H 和 C₁-C₁₀ 酰氧基;以及

[0013] ● R₅ 选自 -H、C₁-C₁₀ 烷基、C₂-C₁₀ 烯基、C₂-C₁₀ 炔基、C₃-C₇ 环烷基、苯基、苯甲基和 C₃-C₇ 环烯基,同时,最后提到的 7 个基团中的每一个都可用 1 到 6 个卤素原子的任意组合取代;

[0014] ● R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₂₁、R₂₂、R₂、R₃ 和 R₄ 中至少有一个是 C₁-C₁₀ 酰氧基;以及

[0015] ● R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₂₁、R₂₂、R₂、R₃ 和 R₄ 中至少有一个是 -H。

[0016] 优选 R₁₁、R₂ 和 R₄ 各自均为 -H,并且 R₁₂、R₁₃、R₂₁、R₂₂ 和 R₃ 各自均为乙酸酯或苯甲酸酯基团。

[0017] 任选地, R₁₁ 是 -H,并且 R₁₂、R₁₃、R₂₁、R₂₂、R₂、R₃ 和 R₄ 各自均为乙酸酯或苯甲酸酯基团。

[0018] 另外, R₁₁、R₁₃、R₂ 和 R₄ 各自均为 -H,并且 R₁₂、R₂₁、R₂₂ 和 R₃ 各自均为乙酸酯或苯甲酸酯基团。

[0019] 任选地, R₁₁ 和 R₁₃ 各自均为 -H,并且 R₁₂、R₂₁、R₂₂、R₂、R₃ 和 R₄ 各自均为乙酸酯或苯甲酸酯基团。

[0020] R₁₁、R₁₂ 和 R₁₃ 各自均可以是 -H,并且 R₂₁、R₂₂、R₂、R₃ 和 R₄ 各自都可以是乙酸酯或苯甲酸酯基团。

[0021] 在本发明上述化合物的一个实施方案中, R₅ 是 -H,并且 R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₂₁ 和 R₂₂ 各自均为乙酸酯基团。这个特别的实施方案还提供了下列 3 种变化:

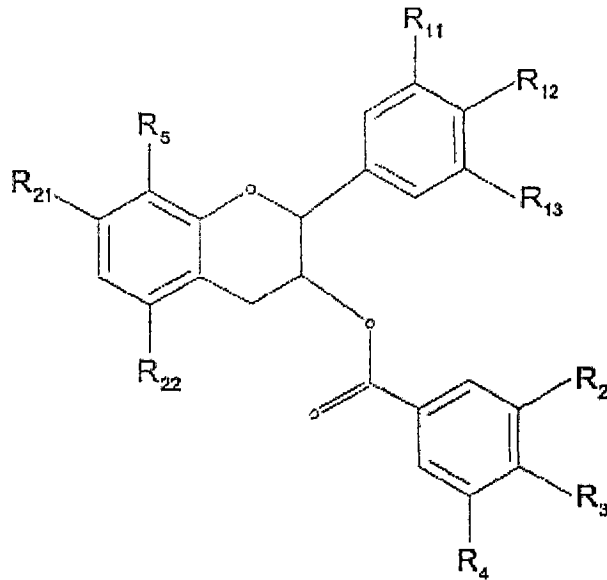
[0022] ● R₂ 是乙酸酯基团,并且 R₃ 和 R₄ 各自均为 -H;

[0023] ● R₃ 是乙酸酯基团,并且 R₂ 和 R₄ 各自均为 -H;或者

[0024] ● R₂ 和 R₄ 各自均为乙酸酯基团,并且 R₃ 是 -H。

[0025] 本发明的另一方面是提供减少肿瘤细胞生长的方法,包括施用有效量的下式化合物的步骤:

[0026]



[0027] 其中,

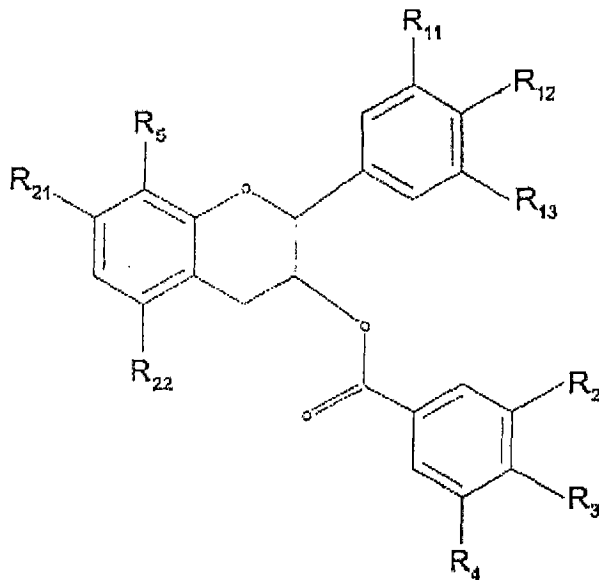
[0028] ● R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 均各自独立地选自 -H 和 C_1 - C_{10} 酰氧基 ; 以及

[0029] ● R_5 选自 -H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_{10} 烯基、 C_2 - C_{10} 炔基、 C_3 - C_7 环烷基、苯基、苯甲基和 C_3 - C_7 环烯基, 同时, 最后提到的 7 个基团中的每一个都可用 1 到 6 个卤素原子的任意组合取代 ; 以及

[0030] ● R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中至少有一个是 C_1 - C_{10} 酰氧基。

[0031] 本发明的另一方面是提供了下式化合物在制造减少肿瘤细胞生长的药物中的应用 :

[0032]



[0033] 其中,

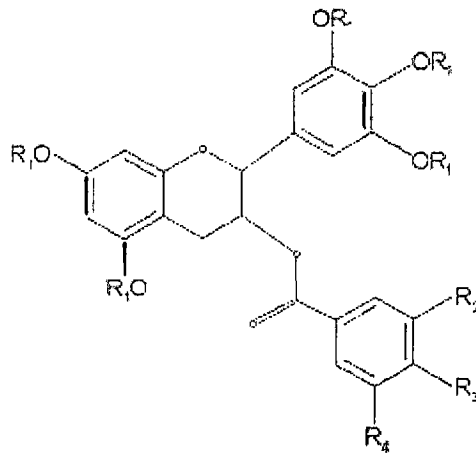
[0034] ● R_{11} 、 R_{12} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 均各自独立地选自 -H 和 C_1 - C_{10} 酰氧基 ; 以及

[0035] ● R_5 选自 -H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_{10} 烯基、 C_2 - C_{10} 炔基、 C_3 - C_7 环烷基、苯基、苯甲基和 C_3 - C_7 环烯基, 同时, 最后提到的 7 个基团中的每一个都可用 1 到 6 个卤素原子的任意组合取代 ; 以及

[0036] ● R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中至少有一个是 C_1 - C_{10} 酰氧基。

[0037] 本发明还提供了抑制蛋白酶体的下式化合物：

[0038]



[0039] 其中，

[0040] ● R₁ 是 -H；

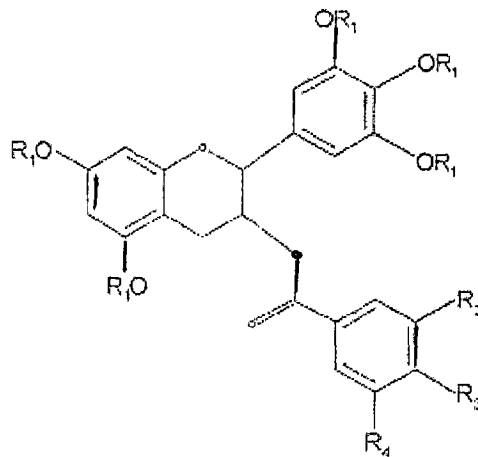
[0041] ● R₂、R₃ 和 R₄ 均各自独立地选自 -H 和 -OH；以及

[0042] ● R₂、R₃ 和 R₄ 中至少有一个是 -H。

[0043] 优选 R₂ 可以是 -OH，并且 R₃ = R₄ = -H。任选地，R₃ 可以是 -OH，并且 R₂ = R₄ = -H；或 R₃ 可以是 -H，并且 R₂ = R₄ = -OH。

[0044] 本发明还提供了减少肿瘤细胞生长的方法，包括施用有效量的下式化合物的步骤：

[0045]



[0046] 其中，

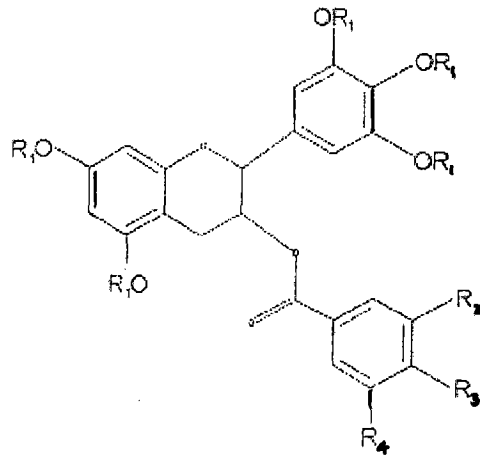
[0047] ● R₁ 是 -H；

[0048] ● R₂、R₃ 和 R₄ 均各自独立地选自 -H 和 -OH；以及

[0049] ● 如果 R₂ = R₃ = R₄，则 R₂ 不是 -OH。

[0050] 本发明的另一方面是提供下式化合物在制造减少肿瘤细胞生长的药物中的应用：

[0051]



[0052] 其中，

[0053] ● R_1 是 -H；

[0054] ● R_2 、 R_3 和 R_4 均各自独立地选自 -H 和 -OH；以及

[0055] ● 如果 $R_2 = R_3 = R_4$ ，则 R_2 不是 -OH。

[0056] 附图概述

[0057] 本发明的优选实施方案将通过举例和参考附图进行说明，其中：

[0058] 图 1 显示了 (-)-EGCG 的结构，以及本发明的 (-)-EGCG 衍生物的实例；

[0059] 图 2 显示了 (-)-EGCG 和 1 的降解曲线；

[0060] 图 3 显示了 EGCG 过乙酸酯 (1) 在含有维生素 C 的培养基中的时程结果 (面积 : 时间)。化合物 1 : ◆ ; 化合物 A (二乙酸酯) : X ; 化合物 B (单乙酸酯) : ▲ ; EGCG : ■ ;

[0061] 图 4 显示了 EGCG 过乙酸酯 (1) 在含有维生素 C 并添加有裂解液的培养基中的时程结果 (面积 : 时间)。化合物 1 : ◆ ; 化合物 A (二乙酸酯) : X ; 化合物 B (单乙酸酯) : ▲ ; EGCG : ■ ;

[0062] 图 5 显示了 1 和 (-)-EGCG 对纯化的 20S 蛋白酶体的糜蛋白酶样活性的抑制作用；

[0063] 图 6 显示了 (a) 1 和 (-)-EGCG 在体内对蛋白酶体活性的抑制作用；(b) 经 1 和 (-)-EGCG 处理后的泛素的蛋白质印迹法测定结果；

[0064] 图 7 显示了经 1 和 (-)-EGCG 处理的 p-Akt 水平的量；

[0065] 图 8 显示了经 1 和 (-)-EGCG 处理的 Jurkat 细胞的存活率；

[0066] 图 9 显示了 Jurkat 细胞用各标明的多酚 $25 \mu\text{M}$ 处理 4 小时 (A)，高至 8 小时 (C)，或 24 小时 (B)，或者 LNCaP 细胞用标明的化合物 $25 \mu\text{M}$ 处理 24 小时 (D)，然后用泛素、Bax、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 、p27 和肌动蛋白 (Actin) 的特异性抗体进行蛋白质印迹分析的结果。箭头所指的带是 Bax 和 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 可能的泛素化形式。A. 第 4 道的 Ub- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 带可能是从第 5 道溢出的结果。所显示的数据为三次独立实验的代表性数据；

[0067] 图 10 显示了 Jurkat T 细胞 (A 和 B) 或 VA-13 (C 和 D) 细胞用标明的多酚 $25 \mu\text{M}$ 处理 24 小时的结果。A. 台盼蓝掺入法 (Trypan blue incorporation) 测定结果。数据以死亡细胞占细胞群总数比的平均值 $\pm\text{SD}$ 表示。B. PARP 裂解的蛋白质印迹。C. 用与 FITC 结合的、对 p85 裂解的 PARP 片断具有特异性的抗体对细胞凋亡后期进行荧光显微分析的结果。以 DAPI 复染作为非凋亡细胞对照。采用倒置荧光显微镜 (Zeiss, 德国) 通过 AxioVision 软件获得图像。D. 通过计算同一区域内凋亡细胞占细胞总数比，得到的 C 中凋亡细胞的量

化。数据为两次重复实验的平均值 \pm SD；

[0068] 图 11 显示了合成的乙酰化多酚对乳腺和前列腺癌细胞的作用。A. MTT 法测定结果。乳腺癌 MCF-7 细胞用各标明的化合物 5 或 25 μ M 处理 24 小时。B. 形态学变化。前列腺癌 LNCaP 细胞用 25 μ M (-)-EGCG 或一种受保护的类似物处理 24 小时, 然后进行形态学评测。图像通过放大倍数为 40X 的相差显微镜 (Leica, 德国) 获得。C. 软琼脂实验测定结果。LNCaP 细胞与溶剂二甲基亚砜 (DMSO) 或 25 μ M (-)-EGCG 或受保护的类似物一起铺板到软琼脂中。培养细胞 21 天, 不再添加药物。所显示的数据为三次重复实验的代表性的检查的孔 (scanned wells)。D. 用自动计数器量化 C 中的菌落并以平均值 \pm SD 表示；

[0069] 图 12 显示了以标明的化合物 25 μ M 处理正常的 WI-38 细胞和 SV-40 转化的 VA-13 细胞 24 小时 (A 和 B) 或 36 小时 (C), 或者以各化合物 25 μ M 处理白血病 Jurkat T 细胞和非转化的 YT 细胞 24 小时 (D) 的结果。A. 完整细胞中蛋白酶体的糜蛋白酶样活性。B 和 C. 脱落细胞和贴壁细胞在 10X (B) 或 40X (C) 放大倍数下的核染色凋亡形态。缺的图板表示没有细胞脱落发生。D. 以 PARP 的特异性抗体进行蛋白质印迹分析的结果；

[0070] 图 13 显示了 (-)-EGCG 的结构, 以及本发明的 (-)-EGCG 过乙酰氧基衍生物的实例。图 13a 和 13b 显示了合成本发明的 (-)-EGCG 过乙酰氧基衍生物时的中间体；

[0071] 图 14 显示了 Jurkat T 细胞经溶剂 (DMSO)、图 13 中的化合物 25 μ M 预孵育后的糜蛋白酶样活性；

[0072] 图 15 显示了 Jurkat T 细胞经溶剂 (DMSO), 以及图 13 中的化合物 25 μ M 处理后的蛋白酶体靶物和泛素化蛋白的累积；

[0073] 图 16 显示了 Jurkat T 细胞经溶剂 (DMSO), 以及图 13 中的化合物 25 μ M 处理后的细胞死亡百分率；

[0074] 图 17 显示了 Jurkat T 细胞经溶剂 (DMSO), 以及图 13 中的化合物 25 μ M 处理后的 caspase-3 的活化；以及

[0075] 图 18 显示了 Jurkat T 细胞和非转化的人自然杀伤 (YT) 细胞经 10 和 25 μ M 19* 处理, 然后用 $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ 、PARP 和肌动蛋白 (Actin) 的特异性抗体进行蛋白质印迹分析后对肿瘤细胞凋亡的诱导。

[0076] 优选实施方案详细说明

[0077] 下文中通过与附图相关的实施例对本发明进行描述。

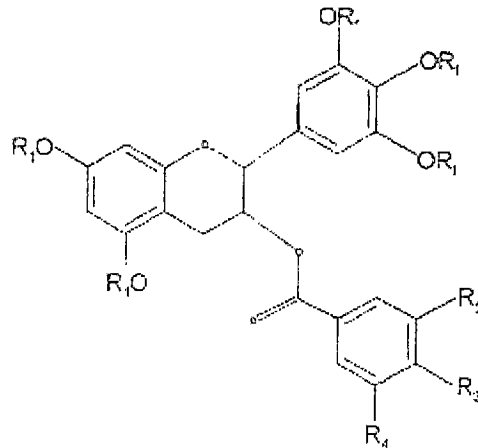
[0078] 本发明的目的、特征及方面在下面的说明中公开或显而易见。本领域技术人员应该理解, 本论述只是对例示性实施方案的描述, 并不意味着限制本发明更广泛的方面, 那些更广泛的方面体现在例示性结构中。

[0079] 在本发明中, 合成了 (-)-EGCG 的前药形式以提高其生物利用度。该前药呈现出: [i] 在中性 pH 的生理条件下具有提高的稳定性; [ii] 在体内保持无生物活性, 直至酶解释放出母药; [iii] 以及最后, 前药基团 (promoiety) 具有低的全身毒性。

[0080] 此外, 还合成了 3 个 (-)-EGCG 衍生物及其前药形式, 并且令人惊讶的是, 这些化合物被证实具有比 (-)-EGCG 自身的天然形式更高的作用强度。

[0081] 本发明醇形式的 (-)-EGCG 衍生物具有如下通式:

[0082]



[0083] 其中,

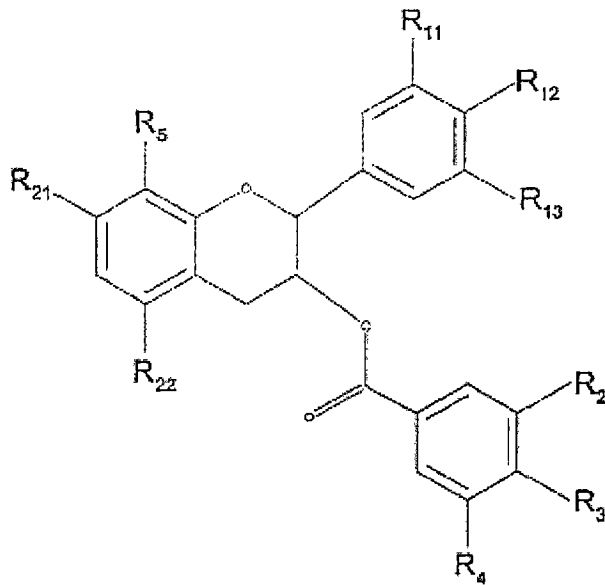
[0084] ● R_1 是 -H ; 以及

[0085] ● R_2 、 R_3 和 R_4 均各自独立地选自 -H 和 -OH。

[0086] 当然, 当 $R_2 = R_3 = R_4$, 且 R_2 是 -OH 时, 该化合物为 (-)-EGCG, 也因此不是本发明的主旨。

[0087] 本发明酯形式的 (-)-EGCG 衍生物具有如下通式 :

[0088]



[0089] 其中,

[0090] ● R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 均各自独立地选自 -H 和 C_1 - C_{10} 酰氧基 ; 以及

[0091] ● R_5 选自 -H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_{10} 烯基、 C_2 - C_{10} 炔基、 C_3 - C_7 环烷基、苯基、苯甲基和 C_3 - C_7 环烯基, 同时, 最后提到的 7 个基团中的每一个都可被 1 到 6 个卤素原子的任意组合取代 ;

[0092] ● R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中至少有一个是 C_1 - C_{10} 酰氧基 ; 以及

[0093] ● R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中至少有一个是 -H。

[0094] 在上述化合物的定义中, 用到了集合名词术语, 通常表示下列基团 :

[0095] C_1 - C_6 酰基 : 具有 $-(CO)-R$ 结构, 其中 R 是氢或具有 1-5 个碳原子的直链或支链烷基, 如甲基、乙基、丙基、1- 甲基乙基、丁基、1- 甲基丙基、2- 甲基丙基、1, 1- 二甲基乙基、戊

基、2-甲基丁基。烷基 R 可以“部分或完全卤化”。术语“部分或完全卤化”的意思是表述这样一种基团,其特征在于其中的氢原子可以部分或全部被相同或不同的卤素原子置换,例如氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯氟甲基、二氯氟甲基、氯二氟甲基、1-氟乙基、2-氟乙基、2,2-二氟乙基、2,2,2-三氟乙基、2-氯-2-氟乙基、2-氯-2,2-二氟乙基、2,2-二氯-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基和五氟乙基。

[0096] C_1-C_{10} 酰氧基:具有 $-O-(CO)-R$ 结构,其中 R 可以是 $-H$ 、 C_1-C_9 烷基、 C_2-C_9 烯基、 C_2-C_9 炔基、 C_3-C_7 环烷基、苯基、苯甲基和 C_3-C_7 环烯基中的任一个,同时,最后提到的 7 个取代基中的每一个都可被任意的直链或支链烷基取代,所述直链或支链烷基如甲基、乙基、丙基、1-甲基乙基、丁基、1-甲基丙基、2-甲基丙基、1,1-二甲基乙基、戊基、2-甲基丁基。烷基 R 可以“部分或完全卤化”。术语“部分或完全卤化”的意思是表述这样一种基团,其特征在于其中的氢原子可以部分或全部被相同或不同的卤素原子置换,例如氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯氟甲基、二氯氟甲基、氯二氟甲基、1-氟乙基、2-氟乙基、2,2-二氟乙基、2,2,2-三氟乙基、2-氯-2-氟乙基、2-氯-2,2-二氟乙基、2,2-二氯-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基和五氟乙基。烷基 R 可以被羟基或烷氧基或氨基部分或全部取代,如羟甲基、2-氨基乙基,或 3-甲氧基丙基。

[0097] 根据本发明,合成了 (-)-EGCG 过乙酸酯,即化合物 1 (图 1)。已证实 1 比 (-)-EGCG 稳定。该前药对纯化的 20S 蛋白酶体无生物活性,但能有效抑制完整肿瘤细胞的蛋白酶体。此外,对完整肿瘤细胞施用该前药而非其母体化合物,导致了磷酸化 Akt (p-Akt) 的缺失,表明了此癌症相关激酶的失活。最后,用 1 处理白血病 Jurkat T 细胞诱导了细胞死亡。

[0098] 为评价其它过乙酸酯保护的茶多酚是否有比其未受保护的母体更高的生物活性,合成了一些除去没食子酸酯环上的羟基的 (-)-EGCG 合成类似物。另外,为提高分子的稳定性,这些羟基被转化成乙酸酯或苯甲酸酯基团以制成前药。令人惊讶的是,已发现这些受保护的类似物是比其未受保护的相似物更有效的完整肿瘤细胞的蛋白酶体抑制剂。

[0099] 本发明化合物的合成方法和特性将在下文中详细说明。

[0100] 原料及方法

[0101] 试剂

[0102] 胎牛血清购自 Tissue Culture Biologicals 公司 (Tulare, CA)。青霉素-链霉素-Glutaxnine 混合物、RPMI 和 DMEM 来自 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA)。二甲基亚砜 (DMSO)、N-乙酰基-L-半胱氨酸 (NAC)、Hoechst 33342、3-((4,5)-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、牛血清白蛋白 (BSA), 和 (-)-EGCG 购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO)。Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (用于蛋白酶体糜蛋白酶样活性) 获自 Biomol 公司 (Plymouth Meeting, PA)。纯化的兔 20S 蛋白酶体获自 Boston Biochem 公司 (Cambridge, MA)。Arnpex Red H202 检测试剂盒购自 Molecular Probes 公司 (Eugene, OR)。抗 Bax 的单克隆抗体 (H280) 和抗泛素的单克隆抗体 (P4D1), 抗 I κ B- α 的多克隆抗体 (C15), 抗肌动蛋白的多克隆抗体 (C11) 和抗羊、抗兔、以及抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司 (Santa Cruz, CA)。抗 p27 的单克隆抗体 (554069) 购自 BD Biosciences 公司 (San Diego, CA)。含 DAPI 的 Vectashield 封片剂 (Mounting Medium) 购自 Vector Laboratories, Inc. 公司 (Burlingame, CA)。对 PARP 裂解位点具有特异性、并与 FITC 结合的多克隆抗体获自 Biosource 公司 (Camarillo, CA)。CaspACE FITC-VAD-FMK 标记物购自

Promega 公司 (Madison, WI)。

[0103] 合成茶多酚类似物的合成。化合物 1、2、2a、3、3a、4, 和 4a 的合成 (图 1)

[0104] 按照文献操作 (Kohri, T.; Nanjo, F.; Suzuki, M.; Seto, R.; Matsumoto, N.; Yamakawa, M.; Hojo, H.; Hara, Y.; Desai, D.; Amin, S.; Conaway, C. C.; Chung, F. L. J Agric Food Chem 2001, 49:1042-8) 制备 1, 但这里仍将阐述 1 的合成。为合成 1, 以市场上可以买到的 (-)-EGCG 为原料。用乙酸酐和吡啶过夜处理 (-)-EGCG, 得到产率为 82% 的期望产物 (图 1)。1 的结构通过 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR、LRMS 和 HRMS 确证。

[0105] Mp 157.1°C

[0106] LRMS m/z (ESI) 817 (MNa⁺)

[0107] HRMS 实测值, 817.1544; C₃₈H₃₄O₁₉Na 的理论值为 817.1592。

[0108] ^1H NMR (CDCl₃, 500MHz) δ 7.62 (s, 2H), 7.24 (s, 2H), 6.73 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.64 (br s, 1H), 5.18 (s, 1H), 3.02 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 9H), 2.27 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.23 (s, 6H)。

[0109] ^{13}C NMR (CDCl₃, 100MHz) δ 168.89, 168.40, 167.59, 167.43, 166.72, 166.20, 163.51, 154.71, 149.72, 149.64, 143.38, 143.29, 138.93, 135.06, 134.34, 127.41, 122.34, 118.79, 109.42, 109.00, 108.06, 76.46, 67.98, 25.85, 21.06, 20.75, 20.54, 20.11。

[0110] (2S*, 3R*)-反式-5,7-双(苄氧基)-2-[3,4,5-三(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-醇 (5)

[0111] 该化合物按照文献操作 (Li, L. H.; Chan, T. H. Org. Lett. 2001, 3, 739-741) 合成。

[0112] (2S*, 3R*)-反式-5,7-双(苄氧基)-2-[3,4,5-三(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基 3-(苄氧基)苯甲酸酯 (2b)

[0113] 向 3-(苄氧基)苯甲酸 (0.12g, 0.53mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液中加入一定量的 (COCl)₂ (0.68mL)。混合物回流 2 小时。之后蒸馏除去过量的 (COCl)₂ 和溶剂, 所得残留物真空干燥过夜。残留物重新溶解在二氯甲烷 (5mL) 中, 在 0°C 加入到 5 (0.20g, 0.26mmol) 和 DMAP (0.08g, 0.64mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液中。然后混合物室温搅拌过夜。加入饱和碳酸氢钠。分离有机层, 水层用乙酸乙酯萃取。合并有机层, 干燥 (以硫酸钠), 并蒸干。残留物用柱层析法 (己烷-乙酸乙酯 4:1) 纯化, 得到为白色固体的化合物 2b (0.22g, 88%)。

[0114] LRMS m/z (ESI) 989 (MNa⁺)

[0115] HRMS 实测值, 989.3657; C₆₄H₅₄O₉Na 的理论值为 989.3666

[0116] ^1H NMR (CDCl₃, 500MHz) δ 7.54-7.12 (m, 30H), 6.72 (s, 2H), 6.29 (d, J = 4.5Hz, 2H), 5.50 (q, J = 7.0Hz, 1H), 5.10 (d, J = 6.5Hz, 1H), 5.05-4.95 (m, 12H), 3.04 (dd, J = 16.5, 6.0Hz, 1H), 2.89 (dd, J = 16.5, 6.5Hz, 1H)。

[0117] ^{13}C NMR (CDCl₃, 100MHz) δ 165.20, 158.81, 158.51, 157.53, 154.68, 152.73, 138.20, 137.60, 136.76, 136.64, 136.25, 133.24, 131.14, 129.32, 128.49, 128.42, 128.40, 128.29, 128.00, 127.96, 127.91, 127.80, 127.69, 127.62, 127.51, 127.43, 127.38, 127.10, 122.13, 119.93, 115.29, 106.13, 101.23, 94.25, 93.74, 78.38, 74.98, 71.07, 70.02, 69.81, 24.18。

[0118] (2S*, 3R*)-反式-5,7-双(羟基)-2-[3,4,5-三(羟基)苯基]苯并二氢吡喃

喃-3-基-3-(羟基)苯甲酸酯(2)

[0119] 将 2b(0.23g,0.24mmol) 在四氢呋喃/甲醇(28mL/28mL) 与 Pd(OH)₂(0.19g,20% 钯/碳) 中的悬浮液置于氢气氛围中。所得混合物室温搅拌至薄层层析显示反应已完成。然后反应混合物经棉花过滤除去催化剂。蒸干后,残留物用柱层析法(乙酸乙酯-二氯甲烷 2:1) 纯化,得到为白色固体的产物 2(80mg,79%)。

[0120] LRMS m/z (ESI) 449 (MNa⁺)

[0121] HRMS 实测值,449.0887;C₂₂H₁₈O₉Na 的理论值为 449.0849。

[0122] ¹H NMR (CD₃OD,500MHz) δ 7.38-6.97 (m,4H),6.42 (s,2H),5.97 (q,J = 2.5Hz,2H),5.40 (q,J = 6.0Hz,1H),5.03 (d,J = 6.0Hz,1H),2.85 (dd,J = 16.5,5.0Hz,1H),2.74 (dd,J = 16.5,6.0Hz,1H)。

[0123] ¹³C NMR (CD₃OD,100MHz) δ 165.87,157.00,156.52,156.03,154.88,145.42,132.50,130.91,129.17,120.29,119.90,115.45,105.00,98.07,95.00,94.12,77.78,70.15,22.71。

[0124] (2S*,3R*)-反式-5,7-双(乙酰氧基)-2-[3,4,5-三(乙酰氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基-3-乙酰氧基苯甲酸酯(2a)

[0125] 将 2b(0.1g,0.1mmol) 在四氢呋喃/甲醇(12mL/12mL) 与 Pd(OH)₂(0.08g,20% 钯/碳) 中的悬浮液置于氢气氛围中。所得混合物室温搅拌至薄层层析显示反应已完成。然后反应混合物经棉花过滤除去催化剂。滤液蒸干得到脱苄基化合物(2),该化合物不用纯化,直接用于下一步。所得脱苄基化合物溶解于吡啶(4ml) 和醋酐(2ml) 中。所得混合物室温搅拌过夜。之后,真空除去醋酐和吡啶。将所得残留物溶于 20mL 二氯甲烷中,溶液用 5×5mL 水和 5mL 盐水洗涤,以 Na₂SO₄ 干燥,并蒸干。粗品用柱层析法(己烷-乙酸乙酯 1:1) 纯化,得到为白色粉末的化合物 2a(0.061g,85%)。

[0126] Mp 71.6°C

[0127] LRMS m/z (ESI) 701 (MNa⁺)

[0128] HRMS 实测值,701.1541;C₃₄H₃₀O₁₅Na 的理论值为 701.1482

[0129] ¹H NMR (CDCl₃,500MHz) δ 7.79 (d,J = 8.0Hz,1H),7.64 (s,1H),7.42 (t,J = 8.0Hz,1H),7.28 (s,1H),7.17 (s,2H),6.69 (s,1H),6.64 (s,1H),5.46 (q,J = 5.5Hz,1H),5.32 (d,J = 5.5Hz,1H),3.02 (dd,J = 17.0,5.0Hz,1H),2.80 (dd,J = 17.0,6.0Hz,1H),2.32 (s,3H),2.29 (s,3H),2.27 (s,3H),2.26 (s,9H)

[0130] ¹³C NMR (CDCl₃,100MHz) δ 169.10,168.81,168.24,167.47,166.61,164.61,154.00,150.42,149.76,149.28,143.47,135.74,134.48,130.72,129.42,127.18,126.68,122.79,118.58,109.84,108.81,107.54,69.17,23.65,20.96,20.92,20.65,20.47,20.10

[0131] (2S*,3R*)-反式-5,7-双(苄氧基)-2-[3,4,5-三(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基-4-(苄氧基)苯甲酸酯(3b)

[0132] 标题化合物采用与前述制备 2b 相同的方式,用 5(0.08g,0.1mmol) 和 4-(苄氧基)苯甲酸(0.049g,0.22mmol) 进行制备,得到为白色固体的 3b(0.087g,90%)。

[0133] LRMS m/z (ESI) 989 (MNa⁺)

[0134] HRMS 实测值,989.3666;C₆₄H₅₄O₉Na 的理论值为 989.3666

[0135] ¹H NMR (CDCl₃,500MHz) δ 7.91 (d,J = 9.0Hz,2H),7.47-7.22 (m,30H),6.95 (d,

J = 9.0Hz, 2H), 6.74 (s, 2H), 6.31 (dd, J = 5.5, 2.5Hz, 2H), 5.52 (q, J = 6.5Hz, 1H), 5.14 (d, J = 6.5Hz, 1H), 5.07-4.97 (m, 12H), 3.02 (dd, J = 17.0, 5.5Hz, 1H), 2.87 (dd, J = 16.5, 7.0Hz, 1H)

[0136] ^{13}C NMR (CDCl₃, 100MHz) δ 165.08, 162.49, 158.76, 157.53, 154.65, 152.69, 138.09, 137.63, 136.79, 136.70, 136.66, 136.00, 133.38, 131.61, 128.55, 128.49, 128.40, 128.29, 128.09, 127.96, 127.91, 127.78, 127.69, 127.62, 127.43, 127.38, 127.30, 127.09, 122.40, 114.33, 106.08, 101.30, 94.22, 93.67, 78.37, 74.98, 71.05, 69.95, 69.79, 69.26, 24.01

[0137] (2S*, 3R*)-反式-5,7-双(羟基)-2-[3,4,5-三(羟基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基 4-(羟基)苯甲酸酯 (3)

[0138] 标题化合物采用与上述制备 2 相同的方式,用 3b (0.24g, 0.25mmol) 进行制备,得到白色固体 3 (79mg, 75%)。

[0139] LRMS m/z (ESI) 449 (MNa⁺)

[0140] HRMS 实测值, 449.0840; C₂₂H₁₈O₉Na 的理论值为 449.0849

[0141] ^1H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.75 (d, J = 8.5Hz, 2H), 6.77 (d, J = 8.5Hz, 2H), 6.42 (s, 2H), 5.95 (dd, J = 8.0, 2.5Hz, 2H), 5.35 (q, J = 6.0Hz, 1H), 5.00 (d, J = 6.0Hz, 1H), 2.85 (dd, J = 16.5, 5.0Hz, 1H), 2.71 (dd, J = 16.5, 6.5Hz, 1H)

[0142] ^{13}C NMR (CD₃OD, 100MHz) δ 165.88, 161.99, 156.54, 156.05, 154.95, 145.41, 132.46, 131.31, 129.25, 120.61, 114.57, 104.98, 98.14, 94.91, 94.04, 78.00, 69.81, 22.98

[0143] (2S*, 3R*)-反式-5,7-双(乙酰氧基)-2-[3,4,5-三(乙酰氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基 4-(乙酰氧基)苯甲酸酯 (3a)

[0144] 标题化合物采用与上述制备 2a 相同的方式,用 3b (0.15g, 0.16mmol) 进行制备,得到白色固体 3a (92.6mg, 88%)。

[0145] Mp 189.4°C

[0146] LRMS m/z (ESI) 701 (MNa⁺)

[0147] HRMS 实测值, 701.1467; C₃₄H₃₀O₁₅Na 的理论值为 701.1482

[0148] ^1H NMR (CDCl₃, 500MHz) δ 7.94 (d, J = 9.0Hz, 2H), 7.17 (s, 2H), 7.13 (d, J = 9.0Hz, 2H), 6.69 (d, J = 2.0Hz, 1H), 6.63 (d, J = 2.0Hz, 1H), 5.45 (q, J = 6.0Hz, 1H), 5.32 (d, J = 6.0Hz, 1H), 3.01 (dd, J = 16.5, 5.0Hz, 1H), 2.79 (dd, J = 16.5, 6.0Hz, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.26 (s, 9H)

[0149] ^{13}C NMR (CDCl₃, 100MHz) δ 168.81, 168.64, 168.26, 167.49, 166.62, 164.74, 154.48, 154.02, 149.76, 149.30, 143.49, 135.82, 134.50, 131.28, 126.76, 121.60, 118.59, 109.90, 108.80, 107.51, 69.01, 23.64, 20.97, 20.63, 20.46, 20.00

[0150] (2S*, 3R*)-反式-5,7-双(苄氧基)-2-[3,4,5-三(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基 3,5-双(苄氧基)苯甲酸酯 (4b)

[0151] 标题化合物采用与上述制备 2b 相同的方式,用 5 (0.3g, 0.4mmol) 和 3,5-双(苄氧基)苯甲酸 (0.27g, 0.81mmol) 制备,得到白色固体 4b (0.36g, 85%)。

[0152] LRMS m/z (ESI) 1095 (MNa⁺)

[0153] HRMS 实测值, 1095.4059; C₇₁H₆₀O₁₀Na 的理论值为 1095.4084

[0154] ^1H NMR (CDCl_3 , 500MHz) δ 7.47-7.17 (m, 35H), 6.76 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.30 (d, $J = 4.5\text{Hz}$, 2H), 5.48 (q, $J = 7.0\text{Hz}$, 1H), 5.08 (d, $J = 7.0\text{Hz}$, 1H), 5.04-4.92 (m, 14H), 3.07 (dd, $J = 17.0, 5.5\text{Hz}$, 1H), 2.85 (dd, $J = 17.0, 7.0\text{Hz}$, 1H)

[0155] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz) δ 165.14, 159.73, 158.98, 157.67, 154.88, 152.87, 137.77, 136.91, 136.82, 136.78, 136.29, 133.35, 131.86, 128.61, 128.56, 128.52, 128.41, 128.15, 128.10, 128.02, 127.94, 127.81, 127.76, 127.67, 127.51, 127.24, 108.52, 106.93, 106.30, 101.38, 94.43, 93.93, 78.57, 75.12, 71.17, 70.26, 70.15, 70.11, 69.92, 24.58

[0156] (2S*,3R*)-反式-5,7-双(羟基)-2-[3,4,5-三(羟基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基-3,5-双(羟基)苯甲酸酯(4)

[0157] 标题化合物采用与上述制备2相同的方式,用4b(0.17g,0.16mmol)制备,得到白色固体4(50mg,71%)。

[0158] LRMS m/z (ESI) 465 (MNa^+)

[0159] HRMS 理论值,465.0844; $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_9\text{Na}$ 的实测值为465.0798

[0160] ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ 6.85 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.44 (t, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.41 (s, 2H), 5.96 (s, 2H), 5.40 (dd, $J = 10.5, 5.0\text{Hz}$, 1H), 5.05 (d, $J = 5.0\text{Hz}$, 1H), 2.80 (dd, $J = 16.5, 5.0\text{Hz}$, 1H), 2.73 (dd, $J = 16.5, 5.0\text{Hz}$, 1H)

[0161] ^{13}C NMR (CD_3OD , 100MHz) δ 165.81, 158.10, 156.56, 156.06, 154.83, 145.43, 132.44, 131.49, 129.28, 107.34, 106.86, 104.81, 97.93, 94.88, 94.06, 77.60, 69.95, 22.28

[0162] (2S*,3R*)-反式-5,7-双(乙酰氧基)-2-[3,4,5-三(乙酰氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基-3,5-双(乙酰氧基)苯甲酸酯(4a)

[0163] 标题化合物采用与上述制备2a相同的方式,用4b(0.15g,0.14mmol)制备,得到白色固体4a(72mg,70%)。

[0164] Mp 105.5 $^{\circ}\text{C}$

[0165] LRMS m/z (ESI) 759 (MNa^+)

[0166] HRMS 实测值,759.1530; $\text{C}_{36}\text{H}_{32}\text{O}_{17}\text{Na}$ 的理论值为759.1537

[0167] ^1H NMR (CDCl_3 , 500MHz) δ 7.54 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 7.17 (s, 2H), 7.13 (t, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.69 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.64 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 5.45 (q, $J = 6.0\text{Hz}$, 1H), 5.29 (d, $J = 6.5\text{Hz}$, 1H), 3.01 (dd, $J = 17.0, 5.0\text{Hz}$, 1H), 2.79 (dd, $J = 17.0, 6.5\text{Hz}$, 1H), 2.30 (s, 6H), 2.28 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.25 (s, 6H)

[0168] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz) δ 168.80, 168.62, 168.21, 167.45, 166.60, 163.78, 153.96, 150.78, 149.77, 149.27, 143.46, 135.55, 134.48, 131.26, 120.57, 120.29, 118.56, 109.79, 108.86, 107.57, 69.48, 23.77, 20.94, 20.86, 20.64, 20.45, 19.99

[0169] 由于化合物1,2,3和4的羧酸酯基或羟基易于发生酰基互换,本领域技术人员应该能够将这些化合物上的羧酸酯基替换为酰基。

[0170] 合成茶多酚类似物的合成

[0171] 概要

[0172] 购自供货商的原料和试剂未经进一步纯化直接使用。采用文献操作制备(2R,3S)反式和(2R,3R)-顺式-5,7-双(苄氧基)-2-(4-苄氧基苯基)苯并二氢吡喃-3-醇,(2R,3S)反式和(2R,3R)-顺式-5,7-双(苄氧基)-2-[3,4-双(苄氧基)-苯基]苯并二氢吡

喃-3-醇, (2R,3R)-顺式-5,7-双(羟基)-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基 3,4,5-三羟基苯甲酸酯 (Sheng Biao Wang; Tak Hang Chan. Tetrahedron, 2004, 60, 8207)。

[0173] 无水四氢吡喃在氮气下从二苯甲酮羰游基钠 (sodiumbenzophenone ketyl) 中蒸馏得到。无水二氯甲烷在氮气下从 CaH_2 中蒸馏得到。无水 DMF 在真空下从 CaH_2 中蒸馏得到。反应瓶在氮气流下热干 (flame-dried)。所有对水分敏感的反应都在氮气中进行。用硅胶 60 (70-230 目) 完成快速层析 (flash chromatography)。熔点未校正。用 CDCl_3 和丙酮-d6 作溶剂测量以 TMS 为内标的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR (400MHz) 光谱。高分辨 (ESI) MS 光谱用 QTOF-2Micromass 光谱仪记录。

[0174] (+)-(2R,3S)-5,7-双(苄氧基)-2-[3,4-双(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基 4-苄氧基苯甲酸酯 (102)

[0175] 在氮气氛下, 4-苄氧基苯甲酸 (140mg, 0.61mmol) 的溶液与草酰氯 (oxally chloride) (1mL) 的干二氯甲烷 (10mL) 溶液和一滴 DMF 一起回流 3 小时。蒸馏除去过量的草酰氯和溶剂, 残留物真空干燥 3 小时后重新溶解于二氯甲烷 (2mL) 中。将该溶液在 0°C 下逐滴加入至 (2R,3S)-反式-5,7-双(苄氧基)-2-[3,4-双(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-醇 (195mg, 0.3mmol) 和 DMAP (75mg, 0.62mmol) 在 CH_2Cl_2 (15mL) 的溶液中。混合物室温搅拌过夜, 然后加入饱和碳酸氢钠水溶液。分离有机层, 水层用二氯甲烷萃取。合并有机相, 干燥 (硫酸镁), 并蒸干。残留物用硅胶快速层析法 (flash chromatography) (乙酸乙酯/正己烷 = 1/4, v/v) 纯化, 得到目的化合物 (220mg, 85.0%)。在乙酸乙酯和正己烷中重结晶, 得到白色粉末: mp $148-150^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} = +18.3$ ($c = 1$, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 7.88 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 7.43-7.28 (m, 25H), 7.01 (s, 1H), 6.93-6.88 (m, 4H), 6.28 (s, 2H), 5.53-5.50 (m, 1H), 5.14 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 1H), 5.11 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 5.04 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 3.04 (A of ABq, $J = 16.8, 4.6\text{Hz}$, 1H), 2.87 (B of ABq, $J = 16.8, 6.3\text{Hz}$, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 165.0, 162.3, 158.6, 157.4, 154.6, 148.5, 136.9, 136.6, 136.5, 135.9, 131.4, 130.9, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 127.3, 127.1, 126.9, 122.3, 119.5, 114.6, 114.1, 113.1, 101.1, 94.1, 93.4, 78.0, 71.0, 70.9, 69.9, 69.8, 69.6, 69.1, 23.8; HRMS (ESI): $\text{C}_{57}\text{H}_{48}\text{O}_8\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 883.3247, 实测值为 883.3241。

[0176] (-)-(2R,3R)-5,7-双(苄氧基)-2-[3,4-双(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-基 4-苄氧基苯甲酸酯 (104)

[0177] 按照 102 的制备操作, (2R,3R)-顺式-5,7-双(苄氧基)-2-[3,4-双(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-醇用 4-苄氧基苯甲酸进行酯化, 以 86% 的产率得到 104。mp $149-151^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} = -3.1$ ($c = 1.5$, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 7.92 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.44-7.26 (m, 25H), 7.15 (d, $J = 1.6\text{Hz}$, 1H), 6.91-6.87 (m, 4H), 6.32 (d, $J = 2.1\text{Hz}$, 1H), 6.28 (d, $J = 2.1\text{Hz}$, 1H), 5.63 (bs, 1H), 5.08 (9s, 2H), 5.06 (s, 1H), 5.03-5.00 (m, 6H), 4.92 (AB, $J = 11.6\text{Hz}$, 2H), 3.08 (bs, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 165.1, 162.5, 158.6, 157.9, 155.6, 148.9, 148.7, 137.1, 137.0, 136.8, 136.7, 136.0, 131.8, 131.1, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.2, 127.1, 122.5, 119.9, 114.6, 114.3, 113.5, 100.9, 94.6, 93.7; HRMS (ESI): $\text{C}_{57}\text{H}_{48}\text{O}_8\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 883.3244, 实测值为 883.3241。

[0178] (+)-(2R,3S)-5,7-双(苄氧基)-2-(4-苄氧基苯基)苯并二氢吡喃-3-基 4-苄氧基苯甲酸酯 (110)

[0179] 按照 102 的制备操作, (2R,3S)-5,7-双(苄氧基)-2-(4-苄氧基苯基)苯并二氢吡喃-3-醇用 4-苄氧基苯甲酸进行酯化, 以 86% 的产率得到 110。mp 117-119°C; $[\alpha]_D = +24.5$ ($c = 1.2$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 7.86 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.42-7.26 (m, 22H), 6.92 (AB, $J = 2.6\text{Hz}$, 4H), 6.29 (AB, $J = 1.9\text{Hz}$, 2H), 5.56-5.51 (m, 1H), 5.17 (d, $J = 6.5\text{Hz}$, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.98 (s, 4H), 4.97 (s, 2H), 3.10 (A of ABq, $J = 16.8, 5.4\text{Hz}$, 1H), 2.88 (B of ABq, $J = 16.8, 6.6\text{Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 165.2, 162.4, 158.8, 158.6, 157.6, 155.0, 136.8, 136.7, 136.1, 131.6, 130.3, 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 127.5, 127.3, 127.1, 122.5, 114.8, 114.3, 101.4, 94.3, 93.6, 78.3, 70.0, 69.9, 69.8, 69.4, 24.2; HRMS (ESI): $\text{C}_{50}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 777.2828, 实测值为 777.2840。

[0180] (-)-(2R,3R)-5,7-双(苄氧基)-2-(4-苄氧基苯基)苯并二氢吡喃-3-基 4-苄氧基苯甲酸酯 (111)

[0181] 按照 102 的制备操作, (2R,3R)-5,7-双(苄氧基)-2-(4-苄氧基苯基)苯并二氢吡喃-3-醇用 4-苄氧基苯甲酸进行酯化, 以 88% 的产率得到 111。mp 129-131°C; $[\alpha]_D = -51.8$ ($c = 3.9$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 7.88 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.43-7.27 (m, 22H), 6.91 (s, 2H), 6.89 (s, 2H), 6.33 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.27 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 5.62 (bs, 1H), 5.11 (bs, 1H), 5.05 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.98 (s, 4H), 3.09 (d, $J = 2.9\text{Hz}$, 2H); $^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 165.3, 162.4, 158.6, 158.4, 157.9, 155.6, 136.8, 136.7, 136.1, 131.7, 130.1, 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.4, 127.3, 127.1, 122.5, 114.5, 114.3, 100.9, 94.6, 93.7, 77.4, 70.0, 69.9, 69.8, 68.1, 26.0; HRMS (ESI): $\text{C}_{50}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 777.2828, 实测值为 777.2815。

[0182] (+)-(2R,3S)-5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基 4-羟基苯甲酸酯 (11)

[0183] 在氢气氛下将 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (20%, 100mg) 加入至 102 (200mg, 0.23mmol) 在四氢呋喃/甲醇 (1:1, v/v, 20mL) 混和溶剂的溶液中。所得反应混合物在氢气下室温搅拌 6 小时, 薄层层析显示反应已完成。反应混合物过滤除去催化剂。滤液蒸干, 残留物用硅胶快速层析法 (先 10% 甲醇/二氯甲烷, 然后 20% 甲醇/二氯甲烷) 迅速纯化, 得到 11 (82mg, 产率 87%): mp 220-222°C (已分解); $[\alpha]_D = +87.2$ ($c = 2.0$, EtOH); $^1\text{H NMR}$ (丙酮- d_6 , 400MHz): δ 7.98 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.13 (s, 1H), 7.04 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 6.99-6.96 (m, 2H), 6.27 (d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 6.19 (d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 5.62 (dd, $J = 11.8, 6.3\text{Hz}$, 1H), 5.34 (d, $J = 6.3\text{Hz}$), 3.15 (A of ABq, $J = 16.5, 5.2\text{Hz}$, 1H), 3.00 (B of ABq, $J = 16.5, 6.4\text{Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (丙酮- d_6 , 400MHz): δ 163.3, 160.0, 155.2, 154.5, 153.6, 143.1, 129.9, 128.7, 119.6, 116.6, 113.4, 113.3, 111.8, 111.7, 96.7, 93.8, 93.0, 76.2, 67.9, 21.9; HRMS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 433.0899, 实测值为 433.0909。

[0184] (-)-(2R,3R)-5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基 4-羟基苯甲酸酯 (12)

[0185] 按照 11 的制备操作氢解 104, 得到产率为 85% 的 12。mp 241-243°C (已分解); $[\alpha]$

$[\alpha]_D = -145.2$ ($c = 0.5$, EtOH), (文献值 -144.4 , $c = 1$, Me_2CO); $^1\text{H NMR}$ (丙酮 $-d_6$, 400MHz): δ 7.89(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.19(d, $J = 1.9\text{Hz}$, 1H), 7.01(A of ABq, $J = 8.2, 1.9\text{Hz}$, 1H), 6.97(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 6.89(B of AB, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 6.17(d, $J = 2.3\text{Hz}$, 1H), 6.14(d, $J = 2.3\text{Hz}$, 1H), 5.65(m, 1H), 5.24(bs, 1H), 3.19(A of ABq, $J = 17.4, 4.5\text{Hz}$, 1H), 3.07(B of AB, $J = 17.4, 2.0\text{Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (丙酮 $-d_6$, 400MHz): δ 164.8, 161.6, 156.8, 156.4, 156.0, 144.6, 144.5, 131.5, 130.3, 121.4, 118.0, 114.9, 114.6, 113.8, 97.8, 95.4, 94.7, 76.9, 68.5, 25.5; HRMS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 433.0899, 实测值为 433.0895。

[0186] (+)-(2R,3S)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-4-羟基苯甲酸酯 (112)

[0187] 按照 11 的制备操作氢解 110, 得到产率为 90% 的 112。mp253-255 $^{\circ}\text{C}$ (已分解); $[\alpha]_D = +45.9$ ($c = 3.5$, EtOH); $^1\text{H NMR}$ (丙酮 $-d_6$, 400MHz): δ 7.74(d, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H), 7.26(d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.81(d, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H), 6.769d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.04(d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 5.95(d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 5.39(dd, $J = 12.4, 6.9\text{Hz}$, 1H), 5.11(d, $J = 6.9\text{Hz}$, 1H), 3.21(A of ABq, $J = 16.3, 5.3\text{Hz}$, 1H), 2.98(B of ABq, $J = 16.3, 7.0\text{Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (丙酮 $-d_6$, 400MHz): δ 163.7, 160.6, 156.0, 155.9, 155.1, 154.3, 130.4, 128.3, 126.8, 120.1, 113.9, 97.3, 94.4, 93.5, 77.0, 68.5, 23.0; HRMS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 417.0950, 实测值为 417.0946。

[0188] (-)-(2R,3R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-4-羟基苯甲酸酯 (10)

[0189] 按照 11 的制备操作, 氢解 111, 得到产率为 89% 的 10。mp214-216 $^{\circ}\text{C}$ (已分解); $[\alpha]_D = -116.1$ ($c = 2.0$, EtOH); $^1\text{H NMR}$ (丙酮 $-d_6$, 400MHz): δ 7.94(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 7.56(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 7.01(d, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 6.95(d, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 6.22(d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 6.20(d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 5.73(bs, 1H), 5.37(bs, 1H), 3.26(A of ABq, $J = 17.4, 4.5\text{Hz}$, 1H), 3.14(B of ABq, $J = 17.4, 2.2\text{Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (丙酮 $-d_6$, 400MHz): δ 164.5, 161.3, 156.6, 156.5, 155.8, 131.2, 129.3, 127.5, 121.1, 114.7, 114.4, 97.5, 95.2, 94.5, 76.7, 68.2, 25.2; HRMS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 417.0950, 实测值为 417.0946。

[0190] (+)-(2R,3S)-5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-4-羟基苯甲酸酯五乙酸酯 (22*)

[0191] 在氮气氛下于 0 $^{\circ}\text{C}$ 将乙酸酐 (0.2ml) 逐滴加入至 (+)-(2R,3S)-5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-4-羟基苯甲酸酯 (11) (20mg, 0.048mmol) 的吡啶 (1ml) 溶液中。反应混合物室温搅拌过夜。真空蒸馏除去多余的吡啶。残留物用硅胶快速层析法 (乙酸乙酯 / 正己烷 = 1/1, v/v) 纯化, 得到 22* (34mg, 产率 95%)。Mp: 149-151 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D = +42.5$ ($c = 1.2$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 7.96(9d, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H), 7.31(A of ABq, $J = 8.4, 1.8\text{Hz}$, 1H), 7.26(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 7.21(B of AB, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 7.15(d, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H), 6.70(d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 6.63(d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 5.51(dd, $J = 11.2, 6.0\text{Hz}$, 1H), 5.33(d, $J = 6.0\text{Hz}$, 1H), 3.04(A of ABq, $J = 16.8, 5.0\text{Hz}$, 1H), 2.83(B of ABq, $J = 16.8, 6.0\text{Hz}$, 1H), 2.31(s, 3H), 2.29(s, 3H), 2.28(s, 3H), 2.27(s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 168.8, 168.7, 168.3, 167.9, 164.8, 154.5, 154.3, 149.8, 149.4, 142.2, 142.1, 136.1, 131.3, 126.9, 124.3, 123.7, 122.0, 121.6, 121.3, 110.0,

108.7, 107.6, 77.7, 69.1, 23.9, 21.0, 20.7, 20.5; HRMS (ESI): $C_{32}H_{28}O_{13}Na$ (M+Na) 的计算值为 643.1428, 实测值为 643.1437。

[0192] (-)-(2R,3R)-5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-4-羟基苯甲酸酯五乙酸酯 (23*)

[0193] 按照 22* 的制备操作, 将 12 乙酰化, 得到产率为 96% 的 23*。mp 91-93 °C; $[\alpha]_D = -26.5$ (c = 0.5, $CHCl_3$); 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ 7.89 (d, J = 8.7Hz, 2H), 7.37 (d, J = 1.9Hz, 1H), 7.34 (A of ABq, J = 8.4, 1.9Hz, 1H), 7.21 (B of AB, J = 8.4Hz, 1H), 7.10 (d, J = 8.7Hz, 2H), 6.74 (d, J = 2.2Hz, 1H), 6.59 (d, J = 2.2Hz, 1H), 5.64 (bs, 1H), 5.22 (bs, 1H), 3.11 (A of ABq, J = 18.0, 4.5Hz, 1H), 3.04 (B of ABq, J = 18.0, 2.4Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 6H), 2.26 (s, 3H), 2.25 (s, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ 168.8, 168.6, 168.3, 167.9, 167.8, 164.9, 154.9, 154.4, 149.7, 142.0, 141.8, 135.7, 131.3, 126.9, 124.2, 123.4, 121.7, 121.5, 109.5, 108.8, 108.0, 67.5, 26.0, 21.0, 20.7, 20.5; HRMS (ESI): $C_{32}H_{28}O_{13}Na$ (M+Na) 的计算值为 643.1428, 实测值为 643.1420。

[0194] (+)-(2R,3S)-5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-3,4,5-三羟基苯甲酸酯七乙酸酯 (24*)

[0195] 按照 22* 的制备操作, 将 (+)-(2R,3S)-5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-3,4,5-三羟基苯甲酸酯 (Sheng Biao Wan; Di Chen; Q. Ping Dou 和 Tak Hang Chan. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12, 3521) 乙酰化得到产率为 95% 的 24*。mp 140-142 °C; $[\alpha]_D = +35.3$ (c = 3.0, $CHCl_3$); 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ 7.67 (s, 2H), 7.28-7.26 (m, 2H), 7.20 (d, J = 8.3Hz, 1H), 6.68 (d, J = 2.2Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.2Hz, 1H), 5.47 (dd, J = 11.8, 6.2Hz, 1H), 5.27 (d, J = 6.2Hz, 1H), 3.02 (A of ABq, J = 16.8, 5.2Hz, 1H), 2.81 (B of ABq, J = 16.8, 6.6Hz, 1H), 2.29 (m, 9H), 2.27 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.25 (s, 6H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ 168.8, 168.2, 167.8, 167.5, 166.2, 163.3, 154.2, 149.8, 149.3, 143.3, 142.1, 138.9, 135.7, 127.5, 124.2, 123.7, 122.2, 121.6, 109.9, 108.8, 107.6, 77.5, 69.7, 24.0, 21.0, 20.7, 20.5, 20.0; HRMS (ESI): $C_{36}H_{32}O_{17}Na$ (M+Na) 的计算值为 759.1537, 实测值为 759.1552。

[0196] (-)-(2R,3R)-5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-3,4,5-三羟基苯甲酸酯七乙酸酯 (25*)

[0197] 按照 22* 的制备操作, 将 (-)-(2R,3R)-5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-3,4,5-三羟基苯甲酸酯 (Sheng Biao Wan; Di Chen; Q. Ping Dou 和 Tak Hang Chan. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12, 3521) 乙酰化得到产率为 93% 的 25*。mp 105-107 °C; $[\alpha]_D = -14.5$ (c = 1.2, $CHCl_3$); 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ 7.62 (s, 2H), 7.33 (d, J = 1.2Hz, 1H), 7.31 (A of AB, J = 8.4Hz, 1H), 7.20 (B of AB, J = 8.4Hz, 1H), 6.73 (d, J = 2.0Hz, 1H), 6.60 (d, J = 2.0Hz, 1H), 5.63 (bs, 1H), 5.20 (bs, 1H), 3.10 (A of ABq, J = 18.0, 4.5Hz, 1H), 3.00 (B of AB, J = 18.0, 1H), 2.28-2.27 (m, 15H), 2.25 (s, 3H), 2.23 (s, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ 168.8, 168.3, 167.9, 167.4, 166.2, 163.5, 154.9, 149.7, 143.3, 142.0, 141.9, 138.9, 135.3, 127.4, 124.3, 123.5, 122.2, 121.8, 109.4, 108.9, 108.0, 68.1, 25.9, 21.0, 20.7, 20.5, 20.1; HRMS (ESI): $C_{36}H_{32}O_{17}Na$ (M+Na) 的计算值为 759.1537, 实测值为 759.1571。

[0198] (+)-(2R,3S)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-4-羟基苯甲酸酯四乙酸酯(114)

[0199] 按照 22* 的制备操作,将 112 乙酰化后得到产率为 91% 的 114。mp 167-169 °C ; $[\alpha]_D = +3.2$ (c = 1.0, CHCl₃) ; ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) : δ 7.94(d, J = 8.7Hz, 2H), 7.42(d, J = 8.5Hz, 2H), 7.14(d, J = 8.7Hz, 2H), 7.09(d, J = 8.5Hz, 2H), 6.69(d, J = 2.2Hz, 2H), 6.61(d, J = 2.2Hz, 2H), 5.53(dd, J = 11.5, 6.3Hz, 1H), 5.31(d, J = 6.3Hz, 2H), 3.01(A of ABq, J = 16.7, 5.1Hz, 1H), 2.81(B of ABq, J = 16.7, 6.3Hz, 1H), 2.30(s, 3H), 2.28(s, 3H), 2.27(s, 3H), 2.25(s, 3H) ; ¹³C NMR(CDCl₃, 400MHz) : δ 169.1, 168.8, 168.7, 168.3, 164.7, 154.6, 154.5, 150.7, 149.8, 149.4, 134.8, 131.2, 127.5, 127.0, 121.8, 121.6, 110.2, 108.6, 107.6, 78.1, 69.1, 24.1, 21.0, 20.7 ; HRMS(ESI) : C₃₀H₂₇O₁₁(M+H) 的计算值为 563.1553, 实测值为 563.1567 ; C₃₀H₂₆O₁₁Na(M+Na) 的计算值为 585.1373, 实测值为 585.1387。

[0200] (-)-(2R,3R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-4-羟基苯甲酸酯四乙酸酯(21*)

[0201] 按照 22* 的制备过程,将 10 乙酰化后得到产率为 89% 的 21*。mp 144-145 °C ; $[\alpha]_D = -30.7$ (c = 2.5, CHCl₃) ; ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) : δ 7.90(d, J = 8.7Hz, 2H), 7.49(d, J = 8.5Hz, 2H), 7.10(d, J = 8.5Hz, 2H), 7.08(d, J = 8.7Hz, 2H), 6.74(d, J = 2.2Hz, 2H), 6.59(d, J = 2.2Hz, 2H), 5.64(bs, 1H), 5.22(s, 1H), 3.12(A of ABq, J = 17.7, 4.4Hz, 1H), 3.02(B of ABq, J = 17.7, 1.8Hz, 1H), 2.28(s, 6H), 2.27(s, 3H), 2.25(s, 3H) ; ¹³C NMR(CDCl₃, 400MHz) : δ 169.1, 168.9, 168.7, 168.4, 164.8, 155.2, 154.4, 150.5, 149.7, 134.5, 131.2, 127.4, 126.9, 121.6, 109.7, 108.7, 108.0, 67.7, 26.2, 21.0, 20.7 ; HRMS(ESI) : C₃₀H₂₆O₁₁Na(M+Na) 的计算值为 585.1373, 实测值为 585.1371。

[0202] (+)-(2R,3S)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-3,4,5-三羟基苯甲酸酯六乙酸酯(16*)

[0203] 按照 22* 的制备操作,将 (+)-(2R,3S)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-3,4,5-三羟基苯甲酸酯(Sheng Biao Wan ; Tak HangChan. Tetrahedron, 2004, 60, 8207) 乙酰化得到产率为 93% 的 16*。mp 96-98 °C ; $[\alpha]_D = +17.7$ (c = 1.0, CHCl₃) ; ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) : δ 7.76(s, 2H), 7.41(d, J = 8.5Hz, 2H), 7.10(d, J = 8.5Hz, 2H), 6.68(d, J = 2.2Hz, 2H), 6.62(d, J = 2.2Hz, 2H), 5.51(dd, J = 12.2, 6.7Hz, 1H), 5.26(d, J = 6.7Hz, 1H), 3.02(A of ABq, J = 16.7, 5.3Hz, 1H), 2.81(B of ABq, J = 16.7, 6.6Hz, 1H), 2.30(s, 6H), 2.29(s, 3H), 2.28(s, 3H), 2.27(s, 6H) ; ¹³C NMR(CDCl₃, 400MHz) : δ 169.1, 168.8, 168.3, 167.5, 166.2, 163.3, 154.5, 150.7, 149.9, 149.4, 143.4, 138.9, 134.5, 127.5, 122.2, 121.8, 110.1, 108.7, 107.7, 78.0, 69.8, 24.3, 21.0, 20.7, 20.5, 20.1 ; HRMS(ESI) : C₃₄H₃₀O₁₅Na(M+Na) 的计算值为 701.1482, 实测值为 701.1490。

[0204] (-)-(2R,3R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-3,4,5-三羟基苯甲酸酯六乙酸酯(19*)

[0205] 按照 22* 的制备操作,将 (-)-(2R,3R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-3-基-3,4,5-三羟基苯甲酸酯(Sheng Biao Wan ; Tak HangChan. Tetrahedron, 2004, 60, 8207) 乙酰化得到产率为 91% 的 19*。mp 152-154 °C ; $[\alpha]_D = -35.5$ (c = 2.5, CHCl₃) ;

^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz) : δ 7.62(s, 2H), 7.46(d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 7.11(d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.73(d, $J = 2.1\text{Hz}$, 1H), 6.60(d, $J = 2.1\text{Hz}$, 1H), 5.60(bs, 1H), 5.21(s, 1H), 3.10(A of ABq, $J = 17.8, 4.5\text{Hz}$, 1H), 3.00(B of ABq, $J = 17.8, 1.8\text{Hz}$, 1H), 2.28-2.26(m, 18H); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 400MHz) : δ 169.1, 168.8, 168.3, 167.4, 166.2, 163.5, 155.1, 150.6, 149.7, 143.3, 138.8, 134.2, 127.5, 127.4, 122.2, 121.7, 109.5, 108.8, 108.0, 77.2, 68.3, 26.0, 21.0, 20.7, 20.5, 20.1; HRMS(ESI) : $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{O}_{15}\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 701.1482, 实测值为 701.1452。

[0206] (E)-3-[2,4-双(苄氧基)-6-羟基苯基]-1-苯基-丙烯 (#a)

[0207] 按照文献操作 (Li, L.; Chan, T. H. Org. Lett. 2001, 5, 739), 肉桂醇与 3,5-二苄氧基苯酚反应产生为白色固体的 (#a) (产率为 62%) ; mp 76-78°C; ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz) : δ 7.40-7.24(m, 15H), 6.48(A of AB, $J = 15.9\text{Hz}$, 1H), 6.35(B of ABt, $J = 15.9, 5.5\text{Hz}$, 1H), 6.27(d, $J = 2.1\text{Hz}$, 1H), 6.16(d, $J = 2.1\text{Hz}$, 1H), 5.07(s, 1H), 5.02(s, 2H), 4.99(s, 2H), 3.59-3.57(d, $J = 5.5\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 400MHz) : δ 158.5, 157.6, 155.4, 137.0, 136.8, 136.6, 130.2, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.6, 127.3, 127.0, 126.8, 125.8, 106.6, 94.8, 93.4, 70.1, 69.9, 26.2; HRMS(ESI) : $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 445.1780, 实测值为 445.1793。

[0208] (+)-(1S, 2S)-3-[2,4-双(苄氧基)-6-羟基苯基]-1-苯基丙烷-1,2-二醇 ((+)-#b)

[0209] 按照文献操作 (Li, L.; Chan, T. H. Org. Lett. 2001, 5, 739), 但是以 (#a) 为原料, 以 AD-mix- α 为二羟基化试剂, 获得为白色固体的 (+)-#b (产率 47%) ; mp 121-123°C; $[\alpha]_D = +4.7$ ($c = 0.6$, CHCl_3); ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz) : δ 7.38-7.19(m, 13H), 7.10(m, 2H), 6.23(d, $J = 2.3\text{Hz}$, 1H), 6.17(d, $J = 2.3\text{Hz}$, 1H), 4.94(s, 2H), 4.82(AB, $J = 11.7\text{Hz}$, 2H), 4.47(d, $J = 6.6\text{Hz}$, 1H), 3.97(m, 1H), 2.88(A of ABt, $J = 14.6, 3.6\text{Hz}$, 1H), 2.72(b of ABt, $J = 14.6, 8.6\text{Hz}$, 1H); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 400MHz) : δ 158.8, 157.6, 157.0, 140.0, 136.6, 136.5, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.7, 127.4, 127.3, 126.8, 126.5, 105.9, 95.6, 93.2, 76.6, 69.8, 69.7, 26.2; HRMS(ESI) : $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 479.1834, 实测值为 479.1841。

[0210] (+)-(2S, 2S)-顺式-5,7-双(苄氧基)-2-苯基苯并二氢吡喃-3-醇 ((+)-#c)

[0211] 按照文献操作 (Li, L.; Chan, T. H. Org. Lett. 2001, 5, 739), 但是以 (+)-#b 为原料, 获得为白色固体的 (+)-#c (产率 47%) ; mp 60-62°C; $[\alpha]_D = +0.9$ ($c = 1.0$, 乙酸乙酯); ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz) : δ 7.49-7.30(m, 15H), 6.29(d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 6.27(d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 5.02(bs, 1H), 4.99(s, 4H), 4.25(bs, 1H), 3.03(A of ABt, $J = 17.2, 1.4\text{Hz}$, 1H), 2.96(B of ABt, $J = 17.2, 4.2\text{Hz}$, 1H); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 400MHz) : δ 158.7, 158.2, 155.2, 138.1, 136.9, 136.8, 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 127.8, 127.4, 127.1, 126.2, 100.9, 94.6, 94.0, 78.6, 70.0, 69.8, 66.2, 28.2; HRMS(ESI) : $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 461.1729, 实测值为 461.1741。

[0212] (+)-(2S, 2S)-5,7-二羟基-2-苯基苯并二氢吡喃-3-基-3,4,5-三羟基苯甲酸酯 ((+)-15)

[0213] 按照文献操作 (Li, L.; Chan, T. H. Org. Lett. 2001, 5, 739), 但是以 (+)-#c 为原料,

得到化合物 (+)-15 (产率 90%) ; mp 258-260 °C (已分解) ; $[\alpha]_D = +13.9$ (c = 3.5, 乙醇) ; $^1\text{H NMR}$ (丙酮- d_6 , 400MHz) : δ 7.73-7.71 (m, 2H), 7.49-7.45 (m, 2H), 7.41-7.38 (m, 1H), 7.17 (s, 2H), 6.24 (d, J = 2.2Hz, 1H), 6.23 (d, J = 2.2Hz, 1H), 5.76 (bs, 1H), 5.44 (bs, 1H), 3.27 (A of ABt, J = 17.4, 4.5Hz, 1H), 3.14 (B of ABt, J = 17.4, 1.4Hz, 1H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (丙酮- d_6 , 400MHz) : δ 164.7, 156.6, 156.3, 155.7, 144.7, 138.5, 137.6, 127.6, 127.3, 126.3, 120.4, 108.7, 97.7, 95.4, 94.6, 77.0, 68.1, 25.3 ; HRMS (ESI) : $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 433.0899, 实测值为 433.0904。

[0214] 2-苄基-3,5-双(苄氧基)苯酚 (#d)

[0215] 在 0 °C 将乙硫醇 (10g, 216mmol) 逐滴加入至氢氧化钠 (分散于矿物油中的 60% 分散体, 2.4g, 100mmol) 在干燥 DMF (120ml) 的搅拌悬浮液中。1 小时后, 分 10 次加入 1,3,5-三苄氧基苯 (24g, 60mmol), 并将混合物加热至 150 °C 保持 1.5 小时。待反应冷却后, 加入 500mL 水, 混合物用乙酸乙酯萃取。合并的有机层用硫酸镁干燥, 蒸干。残留物经硅胶快速层析法 (苯) 纯化, 用四氯化碳重结晶后得到为白色固体的 3,5-二苄氧基苯酚 (11%), 用乙酸乙酯和己烷重结晶后得到为白色固体的产物 #d (56%)。化合物 #d 鉴定如下 : mp 107-109 °C ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) : δ 7.36-7.23 (m, 15H), 6.25 (d, J = 2.2Hz, 1H), 6.07 (d, J = 2.2Hz, 1H), 4.96 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 3.99 (s, 2H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) : δ 158.4, 157.9, 154.9, 140.7, 136.7, 136.6, 128.4, 128.2, 128.1, 127.8, 127.5, 127.3, 127.0, 125.6, 108.5, 94.7, 93.3, 70.2, 69.9, 28.3 ; HRMS (ESI) : $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 419.1623, 实测值为 419.1645。

[0216] (E)-3-[2,4-双(苄氧基)-5-苄基-6-羟基苯基]-1-[3,4-双(苄氧基)苯基]-丙烯 (#e)

[0217] 在室温下于氮气氛围中将 25% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ (1.6g, 4mmol) 一次加入至 2-苄基-3,5-双(苄氧基)苯酚 (3.96g, 10mmol) 和 (E)-3,4-双(苄氧基)肉桂醇 (3.46g, 10mmol) 在干燥 CH_2Cl_2 (80mL) 的搅拌混合物中。所得混合物室温搅拌过夜。过滤, 蒸干之后, 残留物用硅胶柱层析 (乙酸乙酯 / 正己烷 = 1/7, v/v) 纯化, 用乙酸乙酯和正己烷重结晶, 得到白色固体 (3.4g, 产率 46.0%) : mp 93-95 °C ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) : δ 7.41-7.22 (m, 30H), 6.92 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.78 (d, J = 4.0Hz, 1H), 6.35 (A of AB, J = 15.8, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.13-6.07 (B of ABt, J = 15.8, 5.0Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.99 (s, 4H), 4.02 (s, 2H), 3.55 (d, J = 5.0Hz, 2H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) : δ 156.1, 155.6, 154.0, 148.9, 148.2, 141.1, 137.2, 137.1, 131.0, 130.1, 128.5, 128.4, 128.2, 127.8, 127.7, 127.6, 127.3, 127.2, 127.1, 126.5, 125.7, 119.7, 114.9, 112.4, 109.6, 107.3, 91.4, 71.1, 70.5, 70.3, 28.8, 26.6 ; HRMS (ESI) : $\text{C}_{50}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{Na}$ (M+Na) 的计算为 747.3086, 实测值为 747.3096。

[0218] (-)-(1R,2R)-3-[2,4-双(苄氧基)-5-苄基-6-羟基-苯基]-1-[3,4-双(苄氧基)苯基]丙-1,2-二醇 ((-)-#f)

[0219] 丙烯 (#e) (3.4g, 4.6mmol) 用干燥 DMF (30mL) 溶解, 向该溶液中连续加入咪唑 (1.03g, 15.2mmol) 和 TBSCl (1.2g, 7.8mmol)。所得混合物室温搅拌 3 天, 然后加入饱和碳酸钠溶液淬灭反应。混合物用乙酸乙酯萃取。合并有机层, 用硫酸镁干燥, 蒸干。残留物用硅胶快速层析法 (正己烷 / 乙酸乙酯 = 9/1, v/v) 纯化, 得到 [3,5-双(苄氧基)-6-苄

基-2-[3-[3,4-双(苄氧基)苯基]烯丙基]苯氧基]-叔丁基二甲基硅烷。该物质未经进一步纯化直接用于下一步。

[0220] 将AD-mix- β (13.0g)和甲磺酰胺(0.87g)溶解在叔丁醇(50mL)和水(50mL)的混合溶剂中。所得混合物室温搅拌5分钟,然后将混合物冷却至0°C,并加入[3,5-双(苄氧基)-6-苄基-2-[3-[3,4-双(苄氧基)苯基]-烯丙基]苯氧基]-叔丁基二甲基硅烷的二氯甲烷(50mL)溶液。混合物搅拌过夜后,每24小时时间间隔加入两次以上AD-mix- β (每次13.0g)和甲磺酰胺(每次0.87g)。再次于0°C搅拌24小时后,薄层层析显示反应已完成。然后加入10% Na₂S₂O₃溶液淬灭反应。混合物用乙酸乙酯萃取。合并有机相,用硫酸镁干燥,蒸干。残留物用硅胶快速层析法(正己烷/乙酸乙酯=4/1, v/v)纯化,得到[3,5-双(苄氧基)-6-苄基-2-[3-[3,4-双(苄氧基)苯基]-1,2-二羟基-丙基]苯氧基]-叔丁基二甲基硅烷。所得化合物溶解于四氢呋喃(75mL)中,加入TBAF(10mL, 1M在四氢呋喃中的溶液)。所得混合物室温搅拌4小时,加入饱和碳酸氢钠溶液。混合物用乙酸乙酯萃取,合并有机层,用硫酸镁干燥,蒸干。残留物用硅胶快速层析法(乙酸乙酯/己烷=1/2, v/v)纯化,然后用乙酸乙酯和己烷重结晶后得到白色固体(2.4g, 产率67%)(-)-#f: mp 157-159°C; $[\alpha]_D = -5.5$ (c = 1.1, CHCl₃); ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 7.41-7.09(m, 25H), 6.91(d, J = 1.6Hz, 1H), 6.77(m, 2H), 6.17(s, 1H), 5.06(s, 4H), 4.98(s, 2H), 4.82(AB, J = 11.9Hz, 2H), 4.42(d, J = 6.6Hz, 1H), 4.05(s, 2H), 3.91(b, 1H), 2.93(A of ABt, J = 14.5, 3.2Hz, 1H), 2.72(B of ABt, J = 14.5, 8.5Hz, 1H); ¹³C NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 156.4, 155.6, 155.3, 148.9, 148.8, 142.1, 137.2, 137.1, 137.0, 133.5, 128.6, 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6, 127.3, 127.2, 127.1, 126.7, 125.3, 119.9, 114.5, 113.6, 112.1, 111.2, 106.7, 90.9, 77.2, 76.7, 71.1, 70.9, 70.3, 70.2, 29.1, 26.8; HRMS(ESI): C₅₀H₄₆O₇Na(M+Na)的计算值为781.3141, 实测值为781.3110。

[0221] (-)-(2S,3R)-反式-5,7-双(苄氧基)-8-苄基-2-[3,4-双(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-醇((-)-#g)

[0222] 向(-)-#f(2.4g, 3.1mmol)的1,2-二氯乙烷(50mL)悬浮液中加入原甲酸三乙酯(1mL),随后加入PPTS(450mg, 1.8mmol)。混合物室温搅拌20分钟至固体溶解。然后将混合物加热至55°C 5小时至薄层层析显示反应已完成。蒸干溶剂后,残留物溶解于DME(30mL)和甲醇(30mL),加入碳酸钾(450mg)。混合物室温搅拌过夜。蒸干溶剂后,残留物用硅胶快速层析法(乙酸乙酯/己烷=1/3, v/v)纯化,得到目的产物为白色固体(1.8g, 产率77%): mp 145-146°C; $[\alpha]_D = -20.1$ (c = 1.3, CHCl₃); ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 7.42-7.15(m, 25H), 6.93(d, J = 1.6Hz, 1H), 6.88(A of AB, J = 8.3Hz, 1H), 6.82(B of ABt, J = 8.3, 1.6Hz, 1H), 6.24(s, 1H), 5.13(s, 2H), 5.02(s, 2H), 5.00(s, 2H), 4.98(s, 2H), 4.63(d, J = 8.1Hz, 1H), 4.04(AB, J = 14.2Hz, 2H), 3.86(m, 1H), 3.10(A of ABt, J = 5.6, 16.4Hz, 1H), 2.67(B of ABt, J = 9.0, 16.4Hz, 1H); ¹³C NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 155.8, 155.5, 152.9, 148.9, 148.8, 142.2, 137.2, 137.1, 137.0, 136.9, 131.2, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.7, 127.4, 127.2, 127.1, 127.0, 125.2, 120.2, 114.5, 113.2, 110.2, 102.4, 91.1, 81.2, 71.1, 70.9, 70.4, 69.9, 68.2, 28.6, 27.6; HRMS(ESI): C₅₀H₄₄O₆Na(M+Na)的计算值为763.3036, 实测值为763.3032。

[0223] (+)-(2R)-5,7-双(苄氧基)-8-苄基-2-[3,4-双(苄氧基)-苯基]苯并二氢吡

喃-3-酮((-)-#h)

[0224] 在氮气氛围下将戴斯-马丁试剂(Dess-Martin periodinane)(6.3mL,15%g/mL在CH₂Cl₂中的溶液,2.2mmol)一次加入至(-)-#g(900mg,1.2mmol)的CH₂Cl₂(30mL)搅拌溶液中。混合物室温搅拌约2小时至薄层层析显示原料消失。随后加入饱和碳酸氢钠溶液(15mL)和10%Na₂S₂O₃水溶液(15mL)淬灭反应。分离有机层,水层用二氯甲烷萃取。合并有机相,用硫酸镁干燥,并蒸干。残留物用硅胶快速层析法(苯)纯化,然后在CHCl₃和醚中重结晶得到目的化合物(770mg,86%):mp143-145°C;[α]_D = -17.1(c = 1.1, CHCl₃);¹H NMR(CDCl₃,400MHz):δ7.43-7.07(m,25H),6.89(s,1H),6.84(AB,J = 8.5Hz,2H),6.33(s,1H),5.13-5.04(m,6H),5.02(s,1H),4.99(s,2H),4.05(AB,J = 14.2Hz,2H),3.67(AB,J = 20.8Hz,2H);¹³C NMR(CDCl₃,400MHz):δ205.8,156.5,154.8,152.5,149.0,148.7,141.7,137.1,136.9,136.8,136.5,128.6,128.5,128.4,128.1,128.0,127.8,127.7,127.3,127.1,125.4,120.0,114.5,113.2,111.9,102.4,92.6,82.9,71.0,70.5,70.2,34.0,28.8;HRMS(ESI):C₅₀H₄₂O₆Na(M+Na)的计算值为761.2879,实测值为761.2843。

[0225] (+)-(2S,3S)-顺式-5,7-双(苄氧基)-8-苄基-2-[3,4-双(苄氧基)苯基]苯并二氢吡喃-3-醇(+)-#i)

[0226] 在氮气氛围下将酮(-)-#h(700mg,0.95mmol)溶解在干燥四氢呋喃(15mL)中,冷却该溶液至-78°C。然后逐滴加入L-selectride(1.5mL,1M在四氢呋喃中的溶液,1.5mmol)。所得溶液在-78°C搅拌8小时。当薄层层析显示反应完成,加入饱和碳酸氢钠水溶液(10mL)淬灭反应。分离有机层,水层用乙酸乙酯萃取。合并的有机相用硫酸镁干燥,蒸干。残留物用硅胶快速层析法(5%乙酸乙酯/苯)纯化,然后用乙醇和乙酸乙酯重结晶,得到目的产物(630mg,90%)为白色固体:mp129-131°C;[α]_D = +5.3(c = 1.2, CHCl₃);¹H NMR(CDCl₃,400MHz):δ7.44-7.07(m,25H),7.05(s,1H),6.93(AB,J = 8.4Hz,2H),6.26(s,1H),5.15(s,2H),5.02(s,2H),5.00(s,4H),4.92(bs,1H),4.20(bs,1H),4.10(AB,J = 14.5Hz,2H),3.07(A of AB,J = 17.2Hz,1H),2.92(B of ABt,J = 17.2,4.2Hz,1H);¹³C NMR(CDCl₃,400MHz):δ156.2,155.9,152.8,148.9,148.5,142.1,137.2,137.1,137.0,131.6,128.5,128.4,128.0,127.8,127.7,127.4,127.2,125.2,118.9,114.9,112.9,110.2,101.1,91.4,78.0,71.2,71.0,70.5,70.0,66.1,28.6,28.2;HRMS(ESI):C₅₀H₄₄O₆Na(M+Na)的计算值为763.3036,实测值为763.3024。

[0227] (+)-(2S,3S)-5,7-双(苄氧基)-8-苄基-2-[3,4-双(苄氧基)-苯基]苯并二氢吡喃-3-基3,4,5-三(苄氧基)-苯甲酸酯(+)-#j)

[0228] 在氮气氛围下,3,4,5-三(苄氧基)苯甲酸(170mg,0.39mmol)的溶液与草酰氯(1mL)的干燥二氯甲烷(10mL)溶液和一滴DMF一起回流3小时。蒸馏除去多余的草酰氯和溶剂,残留物真空干燥3小时,溶解于二氯甲烷(2mL)中。在0°C将该溶液逐滴加入至(+)-#i(150mg,0.20mmol)和DMAP(75mg,0.62mmol)的二氯甲烷(15mL)溶液中。混合物室温搅拌过夜,然后加入饱和碳酸氢钠水溶液。分离有机层,水层用二氯甲烷萃取。合并有机相,用硫酸镁干燥,蒸干。残留物用硅胶快速层析法(5%乙酸乙酯/苯)纯化,得到目的化合物(215mg,91%)。在CHCl₃和醚中重结晶,得到白色粉末:mp52-54°C;[α]_D = +37.5(c = 1.0, CHCl₃);¹H NMR(CDCl₃,400MHz):δ7.39-7.10(m,42H),6.99(t,J = 7.4Hz,1H),6.93(AB,J = 8.3Hz,2H),6.31(s,1H),5.65(bs,1H),5.13(bs,1H),5.07(s,2H),5.02(s,

4H), 5.00 (s, 2H), 4.92 (s, 4H), 4.83 (AB, $J = 11.8\text{Hz}$, 2H), 4.11 (s, 1H), 3.15 (bs, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 165.2, 156.0, 155.9, 153.2, 152.3, 148.8, 148.6, 142.6, 142.2, 137.4, 137.2, 137.0, 136.5, 131.4, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9, 127.7, 127.3, 127.2, 125.4, 125.1, 119.4, 114.6, 113.2, 110.3, 109.2, 101.0, 91.2, 75.1, 71.1, 70.5, 70.0, 68.6, 28.7, 26.2; HRMS (ESI): $\text{C}_{78}\text{H}_{66}\text{O}_{10}\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 1185.4554, 实测值为 1185.4542。

[0229] (-)-(2S, 3R)-5,7-双(苄氧基)-8-苄基-2-[3,4-双(苄氧基)-苯基]苯并二氢吡喃-3-基 3,4,5-三(苄氧基)-苯甲酸酯((-)-#k)

[0230] 按照用于制备(-)-#j的操作,但以(-)-#g为原料,得到为白色固体的(-)-(2S, 3R)-5,7-双(苄氧基)-8-苄基-2-[3,4-双(苄氧基)-苯基]-苯并二氢吡喃-3-基 3,4,5-三(苄氧基)-苯甲酸酯(产率 90%): mp 103-105°C; $[\alpha]_{\text{D}} = -9.8$ ($c = 1.3$, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 7.37-7.11 (m, 42H), 6.90 (s, 1H), 6.77 (m, 2H), 6.27 (s, 1H), 5.42 (m, 1H), 5.18 (d, $J = 6.3\text{Hz}$, 1H), 5.06 (s, 4H), 5.05-4.99 (m, 4H), 4.97 (s, 4H), 4.88 (s, 2H), 4.12 (AB, $J = 14.1\text{Hz}$, 2H), 3.01 (a of ABt, $J = 16.8, 5.0\text{Hz}$, 1H), 2.89 (B of ABt, $J = 16.8, 6.4\text{Hz}$, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 156.0, 155.9, 155.4, 152.5, 152.3, 148.8, 148.6, 142.3, 142.1, 137.3, 137.1, 137.0, 136.9, 136.5, 131.3, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.3, 127.2, 127.1, 125.3, 124.9, 114.6, 112.8, 110.2, 108.9, 101.5, 91.0, 78.0, 75.0, 71.2, 71.1, 71.0, 70.4, 70.0, 69.9, 28.6, 24.0; HRMS (ESI): $\text{C}_{78}\text{H}_{66}\text{O}_{10}\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 1185.4554, 实测值为 1185.4573。

[0231] (+)-(2S, 3S)-5,7-二羟基-8-苄基-2-[3,4-二羟基-苯基]苯并二氢吡喃-3-基 3,4,5-三羟基苯甲酸酯(+)-#1)

[0232] 在氢气氛下将 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (20%, 400mg) 加至 (+)-#j (200mg, 0.17mmol) 在四氢呋喃/甲醇 (1:1v/v, 20ml) 混合溶剂的溶液中。反应混合物在氢气下室温搅拌 6 小时至薄层层析显示反应已完成。反应混合物过滤除去催化剂。滤液蒸干, 残留物迅速用硅胶快速层析法 (先 10% 甲醇/二氯甲烷, 后 20% 甲醇/二氯甲烷) 纯化, 得到 (+)-8-苄基儿茶素没食子酸酯(+)-#1 (82mg, 产率 90%): mp 243-245°C (已分解); $[\alpha]_{\text{D}} = +123$ ($c = 1.8$, 丙酮); ^1H NMR (丙酮- d_6 , 400MHz): δ 7.53 (d, $J = 7.4\text{Hz}$, 2H), 7.42 (t, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.26-7.21 (m, 4H), 7.04 (AB, $J = 8.2\text{Hz}$, 2H), 6.31 (s, 1H), 5.75 (bs, 1H), 5.32 (bs, 1H), 4.22 (AB, $J = 14.3\text{Hz}$, 2H), 3.29 (a of ABt, $J = 17.4, 4.4\text{Hz}$, 1H), 3.17 (b of AB, $J = 17.4\text{Hz}$, 1H); ^{13}C NMR (丙酮- d_6 , 400MHz): δ 165.2, 154.2, 154.1, 153.6, 144.9, 144.6, 144.3, 142.6, 137.9, 130.6, 128.4, 127.8, 125.0, 120.9, 118.1, 114.7, 113.7, 109.1, 106.7, 98.0, 95.3, 77.1, 68.3, 25.9; HRMS (ESI): $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{O}_{10}\text{Na}$ (M+Na) 的计算值为 555.1267, 实测值为 555.1279。

[0233] (-)-(2S, 3R)-5,7-二羟基-8-苄基-2-[3,4-二羟基-苯基]苯并二氢吡喃-3-基 3,4,5-三羟基苯甲酸酯((-)-16)

[0234] 按照制备(+)-#1的操作,但以(-)-#k为原料,得到(-)-8-苄基儿茶素没食子酸酯((-)-16) (产率 91%): mp 239-241°C (已分解); $[\alpha]_{\text{D}} = -35$ ($c = 2.0$, 丙酮); ^1H NMR (丙酮- d_6 , 400MHz): δ 7.44 (d, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 7.33 (t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 7.23 (s, 2H), 7.21 (t, $J = 7.3\text{Hz}$, 1H), 6.92-6.86 (m, 2H), 6.34 (s, 1H), 5.56 (m, 1H), 5.35 (d, $J = 6.2\text{Hz}$,

1H), 4.17(AB, J = 14.3Hz, 2H), 3.12(A of ABt, J = 16.5, 5.2Hz, 1H), 2.98(b of ABt, J = 16.5, 6.2Hz, 1H); ¹³C NMR(丙酮-d₆, 400MHz): δ 165.0, 154.1, 153.7, 152.8, 144.9, 144.7, 144.6, 142.2, 137.8, 130.2, 128.3, 127.5, 124.8, 120.5, 117.9, 114.8, 113.2, 108.8, 106.2, 98.2, 95.1, 77.7, 69.4, 23.5; HRMS(ESI): C₂₉H₂₄O₁₀Na 的计算值为 555.1267, 实测值为 555.1285。

[0235] (-)-EGCG 和 1 的稳定性试验

[0236] (-)-EGCG 或 1(0.1mM) 与 RPMI 1640 培养基一起在 37°C 孵育。于不同时间点取培养基 15 μL 注入装有 C-18 反相柱 (CAPCELL PAK C18UG 120, Shiseido Co., Ltd., 4.6mm 内径 × 250mm) 的高效液相色谱仪中; 流速为 1ml/min; 在 UV 280nm 处检测; 对于 (-)-EGCG, 取样时间点为 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120 分钟, 流动相为 20% 乙腈水溶液和 0.01% TFA; 对于前药 1, 取样时间点为 0, 30, 60, 90, 120 分钟, 流动相为 50% 乙腈水溶液和 0.01% TFA。

[0237] 1 的酶水解

[0238] 将裂解缓冲液 (pH 5) (0.25mL) 加至 2 × 10⁶ Jurkat T 细胞中。这可以使 Jurkat T 细胞的细胞膜破裂, 从而释放出胞质酶。加入 PBS (0.75mL) 中和培养基至酶最适宜的 pH 值 (pH 7)。将前药 1 (0.25mM) 加入反应混合物中, 于 37°C 孵育。在不同时间点 (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 和 360 分钟) 取定量 (0.06mL) 反应混合物, 过滤, 注入高效液相色谱仪, 按上述条件分析。

[0239] 在含维生素 C 的培养基中, 有或无溶菌液 (lysate) 时 1 的水解

[0240] 化合物 1 (35 μM) 在 DMEM 培养基 (dulbecco' s modified eagle medium) (1mL, 含 1.67mg/mL 维生素 C) 中于 37°C 孵育。在不同时间点取溶液 10 μL 注入装有 C-18 反相柱的 HPLC 中; 流速为 1mL/min; 在 UV 280nm 处检测; 流动相为: 0-8 分钟 (20% 乙腈水溶液和 0.016% TFA), 8-13 分钟 (从含 0.016% TFA 的 20% 乙腈水溶液变至含 0.008% TFA 的 60% 乙腈水溶液)。

[0241] 为研究溶菌液存在下 1 的水解, 将相同浓度的 1 与 DMEM (2mL, 含 1.67mg/mL 维生素 C) 在溶菌液 (5 × 10⁵ 乳腺癌细胞和 0.15mL 裂解缓冲液) 存在下进行孵育。在不同时间点取定量 (0.06mL) 反应混合物, 过滤, 注入高效液相色谱仪, 按上述条件分析。

[0242] 细胞培养

[0243] 人 Jurkat T 细胞和 LNCaP 细胞在添有 10% (v/v) 胎牛血清, 100U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI 培养基中培养。非转化的自然杀伤细胞 (YT 系) 在含 10% (v/v) 胎牛血清, 100U/ml 青霉素, 100 μg/ml 链霉素, 1mM MEM 丙酮酸钠和 0.1mM MEM 非必需氨基酸溶液的 RPMI 培养基中生长。人乳腺癌 MCF-7 细胞, 正常 (WI-38) 和猴病毒转化 (VA-13) 人成纤维细胞在添有 10% (v/v) 胎牛血清, 100U/ml 青霉素, 100pg/ml 链霉素的 DMEM 培养基 (dulbecco' s modified eagle medium) 中生长。所有细胞培养保持在 37°C 的 5% 二氧化碳气氛中。

[0244] 细胞提取物的制备和蛋白质印迹分析

[0245] 所有细胞提取物均以先前描述的方法制备 (An B, Goldfarb RH, Siman R, Dou QP. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. cell Death Differ

1998 ;5 :1062-75)。Bax, IK Ba, p27, PAW 和泛素化蛋白表达的分析用单克隆或多克隆抗体按照先前报道的方案 (An B 等) 完成。

[0246] (-)-EGCG 或合成茶多酚对纯化的 20s 蛋白酶体活性的抑制作用

[0247] 将 0.5 μ g 纯化的兔 20s 蛋白酶体在 40 μ M 荧光肽底物 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC 中, 加入或不加入各种浓度的天然和合成茶多酚进行孵育, 按照先前描述的方法 (Nam S 等) 进行 20s 蛋白酶体的糜蛋白酶样活性的测定。

[0248] 天然 / 合成茶多酚对完整细胞蛋白酶体活性的抑制作用

[0249] VA-13 或 WI-38 细胞在 24 孔板 (2ml/孔) 中生长至 70-80% 覆盖度 (confluency), 然后用 25pM(-)-EGCG, 2, 或 2a 处理 24 小时。随后加入 40pM Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC 底物于 37 $^{\circ}$ C 培养 2.5 小时, 照上述方法测定糜蛋白酶样活性。或者, 将细胞用 25 μ M 的各个化合物处理 4 或 24 小时, 将细胞收获并裂解。然后将 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (40 μ M) 与制备好的细胞裂解液一起孵育 2.5 小时, 照上述方法测定糜蛋白酶样活性。

[0250] 与 FITC 结合的抗裂解 PARP 抗体对凋亡细胞的免疫染色

[0251] 凋亡细胞的免疫染色通过加入识别裂解的聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 的 FITC 结合多克隆抗体来完成, 并在 Axiovert 25 (Zeiss ;Thornwood, 纽约) 显微镜上观察。细胞在 60mm 皿中生长至约 80% 覆盖度 (confluency)。然后 VA-13 细胞用 VP-16, 2 或 2a (25 μ M) 处理 24 小时。处理之后, 收集悬浮和贴壁细胞, 在 pH 7.4 的 PBS 中洗涤两次。在下列所有步骤之间均需洗涤细胞, 并且所有洗涤均为 PBS 洗涤 1 分钟。然后将细胞固定在冰冷的 70% 乙醇中, 在 0.1% Triton-X-100 中使细胞透化, 并在室温下于 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 中阻断 30 分钟。在 4 $^{\circ}$ C 于暗处以 FITC 结合的 p85/PARP 第一抗体轻摇孵育 30 分钟。随后将细胞悬浮液转移至有 Vector Shield 封片剂和 DAPI 的载玻片上。用 AxioVision 4.1 捕捉图像, 并用 Adobe Photoshop 6.0 软件调整。通过计算凋亡细胞数占同一区域内总细胞数的比来对细胞死亡进行定量。数据为两次重复试验的平均值 \pm SD。

[0252] 台盼蓝染色分析

[0253] 用台盼蓝染色分析确定以所指天然和合成多酚处理过的 Jurkat T 细胞中的死亡细胞。细胞凋亡形态学用相差显微镜依照先前描述的方法评价 (Kazi A, Hill R, Long TE, Kuhn DJ, Twos E, Dou QP. Novel N-thiolated beta-lactam antibiotics selectively induce apoptosis in human tumor and transformed, but not normal or nontransformed, cells. *Biochem Pharmacol* 2004 ;67 :365-74 ;Kuhn DJ, Smith DM, Pross S, Whiteside TL, Dou QP. Overexpression of interleukin-2 receptor alpha in a human squamous cell carcinoma of the head and neck cell line is associated with increased proliferation, drug resistance, and transforming ability. *J Cell Biochem* 2003 ;89 :824-36)。

[0254] MTT 分析法

[0255] 用 MTT 确定茶多酚对肿瘤细胞全面增殖的影响。人乳腺 MCF-7 细胞铺板于 96 孔板中, 生长至 70-80% 覆盖度, 然后加入类似物培养 24 小时。随后将 MTT (1mg/ml) 的 PBS 溶液加入孔内, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时, 以使代谢旺盛的细胞完全裂解四唑盐。接着, 去除 MTT, 加入 100 μ L DMSO, 用多标记微孔板测读仪在 560nm 处进行比色分析 (Victor³ ;Perkin Elmer)。标示的吸收值为三次重复试验的平均值。

[0256] 软琼脂分析

[0257] 在 (-)-EGCG 或保护的茶类似物 (25pM) 或 DMSO (对照) 存在下, 将 LNCaP 细胞 (2×10^4) 铺板于 6 孔板上的软琼脂中, 照先前描述的方法确定细胞转化活性 (Kazi A 等)。

[0258] 核染色

[0259] 用各药品处理之后, 所有漂浮和贴壁 VA-13 和 WI-38 细胞都用 Hoechst 33342 染色以评价细胞凋亡。简单地说, 细胞在 PBS 中洗涤 2 次, 在 4°C 用 70% 乙醇固定 1 小时, 在 PBS 中洗涤 3 次, 在暗处于室温下用 50pM Hoechst 染色 30 分钟。漂浮细胞铺于载玻片上, 贴壁细胞在板上用荧光显微镜 (Zeiss, 德国) 在 10 倍或 40 倍分辨率下观察。Digital Scientific 用 AxioVision 4.1 获得图像并用 Adobe Photoshop 6.0 进行调整。

[0260] 合成茶多酚对 Caspase-3 活性的诱导

[0261] 细胞用各化合物 25 μ M 处理 4 或 24 小时, 然后收获并裂解。将 Ac-DEVD-AMC (40 μ M) 加入至细胞裂解液中 2.5 小时, 测定 Caspase-3 活性。

[0262] 实验结果

[0263] (-)-EGCG 过乙酸酯 (1) 的化学稳定性和酶水解

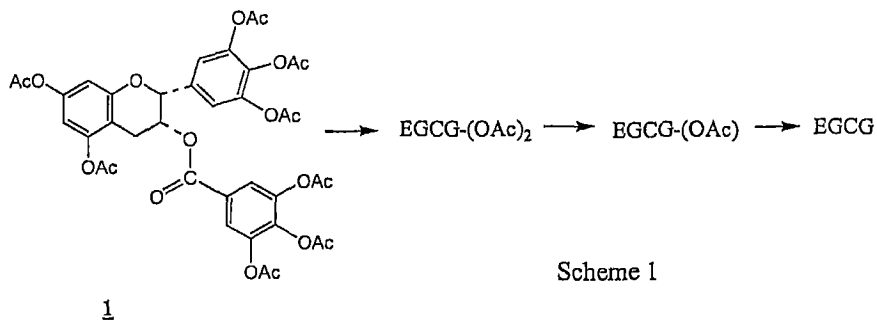
[0264] 对比了 1 和 (-)-EGCG 在培养基 (RMPI) 中的稳定性, 该培养基模拟体液, pH 值在 8 左右。将 0.1mM (-)-EGCG 或 1 在 1mL RMPI 中于 37°C 孵育至指示的时间。在不同时间点用 HPLC 分析培养基中剩余试验化合物的量。降解曲线见图 2。

[0265] 当 (-)-EGCG 在培养基中溶解后, 其在 20 分钟内迅速降解, 表明了 (-)-EGCG 在培养基中稳定性差。尽管 1 也在培养基中降解, 但如图 2 所示, 与 (-)-EGCG 相比, 其降解速率慢得多。1 在 2 个小时后才完全消失, 表明它在该培养基中比 (-)-EGCG 稳定 6 倍。因此, 过乙酸酯化保护 (-)-EGCG 的酚基有助于使 1 在培养 (接近生理) 条件下稳定。

[0266] 为了确定 1 是否在培养基条件下分解为 EGCG, 重复实验但这次加入维生素 C (1.67mg/mL) 以阻止生成的 EGCG 的迅速降解。当 1 消失时, HPLC 观察到一个新的峰 A 随着时间变化其强度先增加后降低。然后出现另一个 HPLC 峰 B, 其同样最终消失了。最后, 检测到与 EGCG 保留时间相同的 HPLC 峰形成。这些组份的时程结果见图 3。EGCG 的鉴定由 UV 光谱和质谱确认。另外, 对峰 A 和 B 的质谱分析表明, A 和 B 分别为 EGCG 的二乙酸酯和单乙酸酯。这些结果提示化合物 1 在培养基条件下首先分解为二乙酸酯, 然后分解为单乙酸酯, 最后分解为 EGCG。

[0267] 在细胞条件下从化合物 1 生成 (-)-EGCG 可以由加入维生素 C 阻止 (-)-EGCG 快速消失来更清楚地证明。在这种情况下, 发明人在含有乳腺癌细胞裂解液的培养基中进行实验。HPLC 分析显示了 1 的消失伴随着 A (二乙酸酯), B (单乙酸酯), 然后是 (-)-EGCG 的瞬间生成, 其时程结果 (图 4) 与图 3 相似。因此相信, 在加有细胞裂解液的培养基中, 化合物 1 历经水解而先形成 EGCG 二乙酸酯, 然后形成 EGCG 单乙酸酯, 接着形成 EGCG, 最后形成没食子酸 (流程图 1)。

[0268]



[0269] 1 和 (-)-EGCG 在体内和体外对蛋白酶体活性的抑制作用

[0270] 如果 1 有 (-)-EGCG 前药的作用,那么它应该保持无生物活性直至在细胞内去乙酰化,在该细胞内它被转化为其母体化合物。为证实这一假设,以 1 或 (-)-EGCG (作为阳性对照)测定体外和完整 Jurkat T 细胞中的蛋白酶体活性。首先,将 1 和购买的 (-)-EGCG 溶解在 DMSO 中,测定它们对纯化的 20S 蛋白酶体的糜蛋白酶样活性的影响。10 μ M 的 1 在抑制纯化的 20S 蛋白酶体的糜蛋白酶样活性方面完全没有作用(图 5)。与此相反,10 μ M 的 (-)-EGCG 抑制了 80-90% 的蛋白酶体糜蛋白酶样活性。因此,象预计的那样,1 在细胞系统外不是蛋白酶体抑制剂。

[0271] 如果 1 在细胞内转化成 (-)-EGCG,则应该能检测到体内的蛋白酶体抑制作用。为考察这种可能性,将人 Jurkat 细胞用 25 μ M 的 1 或 (-)-EGCG 处理 12 或 24 小时,然后用糜蛋白酶样特异荧光底物测定完整细胞内的蛋白酶体活性(图 6a),或者用泛素化蛋白的蛋白质印迹法进行测定(图 6b)。用 (-)-EGCG 处理 Jurkat T 细胞 24 小时后,蛋白酶体活性的抑制率为 31%,与此相对,用 1 处理时的抑制率为 42%(图 6a)。为了分析胞内多泛素化蛋白的水平,细胞在孵育 12 小时后被裂解并进行蛋白质印迹分析。1 显示出与天然 (-)-EGCG 可比的泛素化蛋白水平(图 6b)。因此,1 在抑制完整细胞内的蛋白酶体活性方面强度与 (-)-EGCG 相同,甚至更强。另一方面,虽然 1 比 EGCG 稳定 6 倍,但其在细胞内的生物活性强度并没有增加到类似的程度。这可能是由于由 1 产生的 EGCG 的量及其在细胞内的生物活性依赖于多个因素的组合:1 对细胞的相对渗透性,酯酶的量 and 任何时候都存在于细胞内的抗氧化剂的量。

[0272] 1 和 (-)-EGCG 对 Jurkat 细胞内 Akt 的去磷酸化作用

[0273] 5, 10 和 25 μ M 的 (-)-EGCG 和 1 与 Jurkat T 细胞一起孵育 24 小时,然后用磷酸化 Akt 的特异抗体进行蛋白质印迹分析(图 7)。光密度分析结果表明,25 μ M 的 (-)-EGCG 能降低 32% 的 p-Akt 水平,与之相比,用 25 μ M 的 1 处理后能减少 73% 的活化 Akt(图 7)。以肌动蛋白作为负载对照。

[0274] 1 和 (-)-EGCG 诱导的细胞死亡

[0275] 同样在经 10 μ M (-)-EGCG 和 1 处理 24 小时的 Jurkat T 细胞内评价 (-)-EGCG 和 1 诱导细胞死亡的能力。(-)-EGCG 对细胞死亡的作用极小(5%),而同样浓度的 1 能诱导高至 15% 的细胞死亡(图 8)。因此,1 抑制细胞蛋白酶体活性(图 6)和使 Akt 失活(图 7)的较强能力与其诱导细胞死亡活性的增加有关(图 8)。

[0276] 乙酰化合成茶多酚不抑制纯化的 20S 蛋白酶体活性

[0277] 将高至 25 μ M 的所有被保护和未被保护化合物与纯化的 20S 蛋白酶体以及糜蛋白酶活性荧光底物一起孵育 30 分钟。然后测定半数最大抑制浓度或 IC₅₀。(-)-EGCG 显示出

最强的抑制作用,其 IC_{50} 为 $0.2 \mu M$,其次是 2(IC_{50} 约 $9.9 \mu M$)。化合物 3 或 4 的 IC_{50} 值为 $14-15 \mu M$ 。相比之下,被保护的类似物活性低得多: $25 \mu M$ 时的抑制率 $< 35\%$ 。这与上述结果一致。

[0278] 被保护的茶类似物在完整肿瘤细胞内表现出更强的蛋白酶体抑制能力

[0279] 为确定合成的茶类似物在体内对蛋白酶体有何作用,将 Jurkat 细胞用 $25 \mu M$ 的各合成化合物处理 4 或 24 小时,以 (-)-EGCG 为对照 (图 9A 和 9B)。处理 4 小时后,蛋白质印迹分析显示,乙酸酯保护的类似物诱导了更大量的泛素化蛋白 (图 9A, 第 5, 7 和 9 道), 表明蛋白酶体活性被阻止。根据上述数据,以 1 为对照,显示过乙酸酯保护的 (-)-EGCG 比天然 (-)-EGCG 更强效 (图 9A, 第 3 道对第 2 道)。另外,对被认为是两种蛋白酶体靶物的 Bax 和 $I\kappa B\alpha$ 的蛋白质印迹分析显示这些蛋白质消失并出现了一个更高分子量的带,其被推测为蛋白质的多泛素化形式 (图 9A, 3, 5, 7 和 9 道)。然而,在处理 24 小时后,(-)-EGCG 及其未被保护的类似物表现出更大量的泛素化蛋白 (图 9B, 2, 4, 6 和 8 道)。这与被保护的类似物在较早时间点时为蛋白酶体有效抑制剂,在处理 24 小时之后,泛素化蛋白被去泛素酶耗尽的想法是一致的。在经被保护的类似物 2a, 3a 和 4a 处理的 Jurkat 细胞中还发现了另一种蛋白酶体靶物 p27 的聚集 (图 9B, 第 9, 5, 7 道)。在经 2a, 3a 和 4a 处理的细胞中仍然发现了被推定为泛素化 $I\kappa B\alpha$ 的带 (图 9B, 第 9, 5, 7 道)。经过 24 小时处理后,被推定为泛素化 $I\kappa B\alpha$ 的带的缺乏可能是由于去泛素化作用 (图 9B)。本实验采用肌动蛋白作为负载对照。

[0280] 被保护的类似物诱导更大量白血病细胞死亡

[0281] 用一对类似物 4 和 4a 进行的动力学实验显示,经过多酚处理 8 小时后,未被保护的类似物 4 以最高表达量诱导了泛素化蛋白的聚集 (图 9C)。相反地,被保护的 4a 早在 2 小时时就表现出增加的泛素化蛋白聚集,并持续至 8 小时 (图 9C)。为确定乙酸酯保护的类似物在其他癌细胞系统中是否为有效蛋白酶体抑制剂,以 DMSO 为对照,将前列腺癌 LNCaP 细胞用 $25 \mu M$ 的 (-)-EGCG, 1, 2a 或 3a 处理 24 小时。结果的确检测到了泛素结合蛋白,并且在经 2a 和 3a 处理的细胞中泛素结合蛋白的增加量最大 (图 9D)。

[0282] 被保护的类似物是更有效的细胞凋亡诱导剂

[0283] 已证实蛋白酶体抑制作用可诱导多种癌细胞凋亡,而不诱导正常非转化细胞凋亡 (An B 等)。将 Jurkat T 细胞用各选定的多酚及其受保护的类似物 $25 \mu M$ 处理 24 小时,以研究其诱导凋亡性细胞死亡的能力。台盼蓝掺入实验显示, 2a, 3a 和 4a, 而不是其它的化合物, 分别诱导了 99%, 57% 和 83% 的 Jurkat 细胞死亡 (图 10A)。同样地, 蛋白质印迹分析显示, 只有 2a, 3a 和 4a 在 24 小时后诱导了凋亡特异性的 PARP 裂解 (图 10B)。仅检测 PARP 裂解片断 (p85; 绿色) 的免疫荧光染色结果显示, SV40 转化的 VA-13 细胞对 2a 诱导的凋亡高度敏感, 其经 2a 处理 24 小时后凋亡细胞达 73% (图 10C 和 10D)。未被保护的 2 诱导的细胞凋亡较少 (21%), 而用作阳性对照的 $25 \mu M$ 的 VP-16 诱导了 92% 的细胞凋亡 (图 10C 和 10D)。凋亡细胞内, 与 DNA 的 A-T 富集区小沟结合的 DAPI 复染急剧减少 (图 10C), 这与细胞凋亡后期的 DNA 片段是一致的。

[0284] 被保护的多酚对肿瘤细胞增殖的抑制作用

[0285] 处理过的乳腺癌 (MCF-7) 细胞接着用 5 或 $25 \mu M$ 过乙酸酯保护的类似物处理 24 小时, 然后进行 MTT 分析以确定其对细胞增殖的影响。化合物 1 在 $25 \mu M$ 时抑制 40% 的细

胞增殖(图 11A)。被保护的化合物 2a, 3a 和 4a 在 5 μ M 和 25 μ M 时导致的抑制率分别为 50% 和 70% (图 11A)。

[0286] 将人前列腺癌 LNCaP 细胞分别用选定的、被保护的茶多酚类似物 1, 2a, 3a 和 4a 各 25 μ M 处理 24 小时, 然后确定细胞凋亡形态学的变化。被保护的类似物 2a, 3a 和 4a 又一次导致了戏剧性的聚拢、脱落和细胞破裂(图 11B)。1 引发了轻微的形态学变化, 而用 (-)-EGCG 处理则导致了细胞变大, 变平, 表明细胞生长停滞。

[0287] 用软琼脂分析来确定肿瘤细胞的转化活性。集落形成的消失与 GI 期阻滞和 / 或细胞凋亡有关。将 LNCaP 细胞加入至 6 孔板的软琼脂中, 然后在最初铺板时用 25 μ M 的 (-) EGCG 或被保护的类似物处理一次(图 11C)。21 天后评价集落形成。与用 DMSO 处理的对照组相比, 用 (-) EGCG 处理的细胞显示集落形成明显减少(图 11C 和 11D)。被保护的多酚也抑制了肿瘤细胞的转化活性, 其中 2a 和 4a 是最有效的集落形成抑制剂(图 11D)。

[0288] 被保护的类似物对肿瘤细胞凋亡的优先诱导

[0289] 诱导肿瘤细胞凋亡而不诱导正常细胞凋亡的能力是新型抗癌药物的重要评估标准。为确定被保护的化合物是否也影响正常细胞, 将 VA-13 和 WI-38 细胞用 25 μ M 的 (-)-EGCG, 2 或 2a 处理 24 小时, 测定蛋白酶体活性, 核形态学变化和细胞脱落。结果发现 VA-13 细胞内的蛋白酶体糜蛋白酶样活性的降低程度与正常 WI-38 细胞内的不同(图 12A)。用 (-)-EGCG 和 2 处理 VA-13 细胞, 其蛋白酶体活性下降了 42-48%, 而 2a 则抑制了 92% 的蛋白酶体活性。相反地, 用所有三种多酚处理的 WI-38 细胞的蛋白酶体活性均仅下降了 5%。

[0290] 接下来检查经天然 (-)-EGCG, 2 和 2a 处理后的凋亡细胞核形态学(图 12B)。(-)-EGCG 和 2 表现出少量或无细胞凋亡, 2a 则显著地诱导了 SV-40 转化 VA-13 细胞的凋亡。与之相反, 用所有化合物处理的正常 WI-38 成纤维细胞均没有凋亡, 并且仅可见极少量脱落。接着用所有被保护的类似物各 25 μ M 处理 24 小时进行对比实验。36 小时后, (-)-EGCG 引发了 VA-13 细胞凋亡(图 12C)。所有被保护的类似物均诱导了转化 VA-13 细胞的凋亡, 但对正常 WI-38 细胞无作用(图 12B 和 12C)。同样地, 用 (-)-EGCG 和 2a 处理白血病 (Jurkat T) 细胞和正常非转化自然杀伤 (YT) 细胞时, 经 PAW 裂解证明, 仅 Jurkat 细胞发生了细胞凋亡(图 12D)。

[0291] 新型合成茶多酚类似物对纯化的 20S 蛋白酶体的活性抑制作用

[0292] 绿茶多酚 (-)-EGCG 包括带有 3 个 -OH 基的 B 环(图 1), 对纯化的 20S 蛋白酶体的 IC_{50} 值是 0.3 μ M(表 1)。

[0293] 表 1 合成茶多酚对蛋白酶体活性的抑制作用^{1,2}

	未保护的	IC ₅₀ (μM)	被保护的	IC ₅₀ (μM)
[0294]	(-)-EGCG	0.30 ? 0.02		
	No 16	0.59 ? 0.17	No 24*	<i>n.a.</i> ³
	No 6	2.69 ? 1.07	No 19*	<i>n.a.</i> ³
	No 15	4.56 ? 1.20		
	No 12	5.99 ? 0.13	No 23*	<i>n.a.</i> ³
	No 11	7.70 ? 0.14	No 22*	<i>n.a.</i> ³
	No 10	8.51 ? 0.47	No 21*	<i>n.a.</i> ³

[0295] ¹ 对纯化的 20S 蛋白酶体的抑制作用通过糜蛋白酶样特异荧光底物

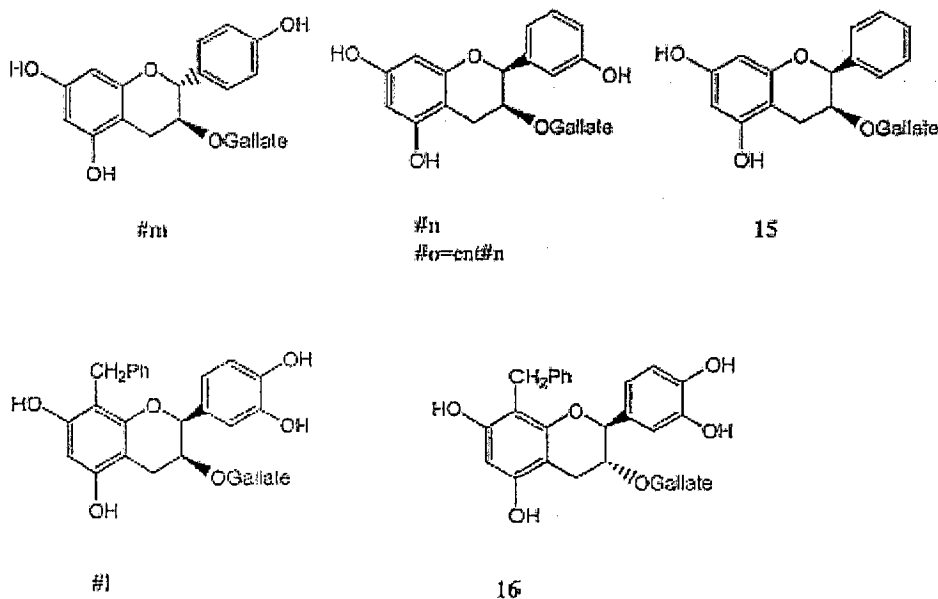
[0296] (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) 评价。20S 蛋白酶体与多酚一起孵育 2 小时。

[0297] ² 实验结果获自 3 次独立的重复实验。

[0298] ³n. a. 表示 25 μM 时对纯化的 20S 蛋白酶体的抑制活性 < 20%。

[0299] 从 (-)-EGCG 的 B 环上去掉 -OH 后生成的 (-)-ECG 具有下降的体外蛋白酶体抑制效力 (0.58 μM)。为了进一步考察 B 环上 -OH 基的去除对蛋白酶体抑制作用和诱导细胞死亡能力的影响, 发明人合成了几个新的 B 环上 -OH 基减少的 EGCG 类似物, 及其推定的前药、过乙酸酯保护的对应物。用纯化的 20S 蛋白酶体和糜蛋白酶样荧光底物确定了下列未被保护的多酚类似物的蛋白酶体抑制作用:

[0300]



[0301]

化合物	IC ₅₀ (μM)	参考文献
(-)-EGCG	0.30	本文
(-)-ECG, 8	0.58	参考文献 a
(+)-CG, 7	0.73	参考文献 a

(-)-EZG, 6	2.69	本文
(+)-ZG, #m	4.56	本文
#n	0.84	本文
#o	1.22	本文
15	4.56	本文
(+)-ECG	0.73	参考文献 a
#1	0.39	本文
(-)-CG	0.75	参考文献 a
16	0.59	本文

[0302] 表 2 天然和合成茶多酚对 20S 原核蛋白酶体活性的影响

[0303] 参考文献 a 是 :Smith, D. M. ;Daniel, K. G. ;Wang, Z. ;Guida, W. C. ;Chan, T. H. ;Dou, Q. P. Proteins :Structure, Function, and Bioinformatics, 2004, 54, 58.

[0304] 结果观察到, 蛋白酶体抑制活性与 B 环和 D 环上 -OH 基数目之间存在着良好的关联。当 -OH 逐个从 B 环上去除, 其 IC_{50} 值逐步增加, 观察到的效力顺序为 :(-)-EGCG (IC_{50} 0.30 μ M) > (-)-ECG (0.58 μ M) > 6 (2.69 μ M) > #m (4.56 μ M) (图 13 和表 1)。与此一致地, 在 D 环上含一个 -OH 的一系列化合物 12, 11 (12 的差向异构体) 和 10 (图 13) 中, B 环上有两个 -OH 基的 12 和 11 比 B 环上只有一个 -OH 基的 10 作用更强 (分别是 5.99, 7.70 和 8.51 μ M, 表 1)。

[0305] 另外 SAR 分析也显示, 当更多 -OH 基从 D 环上去掉时, 其抑制作用强度比仅去除 B 环上 -OH 时进一步降低。例如, 6 比 10 作用更强 (2.69 μ M 对 8.51 μ M), (-)-ECG 和 (-)-CG 比 No 12 作用更强 (0.58 μ M 和 0.75 μ M, 对 5.99 μ M)。最后, 发明人纳入化合物 16 以探讨 A 环的疏水作用。实际上, 化合物 16 比其对应物 (-)-CG 活性更强 (0.59 μ M 对 0.75 μ M; 图 13, 表 1 和 2)。

[0306] 作为对比, 同时确定了被保护的多酚类似物对纯化的蛋白酶体的抑制活性。和预期的一样, 与其未被保护的类似物相比, 过乙酸酯保护的类似物 (标示以*) 不是纯化的 20S 蛋白酶体糜蛋白酶样活性的强效抑制剂, 这可能是由于缺少转化所需的细胞酯酶。所有被保护的类似物在 25 μ M 时均抑制了纯化的 20S 蛋白酶体的 < 20% 活性。

[0307] 合成茶多酚对细胞蛋白酶体活性的抑制作用

[0308] 为确定未被保护和被保护的多酚类似物是否能抑制完整细胞的蛋白酶体活性, 将白血病 Jurkat T 细胞用 25 μ M 的各化合物处理 4 和 24 小时, 然后收集细胞团, 测定制备好的细胞裂解液中的蛋白酶体糜蛋白酶样活性。未被保护的化合物显示出对完整 Jurkat T 细胞有限的蛋白酶体抑制作用, 尽管 10 和 15 表现为中等强度 (图 14)。这些数据提示, 大

多数甚至所有未被保护的化合物与 (-)-EGCG 相似,在细胞环境下仅有中等活性,这可能是由于它们在细胞内的不稳定性。

[0309] 重要的是,经过 24 小时的处理后,所有试验的过酰氧基保护的、尤其是过乙酸酯保护的多酚均为比其未被保护的对应物更有效的蛋白酶体糜蛋白酶样活性抑制剂(图 14)。尤其是 19*,其在处理 24 小时后抑制了 97%的糜蛋白酶样活性,而其未被保护的多酚对应物 6 仅抑制了 30%的糜蛋白酶样活性。

[0310] 促凋亡蛋白 Bax 和周期依赖性激酶抑制剂 p27 是天然的蛋白酶体靶物。如果过乙酸酯保护的多酚抑制完整细胞的蛋白酶体活性,则预期在这些细胞中能观测到 Bax 和 p27 的聚积。为了试验这一设想,将 Jurkat T 细胞用被保护和未被保护的化合物进行处理,细胞裂解液用 Bax 和 p27 的特异性抗体采用蛋白质印迹法进行分析(图 15)。处理 4 小时后,过乙酸酯保护的类似物 24* 和 19*,而不是其它未被保护的类似物,能增加 Bax(分别为 3 倍和 2.5 倍)和 p27(分别为 6 倍和 11 倍)的聚积(图 15A)。处理 24 小时后,所有以过乙酸酯保护的化合物处理过的细胞中 Bax 水平均增加(24*, 19*, 21* 和 23* 分别为 13 倍,12 倍,40 倍和 36 倍)。然而,24 小时后的 p27 增加主要在经 21*(2 倍)和 23*(2 倍)处理的细胞中观察到。另外,作为蛋白酶体抑制作用指示剂的泛素化蛋白的水平,在用被保护的化合物 22* 处理 4 小时后有了显著增加,而用其相应未被保护的化合物 11 处理后无显著增加(图 15C)。这些数据与这些化合物的蛋白酶体抑制活性的特性是一致的(图 14)。这就暗示了,被保护的类似物能在培养的肿瘤细胞内转化为活性蛋白酶体抑制剂。

[0311] 合成茶多酚类似物对凋亡性细胞死亡的诱导

[0312] 先前已证实蛋白酶体抑制作用与诱导细胞凋亡有关。为确定 B 环 /D 环保护的类似物是否能诱导细胞死亡,将 Jurkat T 细胞先用 25 μ M 的所有被保护和未被保护类似物处理 24 小时,然后进行台盼蓝排除分析(图 16)。处理 4 小时后观察到所有用被保护和未被保护类似物处理的细胞均发生了细胞形态学变化(细胞萎缩和特征性的凋亡性泡状化),并且这些变化在用被保护化合物处理 24 小时后大大增加(数据未列出)。另外,过乙酸酯保护的类似物在孵育 4 小时后导致了细胞死亡增加 5 到 10 倍,到 24 小时时增加高至 20 倍(图 16)。相对之下,未被保护的多酚引起的细胞死亡少得多,即便经过 24 小时的处理,也只增加了 3 到 5 倍(图 16)。

[0313] 为了确定观察到的细胞死亡(图 16)是否是因为诱导了细胞凋亡,在 Jurkat T 细胞中进行了相同的实验,然后测定 Caspase-3 活化和 PARP 裂解。过乙酸酯保护的多酚诱导了最高水平的 Caspase-3 活性(图 17A):用 24* 处理 4 小时导致了约 16 倍的增加,而未被保护的 16 仅导致了 4 倍的增加。此外,用被保护的 19* 处理使 Caspase-3 的活性提高了 16 倍,而其未被保护的对应物 6 作用弱得多(4 倍)。与此相一致,在经 24* 和 19* 处理的细胞中检测到了 PARP 裂解,但在经其未被保护的对应物 16 和 6 处理的细胞中则未发现(图 17B)。而且,被保护的化合物 22* 能在处理细胞 4 小时后导致细胞 PARP 裂解,而其未被保护的对应物 11 则不能(图 17C)。

[0314] 过乙酸酯保护的 (-)-EGCG 类似物对肿瘤细胞凋亡的优先诱导

[0315] 诱导肿瘤细胞凋亡而不诱导正常细胞凋亡是抗癌药物的一个重要方面。为确定过乙酸酯保护的类似物是否影响正常细胞,发明人用看起来最有效的过乙酸酯保护的类似物 19* 处理白血病 Jurkat T 细胞和非转化永生化自然杀伤(YT)细胞。白血病 Jurkat T 细胞

中的蛋白酶体靶蛋白 Bax, p27 (数据未列出) 和 I κ B- α (图 18) 的水平再一次增加。然而, 这些蛋白的水平在非转化永生自然杀伤 (YT) 细胞中没有增加。另外, 泛素化蛋白水平在 Jurkat T 细胞中以剂量依赖性方式聚集。相比之下, 泛素化蛋白水平在 YT 细胞中仅检测到轻微而短暂的增加。与选择性抑制蛋白酶体活性一致的是, 仅在 Jurkat T 中发现了凋亡特异性 PARP 裂解, 在 YT 细胞中则没有。因此, 有效的过乙酸酯保护的多酚显然没有诱导非转化 YT 细胞的蛋白酶体抑制及随后的细胞凋亡。

[0316] 讨论

[0317] 绿茶中的天然 (-)-EGCG 被转化成其过乙酸酯化合物 1。另外, 合成了多个没食子酸酯环上缺失羟基的 (-)-EGCG 合成类似物。此外, 羟基被转化为乙酸酯基以生成前药, 该前药可以在细胞内通过酯酶裂解转化为其母体药物。令人惊讶的是, 被保护的类似物是比其未被保护的对应物更有效的完整肿瘤细胞蛋白酶体抑制剂。与此相一致地, 在白血病 (Jurkat), 实体瘤和转化细胞系中试验时, 被保护的类似物同样是比其未被保护的对应物更有效的细胞凋亡诱导剂。对被保护类似物的 SAR 分析表明其活性强度的顺序如下: 2a = 4a > 3a > 1 > (-)-EGCG。

[0318] 设计和合成了 (-)-EGCG 的被保护类似物。出乎意料的是, 这些化合物在体内表现出蛋白酶体抑制活性。

[0319] 过酰氧基, 尤其是过乙酸酯保护的类似物同样是比其未被保护的羟基化对应物更有效的蛋白酶体抑制剂。已有观点认为, 是蛋白酶体糜蛋白酶样亚基 (β 5) 的 N 端 Thr 对 (-)-EGCG 的酯键碳发起的亲核攻击引起了 β 5 亚基的不可逆酰化, 从而抑制了其蛋白酶活性 (Nam S, Smith DM and Dou QP: J Biol Chem 276:13322-13330, 2001)。但是, 过乙酸酯部分的加入降低了酯键碳的亲电子特性, 从而导致了纯化的 20S 蛋白酶体的抑制作用大大降低。不出人意料的是, 本文中测定的被保护多酚同样对纯化的 20S 蛋白酶体糜蛋白酶样活性表现出有限的抑制作用 (表 1)。

[0320] 揭示了 B 环上的 -OH 基数和蛋白酶体抑制活性之间的关系 (表 2)。未被保护类似物的 IC₅₀ 值随着 -OH 基的逐个去除而逐步增加 (表 1)。尽管 16 含有一个在 (-)-CG 的 A 环 C₈ 碳上没有的额外的苯环, 但其蛋白酶体抑制作用强度与 (-)-CG 相比有轻微增加 (0.59 μ M 对 0.75 μ M)。

[0321] 发现的另一个重要的 SAR 是, 进一步从 D 环上去除 -OH 可导致体外蛋白酶体抑制作用强度进一步降低 (表 1)。

[0322] 如图 14 所示, 过乙酸酯保护的多酚是比未被保护的多酚更有效的蛋白酶体糜蛋白酶样活性抑制剂。24 小时时细胞蛋白酶体糜蛋白酶样活性的降低证明, 过乙酸酯保护的类似物表现出较长时间的稳定性。相比之下, 未被保护的类似物在 24 小时的处理后则丧失了稳定性。类似物 19* 在 24 小时后抑制了 97% 的细胞蛋白酶体糜蛋白酶样活性, 而其未被保护的对应物 6 仅抑制了 30% 的活性。与其它被保护和未被保护的化合物对相比, 22* 显示出比其对应物 11 在糜蛋白酶抑制作用强度方面相对小的增加, 这表明 22* 可能在细胞内转化成了母体药物。尽管机理还不是完全清楚, 但其它过乙酸酯保护的绿茶类似物似乎在细胞环境中被转化成为显著有效的化合物。

[0323] 在合成茶多酚的蛋白酶体抑制作用之后还对多个蛋白酶体靶蛋白进行了评价 (图 15)。实验数据提供了另一个证据, 证明过乙酸酯保护的类似物需要细胞环境和 / 或细

胞提取物环境来转化为有效的蛋白酶体抑制剂,这表现为 Bax, p27 和泛素化蛋白的聚积。在与体外模型相对的细胞模型中,被保护类似物比其未被保护对应物更能有效地聚积靶蛋白。相对之下,未被保护类似物没有表现出与被保护类似物相同程度的靶蛋白聚积作用,这可能是 -OH 基上质子给出和随后降解的结果。实验数据进一步说明,过乙酸酯保护的类似物在体内转化为新的化合物并起到前药的作用。

[0324] 台盼蓝分析证明,主要由被保护的类似物处理后,诱导了细胞死亡和特征性细胞凋亡形态学变化的发生(图 16)。被保护类似物在 24 小时再一次表现出比未被保护类似物更强的稳定性(其细胞死亡数高于总数的 50%)。Caspase-3 活性证明,在用被保护化合物孵育 4 小时后发生细胞凋亡,Caspase-3 活性与对照相比增加高至 16 倍(图 17)。对 PARP 裂解的蛋白质印迹分析进一步表明,PARP 裂解在用被保护类似物如 19*,24* 和 22* 处理 4 小时后发生。最重要的是,过乙酸酯保护的(-)-EGCG 类似物 19* 优先诱导 Jurkat T 细胞凋亡,而非转化 YT 细胞仍然不怎么受影响(图 18),这一点暗示了将被保护类似物开发成新型抗癌剂的潜力。

[0325] 总之,流行病学研究已指出绿茶消费品的抗癌益处。已经显示在癌症的病理状态中存在蛋白酶体的作用(Ciechanover A:Embo J 17:7151-7160,1998),绿茶多酚作为蛋白酶体抑制剂可能是一些癌症可行的治疗物质。目前的研究进一步指出,含有过乙酸酯保护的 -OH 基的合成绿茶多酚是有效的蛋白酶体抑制剂,并且进一步研究这些化合物可阐明这种形式治疗剂的其它益处。

[0326] 本发明提供了多种至少与(-)-EGCG 同样有效的(-)-EGCG 衍生物。(-)-EGCG 的羧酸酯保护形式及其衍生物比其可用作蛋白酶体抑制剂以减少肿瘤细胞生长的未被保护的形式更稳定。此外,从 1,2,3,4,19*,21*,22* 和 23* 的结构可以看出,(-)-EGCG 的没食子酸酯环上的一些羟基可能对作用强度不重要。

[0327] 虽然通过实施例详细描述了本发明的优选实施方案,但是很明显,本领域技术人员可以对本发明进行修改和调整。而且,本发明的实施方案不应被理解为仅限于实施例或附图。应该明确的是,那些修改和调整均在下列权利要求书中所述的本发明的范围内。例如,举例说明或描述的作为一个实施方案的一部分的特征可以用于另一个实施方案以产生又一个实施方案。因此,本发明意欲保护那些属于本权利要求及其等同体范围内的修改和变化。

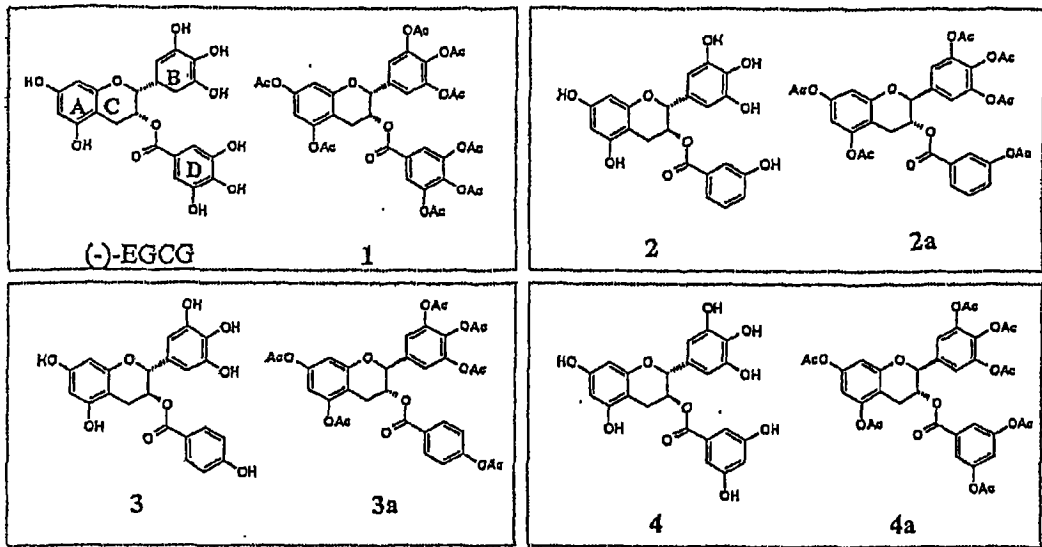


图 1

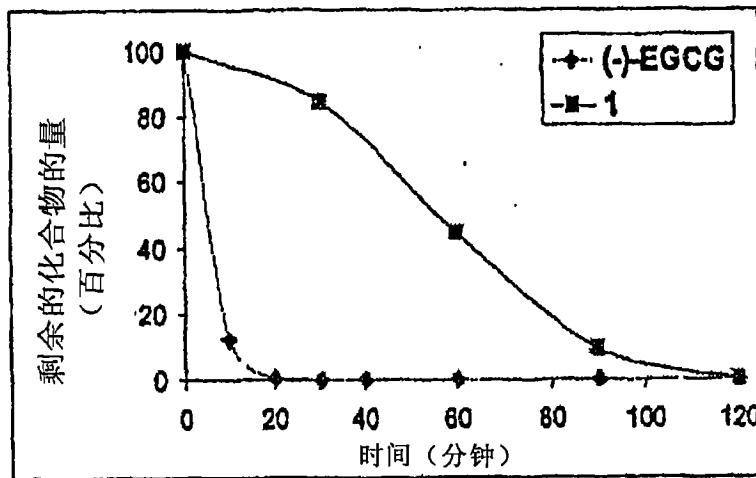


图 2

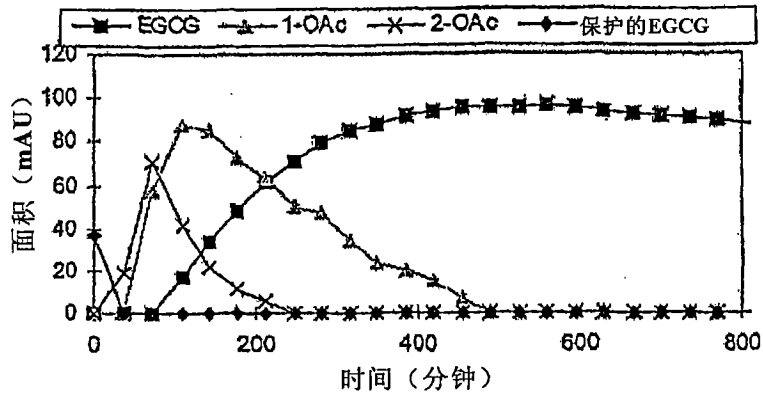


图 3

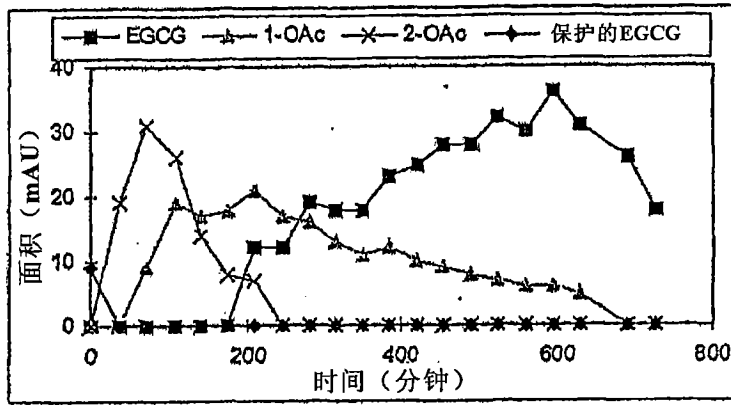


图 4

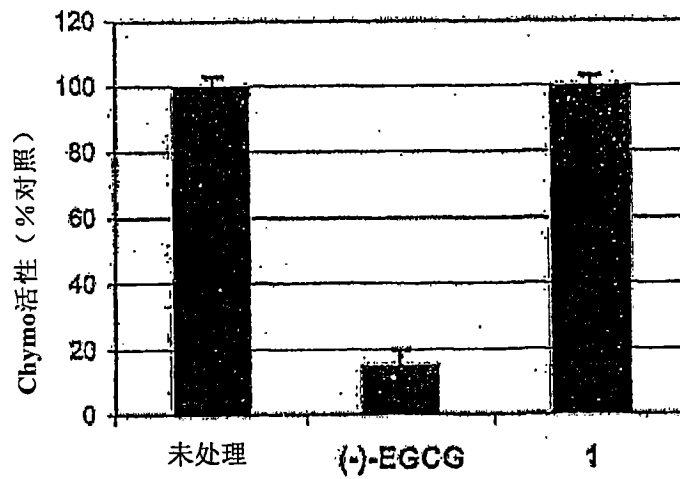


图 5

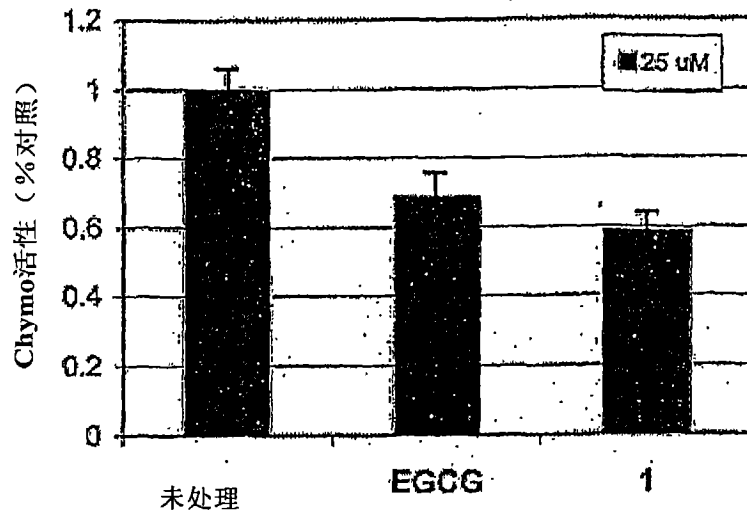
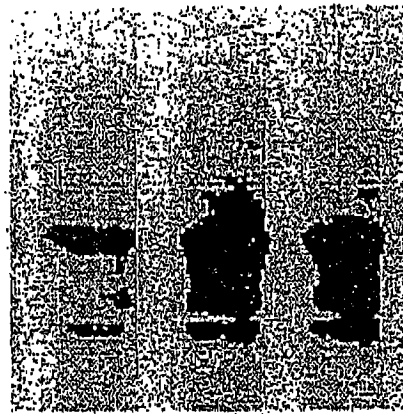


图 6a



DMSO (-)EGCG 1

图 6b

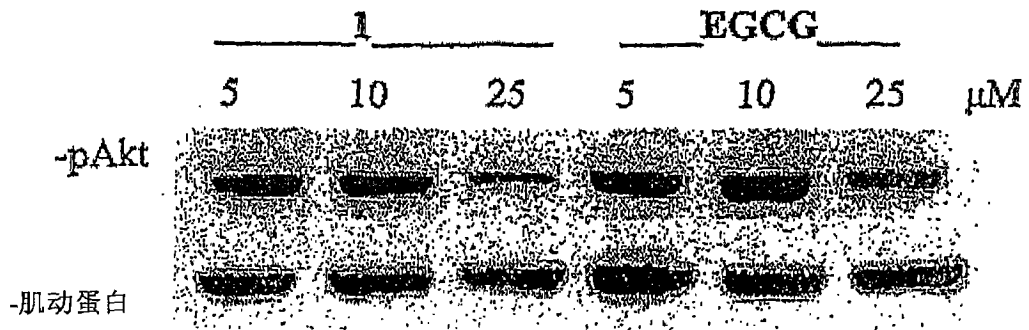


图 7

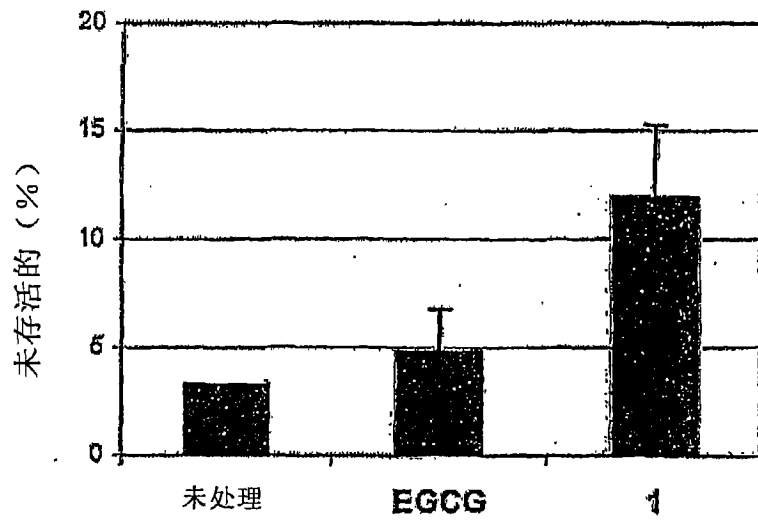


图 8

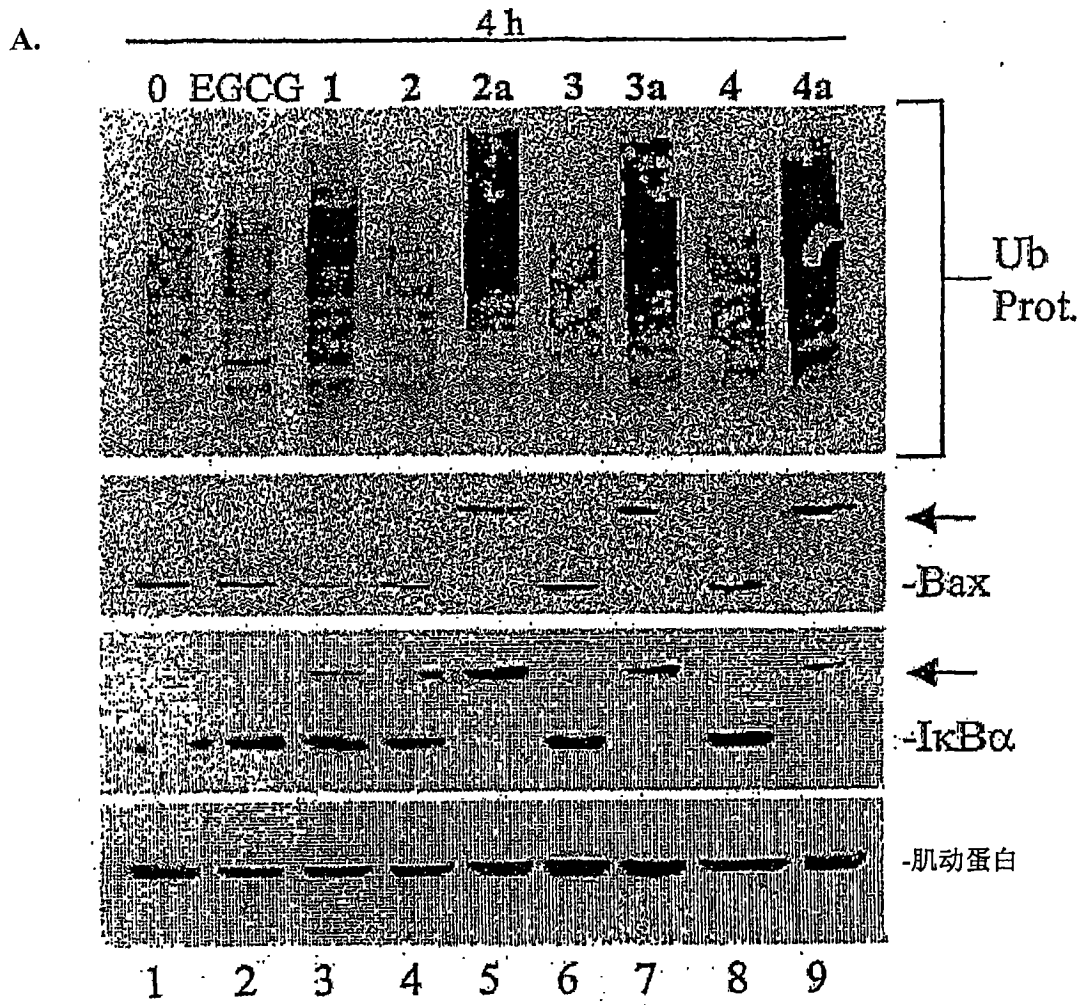


图 9a

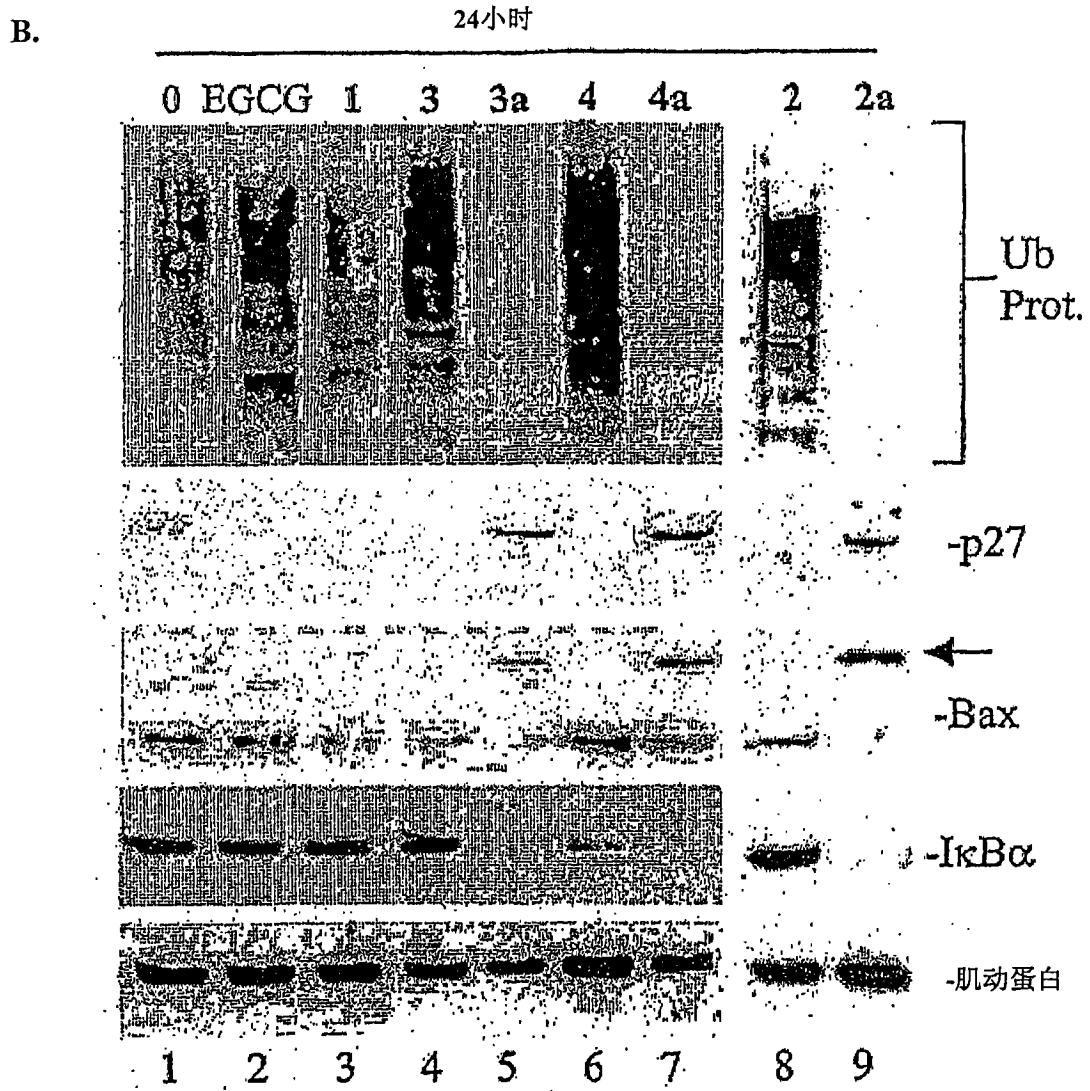


图 9b

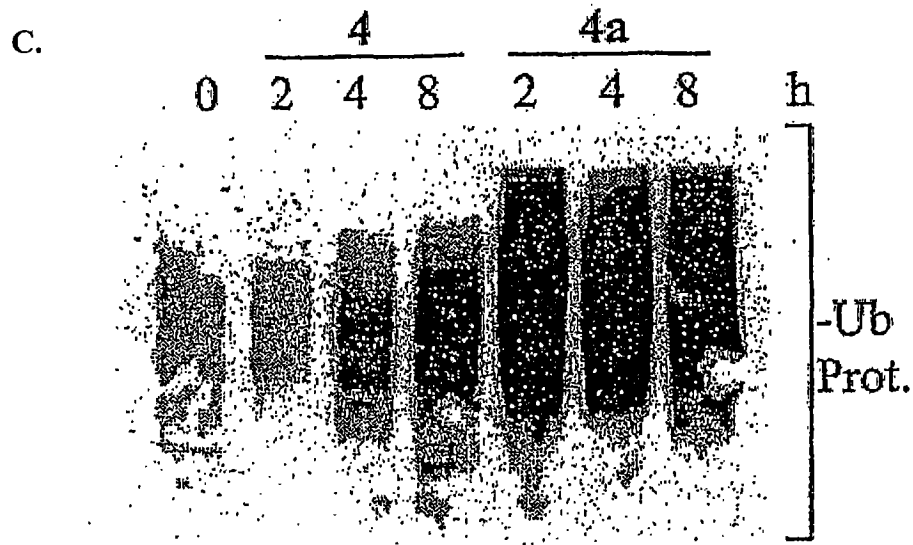


图 9c



图 9d

A.

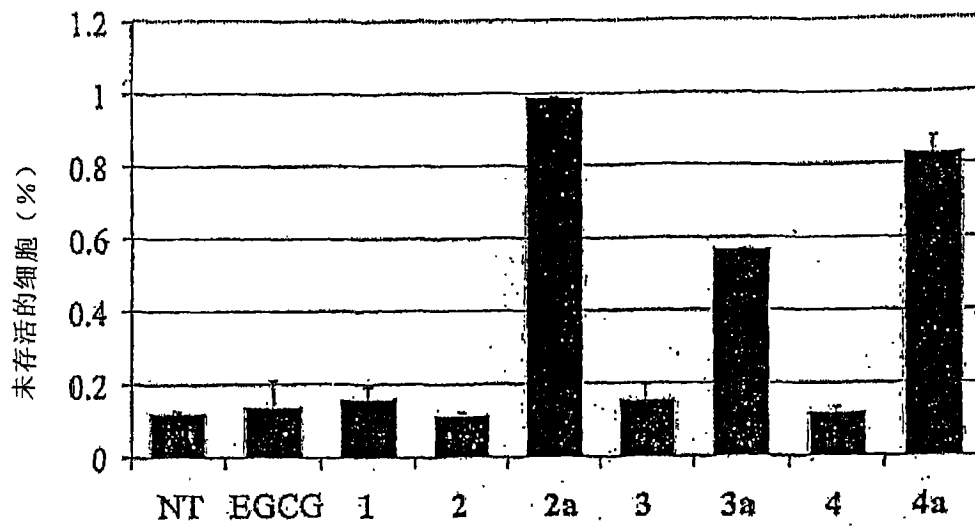


图 10a

B.

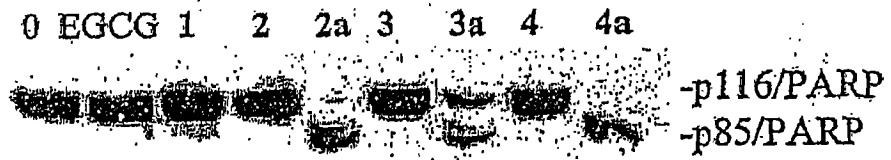


图 10b

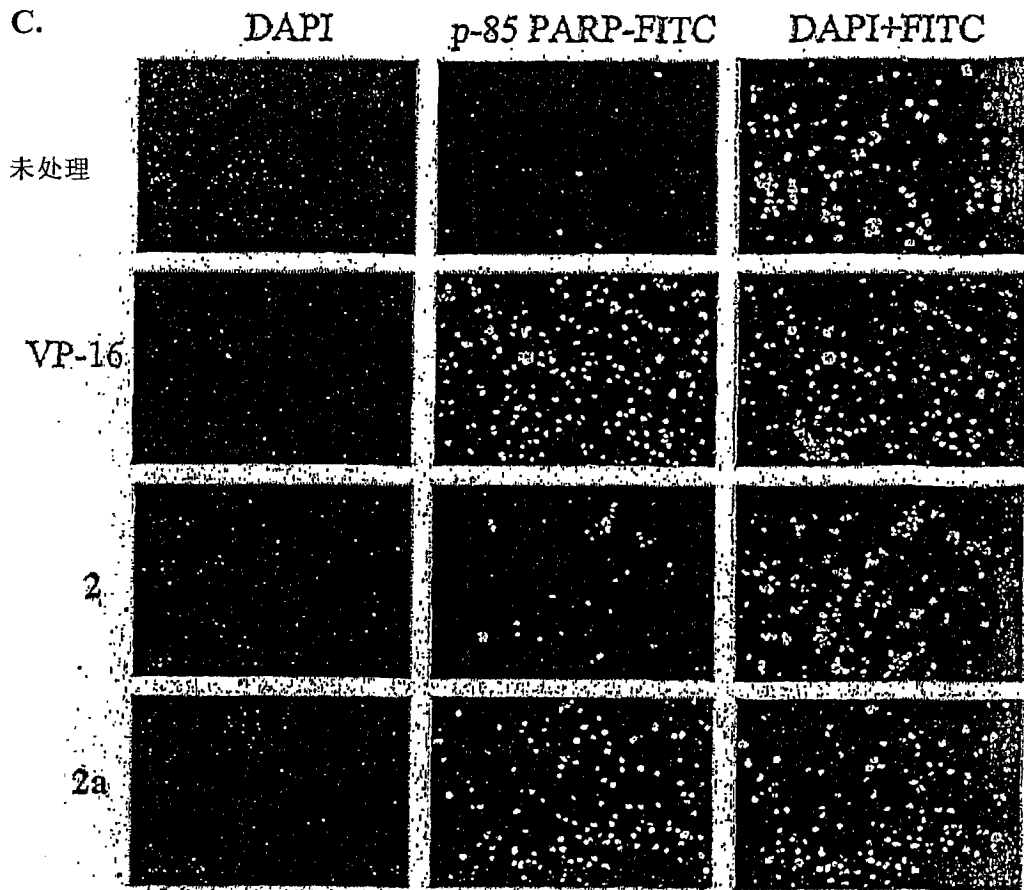


图 10c

D.

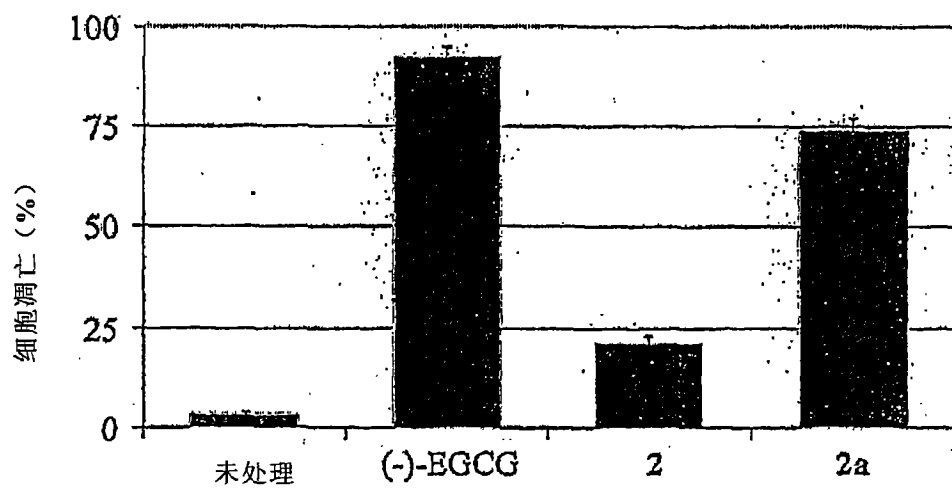


图 10d

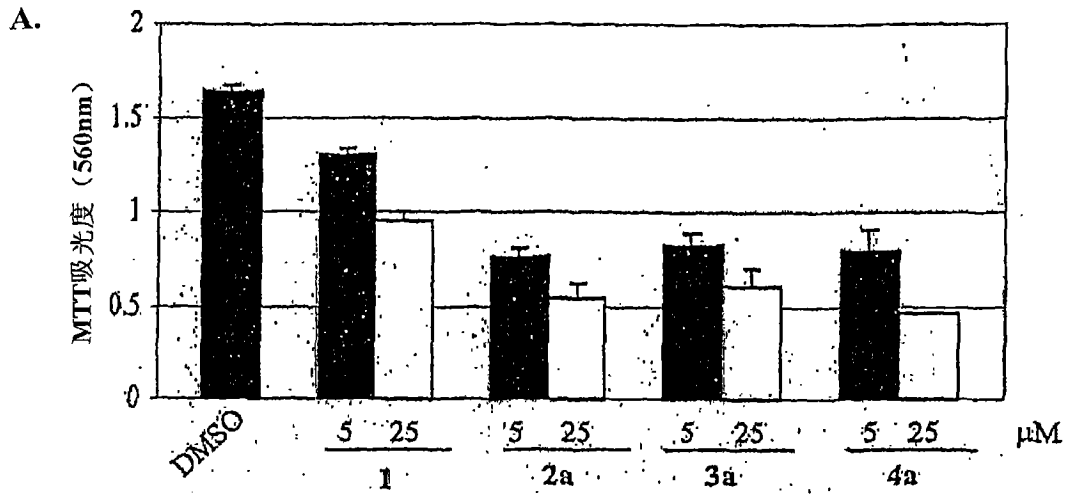


图 11a

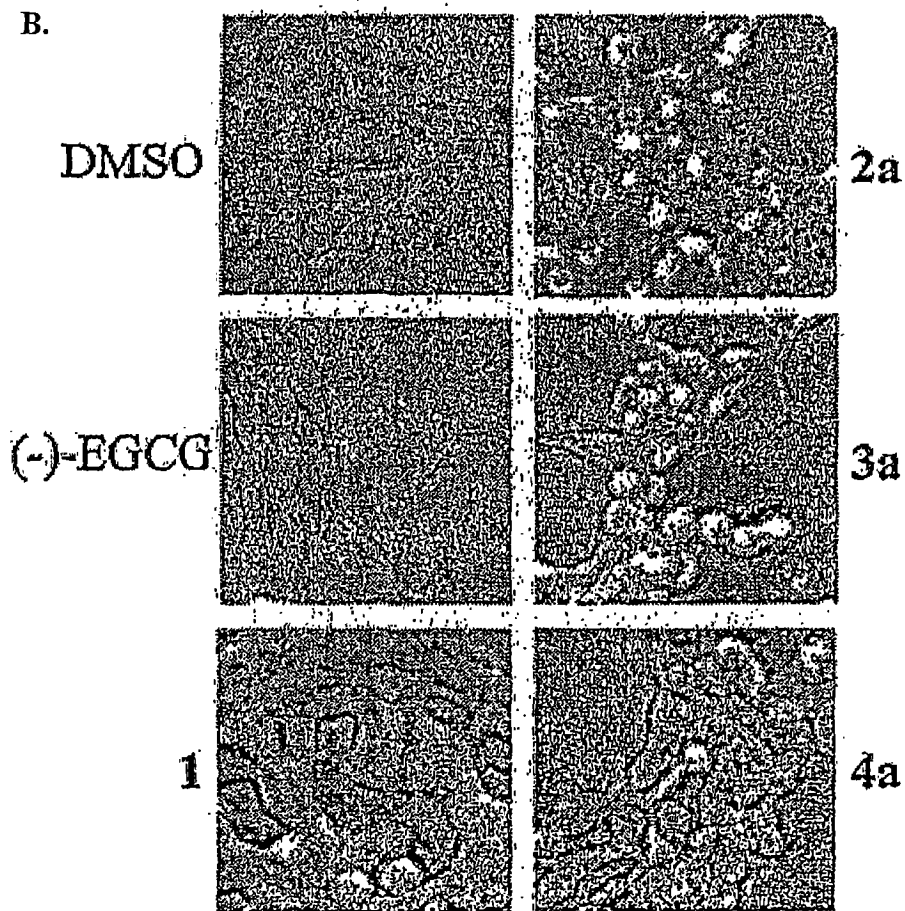


图 11b

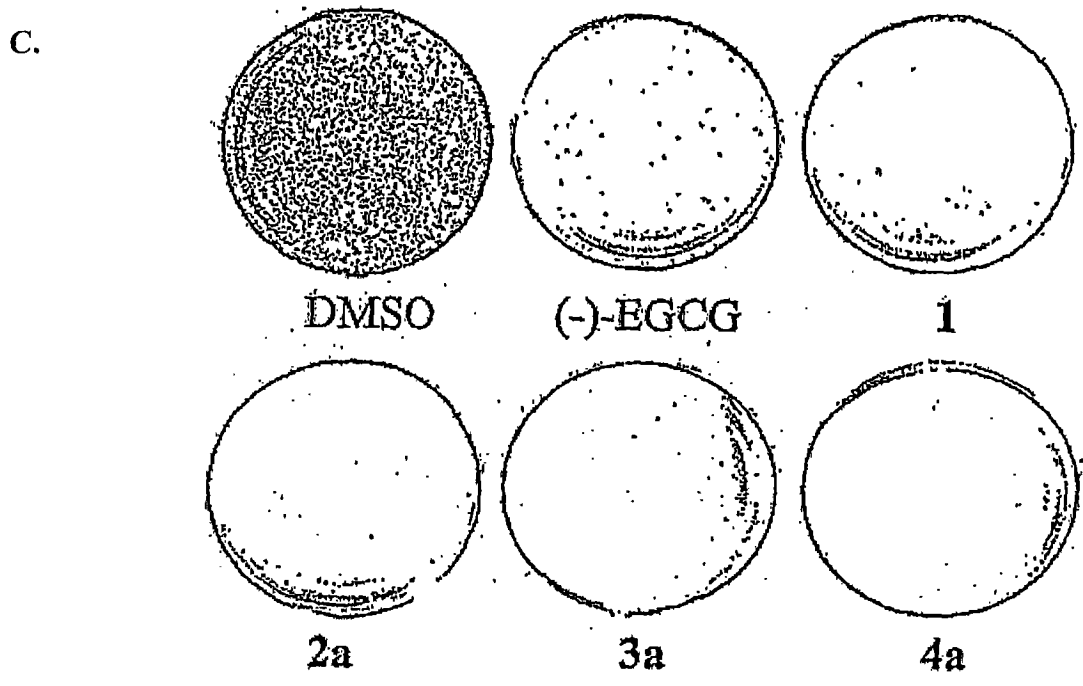


图 11c

D.

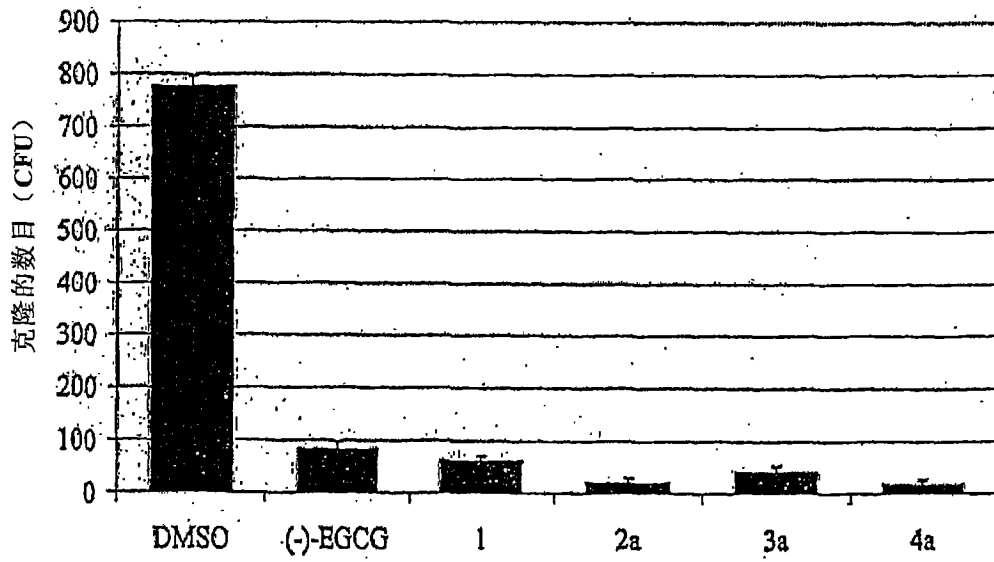


图 11d

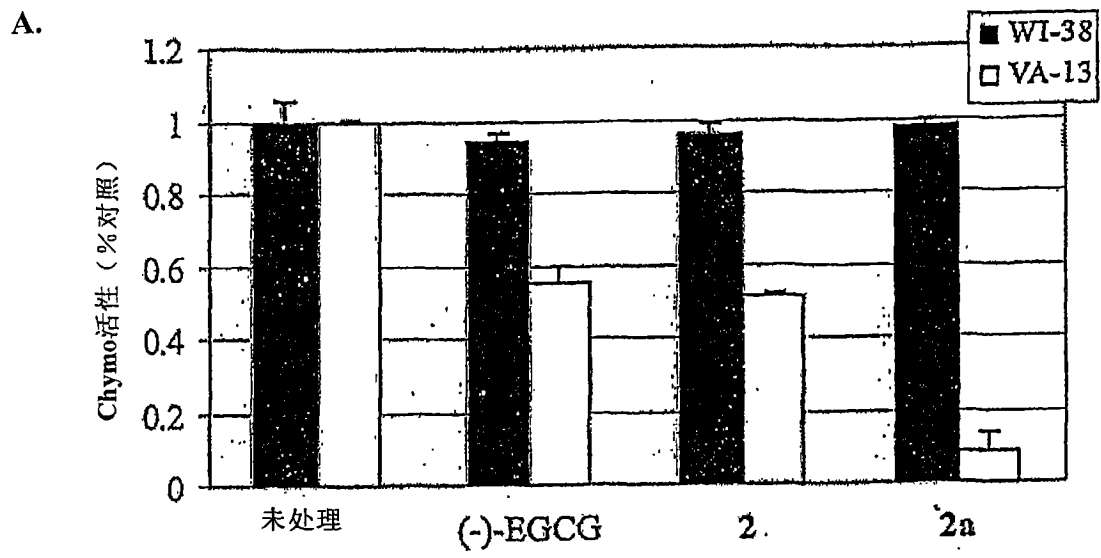


图 12a

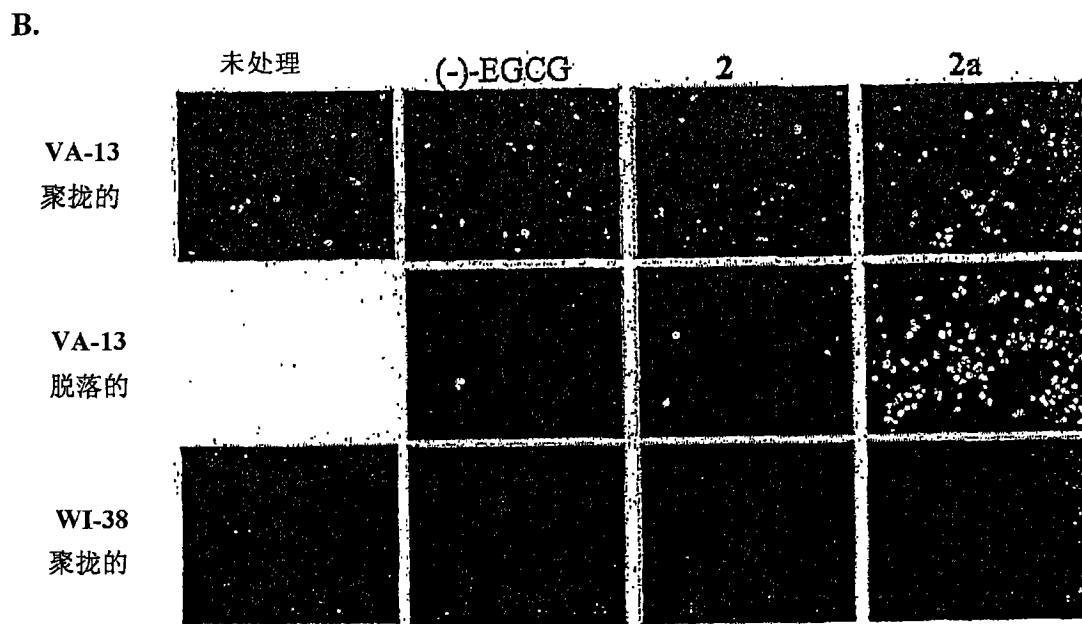


图 12b

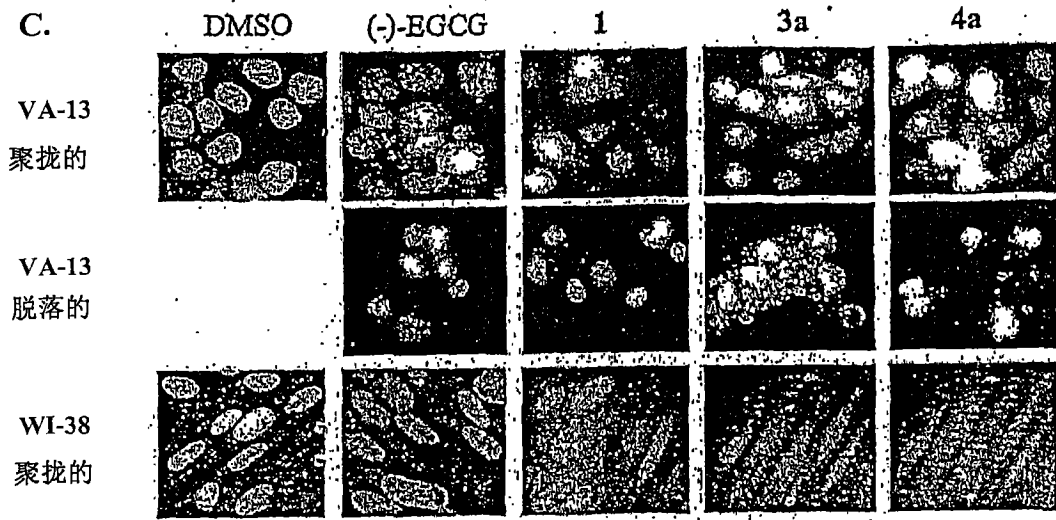


图 12c

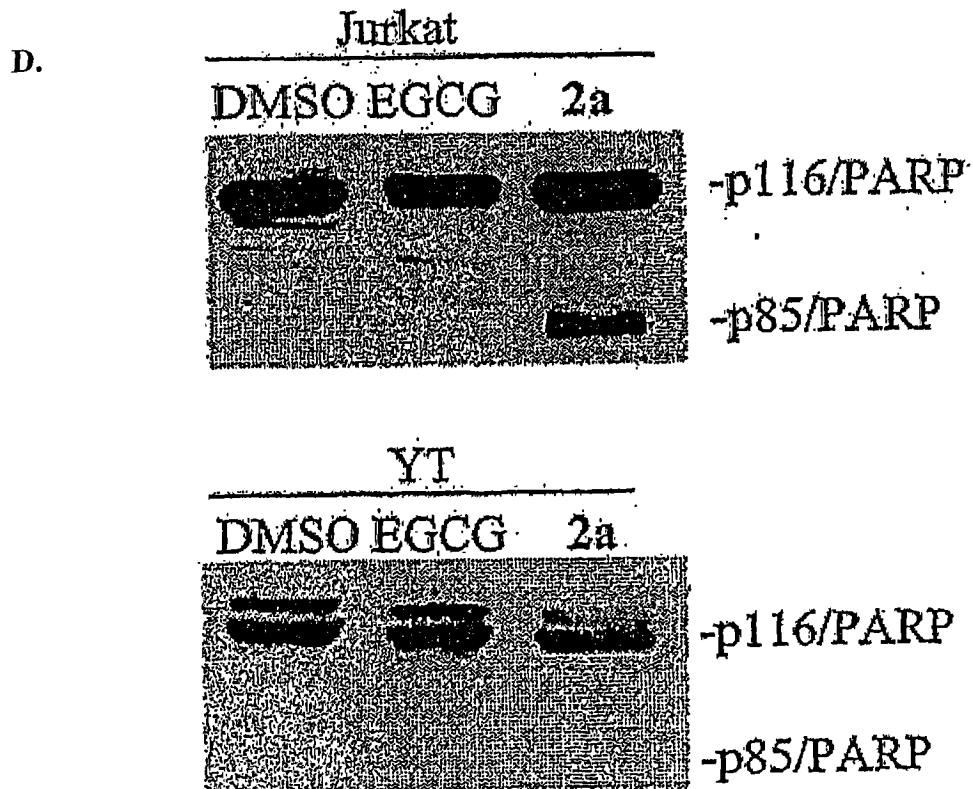


图 12d

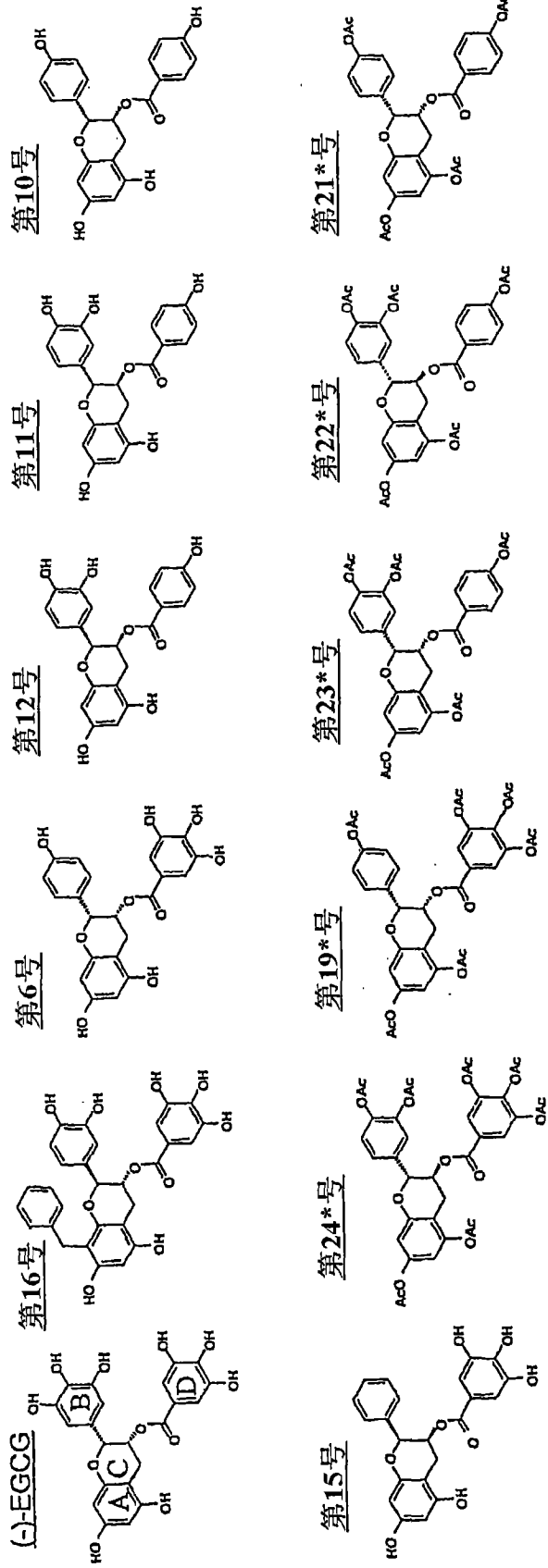


图13

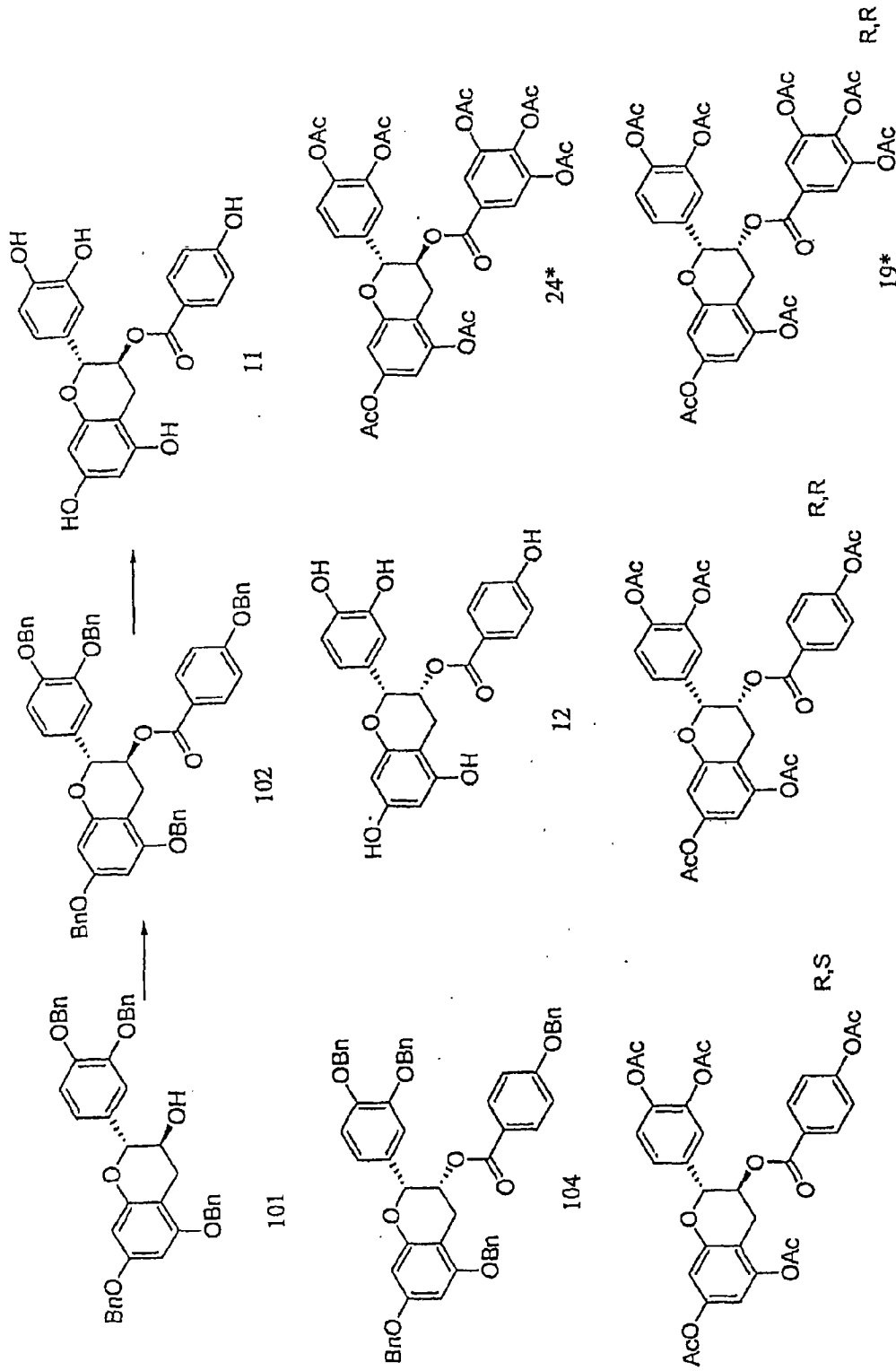


图13a

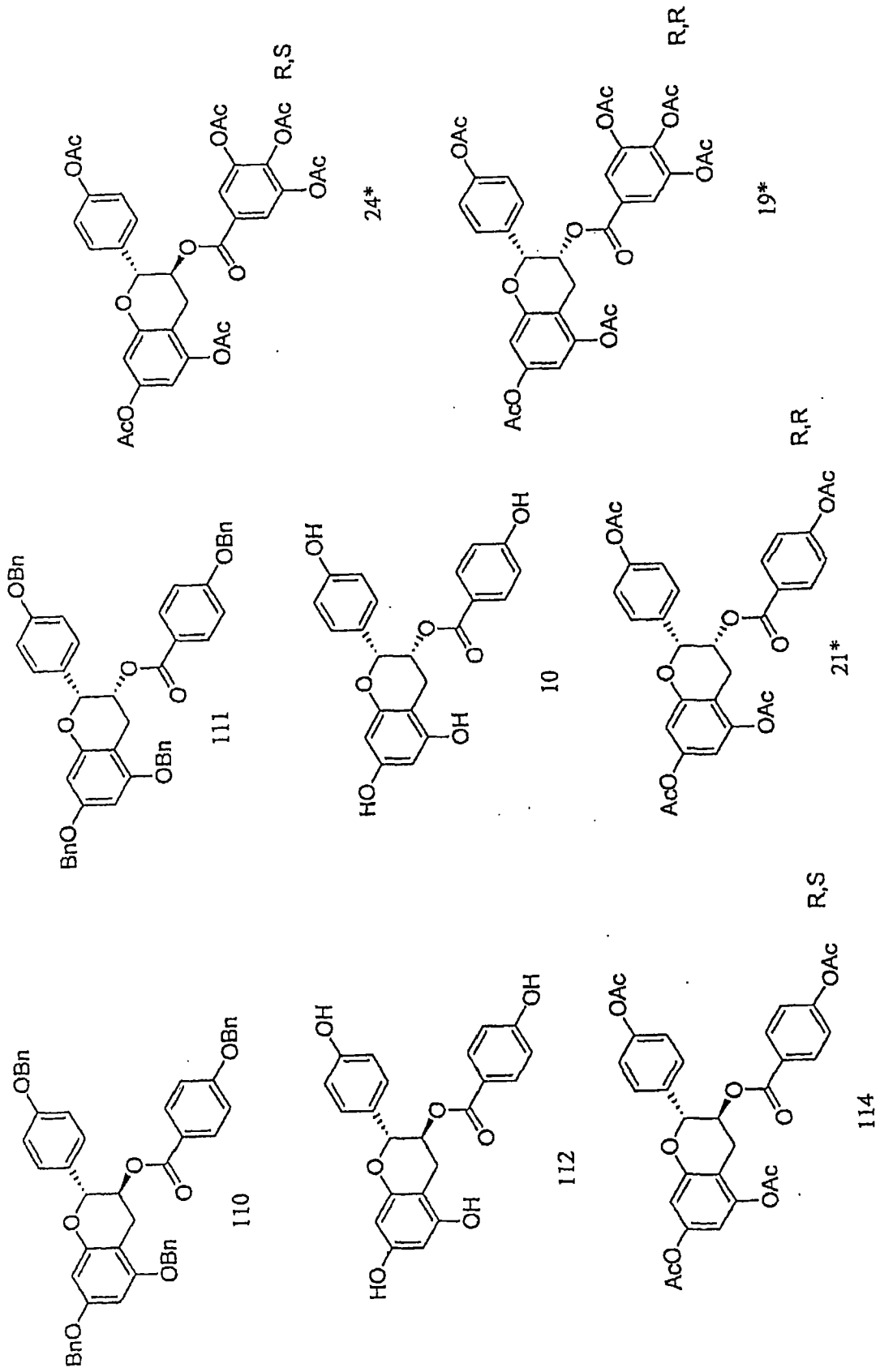


图13b

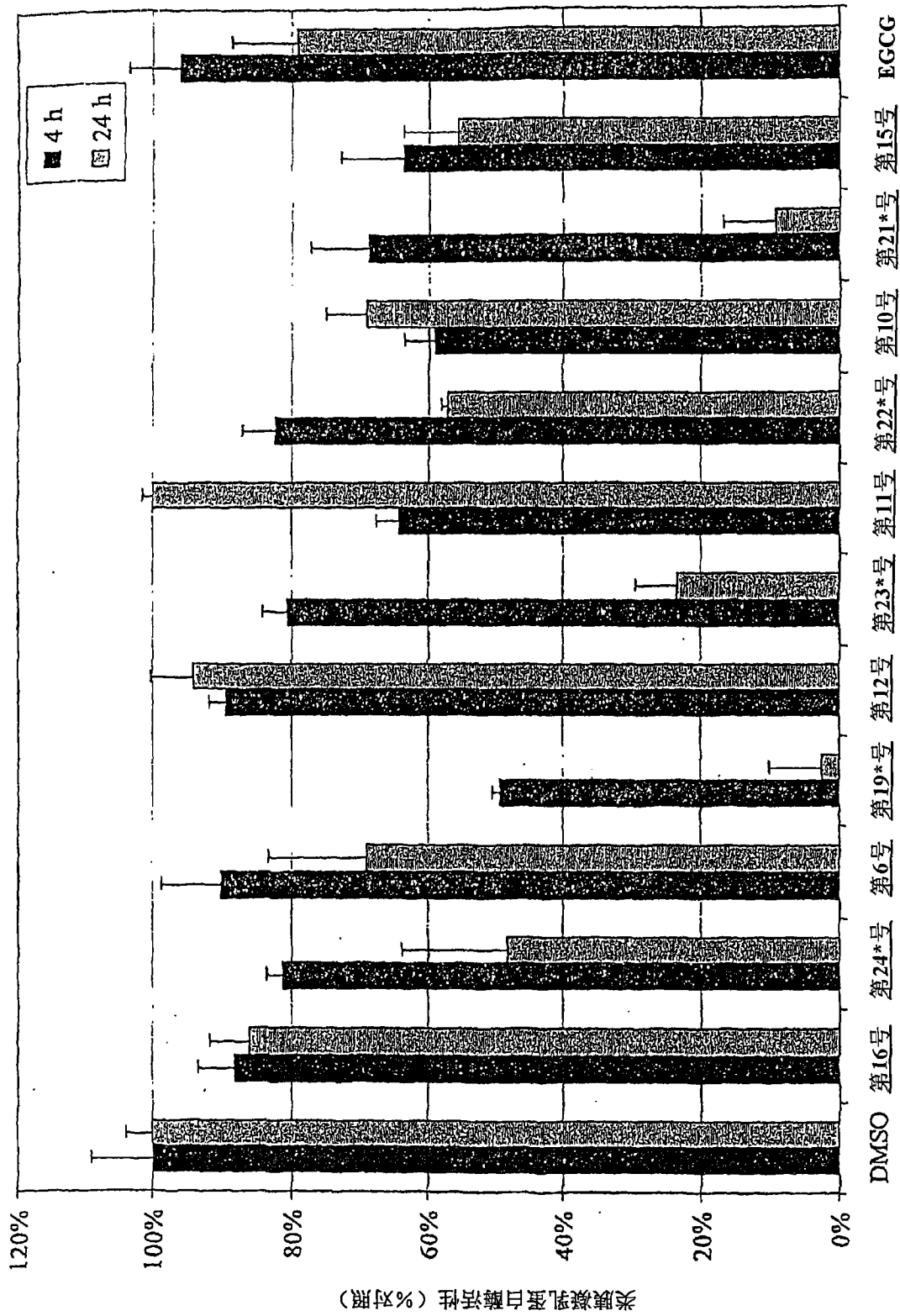


图14

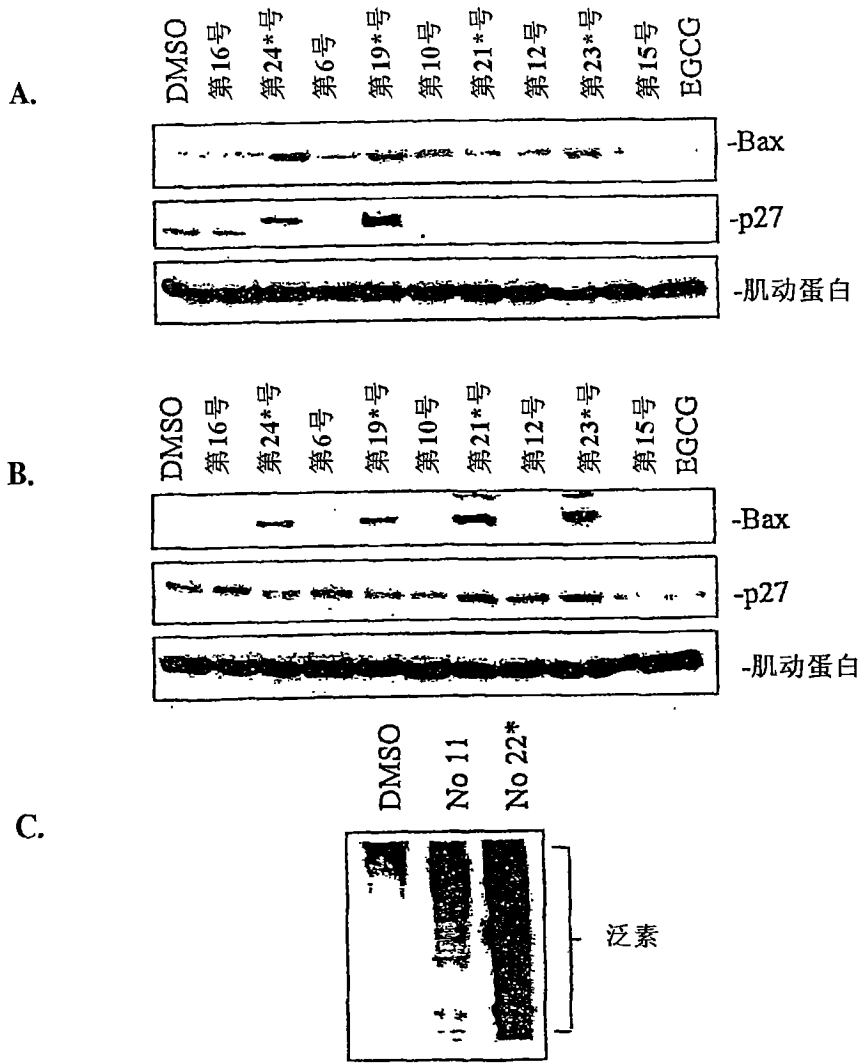


图 15

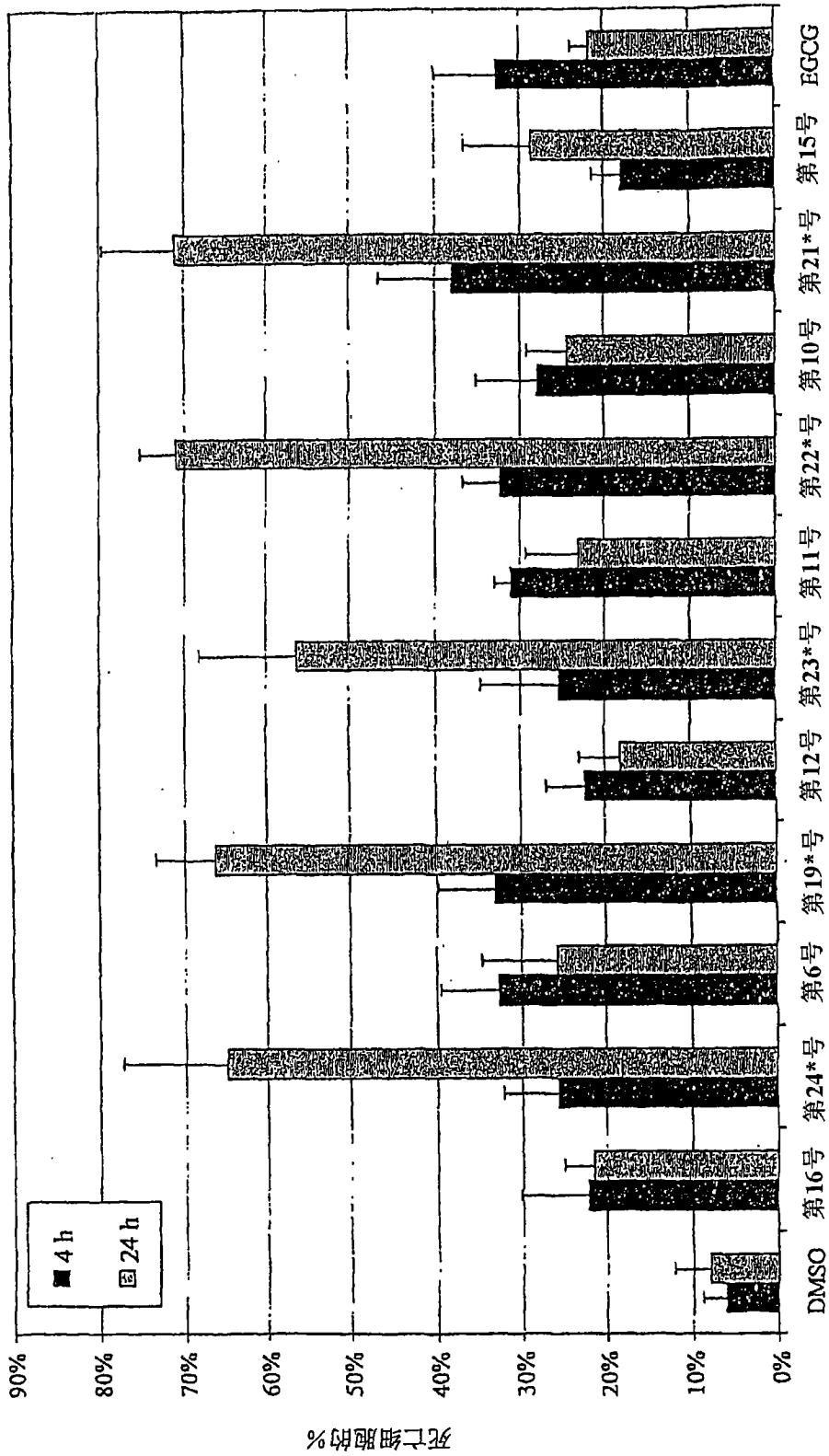


图16

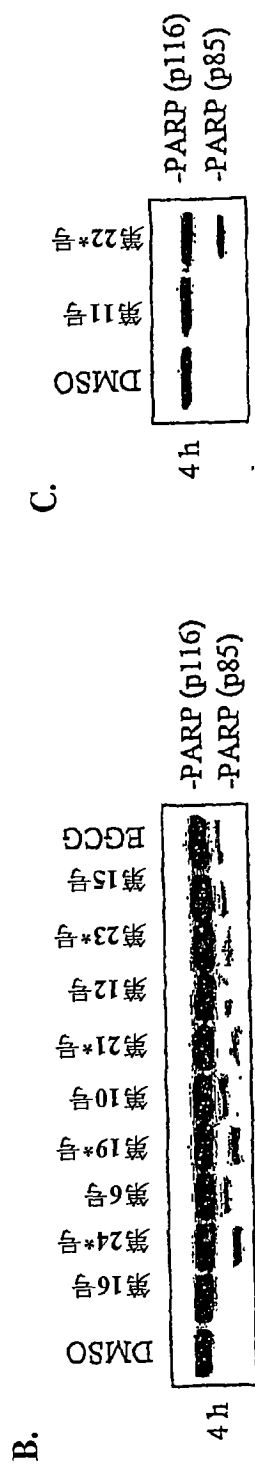
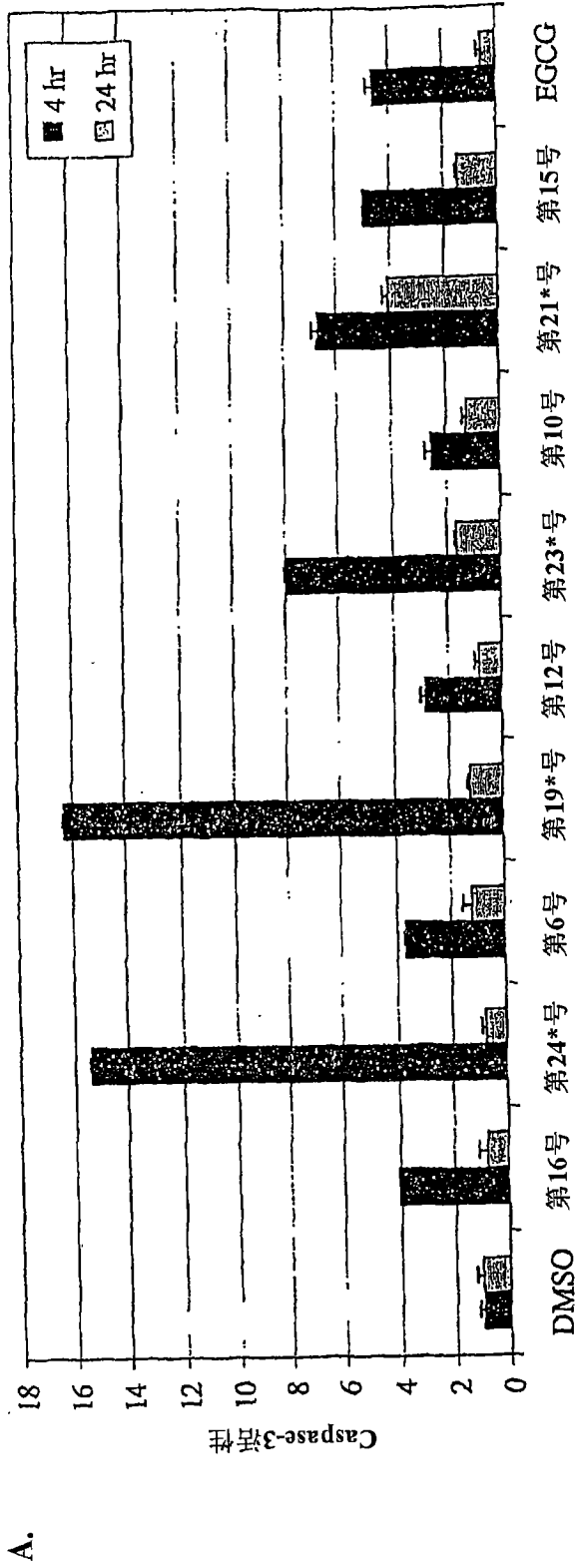


图17

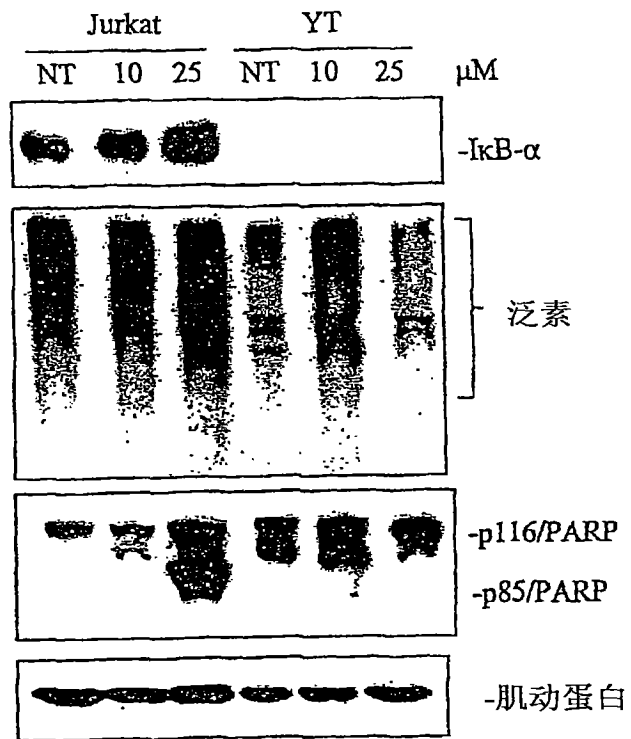


图18