

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101454305 B

(45) 授权公告日 2012.08.29

(21) 申请号 200780018290.0

A61K 31/352(2006.01)

(22) 申请日 2007.05.09

A61K 31/365(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(30) 优先权数据

60/801,390 2006.05.19 US

60/872,989 2006.12.06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.11.19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2007/051730 2007.05.09

(87) PCT申请的公布数据

W02007/135592 EN 2007.11.29

(73) 专利权人 香港理工大学

地址 香港九龙红磡

专利权人 麦吉尔大学

(72) 发明人 陈德恒 周铭祥

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 黄健

(51) Int. Cl.

C07D 311/30(2006.01)

C07D 311/32(2006.01)

A61K 31/35(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2005068484 A1, 2005.07.28,

Iris L. K. Wong et al..Flavonoid dimers as bivalent modulators for pentamidine and sodium stiboglucanate resistance in leishmania. 《Antimicrobial agents and chemotherapy》.2006, 第51卷(第3期), 930-940.

Kin-Fai Chan et al..Flavonoid dimers as bivalent modulators for P-glycoprotein-based multidrug resistance: synthetic apigenin homodimers linked with defined-length poly(ethylene glycol) spacers increase drug retention and enhance chemosensitivity in resistant cancer cells. 《J. Med. Chem.》.2006, 第49卷(第23期), 6742-6759.

审查员 孙文倩

权利要求书 2 页 说明书 40 页 附图 19 页

(54) 发明名称

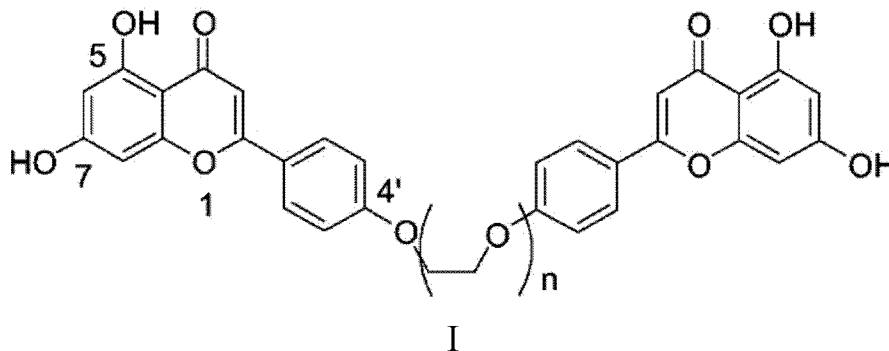
类黄酮二聚物及其制备方法和使用方法

(57) 摘要

多药耐药性 (MDR) 是癌症化学治疗中的主要问题。最好的特征性耐药机制是由将各种抗癌药物泵出细胞、导致细胞内药物累积量降低的药物流出转运体——渗透性糖蛋白 (P-gp) 的过度表达所介导的机制。本发明开发了一系列通过各种长度的连接基团连接在一起的类黄酮二聚物。发现这些类黄酮二聚物是增加抗癌药物的体外细胞毒性并大大增强它们的细胞内药物累积的有效的 P-gp 调节剂。发现本发明的类黄酮二聚物也可用于在治疗寄生性疾病时降低药物耐受性。

CN 101454305 B

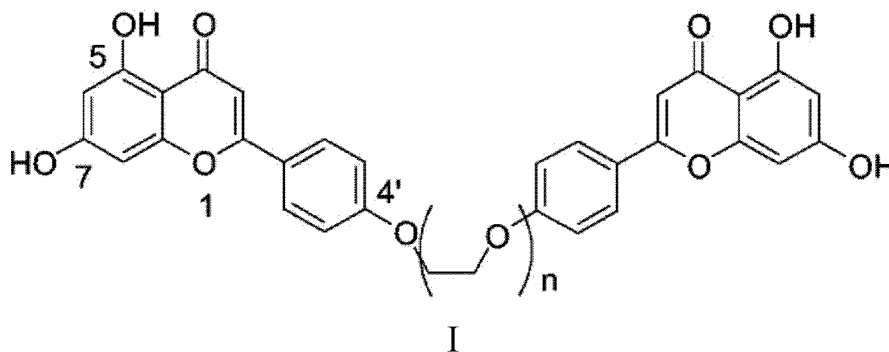
1. 一种式 I 化合物：



其中, $n = 3$ 或 4 。

2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中, $n = 4$ 。

3. 有效量的式 I 化合物在制备用于降低基于 P-糖蛋白的多药耐药性的药剂方面的用途, 所述式 I 化合物是：

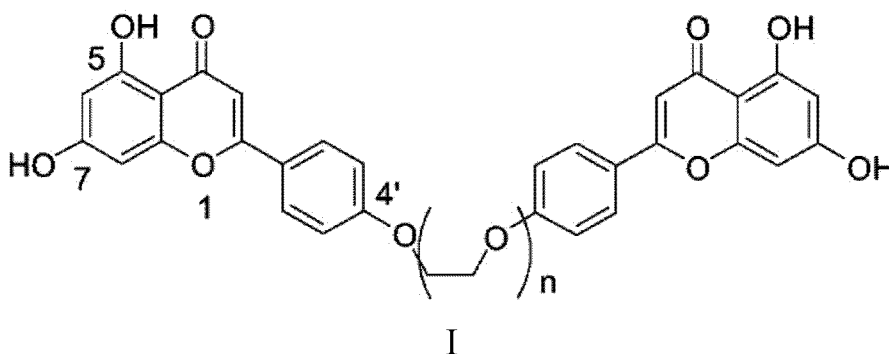


其中, $n = 3$ 或 4 。

4. 如权利要求 3 所述的用途, 其中, $n = 4$ 。

5. 如权利要求 3 所述的用途, 其中, 所述式 I 化合物的浓度为 $5 \mu\text{M} \sim 30 \mu\text{M}$ 。

6. 有效量的式 I 化合物在制备用于降低药物在寄生性疾病中的耐受性的药剂方面的用途, 所述式 I 化合物是：



其中, $n = 3$ 或 4 。

7. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, $n = 4$ 。

8. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述式 I 化合物的浓度为 $4 \mu\text{M} \sim 60 \mu\text{M}$ 。

9. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述寄生性疾病是由利什曼原虫属导致的。

10. 如权利要求 9 所述的用途, 其中, 所述寄生性疾病是由选自杜氏利什曼原虫、亚马逊利什曼原虫、蜥蜴利什曼原虫、热带利什曼原虫、豚鼠利什曼原虫、墨西哥利什曼原虫

和硕大利什曼原虫组成的组中的一种寄生虫引起的。

11. 如权利要求 6 所述的用途,其中,所述药物选自葡萄糖酸锑钠和喷他脒组成的组。

12. 如权利要求 11 所述的用途,其中,所述药物的浓度为 1mg/mL 至 6.4mg/mL。

13. 一种用于降低基于 P-糖蛋白的多药耐药性或用于降低寄生性疾病中的药物耐受性的药剂,所述药剂包含权利要求 1 或 2 所述的化合物。

14. 如权利要求 13 所述的药剂,其中,所述药物用于治疗癌症。

类黄酮二聚物及其制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及降低基于 P-糖蛋白的多药耐药性的化合物及方法,以及这些化合物的合成。

背景技术

[0002] 癌症化学治疗中的药物耐受性

[0003] 多药耐药性 (MDR) 是癌症化学治疗中的主要问题。最好的特征性耐药机制是由将各种抗癌药物泵出细胞、导致细胞内药物累积量降低的药物流出转运体——渗透性糖蛋白 (P-gp) 的过度表达所介导的机制。据信,药物被 P-gp 挤出是由构象改变介导的。抗 P-gp 的逆转剂或调节剂的开发已吸引了学术界和工业界的兴趣。Tsuruo 等 [Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil (Cancer Res 1981, 41, 1967-1972)] 率先报道了维拉帕米 (一种钙通道阻断剂) 可以通过抑制 P-gp 介导的药物流出而逆转耐药性。自那时起,有大量的体外数据表明 P-gp 导致的 MDR 可由某些化合物有效调节,所述化合物包括右维拉帕米²¹、右尼古地平²²、PSC833 (Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin. Eur J Cancer 1991, 27, 1639-1642) 和 VX-710 (BIRICODAR (VX-710; Incel): an effective chemosensitizer in neuroblastoma. Br J Cancer 1999, 80, 1190-1196)。虽然这些所谓的二代 MDR 调节剂显示出一些振奋人心的结果,但它们的使用受制于它们与抗癌药物之间的不可预知的药物代谢动力学相互作用 (MDR expression in normal tissues. Pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors. Hematol Oncol Clin North Am 1995, 9, 319-336)。由构效关系和组合化学途径开发出的第三代 MDR 调节剂包括 zosuquidar LY335979、tariquidar XR9576、laniquidar R101933、吡啶酮甲酰胺 GF120918 和带有取代基的二芳基咪唑 ONT-090, 这些调节剂最近正在进行临床试验评价。

[0004] 因为类黄酮通常具有较低的毒性,所以一类有望作为 MDR 调节剂的化合物是类黄酮。类黄酮是水果和蔬菜中天然存在的化合物,构成人类食物的常见成分。取决于细胞类型和所用的药物,它们对 MDR 也显示不同的效果。据报道,柯因 (1)、槲皮素 (2)、茨非醇 (3) 和脱氢水飞蓟宾 (4) (图 1a) 直接结合至小鼠 P-gp 的 NBD2 胞浆区 (Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 2002, 59, 307-322。)。通过将异戊二烯基或其他烃基引入类黄酮结构而增加的疏水性往往产生更有效的抑制剂。8-异戊二烯柯因或 6-异戊二烯柯因 (5 或 6) (图 1a) 抑制白血病 K562/R7 细胞内的 P-gp 介导的药物流出,而 8-二甲基烯丙基茨非醇 (7) 在抑制 Ltrmdr1 方面是比环孢霉素 A 或维拉帕米更好的调节剂。

[0005] 即便类黄酮具有较低的毒性,当前这一代类黄酮调节剂仍有局限性。首先是它们的活性往往是中等活性。其次,它们具有广谱生物活性,包括抗雌激素和抑制其他 ATP 酶。

将类黄酮作为 MDR 调节剂高剂量施用,很可能导致副作用。

[0006] 在治疗寄生性疾病方面的药物耐受性

[0007] 利什曼病(世界卫生组织(WHO)所针对的六种寄生性疾病之一)是全世界 88 个国家存在的地区性疾病。利什曼病主要出现在北非、亚洲、拉丁美洲和中东。有三亿五千万人口处于传染的危险中,每年有两百万病例报道。这些病例中约有四分之一是内脏利什曼病,这可能是致命的。利什曼病的主要治疗方法是施用五价的锑(Pentostam 和 Glucantime)。二级治疗包括喷他脒和两性霉素 B。这些治疗具有许多副作用,并且它们的疗效因出现对这些抗利什曼原虫药物中的某些药物的临床耐受性而进一步受阻(Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin. Infect. Dis. 1997, 24, 684-703)。据报道在印度超过 50%的内脏利什曼病病例对锑剂有耐受性(Circulating T helper1(Th1) cell-and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1997, 56, 522-5)。WHO 已将五价锑剂在利什曼原虫中的耐药性作为其最优先考虑的因素之一。诸如米替福新(一种十六烷基磷酸胆碱)等较新的治疗剂也显示出巨大的潜力。不过由于在血液中的半衰期较长,以米替福新治疗容易导致药物耐受性。因此需要开发能治疗显示多药耐药性的寄生性疾病的新颖药物。

[0008] 发明目的

[0009] 因此,本发明的目的是开发比类黄酮具有改善的活性和/或选择性的类黄酮衍生物,从而解决现有技术所提出的至少一个或多个以上的问题。最低限度,本发明的目的是向公众提供一种可用的选择。

发明内容

[0010] 因此,本发明提供式 I 化合物:

[0011] 类黄酮-接头-类黄酮

[0012] I

[0013] 其中,

[0014] 所述类黄酮选自查耳酮、黄酮、黄酮醇、黄烷酮、花色苷和异类黄酮组成的组;并且

[0015] 所述接头(Linker)是具有至少一个碳原子的基团。

[0016] 优选的是,所述接头选自亚烷基、具有多个乙二醇单元的基团、具有多个丙二醇单元的基团、具有多个邻亚苯基二氧基、间亚苯基二氧基或对亚苯基二氧基单元的基团或它们的组合组成的组。

[0017] 更优选的是,所述接头是具有多个乙二醇单元的基团,所述基团可具有 1 至 13 个乙二醇单元。有利的是,所述接头具有 2 至 6 个或 2 至 4 个乙二醇单元,更优选的是具有 4 个乙二醇单元。

[0018] 式 I 中的类黄酮可以是黄烷酮,更优选是芹菜素。

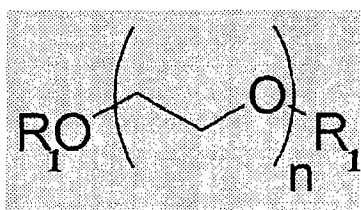
[0019] 本发明的另一方面提供一种合成上述式 I 的化合物的方法,其中

[0020] 所述类黄酮是黄烷酮;并且

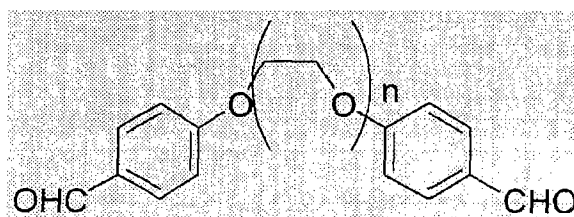
[0021] 所述接头是具有多个乙二醇单元的基团。

[0022] 对羟基苯甲醛首先与式 II 化合物反应以形成式 III 化合物

[0023]



II

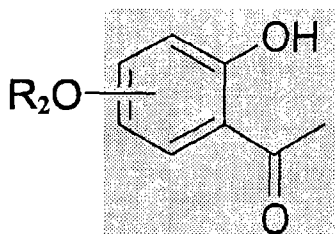


III

[0024] 其中, R_1 选自 -H、- 甲苯磺酰基和 - 甲磺酰基。

[0025] 然后式 III 化合物与式 IV 化合物反应以形成式 I 化合物

[0026]



IV

[0027] 其中 R_2 选自由 -H、苄基和甲氧基甲基组成的组。

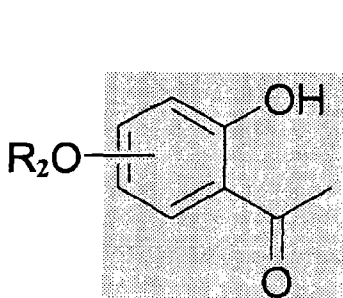
[0028] 本发明还提供合成式 I 化合物的另一种方法, 其中

[0029] 所述类黄酮是黄烷酮; 并且

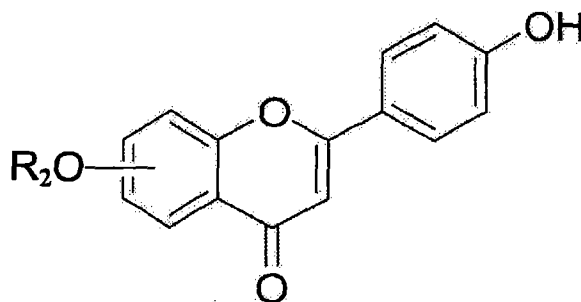
[0030] 所述接头是具有多个乙二醇单元的基团。

[0031] 对羟基苯甲醛首先与式 IV 化合物反应以形成式 V 化合物

[0032]



IV

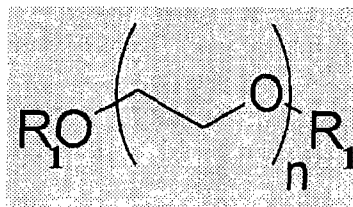


V

[0033] 其中, R_2 选自由 -H、苄基和甲氧基甲基组成的组。

[0034] 然后式 V 化合物与式 II 化合物反应以形成式 I 化合物

[0035]



II

[0036] 其中, R_1 选自 -H、- 甲苯磺酰基和 - 甲磺酰基。

[0037] 本发明的再一个方面提供一种降低基于 P- 糖蛋白的多药耐药性的方法, 所述方法包括施用有效量的式 I 化合物的步骤:

[0038] 类黄酮 - 接头 - 类黄酮

[0039] I

[0040] 其中,

[0041] 所述类黄酮选自由查耳酮、黄酮、黄酮醇、黄烷酮、花色素苷和异类黄酮组成的组; 并且

[0042] 所述接头是具有至少一个碳原子的基团。

[0043] 本发明的另一个方面提供一种降低寄生性疾病中的药物耐受性的方法, 所述方法包括施用有效量的式 I 化合物的步骤, 优选以 $4 \mu\text{M}$ 至 $60 \mu\text{M}$ 的浓度施用:

[0044] 类黄酮 - 接头 - 类黄酮

[0045] I

[0046] 其中,

[0047] 所述类黄酮选自由查耳酮、黄酮、黄酮醇、黄烷酮、花色素苷和异类黄酮组成的组; 并且

[0048] 所述接头是具有至少一个碳原子的基团。

[0049] 优选的是, 所述寄生性疾病是由利什曼原虫类引起的。更优选的是, 所述寄生性疾病是由选自由杜氏利什曼原虫 (*L. donovani*)、亚马逊利什曼原虫 (*L. amazonensis*)、tarentolae 利什曼原虫 (*L. tarentolae*)、热带利什曼原虫 (*L. tropica*)、豚鼠利什曼原虫 (*L. enriettii*)、墨西哥利什曼原虫 (*L. mexicana*) 和硕大利什曼原虫 (*L. major*) 组成的一种寄生虫引起。

[0050] 有利的是, 所述药物选自由葡萄糖酸锑钠和喷他脒组成的组, 所述药物的浓度优选为 1mg/mL 至 6.4mg/mL 。

[0051] 本发明的另一个方面提供一种药剂, 所述药剂包含上述类黄酮二聚物中的任何一种类黄酮二聚物, 所述药剂用于降低基于 P- 糖蛋白的多药耐药性或用于降低癌症或寄生性疾病中的药物耐受性。

附图说明

[0052] 现在将通过实施例并参考附图解释本发明的优选实施方式, 在附图中:

[0053] 图 1 显示已知类黄酮的结构 (图 1a) 和本发明的二聚类黄酮的结构 (图 1b); 和

[0054] 图 2 显示通过两种路线合成芹菜素二聚物的反合成分析;

[0055] 图 3 显示芹菜素单体和二聚物在 MDA435LCC6MDR 细胞中对紫杉醇细胞毒性的作用;

[0056] 图 4 显示芹菜素单体和二聚物在 MDA435LCC6MDR 细胞中对长春碱细胞毒性的作用；

[0057] 图 5 显示芹菜素单体和二聚物在 MDA435LCC6MDR 细胞中对阿霉素细胞毒性的作用；

[0058] 图 6 显示,在存在抗癌药物 (A) 长春碱、(B) 紫杉醇、(C) 阿霉素、(D) 长春新碱、(E) 柔红霉素和 (F) 米托蒽醌时,在有或没有 $5 \mu\text{M}$ 9d 的情况下 MDA435LCC6MDR 细胞和 MDA435LCC6 细胞的增殖；

[0059] 图 7 显示阿霉素在以 (A) 不同的调节剂和 (B) 不同浓度 (0 至 $20 \mu\text{M}$) 的 9d 处理的 MDA435LCC6MDR 细胞和 MDA435LCC6 细胞中的细胞内累积；

[0060] 图 8A 显示芹菜素单体和二聚物在 P388/ADR 细胞中对阿霉素细胞毒性的作用,图 8B 显示 9d 在 P388/ADR 细胞中对阿霉素细胞毒性的浓度依赖作用,表示为由在不同浓度 (0 至 $10 \mu\text{M}$) 9d 的存在下的 MTS 细胞毒性检测的剂量响应曲线计算出的 IC_{50} 值；

[0061] 图 9A 显示芹菜素单体和二聚物在 P388/ADR 细胞中对柔红霉素细胞毒性的作用,图 9B 显示 9d 在 P388/ADR 细胞中对柔红霉素细胞毒性的浓度依赖作用。结果表示为由在不同浓度 (0 至 $10 \mu\text{M}$) 9d 的存在下的 MTS 细胞毒性检测的剂量响应曲线计算出的 IC_{50} 值；

[0062] 图 10 显示,在存在抗癌药物 (A) 长春碱、(B) 紫杉醇、(C) 阿霉素、(D) 长春新碱、(E) 柔红霉素和 (F) 米托蒽醌时,在有或没有 $5 \mu\text{M}$ 9d 的情况下 P388/ADR 细胞和 P388 细胞的增殖；

[0063] 图 11 显示阿霉素在以 (A) 不同的调节剂和 (B) 不同浓度 (0 至 $20 \mu\text{M}$) 的 9d 处理的 P388/ADR 细胞和 P388 细胞中的细胞内累积；

[0064] 图 12 显示 9d 对 P-gp ATP 酶活性的作用；

[0065] 图 13 显示下述利什曼原虫的药物耐受性:(A) 喷他脒耐受型豚鼠利什曼原虫 (LePentR50) 和 (B) 葡萄糖酸锑钠 (SSG) 耐受型杜氏利什曼原虫 (Ld39 和 Ld2001)；

[0066] 图 14 显示具有不同长度的乙二醇单元 (1 至 13 个单元) 的本发明的类黄酮二聚物对喷他脒耐受型豚鼠利什曼原虫 LePentR50 (A) 的耐受性、SSG 耐受型杜氏利什曼原虫 Ld39 和 Ld2001 (B 和 C) 和野生型杜氏利什曼原虫 LdAG83 (D) 的 SSG 耐受性的调节活性；

[0067] 图 15 显示类黄酮二聚物 9c 和 9d 对 LePentR50 的喷他脒耐受性的剂量依赖性调节活性；

[0068] 图 16 显示类黄酮二聚物 9d 对 LePentR50 的喷他脒累积的作用；

[0069] 图 17 显示 9c (A) 和 9d (B) 对 Ld39 的 SSG 耐受性、9d 对 LdAG83 (C) 的 SSG 耐受性的剂量依赖调节活性和 9d 对 LdAG83 和 Ld2001 中的总锑累积的作用 (D)；和

[0070] 图 18 显示 9c 和 9d 与其他 MDR 调节剂对 LePentR50 的喷他脒耐受性 (A) 和对 Ld39 的 SSG 耐受性 (B) 的调节活性的比较。

具体实施方式

[0071] 在下面的段落中通过举例的方式并参考附图来描述本发明。

[0072] 本发明的目的、特征和方案将在下面的说明中公开,或者通过下面的说明而显而易见。本领域技术人员应当理解本申请中的讨论仅是示例性实施方式的说明,其意图并不在于限制本发明的范围更宽的方案,范围更宽的方案包含在示例性的解释中。

[0073] 改善本发明的类黄酮的效力和选择性的方法是通过采用多价相互作用来利用 P-gp 的假二聚性质 (pseudodimeric nature) 和多个结合点。生物体系的多价相互作用的特征在于多个配体同时结合在一个生物实体上。“多价性”是指单个分子具有一个或多个能同时结合在一个生物实体上的“配体”。在合适的条件下,由于二次结合事件的熵更加有利,所以多价相互作用通常比相应的单价相互作用更强。该方法的目的在于将类黄酮作为相对安全的 P-gp 逆转剂的优势和在增加单体亲合力方面的多价性能力的优势结合起来。

[0074] 本发明广义而言,合成了式 I 化合物:

[0075] 类黄酮-接头-类黄酮

[0076] I

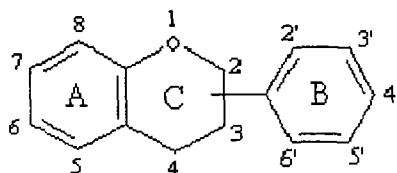
[0077] 其中,

[0078] 所述类黄酮选自由查耳酮、黄酮、黄酮醇、黄烷酮、花色苷和异类黄酮组成的组;并且

[0079] 所述接头是具有至少一个碳原子的基团。

[0080] 术语“类黄酮”是指基于 C15 骨架的化合物,该 C15 骨架具有在 2 位、3 位或 4 位上带第二个芳环 B 的 CHROMANE 环(苯并二氢吡喃环)。

[0081]

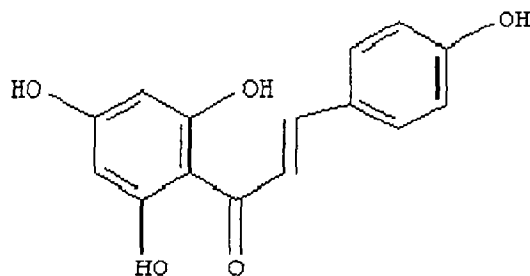


[0082] 类黄酮的各种亚群是根据 C 环的取代模式分类的。在分类中,杂环的氧化状态和环 B 的位置都很重要。

[0083] 6 个主要的亚群的实例是:

[0084] 1. 查耳酮

[0085]

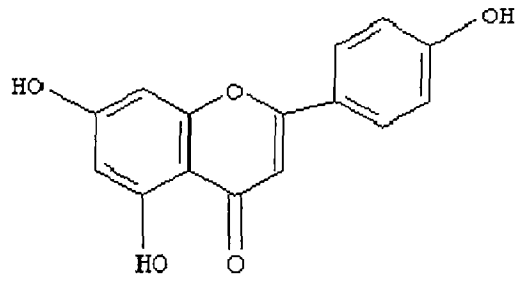


[0086] 2. 黄酮(通常在草本植物族中,例如,唇形科、伞形科、菊科)。

[0087] 芹菜素(芹菜、西芹)。

[0088] 藤黄菌素(问荆)

[0089]



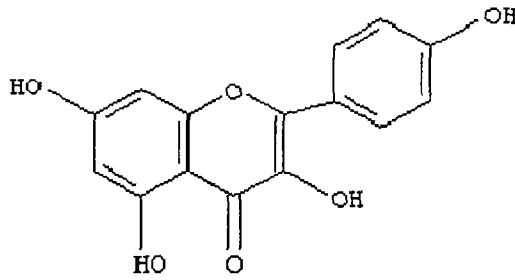
[0090] 3. 黄酮醇（通常在木本被子植物中）

[0091] 栎醇（芸香、荞麦、西洋接骨木）

[0092] 茨非醇（西洋接骨木、肉桂、问荆、野芝麻、拳参）。

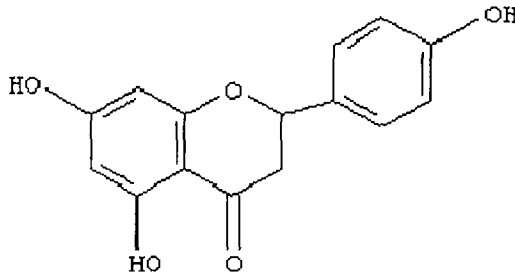
[0093] 杨梅黄酮。

[0094]



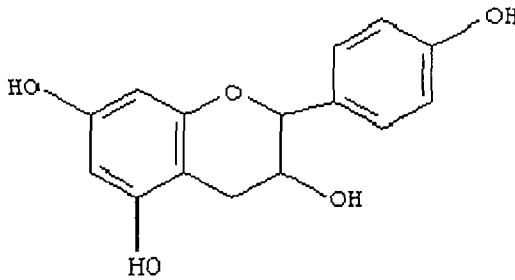
[0095] 4. 黄烷酮

[0096]



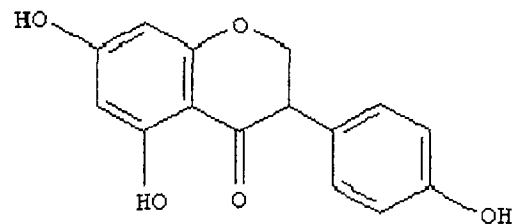
[0097] 5. 花色苷

[0098]



[0099] 6. 异类黄酮

[0100]



[0101] 所有上述化合物均能用作本发明全文的“类黄酮”。类黄酮的苯环或 6 元环上的 -H 或 -OH 的各种取代都是可能的。例如, -H 或 -OH 可以被下述基团取代:

[0102] 卤素:氟、氯、溴和碘;

[0103] $C_1 \sim C_{10}$ 烷基:具有 1 至 10 个碳原子的直链或支化烷基,例如甲基、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;

[0104] $C_1 \sim C_{10}$ 卤代烷基:具有 1 至 10 个碳原子的直链或支化烷基,这些基团中的某些氢原子或全部氢原子可能被如上所述的卤原子所替换,例如,诸如氯代甲基、二氯甲基、三氯甲基、氟代甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯代氟甲基、二氯氟甲基、氯代二氟甲基、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、2,2,2-三氟乙基和五氟乙基等 $C_1 \sim C_{10}$ 卤代烷基;

[0105] $C_1 \sim C_{10}$ 烷氧基:通过氧原子 (-O-) 连接在骨架上的如上所述的具有 1 至 10 个碳原子的直链或支化烷基,例如,诸如甲氧基、乙氧基、丙氧基、1-甲基乙氧基、丁氧基、1-甲基丙氧基、2-甲基丙氧基、1,1-二甲基乙氧基等 $C_1 \sim C_{10}$ 烷氧基;

[0106] $C_2 \sim C_{10}$ 卤代烷氧基:具有 2 至 10 个碳原子的直链烷基,这些基团中的某些氢原子或全部氢原子可能被如上所述的卤原子所替代,这些基团通过氧原子连接在骨架上,例如,2-氟乙氧基、2,2-二氟乙氧基、2,2,2-三氟乙氧基、2-氯-2-氟乙氧基、2-氯-2,2-二氟乙氧基、2,2-二氯-2-氟乙氧基和 2,2,2-三氯乙氧基。

[0107] 术语“部分或完全卤代”是表示在以此为特征的基团中,氢原子可以部分或完全地被相同或不同的如上所述的卤原子所替代。

[0108] 类黄酮的苯环或 6 元环上的氢原子或 -OH 基团可以部分或完全地被氨基(其带有上述的具有不同取代基的烷基或芳基)、硝基、硫醚基团、亚砷基或砷基所替代。

[0109] 此外,如果需要,可以用合适的酯基团保护类黄酮的苯环或 6 元环上的 -OH 基团,例如,所述 -OH 基团上的 H 可以被具有结构 $-(CO)-R$ 的 $C_1 \sim C_6$ 酰基所替代,其中 R 是 H 或具有 1 至 5 个碳原子的直链或支化的烷基,例如甲基、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 可以部分或完全卤代。术语“部分或完全卤代”是表示在以此为特征的基团中,氢原子可以部分或完全地被相同或不同的卤原子所替代,例如氯代甲基、二氯甲基、三氯甲基、氟代甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯代氟甲基、二氯氟甲基、氯代二氟甲基、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、2,2,2-三氟乙基和五氟乙基。

[0110] 各种接头基团(Linker Group)都可用于本发明中。显然所述接头必须具有两个末端,每个末端连接所述类黄酮中的一个。接头应当具有至少一个碳原子,包括亚烷基 $(-CH_2-)_n$;具有通式 $-O[-(-CH_2-)_m-(O)]_n-$ 的基团,例如具有多个乙二醇单元 $-O-(CH_2-CH_2-O)_n-$ 的基团,具有多个丙二醇单元 $-O-(CH_2-CH_2-CH_2-O)_n-$ 的基团;具有邻苯二氧基、间苯二氧基或对苯二氧基单元的基团;或这些基团的组合或可通过化学键将多个类黄酮连接在一起的其他基团。这些基团各自又可以是“部分或完全卤代”的。后面将显示接头基团可具有各种长度,即,“m”和/或“n”可以是大于或等于 1 的任何整数。

[0111] 应当注意,式 I 中的两个类黄酮可以是不同的。例如,一个可以是黄酮,而另一个可以是黄烷酮,并且各种其他组合也是可以的。

[0112] 此外,连接部位可以在类黄酮的各种位置。这是化合物合成中的设计选择问题,将由本领域技术人员确定。

[0113] 令人惊讶的是,发现本发明的类黄酮二聚物是高度有效的体外化学增敏剂。其中的一些化合物能够增加药物在药物耐受性细胞而不是药物敏感性细胞中的累积,并能够在体外将抗癌药物(紫杉醇、阿霉素、柔红霉素、长春新碱和长春碱)在药物耐受性乳腺癌细胞和白血病细胞中的细胞毒性增强 5 倍~ 50 倍。

[0114] 合成了整体结构如 9 所示的一系列类黄酮二聚物(图 1),其具有各种长度的聚乙二醇(PEG)链,其中所述类黄酮是芹菜素(8)。选择芹菜素(8)作为母体单配体是因为据报道芹菜素是克隆 HCT-15 癌细胞中的 MDR 的调节剂。选择 C' 4 位作为接头的附着位点是因为已证实在该位置取代对分子的活性几乎没有作用。研究了以 1 个至 13 个乙二醇单元连接的一系列芹菜素二聚物在增强不同的 MDR 癌细胞的敏感性方面的效力。将它们的活性与芹菜素自身以及单体 10a 和 10b 进行比较。我们还评价了它们逆转 P-gp 介导的药物流出的能力。

[0115] 聚乙二醇连接的芹菜素二聚物的合成

[0116] 化学

[0117] 如图 2 所示,有两条合成路线可开发用以实现聚乙二醇(PEG)连接的类黄酮 9 的合成。第一种方法(路线 A)包括采用一系列 PEG 连接的二醛 11,所述二醛是根据“Synthesis of a ditopic cyclophane based on the cyclobutanering by chalcone photocycloaddition. Tetrahedron 2003, 59, 3455-3459”由醛 15 和相应的乙二醇二甲苯磺酸酯 13a 或乙二醇二甲磺酸酯 13b 合成的。然后二醛 11 与三羟基苯乙酮 14 发生醇醛缩合,然后将二查耳酮氧化成环为黄酮,得到 9。另一条路线(路线 B)包括合成选择性保护的类黄酮 12,然后使类黄酮 12 与活化的 PEG 链 13a 或 13b 偶合。类黄酮 12 也可以由三羟基苯乙酮 14 和苯甲醛 15 获得。

[0118] 直至 n 等于 6 的 PEG 链 13 可商购获得。n 大于 6 的 PEG 不易商购获得,因此需要进行合成。n 大于 6 的 PEG 可通过“An expedient synthesis of monodispersed oligo(ethylene glycols). Synthesis 2004, 7, 1007-1010”中所述的方法获得。乙二醇二甲苯磺酸酯 13a(用于 n = 2, 3)和乙二醇二甲磺酸酯 13b(用于 n = 1, 4~9)根据“Synthesis of orthogonal end functionalized oligoethylene glycols of defined lengths. Tetrahedron Lett. 2004, 45, 4285-4288”中所述的方法在冰浴温度由相应的 PEG 链 13、甲苯磺酰氯或甲磺酰氯和三乙胺在二氯甲烷中制备。化合物三羟基苯乙酮 14 和苯甲醛 15 均商购获得。经保护的 2-羟基苯乙酮 14a(Synthesis of a 3,4,5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epigallocatechin-3-gallate(EGCG): A potential route to the natural product green tea catechin, EGCG. Org. Lett. 2001, 3, 843-846)和 14b(An effective synthesis of isoorientin: the regioselective synthesis of a 6-C-glucosylflavone. Carbohydrate Research 2000, 329, 507-513)可根据相应的文献中所述的方法制备。在尝试其他目标化合物的合成之前,选择类黄酮 9a(n = 1)作为模型研究以探知最佳合成条件。

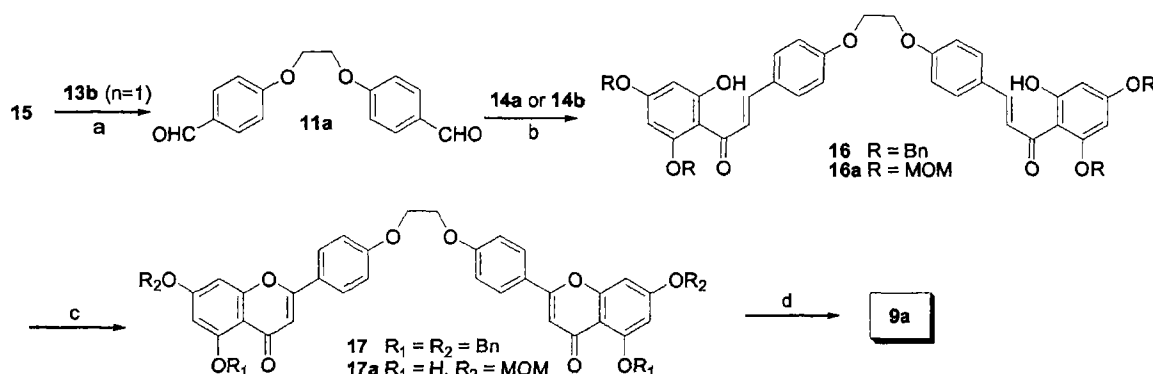
[0119] 经由路线 A 合成 9a(n = 1)

[0120] 根据路线 A 进行 9a 的合成。结果总结于反应式 1 中。对羟基苯甲醛(15)在碳酸钾的存在下在 50% 的乙腈(ACN)水溶液中于回流温度与乙二醇二甲磺酸酯(13b)偶合,从

而以高产率获得二醛 11a。然后在碱性介质下由二醛 11a 与二苄基保护的苯乙酮 14a 的醇醛缩合制备二查耳酮 16。合成二查耳酮 16 的最初尝试因转化率较低、反应速度较慢以及产物的分离难以解决而不成功。我们将这种困难归因于所述醛在反应介质中较低的溶解性。大量的试验后,发现通过将二醛 11a 溶解在 THF 中并将其添加至苯乙酮 14a 在 60% 的 KOH 水溶液中的溶液内,可获得几乎定量的向所需的二查耳酮的转化。二查耳酮 16 具有特征性的金黄色。烯基质子较大的偶合常数 ($J = 16\text{Hz}$) 表明碳-碳双键是反式。二查耳酮 16 转化为二类黄酮 17 的成环可采用催化量的碘在二甲基亚砜 (DMSO) 中在加热条件下经由成环-消除路线以一锅法平稳进行。应当注意,大于催化量的碘的存在导致苄基的断裂以及苯环的碘代。当将大于 100mg 的起始二查耳酮用在所述反应中时,获得最佳结果。用于脱除 17 中的苄基保护基的方法是氢转移氢解和在氢气氛围下采用催化量的活性炭载 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ 或 Pd/C 。不过这些方法都不成功,总是仅回收到起始原料。对反应条件做了各种变化后,最终通过采用大量的 10% Pd/C 在 THF/水混合物中以非常低的产率获得了类黄酮 9a。因而,采用苄基作为保护剂似乎是有问题的,总产率较低。因此,选择甲氧基甲基 (MOM) 来代替苄基,并由二醛 11a 重复整个合成路线 (反应式 1)。

[0121] 采用 3M 的 KOH-EtOH 溶液通过二醛 11a 与二 MOM-保护的苯乙酮 14b 的醇醛缩合以高产率获得了二查耳酮 16a。采用催化量的碘在 DMSO 中进行二查耳酮 16a 转化为黄酮的成环以失败告终。另一方面,在加热条件下进行 2,3-二氯-5,6-二氧基-1,4-苯醌 (DDQ) 介导的氧化成环,可获得去除了一个 MOM 基团的 17a。经过冗长的反应混合物的色谱纯化,以较低的产率获得 17a。17a 向类黄酮 9a 的转化通过 MOM 基团的酸性介质脱保护而实现。这些结果表明由于 MOM 基团可在温和的条件下容易地去除,因此采用 MOM 基团用于保护优于采用苄基。不过,15 到 9a 的总转化产率仍较低。需要对整个合成方案进行再优化。

[0122]



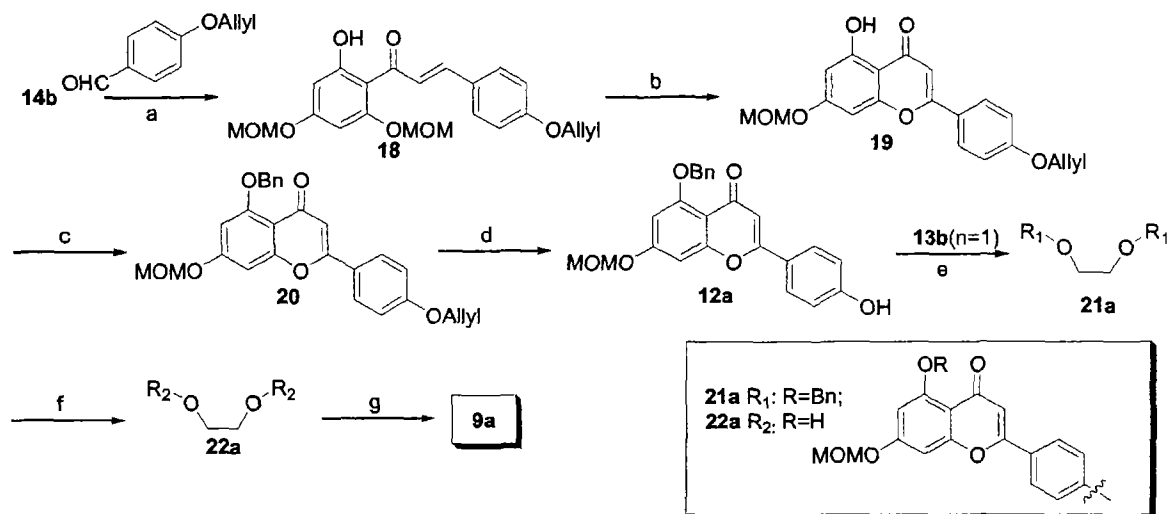
[0123] 反应式 1. (a) K_2CO_3 , ACN/ H_2O , 回流, 14h; (b) 对于 16, 14a, 60% KOH, 室温, 14h; 对于 16a, 14b, 3M KOH 的 EtOH (乙醇) 溶液, 室温, 14h; (c) 对于 17, 催化剂 I_2 , DMSO, 回流, 14h; 对于 17a, DDQ, PhMe (甲苯)/二噁烷, 回流, 14h; (d) 由 17, H_2 , Pd/C , THF/ H_2O , 室温, 14h; 由 17a, 80% AcOH (乙酸), 回流, 14h。

[0124] 经由路线 B 合成 9a ($n = 1$)

[0125] 然后根据路线 B 研究 9a 的合成。结果总结于反应式 2 中。苯乙酮 14b 在碱性条件下与对烯丙氧基苯甲醛缩合,以高产率获得查耳酮 18。进行 DDQ 介导的 18 的氧化成环从而得到有一个 MOM 基团被去除的 19。采用碳酸钾在 DMF 中以苄基溴保护 19 中的羟基,以良好产率得到 20。采用催化量的 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 和碳酸钾在甲醇中去除 20 的烯丙基保护基,以高

产率得到 12a。在碱性条件下二甲磺酸酯 13b (n = 1) 被 12a 的对苯氧基部分分子间亲核取代, 得到 21a。21a 的二聚性质由高分辨率质谱可明显看出。钯催化的苄基脱保护和随后的 MOM 基团的酸性脱保护后, 以高产率获得类黄酮 9a。

[0126]



[0127] 反应式 2. (a) 3M KOH-EtOH, 室温, 16h ; (b) DDQ, PhMe/ 二噁烷, 回流, 7h ; (c) K_2CO_3 , BnBr, DMF, 回流, 2h ; (d) 催化剂 $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , MeOH, 回流, 2h ; (e) K_2CO_3 , DMF, 回流, 2h ; (f) H_2 , Pd/C, $CHCl_3$, 室温, 12h ; (g) 80% AcOH, 回流, 14h。

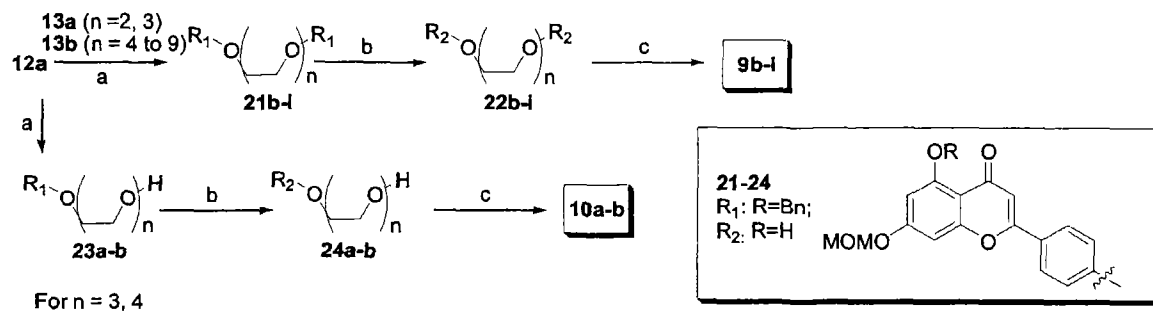
[0128] 经由路线 B 合成黄酮二聚物 9b 至 9i

[0129] 建立了经由路线 B 合成 9a 的最佳条件后, 以相同的方式合成了具有不同 PEG 链的其他类黄酮二聚物。结果总结于反应式 3 中。对于较短的链 (n = 2 和 3), 采用 PEG 二甲磺酸酯 (13a), 而对于较长的链 (n = 4 ~ 9) 则采用 PEG 二甲磺酸酯 (13b)。在所有的情况中, 均以合理的总产率制备了类黄酮二聚物 9a 至 9i, 总产率范围基于 12a 为 30% ~ 50%。一般而言, 具有较长的 PEG 链 (n = 5 以上) 的类黄酮二聚物作为油状物获得。对于具有较短的 PEG 链长度 (n = 4 以下) 的类黄酮二聚物, 它们作为固体获得, 熔点由 352°C (n = 1) 降至 131°C (n = 4)。

[0130] 单价类黄酮 10a 和 10b 的合成

[0131] 在随后的生物研究中, 显然需要一元黄酮 10 用于对照实验。幸运的是, 在以二甲磺酸酯 13a (n = 3) 或二甲磺酸酯 13b (n = 4) 偶合 12a 的过程中, 作为少量副产物获得了单偶合产物 23a (n = 3) 或 23b (n = 4), 推测是因为在反应过程中一个二甲磺酸酯或二甲磺酸酯水解。23a 或 23b 的单体性质由高分辨率质谱可明显看出。随后进行苄基的钯催化脱保护, 接下来进行 MOM 基团的酸性脱保护, 得到一元黄酮 10a 和 10b (反应式 3)。

[0132]

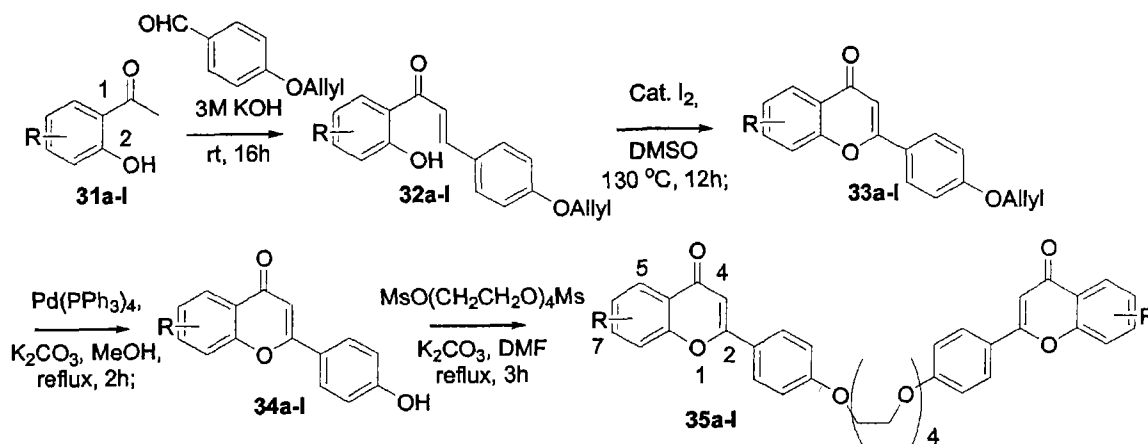


[0133] 反应式 3. (a) K_2CO_3 , DMF, 回流; (b) H_2 , Pd/C, $CHCl_3$, 室温; (c) 对于 $n = 2, 3$; 80% AcOH, 回流; 对于 $n = 4 \sim 9$; 6M HCl, THF, 室温。

[0134] 聚乙二醇连接的芹菜素类似物二聚物的合成

[0135] 采用经由路线 B 开发出的通用方法, 可根据反应式 4 由各种取代的羟基苯乙酮 (31a 至 31i) 开始制备大量的芹菜素类似物二聚物 (35a 至 35i)。也可通过将单体类似物 34a 至 34i 之一与一元芹菜素的甲磺酸酯 24 偶合, 而后进行脱保护以制得非对称的芹菜素二聚物。

[0136]



For compounds 31 to 34:

| | | | |
|---|--------------|---|---------------|
| a | R = H | g | R = 4-Me |
| b | R = 4-F | h | R = 5-Me |
| c | R = 5-F | i | R = 4-MeO |
| d | R = 5-Cl | j | R = 5-MeO |
| e | R = 5-Br | k | R = 6-MeO |
| f | R = 3,5-diCl | l | R = 4,5-diMeO |

For compound 35

| | | | |
|---|--------------|---|---------------|
| a | R = H | g | R = 7-Me |
| b | R = 7-F | h | R = 6-Me |
| c | R = 6-F | i | R = 7-MeO |
| d | R = 6-Cl | j | R = 6-MeO |
| e | R = 6-Br | k | R = 5-MeO |
| f | R = 6,8-diCl | l | R = 6,7-diMeO |

[0137] 反应式 4 (Me : 甲基 ; diMeO : 二甲氧基 ; diCl : 二氯 ; reflux : 回流 ; allyl : 烯丙基 ; rt. : 室温 ; Cat. : 催化剂 ; Ms : 甲磺酰基)

[0138] 本发明中已通过两种合成路线合成了一系列由各种长度的聚乙二醇链连接在一起的基于芹菜素的类黄酮二聚物。发现由于 MOM 基团可在温和的条件下容易地去除, 因此采用 MOM 基团用于保护优于采用苄基基团。这可有效地应用于其他类黄酮化合物的合成中。

[0139] 实验数据

[0140] 概述

[0141] 所有的 NMR 谱图均记录于 Bruker MHz DPX400 光谱仪, 1H 为 400.1MHz, ^{13}C 为 100.62MHz。所有的 NMR 测定均在室温进行, 化学位移均按相对于 $CDCl_3$ 的共振 (分别是: 1H 为 7.26ppm, ^{13}C 模式中的三重峰的中线为 77.0ppm) 的百万分数 (ppm) 作为 δ 的单位进行报告。低分辨率质谱和高分辨率质谱通过电喷雾电离 (ESI) 模式得自 Micromass Q-TOF-2 或者通过电子电离 (EI) 模式得自 Finnigan MAT95ST。采用 Electrothermal IA9100 数字熔点仪测定熔点, 未作校正。所有的试剂和溶剂均为试剂级, 并且如非另外指出, 均未经进一步纯化而使用。薄层色谱 (TLC) 所用的板是 E. MerckSilica Gel160F₂₅₄ (0.25mm 厚), 并在短 (254nm) UV 光下显色。色谱纯化采用 MN 硅胶 60 (230 目至 400 目) 进行。

[0142] 反式-3-(4-烯丙氧基苯基)-1-[2,4-二(甲氧基甲氧基)-6-羟基苯基]丙烯酮(18):将2-羟基-4,6-二(甲氧基甲氧基)苯乙酮14b(4.39g,17.1mmol)、4-烯丙氧基苯甲醛(2.90g,17.9mmol)和KOH溶液(96% EtOH中的3M溶液,30mL)添加至圆底烧瓶中。溶液立即变成褐色,将其在室温搅拌16小时。当TLC显示苯乙酮完全消耗时,将反应混合物倒入含0.5M HCl溶液(180mL)的分液漏斗中。以CH₂Cl₂(40mL×3)提取该混合物。将合并的有机相用MgSO₄干燥,过滤并蒸发以得到粗品棕色油状物,将该油状物在硅胶上(70g)进行快速柱层析(正己烷中20%的EtOAc)以得到黄色固体查耳酮18(6.53g,95%):m. p.:70-71°C;¹H NMR(CDCl₃) δ 3.48(s,3H),3.53(s,3H),4.57(d,J=5.2Hz,2H),5.18(s,2H),5.28(s,2H),5.31(d,J=10.4Hz,1H),5.42(dd,J=1.2,17.2Hz,1H),6.02-6.04(m,1H),6.24(d,J=2.0Hz,1H),6.31(d,J=2.0Hz,1H),6.93(d,J=8.8Hz,2H),7.54(d,J=8.8Hz,2H),7.76(AB中的A,J=15.4Hz,1H),7.83(AB中的B,J=15.4Hz,1H),13.9(s,1H);¹³C NMR(CDCl₃) δ 56.4,56.8,68.8,94.0,94.7,95.1,97.5,107.5,115.1,118.0,125.0,128.3,130.0,132.7,142.6,159.8,160.4,163.2,167.2,192.8;LRMS(ESI)m/z401(M⁺+H,100),423(M⁺+Na,22);HRMS(ESI)C₂₂H₂₅O₇(M⁺+H)的计算值为401.1600,测定值为401.1604。

[0143] 5-羟基-7-甲氧基甲氧基-2-(4'-烯丙氧基苯基)-4H-苯并吡喃-4-酮(19):将查耳酮18(6.53g,16.3mmol)、DDQ(5.56g,24.5mmol)和甲苯中25%的二噁烷的干燥溶剂(100mL)添加至圆底烧瓶中。所述溶液立即变为深褐色,将其在氮气氛围下于回流温度搅拌7小时。当TLC显示查耳酮18完全消耗时,将反应混合物冷却至室温并将溶剂蒸发至干。添加CH₂Cl₂(150mL)后,通过吸滤除去不溶的棕色固体。将深棕色滤液以饱和NaHCO₃洗涤,并用MgSO₄干燥,过滤,蒸发,并在硅胶(130g)上进行快速柱层析(己烷中15%的EtOAc),以得到浅黄色固体化合物19(2.10g,36%):m. p.:100-101°C;¹H NMR(CDCl₃) δ 3.49(s,3H),4.59(d,J=5.2Hz,2H),5.22(s,2H),5.32(d,J=10.8Hz,1H),5.43(d,J=17.2Hz,1H),6.00-6.09(m,1H),6.44(d,J=1.8Hz,1H),6.54(s,1H),6.25(d,J=1.8Hz,1H),6.99(d,J=8.8Hz,2H),7.79(d,J=8.8Hz,2H),12.74(s,1H);¹³C NMR(CDCl₃) δ 56.4,68.9,94.2,94.2,100.0,104.2,106.1,115.1,118.2,123.5,127.9,132.4,157.5,161.6,161.9,162.8,163.9,182.4;LRMS(ESI)m/z355(M⁺+H,36);HRMS(ESI)C₂₀H₁₉O₆(M⁺+H)的计算值为355.1182,测定值为355.1164。

[0144] 5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基-2-(4'-烯丙氧基苯基)-4H-苯并吡喃-4-酮(20):将化合物19(2.24g,6.3mmol)、苄基溴(1.70g,9.9mmol)、K₂CO₃(1.80g,13.0mmol)和DMF(15mL)添加至圆底烧瓶中。将反应混合物在回流温度搅拌2小时。当TLC显示19完全消耗时,将该反应混合物倒入含水(200mL)的分液漏斗中。以CH₂Cl₂(30mL×3)提取该混合物。将合并的有机相用MgSO₄干燥,过滤并蒸发,得到褐色油状物,将该油状物在硅胶(50g)上以梯度洗脱液(己烷中30%的EtOAc→己烷中60%的EtOAc)进行快速柱层析,得到米白色固体化合物20(2.01g,72%):m. p.:120-122°C;¹H NMR(CDCl₃) δ 3.68(s,3H),4.78(d,J=5.2Hz,2H),5.41(s,2H),5.43(s,2H),5.51(d,J=10.8Hz,1H),5.62(d,J=17.2Hz,1H),6.21-6.26(m,1H),6.69(d,J=2.0Hz,1H),6.77(s,1H),6.94(d,J=2.0Hz,1H),7.18(d,J=8.6Hz,2H),7.45(t,J=7.6Hz,1H),7.58(dd,J=7.2,7.6Hz,2H),7.82(d,J=7.2Hz,2H),7.99(d,J=8.6Hz,2H);¹³C NMR(CDCl₃) δ 56.4,68.9,7.07,94.3,96.0,98.7,107.6,110.2,115.0,118.1,123.9,126.6,127.6,128.5,128.7,132.6,136.4,

159. 4, 159. 6, 160. 7, 161. 0, 161. 2, 177. 4 ;LRMS(ESI)m/z445 (M^+H , 100), 467 (M^+Na , 15) ; HRMS(ESI) $C_{27}H_{25}O_6$ (M^+H) 的计算值为 445. 1651, 测定值为 445. 1641。

[0145] 5- 苄氧基 -7- 甲氧基甲氧基 -2-(4' - 羟基苯基) -4H- 苯并吡喃 -4- 酮 (12a) : 将化合物 20 (2. 01g, 4. 5mmol)、催化量的 $Pd(PPh_3)_4$ (0. 1g)、 K_2CO_3 (2. 50g, 18. 1mmol) 和 MeOH (80mL) 添加至圆底烧瓶中。该反应混合物在回流温度搅拌 2 小时。当 TLC 显示 20 完全消耗时, 将该反应化合物倒入含水 (200mL) 的烧杯中。用 1M HCl 溶液将该溶液酸化至 pH4, 形成大量米白色固体, 通过吸滤收集所述固体。将收集的固体溶于 50% EtOAc 的 MeOH 溶液中, 并通过过滤除去不溶的黑色炭。将褐色滤液在减压下蒸发, 慢慢结晶出白色固体化合物 12a (1. 42g, 78%) : m. p. : 202-204°C ; 1H NMR (d_6 -DMSO) δ 3. 59 (s, 3H), 5. 40 (s, 2H), 5. 51 (s, 2H), 6. 77 (s, 1H), 6. 85 (d, $J = 1. 8$ Hz, 1H), 7. 07 (d, $J = 1. 8$ Hz, 1H), 7. 09 (d, $J = 8. 8$ Hz, 2H), 7. 49 (t, $J = 7. 6$ Hz, 1H), 7. 58 (dd, $J = 7. 2, 7. 6$ Hz, 2H), 7. 79 (d, $J = 7. 2$ Hz, 2H), 8. 06 (d, $J = 8. 8$ Hz, 2H), 10. 41 (s, 1H) ; ^{13}C NMR (d_6 -DMSO) δ 56. 5, 70. 3, 94. 4, 96. 2, 99. 1, 106. 6, 109. 6, 116. 3, 121. 7, 127. 3, 127. 9, 128. 3, 128. 7, 137. 3, 159. 2, 159. 4, 160. 7, 161. 0, 161. 2, 176. 1 ; LRMS(ESI)m/z405 (M^+H , 100), 427 (M^+Na , 19) ; HRMS(ESI) $C_{24}H_{21}O_6$ (M^+H) 的计算值为 405. 1338, 测定值为 405. 1336。

[0146] 由 12a 合成类黄酮二聚物 21a 至 21i 的一般步骤: 将化合物 12a (1. 6 当量)、二甲磺酸酯 13b (对于 $n = 1, 4$ to 9) 或二甲苯磺酸酯 13a ($n = 2, 3$) (1 当量)、 K_2CO_3 (8 当量) 和 DMF 添加至圆底烧瓶中。将该反应混合物在回流温度搅拌 2 小时至 3 小时。在加热过程中, 反应混合物逐渐由浅褐色转变为乳白色。当 TLC 显示 12a 完全消耗时, 将该反应混合物倒入含水 (200mL) 的分液漏斗中。以 CH_2Cl_2 (20mL \times 3) 提取该混合物。如果混合物不能分离成两层, 则添加 1M HCl (20mL)。将合并的有机层用 $MgSO_4$ 干燥, 过滤并蒸发, 得到粗品反应混合物。通过如下所述的结晶或快速柱层析进行类黄酮二聚物的纯化。

[0147] 1, 4- 二 [4' - ((5- 苄氧基 -7- 甲氧基甲氧基) -4H- 苯并吡喃 -4- 酮 -2- 基) 苯基] -1, 4- 二氧丁烷 (21a) : 该化合物由 12a (230mg, 0. 57mmol)、乙二醇二甲磺酸酯 (75mg, 0. 34mmol)、 K_2CO_3 (380mg) 和 DMF (8mL) 按照如上所述的合成类黄酮二聚物的一般步骤制备。从 EtOAc 中结晶后, 得到作为白色固体的标题化合物 (150mg, 63%) : m. p. : 173-175 °C ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 3. 50 (s, 6H), 4. 40 (s, 4H), 5. 23 (s, 4H), 5. 25 (s, 4H), 6. 51 (d, $J = 1. 6$ Hz, 2H), 6. 57 (s, 2H), 6. 77 (d, $J = 1. 6$ Hz, 2H), 7. 04 (d, $J = 8. 8$ Hz, 4H), 7. 30 (t, $J = 7. 2$ Hz, 2H), 7. 39 (dd, $J = 7. 2, 7. 6$ Hz, 4H), 7. 63 (d, $J = 7. 6$ Hz, 4H), 7. 83 (d, $J = 8. 8$ Hz, 4H) ; ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 56. 4, 66. 5, 70. 7, 94. 3, 96. 0, 98. 8, 107. 7, 110. 2, 114. 9, 124. 3, 126. 6, 127. 6, 127. 7, 128. 5, 136. 4, 159. 4, 159. 6, 160. 6, 160. 9, 161. 3, 177. 4 ; LRMS(ESI)m/z835 (M^+H , 100), 857 (M^+Na , 68) ; HRMS(ESI) $C_{50}H_{42}O_{12}Na$ (M^+Na) 的计算值为 857. 2574, 测定值为 857. 2571。

[0148] 1, 7- 二 [4' - ((5- 苄氧基 -7- 甲氧基甲氧基) -4H- 苯并吡喃 -4- 酮 -2- 基) 苯基] -1, 4, 7- 三氧庚烷 (21b) : 该化合物由 12a (200mg, 0. 50mmol)、二乙二醇二甲苯磺酸酯 (130mg, 0. 31mmol)、 K_2CO_3 (360mg) 和 DMF (8mL) 按照如上所述的合成类黄酮二聚物的一般步骤制备。从 EtOAc 中结晶后, 得到作为白色固体的标题化合物 (88mg, 40%) : m. p. : 110-111°C ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 3. 48 (s, 6H), 3. 96 (t, $J = 4. 6$ Hz, 4H), 4. 22 (t, $J = 4. 6$ Hz, 4H), 5. 26 (s, 8H), 6. 47 (d, $J = 1. 8$ Hz, 2H), 6. 58 (s, 2H), 6. 73 (d, $J = 1. 8$ Hz, 2H), 6. 99 (d, $J =$

8.6Hz, 4H), 7.30 (t, J = 7.6Hz, 2H), 7.40 (dd, J = 7.2, 7.6Hz, 4H), 7.62 (d, J = 7.2Hz, 4H), 7.78 (d, J = 8.6Hz, 4H); ^{13}C NMR(CDCl₃) δ 56.4, 67.6, 69.8, 70.7, 94.3, 95.9, 98.7, 107.5, 110.1, 114.9, 123.9, 126.6, 127.6, 128.5, 136.4, 159.4, 159.5, 160.7, 161.1, 161.3, 177.4; LRMS (ESI) m/z 879 (M⁺+H, 7); HRMS (ESI) C₅₂H₄₇O₁₃ (M⁺+H) 的计算值为 879.3017, 测定值为 879.3032。

[0149] 1,10-二[4'-(5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10-四氧癸烷 (21c) 和 9-[4'-(5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-3,6,9-三氧壬烷-1-醇 (23a): 这些化合物由 12a (200mg, 0.50mmol)、三乙二醇二甲磺酸酯 (140mg, 0.33mmol)、K₂CO₃ (380mg) 和 DMF (8mL) 按照如上所述的合成类黄酮二聚物的一般步骤制备。从 EtOAc 中结晶后, 得到作为白色固体的化合物 21c (96mg, 42%); m. p.: 78-80 °C; ^1H NMR(CDCl₃) δ 3.48 (s, 6H), 3.77 (s, 4), 3.89 (t, J = 4.8Hz, 4H), 4.17 (t, J = 4.8Hz, 4H), 5.20 (s, 8H), 6.46 (d, J = 1.6Hz, 2H), 6.56 (s, 2H), 6.72 (d, J = 1.6Hz, 2H), 6.97 (d, J = 8.6Hz, 4H), 7.30 (t, J = 7.2Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.2Hz, 4H), 7.62 (d, J = 7.2Hz, 4H), 7.76 (d, J = 8.6Hz, 4H); ^{13}C NMR(CDCl₃) δ 56.4, 67.5, 69.6, 70.6, 70.9, 94.3, 95.9, 98.7, 107.4, 110.1, 114.9, 123.8, 126.6, 127.5, 128.5, 136.4, 159.4, 159.5, 160.7, 161.2, 161.2, 177.3; LRMS (ESI) m/z 923 (M⁺+H, 18), 946 (M⁺+Na, 50); HRMS (ESI) C₅₄H₅₀O₁₄Na (M⁺+Na) 的计算值为 945.3098, 测定值为 945.3103。然后将母液进一步蒸发, 并在硅胶 (20g) 上以梯度洗脱液 (CH₂Cl₂ 中 20% 的丙酮 → CH₂Cl₂ 中 50% 的丙酮) 进行快速柱层析, 得到浅黄色油状物化合物 23a (56mg, 21%); ^1H NMR(CDCl₃) δ 2.64 (br, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.60 (t, J = 4.2Hz, 2H), 3.67-3.73 (m, 6H), 3.86 (t, J = 4.7Hz, 2H), 4.16 (t, J = 4.7Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 6.48 (d, J = 2.0Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.73 (d, J = 2.0Hz, 1H), 6.97 (d, J = 8.8Hz, 2H), 7.28 (t, J = 7.4Hz, 1H), 7.37 (dd, J = 7.4, 7.8Hz, 2H), 7.61 (d, J = 7.8Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.8Hz, 2H); ^{13}C NMR(CDCl₃) δ 56.3, 61.6, 67.4, 69.4, 70.2, 70.6, 70.7, 72.4, 94.2, 95.9, 98.6, 107.4, 110.0, 114.8, 123.8, 126.5, 127.5, 127.5, 128.4, 136.3, 159.3, 159.5, 160.7, 161.1, 161.2, 177.3。

[0150] 1,13-二[4'-(5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷 (21d) 和 12-[4'-(5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-3,6,9,12-四氧十二烷-1-醇 (23b): 这些化合物由 12a (1.33g, 3.3mmol)、四乙二醇二甲磺酸酯 (0.72g, 2.1mmol)、K₂CO₃ (2.27g) 和 DMF (30mL) 按照如上所述的合成类黄酮二聚物的一般步骤制备。在硅胶 (40g) 上快速柱层析 (CH₂Cl₂ 中 2% 的 MeOH) 后, 得到作为白色泡沫的标题化合物 21d (0.93g, 58%); ^1H NMR(CDCl₃) δ 3.44 (s, 6H), 3.67 (t, J = 1.6Hz, 4H), 3.69 (t, J = 1.6Hz, 4H), 3.83 (t, J = 4.4Hz, 4H), 4.09 (t, J = 4.0Hz, 4H), 5.15 (s, 8H), 6.42 (d, J = 1.8Hz, 2H), 6.49 (s, 2H), 6.67 (d, J = 1.8Hz, 2H), 6.92 (d, J = 8.8Hz, 4H), 7.25 (t, J = 7.2Hz, 2H), 7.36 (dd, J = 7.2, 7.6Hz, 4H), 7.60 (d, J = 7.6Hz, 4H), 7.71 (d, J = 8.8Hz, 4H); ^{13}C NMR(CDCl₃) δ 56.4, 67.5, 69.5, 70.6, 70.6, 70.8, 94.3, 95.9, 98.6, 107.4, 110.0, 114.8, 123.7, 126.6, 127.5, 127.5, 128.5, 136.5, 159.3, 159.5, 160.6, 161.2, 177.2; LRMS (ESI) m/z 967 (M⁺+H, 18), 989 (M⁺+H, 100); HRMS (ESI) C₅₆H₅₅O₁₅ (M⁺+H) 的计算值为 967.3541, 测定值为 967.3568。得到作为浅黄色油状物的标题化合物 23b (0.27g, 14%); ^1H NMR(CDCl₃) δ 3.00 (br, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.56 (t, J = 4.2Hz,

2H), 3.62–3.69(m, 10H), 3.82(t, $J = 4.5\text{Hz}$, 2H), 4.13(t, $J = 4.5\text{Hz}$, 2H), 5.17(s, 2H), 5.18(s, 2H), 6.44(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 6.53(s, 1H), 6.70(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 6.94(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.25(t, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 7.35(dd, $J = 7.4, 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.59(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.74(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 56.2, 61.4, 67.3, 69.3, 70.0, 70.3, 70.4, 70.4, 70.6, 72.4, 94.1, 95.8, 98.5, 107.2, 109.9, 114.7, 123.6, 126.4, 127.4, 128.3, 136.2, 159.2, 159.3, 160.6, 161.0, 161.1, 177.2。

[0151] 1,16-二[4'-(5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16-六氧十六烷(21e):该化合物由12a(300mg, 0.74mmol)、五乙二醇二甲磺酸酯(170mg, 0.43mmol)、 K_2CO_3 (480mg)和DMF(10mL)按照如上所述的合成类黄酮二聚物的一般步骤制备。在硅胶(15g)上快速柱层析(CH_2Cl_2 中2%的MeOH)后,得到作为白色泡沫的标题化合物(160mg, 43%); ^1H NMR(CDCl_3) δ 3.44(s, 6H), 3.63–3.68(m, 12H), 3.81(t, $J = 4.2\text{Hz}$, 4H), 4.09(t, $J = 4.2\text{Hz}$, 4H), 5.15(s, 8H), 6.42(d, $J = 1.6\text{Hz}$, 2H), 6.49(s, 2H), 6.67(d, $J = 1.6\text{Hz}$, 2H), 6.93(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 4H), 7.26(t, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 7.36(dd, $J = 6.8, 7.4\text{Hz}$, 4H), 7.59(d, $J = 7.4\text{Hz}$, 4H), 7.71(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 4H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 56.4, 67.5, 69.5, 70.5, 70.8, 94.3, 95.9, 98.6, 107.4, 110.0, 114.8, 123.7, 126.6, 127.5, 127.5, 128.5, 128.6, 136.4, 159.3, 159.5, 160.6, 161.2, 177.3; LRMS(ESI) m/z 1011(M^+H , 4), 1033(M^+Na , 26); HRMS(ESI) $\text{C}_{58}\text{H}_{59}\text{O}_{16}$ (M^+H)的计算值为1011.3803, 测定值为1011.3793。

[0152] 1,19-二[4'-(5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19-七氧十九烷(21f):该化合物由12a(230mg, 0.57mmol)、六乙二醇二甲磺酸酯(160mg, 0.37mmol)、 K_2CO_3 (400mg)和DMF(10mL)按照如上所述的合成类黄酮二聚物的一般步骤制备。在硅胶(15g)上快速柱层析(CH_2Cl_2 中2%的MeOH)后,得到作为白色泡沫的标题化合物(160mg, 53%); ^1H NMR(CDCl_3) δ 3.47(s, 6H), 3.64–3.71(m, 16H), 3.85(t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 4.15(t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 5.19(s, 4H), 5.21(s, 4H), 6.47(d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.54(s, 2H), 6.72(d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.97(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 7.27(t, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 7.38(dd, $J = 7.2, 7.6\text{Hz}$, 4H), 7.61(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 4H), 7.76(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 56.4, 67.5, 69.5, 70.5, 70.6, 70.6, 70.8, 94.3, 95.9, 98.7, 107.5, 110.1, 114.9, 123.8, 126.6, 127.5, 128.5, 136.4, 159.4, 159.5, 160.6, 161.2, 177.3; LRMS(ESI) m/z 1055(M^+H , 11), 1077(M^+Na , 47); HRMS(ESI) $\text{C}_{60}\text{H}_{62}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M^+Na)的计算值为1077.3885, 测定值为1077.3883。

[0153] 1,22-二[4'-(5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19,22-八氧二十二烷(21g):该化合物由12a(220mg, 0.54mmol)、七乙二醇二甲磺酸酯(160mg, 0.33mmol)、 K_2CO_3 (370mg)和DMF(10mL)按照如上所述的合成类黄酮二聚物的一般步骤制备。在硅胶(15g)上快速柱层析(CH_2Cl_2 中4%的MeOH)后,得到作为白色泡沫的标题化合物(160mg, 54%); ^1H NMR(CDCl_3) δ 3.44(s, 6H), 3.61–3.69(m, 20H), 3.82(t, $J = 4.2\text{Hz}$, 4H), 4.12(t, $J = 4.2\text{Hz}$, 4H), 5.17(s, 4H), 5.18(s, 4H), 6.44(d, $J = 1.6\text{Hz}$, 2H), 6.51(s, 2H), 6.69(d, $J = 1.6\text{Hz}$, 2H), 6.94(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 4H), 7.25(t, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 7.36(dd, $J = 6.8, 7.0\text{Hz}$, 4H), 7.60(d, $J = 7.0\text{Hz}$, 4H), 7.34(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 4H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 56.4, 67.5, 69.5, 70.5, 70.5, 70.8, 94.3, 95.9, 98.6, 107.4, 110.1, 114.8, 123.7, 126.6, 127.5, 128.5, 128.7, 136.4, 159.3, 159.5, 160.6, 161.2, 177.3;

LRMS (ESI) m/z 1099 (M^+H , 7), 1121 (M^+Na , 31); HRMS (ESI) $C_{62}H_{66}O_{18}Na$ (M^+Na) 的计算值为 1121.4147, 测定值为 1121.4132。

[0154] 1,25-二[4'-(5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19,22,25-九氧二十五烷 (21h): 该化合物由 12a (250mg, 0.62mmol)、八乙二醇二甲磺酸酯 (200mg, 0.38mmol)、 K_2CO_3 (420mg) 和 DMF (10mL) 按照如上所述的合成类黄酮二聚物的一般步骤制备。在硅胶 (15g) 上快速柱层析 (CH_2Cl_2 中 4% 的 MeOH) 后, 得到作为白色泡沫的标题化合物 (170mg, 48%): 1H NMR ($CDCl_3$) δ 3.43 (s, 6H), 3.59-3.67 (m, 24H), 3.80 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 4.10 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 5.15 (s, 4H), 5.16 (s, 4H), 6.43 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.50 (s, 2H), 6.68 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 9.2$ Hz, 4H), 7.25 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.34 (dd, $J = 7.6, 7.2$ Hz, 4H), 7.59 (d, $J = 7.2$ Hz, 4H), 7.72 (d, $J = 9.2$ Hz, 4H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 56.4, 67.5, 69.4, 70.5, 70.5, 70.8, 94.3, 95.9, 98.6, 107.4, 110.1, 114.8, 123.7, 126.5, 127.5, 128.5, 136.4, 159.3, 159.5, 160.6, 161.2, 161.2, 177.2; LRMS (ESI) m/z 1144 (M^+H , 3), 1166 (M^+Na , 21); HRMS (ESI) $C_{64}H_{70}O_{19}Na$ (M^+Na) 的计算值为 1165.4409, 测定值为 1165.4424。

[0155] 1,28-二[4'-(5-苄氧基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28-十氧二十八烷 (21i): 该化合物由 12a (240mg, 0.59mmol)、九乙二醇二甲磺酸酯 (210mg, 0.37mmol)、 K_2CO_3 (410mg) 和 DMF (10mL) 按照如上所述的合成类黄酮二聚物的一般步骤制备。在硅胶 (15g) 上快速柱层析 (CH_2Cl_2 中 4% 的 MeOH) 后, 得到作为白色泡沫的标题化合物 (180mg, 51%): 1H NMR ($CDCl_3$) δ 3.42 (s, 6H), 3.58-3.66 (m, 28H), 3.80 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 4.10 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 5.14 (s, 4H), 5.15 (s, 4H), 6.42 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.48 (s, 2H), 6.67 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 7.59 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H), 7.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 56.3, 67.5, 69.4, 70.5, 70.5, 70.8, 94.2, 95.9, 98.6, 107.4, 110.1, 114.8, 123.7, 126.5, 127.5, 128.5, 136.4, 159.3, 159.5, 160.6, 161.2, 161.2, 177.2; LRMS (ESI) m/z 1188 (M^+H , 3), 1210 (M^+Na , 23); HRMS (ESI) $C_{66}H_{75}O_{20}$ (M^+H) 的计算值为 1187.4852, 测定值为 1187.4825。

[0156] 化合物 21a 至 21i 和 23a 至 23b 氢解的一般步骤: 将化合物 21 或 23、催化量的 10% 活性炭载钨和氯仿添加至圆底烧瓶中。在气球压力的氢气氛围下于室温将该反应混合物剧烈搅拌 12 小时。当 TLC 显示起始物质完全消耗后, 通过吸滤去除炭。通过流经短硅胶垫纯化浅黄色滤液, 得到脱保护产物。

[0157] 1,4-二[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4-二氧丁烷 (22a): 该化合物由 21a (64mg, 0.08mmol)、10% 炭载钨 (15mg) 和氯仿 (10mL) 按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为白色固体的标题化合物 (43mg, 86%): m. p.: 206-207°C; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 3.51 (s, 6H), 4.44 (s, 4H), 5.24 (s, 4H), 6.47 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.59 (s, 2H), 6.66 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 12.73 (s, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 56.4, 66.5, 94.2, 94.3, 100.1, 104.5, 106.2, 115.1, 124.0, 128.1, 157.5, 161.5, 162.0, 162.9, 163.9, 182.5; LRMS (ESI) m/z 655 (M^+H , 14), 677 (M^+Na , 8); HRMS (ESI) 的计算值为 $C_{36}H_{31}O_{12}$ (M^+H) 655.1816, 测定值为 655.1845。

[0158] 1,7-二[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,

4,7-三氧庚烷 (22b) :该化合物由 21b(88mg,0.10mmol)、10%炭载钯 (18mg) 和氯仿 (10mL) 按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为白色固体的标题化合物 (60mg,86%) : m. p. :171-172°C; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 3.50(s,6H),3.98(t,J=4.4Hz,4H),4.24(t,J=4.4Hz,4H),5.23(s,4H),6.44(d,J=1.6Hz,2H),6.55(s,2H),6.62(d,J=1.6Hz,2H),7.00(d,J=9.0Hz,4H),7.79(d,J=9.0Hz,4H),12.63(s,2H); $^{13}\text{C NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO})$ δ 56.5,68.0,69.3,94.3,94.9,99.8,104.1,105.6,115.5,123.0,128.8,157.4,161.5,162.1,162.9,164.1,182.4;LRMS(ESI)m/z699(M⁺+H,5),721(M⁺+Na,3);HRMS(ESI) $\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{O}_{13}$ (M⁺+H)的计算值为 699.2078,测定值为 699.2079。

[0159] 1,10-二[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10-四氧癸烷 (22c) :该化合物由 21c(96mg,0.10mmol)、10%炭载钯 (15mg) 和氯仿 (10mL) 按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为浅黄色固体的标题化合物 (62mg,80%) : m. p. :159-160°C; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 3.39(s,6H),3.62(d,J=4.0Hz,4H),3.76(t,J=4.6Hz,4H),4.17(t,J=4.6Hz,4H),5.28(s,4H),6.37(d,J=2.0Hz,2H),6.76(d,J=2.0Hz,2H),6.87(s,2H),7.06(d,J=8.8Hz,4H),7.96(d,J=8.8Hz,4H),12.85(s,2H); $^{13}\text{C NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO})$ δ 56.3,67.8,69.0,70.3,94.2,94.7,99.6,103.9,105.4,115.2,122.8,128.6,157.2,161.4,161.9,162.7,163.8,182.2;LRMS(ESI)m/z743(M⁺+H,9);HRMS(ESI) $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{O}_{14}$ (M⁺+H)的计算值为 743.2340,测定值为 743.2343。

[0160] 1,13-二[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷 (22d) :该化合物由 21d(930mg,0.96mmol)、10%炭载钯 (88mg) 和氯仿 (20mL) 按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为白色泡沫的标题化合物 (710mg,94%) : $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 3.39(s,6H),3.55-3.59(m,8H),3.76(t,J=4.6Hz,4H),4.13(d,J=4.6Hz,4H),5.28(s,4H),6.37(d,J=2.0Hz,2H),6.75(d,J=2.0Hz,2H),6.85(s,2H),7.04(d,J=8.8Hz,4H),7.95(d,J=8.8Hz,4H),12.84(s,2H); $^{13}\text{C NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO})$ δ 56.3,56.3,67.8,69.0,70.2,94.2,94.7,99.6,103.9,105.4,115.2,122.8,128.6,157.1,161.4,161.9,162.7,163.8,182.2;LRMS(ESI)m/z787(M⁺+H,57),809(M⁺+Na,60);HRMS(ESI) $\text{C}_{42}\text{H}_{43}\text{O}_{15}$ (M⁺+H)的计算值为 787.2602,测定值为 787.2591。

[0161] 1,16-二[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16-六氧十六烷 (22e) :该化合物由 21e(75mg,0.07mmol)、10%炭载钯 (12mg) 和氯仿 (10mL) 按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为白色泡沫的标题化合物 (52mg,84%) : $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 3.48(s,6H),3.66-3.73(m,12H),3.87(t,J=4.6Hz,4H),4.17(t,J=4.6Hz,4H),5.22(s,4H),6.42(d,J=2.0Hz,2H),6.52(s,2H),6.61(d,J=2.0Hz,2H),6.97(d,J=9.0Hz,4H),7.77(d,J=9.0Hz,4H),12.72(s,2H); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 56.4,67.0,67.6,69.5,70.6,70.8,94.1,94.2,100.0,104.2,106.1,115.0,123.4,127.9,157.4,161.7,161.9,162.8,163.9,182.4;LRMS(ESI)m/z831(M⁺+H,35),853(M⁺+Na,100);HRMS(ESI) $\text{C}_{44}\text{H}_{46}\text{O}_{16}\text{Na}$ (M⁺+Na)的计算值为 853.2684,测定值为 853.2677。

[0162] 1,19-二[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19-七氧十九烷 (22f) :该化合物由 21f(76mg,0.07mmol)、10%炭载钯 (19mg) 和氯仿 (10mL) 按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为白色泡沫的标题化合物 (52mg,83%) : $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 3.47(s,6H),3.64-3.72(m,16H),3.85(t,J=4.6Hz,

4H), 4.15(t, J = 4.6Hz, 4H), 5.20(s, 4H), 6.40(d, J = 2.0Hz, 2H), 6.49(s, 2H), 6.58(d, J = 2.0Hz, 2H), 6.95(d, J = 8.8Hz, 4H), 7.74(d, J = 8.8Hz, 4H), 12.70(s, 2H); ^{13}C NMR(CDC $_3$) δ 56.3, 66.9, 67.5, 69.4, 70.4, 70.5, 70.7, 94.1, 94.1, 99.9, 104.1, 106.0, 114.9, 123.3, 127.8, 157.3, 161.7, 161.8, 162.7, 163.8, 182.3; LRMS(ESI)m/z875(M $^+$ +H, 28), 897(M $^+$ +Na, 100); HRMS(ESI)C $_{46}$ H $_{50}$ O $_{17}$ Na(M $^+$ +Na) 的计算值为 897.2946, 测定值为 897.2936。

[0163] 1,22-二[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19,22-八氧二十二烷(22g):该化合物由 21g(102mg, 0.09mmol)、10%炭载钨(21mg)和氯仿(10mL)按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为白色泡沫的标题化合物(78mg, 91%): ^1H NMR(CDC $_3$) δ 3.45(s, 6H), 3.61-3.70(m, 20H), 3.84(t, J = 4.6Hz, 4H), 4.12(t, J = 4.6Hz, 4H), 5.18(s, 4H), 6.38(d, J = 2.0Hz, 2H), 6.47(s, 2H), 6.56(d, J = 2.0Hz, 2H), 6.93(d, J = 9.0Hz, 4H), 7.72(d, J = 9.0Hz, 4H), 12.70(s, 2H); ^{13}C NMR(CDC $_3$) δ 56.3, 67.6, 69.4, 70.5, 70.5, 70.8, 94.1, 94.2, 99.9, 104.1, 106.0, 114.9, 123.3, 127.9, 157.4, 161.8, 161.8, 162.8, 163.9, 182.3; LRMS(ESI)m/z919(M $^+$ +H, 5), 941(M $^+$ +Na, 100); HRMS(ESI)C $_{48}$ H $_{54}$ O $_{18}$ Na(M $^+$ +Na) 的计算值为 941.3208, 测定值为 941.3188。

[0164] 1,25-二[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19,22,25-九氧二十五烷(22h):该化合物由 21h(89mg, 0.08mmol)、10%炭载钨(16mg)和氯仿(10mL)按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为白色泡沫的标题化合物(62mg, 83%): ^1H NMR(CDC $_3$) δ 3.50(s, 6H), 3.68-3.75(m, 24H), 3.87(t, J = 4.6Hz, 4H), 4.18(t, J = 4.6Hz, 4H), 5.23(s, 4H), 6.44(d, J = 2.0Hz, 2H), 6.54(s, 2H), 6.62(d, J = 2.0Hz, 2H), 6.98(d, J = 8.8Hz, 4H), 7.78(d, J = 8.8Hz, 4H), 12.72(s, 2H); ^{13}C NMR(CDC $_3$) δ 56.4, 56.4, 67.6, 69.5, 70.2, 70.3, 70.4, 70.7, 94.2, 94.3, 100.0, 104.3, 106.1, 115.0, 123.5, 128.0, 157.4, 161.7, 161.9, 162.9, 163.9, 182.4; LRMS(ESI)m/z963(M $^+$ +H, 50), 985(M $^+$ +Na, 100); HRMS(ESI)C $_{50}$ H $_{59}$ O $_{19}$ (M $^+$ +H) 的计算值为 963.3651, 测定值为 963.3637。

[0165] 1,28-二[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28-十氧二十八烷(22i):该化合物由黄酮 21i(120mg, 0.10mmol)、10%炭载钨(28mg)和氯仿(10mL)按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为白色泡沫的标题化合物(92mg, 90%): ^1H NMR(CDC $_3$) δ 3.39(s, 6H), 3.53-3.63(m, 28H), 3.77(t, J = 4.6Hz, 4H), 4.04(t, J = 4.6Hz, 4H), 5.11(s, 4H), 6.28(d, J = 1.8Hz, 2H), 6.37(s, 2H), 6.47(d, J = 1.8Hz, 2H), 6.84(d, J = 8.8Hz, 4H), 7.62(d, J = 8.8Hz, 4H), 12.63(s, 2H); ^{13}C NMR(CDC $_3$) δ 56.0, 57.2, 69.1, 70.1, 70.2, 70.4, 93.8, 93.8, 99.5, 103.6, 105.6, 114.6, 122.8, 127.5, 156.9, 161.4, 161.5, 162.4, 163.5, 181.9; LRMS(ESI)m/z1007(M $^+$ +H, 10), 1029(M $^+$ +Na, 58); HRMS(ESI)C $_{52}$ H $_{62}$ O $_{20}$ Na(M $^+$ +Na) 的计算值为 1029.3732, 测定值为 1029.3696。

[0166] 9-[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-3,6,9,-三氧壬烷-1-醇(24a):该化合物由 23a(48mg, 0.09mmol)、10%炭载钨(8mg)和氯仿(10mL)按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为浅黄色固体的标题化合物(32mg, 80%): m. p.: 57-59°C; ^1H NMR(CDC $_3$) δ 3.49(s, 3H), 3.62(t, J = 4.2Hz, 2H), 3.70-3.75(m, 6H), 3.89(t, J = 4.7Hz, 2H), 4.20(t, J = 4.7Hz, 2H), 5.23(s, 2H), 6.45(d, J = 2.0Hz, 1H),

6.56(s, 1H), 6.64(d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 7.00(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.81(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 56.2, 61.5, 67.4, 69.3, 70.1, 70.7, 72.3, 94.0, 94.1, 99.9, 104.1, 106.0, 114.8, 123.4, 127.8, 157.3, 161.6, 161.8, 162.3, 163.9, 182.3; LRMS(EI) m/z 446 (M^+ , 100); HRMS(EI) $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_9$ (M^+) 的计算值为 446.1577, 测定值为 446.1570。

[0167] 12-[4'-(5-羟基-7-甲氧基甲氧基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-3,6,9,12-四氧十二烷-1-醇 (24b): 该化合物由 23b (150mg, 0.26mmol)、10% 炭载钯 (22mg) 和氯仿 (20mL) 按照如上所述的氢解的一般步骤制备。得到作为浅黄色油状物的标题化合物 (122mg, 96%): ^1H NMR(CDCl_3) δ 3.44(s, 3H), 3.56(t, $J = 4.2\text{Hz}$, 2H), 3.62-3.69(m, 10H), 3.82(t, $J = 4.5\text{Hz}$, 2H), 4.13(t, $J = 4.5\text{Hz}$, 2H), 5.18(s, 2H), 6.44(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 6.53(s, 1H), 6.70(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 6.94(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.74(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 56.2, 61.4, 67.3, 69.3, 70.0, 70.3, 70.4, 70.4, 70.6, 72.4, 94.1, 95.8, 98.5, 107.2, 109.9, 114.7, 123.6, 126.4, 127.4, 128.3, 136.2, 159.2, 159.3, 160.6, 161.0, 161.1, 177.2; LRMS(EI) m/z 490 (M^+ , 100); HRMS(EI) $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$ (M^+) 的计算值为 490.1839, 测定值为 490.1828。

[0168] 22a 至 22i 的 MOM 基团脱保护的一般步骤: 方法 A: 将化合物 22 和 75% AcOH 添加至圆底烧瓶中。将该反应混合物在回流温度搅拌 14 小时。当 TLC 显示 22 完全消耗时, 将该反应混合物冷却至 0°C, 并添加冰水。通过吸滤收集所形成的米白色固体。方法 B: 将化合物 22、6M HCl 溶液和 THF 添加至圆底烧瓶中。将该反应混合物在室温搅拌 15 分钟。当 TLC 显示 22 完全消耗时, 将反应混合物倒入含水的分液漏斗中。以 EtOAc (20mL \times 3) 萃取该混合物。将合并的有机层用 MgSO_4 干燥, 过滤并蒸发, 得到粗品混合物。通过流经短硅胶垫纯化所述粗品混合物, 得到所需的产物。

[0169] 1,4-二[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4-二氧丁烷 (9a): 该化合物由化合物 22a (43mg, 0.07mmol) 和 75% 乙酸 (20mL) 按照上述方法 A 制备。得到作为浅绿色固体的标题化合物 (26mg, 70%): m. p.: 352-355°C; ^1H NMR(d_6 -DMSO) δ 4.46(s, 4H), 6.19(d, $J = 1.6\text{Hz}$, 2H), 6.50(d, $J = 1.6\text{Hz}$, 2H), 6.88(s, 2H), 7.17(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 4H), 8.04(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 4H), 10.85(s, 2H), 12.90(s, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 67.0, 94.5, 99.3, 104.1, 104.2, 115.5, 123.4, 128.8, 157.8, 161.7, 161.9, 163.6, 164.7, 182.2; LRMS(EI) m/z 566 (M^+ , 11); HRMS(ESI) $\text{C}_{32}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$ (M^+H) 的计算值为 567.1291, 测定值为 567.1268。

[0170] 1,7-二[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7-三氧庚烷 (9b): 该化合物由化合物 22b (57mg, 0.08mmol) 和 75% 乙酸 (25mL) 按照上述方法 A 制备。得到作为米白色固体的标题化合物 (42mg, 84%): m. p.: 268-270°C; ^1H NMR(d_6 -DMSO) δ 3.85(s, 4H), 4.22(s, 4H), 6.16(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 2H), 6.46(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 2H), 6.84(s, 2H), 7.09(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 7.98(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 10.82(s, 2H), 12.98(s, 2H); ^{13}C NMR(d_6 -DMSO) δ 68.0, 69.3, 94.4, 99.3, 103.9, 104.2, 115.4, 123.3, 128.7, 157.7, 161.9, 161.9, 163.6, 164.6, 182.2; LRMS m/z 611 (M^+H , 8), 633 (M^+Na , 3); HRMS: $\text{C}_{34}\text{H}_{27}\text{O}_{11}$ (M^+H) 的计算值为 611.1553, 测定值为 611.1542。

[0171] 1,10-二[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10-四氧癸烷 (9c): 该化合物由化合物 22c (62mg, 0.08mmol) 和 75% 乙酸 (25mL) 按照上

述方法 A 制备。得到作为浅黄色固体的标题化合物 (43mg, 79%) : m. p. : 143-145 °C ; ^1H NMR(d_6 -DMSO) δ 3.81 (s, 4H), 3.95 (s, 4H), 4.36 (s, 4H), 6.35 (d, $J = 1.0\text{Hz}$, 2H), 6.64 (d, $J = 1.0\text{Hz}$, 2H), 7.01 (s, 2H), 7.27 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 8.16 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 11.00 (s, 2H), 13.08 (s, 2H) ; ^{13}C NMR(d_6 -DMSO) δ 67.8, 69.0, 70.2, 94.2, 99.1, 103.7, 104.0, 115.2, 123.0, 128.5, 157.5, 161.7, 161.8, 163.4, 164.4, 182.0 ; LRMS(ESI) m/z 655 (M^+H , 15) ; HRS(ESI) $\text{C}_{36}\text{H}_{31}\text{O}_{12}$ (M^+H) 的计算值为 655.1816, 测定值为 655.1816。

[0172] 1,13-二[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷 (9d) : 该化合物由化合物 22d (720mg, 0.92mmol)、6M HCl 溶液 (70mL) 和 THF (50mL) 按照上述方法 B 制备。得到作为浅黄色固体的标题化合物 (620mg, 97%) : m. p. : 131-133 °C ; ^1H NMR(d_6 -DMSO) δ 3.54-3.58 (m, 8H), 3.75 (t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 4.15 (t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 6.16 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.45 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.81 (s, 2H), 7.07 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 7.96 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 10.81 (s, 2H), 12.88 (s, 2H) ; ^{13}C NMR(d_6 -DMSO) δ 68.0, 69.2, 70.3, 70.4, 94.4, 99.3, 103.9, 104.2, 115.4, 123.2, 128.7, 157.7, 161.8, 161.9, 163.6, 164.6, 182.2 ; LRMS(ESI) m/z 699 (M^+H , 33), 721 (M^+Na , 58) ; HRMS(ESI) $\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{O}_{13}\text{Na}$ (M^+Na) 的计算值为 721.1897, 测定值为 721.1896。

[0173] 1,16-二[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16-六氧十六烷 (9e) : 该化合物由化合物 22e (48mg, 0.06mmol)、6M HCl 溶液 (20mL) 和 THF (20mL) 按照上述方法 B 制备。得到作为浅黄色泡沫的标题化合物 (37mg, 86%) ; ^1H NMR(d_6 -丙酮) δ 3.59-3.65 (m, 12H), 3.83 (t, $J = 4.6\text{Hz}$, 4H), 4.20 (t, $J = 4.6\text{Hz}$, 4H), 6.22 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.51 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.63 (s, 2H), 7.09 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 7.95 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 12.90 (s, 2H) ; ^{13}C NMR(d_6 -丙酮) δ 67.8, 69.2, 70.4, 70.5, 93.8, 98.8, 103.6, 104.4, 115.0, 123.4, 128.1, 157.8, 162.0, 164.0, 164.6, 182.2 ; LRMS(ESI) m/z 743 (M^+H , 34), 765 (M^+Na , 100) ; HRMS(ESI) $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{O}_{14}\text{Na}$ (M^+Na) 的计算值为 765.2159, 测定值为 765.2164。

[0174] 1,19-二[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19-七氧十九烷 (9f) : 该化合物由化合物 22f (45mg, 0.05mmol)、6M HCl 溶液 (20mL) 和 THF (20mL) 按照上述方法 B 制备。得到作为浅黄色泡沫的标题化合物 (36mg, 89%) : ^1H NMR(d_6 -丙酮) δ 3.56-3.65 (m, 16H), 3.81 (t, $J = 4.6\text{Hz}$, 4H), 4.17 (t, $J = 4.6\text{Hz}$, 4H), 6.22 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.48 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.57 (s, 2H), 7.02 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 7.88 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 12.88 (s, 2H) ; ^{13}C NMR(d_6 -丙酮) δ 67.7, 69.2, 70.3, 70.3, 70.5, 93.9, 98.8, 103.5, 104.4, 114.9, 123.3, 128.0, 157.6, 162.0, 162.3, 163.6, 163.9, 182.0 ; LRMS(ESI) m/z 809 (M^+Na , 15) ; HRMS(ESI) $\text{C}_{42}\text{H}_{43}\text{O}_{15}$ (M^+H) 的计算值为 787.2602, 测定值为 787.2614。

[0175] 1,22-二[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19,22-八氧二十二烷 (9g) : 该化合物由化合物 22g (65mg, 0.07mmol)、6M HCl 溶液 (20mL) 和 THF (20mL) 按照上述方法 B 制备。得到作为浅黄色泡沫的标题化合物 (58mg, 99%) ; ^1H NMR(d_6 -丙酮) δ 3.54-3.65 (m, 20H), 3.81 (t, $J = 4.6\text{Hz}$, 4H), 4.18 (t, $J = 4.6\text{Hz}$, 4H), 6.23 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.49 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.59 (s, 2H), 7.04 (d, $J = 9.0\text{Hz}$, 4H), 7.90 (d, $J = 9.0\text{Hz}$, 4H), 12.90 (s, 2H) ; ^{13}C NMR(d_6 -丙酮) δ 67.7, 69.2, 70.3, 70.3, 70.5,

93.9, 98.8, 103.6, 104.4, 114.9, 123.3, 128.0, 157.8, 162.0, 162.0, 163.6, 163.9, 182.0; LRMS(ESI)m/z853(M^+Na , 36); HRMS(ESI) $C_{44}H_{47}O_{16}$ (M^+H)的计算值为831.2864, 测定值为831.2889。

[0176] 1,25-二[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19,22,25-九氧二十五烷(9h):该化合物由化合物22h(50mg, 0.05mmol)、6M HCl溶液(20mL)和THF(20mL)按照上述方法B制备。得到作为浅黄色泡沫的标题化合物(42mg, 92%); 1H NMR(d_6 -丙酮) δ 3.53-3.65(m, 24H), 3.83(t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 4.19(t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 6.23(d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.51(d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.62(s, 2H), 7.07(d, $J = 9.0$ Hz, 4H), 7.94(d, $J = 9.0$ Hz, 4H), 12.88(s, 2H); ^{13}C NMR(d_6 -丙酮) δ 67.8, 69.2, 70.3, 70.3, 70.5, 93.9, 98.8, 103.6, 104.4, 115.0, 123.3, 128.0, 157.6, 162.0, 162.3, 163.7, 163.9, 182.0; LRMS(ESI)m/z875(M^+H , 3), 897(M^+Na , 100); HRMS(ESI) $C_{46}H_{51}O_{17}$ (M^+H)的计算值为875.3126, 测定值为875.3145。

[0177] 1,28-二[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28-十氧二十八烷(9i):该化合物由化合物22i(78mg, 0.08mmol)、6M HCl溶液(20mL)和THF(20mL)按照上述方法B制备。得到作为浅黄色油状物的标题化合物(69mg, 97%); 1H NMR(d_6 -丙酮) δ 3.53-3.64(m, 28H), 3.80(t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 4.15(t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 6.23(d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.48(d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.57(s, 2H), 7.02(d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.88(d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 12.94(s, 2H); ^{13}C NMR(d_6 -丙酮) δ 67.7, 69.2, 70.3, 70.3, 70.5, 93.9, 98.9, 103.5, 104.4, 114.9, 123.2, 128.0, 157.7, 162.0, 162.3, 163.6, 164.0, 182.0; LRMS(ESI)m/z919(M^+H , 4), 941(M^+Na , 100); HRMS(ESI) $C_{48}H_{55}O_{18}$ (M^+H)的计算值为919.3388, 测定值为919.3399。

[0178] 9-[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-3,6,9-三氧壬烷-1-醇(10a):该化合物由化合物24a(28mg, 0.06mmol)、6M HCl溶液(10mL)和THF(10mL)按照上述方法B制备。得到作为浅黄色固体的标题化合物(19mg, 75%); m. p.: 135-137°C; 1H NMR(d_6 -DMSO) δ 3.40(t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.45-3.59(m, 6H), 3.75(t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.18(t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.57(t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.18(d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.48(d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.86(s, 1H), 7.10(d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.00(d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 10.85(br, 1H), 12.91(s, 1H); ^{13}C NMR(d_6 -DMSO) δ 60.6, 68.0, 69.2, 70.2, 70.4, 72.8, 94.4, 99.3, 103.9, 104.2, 115.4, 123.2, 128.7, 157.7, 161.8, 162.0, 163.7, 164.6, 182.2; LRMS(EI)m/z402(M^+ , 100); HRMS(EI) $C_{21}H_{22}O_8$ (M^+)的计算值为402.1315, 测定值为402.1297。

[0179] 12-[4'-(5,7-二羟基)-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基]苯基]-3,6,9,12-四氧十二烷-1-醇(10b):该化合物由化合物24b(80mg, 0.16mmol)、6M HCl溶液(10mL)和THF(10mL)按照上述方法B制备。得到作为浅黄色油状物的标题化合物(65mg, 89%); 1H NMR($CDCl_3$) δ 3.61(t, $J = 4.1$ Hz, 2H), 3.68-3.75(m, 10H), 3.84(t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.05(t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 6.21(d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.28(d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.35(s, 1H), 6.74(d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.52(d, $J = 8.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 61.4, 67.2, 69.4, 69.8, 70.4, 70.4, 70.4, 72.2, 94.2, 99.4, 103.1, 104.4, 114.4, 122.7, 127.3, 157.3, 161.2, 161.5, 163.3, 181.9; LRMS(EI)m/z446(M^+ , 97); HRMS(EI) $C_{23}H_{26}O_9$ (M^+)的计算值为446.1577, 测定值为446.1574。

[0180] 通过路线A制备化合物9j(n = 10):将固体碳酸钾(6mmol)和4-羟基苯甲醛

(2.2mmol) 添加至搅拌着的二甲磺酸酯 13b ($n = 10$) (1mmol) 的乙腈 (5mL/mmol) 溶液中, 并将所得的反应混合物在 80°C 加热 16 小时。之后, 过滤反应液, 并以二氯甲烷洗涤固体。在减压下蒸发二氯甲烷 / 乙腈母液, 快速柱层析 (EtOAc) 后得到作为无色油状物的二醛 11j ($n = 10$) (61%)。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : 3.6-3.75 (m, 32H), 3.87 (m, 4H), 4.20 (m, 4H), 7.01 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 7.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 9.87 (s, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz) : 67.68, 69.40, 70.47, 70.52, 70.81, 114.83, 130.0, 131.92, 163.82, 190.82; ES-MS C₃₄H₅₁O₁₃ (MH⁺) 的计算值为 667.3330, 测定值为 667.3345。

[0181] 将 60% (重量 / 体积) 的 KOH 溶液 (0.25mL/mmol) 添加至搅拌着的二醛 11j ($n = 10$) (1mmol) 和 2,4-二苧氧基-5-羟基苯乙酮 (2.1mmol) 的 THF 溶液 (0.25mL/mmol) 中。将所得的溶液在室温搅拌 16 小时。之后, 将该反应混合物倒入水中, 并以乙酸乙酯反复洗涤, 直至有机层保持无色为止 (通常洗涤三次)。将合并的有机层干燥 (MgSO₄), 过滤并减压蒸发, 提取至 EtOAc 并真空浓缩之后, 得到作为黄色油状物的查耳酮 16j ($n = 10$) (产率 >95%)。不经任何纯化将其立即用于下一步。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : 3.60-3.75 (m, 36H), 3.78 (m, 4H), 4.13 (m, 4H), 5.06 (s, 4H), 5.10 (s, 4H), 6.16 (d, $J = 2$ Hz, 2H), 6.21 (d, $J = 2$ Hz, 2H), 6.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 7.27-7.5 (m, 20H), 7.68 (d, $J = 16$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 16$ Hz, 2H), 14.76 (s, 2H)。

[0182] 将少量的碘 (通常为一晶粒) 添加至 150°C、搅拌着的查耳酮 16j 的 DMSO (最小体积) 溶液中。所得的反应混合物于常温再搅拌 16 小时或者搅拌至采用少量样品的 ¹H NMR 光谱分析发现反应完成为止。反应完成后, 将混合物倒入水 (10mL/mL 所用的 DMSO) 中, 并以乙酸乙酯洗涤所得的黄色悬浮液。继续洗涤直至有机层保持透明为止 (通常洗涤 3 次~4 次)。然后以 5% 的硫代硫酸钠溶液、水洗涤合并的有机层, 然后干燥 (MgSO₄)、过滤并减压蒸发, 通过快速柱层析 (梯度, 丙酮 / DCM 1:5 → 1:3) 纯化后得到作为浅橙色 / 浅褐色油状物的类黄酮二聚物 17j ($n = 10$) (16%)。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : 3.6-3.75 (m, 32H), 3.87 (m, 4H), 4.19 (m, 4H), 5.10 (s, 4H), 5.20 (s, 4H), 6.44 (d, $J = 2$ Hz, 2H), 6.58 (s, 2H), 6.62 (d, $J = 2$ Hz, 2H), 7.01 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 7.27-7.40 (m, 16H), 7.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 7.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H)。

[0183] 将水逐滴添加至含有经保护的二类黄酮 17j 的 THF 溶液的烧瓶中, 直至混合物恰好开始变浑浊为止。在该点处, 逐滴添加 THF 直至所有物质溶解。添加 10% 的炭载钯 (通常为 1 当量重量), 将所得的黑色悬浮液脱气并充入氢气。将所得的反应混合物在室温快速搅拌直至 ¹H NMR 光谱分析显示苧基保护基被完全脱去为止。反应完成后, 真空除去溶剂以得到作为橙色 / 褐色油状物的化合物 9j ($n = 10$)。¹H NMR (d₆-丙酮, 400MHz) : 3.54-3.64 (m, 32H), 3.88 (m, 4H), 4.26 (m, 4H), 6.27 (d, $J = 2$ Hz, 2H), 6.56 (d, $J = 2$ Hz, 2H), 6.67 (s, 2H), 7.14 (d, $J = 8$ Hz, 4H), 8.02 (d, $J = 8$ Hz, 4H), 13.01 (s, 2H)。

[0184] 采用与 9j 所述相同的步骤制备化合物 9k (平均 $n = 13$), 不同之处在于由商购的 13 (平均 $n = 13$) 制备二甲磺酸酯 13b (平均 $n = 13$)。通过快速柱层析 (EtOAc) 纯化后得到作为无色油状物的化合物 11k (平均 $n = 13$) (61%)。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 3.6-3.75 (m, 约 44H), 3.88 (m, 4H), 4.22 (m, 4H), 7.00 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 7.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 9.88 (s, 2H)。提取至 EtOAc 并真空浓缩后得到作为黄色油状物的化合物 16k (平均 $n = 13$) (产率 >95%)。不经任何纯化将其直接用于下一步。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : 3.60-3.75 (m,

约 44H), 3.80 (m, 4H), 4.14 (m, 4H), 5.07 (s, 4H), 5.10 (s, 4H), 6.18 (d, J = 2Hz, 2H), 6.23 (d, J = 2Hz, 2H), 6.73 (d, J = 8.5Hz, 4H), 7.03 (d, J = 8.5Hz, 4H), 7.27-7.5 (m, 20H), 7.69 (d, J = 16Hz, 2H), 7.77 (d, J = 16Hz, 2H), 14.76 (s, 2H)。通过快速柱层析 (梯度, 丙酮 /DCM1:5 → 1:3) 纯化后得到作为浅橙色 / 浅褐色油状物的化合物 17k (平均 n = 13) (28%)。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) :3.6-3.75 (m, 约 44H), 3.89 (m, 4H), 4.20 (m, 4H), 5.13 (s, 4H), 5.23 (s, 4H), 6.47 (bs, 2H), 6.56 (bs, 2H), 6.62 (bs, 2H), 7.00 (m, 4H), 7.27-7.40 (m, 16H), 7.61 (m, 4H), 7.78 (m, 4H)。得到作为橙色 / 褐色油状物的化合物 9k (平均 n = 13)。¹H NMR(d₆-丙酮, 400MHz) :3.54-3.64 (m, 约 44H), 3.87 (m, 4H), 4.26 (m, 4H), 6.27 (br, 2H), 6.55 (br, 2H), 6.70 (br, 2H), 7.1 (m, 4H), 8.0 (m, 4H)。

[0185] 聚乙二醇连接的芹菜素类似物的二聚物的合成

[0186] 合成查耳酮 32a 至 32l 的一般步骤:将 2'-羟基苯乙酮 31 (1.0 当量)、4-烯丙氧基苯甲醛 (1.0 当量) 和过量的氢氧化钾溶液 (96% EtOH 中的 3M 溶液) 添加至圆底烧瓶中。将该混合物在室温搅拌 16 小时。当 TLC 显示 2'-羟基苯乙酮完全消耗时,以 1M HCl 溶液在冰浴温度将该反应混合物酸化至 pH5。以 CH₂Cl₂ (30mL×3) 连续提取该混合物。将合并的有机层用 MgSO₄ 干燥,过滤并减压蒸发,得到粗品混合物,以 5% 乙酸乙酯的己烷溶液洗涤该混合物,得到所需的查耳酮。

[0187] 合成黄酮 33a 至 33l 的一般步骤:将催化量的碘 (4mol%) 一次添加至 50°C、充分搅拌的查耳酮 32 的二甲基亚砷溶液中。然后将该反应混合物在 130°C 搅拌 12 小时。在加热过程中,反应混合物慢慢由浅褐色变为深褐色。当 TLC 显示查耳酮 32 完全消耗时,将该反应混合物倒入含水 (200mL) 的分液漏斗中。以 CH₂Cl₂ (30mL×3) 提取该混合物。如果所述混合物不能分为两层,则添加 1M HCl (20mL)。以 0.5% 的硫代硫酸钠溶液洗涤合并的有机层,用 MgSO₄ 干燥,过滤并蒸发,得到粗品反应混合物,将其结晶,得到所需的黄酮 33。

[0188] 通过黄酮 33a 至 33l 的烯丙基的脱保护来合成 34a 至 34l 的一般步骤:将催化量的 Pd(PPh₃)₄ (2mol%) 在回流温度下一次添加至装有黄酮 33 (1 当量)、K₂CO₃ (6 当量) 和 MeOH 的圆底烧瓶中。将该反应混合物在回流温度搅拌 2 小时。当 TLC 显示 33 完全消耗时,将该反应混合物倒入含水 (200mL) 的烧杯中。用 1M HCl 溶液将所述溶液酸化至 pH4,形成大量米白色固体,通过吸滤收集该固体。将所收集的固体溶于丙酮,并通过过滤除去不溶的黑色炭。减压下蒸发所得的褐色滤液,得到标题化合物 34。这些黄酮中的某些先前已经在文献中报道过 [化合物 33a-Huang, X.; Tang, E.; Xu, W.-M.; Cao, J. J. Comb. Chem. 2005, 7, 802-805; 化合物 34a-Miyake, H.; Takizawa, E.; Sasaki, M.; Bull. Chem. Soc. Jpn., 2003, 76, 835-836; 化合物 34d-Jesthi, P. K.; Sabat, B. K.; Rout, M. K. J. Indian Chem. Soc. 1965, 42, 105-108; 化合物 34e-Ono, M.; Yoshida, N.; Ishibashi, K.; Haratake, M.; Arano, Y.; Mori, H.; Nakayama, M. J. Med. Chem., 2005, 48, 7253-7260; 化合物 34f-Jha, B. C.; Amin, G. C. Tetrahedron 1958, 2, 241-245; 化合物 34i-Pelter, A.; Bradshaw, J.; Warren, R. Phytochemistry 1971, 10, 835-850; 化合物 34i-Pelter, A.; Ward, R. S.; Balasubramanian, M. Chem. Comm. 1976, 4, 151-152; 化合物 34j 和化合物 34k-Prendergast, Patrick T. Use of flavones, coumarins and related compounds to treat infections. PCT Int. Appl. (2001), 70pp; 化合物 34l-Bargellini, G.; Grippa, A. Gazzetta Chimica Italiana 1927, 57, 605-609.]。

[0189] 合成黄酮二聚物 35a 至 35l 的一般步骤:将黄酮 34(1.6 当量)、四乙二醇二甲磺酸酯(1.0 当量)、 K_2CO_3 (4 当量)和 DMF 添加至圆底烧瓶中。将该反应混合物在回流温度搅拌 2 小时至 3 小时。在加热过程中,反应混合物慢慢由深褐色变为乳白色。当 TLC 显示黄酮 34 完全消耗时,将反应混合物倒入含水(200mL)的分液漏斗中。以 CH_2Cl_2 (20mL \times 3) 连续提取所述混合物。如果所述混合物不能分成两层,则添加 1M HCl(20mL)。将合并的有机层用 $MgSO_4$ 干燥,过滤并蒸发,得到粗品反应混合物。如下所述,通过由丙酮结晶或硅胶上的快速柱层析(以 20%丙酮的 CH_2Cl_2 溶液作为洗脱剂)进行黄酮二聚物 35 的纯化。

[0190] 1,13-二[4'-(4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷(35a):在硅胶上快速柱层析后得到作为浅黄色固体的标题化合物(0.98g,37%): 1H NMR($CDCl_3$) 3.63-3.67(m,8H),3.79(t, J = 4.8Hz,4H),4.06(t, J = 4.4Hz,4H),6.57(s,2H),6.87(d, J = 8.8Hz,4H),7.25(dd, J = 7.6,7.6Hz,2H),7.37(d, J = 8.0Hz,2H),7.53(ddd, J = 1.2,7.6,7.6Hz,2H),7.68(d, J = 8.8Hz,4H),8.06(dd, J = 0.8,7.6Hz,2H); ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 67.3,69.2,70.4,70.5,105.6,114.6,117.6,123.5,123.5,124.7,125.1,127.5,133.3,155.7,161.3,162.8,177.9。

[0191] 1,13-二[4'-(7-氟-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷(35b):在硅胶上快速柱层析后得到作为浅黄色固体的标题化合物(0.15g,54%): 1H NMR($CDCl_3$) 3.68-3.74(m,8H),3.87(t, J = 4.8Hz,4H),4.16(t, J = 4.4Hz,4H),6.65(s,2H),6.98(d, J = 8.8Hz,4H),7.08(t, J = 7.6Hz,2H),7.16(d, J = 8.0Hz,2H),7.77(d, J = 8.8Hz,4H),8.17(dd, J = 6.4,8.8Hz,2H); ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 67.6,69.5,70.6,70.8,104.5,104.7,106.0,113.6,113.8,115.0,120.6,123.6,127.9,156.9,157.1,161.7,163.5,164.2,166.8,177.3。

[0192] 1,13-二[4'-(6-氟-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷(35c):在硅胶上快速柱层析后得到作为白色固体的标题化合物(0.13g,55%)。m. p. : 147-149 $^{\circ}C$; 1H NMR($CDCl_3$) 3.66-3.75(m,8H),3.88(t, J = 4.4Hz,4H),4.17(t, J = 4.8Hz,4H),6.68(s,2H),6.98(d, J = 8.8Hz,4H),7.36(dt, J = 0.4,6.0Hz,2H),7.49(dd, J = 4.0,8.8Hz,2H),7.80(d, J = 8.0Hz,6H); ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 67.6,69.5,70.6,70.8,105.3,110.4,110.6,115.0,120.0,121.5,121.8,123.7,124.9,127.9,152.2,158.2,160.7,161.7,163.5,177.4。

[0193] 1,13-二[4'-(6-氯-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷(35d):在硅胶上快速柱层析后得到作为黄色固体的标题化合物(48mg,31%)。m. p. : 180-182 $^{\circ}C$; 1H NMR($CDCl_3$) 3.70-3.76(m,8H),3.90(t, J = 4.8Hz,4H),4.18(t, J = 4.8Hz,4H),6.70(s,2H),7.00(d, J = 8.8Hz,4H),7.47(d, J = 8.8Hz,2H),7.60(dd, J = 2.8,8.8Hz,2H),7.81(d, J = 8.8Hz,4H)8.14(d, J = 2.4Hz,2H); ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 67.6,69.5,70.7,70.8,105.9,115.0,119.6,123.6,124.8,125.1,127.9,131.0,133.7,154.4,161.8,163.5,177.0;LRMS(ESI) m/z 703(M^+H ,10),725(M^+Na ,37);HRMS(ESI) $C_{38}H_{33}O_9Cl_2$ (M^+H) 的计算值为 703.1502,测定值为 703.1505。

[0194] 1,13-二[4'-(6-溴-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷(35e):在硅胶上快速柱层析后得到作为黄色固体的标题化合物(43mg,34%)。m. p. : 184-186 $^{\circ}C$; 1H NMR($CDCl_3$) 3.69-3.75(m,8H),3.88(t, J = 4.8Hz,4H),4.17(t, J = 4.8Hz,

4H), 6.68(s, 2H), 6.98(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 7.38(d, $J = 9.2\text{Hz}$, 2H), 7.71(dd, $J = 2.4, 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.78(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H) 8.27(d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 67.6, 69.5, 70.6, 70.8, 106.0, 115.0, 119.8, 123.6, 125.1, 127.9, 128.2, 136.5, 154.8, 161.8, 163.5, 176.9; LRMS(ESI) m/z 793 (M^+H , 8), 815 (M^+Na , 20); HRMS(ESI) $\text{C}_{38}\text{H}_{33}\text{O}_9\text{Br}_2$ (M^+H) 的计算值为 791.0491, 测定值为 791.0506。

[0195] 1,13-二[4'-(6,8-二氯-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷 (35f): 在硅胶上快速柱层析后得到作为白色固体的标题化合物 (45mg, 28%): m. p.: 147-148 °C; ^1H NMR(CDCl_3) 3.70-3.76(m, 8H), 3.90(t, $J = 4.8\text{Hz}$, 4H), 4.18(t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 6.71(s, 2H), 7.00(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 7.67(d, $J = 2.4\text{Hz}$, 2H), 7.85(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 8.03(d, $J = 2.8\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 67.7, 69.5, 70.7, 70.8, 105.6, 115.1, 123.1, 123.8, 124.2, 125.6, 128.1, 130.7, 133.5, 150.2, 162.0, 163.3, 176.2; LRMS(ESI) m/z 111 (M^+H , 29), 795 (M^+Na , 100); HRMS(ESI) $\text{C}_{38}\text{H}_{31}\text{O}_9\text{Cl}_4$ (M^+H) 的计算值为 771.0722, 测定值为 771.0730。

[0196] 1,13-二[4'-(7-甲基-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷 (35g): 在硅胶上快速柱层析后得到作为白色固体的标题化合物 (0.12g, 33%): m. p.: 128-129 °C; ^1H NMR(CDCl_3) 2.45(s, 6H), 3.68-3.75(m, 8H), 3.87(t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 4.16(t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 6.66(s, 2H), 6.98(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 7.16(d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.28(s, 2H), 7.79(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 4H), 8.03(d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 21.8, 67.6, 69.5, 70.7, 70.8, 105.9, 114.9, 117.7, 121.5, 124.1, 125.2, 126.5, 127.8, 144.9, 156.2, 161.5, 163.0, 178.3; LRMS(ESI) m/z 663 (M^+H , 97), 685 (M^+Na , 100); HRMS(ESI) $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{O}_9$ (M^+H) 的计算值为 663.2594, 测定值为 663.2588。

[0197] 1,13-二[4'-(6-甲基-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷 (35h): 在硅胶上快速柱层析后得到作为白色固体的标题化合物 (47mg, 36%): m. p.: 139-140 °C; ^1H NMR(CDCl_3) 2.42(s, 6H), 3.69-3.75(m, 8H), 3.88(t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 4.16(t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 6.69(s, 2H), 6.98(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 4H), 7.38(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.44(dd, $J = 1.6, 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.80(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 4H), 7.94(s, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 20.9, 67.6, 69.5, 70.6, 70.8, 105.9, 114.9, 117.6, 123.4, 124.1, 124.9, 127.8, 134.8, 135.0, 154.3, 161.5, 163.1, 178.4; LRMS(ESI) m/z 663 (M^+H , 79), 685 (M^+Na , 100); HRMS(ESI) $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{O}_9$ (M^+H) 的计算值为 663.2594, 测定值为 663.2586。

[0198] 1,13-二[4'-(7-甲氧基-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷 (35i): 在硅胶上快速柱层析后得到作为黄色固体的标题化合物 (95mg, 33%): m. p.: 128-130 °C; ^1H NMR(CDCl_3) 3.69-3.75(m, 8H), 3.88(t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 3.90(s, 6H), 4.17(t, $J = 4.4\text{Hz}$, 4H), 6.65(s, 2H), 6.89(d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.93(dd, $J = 2.0, 8.4\text{Hz}$, 2H), 6.99(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 4H), 7.79(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 4H), 8.07(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 55.8, 67.6, 69.5, 70.7, 70.8, 100.3, 105.9, 114.2, 114.9, 117.6, 124.1, 126.9, 127.7, 157.8, 161.4, 162.9, 164.0, 177.8; LRMS(ESI) m/z 695 (M^+H , 63), 717 (M^+Na , 100); HRMS(ESI) $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{O}_{11}$ (M^+H) 的计算值为 695.2492, 测定值为 695.2495。

[0199] 1,13-二[4'-(6-甲氧基-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷 (35j): 由丙酮结晶后得到作为白色固体的标题化合物 (0.17g, 45%):

m. p. :129-130 °C ;¹H NMR(CDCl₃) 3. 70-3. 74(m, 8H) , 3. 87(s, 6H) , 3. 88(t, J = 4. 4Hz, 4H) , 4. 16(t, J = 4. 4Hz, 4H) 6. 70(s, 2H) , 6. 98(d, J = 8. 8Hz, 4H) , 7. 24(dd, J = 2. 8, 8. 8Hz, 2H) , 7. 43(d, J = 9. 2Hz, 2H) , 7. 53(d, J = 2. 8Hz, 2H) , 7. 80(d, J = 8. 8Hz, 4H) ;¹³C NMR(CDCl₃) δ 55. 9, 67. 6, 69. 5, 70. 7, 70. 8, 104. 7, 105. 3, 114. 9, 119. 3, 123. 5, 124. 3, 127. 8, 150. 9, 156. 8, 161. 5, 163. 1, 178. 1 ;LRMS (ESI) m/z 695 (M⁺+H, 47) , 717 (M⁺+Na, 100) ;HRMS (ESI) C₄₀H₃₉O₁₁ (M⁺+H) 的计算值为 695. 2492, 测定值为 695. 2493。

[0200] 1,13-二[4'-(5-甲氧基-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷(35k):在硅胶上快速柱层析后得到作为白色固体的标题化合物(0.11g, 39%):m. p. :60-61 °C ;¹H NMR(CDCl₃) 3. 68-3. 72(m, 8H) , 3. 86(t, J = 4. 8Hz, 4H) , 3. 95(s, 6H) , 4. 14(t, J = 4. 4Hz, 4H) , 6. 61(s, 2H) , 6. 77(d, J = 8. 0Hz, 2H) , 6. 96(d, J = 8. 8Hz, 4H) , 7. 05(d, J = 8. 4Hz, 2H) , 7. 51(dd, J = 8. 0, 8. 0Hz, 2H) , 7. 77(d, J = 8. 8Hz, 2H) ;¹³C NMR(CDCl₃) δ 56. 4, 67. 5, 69. 5, 70. 6, 70. 8, 106. 3, 107. 5, 110. 0, 114. 8, 123. 6, 127. 6, 133. 5, 158. 1, 159. 6, 161. 0, 161. 3, 178. 2。

[0201] 1,13-二[4'-(6,7-二甲氧基-4H-苯并吡喃-4-酮-2-基)苯基]-1,4,7,10,13-五氧十三烷(35l):由丙酮结晶后得到作为白色固体的标题化合物(0.11g, 39%):m. p. :71-72 °C ;¹H NMR(CDCl₃) 3. 67-3. 71(m, 8H) , 3. 85(t, J = 4. 8Hz, 4H) , 3. 89(s, 6H) , 3. 95(s, 6H) , 4. 12(t, J = 4. 4Hz, 4H) , 6. 60(s, 2H) , 6. 85(s, 2H) , 6. 92(d, J = 8. 8Hz, 4H) , 7. 40(s, 2H) , 7. 71(d, J = 8. 8Hz, 4H) ;¹³C NMR(CDCl₃) δ 56. 1, 56. 3, 67. 5, 69. 4, 70. 6, 70. 7, 99. 5, 104. 0, 105. 3, 114. 8, 116. 9, 124. 0, 127. 5, 147. 3, 151. 9, 154. 1, 161. 2, 162. 5, 177. 3 ;LRMS (ESI) m/z 755 (M⁺+H, 48) , 777 (M⁺+Na, 100) ;HRMS (ESI) C₄₂H₄₂O₁₃Na (M⁺+Na) 的计算值为 777. 2523, 测定值为 777. 2512。

[0202] 聚乙二醇连接的芹菜素二聚物的效力

[0203] 评价以1至13个乙二醇单元连接的一系列芹菜素二聚物9a至9k在增强不同的MDR癌症细胞的敏感性时的效力。将它们的活性与芹菜素自身以及单体10a和10b的活性比较。还评价了它们逆转P-gp介导的药物流出的能力。

[0204] 近来的证据表明某些P-gp和MRP转运体与原生动物寄生虫利什曼原虫中的药物耐受性有关(Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2005, 5, 411-31)。在tarentolae利什曼原虫中对五价锑葡萄糖酸锑钠(SSG)的耐受性是由MRP成员(LtPGPA)引起的。据报道,喷他脒耐受性可能是由于喷他脒被其靶标——线粒体所排斥(Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem. J.* 1996, 315(Pt2), 631-4)。由于在癌症中的P-gp型MDR的调节中已考虑某些类黄酮,并且这些类黄酮已能够抑制诸如质膜ATP酶、环AMP-依赖型蛋白激酶和蛋白激酶C等各种ATP-结合蛋白,因此,在本发明中,可认为本发明的类黄酮二聚物会增强芹菜素结合至NBD的功效,从而使P-gp失活,由此调节对喷他脒和SSG具耐受性的利什曼原虫细胞中的MDR活性。

[0205] 材料和方法

[0206] 材料

[0207] DMSO, 维拉帕米、阿霉素、柔红霉素、长春新碱、长春碱、紫杉醇(taxol)和米托蒽

醌购自 Sigma-Aldrich。Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)、RPMI1640 培养基、胰蛋白酶-EDTA 和青霉素/链霉素来自 Gibco BRL。胎牛血清 (FBS) 来自 HyClone Laboratories。MTS、吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 和具有 P-糖蛋白的 Pgp-Glo™ 检测系统购自 Promega。人乳腺癌细胞系 MDA435/LCC6 和 MDA435/LCC6MDR 由 Robert Clarke 博士 (乔治敦大学, 华盛顿哥伦比亚特区) 友情提供。鼠类白血病细胞系 P388 和 P388/ADR 来自美国国家癌症研究所 (马里兰州, 美国)。

[0208] 癌症化学治疗中的药物耐受性

[0209] 细胞培养

[0210] 在分别补充了 10% FBS 的 DMEM 和 RPMI1640 培养基中供养 MDA435/LCC6 和 P388 (均为亲本和 MDR 亚型)。RPMI1640 培养基还包含 100 单位/ml 的青霉素和 100 μg/ml 的链霉素。在含有 5% CO₂ 的潮湿环境中于 37°C 培养细胞。用 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 溶液使 MDA435/LCC6 (均为野生型和 MDR 亚型) 细胞脱附。

[0211] 细胞增殖测试

[0212] 将 MDA435/LCC6 和 P388 (均为亲本和 MDR 亚型) 细胞分别以每孔 2000 至 5000 个细胞接种在 96 孔板中。添加含有或不含有类黄酮二聚物的不同浓度的抗癌药物 (阿霉素、柔红霉素、长春新碱、长春碱、紫杉醇, 米托蒽醌) 至最终体积为 200 μl, MDA435/LCC6 和 P388 (均为亲本和 MDR 亚型) 细胞分别生长 4 天和 3 天。对于 MDA435/LCC6 (均为亲本和 MDR 亚型), 在细胞附着后 (培育 24 小时) 添加相应的药物。为了测量细胞增殖, 根据生产商的说明书使用 cell Titer 96® Aqueous Assay (Promega)。简言之, 将 MTS (2mg/ml) 和 PMS (0.92mg/ml) 以 20:1 的比例混合。每孔添加 30 μl 的 MTS/PMS 混合物, 并在 37°C 培育 2 小时。然后采用 ELISA 微量滴定板读数仪 (Bio-Rad) 记录 490nm 处的光吸收。各实验以至少一式三份的方式进行, 重复两次。将抗癌药物的细胞毒性表示为存活的细胞相对于未处理的 DMSO (0.05%) 溶剂对照组的分数。抗癌药物的 IC₅₀ 或 IC₆₀ 分别表示抑制 50% 或 60% 的细胞生长的药物浓度。

[0213] 阿霉素累积

[0214] 在 6 孔板的每个孔中接种 2.5ml (10⁵ 细胞/ml) MDA435/LCC6 (均为亲本和 MDR 亚型)。细胞汇合后, 除去培养基。添加 2ml 含有调节剂的新鲜 DMEM, 并在 37°C 培育细胞 30 分钟。然后添加阿霉素 (最终浓度为 20 μM), 并在 37°C 培育 2 小时。然后通过胰酶消化法收集细胞。

[0215] 对于 P388 (均为亲本和 MDR 亚型) 细胞, 将 1ml (10⁵ 细胞) 汇合细胞分装在 Eppendorf 管中, 并在 37°C 与黄酮二聚物一起预培育 30 分钟。然后添加阿霉素 (最终浓度 10 μM), 并以 10 μM 的最终浓度在 37°C 培育 2 小时。通过利用 Eppendorf 微离心机以冷 PBS 洗涤细胞团块三次, 在 50% 乙醇中以 0.3N HCl 裂解细胞, 并超声粉碎 30 秒。以 10000rpm/分钟离心 3 分钟后, 保留上清液。采用分光荧光计测量阿霉素的荧光 ($\lambda_{\text{激发}} = 470\text{nm}$, $\lambda_{\text{发射}} = 585\text{nm}$)。

[0216] ATP 酶检测

[0217] 根据制造商的说明书, 采用具有人 P-gp 膜的 Pgp-Glo™ 检测系统测量 P-gp APT 酶活性。该检测所依靠的是萤火虫荧光素酶的发光反应的 ATP 依赖性。简言之, 将 25 μg P-gp 膜与 Na₃VO₄ (100 μM)、溶剂对照 (0.1% DMSO)、9d (100 μM)、维拉帕米 (100 μM) 或者维拉帕

米 (100 μ M) 加 9d (100 μ M) 一起在 37 $^{\circ}$ C 培育。通过添加 5mM MgATP 来引发 ATP 酶反应, 然后在 37 $^{\circ}$ C 培育 40 分钟。终止反应, 并通过添加 ATP 检测试剂以荧光素酶产生的发光信号检测残留的未代谢 ATP。经过 20 分钟的室温信号稳定期后, 在 BMG Fluostar 板发光计上读出发光值。P-gp ATP 酶活性表示为样品发光值相对于以 Na_3VO_4 处理过的样品的发光值的下降。

[0218] 结果

[0219] 单独的芹菜素二聚物 9a 至 9k 在 5 μ M 浓度以下对所测试的 MDR 细胞系无抗癌活性, 单体 10a 和 10b 在 10 μ M 浓度以下对所测试的 MDR 细胞系也无抗癌活性。因此, 选择 5 μ M 的芹菜素二聚物和 10 μ M 的单体来评价它们在下述检测中的化学增敏作用。

[0220] 类黄酮二聚物在 MDA435/LCC6MDR 细胞中逆转紫杉醇耐受性的作用

[0221] MDA435/LCC6 是雌激素 - 非依赖型人乳腺癌细胞系。其 MDR 亚型 (MDA435/LCC6MDR) 通过转换引导人 MDR1cDNA 的组成型表达的逆转录病毒载体, 形成具有典型 MDR1 耐药性模式的细胞系而产生 (MDA435/LCC6and MDA435/LCC6MDR1 :ascites models of human breastcancer. Br J Cancer1996, 73, 154-161)。测定了本发明的芹菜素二聚物在 MDA435/LCC6MDR 细胞中逆转紫杉醇耐受性的能力。紫杉醇是选择用于治疗乳腺癌的一线药物之一, 已证实紫杉醇耐受性是通过 P-gp 介导的。采用 5 μ M 的维拉帕米作为阳性对照。采用 10 μ M 的芹菜素单体 10a 和 10b 作为阴性对照。如图 3A 所示, 不同的二聚物不同程度地加强了紫杉醇的毒性。间隔基长度为 4 个 PEG 的化合物 9d 显示最显著的逆转活性, 将紫杉醇的 IC_{50} 从 115nM 降低到 4.4nM, 降低了约 26 相对倍数 (relative fold, RF)。其效力与维拉帕米 ($\text{IC}_{50} = 5.2\text{nM}$) 相当。间隔基长度为 2 个和 3 个 PEG 的化合物 9b 和 9c 也显著逆转紫杉醇耐受性, 分别将 IC_{50} 降低到 19.9nM 和 21.5nM, RF 分别为 5.8 和 5.4。不过, 间隔基短于 2 个 PEG 的二聚物 (9a) 或间隔基长于 5 个 PEG 的二聚物 (9e, 9f, 9h, 9j, 9k) 在 5 μ M 显示很小或不显示逆转作用。在这些实验中采用具有 3 个和 4 个 PEG 的芹菜素单体 (10a 和 10b) 作为阴性对照以确定抗癌耐药性逆转活性是否仅仅是由于合成的调节剂的二聚性质, 据发现, 即使以具有相同数目的乙二醇单元的二聚物 9c 和 9d 的浓度 (5 μ M) 的两倍浓度 (10 μ M) 使用所述阴性对照物, 其也仅具有很小的逆转作用。这些结果表明 9d、9c 和 9b 的调节活性是由于它们的二元结构, 而不是由于所存在的芹菜素部分的数目的简单增加。

[0222] 9d 在 MDA435/LCC6MDR 细胞中对紫杉醇耐受性的逆转也具有浓度依赖性 (图 3B)。浓度为 1 μ M 的 9d 能使 IC_{50} 降低约 1.9RF。增加 9d 的浓度进一步增加逆转活性, 当其为 5 μ M 时, 达到平台区。

[0223] 芹菜素二聚物在 MDA435/LCC6MDR 细胞中逆转对其他抗癌药物的耐受性的作用

[0224] 观察到不同的芹菜素二聚物在长春碱耐受性方面具有相似的化学增敏作用趋势 (图 4A)。图 4A 显示 9d 在加强长春碱的细胞毒性方面显示最大效力, 使 IC_{50} 从 4.8nM 下降至 0.36nM, 降低约 13RF。9d 的效力与维拉帕米的效力 ($\text{IC}_{50} = 0.25\text{nM}$) 相似。与 9d 相比, 化合物 9b 和 9c 的效力较低, 但仍具有非常高的活性, 分别使 IC_{50} 降至 0.61nM 和 0.87nM, 分别降低了 7.9RF 和 5.5RF。具有较短间隔基 (9a) 或具有较长间隔基 (9e, 9f, 9h, 9j, 9k) 的其他二聚物具有很小的活性或不具有活性。单体 10a 和 10b 即使以双倍浓度 (10 μ M) 使用也是无效的。化合物 9d 还在加强长春碱的细胞毒性方面显示出剂量依赖效应 (图 4B)。同样, 9d 在加强阿霉素细胞毒性方面比其他化合物更有效, 使 IC_{60} 从 4.7 μ M 降至 0.73 μ M,

下降了约 6RF (图 5)。化合物 9c ($IC_{60} = 1.3 \mu M$) 和 9b ($IC_{60} = 1.3 \mu M$) 也显示较高的效力, 使 IC_{60} 分别降低了约 3.6RF 和 3.1RF。具有较短 PEG (9a) 或具有较长 PEG (9e, 9f, 9h, 9j, 9k) 的芹菜素二聚物具有很小的阿霉素敏感性或不具有阿霉素敏感性。单体 (10a 和 10b) 也是无效的逆转剂。

[0225] 化合物 1d 可以将 MDA435/LCC6MDR 的 MRD 逆转至接近亲本水平

[0226] 由于化合物 9d 一直显示最高的对紫杉醇、长春碱和阿霉素的调节活性, 因此我们着力于研究 9d 是否能将 MDA435/LCC6MDR 的耐药性逆转至亲本水平 (MDA435/LCC6)。图 6A 至 6E 表明 $5 \mu M$ 的 9d 可将 MDA435/LCC6MDR 对长春碱、紫杉醇、阿霉素、长春新碱、柔红霉素的耐受性逆转至接近于亲本 (MDA435/LCC6) 水平的水平。在米托蒽醌中没有观察到作用 (图 6F)。逆转能力 [由存在或不存在 9d 时药物的 IC_{50} 的相对倍数变化 (relative fold change) 确定] 总结于表 1 中。范围为 7.6RF 至 41RF。对于长春碱和紫杉醇的逆转活性特别显著, 因为其 IC_{50} 可降低到几乎与在敏感对应物中的水平相同的水平。

[0227] 芹菜素二聚物对阿霉素在 MDA435/LCC6 和 MDA435/LCC6MDR 细胞中的细胞累积的作用

[0228] 为了理解不同的二聚物对各种抗癌药物的调节活性是否是由于它们对调节 P-gp 介导的药物流出的不同能力所致, 研究了它们在 MDA435/LCC6 敏感性和耐受性细胞中对阿霉素的累积的作用。阿霉素是 P-gp 的荧光药物底物, 在本实验中用于监控 P-gp 介导的药物流出。测定在存在或不存在芹菜素二聚物 ($10 \mu M$) 和单体 ($20 \mu M$) 的情况下阿霉素在这些细胞中的累积。采用维拉帕米作为阳性对照。

[0229] 结果示于图 7A 中。阿霉素在 LCC6 中的累积 (以 P-gp 表达作为基准水平) 不受溶剂对照 (DMSO) 或各种芹菜素单体、芹菜素二聚物或维拉帕米的处理的影响。对于 LCC6MDR 细胞而言, 发现当以 DMSO 对照处理时, 阿霉素的累积水平为 LCC6 的约 20%。这是由于在 LCC6MDR 细胞中发现的 P-gp 介导的阿霉素流出所致。不过, 这样的低水平累积通过以 9d 进行共处理而被完全逆转。在 $10 \mu M$ 时, 9d 使 LCC6MDR 细胞的阿霉素累积增加 5.8 倍。阿霉素的累积现在与以 9d 处理过的 LCC6 细胞的阿霉素累积几乎相同 (97%)。该效力与维拉帕米的效力 (6.2 倍) 相当。化合物 9c 和 9d 在 LCC6MDR 中也具有对紫杉醇、长春碱和阿霉素的药物耐受性逆转活性, 其也分别使阿霉素累积增强了对照的 4.5 倍和 4 倍。一般而言, 调节剂的阿霉素累积的逆转效力与它们在 LCC6MDR 中逆转阿霉素耐受性的效力非常类似。

[0230] 表 1: 9d 在 MDR 细胞中对化学治疗药物的细胞毒性的作用。如“材料和方法”中所示, 将各个细胞系与使用 / 不使用 $5 \mu M$ 的 9d 的一系列浓度的药物接触后, 确定各个细胞系的 IC_{50} 值。RF 代表药物敏感性的倍数变化。VP = 维拉帕米。

[0231]

| 药剂 | 处理 | 细胞系 | | | | | |
|------|-------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----|-----------------------|
| | | LCC6 MDR | | LCC6 | P388/ADR | | P388 |
| | | IC ₅₀ (nM) | RF ^a | IC ₅₀ (nM) | IC ₅₀ (nM) | RF | IC ₅₀ (nM) |
| 长春碱 | 药物 | 4.4 | 1 | 0.34 | 95 | 1 | 4.1 |
| | 药物+9d | 0.42 | 10 | | 4.3 | 22 | |
| | 药物+VP | 0.29 | 15 | | N.D. | | |
| 紫杉醇 | 药物 | 105 | 1 | 2.9 | 1636 | 1 | 22 |
| | 药物+9d | 4.8 | 22 | | 30 | 55 | |
| | 药物+VP | 5.2 | 20 | | N.D. | | |
| 阿霉素 | 药物 | 4690 | 1 | 300 | 1738 | 1 | 22 |
| | 药物+9d | 550 | 9 | | 123 | 14 | |
| | 药物+VP | 300 | 16 | | N.D. | | |
| 长春新碱 | 药物 | 26 | 1 | 0.29 | 299 | 1 | 2.2 |
| | 药物+9d | 0.63 | 41 | | 4.5 | 66 | |
| | 药物+VP | N.D. | | | N.D. | | |
| 柔红霉素 | 药物 | 977 | 1 | 79 | 2111 | 1 | 25 |
| | 药物+9d | 129 | 7.6 | | 106 | 20 | |
| | 药物+VP | N.D. ^b | | | 40 | 53 | |
| 米托蒽醌 | 药物 | 1442 | 1 | 0.35 | 395 | 1 | 4.3 |
| | 药物+9d | 646 | 2.2 | | 194 | 2 | |
| | 药物+VP | N.D. | | | N.D. | | |

[0232] ^aR. F. 相对倍数 = (无调节剂的 IC₅₀) 与 (有调节剂的 IC₅₀) 的比值。该值用作调节剂的逆转活性的强度指标。^bN. D. 未检测

[0233] 然后研究了 9d 在 P-gp 阳性细胞和阴性细胞中对阿霉素累积的剂量依赖效应, 并示于图 7B 中。发现 9d 以剂量依赖方式显著增加阿霉素在 MDA435/LCC6MDR 细胞中的累积, 但在敏感 MDA435/LCC6 细胞中则无此现象。当 9d 的浓度从 0 μM 增加至 10 μM 时, LCC6 的细胞内阿霉素浓度逐渐由 17% 增加至 88%。

[0234] 芹菜素二聚物逆转 P388/ADR 细胞中的抗癌毒性的作用

[0235] 上述数据显示芹菜素二聚物 (尤其是 9d) 有望在人乳腺癌细胞中逆转药物耐受性。如果这些芹菜素二聚物可通过抑制 P-gp 流出而调节 MDR, 则它们应当也能够调节其他 MDR 癌症。为了证实该推断, 测试了另一个对 ADR(adriamycin, 阿霉素的牌名) 有耐受性的、经充分表征的癌症 MDR 体系 P388/ADR 鼠类白血病细胞系。P388/ADR 已广泛用作 MDR 调节剂的临床前评价标准。

[0236] 与前述观察结果一致, 具有不同间隔基长度的芹菜素二聚物在 P388/ADR 细胞中显示不同的调节活性 (图 8A 和 9A)。而且, 9d 是最有效的调节剂, 使阿霉素和柔红霉素的 IC₅₀ 分别由 1.5 μM 和 2.1 μM 降至 0.15 μM 和 0.10 μM, 分别下降了约 10RF 和 21RF (图 8A 和 9A)。化合物 9d 还在逆转对于阿霉素 (图 8B) 和柔红霉素 (图 9B) 的耐受性方面显示出剂量依赖效应, 饱和浓度为约 5 μM。发现具有较短的间隔基长度的 9c 和 9b 显示适度的抑制性, 分别使阿霉素的 IC₅₀ 下降约 3RF 和 2RF, 使柔红霉素的 IC₅₀ 下降 4.6RF 和 2.5RF。具有比 9d 长的间隔基或者比 9b 短的间隔基的调节剂具有很小或不具有加强阿霉素和柔红霉素在 P388/ADR 细胞中的细胞毒性的作用。单体 10a 和 10b 即使以 9c 和 9b 所用浓度的两

倍添加,也仅显示较小的调节活性。不过,与MDA435/LCC6MDR细胞不同,9d的逆转活性不如维拉帕米好,维拉帕米在P388/ADR细胞中几乎能完全逆转阿霉素和柔红霉素耐受性(IC_{50} 分别为 $0.06\mu M$ 和 $0.04\mu M$)。上述结果表明芹菜素二聚物在LCC6MDR和P388/ADR细胞中均可抑制P-gp。药物耐受性逆转活性和芹菜素二聚物的间隔基长度之间的关系在这两种细胞系中几乎完全相同。

[0237] 化合物9d可将P388/ADR细胞的药物耐受性逆转至与敏感性亲本细胞系P388几乎相同的水平

[0238] 化合物9d也可以以不同程度加强其他P-gp底物对P388/ADR细胞的作用,所述P-gp底物包括阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、长春新碱和长春碱(图10A至10E)。在紫杉醇、长春新碱和长春碱的情况中, $5\mu M$ 的9d将P388/ADR的耐药性完全逆转至敏感水平(图10C、10D和10E),表明抗癌药物的流出被9d完全抑制。对米托蒽醌耐受性没有作用。这表明P388/ADR对米托蒽醌采取另外的对9d不敏感的MDR机制。通过 IC_{50} 的相对倍数变化确定的逆转能力总结于表1中。所述逆转能力在14RF至66RF范围内变化。

[0239] 芹菜素二聚物对阿霉素在P388和P388/ADR细胞中的细胞累积的作用

[0240] 研究了芹菜素二聚物影响阿霉素在P388和P388/ADR细胞中的累积的能力。在经DMSO处理的对照中,阿霉素在P388/ADR细胞中的累积为在P388细胞中的约33%,表明阿霉素流出(图11A)。在MDR细胞中添加不同的芹菜素二聚物可不同程度地抑制阿霉素的P-gp流出。与前面的结果一致,9d显示最高效力,使得阿霉素累积增长至对照的阿霉素累积的约2倍。化合物9b和9c也显示与9d相当的活性。另一方面,单体10b(浓度为二聚物浓度的两倍)或具有较长间隔基(9e,9k)或具有较短间隔基(9a)的其他芹菜素二聚物显示较小的活性或根本不显示活性。在P388/ADR中的药物耐受性逆转活性和芹菜素二聚物的间隔基长度之间的关系与在LCC6MDR细胞中所观察到的类似。相反,在亲本敏感P388细胞中的阿霉素累积几乎不受任何芹菜素二聚物、单体或维拉帕米的影响。当以各种浓度的9d将所述细胞预培育30分钟时,9d以剂量依赖方式显著增加P388/ADR细胞中的阿霉素累积,但在敏感P388细胞中则无此现象(图11B)。虽然9d显示最佳活性,但不能将耐受性P388/ADR细胞中的细胞阿霉素水平恢复至在敏感细胞中的水平,而维拉帕米则可以实现这一点(图11A)。这表明9d不能完全抑制P388/ADR中的阿霉素的P-gp流出。这与其细胞毒性调节作用不如维拉帕米高相一致(图10A)。

[0241] 9d对P-gp ATP酶活性的作用

[0242] 为了进一步研究9d和P-gp之间的相互作用,检测了9d($100\mu M$)对P-gpATP酶活性和维拉帕米诱导的ATP酶活性的作用。有趣的是,9d($100\mu M$)可将P-gp ATP酶活性增加至基准水平的3.3倍($P<0.0001$)(图12)。如同所预期的,维拉帕米(一种通过结合至底物结合点而起作用的众所周知的P-gpATP酶刺激剂)可将P-gp ATP酶水平增加至基准水平的7.4倍($P<0.0001$)。当也存在9d时,这样的维拉帕米诱导的P-gp ATP酶活性从7.4倍降低至6.1倍($P<0.0001$)。该结果表明9d与维拉帕米一样可刺激P-gp ATP酶活性,并且可能与维拉帕米的作用方式一样,也通过结合至P-gp的相同位点起作用。维拉帕米和9d($100\mu M$)对非P-gp ATP酶活性均无显著的作用(数据未示出)。

[0243] 聚乙二醇($n = 4$)连接的芹菜素类似物二聚物的生物活性:

[0244] 由于化合物9d显示出良好的对MDR细胞的逆转活性,因此还研究了具有相同的聚

乙二醇 ($n = 4$) 接头的各种芹菜素类似物二聚物的生物活性。研究了在存在 $5 \mu\text{M}$ 各种合成的类黄酮类似物二聚物 35a 至 35l 的情况中紫杉醇对 LCC6MDR 的 IC_{50} , 结果总结于表 2 中。许多这些类似物二聚物 (35a, 35b, 35f, 35g, 35h) 显示出比维拉帕米更强的逆转活性。

[0245] 总而言之, 上述结果已经明确地证明了通过不同长度的间隔基连接的类黄酮二聚物能够担当用于癌症的化学疗法治疗的共药 (co-drug)。确定了具有最优间隔基长度的芹菜素二聚物 (9d), 9d 通过显著增强抗癌药物的细胞内药物累积而在体外的乳腺和白血病 MDR 细胞中均显示出对抗癌药物的细胞毒性的 6RF 至 50RF 的提高。类黄酮二聚物的类似物也显示显著的抗癌药物的细胞毒性的提高。

[0246] 表 2: 类似物二聚物 35a 至 35l 对于紫杉醇对 LCC6MDR 细胞的细胞毒性的作用。如“材料和方法”中所示, 将 LCC6MDR 细胞与使用 $5 \mu\text{M}$ 所述化合物的一系列浓度的紫杉醇接触后, 确定 IC_{50} 值。

[0247] 在存在 $5 \mu\text{M}$ 浓度的各种合成的类黄酮二聚物类似物的情况下紫杉醇对 LCC6MDR 的 IC_{50}

| [0248] | 所添加的类似物 | 紫杉醇的平均 IC_{50} (nM) |
|--------|-----------------|------------------------------|
| [0249] | 无 (对照) | 128.2 |
| [0250] | 维拉帕米 (阳性对) | 8.1 |
| [0251] | 35a (均为 H) | 2.7 |
| [0252] | 35b (7-F) | 3.1 |
| [0253] | 35c (6-F) | 12.2 |
| [0254] | 35d (6-Cl) | 32.8 |
| [0255] | 35e (6-Br) | 20.9 |
| [0256] | 35f (6, 8-二氯) | 3.4 |
| [0257] | 35g (7-甲基) | 2.4 |
| [0258] | 35h (6-甲基) | 3.3 |
| [0259] | 35i (7-甲氧基) | 32.0 |
| [0260] | 35j (6-甲氧基) | 37.7 |
| [0261] | 35k (5-甲氧基) | 7.4 |
| [0262] | 35l (6, 7-二甲氧基) | 16.4 |

[0263] 在治疗寄生性疾病中通过类黄酮二聚物降低药物耐受性

[0264] 细胞系和细胞培养

[0265] 在该研究中采用豚鼠利什曼原虫 (LePentR50, Le野生型, LeMDR1-/- 和 LeMDR1-过度表达的 LeV160 突变体) 和杜氏利什曼原虫 (LdAG83, Ld2001 和 Ld39) 的前鞭毛体。前者是豚鼠的天然感染菌株, 后者是临床菌株, 可能导致人的内脏利什曼病。两种菌株均在 Schneider 的果蝇细胞 (*Drosophila*) 培养基 (Invitrogen) 中于 27°C 培养 4 天, 所述培养基的 pH 为 6.9, 其中补加有含 4mM 谷氨酰胺 (Sigma) 的 10% (体积 / 体积) 热失活胎牛血清 (Hyclone) 和 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素溶液 (Invitrogen) (Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. *Mol. Biochem. Parasitol* 1993, 60, 195-208)。

[0266] 在存在 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 喷他脒 (Sigma) 和 $3.5\text{mg}/\text{mL}$ 葡萄糖酸锑钠 (SSG) 的情况下分别

培养 LePentR50 (喷他脒耐受型, 喷他脒的 $IC_{50} = 117 \mu g/mL$), Ld2001 (葡萄糖酸锑钠耐受型, SSG 的 $IC_{50} = 4.1 mg/mL$) 和 Ld39 (葡萄糖酸锑钠耐受型, SSG 的 $IC_{50} = 6.4 mg/mL$) 的前鞭毛体。没有葡萄糖酸锑钠添加到野生型杜氏利什曼原虫 (LdAG83, SSG 的 $IC_{50} = 1.5 mg/mL$) 中。在存在 $160 \mu g/mL$ 长春碱的情况下培养 LeV160 的前鞭毛体。不将喷他脒和长春碱 (Sigma) 添加到 Le 野生型和 LeMDR1^{-/-} 突变体中。

[0267] 通过短暂离心 (spin down) 50mL 的四日龄前鞭毛体 (对数生长期后期) 制备杜氏利什曼原虫的无鞭毛体, 并将其转移到含 M199 培养基 (Gibco)、0.5% 的 Trypto 大豆酪蛋白、3mM L-半胱氨酸、15mM D-葡萄糖、5mM L-谷氨酰胺、4mM $NaHCO_3$ 、25mM HEPES、0.01mM 浴铜灵二磺酸 (bathocuproine-disulfonic acid) 和 0.023mM 氯化血红素的无菌培养基中。然后将细胞在 37°C 培育 24 小时。无鞭毛体变成卵形, 可用于药物累积检测。

[0268] 细胞活力检测

[0269] 采用四唑化合物 (MTS) 和电子偶合剂吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 通过 Cell Titer 96[®] Aqueous Assay (Promega) 测定前鞭毛体的活力。将前鞭毛体以 1×10^5 细胞 / 每孔接种在 96 孔平底微量滴定板中, 每孔中培养基的最终体积为 100 μL 。为了测定类黄酮二聚物对寄生虫的细胞毒性作用, 将各种浓度的类黄酮二聚物添加到前鞭毛体中。为了测定具有不同间隔基长度的类黄酮二聚物的逆转作用, 将各种浓度的抗利什曼原虫药物 (喷他脒或 SSG、长春碱和嘌呤毒素中的一种) 添加到含有或不含有类黄酮二聚物的孔中。将寄生虫在 27°C 培育 72 小时。各实验中以一式三份的方式测试含有或不含有类黄酮二聚物的各种浓度的抗利什曼原虫药物。将 2mg/mL MTS 和 0.92mg/mL PMS 以 20:1 (MTS:PMS) 的比例混合。培育 72 小时后, 将 10 μL MTS:PMS 混合物添加到微量滴定板的各个孔中。然后在 27°C 将所述板培育 4 小时以显色。培育 4 小时后, 采用自动微量滴定板读数仪 (Bio-Rad) 在 490nm 测定 OD 值。结果以存活% (含有测试化合物的各孔的 OD 值除以未处理的对照孔的 OD 值) 表示。

[0270] 通过 HPLC 检测喷他脒累积

[0271] 研究了类黄酮二聚物对喷他脒累积的作用。将 1mL 的四日龄前鞭毛体 (对数生长期后期, 细胞密度为约 2×10^8 细胞 / mL) 与 0.84mM 喷他脒和各种浓度 (包括 0 μM 、15 μM 、30 μM 和 60 μM) 的类黄酮二聚物 (9d) 一起于 27°C 在暗处培育 3 小时。在独立的实验中, 以一式三份的方式检测各浓度的 9d 并重复两次。培育 3 小时后, 以 pH7.4 的冷 PBS 洗涤寄生虫三次。然后将细胞团溶于 350 μL 的 75% 乙腈中, 并通过反复的冷融循环使细胞团裂解。细胞裂解后, 将裂解的细胞悬浮物于 4°C 在 14,000g 离心 10 分钟。收集上清液, 准备用于采用 HPLC (Agilent1100 系列) 测定喷他脒浓度。在保持在 40°C 的 Zorbax ODS C18 柱 (4.6mm \times 25cm, 5 微米) 上分析喷他脒蓄积。流动相由用于泵 A 的水 (10mM 四甲基氯化铵 (TMAC)、10mM 庚烷磺酸钠 (SHS)、4.2mM 磷酸 (PA)) 和用于泵 B 的含 75% 乙腈 (ACN) 的水 (10mMTMAC、10mM SHS、4.2mM PA) 组成。分析前将所述柱在 40°C 过夜以使之达到平衡。采用 1.0mL/ 分钟的流速和 265nm 处的信号, 以 58% 泵 A 和 42% 泵 B 进行分析。喷他脒的保留时间为 3.2 分钟。化合物 9d 在这些条件下不会流出。为了绘制标准曲线, 将 2.5mg 喷他脒羟乙基磺酸盐溶解在 21mL 75% 的 ACN (10mM TMAC、10mM SHS、4.2mM PA) 中, 从而配制出喷他脒羟乙基磺酸盐的 200 μM 储备溶液。然后通过连续稀释得到 100 μM 、50 μM 、25 μM 和 13 μM 的浓度, 使得能够绘制标准曲线。

[0272] 采用 ICP-MS 检测总锑 [Sb(III) 和 Sb(V)] 累积

[0273] 研究了类黄酮二聚物对葡萄糖酸锑钠 (SSG) 的累积的作用。由于无鞭毛体对 SSG 更敏感,因此与前鞭毛体相比,无鞭毛体累积更多的 SSG。因此,选择无鞭毛体用于研究 Sb 累积检测。将 1mL 的四日龄无鞭毛体 (2×10^8 细胞/mL) 与 0.05mM SSG 和不同浓度的类黄酮二聚物 (9d) (包括 $0 \mu\text{M}$ 、 $30 \mu\text{M}$ 和 $60 \mu\text{M}$) 一起在 37°C 培育 3 小时。在独立的实验中,以一式三份的方式检测各浓度的 9d 并重复两次。培育 3 小时后,以 pH7.4 的冷 PBS 洗涤寄生虫三次。然后于室温将细胞团在 $200 \mu\text{L}$ 浓硝酸中溶解 24 小时。以蒸馏水将样品稀释至 3mL,使得总 Sb 溶液的最终浓度为约 5ppb。然后将其注入 ICP-MS (Perkin-Elmer) 以进行定量。以铟 (In, $m/z = 115$) 作为内标来测定锑,其 m/z 比为 121 和 123。用于样品预处理的所有化学品都至少是分析级的,蒸馏水按原样直接使用,未经进一步纯化。

[0274] 结果

[0275] 喷他脒耐受型豚鼠利什曼原虫 (LePentR50) 和 SSG 耐受型杜氏利什曼原虫 (Ld39 和 Ld2001)

[0276] 采用三种药物耐受型利什曼原虫细胞系,即, LePentR50 (喷他脒耐受型豚鼠利什曼原虫)、Ld39 和 Ld2001 (SSG 耐受型杜氏利什曼原虫) 来研究本发明合成的类黄酮二聚物对药物耐受性的调节活性。LePentR50 是在发明人的实验室中通过逐步选择方式 (未发表) 得到的喷他脒耐受型豚鼠利什曼原虫细胞系。将其保存于存在 $50 \mu\text{g/mL}$ 喷他脒的条件下, IC_{50} 为约 $117 \mu\text{g/mL}$,而野生型豚鼠利什曼原虫 (Le) 的 IC_{50} 为约 $8.7 \mu\text{g/mL}$ (图 13A)。Ld39 和 Ld2001 是两种对五价锑葡萄糖酸锑钠 (SSG) (2) 具耐受性的杜氏利什曼原虫细胞系。Ld39 和 Ld2001 保存于存在 $3.5 \mu\text{g/mL}$ SSG 的条件下, IC_{50} 分别为约 6.1mg/mL 和 4.1mg/mL ,而野生型杜氏利什曼原虫 (LdAG83) 的 IC_{50} 为约 2.4mg/mL (图 13B)。

[0277] 合成的类黄酮二聚物对利什曼原虫寄生虫的体外细胞毒性

[0278] 通过基于 MTS 的细胞增殖法测定本发明的类黄酮二聚物在各利什曼原虫细胞系中的细胞毒性。表 3 总结了各合成调节剂对 LePentR50、LdAG83 和 L39 的 IC_{50} 值。喷他脒耐受型 LePentR50 对一些类黄酮二聚物 (9a 至 9f, 10a 和 10b) 相对更具耐受性, IC_{50} 范围是 $40 \mu\text{M}$ ~ 大于 $200 \mu\text{M}$ 。除 9c 和 9d 外,杜氏利什曼原虫 LdAG83 和 Ld39 对合成的类黄酮二聚物的敏感性与豚鼠利什曼原虫相当。发现 LdAG83 (9c 的 IC_{50} 为 $8 \pm 0.3 \mu\text{M}$, 9d 的 IC_{50} 为 $7 \pm 0.4 \mu\text{M}$) 和 Ld39 (9c 的 IC_{50} 为 $11 \pm 0.7 \mu\text{M}$, 9d 的 IC_{50} 为 $10 \pm 0.9 \mu\text{M}$) 对 9c 和 9d 比 LePentR50 更敏感。豚鼠利什曼原虫和杜氏利什曼原虫之间的物种差异仅限于芹菜素二聚物 9c 和 9d。这两个物种对芹菜素单体和具有 3 个乙二醇单元 (10a) 或 4 个乙二醇单元 (10b) 的芹菜素具有相等的敏感性 (表 3)。杜氏利什曼原虫 (LdAG83 和 Ld39) 对 9c 和 9d 的超敏性可能意味着这两个芹菜素二聚物可用作抗杜氏利什曼原虫剂。

[0279] 表 3. 杜氏利什曼原虫 (LdAG83 和 Ld39) 对 9c 和 9d 的超敏性可能意味着这两个芹菜素二聚物可用作抗杜氏利什曼原虫剂

[0280] 表 3. 合成的类黄酮对利什曼原虫寄生虫的 IC_{50}

[0281]

| | IC ₅₀ (μ M) | | |
|------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| | LePentR50 | LdAG83 | Ld39 |
| 9a | >200 ^a | 95 \pm 3.2 | 117 \pm 10 |
| 9b | >200 ^a | >200 ^a | >200 ^a |
| 9c | >200 ^a | 8 \pm 0.3 | 11 \pm 0.7 |
| 9d | >200 ^a | 7 \pm 0.4 | 10 \pm 0.9 |
| 9e | 70 \pm 3.0 | 30 \pm 1.2 | 42 \pm 2.3 |
| 9f | 40 \pm 5.3 | 11 \pm 2.0 | 13 \pm 0.6 |
| 9h-1 | ND | 12 \pm 0.2 | 14 \pm 0.1 |
| 9i | ND | 10 \pm 0.3 | 14 \pm 0.1 |
| 9j | ND | >200 ^a | >200 ^a |
| 9k-1 | ND | 50 \pm 7 | 60 \pm 3 |
| 10a | >200 ^a | >200 ^a | >200 ^a |
| 10b | >200 ^a | >200 ^a | >200 ^a |
| 芹菜素 | 55 \pm 2.6 | 32 \pm 4.1 | 43 \pm 5.9 |

[0282] 通过基于MTS的增殖检测测定了各合成黄酮的IC₅₀值。各IC₅₀值通过至少两次独立的实验获得,每次实验中测定一式三份。

[0283] ^a因为这些调节剂在所测试的最高浓度(200 μ M)不具有任何细胞毒性作用,所以无法测定IC₅₀值。

[0284] ND:没有测定这些调节剂的IC₅₀值,但观察到在12 μ M没有细胞毒性作用,12 μ M是用于研究药物耐受性调节活性的浓度的两倍。

[0285] 合成的类黄酮二聚物对调节LePentR50的喷他脒耐受性的作用

[0286] 经DMSO处理的LePentR50对喷他脒的IC₅₀为约117.0 \pm 3.0 μ g/mL(图14A)。6 μ M的化合物9c(n=3)(IC₅₀=40.0 \pm 2.7 μ g/mL,P<0.01)和9d(n=4)(IC₅₀=39.2 \pm 2.1 μ g/mL,P<0.01)显著降低LePentR50的IC₅₀,降低了约3倍(图14A)。具有更短的头(9a(IC₅₀=90 \pm 4.88 μ g/mL)和9b(IC₅₀=89.2 \pm 8.92 μ g/mL))或具有更长的接头长度(9e(IC₅₀=90 \pm 7.88 μ g/mL)、9f(IC₅₀=75 \pm 10.99 μ g/mL)、9h-1(IC₅₀=106 \pm 2.7 μ g/mL)、9i(IC₅₀=73 \pm 3.54 μ g/mL)、9j(IC₅₀=134 \pm 5.4 μ g/mL)和9k-1(IC₅₀=130 \pm 6.1 μ g/mL))的其他类黄酮二聚物具有小于一半的调节活性或没有调节活性(图14A)。类黄酮二聚物的接头长度和调节活性之间的“U”型关系可能表明芹菜素部分的靶标之间存在相对确定的间隔。具有三个或四个乙二醇单元的芹菜素单体对照化合物(10a和10b)即使以两倍浓度(12 μ M)使用也不显示任何调节活性(图14A;IC₅₀分别为100.0 \pm 5.0 μ g/mL和98.5 \pm 8.5 μ g/mL)。这可能表示9c和9d的调节活性实际上是由于它们的二聚性质。芹菜素部分的简单的摩尔数增加不导致任何显著的调节活性。作为对照,n=3和4(三PEG接头和四PEG接头)的接头不具有任何逆转作用(图14A)。

[0287] 合成的类黄酮二聚物对调节Ld39和Ld2001的SSG耐受性的作用

[0288] 还研究了本发明的类黄酮二聚物对调节Ld39和Ld2001前鞭毛体的SSG耐受性的作用。在所述类黄酮二聚物中(以6 μ M使用),9c和9d在调节杜氏利什曼原虫Ld39前鞭毛体的SSG耐受性方面是最有效的。Ld39的SSG IC₅₀由6.4 \pm 0.7mg/mL(经DMSO处理)降至2.3 \pm 0.2mg/mL(经9c处理)和2.3 \pm 0.3mg/mL(经9d处理)(图14B)。与在LePentR50中的喷他脒耐受性相似,具有较短接头(9a和9b)或具有较长接头(9e至9j)的化合物不显示实质的SSG耐受性调节活性(图14B)。芹菜素10a和10b即使以12 μ M使用也不显示

任何显著的调节活性（图 14B）。 $n = 3$ （三 PEG 接头）或 $n = 4$ （四 PEG 接头）的对照接头也无效果（图 14B）。

[0289] 实质上,当研究其他 SSG 耐受型杜氏利什曼原虫 Ld2001 时,观察到相似的模式（图 14C）。化合物 9c 和 9d 是最有效的,可将 Ld2001 的 SSG IC_{50} 由 6.6mg/mL(DMSO 对照)分别降至 1.5mg/mL(9c) 和 1.0mg/mL(9d)（图 14C）。

[0290] 不过,所有的合成类黄酮调节剂（包括 9c 和 9d）对 SSG 敏感型的野生型杜氏利什曼原虫 LdAG83 均不具有调节作用。含有或不含有任何调节剂时, IC_{50} 值都保持几乎相同（图 14D）。这可能表明 9c 和 9d 特异性靶向在 SSG 耐受型寄生虫中唯一存在或足量存在的蛋白质,而该蛋白质在 SSG 敏感型寄生虫中不存在或很少表达。

[0291] 合成的类黄酮二聚物 9c 和 9d 对 LePentR50 中的喷他脒耐受性和喷他脒累积显示剂量依赖性调节活性

[0292] 根据上述结果研究了两种最有效的调节剂,即 9c（含 3 个乙二醇单元）和 9d（含 4 个乙二醇单元）对调节 LePentR50 的喷他脒耐受性的剂量作用。当单独以 60 μ g/ml 喷他脒处理时,LePentR50 的存活率仅略微下降（是未处理的 $94.0 \pm 2.3\%$ ）。不过,以 60 μ g/ml 的喷他脒和渐增浓度的 9c 一起处理时,导致 LePentR50 的存活率的逐渐降低,表明 9c 可以以剂量依赖方式调节 LePentR50 的喷他脒耐受性（图 15A）。9c 的 EC_{50} （在存在 60 μ g/ml 喷他脒时,导致 LePentR50 存活率为 50% 的 9c 有效浓度）为约 1.85 μ M。对于化合物 9d 也进行了类似的观察（图 15B）。对于 9d,浓度高达 6 μ M 时仍未观察到毒性。9d 的 EC_{50} 为约 0.94 μ M。因此化合物 9d 在调节 LePentR50 的喷他脒耐受性方面的效果是 9c 的约两倍。

[0293] 也研究了 9d 对 LePentR50 的喷他脒累积的作用。采用更高浓度的 9d（15 μ M、30 μ M 和 60 μ M）和更短的培育时间（3 小时）以测定喷他脒累积。化合物 9d 可以以剂量依赖方式增加 LePentR50 的喷他脒累积（图 16）。当 9d 的浓度由 0 增加至 15 μ M、30 μ M 和 60 μ M 时,LePentR50 的分子内喷他脒浓度由 $2.0 \pm 0.2 \mu$ M 喷他脒 /mg 蛋白质分别逐渐增加至 $2.95 \pm 0.01 \mu$ M 喷他脒 /mg 蛋白质、 $4.69 \pm 0.51 \mu$ M 喷他脒 /mg 蛋白质和 $26.6 \pm 0.6 \mu$ M 喷他脒 /mg 蛋白质（图 16）。这表明 9d 通过增加喷他脒累积调节 LePentR50 的喷他脒耐受性。以 60 μ M 的 9d 培育 LePentR50 3 小时不产生任何细胞毒性（数据未示出）。因此,据信喷他脒累积的剂量依赖性增加是由于 9d 的调节作用,而不是由于其对 LePentR50 的细胞毒性作用。

[0294] 合成的类黄酮二聚物 9c 和 9d 对 Ld39 细胞中的 SSG 耐受性和 SSG 累积显示剂量依赖性调节活性

[0295] 与 LePentR50 类似,9c 和 9d 均对 Ld39 前鞭毛体的 SSG 耐受性显示剂量依赖性调节作用（图 17A 和 17B）。4 μ M 的 9c 或 9d 可将 Ld39 的 SSG 耐受性水平恢复至 LdAG83 敏感菌株的水平（图 17A 和 17B）。据信 9d 的调节作用对仅存在于 Ld39 上的靶蛋白具有特异性,这是因为即使以高达 6 μ M 的浓度使用,9d 对 LdAG83 的 SSG 敏感性也不具任何调节作用（图 17C）。

[0296] 已研究了 9d 对杜氏利什曼原虫无鞭毛体的 SSG 累积的作用。通过使寄生虫在 37°C 适应 24 小时来产生无菌无鞭毛体。光学显微镜显示细胞已圆起（round up）（数据未示出）。

[0297] 在 SSG 累积实验中,采用了更高浓度的 9d(30 μ M 和 60 μ M) 和更短的培育时间 (3 小时) 以测定 SSG 累积。不存在 9d 时, Ld39 和 Ld2001 的 SSG 累积分别是 LdAG83 的 SSG 累积的 28% 和 15% (图 17D)。以 30 μ M 的 9d 处理时, Ld39 和 Ld2001 的 SSG 累积分别增加至 LdAG83 的 SSG 累积的 74% 和 83% (图 17D)。当 9d 的浓度进一步增加至 60 μ M 时, Ld39 和 Ld2001 的 SSG 累积分别是 LdAG83 的 SSG 累积的 90% 和 69% (图 17D)。相反,以 9d(30 μ M 或 60 μ M) 处理的 SSG 敏感性 LdAG83 中的 SSG 累积与不经任何处理的细胞中的 SSG 累积没有明显区别,表明二聚物 9d 似乎可以特异性地抑制仅存在于 SSG 耐受型菌株中的 ABC 转运体的功能 (图 17D)。当处理 3 小时,化合物 9d 在 60 μ M 对杜氏利什曼原虫不具有任何细胞毒性 (数据未示出),证实了 SSG 累积的增加是由于 9d 的调节作用,而不是由于其细胞毒性作用。

[0298] 9c 和 9d 的调节活性与其他传统 MDR 调节剂的调节活性的比较

[0299] 比较了 9c 和 9d 的调节活性与维拉帕米、利血平、奎宁、米帕林、奎尼丁的调节活性。对于 LePentR50 而言,调节剂 9c ($IC_{50} = 47 \pm 1.2 \mu$ g/mL) 和 9d ($IC_{50} = 35 \pm 2.3 \mu$ g/mL) 的调节活性与利血平 ($IC_{50} = 40 \pm 1.3 \mu$ g/mL) 和米帕林 ($IC_{50} = 28.7 \pm 1.3 \mu$ g/mL) 的调节活性相似,分别是约 2.7、3.7、3.2 和 4.5 倍喷他脒增敏性 (图 18A)。相反,当采用维拉帕米、奎宁和奎尼丁时,仅显示小于半倍的增敏性 (图 18A)。关于 Ld39 中的 SSG 耐受性调节活性,只有 9c 和 9d 是有效的 (IC_{50} 分别为 2.3 ± 0.1 mg/mL 和 1.8 ± 0.05 mg/mL), 呈现 3.1 倍和 3.9 倍的 SSG 增敏性 (图 18B)。其他传统的 MDR 化学增敏剂均不显示任何调节作用 (维拉帕米、利血平、奎宁、米帕林、奎尼丁的 IC_{50} 分别为 7.2 ± 0.54 mg/mL、 7.2 ± 0.3 mg/mL、 7.0 ± 0.21 mg/mL、 6.7 ± 0.11 mg/mL 和 7.2 ± 0.04 mg/mL) (图 18B)。

[0300] 本发明的类黄酮二聚物的靶标不是 LeMDR1

[0301] 本发明的类黄酮二聚物也可能通过两个 NBD 结合至 ABC 转运体。已通过研究合成的类黄酮二聚物对三种豚鼠利什曼原虫细胞系 [即,野生型 Le, LeMDR1 敲除型 (LeMDR1^{-/-}) 和 LeMDR1 过度表达型 (LeV160)] 的调节作用,研究了豚鼠利什曼原虫中的 ABC 转运体、LeMDR1 是否是合成的类黄酮二聚物的靶标的可能性。发现喷他脒耐受性与 LeMDR1 的复制数负相关。LeMDR1^{-/-}、Le 和 LeV160 的喷他脒 IC_{50} 分别是 $18.9 \pm 0.8 \mu$ g/mL、 $12.0 \pm 0.8 \mu$ g/mL 和 $9.0 \pm 0.1 \mu$ g/mL (表 4)。当测试合成的类黄酮二聚物组对 LeMDR1^{-/-} 的喷他脒耐受性的调节活性时,发现 9c 和 9d 是有效的,分别将喷他脒的 IC_{50} 降低至 $5 \pm 0.3 \mu$ g/mL 和 $4.6 \pm 0.4 \mu$ g/mL, 呈现 3.8 倍和 4.1 倍的增敏性 (表 4)。化合物 9b ($IC_{50} = 9.4 \pm 0.4 \mu$ g/mL) 和 9h-1 ($IC_{50} = 8.2 \pm 0.5 \mu$ g/mL) 分别显示 2.0 倍和 2.3 倍的增敏性。不过,9a ($IC_{50} = 18 \pm 1.0 \mu$ g/mL)、9e ($IC_{50} = 12.5 \pm 0.1 \mu$ g/mL)、9f ($IC_{50} = 12.5 \pm 0.8 \mu$ g/mL)、9i ($IC_{50} = 13.8 \pm 0.7 \mu$ g/mL)、9j ($IC_{50} = 20.9 \pm 1.3 \mu$ g/mL) 和 9k-1 ($IC_{50} = 20.9 \pm 3 \mu$ g/mL) 提供小于一半或很小的增敏作用 (表 4)。对所有的类黄酮二聚物进行分析时,发现乙二醇接头长度和喷他脒耐受性调节活性之间存在“U”型关系。这与在 LePentR50 中所发现的 (图 14A) 相似。

[0302] 在 Le 野生型细胞中,9d ($IC_{50} = 4 \pm 0.3 \mu$ g/mL) 显著降低喷他脒的 IC_{50} , 由 $12.0 \pm 0.8 \mu$ g/mL 降低至 $4.0 \pm 0.8 \mu$ g/mL (降低约 3 倍) (表 4)。在 LeMDR1 过度表达型 LeV160 中,9c ($IC_{50} = 5.0 \pm 0.4 \mu$ g/mL) 和 9d ($IC_{50} = 4.7 \pm 0.1 \mu$ g/mL) 略微降低喷他脒的 IC_{50} , 由 $9.0 \pm 0.1 \mu$ g/mL 分别降低至 $5.0 \pm 0.4 \mu$ g/mL 和 $4.7 \pm 0.1 \mu$ g/mL (降低约 1.8 倍和

1.9 倍) (表 4)。不过, 化合物 9e ($IC_{50} = 7.5 \pm 0.3 \mu g/mL$)、9f ($IC_{50} = 7.2 \pm 0.3 \mu g/mL$) 和 9i ($IC_{50} = 6.8 \pm 0.2 \mu g/mL$) 不提供增敏作用。

[0303] 表 4. 合成的类黄酮二聚物对 LeMDR1 突变体的喷他脒耐受性的作用

[0304]

| | 喷他脒的 $IC_{50}(\mu g/ml)$ | | | 长春碱的 $IC_{50}(\mu g/ml)$ | 嘌呤毒素 $IC_{50}(\mu g/ml)$ |
|------|--------------------------|----------|---------|-----------------------------|-----------------------------|
| | <i>LeMDR1</i> -/- | Le | LeV160 | LeV160 | LeV160 |
| 无调节剂 | 18.9±0.8 | 12.0±0.8 | 9.0±0.1 | 167.0±3.6 | 16.0±1.0 |
| 9a | 18.0±1.0 | - | - | 170.0±7.0 | - |
| 9b | 9.4±0.4 | - | - | 160.0±6.0 | - |
| 9c | 5.0±0.3 | - | 5.0±0.4 | 134.0±6.0 | 13.0±0.5 |
| 9d | 4.6±0.4 | 4.0±0.3 | 4.7±0.1 | 140.0±2.3 | 15.0±0.6 |
| 9e | 12.5±0.1 | - | 7.5±0.3 | 170.0±2.3 | 19.0±0.4 |
| 9f | 12.5±0.8 | - | 7.2±0.3 | 165.0±2.3 | 17.0±1.0 |
| 9h-1 | 8.2±0.5 | - | - | 160.0±8.0 | - |
| 9i | 13.8±0.7 | - | 6.8±0.2 | 165.0±2.3 | 19.0±0.8 |
| 9j | 20.9±1.3 | - | - | 170.0±4.0 | - |
| 9k-1 | 20.9±3.0 | - | - | 150.0±6.0 | - |

[0305] 通过基于 MTS 的增殖检测测定各药物的 IC_{50} 值。

[0306] 各 IC_{50} 值由至少三次独立的实验获得, 各实验中测定一式三份。

[0307] “-”表示未测定。

[0308] 本发明的类黄酮二聚物可调节喷他脒耐受性而与 LeMDR1 的复制数无关, 这一观察结果表明 LeMDR1 不是所述合成的类黄酮二聚物的靶标, 已知 LeMDR1 是造成豚鼠利什曼原虫中的长春碱和嘌呤毒素耐受性的原因 (Sequence requirements of the ATP-binding site within the C-terminal nucleotide-binding domain of mouse P-glycoprotein: structure-activity relationships for flavonoid binding. *Biochemistry* 2001, 40, 10382-91)。发现各类黄酮二聚物对长春碱和嘌呤毒素的耐受性均不具有任何显著的调节活性 (表 4), 进一步表明合成的类黄酮二聚物并非靶向 LeMDR1。

[0309] 讨论

[0310] 利什曼原虫中的各种 ABC 转运体与介导药物耐受性有关 (Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr. Drug Targets Infect Disord* 2005, 5, 411-31)。这些 ABC 转运体包括杜氏利什曼原虫中的 Lmdr1、亚马逊利什曼原虫中的 Lamdr1 和 Lamdr2、tarentolae 利什曼原虫中的 LtpgpA、热带利什曼原虫中的 Ltmdr1、豚鼠利什曼原虫中的 Lemdr1、墨西哥利什曼原虫中的 LmepgpA、硕大利什曼原虫中的 LmpgpA 和硕大利什曼原虫中的 PEN。根据结构, 可将其分成 ABCB 型 (Lmdr1, Lamdr1, Lamdr2, Ltrmdr1, Lemdr1 和 PEN) 和 ABCC 型 (LtpgpA, LmepgpA 和 LmpgpA)。ABCB 和 ABCC 转运体均具有两个 NBD, 因此是类黄酮的潜在靶标。

[0311] 受到 MDR 调节剂缺乏特异性以及对 ABC 转运体的药物结合点的亲和力较低的限制, 目前无法成功地战胜 MDR。

[0312] 上述结果显示出发明的类黄酮二聚物可抑制并逆转寄生性疾病中的喷他脒耐受性, 特别是由利什曼原虫类导致的那些寄生性疾病。具有两个通过三个或四个乙二醇单元连接的芹菜素的化合物 9c 或 9d 对喷他脒耐受性和 SSG 耐受性均显示最高的调节活性,

IC₅₀ 降低约 3 倍。具有更长或更短的接头长度的本发明的其他类黄酮二聚物也显示较低的调节活性或不显示调节活性。即使以两倍浓度 (12 μ M) 使用, 接头中具有相同数目的乙二醇的芹菜素单体 (10a 和 10b) 也不具有任何调节活性。这证明本发明的类黄酮二聚物 (特别是 9c 和 9d) 的调节活性不是由于结合至 ABC 转运体上的类黄酮的浓度加倍, 而是由于这两个芹菜素之间的乙二醇单元的链长度的作用。在逆转喷他咪耐受性和 SSG 耐受性方面具有最佳性能的链长度是 3 至 4 个乙二醇单元。以 9c 和 9d 处理使得喷他咪和 SSG 的累积以剂量依赖性的方式增加。该结果可能间接表明流出物转运体正通过降低药物累积来介导喷他咪和 SSG 耐受性。

[0313] 与其他传统 MDR 调节剂相比, 9c 和 9d 显示与利血平和米帕林相当的喷他咪耐受性逆转活性。在 SSG 耐受性的情况中, 9c 和 9d 具有显著的调节活性, 而传统 MDR 调节剂均不起作用。

[0314] 虽然已通过实施例详细描述了本发明的优选实施方式, 但本发明的修改和调整对本领域技术人员是显而易见。此外, 不应将本发明的实施方式解释为仅限于实施例或附图。不过, 特别应当理解的是, 这样的修改和调整都在下面的权利要求所限定的本发明的范围内。例如, 作为一个实施方式的一部分列举或描述的特征可用于其他实施方式以得到另一个实施方式。因此, 本发明意图涵盖包含在权利要求范围内的这样的修改和调整以及它们的等同物。

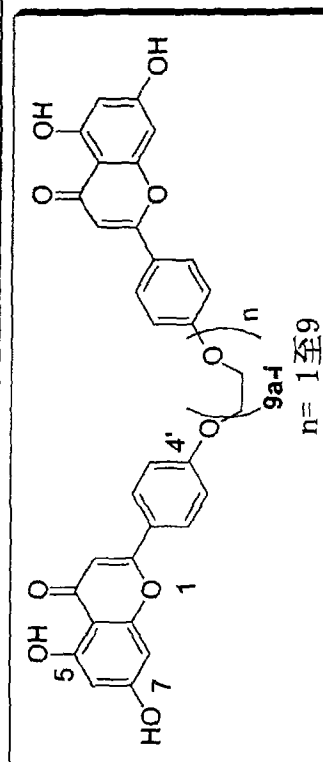
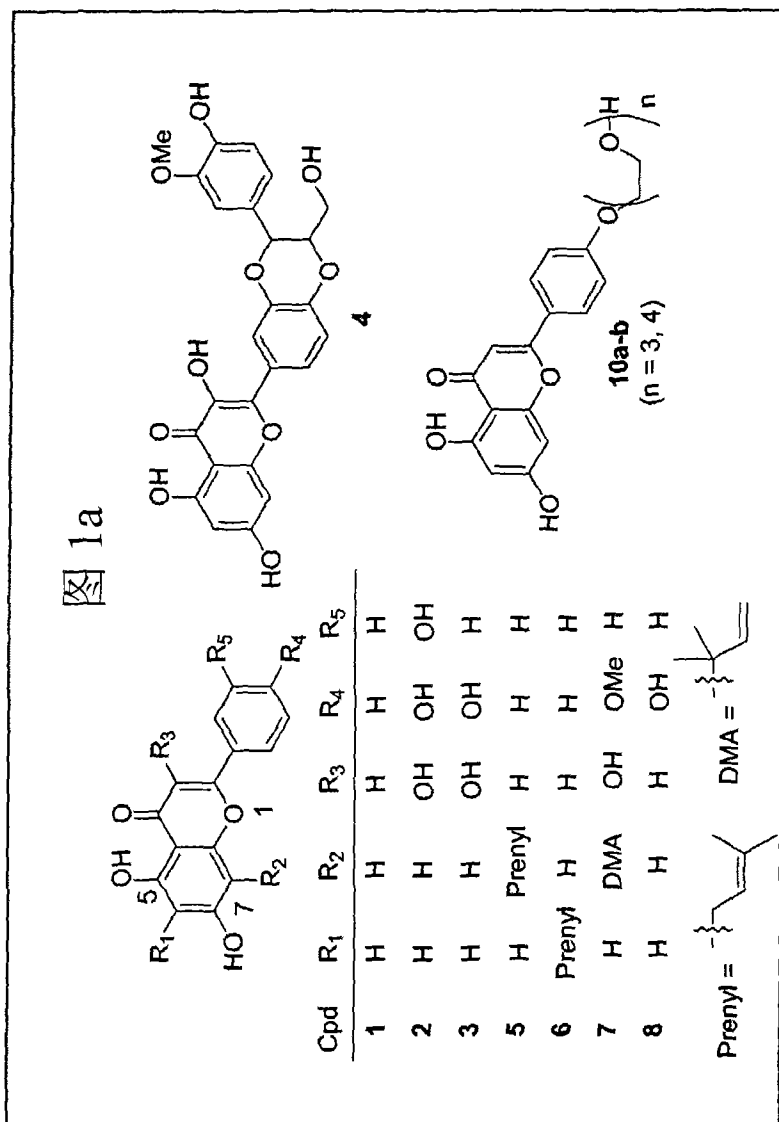


图 1b

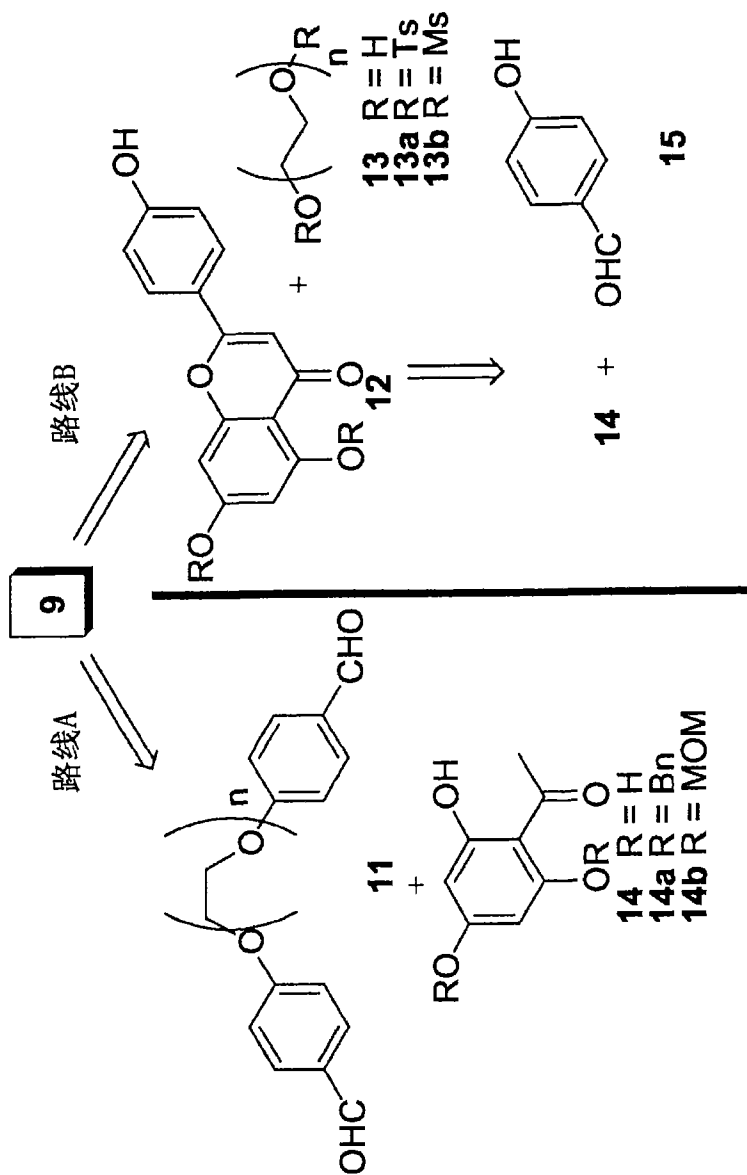


图 2

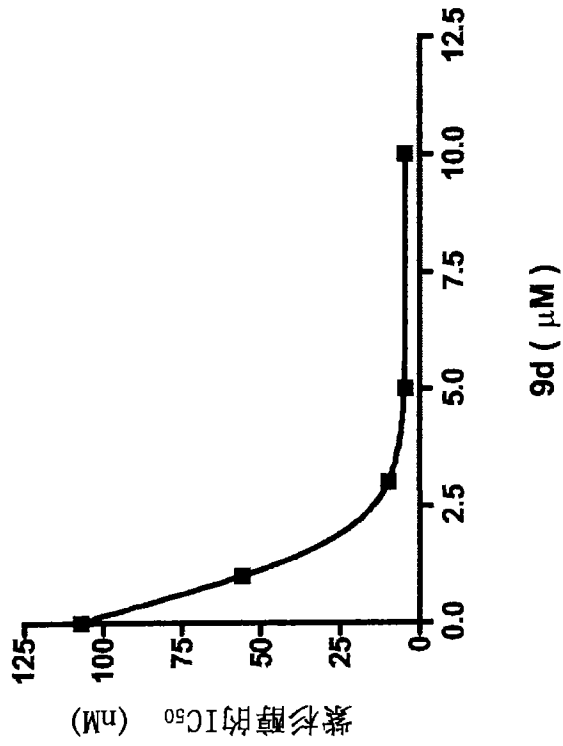


图 3B

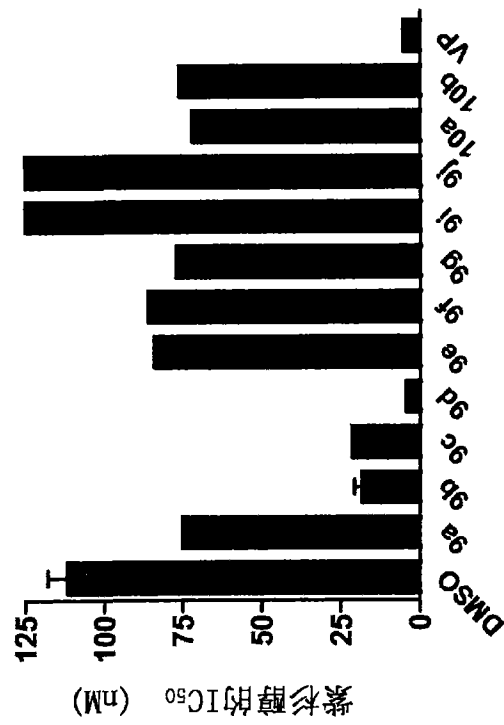


图 3A

图 3

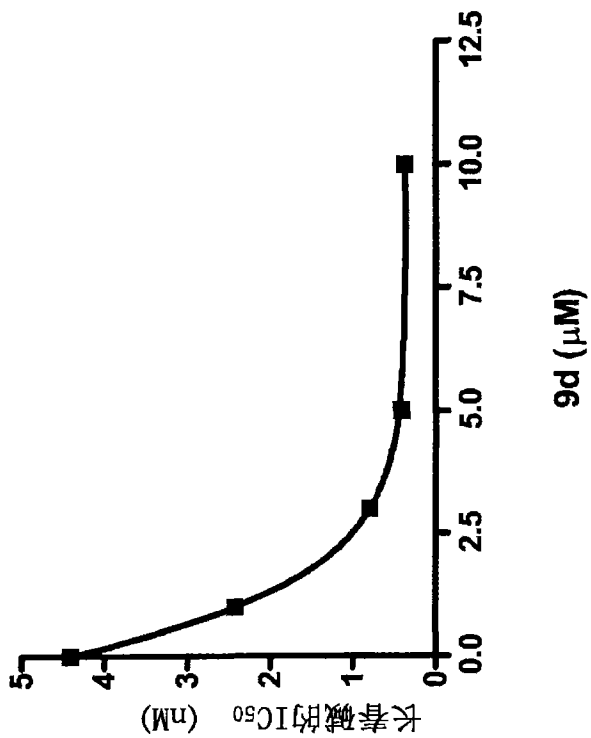


图 4B



图 4A

图 4

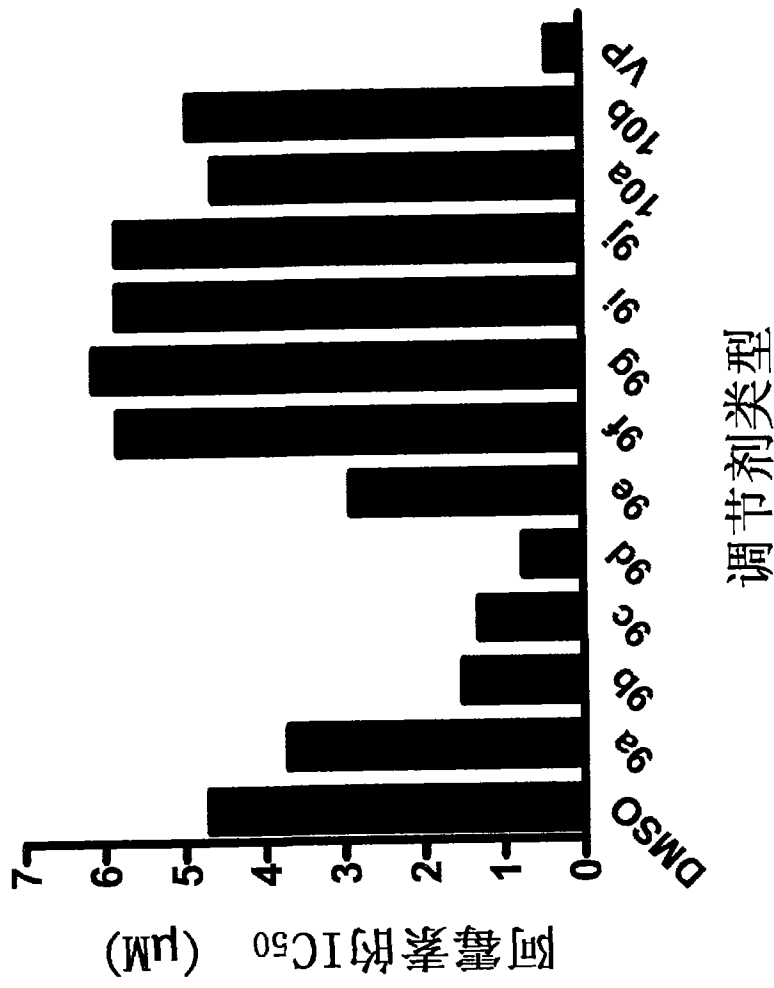


图 5

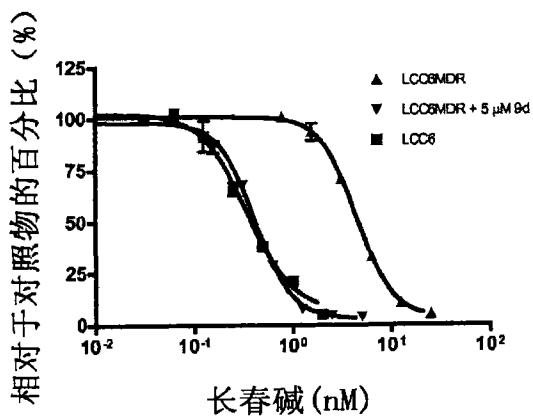


图 6A

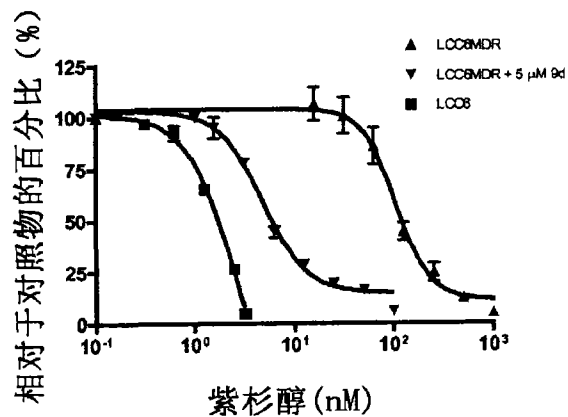


图 6B

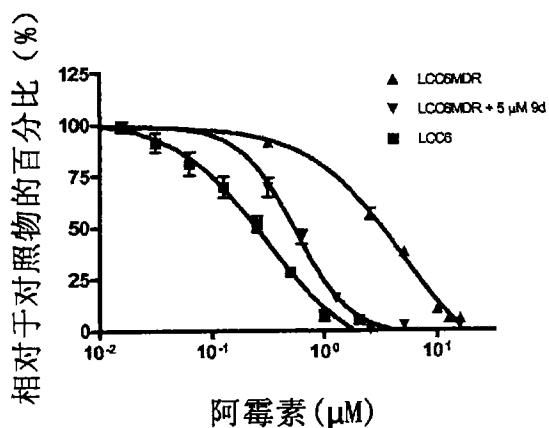


图 6C

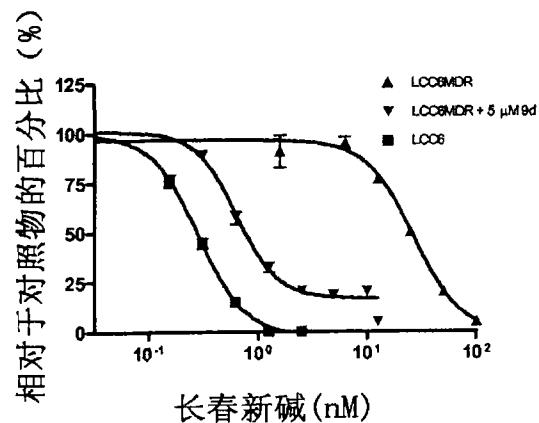


图 6D

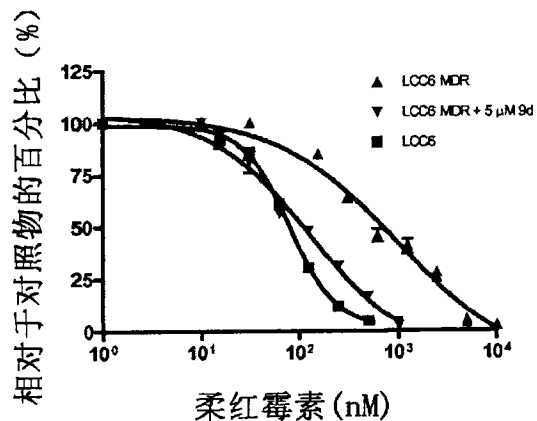


图 6E

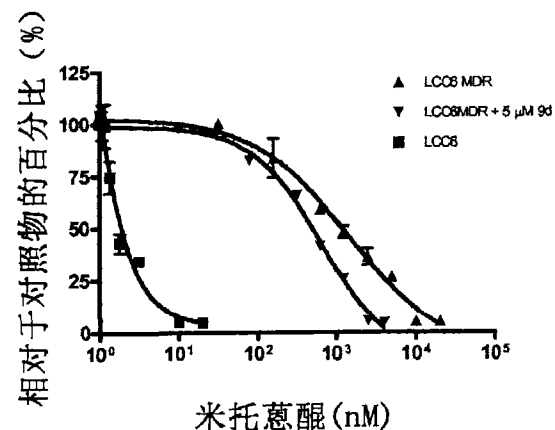


图 6F

图 6

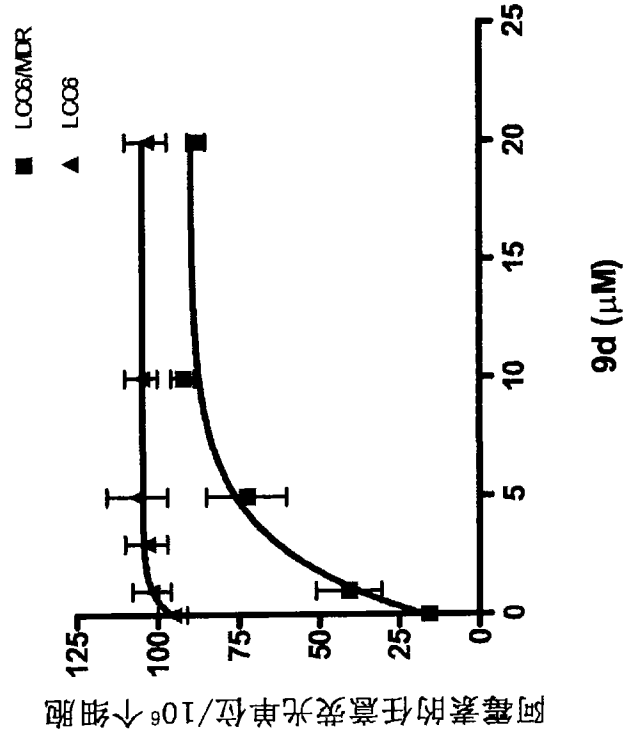


图 7B

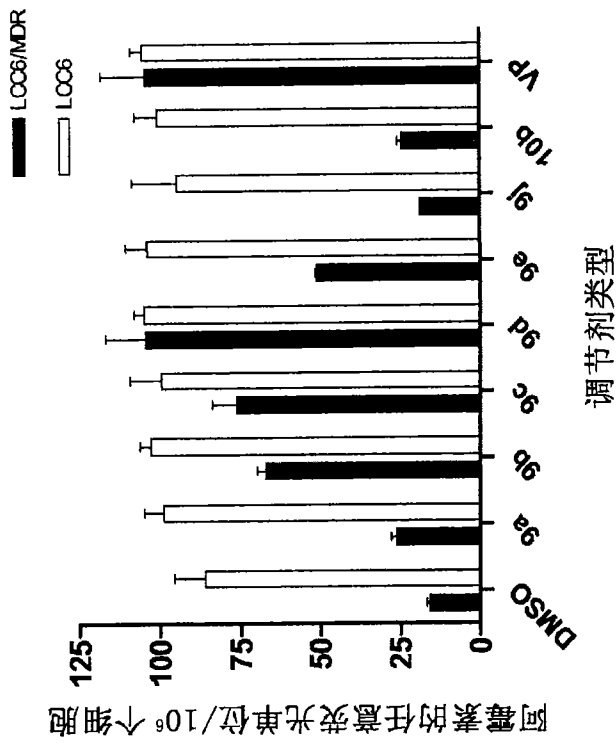


图 7A

图 7

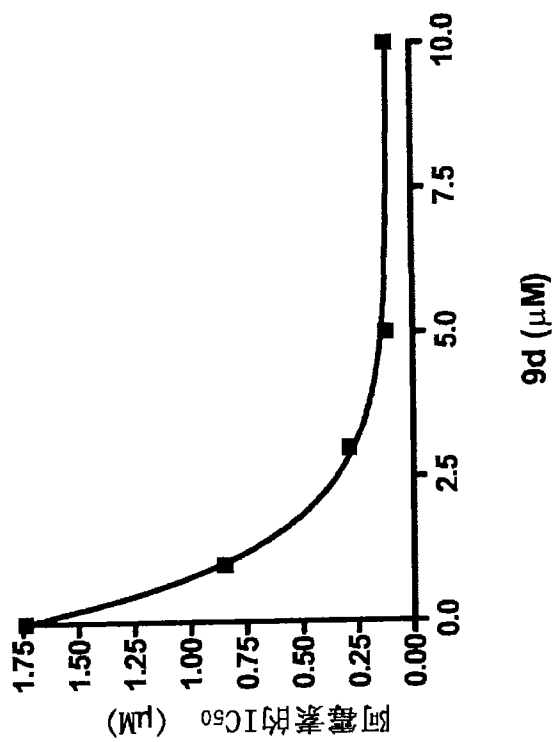


图 8B

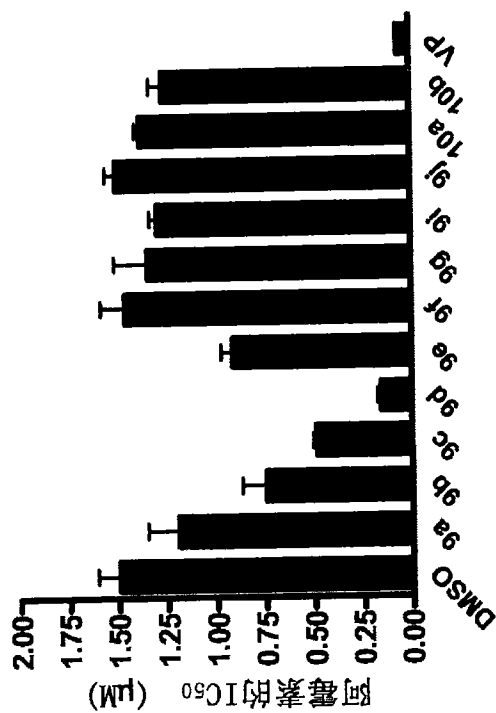


图 8A

8

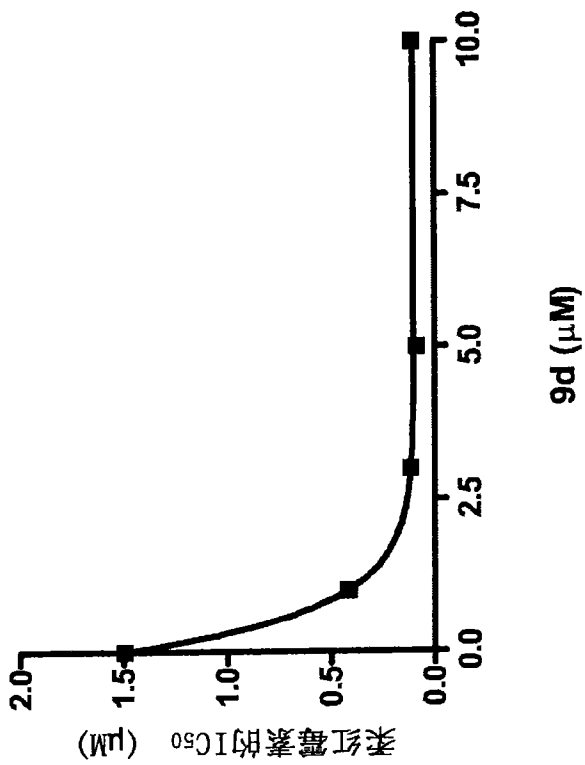


图 9B

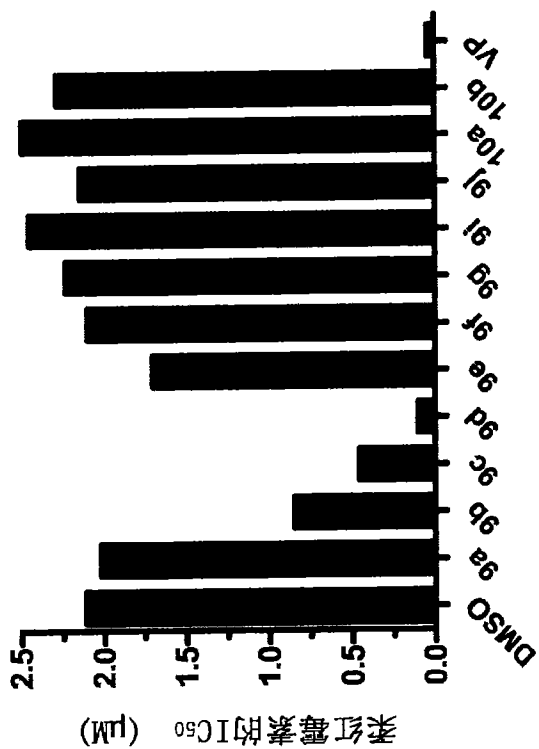


图 9A

图 9

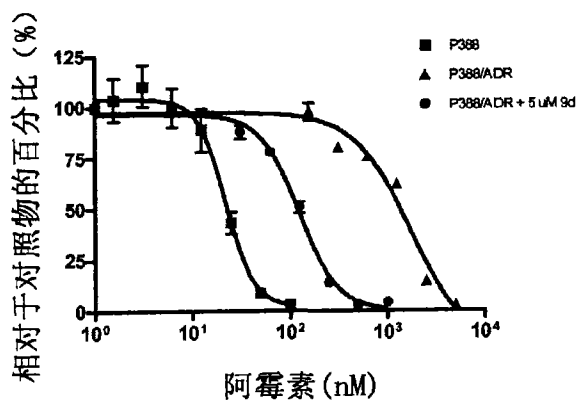


图 10A

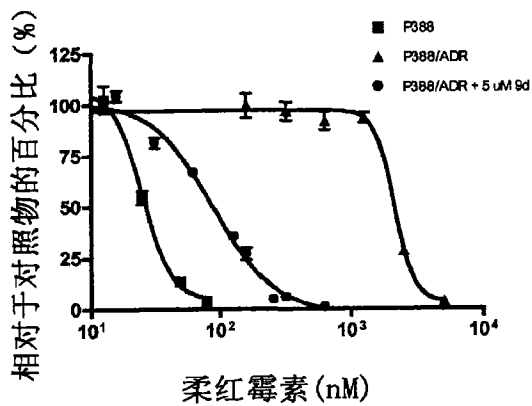


图 10B

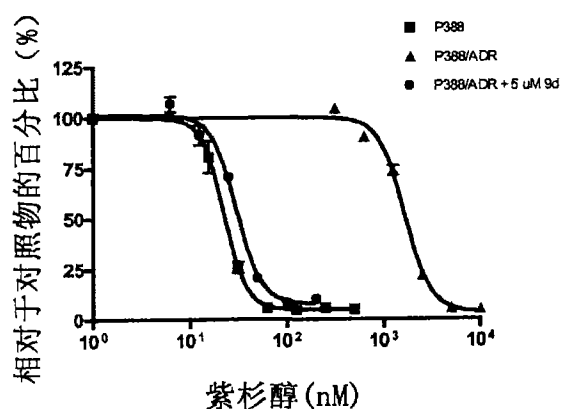


图 10C

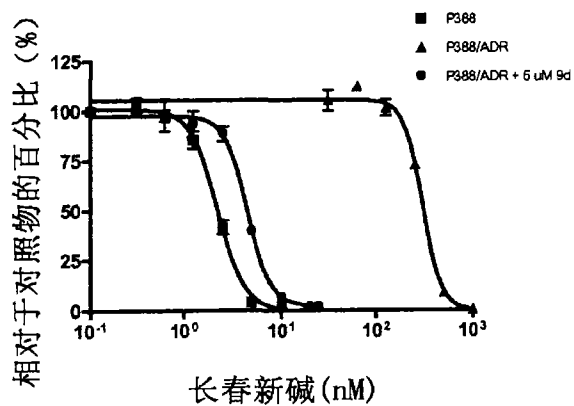


图 10D

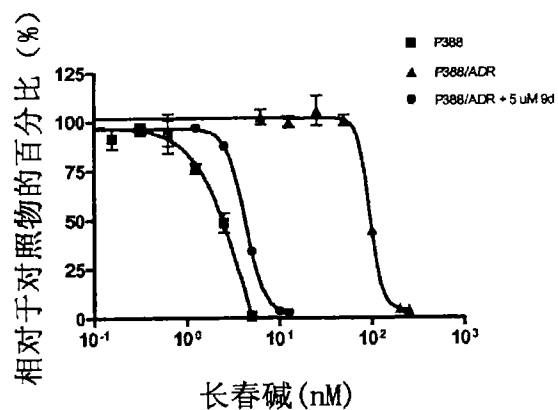


图 10E

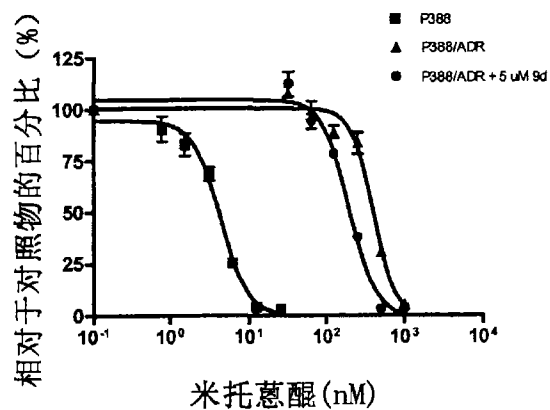


图 10F

图 10

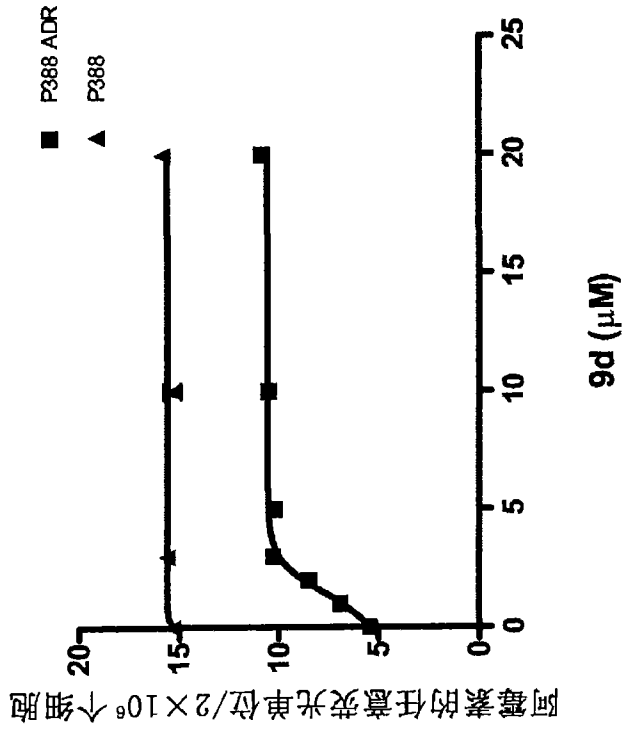


图 11B

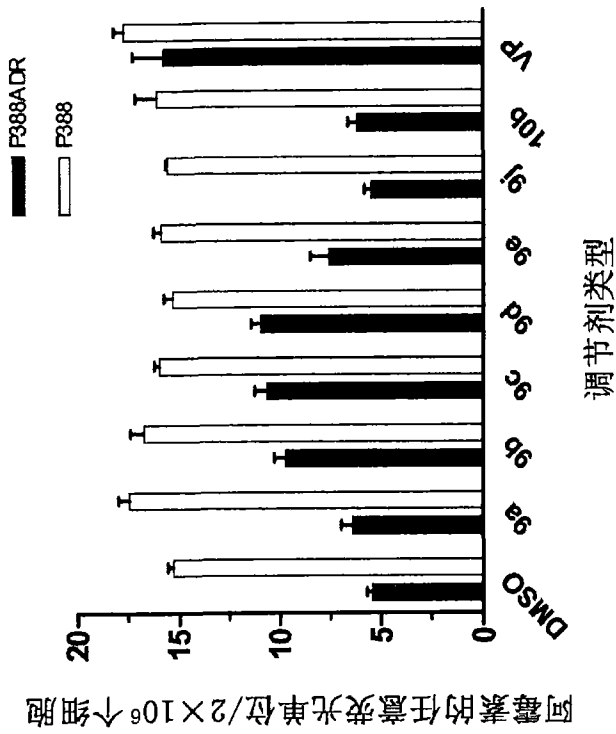


图 11A

图 11

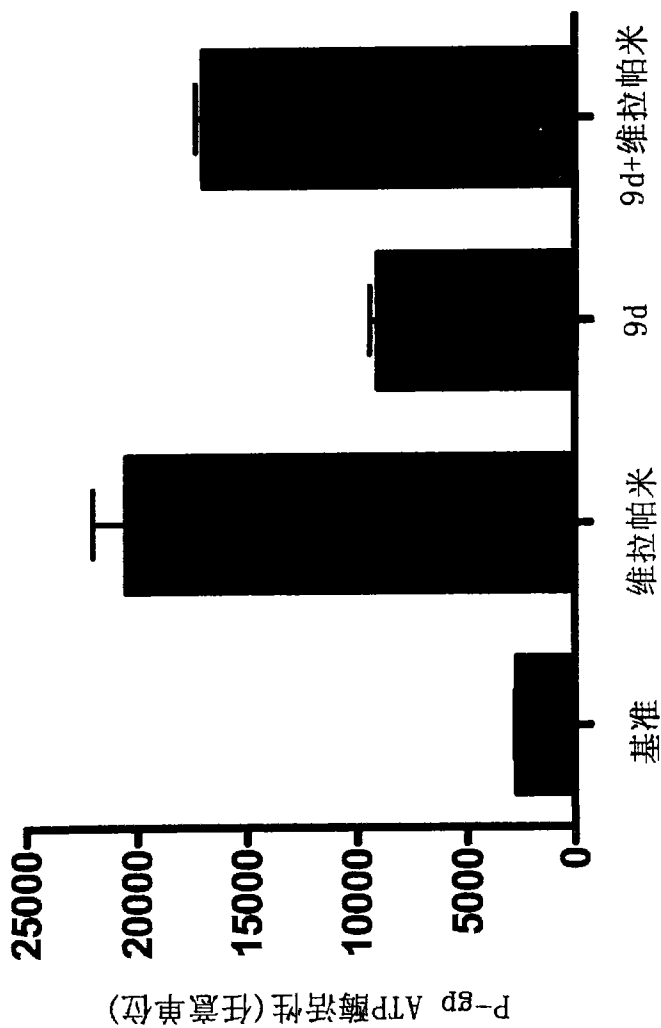


图 12

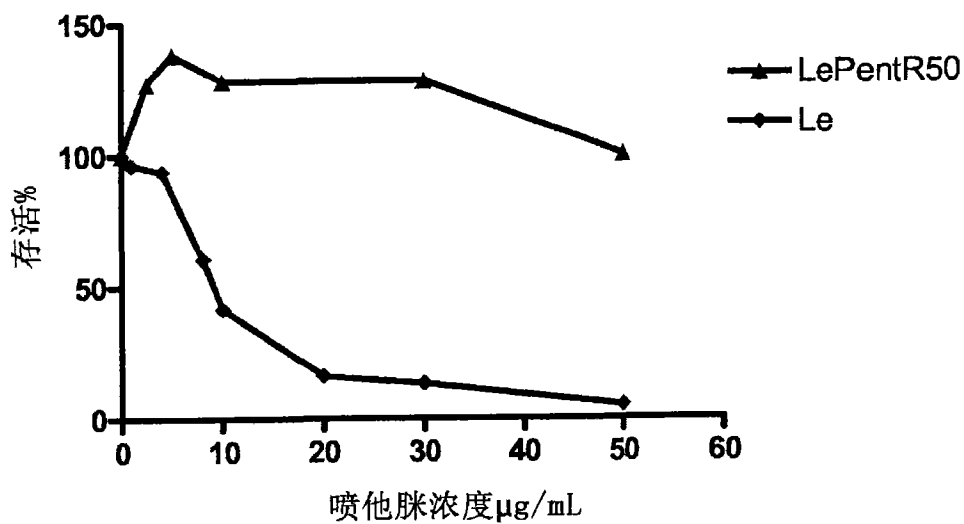


图 13A

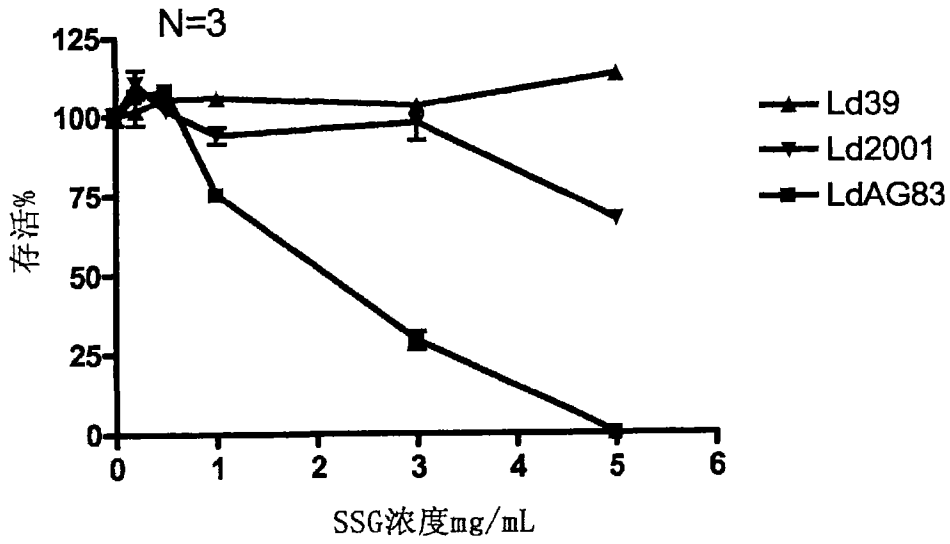


图 13B

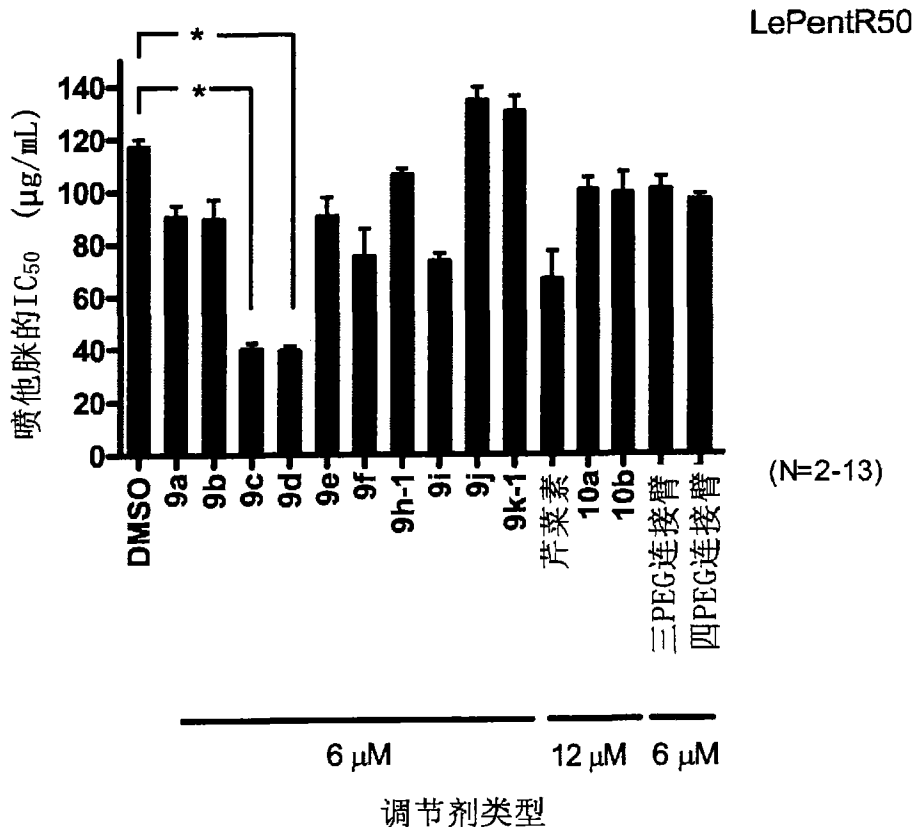


图 14A

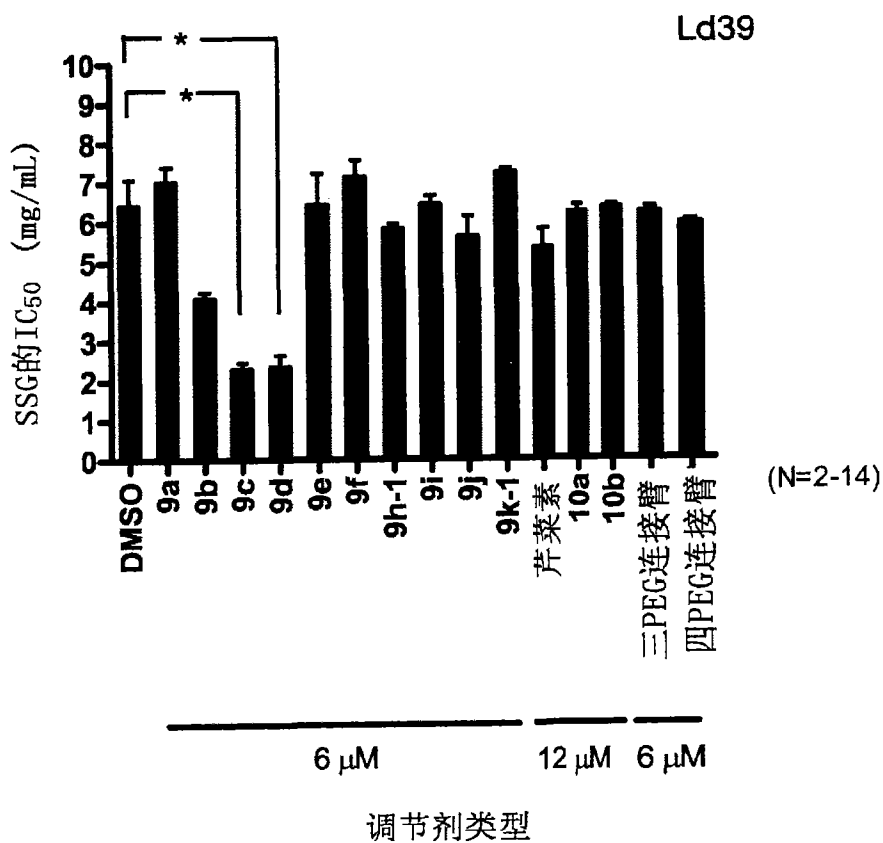


图 14B

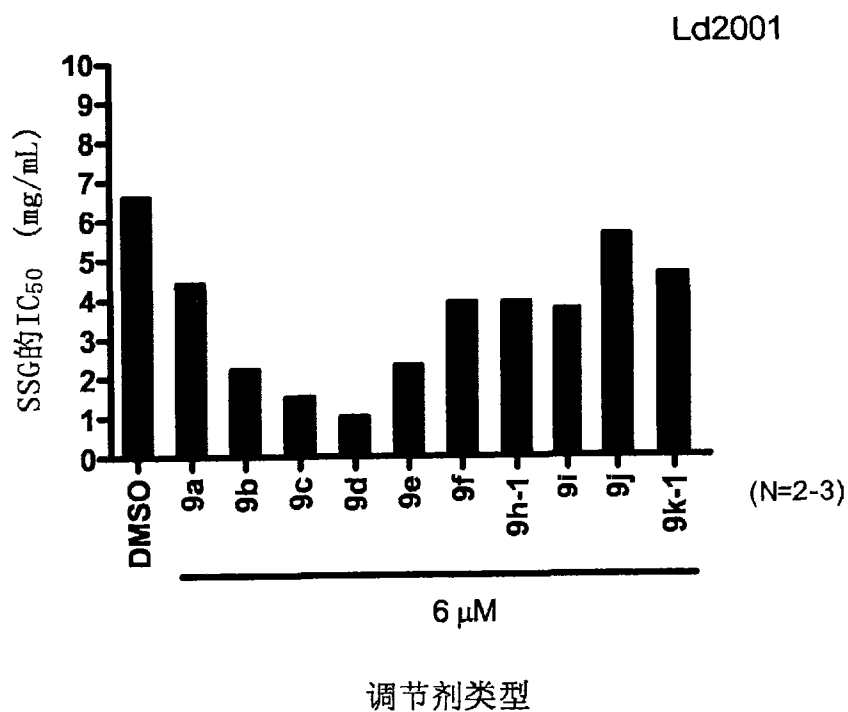


图 14C

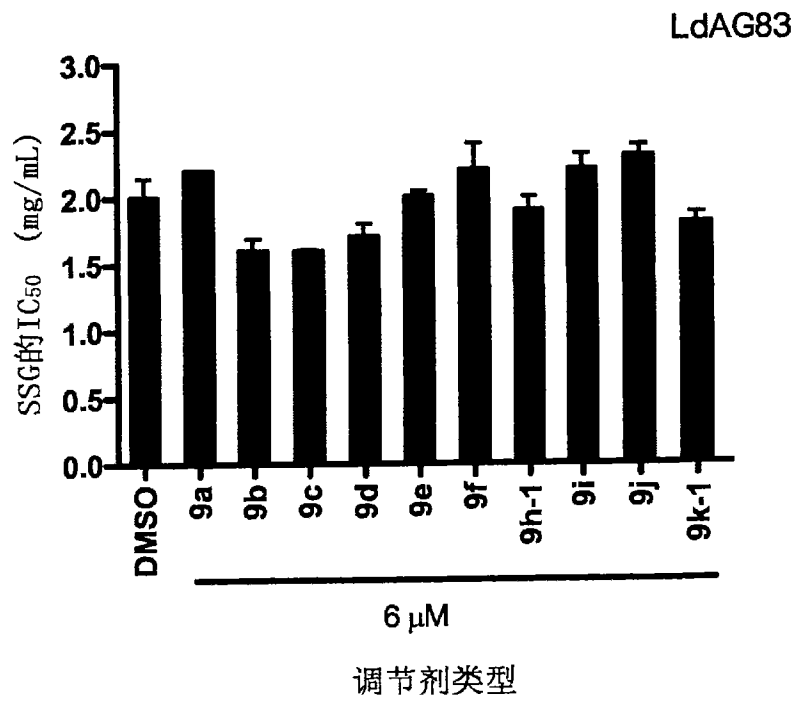


图 14D

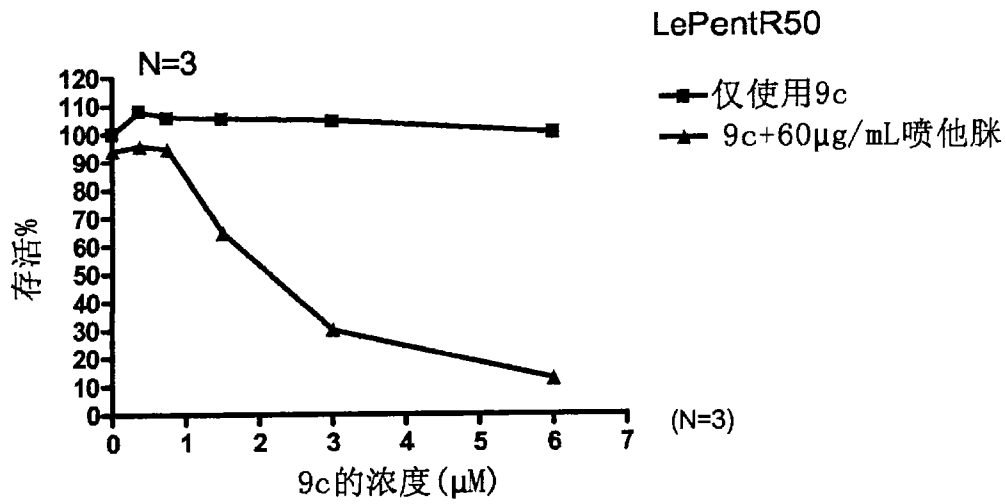


图 15A

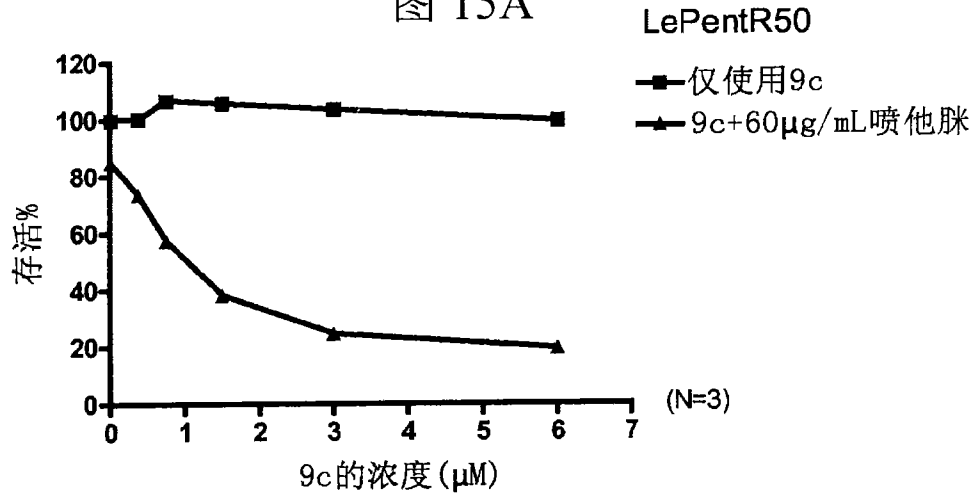


图 15B

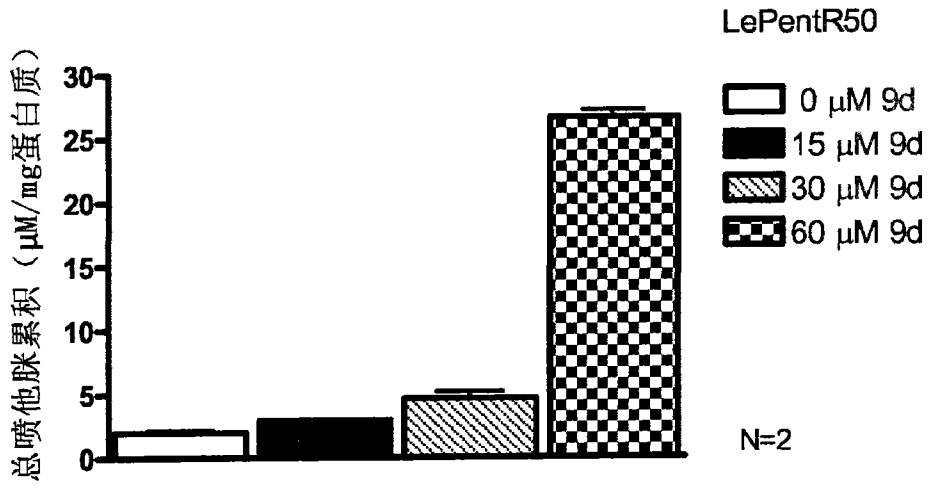


图 16

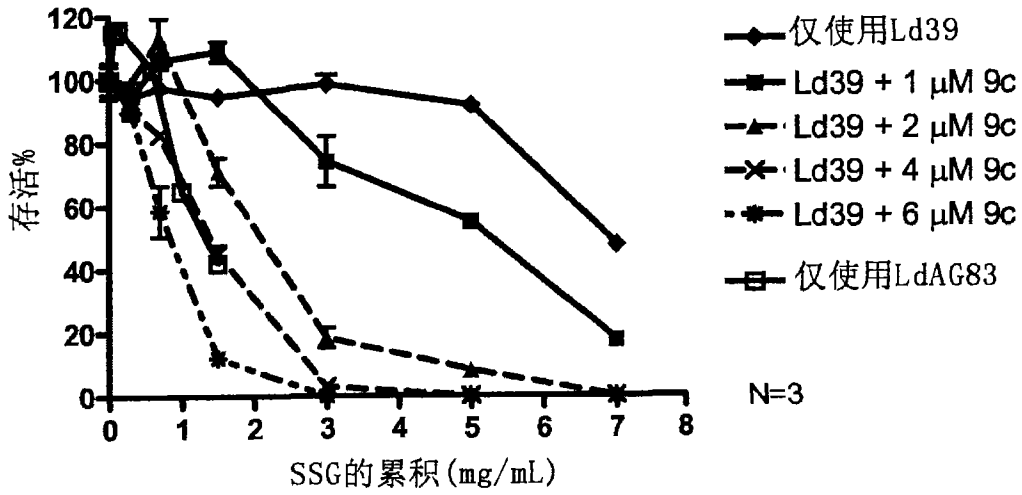


图 17A

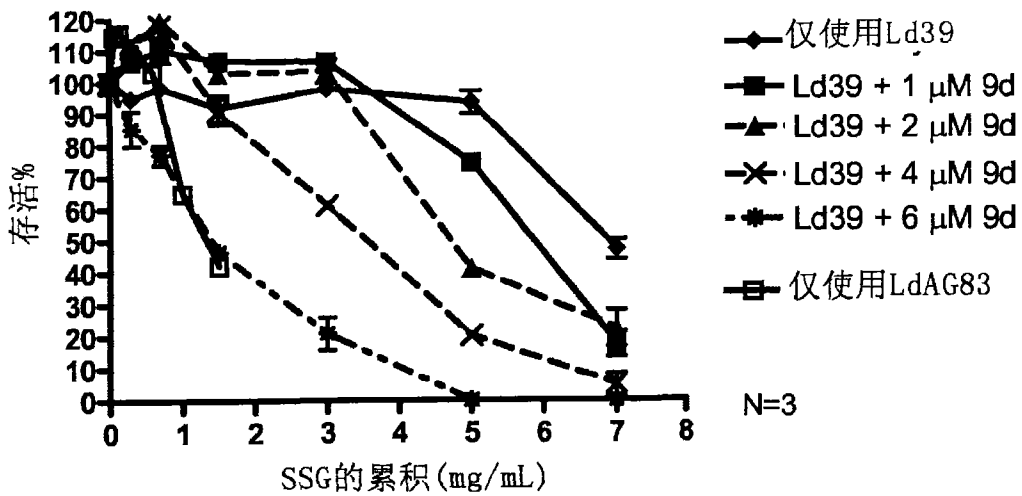


图 17B

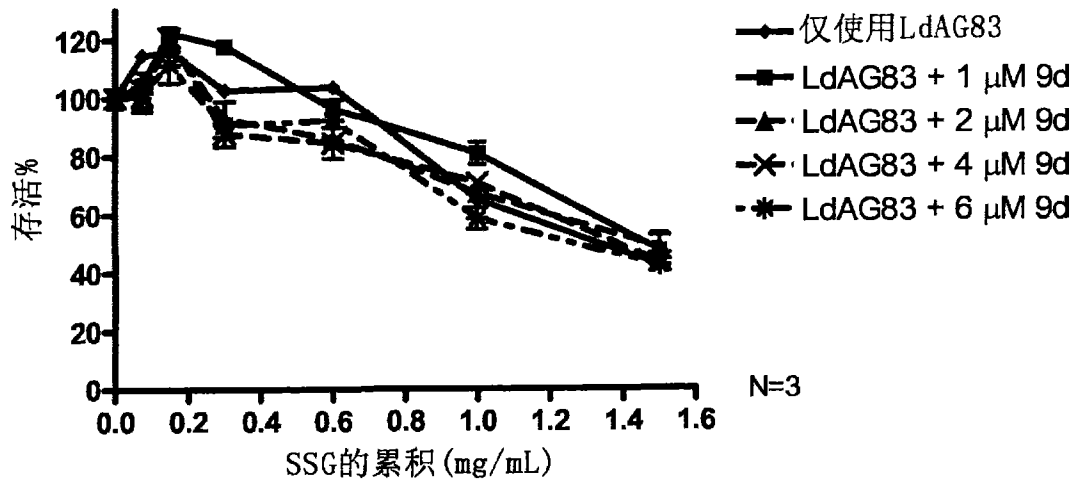


图 17C

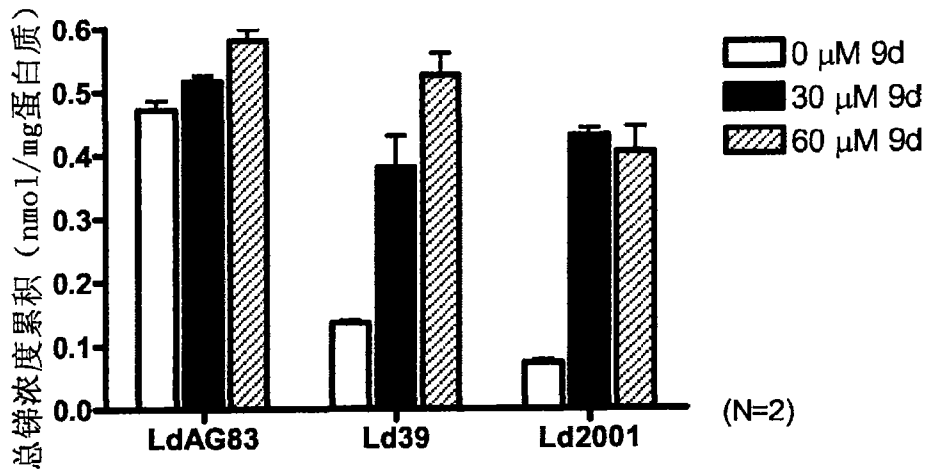


图 17D

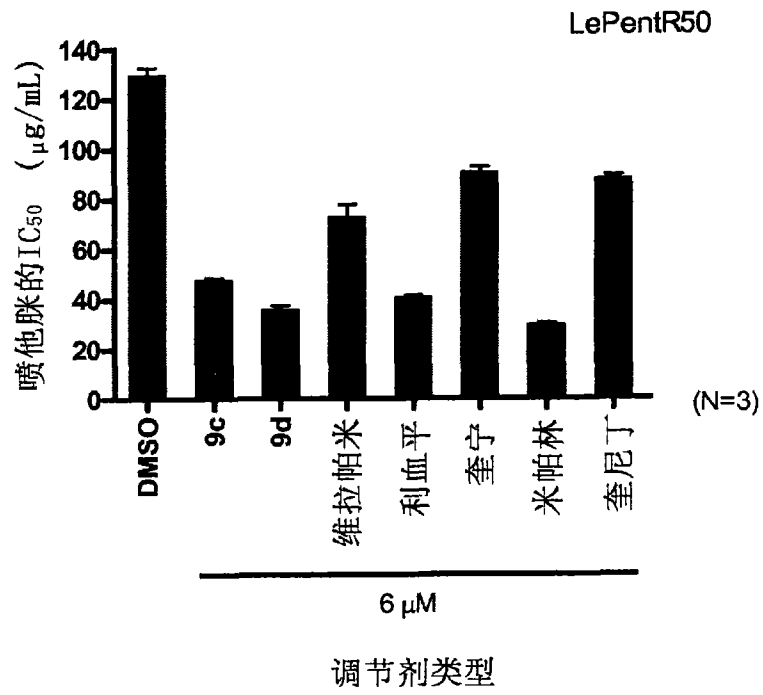


图 18A

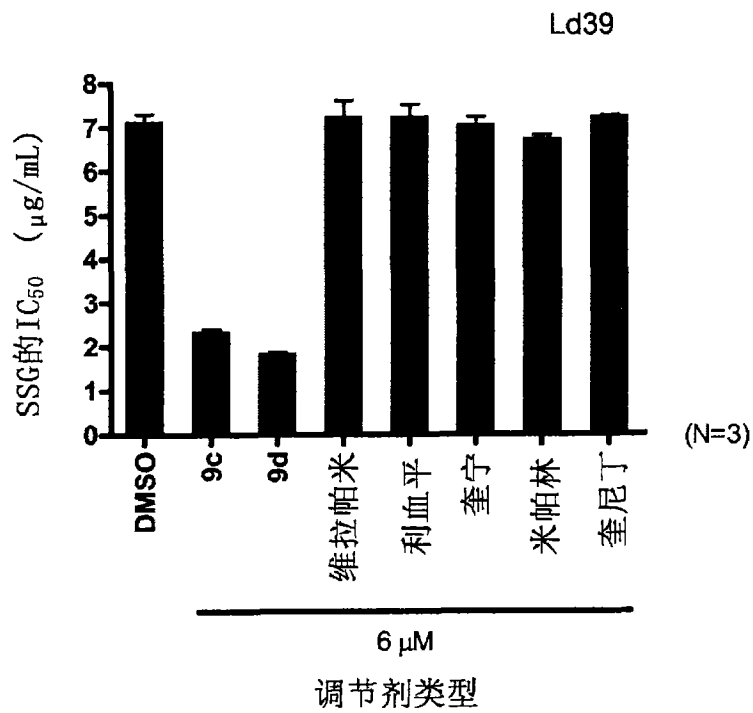


图 18B