

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

Design and synthesis of G-quartet binders and applications toward G-quadruplex structures

計畫類別：V 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CN-9617

執行期間：96 年 1 月 1 日至 96 年 12 月 31 日

計畫主持人：林敬涵

計畫參與人員：蕭泳助

執行單位：醫藥化學系

中華民國 97 年 3 月 24 日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

Design and synthesis of G-quartet binders and applications toward G-quadruplex structures

計畫編號：CN9617

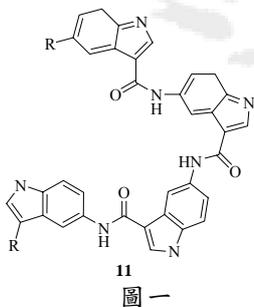
執行期限：96年01月01日至96年12月31日

主持人：林敬涵

利用結構相似性的機制來設計出新型的分子環四合胍肽引朵 cyclo-tetra-[N-(1H-indol-5-carboxamide-3-yl)] (CTIn) **11**，並進而探討其對 G-quadruplexes 部位癌細胞的生長。

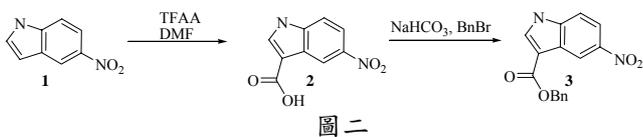
簡介

許多的藥物和抗生素是作用在細胞的去氧核糖核酸鏈上才能顯示其治療疾病的功能，核酸結合藥物作用在去氧核糖核酸鏈的方法主要可分為四類；第一類為嵌立法 (intercalation)，第二類為凹槽結合法 (groove-binding)。前兩類皆屬於非共價鍵結合法，如 actinomycin D 和 chromomycin A3 (或 mithramycin) 皆屬於利用非共價鍵結合法的核酸結合藥物專一性 GpC 之核酸結合藥物。而第三類為共價鍵結合法 (covalent linkages)，另外最後一類為切斷核酸鏈骨幹法 (DNA backbone cleavages)。這些藥物已經被主要是從細菌萃取出來的，並且具有治療癌症的活性，其抗癌活性主要是抑制細胞核酸的複製或是轉錄。本研究主要是設計一種新型的配位體 cyclo-tetra-[N-(1H-indol-5-carboxamide-3-yl)] (CTIn) **11**，其結構骨幹與鳥糞嘌呤⁽¹⁾形成的 G-quadruplex^(2,5)相似並預期可以與人類 G-quadruplex⁽⁴⁾作用來抑制人類端粒酶⁽⁵⁻⁷⁾的作用及壓制 c-Myc 的表現⁽⁸⁻¹¹⁾。(圖一)

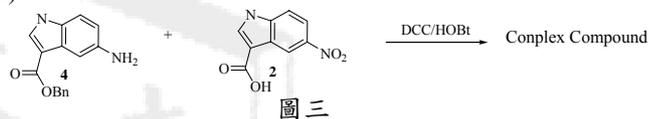


結果與討論

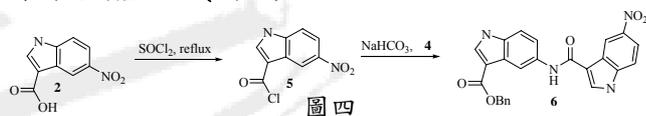
首先我們將化合物 **1** (5-nitro-1H-indole) 溶於二甲基甲醯胺 (N,N-Dimethylformamide) 中，隨後在氮氣與冰浴的條件下緩緩加入三氟醋酸酐 (Trifluoroacetic anhydride)，得到化合物 **2**。接著在鹼性條件下將酸保護成 benzyl group **3**。(圖二)



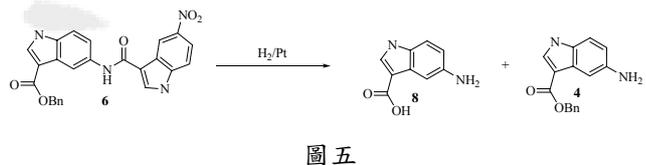
緊接著將化合物 **3** 在 (Zn/NH₄Cl) 條件下還原 NO₂，得到 amine compound。為了得到四吲哚結構，接下來我們取化合物 **4** 與化合物 **2** 在 (DCC/HOBt) 條件下進行 couple 反應，卻得到複雜與無法辨識的產物(圖三)。



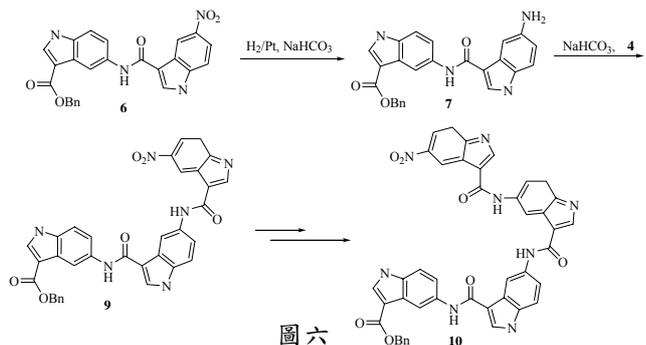
於是我們修正合成途徑，我們取化合物 **2** 在 SOCl₂ 條件下，將官能基修飾得到醯氯化合物 **5**。在分別得到化合物 **4** 與 **5** 後，在鹼性條件下進行 couple 作用，成功得到交聯產物 **6** (圖四)。



接著將化合物 **6** 在 H₂/Pt 條件下進行氫化，卻得到斷鍵與還原產物 **4** 與 **8** (圖五)。



我們認為應該是化合物 **6** 在微酸條件下，進行了水解。於是我們在反應時加入了 NaHCO₃，在鹼性條件下進行氫化，成功得到產物 **7**。然後再與化合物 **4** 進行 couple 作用，得到三吲哚架構化合物 **9**。重複相同步驟，我們成功得到四吲哚結構化合物 **10** (圖六)。



在這整個實驗中，以結構相似物的理論來模擬鳥糞嘌呤的四合體結構設計出新型的配位體藥物(CTIn)**11**，這個結構不但是屬於新穎的設計結構，再者因為結構的可修飾性，因此發展的潛力是可以預見的，更進一步來說，因為結構的新穎和複雜，因此可以為各界提供一個新的合成方式。再者，預期此以鳥糞嘌呤的特殊結構為相似結構的化合物可以針對細胞做初步測試達到效果，或者在經由結構上的再修飾達到新型藥劑的改良及開發。

實驗部分

5-nitro-1H-indole-3-carboxylic acid (1)

將化合物 **1**(5-nitro-1H-indole) (10.0 g, 0.09 mol) 溶於二甲基甲醯胺(N,N-Dimethylformamide) (150ml) 中，隨後在氮氣與冰浴的條件下緩緩加入三氟醋酸酐(Trifluoroacetic anhydride) (21.4 g, 0.2 mol)，此時會產生白色煙霧並升高溫度。待穩定時改以油浴加熱迴流，大約在 120-130°C 反應二十四小時，反應由開始的黃色逐漸變為橙棕色。待反應終了，慢慢回溫至室溫後，加入二次水(500ml)以濾紙抽氣過濾，取其棕色固體以氫氧化鈉(Sodium hydroxide) (50g/200ml) 溶解並用乙醚(Ether)與水萃取。取水層緩緩攪拌加入鹽酸水溶液，白色固體慢慢析出，在經抽氣過濾後送烘箱烘乾得到化合物 **2** (19 g, 100%)。¹H NMR(500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.74 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 7.81 (dd, *J* = 2.0, 2.0 Hz, 1 H), 8.25 (d, 1 H), 8.92 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H)。¹³C NMR(DMSO-d₆) δ 110.02, 113.92, 117.18, 119.69, 125.28, 139.96, 140.97, 141.01, 143.70

Benzyl 5-nitro-1H-indole-3-carboxylate (2)

將化合物 **2**(640 mg, 3.1 mmol) 以二甲基甲醯胺(15ml) 預溶後，加入碳酸氫鈉(Sodium bicarbonate)(1.6 g, 19.0 mmol) 最後與溴化甲苯(Benzyl bromide)(0.54mL, 4.5 mmol) 室溫下反應18個小時顏色會由淡黃色變成橙色。反應終了後加入二次水，並以乙酸乙酯(Ethyl acetate) 進行萃取，取有機層以硫酸鎂除水過濾後經過濃縮後，再以正己烷少量洗滌三次，自然風乾後得到黃色半透明晶體化合物 **3**(828 mg, 90%)。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 5.47 (s, 2 H), 7.18 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 2 H), 7.37-7.43 (m, 4 H), 8.11 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 8.22 (dd, *J* = 2.0, 2.0 Hz, 1H), 9.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H)。¹³C NMR(CDCl₃-d₁) δ 51.90, 111.14, 115.43, 117.74, 119.40, 120.21, 126.68, 126.98, 129.06, 129.48, 133.74, 139.50, 139.82, 139.85, 144.85, 174.66, 174.95

Benzyl 5-amino-1H-indole-3-carboxylate (3)

將鋅粉(Zinc powder)(32.7 mg, 0.5mmol) 與氯化銨(Ammonium chloride)(17 mg, 0.162 mmol) 在室溫下以甲醇(Methol)(5ml) 內攪拌，隨後加入化合物 **3**(15.1 mg, 0.051mmol) 加熱迴流 4 小時，反應由白色變為綠色。反應終了後以矽藻土(Celite) 抽氣過濾最後經過管柱層析法過濾分離 (沖提系統 乙酸乙酯：正己烷=1：1)，濃縮抽乾溶液後得到黃色粉末化合物 **4**(10.3 mg, 78%)。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃-d₆) δ 5.28 (s, 2 H), 6.68 (dd, *J* = 2.5, 2.5 Hz, 2 H), 7.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H) 7.15(d, *J* = 6.5 Hz, 2H) 7.26-7.36 (m, 4 H), 7.65 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H)。¹³C NMR(CDCl₃-d₁) δ 27.43, 50.81, 107.27, 110.78, 113.53, 116.50, 126.90, 127.65,

128.11, 128.97, 131.58, 135.05, 135.90, 142.48, 192.99.

5-(5-nitro-1H-indole-3-carboxamido)-1H-indole-3-carboxylate (6)

先將化合物 **2** 做除水處理後加入3滴的二甲基甲醯胺最後加入氯化亞硫鹽(Thionylchloride) 為溶劑進行反應加熱約至 70-80°C 迴流，反應由一開始的白色逐漸轉變為黃色。最後直接濃縮抽乾後得到黃色產物為化合物 **5**。接著不經純化先以二氯甲烷(Dichloromethane) 預溶後加入碳酸氫鈉攪拌數分鐘，待不再起泡沫後加入化合物 **2** (200 mg, 0.75 mmol) 反應4小時，此時反應顏色會由淡黃色變為深黃色。以矽膠乾填再經管柱層析法過濾 (沖提系統 乙酸乙酯：正己烷= 1：4)，濃縮得到黃色固體化合物 **6**。(242 mg, 53%)

5-(5-amino-1H-indole-3-carboxamido)-1H-indole-3-carboxylate (7)

將化合物 **6** (50 mg, 0.11mg) 以乙酸乙酯溶解，隨後加入碳酸氫鈉最後再加入 Pd-10%C，以真空幫浦抽氣到溶劑沸騰後充以氫氣，重複三次後攪拌反應一天。反應結束以後，以矽藻土抽氣過濾得到深黃色固體化合物 **7**。(41mg, 88%) ¹H NMR(500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 5.25(s, 1 H), 6.65(dd, *J* = 2.5, 2.5 Hz, 1H), 6.67(dd, *J* = 2.5, 2.5 Hz, 1 H), 6.9 (d, *J* = 1.5 Hz, 1 H), 7.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.12-7.15 (m, 3 H), 7.20 (d, 2.5 Hz, 1 H), 7.25-7.34 (m, 3 H), 7.64(s, 1 H), 7.84 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 8.09 (s, 1 H)。¹³C NMR(500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 27.46, 50.83, 55.03, 103.92, 105.63, 108.66, 110.92, 111.99, 112.77, 113.54, 116.69, 123.76, 126.83, 126.94, 127.60, 128.15, 128.99, 130.82, 131.71, 135.07, 135.83, 140.01, 142.98, 193.01

Benzyl 5-(5-(5-nitro-1H-indole-3-carboxamido)-1H-indole-3-carboxamido)-1H-indole-3-carboxylate (9)

此重複了化合物 **6** 的合成方式。以預先合成的化合物 **5**，濃縮再以二氯甲烷溶解待氣泡(二氧化碳)，加入化合物 **7**(50 mg, 0.12mmol)，經過過夜的時間後，經乾填(量多時先以濾紙過濾) 以矽膠粉乾填再經管柱層析法過濾，(沖提系統 乙酸乙酯：正己烷= 1：4) 濃縮得到黃色固體化合物 **9** (34mg, 46%)。

5-(5-(5-(5-nitro-1H-indole-3-carboxamido)-1H-indole-3-carboxamido)-1H-indole-3-carboxylate (10)

在此重複了化合物 **6** 的合成方式。經乾填(量多時先以濾紙過濾) 以矽膠粉乾填再經管柱層析法過濾，(沖提系統 乙酸乙酯：正己烷= 1：4)，濃縮得到黃棕色固體化合物 **10**(31 mg, 46%)

致謝

本研究承蒙學校補助 CN9617，在此特表謝意。

參考資料

1. Lee JS, Evans DH, and Morgan AR. Polypurine DNAs and RNAs form secondary structures which may be tetra-stranded. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(18):4305-20
2. Williamson JR. G-quartet structures in telomeric DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1994;23:703-30

3. Wellinger RJ, Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer*.1997;33(5):735-49.
4. Kerwin SM. G-Quadruplex DNA as a target for drug design. *Curr Pharm Des*. 2000,6(4):441-78.
5. Damm, K et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J*. 2001;20: 6958-68.
6. Pitts AE, Corey DR. Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(20):11549-54.
7. Read M et al. Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(9):4844-9
8. Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. myc function and regulation. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:809-60.
9. Slamon DJ, deKernion JB, and Verma IM, Cline MJ. Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science*. 1984;224(4646):256-62.
10. Spencer CA, and Groudine M. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res*. 1991;56:1-48
11. Facchini LM, Penn LZ. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J*. 1998;12(9):633-51.

