

## · 实验研究 ·

## 4-取代-7-氯喹啉衍生物的合成及抗肿瘤活性的初步评价

章九云<sup>1</sup> 韩 静<sup>1</sup> 张 勇<sup>2</sup> 吴 振<sup>3</sup> 王立强<sup>1</sup>

(1 华侨大学生物医学学院, 泉州 362021; 2 美国北卡罗来纳大学教堂山分校药学院, 教堂山 27599;

3 厦门大学药学院, 厦门 361101)

**[摘要]** 目的:设计合成一系列4-取代-7-氯喹啉衍生物并测定其抗肿瘤活性。方法:4,7-二氯喹啉通过羟化反应及缩合反应得到目标化合物,并采用MTT法,评价了其对于4种体外培养肿瘤细胞的生长抑制作用。结果:大多数化合物具有一定的抑制肿瘤细胞增殖的活性,其中化合物3、5和10a抑制人非小细胞肺癌A549、NCI-H446、Hela细胞生长的作用强于阳性对照,化合物5和10a对于人非小细胞肺癌A549的抑制活性是阳性对照药的4~5倍,明显优于阳性对照。结论:本文合成的该系列部分化合物具有较好的抗肿瘤活性,是潜在的抗肿瘤候选药物。

**[关键词]** 4-取代-7-氯喹啉衍生物;酪氨酸激酶;MTT;肿瘤

**[中图分类号]** R914.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2014)05-0585-07

## Synthesis of 4-substituted-7-chloroquinoline derivatives and preliminary evaluation of their antitumor activity

ZHANG Jiu-yun<sup>1</sup>, HAN Jing<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>, WU Zhen<sup>3</sup>, WANG Li-qiang<sup>1</sup>

(1 School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China; 2 Eshelman School of Pharmacy, The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill 27599, USA;

3 School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To design and synthesize a series of 4-substituted-7-chloroquinoline derivatives, and to assay their antitumor activity. **Methods:** The compounds were synthesized through alkylation and condensation reaction using 4,7-dichloro-quinoline, and the antitumor activities were assayed by MTT. **Results:** Most synthesized compounds had the property of antiproliferation on tumor cell lines *in vitro*. It was obvious that the compounds of 3, 5 and 10a had stronger effect on the growth of A549, NCI-H446 and Hela cancer cells than the positive control group does, and compounds 5 and 10a also showed 4~5 times more inhibition effect on the A549 cells than the positive control group in terms of antitumor activity. **Conclusion:** The series of synthesized compounds exhibit excellent antitumor activities and deserve consideration for potential candidate of antitumor drugs

**[Key words]** 4-substituted-7-chloroquinoline derivatives; tyrosine kinase; MTT; tumor

**[基金项目]** 泉州市科技计划重点项目(2013Z35)

**[作者简介]** 章九云,女,硕士研究生,研究方向为新药设计合成与药剂学。联系电话:15260775968, E-mail: zhangjiuyun99@163.com。

**[通讯作者]** 王立强,男,教授,研究方向为药剂学和新药开发。联系电话:13359870132, E-mail: wlq1599@163.com。

近年来,分子靶向治疗药物的开发已成为肿瘤治疗领域的研究热点。蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTKs)是信号传递过程中重要因子,参与一系列细胞功能,与细胞生长、分化、增殖密切相关,它催化ATP上的 $\gamma$ 磷酸基转移到许多重要蛋



白质的酪氨酸残基上,使酚羟基磷酸化,从而传递细胞内信号<sup>[1]</sup>。蛋白酪氨酸激酶功能的失调,会导致其下游信号通路激活引起细胞增殖分化调节发生紊乱,最终导致肿瘤的形成。以蛋白酪氨酸激酶为靶点的抗肿瘤治疗也因此成为癌症研究中的活跃领域之一,目前已有多个酪氨酸激酶抑制剂类药物进入市场,并在肿瘤靶向治疗药物市场中占据了核心位置<sup>[2]</sup>。

甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)是通过计算机辅助设计,于1992年由人工合成的2-苯基氨基嘧啶类化合物,可选择性抑制 bcr-abl、C-kit 和血小板衍生生长因子受体(PDGFR)等酪氨酸激酶;其作为 ATP 竞争性抑制剂,能够阻滞酪氨酸激酶的磷酸

化,抑制 bcr-abl 表达,从而阻止细胞的增殖和肿瘤的形成。但 bcr-abl 的产物具有多重作用,单一途径的抑制并不能全部消除肿瘤细胞的恶性增殖,且甲磺酸伊马替尼只能与活化状态的 ATP 结合位点结合,鉴于此局限性,该药物仅为高效而非特效的抗肿瘤药<sup>[3]</sup>。近年来,伊马替尼的耐药性十分显著,因此研究并开发新的小分子酪氨酸激酶抑制剂成为热点<sup>[4-6]</sup>。2-(5-氨基-2-甲基苯胺)-4-(4-吡啶)嘧啶是酪氨酸蛋白激酶抑制剂-伊马替尼的药效团,本课题组以 4,7-二氯喹啉为先导化合物,通过烃化反应及缩合反应合成化合物 3~6(见图 1),希望得到的小分子结构能够与受体形成附加的作用力,获得活性更高或具有某种肿瘤细胞选择性的新结构化合物。

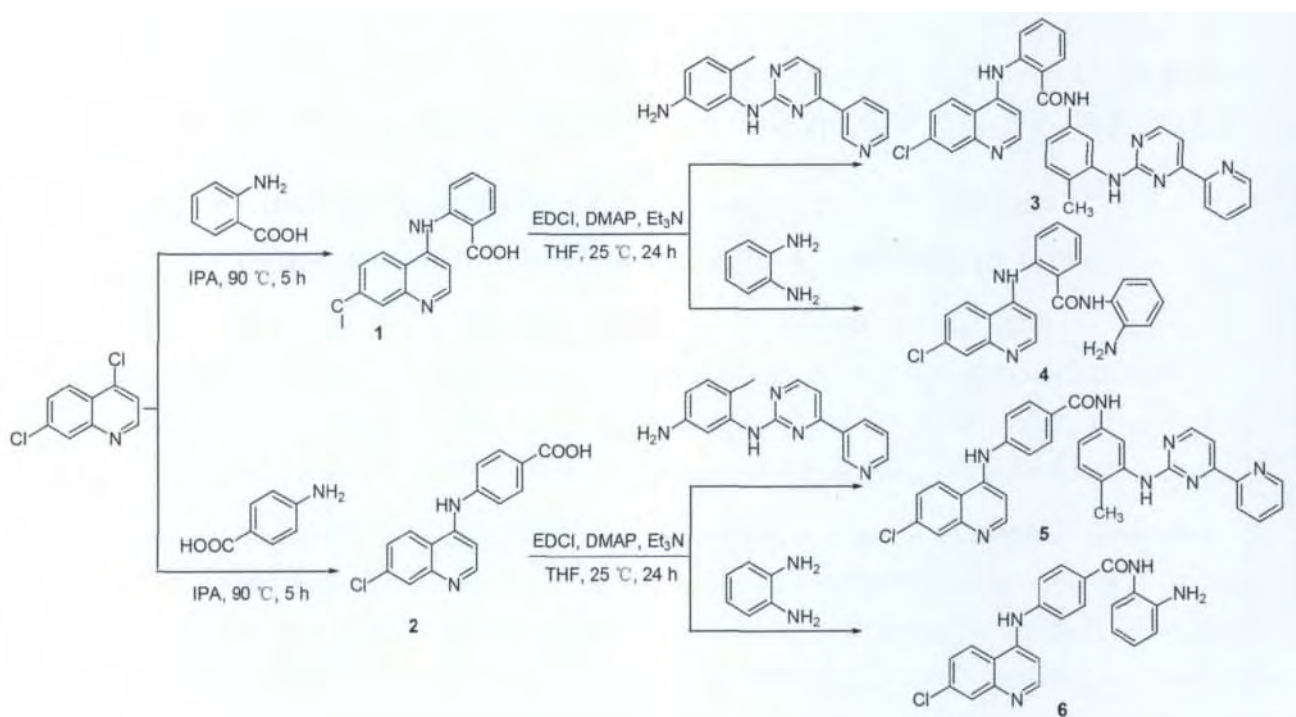


图 1 4-取代-7-氯喹啉衍生物(化合物 3~6)的合成

吉非替尼(gefitinib)是一种苯胺喹唑啉类化合物,2002年首次在日本上市,2003年在美国及澳大利亚获准作为三线药物单药治疗晚期非小细胞肺癌。与伊马替尼相比,吉非替尼的抑酶谱较窄,但其临床疗效不高,并且容易产生原发性及获得性的耐药

性<sup>[7-8]</sup>。本课题组同时以 4,7-二氯喹啉为先导化合物,引入萘环与不同小分子苯环经过酯化、成醚、水解及缩合得到化合物 10a~10d(合成路线见图 2,该系列化合物作者未见文献报道),期望该类小分子结构能与 EGFR 受体有更多的分子间作用力,不易产生耐药性。

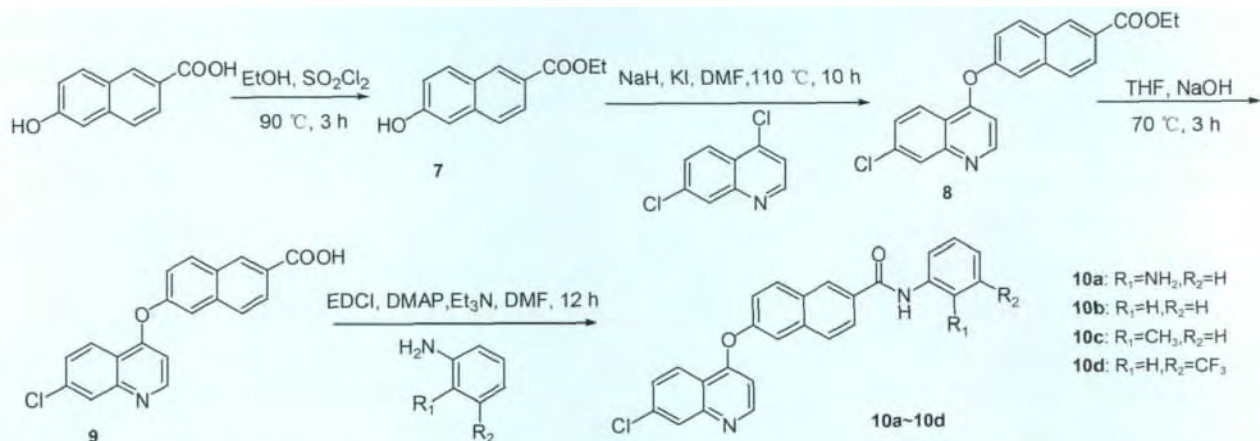


图2 4-取代-7-氯喹啉衍生物(化合物10a~10d)的合成

本研究另选择伊马替尼和吉非替尼作为阳性对照药,采用四氮唑盐(MTT)还原法<sup>[9]</sup>评价化合物3~6,10a~10d对肿瘤细胞NCI-H446,A549,Hela,SMMC-7721和正常人脐静脉内皮细胞HUVEC的体外抗肿瘤活性,结果报道如下。

## 实验部分

### 1 仪器及试剂

4,7-二氯喹啉、2-(5-氨基-2-甲基苯胺)-4-(4-吡啶)嘧啶、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、苯胺、6-羟基-2-萘甲酸均购自百灵威科技有限公司;TLC硅胶板和柱层析硅胶购自青岛海洋化工厂。NCI-H446,A549,Hela,SMMC-7721,HUVEC细胞株购自上海中科院细胞库;96孔细胞培养板(美国Corning公司);RPMI1640培养基(美国Invitrogen公司);新生牛血清(美国Hyclone公司);胰蛋白酶、DMSO(Amresco);MTT(美国Sigma公司);伊马替尼、吉非替尼对照品由大连美仑生物技术有限公司提供;实验所用试剂均为分析纯;THF和DCM经分子筛干燥后直接使用;其他溶剂未特别指出则未经处理。

Dalton Esquire 3000 plus 质谱仪(德国Bruker公司);AV400核磁共振(德国Bruker公司);WRR熔点仪(上海精密科学仪器有限公司);371 CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo公司);Infinite M200全功能酶标仪(瑞士Tecan公司);HJ-4四联磁力搅拌机(江苏金坛市天竟实验仪器厂);BS224S万分之一电子天平(德国Sartorius公司);Forma-86 °C超低温冰箱(美国Thermo公司)。

### 2 实验方法

**2.1 2-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酸(1)的合成** 称取0.76 g(5.547 mmol)邻氨基苯甲酸和1.00 g(5.505 mmol)4,7-二氯喹啉,置于100 mL圆底烧瓶中,加入50 mL异丙醇加热搅拌回流反应5~6 h,用薄层色谱监测反应进程,反应结束后,冷却,用30 mL二氯甲烷洗涤2次,抽滤,干燥,得黄色固体粉末,收率为95%。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ(ppm):11.25(s,1H),8.81(d,J=9.03 Hz,1H),8.51(d,J=7.03 Hz,1H),8.26(d,J=2.01 Hz,1H),8.09(dd,J=7.78,1.26 Hz,1H),7.90(dd,J=9.03,2.01 Hz,1H),7.80(td,J=7.78,1.51 Hz,1H),7.57~7.63(m,2H),8.55(d,J=7.03 Hz,1H)。ESI-MS m/z:298.7[M-H]<sup>-</sup>。

**2.2 2-(7-氯喹啉-4-氨基)-N-(4-甲基-3-[4-(4-吡啶)嘧啶-2-氨基]苯基)苯甲酰胺(3)的合成** 称取1.639 g(5.5 mmol)2-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酸和0.6534 g(6.05 mmol)邻苯二胺、1.109 g(9.08 mmol)4-二甲氨基吡啶,置于200 mL圆底烧瓶中,加入40 mL THF,滴加1.1 g三乙胺,轻微搅拌后滴加20 mL溶解0.0579 g(0.302 mmol)1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,室温搅拌3 h,用薄层色谱监测反应进程,反应结束后,冷却,抽滤除去大部分的盐再减压蒸馏得黄色固体。将固体与适量硅胶搅拌均匀,以CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH(20:1)为洗脱剂进行硅胶柱层析分离得化合物3,收率68%,mp:235.8~238.1 °C。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ(ppm):10.56(s,1H),8.87(s,1H),8.67(d,J=9.03 Hz,1H),8.44~8.48(m,2H),8.40(d,J=8.03 Hz,1H),8.00(d,J=1.76 Hz,

1H), 7.88~7.90(m, 2H), 7.71~7.74(m, 2H), 7.57~7.62(m, 2H), 7.36(d,  $J=5.27$  Hz, 1H), 7.28(dd,  $J=8.03, 1.76$  Hz, 1H), 7.12(d,  $J=8.53$  Hz, 1H), 6.59(d,  $J=6.78$  Hz, 1H), 2.16(s, 3H)。ESI-MS  $m/z$ :558.2 [M+H]<sup>+</sup>。

**2.3 4-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酸(2)的合成** 合成方法同2.1, 得到黄色固体化合物4-(7-氯喹啉-4-氨基)苯甲酸, 产率为90%。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 8.61(d,  $J=9.29$  Hz, 1H), 8.47(d,  $J=7.03$  Hz, 1H), 8.23~8.26(m, 2H), 8.00(d,  $J=2.01$  Hz, 1H), 7.86(dd,  $J=9.29, 2.26$  Hz, 1H), 7.63(dd,  $J=6.78, 2.01$  Hz, 2H), 7.11(d,  $J=7.03$  Hz, 1H)。ESI-MS  $m/z$ :298.7 [M-H]<sup>-</sup>。

**2.4 2-(7-氯喹啉-2-氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺(4)的合成** 合成方法同2.2, 得黄色固体, 即为化合物4, 收率58% mp:324.5~330.8℃。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 10.53(s, 1H), 9.86(s, 1H), 8.55(s, 1H), 8.20(d,  $J=8.78$  Hz, 1H), 8.02(d,  $J=7.78$  Hz, 1H), 7.93(s, 1H), 7.62(d,  $J=7.53$  Hz, 3H), 7.29(t,  $J=15.06, 7.53$  Hz, 1H), 7.13(s, 1H), 7.05(d,  $J=7.53$  Hz, 1H), 6.96(t,  $J=15.06, 8.03$  Hz, 1H), 6.74(d,  $J=7.78$  Hz, 1H), 6.55(t,  $J=15.06, 7.03$  Hz, 1H), 4.9(s, 2H)。ESI-MS  $m/z$ :388.8 [M+H]<sup>+</sup>。

**2.5 4-(7-氯喹啉-2-氨基)-N-{4-甲基-3-[4-(4-吡啶)嘧啶-2-氨基]苯基}苯甲酰胺(5)的合成** 合成方法同2.2, 得黄色固体。将固体与适量硅胶搅拌均匀, 以CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH(20:1)为洗脱剂进行硅胶柱层析分离, 得化合物5, 收率72% mp:292.2~296.5℃。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 11.14(s, 1H), 10.36(s, 1H), 9.34(s, 1H), 9.06(s, 1H), 8.79(d,  $J=9.04$  Hz, 1H), 8.76(d,  $J=4.76$  Hz, 1H), 8.63(d,  $J=6.8$  Hz, 1H), 8.62(dd,  $J=6.14$  Hz, 2.00 Hz, 1H), 8.55(d,  $J=5.26$  Hz, 1H), 8.18(d,  $J=8.54$  Hz, 2H), 8.14(d,  $J=2.04$  Hz, 1H), 2.25(s, 3H), 8.12(d,  $J=2.24$  Hz, 1H), 7.01(d,  $J=7.00$  Hz, 1H), 7.93(dd,  $J=9.04$  Hz, 2.00 Hz, 1H), 7.65(d,  $J=8.76$  Hz, 2H), 7.64(d,  $J=7.76$  Hz, 1H), 7.51(dd,  $J=8.04, 2.04$  Hz, 1H), 7.47(d,  $J=5.26$  Hz, 1H), 7.24(d,  $J=8.54$  Hz, 1H), 7.01(d,  $J=7.00$  Hz, 1H), 2.25(s, 3H)。ESI-MS  $m/z$ :558.2 [M+H]<sup>+</sup>。

**2.6 4-(7-氯喹啉-2-氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺(6)的合成** 合成方法同2.2, 得黄色固体6, 收率50% mp:160.3~165.7℃。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 9.62(s, 1H), 9.36(s, 1H), 8.59(d,  $J=5.27$  Hz, 1H), 8.45(d,  $J=9.03$  Hz, 1H), 8.06(d,  $J=8.78$  Hz, 1H), 7.96(d,  $J=2.01$  Hz, 1H), 7.64(dd,  $J=9.03, 2.01$  Hz, 1H), 7.48(d,  $J=8.53$  Hz, 2H), 7.20~7.17(m, 2H), 7.00~6.96(m, 1H), 6.81(dd,  $J=8.03, 1.51$  Hz, 1H), 6.64(td,  $J=7.53, 1.25$  Hz, 1H)。ESI-MS  $m/z$ :388.8 [M+H]<sup>+</sup>。

**2.7 6-羟基-2-萘甲酸乙酯(7)的合成** 称取1.8822 g(10.0 mmol) 6-羟基-2-萘甲酸, 置于100 mL圆底烧瓶中, 加入30 mL无水乙醇溶解, 搅拌状态下滴加10 mL SOCl<sub>2</sub>, 90℃回流搅拌2 h, 用薄层色谱监测反应进程, 反应结束后, 冷却后减压除去无水乙醇, 再用10 mL乙酸乙酯溶解固体, 加入10 mL饱和碳酸氢钠萃取, 重复3次, 收集有机相加入无水硫酸钠静置干燥, 0.5 h后减压除去溶剂得到产物7, 产率98%, 棕色固体。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 8.56(s, 1H), 8.03(dd,  $J=1.76, 8.78$  Hz, 1H), 7.87(d,  $J=8.53$  Hz, 1H), 7.71(d,  $J=8.53$  Hz, 1H), 7.21(m, 2H), 6.11(s, 1H), 4.47(m, 2H), 1.47(m, 3H)。ESI-MS  $m/z$ :216.2 [M-H]<sup>-</sup>。

**2.8 6-[(7-氯喹啉-4-氧基)酚醚]-2-萘甲酸乙酯(8)的合成** 称取2.1668 g(9.8 mmol) 6-羟基-2-萘甲酸乙酯, 置于100 mL双颈瓶中, 加入10 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 冰浴下搅拌, 缓慢滴加含0.6002 g(25 mmol) NaH的DMF溶液10 mL, 冰浴下搅拌0.5 h, 撤去冰浴, 待温度恢复至室温, 在缓慢滴加含2.1788 g(11 mmol) 4,7-二氯喹啉以及0.3325 g(2 mmol) KI的DMF溶液10 mL, 室温下搅拌0.5 h, 110℃回流10 h, 用薄层色谱监测反应进程, 反应结束后, 减压除去溶剂, 加入15 mL甲醇超声溶解, 有大量白色固体析出, 重复洗涤3次, 真空干燥后白色固体粉末即为产物8, 产率60%。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 8.76(s, 1H), 8.73(s, 1H), 8.36(s, 1H), 8.14(s, 1H), 8.04(s, 1H), 7.92(s, 1H), 7.73(s, 1H), 7.62(s, 1H), 6.82(s, 1H), 4.40(s, 1H), 1.39(s, 1H)。ESI-MS  $m/z$ :376.8 [M-H]<sup>-</sup>。

**2.9 6-[(7-氯喹啉-4-氧基)酚醚]-2-萘甲酸(9)的合成** 称取1.8842 g(5 mmol) 6-[(7-氯喹啉-4-氧

基) 酚醚]-2-萘甲酸乙酯, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 四氢呋喃(THF), 加入 10 mL  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH,  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  回流 5 h, 用薄层色谱监测反应进程, 反应结束后, 冰浴下滴用 10% 稀盐酸调节 pH 3, 大量白色固体析出, 抽滤除去溶剂, 真空干燥后白色固体粉末即为产物 6-[(7-氯喹啉-4-氧基) 酚醚]-2-萘甲酸(9)。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 8.76(d,  $J=4.77 \text{ Hz}$ , 1H), 8.71(s, 1H), 8.46(d,  $J=8.78 \text{ Hz}$ , 1H), 8.32(d,  $J=9.03 \text{ Hz}$ , 1H), 8.14(s, 1H), 8.03(s, 1H), 7.92(s, 1H), 7.72(d,  $J=8.28 \text{ Hz}$ , 1H), 7.60(d,  $J=7.53 \text{ Hz}$ , 1H), 6.81(d,  $J=4.77 \text{ Hz}$ , 1H)。ESI-MS  $m/z$ : 348.8  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

**2.10** *N*-(2-氨基苯基)-6-[(7-氯喹啉-4-氧基) 酚醚]-2-萘甲酰胺(10a)的合成 方法同 2.2, 以石油醚-乙酸乙酯(10:1)为洗脱剂进行硅胶柱层析分离, 所得白色固体即为产物 10a, 收率 63%, mp:  $164.0 \sim 169.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 9.88(s, 1H), 8.76(d,  $J=5.27 \text{ Hz}$ , 1H), 8.46(d,  $J=9.29 \text{ Hz}$ , 1H), 8.42(d,  $J=9.03 \text{ Hz}$ , 1H), 8.14(d,  $J=2.01 \text{ Hz}$ , 1H), 8.10(d,  $J=8.28 \text{ Hz}$ , 1H), 7.97(d,  $J=2.50 \text{ Hz}$ , 1H), 7.91(d,  $J=6.78 \text{ Hz}$ , 1H), 7.73(dd,  $J=9.03, 2.26 \text{ Hz}$ , 1H), 7.68(t,  $J=15.31, 8.03 \text{ Hz}$ , 1H), 7.62(dd,  $J=2.51, 9.29 \text{ Hz}$ , 1H), 7.37(brt,  $J=8.03 \text{ Hz}, 6.78 \text{ Hz}$ , 1H), 7.01(t,  $J=13.80 \text{ Hz}, 6.53 \text{ Hz}$ , 1H), 6.83(d,  $J=9.03 \text{ Hz}$ , 1H), 6.77(d,  $J=5.27 \text{ Hz}$ , 1H), 6.65(t,  $J=14.81, 7.78 \text{ Hz}$ , 1H), 5.00(s, 2H)。ESI-MS  $m/z$ : 439.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

**2.11** *N*-苯基-6-[(7-氯喹啉-4-氧基) 酚醚]-2-萘甲酰胺(10b)的合成 方法同 2.2, 以石油醚-乙酸乙酯(10:1)为洗脱剂进行硅胶柱层析分离, 所得淡黄色固体即为产物 10b, 收率 50%, mp:  $166.8 \sim 169.6 \text{ }^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 10.48(s, 1H), 8.78(d,  $J=5.27 \text{ Hz}$ , 1H), 8.41(d,  $J=8.78 \text{ Hz}$ , 1H), 8.29(d,  $J=9.03 \text{ Hz}$ , 1H), 8.15(t,  $J=4.52, 1.51 \text{ Hz}$ , 1H), 8.09~8.08(m, 2H), 7.93(d,  $J=2.26 \text{ Hz}$ , 1H), 7.86(t,  $J=8.53, 1.00 \text{ Hz}$ , 1H), 7.74(dd,  $J=8.78, 2.01 \text{ Hz}$ , 1H), 7.63(dd,  $J=8.78, 2.26 \text{ Hz}$ , 1H), 7.41(t,  $15.81, 7.53 \text{ Hz}$ ,

2H), 7.68(s, 1H), 7.15(d,  $J=7.28 \text{ Hz}$ , 1H), 6.82(d,  $J=5.02 \text{ Hz}$ , 1H)。ESI-MS  $m/z$ : 424.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

**2.12** *N*-(2-甲基苯基)-6-[(7-氯喹啉-4-氧基) 酚醚]-2-萘甲酰胺(10c)的合成 方法同 2.2, 以石油醚-乙酸乙酯(10:1)为洗脱剂进行硅胶柱层析分离, 所得白色固体即为产物 10c, 收率 58%, mp:  $165.2 \sim 172.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 8.74(d,  $J=5.02 \text{ Hz}$ , 1H), 8.51(s, 1H), 8.38(d,  $J=9.03 \text{ Hz}$ , 1H), 8.16(d,  $J=2.01 \text{ Hz}$ , 1H), 8.13(d,  $J=8.78 \text{ Hz}$ , 1H), 8.03~8.01(m, 1H), 7.96(d,  $J=8.53 \text{ Hz}$ , 1H), 7.85(s, 1H), 7.70(d,  $J=2.26 \text{ Hz}$ , 1H), 7.61(dd,  $J=8.78, 2.01 \text{ Hz}$ , 1H), 7.48(dd,  $J=8.78, 2.26 \text{ Hz}$ , 1H), 7.33(d,  $J=8.28 \text{ Hz}$ , 1H), 7.21(dd,  $J=7.53, 1.25 \text{ Hz}$ , 1H), 6.67(d,  $J=5.27 \text{ Hz}$ , 1H), 2.43(s, 3H)。ESI-MS  $m/z$ : 438.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

**2.13** *N*-(3-三氟甲基苯基)-6-[(7-氯喹啉-4-氧基) 酚醚]-2-萘甲酰胺(10d)的合成 方法同 2.2, 以石油醚-乙酸乙酯(10:1)为洗脱剂进行硅胶柱层析分离, 所得白色固体即为产物 10d, 收率 57%, mp:  $131.6 \sim 135.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 10.77(s, 1H), 8.78(d,  $J=4 \text{ Hz}$ , 1H), 8.72(s, 1H), 8.39(d,  $J=8 \text{ Hz}$ , 1H), 8.32~8.27(m, 2H), 8.14~8.09(m, 4H), 7.93(d,  $J=0 \text{ Hz}$ , 1H), 7.73(dd,  $J=4, 4 \text{ Hz}$ , 1H), 7.64~7.61(m, 2H), 7.49(d,  $J=8 \text{ Hz}$ , 1H), 6.82(d,  $J=4 \text{ Hz}$ , 1H)。ESI-MS  $m/z$ : 493.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

### 3 细胞活性检测

在 96 孔培养板中加入对数生长期的 NCI-H446, A549, HeLa, SMMC-7721 和 HUVEC 细胞, 每孔  $1 \times 10^4$ , 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h, 待其贴壁长满后分 5 个浓度(0.5, 2, 8, 16  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的药物, DMSO 含量 1% 给药, 每组 3 个复孔, 阳性对照药物为吉非替尼分别给予上述浓度, 孵育 24 h 后加入  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MTT  $20 \mu\text{L}$  继续培养 4 h 后吸弃培养液, 每孔加入  $150 \mu\text{L}$  DMSO, 震荡 10 min 使结晶物充分溶解, 用酶标测定仪测定各孔的吸收度 ( $A_{570}$ ), 得到抑制率后采用 SPSS 17.0 软件计算半数抑制浓度  $\text{IC}_{50}$ 。结果见表 1~2。



表1 目标化合物3~6体外抗肿瘤活性

化合物	IC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>				
	NCI-H446	A549	Hela	SMMC-7721	HUVEC
3	9.04	7.03	8.07	7.54	85.03
4	—	6.74	—	—	>100
5	5.78	4.47	6.70	9.14	80.52
6	9.83	5.96	—	—	>100
imatinib	22.69	20.32	15.30	17.39	75.69

表2 目标化合物10a~10d体外抗肿瘤活性

化合物	IC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>				
	NCI-H446	A549	Hela	SMMC-7721	HUVEC
10a	7.61	5.52	7.82	9.74	>100
10b	—	12.35	—	—	>100
10c	—	10.64	—	—	>100
10d	14.53	8.40	—	—	90.48
gefitinib	21.96	24.31	18.30	22.89	85.28

由表1~2可知,合成的8种化合物对NCI-H446, A549, Hela, SMMC-7721肿瘤细胞的生长具有不同程度的抑制活性,抑制A549细胞的增殖活性的IC<sub>50</sub>值均在4.47~12.35 μmol·L<sup>-1</sup>范围内,其中化合物5和10a对A549的抑制效果最显著,给药后24h的IC<sub>50</sub>值达4.47 μmol·L<sup>-1</sup>和5.52 μmol·L<sup>-1</sup>,其抑制活性是各自阳性对照药的4~5倍,然而化合物对HUVEC的IC<sub>50</sub>值均大于80 μmol·L<sup>-1</sup>,明显弱于其对敏感肿瘤细胞的作用,预示该类化合物是比较安全的。

## 讨 论

体外活性测定结果显示,化合物5和6在所有细胞中的IC<sub>50</sub>值均小于伊马替尼。表明化合物5和6尾端的杂环结构中氮原子是很好的氢键受体,它们同时具有苯胺嘧啶基团和酰胺键,因此化合物5和6具有潜在抗肿瘤活性,这也符合已报道过的抗肿瘤活性较好的伊马替尼类似物,它们都具有以下三点特征:整个分子结构要在同一个平面上;尾端的小分子胺需要有两个氢键受体;苯胺嘧啶和酰胺键需要保留<sup>[10]</sup>。化合物10a~10d是萘甲酰胺类衍生物,其中化合物10a对4种肿瘤细胞均有抑制增殖作用,末端苯环的2位引入供电子集团如氨基,化合物体外细胞增殖抑制活性明显增强,这为进一步结构活性关系研究提供了参考。MTT结果说明本文所合成的目标化合物对人非小细胞肺癌A549的

抑制作用更为显著,虽然吉非替尼被认为是非小细胞肺癌治疗中最成功的靶向药物,但是由于原发性及获得性耐药的存在,从而需要新的药物从多个方面抑制EGFR信号通路。靶向EGFR特有的氨基酸残基Cys773的不可逆EGFR酪氨酸抑制剂可以在较低浓度下选择性抑制EGFR,并具有持续的封锁效应,因此能进一步增强对肿瘤细胞的抑制,且由于它和EGFR结合以共价键的方式异于可逆性TKI的非共价结合,在某些耐药机制如T790M存在的情况下仍能保持活性,因此,不可逆EGFR-TKI成为治疗第一代TKI耐药患者新的靶向方式。综上所述,本研究结果一方面可为该类4-取代-7-喹啉衍生物结构的进一步研究提供重要的科学依据;另一方面由于非小细胞肺癌中EGFR突变可以作为EGFR-TKI治疗敏感性的预测因子,所以可以通过检测EGFR突变的情况来指导临床用药和针对性个体化治疗。

## [参 考 文 献]

- [1] PAWSON T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases [J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(Suppl 5): S3-S10.
- [2] 秦爱方,李燕,宋宏锐,等. 含吡啶-2-酰胺结构的索拉非尼类似物的设计、合成及其抗肿瘤活性[J]. *药学报*, 2012, 47(12): 1623-1629.
- [3] 孙忠实,朱珠,韩风英. 酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼[J]. *中国药学杂志*, 2003, 38(1): 69-71.

(下转第600页)



## 讨 论

Penamaldate 法是基于氯化汞可与青霉噻唑衍生物形成 Penamaldate 衍生物,在 285 nm 波长处有吸收峰,原理见图 14<sup>[6]</sup>。杂质 I 和杂质 II 加入 HgCl<sub>2</sub> 溶液后,在 285 nm 波长处均呈现新的吸收峰,证明其含有青霉噻唑基团。

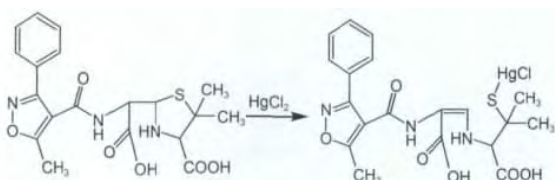


图 14 Penamaldate 法测定青霉噻唑基团原理

将杂质 I 和杂质 II 的红外吸收图谱与苯唑西林钠的红外吸收图谱比较,可以发现杂质 I 和杂质 II 中均已不含  $\beta$ -内酰胺环。(  $\beta$ -内酰胺环  $\nu_{C=O}$  的波数应为  $1780\text{ cm}^{-1}$  )。

杂质 I 和杂质 II 所对应的准分子离子峰  $[M + H]^+$  均为 420.2, 即其相对分子质量均为 419.2, 根据氮规则, 该杂质应含有奇数个氮, 进一步推测  $420.20 - 376.21 = 44$ , 失去一个羧基, 综合推断, 它们的分子归属可能为苯唑西林噻唑酸及其异构体。

从核磁共振氢谱并结合苯唑西林原料核磁共振氢谱分析可知: 杂质 I 和杂质 II 在化学位移  $\delta 7 \sim \delta 8$  之间有 2 组多重峰, 积分面积分别为 2 和 3, 应为单取代苯环上的质子。在化学位移  $\delta 4 \sim \delta 6$  之间有 2 组谱峰, 积分面积均为 1, 结合苯唑西林原料核磁共

振氢谱, 可将  $\delta 5.053$  的双峰和  $\delta 4.866$  的双峰分别归属为 12 位和 11 位质子。 $\delta 3.482$  的单峰积分面积为 1, 归属为 15 位质子。 $\delta 2.734$ ,  $\delta 1.591$ ,  $\delta 1.078$  的 3 个单峰积分面积均为 3, 应为 3 个甲基的峰, 其中  $\delta 2.734$  归属为 19 位的甲基,  $\delta 1.591$  和  $\delta 1.078$  归属为 17 和 18 位的甲基。

从核磁共振碳谱并结合苯唑西林原料核磁共振碳谱分析可知: 杂质 I 与杂质 II 分子中均有 19 个碳原子, 且各碳原子所属基团与苯唑西林基本相同。

通过以上分析, 可以证实杂质 I 与杂质 II 分别为 5R, 6R-苯唑西林噻唑酸及其异构体 5S, 6R-苯唑西林噻唑酸。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] MILLER EL. The penicillins: a review and update [J]. *Midwifery Womens Health* 2002 47(5):426-434.
- [2] RAYNOR BD. Penicillin and ampicillin [J]. *Prim Care Update Db/Gyns* 1997 29(4):147-152.
- [3] 于农, 杨峰. MRSA 的苯唑西林、头孢西丁 MIC 与 PBP2a 的相关性研究 [J]. *解放军保健医学杂志* 2006 8(4):236.
- [4] 姜伯岭 (译). 单疗程苯唑青霉素治疗梅毒的疗效 [J]. *地方病译丛* 1994 15(5):38-41.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 2010 年版. 二部. 北京: 中国医药科技出版社 2010:441.
- [6] 刘文英. 药物分析 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:232-262.
- [7] 吴琦琦, 刘雁鸣, 倪孟祥. 苯唑西林钠碱性降解物的分析研究 [J]. *药物分析杂志* 2011 31(6):1102-1105.
- [8] GHEBRE-SELLASSIE I, HEM SL, KNEVEL AM. Epimerization of benzylpenicilloic acid in alkaline media [J]. *J Pharm Sci* 1984, 73(1):125-128.

编辑: 周卓/接受日期: 2014-01-15

(上接第 590 页)

- [4] NG KP, HILLMER AM, CHUAH CTH, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer [J]. *Nat Med*, 2012, 4(18):521-528.
- [5] GRUNDSCHOBBER E, WARSCH W, SEXL V. The transcription factor STAT5 drives mutation and imatinib resistance in chronic myeloid leukemia via ROS production [J]. *BMC Pharmacol*, 2011, 11(Suppl 2):A22.
- [6] 史玉叶, 李玉峰. 慢性粒细胞白血病耐伊马替尼机制及治疗进展 [J]. *现代医学*, 2011, 39(6):751-753.
- [7] WEICKHARDT AJ, TEBBUTT NC, MARIADASON JM. Strategies for overcoming inherent and acquired resistance to EGFR inhibitors by targeting downstream effectors in the RAS/PI3K pathway [J]. *Curr Cancer Drug Tar*, 2010, 10(8):824-833.

- [8] JANMAAT ML, KRUYT FAE, RODRIGUEZ JA, et al. Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in nonsmall cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(6):2316-2326.
- [9] MOON DO, KIM MO, HEO MS, et al. Gefitinib induces apoptosis and decreases telomerase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(10):1351-1360.
- [10] 刘舒畅. 伊马替尼类似物及冬凌草甲素衍生物的合成与活性研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2010.

编辑: 郭超伟/接受日期: 2013-01-03

