

## 2-芳基取代苯/吡啶并咪唑衍生物的合成及生物活性研究

顾秀<sup>1,2,3</sup>, 焦民茹<sup>2,3</sup>, 陆冰榴<sup>2,3</sup>, 张浩<sup>2,3,4</sup>, 李建其<sup>2,3\*</sup>, 张庆伟<sup>2,3\*</sup>

(1. 上海工程技术大学 化学化工学院, 上海 201620; 2. 中国医药工业研究总院 上海医药工业研究院 化学制药新技术中心, 上海 201203; 3. 上海药物合成工艺过程工程技术研究中心, 上海 201203; 4. 复旦大学 药学院, 上海 201203)

**摘要:**目的 设计、合成系列 2-芳基取代苯/吡啶并咪唑衍生物, 进行化合物体外抗肿瘤细胞增殖活性测试, 选择活性较好的化合物进行表皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮细胞生长因子受体(KDR)和肝细胞生长因子受体(c-Met)激酶抑制活性测试。方法 以 6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4(3H)-酮为起始原料, 经过氯代、偶联、缩合、环合反应制备目标化合物 5a~5m。选择人肺癌细胞 A549 和人胃癌细胞 SNU-5 进行体外抗肿瘤增殖活性筛选, 对活性较优的化合物进行体外激酶(EGFR、KDR 和 c-Met)抑制活性测试。结果与结论 共合成 13 个未见文献报道的新化合物, 结构经 MS、<sup>1</sup>H-NMR 谱确证。体外抗肿瘤细胞活性研究结果表明, 化合物 5a 和 5f 在测试浓度下显示出优于对照药物厄洛替尼的抗增殖活性; 在测试浓度下化合物对 A549 抗增殖活性与阳性对照药厄洛替尼相比未见提高, 在 1 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度时化合物 5a 活性稍弱于阳性对照药, 且苯并咪唑类衍生物活性略优于吡啶并咪唑类衍生物。选择化合物 5a 进行体外激酶抑制活性测试, 结果显示其对 EGFR、KDR 及 c-Met 三种激酶抑制活性较弱, 提示化合物 5a 有进一步结构改造的空间, 推测喹唑啉环 6,7 位不同取代基可能对活性产生影响。本研究初步明确了 2-芳基取代苯/吡啶并咪唑衍生物主要修饰位点, 为后续深入研究构效关系提供指导。

**关键词:** 2-芳基取代苯/吡啶并咪唑; 多靶点; 抗肿瘤细胞增殖活性; 合成

**中图分类号:** R914 **文献标志码:** A

蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinases, PTKs) 能催化 ATP 磷酸基团转移到多种重要蛋白质的酪氨酸残基上, 使其残基磷酸化, 从而激活各种底物酶, 实现细胞信号通路的转导, 参与多种细胞功能<sup>[1-3]</sup>。PTKs 表达异常, 会激活一系列下游信号通路, 发生级联反应, 使信号放大增强, 导致细胞增殖调节紊乱, 最终导致肿瘤的形成。已上市的大部分靶向抗肿瘤药物均以 PTKs 为靶标<sup>[4-5]</sup>。目前已发现 PTKs 约 58 种<sup>[6-8]</sup>, 研究较多的主要有表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)<sup>[9]</sup>、血小板生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)<sup>[10]</sup>、血管内皮细胞生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、肝细胞生长因子受体 (hepatocyte growth factor receptor, HGFR) 及成纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factors receptor, FGFR)<sup>[11]</sup> 等。肿瘤是多基因、多通路相互作用的结果, 研究开发多靶

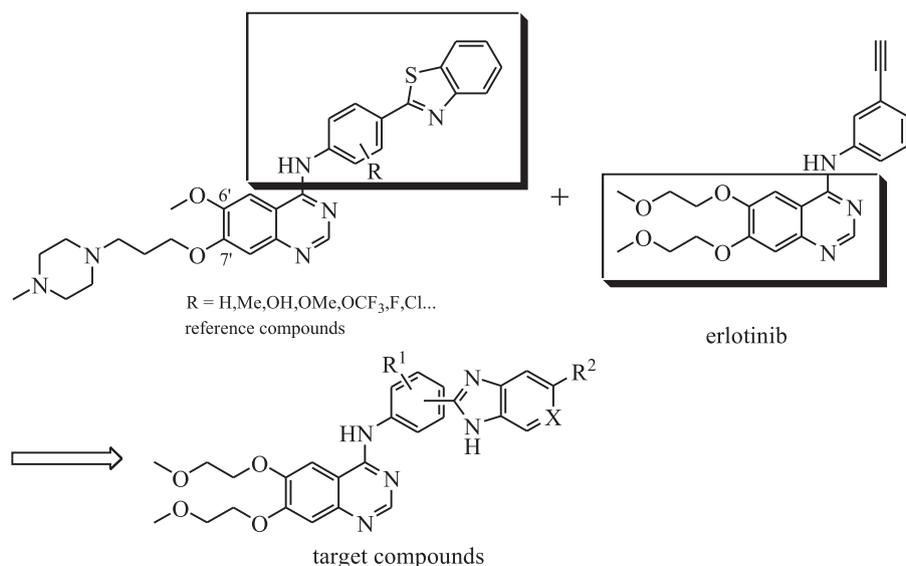
点、多通路的激酶抑制剂治疗肿瘤耐药性和复发, 代表着目前肿瘤靶向药物研发的趋势和方向。

### 1 目标化合物设计及合成路线

Tasler 等<sup>[12-13]</sup> 通过虚拟筛选发现一类具有多靶点激酶抑制活性的 2-苯基苯并咪唑片段, 将该片段作为侧链引入到 4-氨基喹唑啉母核结构中获得一类结构新颖的喹唑啉类衍生物 (图 1)。体外激酶实验显示该类化合物对 EGFR、ErbB2、PDGFRβ、VEGFR-2、VEGFR-3 和 TIE2 等多种激酶均显示纳摩尔级的抑制活性。本文以上市的 EGFR 抑制剂厄洛替尼 (erlotinib) 中的喹唑啉片段为母核, 通过电子等排在其结构中引入 2-芳基取代苯/吡啶并咪唑片段设计合成系列新化合物 5a~5m, 经体外抗肿瘤细胞增殖试验及激酶抑制活性测试, 期望获得结构新颖、体外抗肿瘤活性较好的多靶点酪氨酸激酶抑制剂。

收稿日期: 2021-04-14

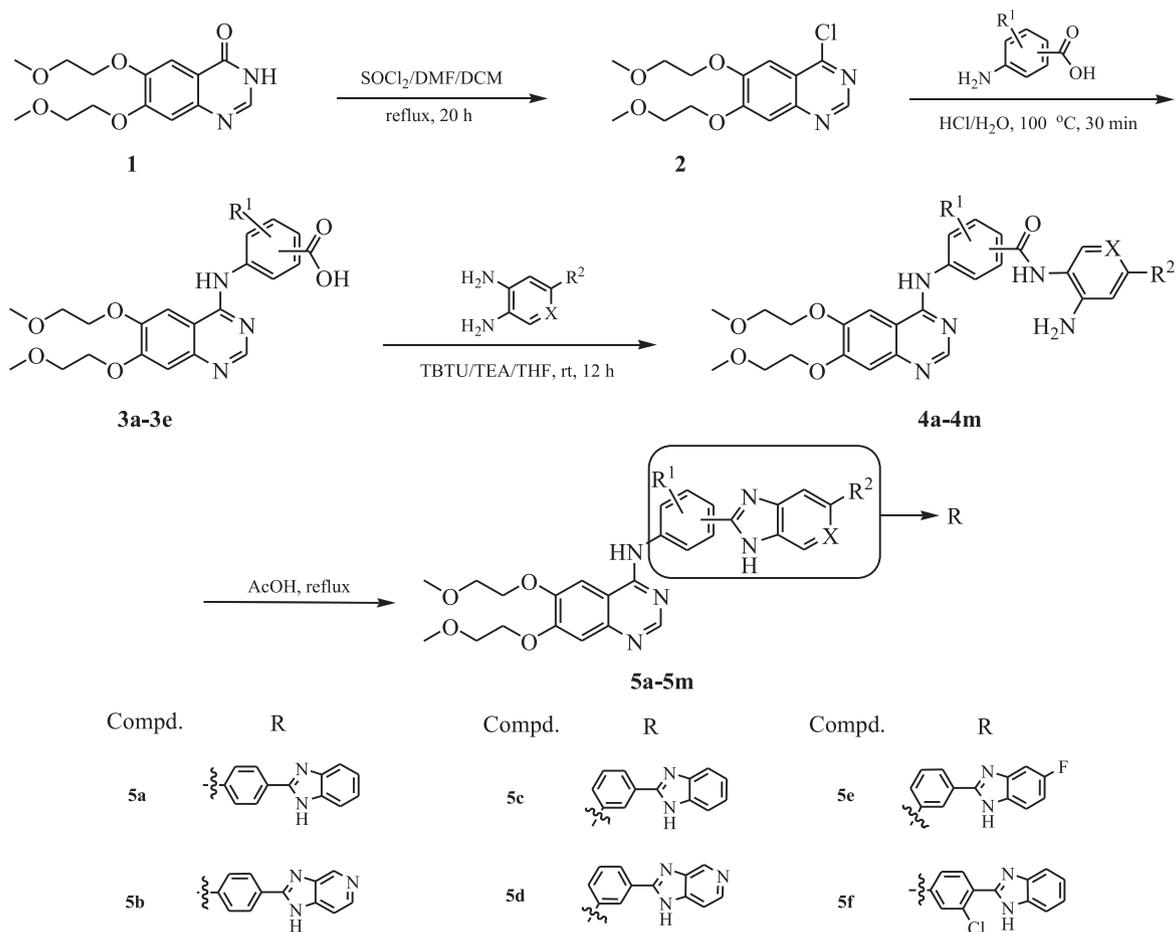
作者简介: 顾秀 (1997-), 女 (汉族), 江苏泰兴人, 硕士研究生, Tel: (021) 20572000-5060, E-mail: Guxiu\_1997@163.com; \* 通信作者: 李建其 (1957-), 男 (汉族), 江苏南通人, 研究员, 博士生导师, 主要从事创新药物及药物合成工艺研究, Tel: (021) 55514600-288, E-mail: lijq@sipi.com.cn; 张庆伟 (1983-), 男 (汉族), 山东烟台人, 副研究员, 主要从事靶向性抗肿瘤、中枢神经及心脑血管原创性新药研发及医药品种的产业化开发研究, Tel: 20572000-5061, E-mail: sipiqingwei@163.com。



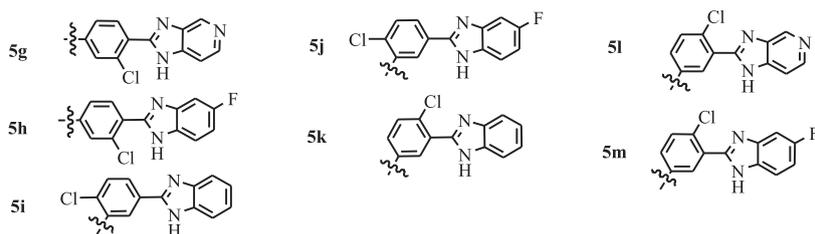
**Figure 1** Design of substituted 2-arylbenzene/pyridoimidazole as multi-target kinase inhibitors

目标化合物的合成路线如图 2 所示。以 6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4(3H)-酮(**1**)为起始原料,在氯化亚砷条件下氯代得中间体**2**,再与不同取代的氨基苯甲酸反应制备中间体**3a~3e**。

**3a~3e** 与芳基二胺缩合制得中间体**4a~4m**,再经酸性条件加热关环得目标化合物**5a~5m**。新化合物结构均经 MS 谱和<sup>1</sup>H-NMR 谱确证。



**Figure 2** Synthesis of target compounds **5a-5m**



Continued Figure 2

## 2 合成实验

熔点采用 WRR 型毛细管熔点仪测定(温度计未经校正,上海精密科学仪器有限公司);质谱采用 Finnign - MAT 212 型质谱仪测定(美国赛默飞公司);<sup>1</sup>H-NMR谱采用 Bruker AM-400 型核磁共振仪测定(DMSO-*d*<sub>6</sub> 为溶剂,TMS 为内标,德国布鲁克公司);吸光度采用 SpectraMax M5 Microplate Reader 测定(Molecular Devices公司)。反应进程采用高效薄层色谱硅胶板进行监测。所用试剂除有特殊说明外均为市售的分析纯或化学纯,未经进一步纯化。

### 2.1 4-氯-6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉(2)的制备

将 75 g (0.26 mol) 6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4(3H)-酮(1)和 9.9 mL 二甲基甲酰胺溶于 1 000 mL 二氯甲烷中,冰水浴搅拌,控温低于 30 °C 滴加 46.5 mL 二氯亚砷,滴毕,升温至 40 °C 回流反应 20 h,冷却至室温。冰水浴搅拌下,以 230 mL 水稀释,碳酸氢钠调节 pH 值为 7.0~8.0,继续搅拌 30 min,减压浓缩,正庚烷重结晶,抽滤,真空干燥得到白色固体(2)70 g,收率为 91.0%。

### 2.2 中间体 3 的合成通法,以 4-((6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-基)氨基)苯甲酸(3a)为例

将 1.54 g (5 mmol) 中间体 2 和 0.675 g (5 mmol) 4-氨基苯甲酸溶于 80 mL 水中,加入 2 mL 浓盐酸,升温至 100 °C 反应 30 min, TLC 板

检测至反应完全。冷却至室温,抽滤,少量水洗,真空干燥得到白色固体(3a)1.55 g,收率为 76.3%。

中间体 3b~3e 参考此法合成。

### 2.3 中间体 4 的合成通法,以 N-(2-氨基苯基)-4-((6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-基)氨基)苯甲酰胺(4a)为例。

将 0.826 g (2 mmol) 中间体 3a 溶于 40 mL 四氢呋喃中,加入 0.85 mL 三乙胺和 0.685 g (2.05 mmol) O-苯并三氮唑-N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯(TBTU),室温搅拌 30 min,加入 0.216 g (2 mmol) 邻苯二胺,室温搅拌过夜。减压蒸除溶剂,以 30 mL 水稀释,加入 6 mL 饱和碳酸钾溶液,用乙酸乙酯萃取(20 mL × 3),收集有机相,有机相经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸除溶剂浓缩得类白色固体,经乙醇重结晶,真空干燥得到白色固体(4a)0.959 g,收率为 95.3%。

中间体 4b~4m 参考此法合成。

### 2.4 目标化合物 5 的合成通法,以 N-(4-(1H-苯并咪唑-2-基)苯基)-6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-胺(5a)为例。

将 0.503 g (1 mmol) 中间体 4a 溶于 10 mL 乙酸中,加热至 120 °C 回流反应 2 h。冷却至室温,减压蒸除溶剂得类白色固体,经乙醇重结晶,真空干燥得到白色固体(5a)0.429 g,收率为 88.4%。

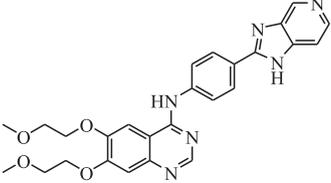
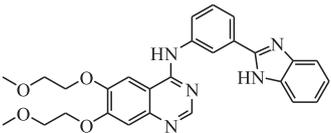
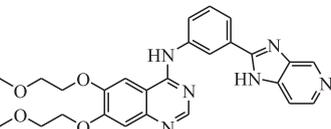
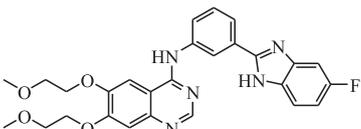
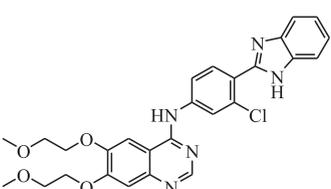
目标化合物 5b~5m 参考此法合成。13 个目标化合物的熔点、收率、MS 和核磁数据见表 1。

Table 1 The physical properties and spectral data of target compounds 5a-5m

Compd.	Structure	mp/°C	Yield/%	ESI- MS $m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H-NMR(400 Hz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ
5a		98.0-102.1	88.4	486.2	12.84 (s, 1H, NH), 9.65 (s, 1H, NH), 9.56 (s, 1H, Ar-H), 8.20 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 8.06 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.84 (s, 1H, Ar-H), 7.65 (d, J = 4.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.26 (s, 1H, Ar-H), 7.20 (s, 2H, Ar-H), 4.32 (t, J = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.55 (t, J = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.35 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )

(to be continued)

Continued Table 1

Compd.	Structure	mp/°C	Yield/%	ESI- MS $m/z$ [M + H] <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H-NMR(400 Hz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$
<b>5b</b>		110.3 – 118.4	83.1	487.2	12.88 (s, 1H, NH), 9.72 (s, 1H, NH), 8.93 (s, 1H, Ar-H), 8.57 (s, 1H, Ar-H), 8.25 – 8.33 (m, 3H, Ar-H), 8.10 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.94 (s, 1H, Ar-H), 7.59 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.26 (s, 1H, Ar-H), 4.32 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.81 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.37 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )
<b>5c</b>		148.6 – 150.2	82.9	486.2	13.01 (s, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, Ar-H), 8.52 (s, 1H, Ar-H), 8.12 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.00 (s, 1H, Ar-H), 7.90 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.67 (s, 1H, Ar-H), 7.58 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.20 – 7.28 (m, 3H, Ar-H), 4.33 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.81 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.37 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )
<b>5d</b>		136.3 – 140.7	88.0	487.2	12.80 (s, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, NH), 8.96 (s, 1H, Ar-H), 8.69 (s, 1H, Ar-H), 8.53 (s, 1H, Ar-H), 8.32 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.17 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.99 (s, 1H, Ar-H), 7.94 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, Ar-H), 7.61 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.26 (s, 1H, Ar-H), 4.32 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.76 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.37 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )
<b>5e</b>		136.0 – 138.9	81.3	504.2	12.92 (s, 1H, NH), 9.72 (s, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, Ar-H), 8.52 (s, 1H, Ar-H), 8.14 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.99 (s, 1H, Ar-H), 7.88 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.59 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.56 (s, 1H, Ar-H), 7.41 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.26 (s, 1H, Ar-H), 7.08 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 4.33 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.81 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.37 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )
<b>5f</b>		241.6 – 246.2	74.5	520.1	12.60 (s, 1H, NH), 8.59 (s, 1H, NH), 8.29 (s, 1H, Ar-H), 8.12 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.00 (s, 1H, Ar-H), 7.92 (s, 1H, Ar-H), 7.67 – 7.59 (m, 2H, Ar-H), 7.27 (s, 1H, Ar-H), 7.28 – 7.20 (m, 3H, Ar-H), 4.33 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.81 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.37 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )

(to be continued)

Continued Table 1

Compd.	Structure	mp/°C	Yield/%	ESI- MS $m/z$ [M + H] <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H-NMR(400 Hz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$
5g		107.9 – 114.8	89.6	521.1	13.10 (s, 1H, NH), 9.76 (s, 1H, NH), 8.82 (s, 1H, Ar-H), 8.60 (s, 1H, Ar-H), 8.22 (s, 1H, Ar-H), 8.15 – 8.07 (m, 2H, Ar-H), 7.99 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.94 (s, 1H, Ar-H), 7.45 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.27 (s, 1H, Ar-H), 4.32 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.81 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.37 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )
5h		155.1 – 159.9	79.2	538.2	12.75 (s, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, Ar-H), 8.32 (s, 1H, Ar-H), 8.04 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.92 (s, 1H, Ar-H), 7.64 (s, 1H, Ar-H), 7.41 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.29 (s, 1H, Ar-H), 7.11 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 4.33 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.80 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.39 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )
5i		269.9 – 273.8	85.5	520.2	13.02 (s, 1H, NH), 9.71 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 2H, Ar-H), 8.13 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.92 (s, 1H, Ar-H), 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.64 – 7.56 (m, 2H, Ar-H), 7.28 – 7.20 (m, 3H, Ar-H), 4.30 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.80 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.39 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )
5j		93.4 – 96.0	85.3	538.2	13.14 (s, 1H, NH), 9.71 (s, 1H, NH), 8.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ar-H), 8.11 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (s, 1H, Ar-H), 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.59 (s, 1H, Ar-H), 7.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.25 (s, 1H, Ar-H), 7.07 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 4.30 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.78 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.38 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )
5k		238.4 – 241.9	77.9	520.1	12.88 (s, 1H, NH), 9.81 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1H), 8.41 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, Ar-H), 8.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.95 (s, 1H, Ar-H), 7.72 – 7.64 (m, 3H, Ar-H), 7.27 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H, Ar-H), 4.31 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.80 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.38 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )

(to be continued)

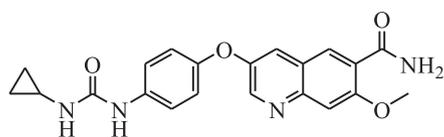
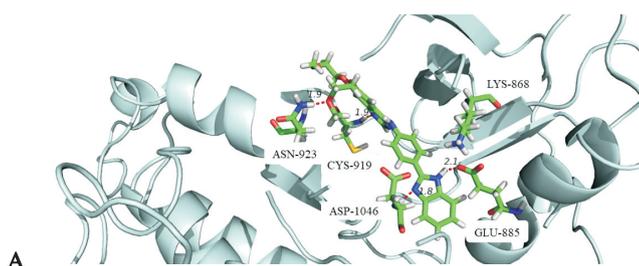
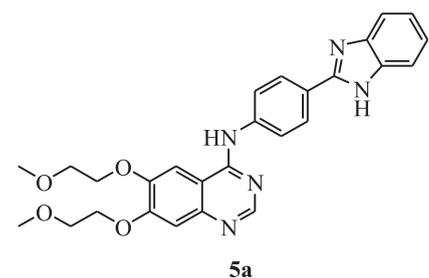
Continued Table 1

Compd.	Structure	mp/°C	Yield/%	ESI- MS $m/z$ [M + H] <sup>+</sup>	<sup>1</sup> H-NMR(400 Hz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$
<b>5l</b>		199.4 – 206.8	88.7	521.2	13.07 (s, 1H, NH), 9.67 (s, 1H, NH), 8.88 (s, 1H, Ar-H), 8.52 (s, 1H, Ar-H), 8.45 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.19 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.15 (s, 1H, Ar-H), 7.95 (s, 1H, Ar-H), 7.60 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.51 (s, 1H, Ar-H), 7.25 (s, 1H, Ar-H), 4.31 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.80 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.38 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )
<b>5m</b>		83.7 – 89.9	85.2	538.1	13.02 (s, 1H, NH), 9.95 (s, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, Ar-H), 8.41 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.22 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.96 (s, 1H, Ar-H), 7.69 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.59 (s, 1H, Ar-H), 7.47 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.26 (s, 1H, Ar-H), 7.14 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 4.31 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.78 (t, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.38 (s, 6H, CH <sub>3</sub> )

### 3 分子对接

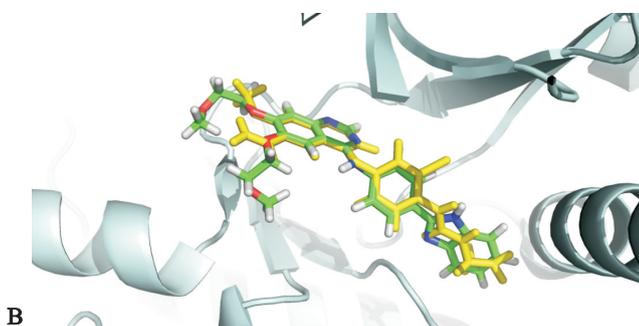
利用计算机辅助药物设计软件,将设计的化合物 **5a** 与 VEGFR-2 (KDR, PDB code: 3WZD) 蛋白进行对接,初步考察化合物设计的合理性。化合物 **5a** 与 VEGFR-2 (KDR) 蛋白作用模式(图

3A)表明,化合物母核咪唑啉的氮原子与蛋白残基 Cys919 形成关键氢键作用,同时苯并咪唑的咪唑部分与蛋白残基 Glu-885 和 Asp-1046 形成氢键作用。且 **5a** 结构可与原配体分子乐伐替尼叠合,显示较好的叠合度(图 3B),提示设计的化合物可能具有 VEGFR 抑制活性。



VEGFR-2 IC<sub>50</sub> = 4.0 nmol·L<sup>-1</sup>

VEGFR-3 IC<sub>50</sub> = 5.2 nmol·L<sup>-1</sup>



**Figure 3** Action mode of compound **5a** and KDR kinase (A); Structure superimposition of compound **5a** and lenvatinib (B)

## 4 体外活性研究

### 4.1 体外抗肿瘤细胞增殖活性试验

选择人肺癌细胞 A549 (EGFR、KDR 高表达) 和人胃癌细胞 SNU-5 (c-Met 高表达), 以上市药物厄洛替尼 (erlotinib) 为阳性对照, 采用 CCK-8 法<sup>[13]</sup> 评价目标化合物的抗肿瘤增殖活性。

体外培养人肺癌细胞 A549 和人胃癌细胞 SUN-5, 细胞生长至对数生长期后, 收集细胞。将细胞浓度调整至合适浓度, 接种 96 孔板, 每孔接种 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液。细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、100% 相对湿

度、体积分数为 5% 的  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 24 h。细胞完全贴壁后, 加入以 DMSO 稀释的待测化合物 ( $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。同样条件下继续培养 48 h。加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液并置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 4 h。震荡后测定 450 nm 波长处的吸光度, 以 650 nm 处吸光度 (OD) 作为参比, 计算抑制率<sup>[14]</sup>。

肿瘤细胞生长抑制率% =  $[(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\%$ , 其中,  $As$  为样品的组平均 OD 比值,  $Ac$  为阴性对照的组平均 OD 比值,  $Ab$  为阳性对照的组平均 OD 比值。

Table 2 Anti-proliferation activities of target compounds 5a–5m ( $n = 2$ )

Compd.	R	Inhibition/%			
		A549		SNU-5	
		$1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
5a		42.50	-1.18	55.96	1.39
5b		-4.24	-9.31	-11.15	-2.38
5c		10.12	4.13	-22.13	-8.04
5d		-7.90	2.89	-7.60	-1.61
5e		0.35	-1.47	-22.8	5.05
5f		11.91	-6.90	29.23	5.49
5g		-13.14	-8.43	-4.49	-4.38
5h		2.77	2.71	0.83	-9.04
5i		8.96	-0.35	-1.94	-0.50
5j		-2.30	4.36	-2.94	-4.05
5k		7.84	1.41	-12.81	-12.59
5l		-4.30	-6.60	-2.05	10.15
5m		-1.05	1.24	-31.34	-15.03
erlotinib		53.53	18.52	-6.57	7.87

实验结果表明:阳性对照厄洛替尼对 SNU-5 抑制活性较弱,在  $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  测试浓度下,目标化合物 **5a** 和 **5f** 对 SNU-5 的抗增殖活性优于厄洛替尼;目标化合物对 A549 抗增殖活性与厄洛替尼相比未见提高,在  $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度时目标化合物 **5a** 活性稍弱于厄洛替尼;苯并咪唑类衍生物活性略优于吡啶并咪唑类衍生物,如 **5a** > **5b**, **5f** > **5g**。

#### 4.2 体外激酶抑制活性试验

体外抗肿瘤细胞活性研究结果表明,化合物 **5a**

在测试浓度下显示优于对照药物厄洛替尼的抗增殖活性。选择化合物 **5a** 进行 EGFR、VEGFR (KDR)、HGFR (c-Met) 三种激酶的体外抑酶试验,酶测试方法以 c-Met 激酶为例,具体实验方法参见文献<sup>[15]</sup>。

酶抑制活性结果(表 3)显示,化合物 **5a** 对 EGFR、KDR、c-Met 三种激酶抑制活性较弱,结合其细胞活性提示化合物可能还作用于其它激酶,与参考文献报道的化合物活性  $\text{IC}_{50}$  为纳摩尔浓度级别存在较大差距,有待进一步深入考察。

Table 3 Inhibition to enzyme of compound

Compd.	Inhibition/%					
	EGFR		KDR		C-Met	
	$1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>5a</b>	26.9	12.8	15.9	1.2	37.5	8.7
cabozantinib	44.3	16.5	100.0	98.1	100.8	99.5

## 4 结论

文献[12]报道将苯基苯并噻唑结构片段以侧链形式引入噻唑啉母核中,具有较好的多靶点激酶抑制活性和抗肿瘤活性。因此,本文运用生物电子等排原理,在 EGFR 抑制剂厄洛替尼噻唑啉母核的侧链位置上引入苯(或吡啶)并咪唑片段,得到一系列 2-芳基取代苯/吡啶并咪唑衍生物,以考察其抗肿瘤活性。

首先以厄洛替尼为阳性对照药,选择敏感细胞株人肺癌细胞 A549 (EGFR、KDR 过表达肿瘤株) 和人胃癌细胞 SNU-5 (c-Met 过表达肿瘤株) 进行体外抗肿瘤细胞增殖活性筛选。实验结果表明,目标化合物 **5a** 对 A549 细胞、SUN-5 细胞显示一定程度的抑制作用,在  $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  测试浓度下对 A549 细胞的抗增殖作用稍弱于厄洛替尼,对 SNU-5 细胞株的抗增殖作用优于厄洛替尼。目标化合物 **5a** 体外激酶抑制活性试验结果表明,目标化合物 **5a** 对 EGFR、VEGFR (KDR)、HGFR (c-Met) 三种激酶抑制活性较弱,与参考文献报道的化合物对相关酶抑制活性 ( $\text{IC}_{50}$  为纳摩尔浓度级别) 存在差距。鉴于本论文所用 2-苯基苯并咪唑与文献中 2-苯基苯并噻唑片段互为电子等排体,所设计化合物仅噻唑啉环 6,7 位取代基不同,推测噻唑啉环 6,7 位取代基对活性影响较大,后续将设计 6,7 位的不同取代基的化合物进行活性验证。

#### 参考文献:

[1] PAWSON T. Regulation and targets of receptor tyro-

- sine kinases[J]. Eur J Cancer, 2002, 38 (5): 3 - 10.
- [2] SUHARDJA A, HOFFMAN H. Role of growth factors and their receptors in proliferation of microvascular endothelial cells[J]. Microsc Res Tech, 2003, 60 (1): 70 - 75.
- [3] BIKFALVI A, BICKNELL R. Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting[J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23 (12): 576 - 582.
- [4] 毛艳艳, 高柳滨. Report on global development of antitumor drugs (2016) [J]. 科技导报, 2016, 34(11): 21 - 24.
- [5] WEI L, MALHOTRA S V. Recent development of cyclic amide (pyridone/lactam) moiety containing heterocycles as protein kinase inhibitors [J]. Curr Med Chem, 2010, 17(3): 234 - 253.
- [6] COHEN P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century[J]. Nat Rev Drug Discovery, 2002, 1(4): 309 - 315.
- [7] FAIVRE S, DJELLOUL S, RAYMOND E. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors [J]. Semin Oncol, 2006, 33(4): 407 - 420.
- [8] VIETH M, HIGGS R E, ROBERTSON D H, et al. Kinomics—structural biology and chemogenomics of kinase inhibitors and targets[J]. Biochim Biophys Acta, Proteins Proteomic, 2004, 1697(1/2): 243 - 257.
- [9] TSANG J E, URNER L M, KIM G, et al. Development of a potent brain-penetrant EGFR tyrosine kinase inhibitor against malignant brain tumors [J]. ACS Med Chem Lett, 2020, 11(10): 1799 - 1809.
- [10] PASQUALE G D, DAVIDSON B L, STEIN C S, et al. Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction[J]. Nat Med, 2003, 9 (10): 1306 - 1312.
- [11] ITOH N, ORNITZ D M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families[J]. Trends Genet, 2004, 20(11): 563 - 569.

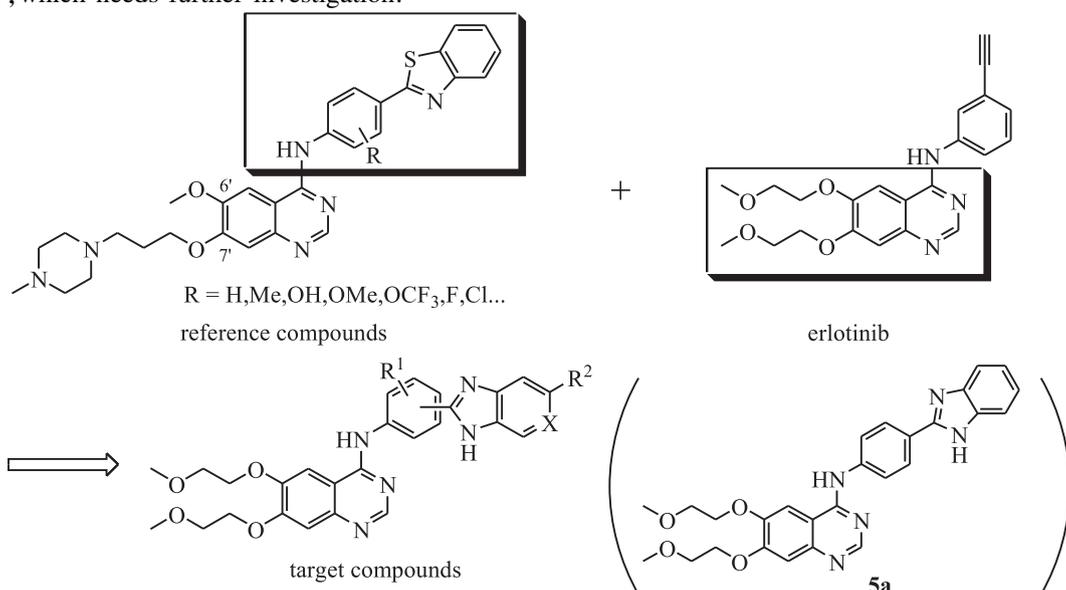
- [12] TASLER S, MÜLLER O, WIEBER T, et al. Substituted 2-arylbenzothiazoles as kinase inhibitors; hit-to-lead optimization [J]. *Bioorg Med Chem* 2009, 17 (18): 6728 – 6737.
- [13] TASLER S, MÜLLER O, WIEBER T, et al. N-substituted 2'-(aminoaryl) benzothiazoles as kinase inhibitors; hit identification and scaffold hopping [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19 (5): 1349 – 1356.
- [14] YDA F, XFA F, PSBCD F, et al. Discovery and biological evaluation of pyrimido[4,5-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione derivatives as potent bruton's tyrosine kinase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27(15): 3390 – 3395.
- [15] HUANG D, HUANG L, ZHANG Q, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 6,11-dihydro-5H-benzo[e]pyrimido-[5,4-b][1,4]diazepine derivatives as potential c-Met inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 140(11): 212 – 218.

## Synthesis and biological activity of 2-aryl substituted benzene/pyridoimidazole derivatives

GU Xiu<sup>1,2,3</sup>, JIAO Min-ru<sup>2,3</sup>, LU Bing-liu<sup>2,3</sup>, ZHANG Hao<sup>2,3,4</sup>, LI Jian-qi<sup>2,3\*</sup>, ZHANG Qing-wei<sup>2,3\*</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China; 2. Novel Technology Center of Pharmaceutical Chemistry, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 4. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** According to literature reports, a series of new compounds were designed and synthesized by introducing a 2-aryl substituted benzene/pyridoimidazole fragment into the quinazoline core. Using 6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4(3H)-one as the starting material, the target compounds were prepared through chlorination, coupling, condensation, and ring closure reactions. Thirteen new target compounds (**5a** – **5m**) were synthesized, and their structures were confirmed by MS and <sup>1</sup>H-NMR spectra. Compounds **5a** and **5f** showed better anti-proliferative activity to SNU-5 cells than erlotinib at the test concentration. Further tests showed that the inhibitory activity of compound **5a** on EGFR, KDR and c-Met kinases was weak. It is speculated that the different substituents at 6,7 positions of quinazoline ring may affect the activity, which needs further investigation.



**Key words:** 2-aryl substituted benzene/pyridoimidazole; multiple targets; anti-tumor cell proliferation activity; synthesis