水杨酰芳胺类化合物的设计、合成及体外抗肿瘤活性研究

王 杰^a 邬 皓^a 李家明^{*,a} 许勤龙^a 何广卫^b
钟国琛^a 张艳春^a

(^a 安徽中医学院药学院 安徽省现代中药重点实验室 合肥 230031)

(^b 合肥医工医药有限公司 合肥 230059)

摘要 根据骨架跃迁原理, 设计并合成了一系列具有酪氨酸激酶抑制剂拉帕替尼(Lapatinib)和诺拉替尼(Neratinib)结构片段的水杨酰芳胺类化合物, 其结构均经 IR, ¹H NMR, ¹³C NMR 和 MS 确证. 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法考察所合成化合物的体外抗肿瘤细胞(A549, MCF-7, SGC-7901, Bel-7402)活性. 结果表明, 所合成的化合物对 4 种肿瘤细胞增殖均有一定的抑制活性, 部分化合物的活性强于阳性对照药吉非替尼(Gefitinib).

关键词 水杨酰芳胺; 酪氨酸激酶抑制剂; 抗肿瘤

Design, Synthesis, and Biological Evaluation of *N*-Aryl-salicylamide Derivatives as Potential Antitumor Agents

Wang, Jie^a Wu, Hao^a Li, Jiaming^{*,a} Xu, Qinlong^a He, Guangwei^b
Zhong, Guochen^a Zhang, Yanchun^a

(^a Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Department of Pharmacy,
Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031)

(^b Hefei Medical Engineering Pharmaceutical Co, Ltd., Hefei 230059)

Abstract According to the scaffold hopping, a series of *N*-aryl-salicylamide derivatives, which have fragments of tyrosine kinase inhibitors lapatinib and neratinib were designed and synthesized. Their structures were identified by IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and MS techniques. The target compounds were tested for cytotoxic activity against four cancer cell lines, including A549, MCF-7, SGC-7901, Bel-7402, by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) *in vitro*. All the compounds demonstrated certain antitumor abilities, and some of them were better than gefitinib.

Keywords *N*-aryl-salicylamide; tyrosine kinase inhibitors; antitumor

长期以来, 肿瘤治疗一直是世界性的难题, 也是医药研究面临的一项挑战. 近些年来, 随着分子生物学和细胞生物学的快速发展, 人们逐渐认识到细胞癌变的本质可能是细胞信号转导通路失调导致的细胞无限增殖, 抗肿瘤药物研发的理念也从传统细胞毒类药物的研究(主要作用于 DNA, RNA 和微管蛋白)转向寻找针对细胞内信号转导通路的新型抗肿瘤药物^[1,2]. 在此研究基础上科学家们已发现了多种抗肿瘤的新药物靶标, 其中蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)作为新型靶标引起了人们的高度关注. PTK 是一类具有酪氨酸激酶活性的蛋白质, 其与配体结合导致重要的构象变化, 暴

露受体中的二聚环结构, 引发自身磷酸化, 转导下游信号, 调节细胞的增殖、凋亡、迁移、存活等一系列生理生化过程, 而 PTK 的过度表达则会促进细胞的癌变, 导致肿瘤的发生. 因此许多科研工作者致力于发现、设计与合成酪氨酸激酶抑制剂, 并取得了一定的成果, 如: 吉非替尼(Gefitinib)、拉帕替尼(Lapatinib)和厄洛替尼(Erlotinib) (图 1)等 9 个小分子蛋白酪氨酸激酶抑制剂已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市, 诺拉替尼(图 1)等 100 多个候选药物正处于临床试验阶段^[3~8].

近年来, 水杨酰胺类化合物的抗肿瘤活性引起了人们的高度关注, 文献报道, 4-(4-氨基苯基)-*N*-(3-氯苯基)

* E-mail: lijiaming2004@sina.com

Received December 3 2012; revised January 15, 2013; published online January 21, 2013.

安徽省自然科学基金(No. 1208085MH128)、国家创新药物孵化基地(No. 2012ZX09401066)资助项目.

水杨酰胺和 *N*-(3-氯苯基)-4-羟基水杨酰胺(图 1)对表皮生长因子受体(EGFR)具有选择性抑制活性, 其 IC_{50} 分别达到 23 和 71 nmol/L^[9,10]. Zhu 等^[11]研究发现 5-氯-2-羟基-*N*-(喹啉-8-基)苯甲酰胺可选择性作用于血管内皮生长因子受体(VEGFR)中的 VEGFR-2 亚型, IC_{50} 为 3.8 nmol/L. 治疗血吸虫病的药物氯硝柳胺也属于水杨酰胺类化合物(图 1), Ding 等^[12]研究发现氯硝柳胺对肺癌、前列腺癌、口腔上皮癌、肾癌、结肠癌、急性髓细胞性白血病等显示出良好的抗癌活性. 水杨酰胺类化合物结构中的 2 位羟基与酰胺羰基通过分子内氢键形成一个六元环构型, 该构型与酪氨酸激酶抑制剂替尼类抗肿瘤药物的主要基本母核 4-芳氨基喹啉的空间构型具有相似性(图 2), 因而产生类似酪氨酸激酶抑制剂的抗肿瘤活性^[13].

基于骨架迁越和分子片断的药物设计是近年发展、成熟起来的寻找先导化合物或类药的有效方法. 本文以

氯硝柳胺和 5-氯-2-羟基-*N*-(喹啉-8-基)苯甲酰胺中的水杨酰胺片断和诺拉替尼分子结构中的 3-氯-4-(吡啶-2-甲氧基)苯胺片断为基础, 设计并合成了 16 个新型水杨酰胺类化合物. 以吉非替尼为阳性对照, 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法筛选化合物的体外抗肿瘤活性, 结果表明, 化合物 **5c**~**10c** 对非小肺癌细胞株 A549、肝癌细胞株 BEL-7402、乳腺癌细胞株 MCF-7、胃癌细胞株 SGC-7901 的抑制活性强于吉非替尼. 化合物的合成路线如 Scheme 1 所示.

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

以 2-氯-4-硝基苯酚为原料, 经醚化反应、还原反应化合物 **5c**~**10c** 是由 4-(3-氟苄氧基)-3-氯苯胺(**4c**)和不同取代的水杨酸类似物经一步酰胺化反应而制得. 目标

图 1 吉非替尼、拉帕替尼、诺拉替尼、氯硝柳胺等化合物的化学结构式

Figure 1 Structures of gefitinib, lapatinib, neratinib, and *N*-aryl-salicylamide derivatives

图 2 吉非替尼与水杨酰胺类化合物的骨架迁越图

Figure 2 Scaffold hopping of gefitinib and *N*-aryl-salicylamide derivatives

图3 化合物的设计思路

Figure 3 Design strategy for target compounds

Reagents and condition: (i) K₂CO₃, NaI/DMF, 60 °C 16 h; (ii) Fe, NH₄Cl/95% alcohol; (iii) PCl₃/chlorobenzene, 135 °C, 8 h

Scheme 1

产物的产率普遍不高, 可能是由于吡啶环上的氮原子碱 后得到中间体 4a 和 4b, 再和不同取代的水杨酸通过一

步酰胺化反应得最终目标产物 **5a~9a** 和 **5b~9b**. 目标性较强, 容易和反应中生成的盐酸成盐, 导致原料难以继续反应, 影响产率. *N*-4[(吡啶-2-基-甲氧基)-3-氯苯基]-2-羟基-4-硝基苯甲酰胺(**10a**)和 *N*-4[(吡啶-3-基-甲氧基)-3-氯苯基]-2-羟基-4-硝基苯甲酰胺(**10b**)也属于设计的目标化合物范畴, 但在合成的过程中, 多次尝试都未得到这两个化合物, 可能是由于取代基的强吸电子效应影响了反应历程, 同时由于此类化合物的溶解度很差, 无法分离纯化, 最终未能制得化合物 **10a** 和 **10b**. 本课题组在酰胺化反应中采用滴加脱水剂 PCl_3 , 主要原因是水杨酸的 2 位羟基与羧基会形成一个分子内氢键, 采用酰氯的方法产率很低.

1.2 目标化合物的抗肿瘤活性

MTT 实验结果见表 1, 从表 1 中数据可知, 目标化

合物对 4 种肿瘤细胞均有不同程度的抑制活性. 侧链为拉帕替尼片段的化合物 **5c~10c** 表现出较好的抑制活性, 明显优于阳性对照吉非替尼. 而吡啶环上氮原子在 2 位的化合物 **5a~9a** 对肿瘤株的抑制活性明显优于氮原子在 3 位的化合物 **5b~9b**. 另外, 多个化合物表现出对不同细胞均有较高的抑制活性, 例如 **9a** 对 4 种细胞 A549, MCF-7, SGC-7901, Bel-7402 的 IC_{50} 值分别为 9.76, 9.63, 15.32, 12.92 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 当侧链为诺拉替尼和拉帕替尼片段时, R 为 5 位氯取代(**9a**, **9c**), 活性优于其他取代基. 此外, 当侧链为诺拉替尼片段时, 考虑取代基电效应的影响, R 为 4 位给电子基(**6a**, **7a**)时针对 A549 细胞的抑制活性优于吸电子基(**5a**, **8a**), 其他肿瘤的抑制活性无明显规律. 详细构效关系有待进一步研究证明.

表 1 目标化合物的体外抗肿瘤活性

Table 1 Antitumor activity of target compounds *in vitro*

Compd.	R^1	Ar	Cytotoxicity in different cell lines (IC_{50} , $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
			A549	MCF-7	SGC-7901	Bel-7402
5a	4-Cl		15.81	13.6	13.63	14.54
6a	4-CH ₃		10.07	8.95	12.69	18.72
7a	4-OCH ₃		14.99	11.43	11.73	16.04
8a	4-CF ₃		15.89	12.42	10.69	11.10
9a	5-Cl		9.76	9.63	15.32	12.92
5b	4-Cl		55.16	50.74	77.56	52.39
6b	4-CH ₃		43.63	47.01	83.29	42.99
7b	4-OCH ₃		47.45	53.10	81.54	58.73
8b	4-CF ₃		67.96	67.25	60.40	70.37
9b	5-Cl		63.44	49.85	66.32	57.08
5c	4-Cl		9.29	10.18	16.68	13.51

续表

Compd.	R ¹	Ar	Cytotoxicity in different cell lines (IC ₅₀ , μmol·L ⁻¹)			
			A549	MCF-7	SGC-7901	Bel-7402
6c	4-CH ₃		10.44	9.43	11.34	19.05
7c	4-OCH ₃		10.77	8.60	12.55	19.94
8c	4-CF ₃		9.22	10.28	14.63	12.10
9c	5-Cl		8.95	13.04	14.25	16.11
10c	4-NO ₂		11.15	9.99	15.56	22.56
Gefitinib			32.6	28.04	25.33	38.09

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

WRS-1B 数字熔点仪、SGW X-4 型显微熔点仪(上海精密科学仪器有限公司); LCQ ADVANTAGE MAX 液质连用质谱仪(FINNIGA 公司), Micromass GCT-MS (英国质谱公司); Nicolet Avatar 370 DTGS 型红外光谱仪(KBr 压片); Bruker 300 MHz、400 MHz 超导核磁共振仪(DMSO-*d*₆ 或 CDCl₃ 为溶剂, TMS 为内标); BS 240 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); 立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-40KB, 上海申安医疗器械厂); CO₂ 培养箱(2306-Z, 美国 SHELLAB 公司); 超净工作台(SW-CJ-1F 型, 苏州净化设备有限公司); 显微镜(ECLIPSE TE300, NILON 公司); 全波段酶标仪(MULISKAN MK3, 荷兰雷勃公司)。

4-甲基水杨酸、4-甲氧基水杨酸、4-三氟甲基水杨酸、4-氯水杨酸、5-氯水杨酸、4-硝基水杨酸、2-(氯甲基)吡啶盐酸盐和 3-(氯甲基)吡啶盐酸盐均购自上海卓锐化工有限公司; 2-氯-4-硝基苯酚、4-(3-氟苄氧基)-3-氯苯胺购自南京安格医药化工有限公司, 吉非替尼对照品由浙江武义家园医药原料有限公司提供, 其它试剂均为市售分析纯, 薄层和柱层析用硅胶均为烟台德信生物科技有限公司产品。

2.2 化合物的合成

2.2.1 2-[(2-氯-4-硝基苯氧基)甲基]吡啶(3a)的合成

在 250 mL 三颈瓶中依次加入 2-(氯甲基)吡啶盐酸盐(5.0 g, 30 mmol), 碳酸钾(8.4 g, 60 mmol), DMF (100 mL), 室温搅拌 0.5 h 后, 加入 2-氯-4-硝基苯酚(5.3 g, 30 mmol)和碘化钠(0.25 g, 15 mmol), 于 60 °C 反应 16 h, TLC [*V*(氯仿):*V*(甲醇)=10:1 为展开剂]检测显示反

应基本完全, 抽滤, 将滤液加入到 400 mL 水(冰浴)中, 搅拌, 抽滤, 水洗, 得 4.4 g 黄色固体, 收率 60%, m.p. 149.2~149.9 °C(文献值^[14]: m.p. 149~150 °C)。

用 3a 方法类似可得到 3-[(2-氯-4-硝基苯氧基)甲基]吡啶(3b), 黄色固体, 收率 56%, m.p. 142.2~143.5 °C。

2.2.2 4-[(吡啶-2-基)甲氧基]-3-氯苯胺(4a)的合成

在 250 mL 三颈瓶中依次加入 2a (4.5 g, 17 mmol), 铁粉(3.8 g, 68 mmol), 氯化铵(5.4 g, 102 mmol)和 95% 的乙醇(80 mL), 于 85 °C 下, 回流 12 h, TLC [氯仿为展开剂]检测显示反应基本完全。趁热抽滤, 浓缩, 固体用二氯甲烷溶解, 水和饱和碳酸氢钠水溶液萃取至 pH 9~10, 分液, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 浓缩, 得到 2.6 g 淡黄色固体, 收率 71%, m.p. 90.1~91.8 °C(文献值^[14]: m.p. 91~92 °C)。

用 4a 方法类似可得到 4-[(吡啶-3-基)甲氧基]-3-氯苯胺(4b), 淡黄色固体, 收率 68%, m.p. 88.7~89.9 °C。

2.2.3 *N*-{4-[(吡啶-2-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-4-氯苯甲酰胺(5a)的合成

在 250 mL 三颈瓶中, 依次加入 4a (3.0 g, 13 mmol), 4-氯水杨酸(5) (2.2 g, 12 mmol), 氯苯(30 mL), 于 80 °C 下, 搅拌回流至固体完全溶解, 升温至 135 °C, 再向其中缓慢滴加 PCl₃ (0.52 mL, 6 mmol), 继续反应 8 h, TLC [*V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=2:1]检测显示反应完全。趁热抽滤、冷却, 产品析出, 抽滤, 用丙酮重结晶得纯品^[15]。白色固体, 产率 36%, m.p. 220.8~221.5 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 Hz) δ: 11.92 (s, 1H, NH), 10.34 (s, 1H, OH), 8.60 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, PyH), 7.94~7.91 (m, 2H, PhH), 7.88 (dd, *J*=7.8, 1.5 Hz, 1H, PyH), 7.58~7.54 (m, 2H, PyH), 7.39~7.35 (m, 1H, PhH), 7.26 (d, *J*=9.0 Hz, 1H, PhH), 7.05~7.02 (m, 2H, PhH), 5.28 (s, 2H,

CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 165.5, 159.0, 156.2, 150.0, 149.0, 137.4, 137.1, 132.1, 130.6, 123.0, 122.6, 121.4, 121.1, 120.8, 119.2, 116.9, 116.8, 114.4, 71.1; IR (KBr) ν : 3341.9, 3075.1, 1662.4, 1600.1, 1545.7, 1502.3, 1443.5, 1411.3, 1280.1, 1215.7, 1063.9, 913.4 cm⁻¹; ESI-MS m/z : 386.89 (M⁺ - H). HRMS calcd for C₁₉H₁₄Cl₂N₂O₃ 388.0381, found 388.0379.

用类似的方法制得化合物 **6a**~**9a**.

N-{4-[(吡啶-2-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-4-甲基苯甲酰胺(**6a**): 白色固体, 产率 54%. m.p. 219.2~221.0 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 11.91 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, OH), 8.60 (d, J =4.8 Hz, 1H, PyH), 7.92 (s, 1H, PhH), 7.89 (t, J =7.6 Hz, 2H, PyH), 7.59 (d, J =8.4 Hz, 2H, PhH), 7.38 (t, J =6.0 Hz, 1H, PyH), 7.26 (d, J =8.8 Hz, 1H, PhH), 6.80 (d, J =8.4 Hz, 2H, PhH), 5.28 (s, 2H, CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ : 166.9, 159.2, 156.3, 150.0, 149.1, 144.4, 137.1, 132.1, 128.5, 123.0, 122.8, 121.4, 121.1, 121.0, 120.0, 117.5, 114.3, 113.8, 71.1, 21.1; IR (KBr) ν : 3340.4, 3068.8, 2915.3, 1661.6, 1598.5, 1544.0, 1504.0, 1413.6, 1373.7, 1284.2, 1245.3, 1218.7, 1141.8, 1064.4, 799.3, 751.6 cm⁻¹; ESI-MS m/z : 367.07 (M⁺ - H). HRMS calcd for C₂₀H₁₇ClN₂O₃ 368.0928, found 368.0921.

N-{4-[(吡啶-2-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-4-甲氧基苯甲酰胺(**7a**): 白色固体, 产率 43%. m.p. 222.7~224.1 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 12.35 (s, 1H, NH), 10.20 (s, 1H, OH), 8.60 (d, J =4.4 Hz, 1H, PyH), 7.96 (t, J =8.8 Hz, 1H, PhH), 7.88 (t, J =2.4 Hz, 2H, PyH), 7.58~7.54 (m, 2H, PhH), 7.38 (t, J =5.2 Hz, 1H, PyH), 7.26 (d, J =9.2 Hz, 1H, PhH), 6.57 (dd, J =2.0, 8.8 Hz, 1H, PhH), 6.50 (d, J =2.0 Hz, 1H, PhH), 5.28 (s, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 167.2, 163.8, 161.8, 156.3, 150.0, 149.1, 137.0, 132.1, 129.9, 123.0, 122.9, 121.4, 121.1, 121.0, 114.3, 108.7, 106.3, 101.3, 71.2, 55.4; IR (KBr) ν : 3346.3, 3074.7, 1661.0, 1602.8, 1544.9, 1505.1, 1439.8, 1397.3, 1278.9, 1244.3, 1215.3, 1161.3, 1099.5, 1060.3, 1033.2 cm⁻¹; ESI-MS m/z : 383.01 (M⁺ - H). HRMS calcd for C₂₀H₁₇ClN₂O₄ 384.0877, found 384.0881.

N-{4-[(吡啶-2-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-4-三氟甲基苯甲酰胺(**8a**): 白色固体, 产率 36%. m.p. 223.7~224.9 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.82 (s, 1H, NH), 10.44 (s, 1H, OH), 8.60 (d, J =4.0 Hz, 1H, PyH), 8.01 (d, J =8.0 Hz, 1H, PyH), 7.96 (d, J =2.0 Hz, 1H, PhH), 7.88 (t, J =6.8 Hz, 1H, PyH), 7.58 (d, J =7.6 Hz,

2H, PhH), 7.38~7.36 (m, 1H, PyH), 7.30~7.25 (m, 3H, PhH), 5.29 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ : 164.7, 157.3, 156.2, 150.0, 149.0, 137.1, 132.3, 132.2, 130.5, 125.3, 123.2, 123.0, 122.2, 121.4, 121.2, 120.5, 115.3, 114.4, 113.4, 71.1; IR (KBr) ν : 3348.4, 3075.8, 1665.0, 1597.0, 1543.2, 1502.8, 1422.4, 1290.2, 1157.5, 1128.1, 1065.4, 1036.0, 925.9, 855.8, 750.9 cm⁻¹; ESI-MS m/z : 421.28 (M⁺ - H). HRMS calcd for C₂₀H₁₄ClF₃N₂O₃ 422.0645, found 422.0666.

N-{4-[(吡啶-2-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-5-氯苯甲酰胺(**9a**): 白色固体, 产率 40%. m.p. 218.6~219.9 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 11.82 (s, 1H, NH), 10.39 (s, 1H, OH), 8.61 (d, J =4.4 Hz, 1H, PyH), 7.96 (t, J =1.6 Hz, 2H, PhH), 7.90 (t, J =7.6 Hz, 1H, PyH), 7.59 (d, J =8.4 Hz, 2H, PhH), 7.48 (dd, J =8.8, 1.6 Hz, 1H, PyH), 7.38 (t, J =6.0 Hz, 1H, PyH), 7.27 (d, J =9.2 Hz, 1H, PhH), 7.03 (d, J =8.8 Hz, 1H, PhH), 5.29 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 165.0, 157.0, 156.2, 150.1, 149.1, 137.0, 133.1, 132.0, 129.1, 128.2, 123.0, 122.7, 122.6, 121.4, 121.1, 120.7, 119.1, 114.3, 71.1; IR (KBr) ν : 3320.5, 3075.2, 1661.0, 1601.0, 1545.1, 1501.1, 1446.4, 1413.1, 1375.0, 1275.4, 1217.9, 1152.6, 1106.1, 1064.9, 1008.0, 801.9, 761.7 cm⁻¹; ESI-MS m/z : 387.42 (M⁺ - H). HRMS calcd for C₁₉H₁₄Cl₂N₂O₃ 388.0381, found 388.0373.

2.2.4 *N*-{4-[(吡啶-3-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-4-氯苯甲酰胺(**5b**)的合成

在 250 mL 三颈瓶中, 依次加入 **4b** (3.0 g, 13 mmol), 4-氯水杨酸(**5**) (2.2 g, 12 mmol), 氯苯(30 mL), 于 80 °C 下, 搅拌回流至固体完全溶解, 升温至 135 °C, 再向其中缓慢滴加 PCl₃ (0.52 mL, 6 mmol), 继续反应 8 h, TLC [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=2:1]检测显示反应完全. 趁热抽滤、冷却, 产品析出, 抽滤, 用丙酮重结晶得纯品^[15]. 白色固体, 产率 40%. m.p. 239.6~241.4 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 11.80 (s, 1H, NH), 10.38 (s, 1H, OH), 8.77 (s, 1H, PyH), 8.64 (d, J =4.0 Hz, 1H, PyH), 8.34 (d, J =2.8 Hz, 1H, PyH), 8.29 (dd, J =2.8, 9.2 Hz, 1H, PhH), 8.00 (d, J =8.0 Hz, 1H, PyH), 7.80 (d, J =8.4 Hz, 1H, PhH), 7.56~7.51 (m, 2H, PhH), 7.06 (d, J =2.0 Hz, 1H, PhH), 6.99 (dd, J =2.0, 8.4 Hz, 1H, PhH), 5.46 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 171.1, 161.7, 158.6, 149.0, 148.4, 141.0, 139.5, 136.4, 131.8, 131.6, 125.4, 124.5, 124.0, 122.1, 119.4, 116.8, 113.8, 112.3, 68.7; IR (KBr) ν : 3083.4, 2931.6, 1673.9, 1584.0, 1519.8, 1486.5, 1358.2, 1279.0, 1215.0, 1124.3, 1009.2,

904.3, 855.4, 794.4, 737.6, 693.4, 655.6 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 386.86 ($\text{M}^+ - \text{H}$). HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ 388.0381, found 388.0388.

用类似的方法制得化合物 **6b**~**9b**.

N-{4-[(吡啶-3-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-4-甲基苯甲酰胺(**6b**): 纯白色固体, 产率 34%. m.p. 244.5~246.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 11.89 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, OH), 8.71 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, PyH), 8.58 (dd, $J=1.6, 4.8$ Hz, 1H, PyH), 7.90~7.86 (m, 2H, PyH), 7.68 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhH), 7.61 (dd, $J=2.8, 9.2$ Hz, 1H, PhH), 7.48~7.45 (m, 1H, PhH), 7.31 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 6.78 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, PhH), 5.26 (s, 2H, CH_2), 2.3 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 171.9, 166.9, 161.2, 159.1, 149.9, 148.8, 146.4, 135.6, 132.2, 130.0, 128.5, 123.6, 122.7, 120.3, 117.1, 114.6, 113.8, 110.2, 68.1, 21.3; IR (KBr) ν : 3442.1, 3309.6, 2922.0, 1650.1, 1618.9, 1538.3, 1503.6, 1450.3, 1407.1, 1369.7, 1291.1, 1247.8, 1219.8, 1159.8, 1065.8, 789.1 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 367.02 ($\text{M}^+ - \text{H}$). HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_3$ 368.0928, found 368.0925.

N-{4-[(吡啶-3-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-4-甲氧基苯甲酰胺(**7b**): 白色固体, 产率 33%. m.p. 240.6~241.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.36 (s, 1H, NH), 10.22 (s, 1H, OH), 8.71 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, PyH), 8.58 (dd, $J=1.2, 4.8$ Hz, 1H, PyH), 7.97 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.91 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PyH), 7.88 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, PhH), 7.60 (dd, $J=2.4, 8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.45~7.48 (m, 1H, PhH), 7.30 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, PhH), 6.57 (dd, $J=2.4, 4.4$ Hz, 1H, PyH), 6.50 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, PhH), 5.26 (s, 2H, CH_2), 3.80 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ : 167.2, 163.8, 161.8, 149.9, 149.1, 148.8, 135.6, 132.3, 132.2, 129.9, 123.7, 122.9, 121.3, 121.0, 114.6, 108.7, 106.3, 101.3, 68.1, 55.4; IR (KBr) ν : 3319.5, 3045.0, 2926.2, 1647.7, 1591.0, 1505.2, 1449.4, 1399.1, 1334.3, 1284.8, 1245.7, 1220.4, 1165.8, 1124.8, 1095.4, 1062.7, 1033.4, 791.0 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 383.03 ($\text{M}^+ - \text{H}$). HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_4$ 384.0877, found 384.0869.

N-{4-[(吡啶-3-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-4-三氟甲基苯甲酰胺(**8b**): 白色固体, 产率 35%. m.p. 242.7~244.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.50 (s, 1H, NH), 10.44 (s, 1H, OH), 8.71 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, PyH), 8.59 (dd, $J=4.8, 1.6$ Hz, 1H, PyH), 8.00 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, PyH), 7.94~7.90 (m, 2H, PhH), 7.63 (dd, $J=2.4, 8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.49~7.46 (m, 1H, PhH), 7.32~7.29 (m,

3H, PhH, PyH), 5.27 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 164.7, 157.3, 149.9, 149.1, 148.7, 135.7, 132.7, 132.4, 132.3, 130.5, 124.9, 123.7, 123.2, 122.2, 121.4, 120.4, 115.3, 114.7, 113.4, 68.1; IR (KBr) ν : 3064.2, 2866.7, 1594.1, 1502.9, 1439.3, 1379.3, 1334.0, 1291.8, 1230.0, 1066.7, 921.2, 743.1, 702.3 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 421.00 ($\text{M}^+ - \text{H}$). HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$ 422.0645, found 422.0658.

N-{4-[(吡啶-3-基)甲氧基]-3-氯苯基}-2-羟基-5-氯苯甲酰胺(**9b**): 白色固体, 产率 50%. m.p. 242.4~243.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 11.79 (s, 1H, NH), 10.41 (s, 1H, OH), 8.75 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, PyH), 8.63 (dd, $J=4.8, 1.4$ Hz, 1H, PyH), 8.02 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PyH), 7.94 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, PyH), 7.91 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, PhH), 7.62 (dd, $J=8.8, 2.4$ Hz, 1H, PhH), 7.61~7.57 (m, 1H, PhH), 7.49 (dd, $J=8.8, 2.8$ Hz, 1H, PhH), 7.32 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.04 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 5.29 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 165.0, 156.9, 150.0, 148.4, 148.0, 136.5, 133.1, 132.7, 132.2, 128.2, 124.0, 122.7, 122.5, 121.4, 120.7, 119.3, 119.1, 114.7, 68.0; IR (KBr) ν : 3439.8, 1664.2, 1604.8, 1548.0, 1501.5, 1413.2, 1274.4, 1220.6, 803.8 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 386.92 ($\text{M}^+ - \text{H}$). HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ 388.0381, found 388.0385.

2.2.5 *N*-[4-(3-氟苄氧基)-3-氯苯基]-2-羟基-4-氯苯甲酰胺(**5c**)^[15]

在 250 mL 三颈瓶中, 依次加入 **4c** (3.3 g, 13 mmol), 4-氯水杨酸(**5**) (2.2 g, 12 mmol), 氯苯(30 mL), 于 80 $^{\circ}\text{C}$ 下, 搅拌回流至固体完全溶解, 升温至 135 $^{\circ}\text{C}$, 再向其中缓慢滴加 PCl_3 (0.52 mL, 6 mmol), 继续反应 8 h, TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=2:1]检测显示反应完全. 趁热抽滤、冷却, 产品析出, 抽滤, 用丙酮重结晶得纯品. 白色固体, 产率 52%. m.p. 218.7~220.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 12.08 (s, 1H, NH), 10.35 (s, 1H, OH), 7.95 (t, $J=8.4$ Hz, 2H, PhH), 7.60 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.49~7.44 (m, 1H, PhH), 7.33 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, PhH), 7.25 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, PhH), 7.20 (t, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.06 (s, 1H, PhH), 7.05 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 5.24 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ : 165.5, 162.2, 159.1, 150.0, 139.6, 137.5, 132.1, 130.6, 123.2, 122.6, 121.3, 120.7, 119.2, 116.8, 114.7, 114.5, 114.4, 114.1, 113.9, 69.4; IR (KBr) ν : 3319.5, 2924.2, 1619.7, 1560.5, 1501.5, 1453.6, 1423.2, 1378.4, 1332.5, 1288.8, 1257.9, 1227.5, 1136.3, 1063.7, 1018.3, 929.3, 857.4, 814.1, 779.6, 754.2, 710.3, 677.8 cm^{-1} ;

ESI-MS m/z : 404.62 ($M^+ - H$). HRMS calcd for $C_{20}H_{14}Cl_2FNO_3$ 405.0335, found 405.0334.

类似的方法合成化合物 **6c**~**10c**.

N-[4-(3-氟苄氧基)-3-氯苯基]-2-羟基-4-甲基苯甲酰胺(**6c**): 白色固体, 产率 65%. m.p. 217.7~218.4 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 11.87 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, OH), 7.89 (t, $J=5.4$ Hz, 2H, PhH), 7.58 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, PhH), 7.49~7.44 (m, 1H, PhH), 7.33 (t, $J=5.4$ Hz, 2H, PhH), 7.25 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, PhH), 7.20 (t, $J=6.3$ Hz, 1H, PhH), 6.80 (d, $J=4.8$ Hz, 2H, PhH), 5.24 (s, 2H, CH₂), 2.30 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 166.9, 162.2, 159.2, 149.9, 144.4, 139.6, 132.1, 130.5, 128.5, 123.3, 122.8, 121.2, 120.9, 120.0, 117.5, 114.8, 114.4, 114.1, 113.9, 69.3, 21.1; IR (KBr) ν : 3308.1, 2920.7, 1618.0, 1557.8, 1500.7, 1448.4, 1374.6, 1290.9, 1252.8, 811.6, 770.6, 686.4 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 384.33 ($M^+ - H$). HRMS calcd for $C_{21}H_{17}ClFNO_3$ 385.0881, found 385.0876.

N-[4-(3-氟苄氧基)-3-氯苯基]-2-羟基-4-甲氧基苯甲酰胺(**7c**): 白色固体, 产率 54%. m.p. 217.4~219.3 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.61 (s, 1H, NH), 10.86 (s, 1H, OH), 7.92 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, PhH), 7.54 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.49~7.44 (m, 1H, PhH), 7.33 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, PhH), 7.24~7.15 (m, 2H, PhH), 6.47 (t, $J=9.6$ Hz, 2H, PhH), 5.23 (s, 2H, CH₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 166.8, 163.7, 162.2, 149.6, 139.6, 132.6, 130.5, 130.1, 123.3, 122.4, 121.3, 120.6, 114.7, 114.5, 114.1, 113.9, 109.5, 105.3, 101.6, 69.4, 55.2; IR (KBr) ν : 3299.4, 2932.6, 1616.5, 1559.9, 1501.3, 1442.4, 1376.8, 1315.1, 1269.5, 1212.7, 1163.2, 994.7, 855.0, 672.8 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 399.94 ($M^+ - H$). HRMS calcd for $C_{21}H_{17}ClFNO_4$ 401.0830, found 401.0833.

N-[4-(3-氟苄氧基)-3-氯苯基]-2-羟基-4-三氟甲基苯甲酰胺(**8c**): 白色固体, 产率 50%. m.p. 219.7~220.9 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.72 (s, 1H, NH), 10.45 (s, 1H, OH), 7.99 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, PhH), 7.93 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, PhH), 7.59 (dd, $J=2.4, 9.2$ Hz, 1H, PhH), 7.43~7.49 (m, 1H, PhH), 7.33 (d, $J=7.6$ Hz, 2H, PhH), 7.28 (s, 2H, PhH), 7.26 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.20~7.15 (m, 1H, PhH), 5.24 (s, 2H, CH₂); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 165.7, 163.8, 160.5, 157.4, 149.9, 139.6, 132.3, 130.6, 130.5, 123.3, 123.2, 122.2, 121.3, 120.4, 115.2, 114.8, 114.6, 114.1, 113.8, 113.4, 69.4; IR (KBr) ν : 3320.2, 3116.0, 1627.7, 1564.8, 1503.5, 1431.8,

1389.7, 1332.2, 1291.5, 1265.8, 1228.3, 1181.2, 1125.2, 1068.8, 810.5 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 438.18 ($M^+ - H$). HRMS calcd for $C_{21}H_{14}ClF_4NO_3$ 439.0598, found 439.0601.

N-[4-(3-氟苄氧基)-3-氯苯基]-2-羟基-5-氯苯甲酰胺(**9c**): 白色固体, 产率 57%. m.p. 215.6~216.9 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 11.78 (s, 1H, NH), 10.39 (s, 1H, OH), 7.92 (dd, $J=11.6, 2.5$ Hz, 2H, PhH), 7.58 (dd, $J=8.8, 2.5$ Hz, 1H, PhH), 7.51~7.42 (m, 2H, PhH), 7.31 (t, $J=7.8$ Hz, 2H, PhH), 7.25 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, PhH), 7.18 (t, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.01 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 5.24 (s, 2H, CH₂); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 165.0, 162.2, 156.9, 150.0, 139.6, 133.1, 132.0, 130.6, 128.2, 123.3, 122.6, 121.3, 120.7, 119.3, 119.1, 114.8, 114.5, 114.1, 113.8, 69.4; IR (KBr) ν : 3313.5, 3069.7, 1624.3, 1550.8, 1502.4, 1419.6, 1384.5, 1290.1, 1223.2, 817.5, 680.7 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 404.62 ($M^+ - H$). HRMS calcd for $C_{20}H_{14}Cl_2FNO_3$ 405.0335, found 405.0329.

N-[4-(3-氟苄氧基)-3-氯苯基]-2-羟基-4-硝基苯甲酰胺(**10c**): 绿色固体, 产率 48%. m.p. 221.4~223.2 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 11.94 (s, 1H, NH), 10.47 (s, 1H, OH), 8.00 (t, $J=8.4$ Hz, 2H, PhH), 7.78 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, PhH), 7.61 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, PhH), 7.49~7.44 (m, 1H, PhH), 7.33 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, PhH), 7.26 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 7.20 (t, $J=8.8$ Hz, 1H, PhH), 5.24 (s, 2H, CH₂); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 163.8, 162.2, 157.0, 149.9, 149.5, 139.6, 132.3, 130.7, 126.2, 123.2, 122.0, 121.4, 120.2, 114.7, 114.5, 114.1, 113.9, 113.5, 111.3, 69.4; IR (KBr) ν : 3316.9, 3111.2, 1634.5, 1597.4, 1536.3, 1508.8, 1455.2, 1429.2, 1386.8, 1352.2, 1298.4, 1265.9, 1241.4, 810.5 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 415.21 ($M^+ - H$). HRMS calcd for $C_{20}H_{14}ClFNO_5$ 416.0575, found 416.0562.

2.3 体外抗肿瘤活性测试

该实验以吉非替尼为阳性对照, 采用四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法测试所设计合成的新型水杨酰芳胺类化合物对体外肿瘤细胞(人肝癌细胞 Bel-7402、人胃癌细胞 SGC-7901、人非小细胞肺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 MCF-7)增殖的抑制活性. 实验方法: 取对数生长期的肝癌细胞、胃癌细胞、非小细胞癌细胞、乳腺癌细胞, 分别以 2×10^4 个/mL 细胞密度接种于 96 孔培养板中, 100 μ L/孔, 每种细胞各种 4 块板. 置 37 °C, 5% CO₂ 孵箱内培养 12 h. 吸弃上清, 然后分别加入 200 μ L 不同浓度的水杨酰芳胺类化合物, 同时设阳性对照药组和空白细胞对照组, 每组设 4 个复孔.

培养 48 h 后, 再加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L/孔, 继续培养 4 h 后弃上清, 加入 DMSO 150 μ L/孔, 微振荡器上振荡 10 min, 将试剂对照调零, 用自动酶标仪在 550 nm 波长处测出细胞对照组和各药物组的 OD 值, 取各组均值, 重复实验 3 次. 以下面的公式计算各组药物对细胞的抑制率: 抑制率 = (1 - 药物组 OD 值/细胞对照组 OD 值) $\times$ 100%, 同时计算 IC₅₀ 值^[16,17].

References

- [1] Zhao, X.; Guo, C.-B.; Zhou, H. *Chin. J. Med. Chem.* **2010**, 20(5), 442 (in Chinese).
(赵欣, 郭长彬, 周化, 中国药物化学杂志, **2010**, 20(5), 442.)
- [2] Levitzki, A.; Klein, S. *Mol. Aspects Med.* **2010**, 31(4), 287.
- [3] Curigliano, G. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, 38(4), 303.
- [4] Hoelder, S.; Clarke, P. A.; Workman, P. *Mol. Oncol.* **2012**, 6(2), 155.
- [5] Singh, J.; Petter, R. C.; Kluge, A. F. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14(4), 475.
- [6] Dienstmann, R.; Dossob, S. D.; Felipa, E.; Tabernero, J. *Mol. Oncol.* **2012**, 15, 26.
- [7] Kim, J. W.; Kim, H. P.; Kang, S.; Hur, H. S.; Yoon, Y. K.; Oh, D. Y.; Kim, J. H.; Lee, D. S.; Kim, T. Y.; Bang, Y. J. *Cancer Lett.* **2008**, 272(2), 296.
- [8] Slobbe, P.; Poot, A. J.; Windhorst, A. D.; Dongen, G. V. *Drug Discovery Today* **2012**, 17(21-22), 1175.
- [9] Dolezal, R.; Damme, S. V.; Bultinck, P.; Waisser, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44(2), 869.
- [10] Liechti, C.; Sequin, U.; Bold, G.; Furet, P.; Meyer, T.; Traxler, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39(1), 11.
- [11] Yang, Y.; Shi, L.; Zhou, Y.; Li, H.-Q.; Zhu, Z.-W.; Zhu, H.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20(22), 6653.
- [12] Jin, Y.-L.; Lu, Z.-Z.; Ding, K.; Li, J.; Du, X.; Chen, C.; Sun, X.-Y.; Wu, Y.-B.; Zhou, J.; Pan, J.-X. *Cancer Res.* **2010**, 70, 2516.
- [13] Guo, L.; Wang, Q. L.; Jiang, Q. Q.; Jiang, Q. J.; Jiang, Y. B. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 9947.
- [14] Zhang, P.-X.; Mao, Y.-J.; Shen, J.-S.; Wei, Y.-B. *Chin. J. Med. Chem.* **2008**, 18(5), 355 (in Chinese).
(张佩璇, 茆勇军, 沈敬山, 韦亚兵, 中国药物化学杂志, **2008**, 18(5), 355.)
- [15] Waissera, K.; Buresa, O.; Holya, P.; Kunesa, J.; Oswald, R.; Jiraskova, L.; Poura, M.; Klimesova, V.; Kubicova, L.; Kaustovab, J. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2003**, 336(1), 53.
- [16] Song, J.-P.; Zhong, P.; Wang, T.; Wei, X.-L.; Zhang, H. J. *Cell Mol. Immunol.* **2001**, 17(3), 292 (in Chinese).
(宋锦平, 钟萍, 汪涛, 温秀兰, 张虹, 细胞与分子免疫学杂志, **2001**, 17(3), 292.)
- [17] Datki, Z.; Juhasz, A.; Galfi, M.; Soos, K.; Papp, R.; Zadori, D.; Penke, B. *Brain Res. Bull.* **2003**, 62(3), 223.

(Li, L.; Fan, Y.)