3-甲氧基-6-取代-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-1-酮的合成与生物活性

孙广龙 张蔚蔚 詹晓平 刘增路 毛振民*

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 以 3-甲基-2-氰基吡啶为原料, 经水解、酯化、硝化、甲氧基取代、溴代反应制得中间体 3-溴甲基-5-甲氧基吡啶-2-甲酸甲酯(7), 然后中间体与不同的有机胺经环合反应得到一系列新的沙利度胺衍生物 3-甲氧基-6-取代-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮 **1a~1l**. 其结构经 ^1H NMR, ^{13}C NMR 及 HRMS 确证. 采用 MTT(噻唑蓝)法测试了目标化合物抑制 HCT-116, MG-63, MCF-7, HUVEC 及 HMVEC 细胞的活性, 结果表明, 几乎所有化合物对人体正常细胞无明显抑制作用, 化合物 **1h~1l** 只对 MG-63 细胞株有明显的抑制活性, 化合物 **1c~1g** 对这三种肿瘤细胞都有较强的抑制活性, 其中化合物 **1d** 和 **1e** 活性最强.

关键词 沙利度胺衍生物; 3-甲基-2-氰基吡啶; 合成; 生物活性

Synthesis and Biological Activities of 3-Methoxy-6-substituted-5,6-dihydropyrrolo[3,4-*b*]pyridin-7-ones

Sun, Guanglong Zhang, Weiwei Zhan, Xiaoping Liu, Zenglu Mao, Zhenmin*

(School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

Abstract A series of thalidomide derivatives named 3-methoxy-6-substituted 5,6-dihydropyrrolo[3,4-*b*]pyridin-7-ones **1a~1l**, which have never been reported in literature, were synthesized from 3-methyl pyridine-2-carboxylic acid methyl ester (7) and different amines by cyclization reaction. The intermediate 7 was produced via hydrolysis, esterification, nitration reaction, methoxy substitution, bromination reaction using 3-methyl-pyridine-2-carbonitrile as the starting material. The structures of all compounds have been confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS techniques. The target compounds were evaluated for their inhibitory activity against HCT-116, MG-63, MCF-7, HUVEC and HMVEC cells by MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) method, and the results indicated that almost all of them had no obvious inhibitory effect on normal human cells, compounds **1h~1l** only displayed obvious inhibitory effect on MG-63 cells while compounds **1c~1g** presented excellent inhibitory activities against all the three kinds of tumor cells, among which compounds **1d** and **1e** exhibited most potent activities.

Keywords thalidomide derivative; 3-methyl-pyridine-2-carbonitrile; synthesis; biological activity

沙利度胺(Thalidomide, TLD), 又名反应停或酞胺哌啶酮, 1954年由瑞士 Ciba 公司首次合成, 作为镇静剂和止痛药上市, 曾广泛用于治疗孕妇的妊娠反应性呕吐, 因具有严重的致畸性而被叫停. 尽管如此沙利度胺仍具有研究价值, 1994年 D'Amato 等^[1]首次发现沙利度胺可抑制肿瘤新血管的生成, 1997年 Dunzendorfer 等^[2]发现沙利度胺可选择性地抑制肿瘤坏死因子(TNF- α)生成, 以及后来大量的研究表明沙利度胺及其衍生物确有抗肿瘤作用^[3,4]. 通过近年来对沙利度胺结构改造发现: 在沙利度胺母核苯环上引入供电子基团或将苯环替换

成吡啶环(**T₁**, **T₂**), 会显著提高抑制肿瘤坏死因子的活性^[5~7]; 沙利度胺母核上的双羰基与致畸作用有关, 将双羰基改变为单羰基时(**T₃**), 没有发现致畸作用, 并且抗肿瘤活性也会增强^[8,9]; 沙利度胺衍生物产生抗肿瘤作用是由于含羟基的代谢产物, 代谢物中的羟基是药效基团^[10].

本实验小组也一直从事沙利度胺衍生物的合成和抗肿瘤活性研究, 曾合成了很多系列的沙利度胺衍生物, 通过生物活性筛选发现^[11,12]: 将沙利度胺母核苯环替换为吡啶环时抗肿瘤活性有所增强, 而且吡啶环上的

* E-mail: zmmao@sjtu.edu.cn

Received September 24, 2013; revised October 14, 2013; published online November 20, 2013.

Project supported by the National Significant and Special Project of New Created Drugs (No. 2010ZX09401-404).

国家科技重大新药创制专项(No. 2010ZX09401-404)资助项目.

氮原子易与酸成盐,可解决沙利度胺溶解性差的问题^[13],从而可以提高生物利用度;在吡啶环上引入供电子基团(胺基或甲氧基)会提高化合物的抗肿瘤血管生成作用^[11],并且甲氧基更容易变为抗肿瘤药效基团羟基;在以往的衍生物活性筛选中发现,使用芳香胺来合成侧链 **R** 时所得化合物的抗肿瘤活性较好^[14~16],尤其是使用间位含甲基、三氟甲基或甲氧基取代的苯胺所得化合物的活性更好^[12],而使用脂肪胺所得化合物的抗肿瘤活性虽然没有明显增强,但它们的毒副作用较小,且产率较高^[16]. 本工作则是根据结构拼合和活性叠加原理,将活性较好的含供电子基团的吡啶环母核与活性较好的侧链芳香 **a~g** 或者毒副作用较小的脂肪胺 **h~l** 结合起来,期望可以获得抗肿瘤活性更好、毒副作用更小的化合物.

图1 沙利度胺及其衍生物(R' 为供电子基团)

Figure 1 Thalidomide and its derivatives (R' as the electron-donating group)

本研究共合成了 12 个未见报道的化合物,其结构经 ^1H NMR, ^{13}C NMR 及 HRMS 表征. 并进行了抗肿瘤活性和人体正常细胞毒性的研究. 合成路线见 Scheme 1.

Scheme 1

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

本实验以 3-甲基-2-氰基吡啶为原料,经氰基碱性水解、羧酸性催化酯化后得重要中间体 **4**^[17,18],再经硝化、甲氧基取代、溴代反应得中间体 **7**^[19~23],通过与有机胺环合反应得目标化合物 **1a~1l**. 吡啶环上的亲电取代反应虽然比较困难,但它的 β 位较 α , γ 位则更容易进行,通过混酸体系 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$, 四丁基硝酸铵-三氟醋酸酐(TBAN-TFAA), $\text{NaNO}_3\text{-TMSCl-AlCl}_3$ 及 $\text{AgNO}_3\text{-TFAA}$ 均可完成硝化反应得到化合物 **5**,而 TBAN-TFAA 体系则以高产率、高选择性完成了吡啶 β 位的硝化,是较佳的硝化方法. 由于硝基对位甲酯基的激发作用,使得甲氧基更容易取代硝基发生亲核取代反应,得到更稳定的化合物 **6**,同时甲酯在碱性条件下(甲醇钠)也容易发生酯交换反应,所以反应中只能用甲醇作溶剂. 由于吡啶环上的甲基裸露,附近位阻较小,导致溴代过程有副产物 **8** 生成(二溴取代物 **8**/化合物 **7**, 1 : 3),通过少量多次地分批加入 NBS 和 AIBN 并控制好各物质的投料物质的量的比(化合物 **6**/NBS/AIBN, 1 : 1.2 : 0.2)及反应时间,可有效降低过量溴代. 中间体 **7** 分子间也会发生亲核取代反应而产生少量的副产物 **9**(图 2),为避免 **9** 的生成,中间体 **7** 可制成盐酸盐长期存放,可在 0 $^\circ\text{C}$ 以下短期保存,或者现制备现用,效果最好.

图2 溴代反应的副产物

Figure 2 By-products of bromination reaction

在目标化合物的环合反应中^[24,25],我们以 **1a** 的合成为研究对象,探讨了不同的环合反应条件对 **1a** 收率的影响,结果如表 1 所示(防止酯键水解断裂,该反应在无水条件下进行). 由表 1 可以看出,在无碱条件下选用甲醇为溶剂,回流反应 10 h,是合成目标产物的较佳方法. 该法不仅收率最高,而且后续分离比较容易,只需重结晶即可得到产物,采用该法成功合成了其他目标化合物.

1.2 生物活性

化合物 **1a~1l** 对 5 种细胞株的增殖抑制作用如表 2 所示. 多数化合物对人体正常细胞(HUVEC 和 HMVEC)没有明显的抑制作用,只有化合物 **1f** 和 **1g** 对人体细胞

表 1 环合反应的条件与收率
Table 1 The condition and yield of cyclization reaction

溶剂	碱	反应温度/℃	反应时间/h	收率/%
THF	NaOH	Reflux	8	12
THF	K ₂ CO ₃	Reflux	10	20
THF	Et ₃ N	Reflux	10	19
DMF	NaOH	100	2	10
DMF	K ₂ CO ₃	100	4	18
DMF	Et ₃ N	100	4	17
MeCN	NaOH	Reflux	8	18
MeCN	K ₂ CO ₃	Reflux	12	33
MeCN	Et ₃ N	Reflux	12	31
MeOH	NaOH	Reflux	8	16
MeOH	K ₂ CO ₃	Reflux	10	40
MeOH	Et ₃ N	Reflux	10	42
MeOH	—	Reflux	10	67

表 2 目标化合物对细胞株的增殖抑制活性结果 [IC₅₀/ (μmol·L⁻¹)]^a

Table 2 Results of anti-proliferative activity of the target compounds on cells [IC₅₀/ (μmol·L⁻¹)]

编号	HCT-116	MG-63	MCF-7	HUVEC	HMVEC
T	625	717	796	845	766
L	>1000	792	>1000	739	612
1a	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
1b	977	>1000	>1000	>1000	>1000
1c	377	69	141	>1000	>1000
1d	12	41	26	>1000	>1000
1e	12	70	138	>1000	>1000
1f	237	240	46	442	831
1g	407	160	273	131	452
1h	>1000	80	>1000	>1000	>1000
1i	>1000	511	>1000	>1000	>1000
1j	>1000	875	>1000	>1000	>1000
1k	>1000	802	>1000	>1000	>1000
1l	>1000	224	986	>1000	992

^a T=Thalidomide, L=Lenalidomide.

有一定的抑制作用, 尤其是 **1g** 的抑制活性明显强于阳性对照物沙利度胺和来那度胺; 对肿瘤细胞 HCT-116, MG-63 及 MCF-7, 化合物 **1c~1g** 皆有很强的抑制作用, 其中以化合物 **1d** 和 **1e** 活性最好, 在 100 μmol/L 浓度下两者对 HCT-116 细胞株的抑制率达到了 86.3% 和 81.5% (IC₅₀=12 μmol/L); 该系列化合物几乎都对 MG-63 细胞株有抑制活性, 并且化合物 **1h~1l** 也只对 MG-63 细胞株有明显的抑制活性, 表现出一定的选择性和专一性; 化合物 **1a** 和 **1b** 则对人体细胞及肿瘤细胞均无明显抑制活性。

2 结论

为了寻求新型抗肿瘤活性新分子, 本研究根据活性亚结构拼接和活性叠加原理, 以简单、新颖的方法优化合成了 12 个新型沙利度胺衍生物。初步活性测试结果

表明: 与沙利度胺和来那度胺相比, 有些衍生物的抗肿瘤活性更好、毒副作用更小, 尤其是侧链苯环的间位有甲基或三氟甲基取代的化合物 **1c~1e**, 而侧链为脂肪族的化合物对 **1h~1l** 肿瘤细胞 MG-63 则表现出了一定的选择抑制性。这为以后寻找更加理想的新型抗肿瘤化合物提供了思路, 对进一步血管生成抑制活性研究具有重要的指导意义。将来可通过细胞迁移实验以及管腔生成抑制实验做进一步研究, 期望得到更好的结果。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

柱色谱采用 200~300 目硅胶粉(安徽良臣硅材料有限公司生产); 薄层色谱(TLC)采用硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司); 熔点采用 SGW X-4 显微熔点仪测定(上海精密科学仪器有限公司), 温度计未经校正; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 采用 Bruker Avance III 400 型核磁共振仪测定, TMS 为内标, CDCl₃ 或 DMSO-*d*₆ 为溶剂; 高分辨质谱(ESI-HRMS)采用 Waters 公司的 UPLC-Q-TOF-MS 测定。所用试剂均为市售的分析纯或化学纯。

3.2 化合物的合成部分

3.2.1 3-甲基吡啶-2-甲酸(**3**)的合成

将 42.4 mmol 3-甲基-2-氰基吡啶(**2**), 75.0 mmol 氢氧化钠, 20 mL 水加入 100 mL 三口烧瓶中, 搅拌回流, 用 pH 试纸监测反应液上方空气, 反应 5 h, 当试纸颜色不再有明显变化时停止加热。冰浴条件下, 慢慢滴加 10 mL 浓盐酸, 至 pH 为 1~2, 有大量白色固体析出。抽滤, 收集滤饼, 烘箱(50 °C)内烘干, 得 5.6 g 白色固体 **3**, 产率 97%。m.p. 104~106 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.68 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, NCH), 8.52 (d, *J*=10.8 Hz, 1H, NCHCHCHC), 7.94 (s, 1H, COOH), 7.63 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, NCHCH), 4.03 (s, 3H, CH₃); IR (KBr) ν: 3418, 3351, 3151, 1697 cm⁻¹。

3.2.2 3-甲基吡啶-2-甲酸甲酯(**4**)的合成

将 36.5 mmol 化合物 **3** 溶于 25 mL 无水甲醇中, 搅拌, 用恒压滴液漏斗慢慢滴加 5.2 mL 浓硫酸, 滴毕后回流反应 10 h。反应结束后, 冷至室温, 减压蒸除溶剂后, 加 15 mL 水, 用无水碳酸钠调节 pH 至 7。用二氯甲烷(100 mL×6)萃取, 合并全部有机相经无水硫酸钠干燥, 减压蒸除溶剂后得 5.0 g 无色液体 **4**, 产率 91%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.45 (d, *J*=4.6 Hz, 1H, NCH), 7.53 (d, *J*=1.69 Hz, 1H, NCHCHCHC), 7.25 (d, *J*=4.7 Hz, 1H, CHCHN), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 2.50 (s, 3H, CH₃); ESI-HRMS calcd for C₈H₁₀NO₂ [M+H]⁺ 152.1101,

found 152.1104.

3.2.3 3-甲基-5-硝基吡啶-2-甲酸甲酯(**5**)的合成

将 20.0 mmol 化合物 **4** 和 44.0 mmol 四丁基硝酸铵溶解于 50 mL 二氯甲烷中, 冰浴条件下, 用恒压滴液漏斗慢慢滴加 22.0 mmol 三氟醋酸酐, 滴毕, 室温搅拌 22 h. 反应结束后, 减压蒸除溶剂得黄色粘稠状液体, 加 25 mL 水, 用无水碳酸钠调节 pH 至 7. 用二氯甲烷(25 mL $\times$ 6)萃取, 合并全部有机相经无水硫酸钠干燥, 减压蒸除溶剂得黄棕色粘稠状固体, 粗品通过柱层析分离提纯得 3.2 g 白色晶体 **5**[洗脱剂为 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=10:1$], 产率 83%. m.p. 80~82 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.30 (s, 1H, NCH), 8.41 (s, 1H, $\text{NO}_2\text{C-CH}$), 4.02 (s, 3H, OCH_3), 2.70 (s, 3H, CH_3); ESI-HRMS calcd for $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 197.1022, found 197.1022.

3.2.4 3-甲基-5-甲氧基吡啶-2-甲酸甲酯(**6**)的合成

先将 1.5 mmol 钠氢慢慢加入 50 mL 无水甲醇中, 搅拌, 待全部溶解后再加入 10.2 mmol 化合物 **5**, 回流反应 2.5 h. 反应结束后, 冷至室温, 加 50 mL 水, 用氯化铵调节 pH 至 7. 用二氯甲烷(50 mL $\times$ 6)萃取, 合并全部有机相经无水硫酸钠干燥, 减压蒸除溶剂得 1.4 g 黄色固体 **6**, 产率 78%. m.p. 67~69 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.24 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, NCH), 7.06 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, COOCH_3), 2.64 (s, 3H, CH_3); ESI-HRMS calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 182.1502, found 182.1509.

3.2.5 5-甲氧基-3-溴甲基吡啶-2-甲酸甲酯(**7**)的合成

将 2.0 mmol 化合物 **6** 溶于 30 mL 四氯化碳中, 回流搅拌, 然后分批加入 2.4 mmol NBS 和 0.4 mmol AIBN, 继续回流反应 5 h, TLC 监测反应, 此时副产物二溴取代物开始增多, 停止加热, 冷却室温. 抽滤, 减压旋干滤液得黄色粘稠状液体. 粗品通过柱层析分离提纯得 306 mg 淡黄色固体 **7**(洗脱剂: 二氯甲烷), 产率 59%. m.p. 43~44 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.33 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.34 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, OCH_3CCH), 4.98 (s, 2H, BrCH_2), 4.00 (s, 3H, OCH_3), 3.95 (s, 3H, COOCH_3); ESI-HRMS calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{Br}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 261.1321, found 261.1317.

3.2.6 化合物 **1a~1l** 的合成通法

将 0.77 mmol 的化合物 **7** 和 1.15 mmol 的有机胺 **a~l** 溶于 20 mL 无水甲醇中, 60 °C 搅拌 1 h 后, 升温回流反应 10 h, TLC 监测反应完毕, 此时原料基本已反应完全, 停止加热, 待反应液冷至室温后减压浓缩, 冷冻, 析出固体, 粗品用甲醇重结晶, 得到化合物 **1a~1l**.

3-甲氧基-6-(2-甲基苯基)-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1a**): 黄色晶体, 收率 67%. m.p. 157~158 °C; ^1H

NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.46 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, NCH), 7.70 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 7.30~7.42 (m, 5H), 4.82 (s, 2H, NCH_2), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 2.17 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.4, 157.7, 140.6, 137.1, 136.8, 136.3, 131.3, 128.3, 127.3, 126.9, 125.5, 114.1, 56.1, 50.4, 18.2; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 255.1134, found 255.1132.

3-甲氧基-6-(4-甲基苯基)-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1b**): 黄色固体, 收率 70%. m.p. 243~244 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.44 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.77 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, $\text{NC}(\text{CH}_2)_2$), 7.68 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 7.25 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, $\text{NCC}(\text{CH}_2)_2$), 4.95 (s, 2H, NCH_2), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.6, 157.2, 142.8, 135.2, 133.6, 133.3, 131.6, 129.4, 121.7, 120.3, 56.0, 50.3, 20.9; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 255.1126, found 255.1120.

3-甲氧基-6-(3-甲基苯基)-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1c**): 黄色固体, 收率 61%. m.p. 229~230 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.45 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.69 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 7.72~7.74 (m, 2H, $\text{NC}(\text{CH}_2)_2$), 7.34 (t, $J=15.6$ Hz, 1H, NCCHCH), 7.02 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, CH_3CCH), 4.97 (s, 2H, NCH_2), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 2.37 (s, 3H, CCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.0, 157.9, 142.8, 140.6, 139.2, 139.1, 136.0, 129.0, 125.6, 119.9, 116.4, 113.9, 56.1, 48.2, 21.7; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 255.1134, found 255.1134.

3-甲氧基-6-(3-三氟甲基苯基)-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1d**): 白色固体, 收率 46%. m.p. 260~262 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.48 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 8.43 (s, 1H, NCCHCCF_3), 8.10 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, NCCH), 7.69~7.73 (m, 2H, CF_3CCHCH), 7.54 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 5.08 (s, 2H, NCH_2), 3.97 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.0, 162.3, 157.9, 146.0, 141.4, 140.2, 138.2, 137.7, 130.2, 122.3, 120.4, 114.3, 108.2, 56.2, 47.8; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 309.0851, found 309.0851.

3-甲氧基-6-(3,5-二甲苯基)-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1e**): 淡黄色固体, 收率 63%. m.p. 271~272 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.49 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, NCH), 7.47 (s, 2H, NCCH), 7.29 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 6.84 (s, 1H, NCCCH), 4.78 (s, 2H, NCH_2), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 2.36 (s, 6H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.0, 157.8, 143.1, 140.6, 139.2, 138.9,

135.8, 126.6, 117.2, 113.9, 56.1, 48.4, 21.6; ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{17}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 269.1280, found 269.1290.

3-甲氧基-6-(3,5-二甲氧基苯基)-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1f**): 黄色固体, 收率 69%. m.p. 218~221 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.45 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.69 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 7.14 (d, $J=2.0$ Hz, 2H, NCCH), 6.37 (t, $J=2.4$ Hz, 1H, NCCHCCH), 4.96 (s, 2H, NCH_2), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 3.79 (s, 6H, OCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.7, 160.7, 157.7, 141.8, 141.1, 140.3, 137.3, 114.2, 97.6, 95.9, 56.2, 55.2, 48.0; ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{17}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 301.1187, found 301.1188.

3-甲氧基-6-(4-氟-3-甲基苯基)-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1g**): 黄色固体, 收率 55%. m.p. 275~277 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.45 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.79~7.81 (m, 1H), 7.72~7.76 (m, 1H), 7.69 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 7.21~7.25 (m, 1H), 4.96 (s, 2H, NCH_2), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 2.29 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.2, 157.5, 147.8, 142.4, 140.9, 138.6, 133.7, 129.8, 127.0, 118.9, 114.4, 111.5, 56.2, 48.1, 21.7; ESI-HRMS calcd for $C_{15}H_{14}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 273.1039, found 273.1035.

3-甲氧基-6-正己基-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1h**): 白色固体, 收率 71%. m.p. 180~181 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.36 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.24 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 4.31 (s, 2H, NCH_2), 3.89 (s, 3H, CH_3O), 3.58 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, NCH_2), 1.60~1.64 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1.24~1.37 (m, 6H), 0.82~0.86 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.2, 157.3, 143.3, 139.8, 136.5, 114.2, 56.0, 47.3, 42.8, 31.5, 28.3, 26.5, 22.5, 14.0; ESI-HRMS calcd for $C_{14}H_{21}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 249.1603, found 249.1612.

3-甲氧基-6-环己基-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1i**): 白色晶体, 收率 77%. m.p. 186~189 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.44 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.25 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 4.32 (s, 2H, NCH_2), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 1.15~1.89 (m, 11H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.1, 157.2, 142.8, 133.6, 131.6, 121.7, 56.0, 47.3, 46.0, 31.1, 27.1, 22.3; ESI-HRMS calcd for $C_{14}H_{19}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 247.1409, found 247.1411.

3-甲氧基-6-苄基-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1j**): 白色晶体, 收率 82%. m.p. 169~170 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.69 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.35 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 7.14 (dd, $J=11.2, 1.6$ Hz,

2H, 1.6 Hz, $NC(CH_2)_2$), 7.05~7.08 (m, 3H, $NCCHCHCH$, $NCCH(CH_2)_2$), 4.74 (s, 2H, NCH_2), 4.31 (s, 2H, NCH_2), 3.93 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.7, 161.0, 152.5, 151.2, 137.1, 128.6, 127.7, 127.3, 124.4, 108.6, 55.9, 45.8, 44.7; ESI-HRMS calcd for $C_{15}H_{15}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 255.1134, found 255.1124.

3-(3-甲氧基-7-酮-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-6-基)-哌啶-2,6-二酮(**1k**): 蓝白色固体, 收率 60%. m.p. 279~280 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.99 (s, 1H, NH), 8.63 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.25 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 5.10~5.15 (m, 1H, NCH), 4.33~4.36 (m, 2H, NCH_2), 3.98 (s, 3H, OCH_3), 2.86~2.96 (m, 2H, $COCH_2$), 2.57~2.64 (m, 2H, $COCH_2CH_2$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.8, 170.8, 166.4, 161.2, 152.7, 150.8, 124.9, 108.8, 56.1, 52.0, 43.0, 31.2, 22.1; ESI-HRMS calcd for $C_{13}H_{14}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 276.0984, found 276.0964.

3-甲氧基-6-异丙基-5,6-二氢吡咯[3,4-*b*]吡啶-7-酮(**1l**): 白色固体, 收率 86%. m.p. 165~166 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.41 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, NCH), 7.22 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH_3OCCH), 4.77~4.79 (m, 1H, NCH), 4.34 (s, 2H, NCH_2), 1.30 (d, $J=6.8$ Hz, 6H, $2CH_3$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.1, 157.2, 143.1, 135.1, 131.9, 121.7, 56.2, 43.2, 42.9, 20.9 ($2\times C$); ESI-HRMS calcd for $C_{11}H_{15}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 207.1101, found 207.1120.

3.3 细胞增殖抑制实验

用 MTT(噻唑蓝)法测定目标化合物对 HCT-116, MG-63, MCF-7, HUVEC 及 HMVEC 这 5 种细胞株的体外增殖抑制作用^[26,27]. 细胞培养, 收集对数生长期状态良好的细胞, 调整细胞悬液的浓度, 每孔加入 100 μL 细胞液(约 5000 个细胞/孔), 边缘孔用无菌 PBS 填充. 置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 至细胞铺满孔底(96 孔板), 加入浓度梯度的待测化合物, 设置 6 个梯度浓度 0, 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu mol/L$, 设置 4 个平行孔, 每孔加入 10 μL , 置于培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液(即 0.5% MTT), 继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 100 μL 二甲亚砜, 置于酶联免疫检测仪上振摇 10 min, 使孔中残留物充分溶解, 然后在 570 nm 处测定每孔的吸光值(OD 值). 细胞增殖抑制率 = $[(\text{阴性对照孔的平均 OD 值} - \text{测试孔的平均 OD 值}) / \text{阴性对照孔的平均 OD 值}] \times 100\%$. 根据 IC_{50} 统计软件进行计算, 得到抑制率为 50% 时的化合物浓度(阳性对照物为沙利度胺和来那度胺, 阴性对照物为等量的培养基).

致谢 感谢上海交通大学分析测试中心提供所有的光谱数据。

References

- [1] D'Amato, R. J.; Loughnan, M. S.; Flynn, E.; Folkman, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 4082.
- [2] Dunzendorfer, S.; Schratzberger, P.; Reinisch, N.; Kahler, C. M.; Wiedermann, C. J. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1997**, *356*, 529.
- [3] Richardson, P.; Hideshima, T.; Anderson, K. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 629.
- [4] Chen, L. H.; Li, D. D. *Chin. J. New Drugs* **2006**, *15*, 1141 (in Chinese).
(陈立慧, 李电东, 中国新药杂志, **2006**, *15*, 1141.)
- [5] Greig, N. H.; Holloway, H.; Brossi, A.; Zhu, X. X.; Giordano, T.; Yu, Q. S.; Figg, W. D. *WO 2005028436*, **2005** [*Chem. Abstr.* **2005**, *142*, 355170].
- [6] Miyachi, H.; Azuma, A.; Ogasawara, A.; Uchimura, E.; Watanabe, N.; Kobayashi, Y.; Kato, F.; Kato, M.; Hashimoto, Y. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2858.
- [7] Man, H. W.; Corral, L. G.; Stirling, D. I.; Muller, G. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3415.
- [8] Kotla, V.; Goel, S.; Nischal, S.; Heuck, C.; Vivek, K.; Das, B.; Verma, A. *J. Hematol. Oncol.* **2009**, *2*, 36.
- [9] Kaplan, G.; Sampaio, E. P. *US 5385901*, **1992** [*Chem. Abstr.* **1992**, *117*, 226313].
- [10] Kennenth, S. B.; Shannon, C. D.; William, D. F. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 1827.
- [11] Fan, B.-L. *Ph.D. Dissertation*, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, **2008** (in Chinese).
(范柏林, 博士论文, 上海交通大学, 上海, **2008**.)
- [12] Shi, Q.-F. *M.S. Thesis*, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, **2012** (in Chinese).
(史群峰, 硕士论文, 上海交通大学, 上海, **2012**.)
- [13] Kale, R.; Tayade, P.; Saraf, M.; Juvekar, A. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2008**, *34*, 149.
- [14] Shibata, Y.; Sasaki, K.; Hashimoto, Y.; Iwasaki, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 156.
- [15] Capitosti, S. M.; Hansen, T. P.; Brown, M. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 327.
- [16] Zhou, H. *Ph.D. Dissertation*, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, **2013** (in Chinese).
(周恒, 博士论文, 上海交通大学, 上海, **2013**.)
- [17] Xie, Y.; Wu, G. Q.; Zheng, S. C.; Chen, F. E. *Chin. J. Med. Chem.* **2006**, *16*, 49 (in Chinese).
(谢艳, 吾国强, 郑士才, 陈芬儿, 中国药物化学杂志, **2006**, *16*, 49.)
- [18] Zhang, W.-J.; Luo, Y.; Zhang, Y. M. *Chin. J. Pharm.* **2006**, *37*, 434 (in Chinese).
(张万金, 罗艳, 张燕梅, 中国医药工业杂志, **2006**, *37*, 434.)
- [19] Njoroge, F. G.; Vibulbhan, B.; Pinto, P.; Chan, T. M.; Osterman, R.; Remiszewski, S.; Rosario, J. D.; Doll, R.; Girijavallabhan, V.; Ganguly, A. K. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 445.
- [20] Wang, Y.-H.; Song, Y. J.; Hu, Z.; Jing, J. H.; Meng, X. L.; Huang, Y. D. *Chin. J. Org. Chem.* **2009**, *29*, 780 (in Chinese).
(王艳红, 宋元军, 胡 楨, 景介辉, 孟祥丽, 黄玉东, 有机化学, **2009**, *29*, 780.)
- [21] Xie, C.; Runnegar, M. T. C.; Snider, B. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5017.
- [22] Clarke, K.; Goulding, J.; Scrowston, R. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1984**, 1501.
- [23] Zhang, E.; Li, C.; Zhang, B. Y.; Lü, A. Q.; Fang, Y.; Feng, S. Q.; Liu, H. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 1100 (in Chinese).
(张恩, 李聪, 张保寅, 吕爱桥, 方园, 冯思琦, 刘宏民, 有机化学, **2013**, *33*, 1100.)
- [24] Mamiko, S.; Yohei, M.; Hiroki, K.; Hiroyuki, K.; Aya, T.; Kazuo, N.; Yuichi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1098.
- [25] Caroline, S.; Jean-michel, R. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 659.
- [26] Yang, M.; He, J. B.; Cheng, Y. X.; Jiang, S. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 1319 (in Chinese).
(杨梅, 何江波, 程永现, 蒋晟, 有机化学, **2013**, *33*, 1319.)
- [27] Du, C.; Ren, Y. J.; Wang, Q. W.; Jin, L. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 1279 (in Chinese).
(杜成, 任玉杰, 王庆伟, 金鹭, 有机化学, **2013**, *33*, 1279.)

(Zhao, C.)