6-位修饰的吉非替尼衍生物合成及细胞毒活性研究

沈明辉^a 陈仕杰^a 王雪微^a 龚显峰^{*,a,b} 张 华^{*,a,b}^(a) 黑龙江大学功能有机重点实验室 哈尔滨 150080^(b) 国药一心制药有限公司 长春 130012

摘要 以 2-氨基-4,5-二甲氧基苯甲酸为起始原料, 经关环, 选择性脱甲基, 醋酸酐保护, 氯代, 与 3-氯-4-氟苯胺取代, 去保护得到关键中间体 4-(3-氯-4-氟苯胺)-7-甲氧基-喹唑啉-6-醇. 再经过 6-位羟基成醚、成酯反应合成了共计 23 个吉非替尼衍生物. 所有目标化合物通过 IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, HRMS 等结构确证. 并采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法对所得目标化合物进行了细胞毒活性测试, 结果发现部分化合物具有一定的抑制活性, 其中化合物 **7b**, **7c**, **7d**, **8a**, **8m** 抑制人非小细胞肺癌细胞(A549)增殖活性和化合物 **7c**, **8m** 抑制人肝癌细胞(HepG-2)增殖活性与吉非替尼相当.

关键词 吉非替尼衍生物; 合成; MTT 法

Synthesis and Cytotoxic Activity of 6-Modified Gefitinib Derivatives

Shen, Minghui^a Chen, Shijie^a Wang, Xuewei^a Gong, Xianfeng^{*,a,b} Zhang, Hua^{*,a,b}^(a) Key Laboratory of Applied Organic, Heilongjiang University, Harbin 150080^(b) Sinopharm A-Think Pharmaceuticals Co., Ltd., Changchun 130012

Abstract Twenty-three derivatives of gefitinib have been synthesized by etherification and esterification of 4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-6-hydroxy-7-methoxy quinazoline, which was prepared from 2-amino-4,5-dimethoxy-benzoic acid through the reactions of cyclization, selective demethylation, acetyl protection, chlorination, substitution with 3-chloro-4-fluoro-benzenamine and deprotection, respectively. The structures of the target compounds were characterized by IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS spectra. All the title compounds were evaluated for cytotoxic activity against human non-small-cell-lung cancer cells lines (A549) and human hepatoma cell lines (HepG2) by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The results showed that the cytotoxic activities of compounds **7b**, **7c**, **7d**, **8a**, **8m** against human non-small-cell-lung cancer cells lines and compounds **7c**, **8m** against human hepatoma cell lines were comparable to those of gefitinib.

Keywords gefitinib derivatives; synthesis; MTT assay

吉非替尼(商品名: 易瑞沙, IressaTM, 图 1), 由阿斯利康公司研制的第一个表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂, 其化学名为 4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(3-吗琳基丙氧基)喹唑啉, 2002 年 7 月首次在日本上市^[1~5]. 主要用于非小细胞肺癌的治疗, 其作用机制主要是抑制酪氨酸激酶表皮生长因子受体(EGFR), 以 EGFR 为作用靶点通过与 EGFR 的三磷酸腺苷(ATP)结合位点上高度保守的 ATP 竞争性结合 EGFR^[6,7]; 对 EGF 受体有抑制作用^[8~12]; 促进细胞凋亡; 并能抑制肿瘤血管生成. 具有十分广阔的临床应用前景. 但是, 随着吉非替尼的上市使用, 相继产生了耐药性等问题^[13], 因此合成吉非替尼衍生物, 研究开发吉非替尼 “me-too” 或

“me-better” 药物具有十分重要意义.

图 1 吉非替尼的结构

Figure 1 Structure of gefitinib

本文参考文献[14~16]的合成方法, 以 2-氨基-4,5-二甲氧基苯甲酸为起始原料经关环, 选择性脱甲基, 醋酸酐保护, 氯代, 与 3-氯-4-氟苯胺反应, 去保护得到关

* E-mail: zhanghua34@163.com

Received March 22, 2015; revised April 20, 2015; published online April 30, 2015.

Project supported by the Foundation of Heilongjiang Educational Committee.

黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目.

键中间体 4-(3-氯-4-氟苯胺)-7-甲氧基-喹唑啉-6-醇(**6**), 再通过 6-位羟基成醚、成酯反应合成 6-位不同取代的吉非替尼衍生物(Scheme 1). 中间体 **6** 与取代的对甲苯磺酸酯、 α -氯代酰胺反应成醚时, 以 DMF 为溶剂, K_2CO_3 为催化剂, 反应温度 $75\sim 80\text{ }^\circ\text{C}$, 加入少量 KI 可以明显加快反应速度, 一般反应 $3\sim 6\text{ h}$, 收率可达 $60\%\sim 80\%$. 而中间体 **6** 与 *N*-乙酰化氨基酸或二肽缩合成酯时, 用 *O*-苯并三唑-*N,N,N,N*-四甲基脲四氟硼酸酯(TBTU)为缩合剂, 室温下反应 $8\sim 10\text{ h}$, 收率较高. 所有目标化合物

均经过 IR, $^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, HRMS 结构确证, 并采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测试目标化合物细胞毒活性.

1 结果与讨论

1.1 波谱解析

以目标化合物 **7a**, **8a**, **9a** 的光谱数据分析为例. 对于化合物 **7a** 的 $^1\text{H NMR}$ 中 $\delta\ 8.66$ 处的单峰为喹唑啉 2-位碳原子上质子 H 信号峰; $\delta\ 7.08\sim 7.90$ 为苯环碳原子

图式 1 6-位修饰的吉非替尼衍生物的合成

Scheme 1 Synthesis of 6-modified gefitinib derivatives

上质子 H 信号峰; δ 3.88 处的单峰为 7-位甲氧基碳原子上质子 H 信号峰; δ 3.49 处的单峰为 6-位侧链末端甲氧基碳原子上质子 H 信号峰. 分子结构中存在四个脂肪碳 δ : 56.2, 59.4, 68.0, 69.1; 十四个芳环碳 δ : 101.4, 108.2, 109.2, 116.0, 116.5, 120., 124.0, 135.2, 135.3, 147.8, 149.0, 153.6, 155.4, 156.1. 其红外光谱图中 3346 cm^{-1} 处有吸收峰说明分子中有仲胺存在; 3120 cm^{-1} 为苯环 C—H 伸缩振动吸收峰, 2929.8 cm^{-1} 为侧链甲基或亚甲基 C—H 伸缩振动吸收峰, $1640, 1577, 1502, 1425\text{ cm}^{-1}$ 为苯环 C=C 伸缩振动吸收峰, 1223 cm^{-1} 为醚键 C—O 伸缩振动吸收. 高分辨质谱 HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClFN}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 378.0992, found 378.0996. 说明分子量正确. 综合 ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, HRMS 等光谱数据, 可以充分说明其结构的正确性.

对于化合物 **8a** 的 ^1H NMR 中 δ 10.6 处的单峰为喹啉 6-位侧链酰胺键的质子 H 信号峰; δ 9.58 为胂胺质子 H 信号峰; δ 8.53 为喹啉环上 2-位质子 H 信号峰; δ 7.09~7.95 为苯环碳原子质子 H 信号峰; δ 4.89 为侧链亚甲基单峰, δ 4.00 处单峰为 7-位甲氧基碳原子上质子 H 信号峰. 分子结构中存在两个脂肪碳 δ : 56.5, 69.1; 二十个芳环碳 δ : 156.7, 155.0, 154.90, 153.5, 152.5, 148.0, 138.7, 137.2, 129.3, 124.3, 124.0, 122.8, 120.1, 119.3, 116.9, 109.1, 108.1, 104.7; 一个羰基碳 δ : 166.3. 其红外光谱图中, 3394 cm^{-1} 处有单峰说明分子中有仲胺基; 3004 cm^{-1} 为苯环 C—H 振动吸收峰; 1673 cm^{-1} 为酰胺键 C=O 伸缩振动吸收峰; $1631, 1504, 1434\text{ cm}^{-1}$ 为苯环 C=C 伸缩振动吸收峰, 1198 cm^{-1} 醚键 C—O 伸缩振动吸收峰. 高分辨质谱 HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 453.1131, found 453.1132. 说明分子量正确. 综合 ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, HRMS 等光谱数据, 可以充分说明其结构的正确性.

对于化合物 **9a** 的 ^1H NMR 中 δ 9.75 处的单峰为喹啉 6-位侧链酰胺键的质子 H 信号峰; δ 8.59 为胂胺质子 H 信号峰; δ 8.31 喹啉环上 2-位质子 H 信号峰, δ 7.36~8.18 为苯环碳原子上质子 H 信号峰; δ 4.19~4.20 为侧链亚甲基质子 H 信号峰; δ 3.93 处单峰为 7-位甲氧基碳原子上质子 H 信号峰; δ 1.91 处单峰为甲基上质子 H 信号峰. 分子结构中存在三个脂肪碳 δ : 22.7, 56.9; 十四个芳环碳 δ : 157.3, 155.8, 155.2, 150.7, 139.4, 137.1, 123.8, 122.6, 119.4, 119.2, 117.2, 116.9, 116.5, 109.1; 两个羰基碳 δ : 170.4, 169.1. 红外光谱中 3401 cm^{-1} 处有单峰说明分子中有仲胺基; 3123 cm^{-1} 为苯环 C—H 振动吸收峰; 1760 cm^{-1} 酯羰基的伸缩振动峰; 1630 cm^{-1} 为酰胺键羰基的伸缩振动峰; $1499, 1427\text{ cm}^{-1}$ 为苯环 C=C 伸缩振动吸收峰; 1164 cm^{-1} 醚键 C—O 伸缩振动吸收峰.

高分辨质谱 HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 419.0924, found 419.0920. 说明分子量正确. 综合 ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, HRMS 等光谱数据, 可以充分说明其结构的正确性.

1.2 生物活性测试结果与讨论

采用 MTT 比色法考察 23 个目标化合物对体外培养的人非小细胞肺癌细胞(A549)和人肝癌细胞(HepG-2)生长的抑制作用, 结果发现 6-位接直链醚类化合物 **7a**~**7d** 抑制非小细胞肺癌细胞(A549)生长活性均较高, 其中化合物 **7b**、**7c** 抑制非小细胞肺癌(A549)生长活性高于对照品吉非替尼. 而 6-位以酰胺醚相连接的化合物抑制活性较小, 芳酰胺醚比脂肪酰胺醚类化合物抑制活性较高, 其芳酰胺中芳环上无取代或有吸电子取代的化合物抑制活性较高. 其中化合物 **8a**、**8m** 抑制非小细胞肺癌细胞(A549)生长活性高于对照品吉非替尼, 6-位成酯接入氨基酸或二肽的化合物 **9a**~**9d** 抑制活性均较小. 此 6-位修饰的吉非替尼衍生物对人肝癌细胞(HepG-2)生长的抑制作用均较小, 只有化合物 **7c**、**8m** 表现出一定的对人肝癌细胞(HepG-2)生长抑制作用(表 1).

表 1 目标化合物体外对人 A549 肺癌细胞和 HepG-2 肝癌细胞的抑制活性

Table 1 Inhibitory activity of target compounds against K562 and HEPG-2 cell growth *in vitro*

Compd.	IC ₅₀ 值/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	
	A549	HepG-2
7a	70.450	11.345
7b	40.670	21.674
7c	38.015	8.670
7d	55.600	18.344
8a	40.345	13.065
8b	>500	>100
8c	>500	>100
8d	>500	>100
8e	>500	>100
8f	>500	>100
8g	86.765	19.694
8h	150.124	30.190
8i	49.456	12.456
8j	50.867	20.134
8k	>500	>100
8l	>500	>100
8m	36.345	7.567
8n	>500	>100
8o	>500	>100
9a	67.436	30.456
9b	88.670	17.543
9c	>500	>100
9d	>500	>100
Gifitinib	45.746	6.032

2 结论

该 6-位修饰的吉非替尼衍生物对人肝癌细胞(HepG-2)生长抑制作用均较小,只有化合物 **7c**, **8m** 表现出一定的对人肝癌细胞(HepG-2)生长的抑制作用. 化合物 **7a~7d**, **8a**, **8i**, **8j**, **8m** 具有一定的抑制非小细胞肺癌细胞(A549)生长活性,其中 **7b**, **7c**, **8a**, **8m** 抑制非小细胞肺癌细胞(A549)生长活性高于对照品吉非替尼.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

红外光谱仪为 Spectrum One (溴化钾压片); 核磁共振光谱仪为 BrukerAvance III400 (TMS 为内标, CDCl_3 或 $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂); 高分辨质谱仪为 micrOTOF-Q II10203; X-4 型数显显微熔点测定仪(温度计未校正); 氨基酸甲酯盐酸盐和 *N*-乙酰化甘氨酸, *N*-乙酰化亮氨酸(纯度 99%, 上海瀚鸿化工科技有限公司), 对甲苯磺酸酯 (ROTs) 和二肽 AcHN-Leu-Phe-COOH 和 AcHN-Leu-Gly-COOH(纯度 99%, 百灵威科技有限公司), 吉非替尼对照品(国药一心制药有限公司提供), 实验中其他化学试剂和原料均为化学纯或分析纯.

3.2 6,7-二甲氧基喹啉-4-酮(2)的合成

参考文献[15]合成, 白色固体, 收率 90%, m.p. > 230 °C(文献[15], 收率 79%, m.p. 295~298 °C).

3.3 6-羟基-7-甲氧基喹啉-4-酮(3)的合成

参考文献[15, 16]合成, 灰色固体, 收率 40.5%, m.p. > 230 °C(文献[15, 16], 收率 46.6%, m.p. > 200 °C).

3.4 6-乙酰氧基-7-甲氧基喹啉-4-酮(4)的合成

参考文献[15, 16]合成, 白色固体, 收率 94.5%, m.p. > 230 °C(文献[15, 16], 收率 95.6%, m.p. > 200 °C).

3.5 6-乙酰氧基-7-甲氧基-4-(3-氯-4-氟苯胺基)喹啉(5)的合成

参考文献[15, 16]合成, 白色固体, 收率 53.0%, m.p. > 230 °C(文献[15, 16], 收率 52.1%, m.p. > 270 °C).

3.6 4-(3-氯-4-氟苯胺基)-6-羟基-7-甲氧基喹啉(6)的合成

参考文献[15, 16]合成, 白色粉末, 收率 95.0%, m.p. > 200 °C(文献[15, 16], 收率 95.2%, m.p. > 200 °C). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.69 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.22 (dd, $J=6.9, 2.6$ Hz, 1H), 7.84 (dd, $J=9.0, 4.3$ Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.41 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 3.98 (s, 3H); IR (KBr) ν : 3384, 2935, 2469, 1897, 1586, 1519, 1417, 1215, 1003, 933, 649, 507 cm^{-1} .

3.7 吉非替尼衍生物 7a~7d 的合成

向 100 mL 三口瓶中, 依次加入 4-(3-氯-4-氟苯胺)-7-甲氧基-喹啉-6-醇(0.5 g, 1.56 mmol), 取代对甲苯磺酸酯(3.9 mmol), *N,N*-二甲基甲酰胺 20 mL, 无水 K_2CO_3 (1.07 g, 7.8 mmol), 少量 KI. 搅拌并加热至 75 °C 反应 3 h, TLC 跟踪至反应完成, 冷却至室温, 倒入 100 g 冰水中, 搅拌有固体析出, 抽滤得到固体粗品, [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 3~5:1]重结晶得到化合物 **7a~7d**.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(甲氧乙氧基)喹啉(**7a**): 白色固体, 收率 57%. m.p. 115.2~117.0 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.66 (s, 1H), 7.90 (dd, $J=6.5, 2.7$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J=8.9, 4.0$ Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.18 (t, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 4.30~4.36 (m, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.87 (dd, $J=5.4, 4.0$ Hz, 2H), 3.49 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 156.1, 155.4, 153.6, 149.0, 147.8, 135.3, 135.2, 124.0, 121.5, 116.5, 116.0, 109.2, 108.2, 101.4, 69.1, 68.0, 59.4, 56.2; IR (KBr) ν : 3346, 2929, 2188, 1640, 1576, 1502, 1425, 1223, 1072, 934, 697, 546 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClFN}_3\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 378.0992, found 378.0996.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(甲氧乙氧乙氧基)喹啉(**7b**): 类白色固体, 收率 68%. m.p. 58.5~59.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.64 (s, 1H), 7.91 (dd, $J=6.6, 2.6$ Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.58 (dd, $J=8.9, 4.1$ Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.16 (t, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.34~4.40 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.86~3.95 (m, 2H), 3.68~3.80 (m, 2H), 3.60~3.68 (m, 2H), 3.32 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 156.6, 155.8, 155.2, 153.5, 148.6, 147.5, 135.8, 124.2, 120.7, 116.3, 109.1, 107.5, 103.5, 77.1, 71.8, 70.3, 69.4, 58.7, 56.1; IR (KBr) ν : 3328, 3127, 2936, 2883, 2195, 1633, 1576, 1502, 1425, 1344, 1206, 1125, 934, 853, 690, 546 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClFN}_3\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 422.1285, found 422.1284.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(甲氧乙氧乙氧乙氧基)喹啉(**7c**): 白色固体, 收率 75%. m.p. 113.8~113.9 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.62 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.92 (dd, $J=6.6, 2.5$ Hz, 1H), 7.60~7.68 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.14 (dd, $J=11.2, 6.3$ Hz, 2H), 4.20~4.28 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.82~3.92 (m, 2H), 3.70 (dd, $J=10.7, 5.4$ Hz, 4H), 3.62 (dd, $J=5.5, 3.4$ Hz, 2H), 3.50 (dd, $J=5.5, 3.4$ Hz, 2H), 3.26 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 156.8, 155.8, 153.5, 148.5, 147.5, 135.9,

124.5, 120.7, 116.3, 109.2, 107.4, 103.2, 77.3, 76.8, 70.6, 70.3, 68.7, 58.8, 56.0; IR (KBr) ν : 3326, 3094, 2878, 1621, 1503, 1421, 1214, 1101, 1003, 849, 782, 694, 540 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClFN}_3\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 466.1547, found 466.1541.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(甲氧乙氧乙氧乙氧乙氧基)喹啉(**7d**): 白色固体, 收率 75%. m.p. 64.8~65.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.61 (s, 2H), 7.92 (dd, $J=6.6, 2.6$ Hz, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.15 (dd, $J=11.8, 5.7$ Hz, 2H), 4.35 (t, $J=5.0$ Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.81~3.90 (m, 2H), 3.70 (dd, $J=6.1, 2.5$ Hz, 2H), 3.62 (m, 6H), 3.55 (dd, $J=5.6, 3.4$ Hz, 2H), 3.45 (dd, $J=5.6, 3.4$ Hz, 2H), 3.23 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 156.8, 155.8, 155.0, 153.5, 148.4, 147.4, 136.0, 124.5, 120.5, 116.2, 109.2, 107.4, 103.5, 77.1, 71.7, 70.4, 69.8, 58.8, 56.1; IR (KBr) ν : 3471, 3337, 3115, 2883, 1822, 1458, 1431, 1343, 1220, 1116, 931, 849, 787, 689, 545 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{ClFN}_3\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 510.1799, found 510.1798.

3.8 吉非替尼衍生物 **8a~8o** 的合成

向 100 mL 的三口瓶中, 依次加入二氯甲烷 20 mL, 胺(1.87 mmol), 三乙胺 0.31 g (2.99 mmol), 降温至 0 $^{\circ}\text{C}$, 保持此温度缓慢滴加氯乙酰氯 0.25 g (2.24 mmol)的二氯甲烷(10 mL)溶液. 滴毕升至室温反应 5~6 h, TLC 跟踪, 原料点消失, 停止反应, 倒入 20 mL 水中, 分出有机相, 水洗 2 次(10 mL $\times$ 2), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸馏除去溶剂得固体残余物, 干燥后直接用于下一步反应.

将上一步所得固体残余物加入 100 mL 的三口瓶中, 依次加入 4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-喹啉-6 醇 0.5 g (1.56 mmol), N,N -二甲基甲酰胺 20 mL, 无水 K_2CO_3 0.52 g (3.74 mmol), KI 催化量. 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 反应 6 h, TLC 跟踪, 原料点消失, 停止反应降至室温, 倒入水中, 有固体析出, 过滤, 固体粗产物经 $V(\text{甲醇}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 5 \sim 8 : 1$ 重结晶得化合物 **8a~8o**.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰苯胺基)喹啉(**8a**): 白色固体, 产率 74.3%. m.p. 267.1~269.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.06 (s, 1H), 9.58 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.12 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.77 (dd, $J=9.0, 4.3$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J=7.7$ Hz, 2H), 7.45 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J=20.3, 12.2$ Hz, 3H), 7.10 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.00 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.3, 156.7, 155.0, 154.90, 153.5, 152.5, 148.0, 138.7, 137.2, 129.3, 124.3, 124.0, 122.8, 120.1, 119.3, 116.9, 109.1, 108.1, 104.7,

69.1, 56.5; IR (KBr) ν : 3394, 3195, 3004, 1673, 1631, 1504, 1434, 1230, 1140, 997, 842, 752, 557 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 453.1131, found 453.1132.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰- α -苯乙胺基)喹啉(**8b**): 白色固体, 产率 73.4%. m.p. 235.6~237.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.51 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.32 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J=6.7$ Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.78 (dd, $J=8.3, 3.3$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.38~7.17 (m, 6H), 5.03 (dd, $J=14.3, 7.1$ Hz, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 1.43 (d, $J=6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.7, 156.6, 153.5, 152.4, 147.9, 144.5, 137.2, 128.7, 119.4, 119.2, 117.1, 116.9, 109.1, 108.0, 104.7, 68.9, 56.4, 48.4, 22.5; IR (KBr) ν : 3369, 3219, 2979, 1626, 1504, 1428, 1209, 1075, 1002, 857, 701, 606, 548 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{ClFN}_4\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 481.1434, found 481.1438.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰苯乙胺基)喹啉(**8c**): 白色固体, 产率 75.6%. m.p. 226.7~227.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.56 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.10 (dd, $J=6.8, 2.4$ Hz, 1H), 7.92~7.85 (m, 2H), 7.81~7.74 (m, 1H), 7.45 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.30~7.15 (m, 6H), 4.67 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.43 (dd, $J=13.5, 6.7$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J=7.2$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.5, 154.9, 153.5, 152.5, 147.6, 139.1, 137.2, 129.1, 122.8, 119.3, 117.1, 116.9, 109.0, 108.0, 104.3, 68.6, 56.5, 35.5; IR (KBr) ν : 3395, 3326, 3031, 2922, 1668, 1625, 1500, 1428, 1215, 1144, 1007, 881, 699, 547 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{ClFN}_4\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 481.1434, found 481.1437.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰-4-氯苯胺基)喹啉(**8d**): 白色固体, 产率 69.7%. m.p. 244.3~245.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.22 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.11 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.82~7.66 (m, 3H), 7.50~7.37 (m, 3H), 7.28 (s, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.99 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.5, 155.1, 153.5, 147.9, 137.8, 137.2, 129.2, 127.9, 119.4, 116.9, 109.1, 108.2, 104.8, 69.0, 49.1; IR (KBr) ν : 3368, 3127, 2915, 2802, 1703, 1504, 1429, 1340, 1233, 1147, 1025, 933, 837, 674, 558 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{FN}_4\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 487.0732, found 487.0738.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰-4-氟苯胺基)喹啉(**8e**): 浅黄色固体, 产率 76.4%. m.p. 244.3~245.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.12 (s,

1H), 9.56 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.10 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.76 (dd, $J=9.0, 4.3, 2.7$ Hz, 1H), 7.70~7.65 (m, 2H), 7.45 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.18 (t, $J=8.9$ Hz, 2H), 4.87 (s, 2H), 3.99 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.3, 159.9, 157.6, 155.1, 152.5, 148.0, 137.1, 135.1, 124.0, 116.9, 115.7, 109.1, 108.1, 104.8, 69.0, 56.5; IR (KBr) ν : 3353, 3004, 2380, 1674, 1629, 1508, 1433, 1343, 1231, 1141, 999, 835, 556 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{ClF}_2\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 471.1023, found 471.1029

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰-4-甲基苯胺基)喹啉(**8f**): 白色固体, 产率 75.3%. m.p. 260.2~261.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.94 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.11 (dd, $J=6.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.76 (dd, $J=8.9, 4.1, 2.8$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.44 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.14 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 4.85 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 2.26 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.1, 156.1, 154.9, 153.5, 147.9, 137.2, 136.2, 133.2, 129.7, 119.4, 117.0, 109.1, 108.1, 104.6, 69.1, 56.5, 20.9; IR (KBr) ν : 3351, 3031, 2924, 1677, 1500, 1428, 1215, 1141, 1004, 812, 633, 550 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{ClF}_2\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 467.1288, found 467.1289.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰-4-三氟甲氧基苯胺基)喹啉(**8g**): 白色固体, 产率 78.4%. m.p. 263~264 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.30 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.11 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.83~7.70 (m, 3H), 7.46 (d, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.42~7.31 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.00 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.6, 155.1, 153.5, 152.5, 144.4, 137.1, 122.9, 121.5, 119.2, 116.9, 109.1, 108.1, 104.8, 69.0, 56.5; IR (KBr) ν : 3668, 3366, 2938, 1676, 1631, 1506, 1432, 1343, 1211, 997, 934, 842, 661, 557 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{ClF}_4\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 537.0944, found 537.0946.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰-3-乙炔基苯胺基)喹啉(**8h**): 浅黄色固体, 产率 78.7%. m.p. 272.3~274.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.20 (s, 2H), 9.57 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.11 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.76 (dd, $J=8.9, 4.2, 2.7$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J=15.9, 8.6$ Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.21 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.19 (s, 1H), 4.00 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.7, 156.7, 155.1, 153.5, 148.0, 139.0, 137.1, 124.9, 122.6, 119.4, 116.9, 109.1, 108.1,

104.7, 83.7, 81.2, 69.0; IR (KBr) ν : 3388, 3296, 2939, 2828, 1706, 1502, 1430, 1235, 1143, 1001, 862, 790, 688, 557 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{ClF}_2\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 477.1121, found 477.1125.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰-3,4-二氯苯胺基)喹啉(**8i**): 白色固体, 产率 71.7%. m.p. 243~244 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.41 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.17~8.02 (m, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.75 (dd, $J=9.0, 4.3$ Hz, 1H), 7.61 (s, 2H), 7.45 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 4.91 (s, 2H), 4.00 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.0, 155.1, 153.5, 152.5, 147.9, 138.9, 137.1, 131.2, 123.0, 119.4, 116.9, 109.0, 108.2, 104.9, 68.9, 56.5; IR (KBr) ν : 3374, 3062, 2932, 1686, 1632, 1585, 1500, 1433, 1338, 1236, 1089, 1007, 852, 683, 553 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{FN}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 521.0354, found 521.0352.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰-3-氟-4-氯苯胺基)喹啉(**8j**): 白色固体, 产率 77.8%. m.p. 253.1~255.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.33 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.10 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.98 (dd, $J=6.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.75 (dd, $J=8.9, 4.1, 2.8$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J=8.9, 4.1$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J=16.5, 9.1$ Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.99 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.8, 155.1, 153.6, 152.5, 147.9, 137.1, 136.0, 121.7, 119.6, 117.6, 116.9, 109.4, 108.2, 104.8, 68.9, 56.5; IR (KBr) ν : 3376, 3343, 1683, 1581, 1501, 1428, 1262, 1214, 1147, 1007, 855, 707, 544 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 505.0648, found 505.0645.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰-2,4-二甲氧基嘧啶胺基)喹啉(**8k**): 白色固体, 产率 71.6%. m.p. 249.5~252.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.63 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.09 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.74 (dd, $J=9.0, 4.3$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.90 (d, $J=7.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.0, 164.9, 154.9, 152.6, 147.8, 137.1, 124.3, 119.2, 117.2, 116.9, 109.0, 108.2, 104.6, 88.1, 68.4, 56.5, 54.9, 54.5; IR (KBr) ν : 3486, 3376, 2945, 1700, 1584, 1503, 1429, 1359, 1233, 1100, 1000, 829, 685, 550 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{ClF}_2\text{N}_6\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 515.1232, found 515.1238.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(氧代乙酰-环丙胺基)喹啉(**8l**): 浅黄色固体, 产率 68.8%. m.p. 263.9~265.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.54 (s, 1H),

8.52 (s, 1H), 8.12 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.77 (dd, $J=9.0, 4.3$ Hz, 1H), 7.46 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 2.74 (dd, $J=7.3, 3.9$ Hz, 1H), 0.67 (dd, $J=7.0, 4.8$ Hz, 2H), 0.58~0.43 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 168.6, 155.0, 153.5, 152.5, 147.9, 137.2, 122.8, 119.3, 117.2, 116.9, 109.1, 108.1, 104.6, 68.8, 56.5, 22.7, 6.2; IR (KBr) ν : 3405, 3285, 1640, 1532, 1500, 1429, 1213, 1138, 996, 843, 692, 545 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 417.1171, found 417.1177.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-[氧代乙酰胺基-(*L*)-丙胺酸甲酯]喹啉(**8m**): 白色固体, 产率 65.7%. m.p. 213.3~215.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.49 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.34 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.12 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.77 (dd, $J=9.0, 4.2$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 4.85~4.64 (m, 2H), 4.43 (p, $J=7.2$ Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 1.36 (d, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.2, 167.5, 155.0, 153.5, 152.4, 147.9, 147.7, 137.2, 123.8, 119.2, 117.1, 116.9, 109.0, 108.1, 104.7, 68.5, 56.5, 52.5, 47.9, 17.5; IR (KBr) ν : 3356, 3230, 2939, 1732, 1627, 1501, 1426, 1229, 1147, 1056, 1001, 852, 782, 555 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClFN}_4\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 463.1176, found 463.1178.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-[氧代乙酰胺基-(*L*)-苯丙胺酸甲酯]喹啉(**8n**): 白色固体, 产率 74.6%. m.p. 223.3~224.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.47 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.19 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 8.11 (dd, $J=6.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.87~7.72 (m, 2H), 7.46 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.26~7.14 (m, 6H), 4.72 (t, $J=8.5$ Hz, 2H), 4.65 (dt, $J=8.0, 5.4$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.08 (dd, $J=13.8, 6.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.0, 167.8, 154.9, 153.5, 152.4, 147.9, 137.2, 129.5, 123.8, 122.5, 119.2, 116.9, 109.0, 108.1, 104.5, 68.4, 56.5, 53.6, 52.5, 36.9; IR (KBr) ν : 3407, 3353, 3029, 2950, 2838, 1729, 1627, 1501, 1434, 1231, 1141, 998, 855, 754, 701, 555 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{ClFN}_4\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 539.1499, found 539.1495.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-[氧代乙酰胺基-(*L*)-甲硫氨酸甲酯]喹啉(**8o**): 白色固体, 产率 72.7%. m.p. 223.9~224.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.49 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.38 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.10 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.77 (dd, $J=9.0, 4.2$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 4.81~4.71 (m, 2H), 4.54 (dd, $J=8.3, 5.1$ Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.64 (s,

3H), 2.49~2.40 (m, 2H), 2.06~1.94 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.4, 167.9, 156.6, 153.5, 152.5, 147.8, 137.2, 123.8, 122.7, 119.4, 117.1, 109.0, 108.1, 104.5, 68.4, 56.4, 52.6, 51.2, 30.8, 29.6, 15.0; IR (KBr) ν : 3355, 3216, 2917, 2838, 1742, 1648, 1500, 1425, 1209, 1143, 1000, 858, 786, 548 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{ClFN}_4\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 523.1210, found 523.1214.

3.9 吉非替尼衍生物 9a~9d 的合成

向 100 mL 三颈瓶中依次加入 *N,N*-二甲基甲酰胺 DMF 20 mL, 4-(3-氯-4-氟苯胺)-7-甲氧基-喹啉-6-醇 0.7 g (2.2 mmol), 氮乙酰化氨基酸或二肽(4.4 mmol). 降温至 0 $^{\circ}\text{C}$, 依次加入 TBTU 1.4 g (4.4 mmol), *N*-甲基吗啉 0.45 g (4.4 mmol). 搅拌保持 0 $^{\circ}\text{C}$ 反应 0.5 h 后恢复至室温搅拌 8~10 h, TLC 跟踪至原料点消失, 停止反应, 将反应液倒入水中有固体析出, 抽滤, 得固体粗产物通过柱层析 [*V*(乙酸乙酯): *V*(石油醚)=1:5~8] 分离得到化合物 9a~9d.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(*N*-乙酰甘氨酸酯)喹啉(**9a**): 白色固体, 产率 67.2%. m.p. 232.2~234.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.75 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.51 (t, $J=5.8$ Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.18 (dd, $J=6.8, 2.4$ Hz, 1H), 7.91~7.70 (m, 1H), 7.40 (dd, $J=21.0, 11.9$ Hz, 2H), 4.19 (d, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 1.91 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.4, 169.1, 157.3, 155.8, 155.2, 150.7, 139.4, 137.0, 122.6, 119.4, 117.2, 116.5, 109.1, 109.0, 56.9, 22.7; IR (KBr) ν : 3401, 3298, 3123, 2983, 2839, 1760, 1630, 1499, 1427, 1671, 1242, 1164, 1004, 822, 690, 536 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 419.0924, found 419.0920.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-[(*L*)-*N*-乙酰亮氨酸酯]喹啉(**9b**): 白色固体, 产率 77.4%. m.p. 224.4~225.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.78 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.47 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.17 (dd, $J=6.9, 2.6$ Hz, 1H), 7.78 (dd, $J=9.0, 4.3, 2.7$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.60 (dd, $J=8.1, 6.4$ Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.77 (dd, $J=14.3, 7.4$ Hz, 3H), 0.95 (dd, $J=19.9, 5.8$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.6, 170.1, 157.4, 155.7, 155.1, 152.5, 150.7, 139.6, 137.0, 122.7, 119.3, 117.1, 116.5, 109.1, 108.9, 56.9, 50.7, 24.8, 23.3, 22.7, 21.7; IR (KBr) ν : 3316, 3223, 3061, 2953, 1761, 1633, 1503, 1430, 1343, 1232, 1141, 1001, 925, 862, 693, 558 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{ClFN}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 475.1544, found 475.1548.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-[(*L*)-*N*-乙酰亮氨酸-(*L*)-苯丙氨酸酯]喹啉(**9c**): 白色固体, 产率 69.7%. m.p. 255.3~257.2 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.80 (s, 1H), 8.70 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.20 (dd, $J=6.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.86~7.77 (m, 1H), 7.48~7.21 (m, 7H), 4.91~4.82 (m, 1H), 4.35 (dd, $J=9.0, 5.8$ Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.40 (dd, $J=13.8, 3.9$ Hz, 2H), 3.08 (dd, $J=13.4, 11.5$ Hz, 1H), 1.81 (s, 3H), 1.35~1.27 (m, 1H), 1.15~1.08 (m, 1H), 0.76 (t, $J=6.1$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.0, 170.6, 169.4, 157.4, 155.8, 155.2, 150.8, 139.5, 137.4, 137.0, 129.8, 119.4, 117.2, 116.5, 109.1, 57.0, 53.7, 51.2, 41.7, 37.2, 24.5, 23.3, 22.1; IR (KBr) ν : 3392, 3302, 2966, 1751, 1647, 1500, 1426, 1390, 1241, 1161, 1002, 852, 701, 541 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{ClFN}_5\text{O}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 622.2248, found 622.2243.

4-(3-氯-4-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-[(*L*)-*N*-乙酰甘氨酸-(*L*)-苯丙氨酸酯]喹啉(**9d**): 白色固体, 产率 79.4%. m.p. 276.3~278.7 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.80 (s, 1H), 8.69~8.53 (m, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.19 (dd, $J=6.7, 2.2$ Hz, 1H), 8.08 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.84~7.78 (m, 1H), 7.50~7.22 (m, 7H), 4.85 (dd, $J=9.4, 4.5$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.80 (dd, $J=16.8, 5.9$ Hz, 1H), 3.65 (dd, $J=16.8, 5.6$ Hz, 1H), 3.39 (d, $J=4.5$ Hz, 1H), 3.11 (dd, $J=13.8, 10.1$ Hz, 1H), 1.86 (d, $J=8.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.4, 170.1, 170.0, 169.9, 155.7, 152.5, 150.8, 139.5, 137.5, 129.7, 119.4, 116.5, 109.1, 108.9, 56.9, 53.9, 42.1, 37.1, 22.9; IR (KBr) ν : 3290, 3026, 2835, 1772, 1656, 1503, 1426, 1342, 1230, 1153, 1027, 931, 840, 699, 552 cm^{-1} ; HRMS (ESI-MS) calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{ClFN}_5\text{O}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 566.1606, found 566.1609.

3.10 抗肿瘤细胞毒活性实验

采用溴化噻唑蓝四氮唑比色法(MTT)测试化合物 **7a**~**7d**, **8a**~**8o** 和 **9a**~**9d** 对人非小细胞肺癌细胞(A549)、人肝癌细胞(HepG-2)的体外抑制活性实验. 取处于对数生长期的状态良好的细胞一瓶, 加入 0.25 (wt)%胰蛋白酶消化液消化, 使贴壁细胞脱落, 计数, 制成 $(2\sim4)\times 10^4$ 个细胞/mL 的悬液. 接种于 96 孔板上, 180 μL /孔, 置恒温 CO_2 培养箱中培养 24 h, 换液, 加入受试化合物的 DMSO 溶液, 20 μL /孔, 再加入含体积分数为 10%的血清培养液 80 μL , 培养 48 h, 将 MTT 加入 96 孔板中, 20 μL /孔, 培养箱中反应 4 h. 吸去上清液, 加入 DMSO, 150 μL /孔, 平板摇床上振摇 5 min. 用酶联

免疫检测仪在波长为 570 nm 处测定每孔的吸光值(OD 值), 并计算对细胞增殖的抑制率. 以相应溶媒作阴性对照, 以吉非替尼为阳性对照, 公式: 抑制率=[(阴性对照组 OD 值-受试物组 OD 值)/阴性对照组 OD 值] $\times 100\%$, 计算不同浓度下的抑制率, 再以此求出值各样品的 IC_{50} (见表 1).

辅助材料(Supporting Information) 所有目标化合物的 IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, HRMS 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Ciardiello, F.; Caputo, R.; Bianco, R.; Damiano, V.; Pomatito, G.; Placido, S. D.; Bianco, A. R.; Tortora, G. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2053.
- [2] Moasser, M. M.; Basso, A.; Averbuch, S. D.; Rosen, N. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 7184.
- [3] Friedmann, B.; Caplin, M.; Hartley, J. A.; Hochhauser, D. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 6476.
- [4] Chang, G.-C.; Hsu, S.-L.; Tsai, J.-R.; Liang, F.-P.; Lin, S.-Y.; Sheu, G.-T.; Chen, C.-Y. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 1453.
- [5] Lee, E. J.; Whang, J. H.; Jeon, N. K.; Kim, J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1095*, 113.
- [6] Palmer, B. D.; Trump, S. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1519.
- [7] Trump, S.; Rubin, J. R. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1752.
- [8] Wissner, A.; Berger, D. M.; Boschelli, D. H.; Floyd, M. B.; Greenberger, Jr. L. M.; Gruber, B. C.; Johnson, B. D.; Mamuya, N.; Nilakantan, R.; Reich, M. F.; Shen, R.; Tsou, H. R.; Upešlacis, E.; Wang, Y. F.; Wu, B.; Ye, F.; Zhang, N. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3244.
- [9] Wissner, A.; Overbeek, E.; Reich, M. F.; Floyd, M. B.; Johnson, B. D.; Mamuya, N.; Rosfjord, E. C.; Discifan, C.; Davis, R.; Shi, X. Q.; Rabinran, S. K.; Gruber, B. C.; Ye, F.; Hallett, W. A.; Nilakantan, R.; Shen, R.; Wang, Y. F.; Greenberger, L. M.; Tsou, H. R. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 49.
- [10] Lee, J. Y.; Park, Y. K.; Seo, S. H.; So, I.-S.; Chung, H.-K.; Yang, B.-S.; Lee, S. J.; Park, H.; Lee, Y. S. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, *334*, 357.
- [11] Lee, J.-Y.; Lee, Y.-S.; Park, H.-K.; Seo, S.-H.; Yang, B.-S. *US 2003045537*, **2003** [*Chem. Abstr.* **2003**, *138*, 122652c].
- [12] Hou, T.-J.; Zhu, L.-L.; Chen, L.-R.; Xu, X.-J. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 1023 (in Chinese). (侯廷军, 朱丽荔, 陈丽蓉, 徐筱杰, 化学学报, **2002**, *60*, 1023.)
- [13] Kobayashi, S.; Boggon, T. J.; Dayaram, T.; Janne, P. A.; Kocher, O.; Meyerson, M.; Johnson, B. E.; Eck, M. J.; Tenen, D. G.; Halmos, B. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 786.
- [14] Gibson, K. H.; Grundy, W.; Godfrey, A. A.; Woodburn, J. R.; Ashton, S. E.; Curry, B. J.; Scarlett, L.; Barker, A. J.; Brown, D. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2723.
- [15] Gibson, K. H. *WO 9633980*, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, *126*, 47235].
- [16] Du, P.; Pan, C.-Y.; Peng, D.-M. *Chin. J. New Drugs* **2006**, *21*(15), 1849 (in Chinese). (杜鹏, 潘春跃, 彭东明, 中国药学杂志, **2006**, *21*(15), 1849.)

(Li, L.; Lu, Z.)