伊马替尼衍生物的合成及细胞毒活性研究

陈仕杰^a 和 龙^{a,b} 王雪微^a 龚显峰^a 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 3-乙酰基嘧啶、2-甲基-5-硝基苯胺为起始原料, 经加成、缩合、环化、还原得到中间体 *N*-(2-甲基-5-氨基苯基)-4-(3-吡啶基)嘧啶-2-胺(6), 再与(*L*)-*N*-酰化-氨基酸缩合得到 14 个伊马替尼氨基酸衍生物 7a~7n。目标化合物结构经过 IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, HRMS 等确证。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法考察了目标化合物对人白血病细胞(K562)、人肺癌细胞(A549)、人肝癌细胞(HepG-2)体外抑制活性测试。结果显示化合物 7a, 7d, 7e, 7i, 7j, 7k, 7l, 7n 体外抑制活性较高, 与对照品伊马替尼相近。

关键词 伊马替尼衍生物; 合成; 四甲基偶氮唑盐(MTT)法

Synthesis and Cytotoxic Activity of Imatinib Derivatives

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

Abstract Fourteen derivatives of imatinib have been prepared by condensation of (*L*)-*N*-acylation amino acid with *N*-(5-amino-2-methylphenyl)-4-(3-pyridyl)-2-pyrimidine amine (6), which was prepared from 3-acetyl-pyrimidin and 2-methyl-5-nitroaniline through the reactions of addition, condensation, cyclization and reduction, respectively. The structures of all target compounds were characterized by IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS techniques. They were evaluated for cytotoxic activity against human Leukemia cells (K562), human non-small-cell-lung cancer cells lines (A549) and human hepatoma cell lines (HepG-2) by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The results showed the cytotoxic activities of compounds 7d, 7i, 7j, 7k, 7l, 7n against human Leukemia cells (K562) and human non-small-cell-lung cancer cell lines (A549), compounds 7a, 7d, 7e against human hepatoma cell lines (HepG-2) were comparable to those of imatinib.

Keywords imatinib derivatives; synthesis; methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay

甲磺酸伊马替尼(Imatinib Mesilate, 图 1), 化学名为 4-[(4-甲基-1-哌嗪)甲基]-*N*-[4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-嘧啶]氨基]苯基]-苯胺甲磺酸盐, 由瑞士诺华(Novartis)公司开发, 属于小分子蛋白酪氨酸激酶抑制剂, 临床上用于治疗慢性髓细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)^[1], 其作用机制是针对酪氨酸激酶 bcr/abl 亚型受体, 选择性结合于 bcr/abl 蛋白酪氨酸激酶催化区的核苷酸, 竞争性地阻止酪氨酸激酶与 ATP 结合, 降低酪氨酸激酶活性, 从而抑制肿瘤细胞的增殖、转移^[2,3]。2001 年获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市^[4,5], 当年即取得了 1.65 亿美元的显赫销售佳绩, 短短三年就培育成了“重磅炸弹”药物。2004 年销售额已达

16.34 亿美元。目前该药已在世界 90 多个国家和地区销售, 2014 年销售额达 47.60 亿美元。

图 1 甲磺酸伊马替尼
Figure 1 Imatinib mesylate

甲磺酸伊马替尼在慢性髓细胞白血病的治疗上取得了显著的疗效, 但是随着临床上的应用, 其耐药性和

* E-mail: zhanghua34@163.com

Received June 25, 2015; revised July 27, 2015; published online August 26, 2015.

Project supported by the Foundation of Heilongjiang Educational Committee (No. 12521417).

黑龙江省教育厅科学技术研究(No. 12521417)资助项目.

不良反应如水肿、恶心、呕吐、皮疹、骨关节及肌肉疼痛、中性粒细胞及血小板减少等相继出现^[6-9]。临床研究报道该药在急性变期 CML 平均使用 10.5 周后疗效明显下降。Sawyers 等^[10]曾报道 291 例 CML 患者在平均接受伊马替尼治疗 123 d 后,伊马替尼的耐药率为 14.44%(其中 21 例男性,21 例女性)。因此合成伊马替尼衍生物,研究开发其“Me-too”或“Me-better”药物具有重要应用价值。本工作尝试将 *L*-氨基酸引入伊马替尼母体结构中,希望能够增加化合物的溶解性,增加药物分子与酪氨酸激酶催化区域的特异性空间结合位点,从而竞争性地阻止酪氨酸激酶与 ATP 结合,降低酪氨酸激酶活性。本工作参考文献报道^[11-13],以 3-乙酰基嘧啶、2-甲基-5-硝基苯胺为起始原料,经加成、缩合、环化、还原得到关键中间体 *N*-(2-甲基-5-氨基苯基)-4-(3-吡啶基)嘧啶-2-胺(**6**),最后采用综合剂 *O*-苯并三唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲四氟硼酸酯(TBTU)使中间体 **6** 与 (*L*)-*N*-酰化-氨基酸缩合得到 14 个光学活性的伊马替尼氨基酸衍生物 **7a~7n** (Scheme 1)。并对这 14 个目标衍生物进行了人白血病细胞(K562)、人肺癌细胞(A549)、人肝癌细胞(HepG-2)体外抑制活性测试。

1 结果与讨论

1.1 波谱解析

以目标化合物 **7a** 的光谱数据分析为例。化合物 **7a**

的 ¹H NMR 中 δ 10.04 出现酰胺活泼氢, δ 7.15~9.27 出现 14 个芳环氢,高场 δ 1.80~2.20 出现两个甲基单峰, δ 2.85 出现两个氢峰, δ 4.67 出现一个氢峰,分子结构中存在四个脂肪碳 δ 18.1, 22.9, 38.3, 55.4; 21 个芳环碳 δ 108.0, 116.1, 116.6, 124.3, 126.8, 127.6, 128.5, 129.6, 134.9, 148.7, 151.8, 159.9, 161.6, 162.1(部分芳环碳化学位移重合); 两个酰胺羰基碳 δ 169.7, 170.6。其红外光谱图中 3450, 3289 cm⁻¹ 处有吸收峰说明分子中有酰胺氢存在; 3029 cm⁻¹ 为苯环=CH 伸缩振动吸收峰, 2969 cm⁻¹ 为甲基或亚甲基 C—H 伸缩振动吸收峰, 1664 cm⁻¹ 为酰胺羰基伸缩振动吸收峰, 1645, 1602, 1578, 1532 cm⁻¹ 为苯环 C=C 伸缩振动吸收峰, 高分辨质谱 HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₇H₂₇N₆O₂ [M+H]⁺ 467.2190, found 467.2190, 说明分子量正确。综合 ¹H NMR, ¹³C 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 14 个目标化合物对体外培养的人白血病细胞(K562)、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 R² 侧链基团较小的化合物 **7d**, **7i**, **7j**, **7k**, **7l**, **7n** 对人白血病细胞(K562)和人非小细胞肺癌细胞(A549)体外生长抑制作用较强, R¹ 侧链基团较小的化合物 **7a**, **7d**, **7e** 对人肝癌细胞(HepG-2)的体外生长抑制作用较强(表 2)。

图式 1 化合物 **7a~7n** 合成路线

Scheme 1 Synthetic routes of target compounds **7a~7n**

表2 目标化合物体外对人 K562, A549 和 HepG-2 细胞的抑制活性($c=150 \mu\text{mol/L}$)

Table 2 Inhibitory activity of target compounds against K562, A549 and HEPG-2 cell growth *in vitro* ($c=150 \mu\text{mol/L}$)

Compound	抑制率/%		
	K562	A549	HepG-2
7a	20.5	18.1	56.8
7b	28.2	17.4	23.0
7c	28.8	19.2	17.2
7d	66.3	59.0	49.2
7e	13.5	16.3	56.5
7f	23.2	13.2	27.8
7g	27.5	17.5	26.9
7h	23.9	13.9	25.3
7i	60.2	60.1	28.4
7j	64.3	61.3	27.1
7k	61.2	61.5	26.1
7l	63.3	59.3	17.8
7m	28.9	18.9	27.1
7n	62.0	58.6	19.4
Imatinib	61.7	61.2	50.6

2 结论

该类伊马替尼氨基酸衍生物 **7a~7n** 对人白血病细胞(K562)、人非小细胞肺癌细胞(A549)和人肝癌细胞(HepG-2)的生长均有一定程度的抑制作用. 其中化合物 **7a, 7d, 7e, 7i, 7j, 7k, 7l, 7n** 的抑制作用与对照品伊马替尼的抑制活性相当或略高.

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 Avance 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); 各种(L)-N-酰化氨基酸(纯度 99%, 上海瀚鸿化工科技有限公司), 伊马替尼对照品(国药一心制药有限公司提供), 其他化学试剂和原料均为化学纯或分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 2-甲基-5-硝基苯胺硝酸盐(3)的合成

将 2-甲基-5-硝基苯胺(40 g, 0.26 mol)和单脒胺(22.0 g, 0.55 mol)溶于 200 mL 异丙醇中, 搅拌, 加热到 80°C , 于此温下缓慢滴入 35 mL 浓盐酸, 滴毕, 维持此温搅拌 1 h, 然后再于 80°C 再缓慢滴入 15 mL 浓盐酸, 并再维持此温继续搅拌 2 h, 将反应混合物冷却到 60°C , 逐滴加入 65% 的浓硝酸(20 mL, 0.28 mol), 搅拌, 自然冷却到室温, 析出白色固体, 过滤, 异丙醇洗涤, 干燥得产物(60.0 g, 89%), m.p. $222\sim 224^\circ\text{C}$ (文献值^[14]: m.p.

$219\sim 226^\circ\text{C}$).

1.2.2 3-二甲氨基-1-(3-吡啶基)-2-丙烯-1-酮(4)的合成

将 3-乙酰基吡啶(50 g, 0.42 mol)和 *N,N*-二甲基甲酰胺二甲基缩醛(74.0 g, 0.64 mol)混合溶于 200 mL 二甲苯中, 搅拌, 加热回流 6 h, 减压蒸干溶剂及 *N,N*-二甲基甲酰胺二甲基缩醛等, 残留物用石油醚/丙酮($V:V=5:1$)重结晶得淡黄色固体(66.0 g, 90%), m.p. $65\sim 67^\circ\text{C}$ (文献值^[15]: m.p. $66\sim 67^\circ\text{C}$).

1.2.3 *N*-(2-甲基-5-硝基苯基)-4-(3-吡啶基)嘧啶-2-胺(5)的合成

将 3-二甲氨基-1-(3-吡啶基)-2-丙烯-1-酮(44.0 g, 0.25 mol)及 2-甲基-5-硝基苯胺硝酸盐(56.0 g, 0.22 mol)溶于 150 mL DMF 中, 搅拌, 逐滴加入 NaOH 水溶液(8.8 g NaOH 溶于 20 mL 水中), 滴毕, 加热到 $140\sim 145^\circ\text{C}$ 反应 8 h, 冷却到 80°C , 缓慢加入 1 L 水, 搅拌, 自然冷却到室温, 过滤, 甲醇重结晶得淡黄色粉末(54.0 g, 80%), m.p. $196\sim 198^\circ\text{C}$ (文献值^[15]: $195\sim 198^\circ\text{C}$).

1.2.4 *N*-(2-甲基-5-氨基苯基)-4-(3-吡啶基)嘧啶-2-胺(6)的合成

N-(2-甲基-5-硝基苯基)-4-(3-吡啶基)嘧啶-2-胺(30.0 g, 0.098 mol)溶于 1 L 四氢呋喃中, 加入 15 g 新制的雷尼镍, 常温常压催化氢化 12 h, 过滤, 减压浓缩, 乙醇重结晶得到黄色结晶(24.6 g, 90.3%), m.p. $139\sim 140^\circ\text{C}$ (文献值^[15]: $138\sim 140^\circ\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.27 (s, 1H), 8.73~8.72 (d, $J=4$ Hz, 1H), 8.53~8.41 (d, $J=4$ Hz, 1H), 8.37~8.34 (m, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.45~7.41 (m, 1H), 7.16~7.14 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.07~6.86 (m, 2H), 6.44~6.41 (m, 1H), 2.29~2.19 (s, 3H); IR (KBr) ν : 3442.6, 3309.0, 3207.4, 1587.9, 1567.9, 1528.0, 1443.3, 1403.1, 1194.8, 793.3 cm^{-1} .

1.2.5 伊马替尼氨基酸衍生物 7a~7n 的合成

向 100 mL 四颈瓶中加入二氯甲烷(50 mL), 冰浴降至 0°C 后, 依次加入 *N*-(2-甲基-5-氨基苯基)-4-(3-吡啶基)嘧啶-2-胺(2.20 g, 0.008 mol)和(L)-N-酰化氨基酸(0.01 mol), 搅拌 10 min 后加入 *O*-苯并三唑-*N,N,N'*,*N'*-四甲基脲四氟硼酸酯(TBTU, 3.60 g, 0.012 mol)及 *N,N*-二异丙基乙胺(DIEA, 1.40 g, 0.012 mol), 固体全部溶解, 控温 0°C 搅拌 30 min, 撤去冰浴, 逐渐升至室温反应, 有固体逐渐析出, TLC 跟踪至反应完成[展开剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=1:2\sim 1:5$]. 抽滤, 滤饼用 20 mL 饱和 Na_2CO_3 溶液洗涤, 固体用甲醇/乙酸乙酯($V:V=1:3\sim 1:5$)重结晶, 得到伊马替尼氨基酸衍生物 **7a~7n**.

[(2*S*)-2-乙酰胺基]-*N*-(4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-嘧啶]氨基]苯基)苯丙酰胺(**7a**): 淡黄色晶体, 产率 79.6%.

m.p. 267.5~268 °C, $[\alpha]_D^{25} -34.3$ (c 1, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.04 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.74~8.66 (m, 1H), 8.49 (dd, $J=22.4$, 6.6 Hz, 2H), 8.25 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.53 (dd, $J=8.0$, 4.8 Hz, 1H), 7.44 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.35~7.10 (m, 7H), 4.66 (td, $J=9.2$, 5.3 Hz, 1H), 3.03 (dd, $J=13.7$, 5.0 Hz, 1H), 2.85 (dd, $J=13.7$, 9.5 Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.80 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.6, 169.7, 162.0, 161.5, 159.9, 151.8, 148.6, 138.3, 137.3, 134.9, 132.6, 130.5, 129.6, 128.5, 127.6, 126.7, 124.2, 116.5, 116.1, 108.0, 55.3, 38.2, 22.8, 18.0; IR (KBr) ν : 3703, 3450, 3289, 1645, 1532, 1454, 1396, 798, 701, 566 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₇H₂₇N₆O₂ [M+H]⁺ 467.2190, found 467.2190.

[(2*S*)-2-丙酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-嘧啶]氨基]苯基}苯丙酰胺(**7b**): 白色粉末, 产率 77.1%. m.p. 220.5~222 °C; $[\alpha]_D^{25} -35.6$ (c 0.5, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.03 (s, 1H), 9.26 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.69 (dd, $J=4.8$, 1.6 Hz, 1H), 8.48 (dd, $J=20.6$, 6.6 Hz, 2H), 8.13 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.53 (dd, $J=7.9$, 4.8 Hz, 1H), 7.43 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.34~7.11 (m, 7H), 4.76~4.58 (m, 1H), 3.14~2.76 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.13~1.98 (m, 2H), 0.90 (t, $J=7.6$ Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 173.4, 170.6, 162.0, 161.5, 159.9, 151.84, 148.6, 138.3, 137.3, 134.8, 132.6, 130.5, 129.6, 128.5, 127.6, 126.7, 124.2, 116.6, 116.1, 108.0, 55.1, 38.3, 28.6, 18.0, 10.1; IR (KBr) ν : 3699, 3289, 2972, 1670, 1643, 1583, 1528, 1454, 1402, 797, 697 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₈H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺ 481.2347, found 481.2347.

[(2*S*)-2-叔丁氧羰基胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-嘧啶]氨基]苯基}苯丙酰胺(**7c**): 白色粉末, 产率 76.9%. m.p. 205.7~206.9 °C; $[\alpha]_D^{25} -33.5$ (c 1, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.97 (s, 1H), 9.27 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.70 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 8.50 (dd, $J=15.8$, 6.6 Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.61~7.00 (m, 10H), 4.34 (s, 1H), 3.09~2.74 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.28 (d, $J=31.2$ Hz, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 171.0, 162.0, 161.5, 159.9, 155.8, 151.8, 148.6, 138.4, 137.3, 134.9, 132.6, 130.6, 129.7, 128.4, 127.5, 126.7, 124.2, 116.4, 116.0, 108.0, 78.5, 57.0, 38.0, 28.6, 18.0; IR (KBr) ν : 3693, 3337, 2980, 1698, 1573, 1452, 1410, 1163, 1029, 707, 605 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₃₀H₃₃N₆O₃ [M+H]⁺ 525.2609, found 525.2606.

[2-乙酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-嘧啶]氨基]苯基}甘氨酸酰胺(**7d**): 白色晶体, 产率 79.8%. m.p. 212~213.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.88 (s, 1H), 9.26 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.70 (dd, $J=4.8$, 1.5 Hz, 1H), 8.47 (ddd, $J=9.8$, 8.0, 3.5 Hz, 2H), 8.18 (t, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J=8.0$, 4.8 Hz, 1H), 7.43 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J=8.2$, 1.9 Hz, 1H), 7.16 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.89 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.1, 168.1, 162.0, 161.5, 159.9, 151.8, 148.6, 138.3, 137.3, 134.9, 132.6, 130.6, 127.4, 124.3, 116.4, 115.9, 108.0, 43.2, 22.9, 18.0; IR (KBr) ν : 3433, 3196, 2905, 1698, 1655, 1557, 1452, 1239, 1311, 1023, 790, 705, 589 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₀H₂₁N₆O₂ [M+H]⁺ 377.1721, found 377.1717.

[(2*S*)-2-乙酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-嘧啶]氨基]苯基}亮氨酸酰胺(**7e**): 淡黄色粉末, 产率 84.7%. m.p. 207.5~209 °C; $[\alpha]_D^{25} -35.7$ (c 0.8, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.01 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.70 (d, $J=4.2$ Hz, 1H), 8.48 (dd, $J=22.1$, 6.5 Hz, 2H), 8.11 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.52 (dd, $J=7.7$, 5.0 Hz, 1H), 7.43 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 4.45 (dd, $J=14.8$, 8.1 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.72~1.41 (m, 3H), 0.90 (dd, $J=16.7$, 6.4 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 171.6, 169.7, 162.0, 161.5, 159.9, 151.8, 148.6, 138.2, 137.4, 134.8, 132.6, 130.5, 127.5, 124.2, 116.5, 116.1, 108.0, 52.3, 41.4, 24.8, 23.4, 22.8, 22.2, 18.0; IR (KBr) ν : 3445, 3249, 2924, 1649, 1633, 1417, 1299, 891, 804, 633, 483 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₄H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺ 433.2347, found 433.2345.

[(2*S*)-2-苯甲酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-嘧啶]氨基]苯基}苯丙酰胺(**7f**): 白色粉末, 产率 76.2%. m.p. 258~259.5 °C; $[\alpha]_D^{25} -34.5$ (c 1, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.18 (s, 1H), 9.27 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.81~8.60 (m, 2H), 8.57~8.27 (m, 2H), 7.99 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.93~7.76 (m, 2H), 7.60~7.38 (m, 7H), 7.36~7.23 (m, 3H), 7.23~7.11 (m, 2H), 4.87 (td, $J=9.6$, 5.0 Hz, 1H), 3.26~2.97 (m, 2H), 2.22 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.7, 166.9, 162.0, 161.5, 159.9, 151.8, 148.6, 138.6, 138.3, 137.3, 134.9, 134.4, 132.6, 131.8, 130.6, 129.7, 128.6, 127.9, 127.5, 126.7, 124.2, 116.5, 116.0, 108.0, 56.3, 37.7, 18.0; IR (KBr) ν : 3432, 3295, 2924, 1668, 1637, 1584, 1529, 1399, 801, 698, 567 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₃₂H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺ 529.2347, found 529.2337.

[(2*S*)-2-苯乙酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-嘧啶]氨基]苯基}甘氨酸酰胺(**7g**): 白色粉末, 产率 76.2%. m.p. 258~259.5 °C; $[\alpha]_D^{25} -34.5$ (c 1, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.18 (s, 1H), 9.27 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.81~8.60 (m, 2H), 8.57~8.27 (m, 2H), 7.99 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.93~7.76 (m, 2H), 7.60~7.38 (m, 7H), 7.36~7.23 (m, 3H), 7.23~7.11 (m, 2H), 4.87 (td, $J=9.6$, 5.0 Hz, 1H), 3.26~2.97 (m, 2H), 2.22 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.7, 166.9, 162.0, 161.5, 159.9, 151.8, 148.6, 138.6, 138.3, 137.3, 134.9, 134.4, 132.6, 131.8, 130.6, 129.7, 128.6, 127.9, 127.5, 126.7, 124.2, 116.5, 116.0, 108.0, 56.3, 37.7, 18.0; IR (KBr) ν : 3432, 3295, 2924, 1668, 1637, 1584, 1529, 1399, 801, 698, 567 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₃₂H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺ 529.2347, found 529.2337.

啉]氨基]苯基}苯丙酰胺(**7g**): 淡黄色粉末, 产率 87.1%. m.p. 234.5~235 °C; $[\alpha]_D^{25} - 33.8$ (*c* 1, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.07 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.69 (d, *J*=4.8 Hz, 1H), 8.58~8.39 (m, 3H), 7.91 (s, 1H), 7.58~7.41 (m, 2H), 7.35~7.04 (m, 12H), 4.69 (td, *J*=9.2, 5.1 Hz, 1H), 3.57~3.34 (m, 2H), 2.20 (s, 2H), 1.24 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.5, 162.0, 161.5, 159.9, 151.7, 148.6, 138.3, 138.0, 137.2, 136.7, 134.9, 132.7, 130.6, 129.7, 129.4, 128.5, 127.6, 126.7, 124.3, 116.5, 116.1, 108.0, 55.3, 42.3, 38.4, 18.0; IR (KBr) ν : 3429, 3297, 3025, 1630, 1581, 1454, 1394, 1084, 796, 701, 572 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₃₃H₃₁N₆O₂ [M+H]⁺ 543.2503, found 543.2505.

[(2*S*)-2-对甲苯甲酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-噻啉]氨基]苯基}苯丙酰胺(**7h**): 淡黄色粉末, 产率 75.5%. m.p. 235~236.3 °C; $[\alpha]_D^{25} - 33.3$ (*c* 1, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.18 (s, 1H), 9.27 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.70~8.59 (m, 2H), 8.48 (dd, *J*=10.2, 8.0 Hz, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.75 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), 7.54~7.38 (m, 4H), 7.36~7.13 (m, 7H), 4.86 (dd, *J*=8.9, 5.4 Hz, 1H), 3.24~3.04 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.22 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.8, 166.8, 162.0, 161.5, 159.9, 151.8, 148.6, 141.7, 138.7, 138.3, 137.4, 134.9, 132.6, 131.6, 130.6, 129.7, 129.1, 128.5, 127.9, 124.2, 116.4, 116.0, 107.9, 56.2, 37.7, 21.4, 18.0; IR (KBr) ν : 3448, 3285, 3031, 1670, 1632, 1530, 1504, 885, 704, 666, 572 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₃₃H₃₁N₆O₂ [M+H]⁺ 543.2503, found 543.2501.

[2-苯乙酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-噻啉]氨基]苯基}甘氨酸酰胺(**7i**): 白色晶体, 产率 78.8%. m.p. 239~240.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.91 (s, 1H), 9.26 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.69 (dd, *J*=4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.47 (dd, *J*=8.0, 3.5 Hz, 2H), 8.36 (t, *J*=5.7 Hz, 1H), 7.88 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J*=7.5, 4.8 Hz, 1H), 7.43 (d, *J*=5.2 Hz, 1H), 7.35~7.13 (m, 7H), 3.91 (d, *J*=5.8 Hz, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.20 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 171.0, 167.9, 162.1, 161.5, 159.9, 151.8, 148.6, 138.3, 137.3, 136.7, 134.9, 132.6, 130.6, 129.5, 128.6, 127.5, 126.7, 124.3, 116.3, 115.9, 108.0, 43.2, 42.5, 18.0; IR (KBr) ν : 3267, 3056, 2984, 1697, 1654, 1534, 1409, 1244, 1021, 821, 703, 645 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₆H₂₅N₆O₂ [M+H]⁺ 453.2034, found 453.2026.

[(2*S*)-2-苯甲酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-噻啉]氨基]苯基}丙酰胺(**7j**): 淡黄色粉末, 产率 76.1%. m.p. 206.0~207.5 °C; $[\alpha]_D^{25} + 13.8$ (*c* 1, CH₃OH); ¹H

NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.02 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.64 (dd, *J*=14.6, 5.5 Hz, 2H), 8.48 (dd, *J*=19.4, 6.4 Hz, 2H), 8.02~7.87 (m, 3H), 7.59~7.39 (m, 5H), 7.31 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.16 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 4.73~4.54 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.45 (d, *J*=7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 171.7, 166.7, 162.0, 161.5, 159.9, 151.7, 148.6, 138.3, 137.5, 134.9, 134.4, 132.6, 131.7, 130.5, 128.6, 128.0, 127.3, 124.2, 116.4, 115.9, 108.0, 50.3, 18.3, 18.0; IR (KBr) ν : 3440, 3302, 2983, 1668, 1634, 1582, 1529, 1397, 1010, 792, 662, 619 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₆H₂₅N₆O₂ [M+H]⁺ 453.2034, found 453.2034.

[(2*S*)-2-苯乙酰胺基]-*N*-{甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-噻啉]氨基]苯基}丙酰胺(**7k**): 淡黄色粉末, 产率 75.0%. m.p. 237~238.3 °C; $[\alpha]_D^{25} + 13.6$ (*c* 1, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.96 (s, 1H), 9.26 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.69 (dd, *J*=4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.51 (d, *J*=5.1 Hz, 1H), 8.48~8.43 (m, 1H), 8.39 (d, *J*=7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J*=7.9, 4.9 Hz, 1H), 7.43 (d, *J*=5.2 Hz, 1H), 7.27 (d, *J*=4.4 Hz, 5H), 7.23~7.13 (m, 2H), 4.43 (p, *J*=7.0 Hz, 1H), 3.49 (s, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.31 (d, *J*=4.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 171.5, 70.4, 162.0, 161.5, 159.9, 151.8, 148.6, 138.3, 137.4, 136.8, 134.8, 132.6, 130.6, 129.5, 128.6, 127.5, 126.7, 124.2, 116.4, 115.9, 108.0, 49.5, 42.3, 18.8, 18.0; IR (KBr) ν : 3440, 3303, 2983, 1668, 1634, 1582, 1529, 1387, 1023, 791, 691, 662, 586 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₇H₂₇N₆O₂ [M+H]⁺ 467.2190, found 467.2183.

[(2*S*)-2-对甲苯甲酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-噻啉]氨基]苯基}丙酰胺(**7l**): 淡黄色粉末, 产率 70%. m.p. 240~241.5 °C; $[\alpha]_D^{25} + 14.2$ (*c* 1, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.01 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.66 (d, *J*=4.5 Hz, 1H), 8.52 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 8.46 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.84 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.49 (dd, *J*=7.8, 4.8 Hz, 1H), 7.42 (d, *J*=5.1 Hz, 1H), 7.29 (dd, *J*=14.1, 8.2 Hz, 3H), 7.16 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 4.68~4.55 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.44 (d, *J*=7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 171.8, 166.6, 162.0, 161.5, 159.9, 151.7, 148.6, 141.6, 138.3, 137.5, 134.9, 132.6, 131.6, 130.5, 129.1, 128.0, 127.3, 124.2, 116.4, 115.9, 108.0, 50.3, 21.4, 18.3, 18.0; IR (KBr) ν : 3407, 3286, 3203, 2922, 1691, 1633, 1571, 1490, 1074, 971, 882, 757, 582 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₇H₂₇N₆O₂ [M+H]⁺ 467.2190, found 467.2188.

[(2*S*)-2-苯乙酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-噻

啉[氨基]苯基}缬氨酸(7m): 淡黄色粉末, 产率 75.7%. m.p. 223.5~224 °C; $[\alpha]_D^{25} + 27.6$ (c 0.6, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.04 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.69 (d, $J=3.8$ Hz, 1H), 8.48 (dd, $J=24.4$, 6.5 Hz, 2H), 8.26 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.53~7.39 (m, 2H), 7.28 (d, $J=4.2$ Hz, 5H), 7.22~7.12 (m, 2H), 4.30 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 3.54 (dd, $J=36.9$, 13.8 Hz, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.02 (dd, $J=12.0$, 4.0 Hz, 1H), 0.89 (d, $J=5.9$ Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.7, 170.5, 162.0, 161.5, 159.9, 151.8, 148.6, 138.3, 137.1, 134.8, 132.6, 130.6, 129.4, 128.6, 127.5, 126.7, 124.2, 116.4, 116.0, 108.0, 59.0, 42.4, 31.3, 19.6, 18.9, 18.0; IR (KBr) ν : 3450, 3251, 2970, 2926, 1677, 1642, 1604, 1583, 1444, 1236, 789, 709, 621 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₉H₃₁N₆O₂ [M+H]⁺ 495.2503, found 495.2494

[2-对甲苯甲酰胺基]-*N*-{4-甲基-3-[[4-(3-吡啶)-2-啉[氨基]苯基}甘氨酸(7n): 白色晶体, 产率 73.8%. m.p. 245.5~247 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.00 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.71 (d, $J=29.7$ Hz, 2H), 8.50 (d, $J=12.5$ Hz, 2H), 8.14~7.74 (m, 3H), 7.35 (dd, $J=89.7$, 43.5 Hz, 6H), 4.07 (s, 2H), 2.29 (d, $J=60.4$ Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 168.1, 167.0, 162.1, 161.5, 159.8, 151.7, 148.5, 141.7, 138.3, 137.4, 134.9, 132.6, 131.7, 130.6, 129.3, 127.8, 127.3, 124.3, 116.3, 115.9, 108.0, 43.7, 21.4, 18.0; IR (KBr) ν : 3349, 3279, 3050, 2921, 1706, 1637, 1529, 1494, 1426, 1229, 878, 748, 587 cm⁻¹; HRMS (ESI-MS) calcd for C₂₆H₂₅N₆O₂ [M+H]⁺ 453.2034, found 453.2033.

1.3 抗肿瘤细胞毒活性实验

对合成的 14 个化合物 7a~7n 进行了体外细胞毒活性测试. 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)微量酶反应比色法测定其对人白血病细胞(K562)、人肺癌细胞(A549)、肝癌细胞(HepG-2)体外抑制作用. 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 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个细胞/mL 的悬液. 接种于 96 孔板上, 180 μ L/孔, 置恒温 CO₂ 培养箱中培养 24 h, 换液, 加入受试化合物的 DMSO 溶液, 20 μ L/孔, 再加入含体积分数为 10% 的血清培养液 80 μ L, 培养 48 h, 将 MTT 加入 96 孔板中, 20

μ L/孔, 培养箱中反应 4 h. 吸去上清液, 加入 DMSO, 150 μ L/孔, 平板摇床上振摇 5 min. 用酶联免疫检测仪在波长为 540 nm 处测定每孔的吸光值(OD 值), 计算对细胞增殖的抑制率. 以相应溶媒作阴性对照, 以伊马替尼为阳性对照. 计算抑制率采用公式: 抑制率(%)=(空白吸光度值-给药组吸光度值)/空白吸光度值 $\times$ 100%. 目标化合物体外蛋白酪氨酸激酶抑制活性实验仍在研究中.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 7a~7n 质谱、核磁共振氢谱、碳谱和红外图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Guo, X.-N.; Ding, J. *Chin. J. Med. Chem.* **2003**, *34*, 183 (in Chinese). (郭晓宁, 丁健, 中国新药杂志, **2003**, *34*, 183.)
- [2] Wang, S. H. *J. Leuk. Lymphoma* **2002**, *11*, 29 (in Chinese). (张穗慧, 白血病·淋巴瘤, **2002**, *11*, 29.)
- [3] Guilhot, F.; Chastang, C.; Michallet, M.; Guerci, A.; Harousseau, J. L.; Maloisel, F.; Bouabdallah, R.; Gugotat, D.; Cheron, N.; Nicolini, F.; Abgrail, J. F.; Tanzer, J. N. *Engl. J. Med.* **1997**, *337*, 223..
- [4] Nowell, P. C.; Hungerford, D. A. *Science* **1960**, *132*, 1497.
- [5] Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89*, 1616.
- [6] O'Brien, S. G.; Guilhot, F.; Larson, R. A. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 994.
- [7] Gambacorti Passerini, C. B.; Gunby, R. H.; Piazza, R. J. *Lancet Oncol.* **2003**, *4*, 75.
- [8] Mahon, F. X.; Faberes, C.; Pueyo, S. *Blood* **1998**, *92*, 4059.
- [9] Zheng, Y.-G.; Chen, D.-J.; Zhu, B.-Q. *Chin. J. Med. Chem.* **2009**, *18*, 189 (in Chinese). (郑玉果, 陈代杰, 朱宝泉, 中国新药杂志, **2009**, *18*, 189.)
- [10] Sawyers, C. L.; Hohhasus, A.; Feldman, E.; Goldman, J. M.; Miller, C. B.; Ottmann, O. G.; Schiffer, C. A.; Talpaz, M.; Guilhot, F.; Deininger, M. W. N.; Fischer, T.; O'Brien, S. G.; Stone, R. M. *Blood* **2002**, *99*, 3530.
- [11] Kil, K. E.; Ding, Y. S.; Lin, K. S. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34*, 153.
- [12] Kompella, A. K.; Adibnatla, K. S.; Bhujanga, R. *WO 2006027795*, **2006** [*Chem. Abstr.* **2006**, *144*, 312102].
- [13] Buerger, H. M.; Caravatti, G.; Zimmerman, J. *WO 2002022597*, **2002** [*Chem. Abstr.* **2002**, *136*, 2476057].
- [14] Jur, G. Z.; Wallba, C. H. *US 5521184*, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, *125*, 114681].
- [15] Li, M.-D.; Li, D.; Ji, M. *Chin. Pharm. J.* **2008**, *43*, 228 (in Chinese). (李铭东, 李东, 吉民, 中国药学杂志, **2008**, *43*, 228.)

(Zhao, C.)