

含吡啶环 2,4-二氨基嘧啶类化合物的合成及抗肿瘤活性

黎秋 汪雨 胡孟金 陈鹏 游文玮 赵培亮*

(南方医科大学药学院 广东省新药筛选重点实验室 广州 510515)

摘要 在课题组前期研究的基础上, 设计、合成了 23 个未见文献报道的含吡啶结构单元的 2,4-二氨基嘧啶类化合物, 其结构经 ^1H NMR, ^{13}C NMR 及 HRMS 确认. 并采用噻唑蓝(MTT)法测试了目标化合物对子宫颈癌细胞(HeLa)、乳腺癌细胞(MD-MBA-231)、前列腺癌细胞(PC-3)、人结肠癌细胞(HCT116)的体外抗肿瘤活性. 结果表明, 大部分化合物具有一定的肿瘤抑制活性. 尤其是 2-[5-硝基-2-(6-氯-2-苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-氨基)嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8j**)对 HCT116、MD-MBA-231 的体外肿瘤抑制活性比阳性对照药品 5-氟尿嘧啶分别高出 2.0、0.5 倍, 体现出了较好的进一步研究价值.

关键词 吡啶; 二氨基嘧啶; 合成; 抗肿瘤活性

Synthesis and Biological Activities of Novel 2,4-Diaminopyrimidine Derivatives Bearing Indole Moiety

Li, Qiu Wang, Yu Hu, Mengjin Chen, Peng You, Wenwei Zhao, Peiliang*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Screening, School of Pharmaceutica Science,

Southern Medical University, Guangzhou 510515)

Abstract Based on our previous work, twenty-three novel 2,4-diaminopyrimidine derivatives bearing indole moiety were designed and synthesized. Structures of all compounds were elucidated by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS. Antiproliferative activities for all these compounds were evaluated by the method of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay against four cancer cell lines (HeLa, MD-MBA-231, PC-3 and HCT116), and the results demonstrated that some compounds possessed significant antitumor activities *in vitro*. Particularly, the most promising ethyl 2-((2-benzoyl-5-chloro-1*H*-indol-3-yl)amino)-5-nitropyrimidin-4-ylglycinate (**8j**) displayed 2.0- and 0.5-fold improvement compared to fluorouracil in inhibiting HCT116, and MD-MBA-231 cell proliferation with IC_{50} values of 23.15 and 36.88 $\mu\text{mol/L}$, respectively. These findings suggest that compound **8j** may have potential to be developed as a promising lead for the design of novel anticancer small-molecule drugs.

Keywords indole; pyrimidine; synthesis; antiproliferative activity

2,4-二氨基嘧啶是一类具有广泛生物活性的含氮杂环化合物, 在药物研发和生物学等方面发挥着非常重要的作用^[1,2]. 近年来, 2,4-二氨基嘧啶衍生物的优异抗肿瘤活性更是吸引了许多药物化学研究者的关注^[3,4], 不断有新型的 2,4-二氨基嘧啶类化合物被研究和报道, 多个化合物已处于临床或临床前研究阶段, 更有一些化合物已被成功开发为商品化抗癌药物, 如诺华公司研发并于 2014 年成功上市的用于治疗非小细胞肺癌的色瑞替尼, 以及辉瑞研发的于 2015 年底获得食品药品监督管理局(FDA)上市批准的抗癌药物 Palbociclib, 其作为全球首个 CDK4/6 抑制剂, 被 FDA 授予突破性疗法认定.

因此, 有关 2,4-二氨基嘧啶类化合物的分子设计、合成及抗肿瘤活性的研究是当前抗肿瘤新药创制的热点之一.^[5-12]

为了寻找具有高效抗肿瘤活性的先导化合物, 我们课题组在前期工作中^[13-15], 分别合成并报道了一系列含嘧啶、嘧啶及长链烷酯基取代的 2,4-二氨基-5-硝基嘧啶衍生物, 发现了一批具有良好抗肿瘤活性的化合物. 尤其是烷酯基取代的 2,4-二氨基-5-硝基嘧啶类化合物 **A**, 能抑制多种癌细胞, 且对正常细胞没有明显损伤. 此外, 吡啶及其衍生物也是一类具有广泛生物活性的药效基团, 如抗肿瘤^[16-18]、抗菌^[19]、抗惊厥^[20]、抗炎^[21]

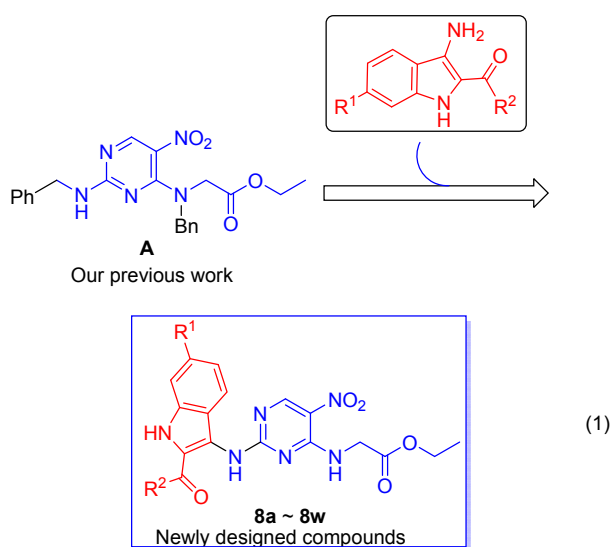
* Corresponding author. E-mail: plzhao@smu.edu.cn

Received November 3, 2016; revised December 19, 2016; published online December 29, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21102069, 21372113), and the Project of Science and Technology New Star in Zhujiang Guangzhou City (No. 2012J2200051).

国家自然科学基金(Nos. 21102069、21372113)、广州市珠江科技新星专项(No. 2012J2200051)资助项目.

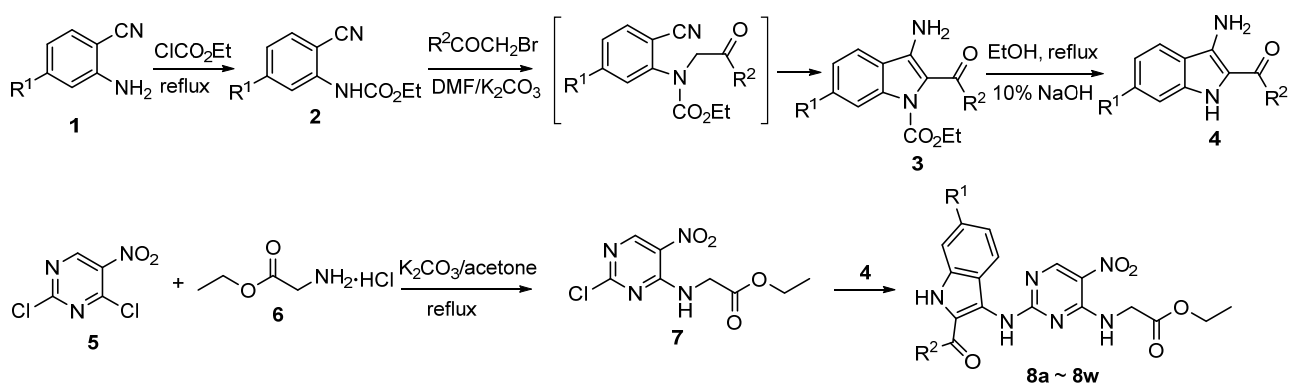
和糖尿病^[22]等,因而备受关注.基于以上考虑,为了进一步丰富 2,4-二氨基-5-硝基嘧啶衍生物的结构类型,深入研究其生物活性及构效关系规律,本文以前期发现的具有较强肿瘤抑制活性的化合物 **A** 为先导结构,依据生物活性叠加原理,将具有广泛生物活性的功能团 3-氨基-2-芳甲酰基吲哚引入到 2,4-二氨基-5-硝基嘧啶衍生物中,设计、合成了 23 个未见文献报道的含吲哚环的 2,4-二氨基嘧啶类化合物(Eq. 1),其结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR 以及 HRMS 的分析确认.目标化合物的合成路线如 Scheme 1 所示.



1 结果与讨论

1.1 合成

文献报道的 3-氨基-1*H*-吲哚类化合物的合成方法



8a: R¹=H, R²=C₆H₅; **8b:** R¹=H, R²=4-BrC₆H₄; **8c:** R¹=H, R²=4-CH₃OC₆H₄; **8d:** R¹=H, R²=4-CF₃C₆H₄; **8e:** R¹=H, R²=4-CH₃C₆H₄; **8f:** R¹=H, R²=4-ClC₆H₄; **8g:** R¹=H, R²=3,4-F₂C₆H₃; **8h:** R¹=H, R²=4-PhC₆H₄; **8i:** R¹=H, R²=3-BrC₆H₄; **8j:** R¹=Cl, R²=C₆H₅; **8k:** R¹=Cl, R²=4-CH₃OC₆H₄; **8l:** R¹=Cl, R²=4-ClC₆H₄; **8m:** R¹=H, R²=2-thienyl; **8n:** R¹=Cl, R²=4-BrC₆H₄; **8o:** R¹=Cl, R²=4-CH₃C₆H₄; **8p:** R¹=Cl, R²=2-thienyl; **8q:** R¹=CH₃, R²=C₆H₅; **8r:** R¹=CH₃, R²=4-BrC₆H₄; **8s:** R¹=CH₃, R²=4-CH₃OC₆H₄; **8t:** R¹=CH₃, R²=4-ClC₆H₄; **8u:** R¹=CH₃, R²=4-CH₃C₆H₄; **8v:** R¹=CH₃, R²=2-thienyl; **8w:** R¹=Cl, R²=C₆H₄C₆H₅

图式 1 目标化合物的合成

Scheme 1 Synthetic routes of the title compounds

较少.本文采用邻氨基苯腈为起始原料,在无溶剂条件下与氯甲酸乙酯进行回流反应 6 h,反应完毕后减压蒸馏除去过量的氯甲酸乙酯,以 93% 的收率得到关键中间体 *N*-(2-氨基苯基)氨基甲酸乙酯.在无水碳酸钾存在下,以无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂,该中间体顺利与 α -溴代芳基乙酮在室温下进行 Thorpe-Ziegler 环化反应高收率地制得了 3-氨基-1-乙酯基-2-苯甲酰基吲哚,最后在乙醇溶剂中,以 10% NaOH 为碱经酰胺水解反应得到一系列 3-氨基-2-取代芳甲酰基-1*H*-吲哚类化合物 **4**.以新炒碳酸钾为缚酸剂,2,4-二氯-5-硝基嘧啶与甘氨酸乙酯盐酸盐在无水乙醇为溶剂中进行亲核取代反应,以 84% 的收率顺利得到的中间体 2-氯-5-硝基-4-取代氨基嘧啶.而后,在乙二醇甲醚溶剂中,中间体 3-氨基吲哚 **4** 和 2-氯-5-硝基-4-取代氨基嘧啶取代缩合,经丙酮重结晶,得目标化合物 **8a~8w**.

1.2 抗肿瘤活性

为了研究目标化合物 **8a~8w** 的抗肿瘤活性,我们将人宫颈癌细胞(Hela)、乳腺癌细胞(MD-MBA-231)、前列腺癌细胞(PC-3)以及人结肠癌细胞(HCT 116)用不同浓度的化合物处理 48 h.细胞存活率由 MTT 实验确定.阳性对照药物为 5-氟尿嘧啶(5-Fu).测试结果如表 1 所示.

从表 1 可见,所合成的化合物对 4 种人肿瘤细胞的体外生长显示出不同的抑制作用.对于人前列腺癌细胞(PC-3),大部分化合物没有表现出显著的肿瘤抑制活性.而对于宫颈癌细胞(Hela),部分化合物(如化合物 **8a**、**8j**、**8m**)表现出了与阳性对照药品 5-氟尿嘧啶相当的抑制活性.对于人乳腺癌细胞(MD-MBA-231),化合物 **8j**

表1 化合物 **8a**~**8w** 对 HeLa、MD-MBA-231、PC-3 和 HCT116 的 IC₅₀ 值(μmol/L)

Table 1 IC₅₀^a (μmol/L) values of target compounds **8a**~**8w** for HeLa, MD-MBA-231, PC-3 and HCT116

Compd.	HeLa	MDA-MB-231	PC-3	HCT 116
8a	70.63	106.80	150.36	70.51
8b	>200	113.80	>200	>200
8c	115.32	>200	>200	87.25
8d	>200	155.2	123.69	76.84
8e	>200	>200	>200	186.34
8f	>200	>200	>200	153.69
8g	108.32	>200	236.15	>200
8h	>200	>200	>200	>200
8i	>200	>200	>200	>200
8j	60.69	36.88	80.69	23.15
8k	>200	>200	>200	>200
8l	>200	>200	>200	>200
8m	60.03	>200	>200	153.72
8n	>200	>200	>200	>200
8o	>200	>200	>200	>200
8p	108.54	103.30	156.32	60.35
8q	116.85	78.06	100.26	53.21
8r	>200	>200	>200	>200
8s	>200	135.81	>200	>200
8t	>200	>200	>200	>200
8u	>200	>200	>200	145.98
8v	93.52	145.69	>200	68.69
8w	>200	>200	>200	>200
5-Fu	57.17	53.47	57.04	68.71

^a IC₅₀ values mean of three experiments in replicate.

体现出了明显优于对照药品的体外肿瘤抑制活性。更值得关注的是, 所合成的大部分目标化合物对人结肠癌细胞(HCT 116)显示了明显的抑制活性, 其中化合物 **8j**、**8p**、**8q**、**8v** 体现了优于 5-氟尿嘧啶的抗肿瘤活性, 而化合物 **8a**、**8c**、**8d** 也显示了与 5-氟尿嘧啶处于同一水平的抑制活性。此外, 比较化合物 **8a** 与 **8b**~**8i** 的对 HeLa、MD-MBA-231、PC-3 和 HCT116 的 IC₅₀ 值可以发现, 当在咪唑环-2 位的苯环(R²)上引入取代基时, 其肿瘤抑制活性均明显降低。而通过分别比较化合物 **8j** 与 **8k**~**8o**、**8q** 与 **8r**~**8u** 也可以得到同样的结论。说明处于咪唑环-2 位的苯环上的取代基对该类化合物的抗肿瘤活性有重要影响。

2 结论

本文设计、合成了 23 个结构新颖的含咪唑结构单元的 2,4-二氨基嘧啶类化合物, 结构均经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 确证。采用 MTT 法测试了目标产物对肿瘤细胞 HeLa、MD-MBA-231、PC-3 和 HCT116 的增殖抑制活性, 结果表明, 部分目标化合物显示了较好的抑制肿瘤细胞增殖活性。尤其是化合物 **8j** 对 HCT116、

MD-MBA-231 的体外肿瘤抑制活性比阳性对照药品 5-氟尿嘧啶分别高出 2.0、0.5 倍, 体现出进一步深入研究的潜力。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点用 Electrothermal 数字熔点仪测定, 温度计未经校正; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 以 DMSO-*d*₆ 为溶剂, MERCURY-PLUS400 型核磁共振仪测定, 内标为 TMS; 高分辨质谱由超高解析度四级杆-飞行时间质谱仪(agilent 6540)测定; 薄层层析硅胶用青岛海洋化工厂有限公司生产的 GF₂₅₄60 型。所有试剂均为分析纯或化学纯, 由进口或国产, 使用前经常规处理。α-溴代芳基乙酮按文献[23]制备。

3.2 中间体的合成

3.2.1 6-取代-3-氨基-1-乙酯基-2-芳甲酰基咪唑(**3**)和 6-取代-3-氨基-2-苯甲酰基-1*H*-咪唑(**4**)的合成

中间体 6-取代-3-氨基-1-乙酯基-2-芳甲酰基咪唑(**3**)和 6-取代-3-氨基-2-苯甲酰基-1*H*-咪唑(**4**)分别参照我们课题组前期发表的文献[24, 14]合成。

3.2.2 2-氯-5-硝基-4-取代氨基嘧啶(**7**)的合成

向 1.92 g (10.0 mmol)的 2,4-二氨基嘧啶、10.0 mmol 的 2-氨基乙酸乙酯盐酸盐和 3.04 g (22.0 mmol)的新炒碳酸钾的 20 mL 无水乙醇溶液中加入 2 滴冰醋酸, 搅拌, 室温反应 5 h, 薄层色谱(TLC)检测。反应完成后减压过滤, 干燥, 柱层析得无色固体, 收率 84%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.36 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃), 4.32 (dd, *J*=7.0, 14.2 Hz, 2H, CH₂), 4.42 (d, *J*=5.2 Hz, 2H, CH₂), 8.78 (br, 1H, NH), 9.11 (s, 1H, ArH); ESI-MS *m/z*: 261.9 [M+1]⁺。

3.3 目标化合物 **8a**~**8w** 的合成

向 100 mL 单颈圆底烧瓶中, 加入 0.256 g (1 mmol) 中间体 **4** 和 0.26 g (1 mmol) 中间体 **7** 及 30 mL 乙二醇甲醚, 加热至 60 °C, 搅拌, TLC 监测。反应完成后, 缓慢倾入水中, 用乙酸乙酯萃取, 干燥, 减压蒸除溶剂, 丙酮重结晶, 得目标化合物 **8a**~**8w**。

2-[5-硝基-2-(2-苯甲酰基-1*H*-咪唑-3-氨基)嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8a**): 黄色固体, 收率 85.3%。m.p. 212.3~214.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.93 (s, 3H, OCH₂CH₃), 3.71~3.74 (m, 2H, OCH₂CH₃), 3.88 (s, 2H, NHCH₂CO₂), 7.07 (t, *J*=8.0 Hz, 1H, ArH), 7.30~7.34 (m, 3H, ArH), 7.47~7.53 (m, 3H, ArH), 7.66 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, ArH), 8.76 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.86 (t, *J*=6.0 Hz, 1H, NHCH₂CO₂), 10.07 (s, 1H, NH), 11.80 (s, 1H,

NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 188.0, 169.4, 161.0, 157.7, 155.5, 138.3, 136.1, 132.6, 129.1, 128.3, 125.9, 123.6, 121.2, 120.8, 120.3, 118.9, 113.1, 60.7, 42.3, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_5$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 461.1495, found 461.1853.

2-[5-硝基-2-(2-对溴苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-胺基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8b**): 黄色固体, 收率 57.1%. m.p. 198.5~201.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.93 (s, 3H, OCH_2CH_3), 3.71~3.74 (m, 2H, OCH_2CH_3), 3.86 (s, 2H, NHCH_2), 7.08 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.33 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.48 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.55 (dd, $J=16.0, 8.0$ Hz, 5H, ArH), 8.81 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.89 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 10.07 (s, 1H, NH), 11.84 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 186.9, 170.7, 169.4, 157.7, 155.5, 137.4, 136.2, 131.4, 131.0, 130.9, 127.3, 126.3, 126.1, 121.0, 121.3, 120.4, 113.1, 60.3, 42.3, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{BrN}_6\text{O}_5$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 540.3382, found 541.0727.

2-[5-硝基-2-(2-对甲氧基苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-胺基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8c**): 产率 83.4%. m.p. 206~208.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.93 (s, 3H, OCH_2CH_3), 3.78 (s, 5H, OCH_2CH_3 , OCH_3), 3.88 (s, 2H, NHCH_2CO_2), 6.87 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.07 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.29~7.52 (m, 3H, ArH), 7.69 (d, $J=12.0$ Hz, 2H, ArH), 8.82 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.88 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 10.08 (s, 1H, NH), 11.74 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 186.7, 169.4, 163.0, 160.9, 157.7, 155.5, 135.8, 131.6, 130.9, 125.5, 123.6, 121.1, 120.2, 113.7, 113.0, 60.7, 55.9, 42.3, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_6$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 491.14681, found 491.1944.

2-[5-硝基-2-(2-对三氟甲基苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-胺基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8d**): 黄色固体, 收率 49.1%. m.p. 201.7~204.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.93 (s, 3H, OCH_2CH_3), 3.74 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.86 (s, 2H, NHCH_2CO_2), 7.09 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.35 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.52 (dd, $J=8.0, 24.0$ Hz, 2H, ArH), 7.67 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.79 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.72 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.88 (s, 1H, NHCH_2CO_2), 10.05 (s, 1H, NH), 11.91 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 186.9, 169.4, 161.2, 157.7, 155.4, 142.0, 136.5, 131.6, 129.6, 127.2, 126.5, 125.5, 125.2, 123.7, 122.8, 121.3, 120.5, 113.2, 60.8, 42.3, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_5$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 529.1369 found 529.1661.

2-[5-硝基-2-(2-对甲基苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-胺基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8e**): 黄色固体, 收率 84.0%. m.p. 225.1~226.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.89 (s, 3H, OCH_2CH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3), 3.74 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.87 (s, 2H, NHCH_2CO_2), 7.07 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.15 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.31 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd, $J=8.0, 16.0$ Hz, 2H, ArH), 7.59 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.80 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.87 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 10.05 (s, 1H, NH), 11.76 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 187.7, 169.4, 161.0, 157.7, 155.5, 142.9, 136.0, 135.7, 129.4, 128.9, 125.7, 121.1, 120.2, 113.1, 60.7, 42.3, 21.5, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_5$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 475.1652 found 475.1923.

2-[5-硝基-2-(2-对氯苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-胺基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8f**): 黄色固体, 收率 70.1%. m.p. 229.1~230.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.90 (s, 3H, OCH_2CH_3), 3.75 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.87 (s, 2H, NHCH_2CO_2), 7.08 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.33 (dd, $J=6.0, 10.0$ Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.51 (dd, $J=8.0, 16.0$ Hz, 2H, ArH), 7.66 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.81 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.88 (t, $J=6.0$ Hz, NHCH_2CO_2), 10.07 (s, 1H, NH), 11.84 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 186.7, 169.4, 161.1, 157.7, 155.5, 137.3, 137.1, 136.3, 130.9, 128.4, 127.3, 126.1, 123.6, 121.3, 121.1, 120.4, 119.3, 113.1, 60.8, 42.3, 14.2. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{ClN}_6\text{O}_5$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 495.1105, found 495.1356.

2-[5-硝基-2-[2-(3,4-二氟苯甲酰基)-1*H*-吡啶-3-胺基]嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8g**): 黄色固体, 收率 80.1%. m.p. 212.6~213.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.95 (s, 3H, OCH_2CH_3), 3.75 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.86 (s, 2H, NHCH_2), 7.09 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.32~7.55 (m, 5H, ArH), 7.61~7.66 (m, 1H, ArH), 8.84 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.90 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 10.10 (s, 1H, NH), 11.88 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 185.4, 169.3, 161.2, 157.8, 155.5, 153.3, 150.9, 148.2, 136.4, 135.8, 127.1, 126.6, 126.3, 123.6, 121.3, 120.5, 118.4, 118.3, 117.7, 117.6, 113.2, 60.8, 42.3, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_5$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 497.1307, found 497.1705.

2-[5-硝基-2-(2-对苯基苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-胺基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8h**): 黄色固体, 收率 70.2%. m.p. 205.5~207.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.90 (s, 3H, OCH_2CH_3), 3.77 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.90 (s, 2H,

NHCH₂), 7.09 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.34 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, ArH), 7.42 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, ArH), 7.41~7.56 (m, 4H, ArH), 7.63 (t, $J=6.0$ Hz, 4H, ArH), 7.76 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.75 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.88 (s, 1H, NHCH₂CO₂), 10.12 (s, 1H, NH), 11.83 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 187.5, 169.4, 161.1, 157.6, 155.5, 144.1, 139.5, 137.2, 136.1, 129.9, 129.5, 128.6, 127.2, 126.6, 125.9, 121.3, 120.3, 119.1, 113.1, 60.8, 42.3, 14.1. HRMS (ESI) calcd for C₂₉H₂₅N₆O₅ (M+H⁺) 537.1808, found 537.2066.

2-[5-硝基-2-(2-间溴苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-氨基)嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8i**): 黄色固体, 收率 69.6%. m.p. 200.2~202.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.93 (s, 3H, OCH₂CH₃), 3.73 (s, 2H, OCH₂CH₃), 3.86 (s, 2H, NHCH₂), 7.08 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, ArH), 7.29~7.35 (m, 2H, ArH), 7.49 (t, $J=10.1$ Hz, 2H, ArH), 7.62~7.70 (m, 3H, ArH), 8.81 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.91 (s, 1H, NHCH₂CO₂), 10.04 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 186.4, 169.3, 161.1, 157.9, 155.6, 140.5, 136.4, 135.0, 131.5, 130.6, 127.9, 127.1, 126.3, 121.5, 121.4, 120.4, 119.7, 113.2, 60.7, 42.3, 14.1. HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₀BrN₆O₅ (M+H⁺) 540.3382, found 541.0790.

2-[5-硝基-2-(6-氯-2-苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-氨基)嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8j**): 黄色固体, 收率 64.1%. m.p. 239.8~242.6 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.93 (s, 3H, OCH₂CH₃), 3.74 (s, 2H, OCH₂CH₃), 3.87 (s, 2H, NHCH₂), 7.09 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.33 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.53 (dd, $J=10.0, 14.0$ Hz, 3H, ArH), 7.65 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.78 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.89 (s, 1H, NHCH₂CO₂), 10.07 (s, 1H, NH), 11.95 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 187.9, 169.3, 161.0, 157.8, 155.5, 138.0, 136.2, 132.8, 130.4, 129.1, 128.4, 128.3, 123.0, 122.4, 120.9, 119.0, 122.1, 60.7, 42.4, 14.1. HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₀ClN₆O₅ (M+H⁺) 495.1105, found 495.1355.

2-[5-硝基-2-(6-氯-2-对甲氧基苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-氨基)嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8k**): 黄色固体, 收率 75.3%. m.p. 234.5~236.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.93 (s, 3H, OCH₂CH₃), 3.77 (s, 5H, OCH₂CH₃, OCH₃), 3.87 (s, 2H, NHCH₂), 6.86 (d, $J=8.0$, 2H, ArH), 7.08 (t, $J=4.0$ Hz, 1H, ArH), 7.48~7.54 (m, 2H, ArH), 7.67 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.82 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.89 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, NHCH₂CO₂), 10.06 (s, 1H, NH), 11.89 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz,

DMSO-*d*₆) δ : 186.5, 169.4, 163.1, 161.0, 157.8, 155.5, 136.0, 131.6, 130.6, 130.0, 128.5, 122.9, 120.2, 118.3, 113.7, 112.3, 60.7, 58.4, 42.3, 14.1. HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₂ClN₆O₆ (M+H⁺) 525.1211, found 525.1398.

2-[5-硝基-2-(6-氯-2-对氯苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-氨基)嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8l**): 产率 73.1%. m.p. 266.7~268.9 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.93 (d, 3H, OCH₂CH₃), 3.74 (s, 2H, OCH₂CH₃), 3.86 (s, 2H, NHCH₂), 7.10 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.49 (s, 1H, ArH), 7.55 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.62~7.65 (m, 2H, ArH), 8.82 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.91 (t, $J=6.0$ Hz, NHCH₂CO₂), 10.07 (s, 1H, NH), 11.98 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 186.6, 169.3, 161.0, 157.8, 155.5, 137.5, 136.8, 136.4, 130.9, 130.7, 128.5, 128.1, 123.1, 121.0, 119.4, 112.5, 60.8, 42.4, 14.1. HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₁₉Cl₂N₆O₅ (M+H⁺) 529.0716, found 529.0816.

2-[5-硝基-2-[2-(2-噻吩甲酰基)-1*H*-吡啶-3-氨基]嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8m**): 黄色固体. 收率 69.9%. m.p. 222.2~224.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.92 (s, 3H, OCH₂CH₃), 3.74 (s, 2H, OCH₂CH₃), 3.89 (s, 2H, NHCH₂), 7.06~7.13 (m, 2H, ArH), 7.32 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.56 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.72 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, ArH), 7.95~7.97 (m, 1H, ArH), 8.87 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.89 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, NHCH₂CO₂), 10.25 (s, 1H, NH), 11.80 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 179.5, 169.4, 160.9, 157.9, 155.6, 143.6, 135.8, 135.0, 133.9, 128.6, 127.3, 125.7, 123.4, 121.3, 120.3, 118.3, 113.1, 60.7, 58.4, 42.4, 14.4. HRMS (ESI) calcd for C₂₁H₁₉N₆O₅S (M+H⁺) 467.1059, found 467.1063.

2-[5-硝基-2-(6-氯-2-对溴苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-氨基)嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8n**): 黄色固体, 收率 60.2%. m.p. 201.6~203.7 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.90 (d, 3H, OCH₂CH₃), 3.75 (s, 2H, OCH₂CH₃), 3.86 (s, 2H, NHCH₂), 7.10 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.50 (s, 1H, ArH), 7.55 (dd, $J=8.0, 12.0$ Hz, 5H, ArH), 8.83 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.91 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, NHCH₂CO₂), 10.07 (s, 1H, NH), 11.99 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 186.8, 169.3, 161.0, 157.8, 155.5, 137.1, 136.4, 131.4, 131.0, 130.7, 127.9, 127.7, 126.6, 123.1, 121.0, 119.2, 112.5, 60.9, 42.3, 14.1. HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₁₉BrClN₆O₅ (M+H⁺) 574.7832, found 575.0325.

2-[5-硝基-2-(6-氯-2-对甲苯甲酰基-1*H*-吡啶-3-氨基)嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8o**): 黄色固体, 收率 50.8%.

m.p. 276.8~278.4 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.87~0.89 (m, 3H, OCH_2CH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3), 3.74 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.87 (s, 2H, NHCH_2), 7.09 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.49~7.59 (m, 4H, ArH), 7.57 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.82 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.90 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 10.05 (s, 1H, NH), 11.95 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 187.5, 169.3, 160.9, 157.7, 155.5, 143.2, 136.1, 135.4, 132.1, 130.2, 129.4, 129.0, 123.0, 120.8, 112.4, 60.7, 42.3, 21.5, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{ClN}_6\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 509.1262, found 509.1291.

2-[5-硝基-2-[6-氯-2-(2-噻吩甲酰基)-1H-吡啶-3-氨基]嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8p**): 黄色固体, 收率 42.6%. m.p. 287.3~289.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.89 (s, 3H, OCH_2CH_3), 3.74 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.89 (s, 2H, NHCH_2), 7.09~7.14 (m, 2H, ArH), 7.49 (s, $J=1.6$ Hz, 1H, ArH), 7.58 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, ArH), 7.70 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, ArH), 7.99 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, ArH), 8.90 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.92 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 10.27 (s, 1H, NH), 11.96 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 179.3, 169.4, 160.9, 157.9, 155.7, 143.3, 135.8, 135.0, 133.9, 128.6, 127.3, 125.7, 123.3, 121.6, 120.3, 118.3, 113.1, 60.7, 42.4, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{ClN}_6\text{O}_5\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 501.0690, found 501.0846.

2-[5-硝基-2-(6-甲基-2-苯甲酰基-1H-吡啶-3-氨基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8q**): 黄色固体, 收率 76.3%. m.p. 231.9~233.6 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.95 (s, 3H, OCH_2CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.90 (s, 2H, NHCH_2CO), 6.91 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.32 (t, $J=16.0$ Hz, 2H, ArH), 7.40 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.48 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.65 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.77 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.87 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 10.02 (s, 1H, NH), 11.65 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 187.9, 169.4, 161.0, 157.8, 155.5, 138.5, 136.7, 135.5, 132.8, 129.1, 128.4, 127.0, 123.0, 122.4, 120.9, 119.0, 122.1, 60.7, 42.4, 22.1, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 475.1652, found 475.1984.

2-[5-硝基-2-(6-甲基-2-对溴苯甲酰基-1H-吡啶-3-氨基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8r**): 黄色固体, 收率 76.8%. m.p. 243.1~245.4 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.95 (s, 3H, OCH_2CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.88 (s, 2H, NHCH_2CO_2), 6.92 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.40 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.54

(dd, $J=8.0$, 16.0 Hz, 4H, ArH), 8.81 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.88 (t, $J=12.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 10.00 (s, 1H, NH), 11.69 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 186.7, 169.4, 161.0, 157.7, 155.5, 137.6, 136.8, 135.9, 131.3, 130.9, 126.2, 122.6, 121.1, 112.5, 60.8, 42.3, 22.1, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{BrN}_6\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 554.3647, found 555.0932.

2-[5-硝基-2-(6-甲基-2-对甲氧基苯甲酰基-1H-吡啶-3-胺基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8s**): 黄色固体, 收率 81.2%. m.p. 245.25~247.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.95 (s, 3H, OCH_2CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 5H, OCH_2CH_3 , OCH_3), 3.90 (s, 2H, NHCH_2CO_2), 6.88 (dd, $J=8.0$, 16.0 Hz, 3H, ArH), 7.25 (s, 1H, ArH), 7.39 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.67 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.82 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.87 (m, 1H, NHCH_2CO_2), 10.02 (s, 1H, NH), 11.59 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 186.6, 169.4, 162.9, 161.0, 157.7, 155.5, 136.4, 135.1, 131.6, 131.0, 127.3, 122.3, 121.6, 120.2, 118.3, 113.7, 112.3, 60.7, 58.4, 42.3, 22.0, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 505.1757, found 505.1961.

2-[5-硝基-2-(6-甲基-2-对氯苯甲酰基-1H-吡啶-3-胺基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8t**): 黄色固体, 收率 76.8%. m.p. 243.1~245.4 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.96 (m, 3H, OCH_2CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 3.78 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.88 (s, 2H, NHCH_2CO_2), 6.92 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.39 (t, $J=8.0$ Hz, 3H, ArH), 7.63 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.81 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.88 (t, $J=12.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 9.99 (s, 1H, NH), 11.68 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 186.5, 169.4, 161.0, 157.7, 155.5, 152.5, 137.6, 136.8, 135.9, 131.3, 130.9, 126.9, 126.2, 122.6, 121.1, 119.6, 112.5, 60.8, 42.3, 22.1, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{ClN}_6\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 509.1262, found 509.1465.

2-[5-硝基-2-(6-甲基-2-对甲基苯甲酰基-1H-吡啶-3-胺基)嘧啶-4-胺基]乙酸乙酯(**8u**): 黄色固体, 收率 72.9%. m.p. 250.5~253.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.95 (s, 3H, OCH_2CH_3), 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.89 (s, 2H, NHCH_2CO_2), 6.91 (d, $J=8.0$ Hz, 3H, ArH), 7.14 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.39 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.57 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.80 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.87 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, NHCH_2CO_2), 9.99 (s, 1H, NH), 11.60 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz,

DMSO- d_6) δ : 187.5, 169.4, 161.0, 157.7, 155.5, 136.4, 135.1, 131.6, 131.0, 127.3, 122.3, 121.6, 120.2, 118.3, 113.7, 112.3, 60.7, 42.3, 22.1, 21.5, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $C_{25}H_{25}N_6O_5$ ($M+H^+$) 489.4595, found 490.2015.

2-[5-硝基-2-[6-甲基-2-(2-噻吩甲酰基)-1*H*-吡啶-3-氨基]嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8v**): 黄色固体, 收率 50.3%. m.p. 228.4~230.3 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.96 (s, 3H, OCH_2CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.78 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.92 (s, 2H, $NHCH_2CO_2$), 6.92 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.12 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.45 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.70 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, ArH), 7.95 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.88 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.90 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, $NHCH_2CO_2$), 10.20 (s, 1H, NH), 11.64 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 179.0, 169.4, 161.8, 157.9, 155.6, 143.7, 136.5, 135.4, 134.8, 133.6, 128.6, 127.3, 125.7, 123.3, 121.6, 120.3, 118.3, 113.1, 60.7, 42.4, 22.0, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $C_{22}H_{21}N_6O_5S$ ($M+H^+$) 481.1216, found 481.1580.

2-[5-硝基-2-(6-甲基-2-对苯基苯甲酰基)-1*H*-吡啶-3-氨基]嘧啶-4-氨基]乙酸乙酯(**8w**): 黄色固体, 收率 60.2%. m.p. 205.5~207.5 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.95 (s, 3H, OCH_2CH_3), 3.77 (s, 2H, OCH_2CH_3), 3.90 (s, 2H, $NHCH_2CO_2$), 7.10 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.41~7.61 (m, 5H, ArH), 7.63 (t, $J=12.0$, 4H, ArH), 7.75 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.77 (s, 1H, Pyrimidine-H), 8.92 (s, 1H, $NHCH_2CO_2$), 10.13 (s, 1H, NH), 11.98 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 187.3, 169.3, 161.0, 157.7, 155.5, 144.3, 139.5, 136.9, 136.3, 130.5, 129.9, 129.5, 128.6, 127.2, 126.6, 123.1, 122.4, 120.9, 119.2, 112.4, 60.8, 42.4, 14.1. HRMS (ESI) calcd for $C_{29}H_{24}ClN_6O_5$ ($M+H^+$) 571.9831, found 571.1446.

3.4 体外抗肿瘤活性测试

用噻唑蓝(MTT)比色法测试了化合物的体外抗肿瘤活性. 收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度, 以 20000~25000 个/mL 接种于 96 孔板, 孵育 12~24 h. 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的药物, 设置 3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100 $\mu g/mL$ 共 6 个浓度梯度, 每个浓度 4 个副孔. 37 °C、5% CO_2 培养箱, 开始计时培养. 在加药 48 h 后取出 96 孔板, 每孔加入 20 μL 的 5 mg/mL MTT 溶液, 37 °C 继续培养 4 h. 然后, 小心吸弃孔内上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 10 min, 使结晶物溶解. 选择 570 nm 波长在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值(OD 值). 按下式计算抑制率, 抑制率(%)=(1—

加药组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$. 用 GraphPad Prism5 软件计算半数抑制量 IC_{50} .

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **8a**~**8w** 的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Peasland, A.; Wang, L. Z.; Rowling, E.; Kyle, S.; Chen, T.; Hopkins, A.; Cliby, W. A.; Sarkaria, J.; Beale, G.; Edmondson, R. J.; Curtin, N. J. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 372.
- [2] Boschi, D.; Tosco, P.; Chandra, N.; Chaurasia, S.; Fruttero, R.; Griffin, R.; Wang, L. Z.; Gasco, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 333.
- [3] Argade, A.; Bhamidipati, S.; Li, H.; Carroll, D.; Clough, J.; Keim, H.; Sylvain, C.; Rossi, A. B.; Coquilla, C.; Issakani, S. D.; Masuda, E. S.; Payan, D. G.; Singh, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2117.
- [4] Daniels, T. R.; Leuchter, R. K.; Quintero, R.; Helguera, G.; Rodríguez, J. A.; Martínez-Maza, O.; Schultes, B. C.; Nicodemus, C. F.; Penichet, M. L. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, *61*, 991.
- [5] Seganish, W. M.; McElroy, W. T.; Herr, R. J.; Brumfield, S.; Greenlee, W. J.; Harding, J.; Komanduri, V.; Matasi, J.; Prakash, K. C.; Tulshian, D.; Yang, J.; Yet, L.; Devito, K.; Fossetta, J.; Garlisi, C. G.; Lundell, D.; Niu, X.; Sondey, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3203.
- [6] Robinson, S. J.; Petzer, J. P.; Terre'Blanche, G.; Petzer, A.; Walt, M. M.; Bergh, J. J.; Lourens, A. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *104*, 177.
- [7] Liu, Z.; Ai, J.; Peng, X.; Song, Z.; Wu, K.; Zhang, J.; Yao, Q.; Chen, Y.; Ji, Y.; Yang, Y.; Geng, M.; Zhang, A. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 304.
- [8] Lange, A.; Günther, M.; Büttner, F. M.; Zimmermann, M. O.; Heidrich, J.; Hennig, S.; Zahn, S.; Schall, C.; Sievers-Engler, A.; Ansideri, F.; Koch, P.; Laemmerhofer, M.; Stehle, T.; Laufer, S. A.; Boeckler, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14640.
- [9] Hanan, E. J.; Eigenbrot, C.; Bryan, M. C.; Burdick, D. J.; Chan, B. K.; Chen, Y.; Dotson, J.; Heald, R. A.; Jackson, P. S.; La, H.; Lainchbury, M. D.; Malek, S.; Purkey, H. E.; Schaefer, G.; Schmidt, S.; Seward, E. M.; Sideris, S.; Tam, C.; Wang, S.; Yeap, S. K.; Yen, I.; Yin, J.; Yu, C.; Zilberley, I.; Heffron, T. P. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10176.
- [10] Lawrence, H. R.; Mahajan, K.; Luo, Y.; Zhang, D.; Tindall, N.; Huseyin, M.; Gevariya, H.; Kazi, S.; Ozcan, S.; Mahajan, N. P.; Lawrence, N. J. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2746.
- [11] Alexander, L. T.; Moebitz, H.; Drueckes, P.; Savitsky, P.; Fedorov, O.; Elkins, J. M.; Deane, C. M.; Cowan-Jacob, S. M.; Knapp, S. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2116.
- [12] Deng, L. Q.; Zhong, H.; Wang, S. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, *34*, 414 (in Chinese). (邓兰青, 钟宏, 王帅, 有机化学, **2014**, *34*, 414.)
- [13] Ma, W. F.; Yang, H. K.; Hu, M. J.; Li, Q.; Ma, T. Z.; Zhou, Z. Z.; Liu, R. Y.; You, W. W.; Zhao, P. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84*, 127.
- [14] Hu, M. J.; Zhang, B.; Yang, H. K.; Liu, Y.; Chen, Y. R.; Ma, T. Z.; Lu, L.; You, W. W.; Zhao, P. L. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *86*, 1491.
- [15] Zhao, P. L.; Li, Y. H.; Yang, H. K.; Chen, P.; Zhang, B.; Sun, Q.; Li, Q.; You, W. W. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *118*, 161.
- [16] Esmaeliani, B.; Benkendorff, K.; Johnston, M. R.; Abbott, C. A.

- Mar. Drugs* **2013**, *10*, 3802.
- [17] Ma, H. G.; Wang, L. P.; Xu, Z. H.; Zhang, Y. P.; Li, X.; Zhu, W. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 1839 (in Chinese). (马红光, 王立平, 徐志红, 张亚鹏, 李霞, 朱伟明, 有机化学, **2016**, *36*, 1839.)
- [18] Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Salvador, M. K.; Prencipe, F.; Lopez-Cara, C.; Ortega, S. S.; Brancale, A.; Hamel, E.; Castagliuolo, I.; Mitola, S.; Ronca, R.; Bortolozzi, R.; Porcu, E.; Basso, G.; Viola, G. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3209.
- [19] Ma, H. L.; Yan, X. J.; Xiao, Y. M.; Yuan, D. K.; Zhang, Z. H.; Fu, B.; Yuan, H. Z. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 158 (in Chinese). (麻红利, 闫晓静, 肖玉梅, 袁德凯, 张振华, 傅滨, 袁会珠, 有机化学, **2016**, *36*, 158.)
- [20] Rohini, R. M.; Manjunath, M. *Pharma Chem.* **2012**, *6*, 2438.
- [21] Guerra, A. S.; Malta, D. J.; Laranjeira, L. P.; Maia, M. B.; Colaço, N. C.; de Lima Mdo, C.; Galdino, S. L.; Pitta Ida, R.; Gonçalves-Silva, T. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 1816.
- [22] Mei, W. W.; Guo, Y. W.; Li, J.; Cai, M. Y.; Ma, W. Q.; Gong, J. X.; Wang, X. D. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 533 (in Chinese). (梅雯雯, 郭跃伟, 李佳, 蔡妹艺, 马文泉, 龚景旭, 王学东, 有机化学, **2016**, *36*, 533.)
- [23] Silveira, C. C.; Bernardi, C. R.; Braga, A. L.; Kaufman, T. S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *51*, 8947.
- [24] Yang, H. K.; You, W. W.; Yan, G. H.; Jiang, Z. H.; Zhao, P. L.; Zhou, Z. Z. *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 1165.

(Li, L.; Lu, Z.)