

吡唑并[1,5-*a*]嘧啶类 c-Met 激酶抑制剂的合成及生物活性研究

倪春燕 张虞婷 赵育* 朱俐

(南通大学航海医学研究所 南通 226001)

摘要 设计并合成了 5,6-二甲基-7-(2-氟-4-氨基苯氧基)吡唑并[1,5-*a*]嘧啶类 c-Met 激酶抑制剂. 以 3-氨基吡唑和 2-甲基-乙酰乙酸乙酯为起始原料, 经 5 步反应合成了 11 个未见文献报道的吡唑并[1,5-*a*]嘧啶类衍生物, 通过氢谱、碳谱、高分辨质谱等方法对所合成的化合物进行了结构表征. 采用噻唑蓝法(MTT)的方法和酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测部分新化合物的生物活性.

关键词 吡唑并嘧啶; 合成; c-Met 抑制剂; 抗肿瘤

Synthesis and Bioactivity of Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine Derivatives as Novel c-Met Inhibitors

Ni, Chunyan Zhang, Yuting Zhao, Yu* Zhu, Li

(Institute of Nautical Medicine, Nantong University, Nantong 226001)

Abstract Eleven pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines were synthesized via a five-step procedure starting from 3-aminopyrazole. The structures were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS techniques. Their antiproliferative activities against A549 cell line were investigated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Their c-Met kinase inhibitory abilities were evaluated by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Keywords pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine; synthesis; c-Met inhibitor; anticancer

癌症是一种严重危害人类生命与健康的疾病, 其危害性仅次于心血管疾病. 现已知肝细胞生长因子(HGF)/c-Met 信号通路在原发性肿瘤的形成及继发转移中起着至关重要的作用^[1,2]. 阻断 HGF/Met 信号途径可以有效抑制肿瘤细胞生长、侵袭和转移^[3~8]. HGF/Met 已被国际公认为抗肿瘤的靶标. 基于 c-Met 信号通路的抗肿瘤药物研究进入一个全新的阶段, 特别是小分子 c-Met 激酶抑制剂已经成为整个抗肿瘤药物研究的重点和热点. 近年来已有多个 c-Met 小分子抑制剂进入临床研究, 如 SU11274^[9], MK-8033^[10], AMG-458^[11]等.

在新型的 c-Met 抑制剂中, 日本 Kirin 公司的喹啉基酰基硫脲类化合物引起许多药学家的重视^[12,13], 这类化合物的类似物^[14~16]的合成很快成为 c-Met 抑制剂的研究热点. 研究者在此基础上进行结构改造, 得到多个系列类似物(见图 1), 具有 IC_{50} 值 2-110 nmol/L 的 c-Met 激酶抑制活性.

通过文献调研分析, 我们得到了这一类 c-Met 激酶抑制剂的初步构效关系(图2). 铰链连接基团喹啉环可以用六元芳香环或五元芳香/非芳香环的稠环母核结构来代替, 醚键对位必须是 N, 以作为氢键受体形成氢键, 与腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)结合位点结合, 同时该部分可以引入亲水性侧链与核糖结合位点结合; 邻氟苯胺上的氨基酰基与 ATP 结合位点形成两个氢键结合, 为必需基团, 对氟苯基部分为疏水结构, 与疏水结合位点结合.

我们设计采用具有多种生物活性的化学优势结构基团吡唑并嘧啶来代替喹啉基酰基硫脲的喹啉结构合成酰胺类衍生物. 首先以 3-氨基吡唑和 2-甲基-乙酰乙酸乙酯为起始原料, 合成 5,6-二甲基-7-羟基吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(7), 再经氯代、缩合、还原后得到 5,6-二甲基-7-(2-氟-4-氨基苯氧基)吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(10)母核.

* E-mail: zhaoyoo@163.com

Received July 12, 2012; revised August 21, 2012; published online August 27, 2012.

Project supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2011390) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

江苏省自然科学基金(No. BK2011390)和江苏省高校优势学科资助项目.

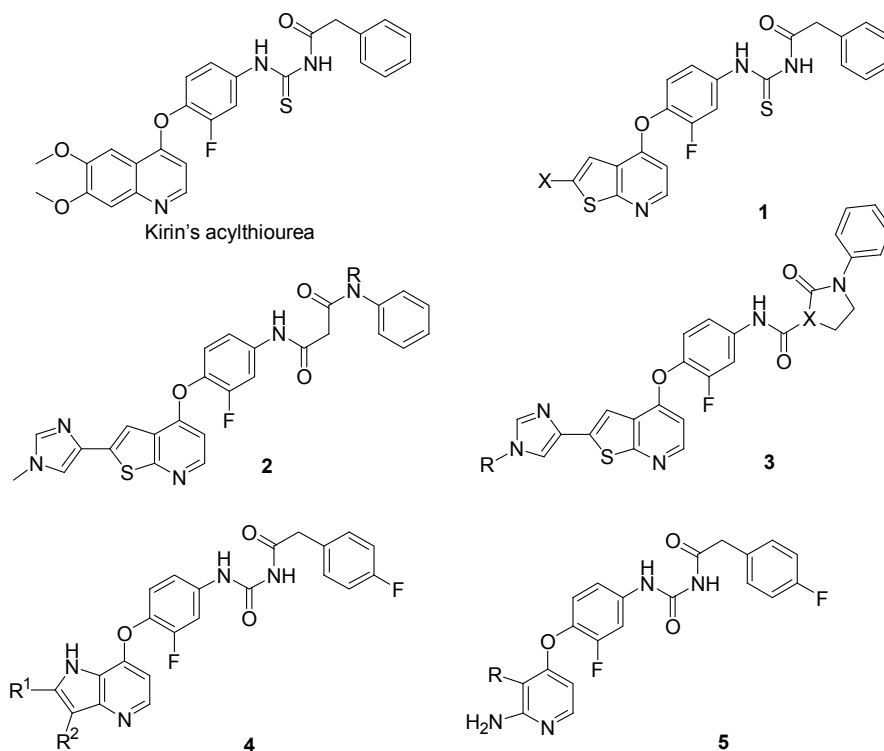


图1 Kirin' acylthiourea 与系列 1~5 类似物
Figure 1 Kirin' acylthiourea and analogues of series 1~5

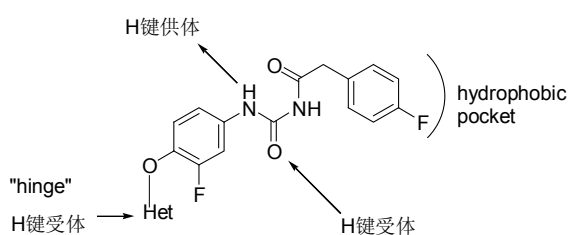


图2 构效关系分析
Figure 2 Structure-activity relationship

化合物 **10** 与相应的酸进行反应得到酰胺类吡唑并[1,5-*a*]嘧啶类似物 **11a~11k**。目标化合物的结构经核磁共振氢谱、碳谱和质谱确证。合成路线如图 3 所示。

1 结果与讨论

1.1 化学合成

我们的目标产物是吡唑并嘧啶酰胺类化合物。它是采用吡唑并嘧啶来代替喹啉基酰基硫脲的喹啉化合物而合成的。

首先以 3-氨基吡唑和 2-甲基-乙酰乙酸乙酯为起始原料, 合成 5,6-二甲基-7-羟基吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(**7**), 再在 *N,N'*-二甲苯胺、氧氯化磷存在下发生氯代生成化合物 **8**, **8** 与 2-氟对硝基苯酚在氯苯存在下发生缩合得到醚 **9**, 再经连二亚硫酸钠还原后得到母核部分 5,6-二甲基-7-(2-氟-4-氨基苯氧基)吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(**10**), 产率为

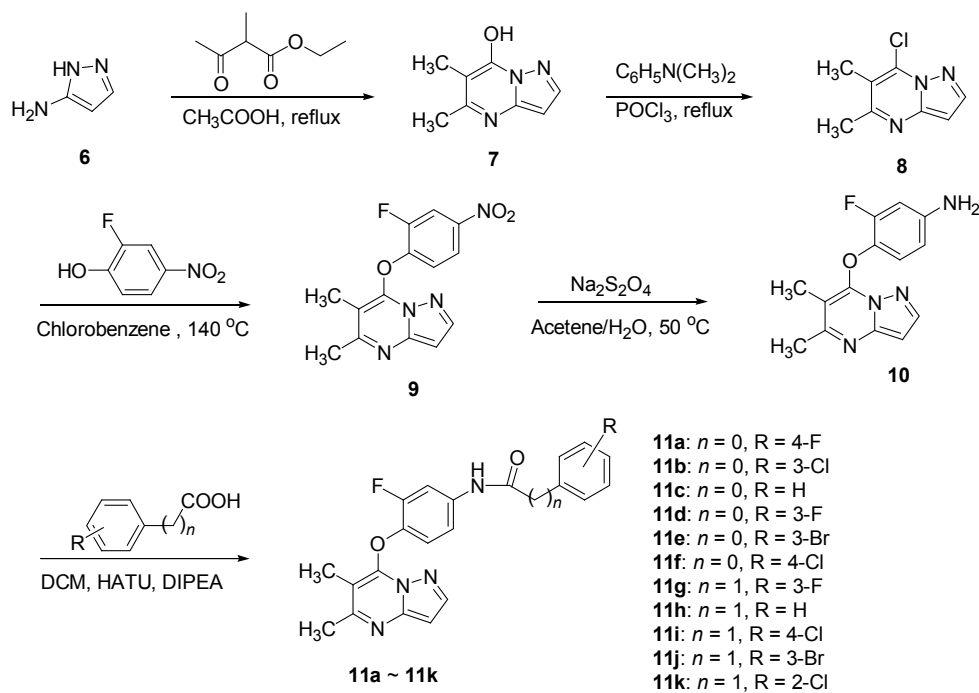
21%。吡唑并嘧啶酰胺类化合物就是由氨基化合物 **10** 和相应的酸发生缩合生成的, 而缩合剂的不同是影响化合物产率的重要因素。常用的缩合剂有 *N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC), 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI), 2-(7-偶氮苯并三唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脒六氟磷酸酯(HATU)等。本实验也采用这几种常用的缩合剂进行缩合反应的探索, 结果见表1。

表1 不同催化剂对反应的影响

Table 1 Effect of different catalysts on the yields

序号	反应条件	产率
1	DCC, DMAP, DCM, r.t.	30%~40%
2	EDCI, DMAP, DCM, r.t.	未反应
3	HATU, DCM, r.t.	40%

使用 DCC 或者 HATU 缩合剂, 经检测为同一化合物, 产率均为 30%~40%。但使用 DCC 作为缩合剂反应过程中会生成副产物 *N,N'*-二环己基脒(DCU)。DCU 不溶于水, 一般用过滤除去, 但仍有少量残留于溶液中, 难以除净。而使用 HATU 后处理水洗既可除去, 而且具有反应速度快的优点。故我们选用 HATU 作为缩合剂进行这步反应, 经柱层析得到纯的化合物。此类化合物通过氢谱、碳谱、质谱, 确认其结构为我们所设计的目标产物。

图3 吡唑并[1,5-*a*]嘧啶类 c-Met 激酶抑制剂的合成Figure 3 Synthesis of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine derivatives as novel c-Met inhibitors

1.2 生物活性

首先采用噻唑蓝法(MTT)的方法检测此类化合物对肿瘤细胞增殖活性的影响(结果见表2)。实验结果表明**11a**在A549细胞株上有相对较好的药效活性,其他化合物对A549细胞不敏感。酰胺部分连接苯乙酸类衍生物活性优于连接苯甲酸类衍生物,如**11h**, **11g**, **11j**的活性优于相对应的**11c**, **11d**, **11e**。此外,卤素在酰胺键的相对位置对抑制肿瘤细胞增殖活性有部分影响,对位上**11a**, **11f**的抑制肿瘤细胞增殖活性比间位**11b**, **11d**, **11e**的强,且对位为F时活性最强;D'Angelo^[17]设计合成了一些c-Met激酶抑制剂,其中的构效关系与本文相似。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)实验结果(表2)显示,**11a**相对于其他化合物有部分抑制酪氨酸激酶的活性,这与MTT结果相同。

2 结论

我们以3-氨基吡唑和2-甲基-乙酰乙酸乙酯为起始原料合成11个吡唑并[1,5-*a*]嘧啶酰胺类化合物,并且确定其均为我们所设计的目标化合物。其中**11a**在A549细胞株上有相对较好的药效活性,且相对于其他化合物有部分抑制酪氨酸激酶的活性。构效关系表明酰胺部分的碳链长度越长活性相对越好;卤素在酰胺键的相对位置对抑制肿瘤细胞增殖活性有部分影响,卤素在对位位置的抑制肿瘤细胞增殖活性比间位强,且对位为F时活性最强。这为进一步的研究开发提供了一定的指导意

义。

表2 吡唑并[1,5-*a*]嘧啶类衍生物对A549肿瘤细胞和c-Met酶的抑制活性

Table 2 The inhibitory effect of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine derivatives on A549 and c-Met

Compound	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Inhibition ratio/%
11a	42.86	3.3
11b	130.05	0
11c	329.36	0
11d	259.06	0
11e	178.42	—
11f	72.76	—
11g	181.08	0
11h	173.12	—
11i	184.19	—
11j	102.51	—
11k	178.48	—
SU11274 (1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	—	92.3

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

NMR谱采用Bruker ARX-300型核磁共振仪(CDCl_3 为溶剂, TMS为内标)测定;质谱采用Q-TOF Global Mass质谱仪测定。所用试剂均为市售化学纯或分析纯。

3.2 化学合成部分

3.2.1 5,6-二甲基-7-羟基吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(7)的合成

将 10.8 g (130 mmol) 3-氨基吡唑和 19 g (130 mmol) 2-甲基-乙酰乙酸乙酯加入装有 40 mL 乙酸反应瓶中, 110 °C 回流反应 30 min. 反应结束后, 冷却, 过滤, 无水乙醇洗涤, 得白色固体 16.1 g, 产率为 74%.

3.2.2 5,6-二甲基-7-氯吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(8)的合成

将 8.15 g (0.05 mol) 化合物 7 和 4.2 g (0.035 mol) *N,N'*-二甲苯胺加入装有 85 mL 氧氯化磷的 250 mL 的反应瓶中, 回流反应 30~40 min. 反应结束后, 旋蒸除去氧氯化磷, 残留液用氯仿稀释, 饱和 NaHCO₃ 洗涤 3 次, 无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 减压浓缩, 柱层析 [*V*(乙酸乙酯): *V*(石油醚)=1:3] 得到白色固体 7.5 g, 产率为 83%.

3.2.3 5,6-二甲基-7-(2-氟-4-硝基苯氧基)吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(9)的合成

将 1.81 g (0.01 mol) 化合物 8 和 6.6 g (0.042 mol) 2-氟对硝基苯酚加入装有 40 mL, 氯苯的反应瓶中, 140 °C 反应 10 h. 反应结束后, 减压浓缩, 柱层析 [*V*(乙酸乙酯): *V*(石油醚)=1:4] 得到淡黄色固体 1.87 g, 产率为 62%. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 2.29 (s, 3H, 6-CH₃), 2.64 (s, 3H, 5-CH₃), 6.58 (d, *J*=2.1 Hz, 1H, 3-H), 6.77 (dd, *J*=7.8, 9 Hz, 1H, 6'-ArH), 7.91 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, 2-H), 7.92~7.96 (m, 1H, 5'-ArH), 8.1 (dd, *J*=2.4, 10.2 Hz, 1H, 3'-ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 10.96, 23.76, 96.56, 113.46, 113.76, 116.92, 120.55, 144.75, 146.38, 148.16, 148.82, 149.43, 152.81, 161.13.

3.2.4 5,6-二甲基-7-(2-氟-4-氨基苯氧基)吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(10)的合成

将化合物 9 (250 mg, 0.83 mmol) 溶于丙酮-水体系 (*V*:*V*=3:1) 中, 加入连二亚硫酸钠 (864 mg, 4.96 mmol), 50 °C 反应 1 h. 反应结束后, 用水洗涤, 收集有机相, 无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 减压浓缩得粗产物 121 mg, 产率为 54%.

3.2.5 吡唑并[1,5-*a*]嘧啶衍生物的合成

将 0.6 mmol 酸, 0.72 mmol HATU 和 1.5 mmol *N,N'*-二异丙基乙胺溶于 10 mL DCM 中, 待溶解后加入 0.5 mmol 化合物 10, 室温反应过夜. 反应结束后, 加入 CH₂Cl₂ 稀释, 水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩. 将产物用柱层析 [*V*(乙酸乙酯): *V*(石油醚)=1:4] 纯化得相应的化合物 6a~6k.

7-[2-氟-4-(4"-氟苯甲酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(6a): 产率为 41%. m.p. 179~181 °C; ¹H NMR δ: 1.96 (s, 3H, 6-CH₃), 2.55 (s, 3H, 5-CH₃), 6.51 (d,

J=2.1 Hz, 1H, 3-H), 6.80 (d, *J*=9 Hz, 1H, 6'-ArH), 6.87 (dd, *J*=2.4, 9.0 Hz, 1H, 5'-ArH), 7.18 (t, *J*=8.7 Hz, 2H, 3'',5''-ArH), 7.24 (dd, *J*=1.2, 9.6 Hz, 1H, 3'-ArH), 7.86 (s, 1H, NH), 7.98 (d, *J*=2.1 Hz, 1H, 2-H), 8.20 (dd, *J*=2.1, 5.4 Hz, 1H, 2''-ArH), 8.23 (dd, *J*=2.1, 5.4 Hz, 6''-ArH); ¹³C NMR δ: 14.71, 23.96, 95.67, 109.80, 115.81, 116.11, 116.84, 124.25, 124.89, 133.11, 134.53, 140.78, 143.06, 147.35, 152.68, 156.00, 160.74, 163.28, 168.08; HRMS calcd for C₂₁H₁₆F₂N₄O₂ (M+H)⁺ 395.1241, found 395.1311.

7-[2-氟-4-(3"-氯苯甲酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(6b): 产率为 38%. m.p. 150~153 °C; ¹H NMR δ: 1.96 (s, 3H, 6-CH₃), 2.55 (s, 3H, 5-CH₃), 6.51 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, 3-H), 6.80 (dd, *J*=2.7, 7.5 Hz, 1H, 6'-ArH), 6.85 (dd, *J*=2.4, 9.3 Hz, 1H, 5'-ArH), 7.24 (dd, *J*=3.0, 11.4 Hz, 1H, 3'-ArH), 7.47 (t, *J*=8.1 Hz, 1H, 5''-ArH), 7.60~7.63 (m, 1H, 4''-ArH), 7.89 (s, 1H, NH), 7.96 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, 2-H), 8.05~8.09 (m, 1H, 6''-ArH), 8.17 (t, *J*=1.8 Hz, 1H, 2''-ArH); ¹³C NMR δ: 14.75, 23.99, 95.70, 109.70, 116.71, 116.75, 124.15, 124.18, 128.49, 130.02, 130.38, 134.40, 134.89, 138.72, 140.73, 143.07, 147.35, 152.60, 155.92, 160.78, 163.10; HRMS calcd for C₂₁H₁₆ClFN₄O₂ (M+H)⁺ 411.1024, found 411.1009.

7-[2-氟-4-(苯甲酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(6c): 产率为 37%. m.p. 181~183 °C; ¹H NMR δ: 1.95 (s, 3H, 6-CH₃), 2.55 (s, 3H, 5-CH₃), 6.51 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, 3-H), 6.82 (dd, *J*=2.4, 7.8 Hz, 1H, 6'-ArH), 6.86 (dd, *J*=2.4, 9.6 Hz, 1H, 5'-ArH), 7.2 (t, *J*=9.3 Hz, 1H, 3'-ArH), 7.52 (t, *J*=7.8 Hz, 2H, 3'',5''-ArH), 7.66 (t, *J*=7.5 Hz, 1H, 4''-ArH), 7.91 (s, 1H, NH), 7.96 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, 2-H), 8.17 (s, 1H, 2''-ArH), 8.20 (s, 1H, 6''-ArH); ¹³C NMR δ: 14.74, 23.96, 95.63, 109.87, 116.87, 116.91, 124.34, 128.70, 130.39, 133.97, 134.53, 134.71, 140.85, 143.07, 147.3, 152.72, 156.04, 160.76, 164.27; HRMS calcd for C₂₁H₁₇FN₄O₂ (M+H)⁺ 377.1414, found 377.1403.

7-[2-氟-4-(3"-氟苯甲酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡唑并[1,5-*a*]嘧啶(6d): 产率为 37%. m.p. 182~184 °C; ¹H NMR δ: 1.95 (s, 3H, 6-CH₃), 2.55 (s, 3H, 5-CH₃), 6.51 (s, 1H, 3-H), 6.79 (dd, *J*=3.3, 8.4 Hz, 1H, 6'-ArH), 6.84 (d, *J*=9 Hz, 1H, 5'-ArH), 7.20 (dd, *J*=3.6, 12 Hz, 1H, 3'-ArH), 7.35 (t, *J*=8.1 Hz, 1H, 4''-ArH), 7.48 (dd, *J*=5.4, 7.8 Hz, 1H, 5''-ArH), 7.87 (d, *J*=9.3 Hz, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, 2-H), 7.95 (s, 1H, 2''-ArH), 7.99 (s, 1H, 6''-ArH); ¹³C NMR δ: 14.77, 23.98, 95.68, 109.39, 109.68, 116.70,

117.10, 117.41, 124.17, 126.15, 130.72, 134.31, 138.68, 140.75, 143.07, 147.32, 152.59, 155.90, 160.81, 163.20, 164.24; HRMS calcd for $C_{21}H_{16}F_2N_4O_2$ ($M+H$)⁺ 395.1319, found 395.1314.

7-[2-氟-4-(3'-溴苯甲酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡啶并[1,5-a]嘧啶(**6e**): 产率为 29%. m.p. 132~134 °C; ¹H NMR δ: 1.95 (s, 3H, 6-CH₃), 2.55 (s, 3H, 5-CH₃), 6.50 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, 3-H), 6.81 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.86 (dd, $J=2.4, 9.3$ Hz, 1H, 5'-ArH), 7.27 (t, $J=9$ Hz, 1H, 3'-H), 7.41 (t, $J=3$ Hz, 1H, 5''-ArH), 7.43 (dd, $J=2.1, 6.0$ Hz, 1H, 4''-ArH), 7.72 (dd, $J=2.1, 6.9$ Hz, 1H, 6''-ArH), 7.86 (s, 1H, NH), 7.95 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, 2-H), 8.05 (dd, $J=2.7, 7.5$ Hz, 1H, 2''-ArH); ¹³C NMR δ: 14.78, 23.99, 95.67, 109.81, 116.83, 122.74, 124.27, 127.47, 130.12, 132.21, 133.62, 134.36, 134.86, 140.76, 143.09, 147.31, 152.66, 155.86, 160.80, 163.43; HRMS calcd for $C_{21}H_{16}BrFN_4O_2$ ($M+H$)⁺ 455.0519, found 455.0506.

7-[2-氟-4-(4'-氯苯甲酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡啶并[1,5-a]嘧啶(**6f**): 产率为 35%. m.p. 193~195 °C; ¹H NMR δ: 1.95 (s, 3H, 6-CH₃), 2.54 (s, 3H, 5-CH₃), 6.51 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, 3-H), 6.80 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.85 (dd, $J=2.1, 9.6$ Hz, 1H, 5'-ArH), 7.22 (dd, $J=5.1, 13.5$ Hz, 1H, 3'-H), 7.46 (s, 1H, 3''-ArH), 7.49 (s, 1H, 5''-ArH), 7.91 (s, 1H, NH), 7.95 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, 2-H), 8.10 (s, 1H, 2''-ArH), 8.13 (s, 1H, 6''-ArH); ¹³C NMR δ: 14.78, 24.01, 95.68, 109.69, 116.72, 124.22, 127.00, 129.08, 131.77, 134.36, 138.74, 140.59, 143.08, 147.32, 152.61, 155.93, 160.8, 163.45; HRMS calcd for $C_{21}H_{16}ClFN_4O_2$ ($M+H$)⁺ 411.1024, found 411.1016.

7-[2-氟-4-(3'-氟苯乙酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡啶并[1,5-a]嘧啶(**6g**): 产率为 23%. m.p. 113~115 °C; ¹H NMR δ: 1.89 (s, 3H, 6-CH₃), 2.52 (s, 3H, 5-CH₃), 3.88 (s, 2H, CH₂), 6.49 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 3-H), 6.73 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.84 (dd, $J=2.4, 10.5$ Hz, 1H, 5'-ArH), 6.99 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, 2''-ArH), 7.01 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, 4''-ArH), 7.07 (s, 1H, 6''-ArH), 7.14 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, 5''-ArH), 7.32 (dd, $J=7.8, 14.1$ Hz, 1H, 3'-H), 7.86 (s, 1H, NH), 7.94 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, 2-H); ¹³C NMR δ: 14.70, 23.92, 40.42, 95.63, 109.68, 114.69, 116.30, 116.59, 116.71, 123.98, 125.09, 130.23, 134.27, 135.25, 140.77, 143.07, 147.26, 152.57, 155.82, 160.79, 164.62, 168.62; HRMS calcd for $C_{22}H_{18}F_2N_4O_2$ ($M+H$)⁺ 409.1476, found 409.1463.

7-[2-氟-4-(苯乙酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡啶并[1,5-a]嘧啶(**6h**): 产率为 34%. m.p. 139~142 °C; ¹H

NMR δ: 1.89 (s, 3H, 6-CH₃), 2.52 (s, 3H, 5-CH₃), 3.88 (s, 2H, CH₂), 6.49 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 3-H), 6.73 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.77 (dd, $J=2.1, 11.4$ Hz, 1H, 5'-ArH), 7.02 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, 4''-ArH), 7.30 (dd, $J=3.6, 7.5$ Hz, 1H, 3'-H), 7.35 (s, 2H, 2'',6''-ArH), 7.36 (s, 2H, 3'',5''-ArH), 7.89 (s, 1H, NH), 7.93 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, 2-H); ¹³C NMR δ: 14.71, 23.94, 40.82, 95.62, 109.69, 116.69, 116.72, 124.05, 127.50, 128.79, 129.34, 133.02, 134.41, 140.80, 143.03, 147.29, 152.49, 155.81, 160.81, 169.18; HRMS calcd for $C_{22}H_{19}FN_4O_2$ ($M+H$)⁺ 391.1570, found 391.1569.

7-[2-氟-4-(4''-氟苯乙酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡啶并[1,5-a]嘧啶(**6i**): 产率为 30%. m.p. 142~145 °C; ¹H NMR δ: 1.89 (s, 3H, 6-CH₃), 2.52 (s, 3H, 5-CH₃), 3.85 (s, 2H, CH₂), 6.49 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, 3-H), 6.71 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.84 (dd, $J=2.1, 10.2$ Hz, 1H, 5'-ArH), 7.03 (t, $J=8.7$ Hz, 1H, 3'-H), 7.29 (s, 2H, 2'',6''-ArH), 7.31 (s, 2H, 3'',5''-ArH), 7.83 (s, 1H, NH), 7.94 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, 2-H); ¹³C NMR δ: 14.73, 24.00, 40.10, 95.66, 109.65, 116.70, 123.97, 128.94, 130.73, 131.4, 133.51, 134.15, 140.70, 143.06, 147.30, 152.43, 155.75, 160.77, 168.8; HRMS calcd for $C_{22}H_{18}ClFN_4O_2$ ($M+H$)⁺ 425.1181, found 425.1168.

7-[2-氟-4-(4''-溴苯乙酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡啶并[1,5-a]嘧啶(**6j**): 产率为 33%. m.p. 103~105 °C; ¹H NMR δ: 1.89 (s, 3H, 6-CH₃), 2.52 (s, 3H, 5-CH₃), 4.06 (s, 2H, CH₂), 6.49 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, 3-H), 6.74 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.84 (dd, $J=2.4, 9$ Hz, 1H, 5'-ArH), 7.11 (t, $J=8.7$ Hz, 1H, 6''-ArH), 7.19 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, 5''-ArH), 7.30 (dd, $J=2.4, 7.2$ Hz, 1H, 3'-H), 7.36~7.43 (m, 2H, 2'',4''-ArH), 7.79 (s, 1H, NH), 7.94 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 2-H); ¹³C NMR δ: 14.70, 23.91, 41.31, 95.61, 109.86, 116.91, 124.14, 125.07, 127.77, 129.34, 131.60, 132.98, 133.35, 134.44, 140.82, 143.08, 147.21, 152.57, 155.92, 160.78, 168.19; HRMS calcd for $C_{22}H_{18}BrFN_4O_2$ ($M+H$)⁺ 469.0675, found 469.0670.

7-[2-氟-4-(2''-氯苯乙酰胺基)苯氧基]-5,6-二甲基吡啶并[1,5-a]嘧啶(**6k**): 产率为 27%. m.p. 135~138 °C; ¹H NMR δ: 1.89 (s, 3H, 6-CH₃), 2.52 (s, 3H, 5-CH₃), 4.04 (s, 2H, CH₂), 6.49 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 3-H), 6.72 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.78 (dd, $J=2.4, 9.6$ Hz, 1H, 5'-ArH), 7.23~7.27 (m, 3H, 4'',5'',6''-ArH), 7.37 (dd, $J=1.5, 5.4$ Hz, 1H, 3'-H), 7.39~7.42 (m, 1H, 3''-ArH), 7.83 (s, 1H, NH), 7.94 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 2-H); ¹³C NMR δ: 14.70, 23.98, 38.76, 95.62, 109.78, 116.82, 124.11, 127.12,

129.25, 129.65, 131.54, 134.32, 134.64, 138.55, 140.77, 143.04, 147.28, 152.49, 155.82, 160.76, 168.24; HRMS calcd for $C_{22}H_{18}ClFN_4O_2$ ($M + H$)⁺ 425.1181, found 425.1172.

3.3 MTT 法检测药物抑制肿瘤细胞增殖活性

我们将对数生长期的细胞制成细胞悬液, 用血球计数板计数并将细胞终浓度稀释至 $1 \sim 2 \times 10^4$ cell/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔体积 100 μ L. 另将不含细胞的孔设为空白组, 只加入 100 μ L 培养基, 孵育 48 h 使细胞贴壁.

将待测的化合物用 DMSO 助溶, 同时用完全培养基稀释至相应浓度(DMSO 浓度为 0.1%). 肿瘤细胞药物设浓度梯度浓度, 分别为 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ mol/L, 每孔加入 90 μ L 药液, 每个浓度设 6 个复孔, 药物作用 72 h.

加药培养时间结束后, 每孔加入 10 μ L MTT 溶液(5 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 条件下避光培养 4 h, 之后每个孔再加入甲臞溶解液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下孵育 5~6 h, 酶标仪在 570 nm 波长下检测 OD 值, 并且计算抑制率. 计算公式如下:

抑制率 = (对照组 OD - 处理组 OD) / (对照组 OD - 空白组 OD) $\times$ 100%

采用 Sigma plot 计算 IC₅₀ 值.

致谢 酶联免疫吸附测定(ELISA)由中国科学院上海药物研究所耿美玉课题组完成, 谨表谢意.

References

- [1] Jeffers, M.; Schmidt, L.; Nakaigawa, N.; Webb, C. P.; Weirich, G.; Kishida, T.; Zbar, B.; Vande Woude, G. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 11445.
- [2] Ferracini, R.; Olivero, M.; Di Renzo, M. F.; Martano, M.; De Giovanni, C.; Nanni, P.; Basso, G.; Scotlandi, K.; Lollini, P. L.; Comoglio, P. M. *Oncogene* **1996**, *12*, 1697.
- [3] Canadas, I.; Rojo, F.; Arumi-Uria, M.; Rovira, A.; Albanell, J.; Arriola, E. *Clin. Transl. Oncol.* **2010**, *12*, 253.
- [4] Cecchi, F.; Rabe, D. C.; Bottaro, D. P. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1260.
- [5] Stellrecht, C. M.; Gandhi, V. *Cancer Lett.* **2009**, *280*, 1.
- [6] Peruzzi, B.; Bottaro, D. P. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 3657.
- [7] Liu, X.; Newton, R. C.; Scherle, P. A. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 37.
- [8] Bode, C. M.; Boezio, A. A.; Albrecht, B. K.; Bellon, S. F.; Berry, L.; Broome, M. A.; Choquette, D.; Dussault, I.; Lewis, R. T.; Lin, M. H.; Rex, K.; Whittington, D. A.; Yang, Y.; Harmange, J. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4089.
- [9] Underiner, T. L.; Herbertz, T.; Miknyoczki, S. J. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 7.
- [10] Weinberg, L. R.; Albom, M. S.; Angeles, T. S.; Husten, J.; Lisko, J. G.; McHugh, R. J.; Milkiewicz, K. L.; Murthy, S.; Ott, G. R.; Therooff, J. P.; Tripathy, R.; Underiner, T. L.; Zifcsak, C. A.; Dorsey, B. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 164.
- [11] Allen, J. V.; Bardelle, C.; Blades, K.; Buttar, D.; Chapman, L.; Colclough, N.; Dossetter, A. G.; Garner, A. P.; Girdwood, A.; Lambert, C.; Leach, A. G.; Law, B.; Major, J.; Plant, H.; Slater, A. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5224.
- [12] Fujiwara, Y.; Senga, T.; Nishitoba, T.; Osawa, T.; Miwa, A.; Nakamura, K. *WO 2003000660*, **2003** [*Chem. Abstr.* **2003**, *138*, 73182].
- [13] Kubo, K.; Furuta, T.; Osawa, T.; Miwa, A. *WO 2006104161*, **2006** [*Chem. Abstr.* **2006**, *145*, 397496].
- [14] Claridge, S.; Raeppl, F.; Granger, M. C.; Bernstein, N.; Saavedra, O.; Zhan, L.; Llewellyn, D.; Wahhab, A.; Deziel, R.; Rahil, J.; Beaulieu, N.; Nguyen, H.; Dupont, I.; Barsalou, A.; Beaulieu, C.; Chute, I.; Gravel, S.; Robert, M. F.; Lefebvre, S.; Dubay, M.; Pascal, R.; Gillespie, J.; Jin, Z.; Wang, J.; Besterman, J. M.; MacLeod, A. R.; Vaisburg, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2793.
- [15] Raeppl, S.; Claridge, S.; Saavedra, O.; Gaudette, F.; Zhan, L.; Mannion, M.; Zhou, N.; Raeppl, F.; Granger, M. C.; Isakovic, L.; Deziel, R.; Nguyen, H.; Beaulieu, N.; Beaulieu, C.; Dupont, I.; Robert, M. F.; Lefebvre, S.; Dubay, M.; Rahil, J.; Wang, J.; Ste-Croix, H.; Robert Macleod, A.; Besterman, J.; Vaisburg, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1323.
- [16] Cai, Z. W.; Wei, D.; Schroeder, G. M.; Cornelius, L. A.; Kim, K.; Chen, X. T.; Schmidt, R. J.; Williams, D. K.; Tokarski, J. S.; An, Y.; Sack, J. S.; Manne, V.; Kamath, A.; Zhang, Y.; Marathe, P.; Hunt, J. T.; Lombardo, L. J.; Fargnoli, J.; Borzilleri, R. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3224.
- [17] D'Angelo, N. D.; Bellon, S. F.; Booker, S. K.; Cheng, Y.; Coxon, A.; Dominguez, C.; Fellows, I.; Hoffman, D.; Hungate, R.; Kaplan-Lefko, P.; Lee, M. R.; Li, C.; Liu, L.; Rainbeau, E.; Reider, P. J.; Rex, K.; Siegmund, A.; Sun, Y.; Tasker, A. S.; Xi, N.; Xu, S.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Burgess, T. L.; Dussault, I.; Kim, T. S. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5766.

(Zhao, X.)