

1,2-苯并噻嗪类化合物的设计、合成及抗肿瘤活性研究

王 杰^{a,b} 许勤龙^c 李家明^{*,a,b} 张恩立^{a,b}
 胡敏华^{a,b} 叶文峰^{a,b} 黄伟军^{a,b}

(^a 安徽中医药大学 安徽省现代中药重点实验室 合肥 230031)

(^b 安徽省中医药科学院药物化学研究所 合肥 230038)

(^c 合肥医工医药有限公司 合肥 230059)

摘要 依据生物电子等排原理, 设计合成了 13 个全新结构的 1,2-苯并噻嗪类化合物, 其结构均经 IR, ¹H NMR, ¹³C NMR 和 MS 确证. 以 A431, A549, MDA-MB-468 和 HL60 4 种细胞株为活性筛选对象, 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法进行初步的体外抗肿瘤活性研究. 结果表明, 部分化合物对肿瘤细胞有一定的抑制活性, 其中化合物 **5b** 对 A431 具有显著的抑制活性, IC₅₀ 值为 1.57 μmol/L, 化合物 **9a** 对 A431, A549 和 MDA-MB-468 3 种细胞株的抑制活性均强于阳性对照药 gefitinib. 并采用 Moe 软件对所合成的化合物与表皮生长因子受体(EGFR)结合位点进行对接, 以进一步阐释所合成化合物的作用靶标.

关键词 1,2-苯并噻嗪类化合物; 酪氨酸激酶抑制剂; 抗肿瘤

Design, Synthesis and Biological Activity of 1,2-Benzothiazine Derivatives as Potential Anticancer Agents

Wang, Jie^{a,b} Xu, Qinlong^c Li, Jiaming^{*,a,b} Zhang, Enli^{a,b}
 Hu, Minhua^{a,b} Ye, Wenfeng^{a,b} Huang, Weijun^{a,b}

(^a Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031)

(^b Medicinal Chemistry Department, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230038)

(^c Hefei Industrial Pharmaceutical Institute Co., Ltd., Hefei 230059)

Abstract Thirteen 1,2-benzothiazine derivatives **5a**~**11a**, **5b**~**10b** have been designed and synthesized based on bioisosterism, and the structures of the target compounds were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, IR and mass spectra. The Anti-tumor activities of the target compounds against A549, A431, MDA-MB-468, HL60 cells *in vitro* were investigated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Most of the synthesized compounds were proved to have potent antitumor activity. Among them, compound **5b** showed the most potent biological activity against A549 cell line with IC₅₀ value of 1.57 μmol/L, compound **9a** against A431, A549 and MDA-MB-468 had stronger cell growth inhibitory action than gefitinib. Molecular docking was performed to position compound **5b** into epidermal growth factor receptor (EGFR) binding site in order to explore the potential target.

Keywords 1,2-benzothiazine derivatives; tyrosine kinase inhibitors; antitumor

恶性肿瘤的治疗长期以来是一个世界性的难题, 随着肿瘤分子生物学等学科快速发展, 抗肿瘤药物从传统细胞毒类药物的研究(主要作用于 DNA, RNA 和微管蛋白)转向寻找针对细胞内信号转导通路的新型抗肿瘤药物^[1~4]. 其中 EGFR 抑制剂、mTOR 抑制剂、HDAC

抑制剂等的开发引起了人们的高度关注^[5~8].

非甾体抗炎药作为一种治疗疼痛和风湿性疾病的药物被广泛使用^[9]. 其中 1,2-苯并噻嗪类药物是一类具有苯噻嗪环的非甾体抗炎药, 代表药物有美洛昔康、吡罗昔康(结构见 Scheme 1)等^[10,11]. 临床发现此类药物具

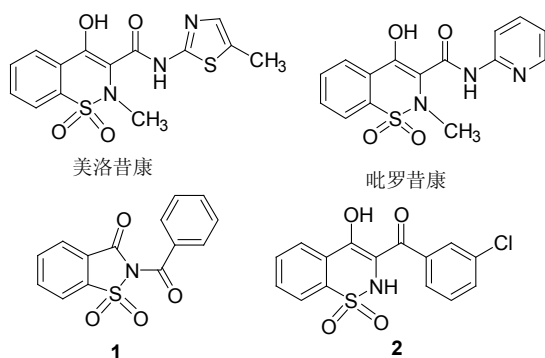
* E-mail: lijiaming2004@sina.com

Received February 17, 2014; revised April 27, 2014; published online June 9, 2014.

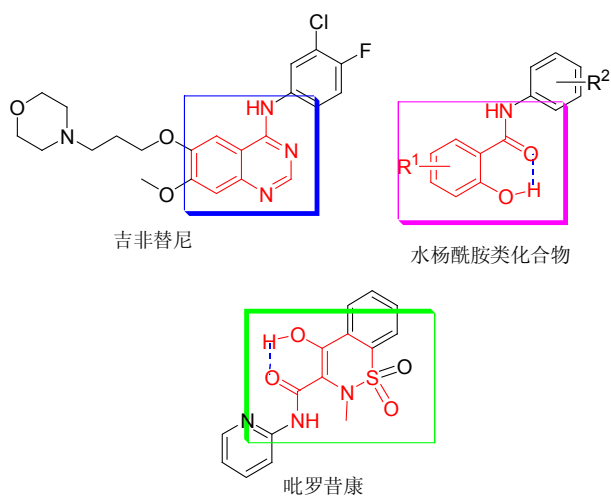
Project supported by the Anhui Provincial Natural Science Foundation (No. 1208085MH128) and the National Incubator of Innovative Drugs (No. 2012ZX09401066).

安徽省自然科学基金(No. 1208085MH128)、国家创新药物孵化基地(No. 2012ZX09401066)资助项目.

有多种药理活性, 例如抗炎、抗分支杆菌、免疫调节、抑制 PGs 合成、抗肿瘤等^[12]. 近年来, 1,2-苯并噻嗪类化合物的抗肿瘤活性引起了科研工作者的关注, Zhang 等^[13]研究发现美洛昔康与大肠癌的早期发病及发生发展, 包括肿瘤生成有着密切的关系, 并在分子水平上阐述了其与 VEGF 和 Ang-2 的关系. Naruse 等^[14]采用 MTT 法研究了美洛昔康分别与顺铂和阿霉素对骨肉瘤细胞株 MG-63 的协同抗肿瘤活性, 结果显示, 顺铂和阿霉素的抗肿瘤活性明显提高, 表明美洛昔康与一些抗肿瘤药物联合用药具有一定的临床应用价值. Khalid 等^[15]设计了一系列苯并异噻唑类化合物, 化合物 **1** 具有较强的抗肿瘤活性. Ahmad 等^[16]在此基础上通过进一步活性筛选得到了化合物 **2**, 发现其对恶性肿瘤具有一定的抑制作用.

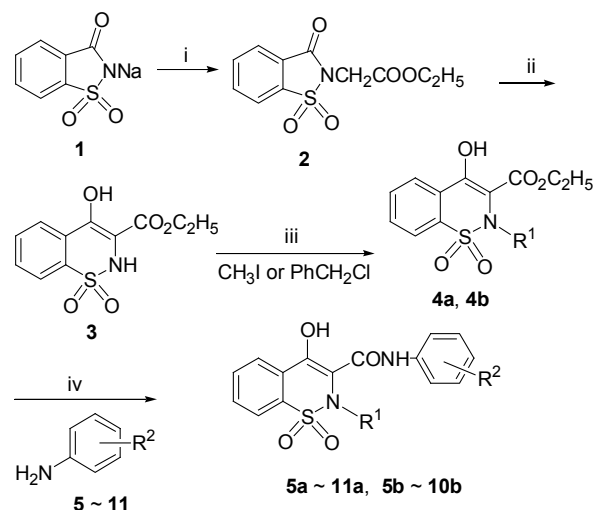


我们课题组前期在研究水杨酰胺类抗肿瘤药物的结构特征发现, 水杨酰胺分子内氢键形成了一个六元环后与蛋白酪氨酸激酶(PTKs)受体抑制剂替尼类药物吉非替尼的母核结构非常相似(Scheme 2), 后期药理结果发现, 该类化合物具有较强的抗肿瘤活性^[17-19]. 同样, 课题组在研究 1,2-苯并噻嗪类化合物的结构时发现, 其也可以形成 1 个六元环分子内氢键, 稳定构象与水杨酰胺类化合物类似, 可能也具有相似的药理活性.



Scheme 2

因此, 我们课题组依据生物电子等排原理, 用不同取代苯胺替换 2-氨基-5-甲基噻唑或 2-氨基吡啶, 设计并合成了 13 个新型 1,2-苯并噻嗪类化合物 **5a~11a** 和 **5b~10b** (Scheme 3), 合成路线如 Scheme 1 所示, 并对其进行了体外抗肿瘤活性测定, 部分化合物显示了较好的抗肿瘤活性. 为了进一步研究所合成化合物的作用机制, 使用 Moe 模拟软件, 探究了其 EGFR 结合位点的相互作用, 具体深入的作用机制有待于进一步的研究证明.



5a $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = 4\text{-OCH}_3$; **5b** $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R^2 = 3\text{-CF}_3$
6a $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = 3\text{-CH}_3$; **6b** $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R^2 = 3\text{-CH}_3$
7a $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = 3\text{-CF}_3$; **7b** $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R^2 = 2\text{-Cl-4-NO}_2$
8a $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = 2\text{-Cl-4-NO}_2$; **8b** $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R^2 = 3\text{-Cl-4-F}$
9a $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = 3\text{-Cl-4-F}$; **9b** $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R^2 = 3\text{-Cl}$
10a $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = 3\text{-Cl}$; **10b** $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R^2 = 3\text{-Br}$
11a $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = 3\text{-Br}$

Reagents and conditions: (i) DMF, $\text{ClCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, reflux, 3 h; (ii) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, reflux; (iii) CH_3I or PhCH_2Cl , DMF, K_2CO_3 , r.t., 2 h; (iv) Xylene, reflux, 24 h

Scheme 3

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

以糖精钠为起始原料, 经亲和取代反应制得 3-氧代-1,2-苯并异噻唑-2-乙酸乙酯 1,1-二氧化物 **2**; 化合物 **2** 经 Gabriel-Colman 反应制得化合物 4-羟基-2H-1,2-苯并噻嗪-3-羧酸乙酯 1,1-二氧化物 **3**, 在此步反应中要严格控制无水, 酸化时要先将浓盐酸和碎冰充分混合, 再一次性加入, 否则会使产率降低, 文献中此步反应的温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$, 但产率较低. 后来参考其他相关文献将开始反应温度控制在 $90\text{ }^\circ\text{C}$, 反应 0.5 h 后将温度控制在 $60\text{ }^\circ\text{C}$, 收率明显提高, 且后处理简易.

化合物 **3** 与碘甲烷或苄氯经亲和取代反应制得中间

体 **4a** 或 **4b**, 然后再与不同的取代苯胺经胺解反应制得目标化合物 **5a~11a**, **5b~10b**, 化合物 **5b~10b** 的产率普遍低于化合物 **5a~11a**, 可能由于空间位阻效应, 使 **4b** 与取代苯胺反应相对与 **4a** 与取代苯胺反应较难进行。

1.2 目标化合物的抗肿瘤活性

MTT 实验结果见表 1, 从表 1 中数据可知, 目标化合物对不同的细胞株具有选择性的抑制活性, 所合成的目标化合物对 3 种肿瘤细胞株(A431, A549, MDA-MB-468)均有不同程度的抑制活性, 而对肿瘤细胞 HL60 的抑制活性不明显。苯基取代的化合物 **8b** 对细胞株 A431 的抑制活性优于阳性对照药 gefitinib, 其 IC_{50} 值为 18.60 $\mu\text{mol/L}$; 化合物 **5b** 对细胞株 A549 的抑制活性明显优于 gefitinib, 其 IC_{50} 值为 1.57 $\mu\text{mol/L}$; 化合物 **9a** 对细胞株 A431, A549 和 MDA-MB-468 均具有较好的抑制活性, IC_{50} 值分别为 9.46, 9.49 和 6.33 $\mu\text{mol/L}$ 。详细构效关系有待于进一步的研究证明。化合物 **5b** 与 EGFR 受体结合位点的相互作用如图 1。由图 1 可知, 化合物 **5b** 通过氢键与 EGFR 受体结合位点的 Thr854 相互作用, 1,2-苯并噻嗪环上的羟基与酰胺基中的氧原子通过氢键形成与蛋白酪氨酸激酶(PTKs)受体抑制剂替尼类药物的母核相类似的六元环, 这可能是此类化合物的具有抗肿瘤活性的主要原因。

表 1 目标化合物的抗肿瘤细胞增殖活性

Table 1 Anti-tumor cell proliferation activity of target compounds

Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$			
	HL60	A431	A549	MDA-MB-468
5a	>50	>50	>50	>50
6a	>50	>50	22.85	>50
7a	>50	27.56	12.37	15.18
8a	>50	>50	>50	27.44
9a	>50	9.46	9.49	6.63
10a	>50	29.40	>50	>50
11a	>50	>50	>50	>50
5b	>50	>50	1.57	>50
6b	>50	>50	20.75	30.86
7b	>50	>50	>50	>50
8b	>50	18.60	11.99	16.99
9b	>50	>50	10.79	37.24
10b	>50	>50	47.31	>50
Gefitinib	10.08	20.72	11.26	8.38
Meloxicam	>800	$\approx$ 800	>800	>800

2 结论

依据生物电子等排原理, 设计合成了系列 1,2-苯并噻嗪类化合物, 其结构均经 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 MS 确证。采用 MTT 法对所合成化合物进行了体外抗肿瘤细胞(A431, A549, MDA-MB-468 和 HL60)活性测试, 结果

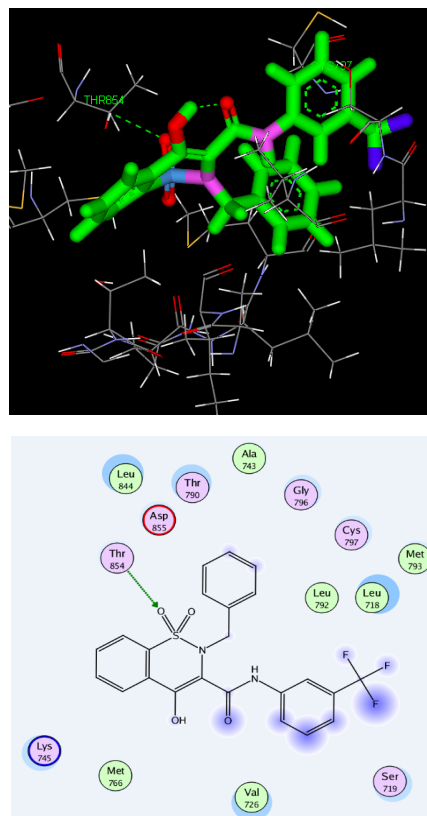


图 1 化合物 **5b** 与 EGFR 受体结合位点的相互作用

Figure 1 Molecular docking modeling of compound **5b** with EGFR

表明, 部分化合物对肿瘤细胞有一定的抑制活性, 其中化合物 **5b** 对 A431 具有显著的抑制活性, IC_{50} 值为 1.57 $\mu\text{mol/L}$ 。所合成的化合物的抗肿瘤机制正在进一步的研究。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

WRS-1B 数字熔点仪、SGW X-4 型显微熔点仪(上海精密科学仪器有限公司); LCQ ADVANTAGE MAX 液质连用质谱仪(FINNIGA 公司); Nicolet Avatar 370 DTGS 型红外光谱仪(KBr 压片); Bruker 300, 400 MHz 超导核磁共振仪(DMSO- d_6 或 CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标); BS 240 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); 立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-40KB, 上海申安医疗器械厂); CO_2 培养箱(2306-Z, 美国 SHELLAB 公司); 超净工作台(SW-CJ-1F 型, 苏州净化设备有限公司); 显微镜(ECLIPSE TE300, NILON 公司); 全波段酶标仪(MULISKAN MK3, 荷兰雷勃公司)。

糖精钠由天津长捷化工有限公司提供, 氯乙酸乙酯由天津市光复精细化工研究所提供, 碘甲烷和苄氯由上海润捷化学试剂有限公司提供, 4-甲氧基苯胺、3-甲基苯

胺、3-三氟甲基苯胺、2-氯-4-硝基苯胺、3-氯-4-氟苯胺、3-氯苯胺和3-溴苯胺由上海凯赛化工有限公司提供,乙醇钠由本实验室自制,吉非替尼对照品由浙江武义家园医药原料有限公司提供,其它试剂均为市售分析纯,薄层和柱层析用硅胶均为烟台德信生物科技有限公司产品。

3.2 化合物的合成

3.2.1 3-氧代-1,2-苯并异噻唑-2-乙酸乙酯 1,1-二氧化物(2)的合成

在三颈瓶中依次加入糖精钠(40.0 g, 0.17 mol), 氯乙酸乙酯(21.0 g, 0.17 mol), DMF (100 mL), 混合物逐渐加热至 120 °C, 反应 3 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯)]=1:1 为展开剂]检测显示反应基本完全. 冷却至室温, 搅拌下将反应混合物加到冷水(300 mL)中, 立即析出白色固体, 抽滤, 滤饼用 50 mL 水洗涤 3 次. 用 80% 乙醇(100 mL)重结晶, 冷却得白色针状固体, 真空干燥(60 °C)后得 38.8 g, 收率 86.9%. m.p. 103~105 °C(文献值^[22] m.p. 106~108 °C).

3.2.2 4-羟基-2H-1,2-苯并噻嗪-3-羧酸乙酯 1,1-二氧化物(3)的合成

在三颈瓶中加入 60 mL 无水乙醇, 将金属钠(2.56 g, 0.11 mol)切成小块后分批加入, 搅拌至钠块完全溶解后, 加热至 90 °C, 立即一次性加入固体 3-氧代-1,2-苯并异噻唑-2-乙酸乙酯 1,1-二氧化物(10.0 g, 0.037 mol), 同时用机械搅拌装置剧烈搅拌(注意防止冲出), 反应得到橙黄色浆状物, 0.5 h 后将温度调至 60 °C, 继续反应 2 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯)]=2:1 为展开剂]检测反应基本完全. 撤去油浴, 冰水浴降温至 5~10 °C, 然后加入冰(72 g)和浓盐酸(28 mL)混合液, 搅拌, 析出白色固体, 抽滤, 水洗. 干燥得白色固体 5.5 g, 收率为 55.0%. m.p. 167~169 °C(文献值^[22] m.p. 169~170 °C).

3.2.3 4-羟基-2-甲基-2H-1,2-苯并噻嗪-3-羧酸甲酯 1,1-二氧化物(4a)的合成

在三颈瓶中加入 4-羟基-2H-1,2-苯并噻嗪-3-羧酸乙酯 1,1-二氧化物(5.0 g, 0.019 mol), DMF (30 mL), K_2CO_3 (13.1 g, 0.095 mol), 室温搅拌反应 0.5 h 后滴加 CH_3I (2.7 g, 0.019 mol), 继续反应 2 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯)]=3:1 为展开剂]检测反应基本完全. 抽滤, 取滤液加水 50 mL, 水相用乙酸乙酯(50 mL×3)萃取, 合并乙酸乙酯层, 然后用水(50 mL×2)洗涤后, 经无水硫酸钠干燥, 减压回收乙酸乙酯后得无色油状物 4a, 冷却得白色固体 3.2 g, 收率 59.5%. m.p. 105~107 °C(文献值^[22] m.p. 104~105 °C).

3.2.4 4-羟基-2-甲基-*N*-(4-甲氧基苯基)-2H-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(5a)的合成

三颈瓶中依次加入 4-羟基-2-甲基-2H-1,2-苯并噻嗪-3-羧酸甲酯-1,1-二氧化物(5.0 g, 0.018 mol)、4-甲氧基苯胺(2.1 g, 0.020 mol)和二甲苯(40 mL)回流反应 24 h 后, TLC [V (氯仿): V (甲醇)]=15:1 为展开剂]检测反应基本完全. 温度降至室温析出固体, 抽滤, 用丙酮重结晶, 得淡绿色固体 5a 4.3 g, 产率 67.5%. m.p. 253.2~255.1 °C; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 14.23 (s, 1H, NH), 10.24 (s, 1H, OH), 8.03 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.95~7.88 (m, 3H, ArH), 7.64 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, ArH), 6.97 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, ArH), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 2.86 (s, 3H, NCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 166.7, 156.9, 156.6, 134.0, 133.5, 132.9, 129.6, 127.8, 126.1, 124.1, 123.9, 113.7, 111.4, 55.2, 39.7; IR (KBr) ν : 3336.8, 2933.5, 1621.9, 1538.8, 1510.5, 1447.9, 1415.4, 1342.0, 1249.7, 1182.7, 1154.1, 1121.5, 1066.7, 1033.2, 933.7, 869.6, 830.6, 760.1, 718.0 cm^{-1} . HRMS calcd for $C_{17}H_{17}N_2O_5S$ ($M^+ + H$) 361.0853, found 361.0856.

用类似的方法合成化合物 6a~11a.

4-羟基-2-甲基-*N*-(3-甲基苯基)-2H-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(6a): 白色固体, 产率 87.2%. m.p. 222.7~225.5 °C; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 14.12 (s, 1H, NH), 10.25 (s, 1H, OH), 8.04 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.95~7.88 (m, 3H, ArH), 7.58 (t, $J=4.8$ Hz, 2H, ArH), 7.28 (t, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.02 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 2.87 (s, 3H, NCH_3), 2.33 (s, 3H, $PhCH_3$); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 167.0, 157.2, 137.8, 136.9, 134.2, 133.5, 133.0, 128.4, 127.9, 126.2, 125.7, 124.1, 122.7, 119.2, 111.5, 39.4, 21.0; IR (KBr) ν : 3341.4, 2949.4, 1610.5, 1542.5, 1488.8, 1449.1, 1412.1, 1344.1, 1265.3, 1178.3, 1038.2, 707.9 cm^{-1} . HRMS calcd for $C_{17}H_{17}N_2O_4S$ ($M^+ + H$) 345.0904, found 345.0907.

4-羟基-2-甲基-*N*-(3-三氟甲基苯基)-2H-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(7a): 白色固体, 产率 88.3%. m.p. 203.2~206.3 °C; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 13.78 (s, 1H, NH), 10.57 (s, 1H, OH), 8.22 (s, 1H, ArH), 8.15 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 8.08~8.06 (m, 1H, ArH), 7.98~7.91 (m, 3H, ArH), 7.65 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 2.90 (s, 3H, NCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 167.4, 157.5, 138.0, 134.3, 133.5, 133.1, 129.8, 129.2, 127.7, 126.3, 125.4, 124.2, 122.7, 121.1, 118.2, 111.4, 39.3; IR (KBr) ν : 3344.9, 3078.9, 2924.9, 2365.3, 1636.9, 1611.1, 1547.4, 1490.7, 1449.0, 1336.6, 1272.0, 1227.4, 1158.1, 1119.9, 1069.2,

885.2, 835.3, 801.5, 758.2, 723.7 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M}^+ + \text{H}$) 399.0621, found 399.0619.

4-羟基-2-甲基-*N*-(2-氯-4-硝基苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**8a**): 黄色固体, 产率 58.3%. m.p. 257.5~260.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.88 (s, 1H, OH), 8.44 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, ArH), 8.30 (dd, $J=2.0, 8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.18 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.06 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.94~7.89 (m, 3H, ArH), 2.93 (s, 3H, NCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.3, 158.1, 144.6, 140.3, 134.4, 133.4, 133.0, 128.5, 127.7, 126.6, 126.1, 124.8, 124.0, 123.1, 111.7, 39.9; IR (KBr) ν : 3352.2, 3106.7, 1638.9, 1607.8, 1511.7, 1401.0, 1349.9, 1264.7, 1225.1, 1178.2, 1155.6, 1118.5, 1041.2, 937.6, 850.9, 819.1, 788.1, 742.2, 710.6 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ ($\text{M}^+ + \text{H}$) 410.0208, found 410.0208.

4-羟基-2-甲基-*N*-(3-氯-4-氟苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**9a**): 白色固体, 产率 71.2%. m.p. 248.1~250.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.77 (s, 1H, NH), 10.44 (s, 1H, OH), 8.05~8.02 (m, 2H, ArH), 7.95~7.89 (m, 3H, ArH), 7.80~7.77 (m, 1H, ArH), 7.45 (t, $J=9.2$ Hz, 1H, ArH), 2.87 (s, 3H, NCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.6, 157.9, 155.9, 153.5, 134.7, 134.0, 133.6, 128.2, 126.8, 124.7, 124.2, 122.9, 119.6, 117.3, 111.8, 39.9; IR (KBr) ν : 3334.4, 3075.2, 2939.3, 1626.7, 1603.5, 1541.0, 1499.9, 1448.9, 1398.3, 1344.8, 1302.7, 1266.5, 1215.0, 1181.1, 1154.8, 1039.2, 950.6, 867.1, 838.4, 764.0 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClFN}_2\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M}^+ + \text{H}$) 383.0263, found 383.0263.

4-羟基-2-甲基-*N*-(3-氯苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**10a**): 白色固体, 产率 77.3%. m.p. 271.3~273.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.84 (s, 1H, NH), 10.43 (s, 1H, OH), 8.05 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.96~7.90 (m, 4H, ArH), 7.77 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.43 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.26 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 2.89 (s, 3H, NCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.2, 157.5, 138.7, 134.2, 133.6, 133.1, 130.6, 127.8, 127.5, 126.3, 124.3, 124.2, 121.2, 120.7, 111.4, 39.9; IR (KBr) ν : 3344.6, 3072.6, 2942.1, 1632.7, 1592.2, 1534.6, 1480.3, 1412.8, 1340.9, 1296.7, 1265.5, 1220.0, 1177.7, 1158.7, 1043.6, 942.0, 862.4, 832.6, 771.0, 739.1 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M}^+ + \text{H}$) 365.0357, found 365.0359.

4-羟基-2-甲基-*N*-(3-溴苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**11a**): 白色固体, 产率 59.6%. m.p.

271.1~273.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.82 (s, 1H, NH), 10.42 (s, 1H, OH), 8.05 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.96~7.90 (m, 3H, ArH), 7.82 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 2.87 (s, 3H, NCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.3, 157.5, 138.6, 134.3, 133.6, 133.1, 132.8, 130.3, 127.7, 126.3, 124.6, 124.2, 121.5, 120.3, 111.4, 39.4; IR (KBr) ν : 3344.6, 3068.2, 2939.6, 1631.4, 1585.8, 1531.9, 1476.5, 1409.8, 1340.2, 1294.6, 1264.3, 1218.9, 1176.2, 1065.1, 865.9, 828.6, 770.5, 735.8 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M}^+ + \text{H}$) 410.9832, found 410.9826.

3.2.5 4-羟基-2-苄基-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-羧酸甲酯-1,1-二氧化物(**4b**)的合成

在三颈瓶中加入 4-羟基-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-羧酸乙酯-1,1-二氧化物(5.0 g, 0.019 mol), *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) (30 mL), K_2CO_3 (13.1 g, 0.095 mol), 室温搅拌反应 0.5 h 后滴加氯化苄(2.5 g, 0.020 mol), 继续反应 2 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 3:1 为展开剂]检测反应基本完全. 抽滤, 取滤液加水 50 mL, 水相用乙酸乙酯(50 mL $\times$ 3)萃取, 合并乙酸乙酯层, 然后用水(50 mL $\times$ 2)洗涤后, 经无水硫酸钠干燥, 减压回收乙酸乙酯后得无色油状物 4.3 g, 产率 63.0%, 直接投下步反应.

3.2.6 4-羟基-2-苄基-*N*-(3-三氟甲基苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**5b**)的合成

在 250 mL 三颈瓶中依次加入 4-羟基-2-苄基-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-羧酸甲酯-1,1-二氧化物(3.0 g, 0.0083 mol)、间三氟甲基苯胺(1.5 g, 0.0090 mol)和二甲苯(40 mL)回流反应 24 h. TLC [V (氯仿): V (甲醇) = 15:1 为展开剂]检测反应基本完全. 温度降至室温析出固体, 抽滤, 用丙酮重结晶, 得白色晶体 4-羟基-2-苄基-*N*-(3-三氟甲基苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物 1.2 g, 产率 46.5%. m.p. 242.3~245.0 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.56 (s, 1H, OH), 8.17 (s, 1H, ArH), 8.11 (d, $J=8.4$ Hz, ArH), 7.76 (d, $J=6.8$ Hz, 1H, ArH), 7.73 (dt, $J=1.2, 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.67~7.62 (m, 2H, ArH), 7.59~7.54 (m, 2H, ArH), 7.02~6.98 (m, 1H, ArH), 6.97~6.92 (m, 4H, ArH), 4.60 (s, 2H, NCH_2Ph); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.4, 159.4, 138.0, 137.1, 132.6, 132.4, 131.7, 130.0, 129.7, 129.5, 129.0, 127.9, 127.8, 127.3, 125.7, 125.4, 122.7, 118.3, 107.3, 55.5; IR (KBr) ν : 3329.7, 3072.3, 3031.7, 1639.1, 1610.9, 1544.9, 1491.9, 1447.4, 1338.7, 1235.2, 1177.2, 1122.6, 1065.9, 1019.0, 883.7, 825.4, 800.6, 757.0, 705.0 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M}^+ + \text{H}$) 475.0934, found 475.0934.

用类似的方法制得化合物 **6b**~**10b**.

4-羟基-2-苄基-*N*-(3-甲基苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**6b**): 白色固体, 产率 34.3%. m.p. 222.0~224.1 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 14.06 (s, 1H, NH), 10.24 (s, 1H, OH), 7.75 (d, *J*=7.6 Hz, 1H, ArH), 7.69 (t, *J*=7.2 Hz, 1H, ArH), 7.62 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, ArH), 7.57~7.53 (m, 3H, ArH), 7.28 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, ArH), 7.03~7.00 (m, 2H, ArH), 6.97~6.90 (m, 4H, ArH), 4.58 (s, 2H, NCH₂Ph), 2.34 (s, 3H, PhCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.0, 159.1, 137.8, 137.1, 136.9, 132.5, 132.3, 131.3, 129.8, 128.4, 127.9, 127.4, 125.6, 122.6, 119.3, 107.3, 55.4, 21.1; IR (KBr) *v*: 3493.6, 3329.9, 3060.8, 2982.2, 2934.9, 1631.2, 1594.2, 1541.3, 1500.9, 1444.1, 1405.6, 1341.0, 1289.4, 1256.0, 1223.2, 1178.5, 1159.8, 1121.9, 1064.1, 1035.1, 874.4, 844.9, 758.0, 707.9 cm⁻¹. HRMS calcd for C₂₃H₂₁N₂O₄S (M⁺+H) 421.1217, found 421.1221.

4-羟基-2-苄基-*N*-(2-氯-4-硝基苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**7b**): 黄色固体, 产率 38.3%. m.p. 238.3~240.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.97 (s, 1H, OH), 8.45 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, ArH), 8.30 (dd, *J*=2.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.23 (d, *J*=9.2 Hz, 1H, ArH), 7.76 (d, *J*=7.2 Hz, 1H, ArH), 7.70 (t, *J*=7.2 Hz, 1H, ArH), 7.65~7.58 (m, 2H, ArH), 7.02~6.95 (m, 5H, ArH), 4.69 (s, 2H, NCH₂Ph); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.2, 159.4, 138.8, 137.1, 132.6, 132.4, 131.2, 130.5, 129.9, 128.0, 127.4, 127.3, 125.7, 124.4, 122.7, 121.2, 120.6, 107.2, 55.4; IR (KBr) *v*: 3341.8, 3095.3, 1647.8, 1585.4, 1551.1, 1513.7, 1404.5, 1345.2, 1267.2, 1176.8, 1111.3, 1002.1, 892.9, 746.3, 705.7 cm⁻¹. HRMS calcd for C₂₂H₁₇ClN₃O₆S (M⁺+H) 486.0521, found 486.0523.

4-羟基-2-苄基-*N*-(3-氯-4-氟苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**8b**): 白色固体, 产率 36.0%. m.p. 235.8~237.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.75 (s, 1H, NH), 10.48 (s, 1H, OH), 8.02 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, ArH), 7.75 (d, *J*=7.2 Hz, 2H, ArH), 7.70 (t, *J*=7.2 Hz, 1H, ArH), 7.63 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, ArH), 7.57 (d, *J*=7.6 Hz, 1H, ArH), 7.46 (t, *J*=9.2 Hz, 1H, ArH), 7.01~6.94 (m, 5H, ArH), 4.58 (s, 2H, NCH₂Ph); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.2, 159.4, 138.8, 137.1, 132.6, 132.4, 131.2, 130.5, 129.9, 128.0, 127.4, 127.3, 125.7, 124.4, 122.7, 121.2, 120.6, 107.2, 55.4; IR (KBr) *v*: 3329.2, 3068.3, 1605.4, 1535.7, 1497.7, 1445.5, 1399.9, 1341.1, 1262.2, 1210.6, 1179.5, 1061.0, 1012.3, 827.0, 759.3, 705.4 cm⁻¹. HRMS calcd for C₂₂H₁₇ClFN₂O₄S

(M⁺+H) 459.0576, found 459.0576.

4-羟基-2-苄基-*N*-(3-氯苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**9b**): 白色固体, 产率 49.0%. m.p. 248.5~251.8 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.79 (s, 1H, NH), 10.45 (s, 1H, OH), 7.91 (d, *J*=1.6 Hz, 1H, ArH), 7.80 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, ArH), 7.67 (t, *J*=7.5 Hz, 1H, ArH), 7.61 (d, *J*=6.9 Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, ArH), 7.43 (t, *J*=8.1 Hz, 1H, ArH), 7.26 (d, *J*=8.1 Hz, 1H, ArH), 6.98~6.92 (m, 5H, ArH), 4.57 (s, 2H, NCH₂Ph); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.8, 159.8, 139.1, 137.6, 133.3, 133.1, 132.9, 131.6, 130.7, 130.5, 128.5, 127.8, 126.2, 125.0, 123.2, 122.0, 120.8, 107.7, 55.9; IR (KBr) *v*: 3464.8, 3336.6, 3067.1, 2960.7, 1633.3, 1587.0, 1539.0, 1474.8, 1411.9, 1377.6, 1337.4, 1247.8, 1175.5, 1068.4, 872.1, 815.9, 766.2 cm⁻¹. HRMS calcd for C₂₂H₁₈ClN₂O₄S (M⁺+H) 441.0670, found 441.0665.

4-羟基-2-苄基-*N*-(3-溴苯基)-2*H*-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(**10b**): 白色固体, 产率 39.6%. m.p. 245.4~248.2 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.78 (s, 1H, NH), 10.44 (s, 1H, OH), 8.05 (s, 1H, ArH), 7.82~7.78 (m, 1H, ArH), 7.77 (dd, *J*=1.2, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.72 (dd, *J*=1.5, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.68 (dd, *J*=1.5, *J*=1.5 Hz, 1H, ArH), 7.63 (dd, *J*=1.5, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.58 (dd, *J*=0.9, 1.2 Hz, 1H, ArH), 6.95 (s, 2H, ArH), 6.93 (s, 2H, ArH), 4.58 (s, 2H, NCH₂Ph); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.2, 159.3, 137.1, 134.3, 132.6, 132.4, 131.1, 130.0, 128.0, 127.7, 127.3, 125.7, 123.8, 122.7, 122.5, 122.4, 119.1, 118.8, 116.8, 116.5, 107.7, 55.5; IR (KBr) *v*: 3336.3, 3067.2, 2960.6, 1633.3, 1586.8, 1534.7, 1377.3, 1337.8, 1247.5, 1175.6, 1068.4, 872.1, 815.3, 766.0 cm⁻¹. HRMS calcd for C₂₂H₁₈BrN₂O₄S (M⁺+H) 485.0165, found 485.0162.

3.3 体外抗肿瘤实验测定

该实验以吉非替尼为阳性对照, 采用 MTT 法测化合物 **5a**~**11a**, **6b**~**11b** 体外抗肿瘤活性: 取对数生长期的人 A549, HL60, A431 和 MDA-MB-468 肿瘤细胞, 分别以 2×10⁴ 个/mL 细胞密度接种于 96 孔培养板中, 100 μL/孔, 每种细胞各种 4 块板. 置 37 °C, 5% CO₂ 孵箱内培养 12 h. 吸弃上清液, 然后分别加入 200 μL 不同浓度的待测化合物, 同时设阳性对照药组和空白细胞对照组, 每组设 4 个复孔. 培养 72 h 后, 再加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL/孔, 继续培养 4 h 后弃上清液, 加入 DMSO 150 μL/孔, 微振荡器上振荡 10 min, 将试剂对照调零, 用自动酶标仪在 550 nm 波长处测出细胞对照组和各药

物组的OD值, 取各组均值, 重复实验3次. 以下面的公式计算各组药物对细胞的抑制率, 同时计算 IC_{50} 值^[23].

$$IR = (1 - \text{药物组 OD 值} / \text{细胞对照组 OD 值}) \times 100\%$$

3.4 分子模拟研究

本文中使用的受体(2ITO)来自PDB数据库, 通过使用Autodock对2ITO晶体结构进行了优化, 去除了最初的X-ray结构中的配体gefitinib、水分子和加氢, 同时对其力场进行了优化. 通过Chembio 3D对配体**5b**进行了能量和几何结构优化. 最后使用MOE软件完成Docking过程, 得到**5b**和优化后的2ITO相互作用2D图及通过Discovery studio2.5软件获得**5b**和优化后的2ITO相互作用3D图.

辅助材料(Supporting Information) 所有目标化合物的IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS和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] Zhao, X.; Guo, C.-B.; Zhou, H. *Chin. J. Med. Chem.* **2010**, 20(5), 442 (in Chinese).
(赵欣, 郭长彬, 周化, 中国药物化学杂志, **2010**, 20(5), 442.)
- [2] Levitzki, A.; Klein, S. *Mol. Aspects Med.* **2010**, 31(4), 287.
- [3] Curigliano, G. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, 38(4), 303.
- [4] Hoelder, S.; Clarke, P. A.; Workman, P. *Mol. Oncol.* **2012**, 6(2), 155.
- [5] Peter, W. A. *Prog. Drug Res.* **2011**, 67, 175.
- [6] Chiranjeevi, S.; Ricardo, M. P.; Sahar, A.; Vahid, E.; Glenn, B.; Steve, J.; James, R. R.; Joel, M. G.; Mark, A. P. *Neurobiol. Dis.* **2011**, 42(3), 496.
- [7] Mirzoeva, O. K.; Hann, B.; Hom, Y. K.; Debnath, J.; Aftab, D.; Shokat, K.; Korn, W. M. *J. Mol. Med.* **2011**, 89(9), 877.
- [8] Serova, M.; Gramont, A.; Raballand, A. T.; Santos, C. D.; Riveiro, M. E.; Slimane, K.; Faivre, S.; Raymond, E. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, 71(5), 1297.
- [9] Coussens, L. M.; Werb, Z. *Nature* **2002**, 420, 860.
- [10] Chon, E.; McCartan, L.; Kubicek, L. N.; Vail, D. M. *Vet. Comp. Oncol.* **2012**, 10(3), 184.
- [11] Groot, D. J. A.; Vries, E. G. E.; Groen, H. J. M.; Jong, S. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2007**, 61(1), 52.
- [12] Ye, W. F.; He, C. F.; Li, J. M.; Xu, Q. L. *Chin. J. New Drugs* **2013**, 22(23), 2765 (in Chinese).
(叶文峰, 何从发, 李家明, 许勤龙, 中国新药杂志, **2013**, 22(23), 2765.)
- [13] Zhang, N.; Tao, K. X.; Huang, T. *J. Huazhong Univ. Sci. Med.* **2007**, 27(4), 399.
- [14] Naruse, T.; Nishida, Y.; Ishiguro, N. *Biomed. Pharmacother.* **2007**, 61(6), 338.
- [15] Khalid, A.; Hamid, L. S.; Umar, F. R.; Saeed, A.; Masood, P. *Acta Crystallogr., Sect. E* **2010**, E66, o862.
- [16] Ahmad, I.; Abdullah, D. A. J. *Saudi Chem. Soc.* **2012**.
- [17] Liechti, C.; Sequin, U.; Bold, G.; Furet, P.; Meyer, T.; Traxler, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39(1), 11.
- [18] Yuan, M.; Li, J. M.; He, G. W.; Zhong, G. C.; Zhang, Y. C. *Acta Pharm. Sinica* **2013**, 48(6), 874 (in Chinese).
(袁明, 李家明, 何广卫, 钟国琛, 张艳春, 药学报, **2013**, 48(6), 874.)
- [19] Wang, J.; Wu, H.; Li, J. M.; Xu, Q. L.; He, G. W.; Zhong, G. C.; Zhang, Y. C. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, 33, 1026 (in Chinese).
(王杰, 邬皓, 李家明, 许勤龙, 何广卫, 钟国琛, 张艳春, 有机化学, **2013**, 33, 1026.)
- [20] Jane, W.; David, L.; Jeff, C.; Gabriel, M.; James, G.; Michael, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20(5), 1604.
- [21] Schapira, C.; Perillo, I. A.; Lamdan, S. J. *Heterocycl. Chem.* **1980**, 17, 1281.
- [22] Rasmussen, C. R. *J. Org. Chem.* **1974**, 39(11), 1554.
- [23] Datki, Z.; Juhasz, A.; Galfi, M.; Soos, K.; Papp, R.; Zadori, D.; Penke, B. *Brain Res. Bull.* **2003**, 62(3), 223.

(Qin, X.)