

具更佳成药性的新型三氮烯化合物的设计、合成及抗癌活性研究

许芹芳^a 胡健灵^a 刘园林^a 张超^a 李明月^a
彭姝羚^a 刘志军^{a,b} 陈河如^{*,a,c,d}^(a) 暨南大学药学院中药及天然药物研究所 中药现代化与创新药物研究国际合作联合实验室 广州 510632)^(b) 广州药本君安医药科技股份有限公司 广州 510663)^(c) 广东省中药药效物质基础及创新药物研究重点实验室 广州 510632)^(d) 暨南大学生物活性分子与成药性优化全国重点实验室 广州 510632)

摘要 以 4-氨基苯甲酸为原料, 经重氮化反应后与甲基烷基胺反应构建三氮烯骨架, 随后将羧基与 2-二乙氨基乙醇缩合, 合成了 11 个 1-(4-(N-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)苯基-3-甲基-3-烷基(R²)三氮烯化合物 1-(4-(N-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-环己基三氮烯(**6a**)~1-(4-(N-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-(4-硝基)苄基三氮烯(**6k**), 3 步反应的总收率为 46.5%~68.3%。噻唑蓝(MTT)比色法检测发现, **6a**、1-(4-(N-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-苄基三氮烯(**6e**)~1-(4-(N-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-(4-甲氧基)苄基三氮烯(**6j**)对人肝癌细胞(HepG-2)、大鼠胶质瘤细胞(C6)、人结肠癌细胞(SW620)、人前列腺癌细胞(PC-3)、小鼠黑色素瘤细胞(B16)和人非小细胞肺癌细胞(A549)共六株肿瘤细胞都有良好的抗肿瘤活性, 显示出广谱的抗癌特性; 其中, 1-(4-(N-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-(4-氯)苄基三氮烯(**6g**)的抗癌活性最为突出, 对 C6、SW620、PC-3 和 B16 的 IC₅₀ 值均小于 10 μmol/L, 抗癌活性远优于阳性对照药达卡巴嗪。研究发现, 当 R² 为具有适当吸电子效应的芳基时, 化合物的抗癌活性较高。药物安全性评价发现, **6e**、**6g**、1-(4-(N-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-(4-氯)苄基三氮烯(**6h**)对 C6、SW620、PC-3, **6g**~1-(4-(N-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-(4-甲氧基)苄基三氮烯(**6i**)对 B16, **6e**、**6h**、**6i** 对 HepG-2, **6i** 对 C6、SW620, 其安全指数(SI)均大于 2.0, 其安全性高于达卡巴嗪。化合物 **6e**、**6g**~**6i** 的油水分系数(log P)为 3.0~4.0, 具有较高的膜渗透性。所有数据证实, 新型三氮烯化合物 **6e**、**6g**~**6i** 具有更佳的成药性。

关键词 三氮烯; 抗肿瘤; 药物安全性评价; 成药性; 药物设计合成

Design, Syntheses of Novel Triazenes with Better Druggability and the Investigation on Their Anti-tumor Activities

Xu, Qinfang^a Hu, Jianling^a Liu, Yuanlin^a Zhang, Chao^a Li, Mingyue^a
Peng, Shuling^a Liu, Zhijun^{a,b} Chen, Heru^{*,a,c,d}^(a) International Cooperative Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization and Innovative Drug Development of Chinese Ministry of Education, Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632)^(b) Guangzhou PharmCherub Medical Sci. & Tech. Incorporated Corporation, Guangzhou 510663)^(c) Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and New Drugs Research, Jinan University, Guangzhou 510632)^(d) State Key Laboratory of Bioactive Molecules and Druggability Assessment, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract Eleven novel 1-(4-(N-(2-diethylamino)ethyl)aminoformoxyl)phenyl-3-methyl-3-alkyl (R²) triazenes have been designed and synthesized. Firstly, 4-aminobenzoic acid, as starting material, underwent diazo reaction following the reaction with methyl alkylamine to build the triazene scaffold. Condensation of carboxylic group with 2-diethylaminoethylamine resulted in all the title compounds. The overall yield of these 3-step reactions was between 46.5% and 68.3%. By using 3-(4,5-

* Corresponding author. E-mail: thrchen@jnu.edu.cn

Received November 22, 2023; revised December 20, 2023; published online January 18, 2024.

Project supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2021A1515011238).

广东省自然科学基金(No. 2021A1515011238)资助项目。

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, 1-(4-(*N*-(2-diethylamino)ethyl)aminoformoxyl)phenyl-3-methyl-3-cyclohexyltriazene (**6a**), 1-(4-(*N*-(2-diethylamino)ethyl)aminoformoxyl)phenyl-3-methyl-3-phenyltriazene (**6e**)~1-(4-(*N*-(2-diethylamino)ethyl)aminoformoxyl)phenyl-3-methyl-3-(4-methoxy)benzyltriazene (**6j**) were confirmed as good broad-spectrum anti-cancer agents against human liver cancer cells (HepG-2), rat glioma cells (C6), human colon cancer cells (SW620), human prostate cancer cells (PC-3), murine melanoma cells (B16), and human non-small-cell lung cancer cells (A549). Among them, 1-(4-(*N*-(2-diethylamino)ethyl)aminoformoxyl)phenyl-3-methyl-3-(4-chloro)phenyltriazene (**6g**) showed as the most active agent, where IC₅₀ values of **6g** against C6, SW620, PC-3, and B16 cell lines are less than 10 μmol/L, which is far better than the positive dacarbazine. It was found that when R² is aryl group with appropriate electron-withdrawal intensity, the triazene will have good even excellent anti-cancer activity. Through drug safety evaluation, the safety indexes (SI) of **6e**, **6g**, and 1-(4-(*N*-(2-diethylamino)ethyl)aminoformoxyl)phenyl-3-methyl-3-(4-chloro)benzyltriazene (**6h**) against C6, SW620, and PC-3 cell lines, respectively; **6g**, **6h**, and 1-(4-(*N*-(2-diethylamino)ethyl)aminoformoxyl)phenyl-3-methyl-3-(4-methoxy)phenyltriazene (**6i**) against B16 cell line respectively; **6e**, **6h**, and **6i** against HepG-2 cell line respectively; **6i** against C6, and SW620 cell lines, respectively; were identified more than 2.0, implied better drug safety than dacarbazine. The partition coefficient (lg *P*) of **6e**, **6g**~**6i** lied between 3.0 and 4.0, meaning good membrane permeability. All the data support that the novel triazenes **6e**, **6g**~**6i** have better druggability.

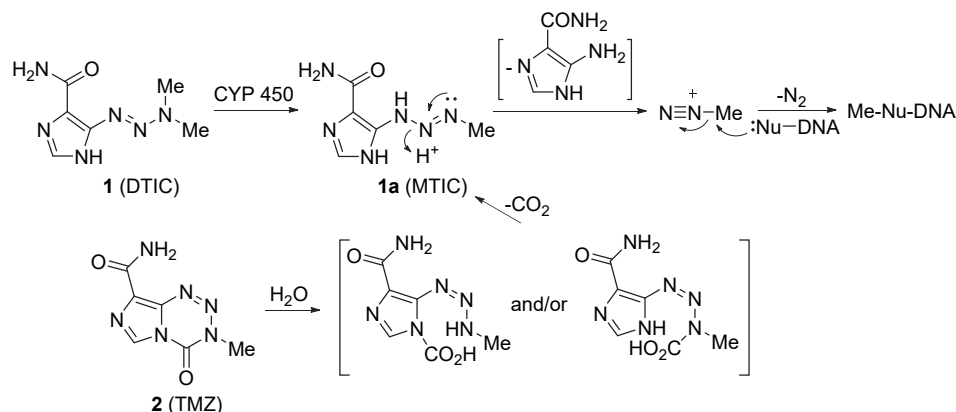
Keywords triazenes; anti-cancer; drug safety evaluation; druggability; drug design-synthesis

三氮烯类化合物又称重氮氨基化合物,是指含有 N=N—N 结构的一类化合物。1862 年, Griess^[1]首次合成了三氮烯。随后,由于三氮烯良好的生物活性和结构特性而逐渐在医药、食品添加剂、染料等行业得到广泛应用^[2]。科学家们很早就注意到了三氮烯类化合物的抗癌活性。例如, 1955 年, Clarke 等^[3]报道了 3,3-二甲基-1-苯基三氮烯对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 的抑制作用; 1962 年, Shealy 等^[4]合成了 5-(3,3-二甲基-1-三氮烯)咪唑-4-甲酰胺(**1**, Scheme 1), 6 年后以商品名达卡巴嗪(Dacarbazine, DTIC)上市,成为临床上用于治疗恶性黑色素瘤的首选药物^[5]; 1979 年, Ege 等^[6]报道了咪唑啉四嗪酮化合物的合成方法,利用该方法将 2-重氮基咪唑酰胺与甲基异氰酸酯反应,得到 3-甲基-4-氧代-3,4-二氢咪唑[5,1-*d*]-[1,2,3,5]四嗪-8-甲酰胺(**2**, Scheme 1)。这个化合物后来被证实具有广谱抗癌活性,口服后完全吸收,并有广泛的组织分布^[7]。1999 年,该化合物被美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市,商品名为替莫唑胺(Temozolomide, TMZ),作为与放射治疗联合治疗脑瘤的一线用药。

达卡巴嗪和替莫唑胺都是由氨基咪唑甲酰胺转化

而来。如 Scheme 1 所示,在它们的抗癌作用机制中,都产生了氨基咪唑甲酰胺。该化合物是生物合成嘌呤的前体,可能对嘌呤的生物合成具有干扰作用^[8];当然它们都能产生甲烷化剂,发挥甲基化作用^[7-10]。作为三氮烯类临床药物,DTIC 和 TMZ 都伴随有嗜睡、呕吐、头痛、疲劳等副作用,因此,还需要不断对三氮烯类化合物进行优化和改进^[11-12]。

为了克服单功能甲烷化剂的缺点,近年来,科学家们将甲基三氮烯结构单元与生物活性分子组合成为“联合分子”,以增强肿瘤细胞对烷化剂的敏感性,从而增强其细胞毒性,达到增强化疗效果的目的^[13]。例如,将 EGFR TK 抑制剂 6-氨基-4-(3-甲基苯)氨基咪唑啉(SMA52)经重氮化后与甲胺反应,得到 1-(4-(间甲基苯)氨基-6-咪唑啉基)-3-甲基三氮烯(SMA41),该化合物分解后得到 EGFR TK 抑制剂 SMA52 和甲基重氮化物烷化剂,显示出优于替莫唑胺的体内外抗癌活性^[14]。研究表明,酪氨酸酶在黑色素瘤中过度表达,*N*-酰基酪氨酸是酪氨酸酶的一种很好的底物,基于此,Monteiro 等^[15]合成了一系列 *N*-酰基酪氨酸三氮烯前药化合物,这些化合物在酪氨酸酶存在的条件下可分解生成三氮烯,从



图式 1 达卡巴嗪和替莫唑胺的化学结构及抗癌机制

Scheme 1 Chemical structures of dacarbazine and temozolomide together with their anti-tumor mechanism

而抑制黑色素瘤细胞. 龙跃课题组^[16]利用拼合原理, 将三氮烯结构与生物活性优势结构 1,3,4-噁二唑相拼合, 合成系列新型三氮烯类化合物, 筛选出对前列腺癌 PC-3 细胞的抑制作用优于 DTIC 的化合物; 依照同样的策略, 该课题组随后进一步设计合成了 1,2,4-三唑三氮烯衍生物^[12]、1,3,4-噁二唑三氮烯类衍生物^[17]和 1,3,4-噁二唑三氮烯酰胺衍生物^[18], 发现了一些有特色的抗癌化合物.

本研究中, 作者认为重氮甲基化剂性质上相当活泼, 容易猝灭, 导致药物的临床使用剂量偏高. 更重要的是, 由于甲基化同时也是生命过程中一种重要的表观遗传修饰方式, 生命体通过在 DNA 分子上添加甲基基团来调节基因表达, 从而影响细胞的分化和发育^[19]. 显然, 通过甲基化作用达到抗癌效果不可避免地会带来副作用. 另外, DTIC 和 TMZ 的亲水性偏高. 因此, 本研究将报道具有较佳亲油亲水特性、安全指数较高、抗癌活性较好的一类新型三氮烯类化合物的设计合成以及抗癌活性研究.

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的设计合成

从达卡巴嗪和替莫唑胺的结构可以看到, 3,3-二甲基三氮烯是其产生抗癌作用的必需结构. 因此, 本研究首先利用 3,3-二甲基三氮烯结构模型寻找最佳的咪唑甲酰胺替代结构, 合成途径如 Scheme 2 所示.

1-(4-酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯类化合物 **4a~4k** 的合成采用对氨基苯甲酸作为起始原料, 经重氮化后直接与二甲胺反应, 生成 4-(3,3-二甲基)三氮烯基苯甲酸 (**3**). 该化合物用乙醇重结晶纯化后为橘黄色固体, 反应收率为 89.4%. 化合物 **3** 在合适缩合剂的作用下与相应的胺或醇缩合, 以 79%~87% 的收率获得化合物 **4a~4k**. 本研究中, 通常采用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)

碳二亚胺(EDCI)或 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)作为缩合剂, 同时用二异丙基乙氨(DIPEA)作为缚酸剂.

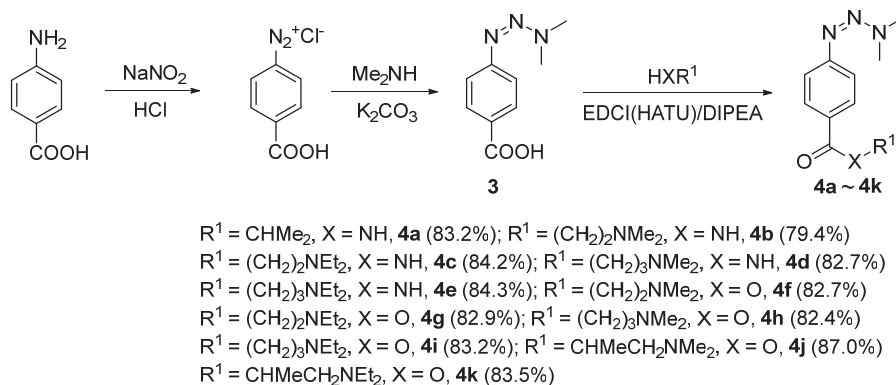
通过建立噻唑蓝(MTT)比色法检测化合物 **4a~4k** 对多种肿瘤细胞株的增殖抑制作用, 发现 **4c** 的抑制作用最优, 远优于阳性对照药 DTIC. 因此, 本研究中, 决定用 4-(*N*-(2-二乙基氨基)乙基)甲酰胺基苯替代 DTIC 中的甲酰胺咪唑. 由此, 本研究设计合成了系列目标化合物 **6a~6k**, 其合成途径如 Scheme 3 所示.

1-(4-(2-二乙基氨基)乙基)氨基甲酰基)苯基-3-甲基-3-烷基三氮烯类化合物 **6a~6k** 的合成与化合物 **4a~4k** 相似. 略有不同的是, 第 2 步用甲基烷基胺替代二甲胺. 通常, 当 R^2 为供电子基团时, 由于能增加 N 的电子云密度, 反应收率都较高, 比如 **5a**、**5c**、**5h**、**5i** 和 **5j** 的反应收率均大于 80%; 相反, 当 R^2 为吸电子基团时, 反应收率较低. 比如 **5d** 和 **5g**. 第 3 步为缩合反应, 除了 **6a** 具有较高的收率(85.1%), 其它产物(**6b~6k**)的收率落在 70%~76% 范围内, 比 **4c** 的收率(84.2%)低. 说明 R^2 基团对苯环对位羧基的缩合反应具有一定的影响, 作者认为主要是通过空间效应施加影响.

1.2 抗癌活性及构效关系

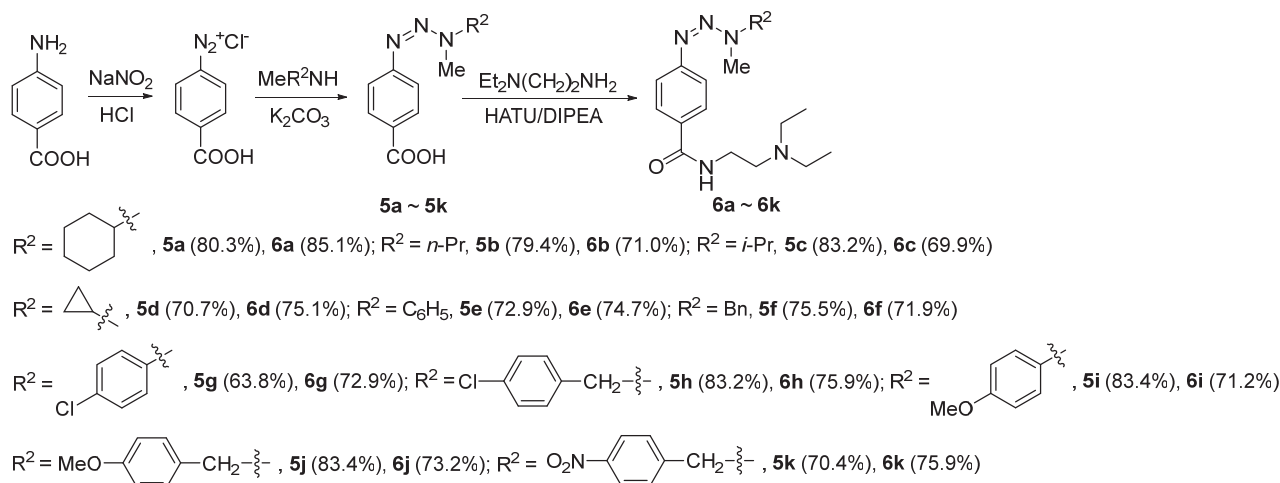
通过 MTT 法对化合物的抗癌活性进行了检测. 文献^[20]报道达卡巴嗪在黑色素瘤细胞株 B16-F1、A875 和 SK-MEL-5 中的半抑制常数(IC_{50})分别为(259.5 ± 22.7)、(287.1 ± 20.9)和(380.2 ± 29.8) $\mu\text{mol/L}$, 因此, 本研究选择 500.0 和 166.7 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度对化合物 **4a~4k** 的肿瘤增殖抑制活性进行检测, 以确定最佳的 XR^1 结构, 结果见表 1.

从表 1 可以看到, 在孵育 24 h 条件下, 化合物对不同肿瘤细胞株的抑制率各不相同. 即使浓度高达 500 $\mu\text{mol/L}$, 只有化合物 **4a** 和 **4c** 对人肝癌细胞(HepG-2)的抑制率大于 50%, 分别为 50.8%和 63.4%; 在浓度为



图式 2 1-(4-酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯的合成

Scheme 2 Syntheses of 1-(4-acyl)phenyl-3,3-dimethyltriazenes
Number in brackets is reaction yield.

图式 3 1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)苯基-3-甲基-3-烷基(R^2)三氮烯的合成

Scheme 3 Syntheses of 1-(4-(*N*-(2-diethylamino)ethyl)aminoformoxyl)phenyl-3-methyl-3-alkyl(R^2)triazenes
 Number in brackets is reaction yield.

表 1 化合物 4a~4k 对 6 株肿瘤细胞的增殖抑制率(孵育 24 h)^a**Table 1** Growth inhibition rates of compounds 4a~4k against 6 cancer cell lines (24 h incubation)

Cell line	Inhibition rate/%										
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4h	4i	4j	4k
HepG-2	50.8	27.3	63.4	18.6	45.1	32.2	28.2	37.7	−8.2	1.8	−8.3
	36.2	13.4	50.3	5.3	22.7	23.8	8.6	8.9	−2.4	7.1	−2.5
MDA-MB-231	−22.5	15.8	17.8	−0.4	14.1	28.1	16.1	26.4	14.8	14.5	1.2
	−47.5	−1.1	1.2	−8.3	23.5	17.5	9.6	5.3	−19.3	−7.2	−11.6
PC-3	36.9	5.5	−16.2	7.1	−18.8	−17.1	−16.5	17.4	1.9	18.7	19.7
	32.1	9.3	2.3	−1.4	11.5	−10.0	−21.0	6.5	−8.8	2.4	−2.0
SW620	−20.7	13.0	5.4	0.9	6.5	−13.8	−9.3	15.1	11.1	3.4	21.8
	−17.5	6.5	−5.0	0.0	2.2	−6.8	5.0	17.8	−3.3	−3.3	2.9
U87	42.4	17.9	39.0	16.2	19.1	17.1	−43.6	19.2	8.4	17.9	17.1
	16.9	7.7	28.4	−15.4	13.2	1.5	−29.0	−16.6	6.0	−9.1	−12.1
A375	14.3	28.2	9.9	8.1	18.3	11.5	39.1	36.8	29.4	3.7	6.4
	−7.3	2.6	5.8	0.0	−3.9	−8.2	15.6	14.3	16.7	−18.4	2.8

^a In each line, data above are the inhibition rates of 500 $\mu\text{mol/L}$, below are the inhibition rates of 166.7 $\mu\text{mol/L}$.

166.7 $\mu\text{mol/L}$, 只有化合物 **4c** 对 HepG-2 的抑制率大于 50%, 为 50.3%。其它化合物对 6 株肿瘤细胞的抑制率均很低, 有不少化合物的抑制率为负值, 意味着可能有促肿瘤细胞增殖的作用。更进一步的实验揭示, 化合物 **4c** 在孵育时间为 24 h 时, 对 HepG-2 的 IC_{50} 值为 (169.45 ± 3.90) $\mu\text{mol/L}$; 在孵育时间为 48 h 时, 对人神经胶质瘤细胞(U87)的 IC_{50} 值为 (92.32 ± 13.42) $\mu\text{mol/L}$ 。经综合研究, 作者认为在本实验所考察的范围内, XR^1 的最优结构为 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NEt}_2$ 。

利用 MTT 法考察了目标化合物 **6a~6k** 对人肝癌细胞(HepG-2)、大鼠胶质瘤细胞(C6)、人结肠癌细胞(SW620)、人前列腺癌细胞(PC-3)、小鼠黑色素瘤细胞(B16)、人非小细胞肺癌细胞(A549)共 6 株常见的肿瘤细胞株的增殖抑制活性, 实验结果见表 2 和 3。

从表 2 和表 3 的实验结果来看, 阳性对照药 DTIC 在所考察的 6 株肿瘤细胞中的 IC_{50} 值均大于 200 $\mu\text{mol/L}$, 说明重氮甲基烷化剂性质活泼, 容易猝灭。一般而言, 同一化合物在同一株肿瘤细胞中孵育 24 h 的 IC_{50} 值要大于孵育 48 h 的 IC_{50} 值, 也有些例外。说明三氮烯型烷化剂对不同的细胞株有不同的最佳作用时间。作者同样发现, 同一化合物在不同肿瘤细胞株中的增殖抑制活性也各不相同, 反映出各种类型肿瘤细胞的特异性。

作者认为, 本文所设计合成的新型三氮烯化合物的抗癌机制与 DTIC 类似, 具体如 Scheme 4 所示, 这一机制与表 2 和表 3 所揭示的实验结果一致。

由表 2 和表 3 可以看到, 当 R^2 为 *n*-Pr、*i*-Pr 和 *c*-Pr(环丙基)时, 其所构成的三氮烯(**6b~6d**)的 IC_{50} 值均大于 200 $\mu\text{mol/L}$, 显然, 这些基团所产生的烷化剂($^+\text{N}_2\text{R}^2$)与

表 2 化合物 6a~6k 对 6 株肿瘤细胞的增殖抑制活性(孵育 24 h)

Table 2 Growth inhibition activities of compounds 6a~6k against 6 cancer cell lines (24 h incubation)

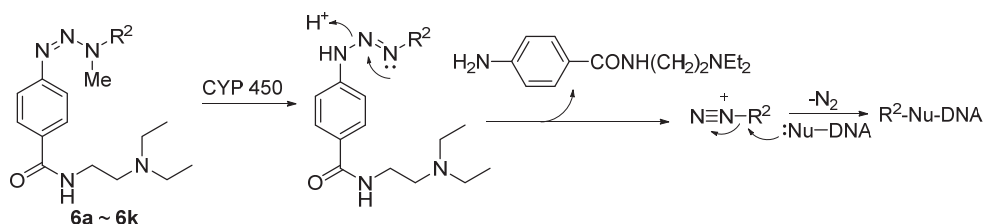
细胞株	IC ₅₀ ^a /(μmol·L ⁻¹)											
	DTIC	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g	6h	6i	6j	6k
HepG-2	>200 ^b	86.7±1.5	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	45.4±2.9	100~200	21.6±2.9	45.1±1.6	100~200	100~200	>200 ^b
C6	>200 ^b	31.4±1.2	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	4.2±1.5	28.2±0.9	3.6±2.1	20.5±1.5	31.9±7.1	27.1±2.3	>200 ^b
SW620	>200 ^b	20.4±0.4	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	12.1±0.4	23.0±2.6	5.8±0.6	13.4±3.8	35.1±8.5	42.9±0.9	>200 ^b
PC-3	>200 ^b	32.2±7.5	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	5.8±0.9	60.6±2.2	7.0±0.3	36.4±0.8	100~200	90.8±1.3	>200 ^b
B16	>200 ^b	64.4±6.2	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	100~200	53.6±3.6	9.4±0.1	13.8±3.1	10.5±0.4	16.8±0.4	>200 ^b
A549	>200 ^b	100~200	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	33.8±4.6	100~200	13.7±1.6	39.5±1.4	74.4±2.1	>200 ^b	>200 ^b

^a Data are the mean of four independent experiments; ^b 200 μmol/L is the highest concentration tested.

表 3 化合物 6a~6k 对 6 株肿瘤细胞的增殖抑制活性(孵育 48 h)

Table 3 Growth inhibition activities of compounds 6a~6k against 6 cancer cell lines (48 h incubation)

细胞株	IC ₅₀ ^a /(μmol·L ⁻¹)											
	DTIC	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g	6h	6i	6j	6k
HepG-2	>200 ^b	22.6±3.4	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	20.3±4.1	31.1±1.0	14.1±2.5	23.1±3.7	41.4±5.3	53.8±1.1	>200 ^b
C6	>200 ^b	22.7±0.1	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	4.0±0.4	30.1±0.8	9.1±0.3	21.7±0.6	35.7±5.9	18.7±1.3	>200 ^b
SW620	>200 ^b	16.5±1.8	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	16.4±2.0	24.9±4.2	4.8±0.2	11.6±0.5	42.9±4.6	36.7±0.4	>200 ^b
PC-3	>200 ^b	100~200	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	4.5±0.6	29.3±1.1	5.7±0.4	28.1±1.9	100~200	49.2±1.0	>200 ^b
B16	>200 ^b	20.6±2.4	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	100~200	28.1±1.2	5.8±0.2	16.5±6.8	18.4±5.7	18.3±0.2	>200 ^b
A549	>200 ^b	57.0±4.0	>200 ^b	>200 ^b	>200 ^b	19.3±2.0	64.5±0.4	18.7±1.2	30.4±1.0	44.4±1.7	>200 ^b	>200 ^b

^a Data are the mean of four independent experiments; ^b 200 μmol/L is the highest concentration tested.

图式 4 化合物 6a~6k 的抗癌可能机制

Scheme 4 Putative anti-tumor mechanism of compounds 6a~6k

重氮甲基一样活泼, 容易猝灭, 需要较高剂量才能产生抗癌效果; 但当 R² 为环己基时例外, 其所构成的三氮烯 6a 有较好的抗癌活性, 这与重氮环己基有较合适的稳定性一致; 当 R² 为 4-取代芳基或 4-取代苄基时, 其所构成的三氮烯(6e~6j)均有较好的抗癌活性, 这个结果与 4-取代芳基或 4-取代苄基能使(⁺N₂R²)具有合适的稳定性和活泼性相关。一般而言, R² 为 4-取代芳基的三氮烯化合物比 R² 为 4-取代苄基的三氮烯化合物的抗癌活性更佳(6e>6f, 6g>6h, 6i>6j); R² 为 4-取代芳基或 4-取代苄基时, 对于 HepG-2、SW620 和 A549 细胞株, 4-位取代基为适当程度的吸电子基团的三氮烯比 4-位取代基为供电子基团的三氮烯的抗癌活性更好(6g>6e>6i, 6h>6f>6j); 当 4-取代基为强吸电子效应的基团(4-NO₂)时, 代表化合物(6k)抗癌活性变差, 对 6 株治疗细胞的 IC₅₀ 值均大于 200 μmol/L。可见, 最佳的 R² 基团必需在能使(⁺N₂R²)具有合适的活泼性和稳定性方面取得合理的平衡。

总的来说, 本文设计合成的三氮烯化合物 6a、6e~6j 对所考察的 6 株肿瘤细胞都有良好的抗肿瘤活性, 显示出广谱的抗癌特征。其中, 6g 的抗癌活性最为突出, 其对 C6、SW620、PC-3 和 B16 的 IC₅₀ 值均小于 10 μmol/L, 抗癌活性远优于阳性对照药达卡巴嗪。

1.3 药物安全性考察

人正常肝细胞(LO2)经常被用来评价药物的潜在肝毒性^[21-22]。本文通过 MTT 法检测代表性化合物对 LO2 细胞的半抑制浓度, 并将其定义为半毒性浓度(TC₅₀), 测定结果见表 4。

表 4 代表性化合物对人正常肝细胞(LO2)的 TC₅₀ 值^aTable 4 TC₅₀ values of the representative compounds against human normal hepatoma cell (LO2)

t/h	TC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)				
	DTIC	6e	6g	6h	6i
24	382.4±2.7	54.4±1.1	21.5±0.3	77.4±1.5	159.8±0.3
48	366.9±2.7	34.1±1.2	15.4±3.2	62.9±2.5	156.6±3.2

^a Data are the mean of four independent experiments.

从表 4 可以看到, 阳性药 DTIC 对 LO2 细胞的毒性较低, 但其对 HepG-2 肝癌细胞和其它 5 株细胞的抑制活性也较低($IC_{50} > 200 \mu\text{mol/L}$), 用药剂量大. 化合物 **6e**、**6g**~**6i** 对 LO2 细胞的毒性较高, 尤其是化合物 **6e** 和 **6g**, 其孵育 48 h 的 TC_{50} 值分别为 (34.1 ± 1.2) 和 $(15.4 \pm 3.2) \mu\text{mol/L}$, 但它们对 HepG-2 肝癌细胞和其它 5 株细胞的抑制活性也更高, 用药剂量小.

实际上, 评价药物安全性的另一个更好的指标是治疗指数(therapeutic index, TI), 它被定义为半数致死量(LD_{50})与半数有效量(ED_{50})的比值, 比值越大, 药物的安全性越高^[23-24]. 参照治疗指数, 本文定义细胞基础上的安全指数(safety index, SI), 即三氮烯化合物对 LO2 细胞的 TC_{50} 值与对相应肿瘤细胞的 IC_{50} 的比值. 将 SI 作为细胞基础上评价药物安全性的指标, 作者认为要比纯粹的 TC_{50} 更加贴近药物的治疗安全性. 一般认为, 安全指数大于 1.0, 所考察的药物可能有一个合适的安全治疗窗口, 指数越大其安全治疗窗口越宽. 几个代表性三氮烯化合物的 SI 值列于表 5 和表 6.

表 5 代表性化合物对不同肿瘤细胞孵育 24 h 的安全指数(SI)
Table 5 Safety index (SI) of the representative compounds against different tumor cells incubated for 24 h

Compd.	Safety index				
	HepG-2	C6	SW620	PC-3	B16
DTIC	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	1.5 ^a
6e	1.2	12.8	4.5	9.4	<0.2
6g	1.0	5.9	3.7	3.1	2.3
6h	1.7	3.8	5.8	2.1	5.6
6i	<0.2	5.0	4.6	<0.2	15.2

^a IC_{50} value referred to reference [20].

表 6 代表性化合物对不同肿瘤细胞孵育 48 h 的安全指数(SI)
Table 6 Safety index (SI) of the representative compounds against different tumor cells incubated for 48 h

Compd.	Safety index				
	HepG-2	C6	SW620	PC-3	B16
DTIC	<1.4	<1.4	<1.4	<1.4	1.4 ^a
6e	1.7	8.5	2.1	7.6	<0.2
6g	1.1	1.7	3.2	2.7	2.7
6h	2.7	2.9	5.4	2.2	3.8
6i	3.8	4.4	3.6	<0.2	8.5

^a IC_{50} value referred to reference [20].

由表 5 和表 6 可以看到, 除三氮烯化合物 **6e** 对 B16 细胞(不管孵育 24 h 还是 48 h)、**6i** 对 HepG-2(孵育 24 h)、**6i** 对 PC-3(不管孵育 24 h 还是 48 h)的 SI 值小于 0.2 外, 其它三氮烯化合物对所考察的肿瘤细胞株的 SI 值均大于或等于 1.0, 说明这些潜在的抗肿瘤三氮烯均有一个合适的安全治疗窗口. 与阳性对照药 DTIC 相比, 化合物 **6e**、**6g**、**6h** 对胶质瘤(C6)、结直肠腺癌(SW620)、前

列腺癌(PC-3)的安全性要高, $SI > 2.0$, 最大值为 12.8; 化合物 **6g**~**6i** 对黑色素瘤(B16)的安全性要高, $SI > 2.0$, 最大值为 15.2; 化合物 **6e**、**6h**、**6i** 对肝癌(HepG-2)的安全性要高, $SI > 2.0$, 最大值为 3.8; 化合物 **6i** 对胶质瘤(C6)、结直肠腺癌(SW620)的安全性要高, $SI > 2.0$, 最大值为 5.0.

1.4 药物油水分布系数考察

油水分布系数是指药物在水相和有机相达平衡时, 药物在有机相中的浓度和在水相中的浓度之比, 它反映了药物在水相和有机相间的迁移能力, 是描述药物在环境中行为的重要物理化学特性参数^[25]. 药物的油/水分分配系数对药物吸收的影响较大, 因为药物穿过生物膜的能力(渗透性)取决于药物的油水分配平衡.

本文采用摇瓶法^[26]结合高效液相分析法测定了几个代表性化合物的油水分布系数($\lg P$). 结果见表 7. 可以看到, 阳性对照药 DTIC 的 $\lg P$ 值为 0.3, 小于 1, 明显水溶性较大, 预测其被动扩散渗透低、吸收和脑通透性差, 可能具有很高的肾清除, 并出现细胞旁路渗透; 化合物 **6e**、**6g**~**6i** 的 $\lg P$ 值处于 3.0~4.0, 显而易见, 这些化合物水溶性较差, 但脂溶性较好, 具有较好的渗透性, 即具有较强的穿过生物膜的能力; 不过, 这类结构的化合物是否更有利于药物的吸收, 还有待进一步的实验.

表 7 几个代表性化合物的油水分布系数

Table 7 Partition coefficient of several representative compounds

Compd.	Coil phase/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Aqueous phase/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	P	$\lg P$
DTIC	205.4	112.4	1.8	0.3
6e	845.4	0.3	2633.8	3.4
6g	1539.3	0.2	7975.8	3.9
6h	1784.3	0.2	7965.7	3.9
6i	732.9	0.4	1720.4	3.2

2 结论

本研究设计合成了 11 个 1-(4-(*N*-(2-(*N,N*-二乙基)氨基)乙基)氨基甲酰基)苯基-3-甲基-3-烷基(R^2)三氮烯化合物 **6a**~**6k**. 这些化合物的合成以 4-氨基苯甲酸为原料, 重氮化反应后与甲基烷基胺反应构建三氮烯骨架, 随后将羧基与 2-二乙基氨基乙基缩合, 3 步反应的总收率为 46.5%~68.3%.

本文通过 MTT 法检测了 11 个新型三氮烯化合物的抗肿瘤活性. 发现化合物 **6a**、**6e**~**6j** 对所考察的 6 株肿瘤细胞都有良好的抗肿瘤活性, 显示出广谱的抗癌特征. 其中, 化合物 **6g** 的抗癌活性最为突出, 对 C6、SW620、PC-3 和 B16 的 IC_{50} 值均小于 $10 \mu\text{mol/L}$, 抗癌

活性远优于阳性对照药达卡巴嗪。构效关系研究揭示,当 R^2 为具有适中吸电子效应的芳基时,其代表的三氮烯抗癌活性更好。

通过安全指数评价几个代表性新型三氮烯化合物的安全性。结果揭示,与阳性对照药 DTIC 相比,化合物 **6e**、**6g**、**6h** 对胶质瘤(C6)、结直肠腺癌(SW620)、前列腺癌(PC-3)的安全性要高, $SI > 2.0$, 最大值为 12.8; 化合物 **6g**~**6i** 对黑色素瘤(B16)的安全性要高, $SI > 2.0$, 最大值为 15.2; 化合物 **6e**、**6h**、**6i** 对肝癌(HepG-2)的安全性要高, $SI > 2.0$, 最大值为 3.8; 化合物 **6i** 对胶质瘤(C6)、结直肠腺癌(SW620)的安全性要高,其 $SI > 2.0$, 最大值为 5.0。

利用摇瓶法结合反向高效液相法检测了化合物的油水分布系数。发现,该类三氮烯化合物的 $\lg P$ 值为 3.0~4.0, 属于较为亲油的化合物,具有较好的膜穿透性。其是否有利于药物的吸收,还有待进一步的研究。

以上所有的研究结果显示,本文所设计合成的新型三氮烯化合物具有更佳的成药性。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker-AV300MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); DHG-9140A 型恒温干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司); CLJBQ-3 型恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); EYELA 型旋转蒸发器(东京理化器械独资工厂); LGJ-12 冷冻干燥机(巩义市英峪予华仪器有限公司); FA2104 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司); TU-1810S 紫外分光光度计(北京普析通仪器有限公司); LC-UV100 液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司); Cosmosil 5C18-MS-II 色谱柱(Nacalai Tesque Inc., 日本); DZF-150 型小型真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对氨基苯甲酸、异丙胺、亚硝酸钠、二甲胺水溶液、EDCI、HATU、HOBt、DIPEA、所有的甲基胺基、所有的醇胺类化合物和二胺类化合物均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

二氯甲烷(DCM)加 P_2O_5 回流 3~4 h, 蒸馏备用; 乙腈、甲醇、DMSO 分别用无水碳酸钠预处理, 过夜后过滤, 上清液加 CaH_2 回流 3~4 h, 蒸馏备用。

人肝癌细胞(HepG-2)、大鼠胶质瘤细胞(C6)、人结肠癌细胞(SW620)、人前列腺癌细胞(PC-3)、小鼠黑色素瘤细胞(B16)、人非小细胞肺癌细胞(A549)、人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)、人神经胶质瘤细胞(U87)、人恶性黑色素瘤细胞(A357)、人正常肝细胞(LO2)均购于中国科学院上海细胞库。

3.2 化合物的合成

3.2.1 1-(4-酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯类化合物(**4a**~**4k**)的合成

1-(4-羧基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**3**): 称取对氨基苯甲酸 1.0 g (7.3 mmol) 于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 乙腈和 10 mL 水溶解, 随后加入 3.5 mL 浓盐酸, 将反应器置于冰浴中。将 1.0 g (14.6 mmol) 亚硝酸钠溶于少量水中, 缓慢滴加到圆底烧瓶中, 0 °C 下搅拌 2 h, 得到对羧基苯基重氮盐溶液; 另取一只 100 mL 的圆底烧瓶, 加入二甲胺水溶液 2.99 g (21.9 mmol)、碳酸钾 3.02 g (21.9 mmol) 以及少量的水, 0 °C 下将对羧基苯基重氮盐溶液缓慢滴入, 滴加完毕后于 0 °C 下反应 3~4 h, 薄层色谱(TLC)跟踪, 直至显示反应完全; 反应完毕, 用稀盐酸调节 pH 值至 2~3, 用乙酸乙酯萃取(60 mL×3), 减压旋蒸除去溶剂, 残留物用乙醇重结晶, 得橘黄色固体 1.26 g, 收率 89.4%。m.p. 175~177 °C (lit.^[27] 174~176 °C); 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.90 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.52 (s, 3H), 3.18 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.77, 153.95, 130.38, 126.79, 119.79, 42.97, 35.92。数据与文献[27]相同。

1-(4-(*N*-异丙基氨甲酰基))苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4a**): 称取化合物 **3** (193.2 mg, 1.0 mmol) 于 50 mL 反应瓶中, 加入 EDCI (287.6 mg, 1.5 mmol)、HOBt (202.6 mg, 1.5 mmol), 用无水 DCM/*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) ($V:V=10:1$) 溶解, 反应瓶置于冰浴中, 随后加入 DIPEA (0.5 mL, 3.0 mmol), 0 °C 下搅拌反应 1 h, 随后加入异丙胺(0.1 mL, 1.2 mmol), 搅拌 30 min 后, 撤去冰浴, 升至室温, 继续反应 24 h。反应结束后加入 50 mL 饱和食盐水淬灭, 用 DCM 萃取(50 mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后经油泵抽除 DMF, 粗品静置后析出白色絮状晶体 183.4 mg, 收率为 78.3%, 纯度 97.1%。m.p. 154~156 °C (lit.^[28] 153~155 °C); 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.12 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 4.10 (h, $J=6.6$ Hz, 1H), 3.51 (s, 3H), 3.16 (s, 3H), 1.16 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.00, 152.46, 131.03(2), 128.23(2), 119.49, 42.89, 40.89, 35.93, 22.39 (2)。

1-(4-(*N*-(2-二甲氨基)乙基)氨甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4b**): 称取化合物 **3** (193.2 mg, 1.0 mmol) 于 50 mL 反应瓶中, 加入 HATU (456.0 mg, 1.2 mmol), 用适量重蒸 DCM/DMF ($V:V=10:1$) 溶解, 反应瓶置于冰浴中, 随后加入 DIPEA (0.5 mL, 3 mmol) 和 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol), 搅拌 30 min 后, 撤去冰浴, 升至

室温继续反应 24 h. 反应结束后, 加入 50 mL 饱和食盐水淬灭, DCM 萃取(50 mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压旋蒸除去溶剂, 残留物硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=30:1$). 收集 $R_f=0.41$ 馏分, 除去溶剂, 得白色固体 209.3 mg, 收率为 79.4%, 纯度 96.3%. m.p. 161~163 °C (lit.^[28] 162~164 °C); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.59 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 3.59 (dd, $J=11.7, 5.8$ Hz, 2H), 3.53 (s, 3H), 3.25 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.18 (s, 3H), 2.85 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.11, 153.44, 130.36, 128.83(2), 120.10(2), 56.70, 43.47(2), 43.09, 36.46, 35.13.

1-(4-(*N*-(2-二甲氨基)乙基)氧甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4c**)^[28]: 将 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol)替换为 2-二乙氨基乙胺(0.17 mL, 1.2 mmol), 合成过程按照化合物 **4b** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=25:1$), 收集 $R_f=0.23$ 馏分, 除去溶剂, 得橘色乳状液体 245.2 mg, 收率 84.2%, 纯度 95.7%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.43 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.35 (dd, $J=13.7, 6.1$ Hz, 2H), 3.15 (s, 3H), 2.66~2.54 (m, 6H), 0.99 (t, $J=7.1$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.40, 153.10, 131.07, 128.58(2), 120.07(2), 51.72, 47.19(2), 43.34, 37.45, 36.29, 11.81(2).

1-(4-(*N*-(3-二甲氨基)丙基)氧甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4d**): 将 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol)替换为 3-二甲氨基丙胺(0.15 mL, 1.2 mmol), 合成过程按照化合物 **4b** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=25:1$), 收集 $R_f=0.31$ 馏分, 除去溶剂, 得黄色粉末固体 229.3 mg, 收率 82.7%, 纯度 96.5%. m.p. 172~173 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.43 (t, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.51 (s, 3H), 3.27 (dd, $J=12.8, 6.9$ Hz, 2H), 3.17 (s, 3H), 2.26 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.14 (s, 6H), 1.68~1.62 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.24, 153.00, 131.30, 128.54(2), 120.06(2), 57.43, 45.59(2), 43.38, 38.21, 36.35, 27.55; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 278.1981, found 278.1986.

1-(4-(*N*-(3-二乙氨基)丙基)氧甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4e**): 将 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol)替换为 3-二乙氨基丙胺(0.18 mL, 1.2 mmol), 合成过程按照化合物 **4b** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=45:1$), 收集 $R_f=0.54$ 馏

分, 除去溶剂, 得橘黄色固体 214.8 mg, 收率为 84.3%, 纯度 97.2%. m.p. 166~168 °C (lit.^[28] 167~169 °C); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.53 (t, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.52 (s, 3H), 3.15~3.11 (m, 9H), 1.94~1.82 (m, 2H), 1.25 (dd, $J=7.9, 4.3$ Hz, 2H), 1.19 (t, $J=7.3$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.86, 153.50, 130.84, 128.66(2), 120.12(2), 55.33, 49.37(2), 46.93, 43.40, 36.87, 24.34, 9.05(2).

1-(4-(*O*-(2-二甲氨基)乙基)氧甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4f**): 将 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol)替换为 2-二甲氨基乙醇(0.12 mL, 1.2 mmol), 合成过程按照化合物 **4b** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=30:1$), 收集 $R_f=0.43$ 馏分, 除去溶剂, 得粉红色固体 198.3 mg, 收率为 82.7%, 纯度 98.2%. m.p. 130~132 °C (lit.^[28] 131~133 °C); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.96 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 4.48~4.40 (m, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.09~3.03 (m, 2H), 2.55 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.86, 154.88, 130.95(2), 125.93, 120.42(2), 61.63, 57.18, 44.90(2), 43.56, 36.54.

1-(4-(*O*-(2-二乙氨基)乙基)氧甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4g**): 将 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol)替换为 2-二甲氨基乙醇(0.12 mL, 1.2 mmol), 合成过程按照化合物 **4b** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=50:1$), 收集 $R_f=0.33$ 馏分, 除去溶剂, 得橘黄色固体 203.0 mg, 收率为 82.9%, 纯度 97.7%. m.p. 144~146 °C (lit.^[27] 143~145 °C); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.97 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 4.52~4.46 (m, 2H), 3.55 (s, 3H), 3.11 (s, 9H), 1.19 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.68, 155.10, 131.13(2), 125.49, 120.46(2), 59.72, 50.40, 47.78(2), 43.60, 36.59, 9.26(2).

1-(4-(*O*-(3-二甲氨基)丙基)氧甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4h**): 将 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol)替换为 3-二甲氨基丙醇(0.14 mL, 1.2 mmol), 合成过程按照化合物 **4b** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=70:1$), 收集 $R_f=0.47$ 馏分, 除去溶剂, 得淡黄色固体 191.2 mg, 收率为 82.4%, 纯度 96.9%. m.p. 147~148 °C (lit.^[28] 146~148 °C); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.95 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 4.31 (t, $J=6.2$ Hz, 2H), 3.55 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.12~3.06 (m, 2H), 2.71 (s, 6H), 2.11~2.01 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.92, 154.89, 130.98(2), 125.91, 120.41(2), 62.22, 54.18,

43.61(2), 42.40, 36.59, 23.93.

1-(4-(*O*-(3-二乙氨基)丙基)氧甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4i**): 将 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol)替换为 3-二乙氨基丙醇(0.17 mL, 1.2 mmol), 合成过程按照化合物 **4b** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=45:1$), 收集 $R_f=0.53$ 馏分, 除去溶剂, 得橘色乳状液体 254.9 mg, 收率 83.2%, 纯度 96.3%. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.96 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 4.33 (t, $J=6.1$ Hz, 2H), 3.55 (s, 3H), 3.21~3.13 (m, 9H), 2.17~2.01 (m, 2H), 1.20 (t, $J=14.5$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.05, 154.92, 130.93(2), 125.84, 120.45(2), 62.14, 48.57, 46.98(2), 43.55, 36.55, 23.56, 9.14(2); HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 307.2134, found 307.2128.

1-(4-(*O*-(1-甲基-2-二甲氨基)乙基)氧甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4j**): 将 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol)替换为 1-二甲氨基-2-丙醇(0.13 mL, 1.2 mmol), 合成过程按照化合物 **4b** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=70:1$), 收集 $R_f=0.45$ 馏分, 除去溶剂, 得淡黄色固体 202 mg, 收率 87.0%, 纯度 97.1%. m.p. 134~136 °C (lit.^[29] 133~135 °C); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.91 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 5.22~5.16 (m, 1H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 2.59 (dd, $J=12.8, 7.5$ Hz, 1H), 2.38 (dd, $J=12.9, 4.4$ Hz, 1H), 2.21 (s, 6H), 1.27 (d, $J=6.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.53, 154.71, 130.78(2), 126.53, 120.40(2), 69.04, 64.00, 55.36, 46.14, 43.56, 36.57, 18.83.

1-(4-(*O*-(1-甲基-2-二乙氨基)乙基)氧甲酰基)苯基-3,3-二甲基三氮烯(**4k**): 将 2-二甲氨基乙胺(0.13 mL, 1.2 mmol)替换为 1-二乙氨基-2-丙醇(0.18 mL, 1.2 mmol), 合成过程按照化合物 **4b** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=30:1$), 收集 $R_f=0.44$ 馏分, 除去溶剂, 得白色固体 213.4 mg, 收率 83.5%, 纯度 98.4%. m.p. 143~145 °C (lit.^[29] 142~144 °C); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.97 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 5.42~5.28 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.23~3.17 (m, 9H), 1.35 (d, $J=6.3$ Hz, 3H), 1.24 (t, $J=6.7$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.36, 155.04, 131.12(2), 125.94, 120.38(2), 54.07, 42.31, 38.68(2), 36.22, 31.21, 18.51, 17.15, 12.92.

3.2.2 1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-烷基(R^2)三氮烯类化合物(**5a**~**5k**)的合成

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-环己基三氮烯(**5a**): 称取

对氨基苯甲酸 1.0 g (7.3 mmol)于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 乙腈和 10 mL 水溶解, 随后加入 3.5 mL 浓盐酸, 将反应器置于冰浴中. 将 1.0 g (14.6 mmol)亚硝酸钠溶于少量水中, 缓慢滴加到圆底烧瓶中, 0 °C 下搅拌 2 h, 得到对羧基苯基重氮盐溶液; 另取一只 100 mL 的圆底烧瓶, 加入甲基环己胺 2.8 mL (21.9 mmol)、碳酸钾 3.02 g (21.9 mmol)以及少量的水, 0 °C 下将对羧基苯基重氮盐溶液缓慢滴入, 滴加完毕后于 0 °C 下反应 3~4 h, TLC 跟踪, 直至显示反应完全; 反应完毕, 用稀盐酸调节 pH 值至 2~3, 用乙酸乙酯萃取(60 mL $\times$ 3), 减压旋蒸除去溶剂, 残留物用乙醇重结晶, 得橘红色固体 1.53 g, 收率为 80.3%. m.p. 171~173 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.69 (s, 1H), 7.90 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.81~3.75 (m, 1H), 3.36 (s, 3H), 1.94~1.91 (m, 2H), 1.82~1.80 (m, 2H), 1.67~1.54 (m, 3H), 1.42~1.28 (m, 2H), 1.21~1.15 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.21, 154.46, 130.46(2), 126.58, 119.89(2), 64.39, 33.17, 31.08(2), 24.98(3); HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 262.1556, found 262.1551.

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-正丙基三氮烯(**5b**): 将甲基环己胺(2.8 mL, 21.9 mmol)替换为甲基丙胺(2.2 mL, 21.9 mmol), 合成过程按照化合物 **5a** 的制备步骤. 乙醇重结晶得橘黄色固体 1.26 g, 收率为 79.4%. m.p. 161~163 °C (lit.^[30] 162~164 °C); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.70 (s, 1H), 7.90 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 3.76 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 3.18 (s, 3H), 1.69~1.65 (m, 2H), 0.87 (t, $J=7.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.64, 154.65, 130.91(2), 127.18, 120.33(2), 57.68, 35.14, 21.90, 11.37.

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-异丙基三氮烯(**5c**): 将甲基环己胺(2.8 mL, 21.9 mmol)替换为甲基异丙胺(2.2 mL, 21.9 mmol), 合成过程按照化合物 **5a** 的制备步骤. 乙醇重结晶得橘黄色固体 1.32 g, 收率为 83.2%. m.p. 165~167 °C (lit.^[30] 164~166 °C); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.70 (s, 1H), 7.90 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 4.23~4.19 (m, 1H), 3.12 (s, 3H), 1.31 (d, $J=6.7$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.65, 154.88, 130.91(2), 127.09, 120.35(2), 57.13, 32.58, 21.15(2).

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-环丙基三氮烯(**5d**): 将甲基环己胺(2.8 mL, 21.9 mmol)替换为甲基环丙胺(1.8 mL, 21.9 mmol), 合成过程按照化合物 **5a** 的制备步骤. 乙醇重结晶得橘黄色固体 1.13 g, 收率为 70.7%. m.p. 168~170 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.11 (d, $J=$

8.6 Hz, 2H), 7.51 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 3.22~3.12 (m, 1H), 0.99 (dd, $J=36.6, 4.9$ Hz, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.03, 155.26, 131.32(2), 125.86, 120.57(2), 39.62, 36.74, 6.47(2); HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 220.1086, found 220.1089.

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-苄基三氮烯(5e): 称取对氨基苯甲酸 0.4 g (3.0 mmol) 于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 mL 水溶解, 随后加入 4.5 mL 浓盐酸, 将反应器置于冰浴中. 将 0.2 g (3.0 mmol) 亚硝酸钠溶于少量水中, 缓慢滴加到圆底烧瓶中, 0 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 2 h, 得到对羧基苯基重氮盐溶液; 另取一只 100 mL 的圆底烧瓶, 加入 *N*-甲基苄胺 0.6 mL (6.0 mmol)、碳酸钾 0.8 g (6.0 mmol) 以及少量的水, 0 $^{\circ}\text{C}$ 下将对羧基苯基重氮盐溶液缓慢滴入, 滴加完毕后于 0 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h, TLC 跟踪, 直至显示反应完全. 反应完毕, 用稀盐酸调节 pH 值至 2~3, 乙酸乙酯萃取(50 mL $\times$ 3), 减压旋蒸除去溶剂, 残留物经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=20:1$), 收集 $R_f=0.23$ 馏分, 除去溶剂, 得黄色固体 543.5 mg, 收率 72.9%. m.p. 169~171 $^{\circ}\text{C}$ (lit.^[31] 170~172 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.00 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.61 (dd, $J=11.8, 8.7$ Hz, 4H), 7.49~7.44 (m, 2H), 7.22 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 3.68 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.32, 153.62, 144.82, 131.07 (2), 129.82(2), 126.11, 124.83, 121.38, 120.77(2), 118.02 (2), 33.49.

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-苄基三氮烯(5f): 将 *N*-甲基苄胺(0.6 mL, 6.0 mmol)替换为 *N*-甲基苄胺(0.7 mL, 6.0 mmol), 合成过程按照化合物 **5e** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=10:1$), 收集 $R_f=0.33$ 馏分, 除去溶剂, 得黄色絮状固体 593.4 mg, 收率 75.5%. m.p. 147~149 $^{\circ}\text{C}$ (lit.^[32] 148~150 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.93 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.33~7.29 (m, 3H), 5.03 (s, 2H), 3.12 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.77, 154.17, 137.20, 130.92(2), 129.67, 129.21(2), 128.95(2), 128.32, 120.52(2), 59.57, 35.15.

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-(4-氯代)苄基三氮烯(5g): 将 *N*-甲基苄胺(0.6 mL, 6.0 mmol)替换为 *N*-甲基-4-氯苄胺(0.7 mL, 6.0 mmol), 合成过程按照化合物 **5e** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=15:1$), 收集 $R_f=0.41$ 馏分, 除去溶剂, 得黄色固体 539.2 mg, 收率 63.8%. m.p. 205~206 $^{\circ}\text{C}$ (lit.^[32] 204~206 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.00 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.62 (dd, $J=8.7, 4.1$ Hz, 4H), 7.50 (d, $J=$

9.0 Hz, 2H), 3.66 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.56, 153.18, 143.71, 131.03(2), 129.63(2), 128.69(2), 121.44(2), 119.36(2), 33.23.

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-(4-氯代)苄基三氮烯(5h): 将 *N*-甲基苄胺(0.6 mL, 6.0 mmol)替换为 *N*-甲基-4-氯苄胺(0.6 mL, 6.0 mmol), 合成过程按照化合物 **5e** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=25:1$), 收集 $R_f=0.32$ 馏分, 除去溶剂, 得黄色固体 603.4 mg, 收率 83.2%. m.p. 168~170 $^{\circ}\text{C}$ (lit.^[33] 167~169 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.93 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J=7.4$ Hz, 4H), 7.34 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 3.12 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.67, 154.08, 136.23(2), 130.93(2), 130.25 (2), 129.20(2), 128.11, 120.58(2), 58.77, 35.15.

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-(4-甲氧基)苄基三氮烯(5i): 将 *N*-甲基苄胺(0.6 mL, 6.0 mmol)替换为 *N*-甲基-4-甲氧基苄胺(0.8 mL, 6.0 mmol), 合成过程按照化合物 **5e** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=20:1$), 收集 $R_f=0.38$ 馏分, 除去溶剂, 得黄色固体 693.8 mg, 收率 83.4%. m.p. 195~197 $^{\circ}\text{C}$ (lit.^[33] 196~198 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.15 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.71 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.66, 157.03, 153.70, 138.51, 131.00(2), 129.07, 121.06(2), 119.91(2), 114.99(2), 55.86, 34.29.

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-(4-甲氧基)苄基三氮烯(5j): 将 *N*-甲基苄胺(0.6 mL, 6.0 mmol)替换为 *N*-甲基-4-甲氧基苄胺(0.9 mL, 6.0 mmol), 合成过程按照化合物 **5e** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=10:1$), 收集 $R_f=0.35$ 馏分, 除去溶剂, 得黄色固体 726.9 mg, 收率 83.4%. m.p. 157~158 $^{\circ}\text{C}$ (lit.^[33] 156~158 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.93 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 4.95 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.09 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.67, 159.39, 154.34, 130.94(2), 129.79(2), 128.82, 127.79, 120.51(2), 114.60(2), 59.09, 55.55, 34.87.

1-(4-羧基)苯基-3-甲基-3-(4-硝基)苄基三氮烯(5k): 将 *N*-甲基苄胺(0.6 mL, 6.0 mmol)替换为 *N*-甲基-4-硝基苄胺(0.9 mL, 6.0 mmol), 合成过程按照化合物 **5e** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=15:1$), 收集 $R_f=0.42$ 馏分, 除去溶剂, 得黄色固体 654.3 mg, 收率 70.4%. m.p. 156~157 $^{\circ}\text{C}$ (lit.^[33] 155~157 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ :

8.25 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.52 (dd, $J=44.2, 6.6$ Hz, 4H), 5.19 (s, 2H), 3.17 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.66, 154.58, 136.65, 130.91, 129.42, 128.57(2), 124.33(2), 122.78(2), 120.63 (2), 40.46.

3.2.3 1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)苯基-3-甲基-3-烷基(R^2)三氮烯类化合物(**6a**~**6k**)的合成

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-环己基三氮烯(**6a**): 称取化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol)于 50 mL 反应瓶中, 加入 HATU (228.0 mg, 0.6 mmol), 用适量无水 DCM/DMF ($V:V=10:1$)溶解, 将反应瓶置于冰浴中, 随后加入 DIPEA (0.3 mL, 1.5 mmol)和 2-二乙基氨基乙胺(0.1 mL, 1.2 mmol), 搅拌 30 min 后撤去冰浴, 升至室温继续搅拌反应 24 h. 反应结束后加入 50 mL 饱和食盐水淬灭, 用 DCM 萃取(50 mL $\times$ 3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=10:1$), 收集 $R_f=0.23$ 馏分, 合并除去溶剂, 真空干燥得黄色乳状液体 153.0 mg, 收率 85.1%, 纯度 96.3%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.73~8.71 (m, 1H), 7.87 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.79 (t, $J=11.7$ Hz, 2H), 3.59~3.55 (m, 1H), 3.15 (s, 3H), 3.07 (s, 6H), 1.92 (d, $J=11.3$ Hz, 2H), 1.83 (s, 2H), 1.61 (dd, $J=24.3, 12.3$ Hz, 3H), 1.41~1.33 (m, 2H), 1.26~1.23 (m, 1H), 1.18 (t, $J=14.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.72, 153.80, 130.27, 128.76(2), 120.15(2), 64.73, 50.77, 47.16(2), 35.32, 33.52, 31.55(2), 25.45, 25.40(2), 9.55(2); HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 360.2763, found 360.2767.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-正丙基三氮烯(**6b**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol)替换为化合物 **5b** (110.6 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=8:1$), 收集 $R_f=0.19$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得黄色液体 113.4 mg, 收率 71.0%, 纯度 97.5%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.80 (m, 1H), 7.90 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 3.76 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.62~3.58 (m, 2H), 3.17 (s, 3H), 3.11~3.05 (m, 6H), 1.72~1.64 (m, 2H), 1.22~1.16 (m, 6H), 0.88 (t, $J=14.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166.64, 153.52, 130.39, 128.79(2), 120.12(2), 57.60, 50.71, 47.14(2), 35.21, 35.08, 21.92, 11.40, 9.46(2); HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 320.2450, found 320.2456.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-异丙基三氮烯(**6c**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol)替换

为化合物 **5c** (110.6 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=10:1$), 收集 $R_f=0.35$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得乳白色液体 106.7 mg, 收率 69.9%, 纯度 97.2%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.78 (s, 1H), 7.89 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 4.24~4.18 (m, 1H), 3.61 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.17~3.09 (m, 6H), 3.02 (s, 3H), 1.32 (d, $J=6.6$ Hz, 6H), 1.21 (t, $J=7.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.75, 153.78, 130.22, 128.77(2), 120.15(2), 57.00, 50.62, 49.05 (2), 47.14, 32.48, 21.16(2), 9.22(2); HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 320.2450, found 320.2453.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-环丙基三氮烯(**6d**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol)替换为化合物 **5d** (109.6 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=2:1$), 收集 $R_f=0.42$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得橘色液体 119.2 mg, 收率 75.1%, 纯度 98.4%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.84 (br, 1H), 7.91 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.64~3.58 (m, 2H), 3.23~3.15 (m, 7H), 3.03 (s, 3H), 1.22 (t, $J=7.2$ Hz, 6H), 0.97~0.84 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.74, 153.35, 130.69, 128.83(2), 120.40 (2), 50.51, 47.12(2), 39.52, 34.83(2), 19.31(2), 9.00, 6.49; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318.2294, found 318.2291.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-苯基三氮烯(**6e**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol)替换为化合物 **5e** (127.6 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=5:1$), 收集 $R_f=0.25$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得红色固体 132.1 mg, 收率 74.7%, 纯度 96.8%. m.p. 138 ~ 140 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.97 (br, 1H), 8.00 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.66~7.53 (m, 4H), 7.52~7.40 (m, 2H), 7.24~7.16 (m, 1H), 3.72~3.62 (m, 5H), 3.30~3.06 (m, 6H), 1.32~1.20 (m, 3H), 1.26~1.18 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.62, 152.62, 144.87, 131.87, 129.82(2), 129.03(2), 124.70, 121.18(2), 117.92(2), 50.46, 47.13(2), 34.79, 33.37, 9.31, 8.93; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 354.2294, found 354.2299.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨基甲酰基)-3-甲基-3-苄基三氮烯(**6f**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol)替换为化合物 **5f** (134.7 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为

DCM/MeOH ($V:V=1:1$), 收集 $R_f=0.28$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得红色固体 132.2 mg, 收率 71.9%, 纯度 95.9%. m.p. 137~139 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.76 (br, 1H), 7.92 (d, $J=7.7$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J=6.4$ Hz, 2H), 7.34~7.26 (m, 3H), 5.02 (s, 2H), 3.58~3.50 (m, 2H), 3.10 (s, 3H), 3.02~2.90 (m, 6H), 1.15 (t, $J=6.5$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.51, 153.18, 137.20, 130.97, 129.19(2), 128.80(2), 128.32(2), 128.21, 120.35(2), 59.52, 50.94, 49.05(2), 47.17, 35.06, 10.05(2); HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 368.2450, found 368.2448.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨甲酰基)-3-甲基-3-(4-氯)苄基三氮烯(**6g**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol) 替换为化合物 **5g** (144.8 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=10:1$), 收集 $R_f=0.26$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得橘色液体 141.3 mg, 收率 72.9%, 纯度 96.6%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.60 (br, 1H), 7.94 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.60 (dd, $J=8.8, 3.5$ Hz, 4H), 7.48 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 3.63 (s, 3H), 3.45~3.41 (m, 2H), 2.77~2.71 (m, 6H), 1.05 (t, $J=7.1$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.22, 152.10, 143.75, 132.78, 129.60(2), 128.84(2), 128.52, 121.26(2), 119.21 (2), 51.51, 47.23(2), 37.04, 33.06, 11.31(2); HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{ClN}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 388.1904, found 388.1907.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨甲酰基)-3-甲基-3-(4-氯)苄基三氮烯(**6h**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol) 替换为化合物 **5h** (151.9 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=10:1$), 收集 $R_f=0.28$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得黄色黏稠液体 152.3 mg, 收率 75.9%, 纯度 95.5%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.83 (br, 1H), 7.92 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=7.7$ Hz, 4H), 7.34 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 3.61 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.13~3.09 (m, 9H), 1.21 (t, $J=7.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 167.72, 153.39, 133.12, 132.63, 130.94, 129.91, 129.31, 128.96(2), 128.55(2), 120.71(2), 59.72, 53.04, 48.52(2), 35.69, 31.48, 29.70, 8.91; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{ClN}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 402.2061, found 402.2057.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨甲酰基)-3-甲基-3-(4-甲氧基)苄基三氮烯(**6i**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol) 替换为化合物 **5i** (142.7 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋

洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=5:1$), 收集 $R_f=0.35$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得黑色固体 136.5 mg, 收率 71.2%, 纯度 98.1%. m.p. 136~138 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.80 (br, 1H), 8.10 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 3.93~3.91 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.69~3.65 (m, 3H), 3.31~3.27 (m, 2H), 3.21~3.17 (m, 4H), 1.42 (t, $J=7.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 167.65, 156.71, 153.34, 138.78, 130.22, 128.61(2), 121.16(2), 119.18(2), 114.47(2), 55.61, 53.26, 48.67(2), 35.65, 33.60, 8.77(2); HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 384.2400, found 384.2406.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨甲酰基)-3-甲基-3-(4-甲氧基)苄基三氮烯(**6j**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol) 替换为化合物 **5j** (149.7 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=10:1$), 收集 $R_f=0.26$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得黄色黏液 145.3 mg, 收率 73.2%, 纯度 97.8%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.87 (br, 1H), 7.94~7.91 (m, 2H), 7.45~7.41 (m, 2H), 7.25 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.97~6.93 (m, 2H), 4.94 (s, 2H), 3.76~3.72 (m, 3H), 3.65~3.61 (m, 2H), 3.18~3.14 (m, 6H), 3.07 (s, 3H), 1.23 (t, $J=14.4$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 167.82, 159.31, 153.75, 131.53(2), 130.93, 129.52, 129.30, 128.57, 120.64(2), 114.16(2), 55.31, 53.13, 48.63(2), 43.22, 35.61, 29.69, 8.77; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 398.2556, found 398.2553.

1-(4-(*N*-(2-二乙氨基)乙基)氨甲酰基)-3-甲基-3-(4-硝基)苄基三氮烯(**6k**): 将化合物 **5a** (130.6 mg, 0.5 mmol) 替换为化合物 **5k** (157.1 mg, 0.5 mmol), 合成过程按照化合物 **6a** 的制备步骤. 经硅胶柱层析分离纯化, 淋洗剂为 DCM/MeOH ($V:V=5:1$), 收集 $R_f=0.28$ 馏分, 除去溶剂, 真空干燥得黄色黏液 156.7 mg, 收率 75.9%, 纯度 96.9%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.89 (br, 1H), 8.24 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 5.18 (s, 2H), 3.63~3.61 (m, 3H), 3.11 (dd, $J=18.5, 11.5$ Hz, 6H), 3.04 (s, 3H), 1.21 (t, $J=7.1$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 167.57, 153.82, 146.22, 141.05, 130.16, 128.63 (2), 128.56(2), 124.06(2), 120.85(2), 57.89, 53.49, 48.84 (2), 43.45, 35.65, 20.74, 8.76; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 413.2301, found 413.2307.

3.3 抗肿瘤活性评价(MTT 法)

取对数生长期的细胞(人肝癌细胞(HepG-2)、大鼠胶

质瘤细胞(C6)、人结肠癌细胞(SW620)、人前列腺癌细胞(PC-3)、小鼠黑色素瘤细胞(B16)、人非小细胞肺癌细胞(A549)、人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)、人神经胶质瘤细胞(U87)、人恶性黑色素瘤细胞(A357)和人正常肝细胞(LO2)), 分别加入 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)或 RPMI 1640 培养液(含胎牛血清 10%, 青霉素 100 U/mL)适量, 调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔接种肿瘤细胞悬浊液 100 μ L. 置于 CO_2 ($\varphi=5\%$)培养箱中, 37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后, 加入配制好的供试药物(对照组不加药物), 继续培养 24 h 和(或)48 h 后, 每孔中加入 5 mg/mL 噻唑蓝(MTT)溶液 30 μ L, 37 $^\circ\text{C}$ 温孵 4 h, 弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 100 μ L 溶解形成的甲臍(formazan), 应用酶标仪(Thermo 产品)于 570 nm 处测 OD 值. 按如下公式计算细胞生长抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \text{OD}_{\text{加药组}} / \text{OD}_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

以样品浓度为横轴, 以细胞生长抑制率为纵轴绘制曲线. 根据细胞生长抑制曲线, 用 SPSS 软件计算出半数有效抑制浓度 IC_{50} 值.

3.4 安全性考察

按照第 3.3 节实验方法, 分别测定达卡巴嗪(DTIC)和化合物 **6e**、**6g**~**6i** 对人正常肝细胞(LO2)、人肝癌细胞(HepG-2)、大鼠胶质瘤细胞(C6)、人结肠癌细胞(SW620)、人前列腺癌细胞(PC-3)、小鼠黑色素瘤细胞(B16)、人非小细胞肺癌细胞(A549)的半抑制常数(IC_{50}). 分别计算其安全指数(safety index, SI), 安全指数定义为:

$$\text{SI} = \text{IC}_{50}(\text{LO2}) / \text{IC}_{50}(\text{肿瘤细胞})$$

3.5 亲油亲水系数的测定

3.5.1 待测样品的检测标准曲线

分别将达卡巴嗪(DTIC)和化合物 **6e**、**6g**~**6i** 溶解于缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 1.0 mol/L NaCl, pH 7.4)中, 设置 5 个浓度梯度, 分别为 0.012725、0.006363、0.003181、0.001591、0.000795 $\mu\text{g/mL}$, 使用 HPLC 测定峰面积, 以峰面积为纵坐标, 药物浓度为横坐标绘制标准曲线, 本实验重复 3 次.

3.5.2 摇瓶法测定亲油亲水系数

将正辛醇和水等体积混合后, 搅拌 24 h 使两相相互饱和, 静置分层后, 两相分离, 制备得到水溶液饱和的正辛醇及正辛醇饱和的水溶液, 分别保存备用; 精密称取待测样品 10.0 mg, 于 10 mL 容量瓶中, 加入水溶液饱和的正辛醇溶解样品并稀释至刻度, 从中精密吸取 8.0 mL 至 25 mL 容量瓶中, 加入 8 mL 正辛醇饱和的水溶液. 将容量瓶振荡 3 h 后, 静置分离出水相和油相, 经过

0.22 μm 滤膜过滤, 每次进样 10 μL , 使用高效液相色谱(HPLC)测定峰面积, 带入标准曲线方程, 计算各相中待测样品含量. 油水分布系数($\lg P$)的定义为:

$$\lg P = \lg \left(\frac{c_{\text{油相}}}{c_{\text{水相}}} \right)$$

$c_{\text{油相}}$ 表示油相中待测化合物的平衡物质的量浓度, $c_{\text{水相}}$ 表示水相中待测化合物的平衡物质的量浓度.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **4a**~**4k**、**5a**~**5k** 和 **6a**~**6k** 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] Griess, P. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1862**, 121, 258.
- [2] Connors, T. A.; Goddard, P. M.; Merai, K.; Ross, W. C. J.; Wilman, D. E. V. *Biochem. Pharmacol.* **1976**, 25, 241.
- [3] Clarke, D. A.; Barclay, R. K.; Stock, C. C.; Rondestvedt, C. S. Jr. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* **1955**, 90, 484.
- [4] Shealy, Y. F.; Krauth, C. A.; Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 2150.
- [5] Wexler, P. In *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed., Ed.: Andrea, M., Academic Press, London, **2014**, pp. 1132~1134.
- [6] Ege, G.; Gilbert, K. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 4253.
- [7] Clark, A. S.; Deans, B.; Stevens, M. F. G.; Tisdale, M. J.; Wheelhouse, R. T.; Denny, B. J.; Hartley, J. A. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1493.
- [8] Saunders, P. P.; Schultz, G. A. *Biochem. Pharmacol.* **1970**, 19, 911.
- [9] Skibba, J. L.; Beal, D. D.; Ramirez, G.; Bryan, G. T. *Cancer Res.* **1970**, 30, 147.
- [10] Denny, B. J.; Wheelhouse, R. T.; Stevens, M. F.; Tsang, L. L.; Slack, J. A. *Biochemistry* **1994**, 33, 9045.
- [11] Lei, Q.; Zhang, S. Y.; Liu, M. L.; Li, J.; Zhang, X.; Long, Y. *Mol. Diversity* **2017**, 21, 957.
- [12] Wei, G. P.; Zhang, X.; Lei, Q.; Xu, M.; Zhang, M. Q.; Long, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, 38, 2137 (in Chinese). (魏光璞, 张茜, 雷强, 徐淼, 张明千, 龙跃, 有机化学, **2018**, 38, 2137.)
- [13] Ge, Y.; Ren, T.; Cui, X.; Zhao, L. J.; Zhong, R. G. *Chem. Reagents* **2018**, 40, 707 (in Chinese). (葛瑶, 任婷, 崔鑫, 赵丽娇, 钟儒刚, 化学试剂, **2018**, 40, 707.)
- [14] Matheson, S. L.; McNamee, J. P.; Wang, T. Q.; Alaoui-Jamali, M. A.; Tari, M. A.; Jean-Claude, B. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 311, 1163.
- [15] Monteiro, A. S.; Almeida, J.; Cabral, G.; Severino, P.; Videira, P. A.; Sousa, A.; Nunes, R.; Pereira, J. D.; Francisco, A. P.; Jesus Perry, M.; Mendes, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 70, 1.
- [16] Lei, Q.; Qin, S.; Feng, C.; Li, P.; Zhang, X.; Long, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, 36, 406 (in Chinese). (雷强, 秦上尚, 冯翠宁, 李佩佩, 张茜, 龙跃, 有机化学, **2016**, 36, 406.)
- [17] Zhang, M.; Liu, B.; Lei, Q.; Yan, J.; Zhao, Z.; Long, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, 39, 1064 (in Chinese). (张明千, 刘斌凯, 雷强, 颜景东, 赵中玉, 龙跃, 有机化学, **2019**, 39, 1064.)
- [18] Chen, Y.; Zhang, M.; Li, Z.; Luo, D.; Li, L.; Yu, T.; Long, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, 39, 3283 (in Chinese). (陈彦君, 张明千, 李子秋, 罗德福, 李龙辉, 俞婷婷, 龙跃, 有机化学, **2019**, 39, 3283.)
- [19] Chen, Z. X.; Riggs, A. D. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 18347.
- [20] Jin, J.; Gong, J.; Yin, T.; Lu, Y.; Xia, J.; Xie, Y.; Di, Y.; He, L.; Guo,

- J. Eur. J. Pharm.* **2011**, 654, 17.
- [21] Xiao, Q. W.; Lu, Y. F.; Chen, X. P. *Ind. J. Pharm. Sci.* **2020**, 82, 361.
- [22] Chen, M.; Su, D.; Xu, H.; Ai, Z.; Wang, R.; Chai, X.; Luo, W.; Yang, M.; Liu, Y.; Song, Y. *Chin. Arch. Traditional Chin. Med.* **2022**, 40, 191 (in Chinese).
(陈梦莹, 苏丹, 徐焕华, 艾志福, 王瑞英, 柴晓燕, 罗湾湾, 杨明, 刘亚丽, 宋永贵, 中华中医药学刊, **2022**, 40, 191.)
- [23] Teramoto, S. *Int. J. Chronic Obstruct. Pulm. Dis.* **2022**, 17, 1453.
- [24] Al Jamal, M.; Al Bathish, M.; Gazy, A. *Pharmacia* **2023**, 70, 299.
- [25] Losada-Barreiro, S.; Paiva-Martins, F.; Bravo-Diaz, C. *Antioxidants* **2023**, 12, 828.
- [26] Qiao, Y.; Xia, S.; Ma, P. *Chem. Eng. Data* **2008**, 53, 280.
- [27] Kolar, G. F. Z. *Naturforsch., B: Anorg. Chem., Org. Chem., Biochem., Biophys., Biol.* **1972**, 27, 1183.
- [28] Voronin, V. G.; Pleshkova, A. P.; Ermakov, A. I.; Petrova, I. D.; Karaseva, N. F.; Zelenova, V. P. *Zh. Org. Khim.* **1979**, 15, 63.
- [29] Liu, J.; Zhang, B.; Sun, J.; Chen, Y. *Chin. J. Pharm.* **1984**, 9, 20 (in Chinese).
(刘纪云, 张葆珣, 孙家莉, 陈奕, 中国医药工业杂志, **1984**, 9, 20.)
- [30] Wilman, D. E. V.; Cox, P. J.; Goddard, P. M.; Hart, L. I.; Merai, K.; Newell, D. R. *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 870.
- [31] Freimanis, J.; Markava, E.; Matisova, G.; Gerca, L.; Muzikante, I.; Rutkis, M.; Silinsh, E. *Langmuir* **1994**, 10, 3311.
- [32] Wilman, D. E. V.; Goddard, P. M.; Heales, B. E. *J. Med. Chem.* **1991**, 2, 101.
- [33] Dunn, W. J. 3rd.; Greenberg, M. J. *J. Pharm. Sci.* **1977**, 66, 1416.

(Cheng, F.)