

• 实验研究 •

苯酰胺类 c-Met 激酶抑制剂的合成及其体外抗肿瘤活性研究

张 晶¹, 程 璐¹, 梁泰刚¹, 班树荣¹, 李青山¹, 胡龙勤^{1,2*}

1. 山西医科大学 药学院, 山西 太原 030001

2. Ernest Mario School of Pharmacy, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, NJ 08854, USA

摘 要: 目的 设计和合成苯酰胺类 c-Met 激酶抑制剂, 并测定其体外抗肿瘤活性。方法 以 4-氯-6,7 二甲氧基喹啉、6-氯-7-氮杂嘌呤和 4-氯-7-氮杂吲哚为起始物, 经取代、还原和缩合反应制备目标化合物 **3a~5c**, 并采用噻唑蓝法 (MTT) 测定目标化合物对 GTL-16 细胞的抑制作用。结果 合成了 9 个化合物, 其结构经 MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 确证。化合物 **3a~5c** 对 GTL-16 细胞均呈现不同程度的抑制作用, 其中化合物 **3c** 对 GTL-16 细胞的 IC₅₀ 达到 411 nmol/L。结论 苯酰胺类化合物具有抑制 GTL-16 细胞活性的作用, 值得进一步深入研究。

关键词: 苯酰胺类; c-Met 激酶抑制剂; 合成; GTL-16 细胞; 抑制

中图分类号: R **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2016)09-1313-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.09.001

Synthesis of benzamide compounds c-Met inhibitors and its anti-tumor activities *in vitro*ZHANG Jing¹, CHENG Lu¹, LIANG Tai gang¹, BAN Shu-rong¹, LI Qin-shan¹, HU Long-qin^{1,2}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Ernest Mario School of Pharmacy, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, NJ 08854, USA

Abstract: Objective To design and synthesize benzamide compounds c-Met inhibitors, and study their anti-tumor activities *in vitro*.

Methods 6,7-Dimethoxy-4-chloroquinoline, 6-chloro-7-deazapurinepurine, and 4-chloro-7-azaindole were used as starting material to synthesize the target compounds **3a-5c** by substitution, reduction and condensation reactions. The antitumor activities of the compounds against GTL-16 cells were investigated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. **Results** Nine novel benzamide compounds were synthesized. The structures were characterized by MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR techniques. All of the compounds had different extents potency of antitumor activities against GTL-16 cells. Especially the IC₅₀ value of the compound **3c** was 411 nmol/L.

Conclusion Benzamide compounds have good antitumor activities against GTL-16 cells, which could be a valuable candidate for further development.

Key words: benzamide; c-Met inhibitor; synthesis; GTL-16 cell; inhibition

c-Met 激酶作为受体酪氨酸家族中的一员, 是由原癌基因 c-Met 编码的一种酪氨酸激酶受体^[1], c-Met/HGF 信号通路与多种肿瘤形成相关, 包括肺癌、胃癌、结肠癌、肝癌、乳腺癌等。在这些肿瘤细胞中都出现异常的活化, 涉及 c-Met 基因的过表达、扩增和突变等, 通过一系列的信号转导, 促进肿瘤的生长、侵袭和转移, 因此阻断 HGF/c-Met 信

号途径可有效抑制肿瘤的发生发展和转移^[2]。针对 c-Met 信号通路治疗肿瘤的药物大致可以分为 4 类: HGF 激活抑制剂、HGF 抑制剂、c-Met 拮抗剂和 c-Met 激酶抑制剂^[3]。目前临床上应用的主要是小分子 c-Met 激酶抑制剂。根据抑制剂与 c-Met 激酶的结合构象不同分为 I 型和 II 型^[4], II 型与 I 型相比, 具有更高的选择性, 对多种激酶都有抑制作用。目

收稿日期: 2016-04-05

作者简介: 张 晶 (1991—), 女, 北京人, 硕士研究生, 主要从事药物合成的研究。E-mail: 602960333@qq.com

*通信作者 胡龙勤, 山西省政府“百人计划”特聘教授。E-mail: Longqin.Hu@gmail.com

前已有多个II型小分子 c-Met 激酶抑制剂进入临床研究阶段,如 capmatinib、golvatinib、altiratinib^[5-7]。

通过结构分析以及对文献的调研^[8-9],笔者将II型 c-Met 激酶抑制剂的基本结构骨架分为 Block A、Block B 和 Block C 3个部分(图1),其中酰胺结构为重要基团,可以与腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)结合位点结合,形成两个氢键^[10],Block A 部分的连接臂为5个原子最佳,可以对其连接臂进行结构修饰。Block B 部分为3位氟原子取代活性最佳,醚必须在氮的对位以作为氢键的受体。Block C 部分可以用各种含氮杂环结构来代替。在此基础上,本实验以4-氯-6,7-二甲氧基喹啉、6-氯-7-氮杂吡啶、4-氯-7-氮杂吡啶为起始物,与具有多种生物活性的优势结构噻吩环、呋喃环以及邻甲氧基苯环进行连接,经过取代、还原、缩合反应,共合成9个酰胺类化合物,其结构经 ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 确证,并采用 MTT 法测定其对 GTL-16 细胞株增殖的抑制作用,探讨其构效关系,以期进一步发现具有研究价值的、抗肿瘤活性良好的化合物。

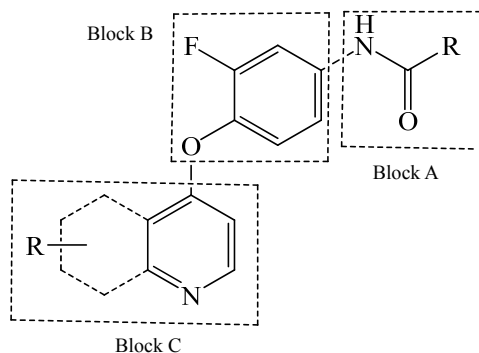


图1 II型 c-Met 激酶抑制剂的基本骨架

Fig. 1 Basic skeleton of type II c-Met kinase inhibitors

1 仪器与试剂

N-1001EYELA 旋转蒸发仪(上海爱郎仪器有限公司); AR224CN 型电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司); IKA C-MAJ HS7 电动磁力搅拌器(广州仪科实验室技术有限公司); Bruker Advance II 600 MHz 核磁共振波谱仪; Bruker Advance III HD 400 MHz 核磁共振仪; 酶标仪(Thermo Fisher Scientific Co.)。

4-氯-6,7-二甲氧基喹啉、6-氯-7-氮杂吡啶、4-氯-7-氮杂吡啶质量分数分别为95%、98%、97%,均由百灵威科技有限公司提供。HATU、DIEPA 均由阿拉丁试剂(上海)有限公司提供; GTL-16 人

胃癌细胞株(广州吉妮欧生物科技有限公司); 标准胎牛血清和胰酶(GIBCO 公司)、噻唑蓝(MTT, Sigma 公司); BMS-2(AstaTech, 质量分数97%); 其余所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 苯胺化合物2的合成^[11]

2.1.1 3-氟-4-(6,7-二甲氧基-喹啉-4-氧基)-苯胺(2a)的制备 在50 mL 单口瓶中加入4-氯-6,7-二甲氧基喹啉446 mg (2 mmol), 加入5 mL 氯苯, 搅拌加热至140 °C, 加入2-氟-4-硝基苯酚628 mg (4 mmol), 反应10 h, 冷却至室温, 抽滤, 干燥后得粗品(1a), 溶于10 mL 乙醇中, 加入氯化铵固体1.07 g, 加热至85 °C, 原料全部溶解后, 分批加入Fe粉, 石油醚-醋酸乙酯(1:1)为展开剂, TLC 监测反应完全后, 立即抽滤除去Fe粉, 旋蒸除去溶剂, 所得固体经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯(2:1)洗脱得浅灰色固体2a (420 mg), 收率为67%; MS *m/z*: 315.11 [M+H]⁺. ¹H-NMR (600 MHz, DMSO) δ : 8.46 (d, 1H, *J*=7.8 Hz, ArH), 7.50 (s, 1H, ArH), 7.38 (s, 1H, ArH), 7.07 (t, 1H, *J*=8.4 Hz, ArH), 6.48~6.38 (m, 3H, ArH), 5.53 (s, 2H, NH), 3.94 (s, 6H, CH₃-H)。

2.1.2 3-氟-4-(7H-吡咯[2,3-d]嘧啶-4-氧基)-苯胺(2b)的制备 按照化合物2a合成方法, 由6-氯-7-氮杂吡啶1 g (6.5 mmol) 和2-氟-4-硝基苯酚1.5 g (9.5 mmol) 反应, 干燥后得粗品(1b), 溶于10 mL 乙醇中, 加入氯化铵固体3.47 g, 加热至85 °C, 再分批加入Fe粉还原, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯(2:1)洗脱得白色固体2b(983 mg), 收率62%; MS *m/z*: 245.08 [M+H]⁺. ¹H-NMR (600 MHz, DMSO) δ : 12.21 (s, 1H, NH), 8.24 (s, 1H, ArH), 7.41 (m, 1H, ArH), 7.01 (t, 1H, *J*=8.4 Hz, ArH), 6.48 (m, 2H, ArH), 6.41 (dd, 1H, *J*=6.6、1.8 Hz, ArH), 5.40 (s, 2H, NH)。

2.1.3 3-氟-4-(1H-吡咯[2,3-b]吡啶-4-氧基)苯胺(2c)的制备 按照化合物2a合成方法, 由4-氯-7-氮杂吡啶833 mg (5.4 mmol) 和2-氟-4-硝基苯酚1.25 g (7.96 mmol) 反应, 干燥后得粗品(1c), 溶于10 mL 乙醇中, 加入氯化铵固体2.86 g, 加热至85 °C, 再分批加入Fe粉还原, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯(2:1)洗脱得白色固体2c (895 mg), 收率68%; MS *m/z*: 244.08 [M+H]⁺. ¹H-NMR (600 MHz, DMSO) δ : 11.70 (s, 1H,

NH), 8.03 (s, 1H, ArH), 7.34 (m, 1H, ArH), 7.03 (t, 1H, $J=9$ Hz, ArH), 6.52 (dd, 1H, $J=7.8$ 、2.4 Hz, ArH), 6.47 (dd, 1H, $J=6$ 、2.4 Hz, ArH), 6.29 (d, 1H, $J=5.4$ Hz, NH), 6.24 (m, 1H, ArH), 5.45 (s, 2H, NH)。

2.2 苯酰胺化合物 3a~5c 的合成^[12]

2.2.1 N-[4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧基)-3-氟-苯基]-2-甲氧基-苯甲酰胺 (3a) 的制备 取 25 mL 茄瓶, 加入邻甲氧基苯甲酸 100 mg (0.657 mmol)、HATU 300 mg (0.789 mmol), 溶于 4 mL 干燥乙腈中, 0 °C 条件下搅拌 10 min, 加入 DIEPA 117 μ L (0.657 mmol), 待反应液颜色发生变化后, 加入化合物 2a 103 mg (0.328 mmol), 石油醚-醋酸乙酯-氨水 (1:1:0.024) 为展开剂, TLC 监测反应, 6 h 后反应结束, 旋蒸除去溶剂, 分别用 10% 柠檬酸 (10 mL $\times$ 3)、饱和碳酸氢钠溶液 (10 mL $\times$ 3) 萃取, 合并有机相, 减压蒸发除去溶剂, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯-氨水 (2:1:0.036) 洗脱得到白色固体化合物 3a (80 mg), 收率 54%; MS m/z : 449.43 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃-d) δ : 9.98 (s, 1H, NH), 8.50 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, ArH), 8.31 (dd, 1H, $J=9.6$ Hz, 2.4 Hz, ArH), 7.92 (dd, 1H, $J=15$ 、3.6 Hz, ArH), 7.60 (s, 1H, ArH), 7.54 (t, 1H, $J=10.8$ Hz, ArH), 7.43 (s, 1H, ArH), 7.38 (d, 1H, $J=13.2$ Hz, ArH), 7.25 (t, 1H, $J=12.6$ Hz, ArH), 7.17 (t, 1H, $J=11.4$ Hz, ArH), 7.07 (d, 1H, $J=12$ Hz, ArH), 6.44 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, ArH), 4.10 (s, 3H, CH₃-H), 4.07 (s, 3H, CH₃-H), 4.05 (s, 3H, CH₃-H)。¹³C-NMR δ : 163.43, 160.29, 157.19, 153.16, 152.95, 149.61, 148.56, 146.58, 137.25, 136.85, 133.69, 132.46, 123.66, 121.76, 121.12, 116.46, 115.52, 111.57, 107.58, 102.2, 99.46, 56.18。

2.2.2 N-[3-氟-4-(7H-吡咯[2,3-d]嘧啶-4-氧基)-苯基]-2-甲氧基-苯甲酰胺 (3b) 的制备 按照化合物 3a 的合成方法, 由邻甲氧基苯甲酸 100 mg (0.657 mmol) 和 2b 80 mg (0.328 mmol) 进行反应, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯-氨水 (3:1:0.048) 洗脱得白色固体 3b (65 mg), 收率 52%; MS m/z : 379.06 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ : 11.10 (s, 1H, NH), 9.97 (s, 1H, ArH), 8.51 (s, 1H, ArH), 8.32 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, ArH), 7.92 (d, 1H, $J=12$ Hz, ArH), 7.56

(t, 1H, $J=7.6$ Hz, ArH), 7.31 (t, 1H, $J=6.4$ Hz, ArH), 7.19 (t, 1H, $J=6.4$ Hz, ArH), 7.08 (d, 1H, $J=8$ Hz, ArH), 6.74 (s, 1H, ArH), 5.33 (d, 2H, NH, ArH), 4.10 (s, 3H, CH₃-H); ¹³C-NMR δ : 175.51, 163.24, 161.93, 157.20, 153.68, 137.07, 136.77, 132.60, 129.88, 123.97, 123.61, 121.83, 116.04, 111.58, 109.32, 105.13, 99.44, 56.32。

2.2.3 N-[3-氟-4-(1H-吡咯[2,3-b]吡啶-4-氧基)-苯基]-2-甲氧基-苯甲酰胺 (3c) 的制备 按照化合物 3a 的合成方法, 由邻甲氧基苯甲酸 100 mg (0.657 mmol) 和 2c 80 mg (0.328 mmol) 进行反应, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯-氨水 (3:1:0.048) 洗脱得白色固体 3c (65 mg), 收率 52%; MS m/z : 378.06 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ : 9.99 (s, 1H, NH), 8.32 (d, 1H, $J=8$ Hz, ArH), 8.17 (d, 1H, $J=5.6$ Hz, ArH), 7.93 (dd, 1H, $J=11.2$ 、1.2 Hz, ArH), 7.56 (t, 1H, $J=8$ Hz, ArH), 7.40 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, ArH), 7.27 (m, 2H, ArH), 7.19 (t, 1H, $J=7.6$ Hz, ArH), 7.10 (d, 1H, $J=8$ Hz, ArH), 6.50 (m, 2H, ArH), 5.32 (s, 1H, NH), 4.12 (s, 3H, CH₃-H); ¹³C-NMR δ : 164.34, 159.49, 157.49, 141.50, 137.22, 136.96, 133.74, 132.65, 123.87, 123.82, 123.44, 121.90, 121.09, 116.22, 111.59, 110.80, 109.93, 109.58, 102.22, 98.74, 56.36。

2.2.4 噻吩-2-甲酸[4-(6,7-二甲氧基-喹啉-4-氧基)-3-氟-苯基]-酰胺 (4a) 的制备 按照化合物 3a 的合成方法, 由 2-噻吩羧酸 68 mg (0.54 mmol) 和 2a 85 mg (0.27 mmol) 进行反应, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯-氨水 (2:1:0.036) 洗脱得白色固体 4a (55 mg), 收率 48%; MS m/z : 425.03 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO) δ : 10.54 (s, 1H, NH), 8.50 (d, 1H, $J=5.2$ Hz, ArH), 8.06 (d, 1H, $J=3.3$ Hz, ArH), 7.98 (dd, 1H, $J=13.0$ 、2.1 Hz, ArH), 7.91 (t, 1H, $J=8.8$ Hz, ArH), 7.66 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, ArH), 7.55 (s, 1H, ArH), 7.49 (t, 1H, $J=9.0$ Hz, ArH), 7.42 (s, 1H, ArH), 7.30~7.25 (m, 1H, ArH), 6.49 (d, 1H, $J=5.1$ Hz, ArH), 3.96 (s, 6H, CH₃-H); ¹³C-NMR δ : 160.17, 155.64, 153.16, 152.93, 149.61, 148.68, 146.68, 138.66, 137.31, 136.53, 128.92, 123.82, 116.39, 115.54, 107.58, 102.28, 99.46, 56.16。

2.2.5 噻吩-2-甲酸[3-氟-4-(7*H*-吡咯[2,3-*d*]嘧啶-4-氧基)-苯基]-酰胺 (**4b**) 的制备 按照化合物 **3a** 的合成方法, 由 2-噻吩羧酸 78 mg (0.614 mmol) 和 **2b** 75 mg (0.307 mmol) 进行反应, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯-氨水(3:1:0.048) 洗脱得白色固体 **4b** (53 mg), 收率 49%; MS *m/z*: 355.11 [M+H]⁺. ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*) δ: 12.30 (s, 1H, NH), 10.47 (s, 1H, ArH), 8.30 (s, 1H, ArH), 8.04 (d, 1H, *J*=4.8 Hz, ArH), 7.91 (d, 1H, *J*=7.2 Hz, ArH), 7.86 (dd, 1H, *J*=16.2, 3 Hz, ArH), 7.57 (dd, 1H, *J*=12、1.8 Hz, ArH), 7.52(t, 1H, *J*=3.6 Hz, ArH), 7.42 (t, 1H, *J*=13.2 Hz, ArH), 7.26 (t, 1H, *J*=4.8 Hz, ArH), 6.60(dd, 1H, *J*=2.4、2.4 Hz, ArH); ¹³C-NMR δ: 173.21, 163.97, 156.32, 153.18, 145.13, 138.52, 137.06, 136.57, 129.18, 123.83, 121.72, 116.32, 111.45, 109.72, 105.42, 99.52。

2.2.6 噻吩-2-甲酸[3-氟-4-(1*H*-吡咯[2,3-*b*]吡啶-4-氧基)-苯基]-酰胺 (**4c**) 的制备 按照化合物 **3a** 的合成方法, 由 2-噻吩羧酸 53 mg (0.414 mmol) 和 **2b** 50 mg (0.204 mmol) 进行反应, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯-氨水(3:1:0.048) 洗脱得白色固体 **4b** (36 mg), 收率 48%; MS *m/z*: 354.21 [M+H]⁺. ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*) δ: 11.81 (s, 1H, ArH), 10.51 (s, 1H, NH), 8.10 (d, 1H, *J*=5.4 Hz, ArH), 8.05 (d, 1H, *J*=4.5 Hz, ArH), 7.94 (m, 2H, ArH), 7.61 (d, 1H, *J*=8.4 Hz, ArH), 7.36 (m, 2H, ArH), 7.26 (t, 1H, *J*=4.2 Hz, ArH), 6.41 (d, 1H, *J*=6 Hz, ArH), 6.27 (m, 1H, ArH); ¹³C-NMR δ: 160.56, 157.63, 154.73, 153.11, 151.55, 144.70, 139.90, 132.83, 130.06, 128.63, 124.76, 124.15, 117.23, 109.85, 109.48, 109.22, 101.21, 97.25。

2.2.7 呋喃-2-甲酸 [3-氟-4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧基)-3-氟-苯基]-酰胺 (**5a**) 的制备 按照化合物 **3a** 的合成方法, 由糠酸 37 mg (0.33 mmol) 和 **2a** 90 mg (0.286 mmol) 进行反应, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯-氨水(2:1:0.036) 洗脱得白色固体 **5a** (60 mg), 收率 52%; MS *m/z*: 409.19 [M+H]⁺. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃-*d*) δ: 8.51 (d, 1H, *J*=6 Hz, ArH), 8.22 (s, 1H, NH), 7.88 (dd, 1H, *J*=14.4、3.6 Hz, ArH), 7.59 (s, 1H,

ArH), 7.55 (d, 1H, *J*=1.2 Hz, ArH), 7.45 (s, 1H, ArH), 7.39 (m, 1H, ArH), 7.30 (d, 1H, *J*=5.4 Hz, ArH), 7.28 (t, 1H, *J*=12.6 Hz, ArH), 6.61 (dd, 1H, *J*=3、2.4 Hz, ArH), 6.45 (dd, 1H, *J*=7.2、1.2 Hz, ArH), 4.07 (s, 3H, CH₃-H), 4.05 (s, 3H, CH₃-H); ¹³C-NMR δ: 160.07, 155.89, 153.21, 149.58, 148.77, 147.23, 146.80, 137.35, 136.14, 123.89, 115.89, 115.52, 112.86, 109.56, 107.74, 102.26, 99.41, 56.17。

2.2.8 呋喃-2-甲酸 [3-氟-4-(7*H*-吡咯[2,3-*d*]嘧啶-4-氧基)-苯基]-酰胺 (**5b**) 的制备 按照化合物 **3a** 的合成方法, 由糠酸 37 mg (0.33 mmol) 和 **2b** 70 mg (0.286 mmol) 进行反应, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯-氨水(3:1:0.048) 洗脱得白色固体 **5b** (48 mg), 收率 50%; MS *m/z*: 354.98 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ: 12.30 (s, 1H, NH), 10.47 (s, 1H, ArH), 8.30 (s, 1H, ArH), 8.04 (d, 1H, *J*=4.8 Hz, ArH), 7.91 (d, 1H, *J*=7.2 Hz, ArH), 7.86 (dd, 1H, *J*=16.2、3 Hz, ArH), 7.57 (dd, 1H, *J*=12、1.8 Hz, ArH), 7.52 (t, 1H, *J*=3.6 Hz, ArH), 7.42 (t, 1H, *J*=13.2 Hz, ArH), 7.26 (t, 1H, *J*=4.8 Hz, ArH), 6.60 (dd, 1H, *J*=2.4、2.4 Hz, ArH); ¹³C-NMR δ: 173.21, 164.17, 156.12, 152.48, 145.06, 138.73, 137.32, 136.44, 128.58, 123.73, 121.29, 116.58, 111.48, 109.80, 105.36, 99.45。

2.2.9 呋喃-2-甲酸[3-氟-4-(1*H*-吡咯[2,3-*b*]吡啶-4-氧基)-苯基]-酰胺 (**5c**) 的制备 按照化合物 **3a** 的合成方法, 由糠酸 46 mg (0.396 mmol) 和 **2c** 50 mg (0.204 mmol) 进行反应, 粗品经硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯-氨水(3:1:0.048) 洗脱得白色固体 **5c** (35 mg), 收率 51%; MS *m/z*: 354.98 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*) δ: 11.79 (s, 1H, NH), 10.52 (s, 1H, ArH), 8.08 (d, 1H, *J*=5.4 Hz, ArH), 7.97 (m, 2H, ArH), 7.67 (d, 1H, *J*=8.4 Hz, ArH), 7.40 (m, 3H, ArH), 6.73 (s, 1H, ArH), 6.38 (d, 1H, *J*=5.4 Hz, ArH), 6.27 (s, 1H, ArH); ¹³C-NMR δ: 157.62, 156.78, 151.55, 147.59, 146.52, 144.71, 130.11, 125.34, 124.14, 117.28, 115.82, 112.80, 109.47, 109.37, 109.22, 101.13, 97.23。

目标化合物 **3a**~**5c** 的合成路线见图 2。

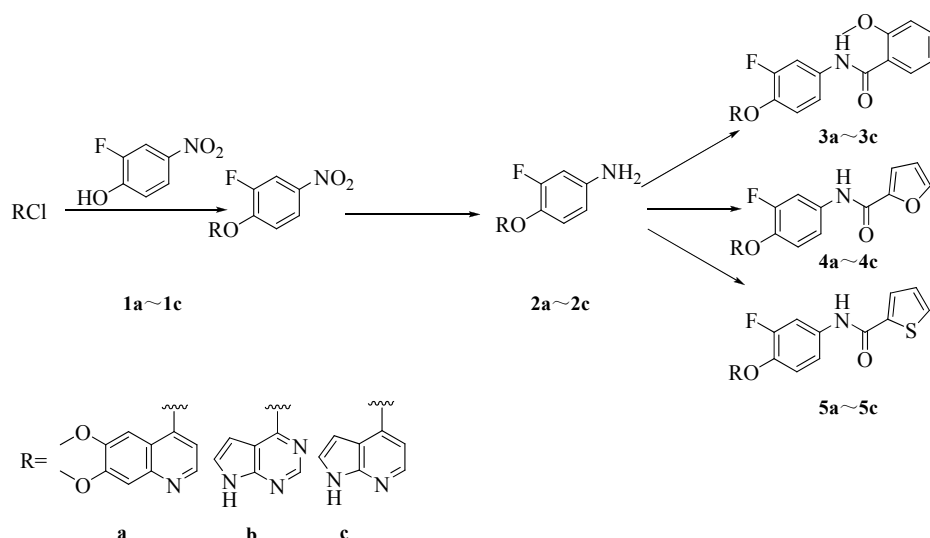


图 2 目标化合物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of target compounds

2.3 体外活性试验

以 BMS-2 为阳性对照药, 采用 MTT 法对合成的苯酰胺类化合物进行体外抗肿瘤活性测试, 所选用的肿瘤细胞为人胃癌细胞 GTL-16^[13]。用含 0.5% 血清的培养基将对数生长期的细胞制成细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔体积 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱中培养。孵育 24 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%), 药物浓度分别为 1 000、500、200、40、8 nmol/L , BMS-2 浓度分别为 20、10、5、2.5、1.25 nmol/L , 每个浓度设

4 个复孔, 药物作用 72 h, 加药培养结束后, 每孔加入无血清培养基 100 μL 和 5 mg/mL MTT 溶液 10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下避光培养 4 h 后, 每孔再加入 DMSO 100 μL 震荡使结晶溶解。用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算被测物对肿瘤细胞的抑制率[抑制率 = ($A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}$) / $A_{\text{对照}}$], 用 Graphpad Prism 5.0 计算 IC_{50} 。见表 1。可见目标化合物对 GTL-16 肿瘤细胞的增殖有一定的抑制作用, 除 4b、4c、5c 外其他化合物对 GLT-16 细胞的抑制活性均小于 1 000 nmol/L , 其中活性最佳的为 3c, IC_{50} 值达到 411 nmol/L 。

表 1 目标化合物对 GTL-16 细胞增殖的抑制作用

Table 1 Antitumor effects of target compounds against GTL-16 cells

化合物	抑制率/%					$\text{IC}_{50}(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$
	8 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	40 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	500 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	
3a	11.40	17.07	31.23	40.56	66.15	578
3b	12.48	17.35	32.68	48.85	51.89	748
3c	10.00	19.72	25.56	52.30	75.36	411
4a	8.47	17.55	23.06	36.05	55.99	973
4b	5.01	22.45	29.83	37.94	42.95	>1 000
4c	17.52	23.93	33.66	40.55	46.19	>1 000
5a	7.46	21.07	29.95	36.6	56.98	883
5b	9.73	15.24	27.09	43.20	50.24	984
5c	10.28	18.89	25.13	29.27	36.72	>1 000
BMS-2						10.9

3 讨论

3-氟-4-苯胺化合物(2)的合成参照文献报道方法^[1], 本实验将取代、还原两步反应合并为一步反应, 方法简单便捷, 产率提高。在进行还原反应时, 首先尝试 10%乙醇作为溶剂, Zn 粉作为还原剂进行反应, 后处理繁琐, 之后选择 93%乙醇作为溶剂, Zn 粉作为还原剂, 发现反应速度过快, 最终实验选择 93%乙醇作为溶剂, Fe 粉作为还原剂, 以 1 个当量为起始加入量, 分批加入, TLC 监测反应进程, 最终反应完全, 副产物少, 产率为 62%~68%。

酰胺化合物(3a~5c)的形成具有多种缩合方法, 缩合剂的不同对实验有着重要的影响。本实验前期合成酰胺化合物, 首先将不同的酸与氯化亚砷反应形成酰氯, 之后与相应的胺进行缩合, 得到酰胺化合物。但是该反应对无水条件要求高, 且反应进程不宜控制, 杂点多, 纯度低。之后以 TBTU 为缩合剂进行反应, 杂质的生成有所减少, 但是对比 HATU 为缩合剂时反应时间长, 且杂质多。故最后选用 HATU 作为缩合剂进行反应, 形成酰胺化合物产率为 48%~54%。

对合成的 9 个苯酰胺类 c-Met 激酶抑制剂进行体外抗肿瘤活性筛选, 其中 3a~3c 在 GTL-16 细胞上有相对较好的药效活性, Block A 为苯环时活性优于五元环结构, 五元环取代时呋喃取代的化合物活性高于噻吩取代的化合物, 当 Block A 同为邻甲氧基苯环时, 喹啉环取代的酰胺化合物活性优于氮杂嘌呤结构和氮杂吲哚的结构, 对 GTL-16 细胞的 IC₅₀ 为 411 nmol/L, 但是相比较阳性对照药 BMS-2 还存在一定差距, 分析原因可能是 Block A 部分没有与 c-Met 激酶完全结合, 因此以后的工作将对这部分进行进一步的结构修饰, 具有一定研究的价值。

参考文献

- [1] Jung K H, Park B H, Hong S S. Progress in cancer therapy targeting c-Met signaling pathway [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(4): 595-604.
- [2] 李永文, 刘红雨, 陈 军. 肺癌细胞中 HGF/c-Met 信号通路的异常调控及其靶向药物研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(8): 625-634.
- [3] Garajová I, Giovannetti E, Biasco G, *et al.* c-Met as a target for personalized therapy [J]. *Transl Oncogenomics*, 2015, 7(Suppl 1): 13-31.
- [4] Timofeevski S L, Mctigue M A, Ryan K, *et al.* Enzymatic characterization of c-Met receptor tyrosine kinase oncogenic mutants and kinetic studies with aminopyridine and triazolopyrazine inhibitors [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(23): 5339-5349.
- [5] Liu X, Wang Q, Yang G, *et al.* A novel kinase inhibitor, INCB28060, blocks c-MET-dependent signaling, neoplastic activities, and cross-talk with EGFR and HER-3 [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(22): 7127-7138.
- [6] Nakagawa T, Tohyama O, Yamaguchi A, *et al.* E7050: a dual c-Met and VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitor promotes tumor regression and prolongs survival in mouse xenograft models [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(1): 210-215.
- [7] Kwon Y, Smith B D, Zhou Y, *et al.* Effective inhibition of c-MET-mediated signaling, growth and migration of ovarian cancer cells is influenced by the ovarian tissue microenvironment [J]. *Oncogene*, 2013, 34(2): 144-153.
- [8] Qi B, Tao H, Wu D, *et al.* Synthesis and biological evaluation of 4-phenoxy-6,7-disubstituted quinolines possessing semicarbazone scaffolds as selective c-Met inhibitors [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2013, 346(8): 596-609.
- [9] 史大阔. 基于 C-Met 靶点的抗肿瘤药物及 Combretastatin A-4 类似物的设计、合成与生物活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [10] 倪春燕, 张虞婷, 赵 育, 等. 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 [J]. *有机化学*, 2012, 32(12): 2294-2299.
- [11] Li S, Jiang R, Qin M, *et al.* Synthesis and antitumor activity of novel 4-(2-fluorophenoxy)quinoline derivatives bearing the 4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide moiety [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2013, 346(7): 521-533.
- [12] Zhang W, Ai J, Shi D, *et al.* Discovery of novel type II c-Met inhibitors based on BMS-777607 [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 80: 254-266.
- [13] Kim K S, Zhang L, Schmidt R, *et al.* Discovery of pyrrolopyridine-pyridone based inhibitors of Met kinase: synthesis, X-ray crystallographic analysis, and biological activities [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(17): 5330-5341.