

·化学合成·

本文引用:黄 珍,方宇希,黄志勇,李荣东. 新型 TOPK 抑制剂的设计、合成及抗肿瘤活性研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(3): 298-304.

新型 TOPK 抑制剂的设计、合成及抗肿瘤活性研究

黄 珍,方宇希,黄志勇,李荣东*
(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

〔摘要〕 目的 将 TOPK 抑制剂 OTS514 的母核噻吩并[2,3-c]喹啉酮环替换成喹唑啉,探究含有喹唑啉的新型 TOPK 抑制剂的抗肿瘤细胞增殖活性。方法 以 OTS514 作为先导化合物设计并合成一系列 4-氨基喹唑啉衍生物。采用 MTT 法测试目标化合物对肺癌细胞(A549)和乳腺癌细胞(MDA-MB-231)的抗增殖活性。结果 合成了 16 个未见报道的新化合物,其结构经 ¹H NMR 和高分辨 MS 确证。手性因子对抗肿瘤活性影响不明显,暴露的氨基能增强化合物的抗肿瘤活性。体外抗肿瘤实验表明,化合物 **12a-12f** 的活性与 OTS514 相当。结论 新骨架的 TOPK 抑制剂具有和 OTS514 相当的抗肿瘤活性,为进一步探索含有喹唑啉药效团的 TOPK 抑制剂研究打下了基础。

〔关键词〕 TOPK 抑制剂;抗肿瘤药;喹唑啉;合成

〔中图分类号〕R914.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.03.010

Design, Synthesis and Antitumor Activity of a Novel TOPK Inhibitor

HUANG Zhen, FANG Yuxi, HUANG Zhiyong, LI Rongdong*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the anti-tumor cell proliferation activity of a novel TOPK inhibitor containing quinazoline, the parental thiophene [2,3-c] quinolinone ring of TOPK inhibitor OTS514 was replaced by quinazoline. **Methods** A series of 4-aminoquinazoline derivatives were designed and synthesized with OTS514 as the lead compound. MTT method was used to test the antiproliferative activity of the target compound on lung cancer cells (A549) and breast cancer cells (MDA-MB-231). **Results** Sixteen new compounds were synthesized and their structures were confirmed by ¹H NMR and high-resolution MS. The effect of chiral factors on antitumor activity was not obvious, and the exposed amino group can enhance the antitumor activity of the compounds. The antitumor activity of compound **12a-12f** *in vitro* was similar to that of OTS514. **Conclusion** The new skeleton TOPK inhibitor has the same antitumor activity as OTS 514, which lays a foundation for further study of TOPK inhibitors containing quinazoline pharmacophore.

〔Keywords〕 TOPK inhibitors; antineoplastic agents; quinazoline; synthesis

恶性肿瘤严重威胁着人类的生命健康。目前,它们已超越其他疾病,成为变色的“头号杀手”^[1]。与传统抗肿瘤药物相比,靶向抗肿瘤药物具有提高疗效、提高药物选择性和患者依从性等优点,已成为抗肿瘤药物的重要研究方向^[2-3]。TOPK,也称为 PBK 或

PDZ 结合激酶,是 MAPKK 蛋白家族的成员^[4-5]。它是一种丝氨酸苏氨酸丝裂原激活蛋白激酶,在肺癌、乳腺癌、结直肠癌、淋巴瘤、白血病、黑色素瘤、胆管癌和胶质瘤等多种人类癌症中高度表达^[6-14]。TOPK 可能是药物开发的一个有前途的分子靶点,它涉及多种细胞

〔收稿日期〕2019-10-26

〔基金项目〕湖南省自然科学基金(2016JJ2098)。

〔作者简介〕黄 珍,男,在读硕士研究生,研究方向:药物合成。

〔通讯作者〕*李荣东,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:jjdhw12@163.com。

功能,包括肿瘤发展、细胞生长、凋亡和炎症^[15-18]。

根据 TOPK 抑制剂的作用机理和构效关系,发现 TOPK 抑制剂的 3 环芳香环结构是其抗肿瘤活性的关键,侧链的改变可能改变药物的选择性,如: HI-TOPK-032^[19]可有效抑制 PBK/TOPK 激酶的活性,对细胞外信号调节激酶 1、氨基末端激酶和 p38 蛋白激酶(p38 kinase activities)等激酶影响较弱;HI-TOPK-032 可通过减少 ERK-RSK 磷酸化达到抑制贴壁依赖型和非依赖型结肠癌细胞生长。但是现有的 PBK/TOPK 抑制剂存在一定的缺陷:(1)分子中的 3 个或者 4 个芳香性结构片段具有较强的脂溶性,因此其理化性质在成药性上存在一定的技术缺陷。(2)该类药物具有血液毒性反应,虽然把药物包裹在脂质体中能够有效避免毒性反应,但是仍存在用药安全性问题。

考虑到 7-羟基-苯并咪唑类化合物和噻吩并[2,3-c]喹诺酮类化合物具有抑制 TOPK 激酶活性,采用骨架跃迁原理,对其进行结构改造。将噻吩并[2,3-c]喹诺酮环替换成喹唑啉环。通过计算机模拟化合物 **12f** 与 TOPK 的活性位点对接,发现化合物 **12f** 与 TOPK 的 ARG-101 和 GLU-116 形成氢键,从而表现出对 TOPK 的抑制作用。见图 1。

目标化合物 **11a-11j** 和 **12a-12f** 合成方案见图 2。以 2-苯基-1-丙胺的混旋、R、S 构型和 1-苯基乙胺的混旋、R、S 构型为原料合成关键中间体 **4**;以 6-羟基-7-甲氧基-4-酮喹唑啉为起始原料经过乙酰化和氯化得到中间体 **7**。将中间体 **4** 和 **7** 对接得到

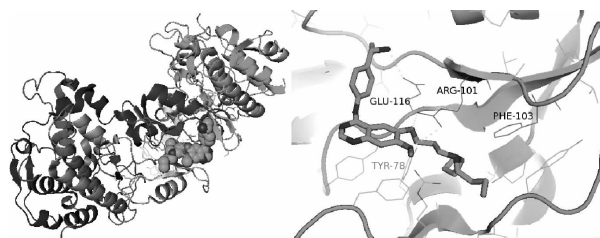


图 1 计算机模拟 **12f** 与 TOPK 活性位点结合

化合物 **8**,在其 6 位上修饰得到化合物 **11a-11j**。将化合物 **11e-11j** 再进一步脱去乙酰基得到目标化合物 **12a-12f**。

1 仪器与试剂

YRT-3 型熔点仪(天津海益达科技有限公司); RE-2000B 型旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限公司); ZF7 三用紫外分析仪(巩义市予华仪器有限公司); Water Xevo G2-XS ToF 质谱仪(美国沃特世公司); 核磁共振波谱仪 AVANCE III HD 600(德国布鲁克公司); Multiskan MK3 多功能酶标仪(Thermo 公司); A549 人肺癌细胞株(上海酶研生物科技有限公司); MDA-MB-231 人乳腺癌细胞株(上海酶研生物科技有限公司); 吉非替尼(Solarbio 公司)。

实验所有试剂均为市售得分析纯或化学纯,所有试剂使用前都未作处理。

2 方法与结果

2.1 目标化合物的合成

2.1.1 N-(2-苯基丙基)乙酰胺(**2**)的制备 2-苯基-

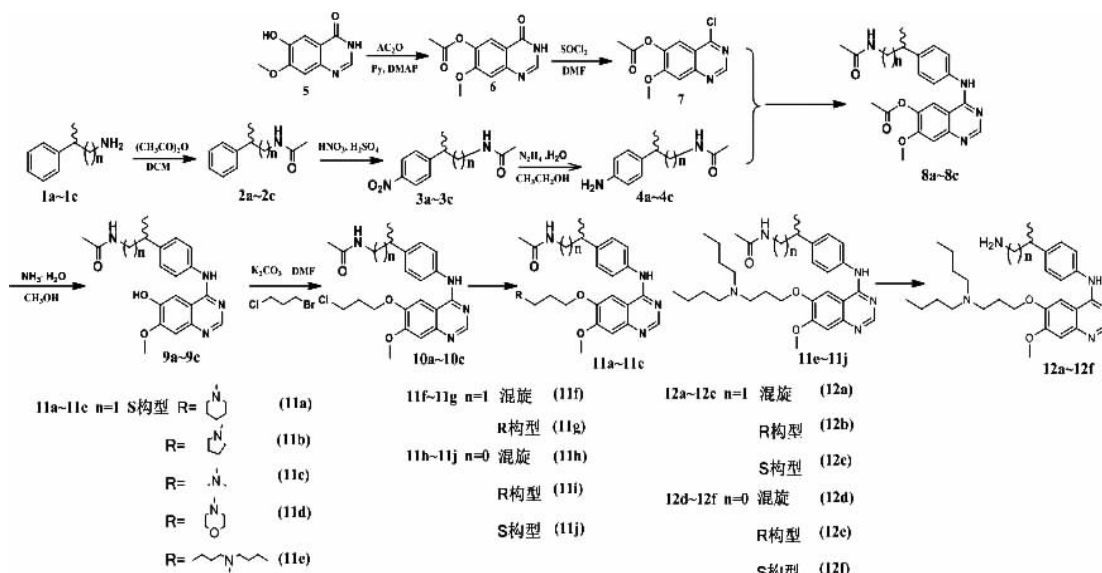


图 2 目标化合物的合成方案

1-丙胺(13.5 g, 0.1 mol)溶于二氯甲烷中(54 mL),在0 °C滴加乙酸酐(8.6 mL, 0.092 mol)的二氯甲烷(70 mL)溶液,搅拌反应30 min,再室温搅拌反应8 h, TLC检测反应完全后,停止反应。向反应液中加入二氯甲烷(45 mL)和2% NaOH溶液(50 mL),分出有机相,水(100 mL×2)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压回收二氯甲烷,得淡黄色油状液体12.15 g,收率:68.9%。HRMS (ESI)Calcd for $C_{11}H_{14}N_2O_3$ [M+H]⁺177.1145, found 177.1136。

2.1.2 N-[2-(4-硝基苯基)丙基]乙酰胺(3)的制备 N-(2-苯基丙基)乙酰胺(9.0 g, 0.051 mol)-5 °C滴加混酸11 mL(98%硫酸:68%硝酸=6:5),滴加完毕后继续反应1 h,室温搅拌反应12 h, TLC检测反应完全后,停止反应。倒入冰水中,二氯甲烷(40 mL×3)提取,分出有机相,无水硫酸钠干燥,减压蒸除二氯甲烷,得到黄色固体产物8.0 g,收率:70.9%, m.p.83.5~84.3 °C。HRMS (ESI)Calcd for $C_{11}H_{14}N_2O_3$ [M+H]⁺222.1054, found 222.1056。

2.1.3 N-[2-(4-氨基苯基)丙基]乙酰胺(4)的制备 N-[2-(4-硝基苯基)丙基]乙酰胺(11.1 g, 0.05 mol)、无水乙醇(92 mL)、活性炭(0.92 g, 0.078 mol)和六水合三氯化铁(0.23 g, 0.001 mol)88 °C搅拌30 min,滴加80%水合肼(7.6 mL, 0.13 mol),继续回流反应6 h,趁热抽滤,减压蒸除无水乙醇,二氯甲烷(40 mL×3)提取,无水硫酸钠干燥,减压蒸除二氯甲烷,得粗产物柱色谱纯化(乙酸乙酯:石油醚=4:1),得7.0 g黄色油状物,收率:73.1%。HRMS (ESI)Calcd for $C_{11}H_{16}N_2O$ [M+H]⁺193.1296, found 193.1305。

2.1.4 7-甲氧基-6-乙酰氧基-4-氯喹啉(7)的制备 6-羟基-7-甲氧基-4-酮喹啉(16.7 g, 0.1 mol)、乙酸酐(125 mL, 1.3 mol)和吡啶(16.7 mL, 0.22 mol)100 °C搅拌30 min,加入4-二甲氨基吡啶(0.75 g, 0.006 mol),继续搅拌6 h,停止反应,减压蒸除乙酸酐,加入大量冰水搅拌,抽滤,烘干,得黄白色固体。将其加至氯化亚砷(158 mL, 2.1 mol)中,80 °C搅拌,再缓慢滴加N,N-二甲基甲酰胺(6.2 mL, 0.08 mol)。6 h后停止反应。减压回收氯化亚砷,加入少量甲苯搅拌,再减压回收甲苯。将反应物倒入冰水中,抽滤,得灰白色固体17.9 g,收率:82.3%^[24]。

2.1.5 4-[4-(2-乙酰胺基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-乙酰氧基喹啉(8)的制备 N-[2-(4-氨基苯基)丙基]乙酰胺(9.5 g, 0.05 mol)、异丙醇(59.5 mL)和7-甲氧基-6-乙酰氧基-4-氯喹啉(11.2 g, 0.043 mol)90 °C加热反应4 h, TLC检测反应完全后,停止反应,抽滤,滤饼用少量异丙醇洗涤,

烘干,得淡黄色固体15.2 g,收率:75.3%, m.p.>200 °C。HRMS (ESI)Calcd for $C_{22}H_{24}N_4O_4$ [M+H]⁺409.1847, found 409.1856。

2.1.6 4-[4-(2-乙酰胺基-1-甲基乙基)苯氨基]-6-羟基-7-甲氧基喹啉(9)的制备 4-[4-(2-乙酰胺基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-乙酰氧基喹啉(8.4 g, 0.02 mol)和甲醇(60 mL)升温至70 °C搅拌,加入氨水(5.8 mL, 0.15 mol),溶液由浑浊变澄清,继续反应4 h, TLC检测反应完全后,停止反应。减压回收甲醇,得黄色油状物。加入丙酮(15 mL),升温至65 °C回流,出现黄白色固体,停止反应,过滤,得黄白色固体6.7 g,收率:88.9%, m.p.183.2~188.6 °C。HRMS (ESI)Calcd for $C_{20}H_{22}N_4O_3$ [M+H]⁺367.1638, found 367.1643。

2.1.7 4-[4-(2-乙酰胺基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-氯丙氧基)喹啉(10)的制备 4-[4-(2-乙酰胺基-1-甲基乙基)苯氨基]-6-羟基-7-甲氧基喹啉(7.4 g, 0.02 mol)、N,N-二甲基甲酰胺(74 mL)、碳酸钾(4.2 g, 0.03 mol)和少量碘化钾,75 °C搅拌20 min,加入1,3-溴氯丙烷(2.2 mL, 0.023 mol),继续反应5 h, TLC检测反应完全后,停止反应。加水100 mL,搅拌有固体析出,抽滤得粗产品,丙酮重结晶得到黄色固体7.4 g,收率:83.0%, m.p.175.3~176.2 °C。HRMS (ESI)Calcd for $C_{23}H_{27}ClN_4O_3$ [M+H]⁺443.1820, found 443.1826。

2.1.8 目标化合物11f的合成 4-[4-(2-乙酰胺基-1-甲基乙基)苯氨基]-6-羟基-7-甲氧基喹啉(3.6 g, 0.01 mol)、N,N-二甲基甲酰胺(45 mL)、碳酸钾(2.0 g, 0.014 mol)和少量碘化钾95 °C搅拌,再缓慢加入N-(3-氯丙基)-二丁基胺(2.72 mL, 0.011 mol),继续反应6 h, TLC检测反应完全后,停止反应。加水150 mL,搅拌有固体析出,抽滤得粗产品。在室温下,将粗产品溶于丙酮,缓慢滴加盐酸,搅拌有固体出现,抽滤,得淡黄色固体4.2 g,收率:77.8%。

目标化合物11a-11j的合成方法参照上述方法。

2.1.9 目标化合物12a的合成 4-[4-(2-乙酰胺基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁基)丙氧基)喹啉(1 g, 0.002 mol)和1N HCl(5 mL)依次加入到100 mL的圆底烧瓶中。升温至95 °C回流反应48 h, HPLC监控检测反应完全后,停止反应。减压蒸馏,用少量无水乙醇多次洗涤,继续减压蒸除无水乙醇,真空干燥得黄白色固体0.7 g,收率:77.8%。

目标化合物12a-12f的合成方法参照上述方法。

2.2 目标化合物的图谱数据

2.2.1 (S)-4-[4-(2-乙酰氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-

7-甲氧基-6-(3-(1-六氢哌啶基)丙氧基)喹啉(**11a**) 淡黄色固体,收率 58.0%,mp.160.2~163.3 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.35 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 4.30 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.37-3.32 (m, 2H), 3.19-3.06 (m, 6H), 3.00-2.96 (m, 1H), 2.30-2.26 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.86-1.79 (m, 4H), 1.27 (d, 3H), 1.20-1.04 (m, 1H), 0.96-0.76 (m, 1H)。HRMS(ESI)Calcd for $C_{28}H_{37}N_5O_3$ [M+H]⁺492.2939, found 429.2930。

2.2.2 (S)-4-[4-(2-乙酰氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(1-四氢吡咯基)丙氧基)喹啉(**11b**) 淡黄色固体,收率 57.0%,m.p.153.1~154.3 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.42 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.66 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.18 (s, 1H), 4.39 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.51 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.39-3.33 (m, 2H), 3.23-3.18 (m, 4H), 3.01-2.97 (m, 1H), 2.41-2.34 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.33-1.31 (m, 4H), 1.28 (d, $J = 4.1$ Hz, 3H)。HRMS(ESI)Calcd for $C_{27}H_{35}N_5O_3$ [M+H]⁺478.2813, found 478.2805。

2.2.3 (S)-4-[4-(2-乙酰氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二甲氨基)丙氧基)喹啉(**11c**) 淡黄色固体,收率:65.0%,m.p.137.2~139.6 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.34 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 4.23 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.41-3.32 (m, 2H), 3.00-2.95 (m, 1H), 2.79 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.47 (s, 6H), 2.17-2.11 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.28 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H)。HRMS (ESI)Calcd for $C_{25}H_{33}N_5O_3$ [M+H]⁺ 452.2653, found 452.2660。

2.2.4 (S)-4-[4-(2-乙酰氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(1-吗啉基)丙氧基)喹啉(**11d**) 白色固体,收率:70.2%,m.p.168.4~170.0 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.65 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 4.45 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.10 (d, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.89 (t, $J = 11.9$ Hz, 3H), 3.66 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H), 3.48 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.37 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.24 (td, $J = 12.3, 3.4$ Hz, 4H), 3.07-3.00 (m, 1H), 2.47-2.41 (m, 2H), 1.93 (s, 3H), 1.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H)。HRMS

(ESI)Calcd for $C_{27}H_{35}N_5O_4$ [M+H]⁺494.2709, found 494.2703。

2.2.5 (S)-4-[4-(2-乙酰氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁氨基)丙氧基)喹啉(**11e**) 灰白色固体,收率: 76.0%,m.p.155.4~156.8 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.66 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 4.43 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.47 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.40 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 8.3$ Hz, 4H), 3.07-3.02 (m, 1H), 2.42-2.31 (m, 2H), 1.96 (s, 3H), 1.83-1.70 (m, 4H), 1.51-1.41 (m, 4H), 1.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H)。HRMS(ESI)Calcd for $C_{31}H_{45}N_5O_3$ [M+H]⁺536.3588, found 536.3597。

2.2.6 4-[4-(2-乙酰氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁氨基)丙氧基)喹啉(**11f**) 灰白色固体,收率: 77.8%,m.p.155.4~157.9 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.36 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H), 7.28 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H), 7.14 (s, 1H), 4.28 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.45-3.32 (m, 2H), 3.09 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H), 3.00-2.95 (m, 1H), 2.92-2.78 (m, 4H), 2.21-2.13 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.65-1.56 (m, 4H), 1.42-1.35 (m, 4H), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H)。HRMS (ESI)Calcd for $C_{31}H_{45}N_5O_3$ [M+H]⁺536.3611, found 536.3618。

2.2.7 (R)-4-[4-(2-乙酰氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁氨基)丙氧基)喹啉(**11g**) 灰白色固体,收率:75.5%,m.p.148.0~149.0 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.66 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 4.43 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.48 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.38 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 8.3$ Hz, 4H), 3.05-3.01 (m, 1H), 2.40-2.36 (m, 2H), 1.92 (s, 3H), 1.81-1.74 (m, 4H), 1.49-1.44 (m, 4H), 1.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H)。HRMS (ESI)Calcd for $C_{31}H_{45}N_5O_3$ [M+H]⁺536.3614, found 536.3615。

2.2.8 4-[4-(1-乙酰氨基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁氨基)丙氧基)喹啉(**11h**) 灰白色固体,收率: 60.0%,m.p.165.4~167.7 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.37 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.17 (s, 1H), 5.04-5.01 (m, 1H), 4.30 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.15 (t, $J = 15.5$ Hz,

2H), 2.93 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H), 2.23–2.18 (m, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.67–1.62 (m, 4H), 1.47 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.42–1.38 (m, 4H), 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H)。HRMS (ESI) Calcd for $C_{30}H_{43}N_5O_3$ [M+H]⁺ 522.3316, found 522.3323。

2.2.9 (R)-4-[4-(1-乙酰氨基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁胺基)丙氧基)喹啉 (**11i**) 灰白色固体, 收率:76.0%, m.p.155.4~157.9 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.36 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.66 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 5.04–5.00 (m, 1H), 4.24 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 2.86 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 20.9, 13.1$ Hz, 4H), 2.08 (dd, $J = 13.3, 6.9$ Hz, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.55–1.50 (m, 4H), 1.47 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.34 (dd, $J = 14.9, 7.5$ Hz, 4H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H)。HRMS (ESI) Calcd for $C_{30}H_{43}N_5O_3$ [M+H]⁺522.3442, found 522.3448。

2.2.10 (S)-4-[4-(1-乙酰氨基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁胺基)丙氧基)喹啉 (**11j**) 灰白色固体, 收率:77.0%, m.p.158.4~160.9 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.66 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 5.05–5.02 (m, 1H), 4.42 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.47 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 8.3$ Hz, 4H), 2.39–2.35 (m, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.80–1.75 (m, 4H), 1.49–1.45 (m, 7H), 1.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H)。HRMS (ESI) Calcd for $C_{30}H_{43}N_5O_3$ [M+H]⁺522.3419, found 522.3426。

2.2.11 4-[4-(2-氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁胺基)丙氧基)喹啉 (**12a**) 黄白色固体, 收率:77.8%, m.p.120.5~123.1 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.67 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 4.45 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.48 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.27–3.22 (m, 5H), 3.21–3.17 (m, 2H), 2.41–2.36 (m, 2H), 1.83–1.69 (m, 6H), 1.50–1.43 (m, 4H), 1.40 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.03 (t, $J = 7.3, 2.7$ Hz, 6H)。HRMS (ESI) Calcd for $C_{29}H_{47}N_5O_2$ [M+H]⁺494.3487, found 494.3496。

2.2.12 (R)-4-[4-(2-氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁胺基)丙氧基)喹啉 (**12b**) 黄白色固体, 收率:73.8%, m.p.121.4~122.9 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.67 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J = 7.9$ Hz,

2H), 7.30 (s, 1H), 4.45 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.47 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.27–3.22 (m, 5H), 3.21–3.17 (m, 2H), 2.41–2.36 (m, 2H), 1.82–1.71 (m, 6H), 1.48–1.45 (m, 4H), 1.40 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.03 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H)。HRMS (ESI) Calcd for $C_{29}H_{47}N_5O_2$ [M+H]⁺494.3380, found 494.3376。

2.2.13 (S)-4-[4-(2-氨基-1-甲基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁胺基)丙氧基)喹啉 (**12c**) 黄白色固体, 收率:70.0%, m.p.119.9~120.1 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.68 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 18.7$ Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 4.31 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.51–3.45 (m, 4H), 3.45–3.39 (m, 2H), 3.26–3.24 (m, 5H), 2.38–2.32 (m, 2H), 1.80–1.75 (m, 6H), 1.47–1.46 (m, 4H), 1.40 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.03 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H)。HRMS (ESI) Calcd for $C_{29}H_{47}N_5O_2$ [M+H]⁺494.3473, found 494.3476。

2.2.14 4-[4-(1-氨基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁胺基)丙氧基)喹啉 (**12d**) 黄白色固体, 收率:66.7%, m.p.126.7~127.9 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.71 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.75–7.67 (m, 2H), 7.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 5.08–5.02 (m, 1H), 4.46 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.47 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.24 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H), 1.80–1.76 (m, 6H), 1.69 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.03 (t, $J = 7.3$ Hz, 10H)。HRMS (ESI) Calcd for $C_{28}H_{41}N_5O_2$ [M+H]⁺ 480.3230, found 480.3228。

2.2.15 (R)-4-[4-(1-氨基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁胺基)丙氧基)喹啉 (**12e**) 黄白色固体, 收率:72.8%, m.p.127.4~130.6 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.71 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.73–7.66 (m, 2H), 7.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 5.08–5.01 (m, 1H), 4.46 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.48 (t, $J = 7.9, 7.3$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 8.8, 7.9$ Hz, 4H), 1.80–1.76 (m, 6H), 1.69 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 10H)。HRMS (ESI) Calcd for $C_{28}H_{41}N_5O_2$ [M+H]⁺480.3315, found 480.3301。

2.2.16 (S)-4-[4-(1-氨基乙基)苯氨基]-7-甲氧基-6-(3-(二丁胺基)丙氧基)喹啉 (**12f**) 黄白色固体, 收率: 76.5%。m.p.127.8~129.5 °C。¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.71 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.76–7.63 (m, 2H), 7.60 (d, $J =$

8.3 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 5.06–4.99 (m, 1H), 4.46 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.47 (t, $J = 15.4, 8.0$ Hz, 2H), 3.24 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H), 1.85–1.72 (m, 6H), 1.69 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.48–1.44 (m, 4H), 1.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H)。HRMS (ESI) Calcd for $C_{28}H_{41}N_5O_2[M+H]^+$ 480.3192, found 480.3199。

2.3 体外抗肿瘤活性实验

采用 MTT 比色法测定目标化合物 **11a–11j** 及 **12a–12f** 对肺癌细胞 A549 和乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外抗肿瘤活性,以 OTS514 和吉非替尼作为阳性对照药。将对数生长期的 A549 和 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板中(8×10^4 个/mL),置温度 37 °C, 5% CO_2 条件下的培养箱中贴壁培养 24 h,弃去原培养基。设置空白对照组、阳性对照组和药物组,96 孔板内分别加入用 0.2% DMSO 稀释的梯度浓度药物(0.5、1.5、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 100 μL ,设 6 个复孔,置于 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养 48 h (A549 细胞)和 72 h (MDA-MB-231 细胞)后,弃去原培养基,每孔加入 MTT(0.5 mg/mL)100 μL 置于培养箱中继续培养 4 h 后,出现紫色结晶,弃去 MTT 溶液,每孔加入 150 μL DMSO,置于摇床 10 min,用酶标仪在 490 nm 波长下测其 OD 值,通过 Graphpad prism 软件计算化合物的 IC_{50} 值。结果见表 1。

表 1 目标化合物的体外抗肿瘤活性($\bar{x} \pm s, n=6$)

化合物	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	A549	MDA-MB-231
11a	204.031±31.362	55.411±5.125
11b	>500	281.590±59.613
11c	>500	>500
11d	>500	>500
11e	16.603±0.136	12.192±0.166
11f	18.242±0.217	12.619±0.741
11g	12.882±0.864	9.720±1.187
11h	18.198±1.469	8.289±0.275
11i	13.726±1.418	9.497±0.583
11j	17.441±0.230	12.188±0.155
12a	7.687±0.707	8.733±0.060
12b	9.556±0.495	9.697±0.162
12c	14.908±0.969	5.879±0.350
12d	9.226±0.737	6.780±0.328
12e	10.380±0.138	7.290±0.521
12f	8.759±0.134	9.850±0.299
吉非替尼	19.235±2.661	27.797±5.323
OTS514	7.435±0.793	2.195±0.122

3 讨论

本实验运用局部修饰、电子等排等新药设计原理,将 OTS514 的母核噻吩并[2,3-*c*]喹啉酮环替换成喹啉啉环,对其骨架环的 4-位和 6-位上的取代基进行了重新的结构修饰,成功设计并合成 16 个目标化合物,经 ^1H NMR、MS 进行结构表征。

通过 MTT 实验结果发现目标化合物对两种肿瘤细胞都有不同程度的抑制作用,6-位取代基分别为 3-六氢哌啶丙氧基、3-四氢吡咯丙氧基、3-二甲胺丙氧基、3-吗啉丙氧基和 3-二丁胺丙氧基,在五种取代基团中以二丁基胺的效果最佳,可能是二丁基胺中的碳链与生物大分子触碰机率变大使两者之间的范德华力变大,也有疏水键的作用,使两个非极性区域间结合更加牢固,抗肿瘤效果更佳。通过细胞实验发现在 4 位的手性侧链对抗肿瘤活性影响不大,手性侧链中的碳链的长短对活性影响也不是很明显;在化合物 11 的基础上,将乙酰基脱去得到化合物 **12a–12f**,发现暴露的氨基能增强化合物的抗肿瘤活性,实验证明了计算机模拟的结果,暴露的氨基能与 TOPK 的 GLU-116 氨基酸形成氢键,使化合物与 TOPK 结合更加牢固。MTT 实验结果证明了化合物 **12a–12f** 的抗肿瘤活性与阳性对照药 OTS514 相当,且 OTS514 抗肿瘤活性优于吉非替尼。为进一步探索含有喹啉啉药效团的 TOPK 抑制剂研究打下了基础。

4 结论

设计、合成了一系列含喹啉啉的 TOPK 抑制剂,通过将噻吩并[2,3-*c*]喹啉酮环替换成喹啉啉环,保留对 TOPK 的抑制特点增加其成药性,通过结构修饰得到 16 个化合物,并通过 ^1H NMR、MS 对其结构确证。通过体外抗肿瘤活性实验,发现目标化合物 **12a–12f** 具有与阳性对照药 OTS514 相当的抗肿瘤活性,为开发新结构的 TOPK 抑制剂提供了思路。

参考文献

- [1] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014, 64(1):9–29.
- [2] CAPPELLI A, PERICOT MOHR GL, GIULIANI G, et al. Further studies on imidazo [4,5-*b*]pyridine AT1 angiotensin II receptor antagonists. Effects of the transformation of the 4-phenylquinoline backbone into 4-phenylisoquinolinone or 1-phenylindene scaf-

- folds[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49(22):6451-6464.
- [3] NAKAMURA T. Proton pump inhibitors: Tenatoprazole (TU-199) [J]. *Nippon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 2002, 60 (Suppl) 2:650-654.
- [4] ABE, Y. Cloning and expression of a novel MAPKK-like protein kinase, lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase, specifically expressed in the testis and activated lymphoid cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(28): 21525-21531.
- [5] GAUDET S, BRANTON D, LUE R A. Characterization of PDZ-binding kinase, a mitotic kinase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(10):5167-5172.
- [6] SHIH M C, CHEN J Y, WU Y C, et al. TOPK/PBK promotes cell migration via modulation of the PI3K/PTEN/AKT pathway and is associated with poor prognosis in lung cancer[J]. *Oncogene*, 2012, 31(19):2389-2400.
- [7] WEI D C, YEH Y C, HUNG J J, et al. Overexpression of T-LAK cell-originated protein kinase predicts poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Science*, 2012, 103(4):731-738.
- [8] PARK J H, LIN M L, NISHIDATE T, et al. PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase, a putative cancer/testis antigen with an oncogenic activity in breast cancer[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(18):9186-9195.
- [9] ZHU F, ZYKOVA T A, KANG B S, et al. Bidirectional Signals Transduced by TOPK-ERK Interaction Increase Tumorigenesis of HCT116 Colorectal Cancer Cells[J]. *Gastroenterology*, 2007, 133 (1):219-231.
- [10] SIMONS-EVELYN M, BAILEY-DELL K, TORETSKY J A, et al. PBK/TOPK Is a Novel Mitotic Kinase Which Is Upregulated in Burkitt's Lymphoma and Other Highly Proliferative Malignant Cells[J]. *Blood Cells Molecules & Diseases*, 2001, 27(5): 825-829.
- [11] PARK J H, JEONG Y J, WON H K, et al. Activation of TOPK by lipopolysaccharide promotes induction of inducible nitric oxide synthase through NF- κ B activity in leukemia cells[J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26(5):849-856.
- [12] NANDI A, TIDWELL M, KARP J, et al. Protein expression of PDZ-binding kinase is up-regulated in hematologic malignancies and strongly down-regulated during terminal differentiation of HL-60 leukemic cells[J]. *Blood Cells Molecules & Diseases*, 2004, 32(1):240-245.
- [13] JOELM, MUGHALA A, GRIEGZ, et al. Targeting PBK/TOPK decreases growth and survival of glioma initiating cells in vitro and attenuates tumor growth in vivo [J]. *Molecular Cancer*, 2015, 14 (1):121.
- [14] PARK J H, NISHIDATE T, NAKAMURA Y, et al. Critical roles of T-LAK cell-originated protein kinase in cytokinesis[J]. *Cancer Science*, 2010, 101(2):403-411.
- [15] V AYLON, O'CONNOR R. PBK/TOPK promotes tumour cell proliferation through p38 MAPK activity and regulation of the DNA damage response[J]. *Oncogene*, 2007, 26(24):3451-3461.
- [16] HU F, GARTENHAUS R B, EICHBERG D, et al. PBK/TOPK interacts with the DBD domain of tumor suppressor p53 and modulates expression of transcriptional targets including p21[J]. *Oncogene*, 2010, 29(40):5464-5474.
- [17] ZYKOVA T A, ZHU F, LU C, et al. Lymphokine-Activated Killer T-Cell-Originated Protein Kinase Phosphorylation of Histone H2AX Prevents Arsenite-Induced Apoptosis in RPMI7951 Melanoma Cells[J]. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12 (23): 6884-6893.
- [18] ZYKOVA T A, ZHU F, VAKORINA T I, et al. T-LAK Cell-originated Protein Kinase (TOPK) Phosphorylation of Prx1 at Ser-32 Prevents UVB-induced Apoptosis in RPMI7951 Melanoma Cells through the Regulation of Prx1 Peroxidase Activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(38):29138-29146.
- [19] KIM D J, LI Y, REDDY K, et al. Novel TOPK Inhibitor HI-TOPK-032 Effectively Suppresses Colon Cancer Growth[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(12):3060-3068.
- [20] 宋树勇. PBK/TOPK 蛋白酶抑制剂噻啉啉衍生物的合成 [D]. 湛江: 广东医学院, 2016.
- [21] MIYAMOTO T. Novel molecule targets cytokinesis[J]. *Cancer Discovery*, 2015, 5(1):OF8.
- [22] JINXUAN L, JING-YI C, YA-LIN D, et al. Structure-Based Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking of Novel PDE10 Inhibitors With Antioxidant Activities[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6:167-178.

(本文编辑 苏 维)