

本文引用: 宁虎林, 郭易华, 李凤凤, 李荣东. 2-苯氨基喹啉衍生物的设计、合成及其抗肿瘤活性研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(5): 802-810.

2-苯氨基喹啉衍生物的设计、合成及其抗肿瘤活性研究

宁虎林^{1,2}, 郭易华¹, 李凤凤¹, 李荣东^{1*}

1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南九典制药股份有限公司,湖南长沙 410000

[摘要] 目的 在喹啉环的 C-2 位引入亲脂性苯胺基团, C-7 位引入亲水性基团, 得到新型 2-苯氨基喹啉衍生物, 探究其抗肿瘤细胞增殖活性。方法 以 DL-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸和 D-苯丙氨酸为原料合成关键中间体, 与喹啉母核连接合成一系列 2-苯氨基喹啉衍生物。采用 CCK-8 法测试目标化合物对人肝癌细胞(HepG2)和非小细胞肺癌细胞(A549)的抗增殖活性。通过 Autodock 软件测试目标化合物与血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor, EGFR)蛋白的结合效果。结果 合成了 16 个新型 2-苯氨基喹啉衍生物, 经 ¹H NMR、LC-MS 确证其结构。体外抗肿瘤实验结果表明, 目标化合物 T-7 与 T-8 的抗肿瘤活性与阳性对照药吉非替尼以及乐伐替尼相当。Autodock 软件预测结果与体外抗肿瘤实验结果一致。结论 新型 2-苯氨基喹啉衍生物具有抗肝癌和非小细胞肺癌的作用, 为进一步探究喹啉衍生物类抗肿瘤药物打下基础。

[关键词] 2-苯氨基喹啉; 肝癌; 肺癌; 细胞增殖; 化学合成

[中图分类号] R284.3

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.05.012

Design, synthesis, and antitumor activity of 2-anilinoquinoline derivatives

NING Hulin^{1,2}, GUO Yihua¹, LI Fengfeng¹, LI Rongdong^{1*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Hunan Jiudian Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha, Hunan 410000, China

[Abstract] **Objective** To yield a novel 2-anilinoquinoline derivative by introducing a lipophilic aniline group at the C-2 position of the quinoline ring and a hydrophilic group at the C-7 position, and to explore its anti-tumor cell proliferation activity. **Methods** Key intermediates were synthesized from DL-phenylalanine, L-phenylalanine, and D-phenylalanine, and a series of 2-anilinoquinoline derivatives were synthesized by linking them with quinoline nuclei. The anti-proliferative activity of the target compound on human liver cancer cells (HepG2) and non-small cell lung cancer cells (A549) was tested using the CCK-8 method. The binding effects of the target compound with vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) proteins were determined by Autodock software. **Results** Sixteen new 2-anilinoquinoline derivatives were synthesized, and their structures were confirmed by ¹H NMR and LC-MS. The results of in vitro anti-tumor experiments showed that the anti-tumor activities of target compounds T-7 and T-8 were comparable to those of the positive control medicines, Gefitinib and Lenvatinib. The test results of Autodock software were consistent with the results of in vitro anti-tumor experiments. **Conclusion** The novel 2-anilinoquinoline derivatives have effects against liver cancer and non-small cell lung cancer, laying a theoretical foundation for further exploration of quinoline derivatives as anti-tumor agents.

[Keywords] 2-anilinoquinolines; liver cancer; lung cancer; cell proliferation; chemical synthesis

[收稿日期] 2023-11-07

[基金项目] 湖南中医药大学药学一流学科开放基金重点项目(2021YX01)。

[通信作者] * 李荣东, 男, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: jjdhw12@163.com。

根据最新的癌症统计,在过去的20年里,每年与肝癌、肺癌相关的死亡率显著上升^[1-2]。当前研究抗肝癌、肺癌药物的重点是开发疗效更好、选择性更强和患者依从性更高的靶向药物^[3]。吉非替尼(Gefitinib)被美国食品药品监督管理局批准为治疗肺癌的一线药物^[4],其作用靶标表皮生长因子受体(epidermal growth factor, EGFR)是最常见的用于研发抗肺癌药物的高效靶标^[5]。血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)抑制剂在肝癌中的应用被认为是阻止肝癌细胞生长和扩散的最成功的方法之一^[6]。乐伐替尼^[7](Lenvatinib)和卡博替尼^[8](Cabozantinib)均是VEGFR 激酶抑制剂,且母核结构都为喹啉环。

喹啉是药物设计的“特权亚结构”^[9-12],以喹啉结构作为母核,利用拼接原理引入苯氨基基团,合成了许多具有抗肿瘤活性的苯氨基喹啉衍生物。例如伯舒替尼^[13](Bosutinib)被批准治疗慢性髓系白血病;来那替尼^[14](Neratinib)、吡咯替尼^[15](Pyrotinib)用于抗乳腺癌;培利替尼^[16](Pelitinib)可以治疗肺癌。这些化合物在喹啉的不同位置进行不同的修饰,喹啉的6、7位分别与不同的疏水或亲水基团相连,4位与苯胺相连。由于4-苯氨基喹啉的显著抗癌特性,研究人员对2-苯氨基喹啉衍生物的抗癌活性进行研究,发现部分2-苯氨基喹啉衍生物的抗肿瘤活性比4-

苯氨基喹啉衍生物强^[17-20]。因此,本文以EGFR抑制剂和VEGFR抑制剂为先导化合物,并采取优势片段对接的策略(图1),利用拼接原理在喹啉的2位上连接苯氨基基团,6、7位与不同的亲水基团对接,设计合成了16个新型2-苯氨基喹啉衍生物,并测试其对人肝癌细胞(HepG2)和非小细胞肺癌细胞(A549)的抗增殖活性。

1 仪器与试药

Water Xevo G2-XS TOF 型质谱仪(美国沃特世科技有限公司);AVANCE III HD 600 MHz 型核磁共振波谱仪(德国布鲁克科技有限公司);RE-2000B 型旋转蒸发仪、DFY-10L 型低温恒温反应浴槽、SHZ-D(III)型循环水式真空泵、DB-2BC 型真空干燥箱(巩义市予华仪器有限公司);ZNCL-DL-G2型智能磁力搅拌器(爱博特科技有限公司);Multiskan MK 型多功能酶标仪(Thermo 公司);5415R 型高速离心机(Eppendorf 公司);SW-CJ-A-2FD 型单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);二氧化碳培养箱(Sheldon Manufacturing inc 公司);人肺癌细胞株 A549 和人肝癌细胞株 Hepg-2 由湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心赠予;吉非替尼(河南普赛化工产品有限公司);乐伐替尼(上海笛柏生物科技有限公司)。实验所用试剂均为市售化学纯或分析纯。

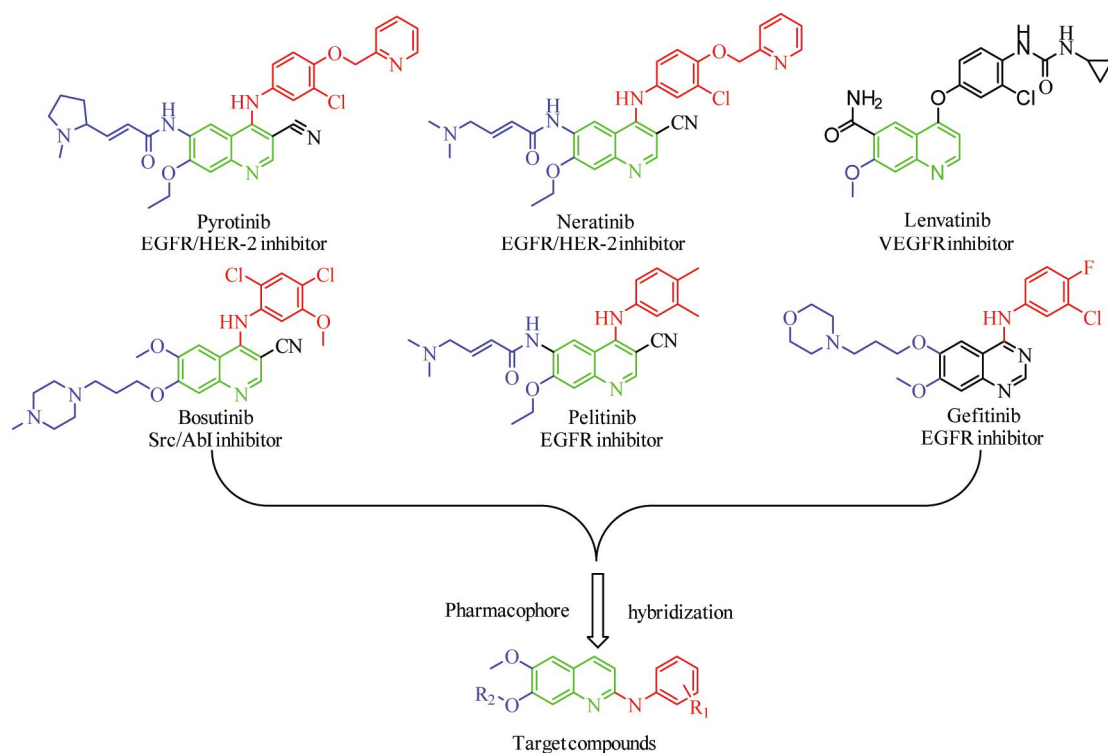


图1 目标化合物的设计理念

2 方法与结果

2.1 目标化合物的合成

目标化合物 **T1~T16** 的合成方案如图 2 所示,合成路线分为两部分。第一部分,以 DL-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、D-苯丙氨酸为起始原料,经乙酰化、硝化、酯化和还原,得到重要中间体 **B-DL-5**、**B-L-5** 和 **B-D-5**。第二部分,目标化合物以阿魏酸为起始原料,经酯化、苄基化、硝化、成环、脱保护、乙酰化和氯化,得到 6-甲氧基-7-乙酰氧基-2-氯喹啉 (**A-8**),然后与第一部分中间体 **B-DL-5**、**B-L-5** 和 **B-D-5** 以及 4-氨基苯甲酸乙酯、4-甲基苯胺、2-甲基-4-甲氧基苯胺、4-溴-2-氟苯胺、3-氯-4-氟苯胺对接得到中间体 **C-1~C-8**,再脱保护得目标化合物 **T-1~T-8**,再对 **T-8** 的 7 位羟基进行修饰,得到目标化合物 **T-9~T-16**。

2.1.1 2-乙酰氨基-3-苯基丙酸 (**B-DL-2**) 的制备

DL-苯丙氨酸 (15 g, 0.091 mol) 和水 (200 mL) 室温搅拌 30 min, 缓慢滴加饱和的 NaOH 水溶液, 调节溶液的 pH 值至 DL-苯丙氨酸全溶, 缓慢滴加乙酸酐 (15 mL, 0.159 mol)。乙酸酐滴加过程中, 由于 pH 值的改变, DL-苯丙氨酸析出, 滴加饱和的 NaOH 水溶液维持反应液的弱碱性环境 (pH=8.0)。室温反应 3 h, TLC 检测反应完全后, 滴加盐酸调节反应液的 pH 值至 2, 产物完全析出, 抽滤, 干燥得白色固

体 15.8 g, 收率: 84.0%。

目标化合物 **B-D-2**、**B-L-2** 的合成参照上述方法。

2.1.2 2-乙酰氨基-3-(4-硝基苯基)丙酸 (**B-DL-3**) 的制备 在 250 mL 圆底烧瓶中缓慢加入 98% 浓硫酸 (4.4 mL) 和 65%~68% 硝酸 (3.7 mL), 控温 -10 °C 搅拌 0.5 h, 分批加 2-乙酰氨基-3-苯基丙酸 (4.6 g, 0.048 mol) 后搅拌 5 h, 将反应瓶置于室温继续搅拌反应 19 h, TLC 检测反应完全后, 将反应液倒入 200 mL 冰水中, 搅拌, 产物析出, 抽滤, 干燥得白色固体 5.2 g, 收率: 92.8%。

目标化合物 **B-D-3**、**B-L-3** 的合成参照上述方法。

2.1.3 2-乙酰氨基-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯 (**B-DL-4**) 的制备 2-乙酰氨基-3-(4-硝基苯基)丙酸 (5.2 g, 0.024 mol), 甲醇 (52 mL) 加入 250 mL 圆底烧瓶中, 在 85 °C 下搅拌 0.5 h 后, 缓慢滴加 98% 浓硫酸 (0.73 mL), 回流反应 7 h, TLC 检测反应完全后, 冷却至室温。减压蒸除甲醇, 加乙酸乙酯 (150 mL) 提取, 滴加饱和 Na₂CO₃ 溶液, 调节 pH 值至 7, 水相用乙酸乙酯 (50 mL×2) 萃取, 合并有机相, 加水 (50 mL×2) 洗涤, 无水硫酸镁干燥有机相 4 h。过滤, 滤液减压浓缩, 得黄色固体 4.5 g, 收率: 83.3%。

目标化合物 **B-D-4**、**B-L-4** 的合成参照上述方法。

2.1.4 2-乙酰氨基-3-(4-氨基苯基)丙酸甲酯 (**B-DL-5**) 的制备 将还原铁粉 (9.7 g, 0.199 mol)、氯化铵 (0.6 g, 0.013 mol)、乙醇 (52 mL)、水 (13 mL)

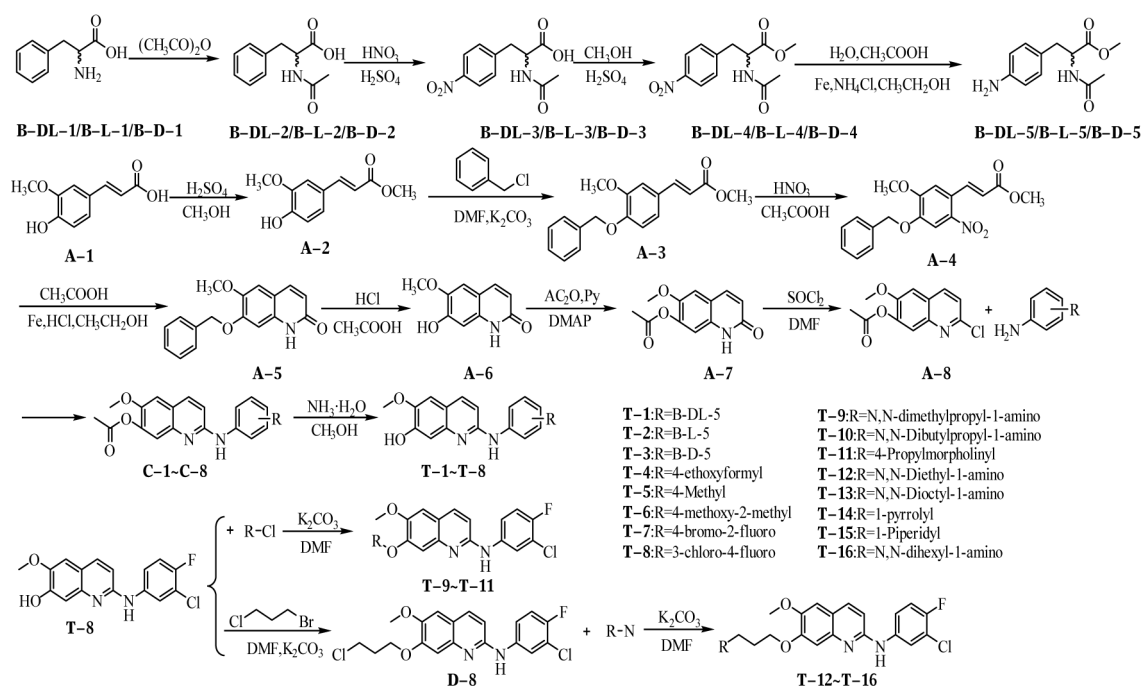


图 2 目标化合物的合成方案

和冰醋酸(3 mL)均加入三颈烧瓶中,再置于 90 °C 油浴锅中搅拌反应 1.5 h 后,加入 2-乙酰氨基-3-(4-硝基苯基)丙烯酸甲酯(4.5 g, 0.019 mol)继续加热搅拌反应 3 h,经 TLC 检测反应完全后,趁热抽滤,滤液减压浓缩,加二氯甲烷(150 mL)提取,加水(50 mL×2)洗涤,无水硫酸镁干燥有机相 4 h。过滤,滤液减压浓缩,得黄白色固体 2.6 g,收率:65.0%。

目标化合物**B-D-5**、**B-L-5**的合成参照上述方法。

2.1.5 (E)-3-((4-羟基-3-甲氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**A-2**)的制备 阿魏酸(10 g, 0.052 mol)溶于甲醇(50 mL),90 °C 搅拌 0.5 h,缓慢滴加 98%浓硫酸(1.8 mL),回流反应 6 h。TLC 检测反应完全后,停止反应。冷却至室温,减压蒸出甲醇,加乙酸乙酯(100 mL),滴加饱和 Na₂CO₃ 水溶液,调节 pH 值至 7,加水(50 mL×3)洗涤,无水硫酸镁干燥有机相 4 h。过滤,减压浓缩,得淡黄色液体 10.2 g,收率:95.3%。

2.1.6 (E)-3-((3-甲氧基-4-苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**A-3**)的制备 (E)-3-((4-羟基-3-甲氧基)苯基)丙烯酸甲酯(10.2 g, 0.049 mol)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF, 27.5 mL)、氯化苄(5.3 mL, 0.046 mol)、K₂CO₃(8 g, 0.058 mol),75 °C 搅拌 6 h。TLC 检测反应完全后,停止反应。冷却至室温,倒入 1 000 mL 冰水中搅拌 2 h,抽滤,烘干滤饼,得白色固体 12.3 g,收率:84.2%。

2.1.7 (E)-3-((5-甲氧基-2-硝基-4-苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**A-4**)的制备 (E)-3-((3-甲氧基-4-苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(12.3 g, 0.041 mol),冰醋酸(50 mL),60 °C 搅拌 0.5 h 后,置于 25 °C 下搅拌,分批缓慢滴加 HNO₃(24.6 mL),反应温度控制在 30 °C 以下。滴加完 HNO₃ 后,继续搅拌 0.5 h, TLC 检测反应完全后,停止反应。将反应液倒入 1 000 mL 冰水中搅拌 2 h,抽滤得到滤饼,滤饼干燥后得淡黄色固体 14 g,收率:98.6%。

2.1.8 6-甲氧基-7-苄氧基-2-喹啉酮(**A-5**)的制备 (E)-3-((5-甲氧基-2-硝基-4-苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(3.6 g, 0.010 mol)、还原铁粉(17.3 g, 0.310 mol)、冰醋酸(36 mL)、无水乙醇(36 mL)和浓盐酸 HCl(12 mL)加入三颈烧瓶中,90 °C 机械搅拌 6 h, TLC 检测反应完全后,停止反应。趁热抽滤,减压浓缩,加入二氯甲烷(126 mL)、水(63 mL),搅拌 0.5 h,

抽滤,滤液用水(50 mL×3)洗涤,抽滤,烘干,得灰白色固体 1.6 g,收率:55.2%。

2.1.9 7-羟基-6-甲氧基-2-喹啉酮(**A-6**)的制备 将 6-甲氧基-7-苄氧基-2-喹啉酮(4.0 g, 0.014 mol)、冰醋酸(10 mL)、浓 HCl(30 mL)均加入反应瓶中,再置于 110 °C 油浴锅中,搅拌反应 6 h, TLC 检测反应完全后,停止反应。反应液冷却至室温,减压浓缩,加甲醇(10 mL)搅拌 1 h 后,抽滤,烘干,得粉红色固体 2.3 g,收率:85.2%。

2.1.10 6-甲氧基-7-乙酰氧基-2-喹啉酮(**A-7**)的制备 7-羟基-6-甲氧基-2-喹啉酮(2.5 g, 0.015 mol)、乙酸酐(36 mL)、吡啶(7.4 mL)置于 100 °C 搅拌 1 h 后,加入 4-二甲氨基吡啶(0.15 g, 0.001 mol),继续反应 6 h, TLC 检测反应完全后,停止反应。反应液冷却至室温,加至 200 mL 冰水中搅拌 2 h 后,抽滤,烘干,得黄白色固体 2.1 g,收率:70.0%。

2.1.11 2-氯-6-甲氧基-7-乙酰氧基喹啉(**A-8**)的制备 6-甲氧基-7-乙酰氧基-2-喹啉酮(2.3 g, 0.010 mol)溶于氯化亚砷(17.7 mL, 0.244 mol),80 °C 搅拌 0.5 h 后,滴加 DMF(23 mL)。继续反应 4 h, TLC 检测反应完全后,停止反应。反应液冷却至室温,减压浓缩后,加冰水 800 mL,搅拌 2 h,抽滤,烘干,得黄色固体 2.3 g,收率:92.0%。

2.1.12 2-乙酰氨基-3-(4-((6-甲氧基-7-乙酰氧基喹啉-2-基)氨基)苯基)丙烯酸甲酯(**C-1**)的制备 将 2-氯-6-甲氧基-7-乙酰氧基喹啉(0.8 g, 0.003 mol)以及 2-乙酰氨基-3-(4-氨基苯基)丙烯酸甲酯(1.1 g, 0.005 mol)加入反应瓶,再置于 160 °C 油浴锅中搅拌反应 2 h, TLC 检测反应完全后,停止反应。冷却至室温,加二氯甲烷(50 mL),搅拌 2 h,抽滤,烘干,得黄色固体 0.6 g,收率:42.8%。

目标化合物 **C-2~C-8** 的合成参照上述方法。

2.1.13 2-乙酰氨基-3-(4-((7-羟基-6-甲氧基喹啉-2-基)氨基)苯基)丙烯酸甲酯(**T-1**)的制备 2-乙酰氨基-3-(4-((6-甲氧基-7-乙酰氧基喹啉-2-基)氨基)苯基)丙烯酸甲酯(0.6 g, 0.001 mol)、甲醇(10 mL),置于 80 °C 搅拌 0.5 h,加入氨水(2 mL),继续反应 6 h, TLC 检测反应完全后,停止反应。冷却至室温,减压浓缩,加 50 mL 冰水搅拌,抽滤,烘干,得黄色固体 0.4 g,收率:73.5%。

目标化合物 **T-2~T-8** 的合成参照上述方法。

2.1.14 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(二甲氨基)丙氧基)喹啉(**T-9**)的制备 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-羟基喹啉(1 g, 0.003 mol)溶于 DMF(5 mL), 置于 95 °C 搅拌 0.5 h, 加入碳酸钾(1.3 g, 0.009 mol)、碘化钾(0.02 g)和 N,N-二甲基-3-氯丙烷(0.46 g, 0.004 mol)。继续反应 24 h, TLC 检测反应完全后, 停止反应。冷却至室温, 加冰水(50 mL), 搅拌 2 h, 抽滤, 烘干滤饼得粗产品。将粗产品溶于甲醇(5 mL), 缓慢滴加盐酸, 析出白色固体, 抽滤, 烘干, 得黄白色固体 1.1 g, 收率: 84.6%。

目标化合物 **T-10~T-11** 的合成参照上述方法。

2.1.15 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-氯丙氧基)喹啉(**D-8**)的制备 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-7-羟基-6-甲氧基喹啉(0.6 g, 0.002 mol)溶于 DMF(2.1 mL), 置于 75 °C 搅拌 0.5 h, 加入碳酸钾(0.54 g, 0.004 mol)、碘化钾(0.02 g)和 1,3-溴氯丙烷(0.71 mL, 0.008 mol)。继续反应 6.5 h, TLC 检测反应完全后, 停止反应。冷却至室温, 加冰水(50 mL), 搅拌 2 h, 抽滤, 烘干, 得白色固体 0.6 g, 收率: 85.7%。

2.1.16 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(二乙氨基)丙氧基)喹啉(**T-12**)的制备 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-氯丙氧基)喹啉(0.7 g, 0.002 mol)溶于 DMF(4.2 mL), 置于 95 °C 搅拌 0.5 h, 加入碳酸钾(0.31 g, 0.002 mol)、碘化钾(0.02 g)和二乙胺(0.37 mL, 0.004 mol)。继续反应 23 h, TLC 检测反应完全后, 停止反应。冷却至室温, 加冰水(50 mL), 搅拌 2 h, 抽滤, 烘干滤饼得粗产品。将粗产品溶于甲醇(5 mL), 缓慢滴加盐酸, 析出白色固体, 抽滤, 烘干, 得黄白色固体 0.4 g, 收率: 52.6%。

目标化合物 **T-13~T-16** 的合成参照上述方法。

2.2 目标化合物的图谱数据

2.2.1 2-乙酰氨基-3-(4-((7-羟基-6-甲氧基喹啉-2-基)氨基)苯基)丙酸甲酯(**T-1**) 黄色固体, 收率: 73.5%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.23 (s, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.96 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 5.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.06-4.01 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.00 (dd, *J* = 11.3, 5.1 Hz, 1H), 2.82 (dd,

J = 11.5, 6.5 Hz, 1H), 1.78 (s, 3H), 1.63 (s, 3H)。HRMS(ESI)_C₂₂_H₂₃_N₃_O₅[M+H]⁺: 理论值 410.171 0, 实测值 410.171 4。

2.2.2 (S)-2-乙酰氨基-3-(4-((7-羟基-6-甲氧基喹啉-2-基)氨基)苯基)丙酸甲酯(**T-2**) 黄色固体, 收率: 70.2%。HRMS(ESI)_C₂₂_H₂₃_N₃_O₅[M+H]⁺: 理论值 410.171 0, 实测值 410.171 4。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.70 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.95 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 5.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.03-4.00 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.00 (dd, *J* = 11.3, 5.8 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 11.4, 6.4 Hz, 1H), 1.78 (s, 3H), 1.24 (s, 3H)。

2.2.3 (R)-2-乙酰氨基-3-(4-((7-羟基-6-甲氧基喹啉-2-基)氨基)苯基)丙酸甲酯(**T-3**) 黄色固体, 收率: 67.5%。HRMS(ESI)_C₂₂_H₂₃_N₃_O₅[M+H]⁺: 理论值 410.171 0, 实测值 410.171 4。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.21 (s, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.97 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.04-3.99 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.00 (dd, *J* = 11.4, 5.0 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 11.4, 6.3 Hz, 1H), 1.78 (s, 3H), 1.24 (s, 3H)。

2.2.4 4-((7-羟基-6-甲氧基喹啉-2-基)氨基)苯甲酸乙酯(**T-4**) 白色固体, 收率: 67.5%。HRMS(ESI)_C₁₉_H₁₈_N₂_O₄[M+H]⁺: 理论值 339.133 9, 实测值 339.130 0。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H), 7.14 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)。

2.2.5 2-(对甲苯氨基)-7-羟基-6-甲氧基喹啉(**T-5**) 白色固体, 收率: 78.9%。HRMS(ESI)_C₁₇_H₁₆_N₂_O₂[M+H]⁺: 理论值 281.128 5, 实测值 281.200 0。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 7.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.04 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.25 (s, 3H)。

2.2.6 2-((2-甲基-4-甲氧基苯基)氨基)-7-羟基-6-甲氧基喹啉(**T-6**) 白色固体, 收率: 80.8%。HRMS

(ESI) $C_{18}H_{18}N_2O_3[M+H]^+$: 理论值 311.139 0, 实测值 311.136 3。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.10 (s, 1H), 7.77 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.83 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 2.19 (s, 3H)。

2.2.7 2-((2-氟-4-溴苯基)氨基)-7-羟基-6-甲氧基喹啉(**T-7**) HRMS(ESI) $C_{16}H_{12}BrFN_2O_2[M+H]^+$: 理论值 363.013 9, 实测值 363.014 3。白色固体, 收率: 89.2%。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 3.85 (s, 3H)。

2.2.8 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-7-羟基-6-甲氧基喹啉(**T-8**) 黄白色固体, 收率: 85.7%。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H)。

2.2.9 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(二甲氨基)丙氧基)喹啉(**T-9**) 黄白色固体, 收率: 84.6%。HRMS(ESI) $C_{21}H_{23}ClFN_3O_2[M+H]^+$: 理论值 404.153 6, 实测值 404.153 9。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.36 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.92 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.22 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.83 (s, 6H), 2.26-2.20 (m, 2H)。

2.2.10 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(二丁氨基)丙氧基)喹啉(**T-10**) 黄白色固体, 收率: 51.4%。HRMS(ESI) $C_{27}H_{35}ClFN_3O_2[M+H]^+$: 理论值 488.247 5, 实测值 488.250 4。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.15 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.54 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.91-1.85 (m, 2H), 1.39-1.33 (m, 4H), 1.29-1.22 (m, 4H), 0.83 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H)。

2.2.11 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(吗啉代丙氧基)喹啉(**T-11**) 黄白色固体, 收率: 71.4%。HRMS(ESI) $C_{23}H_{25}ClFN_3O_3[M+H]^+$: 理论值 446.164 1, 实测值 446.164 8。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.31 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.59 (t, $J = 4.3$ Hz, 4H), 2.46 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.98-1.93 (m, 2H), 1.31-1.21 (m, 4H)。

2.2.12 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(二乙氨基)丙氧基)喹啉(**T-12**) 黄白色固体, 收率: 52.6%。HRMS(ESI) $C_{23}H_{27}ClFN_3O_2[M+H]^+$: 理论值 432.184 9, 实测值 432.187 4。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.86 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.15 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.56 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.49-2.46 (m, 4H), 1.90-1.86 (m, 2H), 0.96 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H)。

2.2.13 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(二辛氨基)丙氧基)喹啉(**T-13**) 黄白色固体, 收率: 67.6%。HRMS(ESI) $C_{35}H_{51}ClFN_3O_2[M+H]^+$: 理论值 600.372 7, 实测值 600.373 4。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.44 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.31 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.15 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.33 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H), 1.87 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.38-1.31 (m, 4H), 1.25-1.20 (m, 6H), 1.16-1.10 (m, 16H), 0.76 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H)。

2.2.14 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(吡咯烷-1-基)丙氧基)喹啉(**T-14**) 黄白色固体, 收率: 80.0%。HRMS(ESI) $C_{23}H_{25}ClFN_3O_2[M+H]^+$: 理论值 430.169 2, 实测值 430.169 6。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.87 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H),

2.57 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.45 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 1.98–1.93 (m, 2H), 1.71–1.68 (m, 4H)。

2.2.15 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(哌啶-1-基)丙氧基)喹啉(**T-15**) 黄白色固体, 收率: 89.6%。HRMS(ESI) $C_{24}H_{27}ClFN_3O_2[M+H]^+$: 理论值 444.184 9, 实测值: 444.185 4。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.32 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.15 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.43 (t, 4H), 1.97 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.57–1.49 (m, 6H), 1.27–1.22 (m, 2H)。

2.2.16 2-((3-氯-4-氟苯基)氨基)-6-甲氧基-7-(3-(二己氨基)丙氧基)喹啉(**T-16**) 黄白色固体, 收率: 72.7%。HRMS(ESI) $C_{31}H_{43}ClFN_3O_2[M+H]^+$: 理论值 544.310 1, 实测值 544.309 6。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.92 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.44 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.20 (s, 3H), 3.32–3.26 (m, 2H), 1.32–1.16 (m, 16H), 0.85 (t, $J = 8.8$ Hz, 12H)。

2.3 体外抗肿瘤活性实验

采用 CCK-8 法测定目标化合物 **T1**~**T16** 对人非小细胞肺癌细胞 A549 和人肝癌细胞 HepG-2 的体外抗肿瘤增殖实验, 分别以吉非替尼和乐伐替尼为阳性对照药物。将处于对数生长期的 A549 癌细胞和 HepG2 癌细胞接种于 96 孔板中(1×10^5 个/mL), 置于 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。分组情况: (1) 空白组: 含有培养基、CCK-8 溶液, 不含细胞与药物; (2) 正常对照组: 含有细胞、培养基、CCK-8 溶液, 不含药物; (3) 药物组: 含有细胞、培养基、CCK-8 溶液、药物; 药物按照浓度梯度 0.5、1、5、10、25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药(每个药物浓度设 6 个复孔), 每孔 100 μL , 置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。细胞培养 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 10 μL 培养基, 置于培养箱中继续培养 1 h 后, 用酶标仪在 450 nm 波长下测其 OD 值, 并计算各化合物的 IC_{50} 值(表 1)。

表 1 目标化合物的细胞毒性实验结果

目标化合物	A549/ IC_{50} ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	HepG2/ IC_{50} ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
吉非替尼	28.68	—
乐伐替尼	—	25.08
T-1	127.20	71.58
T-2	117.80	160.60
T-3	63.46	>200.00
T-4	60.14	109.16
T-5	66.57	59.51
T-6	35.24	125.70
T-7	20.36	28.53
T-8	29.84	56.94
T-9	>200.00	>200.00
T-10	>200.00	170.43
T-11	>200.00	131.22
T-12	162.50	143.31
T-13	135.20	81.04
T-14	141.60	87.30
T-15	>200.00	135.70
T-16	>200.00	106.15

2.4 目标化合物的分子对接

从 RCSB 蛋白库网站(<https://www.rcsb.org/>)获取 EGFR 蛋白的 X-衍射晶体结构(PDB 编号为 2I-TY^[21])和 VEGFR 蛋白的 X-衍射晶体结构(PDB 编号为 3WZD^[22])。利用 Autodock 软件对活性最好的目标化合物 **T-7**、**T-8** 与 VEGFR、EGFR 进行分子对接。对接结果如表 2 所示。目标化合物 **T-7**、**T-8** 与 EGFR 蛋白和 VEGFR 蛋白的结合模式图见图 3—4, **T-7**、**T-8** 能很好地插入靶蛋白的结合口袋并与靶蛋白周围的氨基酸残基发生相互作用, 主要为疏水作用和氢键作用。目标化合物 **T-7** 与 3WZD 蛋白的氨基酸残基 CYS-919 形成氢键, 苯环部分与 ASP-1046、VAL-899、GLU-885 形成疏水作用, 结合自由能为 $-5.52 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 同时其与 2ITY 蛋白的氨基酸残基 MET-793 和 PRO-794 形成氢键, 结合自由能为 $-5.59 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。目标化合物 **T-8** 与 2ITY 蛋白的氨基酸残基 GLU-865、ARG-836 形成氢键, **T-8** 结构中的 2-苯氨基环与 LEU-862 和 THR-892 形成疏水作用, 结合自由能为 $-6.15 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。目标化合物 **T-7** 和 **T-8** 的结合能均小于最低结合自由能 $-5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 可推测目标化合物通过抑制 EGFR 或 VEGFR 蛋白而发挥抗肿瘤活性。

表2 目标化合物与靶蛋白分子对接结果

目标化合物	与3WZD靶蛋白结合能/(kcal·mol ⁻¹)	与2ITY靶蛋白结合能/(kcal·mol ⁻¹)
T-7	-5.52	-5.59
T-8	—	-6.15

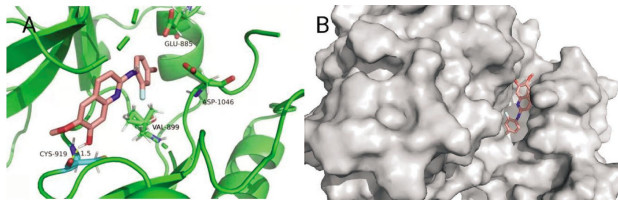


图3 目标化合物 T-7 与 3WZD(VEGFR)靶蛋白对接结果

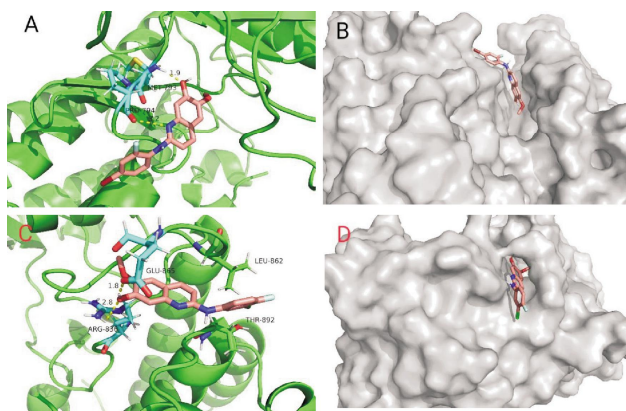


图4 目标化合物与 2ITY(EGFR)靶蛋白对接结果

注:图 A、B 为 T-7 与 2ITY(EGFR)对接结果;图 C、D 为 2ITY(3WZD)对接结果。

3 讨论

本文以阿魏酸为原料,经过酯化、苄基化、硝化、成环、脱保护、乙酰化,最后氯化得到中间体 A-8,将中间体 B-DL-5、B-L-5 和 B-D-5 以及 4-氨基苯甲酸乙酯、4-甲基苯胺、2-甲基-4-甲氧基苯胺、4-溴-2-氟苯胺、3-氯-4-氟苯胺引入 A-8 的 2 位,并对其 7 位的乙酰基脱保护后得目标化合物 T-1~T-8,然后对 T-8 进行修饰得到目标化合物 T-9~T-16,经 ¹H NMR、LC-MS 进行结构表征。

采用 CCK-8 法,对目标化合物 T-1~T-16 进行初步的活性筛选,实验结果表明:当喹啉母核 2 位取代为 3-氯-4-氟苯氨基,7 位取代基为羟基(T-8)以及不同的烷氧基(T-9、T-10、T-11、T-12、T-13、T-14、T-15、T-16)时,目标化合物 T-8 抗肿瘤效果最好,其 C-7 位取代基为羟基;当喹啉母核 C-7 位取代基为羟基,C-2 位取代基为不同的苯氨基(T-1、T-2、T-3、T-4、T-5、T-6、T-7、T-8)时,T-7 抗肿

瘤效果最好,其 2 位取代基为 2-氟-4-溴苯氨基。同时,目标化合物 T-7 抗肿瘤活性与吉非替尼以及乐伐替尼相当,T-8 的抗肿瘤活性与吉非替尼相当。通过 Autodock 软件测试目标化合物 T-7 和 T-8 与抗非小细胞肺癌相关的 EGFR 靶点蛋白以及抗人肝癌细胞相关的 VEGFR 靶点蛋白的结合能力,结果显示目标化合物 T-7 和 T-8 与 EGFR 以及 VEGFR 蛋白均有较好的结合效果,因此目标化合物可能通过抑制 VEGFR 或 EGFR 蛋白而发挥抗肿瘤活性。

本研究设计、合成了一系列 2-苯氨基喹啉衍生物,对其喹啉环 2 位和 7 位进行结构修饰得到 16 个目标化合物,并通过 ¹H NMR、LC-MS 认证其结构。经体外抗肿瘤活性实验,发现目标化合物 T-7 和 T-8 的抗肿瘤活性与阳性对照药吉非替尼以及乐伐替尼相当;分子对接结果显示目标化合物与 EGFR、VEGFR 靶点具有较好的结合作用,推测目标化合物通过抑制 EGFR 或 VEGFR 蛋白而发挥抗肿瘤活性。本研究为进一步开发抗肿瘤药物新型 2-苯氨基喹啉类衍生物提供依据。

参考文献

- [1] LLOVET J M, MONTAL R, SIA D, et al. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2018, 15: 599-616.
- [2] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer[J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554.
- [3] CAPPELLI A, PERICOT MOHR G L, 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 scaffolds[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2006, 49(22): 6451-6464.
- [4] WU G R, XU B, YANG Y Q, et al. Synthesis and biological evaluation of podophyllotoxin derivatives as selective antitumor agents[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 155: 183-196.
- [5] ZI C T, YANG L, KONG Q H, et al. Glucoside derivatives of podophyllotoxin: Synthesis, physicochemical properties, and cytotoxicity[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2019, 13: 3683-3692.
- [6] SHEN H T, WU N, WANG Y, et al. Chloroquine attenuates paraquat-induced lung injury in mice by altering inflammation, oxidative stress and fibrosis[J]. International Immunopharmacology, 2017, 46: 16-22.

- [7] NIKOOKAR H, MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI M, IMAN-PARAST S, et al. Design, synthesis and in vitro α -glucosidase inhibition of novel dihydropyrano[3, 2-c]quinoline derivatives as potential anti-diabetic agents[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2018, 77: 280-286.
- [8] LI Y, XU Q Q, LI Z Y, et al. Application of 2, 4-bis(halomethyl) quinoline: Synthesis and biological activities of 2, 4-bis(benzofuran-2-yl)- and 2, 4-bis(aroxymethyl)quinolines[J]. *Molecular Diversity*, 2020, 24(1): 167-178.
- [9] YADAV V, REANG J, SHARMA V, et al. Quinoline-derivatives as privileged scaffolds for medicinal and pharmaceutical chemists: A comprehensive review[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2022, 100(3): 389-418.
- [10] MATADA B S, PATTANASHETTAR R, YERNALE N G. A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2021, 32: 115973.
- [11] MOOR L F E, VASCONCELOS T R A, DA R REIS R, et al. Quinoline: An attractive scaffold in drug design [J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2021, 21(16): 2209-2226.
- [12] PRADHAN V, SALAHUDDIN, KUMAR R, et al. Molecular target interactions of quinoline derivatives as anticancer agents: A review[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2022: 101(4): 977-997.
- [13] ISFORT S, BRÜMMENDORF T H. Bosutinib in chronic myeloid leukemia: Patient selection and perspectives[J]. *Journal of Blood Medicine*, 2018, 9: 43-50.
- [14] DEEKS E D. Neratinib: First global approval[J]. *Drugs*, 2017, 77(15): 1695-1704.
- [15] BLAIR H A. Pyrotinib: First global approval[J]. *Drugs*, 2018, 78(16): 1751-1755.
- [16] TO K K, POON D C, WEI Y M, et al. Pelitinib (EKB-569) targets the up-regulation of ABCB1 and ABCG2 induced by hyperthermia to eradicate lung cancer[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172(16): 4089-4106.
- [17] EL-DAMASY A K, CHO N C, PAE A N, et al. Novel 5-substituted-2-anilinoquinolines with 3-(morpholino or 4-methylpiperazin-1-yl)propoxy moiety as broad spectrum antiproliferative agents: Synthesis, cell based assays and kinase screening[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(14): 3307-3312.
- [18] EL-DAMASY A K, HAQUE M M, PARK J W, et al. 2-Anilinoquinoline based arylamides as broad spectrum anticancer agents with B-RAFV600E/C-RAF kinase inhibitory effects: Design, synthesis, in vitro cell-based and oncogenic kinase assessments[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 208: 112756.
- [19] PENG H K, LIN I L, LEE C C, et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of anilinoquinoline derivatives by the effect on the expression of polo-like kinase[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2014, 23(3): 1437-1446.
- [20] EL-DAMASY A K, SEO S H, CHO N C, et al. Design and synthesis of new 2-anilinoquinolines bearing N-methylpicolinamide moiety as potential antiproliferative agents[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2017, 89(1): 98-113.
- [21] YUN C H, BOGGON T J, LI Y Q, et al. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: Mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(3): 217-227.
- [22] OKAMOTO K, IKEMORI-KAWADA M, JESTEL A, et al. Distinct binding mode of multikinase inhibitor lenvatinib revealed by biochemical characterization[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 6(1): 89-94.

(本文编辑 苏 维)