

医药与日化原料

N'-苯亚甲基-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 衍生物的合成及抗肿瘤活性

韩 柳¹, 尹树铸¹, 刘家欢¹, 高连丛², 刘紫晗¹,
管雨涵¹, 昌盛^{1*}, 殷世亮^{3*}

(1. 吉林医药学院 药学院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林医药学院 临床医学院, 吉林 吉林 132013;
3. 沈阳医学院 药学院, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 以 *N*-[5-(呋喃-2-基)-1,3,4-二唑-2-基]-2-苯基-喹啉-4-甲酰胺 (STX-0119) 为先导化合物, 基于生物电子等排原理设计、合成了 25 个 *N'*-苯亚甲基-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼衍生物 (收率 20.4%~42.6%)。通过 ¹HNMR、¹³CNMR、HRMS 确证了产物结构, 采用噻唑蓝 (MTT) 和台盼蓝法以人乳腺癌细胞 (MCF-7 细胞)、人非小细胞肺癌细胞 (A549 细胞)、人慢性髓原白血病细胞 (K562 细胞)、人急性淋巴白血病细胞 (RS4:11 细胞) 为测试细胞株评价了目标化合物的体外抗肿瘤活性。目标化合物 *N'*-(2-羟基-5-硝基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIr) 表现出最强的抗 A549 细胞增殖活性 [半抑制浓度 (IC₅₀)=(7.4±0.8) μmol/L]; *N'*-(2-羟基-5-溴苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIq) 表现出最强的抗 RS4:11 细胞增殖活性 [IC₅₀=(2.4±0.2) μmol/L]; *N'*-(4-溴苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIl) 不仅表现出最强的抗 MCF-7 细胞增殖活性 [IC₅₀=(4.9±0.3) μmol/L], 还表现出最强抗 K562 细胞增殖活性 [IC₅₀=(1.2±0.2) μmol/L]。分子对接结果显示, 产物 VIIl 发挥抗肿瘤的作用可能与 STAT3 通路有关, 值得进一步深入研究。

关键词: 喹啉; 酰肼; 合成; 抗肿瘤; 生物电子等排原理; 医药原料

中图分类号: TQ463 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 11-2493-10

Synthesis and anti-tumor activity of *N'*-phenylmethylene-2-(3-pyridyl)quinoline-4-acylhydrazine derivatives

HAN Liu¹, YIN Shuzhu¹, LIU Jiahuan¹, GAO Liancong², LIU Zihan¹,
GUAN Yuhan¹, CHANG Sheng^{1*}, YIN Shiliang^{3*}

(1. College of Pharmacy, Jilin Medical University, Jilin 132013, Jilin, China; 2. College of Clinical Medicine, Jilin Medical University, Jilin 132013, Jilin, China; 3. School of Pharmacy, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning, China)

Abstract: Twenty-five *N'*-phenylmethylene-2-(3-pyridyl)quinoline-4-hydrazide derivatives (yield in 20.4%~42.6%) were designed and synthesized based on bioelectronic isosteric principle with *N*-[5-(furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]-2-phenylquinoline-4-carboxamide (STX-0119) as lead compound, and confirmed by ¹HNMR, ¹³CNMR and MS. The *in vitro* antitumor activity of the target compounds was evaluated by thiazolyl blue (MTT) assay and trypan blue assay using human breast cancer cell line (MCF-7 cells), human lung cancer cell line (A549 cells), human chronic myelogenous leukemia cell line (K562 cells), and human acute B-lymphoblastic leukemia cell line (RS4:11 cells) as test cell lines. Target compound *N'*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-2-(3-pyridyl)quinoline-4-hydrazide (VIIr) exhibited the strongest cell proliferation inhibitory activity against A549 cells with a half-inhibitory concentration (IC₅₀) of (7.4±0.8) μmol/L; Target compound

收稿日期: 2023-04-18; 定用日期: 2023-07-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230318

基金项目: 国家大学生创新创业项目 (202213706002); 吉林省科技厅自然科学基金项目 (20210101033JC); 吉林市科技局杰出青年人才培养项目 (20190104141)

作者简介: 韩 柳 (1987—), 女, 博士, E-mail: 511120149@qq.com。联系人: 昌 盛 (1980—), 男, 教授, E-mail: changsheng-pharm@163.com; 殷世亮 (1980—), 男, 讲师, E-mail: yslal@163.com。

N'-(2-hydroxy-5-bromobenzyl)-2-(3-pyridyl)quinoline-4-hydrazide (VII q) showed the strongest activity against RS4:11 cell proliferation with IC_{50} of $(2.4 \pm 0.2) \mu\text{mol/L}$; And target compound *N'*-(4-bromobenzyl)-2-(3-pyridyl)quinoline-4-hydrazide (VII l) displayed the strongest activity against MCF-7 cells [$IC_{50}=(4.9 \pm 0.3) \mu\text{mol/L}$] and K562 cells [$IC_{50}=(1.2 \pm 0.2) \mu\text{mol/L}$]. Molecular docking result indicated that the anti-tumor activity of compound VII l might be related to the STAT3 pathway, which was worthy of further in-depth research.

Key words: quinoline; acyl hydrazine; synthesis; anti-tumor; bioelectronic isosteric principle; drug materials

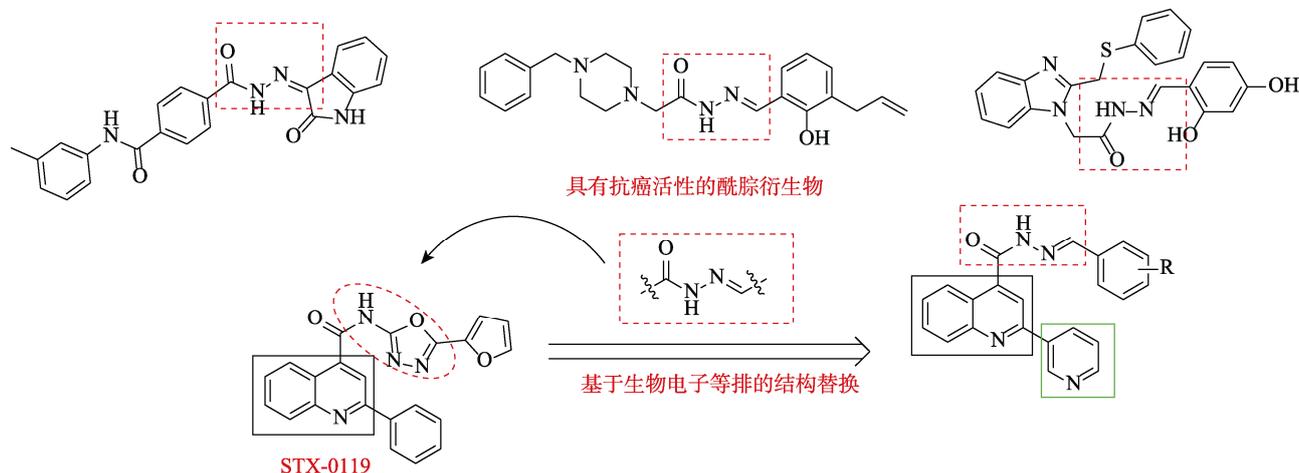
信号转导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 是一种具有信号转导和激活基因转录能力的双功能蛋白。在生理条件下, STAT3 介导细胞增殖、分化、凋亡、生存、免疫、血管生成等重要的细胞过程, 以响应大量细胞因子和生长因子的刺激^[1]。正常的 STAT3 是严格控制在标准的细胞反应内。然而, STAT3 的激活经常发生在多种人类癌症中^[2]。大量的临床前和临床证据表明, STAT3 在促进癌症的几个特征中起着关键作用^[3]。此外, YU 等^[4]研究发现, STAT3 的持续过度激活与化疗耐药和不良预后相关。免疫细胞中也观察到 STAT3 的异常活性, 通过上调免疫抑制因子和下调免疫激活因子来抑制抗肿瘤免疫应答^[5]。尽管 STAT3 的持续激活可归因于多种机制, 但是随着癌症患者关键活性位点的突变越来越多, STAT3 自身的突变近年来受到了广泛关注^[6]。综上所述, 大量研究已经证实, STAT3 是一种抗癌靶点, 开发有效且特异性的 STAT3 抑制剂是一种极具吸引力的癌症治疗方法。

STAT3 蛋白单体的 Src 同源 2 (SH2 结构域) 结构域包含 3 个 STAT3 小分子抑制剂的靶向结合口袋区, 分别是磷酸化酪氨酸 705 (pTyr 705) 识别位点 (pY 口袋结合区)、侧袋 (pY-x 口袋结合区)、亮氨酸 706 (Leu 706) 识别位点 (pY+1 口袋结合区)。此外, STAT3 还有两个重要的磷酸化位点酪氨酸 705 (Tyr 705) 和丝氨酸 727 (Ser 727), 一个单体内磷酸化酪氨酸 705 (pTyr 705) 和另一个单体内的 SH2

结构域之间的相互作用对 STAT3 的激活和二聚作用至关重要。MATSUNO 等^[7]通过虚拟筛选得到的一种新型的 STAT3 SH2 结构域抑制剂 *N*-[5-(咪唑-2-基)-1,3,4-二唑-2-基]-2-苯基-喹啉-4-甲酰胺 (STX-0119), 抑制效力为 99%, 且对其他 STAT 亚型的 DNA 结合活性无影响。分子对接实验显示, 1,3,4-二唑与 pY+1 口袋结合区结合, 2-苯基则与 pY-x 口袋结合区结合, 酰胺结构中—NH 与丝氨酸 636 (Ser 636) 结构中 C=O 形成氢键相互作用。咪唑环与受体周围的疏水区形成相互作用同时与色氨酸 623 (Trp 623) 吡啶部分形成 $\sigma-\pi$ 相互作用。

酰脲 [R'C(O)NHN=CR₁R₂] 结构作为药物结构中的一种优势结构, 在抗肿瘤药物设计与发现中占据重要地位^[8]。本研究拟以 STX-0119 为先导化合物, 基于生物电子等排原理以生物电子等排体酰脲键模拟 1,3,4-二唑结构, 同时以 3-吡啶基团代替苯基以期增加氢键受体来构建一系列基于喹啉结构的酰脲类化合物, 采用噻唑蓝 (MTT) 和台盼蓝法测试目标化合物对人乳腺癌细胞 (MCF-7 细胞)、人非小细胞肺癌细胞 (A549 细胞)、人慢性髓原白血病细胞 (K562 细胞)、人急性淋巴白血病细胞 (RS4:11 细胞) 的体外抗肿瘤活性。以期发现与 STAT3 蛋白 SH2 结构域具有更强结合能力的选择性 STAT3 抑制剂。

目标化合物的设计策略如下所示:



1 实验部分

1.1 试剂与仪器

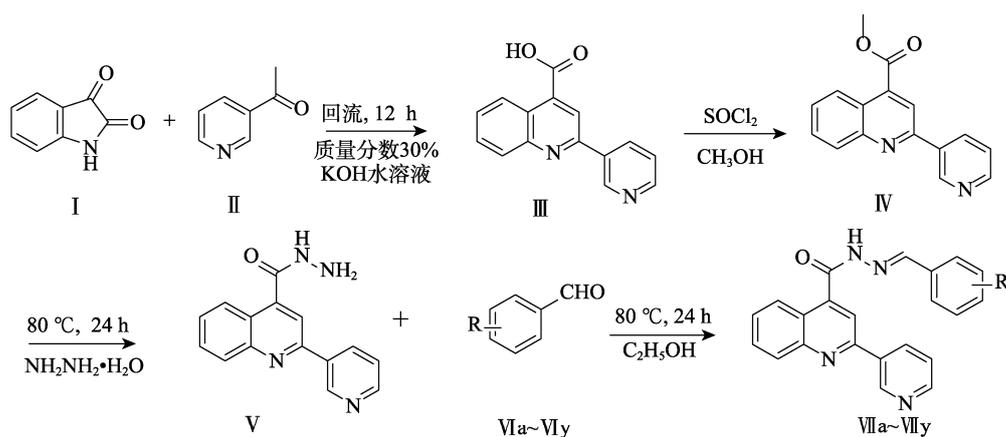
无水乙醇, AR, 天津市瑞金特化学品有限公司; 2,3-二氢吲哚二酮 (I) (质量分数 98%)、3-乙酰基吡啶 (II) (质量分数 98%)、二氯甲烷 (AR)、无水甲醇 (AR)、乙酸乙酯 (AR)、氢氧化钾 (AR)、冰乙酸 (AR)、氯化亚砷 (AR)、正己烷 (AR)、台盼蓝染色液 (质量分数 0.40%)、MTT (质量分数 $\geq 97.0\%$), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 甲醇, 色谱级, Thermo Fisher 化学试剂公司; 三乙酰基吡啶、水合肼 (质量分数 80%)、取代苯甲醛, AR, 上海瑞达精细化学品有限公司; GF254 薄层色谱硅胶板和柱层析硅胶, 青岛海洋化工有限公司; DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium, 达尔伯克 (氏) 改良伊格尔 (氏) 培养基] 高糖培养基、RPMI 1640 培养基, Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS), 杭州四季青公司; 胰蛋白酶, Bioter 公司; 人乳腺癌细胞 (MCF-7

细胞)、人非小细胞肺癌细胞 (A549 细胞)、人慢性髓原白血病细胞 (K562 细胞)、人急性淋巴白血病细胞 (RS4:11 细胞), 中国科学院上海细胞库, 本实验室传代保存; 其余所用试剂均为市售分析纯, 没有特殊说明均未进行处理。

ZF-7 型紫外线分析仪, 南京科尔仪器设备有限公司; Infinite E Plex 型多功能全波段连续光谱酶标仪, 瑞士 TECAN 实验器材有限公司; JC-B30 型玻璃仪器气流烘干器, 巩义市予华仪器有限责任公司; M-565 型熔点仪, 瑞士 Buchi 公司; Forma Steri-Cycle 型 CO₂ 细胞培养箱, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; IX73 型显微镜, 奥林巴斯有限公司; AVANCE III HD 400 MHz 型核磁共振波谱仪, 德国 Bruker 公司; UPLC-Triple-TOF/MS 系统: Acquity TM Ultra 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Triple TOF 5600+型飞行时间质谱仪 (配有电喷雾离子源), 美国 AB SCIEX 公司。

1.2 合成与结构表征

目标化合物的合成路线如下所示:



VIa, VIIa: R = 2-H; VIb, VIIb: R = 2-F; VIc, VIIc: R = 2-NO₂; VI d, VII d: R = 2-CN; VIe, VIIe: R = 2-OCH₃; VI f, VII f: R = 3-CH₃; VI g, VII g: R = 3-F; VI h, VII h: R = 3-NO₂; VI i, VII i: R = 3-OCH₃; VI j, VII j: R = 4-F; VI k, VII k: R = 4-Cl; VI l, VII l: R = 4-Br; VI m, VII m: R = 4-NO₂; VI n, VII n: R = 4-CN; VI o, VII o: R = 4-N(CH₃)₂; VI p, VII p: R = 3-F-4-Br; VI q, VII q: R = 2-OH-5-Br; VI r, VII r: R = 2-OH-5-NO₂; VI s, VII s: R = 2,4-二甲氧基; VI t, VII t: R = 3,4-二甲氧基; VI u, VII u: R = 3,5-二甲氧基; VI v, VII v: R = 4-OH-3,5-二甲氧基; VI w, VII w: R = 2,4,5-三甲氧基; VI x, VII x: R = 3,4,5-三甲氧基; VI y, VII y: R = 2-羟基-3,5-二叔丁基

1.2.1 2-(3-吡啶基)-喹啉-4-羧酸 (III) 的合成

在 250 mL 反应瓶中加入化合物 I 14.70 g (0.1 mol) 和化合物 II 18.20 g (0.15 mol), 加入 150 mL 质量分数为 30% 的 KOH 水溶液, 搅拌、加热回流 12 h, 薄层色谱法 (TLC) 跟踪反应, 展开剂为 *V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=15:1, 在 254 nm 紫外灯下观察暗斑位置, 反应结束后, 反应完全的产物在冰浴中缓慢滴加 20 mL 冰乙酸酸化至白色固体完全析出, 抽滤, 白色固体用蒸馏水洗涤后再用甲醇洗涤, 干燥, 得到 2-(3-吡啶基)-喹啉-4-羧酸 (III) 21.08 g, 收率 84.7%, m.p. 316~318 °C。文献[9]: 收率 80%;

m.p. 315~317 °C。

1.2.2 2-(3-吡啶基)-4-喹啉卡巴肼 (V) 的合成^[10]

在 250 mL 反应瓶中加入 III 12.45 g (0.05 mol) 和 150 mL SOCl₂, 80 °C 搅拌加热回流 9 h, TLC 跟踪反应, 展开剂为 *V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=15:1, 在 254 nm 紫外灯下观察暗斑位置, 待反应完全, 去除过量 SOCl₂, 再加入 150 mL CH₃OH, 70 °C 搅拌下回流反应 4 h, TLC 跟踪反应, 展开剂为 *V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=15:1, 在 254 nm 紫外灯下观察暗斑位置, 待反应完全, 减压蒸除过量 CH₃OH, 得到棕色固体, 即 2-(3-吡啶基)-喹啉-4-甲酸甲酯 (IV)。

向所得的IV中加入 2.503 g (0.05 mol) 质量分数 80% 的水合肼, 并且以 150 mL 无水乙醇为溶剂, 80 °C 搅拌加热反应 24 h, TLC 跟踪反应, 展开剂为 *V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=15:1, 在 254 nm 紫外灯下观察暗斑位置, 待反应完全, 降至室温, 抽滤, 干燥, 得到中间产物 2-(3-吡啶基)-4-喹啉卡巴肼 (V) 10.89 g, 收率 82.4%, m.p. 213~214 °C, ¹HNMR [400 MHz, 氘代二甲基亚砜 (DMSO-*d*₆)], δ: 10.15 (s, 1H), 9.47 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 8.73 (dd, *J*=4.9、1.6 Hz, 1H), 8.66 (td, *J*=8.0、2.1 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J*=8.4、1.4 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.17 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.87 (ddd, *J*=8.4、6.8、1.5 Hz, 1H), 7.74~7.66 (m, 1H), 7.62 (dd, *J*=8.0、4.8 Hz, 1H)。

1.2.3 目标化合物VII的合成通法

在 100 mL 反应瓶中, 加入 V 0.264 g (0.001 mol) 与不同取代基取代的苯甲醛衍生物 0.001 mol, 无水乙醇 10 mL 使其溶解, 缓慢滴加 3~5 滴冰乙酸, 80 °C 搅拌反应 24 h, TLC 跟踪反应, 展开剂为 *V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=15:1, 在 254 nm 紫外灯下观察暗斑位置, 待反应完全, 降至室温, 析出固体产物, 得目标化合物 VIIa~VIIy。

1.2.4 目标化合物的结构表征

ESI-MS 测定: 取适量合成的目标化合物 VIIa~VIIy 粉末溶解到色谱级甲醇中, 采用 UPLC-Triple-TOF/MS 系统测定目标化合物 VIIa~VIIy 的相对分子质量。核磁共振波谱测定: 取少量合成的目标化合物 VIIa~VIIy 粉末用 DMSO-*d*₆ 溶解, 四甲基硅烷 (TMS) 为内标, 分别在 400 和 100 MHz 的核磁共振波谱仪上进行 ¹HNMR 与 ¹³CNMR 测定。

N'-苯亚甲基-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIa): 白色固体, 收率 36.3%, m.p. 218.7~219.6 °C, ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.25 (s, 1H), 9.54 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 8.74~8.70 (m, 2H), 8.48 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.27~8.20 (m, 2H), 7.90 (ddd, *J*=8.6、6.9、1.5 Hz, 1H), 8.20~7.78 (m, 2H), 7.73 (ddd, *J*=8.2、6.8、1.2 Hz, 1H), 7.64 (td, *J*=8.1、3.6 Hz, 1H), 7.51 (d, *J*=5.3 Hz, 2H), 7.23~7.17 (m, 1H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 162.62, 153.75, 150.72, 148.86, 148.50, 147.92, 141.58, 134.69, 133.95, 133.51, 130.63, 130.47, 129.72, 128.95(2C), 127.92, 127.31(2C), 125.17, 123.97, 123.63, 117.32; HRMS, *m/z*: C₂₂H₁₆N₄O [M+H]⁺ 理论值 353.1402, 测试值 353.1402。

N'-(2-氟苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIb): 淡黄色固体, 收率 22.9%, m.p. 264.4~266.1 °C, ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.36 (s, 1H),

9.54 (s, 1H), 8.76~8.69 (m, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.27 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.90 (td, *J*=7.7、1.6 Hz, 1H), 7.76~7.74 (m, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.68 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 7.55 (q, *J*=7.4 Hz, 1H), 7.35 (d, *J*=8.0 Hz, 1H); HRMS, *m/z*: C₂₂H₁₅FN₄O [M+H]⁺ 理论值 371.1308, 测试值 371.1312。

N'-(2-硝基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIc): 白色固体, 收率 20.4%, m.p. 178.2~180.4 °C, ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.58 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.76~8.66 (m, 2H), 8.50 (s, 1H), 8.22 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 8.13 (dd, *J*=8.2、1.2 Hz, 1H), 7.91~7.86 (m, 3H), 7.74 (td, *J*=7.6、1.4 Hz, 2H), 7.69~7.59 (m, 1H); HRMS, *m/z*: C₂₂H₁₅N₅O₃ [M+H]⁺ 理论值 398.1253, 测试值 398.1251。

N'-(2-氰基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII d): 白色固体, 收率 41.7%, m.p. 198.2~199.7 °C, ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.61 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.73 (d, *J*=11.3 Hz, 3H), 8.53 (s, 1H), 8.27 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 8.25~8.20 (m, 2H), 7.97 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.91 (ddd, *J*=8.5、6.8、1.3 Hz, 1H), 7.86 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.79~7.73 (m, 1H), 7.70~7.63 (m, 2H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 162.81, 153.72, 150.75, 148.50, 147.94, 144.21, 140.98, 136.49, 134.68, 133.68, 133.47, 130.81, 130.65, 129.75, 127.99, 125.84, 125.09, 123.97, 123.50, 117.47, 116.91, 111.14; HRMS, *m/z*: C₂₃H₁₅N₅O [M+H]⁺ 理论值 378.1355, 测试值 378.1347。

N'-(2-甲氧基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII e): 白色固体, 收率 35.5%, m.p. 207.9~210.3 °C, ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.20 (s, 1H), 9.56~9.52 (m, 1H), 8.75~8.70 (m, 3H), 8.48 (s, 1H), 8.27 (dd, *J*=8.1、1.3 Hz, 1H), 8.20 (t, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.95 (dd, *J*=7.8、1.7 Hz, 1H), 7.88 (td, *J*=9.9、2.3 Hz, 1H), 7.75~7.71 (m, 1H), 7.63 (dd, *J*=8.0、5.0 Hz, 1H), 7.47 (ddd, *J*=8.5、7.3、1.8 Hz, 1H), 7.14 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.08 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 162.43, 157.94, 153.75, 150.70, 148.52, 147.94, 144.36, 141.42, 134.71, 132.01, 131.66, 130.58, 129.71, 127.88, 125.66, 125.22, 123.96, 123.67, 121.89, 120.86, 117.38, 111.94, 55.73; HRMS, *m/z*: C₂₃H₁₈N₄O₂ [M+H]⁺ 理论值 383.1508, 测试值 383.1509。

N'-(3-甲基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII f): 白色固体, 收率 32.2%, m.p. 284.6~286.9 °C, ¹HNMR

(400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.26 (s, 1H), 9.54 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 8.76~8.70 (m, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.25~8.19 (m, 2H), 7.93~7.89 (m, 1H), 7.73 (ddd, $J=8.3$ 、6.9、1.3 Hz, 1H), 7.63 (d, $J=2.7$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.39 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 2.39 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.60, 153.75, 150.72, 148.90, 148.51, 147.92, 141.61, 138.21, 134.70, 133.91, 133.51, 131.19, 130.63, 129.72, 128.84, 127.91, 127.56, 125.16, 124.73, 123.97, 123.64, 117.30, 20.89; HRMS, m/z : $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 367.1559, 测试值 367.1556。

N'-(3-氟苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIg): 白色固体, 收率 36.5%, m.p. 281.1~281.9 °C, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.37 (s, 1H), 9.54 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 8.78~8.70 (m, 2H), 8.49 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.27~8.19 (m, 2H), 7.89 (td, $J=9.9$ 、2.4 Hz, 1H), 7.77~7.71 (m, 1H), 7.63 (td, $J=10.8$ 、9.5、4.9 Hz, 3H), 7.56 (td, $J=8.0$ 、5.9 Hz, 1H), 7.33 (td, $J=8.7$ 、2.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.77, 153.75, 150.74, 148.50, 147.93, 136.49, 134.70, 133.50, 131.66, 131.01, 130.66, 129.74, 128.70, 127.96, 125.13, 123.98, 123.69, 123.67, 123.59, 117.37, 113.41, 113.18; HRMS, m/z : $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 371.1308, 测试值 371.1296。

N'-(3-硝基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIh): 白色固体, 收率 40.4%, m.p. 233.2~234.4 °C, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.52 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.77~8.69 (m, 2H), 8.63 (t, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.49 (s, 2H), 8.32 (ddd, $J=8.2$ 、2.4、1.0 Hz, 1H), 8.23 (t, $J=8.2$ Hz, 3H), 7.92~7.88 (m, 1H), 7.80 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.74 (ddd, $J=8.2$ 、6.8、1.3 Hz, 1H), 7.63 (td, $J=8.0$ 、4.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.94, 153.75, 150.76, 148.50, 148.30, 147.92, 146.48, 141.32, 135.84, 134.70, 133.53, 132.56, 130.70, 130.60, 129.76, 128.01, 125.10, 124.66, 124.00, 123.55, 121.28, 117.40; HRMS, m/z : $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 398.1253, 测试值 398.1254。

N'-(3-甲氧基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIi): 白色固体, 收率 37.4%, m.p. 175.3~177.1 °C, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.26 (s, 1H), 9.54 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 8.77~8.69 (m, 2H), 8.66 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.27 (dd, $J=8.4$ 、1.3 Hz, 1H), 8.21

(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.92~7.87 (m, 1H), 7.74 (dd, $J=5.4$ 、2.1 Hz, 1H), 7.72~7.67 (m, 1H), 7.64 (dd, $J=8.0$ 、5.0 Hz, 1H), 7.57 (dd, $J=7.2$ 、2.2 Hz, 1H), 7.19 (m, 2H), 3.85 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.59, 153.80, 152.74, 150.76, 148.54, 148.25, 144.54, 141.45, 134.79, 131.72, 130.68, 129.76, 128.74, 127.98, 127.37, 125.24, 124.57, 124.04, 123.67, 117.40, 117.13, 114.69, 61.32, 55.83; HRMS, m/z : $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 383.1508, 测试值 383.1509。

N'-(4-氟苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIj): 白色固体, 收率 34.8%, m.p. 268.7~274.2 °C, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.27 (s, 1H), 9.59~9.52 (m, 1H), 8.76~8.70 (m, 2H), 8.48 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.28~8.17 (m, 2H), 7.88 (ddd, $J=8.5$ 、6.4、3.6 Hz, 3H), 7.73 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.64 (td, $J=8.1$ 、4.0 Hz, 1H), 7.35 (t, $J=8.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 168.69, 162.67, 153.77, 150.73, 148.51, 147.94, 147.76, 141.56, 134.72, 133.53, 130.65, 129.74, 129.61, 129.52, 128.78, 127.94, 125.17, 124.00, 123.64, 117.34, 116.17, 115.95; HRMS, m/z : $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 371.1308, 测试值 371.1306。

N'-(4-氯苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIk): 白色固体, 收率 37.8%, m.p. 268.1~270.4 °C, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.32 (s, 1H), 9.53 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.77~8.70 (m, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.27~8.16 (m, 2H), 7.90 (ddd, $J=8.5$ 、6.9、1.5 Hz, 1H), 7.85~7.81 (m, 2H), 7.73 (ddd, $J=8.3$ 、6.8、1.3 Hz, 1H), 7.64 (td, $J=7.9$ 、3.5 Hz, 1H), 7.60~7.55 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.68, 153.75, 150.73, 148.49, 147.92, 147.53, 141.48, 134.92, 134.69, 133.50, 132.91, 130.65, 129.73, 129.06(2C), 128.96(2C), 127.94, 125.14, 123.98, 123.60, 117.34; HRMS, m/z : $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 387.1013, 测试值 387.1007。

N'-(4-溴苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIl): 白色固体, 收率 36.6%, m.p. 255.4~259.6 °C, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.32 (s, 1H), 9.53 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 8.77~8.67 (m, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.27~8.18 (m, 2H), 7.90 (ddd, $J=8.4$ 、6.8、1.4 Hz, 1H), 7.78~7.69 (m, 5H), 7.63 (dd, $J=8.0$ 、5.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 168.71, 162.69, 153.75, 150.74, 148.50, 147.92, 147.63, 141.48, 134.70, 133.25, 131.98(2C), 130.66,

129.18(2C), 128.40, 127.95, 125.14, 123.99, 123.76, 123.60, 117.35; HRMS, m/Z : $C_{22}H_{15}BrN_4O$ $[M+H]^+$ 理论值 431.0507, 测试值 431.0493。

N'-(4-硝基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII m): 白色固体, 收率 28.0%, m.p. 247.7~279.2 °C, 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.55 (s, 1H), 9.54 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 8.78~8.70 (m, 2H), 8.49 (d, $J=11.2$ Hz, 2H), 8.38~8.32 (m, 2H), 8.28~8.18 (m, 2H), 8.09~8.06 (m, 2H), 7.91 (ddd, $J=8.4$ 、6.9、1.5 Hz, 1H), 7.74 (td, $J=7.3$ 、1.3 Hz, 1H), 7.64 (dd, $J=8.1$ 、5.1 Hz, 1H); HRMS, m/Z : $C_{22}H_{15}N_5O_3$ $[M+H]^+$ 理论值 398.1253, 测试值 398.1238。

N'-(4-氟基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII n): 白色固体, 收率 41.7%, m.p. 263.5~268.2 °C, 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.53 (s, 1H), 9.54 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 8.73 (ddd, $J=13.5$ 、5.6、1.9 Hz, 2H), 8.50 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.25~8.18 (m, 2H), 8.01~7.95 (m, 4H), 7.92~7.87 (m, 1H), 7.73 (ddd, $J=8.3$ 、6.9、1.3 Hz, 1H), 7.64 (dd, $J=8.2$ 、5.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 169.00, 162.91, 153.75, 150.75, 148.50, 147.93, 146.92, 141.25, 138.42, 134.69, 132.86(2C), 130.69, 129.76, 127.88(2C), 125.10, 123.99, 123.54, 118.61, 117.42, 112.29; HRMS, m/Z : $C_{23}H_{15}N_5O$ $[M+H]^+$ 理论值 378.1355, 测试值 378.1344。

N'-(4-二甲氨基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII o): 黄色固体, 收率 30.4%, m.p. 224.3~225.2 °C, 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 11.93 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.72 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 8.43 (s, 1H, N=CH), 8.26~8.18 (m, 3H), 7.89~7.86 (m, 1H), 7.72 (ddd, $J=8.3$ 、6.8、1.3 Hz, 1H), 7.66~7.62 (m, 1H), 7.61~7.57 (m, 2H), 6.82~6.75 (m, 2H), 3.00 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.07, 153.75, 151.73, 150.68, 149.58, 148.50, 147.92, 141.99, 134.69, 133.56, 130.56, 129.68, 128.69(2C), 127.79, 125.28, 123.96, 123.77, 121.08, 117.21, 111.81(2C), 38.87(2C); HRMS, m/Z : $C_{24}H_{21}N_5O$ $[M+H]^+$ 理论值 396.1824, 测试值 396.1828。

N'-(3-氟-4-溴苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII p): 白色固体, 收率 37.3%, m.p. 297.1~299.3 °C, 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.39 (s, 1H); 9.53 (s, 1H), 8.77~8.65 (m, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.22 (dq, $J=8.6$ 、4.2、3.8 Hz, 2H), 8.14 (dd, $J=6.8$ 、2.1 Hz, 1H), 7.89 (ddd, $J=8.0$ 、4.7、2.0 Hz, 2H), 7.73 (ddd, $J=8.2$ 、6.9、1.3 Hz, 1H),

7.63 (dd, $J=8.0$ 、4.7 Hz, 1H), 7.51 (d, $J=8.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.77, 157.62, 153.73, 150.73, 148.49, 147.91, 146.19, 141.40, 134.69, 132.36, 131.96, 130.65, 129.73, 128.68, 128.60, 127.96, 125.10, 123.98, 123.57, 117.54, 117.35, 109.97; HRMS, m/Z : $C_{22}H_{14}BrFN_4O$ $[M+H]^+$ 理论值 449.0413, 测试值 449.0412。

N'-(2-羟基-5-溴苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII q): 淡黄色固体, 收率 39.3%, m.p. 277.4~282.2 °C, 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.48 (s, 1H), δ 11.07 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.73 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.71 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.29~8.24 (m, 1H), 8.21 (dd, $J=8.5$ 、3.8 Hz, 1H), 7.90~7.88 (m, 2H), 7.73 (ddd, $J=8.3$ 、6.9、1.2 Hz, 1H), 7.64 (dd, $J=8.1$ 、4.9 Hz, 1H), 7.47 (dd, $J=8.7$ 、2.6 Hz, 1H), 6.94 (d, $J=8.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.54, 156.42, 153.74, 150.75, 148.50, 147.94, 145.95, 141.01, 134.71, 134.01, 133.53, 131.06, 130.67, 129.90, 129.74, 127.99, 125.15, 123.56, 121.38, 118.73, 117.47, 110.63; HRMS, m/Z : $C_{22}H_{15}BrN_4O_2$ $[M+H]^+$ 理论值 447.0457, 测试值 447.0446。

N'-(2-羟基-5-硝基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII r): 黄色固体, 收率 21.1%, m.p. 281.2~288.9 °C, 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ : 10.06 (m, 2H), 9.35~9.29 (m, 1H), 8.62~8.51 (m, 2H), 7.90~7.85 (m, 2H), 7.82~7.77 (m, 1H), 7.73~7.69 (m, 2H), 7.62~7.57 (m, 3H), 7.53~7.41 (m, 1H), 7.40~7.35 (m, 1H); HRMS, m/Z : $C_{22}H_{15}N_5O_4$ $[M+H]^+$ 理论值 414.1202, 测试值 414.1187。

N'-(2,4-二甲氧基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII s): 白色固体, 收率 37.8%, m.p. 214.9~217.5 °C, 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.27 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.78~8.70 (m, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.25~8.15 (m, 2H), 7.94~7.88 (m, 1H), 7.73 (ddd, $J=8.2$ 、6.9、1.3 Hz, 1H), 7.63 (dd, $J=8.0$ 、4.9 Hz, 1H), 6.95 (d, $J=2.3$ Hz, 2H), 6.62 (t, $J=2.3$ Hz, 1H), 3.82 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.67, 160.75, 160.36, 153.75, 150.73, 148.75, 148.50, 147.92, 141.56, 135.97, 134.69, 133.51, 130.64, 129.73, 127.94, 125.15, 123.98, 123.94, 123.62, 117.32, 105.03, 102.67, 55.40, 54.87; HRMS, m/Z : $C_{24}H_{20}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 理论值 413.1614, 测试值 413.1607。

N'-(3,4-二甲氧基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VII t): 白色固体, 收率 42.6%, m.p. 190.1~

198.4 °C, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 12.12 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.77~8.70 (m, 2H), 8.45 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.26~8.19 (m, 2H), 7.93~7.87 (m, 1H), 7.72 (ddd, $J = 8.3$ 、 6.9 、 1.3 Hz, 1H), 7.64 (td, $J = 8.1$ 、 4.3 Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.26 (dd, $J = 8.3$ 、 1.9 Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 162.44, 153.75, 151.06, 150.70, 149.13, 149.03, 148.48, 147.93, 141.80, 134.75, 130.64, 129.73, 128.68, 127.90, 126.61, 125.21, 124.01, 123.70, 122.27, 117.27, 111.52, 108.31, 65.04, 55.51; HRMS, m/z : $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 413.1614, 测试值 413.1606。

N'-(3,5-二甲氧基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIu): 白色固体, 收率 30.9%, m.p. 236.4~237.9 °C, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 12.06 (s, 1H), 9.62~9.54 (m, 1H), 8.74 (td, $J = 4.7$ 、 4.2 、 1.7 Hz, 2H), 8.64 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.29~8.26 (m, 1H), 8.20 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.93~7.88 (m, 2H), 7.75~7.71 (m, 1H), 7.71~7.67 (m, 1H), 7.63 (dd, $J = 8.1$ 、 4.9 Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 162.77, 162.20, 159.38, 153.74, 150.69, 148.52, 147.94, 144.42, 134.71, 131.67, 130.55, 129.69, 128.70(2C), 126.89, 125.27, 123.96, 123.73, 117.33, 106.57(2C), 98.32, 55.50(2C); HRMS, m/z : $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 413.1614, 测试值 413.1612。

N'-(4-羟基-3,5-二甲氧基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIv): 浅黄色固体, 收率 32.6%, m.p. 238.4~240.3 °C, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 12.11 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.78~8.71 (m, 3H), 8.44 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.93~7.88 (m, 1H), 7.74 (dd, $J = 6.2$ 、 2.7 Hz, 1H), 7.64 (dd, $J = 8.0$ 、 4.8 Hz, 1H), 7.06 (s, 2H), 3.85 (s, 6H); HRMS, m/z : $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 429.1563, 测试值 429.1570。

N'-(2,4,5-三甲氧基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIw): 白色固体, 收率 32.7%, m.p. 228.5~230.7 °C, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 12.05 (s, 1H), 9.53 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.73 (ddd, $J = 5.8$ 、 4.4 、 1.8 Hz, 2H), 8.65 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.27 (dd, $J = 8.5$ 、 1.4 Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.90~7.86 (m, 1H), 7.72 (ddd, $J = 8.3$ 、 6.8 、 1.3 Hz, 1H), 7.66~7.59 (m, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.81 (s, 3H); HRMS, m/z : $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 443.1719, 测试值

443.1718。

N'-(3,4,5-三甲氧基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIx): 白色固体, 收率 24.6%, m.p. 264.6~265.9 °C, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 12.24 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.73 (q, $J = 3.0$ Hz, 1H), 8.71 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.27~8.18 (m, 2H), 7.90 (ddd, $J = 8.3$ 、 6.9 、 1.4 Hz, 1H), 7.73 (ddd, $J = 8.3$ 、 6.8 、 1.3 Hz, 1H), 7.63 (dd, $J = 8.2$ 、 5.0 Hz, 1H), 7.10 (s, 2H), 3.87 (s, 6H), 3.74 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 162.61, 153.77, 153.25(2C), 150.73, 148.83, 148.51, 147.92, 141.72, 139.49, 134.71, 130.66, 129.74, 129.45, 128.67, 127.94, 125.16, 123.99, 123.66, 117.29, 104.52(2C), 60.15, 56.01(2C); HRMS, m/z : $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 443.1719, 测试值 443.1716。

N'-(2-羟基-3,5-二叔丁基苄叉)-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼 (VIIy): 白色固体, 收率 34.9%, m.p. 253.8~255.3 °C, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 12.65 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 12.38~12.10 (m, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.78~8.67 (m, 2H), 8.58~8.51 (m, 2H), 8.29 (dd, $J = 20.5$ 、 11.3 Hz, 2H), 7.94 (dd, $J = 16.4$ 、 8.5 Hz, 1H), 7.77~7.61 (m, 2H), 7.34 (dd, $J = 32.3$ 、 14.9 Hz, 2H), 1.51~1.43 (m, 9H), 1.35~1.26 (m, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 162.33, 154.88, 153.80, 153.74, 152.41, 150.75, 148.49, 147.95, 140.84, 140.60, 135.77, 134.66, 130.70, 129.76, 128.01, 127.86, 126.08, 126.03, 125.15, 123.56, 117.51, 116.78, 34.70, 33.91, 31.28(3C), 29.30(3C); HRMS, m/z : $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 481.2604, 测试值 481.2604。

1.3 抗肿瘤活性测试

分别选用人乳腺癌细胞 (MCF-7 细胞)、人非小细胞肺癌细胞 (A549 细胞)、人慢性髓原白血病细胞 (K562 细胞)、人急性淋巴白血病细胞 (RS4:11 细胞) 为测试细胞株进行合成化合物的体外细胞毒性评价。A549、K562、RS4:11 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清和体积分数 0.1% 青霉素-链霉素双抗 (P/S) 的 RPMI-1640 培养基培养。MCF-7 用含体积分数 10% 胎牛血清和体积分数 0.1% 青霉素-链霉素双抗 (P/S) 的 DMEM 培养基培养。将 A549、MCF-7 细胞孵育在含有体积分数 5% 的 CO_2 细胞培养箱中 37 °C 培养, 培养基为不同细胞相应的培养基, 所有待测化合物均用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 配制成浓度为 100 mmol/L 的母液。

人非小细胞肺癌细胞 (A549 细胞)、人乳腺癌

细胞 (MCF-7 细胞) 用 MTT 法测定化合物体外抗肿瘤活性。取对数生长期的细胞, 用含有质量分数 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (EDTA) 的消化液消化细胞, 将细胞接种于 96 孔板中, 2.5×10^4 个细胞/孔, 设置空白对照组和供试品组, 每孔 100 μL , 放入 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中孵育 24 h。然后供试品组每孔加入新鲜制备的含有各个化合物的培养基 10 μL 。每个化合物均被制备成多个浓度梯度溶液 (100、50、20、10 $\mu\text{mol/L}$), 每个浓度分别设置 3 个平行孔, 空白对照组每孔加入新鲜的 RPMI-1640 培养基 100 μL 。继续放入 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中孵育 72 h, 然后每孔加入 10 μL MTT (质量浓度为 5 g/L) 并在 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中继续孵育 4 h。小心将培养基弃去, 每孔加入 100 μL DMSO, 充分振荡后, 使用多功能全波段连续光谱酶标仪在 490 nm 处测量吸光度。按式 (1) 计算细胞增殖抑制率:

$$\text{IR} / \% = \frac{\text{OD}_c - \text{OD}_i}{\text{OD}_c} \times 100 \quad (1)$$

式中: IR 为细胞增殖抑制率, %; OD_i 为供试品组吸光度平均值; OD_c 为对照组吸光度平均值。

然后, 根据各药物浓度和细胞增殖抑制率, 利用 SPSS 25 软件作线性回归, 从而得出各供试化合物对实验中所有肿瘤细胞的半抑制浓度 (IC_{50}), IC_{50} 指抑制细胞生长 50% 的化合物浓度。

K562、RS4:11 细胞用台盼蓝法测定化合物体外抗肿瘤活性。取对数生长期的细胞, 接种于 24 孔板中, 4×10^4 个细胞/孔, 设置空白对照组和供试品组, 每孔 1000 μL , 然后供试品组每孔加入新鲜制备的含有各个化合物的培养基 100 μL 。每个化合物均被制备成 4 个浓度梯度溶液 (10、5、2、1 $\mu\text{mol/L}$), 空白对照组每孔加入新鲜的 RPMI-1640 培养基 100 μL 。放入 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中孵育 72 h。将孵育后的细胞充分混匀, 取 15 μL 混匀后的细胞与 15 μL 的质量分数 0.4% 的台盼蓝染色液混合, 取 15 μL 混合液置于血细胞计数板的计数池, 于显微镜下记录血细胞计数板内的总细胞数 (N_t) 和死细胞数 (N_d), 按照式 (2) 计算细胞存活率 (CV, %):

$$\text{CV} / \% = \frac{N_t - N_d}{N_t} \times 100 \quad (2)$$

1.4 分子对接研究

根据 Schrodinger 程序中 Glide 分子对接技术研究化合物 VII 的分子对接情况。在本研究中, 与 DNA 结合的 STAT3 β 同源二聚体 (PDB code 1BG1) 的晶体结构被选择用于对接实验。

2 结果与讨论

采用 2,3-吡啶二酮与 3-乙酰基吡啶为初始原料, 在碱性条件下交叉羟醛反应得到了 2-(3-吡啶基)-喹啉-4-羧酸。再与二氯亚砷酰氯化、甲醇酯化后与水合肼反应得到了 2-(3-吡啶基)-4-喹啉卡巴肼。因为酰氯过于活泼, 直接与水合肼反应不仅能生成单酰肼, 还能生成双酰肼, 所以先将羧基酯化再与水合肼经肼解反应得到中间体 (V), 中间体 V 再与不同取代基苯甲醛得到目标化合物 *N'*-苯亚甲基-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼衍生物。在乙醇溶剂中, 芳环上的取代基的电子效应对反应没有明显的影响, 无论是给电子基还是吸电子基都能很好地进行反应。

目标化合物体外抗肿瘤结果如表 1 所示。由表 1 可知, 目标化合物呈现出一定的构效关系。当苯环上没有任何取代基时 (VIIa), 对测试的 4 种癌细胞系 (A549、MCF-7、K562 和 RS4:11), IC_{50} 分别为 (41.5 \pm 3.3)、(74.4 \pm 8.1)、(1.6 \pm 0.1) 和 (7.8 \pm 0.6) $\mu\text{mol/L}$ 。

对 A549 而言, 当苯环 2 号位被 F 取代时 (VIIb), 其抗肿瘤活性略有增强, IC_{50} 为 (24.6 \pm 1.5) $\mu\text{mol/L}$ 。当 2 号位被其他较强的吸电子基 (如—CN 和—NO₂) 取代时, 其抗肿瘤活性降低。当苯环 3 号位被—CH₃ 取代时, 抗肿瘤活性略有增强, 但被 F、—NO₂ 和—OCH₃ 取代时, 抗肿瘤活性降低, 且抗肿瘤活性顺序由弱到强为 3-OCH₃ (VIIi) < 3-F (VIIg) < 3-NO₂ (VIIh), 由此推测, 当苯环 3 号位被具有吸电子能力的基团单取代时, 其抗肿瘤活性会降低且吸电子能力越强, 抗肿瘤活性越弱; 而当被供电子基取代时, 其抗肿瘤活性会增强。当苯环 4 号位被单取代时, 所有化合物的抗肿瘤活性均降低。当苯环 2 号位被—OH 取代时, 5 号位被—NO₂ 取代时, 其抗肿瘤活性显著增强, IC_{50} 为 (7.4 \pm 0.8) $\mu\text{mol/L}$ 。而当 5 号位被 Br 取代时, 其抗肿瘤活性明显降低, 推测是由于 NO₂ 的吸电子能力较强导致的。当苯环 4 号位被—OH 取代时, 抗肿瘤活性降低。当苯环被两个 OCH₃ 取代时, 所有化合物抗肿瘤活性均降低。当苯环 3 个位点被取代时, 只有化合物 VIIy (R=2-羟基-3,5-二叔丁基) 的抗肿瘤活性显著增强 [IC_{50} 为 (9.5 \pm 0.9) $\mu\text{mol/L}$], 其余化合物抗肿瘤活性均明显降低, 推测与两个—C(CH₃)₃ 较大的空间位阻有关。

对 MCF-7 而言, 当苯环 2 号位被单取代时, 其结果与 A549 基本相同, 只有 2 号位被 F 取代时, 抗肿瘤活性增强, 其余均降低。当苯环 3 号位被单取代时, 所有化合物抗肿瘤活性均降低。当苯环 4 号位被单取代时, 其抗肿瘤活性大致与取代基吸电子能力的大小呈反比, 即取代基吸电子能力越强,

抗肿瘤活性越弱。当苯环 2 号位被—OH 取代时, 5 号位被吸电子取代时, 其抗肿瘤活性显著增强。当苯环 4 号位被—OH 取代时, 抗肿瘤活性降低。当苯环被两个—OCH₃ 取代时, 所有化合物抗肿瘤活性均降低。当苯环 3 个位点被取代时, 只有化合物 VII_y (R=2-羟基-3,5-二叔丁基) 的抗肿瘤活性显著增强 [IC₅₀ 为(7.7±0.6) μmol/L], 其余化合物抗肿瘤活性均明显降低。

对 K562 而言, 当苯环 2 号位被单取代时, 其抗肿瘤活性均降低。当苯环 3 号位被单取代时, 所有化合物抗肿瘤活性均降低。当苯环 4 号位被单取代时, 其抗肿瘤活性大致与取代基吸电子能力的大小呈反比, 即取代基吸电子能力越强, 抗肿瘤活性越弱, 抗肿瘤活性顺序由弱到强为 4-N(CH₃)₂ (VII_o) ≈ 4-F (VII_j) < 4-Cl (VII_k) < 4-Br (VII_l)。当苯环 2 号位被—OH 取代时, 5 号位被吸电子取代时, 其对 K562 显示出良好的抗增殖能力, 且与 MCF-7 一样, 5 号位的吸电子基能力越小, 抗肿瘤活性越好。当苯环被两个—OCH₃ 取代时, 所有化合物抗肿瘤活性均降低。当苯环 3 个位点被取代时, 所有化合物抗肿瘤活性均降低。

对 RS4:11 而言, 当苯环 2 号位被单取代时, 其结果与 A549 和 MCF-7 基本相同, 只有 2 号位被 F 取代时, 抗肿瘤活性增强, 其余均降低。当苯环 3 号位被单取代时, 所有化合物抗肿瘤活性均降低。当苯环 4 号位被单取代时, 其抗肿瘤活性大致与取代基吸电子能力的大小呈反比, 即取代基吸电子能力越强, 抗肿瘤活性越弱, 抗肿瘤活性顺序由弱到强为 4-NO₂ (VII_m) < 4-CN (VII_n) < 4-F (VII_j) < 4-Cl (VII_k) < 4-Br (VII_l)。当苯环 2 号位被—OH 取代时, 5 号位被吸电子取代时, 其抗肿瘤活性明显增强, 且 5 号位的吸电子基能力越小, 抗肿瘤活性越好。当苯环被两个—OCH₃ 取代时, 所有化合物抗肿瘤活性均降低。当苯环 3 个位点被取代时, 只有化合物 VII_y (R=2-羟基-3,5-二叔丁基) 的抗肿瘤活性显著增强 [IC₅₀ 为(6.8±0.5) μmol/L], 其余化合物抗肿瘤活性均明显降低。

综上所述, 当苯环 2 号位被单独取代时, 4 种癌细胞系的抗增殖能力均降低, 只有当 F 单独取代 2 号位时, 其抗肿瘤能力有所增强。当苯环 3 号位被单独取代时, 所有化合物抗增殖能力均降低。当苯环 4 号位被单独取代时, 其抗肿瘤活性大致与取代基吸电子能力的大小呈反比, 即取代基吸电子能力越强, 抗肿瘤活性越弱。当苯环 2 号位被—OH 取代时, 5 号位被吸电子取代时, 其抗肿瘤活性明显增强, 且 5 号位的吸电子基能力越小, 抗肿瘤活性越好。当苯环被两个—OCH₃ 取代时, 所有化合物

抗肿瘤活性均降低。当苯环 3 个位点被取代时, 只有化合物 VII_y (R=2-羟基-3,5-二叔丁基) 对 4 种癌细胞系显示出良好的抗肿瘤活性, 其余化合物抗肿瘤活性均明显降低。

目标化合物 VII_r 表现出最强的抗 A549 细胞增殖活性 [IC₅₀=(7.4±0.8) μmol/L], 目标化合物 VII_q 表现出最强的抗 RS4:11 细胞增殖活性 [IC₅₀=(2.4±0.2) μmol/L], 目标化合物 VII_l 不仅表现出最强的抗 MCF-7 细胞增殖活性 [IC₅₀=(4.9±0.3) μmol/L], 而且表现出最强的抗 K562 细胞增殖活性 [IC₅₀=(1.2±0.2) μmol/L]。

表 1 目标化合物 VII_a~VII_y 对 4 种人体癌细胞的抗增殖作用
Table 1 Antiproliferative effect of VII_a~VII_y in four human cancer cells lines

化合物	R	IC ₅₀ /(μmol/L)			
		A549	MCF-7	K562	RS4:11
VII _a	H	41.5±3.3	74.4±8.1	1.6±0.1	7.8±0.6
VII _b	2-F	24.6±1.5	52.4±3.7	2.4±0.2	7.2±0.4
VII _c	2-NO ₂	67.2±5.1	>100	>100	>100
VII _d	2-CN	84.7±6.7	>100	65.5±3.9	26.0±2.2
VII _e	2-OCH ₃	68.3±5.1	86.2±7.4	92.7±6.3	75.2±4.9
VII _f	3-CH ₃	32.7±2.5	>100	37.2±3.1	19.2±1.3
VII _g	3-F	74.5±5.4	85.5±6.8	20.3±2.3	13.6±0.7
VII _h	3-NO ₂	72.2±6.4	>100	>100	>100
VII _i	3-OCH ₃	89.6±7.8	92.3±8.2	40.0±3.1	18.2±1.5
VII _j	4-F	75.3±7.6	56.9±4.2	5.2±0.5	12.4±0.8
VII _k	4-Cl	81.4±7.3	77.0±5.2	4.9±0.3	9.8±1.2
VII _l	4-Br	61.2±5.7	4.9±0.3	1.2±0.2	4.5±0.5
VII _m	4-NO ₂	>100	>100	>100	>100
VII _n	4-CN	88.9±9.6	>100	>100	28.3±1.8
VII _o	4-N(CH ₃) ₂	71.3±5.6	78.3±7.3	5.2±4.6	7.5±0.5
VII _p	3-F-4-Br	81.6±9.6	>100	84.3±7.2	>100
VII _q	2-OH-5-Br	91.7±8.2	22.5±2.4	4.2±0.4	2.4±0.2
VII _r	2-OH-5-NO ₂	7.4±0.8	29.1±2.5	12.4±0.7	5.0±0.4
VII _s	2,4-二甲氧基	>100	>100	>100	>100
VII _t	3,4-二甲氧基	>100	>100	>100	>100
VII _u	3,5-二甲氧基	>100	>100	>100	86.9±7.1
VII _v	4-OH-3,5-二甲氧基	85.7±7.2	>100	>100	>100
VII _w	2,4,5-三甲氧基	>100	>100	>100	>100
VII _x	3,4,5-三甲氧基	>100	>100	>100	>100
VII _y	2-羟基-3,5-二叔丁基	9.5±0.9	7.7±0.6	12.8±0.8	6.8±0.5

图 1 为化合物 VII_l 与 STAT3 结合模式三维图及其相互作用的二维示意图。根据 Schrodinger 程序中 Glide 分子对接技术分析得出, 在 STAT3-SH2 结构域中, 对接区为丙氨酸 703-脯氨酸 704-磷酸化酪氨酸 705-亮氨酸 706-赖氨酸 707-苏氨酸 708(Ala 703-Pro 704-pTyr 705-Leu 706-Lys 707-Thr 708) 的残基。

如图 1a、b 所示, 目标化合物 VIIl 结构中的 2-吡啶环被插入到疏水裂缝中, 与磷酸化酪氨酸 705 (pTyr 705) 识别位点 (pY 口袋结合区) 结合, 可以观察到, 酰胺中的—NH 与天冬酰胺 647 (Asn 647) 主链酰胺的 C=O 存在氢键相互作用。此外, 还观察到, 苯环上存在疏水相互作用, 苯丙氨酸 710 (Phe 710) 环上存在 π - π 相互作用。这些结果提示, 化合物 VIIl 可能通过与 STAT3-SH2 的结合, 从而达到抑制肿瘤细胞的作用。

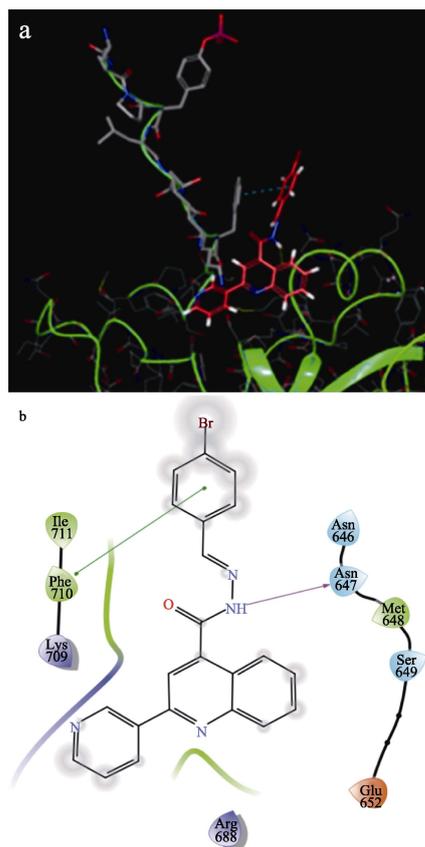


图 1 化合物 VIIl 与 STAT3 结合模式三维图 (PDB 代码: 1BG1) (a) 及其相互作用的二维示意图 (b)

Fig. 1 Three-dimensional diagram of binding mode between compound VIIl and STAT3 (PDB code: 1BG1) (a) and 2D schematic diagram of interactions between compound VIIl and STAT3 (b)

3 结论

(1) 以 2,3-吡啶二酮 (I) 和 3-乙酰基吡啶为原料, 在碱性条件下经交叉羟醛反应得到了 2-(3-吡啶基)-喹啉-4-羧酸; 其再与二氯亚砷酰氯化、甲醇酯化后与水合肼经腓解反应得到了 2-(3-吡啶基)-4-喹啉卡巴肼 (V); 最后, 中间体 V 与不同取代基取

代的苯甲醛衍生物在乙醇中, 以冰醋酸为催化剂经缩合反应合成了 25 个 *N'*-苯亚甲基-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼衍生物;

(2) 采用 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRMS 对目标化合物进行了表征, 通过谱图解析确证了目标化合物结构;

(3) 25 个 *N'*-苯亚甲基-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼衍生物对 4 种肿瘤细胞 (A549、MCF-7、K562 和 RS4:11) 均有一定的体外增殖抑制作用。目标化合物 VIIr 表现出最强的抗 A549 细胞增殖活性 [$\text{IC}_{50}=(7.4\pm 0.8) \mu\text{mol/L}$], 目标化合物 VIIq 表现出最强的抗 RS4:11 细胞增殖活性 [$\text{IC}_{50}=(2.4\pm 0.2) \mu\text{mol/L}$], 目标化合物 VIIl 不仅表现出最强的抗 MCF-7 细胞增殖活性 [$\text{IC}_{50}=(4.9\pm 0.3) \mu\text{mol/L}$], 而且表现出最强的抗 K562 细胞增殖活性 [$\text{IC}_{50}=(1.2\pm 0.2) \mu\text{mol/L}$]。分子对接结果显示, 目标化合物 VIIl 发挥抗肿瘤的作用可能与 STAT3 通路有关, 值得进一步深入研究。基于生物电子等排原理设计合成的 *N'*-苯亚甲基-2-(3-吡啶基)喹啉-4-酰肼衍生物为寻找和发现抗肿瘤先导化合物提供了理论参考。

参考文献:

- [1] HILLMER E J, ZHANG H, LI H S, *et al.* STAT3 signaling in immunity[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2016, 31: 1-15.
- [2] WALDMANN T A. JAK/STAT pathway directed therapy of T-cell leukemia/lymphoma: Inspired by functional and structural genomics[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 451: 66-70.
- [3] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018, 15(4): 234-248.
- [4] YU H, JOVE R. The STATs of cancer-New molecular targets come of age[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4(2): 97-105.
- [5] VILLARINO A V, KANNO Y, FERDINANDJ R, *et al.* Mechanisms of JAK/STAT signaling in immunity and disease[J]. *Journal of Immunology*, 2015, 194(1): 21-27.
- [6] PILATI C, ZUCMAN-ROSSI J. Mutations leading to constitutive active gp130/JAK1/STAT3 pathway[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2015, 26(5): 499-506.
- [7] MATSUNO K, MASUDA Y, UEHARA Y, *et al.* Identification of a new series of STAT3 inhibitors by virtual screening[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 1(8): 371-375.
- [8] MELGE A R, PARATE S, PAVITHRAN K, *et al.* Discovery of anticancer hybrid molecules by supervised machine learning models and *in vitro* validation in drug resistant chronic myeloid leukemia cells[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2022, 62(4): 1126-1146.
- [9] MASHRAQUI S H, BETKAR R, CHANDIRAMANI M, *et al.* Design of a dual sensing highly selective cyanide chemodosimeter based on pyridinium ring chemistry[J]. *New Journal of Chemistry*, 2011, 35: 57-60.
- [10] LIU J J (刘娟娟), ZHAO Z D (赵振东), LU Y J (卢言菊), *et al.* Synthesis and anticancer activity of acylhydrazone compounds from isopimaric acid[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2016, 33(10): 1195-1200.