

5H-苯并[*b*]咔唑类化合物的合成与肿瘤细胞增殖抑制活性曹素芬<sup>1</sup>, 谢琴<sup>2</sup>, 陈奕<sup>3\*</sup>, 段文虎<sup>1,4\*\*</sup>

(<sup>1</sup>华东理工大学药学院, 上海 200237; <sup>2</sup>南昌大学药学院, 南昌 330031; <sup>3</sup>中国科学院上海药物研究所肿瘤药理实验室, 上海 201203; <sup>4</sup>中国科学院上海药物所药物化学研究室, 上海 201203)

**摘要** 为了发现新型选择性拓扑异构酶II抑制剂, 以偏苯醌和咪唑为原料, 合成了16个新的5H-苯并[*b*]咔唑类化合物。探讨了C-9位上不同取代基对肿瘤细胞增殖抑制活性的影响。采用磺酰罗丹明B蛋白染色法检测了16个化合物对4种肿瘤细胞(SMMC-7721、S1、HCT116和HeLa)的增殖抑制活性。结果表明, 其中4个化合物对4种不同的肿瘤细胞株具有明显的增殖抑制活性。其中化合物10e对4种肿瘤细胞株的抑制作用最为显著(IC<sub>50</sub>分别为: 5.06, 4.50, 5.29和6.32 μmol/L)。

**关键词** 5H-苯并[*b*]咔唑; 合成; 增殖抑制活性

**中图分类号** R914.5; R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)02-0157-10

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170205

**引用本文** 曹素芬, 谢琴, 陈奕, 等. 5H-苯并[*b*]咔唑类化合物的合成与肿瘤细胞增殖抑制活性[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(2): 157–166.

**Cite this article as:** CAO Sufen, XIE Qin, CHEN Yi, *et al.* Synthesis and antiproliferative activities of 5H-benzo[*b*]carbazole-6, 11-diones [J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(2): 157–166.

Synthesis and antiproliferative activities of 5H-benzo[*b*]carbazole-6, 11-dionesCAO Sufen<sup>1</sup>, XIE Qin<sup>2</sup>, CHEN Yi<sup>3\*</sup>, DUAN Wenhui<sup>1,4\*\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237; <sup>2</sup>School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330031; <sup>3</sup>Division of Anti-Tumor Pharmacology, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203; <sup>4</sup>Department of Medicinal Chemistry, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

**Abstract** A series of 5H-benzo[*b*]carbazole derivatives were synthesized to find new TopII inhibitors. The substitution pattern at C-9 was discussed. All 16 compounds were tested for their antiproliferative activities against 4 tumor cell lines (SMMC-7721, S1, HCT116, and HeLa) by sulforhodamine B assay. Four compounds were found to inhibit the proliferation of all tested cell lines. And compound 10e displayed the best antiproliferative activity against all 4 tested cell lines with IC<sub>50</sub> values of 5.06, 4.50, 5.29, and 6.32 μmol/L, respectively.

**Key words** 5H-benzo[*b*]carbazole-6, 11-dione; synthesis; antiproliferative activity

This study was supported by Shanghai Institute of Materia Medica (No. CASIMM0120152005, No. CASIMM0120151011) and Chinese Academy of Sciences ‘Strategic Priority Research Program’ (No. XDA12020303)

拓扑异构酶于20世纪70年代由华裔科学家王焯首次发现并提出其作用机制<sup>[1]</sup>。DNA复制时, 解旋酶对双链解旋, 露出单链作为复制模板。但伴随

着解旋过程, 会发生超螺旋现象, 并会蔓延到已经合成的子DNA中, 双链缠绕在一起, 使DNA无法继续复制<sup>[2]</sup>。为了释放积蓄的张力, 拓扑异构酶打开

**收稿日期** 2016-05-25 **通信作者** \* Tel: 021-50806600-4306 E-mail: ychen@simm.ac.cn

\*\* Tel: 021-50806032 E-mail: whduan@simm.ac.cn

**基金项目** 中国科学院上海药物研究所自主部署基金资助项目 (No. CASIMM0120152005, No. CASIMM0120151011); 中国科学院战略先导科技专项资助 (No. XDA012020303)

DNA,或主动绕过 DNA 链,或任其自由松弛,然后合上 DNA 链。根据其作用的 DNA 链数量的不同,拓扑异构酶分为两种类型,即 I 型和 II 型。

对于拓扑异构酶有两种不同的抑制策略。第 1 种作用于 DNA 复合物,如依托泊苷,第 2 种作用于 ATP 结合口袋,如 kibrdelomycin<sup>[3–4]</sup>。DNA 复合物结合口袋有 3 个结合区域,第一个区域是 DNA 碱基对区域,通常由分子中的平面或近平面多环插入到碱基之间。第 2 个区域位于 DNA 小沟方向。第 3 个区域在 DNA 大沟结合口袋<sup>[5]</sup>。ATP 口袋以拓扑异构酶 II  $\beta$  (PDB ID: 1ZXM) 为例,内含有苯丙氨酸和多个指向口袋内部的含有极性侧链的氨基酸残基<sup>[6]</sup>。

对于作用于 DNA 复合物口袋的化合物, Wu 等<sup>[5]</sup>提出了 3 条亚型选择性拓扑异构酶 II 抑制剂的设计原则:首先,化合物需要有一个多环芳香母核,这个母核可以插入至 DNA 双链碱基对中;其次,母核上需要有取代链,伸入到 DNA 小沟结合口袋中;第三,母核上有取代链伸入到 DNA 的大沟结合口袋中,该区域和小沟方向结合口袋不同,两种亚型之间存在着区别。

5H-苯并[*b*] 呋唑-6, 11-二酮类化合物具有四环平面结构,对多种肿瘤细胞具有细胞毒性。总体而言,在多个位点都可以引入极性基团,对活性的提高是有益的<sup>[7–8]</sup>。其中,醌结构是细胞毒活性必须结构。目前的改造集中在 A 环和 B 环,而很少涉及 D 环(路线 1)。D 环上仅有的几个修饰基团大多为简单的烷基或是酚羟基<sup>[9–10]</sup>。故希望在 D 环上进行修饰,并设计了共 3 类不同的侧链。第一类是脂肪胺类取代酰胺;第二类是 L 型氨基酸类取代酰胺;第三类是含有苯环的取代酰胺。虽然苯环本身并不具有极性基团,可能造理化性质欠佳,但由于可在芳环上引入各种取代基团,所以可初步判断作取代链的最佳长度后进一步引入极性修饰基团(路线 1)。

## 1 合成路线

以偏苯酸酐(**1**)为原料,首先制成酰氯 **2**,继而以酰氯、酸酐和酸的不同反应性控制反应产物,得到双酯产物 **3** 和 **4**(路线 1)。如果使用 1,2,4-苯三甲酸直接酯化,有可能生成 3 种单酯,3 种双酯和 1 种三酯,共计 7 种不同的产物,而上述合成方法可

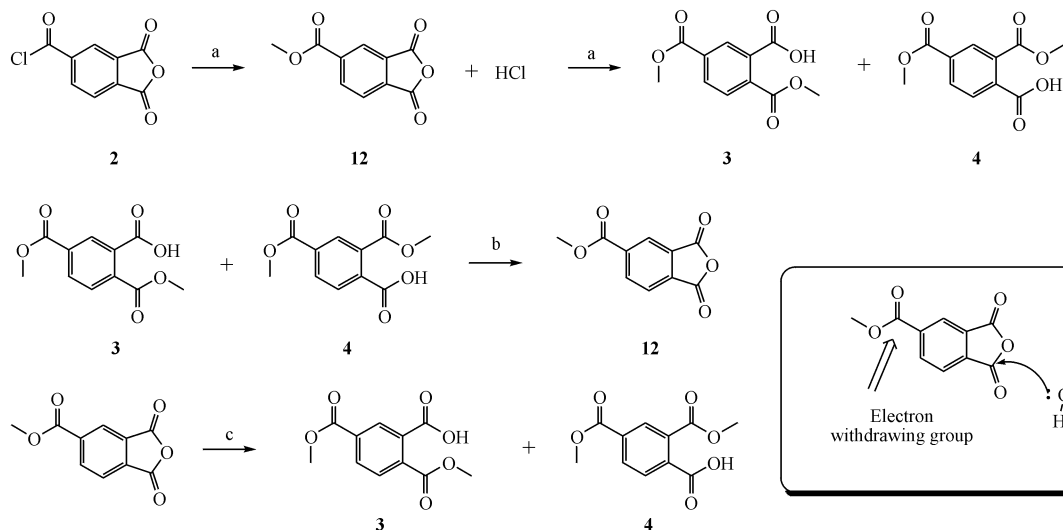
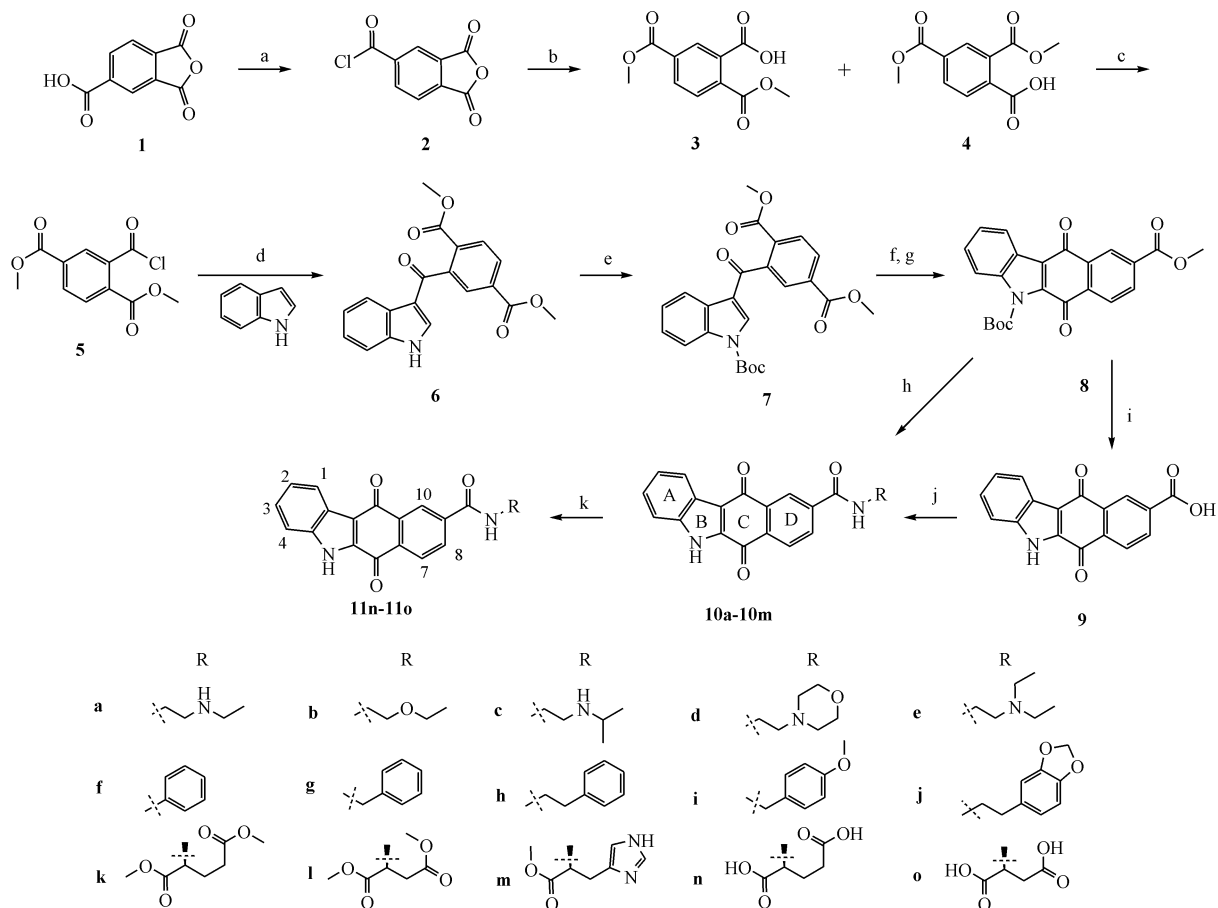
以只生成一对异构体 **3** 和 **4**。如路线 2 所示,甲醇先和酰氯 **2** 反应生成单酯和氯化氢,随后,甲醇和酸酐反应,得到二酯。由于化合物 **12** 的苯环上有吸电子的定位基,即酯基,所以该酯化反应可能具有区域选择性。但降无论是低反应温度,还是添加缚酸剂除去氯化氢,都未能提高反应的选择性。所得二酯粗品多次重结晶后得到化合物 **3**。使用氯化亚砷为溶剂, *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)为催化剂,加热回流条件下,化合物 **3** 生成邻苯二酸酐 **12**。酸酐 **12** 与甲醇反应生成二酯,该反应没有区域选择性,这说明底物 **12** 本身吸电子基的定位效果不强,而非氯化氢催化酯化所致。因此,停止了对酯化反应的优化。改用草酰氯制备酰氯,顺利地得到了双酯 **5**,继而与吡啶发生付克反应得到化合物 **6**。首先,尝试了使用甲基甲醚基作为保护基保护吡啶的氮氢,但最终无法脱除保护基,故用叔丁氧羰基替换甲基甲醚基。叔丁氧羰基保护的底物 **7** 在 LiHMDS(六甲基硅基氨基锂)作用下脱除一个氢,进攻分子内的羰基得到环合产物,并脱除保护基。该环合产物在有机溶剂中溶解度不佳,柱色谱纯化困难,于是再次使用叔丁氧羰基保护吡啶部分,改善溶解度,然后经柱色谱纯化得到化合物 **8**。根据胺的不同,或将化合物 **8** 水解成酸 **9** 后与胺缩合直接得到产物 **10**;或缩合后水解酯基后得到 **11**;又或者将化合物 **8** 与胺反应,胺解得到终产物 **10**。目标化合物结构均由质谱和 <sup>1</sup>H NMR 确认。

## 2 化学实验

### 2.1 材料与仪器

偏苯酸酐(北京华威锐科化工有限公司);吡啶[萨恩化学技术(上海)有限公司];氯化亚砷(国药集团化学试剂有限公司);草酰氯(国药集团化学试剂有限公司);六甲基硅基氨基锂(LiHMDS,百灵威科技有限公司),其他试剂均为市售分析纯。除另行说明外,所有试剂与溶剂均未经处理直接使用。

B-510 熔点仪(瑞士步琦有限公司); Nicolet™ IS™ 50 傅里叶变换红外光谱仪、DFS 磁质谱仪(美国赛默飞世尔公司);Mercury Plus 300 MHz 核磁共振仪(美国瓦里安公司);Avance III 400 MHz 核磁共振仪(德国布鲁克公司);LCQ-DECA 离子阱质谱仪(美国菲尼根质谱公司)。



## 2.2 合成实验

2,5-二甲氧羰基苯甲酸(**3**) 取化合物 **1** (50.000 g, 0.26 mol, 1.0 eq.), 加入氯化亚砷 (65 mL, 0.90 mol, 3.4 eq.), DMF (0.4 mL, 5.2 mmol, 0.02 eq.) 加热回流 22 h。冷却至室温, 减压蒸馏除去多余氯化亚砷, 加入石油醚 20.0 mL, 减压蒸馏除去, 重复两次, 得到白色固体 **2**, 不作进一步纯化, 直接用于下一步反应。将所得固体捣碎, 取固体 (9.421 g, 44.7 mmol, 1.0 eq.) 置于两口瓶中, 冰浴, 取甲醇 (15.0 mL, 370.3 mmol, 8.3 eq.) 于加料漏斗中, 搅拌下逐滴滴加甲醇, 滴加完毕, 10 min 后旋转蒸发除去多余甲醇。使用乙酸乙酯-石油醚体系重结晶多次可以得到白色固体 **3** (3.623 g, 34.0%); mp 122 ~ 124 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 058, 3 027, 2 995, 2 956, 2 919, 2 850, 1 738, 1 718, 1 705, 1 638, 1 581, 1 495, 1 465, 1 440, 1 313, 1 296, 1 285, 1 265, 1 149, 1 116, 1 080, 958, 825, 797, 438  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 3.95 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.98 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7.74 (1H, d,  $J=8.0$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 8.27 (1H, dd,  $J=8.0, 1.6$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.60 (1H, d,  $J=1.5$  Hz,  $\text{C}_6\text{-H}$ ); MS  $m/z$  238  $[\text{M}]^+$ 。

2-(3-1*H*-吡啶基羰基)对苯二甲酸二甲酯(**6**) 取化合物 **3** (2.874 g, 12.0 mmol, 1.0 eq.), 置于预干燥的双口瓶中, 氩气置换 3 次, 加入新蒸的二氯甲烷 35.0 mL 和重蒸过的 DMF (15.0  $\mu\text{L}$ , 0.195 mmol, 0.016 eq.)。加入草酰氯 (1.55 mL, 18.3 mmol, 1.5 eq.), 加热回流 12 h。冷却至室温, 减压蒸馏除去多余二氯甲烷和草酰氯, 加入石油醚 10.0 mL, 减压蒸馏除去, 重复两次后得到米黄色固体 **5** (3.080 g, 100.0%) 不作进一步纯化, 直接用于下一步反应。

取预干燥的吡啶 (824 mg, 7.0 mmol, 2.0 eq.) 于预干燥两口瓶中, 加入  $\text{AlCl}_3$  (467 mg, 3.5 mmol, 1.0 eq.), 氩气置换 3 次, 加入重蒸二氯甲烷 35.0 mL, 室温搅拌 1 h。加入化合物 **5** (960 mg, 3.7 mmol, 1.07 eq.), 溶液变为红色。2.5 h 后加入 1.0 mol/L HCl 水溶液, 搅拌。取有机层, 所余水相使用乙酸乙酯萃取至有机相中无产物。合并有机层, 饱和食盐水洗 1 次, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 得粗品。柱色谱 (二氯甲烷-乙酸乙酯, 20:1) 纯化, 得白色固体 **6** (823 mg, 65.2%); mp 194 ~ 195 °C; IR (KBr,  $\nu$ ):

3 045, 3 026, 2 952, 2 850, 1 728, 1 717, 1 614, 1 580, 1 522, 1 494, 1 459, 1 428, 1 285, 1 140, 1 121, 1 097, 927, 915, 838, 818, 428  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 3.63 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.89 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7.21 ~ 7.32 (2H, m,  $\text{C}_5$  和  $\text{C}_6\text{-H}$ ), 7.52 (1H, d,  $J=7.9$  Hz,  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 7.70 (1H, d,  $J=2.2$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 8.03 (2H, d,  $J=7.9$  Hz,  $\text{C}_2$  和  $\text{C}_6\text{-H}$ ), 8.15 (1H, d,  $J=7.1$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.19 (1H, dd,  $J=8.1, 1.7$  Hz,  $\text{C}_5\text{-H}$ ), 12.08 (1H, s, NH); MS  $m/z$  337  $[\text{M}]^+$ 。

2-{3-[ (1-叔丁氧羰基)-1*H*-吡啶]-羰基}对苯二甲酸二甲酯(**7**) 取化合物 **6** (305.0 mg, 0.904 mmol, 1.0 eq.), 加入二氯甲烷 6.0 mL, 吡啶 (80.0  $\mu\text{L}$ , 0.994 mmol, 1.1 eq.),  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (二碳酸二叔丁酯) (217.3 mg, 0.1 mmol, 1.1 eq.) 和 DMAP (4-二甲氨基吡啶) (11.0 mg, 0.09 mmol, 0.1 eq.)。室温搅拌 2 h, 反应液由浑浊变澄清。加入饱和氯化铵水溶液洗 1 次, 加入乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥, 过滤。滤液减压除去溶剂, 得到粗品。柱色谱纯化 (二氯甲烷-乙酸乙酯, 200:1), 得白色固体 **7** (298.0 mg, 75.3%); mp 166 ~ 167 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 079, 3 008, 2 983, 2 951, 2 850, 1 731, 1 727, 1 644, 1 576, 1 485, 1 449, 1 438, 1 368, 1 294, 1 276, 1 258, 1 246, 1 145, 1 105, 1 078, 859, 836, 427  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 1.66 (9H, s, *t*-Bu), 3.73 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.95 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7.33 ~ 7.47 (2H, m,  $\text{C}_5$  和  $\text{C}_6\text{-H}$ ), 7.71 (1H, s,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 8.04 ~ 8.17 (3H, m,  $\text{C}_5$ 、 $\text{C}_6$  和  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 8.23 (1H, d,  $J=8.1$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.32 ~ 8.42 (1H, m,  $\text{C}_5\text{-H}$ ); MS  $m/z$  437  $[\text{M}]^+$ 。

6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H* 苯[*b*]吡啶-5,9-二甲酸叔丁甲酯(**8**) 取预干燥的 **7** (437.4 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq.) 置于预干燥的两口瓶中, 氩气置换 3 次, 加入新蒸的四氢呋喃 100.0 mL, 加入四甲基乙二胺 (TMEDA) (112.0  $\mu\text{L}$ , 0.75 mmol, 0.75 eq.), -78 °C 搅拌。待反应液温度降至 -78 °C, 取 LiHMDS 的四氢呋喃溶液 (1.0 mol/L, 1.5 mL, 1.5 mmol, 1.5 eq.), 逐渐缓慢滴加入反应液中, 搅拌 2 h 后, 开始逐渐升温, 升至室温后继续搅拌 2 h。加入 DMAP (24.4 mg, 0.2 mmol, 0.2 eq.),  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (480.2 mg, 2.2 mmol, 2.2 eq.), 室温搅拌, 反应液颜色变浅, TLC 监测反应。反应完全后, 将反

应液加入到氯化铵饱和水溶液中,萃取,取有机层。乙酸乙酯萃取水层3次,合并有机层,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到粗品。柱色谱(二氯甲烷-石油醚,3:2)得到黄色固体**8**(234.2 mg,两步收率57.8%):mp > 280 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 2 983, 2 850, 1 728, 1 673, 1 480, 1 444, 1 382, 1 281, 1 248, 1 139, 1 055  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 1.71 (9H, s, *t*-Bu), 4.01 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7.47 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.57 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 8.02 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.23 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 8.38 (1H, dd,  $J = 8.1, 1.5$  Hz,  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.50 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{C}_1\text{-H}$ ), 8.84 (1H, d,  $J = 1.1$  Hz,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ); MS  $m/z$  405 [ $\text{M}$ ] $^+$ 。

6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-甲酸(**9**) 取化合物**8**(405.4 mg, 1.0 mol, 1.0 eq.), 加入乙醇和 NaOH 水溶液(2.0 mol/L, 1.0 mmol, 1.0 eq.)各5.0 mL加热回流3 h,冷却。加入2.0 mol/L HCl 水溶液调节至 pH = 1,加入乙酸乙酯萃取3次,合并有机层,无水硫酸钠干燥有机相,过滤,合并有机层,浓缩,得到粗品。二氯甲烷-甲醇-石油醚体系重结晶,得到橙红色固体**9**(271.5 mg, 93.2%): mp > 280 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 069, 1 692, 1 651, 1 394, 1 295  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 7.34 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.43 (1H, t,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.57 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 8.01 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.16 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{C}_1\text{-H}$ ), 8.22 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.54 (1H, s,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ), 13.00 (1H, br. s, COOH); MS  $m/z$  291 [ $\text{M}$ ] $^+$ 。

*N*-(2-(乙基氨基)乙基)-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-甲酰胺(**10a**) 取化合物**8**(30.0 mg, 0.074 mmol, 1.0 eq.), 加入 *N*-乙基乙二胺(0.5 mL, 4.75 mmol, 64.2 eq.), 室温搅拌12 h, 加入饱和食盐水, 乙酸乙酯萃取。所得水相使用1.0 mol/L HCl 水溶液调节 pH 至中性, 使用水相洗有机相, 所得水相再次使用1.0 mol/L HCl 水溶液调节 pH 至中性, 重复直至萃取后水相为中性。乙酸乙酯萃取水相3次, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 得到粗品。使用二氯甲烷-甲醇-石油醚体系重结晶得到橙黄色固体**10a**(7.6 mg, 28.4%): mp 240 °C (dec); IR (KBr,  $\nu$ ): 3 262, 2 922, 2 890, 1 655, 1 539, 1 433, 1 403, 1 330,

1 305, 1 137  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz)  $\delta$ : 1.04 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2.61 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.75 (2H, t,  $J = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.49 ~ 3.37 (3H, m,  $\text{CH}_2$  和 NH), 7.37 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.45 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.61 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.17 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 8.23 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{C}_8$  和  $\text{C}_1\text{-H}$ ), 8.56 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ), 8.89 (1H, t,  $J = 5.7$  Hz, CONH); MS  $m/z$  362.2 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ ; MS  $m/z$  360.3 [ $\text{M} - \text{H}$ ] $^-$ 。

*N*-(2-(乙氧基)乙基)-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-甲酰胺(**10b**) 操作同化合物**10a**, 反应时间为12 h。橙黄色固体(14.1 mg, 52.6%): mp > 280 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 253, 2 969, 2 929, 2 885, 2 870, 2 816, 1 661, 1 648, 1 637, 1 527, 1 483, 1 470, 1 434, 1 409, 1 394, 1 385, 1 295, 1 141, 1 114, 910, 865  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 1.11 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.39 ~ 3.59 (6H, m,  $3 \times \text{CH}_2$ ), 7.37 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.46 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.60 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 8.11 ~ 8.28 (3H, m,  $\text{C}_1$ 、 $\text{C}_4$  和  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.55 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ), 8.98 (1H, t,  $J = 5.6$  Hz, CONH), 13.16 (1H, br. s, Ar-NH); MS  $m/z$  362 [ $\text{M}$ ] $^+$ 。

*N*-(2-(异丙基氨基)乙基)-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-甲酰胺(**10c**) 操作同化合物**10a**, 反应时间为20 h。橙黄色固体(10.6 mg, 38.2%): mp 263 °C (dec); IR (KBr,  $\nu$ ): 3 395, 2 925, 2 871, 1 698, 1 663, 1 529, 1 468, 1 438, 1 368, 1 300, 1 152  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 0.98 (6H, d,  $J = 6.2$  Hz,  $2 \times \text{CH}_3$ ), 2.72 (2H, t,  $J = 5.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.76 ~ 2.87 (1H, m, CH), 3.36 ~ 3.47 (3H, m,  $\text{CH}_2$  和 NH), 7.36 (1H, t,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.44 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.59 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.15 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz,  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 8.21 (2H, d,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{C}_1$  和  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.53 (1H, s,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ), 8.89 (1H, t,  $J = 5.0$  Hz, CONH); MS  $m/z$  375 [ $\text{M}$ ] $^+$ 。

*N*-(2-(*N*-吗啡啉)乙基)-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-甲酰胺(**10d**) 操作同化合物**10a**, 反应时间为42 h。橙黄色固体(10.9 mg, 36.5%): mp > 280 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 236, 2 971, 2 923, 2 892, 2 858, 1 653, 1 641, 1 529, 1 471,

1 444, 1 416, 1 307, 1 116  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 2.37 ~ 2.57 (6H, m,  $3 \times \text{CH}_2$ ), 3.36 ~ 3.49 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3.53 ~ 3.60 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 7.37 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.46 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.59 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.09 ~ 8.30 (3H, m,  $\text{C}_1$ 、 $\text{C}_7$  和  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.53 (1H, s,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ), 8.86 (1H, t,  $J = 5.5$  Hz, CONH), 13.00 (1H, br. s, Ar-NH); MS  $m/z$  404.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; MS  $m/z$  402.2  $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。

*N*-(2-(二乙基氨基)乙基)-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]吡啶-9-甲酰胺 (**10e**) 操作同化合物 **10a**, 反应时间为 53 h。橙黄色固体 (17.7 mg, 61.4%); mp 236  $^{\circ}\text{C}$  (dec); IR (KBr,  $\nu$ ): 3 234, 2 941, 2 899, 2 876, 1 675, 1 654, 1 522, 1 470, 1 441, 1 392, 1 329, 1 306, 1 209  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 1.09 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $2 \times \text{CH}_3$ ), 2.63 (q,  $J = 7.1$  Hz, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.72 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.62 ~ 3.49 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.41 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.49 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.55 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 8.18 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.23 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.41 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{C}_1\text{-H}$ ), 8.52 (s, 1H,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ); MS  $m/z$  390.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; MS  $m/z$  388.2  $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。

*N*-苄基-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]吡啶-9-甲酰胺 (**10f**) 取化合物 **9** (10.1 mg, 0.035 mmol, 1.0 eq.), 溶解于 0.2 mL DMF 中, 加入苯胺 (3.9  $\mu\text{L}$ , 0.043 mmol, 1.2 eq.), (7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脒六氟磷酸酯 (HATU) (16.5 mg, 0.043 mmol, 1.2 eq.), 2-*N,N*-二异丙基乙胺 (DIPEA) (7.2  $\mu\text{L}$ , 0.044 mmol, 1.2 eq.) 室温搅拌 3 h, 产生橙黄色沉淀。加入 5.0 mL 乙酸乙酯稀释, 过滤, 得到化合物 **10f**, 橙黄色固体 (4.0 mg, 31.2%); mp > 280  $^{\circ}\text{C}$ ; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 239, 3 062, 3 040, 3 013, 1 651, 1 648, 1 601, 1 528, 1 472, 1 445, 1 326, 1 305, 758, 738, 730, 703, 439  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$ : 7.16 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 7.41 (3H, t,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{C}_3$ 、 $\text{C}_5$  和  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.49 (1H, ddd,  $J = 8.3, 7.1, 1.2$  Hz,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.63 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 7.83 (2H, d,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{C}_2$  和  $\text{C}_6\text{-H}$ ), 8.25 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.26 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{C}_1\text{-H}$ ), 8.36 (1H, dd,

$J = 8.0, 1.9$  Hz,  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.67 (1H, d,  $J = 1.7$  Hz,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ), 10.70 (1H, s, CONH), 13.21 (1H, br. s, Ar-NH); MS  $m/z$  366  $[\text{M}]^+$ 。

*N*-苄基-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]吡啶-9-甲酰胺 (**10g**) 操作同化合物 **10a**, 反应时间为 96 h。橙黄色固体 (8.0 mg, 42.6%); mp > 280  $^{\circ}\text{C}$ ; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 241, 3 085, 3 059, 3 029, 2 919, 2 854, 1 663, 1 651, 1 603, 1 565, 1 471, 1 454, 1 436, 1 305, 753, 725, 699, 440  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 4.52 (2H, d,  $J = 5.9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7.19 ~ 7.29 (1H, m,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 7.29 ~ 7.41 (5H, m,  $\text{C}_2$ 、 $\text{C}_2'$ 、 $\text{C}_3'$ 、 $\text{C}_5'$  和  $\text{C}_6'\text{-ArH}$ ), 7.46 (1H, t,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.59 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.17 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{C}_7\text{-H}$ ), 8.22 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{C}_1\text{-H}$ ), 8.27 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.60 (1H, s,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ), 9.50 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H, CONH), 13.12 (br. s, 1H, Ar-NH); MS  $m/z$  380  $[\text{M}]^+$ 。

*N*-苄乙基-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]吡啶-9-甲酰胺 (**10h**) 操作同化合物 **10a**, 反应时间为 96 h。橙黄色固体 (8.9 mg, 30.5%); mp > 280  $^{\circ}\text{C}$ ; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 231, 3 085, 3 059, 3 025, 1 651, 1 637, 1 600, 1 528, 1 470, 1 454, 1 305, 746, 699, 439  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 2.88 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.44 ~ 3.66 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 7.15 ~ 7.34 (5H, m,  $\text{C}_2$ 、 $\text{C}_3$ 、 $\text{C}_4$ 、 $\text{C}_5$  和  $\text{C}_6\text{-H}$ ), 7.37 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.46 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.60 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.09 ~ 8.33 (3H, m,  $\text{C}_1$ 、 $\text{C}_7$  和  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.52 (1H, s,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ), 9.02 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz, CONH), 13.16 (1H, s, Ar-NH); MS  $m/z$  394  $[\text{M}]^+$ 。

*N*-(4-甲氧基苄基)-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]吡啶-9-甲酰胺 (**10i**) 操作同化合物 **10a**, 反应时间为 93 h。橙黄色固体 (3.1 mg, 10.2%); mp > 280  $^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 3.71 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4.44 (2H, d,  $J = 5.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 6.89 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{C}_3$  和  $\text{C}_5\text{-H}$ ), 7.27 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz,  $\text{C}_2$  和  $\text{C}_6\text{-H}$ ), 7.36 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 7.45 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 7.59 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz,  $\text{C}_4\text{-H}$ ), 8.05 ~ 8.39 (3H, m,  $\text{C}_1$ 、 $\text{C}_7$  和  $\text{C}_8\text{-H}$ ), 8.57 (1H, d,  $J = 0.8$  Hz,  $\text{C}_{10}\text{-H}$ ), 9.43 (1H, t,  $J = 5.9$  Hz, CONH); MS  $m/z$  410

[M]<sup>+</sup>。

*N*-(3,4-亚甲二氧基苄)乙基)-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-甲酰胺(**10j**) 操作同化合物**10a**,反应时间为96 h。橙黄色固体(11.3 mg, 34.8%); mp > 280 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 266, 2 766, 1 660, 1 646, 1 641, 1 525, 1 469, 1 442, 1 308, 1 242 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 2.79 (2H, t,  $J$  = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.41 ~ 3.57 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 5.95 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 6.69 (1H, d,  $J$  = 7.9 Hz, C<sub>6'</sub>-H), 6.77 ~ 6.89 (2H, m, C<sub>2'</sub>-H 和 C<sub>3'</sub>-H), 7.37 (1H, t,  $J$  = 7.6 Hz, C<sub>2</sub>-H), 7.45 (1H, t,  $J$  = 7.3 Hz, C<sub>3</sub>-H), 7.59 (1H, d,  $J$  = 8.1 Hz, C<sub>4</sub>-H), 8.11 ~ 8.26 (3H, m, C<sub>1</sub>、C<sub>7</sub> 和 C<sub>8</sub>-H), 8.51 (1H, d,  $J$  = 0.9 Hz, C<sub>10</sub>-H), 8.97 (1H, t,  $J$  = 5.9 Hz, CONH); MS  $m/z$  438 [M]<sup>+</sup>。

*N*-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-羧基-L-谷氨酸二甲酯(**10k**) 取 L-谷氨酸二甲酯盐酸盐(35.4 mg, 0.16 mmol, 1.6 eq.) 和 **9**(29.1 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq.), 加入 DMF (0.5 mL)、HA-TU (45.6 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq.) 和 DIPEA (104  $\mu$ L, 0.63 mmol, 6.3 eq.), 室温搅拌 0.5 h<sup>[11]</sup>。柱色谱纯化(乙酸乙酯-二氯甲烷, 1:4), 得到橙色固体(23.4 mg, 52.2%); mp 255 ~ 257 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 262, 2 993, 2 952, 2 849, 1 740, 1 649, 1 639, 1 526, 1 482, 1 471, 1 436, 1 296, 1 245, 1 210, 1 132 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 1.95 ~ 2.27 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.38 ~ 2.56 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.58 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.66 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.44 ~ 4.60 (1H, m, CH), 7.33 ~ 7.41 (1H, m, C<sub>2</sub>-H), 7.42 ~ 7.50 (1H, m, C<sub>3</sub>-H), 7.60 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz, C<sub>4</sub>-H), 8.18 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, C<sub>7</sub>-H), 8.14 ~ 8.30 (2H, m, C<sub>1</sub> 和 C<sub>8</sub>-H), 8.58 (1H, d,  $J$  = 1.5 Hz, C<sub>10</sub>-H), 9.24 (1H, d,  $J$  = 7.3 Hz, CONH), 13.16 (1H, s, Ar-NH); MS  $m/z$  448 [M]<sup>+</sup>。备注: 2.38 ~ 2.56 (2H, m, CH<sub>2</sub>) 在 DMSO-*d*<sub>6</sub> 中被溶剂遮挡, 改用 CDCl<sub>3</sub> 作溶剂可见, 此化学位移数值为在 CDCl<sub>3</sub> 中的数值。

*N*-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-羧基-L-天冬酸二甲酯(**10l**) 操作同化合物**10k**, 将 L-谷氨酸二甲酯盐酸盐换成 L-天冬酸二甲酯盐酸盐<sup>[12]</sup>。得到化合物**10l**, 橙色固体(13.1 mg, 30.2%); mp 253 ~ 254 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 266,

3 006, 2 953, 2 850, 1 738, 1 647, 1 527, 1 470, 1 437, 1 284, 1 240, 1 212, 1 177, 1 078 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 2.89 (1H, dd,  $J$  = 16.6, 7.8 Hz, CH<sub>2</sub> 之一), 2.99 (1H, dd,  $J$  = 16.3, 5.9 Hz, CH<sub>2</sub> 之一), 3.62 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.66 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.84 ~ 4.97 (1H, m, CH), 7.37 (1H, t,  $J$  = 7.4 Hz, C<sub>2</sub>-H), 7.46 (1H, t,  $J$  = 7.6 Hz, C<sub>3</sub>-H), 7.59 (1H, d,  $J$  = 8.1 Hz, C<sub>4</sub>-H), 8.18 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, C<sub>7</sub>-H), 8.22 (2H, d,  $J$  = 8.1 Hz, C<sub>1</sub> 和 C<sub>8</sub>-H), 8.56 (1H, s, C<sub>10</sub>-H), 9.40 (1H, d,  $J$  = 7.7 Hz, CONH), 13.16 (1H, s, Ar-NH); MS  $m/z$  434 [M]<sup>+</sup>。

*N*-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-羧基-L-组氨酸甲酯(**10m**) 操作同化合物**10k**, 取 **9**(50.0 mg, 0.17 mmol) 将 L-谷氨酸二甲酯盐酸盐换成 L-组氨酸甲酯盐酸盐<sup>[13]</sup>。得到化合物**10m** 橙色固体(11.2 mg, 14.7%); mp 245 ~ 246 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 320, 2 958, 2 918, 2 851, 1 741, 1 665, 1 651, 1 636, 1 530, 1 476, 1 438, 1 306, 1 215, 1 172 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 3.08 (2H, d,  $J$  = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.64 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.73 (1H, q,  $J$  = 7.0 Hz, CH), 6.87 (1H, s, C<sub>5</sub>-H), 7.38 (1H, t,  $J$  = 7.5 Hz, C<sub>2</sub>-H), 7.46 (1H, t,  $J$  = 7.0 Hz, C<sub>3</sub>-H), 7.56 (1H, s, C<sub>3'</sub>-H), 7.60 (1H, d,  $J$  = 8.3 Hz, C<sub>4</sub>-H), 8.11 ~ 8.32 (3H, m, C<sub>1</sub>、C<sub>7</sub> 和 C<sub>8</sub>-H), 8.55 (1H, s, C<sub>10</sub>-H), 9.34 (1H, d,  $J$  = 7.1 Hz, CONH), 11.86 (1H, br. s, Ar-NH), 13.17 (1H, s, Ar-NH); MS  $m/z$  442 [M]<sup>+</sup>。

*N*-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]咪唑-9-羧基-L-谷氨酸(**11n**) 取化合物**10k**(10.0 mg, 0.022 mmol, 1.0 eq.), 加入 NaOH 甲醇-水(1:1) 混合溶剂(1.0 mol/L, 0.2 mL, 0.2 mmol, 9.1 eq.), 室温搅拌 0.5 h。加入水稀释反应液, 加入 2 mol/L 的 HCl 水溶液酸化反应液至 pH 1, 乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 得到粗品。所得粗品使用二氯甲烷-甲醇-石油醚体系重结晶, 得到化合物**10f**, 橙红色固体(7.9 mg, 84.3%); mp 199 ~ 200 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 251, 3 086, 3 063, 2 960, 1 716, 1 651, 1 525, 1 471, 1 405, 1 395, 1 329 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 1.89 ~ 2.04 (1H, m, CH<sub>2</sub> 之一), 2.05 ~ 2.22 (1H, m, CH<sub>2</sub> 之一), 2.38 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>COOH), 4.31 ~ 4.54 (1H, m, CH), 7.38 (1H, t,

$J=7.4$  Hz,  $C_2$ -H),  $7.46$  (1H, t,  $J=7.2$  Hz,  $C_3$ -H),  $7.60$  (1H, d,  $J=8.4$  Hz,  $C_4$ -H),  $8.12 \sim 8.29$  (3H, m,  $C_1$ 、 $C_7$  和  $C_8$ -H),  $8.59$  (d,  $J=1.1$  Hz, 1H,  $C_{10}$ -H),  $9.10$  (1H, d,  $J=7.6$  Hz, CONH),  $13.17$  (1H, s, Ar-NH); MS  $m/z$  443.1  $[M+Na]^+$ ; MS  $m/z$  419.0  $[M-H]^-$ 。

*N*-6,11-二氧代-6,11-二氢-5*H*-苯并[*b*]吡啶-9-羧基-*L*-天冬氨酸 (**11o**) 操作同化合物 **11n**, 取 **10l** (8.0 mg, 0.018 mmol) 得到化合物 **11o**, 橙红色固体 (3.7 mg, 49.4%); mp  $223 \sim 225$  °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 315, 2 961, 2 920, 1 734, 1 656, 1 526, 1 413, 1 395, 1 331  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 2.66 ~ 2.93 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.55 ~ 4.97 (m, 1H, CH), 7.38 (t,  $J=7.5$  Hz, 1H,  $C_2$ -H), 7.46 (1H, t,  $J=7.3$  Hz,  $C_3$ -H), 7.60 (1H, d,  $J=8.1$  Hz,  $C_4$ -H), 8.13 ~ 8.28 (3H, m,  $C_1$ 、 $C_7$  和  $C_8$ -H), 8.57 (1H, s,  $C_{10}$ -H), 9.22 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, CONH), 13.17 (1H, s, Ar-NH); MS  $m/z$  404.9  $[M-H]^-$ 。

### 3 抗细胞增殖活性实验

#### 3.1 细胞培养

拓扑异构酶 II 的表达和催化活性随细胞周期变化, 处于指数期的细胞拓扑异构酶 II 数量更多, 活性更高<sup>[14]</sup>。增殖速度快的细胞对拓扑异构酶 II 抑制剂更为敏感。所以选取了增殖相对较快的细胞株: 人肝癌 SMMC-7721 细胞 (中国人民解放军第二军医大学)、人三阴性乳腺癌 S1 细胞 (未知来源)、人结直肠癌 HCT116 细胞 (美国菌种保藏中心) 和人宫颈鳞癌 HeLa 细胞 (美国菌种保藏中心) 作为体外增殖抑制测试模型。还选取了人正常肝细胞 LO2 细胞 (中国科学上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所) 用于检验化合物对正常细胞的毒性。其中 SMMC-7721、HeLa 和 LO2 细胞的培养条件为含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基; HCT116 培养液为含 10% 胎牛血清的 McCoy' 5A 培养基; S1 培养条件为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。细胞置于含 5%  $CO_2$  的饱和湿度培养箱中进行培养。

#### 3.2 药品和试剂

PRIM-1640, F12, DMEM, 胎牛血清 (Gibco<sup>TM</sup>, 美国赛默飞世尔公司); McCoy' 5A, 磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB), 依托泊苷 (etoposide), *N*、

*N*-二甲基亚砷 (DMSO) (美国西格玛奥德里奇公司); 其余试剂均为市售分析纯试剂。

#### 3.3 体外细胞增殖实验

采用磺酰罗丹明 B 蛋白染色法检测化合物 **10a** ~ **10m**、**11n** 和 **11o** 对各细胞的体外增殖抑制作用。根据细胞生长速率, 按每孔一定细胞数 (3 000 或 4 000 个) 将处于对数生长期的肿瘤细胞以每孔 100  $\mu L$  接种于 96 孔培养板, 待细胞贴壁生长 24 h 后, 将各化合物以一定浓度梯度 (5 倍或 3 倍) 生理盐水稀释, 按每孔 10  $\mu L$  加入 96 孔培养板中, 每个浓度设置 2 个复孔, 并设相应的 DMSO 溶媒对照孔和无细胞调零孔。37 °C、5%  $CO_2$  条件下培养细胞 72 h 后, 倾去培养液, 用 10% 预冷的 TCA 固定细胞, 4 °C 放置过夜后用蒸馏水洗涤 5 次, 置空气中自然干燥, 加入由 1% 冰醋酸配制的 0.4% SRB 溶液, 每孔 100  $\mu L$ , 室温中染色 30 min, 倾去上清液, 1% 醋酸洗涤 5 次去除未结合的染料, 空气中干燥。最后每孔加入非缓冲 Tris-base 碱液 (10 mmol/L, pH = 10.5) 150  $\mu L$  溶解, 在酶标仪上振荡混匀, 以 560 nm 波长测定吸收度 *A*。实验重复 3 次。计算被测化合物对肿瘤细胞生长的抑制率 (IR), 半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 采用 Logit 四参数法计算得出。

### 4 结果与讨论

首先测试了 16 个化合物在 5 和 10  $\mu mol/L$  浓度下对 4 种不同肿瘤细胞株的抑制活性 (表 1)。具有四环平面结构的母核 **9** 在测试浓度下对 4 种肿瘤细胞均无活性, 说明仅 DNA 嵌入作用不足以抑制肿瘤细胞增殖。含有脂肪胺侧链的 **10a**、**10c**、**10d** 和 **10e** 对 4 种肿瘤细胞株有明显的抑制作用。**10b** 将 **10a** 侧链上的氮原子替换成氧原子, 化合物的活性完全消失。据此认为, 侧链上的氮原子是活性必须的。氮原子单取代的 **10a** 和 **10c** 对不同肿瘤细胞株的抑制作用有所不同, 而氮原子双取代的 **10d** 和 **10e** 对不同肿瘤细胞株的抑制作用差异不如 **10a** 和 **10c** 明显 (表 2)。化合物 **10d** 中使用氧桥连接链状取代基, 活性下降。取活性较好的 **10a**、**10d** 和 **10e** 测试了对人正常肝细胞 LO2 的抑制活性, 其  $IC_{50}$  分别为 6.03、15.04 和 3.85  $\mu mol/L$ , 与 4 种肿瘤细胞株的  $IC_{50}$  相当 (表 2)。据文献报道, 依托泊苷对 HeLa 细胞和 LO2 细胞的  $EC_{50}$  分别为



209.9 和 3.88  $\mu\text{mol/L}$ , 对正常肝细胞的毒性更大<sup>[15]</sup>。含有羧基取代的 **11n** 与 **11o** 以及其甲脂化合物 **10k**、**10l** 和 **10m** 在测试浓度下对所测肿瘤细胞株没有明显抑制活性。苯环侧链系列化合物 **10f**~**10j**, 仅连接碳链为一个碳原子的 **10g** 和 **10i** 对 SMMC-7721 有弱抑制活性。据此推测, 一个碳

可能是最优的链长。提高测试浓度发现苯环对位含有甲氧基取代基的 **10i** 的抑制活性优于无任何取代基的 **10g**, 这说明在苯环上引入取代基是有可能增加化合物活性的(表 3)。在苯环上引入含有极性基团的取代基或是将苯环换成极性更大的杂环, 则有可能进一步提高活性。

**Table 1** Inhibition rate (IR) of the compounds **9**,**10a-10m** and **11n-11o** at different concentrations

Compd.	IR/%							
	SMMC-7721		S1		HCT116		HeLa	
	10	5	10	5	10	5	10	5 $\mu\text{mol/L}$
<b>9</b>	0.0	0.0	0.8	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0
<b>10a</b>	46.2	3.9	78.5	48.9	96.2	60.6	0.4	0.0
<b>10b</b>	0.0	0.0	1.6	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0
<b>10c</b>	81.9	23.1	82.6	55.0	96.4	55.8	16.2	0.0
<b>10d</b>	35.6	3.6	74.7	1.1	70.0	0.9	3.9	0.6
<b>10e</b>	88.8	49.8	94.0	62.2	95.5	49.9	93.8	18.8
<b>10f</b>	1.4	0.0	1.1	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0
<b>10g</b>	12.7	0.0	5.5	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0
<b>10h</b>	8.0	0.0	1.2	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0
<b>10i</b>	26.5	0.0	0.8	0.0	0.8	0.0	2.1	0.0
<b>10j</b>	6.1	0.0	1.4	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
<b>10k</b>	4.6	0.0	1.4	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0
<b>10l</b>	0.0	0.0	0.9	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
<b>10m</b>	2.6	0.0	0.3	0.0	0.9	0.0	0.1	0.0
<b>11n</b>	5.9	0.0	0.3	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0
<b>11o</b>	2.8	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0
Etoposide	95.9	94.0	93.8	89.6	92.0	91.1	90.7	85.6

**Table 2** Antiproliferative activities of compound **10a**,**10c**,**10d**, and **10e** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Compd.	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol/L}$ )				
	SMMC-7721	S1	HCT116	HeLa	LO2
<b>10a</b>	10.49 $\pm$ 0.17	5.99 $\pm$ 1.17	4.84 $\pm$ 0.21	15.96 $\pm$ 5.91	6.03 $\pm$ 0.18
<b>10c</b>	7.07 $\pm$ 0.43	5.05 $\pm$ 0.32	4.88 $\pm$ 0.08	15.39 $\pm$ 2.66	NT
<b>10d</b>	12.37 $\pm$ 1.22	9.10 $\pm$ 5.06	11.99 $\pm$ 0.38	17.64 $\pm$ 0.08	15.04 $\pm$ 3.41
<b>10e</b>	5.06 $\pm$ 0.04	4.50 $\pm$ 0.05	5.29 $\pm$ 0.41	6.32 $\pm$ 0.17	3.85 $\pm$ 0.52
Etoposide	0.0013 $\pm$ 0.003	0.0018 $\pm$ 0.0013	0.0041 $\pm$ 0.0001	0.0040 $\pm$ 0.0004	NT

NT: Not tested

**Table 3** Inhibition of compounds **11g-11i** against SMMC-7721 at different concentrations

Compd.	IR/%					
	40	20	10	5	2.5	1.25 $\mu\text{mol/L}$
<b>11g</b>	37.8	18.8	0.5	-0.9	-0.8	-1.5
<b>11i</b>	62.7	46.6	11.4	1.5	-0.7	-2.0
Etoposide	99.9	99.9	97.8	97.0	91.0	72.3

参 考 文 献

[1] Tse YC, Kirkegaard K, Wang JC. Covalent bonds between protein and DNA. Formation of phosphotyrosine linkage between certain DNA topoisomerases and DNA [J]. *J Biol Chem*, 1980, **255**

(12):5560-5565.  
[2] Peter BJ, Ullsperger C, Hiasa H, *et al.* The structure of supercoiled intermediates in DNA replication[J]. *Cell*, 1998, **94**(6): 819-827.  
[3] Wu CC, Li TK, Farh L, *et al.* Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide [J]. *Science*, 2011, **333**(6041): 459-462.  
[4] Lu J, Patel S, Sharma N, *et al.* Structures of kbidelomycin bound to *Staphylococcus aureus* GyrB and ParE showed a novel U-shaped binding mode[J]. *ACS Chem Biol*, 2014, **9**(9): 2023-2031.  
[5] Wu CC, Li YC, Wang YR, *et al.* On the structural basis and design guidelines for type II topoisomerase-targeting anticancer

- drugs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(22):10630–10640.
- [6] Wei H, Ruthenburg AJ, Bechis SK, *et al.* Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase[J]. *J Biol Chem*, 2005, **280**(44):37041–37047.
- [7] Asche C, Frank W, Albert A, *et al.* Synthesis, antitumor activity and structure-activity relationships of 5*H*-benzo[*b*] carbazoles[J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, **13**(3):819–837.
- [8] Luo YL, Chou TC, Cheng CC. Design of antineoplastic agents on the basis of the “2-phenylnaphthalene-type” structural pattern. 3. Synthesis and biological activity evaluation of 5*H*-benzo[*b*] naphtho[2,3-*d'*]pyrrole-6,11-dione derivatives[J]. *J Heterocycl Chem*, 1996, **33**(1):113–117.
- [9] Miguel del Corral JM, Castro MA, Gordaliza M, *et al.* Synthesis and cytotoxicity of new heterocyclic terpenylnaphthoquinones[J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, **14**(8):2816–2827.
- [10] Alegria AE, Sanchez S, Sanchez-Cruz P, *et al.* Terpenylnaphthoquinones are reductively activated by NADH/NADH dehydrogenase[J]. *Toxicol Environ Chem*, 2005, **87**(2):237–245.
- [11] Jörres M, Schiffers I, Atodiressei I, *et al.* Asymmetric Michael additions of  $\alpha$ -nitrocyclohexanone to aryl nitroalkenes catalyzed by natural amino acid-derived bifunctional thioureas[J]. *Org Lett*, 2012, **14**(17):4518–4521.
- [12] Gilfillan L, Artschwager R, Harkiss AH, *et al.* Synthesis of pyrazole containing  $\alpha$ -amino acids via a highly regioselective condensation/aza-Michael reaction of  $\beta$ -aryl  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketones[J]. *Org Biomol Chem*, 2015, **13**(15):4514–4523.
- [13] Turtat F, Ouahrani-Bettache S, Montero JL, *et al.* Synthesis and biological evaluation of a new class of anti-*brucella* compounds targeting histidinol dehydrogenase:  $\alpha$ -*O*-arylketones and  $\alpha$ -*S*-arylketones derived from histidine[J]. *Med Chem Comm*, 2011, **2**(10):995–1000.
- [14] Padget K, Pearson ADJ, Austin CA, *et al.* Quantitation of DNA topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$  in human leukaemia cells by immunoblotting[J]. *Leukemia*, 2000, **14**(11):1997–2005.
- [15] Tang YJ, Xiao L. Anti-tumour activity of nitrogen substituted picropodophyllin derivative and preparation method and use thereof: CN, 102875564A[P]. 2013-01-16[2016-09-08].

## · 本刊讯 ·

### 本刊副主编尤启冬教授成果入选“2016 中国十大医学进展”

2017 年 3 月,“2016 中国十大医学进展/新闻人物”评选颁奖典礼上,本刊副主编尤启冬教授主持的科研成果“复杂结构天然产物抗肿瘤药物的研发及产业化”入选临床应用领域“2016 中国十大医学进展”。

由江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室主任尤启冬教授作为第一完成人、中国药科大学作为第一完成单位的“复杂结构天然产物抗肿瘤药物的研发及其产业化”的研究,突破了抗结直肠癌药伊立替康和抗非小细胞肺癌药长春瑞滨的产业化技术瓶颈,实现了产业化;突破了复杂结构天然产物藤黄酸药效骨架的化学合成关键技术,实现了“由仿到创”的跨越。该研究获中国及国际发明专利授权 15 项、获新药证书 4 项;实现两个品种的产业化,累计销售 52 亿元、利税 19 亿元、创汇 1 200 万美元。

“2016 中国十大医学进展/新闻人物”评选活动由中国科学报社与人民网、今日头条、赛思健康科学研究院、医学科学报社共同主办,旨在评选出促进我国医学科学发展、对全民健康起到积极推动作用,并在全社会范围内引起广泛关注的年度医学进展及新闻人物。活动于 2017 年 1 月下旬启动后,迅速得到全社会的广泛关注。经候选公示、微信点赞、评委函评等环节,并根据今日头条平台用户关注度,最终评选出 10 项“2016 中国十大医学进展”和 10 位“2016 中国十大医学新闻人物”。

(本刊编辑部)