

• 实验研究 •

4-苯基-1,3,5-三嗪-2-胺类衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究

李 唯, 郭舜民, 陈阿虹, 阙慧卿, 林 绥*

福建省医学科学研究院 福建省医学测试重点实验室, 福建 福州 350001

摘要: 目的 以 IMC-038525 为先导化合物, 设计并合成 4-苯基-1,3,5-三嗪-2-胺类化合物, 考察其体外抗肿瘤活性。方法 以 2,4-二氯-1,3,5-三嗪为起始原料, 经过氨化、Suzuki 偶联和还原胺化合成一类 4-苯基-1,3,5-三嗪-2-胺类化合物, 采用噻唑蓝法 (MTT) 测定其对肿瘤细胞的抑制活性。结果 设计并合成了 13 个新化合物, 结构经 $^1\text{H-NMR}$ 和 MS 确证。活性测试结果显示该类化合物具有一定的抗肿瘤活性。结论 合成了一类 4-苯基-1,3,5-三嗪-2-胺类衍生物, 具有一定抑瘤活性的化合物, 为新型抗肿瘤化合物的设计与合成提供思路。

关键词: IMC-038525; 抗肿瘤化合物; 血管靶向药物

中图分类号: R914; R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)08-2253-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.08.001

Synthesis of 4-phenyl-1,3,5-triazine-2-amine derivatives and their antitumor activities *in vitro*

LI Wei, GUO Shun-min, CHEN A-hong, QUE Hui-qing, LIN Sui

Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Analysis, Fujian Academy of Medical Sciences, Fuzhou 350001, China

Abstract: Objective To synthesize 4-phenyl-1,3,5-triazine-2-amine derivatives and evaluate their antitumor activities, according to the skeleton transition of the lead compound IMC-038525. **Methods** 2,4-Dichloro-1,3,5-triazine was used as starting materials to synthesize a series of 4-phenyl-1,3,5-triazine-2-amine derivatives through amination, Suzuki couple reaction, and reductive amination. The inhibitory activity of tumor cells was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. **Results** Thirteen target compounds were synthesized in the article, and their chemical structures were confirmed by MS and $^1\text{H-NMR}$. Antitumor activities test showed some target compounds had antitumor activities. **Conclusion** A series of 4-phenyl-1,3,5-triazine-2-amine derivatives are synthesized with some antitumor activities, which offer new mentality to design and synthesize novel antitumor compounds in the future.

Key words: IMC-038525; antitumor agent; vascular targeting drug

恶性肿瘤是常见的严重危害人类健康, 威胁人类生命的疾病。据世界卫生组织和抗癌联盟的数据统计, 近年来, 全球新发生的癌症患者超过 1 400 万人, 超过 820 万人死于癌症^[1]。因此, 对于肿瘤的预防和治疗是世界各国不容忽视的社会问题, 研究、开发有效的抗肿瘤药物一直是各国医学界重大的研究课题。研究表明肿瘤的生长和转移主要依赖于血管。如果没有血管系统提供氧气和营养物质, 实体瘤的增长不会超过 $1\sim 2\text{ mm}^{3[2-3]}$ 。与正常组织

血管相比, 肿瘤血管在组织结构和功能上存在很大差异, 对肿瘤血管靶向药物更加敏感。因此, 肿瘤血管成为抗肿瘤药物设计的重要靶标。

Chekler 等^[4]发现的 IMC-038525 是噻二唑类化合物, 化学结构见图 1, 具有肿瘤新生血管抑制和血管阻断双重作用, 是一个具有双重阻断作用的肿瘤血管靶向药物。研究表明联合使用肿瘤新生血管抑制剂和血管阻断剂能有效地提高肿瘤治疗效果^[5]。因此, 具有肿瘤新生血管抑制和血管阻断双重作用的

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2017J01141); 福建省省属公益类科研院所基本科研专项 (2015R1031-1), 福建省医学创新项目 (2017-CX-12)

作者简介: 李 唯, 硕士, 研究方向为抗肿瘤小分子化合物的合成。E-mail: 258291562@qq.com

*通信作者 林 绥, 研究员, 研究方向为中药与天然药物。E-mail: linsui_sy@ sina.com

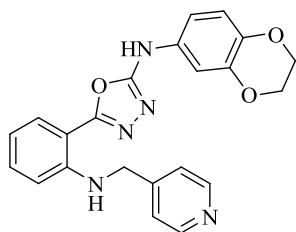


图 1 IMC-038525 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of IMC-038525

药物, 在临床上会在降低用药剂量的同时, 提高肿瘤治疗效果。本文以 IMC-038525 为先导化合物, 通过骨架跃迁原理, 用 1,3,5-三嗪环置换 IMC-038525 中的噻二唑环, 用不同取代的芳杂环取代 IMC-038525 中的 4-吡啶环, 设计合成了一类 4-苯基-1,3,5-三嗪-2-胺类化合物, 并测试了其对 A549、MDA-MB-231 和 HCT-116 肿瘤细胞的体外抗增殖活性。

1 仪器与试剂

79-1 型磁力搅拌器 (上海江星仪器有限公司); RE-2000B 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); SHZ-III 型循环水真空泵 (上海亚荣生化仪器厂); AL204 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司); AVANCE III400 型核磁共振仪 (瑞士

Bruker 公司); Impact II 型超高分辨飞行时间质谱仪 (瑞士 Bruker 公司)。

2,4-二氯-1,3,5-三嗪 (质量分数 98%, 上海阿拉丁科技公司); 2,3-二氢苯并二氧六环-6-胺 (质量分数 98%, 梯希爱化成工业发展有限公司)。人肺癌细胞 A549、人结肠癌细胞 HCT116 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 从中科院上海细胞库购买。二甲基亚砜 (DMSO, Merck 公司); 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司); DMEM 培养基 (Sigma 公司)。阳性对照品 IMC-038525 由本实验室自行合成^[6]。

2 合成部分

起始原料 2,4-二氯-1,3,5-三嗪和 2,3-二氢苯并二氧六环-6-胺通过氨化反应得到 4-氯-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噻英-6-基)-1,3,5-三嗪-2-胺 (**1**), 化合物 **1** 与 2-氨基苯硼酸在 Pd(PPh)₃Cl₂ 的催化下通过 Suzuki 偶联生成 4-(2-氨基苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噻英-6-基)-1,3,5-三嗪-2-胺 (**2**)。化合物 **2** 与 4-叔丁基苯甲醛 (**3a**) 在三乙酰基硼氢化钠的作用下还原胺化合成(2-((4-(叔丁基)苄基)氨基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噻英-6-基)-1,3,5-三嗪-2-胺 (**4a**), 以化合物 **4a** 的合成为例来介绍该类化合物的合成, 合成路线见图 2, **4b**~**4m** 的制备方法同化合物 **4a** 的制备方法。

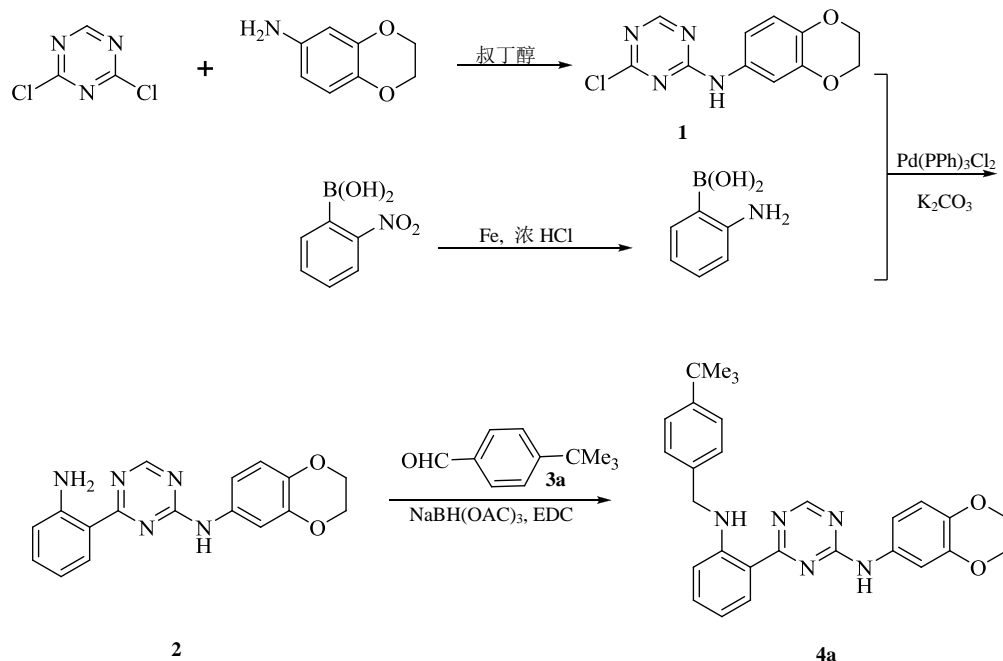


图 2 目标化合物 4a 的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of target compound 4a

2.1 化合物 1 的合成

按照文献报道的方法^[7], 将 2,4-二氯-1,3,5-三嗪 (0.407 g, 2.72 mmol) 和 2,3-二氢苯并二氧六环-6-胺 (0.412 g, 2.73 mmol) 投入到 5 mL 叔丁醇中。室温搅拌 20 min, 反应液投入到 50 mL 饱和 NaHCO₃ 水溶液中。水层用醋酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 蒸干, 硅胶柱色谱分离得化合物 1。

2.2 2-氨基苯硼酸的合成

向 250 mL 反应瓶中加入邻硝基苯硼酸 (8 g, 47.9 mmol)、乙醇 (40 mL) 和水 (60 mL), 于 50 °C 油浴下保温。氮气保护下, 加入铁粉 (16 g) 和浓盐酸 (0.5 mL), 保温反应 3 h。反应结束后, 向反应液中加入乙醇 (80 mL), 趁热用硅藻土滤过, 得浅褐色清液。减压浓缩后为褐色固体, 用 50% 乙醇重结晶, 滤过后干燥, 得浅灰色化合物 5.5 g, 收率 83%。

2.3 化合物 2 的合成

2-氨基苯硼酸 (0.57 g, 4.10 mmol)、化合物 1 (0.79 g, 3.0 mmol), K₂CO₃ (2.04 g, 14.7 mmol) 和 Pd(PPh)₃Cl₂ (0.104 g, 5 mmol) 加入到 1,4-二氧六环 (15 mL) 和水 (7.5 mL) 的混合溶液中, 氮气保护下, 回流反应 0.5 h。在反应液中加入 15 mL 的水, 用醋酸乙酯萃取 3 次。萃取液用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 滤过, 减压除去有机溶剂得粗品, 用石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 洗脱, 柱色谱分离得化合物 2, 黄色固体 0.48 g, 收率 49%, mp 188~192 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.01 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.48~7.12 (m, 4H), 7.11~6.98 (m, 3H), 6.81 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.74 (d, *J*=6.5 Hz, 1H), 6.52 (td, *J*=7.6, 7.1, 1.1 Hz, 2H), 4.20 (d, *J*=3.9 Hz, 4H)。HR-ESI-MS *m/z*: 344.111 8 [M+Na]⁺。

2.4 化合物 4a 的合成

取用 25 mL 的圆底烧瓶, 加入化合物 2 (200 mg, 0.62 mmol) 和对叔丁基苯甲醛 (3a, 1.10 mmol)。加入 6 mL 1,2 二氯乙烷, 使化合物 2 悬浮在溶剂中。往反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠 (800 mg, 3.77 mmol), 常温搅拌, 反应过夜, TLC 监测反应进程。反应结束后, 加入 40 mL 二氯甲烷, 有机相用饱和 NaHCO₃ 水溶液洗涤两次。水相用二氯甲烷萃取。合并有机相, 有机相用饱和食盐水洗, 随后有机层用无水硫酸钠干燥, 滤过, 蒸干。所得粗品, 经 200~300 目硅胶柱洗脱得黄色固体 67 mg, 收率

29%, mp 196~199 °C。

目标化合物 4a~4m 的母核结构见图 2, 波谱数据见表 1。

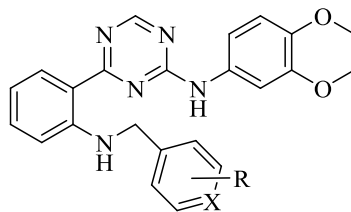


图 2 目标化合物 4a~4m 的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of target compounds 4a — 4m

3 抗肿瘤活性实验

采用 MTT 法, 以 A549、HCT116 和 MDA-MB-231 为测试瘤株, 并用 IMC-038525 为阳性对照, 对所合成的化合物进行抗肿瘤细胞活性评价。目标化合物 4a~4m 用 DMSO 溶解后, 加入磷酸缓冲液配成 1 000 μmol/L 的溶液, 然后用含 DMSO 的磷酸缓冲液稀释为 10 μg/mL, 另设空白和阴性对照。96 孔板每孔加入浓度为 (4~10) × 10⁴ 个/mL 细胞悬液 100 μL, 置 37 °C 5% CO₂ 培养箱内。24 h 后, 加入样品液, 10 μL/孔, 设双复孔, 37 °C 5% CO₂ 作用 72 h。每孔加入 5 mg/L 的 MTT 溶液 20 μL, 作用 4 h 后加入溶解液, 100 μL/孔, 置培养箱内, 溶解后于 Bio-Tek 酶标仪分析 490 nm 处吸光度 (A) 值, 并计算细胞抑制率。样品液的浓度配制了 100、10、1、0.1、0.01、0.001 μg/mL, 实验结果显示 100、10 μg/mL 的抑制率没区别, 0.1、0.01、0.001 μg/mL 的抑制率不高, 所以最后报道样品浓度在 10 μg/mL 时的实验数据。

$$\text{抑制率} = \frac{(A_{\text{目标化合物}} - A_{\text{阴性对照}})}{(A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}})}$$

体外抑瘤活性结果显示, 该系列中的部分化合物在 10 μg/mL 的药物溶度下显示出一定的抗肿瘤活性。部分化合物对 A549 细胞的增殖抑制活性相对较好, 化合物 4c、4e、4f、4h 和 4j 对 A549 细胞的抑制率均大于 40%。其中化合物 4c 对 A549 细胞抑制率最强达到 49.35%。见表 2。

4 讨论

本研究以 2,4-二氯-1,3,5-三嗪和 2,3-二氢苯并二氧六环-6-胺为起始原料, 通过一系列化学合成得到了一系列 4-苯基-1,3,5-三嗪-2-胺类化合物, 经 MS 和 ¹H-NMR 确证了结构, 为首次报道的新结构化合物。作为中间体的 2-氨基苯硼酸如果采用文献

表1 目标化合物的结构数据

Table 1 Structure data of target compounds

编号	X	R	HRMS m/z	$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ :
4a	C	4-CMe ₃	490.221 6	10.03 (s, 1H), 9.56 (d, $J=65.7$ Hz, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.37 (d, $J=14.7$ Hz, 1H), 7.44~6.89 (m, 7H), 6.80 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 6.57 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J=80.5$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J=49.4$ Hz, 4H), 1.21 (s, 9H)
4b	C	4-H	434.158 6	10.04 (s, 1H), 9.59 (d, $J=66.3$ Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.38 (d, $J=15.9$ Hz, 1H), 7.43~7.10 (m, 7H), 7.03 (d, $J=17.7$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.63~6.25 (m, 2H), 4.47 (d, $J=82.5$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J=48.5$ Hz, 4H)
4c	C	4-Cl	468.119 8	10.04 (s, 1H), 9.59 (d, $J=74.7$ Hz, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.38 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 7.40~7.27 (m, 4H), 7.26~7.17 (m, 2H), 7.14~6.92 (m, 2H), 6.87~6.69 (m, 1H), 6.58 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J=79.1$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J=46.5$ Hz, 4H)
4d	C	4-CF ₃	502.146 1	10.05 (s, 1H), 9.65 (d, $J=72.2$ Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.40 (d, $J=19.4$ Hz, 1H), 7.64, 7.57~7.36 (m, 2H), 7.36~6.95 (m, 2H), 6.88~6.73 (m, 3H), 6.59 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J=77.8$ Hz, 2H), 4.13 (d, $J=62.2$ Hz, 4H)
4e	C	4-CH ₃	448.174 5	10.04 (s, 1H), 9.55 (d, $J=67.7$ Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.37 (d, $J=18.3$ Hz, 1H), 7.43~6.95 (m, 7H), 6.80 (s, 1H), 6.59~6.52 (m, 2H), 4.42 (d, $J=80.3$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J=42.5$ Hz, 4H), 2.21 (s, 3H)
4f	C	2-F	452.149 4	10.04 (s, 1H), 9.54 (d, $J=66.3$ Hz, 1H), 8.69 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 8.40 (d, $J=16.1$ Hz, 1H), 7.37~6.93 (m, 7H), 6.88~6.73 (m, 1H), 6.65~6.53 (m, 2H), 4.53 (d, $J=72.6$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J=40.4$ Hz, 4H)
4g	C	2-Cl	468.119 7	10.04 (s, 1H), 9.63 (d, $J=70.4$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.41 (dd, $J=24.5, 7.3$ Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.37~7.08 (m, 5H), 6.99 (dd, $J=40.7, 8.0$ Hz, 1H), 6.78 (dd, $J=29.7, 6.4$ Hz, 1H), 6.61 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J=70.8$ Hz, 2H), 4.13 (d, $J=53.7$ Hz, 4H)
4h	C	4-F	452.149 1	10.04 (s, 1H), 9.57 (d, $J=73.1$ Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.38 (d, $J=16.5$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J=17.7$ Hz, 2H), 7.20 (t, $J=7.7$ Hz, 2H), 7.14~6.95 (m, 4H), 6.79 (s, 1H), 6.58 (t, $J=8.2$ Hz, 2H), 4.46 (d, $J=80.5$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J=44.2$ Hz, 4H)
4i	C	2-Br	490.087 3	10.04 (s, 1H), 9.65 (d, $J=70.3$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 8.41 (dd, $J=26.6, 6.7$ Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.37~7.09 (m, 6H), 7.08~6.91 (m, 1H), 6.86~6.71 (m, 1H), 6.61 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J=75.8$ Hz, 2H), 4.13 (d, $J=53.9$ Hz, 4H)
4j	N	4-H	435.153 9	10.05 (s, 1H), 9.61 (d, $J=74.8$ Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.53~8.29 (m, 3H), 7.37~7.09 (m, 4H), 7.08~6.68 (m, 2H), 6.59 (t, $J=8$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 4.42 (d, $J=80$ Hz, 2H), 4.21 (d, $J=60$ Hz, 4H)
4k	C	4-OH	450.153 5	10.02 (s, 1H), 9.49 (d, $J=63.1$ Hz, 1H), 9.23 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.37 (d, $J=11.9$ Hz, 1H), 7.35~6.94 (m, 6H), 6.81 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 6.71~6.52 (m, 5H), 4.52~4.27 (m, 2H), 4.26~3.99 (m, 4H)
4l	C	4-CH ₃	448.174 6	10.03 (s, 1H), 9.51 (d, $J=60.5$ Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.40 (d, $J=18.4$ Hz, 1H), 7.39~6.92 (m, 7H), 6.74 (s, 1H), 6.63~6.48 (m, 2H), 4.34 (d, $J=68$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J=46.0$ Hz, 4H), 2.29 (d, $J=32.0$ Hz, 3H)
4m	C	2,4-2Cl	502.080 8	10.04 (s, 1H), 9.63 (d, $J=72.4$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.42 (dd, $J=22.2, 7.0$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J=14.5$ Hz, 1H), 7.40~7.21 (m, 3H), 7.19~7.08 (m, 1H), 7.07~6.91 (m, 1H), 6.78 (dd, $J=31.1, 7.1$ Hz, 1H), 6.63 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J=6$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J=75.4$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J=48.1$ Hz, 4H)

表2 目标化合物的抗肿瘤活性

Table 2 Anti-tumor activities of target compounds

目标化合物	抑制率/%		
	A549 细胞	MDA-MB-231 细胞	HCT-116 细胞
4a	9.55	29.81	17.80
4b	18.62	2.64	33.42
4c	49.35	21.42	22.60
4d	22.67	18.97	26.06
4e	40.13	20.54	22.10
4f	42.72	20.85	2.61
4g	12.20	12.57	2.91
4h	43.83	25.69	13.29
4i	11.17	10.25	2.27
4j	42.89	35.83	24.92
4k	35.42	28.87	13.30
4l	18.61	18.07	3.14
4m	20.84	9.05	12.28
IMC-038525	78.92	81.15	84.75

报道的方法^[8]合成, 需要用到高压反应釜和钯碳, 会增加实验成本。因此本实验室改用还原铁粉在盐酸作用下进行还原反应, 在温和的条件下得到相应产物, 控制了实验成本, 并且得到不错的收率。在合成目标化合物时, 最初考虑让化合物 **2** 先形成希夫氏碱, 再用硼氢化钠还原得到目标化合物, 但是合成过程中未能得到相应的希夫氏碱。因此考虑使用还原胺化一步反应得到目标化合物。本文共合成了 13 个系列化合物, 检测了目标化合物的抗肿瘤活性, 发现部分化合物的增殖抑制率大于 40%, 说明这类化合物具有一定的抑瘤活性。

综上所述, 本研究对新化合物的合成以及抗肿瘤

细胞活性研究为更好的开发多靶点抗肿瘤药打下一定基础, 也为具有双重阻断作用的肿瘤血管靶向药物的开发提供新的骨架类型。

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al.* Global Cancer Statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] He X, Li S, Huang H, *et al.* A pharmacokinetic and safety study of single dose intravenous combretastatin A4 phosphate in Chinese patients with refractory solid tumours [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2011, 71(6): 860-870.
- [3] Tozer G M, Kanthou C, Baguley B C. Disrupting tumour blood vessels [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(6): 423-435.
- [4] Chekler E L P, Kiselyov A S, Ouyang X, *et al.* Discovery of dual VEGFR-2 and tubulin inhibitors with *in vivo* efficacy [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2010, 1(9): 488-492.
- [5] Hu C B, Chen C P, Yeh T K, *et al.* BPR0C261 is a novel orally active antitumor agent with antimetabolic and antiangiogenic activities [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(1): 182-191.
- [6] Kiselyov A S, Semenova M N, Chernyshova N B, *et al.* Novel derivatives of 1,3,4-oxadiazoles are potent mitostatic agents featuring strong microtubule depolymerizing activity in the sea urchin embryo and cell culture assays [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45(5): 1683-1697.
- [7] Norman M H, Zhu J, Fotsch C, *et al.* Novel vanilloid receptor-1 antagonists: 1. Conformationally restricted analogues of trans-cinnamides [J]. *J Med Chem*, 2007, 50(15): 3497-3514.
- [8] Groziak M P, Ganguly A D, Robinson P D. Boron heterocycles bearing a peripheral resemblance to naturally-occurring purines: design, syntheses, structures, and properties [J]. *J Am Chem Soc*, 1994, 116(17): 7597-7605.