

含缩氨基脲结构的4-苯氧基喹啉类c-Met激酶抑制剂的合成与抗肿瘤活性

吴霜¹, 林思雨¹, 李楠¹, 林艺涵¹, 丁实^{1,2,3},
陈烨^{1,2,3}, 刘举^{1,2,3}, 沈继伟^{1,2,3}

(1. 辽宁大学药学院, 2. 辽宁省医药原料药制备工程技术研究中心,
3. 沈阳市小分子靶向药物研发重点实验室, 沈阳 110036)

摘要 基于4-苯氧基喹啉类Type II型小分子c-Met激酶抑制剂的结构特点, 设计并合成了13个含缩氨基脲结构的4-苯氧基喹啉类化合物. 采用迁移率改变法(MTS)测试了目标化合物对c-Met激酶的抑制活性. 采用噻唑蓝(MTT)法测试了目标化合物对A549, PC-3, AGS和MKN45细胞的体外抗增殖活性. 体外抗肿瘤活性实验结果表明, 大部分化合物对c-Met激酶和4种肿瘤细胞株均具有较好的抑制活性. 其中化合物6f和6k具有优秀的抑制c-Met激酶活性[c-Met的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为14.50和15.68 nmol/L]. 化合物6f对A549, PC-3, AGS和MKN45细胞的IC₅₀值分别为0.93, 7.81, 12.88和2.58 μmol/L; 化合物6k对A549, PC-3, AGS和MKN45细胞的IC₅₀值分别为0.67, 6.60, 3.04和0.88 μmol/L. 抗肿瘤作用机制研究表明, 化合物6k可诱导MKN45和A549细胞发生细胞凋亡, 并能够抑制2种肿瘤细胞的迁移能力.

关键词 药物分子设计; c-Met抑制剂; 4-苯氧基喹啉; 缩氨基脲; 抗肿瘤活性

中图分类号 O626.3; R914.5 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240439

Synthesis and Anticancer Activity of 4-Phenoxyquinoline Derivatives Bearing Semicarbazone Moiety as c-Met Inhibitors

WU Shuang¹, LIN Siyu¹, LI Nan¹, LIN Yihan¹, DING Shi^{1,2,3},
CHEN Ye^{1,2,3}, LIU Ju^{1,2,3*}, SHEN Jiwei^{1,2,3*}

(1. College of Pharmacy, 2. API Engineering Technology Research Center of Liaoning Province,
3. Shenyang Key Laboratory of Small Molecule Targeted Drug Research and Development,
Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract Thirteen novel 4-phenoxyquinoline derivatives bearing semicarbazone moiety were successfully designed and synthesized based on the structural characteristics of 4-phenoxyquinoline small molecule type II c-Met kinase inhibitors. The *in vitro* inhibitory activities of all the target compounds against c-Met kinase were evaluated using mobility shift assay. The *in vitro* antiproliferative activities of the target compounds against A549, PC-3, AGS and MKN45 cells were evaluated using MTT-based assay. Most of the target compounds showed excellent inhibitory activities against c-Met kinase and all the tested cancer cell lines. Among them, compounds 6f (c-Met:

收稿日期: 2024-09-23. 网络首发日期: 2024-12-22.

联系人简介: 刘举, 男, 博士, 研究员, 主要从事抗肿瘤新药创新研发方面的研究. E-mail: liuju1216@126.com

沈继伟, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事药物活性分子作用机制方面的研究. E-mail: shenjiwei1213@163.com

基金项目: 沈阳市自然科学基金重点实验室专项(批准号: 23-503-6-12)、辽宁省属本科高校基本科研业务费专项(批准号: LJKLJ202419)和辽宁省教育厅基本科研项目(批准号: LJKFZ20220177)资助.

Supported by the Shenyang Natural Science Foundation of Key Laboratory, China(No. 23-503-6-12), the Fundamental Research Funds for Public Universities in Liaoning Province, China(No. LJKLJ202419) and the General Project of Education Department of Liaoning Province, China (No. LJKFZ20220177).

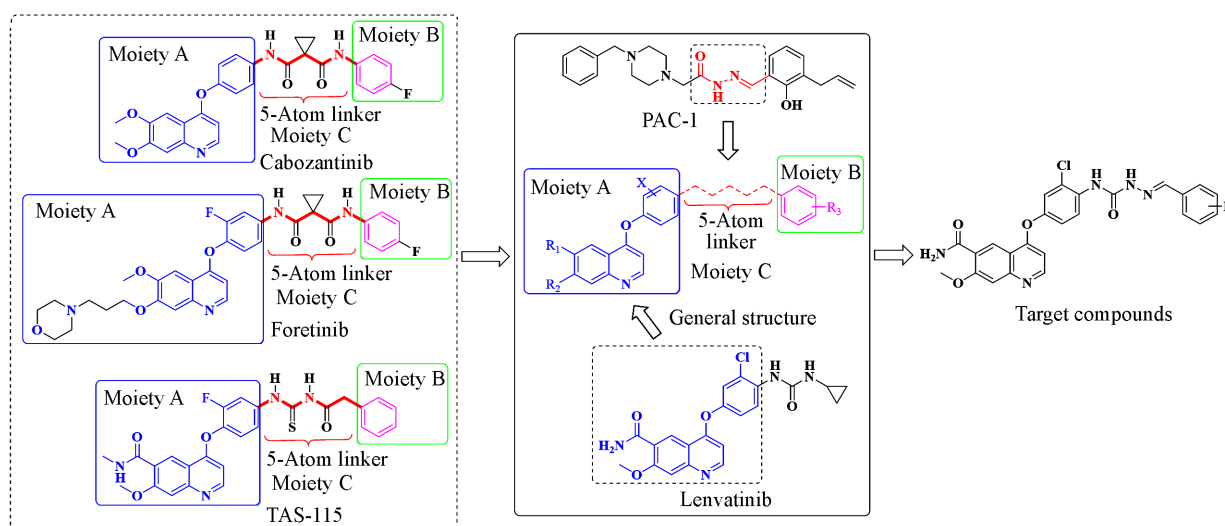
IC_{50} =14.50 nmol/L) and **6k** (c-Met: IC_{50} =15.68 nmol/L) exhibited excellent inhibition activity of against c-Met kinase. The IC_{50} values of **6f** for A549, PC-3, AGS and MKN-45 cells were 0.93, 7.81, 12.88, and 2.58 μ mol/L, respectively. The IC_{50} values of **6k** for A549, PC-3, AGS and MKN45 cells were 0.67, 6.60, 3.04, and 0.88 μ mol/L, respectively. Further studies on the anti-tumor mechanism indicated that compound **6k** induced MKN45 and A549 cells apoptosis, and inhibited the migration ability of MKN45 and A549 cells.

Keywords Drug molecular design; c-Met inhibitor; 4-Phenoxyquinoline; Semicarbazone; Anticancer activity

癌症又称为恶性肿瘤,是严重危害人类健康的常见病和多发病,所以抗肿瘤药物的研究具有重大意义^[1,2]. 细胞间质上皮转换因子(Cellular mesenchymal epithelial transition factor, c-Met)是受体酪氨酸激酶(RTK)家族 Ron 亚族中的一个原型成员,是唯一一个已知的肝细胞生长因子(HGF)的高亲和力受体^[3,4]. 已有研究表明, HGF/c-Met 活性与肿瘤的发生、发展和肿瘤细胞的分裂、血管生成、侵袭、转移及耐药性等密切相关,并在多种肿瘤组织中呈现异常的高表达、突变及活性改变,包括脑癌、结直肠癌、胃癌、肺癌、胃癌、乳腺癌和头颈癌^[5]. 同时, c-Met 编码基因的异常扩增、c-Met 或 HGF 的过表达、c-Met 编码基因的突变都与肿瘤患者的不良预后有关^[6]. 通过小分子抑制剂阻断 c-Met 激酶活性已被确定为治疗癌症的一种有前景的方法. 因此,开发新型、高效的小分子 c-Met 抑制剂是目前靶向抗肿瘤药物研究的一个重要方向^[7,8].

根据化合物与 c-Met 激酶结合方式的不同,可将小分子 c-Met 激酶抑制剂分为 Type I 型和 Type II 型两类,二者均是对 c-Met 激酶催化结构域进行竞争性结合而产生抑制作用^[9,10]. Type I 型抑制剂主要竞争性抑制激酶的铰链区,由于铰链区域的结构较为固定,因此该类抑制剂的可改动空间较小. 有研究表明 c-Met 激酶活性位点附近的突变可能会导致对 Type I 型 c-Met 激酶抑制剂产生耐药性^[11,12]. 相比之下, Type II 型 c-Met 激酶抑制剂具有结构类型丰富且规律性强和不易产生耐药性等特点. 4-苯氧基喹啉类 Type II 型小分子 c-Met 激酶抑制剂是目前该领域的研究热点,代表性药物有卡博替尼(Cabozantinib)、Foretinib 和 TAS-115 等^[13-15]. 通过对文献报道的 4-苯氧基喹啉类 Type II 型小分子 c-Met 激酶抑制剂进行分析发现,其在结构上可以分为 3 个部分: 4-苯氧基喹啉母核(Moiety A, 喹啉部分通常为 6,7-二取代)、疏水片段(Moiety B, 通常为苯环或取代的苯环等)和连接桥 Linker 部分(Moiety C 部分). 连接桥 Linker 部分通常可以是柔性的链状结构或刚性的环状结构,在结构上使 Moiety A 和 Moiety B 两部分之间刚好有含有 5 个原子(5-Atom linker),即两部分之间为 6 根化学键的距离,且通常至少含有一个酰胺键,以提供氢键的供体和受体^[16,17]. 4-苯氧基喹啉类 Type II 型小分子 c-Met 激酶抑制剂的结构通式(General structure)如 Scheme 1 所示.

酰胺 $[R_1C(O)NHN=CR_2R_3]$ 结构中含有多个氢键的受体和供体,该结构广泛用于新化合物的设



Scheme 1 Design strategy and structures of the target compounds

计,尤其是抗肿瘤化合物的设计中^[18,19].乐伐替尼(Lenvatinib)是卫材开发的口服多靶点激酶抑制剂.已被美国FDA批准作为一线治疗药物用于治疗甲状腺癌(THCA)、肾细胞癌(RCC)和晚期肝细胞癌(HCC)^[20-22].本研究以4-苯氧基喹啉类Type II型小分子c-Met激酶抑制剂的结构通式为基础,在Moiety A部分引入乐伐替尼的4-(3-苯氧基)-7-甲氧基-6-氨基甲酰基喹啉,形成新的4-苯氧基喹啉母核,Moiety B部分保留取代苯基结构,并进行不同基团的取代,同时将酰胺基团引入到连接桥Linker部分形成缩氨基脲片段,探索基团变化对抗肿瘤活性的影响,以期通过在Moiety A和Moiety B两部分增加氢键受体和供体来构建一系列含缩氨基脲结构的4-苯氧基喹啉类化合物.采用迁移率改变法(MTS)测试了目标化合物对c-Met激酶的抑制活性.采用噻唑蓝(MTT)法测试了目标化合物对人肺癌细胞株A549、人前列腺癌细胞株PC-3、人胃癌细胞株AGS和MKN-45的体外抗增殖活性.采用AO/EB双染色法和Hoechst 33342染色法考察了化合物6k诱导MKN45和A549细胞凋亡的情况.通过Transwell实验考察了化合物6k对MKN45和A549细胞迁移能力的影响.期望通过对激酶水平、细胞水平和机制方面的研究来发现新型c-Met激酶抑制剂类抗肿瘤化合物.

1 实验部分

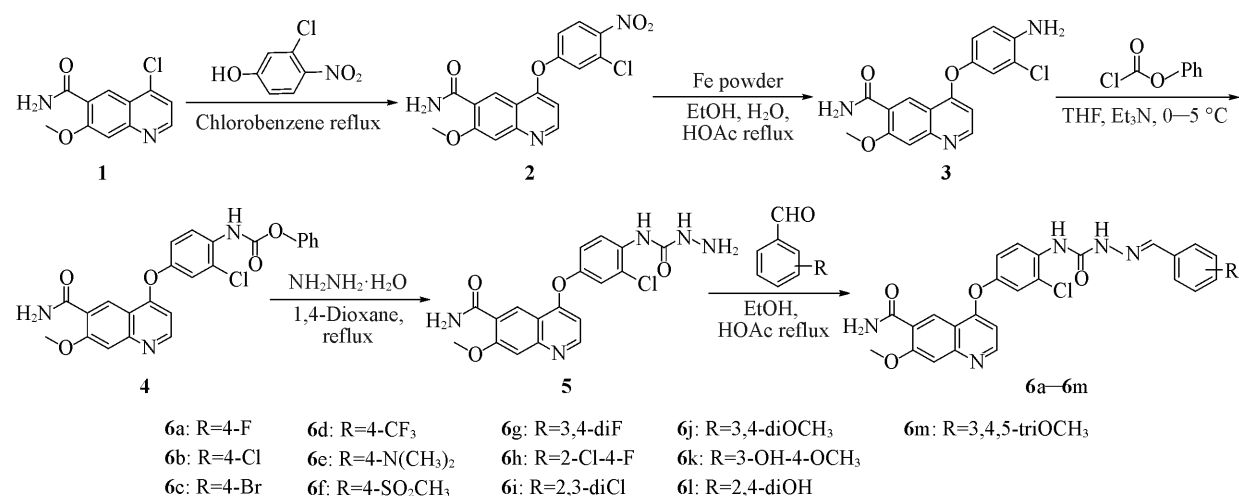
1.1 试剂与仪器

4-氯-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺、3-氯-4-硝基苯酚、4-氯甲酸苯酯、4-氟苯甲醛、4-氯苯甲醛、4-溴苯甲醛、4-甲磺酰基苯甲醛、4-三氟甲基苯甲醛、4-二甲氨基苯甲醛、3,4-二氟苯甲醛、2-氯-4-氟苯甲醛、2,3-二氯苯甲醛、3,4-二甲氧基苯甲醛、2,4-二羟基苯甲醛、3-羟基-4-甲氧基苯甲醛和3,4,5-三甲氧基苯甲醛,分析纯,上海毕得医药有限公司;GF254薄层色谱硅胶板和柱层析硅胶,青岛海洋化工有限公司.其余所用试剂均为市售分析纯,若无特殊说明均未进行处理.

Bruker-600型核磁共振波谱仪(NMR),德国Bruker公司;Q-Tof Micro型高分辨四级杆-飞行时间串联质谱仪(MS),美国Waters-Micromass公司;WRS-3A型数字熔点仪,上海仪电物理光学仪器有限公司;HERAcell 150i型二氧化碳培养箱,德国Thermo公司;Sunrise型全波长酶标仪,帝肯(上海)有限公司;CKX41型荧光显微镜,日本Olympus公司.

1.2 实验过程

目标化合物6a-6m的合成路线如Scheme 2所示.以4-氯-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(1)为原料,在氯苯中回流,与3-氯-4-硝基苯酚发生取代反应得到4-(3-氯-4-硝基苯氧基)-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(2);化合物2在铁粉为还原剂条件下发生还原反应生成4-(4-氨基-3-氯苯氧基)-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(3);化合物3与4-氯甲酸苯酯发生酰化反应得到4-[(6-氨基甲酰基-7-甲氧基喹啉-4-基)氧基]-2-氯苯基}氨基甲酸苯酯(4);将化合物4与水合肼反应制备了重要中间体4-[3-氯-4-(肼基甲酰胺基)苯



Scheme 2 Synthetic routes of target compounds 6a-6m

氧基]-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(5);最后,将重要中间体5分别与不同的取代苯甲醛在冰乙酸催化下在乙醇中经缩合反应制备了13个4-{3-氯-4-[2-(取代亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(6a~6m).利用 ^1H NMR, ^{13}C NMR和MS谱对目标化合物6a~6m的结构进行了表征(见本文支持信息).

1.2.1 化合物2的合成^[23,24] 将4-氯-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(20 g, 84.51 mmol)和3-氯-4-硝基苯酚(18.2 g, 126.77 mmol)加入100 mL氯苯中,回流反应30 h.待反应结束后,冷却至室温,减压浓缩,残余物用适量二氯甲烷溶解,再用 K_2CO_3 溶液和饱和食盐水分别洗涤3次,分出有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤,蒸干溶剂得棕色固体,柱层析得淡黄色固体19.90 g,收率63.0%.ESI-MS, m/z (计算值): 374.10(374.05)[$\text{M}+\text{H}$]⁺.

1.2.2 化合物3的合成^[23,24] 将化合物2(19.00 g, 50.84 mmol)、铁粉(17.03 g, 305.02 mmol)和醋酸(45.80 g, 762.67 mmol)加入200 mL乙醇中,再加入20 mL水,加热回流12 h.待反应完毕后趁热过滤,滤液减压蒸发除去溶剂得粗产物,粗产物经柱层析得淡黄色固体9.80 g,收率56.1%.ESI-MS, m/z (计算值): 344.10(344.08)[$\text{M}+\text{H}$]⁺.

1.2.3 化合物4的合成^[24] 将化合物3(8.00 g, 23.27 mmol)和三乙胺(7.10 g, 70.16 mmol)加入60 mL干燥四氢呋喃(THF)中,在0~5 °C下滴加氯甲酸苯酯(4.40 g, 28.10 mmol)的20 mL干燥THF溶液,添加完毕后于室温下反应3 h.待反应完毕后减压蒸出溶剂,残余物溶于60 mL二氯甲烷中,用适量水洗涤3次,分出有机相,用无水硫酸钠干燥后过滤,减压蒸干溶剂得淡黄色固体7.60 g,产率70.4%.该产物未经分离,直接用于下一步反应.

1.2.4 化合物5的合成 将化合物4(7.5 g, 16.17 mmol)溶解于50 mL 1,4-二氧六环中,慢慢加入20 mL 80%水合胍,回流反应约12 h.反应完毕后冷却至10 °C以下,过滤出沉淀,用水洗涤后,真空干燥,得淡黄色固体4.60 g,收率70.8%. ^1H NMR(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 9.19(s, 1H), 8.82~8.61(m, 2H), 8.43(s, 1H), 7.97(s, 1H), 7.86(s, 1H), 7.74(s, 1H), 7.62~7.45(m, 2H), 7.28(dd, $J=9.0, 2.7$ Hz, 1H), 6.55(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 4.74(s, 2H), 4.04(s, 3H); ESI-MS, m/z (计算值): 402.10(402.10)[$\text{M}+\text{H}$]⁺.

1.2.5 化合物6a~6m的合成 将化合物5(0.20 g, 0.50 mmol)和取代苯甲醛(0.60 mmol)加入5 mL乙醇中,再加入适量冰醋酸,回流反应8 h.待反应完毕后,将反应液冷却至室温,析出大量固体,过滤出沉淀,滤饼用少量乙醇洗涤,干燥后得到白色固体产物,即为6a~6m.

4-{3-氯-4-[2-(4-氟亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(6a): 白色固体,收率69.3%, m. p.: 265.4~267.1 °C. ^1H NMR(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 11.18(s, 1H), 8.98(s, 1H), 8.70(s, 2H), 8.26(d, $J=8.6$ Hz, 1H), 8.02(s, 1H), 7.90(s, 1H), 7.86~7.72(m, 3H), 7.64(s, 1H), 7.54(s, 1H), 7.42~7.25(m, 3H), 6.58(s, 1H), 4.05(s, 3H); ^{13}C NMR(150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 166.16, 163.27(d, $J=247.4$ Hz), 161.78, 158.44, 153.75, 152.85, 152.03, 149.30, 140.78, 133.59, 131.07, 129.22(d, $J=8.4$ Hz), 125.44, 125.11, 124.98, 123.50, 122.44, 121.01, 116.33(d, $J=21.9$ Hz), 114.79, 108.28, 103.54, 56.56; ESI-MS, m/z (计算值): 508.10(508.12)[$\text{M}+\text{H}$]⁺.

4-{3-氯-4-[2-(4-氯亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(6b): 白色固体,收率75.4%, m. p.: 258.3~259.9 °C. ^1H NMR(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 11.15(s, 1H), 8.91(s, 1H), 8.63(d, $J=10.0$ Hz, 2H), 8.16(d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.94(s, 1H), 7.82(s, 1H), 7.71(s, 3H), 7.57(s, 1H), 7.47(s, 3H), 7.28(d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.51(s, 1H), 3.98(s, 3H); ^{13}C NMR(150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 166.16, 161.76, 158.45, 153.76, 152.83, 152.03, 149.45, 140.59, 134.52, 133.55, 133.42, 129.35, 128.73, 125.48, 125.30, 125.09, 123.83, 122.45, 120.99, 114.79, 108.29, 103.57, 56.57; ESI-MS, m/z (计算值): 524.10(524.09)[$\text{M}+\text{H}$]⁺.

4-{3-氯-4-[2-(4-溴亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(6c): 白色固体,收率79.8%, m. p.: 203.2~205.5 °C. ^1H NMR(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 11.22(s, 1H), 8.98(s, 1H), 8.69

(s, 2H), 8.23(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.99(s, 1H), 7.88(s, 1H), 7.82~7.60(m, 6H), 7.54(s, 1H), 7.35(d, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.58(s, 1H), 4.05(s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.16, 161.75, 158.46, 153.76, 152.81, 152.04, 149.47, 140.70, 133.77, 133.54, 132.25, 128.96, 125.49, 125.28, 125.10, 123.79, 123.31, 122.43, 120.97, 114.82, 108.30, 103.60, 56.57; ESI-MS, m/z (计算值): 568.10(568.04)[M+H] $^+$.

4-{3-氯-4-[2-(4-三氟甲基亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(6d): 白色固体, 收率78.4%, m. p.: 213.7~215.5 $^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6), δ : 11.35(s, 1H), 9.02(s, 1H), 8.70(d, $J=5.4$ Hz, 2H), 8.22(d, $J=8.6$ Hz, 1H), 8.09(s, 1H), 7.99(d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.89(s, 1H), 7.85~7.73(m, 3H), 7.65(s, 1H), 7.54(s, 1H), 7.36(d, $J=8.6$ Hz, 1H), 6.59(s, 1H), 4.05(s, 3H); ^{13}C NMR(150 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.15, 161.73, 158.46, 153.76, 152.79, 152.05, 149.60, 140.14, 138.46, 133.47, 129.81, 129.60, 127.65, 126.12, 125.47, 125.11, 124.03, 123.61, 122.44, 120.96, 114.82, 108.30, 103.60, 56.56; ESI-MS, m/z (计算值): 558.41(558.12)[M+H] $^+$.

4-{3-氯-4-[2-(4-二甲氨基亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(6e): 白色固体, 收率69.8%, m. p.: 247.7~249.5 $^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6), δ : 10.90(s, 1H), 8.99(s, 1H), 8.70(s, 2H), 8.39(d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.89(s, 2H), 7.79(s, 1H), 7.63(s, 1H), 7.60~7.46(m, 3H), 7.34(d, $J=8.7$ Hz, 1H), 6.77(d, $J=7.9$ Hz, 2H), 6.58(s, 1H), 4.05(s, 3H), 2.97(s, 6H); ^{13}C NMR(150 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.17, 161.87, 158.44, 153.76, 152.78, 152.02, 151.70, 148.65, 142.86, 133.84, 128.30, 125.44, 125.11, 123.46, 122.45, 121.99, 121.67, 121.14, 114.78, 112.30, 108.28, 103.49, 56.56; ESI-MS, m/z (计算值): 533.20(533.17)[M+H] $^+$.

4-{3-氯-4-[2-(4-甲磺酰基亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(6f): 白色固体, 收率75.2%, m. p.: 236.8~239.4 $^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6), δ : 11.37(s, 1H), 9.03(s, 1H), 8.84~8.58(m, 2H), 8.20(d, $J=8.9$ Hz, 1H), 8.10(s, 1H), 8.06~7.96(m, 4H), 7.87(s, 1H), 7.75(s, 1H), 7.64(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.54(s, 1H), 7.35(dd, $J=8.9, 2.4$ Hz, 1H), 6.59(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 4.05(s, 3H), 3.26(s, 3H); ^{13}C NMR(150 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.15, 161.71, 158.47, 153.75, 152.79, 152.07, 149.73, 141.44, 139.93, 139.32, 133.44, 127.91, 127.69, 125.75, 125.50, 125.12, 124.23, 122.41, 120.91, 114.86, 108.33, 103.67, 56.58, 43.82; ESI-MS, m/z (计算值): 558.10(558.11)[M+H] $^+$.

4-{3-氯-4-[2-(3,4-二氟亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(6g): 白色固体, 收率70.8%, m. p.: 215.2~217.4 $^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6), δ : 11.22(s, 1H), 9.01(s, 1H), 8.71(s, 1H), 8.68(s, 1H), 8.10(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.02~7.72(m, 4H), 7.70~7.46(m, 4H), 7.35(d, $J=8.6$ Hz, 1H), 6.57(s, 1H), 4.04(s, 3H); ^{13}C NMR(150 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.15, 161.70, 158.46, 153.77, 153.06, 152.05, 151.07, 149.98, 139.35, 133.54, 132.49(d, $J=8.9$ Hz), 125.51, 125.08, 124.50, 122.44, 120.87, 118.40(d, $J=17.5$ Hz), 115.40(d, $J=18.4$ Hz), 114.81, 108.30, 103.62, 56.57; ESI-MS, m/z (计算值): 526.10(526.11)[M+H] $^+$.

4-{3-氯-4-[2-(2-氯-4-氟亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(6h): 白色固体, 收率75.5%, m. p.: 271.7~273.9 $^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6), δ : 11.32(s, 1H), 8.98(s, 1H), 8.81~8.58(m, 2H), 8.34(s, 1H), 8.18(d, $J=6.6$ Hz, 2H), 7.88(s, 1H), 7.77(s, 1H), 7.63(s, 1H), 7.59~7.47(m, 2H), 7.44~7.27(m, 2H), 6.58(s, 1H), 4.05(s, 3H); ^{13}C NMR(150 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.15, 162.77(d, $J=251.0$ Hz), 161.72, 158.45, 153.77, 152.78, 152.04, 149.73, 136.82, 133.86(d, $J=10.7$ Hz), 133.46, 128.89(d, $J=9.2$ Hz), 128.55, 125.98, 125.47, 125.09, 124.54, 122.45, 120.94, 117.48(d, $J=25.3$ Hz), 115.88(d, $J=21.8$ Hz), 114.80, 108.29, 103.59, 56.57; ESI-MS, m/z (计算值): 542.00(542.08)[M+H] $^+$.

4-{3-氯-4-[2-(2,3-二氯亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(**6i**): 白色固体, 收率83.3%, m. p.: 254.1~255.4 °C. ¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆), δ: 11.40(s, 1H), 8.98(s, 1H), 8.83~8.62(m, 2H), 8.41(s, 1H), 8.18(d, J=8.8 Hz, 1H), 8.09(d, J=7.8 Hz, 1H), 7.86(s, 1H), 7.75(s, 1H), 7.69(d, J=7.7 Hz, 1H), 7.62(s, 1H), 7.54(s, 1H), 7.47(t, J=7.9 Hz, 1H), 7.35(d, J=7.8 Hz, 1H), 6.59(d, J=5.0 Hz, 1H), 4.05(s, 3H); ¹³C NMR(150 MHz, DMSO-d₆), δ: 166.14, 161.70, 158.47, 153.73, 152.68, 152.06, 149.81, 137.50, 134.17, 133.39, 132.76, 131.53, 130.94, 128.86, 125.92, 125.70, 125.50, 125.12, 124.47, 122.38, 120.88, 114.86, 108.31, 103.66, 56.58; ESI-MS, *m/z*(计算值): 558.10(558.05)[M+H]⁺.

4-{3-氯-4-[2-(3,4-二甲氧基亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(**6j**): 淡黄色固体, 收率79.9%, m. p.: 228.2~229.8 °C. ¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆), δ: 11.09(s, 1H), 9.05(s, 1H), 8.70(s, 2H), 8.34(d, J=8.7 Hz, 1H), 7.94(s, 1H), 7.89(s, 1H), 7.78(s, 1H), 7.64(s, 1H), 7.54(s, 1H), 7.42(s, 1H), 7.35(d, J=8.4 Hz, 1H), 7.20(d, J=7.5 Hz, 1H), 7.03(d, J=7.9 Hz, 1H), 6.57(s, 1H), 4.05(s, 3H), 3.82(s, 3H), 3.81(s, 3H); ¹³C NMR(150 MHz, DMSO-d₆), δ: 166.15, 161.82, 158.45, 153.75, 152.81, 152.04, 150.83, 149.43, 148.94, 141.79, 133.72, 127.15, 125.44, 125.12, 124.06, 122.49, 121.65, 121.15, 114.79, 111.86, 108.29, 108.05, 103.49, 56.56, 55.93, 55.59; ESI-MS, *m/z*(计算值): 550.20(550.15)[M+H]⁺.

4-{3-氯-4-[2-(3-羟基-4-甲氧基亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(**6k**): 淡黄色固体, 收率71.8%, m. p.: 231.3~233.6 °C. ¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆), δ: 11.00(s, 1H), 9.35(s, 1H), 8.97(s, 1H), 8.69(s, 2H), 8.38(d, J=7.7 Hz, 1H), 7.88(s, 2H), 7.77(s, 1H), 7.65(s, 1H), 7.54(s, 1H), 7.35(d, J=7.3 Hz, 1H), 7.24(s, 1H), 7.06(s, 1H), 6.99(s, 1H), 6.59(s, 1H), 4.05(s, 3H), 3.81(s, 3H); ¹³C NMR(150 MHz, DMSO-d₆), δ: 166.17, 161.85, 158.45, 153.77, 152.71, 152.02, 150.00, 148.78, 147.24, 142.38, 133.73, 127.16, 125.47, 125.09, 123.67, 122.45, 122.06, 121.11, 120.29, 114.79, 112.26, 108.29, 103.53, 56.57, 55.94; ESI-MS, *m/z*(计算值): 536.10(536.13)[M+H]⁺.

4-{3-氯-4-[2-(2,4-二羟基亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(**6l**): 白色固体, 收率81.0%, m. p.: 219.0~222.1 °C. ¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆), δ: 10.83(s, 1H), 9.97(s, 1H), 9.78(s, 1H), 8.89(s, 1H), 8.78~8.56(m, 2H), 8.34(d, J=9.0 Hz, 1H), 8.22(s, 1H), 7.87(s, 1H), 7.75(s, 1H), 7.67~7.45(m, 3H), 7.33(dd, J=9.0, 2.7 Hz, 1H), 6.58(d, J=5.2 Hz, 1H), 6.43~6.24(m, 2H), 4.05(s, 3H); ¹³C NMR(150 MHz, DMSO-d₆), δ: 166.17, 161.86, 160.69, 158.47, 158.22, 153.73, 152.71, 152.00, 148.80, 133.88, 125.50, 125.10, 123.79, 122.43, 122.39, 121.02, 114.83, 112.15, 108.32, 108.28, 103.56, 102.81, 56.57; ESI-MS, *m/z*(计算值): 522.10(522.12)[M+H]⁺.

4-{3-氯-4-[2-(3,4,5-三甲氧基亚苄基)胍-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺(**6m**): 白色固体, 收率83.2%, m. p.: 249.3~252.1 °C. ¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆), δ: 11.24(s, 1H), 9.07(s, 1H), 8.70(s, 2H), 8.33(d, J=8.3 Hz, 1H), 7.94(s, 1H), 7.88(s, 1H), 7.78(s, 1H), 7.65(s, 1H), 7.54(s, 1H), 7.36(d, J=8.7 Hz, 1H), 7.09(s, 2H), 6.57(s, 1H), 4.05(s, 3H), 3.84(s, 6H), 3.71(s, 3H); ¹³C NMR(150 MHz, DMSO-d₆), δ: 166.15, 161.82, 158.45, 153.76, 153.54, 152.80, 152.03, 149.05, 141.36, 139.14, 133.65, 129.96, 125.43, 125.11, 124.33, 122.72, 122.55, 121.20, 114.76, 108.28, 104.08, 103.46, 60.49, 56.56, 56.14; ESI-MS, *m/z*(计算值): 580.10(580.16)[M+H]⁺.

1.2.6 体外抑制c-Met激酶活性和抗肿瘤细胞增殖活性测试 采用MTS法,以Foretinib为阳性对照,测定了目标化合物体外对c-Met激酶的抑制活性.采用MTT法,以Foretinib为阳性对照,评价了目标化合物对人肺癌细胞株A549、人前列腺癌细胞PC-3、人胃癌细胞株AGS和MKN45 4种肿瘤细胞株的体外

的抗增殖活性. 具体方法为: 取对数生长期且生长状态良好的细胞, 以 4×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中, 置于 37°C 含5% CO_2 的培养箱内孵育24 h. 然后, 加入不同浓度的目标化合物及阳性对照药Foretinib继续孵育72 h. 每孔加入 $20\ \mu\text{L}$ 浓度为 $5\ \text{mg/mL}$ 的MTT溶液, 在培养箱中孵育4 h后, 加入 $150\ \mu\text{L}$ 二甲基亚砜(DMSO)溶液, 振荡至甲瓚完全溶解, 使用多功能酶标仪在 $490\ \text{nm}$ 下测定吸光度值, 最后通过SPSS软件计算半数抑制浓度(IC_{50})值. 目标化合物抑制c-Met激酶活性和对4种肿瘤细胞株的抗增殖活性的实验方法参考本课题组前期工作^[16,25].

1.2.7 AO/EB 双染色实验 分别将处于对数生长期且生长状态良好的MKN45和A549细胞接种于6孔板中, 细胞密度为 2×10^5 个/孔. 加入指定浓度(0.1和 $1.0\ \mu\text{mol/L}$)的化合物6k(DMSO体积分数小于0.1%), 置于培养箱中培养48 h. 弃去培养液, 每孔加入 $500\ \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液(PBS, $\text{pH}=7.2\sim 7.4$)后再加入 $20\ \mu\text{L}$ AO/EB工作液, 室温避光染色15 min, 使用倒置荧光显微镜观察并拍照.

1.2.8 Hoechst 33342 染色实验 分别将处于对数生长期且生长状态良好的MKN45和A549细胞接种于6孔板中, 细胞密度为 2×10^5 个/孔. 加入指定浓度(0.1和 $1.0\ \mu\text{mol/L}$)的化合物6k(DMSO体积分数小于0.1%), 置于培养箱中培养48 h. 弃去培养液, 每孔加入 $1.5\ \text{mL}$ 的4%多聚甲醛固定20 min, 弃去固定液, 用PBS($\text{pH}=7.2\sim 7.4$)洗涤细胞2次, 加入Hoechst 33342染色液 $0.5\ \text{mL/孔}$, 室温避光染色15 min后用PBS($\text{pH}=7.2\sim 7.4$)洗涤细胞2次, 置于倒置荧光显微镜下观察并拍照.

1.2.9 Transwell 实验 收集对数生长期且生长状态良好的MKN45和A549细胞, 以 2×10^4 个/ $200\ \mu\text{L}$ 的细胞密度接种于上室中, 下室加入 $500\ \mu\text{L}$ 含15%胎牛血清(FBS)的完全培养基, 并加入指定浓度的化合物6k, 置于 37°C 、含5% CO_2 的培养箱中孵育24 h. 取出小室, 用4%多聚甲醛固定15 min, 再用PBS($\text{pH}=7.2\sim 7.4$)轻轻漂洗后加入 $1\ \text{mL}$ 0.5%结晶紫染液, 室温染色20 min后弃去染液, 用PBS($\text{pH}=7.2\sim 7.4$)洗涤细胞, 除去残留染液, 室温晾干后于倒置荧光显微镜下观察并拍照.

2 结果与讨论

2.1 体外抑制c-Met激酶活性和抗肿瘤细胞增殖活性测试结果

目标化合物体外抑制c-Met激酶活性和抗肿瘤细胞增殖活性结果见表1. 在c-Met激酶抑制活性方面, 13个目标化合物中有7个具有较好的抑制c-Met激酶活性, IC_{50} 值均小于 $100\ \text{nmol/L}$. 其中6f, 6k和6l 3个目标化合物具有优良的c-Met激酶抑制活性, IC_{50} 值分别为 14.50 , 15.68 和 $22.46\ \text{nmol/L}$. 初步构效关系的研究表明, 当末端苯环上的R为单取代基时, 具有吸电子基团的化合物6a(R=4-F)和6f(4- SO_2CH_3)抑制c-Met激酶的活性相对较好, 而含供电子基团的6e[4- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$]具有中等的抑制c-Met

Table 1 c-Met kinase inhibitory activities and antiproliferative activities of 6a—6m

Compd.	R	$\text{IC}_{50}^a/(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$		$\text{IC}_{50}^a/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		
		c-Met	A549	PC-3	AGS	MKN45
6a	4-F	48.71 ± 2.68	14.41 ± 0.29	5.34 ± 0.51	6.65 ± 0.48	1.79 ± 1.46
6b	4-Cl	>5000	14.86 ± 0.43	1.13 ± 0.09	3.77 ± 0.36	1.98 ± 0.19
6c	4-Br	>5000	9.57 ± 0.35	3.19 ± 0.27	2.63 ± 0.19	6.03 ± 0.46
6d	4- CF_3	374.26 ± 0.63	2.31 ± 0.11	8.12 ± 0.84	3.67 ± 0.38	0.98 ± 0.10
6e	4- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$	134.35 ± 3.56	1.81 ± 0.12	0.96 ± 0.09	5.39 ± 0.31	3.22 ± 0.21
6f	4- SO_2CH_3	14.50 ± 0.40	0.93 ± 0.06	7.81 ± 0.83	12.88 ± 1.78	2.58 ± 0.16
6g	3,4-diF	51.54 ± 0.32	7.14 ± 0.76	7.45 ± 0.68	6.00 ± 0.54	3.01 ± 0.37
6h	2-Cl-4-F	>5000	14.40 ± 1.49	2.82 ± 0.25	22.94 ± 1.02	9.78 ± 0.43
6i	2,3-diCl	>5000	46.61 ± 3.53	3.23 ± 0.12	26.36 ± 2.56	6.61 ± 0.57
6j	3,4-di OCH_3	84.31 ± 0.63	7.47 ± 0.54	12.62 ± 1.51	4.89 ± 0.28	2.58 ± 0.14
6k	3-OH-4- OCH_3	15.68 ± 0.28	0.67 ± 0.06	6.60 ± 0.48	13.04 ± 1.17	0.88 ± 0.06
6l	2,4-diOH	22.46 ± 1.03	4.29 ± 0.19	4.87 ± 0.35	9.68 ± 0.62	1.42 ± 0.12
6m	3,4,5-tri OCH_3	98.79 ± 1.69	4.31 ± 0.22	5.32 ± 0.27	3.67 ± 0.14	2.13 ± 0.17
Foretinib ^b	—	1.53 ± 0.13	1.12 ± 0.09	0.51 ± 0.03	0.97 ± 0.06	0.06 ± 0.003

a. Data presented are the mean \pm SD values of three independent determinations; b. used as a positive control.

激酶活性. 当R=4-Cl(**6b**)和R=4-Br(**6c**)时, 目标化合物失去c-Met激酶的活性. 当末端苯环上的R为双取代基时, 含氯取代的化合物**6h**(R=2-Cl-4-F)和**6i**(R=2,3-diCl)失去c-Met激酶抑制活性, 其余化合物均具有较好的c-Met激酶抑制活性, 特别是含有羟基的化合物**6k**(R=3-OH-4-OCH₃)和**6l**(R=2,4-di-OH)活性最优. 当末端苯环上的R为三取代基R=3,4,5-triOCH₃(**6m**)时, 与R=3,4-diOCH₃的化合物(**6j**)相比, 活性稍微降低.

在体外抗增殖活性方面, 目标化合物对人肺癌细胞株A549、人前列腺癌细胞PC-3、人胃癌细胞株AGS和MKN45 4种肿瘤细胞株均显示了中等至较好的体外抗增殖活性, 其IC₅₀值范围为0.67~46.61 μmol/L. 特别是化合物**6f**和**6k**抑制A549细胞的IC₅₀值、**6e**抑制PC-3细胞的IC₅₀值以及**6d**和**6k**抑制MKN45细胞的IC₅₀值均小于1.00 μmol/L, 显示了优良的体外抗肿瘤细胞增殖活性.

2.2 AO/EB 双染色实验结果

为了初步了解目标化合物的抗肿瘤机制, 鉴于化合物**6k**对MKN45和A549细胞的抗增殖活性较好(IC₅₀值分别为0.88和0.67 μmol/L). 通过AO/EB染色实验观察了MKN45细胞和A549细胞经化合物**6k**处理48 h后的形态变化. 结果显示, MKN45和A549细胞的空白组细胞形态完整, 边界清晰, 呈现均一的绿色荧光. 经过不同浓度的**6k**处理后, 细胞形态发生变化. 在0.1 μmol/L的浓度下, 细胞数量略有减少, 部分细胞呈现黄绿色荧光的早期凋亡样特征; 而在1.0 μmol/L的浓度下, 细胞数量显著减少, 并且细胞呈现高亮度橘红色荧光的晚期凋亡样特征(图1). 实验结果表明, 化合物**6k**能够诱导MKN45和A549细胞发生凋亡.

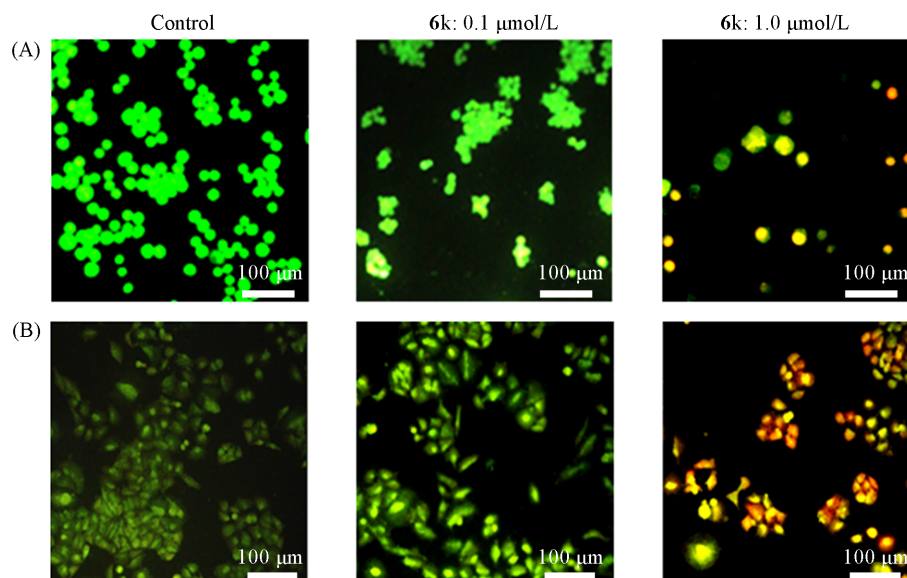


Fig. 1 AO/EB stained apoptosis of MKN45(A) and A549(B) cells with different concentrations of compound **6k**

2.3 Hoechst 33342 染色实验结果

为了进一步证明化合物**6k**能够诱导MKN45和A549细胞发生凋亡, 通过Hoechst 33342染色实验观察了MKN45和A549细胞经化合物**6k**处理48 h后细胞核的形态变化. 如图2所示, MKN45和A549细胞的对照组细胞核呈现均匀较暗的蓝色荧光, 经过不同浓度的**6k**处理后, 细胞核出现皱缩、破碎现象, 且荧光不均匀, 在1.0 μmol/L的浓度下, 细胞核出现块状的浓染, 呈现凋亡样特征, 细胞核数量也显著减少, 进一步表明化合物**6k**能够诱导MKN45和A549细胞发生凋亡.

2.4 Transwell 实验结果

通过Transwell实验检测了化合物**6k**对MKN45和A549细胞迁移能力的影响. 结果见图3. 结果显示, MKN45和A549细胞空白对照组细胞迁移数量较多, 随着化合物**6k**浓度的增加, 迁移的细胞数量减少, 表明化合物**6k**能够抑制MKN45和A549细胞的迁移能力.

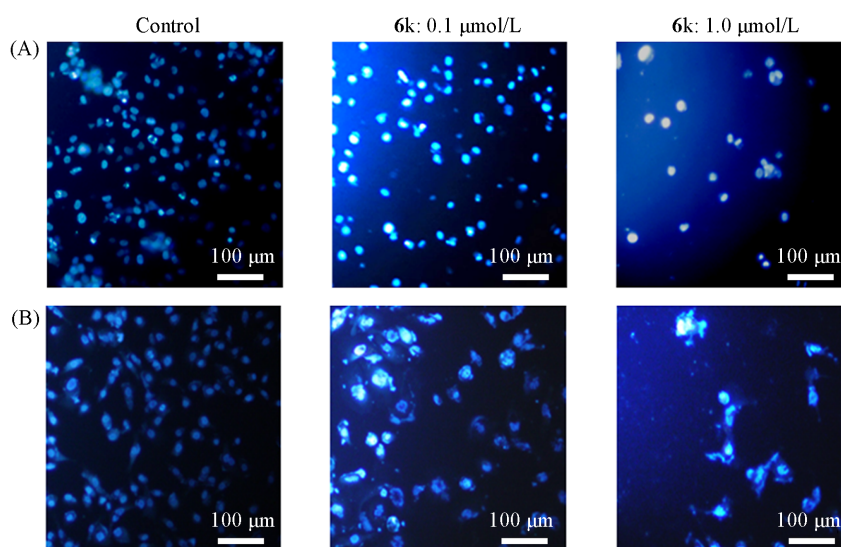


Fig. 2 Hoechst 33342 stained apoptosis of MKN45(A) and A549(B) cells with different concentrations of compound 6k

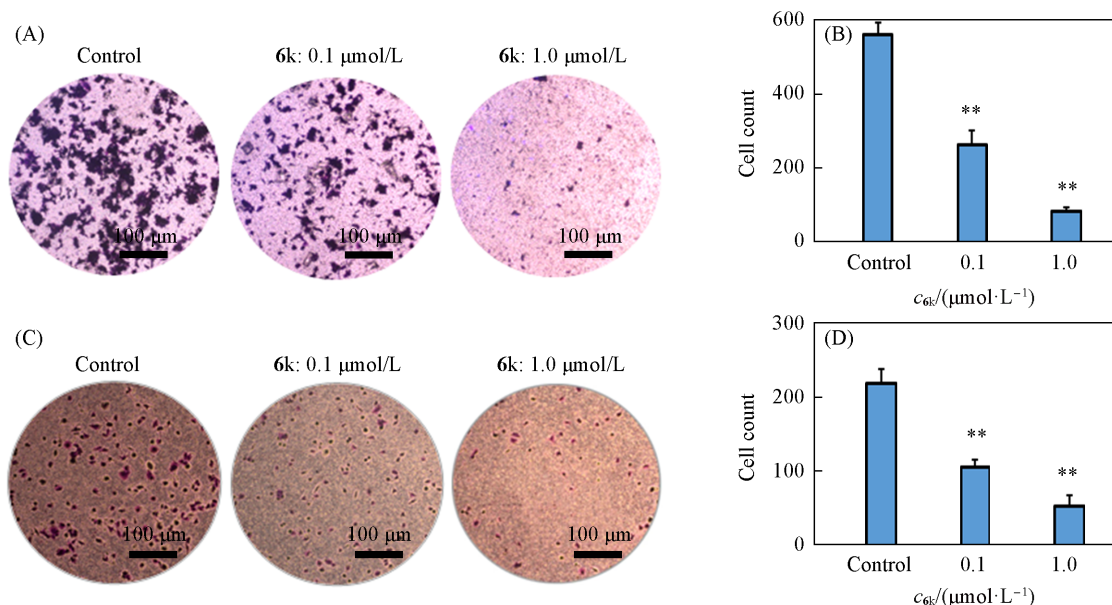


Fig. 3 Anti-migration activity(A, C) and quantification values(B, D) of MKN45(A, B) and A549(C, D) cells with different concentrations of compound 6k in transwell model

3 结 论

基于4-苯氧基喹啉类 Type II 型小分子 c-Met 激酶抑制剂的结构特点, 以4-氯-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺和3-氯-4-硝基苯酚为起始原料, 经醚化反应、还原反应、酰化反应、肼解反应和缩合反应制备了13个4-{3-氯-4-[2-(取代亚苄基)肼-1-甲酰胺基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺类化合物(6a-6m)。目标化合物结构经¹H NMR, ¹³C NMR 和 MS 进行了表征。抗肿瘤活性测试结果表明, 大部分化合物对 c-Met 激酶和 A549, PC-3, AGS 和 MKN45 4 种肿瘤细胞株均具有较好的抑制活性。特别是化合物 6f 和 6k 具有优秀的抑制 c-Met 激酶活性, 其 IC₅₀ 值分别为 14.50 和 15.68 nmol/L。化合物 6f 对 A549, PC-3, AGS 和 MKN45 细胞的抗增殖活性的 IC₅₀ 值分别为 0.93, 7.81, 12.88 和 2.58 μmol/L, 化合物 6k 对 A549, PC-3, AGS 和 MKN45 细胞的抗增殖活性的 IC₅₀ 值分别为 0.67, 6.60, 13.04 和 0.88 μmol/L。进一步的 AO/EB 双染色实验、Hoechst33342 染色实验和 Transwell 实验结果表明, 化合物 6k 可诱导 MKN45 和

A549 细胞发生细胞凋亡, 并能够抑制 2 种细胞的迁移能力. 本文制备的化合物具有优良的抗肿瘤活性, 值得进一步研究.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240439>.

参 考 文 献

- [1] Siegel R. L., Miller K. D., Fuchs H. E., Jemal A., *CA Cancer J. Clin.*, **2021**, *71*(1), 7—33
- [2] Ding X., Shi H. D., Liu Y. Z., *Chem. J. Chinese Universities*, **2021**, *42*(10), 3040—3046(丁鑫, 师红东, 刘扬中. 高等学校化学学报, **2021**, *42*(10), 3040—3046)
- [3] Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E., Vande Woude G. F., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2003**, *4*(12), 915—925
- [4] Bottaro D. P., Rubin J. S., Faletto D. L., Chan A. M., Kmieciak T. E., Vande Woude G. F., Aaronson S. A., *Science*, **1991**, *251*(4995), 802—804
- [5] Zhang Z. C., Li D., Yun H., Tong J., Liu W., Chai K. Q., Zeng T. W., Gao Z. H., Xie Y. Q., *Front Oncol.*, **2022**, *12*, 923260
- [6] Engelman J. A., Zejnullahu K., Mitsudomi T., Song Y. C., Hyland C., Park J. O., Lindeman N., Gale C. M., Zhao X. J., Christensen J., Kosaka T., Holmes A. J., Rogers A. M., Cappuzzo F., Mok T., Lee C., Johnson B. E., Cantley L. C., Jänne P. A., *Science*, **2007**, *316*(5827), 1039—1043
- [7] Pilotto S., Carbognin L., Karachaliou N., Ma P. C., Rosell R., Tortora G., Bria E., *Cancer Treat Rev.*, **2017**, *60*, 1—11
- [8] Luo G. L., Ma Y. X., Liang X. T., Xie G. Q., Luo Y. Q., Zha D. L., Wang S., Yu L. H., Zheng X. H., Wu W. H., Zhang C., *Bioorg. Chem.*, **2020**, *104*, 104356
- [9] Yuan H. L., Liu Q. F., Zhang L., Hu S. H., Chen T. T., Li H. F., Chen Y. D., Xu Y. C., Lu T., *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, *143*, 491—502
- [10] Nan X., Li H. J., Fang S. B., Li Q. Y., Wu Y. C., *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, *193*, 112241
- [11] Norman M. H., Liu L. B., Lee M., Xi N., Fellows I., D'Angelo N. D., Dominguez C., Rex K., Bellon S. F., Kim T. S., Dussault I., *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*(5), 1858—1867
- [12] Buchanan S. G., Hendle J., Lee P. S., Smith C. R., Bounaud P. Y., Jessen K. A., Tang C. M., Huser N. H., Felce J. D., Froning K. J., Peterman M. C., Aubol B. E., Gessert S. F., Sauder M., Schwinn K. D., Russell M., Rooney I. A., Adams J., Leon B. C., Do T. H., Blaney J. M., Sprengeler P. A., Thompson D. A., Smyth L., Pelletier L. A., Atwell S., Holme K., Wasserman S. R., Emtage S., Burley S. K., Reich S. H., *Mol. Cancer Ther.*, **2009**, *8*(12), 3181—3190
- [13] Yakes F. M., Chen J., Tan J., Yamaguchi K., Shi Y. C., Yu P. W., Qian F., Chu F., Bentzien F., Cancilla B., Orf J., You A., Laird A. D., Engst S., Lee L., Lesch J., Chou Y. C., Joly A. H., *Mol. Cancer Ther.*, **2011**, *10*(12), 2298—2308
- [14] Qian F., Engst S., Yamaguchi K., Yu P. W., Won K. A., Mock L., Lou T., Tan J., Li C., Tam D., Lougheed J., Yakes F. M., Bentzien F., Xu W., Zaks T., Wooster R., Greshock J., Joly A. H., *Cancer Res.*, **2009**, *69*(20), 8009—8016
- [15] Kunii E., Ozasa H., Oguri T., Maeno K., Fukuda S., Uemura T., Takakuwa O., Ohkubo H., Takemura M., Niimi A., *Anticancer Res.*, **2015**, *35*(10), 5241—5247
- [16] Liu J., Liu F., Li Z., Li C. Y., Wu S., Shen J. W., Wang H., Du S. Y., Wei H., Hou Y. L., Ding S., Chen Y., *Bioorg. Chem.*, **2022**, *120*, 105629
- [17] Yuan H. L., Liu Q. F., Zhang L., Hu S. H., Chen T. T., Li H. F., Chen Y. D., Xu Y. C., Lu T., *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, *143*, 491—502
- [18] Melge A. R., Parate S., Pavithran K., Koyakutty M., Mohan C. G., *J. Chem. Inf. Model.*, **2022**, *62*(4), 1126—1146
- [19] Zhao Y., Zhang Y. N., Wang K. T., Chen L., *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **2020**, *1874*(1), 188391
- [20] Kudo M., *Liver Cancer*, **2018**, *7*(1), 1—19
- [21] Kudo M., Finn R. S., Qin S., Han K. H., Ikeda K., Piscaglia F., Baron A., Park J. W., Han G., Jassem J., Blanc J. F., Vogel A., Komov D., Evans T. R. J., Lopez C., Dutcus C., Guo M., Saito K., Kraljevic S., Tamai T., Ren M., Cheng A. L., *Lancet*, **2018**, *391*(10126), 1163—1173
- [22] Liu C. C., Zhang Y. T., Mao R. T., *Fine Chemicals*, **2017**, *34*(7), 810—813(刘长春, 张亚婷, 毛芮婷. 精细化工, **2017**, *34*(7), 810—813)
- [23] Yao Y. Q., Liu Z. W., Zhao M. Y., Chen Z. X., Li P., Zhang Y., Wang Y. X., Zhao C. J., Long C. F., Chen X. X., Yang J. L., *Acta Pharm. Sin. B*, **2020**, *10*(8), 1453—1475
- [24] Wang Z. Y., Yang G. S., Tang W., Yang W. Q., Wang T. L., *Preparation of Lenvatinib and Its Intermediates*, CN 113045491A, 2021-06-29(王振宇, 杨国胜, 唐伟, 杨文谦, 王铁林. 一种仑伐替尼及中间体的制备方法, CN 113045491A, 2021-06-29)
- [25] Liu J., Gong Y. L., Shi J. T., Hao X. C., Wang Y., Zhou Y. P., Hou Y. L., Liu Y., Ding S., Chen Y., *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, *194*, 112244

(Ed.: L, V, K, M)