

替沃扎尼衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性评价

冯嘉辉,杨顺琳,王宏旭,张慧敏,刘亚婧*,官平*

(沈阳药科大学 制药工程学院,辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 设计合成一系列含有双酰肼基的替沃扎尼衍生物,并评价其抗肿瘤活性。方法 以替沃扎尼为先导化合物,通过文献调研及分子对接模拟分析,在保留其关键药效团喹啉环、连接苯环、脲基以及末端的疏水杂环的基础上,对喹啉环 6 位甲氧基进行结构修饰,将其替换为小分子胺取代的双酰肼基,设计并合成一系列衍生物。采用 MTT 法,以替沃扎尼为阳性对照,选择 HCT-116 和 HepG2 为测试细胞,考察目标化合物的体外抗肿瘤细胞增殖活性。**结果与结论** 多个目标化合物可以有效抑制 HCT-116 和 HepG2 细胞增殖,其中化合物 A1、A3、A4、A7、A9、A13 对 HCT-116 和 HepG2 细胞的抗增殖活性优于替沃扎尼。

关键词: VEGFR 抑制剂;替沃扎尼;衍生物;活性研究

中图分类号: R914 **文献标志码:** A

血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 是一种受体酪氨酸激酶,参与调控血管生成及血管内皮细胞增殖,在肿瘤发生、发展和迁移过程中发挥重要作用。在转移性结直肠癌治疗中,抑制血管内皮生长因子信号通路已成为一线治疗的重要策略。血管内皮生长因子通过与细胞膜表面免疫球蛋白结构域结合,激活胞内酪氨酸激酶结构域,诱导受体二聚化并触发自磷酸化反应,进而激活 MAPK/PI3K 等下游信号通路,促进病理性新生血管的形成,为肿瘤生长提供必要的氧气及营养物质^[1]。近年来,以 VEGFR 为靶点的抗肿瘤药物研发取得了显著成效,多种不同结构类型的 VEGFR 抑制剂已获批上市^[2]。根据分子结构与作用特点,VEGFR 抑制剂主要分为单克隆抗体、小分子酪氨酸激酶抑制剂以及天然产物抑制剂三类^[3]。

替沃扎尼 (tivozanib, AV-951, KRN-951) 最初由日本协和麒麟 (Kyowa Kirin) 制药公司发现,后经美国 Aevo Oncology 公司和日本安斯泰来 (Astellas) 制药公司联合开发,是一种新型 VEGFR 小分子抑制剂^[4]。该药用于治疗复发及难治性晚期肾细胞癌,正在开展针对不可切除或晚期肝细胞癌的临床 II 期研究^[5],且同时在探索与其他药

物联用治疗结直肠癌的临床潜力。替沃扎尼对 VEGFR-1/2/3 三种亚型展现出纳摩尔级抑制活性,半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.21、0.16、0.24 $nmol \cdot L^{-1}$ 。替沃扎尼通过竞争性占据 ATP 结合位点,阻断激酶活化构象的形成,从而有效抑制病理性血管生成并表现出较高的激酶选择性与较低的脱靶毒性^[6]。

本文作者对替沃扎尼与 VEGFR-2 的共晶结构进行分析,并运用基于结构的药物设计 (structural-based drug design, SBDD) 策略对其进行结构修饰,设计并合成了一系列结构新颖的衍生物,以期进一步提高化合物对肿瘤细胞的抗增殖活性,并为研发高效低毒的新一代抗血管生成药物奠定基础。

1 目标化合物的设计与合成

替沃扎尼与 VEGFR-2 蛋白分子对接结果 (图 1) 显示:替沃扎尼通过喹啉母核锚定于蛋白铰链区,与 Cys919 残基形成关键氢键作用;苯环作为连接片段,嵌入 ATP 结合口袋的疏水区域;脲结构可分别与 Glu885 的羧基和 Asp1046 的氨基形成氢键作用;末端甲基异噁唑深入变构疏水口袋,进一步稳定整体结合构象。

收稿日期:2025-04-03

作者简介:冯嘉辉(2001-),男(汉族),甘肃天水人,硕士研究生,E-mail:2698624017@qq.com; *通信作者:刘亚婧(1979-),女(汉族),河北唐山人,教授,博士生导师,主要从事抗肿瘤和抗感染药物研究,Tel:(024)43520217,E-mail:lyjpharm@126.com;官平(1964-),男(汉族),新疆乌鲁木齐人,教授,博士生导师,主要从事抗肿瘤和抗感染药物研究,Tel:(024)43520016,E-mail:gongpinggp@126.com。

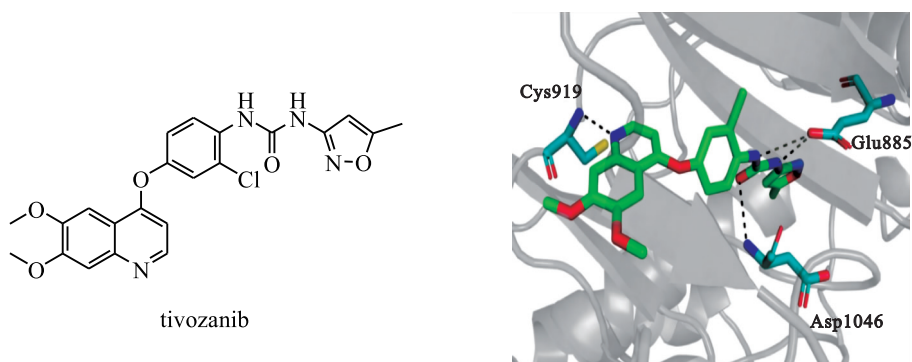


Figure 1 The structure of tivozanib and its docking mode with VEGFR-2 (PDB ID: 4ASE)

基于 VEGFR-2 铰链区结合腔的空间拓扑特征,该区存在较大疏水空腔。本研究采用区域性结构优化策略:在保留喹啉母核、连接苯环、脲基及末端结构的基础上,维持喹啉环与 Cys919 形成的关键氢键作用,重点对喹啉环上的取代基进行结构修饰。鉴于铰链区富含极性氨基酸残基,本研究尝试在替沃扎尼喹啉环的 6 位引入氢键供体,以期与邻近的氨基酸残基(如 Asn923)形成更多的氢键相互作用,从而增强衍生物对 VEGFR-2

的抑制活性。酰肼片段兼具氢键供体与受体特性,因此本研究将喹啉环 6 位的甲氧基替换为哌啶取代的双酰肼基,设计得到目标化合物 A1 (图 2)。分子对接结果表明,A1 与 VEGFR-2 蛋白除保留原有关键相互作用外,双酰肼结构中的羰基还与 Asn923 的两个氨基形成氢键作用,初步验证了上述分子设计思路的合理性和可行性。在此基础上,进一步采用不同脂肪胺替代哌啶,设计并合成了系列衍生物 A2 ~ A13 (图 3)。

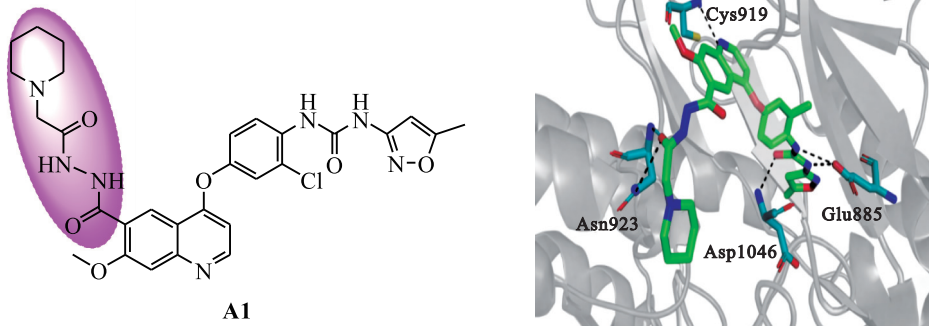
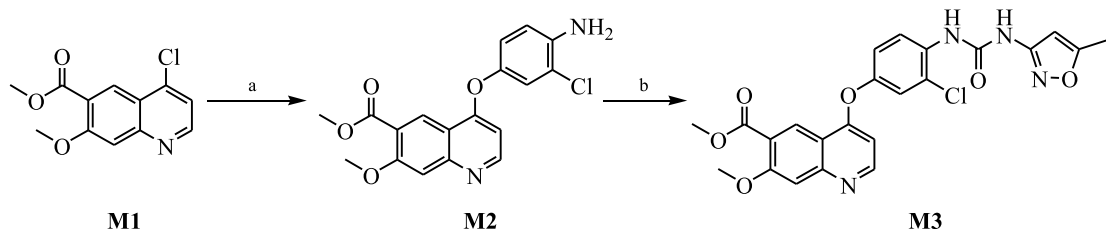


Figure 2 The structure of compound A1 and its docking mode with VEGFR-2 (PDB ID: 4ASE)

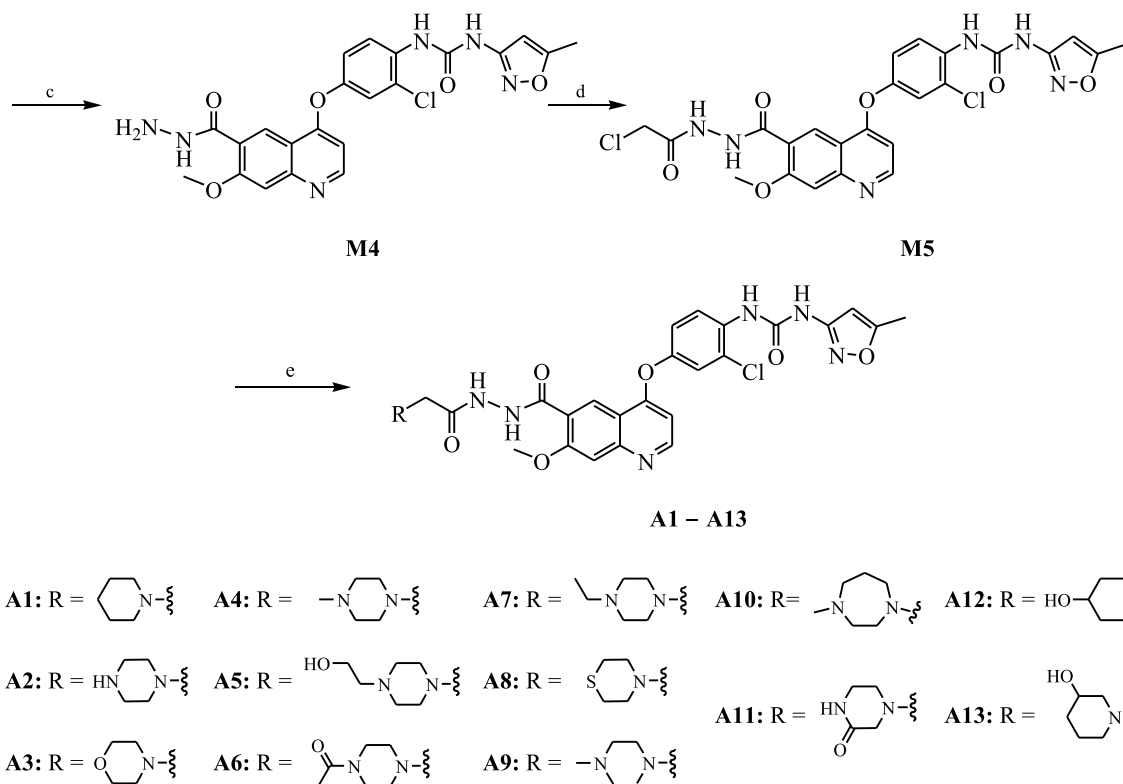
在对替沃扎尼合成路线进行调研的基础上^[7],本研究采用线性合成策略,确定了目标化合物 A1 ~ A13 的合成路线 (图 3)^[8-9]:以 4-氯-7-甲氧基喹啉-6-羧酸甲酯 (M1) 为起始原料,经取

代、成脲、肼解、酰化反应制得关键中间体 M5, M5 再与不同脂肪胺发生取代反应制得目标化合物 A1 ~ A13。



Reagents and conditions: a) 4-amino-3-chlorophenol, EtONa, DMF, 115 °C, 5 h; b) 5-methylisoxazol-3-amine, phenyl carbonochloridate, TEA, DMF, 80 °C, 4 h; c) NH₂NH₂ · H₂O, EtOH, 80 °C, 10 h; d) 2-chloroacetyl chloride, TEA, MeCN, 60 °C, 5 h; e) amine, K₂CO₃, DMF, r. t., 5 h.

Figure 3 The synthetic route of target compounds A1 - A13



Continued Figure 3

2 合成实验

核磁共振谱采用 Bruker ARX-600 型核磁共振波谱仪测定(瑞士 Bruker 公司);质谱采用 Waters Quattro Micro API 型液质联用仪测定(美国 Waters 公司);纯度采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪测定(美国 Agilent 公司)。

2.1 4-(4-氨基-3-氯苯氧基)-7-甲氧基喹啉-6-羧酸甲酯(M2)的制备

氮气保护下,将 4-氨基-3-氯苯酚(10.0 g, 69.7 mmol)加入 25 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中,降温至 0~5 °C,分批加入乙醇钠(6.6 g, 97.0 mmol),升至室温,搅拌 1.5 h,缓慢加入 25 mL 含有 4-氯-7-甲氧基喹啉-6-羧酸甲酯(M1, 13.5 g, 53.6 mmol)的 DMF 溶液,加毕,升温至 115 °C,反应 5 h。反应完毕,将反应液冷却至室温,倒入 100 mL 水-甲醇(体积比 1:1)混合溶液中,搅拌 2 h,过滤,滤饼干燥后得到紫色固体(M2) 12.6 g,收率为 75.6%。LC-MS m/z : 359.0[M+H]⁺, 381.0[M+Na]⁺。

2.2 4-{3-氯-4-[3-(5-甲基异噁唑-3-基)脒基]苯氧基}-7-甲氧基喹啉-6-羧酸甲酯(M3)的制备

室温下,将 3-氨基-5-甲基异噁唑(10.0 g,

101.9 mmol)和 28.3 mL 三乙胺(20.6 g, 203.6 mmol)加入 100 mL DMF 中,降温至 0~5 °C,滴加 12.8 mL 氯甲酸苯酯(16.0 g, 102.2 mmol),滴毕,升至室温,搅拌 2 h,加入中间体 M2(24.4 g, 68.0 mmol),升温至 80 °C,反应 4 h。反应完毕,将反应液冷却至室温,倒入 100 mL 水-甲醇(体积比 1:1)混合溶液中,搅拌 30 min,过滤,滤饼干燥后得到黄色固体(M3) 23.1 g,收率为 70.5%。LC-MS m/z : 482.9[M+H]⁺, 504.9[M+Na]⁺, 480.9[M-H]⁻。

2.3 1-{2-氯-4-[[6-(胍羰基)-7-甲氧基喹啉-4-基]氧基]苯基}-3-(5-甲基异噁唑-3-基)脒(M4)的制备

室温下,将中间体 M3(10.0 g, 20.7 mmol)加入 100 mL 乙醇中,加入 20 mL 水合肼(质量分数 80%),升温至 80 °C,反应 10 h。反应完毕,将反应液冷却至室温,过滤,滤饼用水洗涤,干燥后得到黄色固体(M4) 8.5 g,收率为 85.0%。LC-MS m/z : 483.0[M+H]⁺, 504.9[M+Na]⁺。

2.4 1-{2-氯-4-[[6-[2-(2-氯乙酰基)胍]-1-羰基]-7-甲氧基喹啉-4-基]氧基]苯基}-3-(5-甲基异噁唑-3-基)脒(M5)的制备

0 °C 下,将中间体 M4(5.0 g, 10.4 mmol)和

2.2 mL 三乙胺(1.6 g, 15.8 mmol)加入 50 mL 乙腈中,滴加 1.0 mL 氯乙酰氯(1.4 g, 12.6 mmol),升温至 60 °C,反应 5 h。反应完毕,将反应液减压浓缩,残余物倒入 50 mL 冰水中,析出黄色固体,过滤,滤饼用水洗涤,用乙醇搅拌洗涤,过滤,滤饼干燥后得到橙黄色固体 (**M5**) 2.9 g, 收率为 50.3%。LC-MS m/z : 559.0 $[M + H]^+$, 581.0 $[M + Na]^+$, 557.1 $[M - H]^-$ 。

2.5 目标化合物的制备通法

将中间体 **M5** (1.0 g, 1.8 mmol), 碳酸钾 (0.4 g, 2.9 mmol) 和对应的脂肪胺 (2.4 mmol) 加入 10 mL DMF 中, 室温反应 5 h。反应完毕, 将反应液倒入 50 mL 水中, 用乙酸乙酯萃取 (50 mL \times 3), 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤 (10 mL \times 2), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 将滤液减压浓缩得到粗品, 粗品经薄层色谱纯化, 得到目标化合物 **A1** ~ **A13**。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(哌啶-1\text{-基})\text{乙酰基}]\text{胍-1-羰基}\}-7\text{-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}-3\text{-}(5\text{-甲基异噻唑-3-基})\text{脲}(\mathbf{A1})$: 白色固体, 0.53 g, 收率为 49.4%。LC-MS m/z : 608.8 $[M + H]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.21 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.71 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.27 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.33 (dd, $J = 9.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.32 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.65 ~ 1.56 (m, 4H), 1.41 ~ 1.38 (m, 2H), 1.29 ~ 1.26 (m, 2H), 0.89 ~ 0.84 (m, 2H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(哌啶-1\text{-基})\text{乙酰基}]\text{胍-1-羰基}\}-7\text{-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}-3\text{-}(5\text{-甲基异噻唑-3-基})\text{脲}(\mathbf{A2})$: 黄色固体, 0.48 g, 收率为 32.5%。LC-MS m/z : 609.5 $[M + H]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.29 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.76 ~ 8.69 (m, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.28 ~ 8.23 (m, 1H), 7.61 ~ 7.57 (m, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.34 ~ 7.30 (m, 1H), 6.61 ~ 6.58 (m, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.20 ~ 3.17 (m, 2H), 3.14 ~ 3.06 (m, 4H), 2.75 (s, 4H), 2.38 (s, 3H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(2\text{-吗啉基乙酰基})\text{胍-1-羰基}\}-7\text{-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}-3\text{-}(5\text{-甲基异噻唑-3-基})\text{脲}(\mathbf{A3})$: 黄色固体, 0.48 g, 收率为 45.5%。LC-MS m/z : 610.2 $[M + H]^+$, 632.3

$[M + Na]^+$, 608.0 $[M - H]^-$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.20 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.71 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.27 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.33 (dd, $J = 9.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.65 ~ 3.60 (m, 4H), 3.09 (s, 2H), 2.55 ~ 2.51 (m, 4H), 2.38 (s, 3H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(4\text{-甲基哌嗪-1-基})\text{乙酰基}]\text{胍-1-羰基}\}-7\text{-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}-3\text{-}(5\text{-甲基异噻唑-3-基})\text{脲}(\mathbf{A4})$: 黄色固体, 0.53 g, 收率为 48.3%。LC-MS m/z : 623.2 $[M + H]^+$, 645.2 $[M + Na]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.20 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.70 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.27 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.33 (dd, $J = 9.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.07 (s, 2H), 2.62 ~ 2.51 (m, 4H), 2.39 (s, 3H), 2.38 (s, 4H), 2.18 (s, 3H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[4\text{-}(2\text{-羟乙基})\text{哌嗪-1-基})\text{乙酰基}]\text{胍-1-羰基}\}-7\text{-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}-3\text{-}(5\text{-甲基异噻唑-3-基})\text{脲}(\mathbf{A5})$: 黄色固体, 0.36 g, 收率为 31.4%。LC-MS m/z : 653.2 $[M + H]^+$, 675.2 $[M + Na]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.20 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.70 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.27 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.33 (dd, $J = 9.1, 2.8$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.40 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.52 ~ 3.48 (m, 2H), 3.33 (s, 4H), 3.07 (s, 2H), 2.62 ~ 2.52 (m, 4H), 2.45 ~ 2.38 (m, 4H), 2.37 (s, 3H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(4\text{-乙酰基哌嗪-1-基})\text{乙酰基}]\text{胍-1-羰基}\}-7\text{-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}-3\text{-}(5\text{-甲基异噻唑-3-基})\text{脲}(\mathbf{A6})$: 黄色固体, 0.35 g, 收率为 30.5%。LC-MS m/z : 673.2 $[M + Na]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.19 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.71 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.28 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.33 (dd, $J = 9.1, 2.8$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.02

(s,3H), 3.50~3.45(m,4H), 3.13(s,2H), 2.55(t, $J=5.1$ Hz, 2H), 2.48(t, $J=5.2$ Hz, 2H), 2.38(s,3H), 1.99(s,3H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(4\text{-乙基哌嗪-1-基})\text{乙酰基}\}\text{胍-1-羰基}\}\text{-7-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}\text{-3-(5-甲基异噁唑-3-基)胍(A7)}$:黄色固体, 0.55 g, 收率为 49.3%。LC-MS m/z : 637.2 $[M+H]^+$, 659.3 $[M+Na]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ :10.20(s,1H), 10.19(s,1H), 9.96(s,1H), 8.81(s,1H), 8.70(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 8.55(s,1H), 8.27(d, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.60(d, $J=2.8$ Hz, 1H), 7.55(s,1H), 7.33(dd, $J=9.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.59(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 6.52(s,1H), 4.02(s,3H), 3.08(s,2H), 2.70~2.50(m, 8H), 2.38(s,3H), 2.36(s,2H), 1.00(t, $J=7.2$ Hz, 3H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}[2\text{-}(2\text{-硫代吗啉基乙酰基})\text{胍-1-羰基}\}\text{-7-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}\text{-3-(5-甲基异噁唑-3-基)胍(A8)}$:黄色固体, 0.52 g, 收率为 47.8%。LC-MS m/z : 626.1 $[M+H]^+$, 648.2 $[M+Na]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ :10.19(s,1H), 10.17(s,1H), 9.98(s,1H), 8.80(s,1H), 8.70(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 8.56(s,1H), 8.28(d, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.60(d, $J=2.8$ Hz, 1H), 7.55(s,1H), 7.33(dd, $J=9.1, 2.8$ Hz, 1H), 6.59(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 6.52(s,1H), 4.02(s,3H), 3.12(s,2H), 2.80~2.77(m, 4H), 2.68~2.65(m,4H), 2.38(s,3H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}N\text{-}[2\text{-}(二甲基氨基)乙酰基]\text{-}N\text{-甲基甘氨酸}\}\text{胍-1-羰基}\}\text{-7-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}\text{-3-(5-甲基异噁唑-3-基)胍(A9)}$:黄色固体, 0.52 g, 收率为 47.5%。LC-MS m/z : 625.0 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ :10.23(s,1H), 10.22(s,1H), 8.83(s,1H), 8.74~8.70(m,1H), 8.55(s,1H), 8.30~8.26(m,1H), 7.67~7.62(m,1H), 7.61~7.58(m,1H), 7.56(s,1H), 7.38~7.32(m,1H), 6.62~6.59(m,1H), 6.51(s,1H), 4.02(s,3H), 3.20(s,2H), 2.64(s,3H), 2.47~2.44(m,4H), 2.43(s,3H), 2.38(s,3H), 2.35(s,3H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(4\text{-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基})\text{乙酰基}\}\text{胍-1-羰基}\}\text{-7-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}\text{-3-(5-甲基异噁唑-3-基)胍(A10)}$:黄色固体, 0.35 g, 收率为 31.3%。LC-

MS m/z : 637.9 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ :10.22(s,1H), 9.99(s,1H), 8.84(s,1H), 8.71(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 8.56(s,1H), 8.27(d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.60(d, $J=2.8$ Hz, 1H), 7.55(s,1H), 7.33(dd, $J=9.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.59(d, $J=5.3$ Hz, 1H), 6.52(s,1H), 4.02(s,3H), 3.26(s,2H), 2.84~2.81(m,2H), 2.80~2.78(m,2H), 2.73(s,4H), 2.38(s,3H), 2.37(s,3H), 1.82~1.77(m,2H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(3\text{-氧代哌嗪-1-基})\text{乙酰基}\}\text{胍-1-羰基}\}\text{-7-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}\text{-3-(5-甲基异噁唑-3-基)胍(A11)}$:黄色固体, 0.28 g, 收率为 25.6%。LC-MS m/z : 622.7 $[M+H]^+$, 644.7 $[M+Na]^+$, 620.7 $[M-H]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ :10.21(s,1H), 10.18(s,1H), 10.11(s,1H), 8.82(s,1H), 8.71(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 8.55(s,1H), 8.27(d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.78(s,1H), 7.60(d, $J=2.8$ Hz, 1H), 7.55(s,1H), 7.33(dd, $J=9.1, 2.8$ Hz, 1H), 6.59(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 6.52(s,1H), 4.02(s,3H), 3.24~3.18(m,4H), 3.13(s,2H), 2.78~2.72(m,2H), 2.38(s,3H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(4\text{-羟基哌啶-1-基})\text{乙酰基}\}\text{胍-1-羰基}\}\text{-7-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}\text{-3-(5-甲基异噁唑-3-基)胍(A12)}$:黄色固体, 0.31 g, 收率为 27.6%。LC-MS m/z : 624.3 $[M+H]^+$, 622.0 $[M-H]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ :10.19(s,1H), 10.17(s,1H), 9.93(s,1H), 8.81(s,1H), 8.70(d, $J=5.3$ Hz, 1H), 8.56(s,1H), 8.27(d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.60(d, $J=2.8$ Hz, 1H), 7.55(s,1H), 7.33(dd, $J=9.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.59(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 6.52(s,1H), 4.57~4.54(m,1H), 4.02(s,3H), 3.49~3.43(m,1H), 3.04(s,2H), 2.82~2.77(m,2H), 2.38(s,3H), 2.24~2.18(m,2H), 1.74~1.70(m,2H), 1.50~1.43(m,2H)。

1- $\{2\text{-氯-4-}\{6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(3\text{-羟基哌啶-1-基})\text{乙酰基}\}\text{胍-1-羰基}\}\text{-7-甲氧基喹啉-4-基}\}\text{氧基}\}\text{苯基}\}\text{-3-(5-甲基异噁唑-3-基)胍(A13)}$:黄色固体, 0.31 g, 收率为 28.3%。LC-MS m/z : 623.9 $[M+H]^+$, 645.9 $[M+Na]^+$, 621.8 $[M-H]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ :10.19(s,1H), 10.17(s,1H), 9.98(s,1H), 8.80(s,1H), 8.70(d, $J=5.3$ Hz, 1H), 8.55(s,1H), 8.27(d, $J=$

9.1 Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.33 (dd, $J = 9.1, 2.8$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.71 ~ 4.63 (m, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.60 ~ 3.51 (m, 1H), 3.13 ~ 3.00 (m, 2H), 2.83 ~ 2.79 (m, 1H), 2.65 ~ 2.58 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.19 (s, 1H), 2.07 (s, 1H), 1.75 ~ 1.63 (m, 2H), 1.51 ~ 1.43 (m, 1H), 1.19 ~ 1.12 (m, 1H)。

3 体外活性评价

测试原理: MTT 实验基于活细胞内琥珀酸脱氢酶的还原作用, 可将 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色甲瓚结晶并沉积于细胞内, 死细胞则无此酶活性。采用二甲基亚砷 (DMSO) 溶解甲瓚结晶, 通过酶标仪在 490 nm 或 570 nm 波长处检测吸光度。在一定细胞数量范围内, 甲瓚生成量与活细胞数呈正相关, 因此通过测定吸光度 (OD 值) 可反映活细胞数量。OD 值越高表明细胞活性越强, OD 值越低则提示细胞数量较少或活性

较弱。

具体测试方法: 取对数生长期细胞, 以每孔 5 000 ~ 10 000 个接种至 96 孔板中 (不同种类细胞每孔的细胞数量不同), 每孔细胞悬液体积为 100 μL , 置于标准条件下培养 24 h。取出 96 孔板, 加入 100 μL 不同浓度的待测化合物溶液, 每组设置三个复孔, 共五个浓度梯度, 继续培养 72 h。随后每孔加入 50 μL 质量浓度为 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 孵育 4 h。弃去培养液和 MTT, 每孔加入 100 μL DMSO, 置于微波振荡仪上振荡至结晶完全溶解, 在酶标仪 570 nm 波长处检测吸光度。使用 GraphPad Prism 8.0 软件通过非线性回归方程拟合计算化合物的 IC_{50} 值, 实验结果见表 1。

鉴于替沃扎尼目前处于治疗肝癌与结直肠癌的临床 II 期研究阶段, 本研究以其为阳性对照, 采用 MTT 法考察了目标化合物对人肝癌细胞 HepG2 和人结直肠癌细胞 HCT-116 的体外抗增殖活性。

Table 1 The anti-proliferative activities of compounds A1 – A13

Compd.	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		$\log P^{\text{①}}$
	HepG2	HCT-116	
A1	23.11	6.41	3.38
A2	>40.00	35.11	2.00
A3	18.42	7.28	2.30
A4	23.12	8.74	2.38
A5	>40.00	15.14	1.69
A6	>40.00	21.97	1.61
A7	13.94	9.54	2.74
A8	>40.00	4.92	2.90
A9	26.03	5.26	2.55
A10	39.80	17.10	2.44
A11	>40.00	17.28	1.26
A12	>40.00	7.08	1.85
A13	28.16	7.99	2.31
tivozanib	34.46	15.76	4.22

①: The $\log P$ parameters of the above compounds were predicted by MarvinSketch 6.0.

4 结果与讨论

本研究以替沃扎尼为先导化合物, 结合 VEGFR-2 铰链区结合腔的空间拓扑特征, 在保留替沃扎尼核心结构的基础上, 对喹啉环 6 位甲氧基进行结构改造, 将其替换为小分子胺取代的双酰肼基, 设计并合成了一系列新型衍生物。采用

人结直肠癌细胞 HCT-116 和人肝癌细胞 HepG2 对目标化合物进行体外抗增殖活性评价。由实验结果可知, 目标化合物对 HCT-116 细胞具有一定的选择性抑制作用, 其中化合物 A1、A3、A4、A7、A9、A13 对 HCT-116 和 HepG2 细胞的抗增殖活性均优于阳性对照替沃扎尼。化合物 A2 的抑制活性明显弱于 A1、A3、A8, 说明在双酰肼基结构

中引入哌啶、吗啉或硫代吗啉可明显提高体外抗增殖活性,引入哌嗪则导致活性降低,而甲基或乙基取代哌嗪可使活性得到一定的改善。分子对接研究表明,双酰肼基能与 VEGFR-2 的活性位点形成多重氢键网络,哌啶环与结合口袋产生稳定的疏水作用,从而提高复合物结合稳定性。引入哌嗪虽可增加氢键供体数量,但同时降低了亲脂性,导致分子透膜能力减弱,细胞水平活性下降;而哌啶、吗啉或硫代吗啉等在形成氢键作用的同时,可优化分子 $clogP$ 值,维持适宜的亲脂性。在哌嗪4位氮原子上引入乙酰基或替换为3-氧代哌嗪可使抑制作用减弱。另外,含羟乙基哌嗪结构的化合物 $IC_{50} > 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,说明在哌嗪环上引入羟基不利于提高化合物的抗增殖活性。

综上所述,化合物 **A3** 表现出优于替沃扎尼的抗肿瘤细胞增殖活性,可作为优选化合物进行深入研究。

参考文献:

[1] PATEL S A, NILSSON M B, LE X, et al. Molecular mechanisms and future implications of VEGF/VEGFR in cancer therapy [J]. Clin Cancer Res, 2023, 29 (1): 30 – 39.

[2] GHALEHBANDI S, YUZUGULEN J, PRANJOL M Z I, et al. The role of VEGF in cancer-induced angio-

genesis and research progress of drugs targeting VEGF [J]. Euro J Pharm, 2023, 949: 175586.

- [3] FOUNTZILAS C, GUPTA M, LEE S, et al. A multi-centre phase 1b/2 study of tivozanib in patients with advanced inoperable hepatocellular carcinoma [J]. Br J Cancer, 2020, 122: 963 – 970.
- [4] SU S, HAN M X, GAO T T, et al. Research progress on vascular endothelial growth factor inhibitors [J]. J Chifeng Univ (赤峰学院学报), 2018, 34 (5): 60 – 61.
- [5] ABDELDAYEM A, RAOUF Y S, CONSTANTINESCU S N, et al. Advances in covalent kinase inhibitors [J]. Chem Soc Rev, 2020, 49 (9): 2617 – 2687.
- [6] RINI B I, PAL S K, ESCUDIER B J, et al. Tivozanib versus sorafenib in patients with advanced renal cell carcinoma (TIVO-3): a phase 3, multicentre, randomised, controlled, open-label study [J]. Lancet Oncol, 2020, 21 (1): 95 – 104.
- [7] CHEN B C. A new targeted therapy for advanced renal cell carcinoma: tivozanib [J]. Med Herald (医药导报), 2021, 40 (11): 1609 – 1615.
- [8] FU Y, ZHANG Q W. Synthesis of tivazaniol hydrochloride monohydrate [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2013, 22 (1): 26 – 29.
- [9] MAO Y, ZHU C, WANG H, et al. A new and practical synthesis of tivozanib [J]. Heterocycles, 2016, 92 (10): 1882 – 1887.

Design, synthesis and evaluation of antitumor activities of tivozanib derivatives

FENG Jiahui, YANG Shunlin, WANG Hongxu, ZHANG Huimin,
LIU Yajing*, GONG Ping*

(School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: A series of dihydrazide-containing tivozanib derivatives were designed and synthesized, and their antitumor activities were evaluated. Using tivozanib as the lead compound, structural modification was carried out on the C6-methoxy group of the quinoline ring based on literature review and molecular docking analysis. The C6-methoxy group was replaced with a small amine-substituted dihydrazide group to afford a series of derivatives. The *in vitro* antitumor proliferation activities of these compounds were evaluated using the MTT assay, with tivozanib as a control. The results demonstrated that several target compounds effectively inhibited the proliferation of HCT-116 and HepG2 cells. Notably, compounds **A1**, **A3**, **A4**, **A7**, **A9** and **A13** exhibited better antiproliferative activities than tivozanib.

Key words: VEGFR inhibitor; tivozanib; derivatives; activity study