

酪氨酸蛋白激酶抑制剂的合成及生物活性

庞素华 郭宗儒* 梁晓天

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 设计并合成了四类共 25 个酪氨酸蛋白激酶(TPK)抑制剂。用 ATP 参入法测定了化合物 **1**~**10** 对 HL-60 白血病来源的 TPK 的抑制作用, 有些化合物表现出明显的抑制活性。构效关系(SAR)表明, 呈现抑制活性的必要结构或基团与文献报道的构效关系相一致。还尝试了酶联免疫吸附法(ELISA)测定化合物 **11**~**25** 对正常鼠脾来源的 TPK 的抑制作用, 结果表明这种方法与 ATP 参入法所得的构效关系有很大的不同。

关键词 酪氨酸蛋白激酶; 抑制剂; 构效关系

随着细胞生物学与分子生物学的进步, 癌化学治疗的新靶点不断出现, 一些癌基因的活化与特定的肿瘤发生有关, 这些异常活化的癌基因成为肿瘤早期诊断的指标和治疗的靶点。显然, 寻找用化学物质阻断癌基因的活化和表达的途径有可能控制癌的发生和生长。许多研究表明, 活化的酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinases, TPK)已被确认是大约半数已知病毒转移基因(原癌基因)的产物^[1]。TPK 的活化似乎是启动 DNA 合成和细胞增殖中多细胞反应的关键信号, 任何通过抑制 TPK 而影响细胞增殖的因素都明显与癌的生长相关。TPK 抑制剂能使癌细胞逆转为正常或接近正常细胞, 并且在细胞作用的早期明显影响癌基因的表达。因此, TPK 不仅在癌基因机制的研究方面有重要理论意义, 而且在治疗肿瘤疾病上有实用价值, 成为肿瘤化学治疗的重要途径。

TPK 是一组酶系, 催化 ATP 的 γ -磷酸基转移到许多重要蛋白质的酪氨酸残基上, 使酚羟基磷酸化。在酪氨酸磷酸化反应发现不久, 国外就开始研究 TPK 抑制剂, 报道的化合物类型不断增多, 本文作者就此作了综述^[2]。TPK

抑制剂包括天然产物黄酮和异黄酮类, 微生物代谢产物 erbstatin 和 lavendustin 类, 合成物桂皮酰胺类、亚苄丙二腈类和二底物抑制剂等。近年来又出现如羟苄氨基水杨酸^[3,4], 苯甲氨基吡啶并[4,3-*d*]嘧啶^[5]等。目前设计 TPK 抑制剂所依据的理论基础和 TPK 的反应机理以及 TPK 结合位点的三维结构尚不清楚。由于 TPK 抑制剂的类型较多, 结构差异较大, 还不能概括出普遍的药效团或基本结构。通过对亚苄丙二腈系列化合物的定量构效关系研究, 并与其它类型化合物作结构的定性比较, 认为参与同 TPK 作用的抑制剂的基本结构是: 含有两个或两个以上酚羟基的苯环, 连接一个共轭的可极化的侧链, 侧链上存在杂原子^[6]。然而, 有些有很强抑制作用的化合物并非共轭结构, 也不含有酚羟基。

本文设计合成了四类有共轭体系的化合物: 苄叉巴比妥类(**1**~**4**); 苯甲酰胺类(**5**~**15**); 苯甲酸酯类(**16**~**19**); 肉桂酰胺类(**20**~**24**)及活性对照物(**25**)。Erbstatin 对人上皮癌细胞 A431 来源的 TPK 有很强的抑制作用, 但其合成方法比较复杂, 且性质不稳定, 易失活。其甲酯类似物 2,5-二羟基肉桂酸甲酯(**25**)的活性与 erbstatin 相当, 故合成化合物 **25** 为对照物。

苄叉巴比妥类的合成: 取代的苯甲醛与巴

本文于 1996 年 4 月 29 日收到。

* 通讯联系人

比妥酸以水作溶剂回流而得。

苯甲酰胺类的合成: 化合物 **5** 和 **6** 的合成是由 3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸经酰氯与相应的取代芳胺缩合而得; **9~15** 的合成是 3,4-二羟基苯甲酸经乙酰化保护^[7], 制成酰氯, 在适宜的溶剂中与取代的芳胺缩合, 再经水解得到相应的羟基目的物。

3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸与 2-氨基或 4-氨基吡啶缩合未能得到相应的目的物, 而得到化合物 **7** 和 **8**。

苯甲酸酯类的合成: 4-羟基苯甲醛与丙二

腓缩合, 得到 4-羟基苄叉丙二腓, 然后用取代的苯甲酸酯化。

肉桂酰胺类的合成: 肉桂酸经草酰氯活化, 与取代的芳胺缩合而得。2,5-二羟基肉桂酸甲酯按照文献合成^[8]。

图 1 列出了主要目的物中间体的合成途径。

化合物 **1~10** 对 HL-60 白血病来源的 TPK 的抑制活性和对三种癌细胞的细胞毒活性列于表 1。

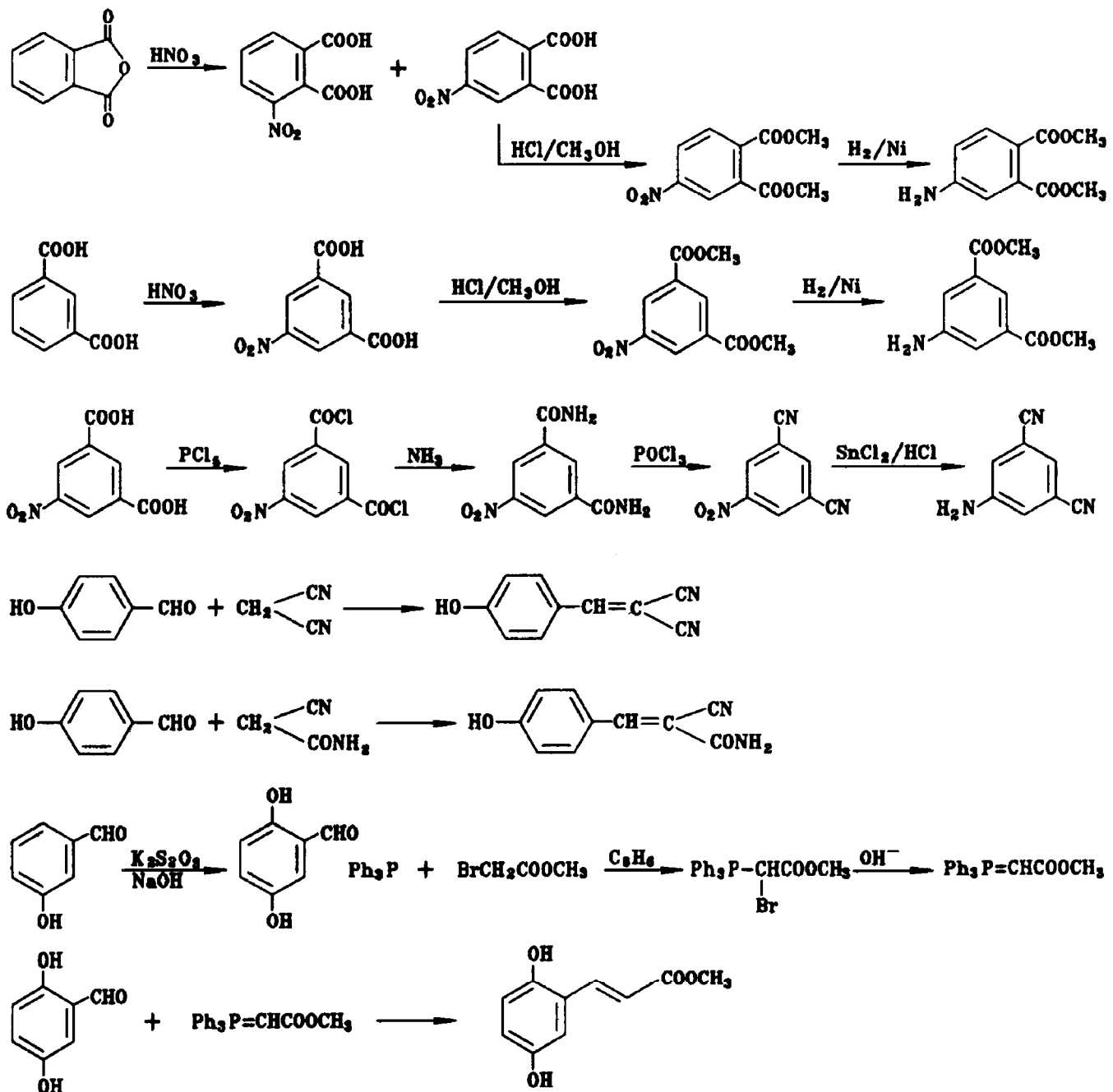


Fig 1 Route of synthesis of some intermediates and methyl 2,5-dihydroxycinnamate.

Tab 1 Structures, TPK inhibitory activities and cytotoxicity of compounds 1~10

No.	Structure	Inhibitory activity	Cytotoxicity ED ₅₀ (mol·L ⁻¹)		
			KB	A-2780	HCT-8
1		70%	4.00×10^{-4}	5.49×10^{-4}	6.31×10^{-4}
2		37%	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
3		0	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	9.12×10^{-4}
4		44%	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
5		0	5.75×10^{-4}	1.65×10^{-4}	5.76×10^{-4}
6		74%	4.46×10^{-4}	2.81×10^{-4}	4.79×10^{-4}
7		0	9.10×10^{-4}	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
8		0	9.10×10^{-4}	7.76×10^{-4}	$>10^{-4}$
9		0	$>10^{-4}$	8.51×10^{-4}	$>10^{-4}$
10		60%	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$

3,4-二羟基苯叉巴比妥酸(1)活性最高, 3-位羟基被醚化(2)活性降低, 两个羟基均被甲醚

化(3)活性消失, 表明苯环的 4-位羟基是必要的。酰胺类化合物的 B 环为带有氯原子取代

的吡啶杂环时活性较高, 嘧啶环则无活性。显然, 活性化合物 A 环上有 1~2 个羟基, B 环有两个或两个以上的杂原子, 提示与文献报道的 TPK 抑制剂的构效关系相一致^[6]。

用三种癌细胞 (KB 细胞, A2780 细胞和 HCT-8 细胞) 进行细胞毒活性试验, 均未呈现毒性, 表明化合物对 TPK 的抑制作用不是由于

细胞毒作用引起的。这为提高选择性作用提示了一定的结构信息。

由于 HL-60 白血病细胞株的培养与 TPK 的萃取较困难, 本文尝试用酶联免疫吸附法 (ELISA), 以正常鼠脾匀浆细胞的质膜部分作为 TPK 来源, 活性结果列于表 2。

Tab 2 Structures and inhibitory activities of compounds 11~25

No.	Structure	Inhibitory activity $IC_{50}(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	No.	Structure	Inhibitory activity $IC_{50}(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
11		3.46×10^{-5}	19		$> 10^{-5}$
12		$> 10^{-5}$	20		3.98×10^{-6}
13		1.07×10^{-5}	21		1.25×10^{-5}
14		$> 10^{-5}$	22		2.51×10^{-5}
15		$> 10^{-5}$	23		1.58×10^{-5}
16		9.10×10^{-6}	24		5.02×10^{-5}
17		$> 10^{-5}$	25		$> 10^{-5}$
18		$> 10^{-5}$			

活性对照物 25 未显示出活性。三甲氧基肉桂酰胺(20~22)和亚甲二氧及肉桂酰胺(23,

24)有一定的抑制作用, 化合物 12, 15, 28 和 29 是含羟基的共轭分子, 却未呈现活性。

两种模型测定的结果不同,可能是由于³²P-ATP参入法用的是HL-60白血病细胞质膜部分,而ELISA法是用正常鼠脾匀浆细胞质膜部分。作为同功酶,它们的活性位点可能是不同的,因而与抑制剂的结合方式未必一致。TPK的来源不同,与它作用所要求的分子结构也就有所差异。

HL-60白血病细胞来源的TPK是从癌细胞中萃取的酶,因而更宜于作为寻找以TPK为靶点的抗癌药物的筛选模型。

实 验 部 分

熔点用电热毛细管法测定,温度未校正。核磁共振仪为JEOL FX-90Q型,TMS为内标;质谱仪为ZAB-2F型;红外光谱仪为Perkin-Elmer-683型,KBr压片;元素分析仪为Carbalo-1106。所有目的化合物均经元素分析,其误差范围不超过计算值的±0.4%。真空液相层析(VLC)和薄层层析用硅胶GF 254,均为青岛海洋化工厂产品。实验用试剂为化学纯或分析纯。

1 3,4-二羟基苕叉巴比妥酸(1)

巴比妥酸1.28 g(10 mmol)热溶于蒸馏水100 ml中,回流搅拌下加入3,4-二羟基苯甲醛1.66 g(12 mmol),生成黄色沉淀,回流1 h,冷却,滤集,少量乙醇洗涤,用水重结晶得黄色结晶1.74 g,收率70.2%,mp >300°C。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 8.09(1H, s, CH=), 6.82(1H, d, J₁ = 9.0 Hz, Ar-H₅), 7.61(1H, dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 3.0 Hz, Ar-H₆), 8.14(1H, d, J₂ = 3.0 Hz, Ar-H₂), 7.36, 10.28(OH, br), 11.00, 11.12(NH)。MS m/z(%): 248(M⁺, 100), 231(18), 204(40), 188(25), 16(20), 134(28)。

同法制得化合物**2,3**和**4**。

2 3-甲氧基-4-羟基苕叉巴比妥酸(2)

收率72.6%, mp 285~287°C(dec)。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 3.79(3H, s, OCH₃), 8.16(1H, s, CH=), 6.86(1H, d, J₁ = 9.0 Hz, Ar-H₅), 7.68(1H, dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 3.0 Hz,

Ar-H₆), 8.34(1H, d, J₂ = 3.0 Hz, Ar-H₂)。MS m/z(%): 263(M⁺ + 1, 100), 262(M⁺, 20), 219(15), 177(1)。

3 3,4-二甲氧基苕叉巴比妥酸(3)

收率70.7%, mp 309~310°C。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 3.80(3H, s, OCH₃), 3.84(3H, s, OCH₃), 8.20(1H, s, CH=), 7.05(1H, d, J₁ = 9.0 Hz, Ar-H₅), 7.84(1H, dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 3.0 Hz, Ar-H₆), 8.34(1H, d, J₂ = 3.0 Hz, Ar-H₂), 11.09, 11.19(NH)。MS m/z(%): 276(M⁺, 100), 261(10), 232(8), 218(22), 190(15), 175(8)。

4 3,4-亚甲二氧基苕叉巴比妥酸(4)

收率88.5%, mp >310°C(dec)。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 6.14(2H, s, OCH₂O), 8.16(1H, s, CH=), 7.00(1H, d, J₁ = 9.0 Hz, Ar-H₅), 7.68(1H, dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 3.0 Hz, Ar-H₆), 8.18(1H, d, J₂ = 3.0 Hz, Ar-H₂), 11.06, 11.18(NH)。MS m/z(%): 260(M⁺, 100), 232(8), 216(30), 173(15), 145(11), 103(5)。

5 N-(2-嘧啶基)-3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酰胺(5)

3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸2.5 g(10 mmol)与氯化亚砷5 ml混合成悬浮液,回流20 min得浅黄色澄明溶液。减压蒸出过量的氯化亚砷,剩余物中加少量石油醚(60~90°C)并减压蒸出以带走多余的氯化亚砷,得白色固体。

2-氨基嘧啶0.95 g(10 mmol)溶于无水吡啶5 ml,回流搅拌下,分次加入上述固体,回流9 h,得棕色澄明溶液。冷却,用10%稀HCl调至中性,滤集固体,水洗,干燥,乙醇重结晶得白色固体**5** 2.53 g,收率77.4%, mp 262~264°C。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 1.46(18H, s, *t*-Bu), 7.00(1H, t, J = 4.8 Hz, Py-H₄), 7.74(2H, s, Ar-H_{2,6}), 8.62(2H, d, J = 4.8 Hz, Py-H_{3,5})。MS m/z(%): 327(M⁺, 12), 233(100)。

同法制得化合物**6,7,8**。

6 N-[2-(5-氯嘧啶基)]-3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酰胺(6)

mp 221~222°C, 收率 80.5%。¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.50(18H, s, *t*-Bu), 7.70(1H, dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, Py-H₅), 7.72(2H, s, Ar-H_{2,6}), 8.16(1H, d, $J_1 = 8.0$ Hz, Py-H₆)。MS *m/z* (%): 360(M⁺, 10), 233(100)。

7 N-(2-吡啶基)-4-(3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酰氧基)-3,5-二叔丁基苯甲酰胺(7)

mp 295~297°C。IR (KBr) cm⁻¹: 3450, 2976, 1740, 1660, 1515, 1440, 1302, 1232, 1115。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.36(18H, s, *t*-Bu), 7.47(18H, s, *t*-Bu), 7.87(2H, s, Ar_a-H), 7.99(2H, s, Ar_b-H), 8.48(2H, s, Py-H_{4,6}), 8.54(2H, s, Py-H_{3,5})。

8 N-(4-吡啶基)-4-(3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酰氧基)-3,5-二叔丁基苯甲酰胺(8)

mp 239~241°C。IR (KBr) cm⁻¹: 3450, 3450, 2980, 1740, 1660, 1515, 1440, 1305, 1230, 1195, 1115。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.40(18H, s, *t*-Bu), 1.51(18H, s, *t*-Bu), 7.93(2H, s, Ar-H), 8.05(2H, s, Ar'-H), 8.16(4H, m, Py-H_{4,6}), 8.54(2H, s, Py-H_{3,5})。

9 N-(2-嘧啶基)-3,4-二羟基苯甲酰胺(9)

3,4-二乙酰氧基苯甲酸按文献^[7]制得, 收率 64.2%, mp 154~156°C (77.1%, 155~156°C)^[7]。

3,4-二乙酰氧基苯甲酸 2.6 g (11 mmol), 加氯化亚砷 5 ml, 呈悬浮液, 回流 20 min, 减压蒸去氯化亚砷, 得棕黄色粘稠物。

2-氨基嘧啶 0.95 g (10 mmol), 加无水二氯甲烷 10 ml, 三乙胺 0.6 g, 混合物在冰浴搅拌下, 加入上述粘稠物于无水二氯甲烷 10 ml 中的溶液, 回流 2 h。蒸去溶剂, 加水 30 ml, 用 10% 稀 HCl 调至中性, 滤集, 得 *N*-(2-嘧啶基)-3,4-二乙酰氧基苯甲酰胺 1.68 g, 收率 72.7%, mp 190~192°C。

N-(2-嘧啶基)-3,4-二乙酰氧基苯甲酰胺 0.79 g (2.5 mmol), 甲醇 3.5 ml, NaOH 0.33 g, 水 0.2 ml。混合室温搅拌 3.5 h, 滴加稀 HCl 调至 pH 5, 滤集, 水洗, 干燥, DMF 重结晶得白色固体 **9** 0.32 g, 收率 29.5%, mp 252~253°C。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 6.75(1H, d, $J = 9.6$ Hz, Ar-H₅), 7.36(2H, m, Ar-H_{2,6}), 7.15(1H, t, $J = 5.1$ Hz, Py-H₄), 8.62(2H, d, $J = 5.1$ Hz, Py-H_{3,5}), 9.13, 9.52, 10.49(NH, 2 × OH, 加入 D₂O 消失)。MS *m/z* (%): 231(M⁺, 31), 202(11), 137(100)。

同法制得化合物 **10**~**15**。

10 N-[2-(5-氯嘧啶基)]-3,4-二羟基苯甲酰胺(10)

中间体 *N*-[2-(5-氯嘧啶基)]-3,4-二乙酰氧基苯甲酰胺 mp 126~131°C。

化合物 **10** mp 260~261°C, 收率 89.4%。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 6.76(1H, d, $J_1 = 9.6$ Hz, Ar-H₅), 7.44(2H, m, Ar-H_{2,6}), 7.87(1H, dd, $J_1 = 9.6$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, Py-H₅), 8.16(1H, d, $J_1 = 8.0$ Hz, Py-H₆), 8.36(1H, d, $J_2 = 3.6$ Hz, Py-H₃), 9.16, 9.60, 10.47(NH, 2 × OH, 加入 D₂O 消失)。MS *m/z* (%): 264(M⁺, 40), 137(100)。

11 N-(3,4-二甲氧羰基苯基)-3,4-乙酰氧基苯甲酰胺(11)

4-氨基-1,2-苯二酸甲酯, 收率 26.0%, mp 84~86°C。

3,4-二乙酰氧基苯甲酸 1.24 g (5.2 mmol), 加氯化亚砷 5 ml, 回流 30 min, 减压蒸去氯化亚砷后得酰氯棕黄色粘稠物。溶于无水乙醚 10 ml, 室温搅拌下滴加到 4-氨基-1,2-苯二酸甲酯 1.5 g (5 mmol) 和无水吡啶 5 ml 的溶液中, 室温搅拌 4 h。减压蒸去乙醚, 加水 10 ml, 用 10% 稀 HCl 调至 pH 5, 乙醚提取, 无水 Na₂SO₄ 干燥, VCL 分离得白色固体 1.42 g, 收率 66%, mp 138~140°C。¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 2.29(3H, s, CH₃C=O), 3.87(3H, s, CH₃O), 3.90(3H, s, CH₃O), 7.22(1H, d, $J = 9.0$ Hz, Ar_a-H₅), 7.68(2H, m, Ar_a-H_{2,6}), 7.80~7.96(3H, m, Ar_b-H)。MS *m/z* (%): 429(M⁺, 10), 398(10), 345(30), 313(95), 209(25), 179(70), 137(100)。

12 N-(3,4-二甲氧羰基苯基)-3,4-羟基苯甲

酰胺(12)

N-(3,4-二甲氧羰基苯基)-3,4-乙酰氧基苯甲酰胺 300 mg (0.7 mmol), 加甲醇 2 ml, NaOH 100 mg, 室温搅拌 10 min, 稀 HCl 中和至 pH 5, 乙酸乙酯提取, VCL 分离得白色固体 130 mg, 收率 53.7%, mp 208~210°C。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 3.79(3H, s, CH₃O), 3.82(3H, s, CH₃O), 6.81(1H, d, J = 9.6 Hz, Ar_a-H₅), 7.36(2H, m, Ar_a-H_{2,6}), 7.74(1H, d, J = 9.6 Hz, Ar_b-H₅), 7.92~8.11(2H, m, Ar_b-H_{2,6})。MS m/z(%): 345(M⁺, 5), 313(47), 209(25), 178(40), 137(100)。

13 N-(3,5-二甲氧羰基苯基)-3,4-乙酰氧基苯甲酰胺(13)

5-氨基-1,3-苯二甲酸甲酯收率 51.4%, mp 169~170°C。

化合物 13 收率 37.2%, mp 143~145°C。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 2.32(6H, s, CH₃C=O), 3.93(6H, s, CH₃O), 7.24(1H, d, J = 7.2 Hz, Ar_a-H₅), 7.70(2H, m, Ar_a-H_{2,6}), 8.12(1H, s(br.), Ar_b-H₄), 8.46(2H, d, J = 1.8 Hz, Ar_b-H_{2,6})。MS m/z(%): 429(M⁺, 5), 398(10), 345(40), 209(88), 179(50), 137(100)。

14 N-(3,5-二氰基苯基)-3,4-乙酰氧基苯甲酰胺(14)

5-氨基-1,3-苯二甲腈: 收率 83.8%, mp 188~190°C。

化合物 14 收率 42.4%, mp 210~212°C。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 2.32(6H, s, CH₃=O), 7.64(1H, d, J = 9.0 Hz, Ar_a-H₄), 7.86(1H, s, Ar_a-H₂), 7.89(1H, d, J = 9.0 Hz, Ar_a-H₆), 8.16(1H, t, Ar_b-H₄), 8.41(2H, d, H_{2,6})。MS m/z(%): 363(M⁺, 1.2), 321(14), 279(30), 221(18), 179(42), 137(100)。

15 N-(3,4-二甲氧羰基苯基)-3,4-二羟基苯甲酰胺(15)

收率 83.5%, mp 206~208°C。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 3.84(6H, s, (br.), CH₃O), 6.46(1H, s, (br.), Ar_a-H₄), 6.81(2H,

d, J = 1.8 Hz, Ar_a-H_{2,6}), 7.78(1H, d, J₁ = 7.2 Hz, Ar-H₅), 7.98(1H, d, J = 1.2 Hz, Ar_b-H), 8.12(1H, dd, J₁ = 7.2 Hz, J₂ = 1.2 Hz, Ar_b-H₆)。MS m/z(%): 345(M⁺, 8), 313(30), 178(10), 137(100)。

16 对-[(2,2-二氰基乙烯基)苯基]-3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸酯(16)

对羟基苜叉丙二腈: 收率 82.9%, mp 188~189°C。

对羟基苜叉丙二腈 0.85 g (5 mmol) 溶于无水吡啶 5 ml, 室温搅拌下加入 3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酰氯 1.26 g (5 mmol) 溶在无水乙醚 10 ml 中的溶液, 立即产生沉淀。室温搅拌 2 h, 减压蒸去乙醚, 稀 HCl 中和, 立即固化, 乙醇重结晶得白色固体 1.5 g, 收率 75%, mp 151~152°C。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: (18H, s, *t*-Bu), 7.31~7.80(4H, dd, J = 16.2 Hz, Ar_b-H), 7.99(3H, s(br.), Ar-H, CH=)。MS m/z(%): 402(M⁺, 0.1), 388(1.7), 233(100), 218(12), 170(10)。

同法制得 17, 18, 19。

17 对-[(2,2-二氰基乙烯基)苯基]-3,5-二乙酰氧基苯甲酸酯(17)

收率 50.4%。mp 178~180°C。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 1.23(6H, s, 2×CH₃CO), 7.19(1H, s, Ar_a-H₄), 7.29~7.80(4H, dd, J = 18 Hz, Ar_b-H), 7.75(2H, d, J = 1.8 Hz, Ar_a-H_{2,6}), 7.99(1H, s, CH=)。MS m/z(%): 221(100), 179(70), 137(70)。

18 对-[(2-氰基-2-氨甲酰基乙烯基)苯基]-3,4-二羟基苯甲酸酯(18)

对羟基苜叉氰基乙酰胺: 收率 79.8%。mp 242~244°C。

化合物 18: 收率 37.4%, mp 190~193°C。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 6.19(1H, d, J = 9.0 Hz, Ar_a-H₅), 7.96(1H, s, CH=), 7.41~8.91(6H, m, Ar_a-H_{2,6}, Ar_b-H)。MS m/z(%): 324(M⁺, 0.3), 221(10), 179(50), 137(100)。

19 对-[(2-氰基-2-氨甲酰基乙烯基)苯基]-3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸酯(19)

收率 57.1%, mp 204 ~ 206°C。¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.47(18H, s, *t*-Bu), 5.76(1H, s, OH, 加入 D₂O 消失), 7.30, 7.95(4H, dd, J = 9.0 Hz, Ar_b-H), 7.95(1H, s, Ar_a-H_{2,6}), 8.26(1H, s, CH =)。MS m/z(%): 233(100), 218(10)。

20 N-(2,5-二氯苯基)-3,4,5-三甲氧基肉桂酰胺(20)

3,4,5-三甲氧基肉桂酸 0.6 g(2.5 mmol), 加无水乙醚 15 ml, 草酰氯 2 ml, 室温搅拌 2 h, 减压蒸去乙醚及草酰氯, 得黄色固体。将固体溶在无水乙醚 20 ml 中, 加到 2,5-二氯苯胺 0.4 g(2.5mmol) 溶在无水吡啶 5 ml 的溶液中, 室温搅拌 2 h, 蒸去乙醚, 稀 HCl 中和后得白色固体 8.1 g, 收率 84.8%, mp 152 ~ 154°C。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 3.91(3H, s, OCH₃), 3.93(6H, s, 2 × OCH₃), 6.46, 7.70(2H, dd, J = 16.2 Hz, CH = CH), 6.80(2H, s, Ar_a-H_{2,6}), 7.03(1H, dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 3.0 Hz, Ar_b-H₄), 7.12(1H, d, J₁ = 9.0 Hz, Ar_b-H₃), 8.66(1H, d, J₂ = 3.0 Hz, Ar_b-H₆)。MS m/z(%): 381(M⁺, 13), 221(100)。

同法制得 **21, 22, 23, 24**。

21 N-(3,5-二甲氧羰基苯基)-3,4,5-三甲氧基肉桂酰胺(21)

收率 82.5%, mp 202 ~ 203°C。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 3.92(6H, s, Ar_b-OCH₃), 3.79(3H, s, 2 × OCH₃), 3.86(6H, s, OCH₃), 6.72, 7.60(2H, dd, J = 16.2 Hz, CH = CH), 6.96(2H, s, Ar_a-H_{2,6}), 8.19(1H, t, J = 1.8 Hz, Ar_b-H₄), 8.58(2H, d, J = 1.80 Hz, Ar_b-H_{2,6})。MS m/z(%): 429(M⁺, 20), 221(100)。

22 N-(3,5-二羧基苯基)-3,4,5-三甲氧基肉桂酰胺(22)

收率 81.6%, mp 297 ~ 298°C。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 3.73(3H, s, OCH₃), 3.84(6H, s, 2 × OCH₃), 6.75, 7.59(2H, dd, J = 15.6 Hz, CH = CH), 6.99(2H, s, Ar_a-H_{2,6}), 8.17(1H, t, J = 1.8 Hz, Ar_b-H₄), 8.55(2H, d, J = 1.8 Hz, Ar_b-H_{2,6})。MS m/z(%): 401(M⁺, 12),

221(100)。

23 N-(2,5-二氯苯基)-3,4-亚甲二氧基肉桂酰胺(23)

收率 74.3%, mp 170 ~ 172°C。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 6.01(2H, s, OCH₂O), 6.19, 7.70(2H, dd, J = 16.2 Hz, CH = CH), 6.83 ~ 7.31(5H, m, Ar_a-H, Ar_b-H_{3,4}), 8.64(1H, d, J₂ = 3.0 Hz, Ar_b-H₆)。MS m/z(%): 336(M⁺, 5), 175(100), 145(30), 117(20), 89(30)。

24 N-(3,5-二甲氧羰基苯基)-3,4-亚甲二氧基肉桂酰胺(24)

收率 74.0%, mp 210 ~ 212°C。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 3.92(6H, s, 2 × OCH₃), 6.09(2H, s, OCH₂O), 6.60, 7.56(2H, dd, J = 16.2 Hz, CH = CH), 6.92 ~ 7.20(3H, m, Ar_a-H), 8.16(1H, s(br), Ar_b-H₄), 8.57(2H, d, J = 1.8 Hz, Ar_b-H_{2,6})。MS m/z(%): 383(M⁺, 15), 175(100), 145(30), 117(20), 89(30)。

25 2,5-二羟基肉桂酸甲酯(25)

按文献^[8]合成, 收率 50.6%, mp 169 ~ 172°C (80.1%, mp 171 ~ 172°C)^[8]。¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 3.76(6H, s, 2 × OCH₃), 6.49, 6.84(2H, dd, J = 16.2 Hz, CH = CH), 6.78 ~ 7.02(3H, m, Ar-H)。MS m/z(%): 194(M⁺, 32), 162(98), 134(100), 105(15)。

参 考 文 献

- 1 Chang CJ, Geajlen RL. Protein tyrosine kinase inhibition: mechanism-based discovery of antitumor agents. *J Nat Prod*, 1992, **55**: 1429
- 2 庞素华, 郭宗儒. 酪氨酸蛋白激酶抑制剂的研究进展. *药学报*, 1996, **31**: 75
- 3 Chen HX, Bioziau J, Parker F, *et al*. Synthesis and structure-activity studies of a series of [(hydroxybenzyl)amino] salicylates as inhibitors of EGF receptor-associated tyrosine kinase activity. *J Med Chem*, 1993, **36**: 4094

- 4 Chen HX, Bioziau J, Parker F, *et al.* Structure-activity relationships in a series of 5-[(2, 5-dihydroxybenzyl) amino] salicylate inhibitors of EGF-receptor associated tyrosine kinase: importance of additional hydrophobic aromatic interactions. *J Med Chem*, 1994, **37**: 845
- 5 Thompson AM, Bridges A, Fry DW, *et al.* Tyrosine kinase inhibitors. 7, 7-amino-4-(phenylamino)- and 7-amino-4-[(phenylmethyl) amino]pyrido[4,3-d]pyrimidines: a new class of inhibitors of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. *J Med Chem*, 1995, **38**: 3780
- 6 郭宗儒, 后藤了, 杨光中, 等. 用定量构效关系分析进行酪氨酸激酶抑制剂的结构类型衍化. 药学学报, 1992, **27**: 90
- 7 Kureha Chemical Industry Co. Ltd. Dihydroxybenzamide derivs. *JP* 58,954,1985. *CA*: 1985, **103**: 123132x
- 8 Umezawa K, Hori T, Tajima H, *et al.* Inhibition of epidermal growth factor-induced DNA synthesis by tyrosine kinase inhibitors. *FEBS Lett*, 1990, **260**: 198

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF TYROSINE PROTEIN KINASE INHIBITORS

SH Pang, ZR Guo* and XT Liang

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences
and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT Four classes of 25 tyrosine protein kinase (TPK) inhibitors were designed and synthesized. Compounds **1** ~ **10** were tested to inhibit TPK of HL-60 leukemia cell using ^{32}P -ATP method, and some of them exhibit evident inhibitory activities. Their structure-activity relationship is similar to that of TPK inhibitors reported in literatures. Compounds **11** ~ **25** were tested to inhibit TPK of normal rat spleen cell using ELISA method and their SAR is different from that using ^{32}P -ATP method.

KEY WORDS Tyrosine protein kinase; Inhibitors; SAR