

萘甲酰胺衍生物 TW918 的合成及体外活性考察

王立强, 雷春花, 邱飞, 杨会勇

(华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 合成一系列萘甲酰胺衍生物,初步筛选出先导化合物 TW918,测定其对肿瘤细胞的活性影响,考察其与激酶分子 EGFR 的结合性及对 EGFR 蛋白表达的影响. TW918 结构经¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 HR-MS 表征确证. 实验结果表明: TW918 对四种肿瘤细胞均有一定的抑制活性,但对正常细胞的影响较小;分子对接显示 TW918 能以母核喹啉为头,深入占据到 EGFR 的活性口袋中,并与活性残基形成氢键,其最低自由结合能为 $-46.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; TW918 能以剂量依赖性方式明显抑制四种肿瘤细胞中 EGFR 蛋白的表达.

关键词: 萘甲酰胺衍生物; 受体酪氨酸激酶; 抗肿瘤活性; 分子对接

中图分类号: R 916

文献标志码: A

随着分子医学和分子生物学的发展,抗癌药物的研究已从传统的、非特异的细胞毒药物向作用于多信号传导分子、多环节的选择性靶向抗癌药物发展^[1-2]. 在各种分子靶点中,蛋白酪氨酸激酶是目前国际上抗肿瘤药物研发的热点^[3]. 本课题组针对现有酪氨酸激酶抑制剂的空间结构特点^[4-5],整合计算机辅助药物设计手段,以及生物电子等排、骨架迁越原理设计合成了一系列结构新颖的活性喹啉类萘甲酰胺衍生物,以期发现具有更高抗癌活性、更低毒性和更高生物利用度的小分子靶向药物. 经前期体外活性验证及结构优化,从中筛选出候选化合物 TW918(a),化学名称为 N-(2-苯胺基)-6-(7-氯喹啉-4-醚氧基)-2-萘酰胺,分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2$,相对分子质量为 439. 本文主要对 TW918 的合成方法、体外抗肿瘤活性、与 EGFR 蛋白的结合性及抑制作用进行研究.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

4,7-二氯喹啉、6-羟基-2-萘甲酸和邻苯二胺(百灵威科技有限公司);其他合成试剂(国药集团化学试剂公司);人小细胞肺癌 NCI-H446、人非小细胞肺癌 A549、人食管癌 Eca-109、人肝癌 HepG2、正常人脐静脉内皮细胞 HUVEC 和正常人胚肺成纤维细胞 MRC-5(上海中科院细胞库);正常人肝细胞 LO2 和正常人食管上皮细胞 HEEC(ATCC);RPMI-1640、MEM、F-12K 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);二甲基亚砜(DMSO)、四氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司);兔抗人 EGFR 抗体、兔抗人 Actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(美国 Abcam 公司);超敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究所);吉非替尼对照品(大连美仑生物技术有限公司);THF(四氢呋喃)和 DCM(二氯甲烷)经分子筛干燥后直接使用;其他溶剂未特别指出则未经处理.

TLC 硅胶板和柱层析硅胶(青岛海洋化工厂);96 孔细胞培养板(美国 Corning 公司);Q Exactive 型高分辨质谱仪(美国 Thermo 公司);AV400 型核磁共振(德国 Bruker 公司);WRR 熔点仪(上海精密科学仪器有限公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);Infinite M200 型全功能酶仪(瑞士 Tecan 公司);

收稿日期: 2015-02-09

通信作者: 王立强(1970-),男,教授,博士,主要从事药剂学和新药开发的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2010J01208);福建省泉州市科技计划重点项目(2013Z35)

HJ-4 型四联磁力搅拌机(江苏金坛市天竟实验仪器厂);BS224S 型电子天平(德国 Sartorius 公司);Forma-86 ℃超低温冰箱(美国 Thermo 公司);ChemiDoc XRS 型凝胶成像系统、Mini-PROTEAN Tetra C 型垂直板电泳和转膜装置(Bio-Rad 公司).

1.2 TW918 的合成方法

目标化合物 TW918 的合成路线,如图 1 所示.

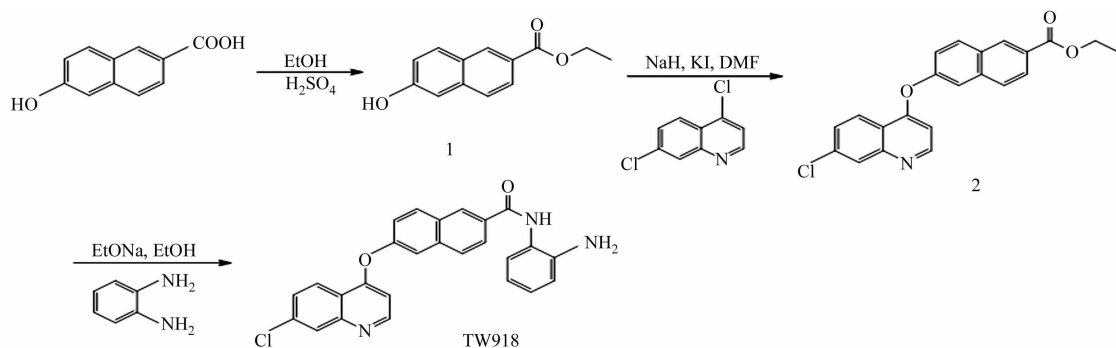


图 1 TW918 的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of TW918

1.2.1 6-羟基-2-萘甲酸乙酯(1)的合成 称取 1.88 g(10 mmol)6-羟基-2-萘甲酸溶于 50 mL 无水乙醇,搅拌下加入 4 滴浓硫酸,78~85 ℃加热回流 4~5 h. TLC 监测反应结束后,将反应液冷却,减压除去溶剂,残留物用 10 mL 乙酸乙酯溶解. 饱和碳酸氢钠萃取 3 次,每次 10 mL,收集有机相加入无水硫酸钠静置干燥,30 min 后减压除去溶剂,得到棕色固体(1)1.99 g,产率为 92%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO), δ 值:8.56(d, $J=8.62$ Hz, 1H), 8.02(dd, $J=8.61$ Hz, 1.88 Hz, 1H), 7.86(d, $J=8.46$ Hz, 1H), 7.69(d, $J=8.50$ Hz, 1H), 7.22(s, 1H), 7.19(dd, $J=8.72$ Hz, 2.42 Hz, 1H), 6.11(s, 1H), 4.48(q, $J=7.01$ Hz, 2H), 1.47(t, $J=7.05$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO), δ 值:17.56, 60.05, 125.02, 127.04, 127.13, 129.16, 130.42, 130.64, 131.62, 132.04, 138.39, 142.37, 163.72.

1.2.2 6-(7-氯喹啉-4-醚氧基)-2-萘甲酸乙酯(2)的合成 称取 2.16 g(10 mmol)6-羟基-2-萘甲酸乙酯溶于 50 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF). 冰浴搅拌下,缓慢滴加含有 0.48 g(20 mmol)氢化钠(NaH)的 DMF 溶液 5 mL,冰浴搅拌 30 min,撤去冰浴. 待温度恢复至室温,缓慢滴入含有 1.97 g(10 mmol)4,7-二氯喹啉以及 0.33 g(2 mmol)碘化钾(KI)的 DMF 溶液 10 mL,室温搅拌 30 min,110 ℃下反应 6~10 h. TLC 监测反应结束后,减压除去溶剂,加入 15 mL 甲醇超声溶解,重复洗涤 3 次,真空干燥,得白色固体(2)3.20 g,产率为 85%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO), δ 值:8.76(d, $J=9.02$ Hz, 1H), 8.73(dd, $J=8.74$ Hz, 2.13 Hz, 1H), 8.36(d, $J=8.54$ Hz, 1H), 8.14(d, $J=8.62$ Hz, 1H), 8.04(s, 1H), 7.92(dd, $J=8.80$ Hz, 2.56 Hz, 1H), 7.73(d, $J=7.04$ Hz, 1H), 7.62(dd, $J=7.24$ Hz, 1.86 Hz, 1H), 6.82(s, 1H), 8.06(d, $J=7.80$ Hz, 1H), 6.84(d, $J=8.54$ Hz, 1H), 4.40(q, $J=7.14$ Hz, 2H), 1.39(t, $J=7.21$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO), δ 值:18.72, 60.63, 109.24, 116.07, 119.68, 122.50, 124.21, 126.47, 126.65, 127.73, 128.74, 128.90, 130.24, 131.18, 132.41, 135.61, 139.76, 140.83, 151.02, 156.20, 161.08, 164.46.

1.2.3 N-(2-苯胺基)-6-(7-氯喹啉-4-醚氧基)-2-萘甲酰胺(TW918)的合成 称取 6-(7-氯代喹啉-4-醚氧基)-2-萘甲酸乙酯 3.78 g(10 mmol)溶于 10 mL 乙醇. 冰浴搅拌下,缓慢滴加含有 1.56 g(20 mmol)乙醇钠(NaOEt)的乙醇溶液 5 mL,冰浴搅拌 30 min,撤去冰浴. 待温度恢复至室温,缓慢滴入含有 1.08 g(10 mmol)邻苯二胺的乙醇溶液 10 mL,搅拌 30 min,78~85 ℃下反应 6~10 h. TLC 监测反应完全后,将反应液用饱和碳酸氢钠和食盐水分别萃取 3 次,每次 15 mL. 收集有机相无水硫酸钠干燥 30 min,减压除去溶剂,再将固体与适量硅胶搅拌均匀,以体积比为 3:1 的石油醚:乙酸乙酯为洗脱剂进行硅胶柱层析分离得到白色固体(TW918)3.70 g,产率为 83%,熔点为 165.7~166.4 ℃. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO), δ 值:9.88(s, 1H), 8.76(d, $J=5.27$ Hz, 1H), 8.46(d, $J=9.29$ Hz, 1H), 8.42(d, $J=9.03$ Hz, 1H), 8.14(d, $J=2.01$ Hz, 1H), 8.10(d, $J=8.28$ Hz, 1H), 7.97(d, $J=2.50$ Hz, 1H), 7.91

(d, $J=6.78$ Hz, 1H), 7.73(dd, $J=9.03$ Hz, 2.26 Hz, 1H), 7.68(t, $J=15.31$ Hz, 8.03 Hz, 1H), 7.62 (dd, $J=2.51$ Hz, 9.29 Hz, 1H), 7.37(brt, $J=8.03$ Hz, 6.78 Hz, 1H), 7.01(t, $J=13.80$ Hz, 6.53 Hz, 1H), 6.83(d, $J=9.03$ Hz, 1H), 6.77(d, $J=5.27$ Hz, 1H), 6.65(t, $J=14.81$ Hz, 7.78 Hz, 1H), 5.00 (s, 2H). ^{13}C -NMR (400 MHz, DMSO), δ 值: 110.88, 113.01, 116.20, 116.40, 121.11, 121.43, 121.82, 121.96, 124.09, 124.65, 125.25, 125.64, 125.97, 127.30, 128.50, 128.78, 133.27, 134.23, 134.62, 136.63, 141.52, 142.99, 151.27, 156.41, 157.04, 163.29. HR-MS (+), m/z 为 440.884 6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{H}^+$ calcd: 440.884 9).

1.3 细胞培养

NCI-H446, Eca-109, LO2 和 HEEC 细胞单层接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基; HepG2 和 MRC-5 细胞单层接种于含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基; A549 和 HUVEC 细胞单层接种于含 10% 胎牛血清的 F-12K 培养基中, 分别置于 37℃, 5% 二氧化碳培养箱中培养.

1.4 MTT 法测定 TW918 对肿瘤细胞的抑制活性

取对数生长期的 NCI-H446, A549, Eca-109, HepG2, HUVEC, LO2, MRC-5 和 HEEC 细胞用体积浓度为 0.25% 的胰酶消化, 制成 $1\times 10^4\text{ mL}^{-1}$ 悬液接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL . 细胞完全贴壁后, 分别给予不同浓度的 TW918, 每组 3 个复孔, 阳性对照组为吉非替尼(Gefinitib), 阴性对照组为 DMSO. 分别孵育 72 h 后, 每孔加入 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 20 μL , 继续培养 4 h, 吸弃培养液, 加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min 使结晶物充分溶解, 用酶标仪在 570 nm 处测定各孔的吸光值, 采用 SPSS 17.0 软件计算半数抑制浓度(IC_{50}). 重复测试 3 次, 取平均值为最终结果.

1.5 分子对接软件考察 TW918 与受体激酶 EGFR 的亲合力

运用 AutoDock 4.2.5 软件将 TW918 与受体激酶 EGFR 进行分子对接, 计算 TW918 与 EGFR (PDB ID: 4HJO) 靶蛋白的自由结合能, 模拟在自由结合能最低的情况下化合物与 EGFR 蛋白结合的空间构象, 探讨其与受体间的亲合力, 确定活性腔内与配体结合的关键残基^[8].

1.6 Western Blot 检测受体激酶 EGFR 蛋白的表达

将 NCI-H446, A549, Eca-109 和 HepG-2 细胞以 5×10^5 个 \cdot 孔 $^{-1}$ 的密度接种于 96 孔板中. 细胞完全贴壁后, 分别给予不同浓度的化合物 (2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TW918, DMSO 含量为 0.1%), 阴性对照组给予同体积的 DMSO. 给药 48 h 后吸弃培养基, 用预冷的 $1\times\text{PBS}$ 洗涤细胞 2 次, 每孔加入 150 μL Western 及 IP 细胞裂解液, 冰浴裂解 30 min, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集上清液, 以 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质. 电泳后, 将蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后, 一抗 4℃ 封闭过夜, 再以辣根过氧化物酶标记的二抗室温封闭 2 h, ECL 显色液显色 1~2 min, 转移到荧光成像仪内曝光、检测, 实验重复 3 次.

2 结果与讨论

2.1 TW918 的合成

合成的小分子化合物 TW918 是一种新的喹啉类萘甲酰胺衍生物. 合成反应中, 首先利用无水乙醇保护 6-羟基-2-萘甲酸的羧酸基团; 然后, 将其与 4,7-二氯喹啉进行亲核取代, 再胺解得到 TW918, 其产率为 64.9%. 此法操作简便, 原料便宜易得, 反应效率高, 易于进行工业化生产.

2.2 TW918 的体外抗肿瘤活性

采用四氮唑盐(MTT)^[6] 还原法, 选择人小细胞肺癌 NCI-H446, 非小细胞肺癌 A549, 食管癌 Eca-109 和肝癌 HepG2 四种肿瘤细胞模型, 以吉非替尼为阳性对照, 对合成的目标化合物进行体外抗肿瘤活性评价, 并以人正常脐静脉内皮细胞 HUVEC、肝细胞 LO2、胚肺成纤维细胞 MRC-5 和食管上皮细胞 HEEC 考察化合物的体外毒性, 结果如表 1 所示. 表 1 中: $n=3$; 与吉非替尼比较, a 表示 $P<0.01$, b 表示 $P<0.001$.

由表 1 可知: TW918 对 NCI-H446, A549, Eca-109 和 HepG2 四种肿瘤细胞的抑制活性均高于吉非替尼; 其中, 对人非小细胞肺癌 A549 和人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用较强, 表明化合物 TW918 可能具有潜在对肺癌、食管癌和肝癌的治疗作用. 但对 HUVEC, LO2, MRC-5 和 HEEC 四种正常细胞而言,

TW918 和吉非替尼对它们的抑制作用明显弱于对肿瘤细胞的作用,预示 TW918 相对较为安全.

表 1 TW918 对肿瘤细胞和正常细胞的体外抗增殖活性 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Anti-proliferation activity of TW918 on tumor cells and normal cells *in vitro* ($\bar{x}\pm s$)

化合物	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹							
	NCI-H446	A549	Eca-109	HepG2	HUVEC	LO2	MRC-5	HEEC
TW918	0.88±0.74 ^a	0.18±0.57 ^a	1.04±0.90 ^b	0.39±0.28 ^b	107±4.86 ^b	69.1±2.91 ^b	74.6±1.86	110±0.86 ^b
吉非替尼	6.58±1.43	3.71±0.97	10.36±1.27	5.37±0.86	83.1±3.84	102±0.16	72.5±2.73	92.1±1.66

2.3 TW918 与受体激酶 EGFR 的分子对接验证

运用 AutoDock 4.2.5 软件^[7]模拟底物小分子 TW918 与受体激酶 EGFR 的分子对接,如图 2 所示.结果表明:TW918 能以母核喹啉为头,深入占据到 EGFR 的活性口袋中与 ATP 结合位点结合(图 2),其中萘环结合激酶的疏水区域,喹啉环类似于 ATP 的腺苷片段,与激酶的“铰链区”结合,其最低自由结合能为-46.1 kJ·mol⁻¹,提示 TW918 可能具有潜在的 EGFR 抑制活性.

一般认为,小分子抑制剂与靶酶结合,起主要相互作用的是抑制剂周围的氨基酸残基,而这些氨基酸残基可认为是活性残基. TW918 与 EGFR 活性残基的对接作用模式,如图 3 所示. 由图 3 可知: TW918 上喹啉环与萘环间的醚键氧原子与 LYS721 残基上的氢发生了氢键相互作用,键长约为 0.22 nm. 氢键的形成有利于化合物分子更好地占据靶蛋白分子的活性口袋,提高与靶蛋白结合的紧密性.

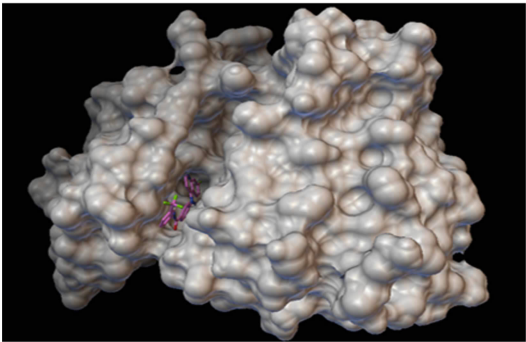


图 2 TW918 与 EGFR 活性位点的立体对接图

Fig. 2 Stereo view of TW918 bound in the active site of EGFR

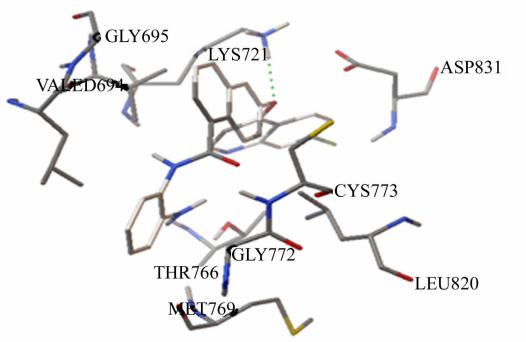


图 3 TW918 与 EGFR 活性残基的对接作用模式

Fig. 3 Docking interaction pattern of EGFR active residues with TW918

2.4 TW918 对 EGFR 蛋白表达的抑制作用

采用 Western Blot 研究 TW918 对 SMMC-7721, A549, Eca-109 和 SMMC-7721 细胞 EGFR 蛋白表达的影响,结果如图 4 所示. 由图 4 可知:与阴性对照组(DMSO)相比,TW918 能明显抑制四种肿瘤细胞中 EGFR 蛋白的表达,且该结果呈剂量依赖性,验证了分子对接结果,表明该化合物可能通过与受体酪氨酸激酶 EGFR 结合,抑制其表达,从而发挥体外抗肿瘤活性.

3 结论

文中合成的小分子化合物 TW918 是一种新的喹啉类萘甲酰胺衍生物,化合物结构经核磁共振氢谱、碳谱和高分辨质谱表征确证. MTT 结果显示:TW918 对肿瘤细胞具有一定的抑制活性,但对正常细胞影响较小. 分子对接结果表明:TW918 能很好地深入 EGFR 蛋白的活性口袋中,并与活性口袋周围的氨基酸残基形成氢键,具有潜在的 EGFR 抑制活性. Western Blot 实验阐明:TW918 能够以剂量依赖性方式抑制 EGFR 蛋白的表达,进一步验证了分子对接结果.

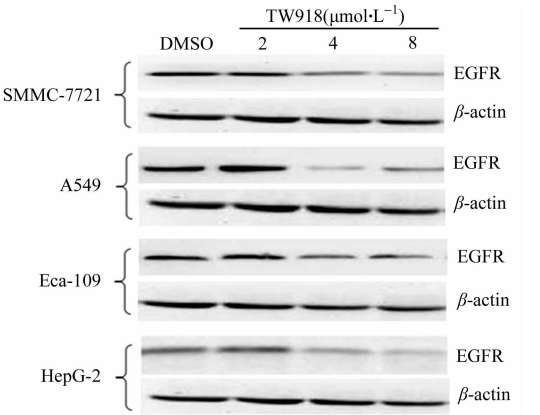


图 4 TW918 对受体激酶 EGFR 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of TW918 on expression of EGFR protein

综上所述, TW918 可能通过与受体酪氨酸激酶 EGFR 结合, 抑制其表达, 从而发挥体外抗肿瘤活性. 体外筛选和体内药效学评估是评价抗肿瘤候选药物有效性的两个重要指标. 在此基础上, 后续还需要通过更多的体内外实验评价 TW918 的抗肿瘤活性, 同时深入研究其作用机理, 探索是否存在除 EGFR 靶点外的其他作用位点^[9-10].

参考文献:

[1] CHEN Xiao-guang, ZHANG Yi. Recent advance in the study of novel anti-tumor targets and drugs: Aurora kinase and Pin1[J]. Acta Pharm Sin, 2009, 44(3): 264-269.

[2] 李娟, 李延团, 李晓明, 等. 分子靶向抗肿瘤药物研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(3): 411-416.

[3] WEI L, MALHOTRA S V. Recent development of cyclic amide (pyridone/lactam) moiety containing heterocycles as protein kinase inhibitors[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(3): 234-253.

[4] YOSHIMURA N, KUDOH S, KIMURA T, et al. EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib[J]. Lung Cancer, 2006, 51(3): 363-368.

[5] 姜梦, 刘丹, 兰帅鹏. 喹啉类蛋白酪氨酸激酶抑制剂的研究进展[J]. 化学试剂, 2013, 35(4): 333-336.

[6] MOON D O, KIM M O, HEO M S, et al. Gefitinib induces apoptosis and decreases telomerase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(10): 1351-1360.

[7] COSCONATIL S, FORLI A, PERRYMAN A L, et al. Virtual screening with AutoDock: Theory and practice[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2010, 5(6): 597-607.

[8] CARMÍ C, CAVAZZONI A, VEZZOSI S, et al. Novel irreversible epidermal growth factor receptor inhibitors by chemical modulation of the cysteine-trap portion[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53(5): 2038-2050.

[9] 唐健红, 曾庆友. 阿魏酸异辛酯的绿色合成[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2011, 32(5): 551-553.

[10] NIE Jian-yun, LIU Xin, JIN Cong-guo, et al. The effect of histone deacetylase inhibitors on cell cycle of breast cancer cell line MCF-7[J]. Clinical Medicine of China, 2009, 25(12): 1238-1240.

Synthesis and *In Vitro* Activity of Naphthamide Derivatives TW918

WANG Li-qiang, LEI Chun-hua, QIU Fei, YANG Hui-yong

(School of Biomedical Science, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: To synthesize a series of naphthamide derivatives and screen out one lead compound TW918, this paper studies its anti-tumor activity *in vitro*, and investigates its ability to bind with kinase and the effect on the expression of EGFR protein. ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HR-MS confirmed the structure of TW918. The results of MTT assay showed that TW918 had certain inhibitory effects against four types of tumor cells, but had less effects on normal cells. Molecular docking revealed that TW918 could make use of the quinoline as head to occupy the activity pocket of EGFR deeply, and form hydrogen bonds with the active residues of EGFR around it, whose lowest free binding energy was -46.1 kJ · mol⁻¹. Western Blot demonstrated that TW918 could inhibit the expression of EGFR in all four types of tumor cells in a dose-dependent manner significantly.

Keywords: naphthamide derivatives; receptor tyrosine kinase; anti-tumor activity; molecular docking

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)