微管蛋白及c-Src双靶点抑制剂的合成与抗肿瘤活性评价

祁献芳[1], 康　悦[2], 齐建国[2*]

(1. 河南省人民医院药学部, 河南 郑州 450003;　2. 河南大学河南省天然药物创新与转化重点实验室, 河南 开封 475004)

摘要: 微管类药物在转移、耐药的癌症治疗中发挥重要的作用。然而, 临床上出现微管类药物耐药现象, 需要研究者研发具有新作用模式、新机制的分子来克服耐药问题。多靶点药物分子策略是近年来针对复杂性疾病及耐药问题发展起来的一种药物分子设计策略。本文在替巴尼布林基础上, 结合课题组前期研究, 开展微管蛋白 (tubulin) 及原癌基因酪氨酸蛋白激酶Src (proto-oncogene tyrosine protein kinase Src, c-Src) 双靶点抑制剂研究。从增加饱和碳原子比率 (fraction of sp^3-hybridized carbon atoms, Fsp3) 角度出发, 合成16个目标化合物, 并通过核磁共振氢谱、碳谱和质谱对其结构进行表征; 采用噻唑蓝 (MTT) 法评价了化合物对宫颈癌细胞 (HeLa) 和肝癌细胞 (HepG2) 两种细胞株的生长抑制活性, 并通过免疫荧光和流式细胞术评价化合物**22**对微管和细胞周期的影响。结果显示2-咪唑啉酮不适合替代替巴尼布林中的吡啶结构, 化合物**22**对HeLa和HepG2的半数生长抑制浓度分别为45和51 nmol·L^{-1}, 并且能够破坏微管结构, 将细胞周期阻滞于G2/M期。化合物**22**可作为先导物开展进一步深入研究。

关键词: 2-咪唑啉酮; 联芳基; 微管抑制剂; c-Src; 抗肿瘤

中图分类号: R914　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2025)06-1778-13

Synthesis and antitumor activity evaluation of dual-target inhibitors for tubulin and c-Src

QI Xian-fang[1], KANG Yue[2], QI Jian-guo[2*]

(*1. Department of Pharmacy, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China;　2. Henan Key Laboratory of Natural Medicine Innovation and Transformation, Henan University, Kaifeng 475004, China*)

Abstract: Microtubule-targeting drugs play a significant role in the treatment of metastatic and drug-resistant cancers. However, the emergence of resistance to microtubule-targeting drugs in clinical settings necessitates the development of molecules with novel modes of action and mechanisms to overcome drug resistance. The multi-target drug molecule strategy is an approach that has been developed in recent years to address complex diseases and drug resistance issues. A series of compounds based on tirbanibulin with increased Fsp3 have been prepared, which have been identified with ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and MS. The antiproliferative activities have been evaluated against HeLa and HepG2 with MTT method. The effect on microtubule and cell cycle distribution of compound **22** has been evaluated with immunofluorescence and flow cytometry. IC_{50} of compound **22** against HeLa and HepG2 were 45 and 51 nmol·L^{-1}. And it destroys microfilament and arrests cell cycle at G2/M. The SAR show that pyridine moiety in tirbanibulin cannot be replaced with 2-imidazolidinone. Compound **22** was identified as a lead in the further research.

Key words: 2-imidazolidinone; biaryl; tubulin inhibitor; c-Src; antitumor

收稿日期: 2025-02-28;　修回日期: 2025-04-25.

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (24A350003).

*通讯作者 Tel: 15093693863, E-mail: qijianguo@henu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0219

微管主要是由α,β微管蛋白异二聚体聚合而成的中空管状结构, 它具有多种生物学功能, 如参与细胞运动、细胞器定位、胞内物质运输及真核细胞的有丝分裂过程等。细胞进入分裂期, 其胞质微管解聚成微管蛋白后再组装成纺锤体微管。在分裂后期, 纺锤体微管牵引着姐妹染色单体从赤道面移向纺锤体两极。在有丝分裂结束后, 纺锤体微管解聚再组装成胞质微管。这种微管蛋白/微管之间的动态转换 (聚合和解聚), 为细胞正常有丝分裂所必需。若破坏此循环将致使进入有丝分裂的细胞停止分裂, 进而延长细胞周期或诱导细胞凋亡。因此, 微管蛋白成为重要的抗肿瘤药物作用靶点[1-3]。临床中常用的微管类药物主要有紫杉醇及长春瑞滨等 (图1)。然而, 临床上出现微管类药物耐药现象, 亟需研发具有新作用模式、新机制的分子来克服耐药问题[4-14]。

多靶点药物分子策略是近年来针对复杂性疾病及耐药问题发展起来的一种药物分子设计策略, 即一个药物分子同时作用于具有联系的两个或多个药物靶点。同时作用的靶点之间或者具有协同作用, 或者一个靶点能够减小另一个靶点的不良反应[15-19]。

c-Src是Src激酶家族 (Src family kinases, SFK) 中的一种非受体酪氨酸激酶, 在多种肿瘤细胞 (如头颈癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌等) 里高表达与过度激活, 参与肿瘤细胞的多种生理、病理过程, 如细胞增殖、黏附、迁移和侵袭等。正常细胞中的c-Src激酶处于一个动态平衡的过程, 但癌细胞中的c-Src激酶持续激活且高度表达, 通过多种信号通路促进不同肿瘤的发生与发展, 包括Src-Janus激酶–信号转导与转录激活因子3 (Src-Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3, Src-JAK-STAT3)、Src-Ras-丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶 (Src-Ras-mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase, Src-Ras-MAPK/ERK)、Src-磷脂酰肌醇3激酶–蛋白激酶B-雷帕霉素靶蛋白 (Src-phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B-mammalian target of rapamycin, Src-PI3K-AKT-mTOR)、Src-黏着斑激酶–桩蛋白 (Src-focal adhesion kinase-paxillin signaling complex, Src/FAK/paxillin) 等通路, 或激活下游效应生长因子而促进肿瘤生长, 或者促进桩蛋白/细胞骨架/整合素聚合物的形成从而促进肿瘤转移[20-22]。另外, c-Src通过多种途径促进肿瘤细胞对多种化疗药物产生耐药。例如, c-Src通过PI3K-AKT途径过度激活导致乳腺癌细胞 (T47D) 对他莫昔芬产生耐药, 而c-Src抑制剂达沙替尼能够逆转他莫昔芬耐药; c-Src通过调节连接蛋白43磷酸化导致人结直肠癌细胞116 (human colorectal tumor 116, HCT116) 发生顺铂耐药等。另有报道, c-Src通过调节γ-微管蛋白的磷酸化而影响纺锤体的成核作用[10,23,24]。因此, 通过合理的药物设计, 同时调节微管蛋白动力学与c-Src, 通过协同增效产生抗肿瘤作用, 尤其是克服耐药问题是一种可行的策略[25]。

最近有研究报道一些秋水仙碱位点微管蛋白聚合抑制剂对紫杉醇耐药肿瘤同样有效[12]。替巴尼布林 (tirbanibulin) 是作用于秋水仙碱位点的微管蛋白聚合及c-Src双靶点抑制剂, 对多种肿瘤细胞株有较好的抑制作用。它最初用于抗肿瘤作用开展临床研究, 然而由于其具有较大毒副作用, 于2020年被FDA批准外用治疗光角化病——一种癌前病变的治疗[26-28]。其中替巴尼布林用于治疗前列腺癌的一项II期临床试验中, 表现出较大的肝毒性。肝毒性并非微管聚合或c-Src抑制直接带来的毒副作用。该毒性往往是由于药物分子在肝脏中I相代谢产生了反应性代谢物[29]。近来, 葛兰素史克公司通过数据分析发现, 药物分子开发过程中出现安全问题概率与环的不饱和度有关: 苯环 > 芳香杂环 > 环烷烃 > 饱和杂环[30]。另外, 替巴尼布林的血浆蛋白结合率高达88%, 其游离血药浓度极易受其他联合用药 (影响肝脏药物代谢酶系统及高血浆蛋白

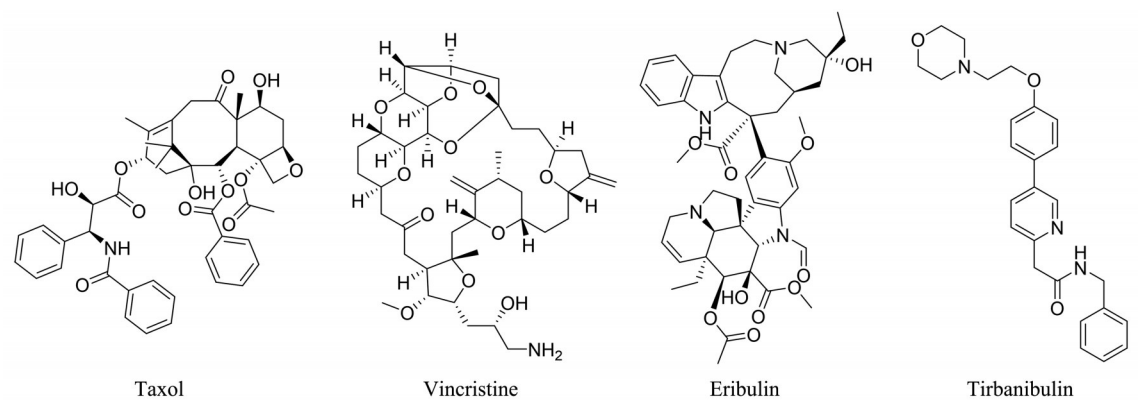


Figure 1 Approved microtubules targeting drugs

结合率的药物) 的影响。这个性质对于治疗窗较窄的微管类药物尤其重要。因此, 提高分子中饱和碳原子比例 (Fsp3) 是改善替巴尼布林毒性及药代动力学性质的一种策略[31]。替巴尼布林分子中A环、C环位于微管蛋白秋水仙碱位点疏水区, B环通过水桥与氨基酸骨架形成氢键。本文尝试2-咪唑啉酮替代B环, 以提高分子Fsp3, 同时增大分子极性以减少肝脏蓄积及血浆蛋白结合来降低替巴尼布林毒性 (图2)。

结果与讨论

1 化合物的合成

化合物 **11a**～**11m** 的合成路线见合成路线1, 以吗啉为起始原料, 与2-溴乙醇发生亲核取代反应得到中间体 **2**; 以4-氨基苯酚为起始原料, 与Boc酸酐反应得到中间体 **4**, 中间体 **2** 与中间体 **4** 经过光延反应得到中间体 **5**, **5** 在酸性条件脱除叔丁氧羰保护基得到中间体 **6**, **6** 与2-氯乙基异氰酸酯缩合得到中间体 **7**, **7** 在碱性条件下与氯乙酸叔丁醇酯通过亲核取代反应得到中间体 **8**, **8** 在酸性条件下水解得到中间体 **9**, **9** 与不同的取代苄胺或芳胺反应得到目标化合物 **11a**～**11m**。

化合物 **19a** 和 **19b** 的合成路线见合成路线2, 以3,4-二氟硝基苯为起始原料, 与吗啉通过亲核取代反应得到中间体 **13**, 中间体 **13** 分别经过还原、缩合、环化反应得到中间体 **16**, 中间体 **17** 与取代苄胺反应得到中间体 **18**, 中间体 **16** 与中间体 **18** 通过亲核取代反应得到目标化合物。共合成16个未见文献报道的新化合物, 其结构通过核磁氢谱、碳谱及高分辨质谱进行了确证且目标产物的纯度均达到95%以上。

化合物 **22** 的合成路线见合成路线3, 以2-(5-溴吡啶-2-基)乙酸为起始原料, 与苄胺缩合得到中间体 **21**, 中间体 **21** 与3-甲氧基苯硼酸经铃木反应得到目标化合物 **22**。

2 活性评价

目标化合物对HeLa和HepG2两种肿瘤细胞株的生长抑制作用如表1所示。首先, 2-咪唑啉酮结构替代替巴尼布林中的吡啶片段时, 仅有苯环上无取代的化合物 **11k** 显示出微弱的抗肿瘤活性。在化合物 **11k** 的基础上, 采用吗啉替代吗啉乙基结构, 同时在吗啉取代苯环的邻位引入氟原子得到化合物 **19a**, 其活性略有提升。然而, 在C环间位引入氯, 活性下降。推测吗啉乙基对活性的影响没有贡献或贡献不大, 同时结合本课题组前期研究 (图2)[32], 在苯环A间位引入甲氧基, 得到化合物 **22**, 结果化合物 **22** 显示出与阳性对照药相当的抗肿瘤活性。

3 化合物22作用机制研究

通过免疫荧光实验发现化合物 **22** 能够破坏微管的形态, 并且使微管固缩在核周围, 呈现出量效关系 (图3)。接下来, 采用流式细胞术分析化合物 **22** 对细胞

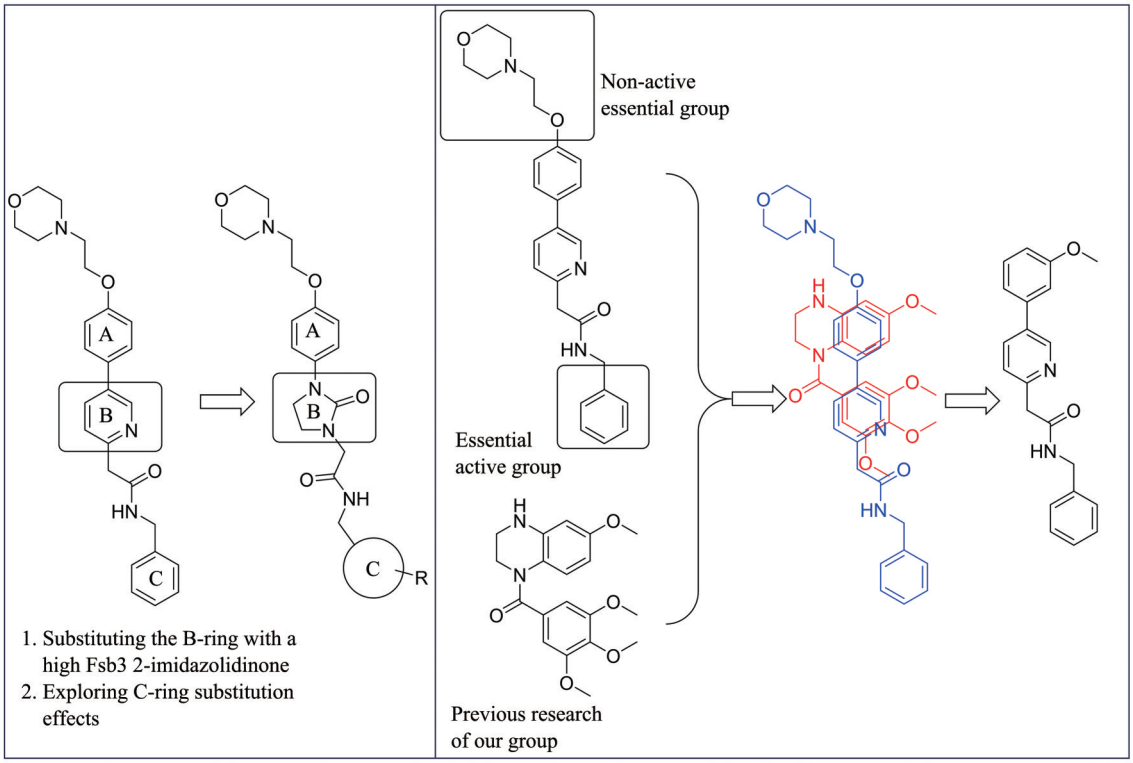
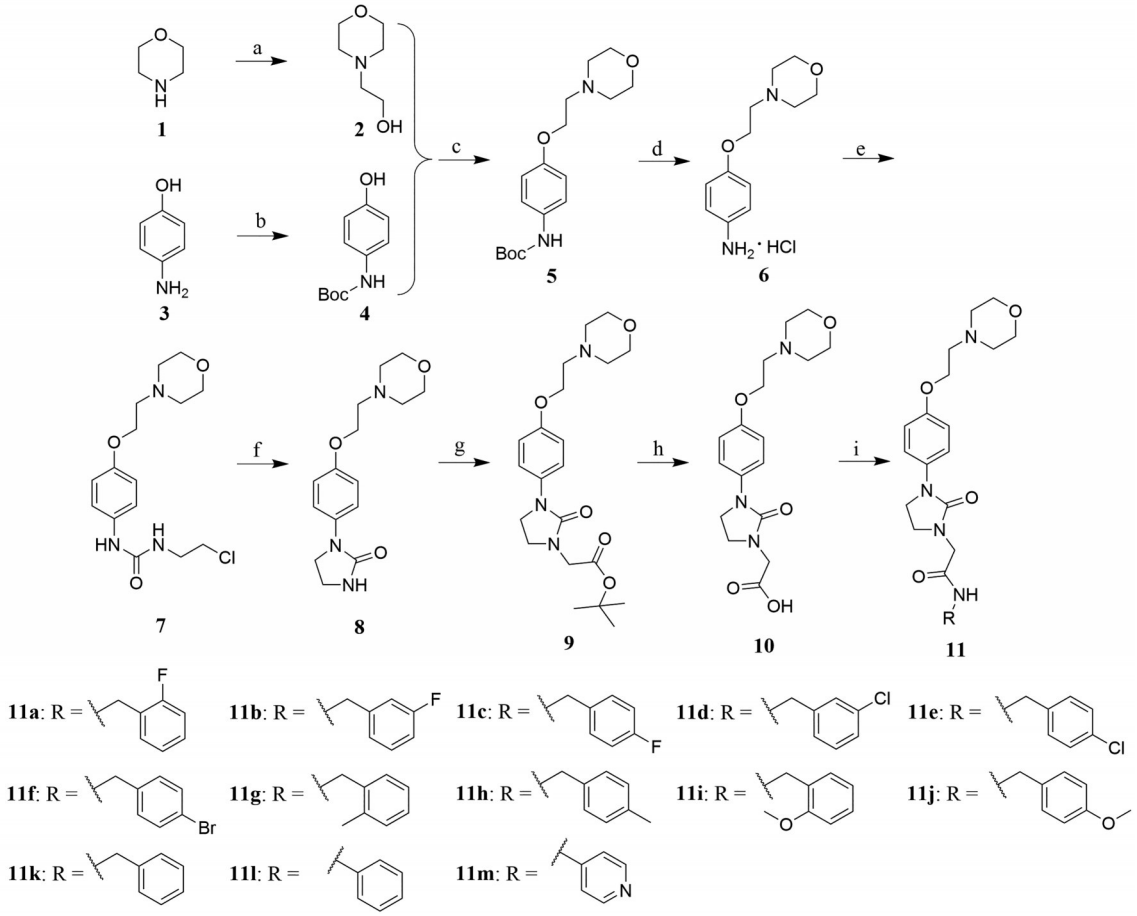
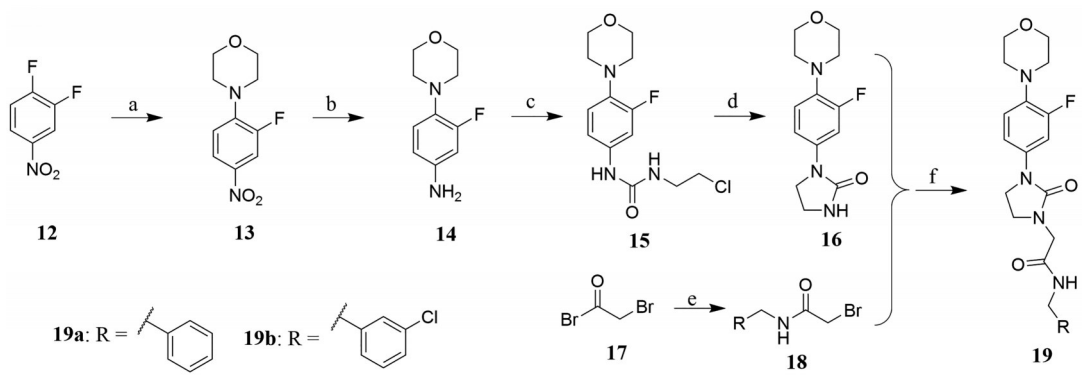


Figure 2 Strategy of compounds design

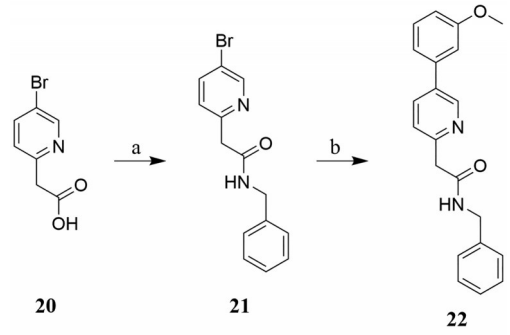


Scheme 1 Synthetic route of compounds **11a**−**11m**. Reagents and conditions, a: 2-Bromoethanol, potassium carbonate, acetonitrile, 30 ℃; b: Di-*tert*-butyl decarbonate, triethylamine, tetrahydrofuran, 20 ℃; c: Tributylphosphane, azodicarbonamide, azodicarbonamide, dry tetrahydrofuran/dry dichloromethane, 0−20 ℃; d: Hydrochloric acid in ethanol, 70 ℃; e: 2-Chloroethyl isocyanate, dry tetrahydrofuran, 20 ℃; f: Dry tetrahydrofuran, sodium hydride, 20 ℃; g: *Tert*-butyl bromoacetate, sodium hydride, dimethylformamide, 20 ℃; h: Trifluoroacetic acid, dichloromethane, 0−20 ℃; i: Substituted benzylamine/aniline, *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyluronium hexafluorophosphate, diisopropylethylamine, dimethylformamide, 40 ℃



Scheme 2 Synthetic route of compounds **19a** and **19b**. Reagents and conditions, a: Morpholine, potassium carbonate, dimethylformamide, 80 ℃; b: Hydrogen, 10% palladium on carbon, methanol, 20 ℃; c: 2-Chloroethyl isocyanate, dry tetrahydrofuran, 20 ℃; d: Dry tetrahydrofuran, sodium hydride, 20 ℃; e: Substituted benzylamine, dichloromethane, 0 ℃; f: Sodium hydride, dimethylformamide, 20 ℃

周期的影响, 化合物**22**能够将HeLa细胞周期阻滞在G2/M期, 并且呈现出剂量依赖性 (图4)。化合物**22**能够有效抑制微管的聚合, 从而抑制纺锤体的形成, 使肿瘤细胞在分裂期无法完成分裂, 产生抗肿瘤作用。因此, 作者在替巴尼布林基础上发现分子质量更小微管蛋白抑制剂化合物**22**, 该化合物可作为先导物开展进



Scheme 3 Synthetic route of compound **22**. Reagents and conditions, a: Benzylamine, 1-hydroxybenzotriazole, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, 4-dimethylaminopyridine, dimethylformamide, 80 ℃; b: 3-Methoxyphenylboronic acid, 2-(dicyclohexylphosphino)-2′,4′,6′-triisopropylbiphenyl, tris (dibenzylideneacetone) dipalladium, cesium fluoride, 90 ℃

Table 1 *In vitro* antitumor activity of compounds **11a**−**11m**, **19a**, **19b**, **22** and tirbanibulin on HeLa and HepG2 cells

Compound	MTT assay IC_{50}/μmol·L^{-1}	
	HeLa	HepG2
11a−**11j**	> 50	> 50
11k	27.6 ± 0.9	32.1 ± 0.4
11l, **11m**	> 50	> 50
19a	14.8 ± 0.8	9.4 ± 0.4
19b	> 50	> 50
22	0.045 ± 0.002	0.051 ± 0.001
Tirbanibulin	0.010 ± 0.001	0.03 ± 0.03

一步深入研究。

4 化合物22与靶点的结合模式探讨

分子对接结果显示 (图5), 化合物**22**结合在微管蛋白秋水仙碱位点, 结合模式类似于替巴尼布林, 略偏向α微管蛋白亚基, 并且能够与周围氨基酸形成较好的结合作用。如吡啶环与Leu248、Ala250及Lys352形成疏水作用, 而吡啶上的氮原子与Asn258残基形成氢键; 孤立的苯环与Leu255与Ile378形成疏水作用。另外, 化合物**22**结合在c-Src的底物结合区域, 并形成很好的相互作用。如化合物**22**上的吡啶环与Phe1171形成T型的π-π堆积作用, 化合物**22**上酰胺氧原子与Ala1181骨架上氨基氢原子形成氢键。综上, 化合物**22**与微管蛋白及c-Src具有很好的结合物作用, 同时这也为进一步提高活性的优化提供三维结构信息。

5 结论

本文在微管蛋白及c-Src双靶点药物替巴尼布林基础上, 从增加Fsp3角度出发, 合成系列化合物并开展抗肿瘤活性评价, 初步探讨了所合成化合物的构效关系, 发现2-咪唑啉酮不适合替代替巴尼布林中的吡啶结构, 同时吗啉乙基对活性没有太大贡献。在此基础上发现化合物**22**具有较好的抗肿瘤活性, 能破坏微管形态及将细胞阻滞在G2/M生长期, 可作为先导物开展进一步深入研究。

实验部分

核磁共振仪 (Bruker Avance III 300 MHz, 瑞士Bruker公司); 氘代二甲基亚砜 (DMSO-d_6) 或氘代氯仿 (chloroform-*d*) 为溶剂, 四甲基硅烷为内标; 高分辨质谱仪 (Aglient 1260-6230, 美国安捷伦公司); 熔点仪 (X-4型, 上海仪电物理光学仪器有限公司); 多色流式细胞分选系统 (CytoFLEX, 美国贝克曼库尔特公司); 多功能酶标仪 (BioTek, 美国安捷伦公司)。文中合成用化合物试剂为分析纯, 从安徽泽升科技股份有限公司购置, 未经进一步纯化。

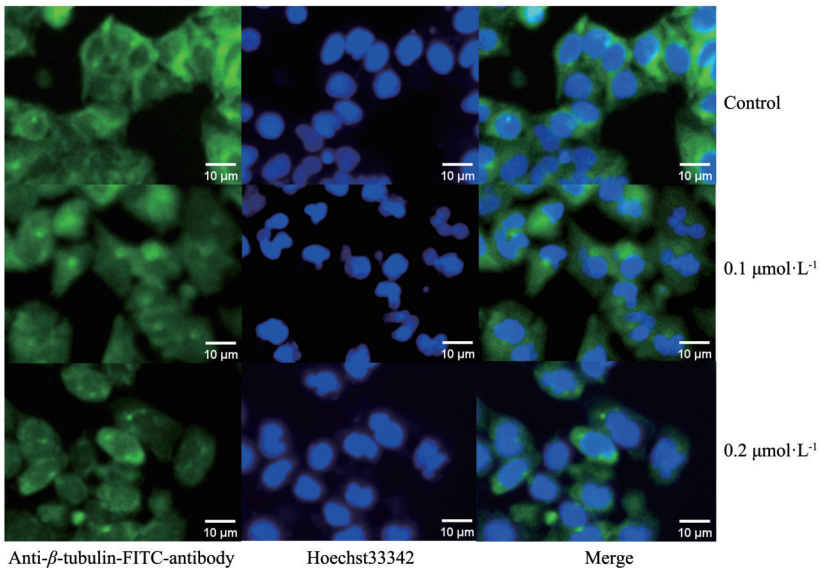


Figure 3 Effects of compound **22** on microtubules assemble by immunofluorescence assay

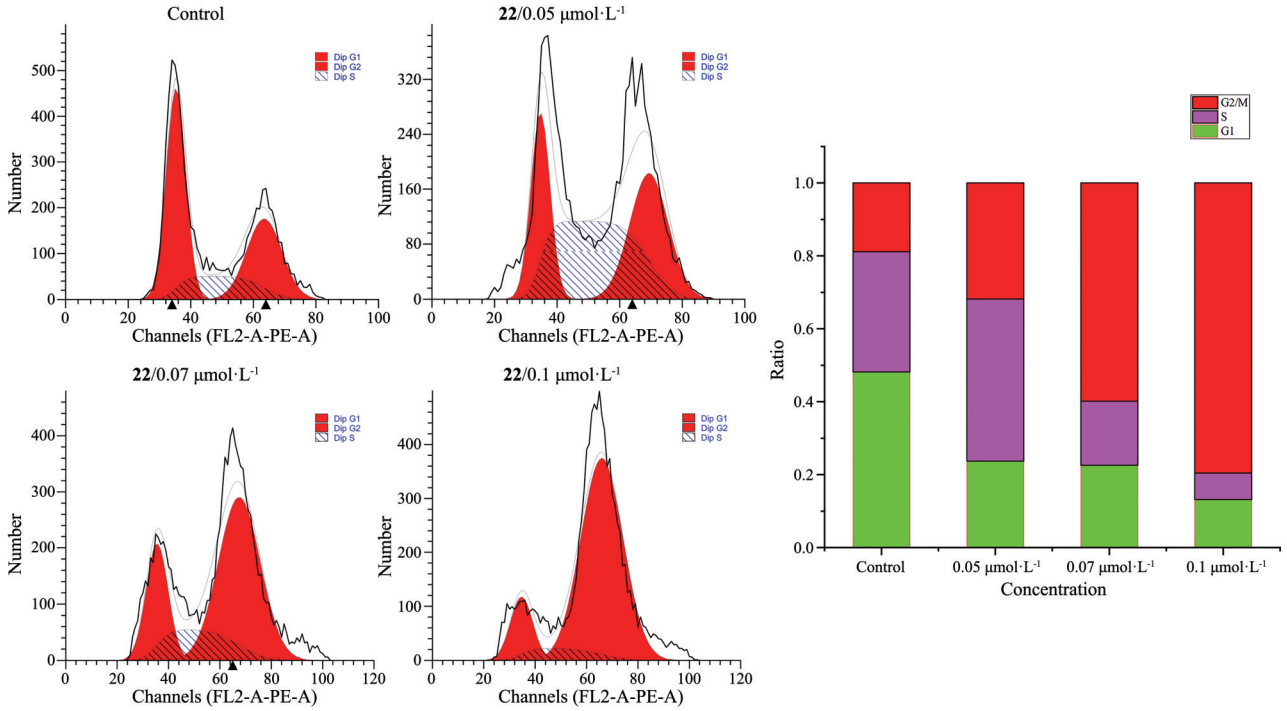


Figure 4 Effects of compound **22** on the cell cycle

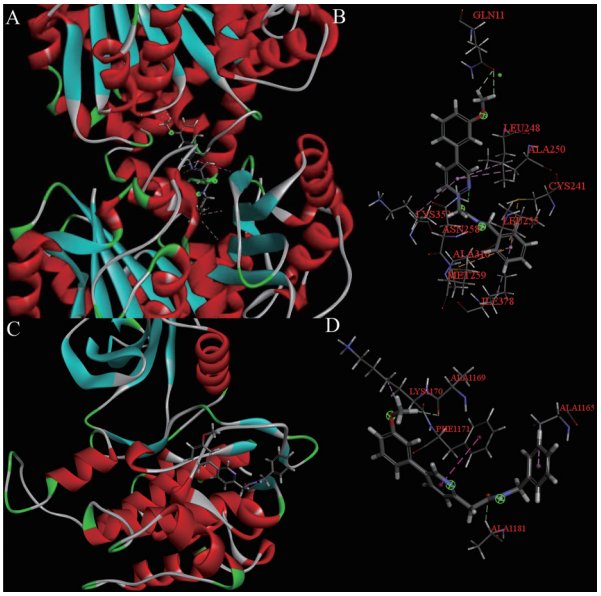


Figure 5 Molecular docking of compound **22** with tubulin (6KNZ) and c-Src (SrcH1). A: Molecular docking of compound **22** with tubulin (6KNZ); B: Binding mode of compound **22** with the colchicine binding site of tubulin; C: Molecular docking of compound **22** with tubulin (6KNZ) and c-Src (SrcH1); D: Binding mode of compound **22** with the substrate binding region of c-Src

1 化学实验

1.1 目标化合物*N*-(2-氟苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11a) 的制备

1.1.1 2-吗啉乙醇 (2) 的制备 将吗啉 (化合物**1**, 0.48 mL, 5.6 mmol)、乙腈 (20 mL)、2-溴乙醇 (0.48 mL, 6.7 mmol, 1.2 equiv)、碳酸钾 (1.0 g, 7.3 mmol, 1.3 equiv) 依次投入至50 mL圆底烧瓶中。30 ℃条件下搅拌18 h, TLC监测反应 (碘显色), 待反应完全, 抽滤后减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300目硅胶, DCM∶MeOH = 10∶1), 得到0.51 g无色液体, 产率为69.5%。^{1}H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ_H: 3.61 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.53 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.27 (s, 1H), 2.43 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.40 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H)。

1.1.2 4-羟基苯胺基碳酸叔丁醇酯 (4) 的制备 将4-氨基苯酚 (化合物**2**, 2.00 g, 18.3 mmol)、四氢呋喃 (20 mL)、三乙胺 (12.2 mL, 87.8 mmol, 4.8 equiv) 依次投入至50 mL圆底烧瓶中。随后, 将二碳酸二叔丁酯 [$(Boc)_2O$, 4.80 g, 22.0 mmol, 1.2 equiv] 溶于5 mL三乙胺中, 通过恒压滴液漏斗缓慢匀速滴加至反应瓶中, 室温搅拌6 h, TLC监测反应, 待反应完全, 减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300目硅胶, PE∶EA = 3∶1), 得到3.45 g无色液体, 产率为90.1%。^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H: 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.72 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 4.93 (s, 1H), 1.48 (s, 9H)。

1.1.3 4-(2-吗啉乙氧基)苯胺基碳酸叔丁醇酯 (5) 的制备 将中间体**4** (2.00 g, 9.60 mmol)、无水四氢呋喃 (20 mL)、中间体**2** (2.30 g, 17.3 mmol, 1.8 equiv)、三丁基膦 (TBUP, 7.20 mL, 28.8 mmol, 3.0 equiv) 依次投入至100 mL圆底烧瓶中。随后, 将偶氮二甲酰胺 (TMAD,

4.90 g, 28.7 mmol, 3.0 equiv) 溶于装有 30 mL 无水二氯甲烷的恒压滴液漏斗中, 氮气置换空气, 0 ℃条件下搅拌 30 min, 缓慢匀速滴加至反应瓶中, 滴加完后移入室温搅拌 2 h, TLC 监测反应, 待反应完全, 减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300 目硅胶, PE∶EA = 1∶1), 得到 2.8 g 无色液体, 产率为 91.0%。^{1}H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ_H: 7.23 (s, 2H), 6.85 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 4.07 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.7 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 2.78 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 1.50 (s, 9H)。

1.1.4 4-(2-吗啉乙氧基)苯胺盐酸盐 (6) 的制备 将中间体 **5** (1.0 g, 3.1 mmol) 投入至 25 mL 圆底烧瓶中。随后加 10 mL 盐酸乙醇溶液, 70 ℃搅拌 1 h, TLC 监测反应, 待反应完全, 减压蒸馏得到油状产物未纯化, 直接投下一步。

1.1.5 1-(2-氯乙基)-3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)脲 (7) 的制备 将中间体 **6** (1.0 g, 4.5 mmol)、无水四氢呋喃 (20 mL)、氯乙基异氰酸酯 (0.43 mL, 5.0 mmol, 1.1 equiv) 三乙胺 (1.2 mL, 9.0 mmol, 2.0 equiv) 依次投入至 50 mL 圆底烧瓶中, 室温搅拌 4 h, TLC 监测反应, 待反应完全, 加入减压蒸馏得到 0.55 g 白色固体, 产率为 37.2%。直接投入下一步。

1.1.6 1-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)咪唑啉-2-酮 (8) 的制备 将中间体 **7** (0.50 g, 1.7 mmol)、无水四氢呋喃 (10 mL) 加入至 25 mL 圆底烧瓶中。随后, 缓慢将氢化钠 (0.14 g, 3.4 mmol, 2.0 equiv) 加入反应瓶中, 室温搅拌 2 h, TLC 监测反应, 待反应完全, 减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300 目硅胶, DCM∶MeOH = 10∶1), 得到 0.31 g 白色固体, 产率为 62.6%。^{1}H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ_H: 7.40 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 5.42 (s, 1H), 4.08 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 3.54 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H)。

1.1.7 2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酸叔丁酯 (9) 的制备 将中间体 **8** (1.1 g, 3.8 mmol)、DMF (20 mL)、溴乙酸叔丁酯 (0.8 mL, 5.7 mmol, 1.5 equiv) 依次投入至 50 mL 圆底烧瓶中。随后, 将氢化钠 (0.15 g, 3.8 mmol, 1.0 equiv) 缓慢加入反应瓶中, 室温搅拌 4 h, TLC 监测反应, 待反应完全, 加入二氯甲烷与水萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤后减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300 目硅胶, DCM∶MeOH = 20∶1), 得到 0.78 g 白色固体, 产率为 50.6%。^{1}H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ_H: 7.23 (s, 2H), 6.85 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 4.07 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 2.78 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.62～2.51 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 1.50 (s, 9H)。

1.1.8 2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酸 (10) 的制备 将中间体 **9** (0.46 g, 1.1 mmol)、二氯甲烷 (16 mL) 投入至 50 mL 圆底烧瓶中。在冰浴条件下缓慢将 16 mL 三氟乙酸加入反应瓶中, 后移至室温搅拌 6 h, TLC 监测反应, 待反应完全, 多次加入二氯甲烷低温减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300 目硅胶, DCM∶MeOH = 5∶1), 得到 0.26 g 白色固体, 产率为 68.4%。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 7.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.03 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 3.80 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.57 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.51 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H)。

1.1.9 *N*-(2-氟苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11a) 的制备 将中间体 **10** (0.10 g, 0.29 mmol)、2-氟苄胺 (0.04 mL, 0.3 mmol, 1.2 equiv)、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯 (HATU, 0.13 g, 0.3 mmol, 1.2 equiv)、二异丙基乙胺 (DIPEA, 0.1 mL, 0.6 mmol, 2.0 equiv) 溶于 2 mL DMF 中。40 ℃搅拌约 4 h。TLC 监测反应, 待反应完全后, 加入二氯甲烷与水, 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥、抽滤后减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300 目硅胶, DCM∶MeOH = 10∶1), 得到 0.042 g 白色固体, 产率为 30.6%。HPLC 纯度:98.75%, 熔点: 153.1～154.7 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.57 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.37～7.28 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J* = 5.1, 2.7 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.35 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.05 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.79 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.51 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 169.00, 162.10, 158.86, 158.06, 154.06, 134.55, 129.99, 129.93, 129.43, 129.32, 126.46, 126.27, 124.82, 124.78, 119.02, 115.66, 115.38, 115.04, 66.66, 65.99, 57.58, 54.13, 47.17, 42.82, 42.75, 36.33, 36.27; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{24}H_{29}FN_4O_4Na^+$ $[M+Na]^+$ 479.206 50, found 479.208 96。

1.2 *N*-(3-氟苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11b) 的制备

除第 (9) 步中用 3-氟苄胺代替 2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例 1, 得到 0.048 g 白色固体, 产率为 36.7%。HPLC 纯度: 99.63%, 熔点: 154.4～155.5 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.60 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.38 (q, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.10 (q, *J* = 7.8 Hz, 3H), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.33

(d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.80 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.58 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.52 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.47 (t, J = 4.8 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 169.05, 164.33, 161.10, 158.07, 154.06, 142.98, 142.89, 134.55, 130.74, 130.63, 123.60, 123.57, 118.99, 115.04, 114.41, 114.12, 113.84, 66.66, 65.98, 57.58, 54.14, 47.28, 42.82, 41.99, 41.96; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{24}H_{29}FN_4O_4Na^+$ [M+Na]$^+$: 479.206 50, found 479.208 70。

1.3 *N*-(4-氟苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11c) 的制备

除第 (9) 步中用4-氟苄胺代替2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例1, 得到0.038 g白色固体, 产率为29.1%。HPLC纯度: 99.35%, 熔点: 163.3～164.5 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.57 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.31 (q, J = 5.7 Hz, 2H), 7.19～7.12 (m, 2H), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.29 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.79 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.58 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.50 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.47 (t, J = 4.8 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.87, 163.25, 160.04, 158.05, 154.05, 136.08, 136.04, 134.55, 129.69, 129.59, 118.99, 115.61, 115.33, 115.04, 66.66, 65.97, 57.58, 54.13, 47.26, 42.81, 42.77, 41.77; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{24}H_{29}FN_4O_4Na^+$ [M+Na]$^+$ 479.206 50, found 479.208 28。

1.4 *N*-(3-氯苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11d) 的制备

除第 (9) 步中用3-氯苄胺代替2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例1, 得到0.035 g白色固体, 产率为25.9%。HPLC纯度: 98.19%, 熔点: 109.7～111.9 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.62 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 9.9 Hz, 3H), 7.24 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.32 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.79 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.52 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 2.68 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.48 (t, J = 4.8 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 169.06, 158.05, 154.02, 142.50, 134.53, 133.46, 130.65, 127.47, 127.21, 126.31, 118.96, 115.01, 66.63, 65.90, 57.56, 54.11, 47.27, 42.81, 41.93; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{24}H_{29}ClN_4O_4Na^+$ [M+Na]$^+$ 495.176 95, found 495.178 89。

1.5 *N*-(4-氯苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11e) 的制备

除第 (9) 步中用4-氯苄胺代替2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例1, 得到0.045 g白色固体, 产率为33.3%。HPLC纯度: 96.84%, 熔点: 163.6～165.5。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.61 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.29 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.79 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.50 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.70 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.51 (s, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.96, 158.04, 154.01, 138.95, 134.54, 131.79, 129.53, 128.70, 118.97, 115.02, 66.58, 65.85, 57.53, 54.08, 47.25, 42.78, 41.81; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{24}H_{29}ClN_4O_4Na^+$ [M+Na]$^+$ 495.176 95, found 495.178 98。

1.6 *N*-(3-溴苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11f) 的制备

除第 (9) 步中用3-溴苄胺代替2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例1, 得到0.047 g白色固体, 产率为31.8%。HPLC纯度: 99.23%, 熔点: 166.6～168.4 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.60 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 15.3, 8.4 Hz, 4H), 7.23 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.27 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.79 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.58 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.50 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.47 (t, J = 4.5 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.95, 158.03, 153.93, 139.39, 134.61, 131.61, 129.92, 120.25, 118.97, 115.06, 66.35, 65.61, 57.37, 53.93, 47.25, 42.78, 42.21, 41.87; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{24}H_{29}BrN_4O_4Na^+$ [M+Na]$^+$ 541.126 44, found 541.128 09。

1.7 *N*-(2-甲基苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11g) 的制备

除第 (9) 步中用2-甲基苄胺代替2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例1, 得到0.035 g白色固体, 产率为27.1%。HPLC纯度: 99.00%, 熔点: 130.9～132.7 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.42 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.18 (q, J = 8.7 Hz, 4H), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.28 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 4.06 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.79 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.52 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 2.70 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.49 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 2.28 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.68, 158.06, 154.01, 137.32, 136.05, 134.56, 130.37, 128.02, 127.36, 126.22, 118.96, 115.02, 65.92, 57.57, 54.12, 47.09, 42.79, 19.13; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{25}H_{32}N_4O_4Na^+$ [M+Na]$^+$ 475.231 58, found 475.233 43。

1.8 *N*-(4-甲基苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11h) 的制备

除第 (9) 步中用 4-甲基苄胺代替 2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例 1, 得到 0.039 g 白色固体, 产率为 30.2%。HPLC 纯度: 99.83%, 熔点: 165.2～167.1 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.54 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.15 (q, J = 8.4 Hz, 4H), 6.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.25 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.78 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.58 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.49 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.47 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 2.28 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.72, 158.03, 154.01, 136.80, 136.30, 134.54, 129.30, 127.68, 118.95, 115.00, 66.65, 65.90, 57.57, 54.13, 47.20, 42.77, 42.73, 42.20, 21.14; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{25}H_{32}N_4O_4Na^+$ $[M+Na]^+$ 475.231 58, found 475.233 39。

1.9 *N*-(2-甲氧基苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11i) 的制备

除第 (9) 步中用 2-甲氧基苄胺代替 2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例 1, 得到 0.036 g 白色固体, 产率为 26.9%。HPLC 纯度: 99.25%, 熔点: 123.8～125.4 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.38 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.25 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.93 (q, J = 6.9 Hz, 3H), 4.27 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 4.06 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 3.52 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 2.70 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.51 (s, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.86, 158.08, 157.07, 154.00, 134.60, 128.53, 128.07, 127.05, 120.59, 118.99, 115.04, 110.90, 66.56, 65.84, 57.51, 55.76, 54.07, 47.16, 42.81, 42.75, 37.57; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{25}H_{32}N_4O_5Na^+$ $[M+Na]^+$ 491.226 49, found 491.228 69。

1.10 *N*-(4-甲氧基苄基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11j) 的制备

除第 (9) 步中用 4-甲氧基苄胺代替 2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例 1, 得到 0.038 g 白色固体, 产率为 28.4%。HPLC 纯度: 98.78%, 熔点: 149.3～151.3 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.53 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.91 (q, J = 8.7 Hz, 4H), 4.23 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.04 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.78 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.58 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.49 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.46 (t, J = 4.5 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.65, 158.67, 158.04, 154.01, 134.54, 131.78, 129.04, 118.96, 115.00, 114.14, 66.65, 65.90, 57.57, 55.51, 54.13, 47.20, 42.77, 42.73, 41.91; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{25}H_{32}N_4O_5Na^+$ $[M+Na]^+$ 491.226 49, found 491.228 53。

1.11 *N*-苄基-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11k) 的制备

除第 (9) 步中用苄胺代替 2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例 1, 得到 0.045 g 白色固体, 产率为 33.3%。HPLC 纯度: 99.12%, 熔点: 150.5～151.3 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.56 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.36～7.22 (m, 5H), 6.95 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.31 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 4.12 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.80 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.65 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 3.51 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.89 (s, 2H), 2.68 (s, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.81, 158.05, 153.81, 139.83, 134.76, 128.76, 127.66, 127.26, 119.01, 115.15, 65.95, 57.11, 53.67, 47.22, 42.82, 42.75, 42.47; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{24}H_{30}N_4O_4Na^+$ $[M+Na]^+$ 461.215 93, found 461.218 32。

1.12 *N*-(苯基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11l) 的制备

除第 (9) 步中用苯胺代替 2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例 1, 得到 0.033 g 白色固体, 产率为 27.2%。HPLC 纯度: 99.65%, 熔点: 165.1～167.0 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.11 (s, 1H), 7.61 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.06 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.07 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.82 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.58 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.57 (t, J = 4.2 Hz, 4H) 2.68 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.47 (t, J = 4.8 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 167.66, 158.19, 154.07, 139.24, 134.51, 129.22, 123.83, 119.71, 119.05, 115.04, 66.63, 65.93, 57.56, 54.11, 47.44, 42.89, 42.70; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{23}H_{28}N_4O_4Na^+$ $[M+Na]^+$ 447.200 28, found 447.202 02。

1.13 *N*-(吡啶-4-基)-2-(3-(4-(2-吗啉乙氧基)苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (11m) 的制备

除第 (9) 步中用 4-氨基吡啶代替 2-氟苄胺外, 其他步骤及提纯方法同实施例 1, 得到 0.038 g 白色固体, 产率为 31.1%。HPLC 纯度: 90.60%, 熔点: 149.6～150.7 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.62 (s, 1H), 8.33 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.78 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.11 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.11 (s, 2H),

4.05 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.81 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H), 2.67 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 169.03, 158.18, 154.08, 150.86, 145.82, 134.44, 119.09, 115.04, 113.72, 66.52, 65.80, 57.48, 54.04, 47.55, 42.93, 42.69; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{22}H_{27}N_5O_4Na^+$ $[M+Na]^+$ 448.195 53, found 448.197 98。

1.14 *N*-苄基-2-(3-(3-氟-4-吗啉苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (19a) 的制备

1.14.1 4-(2-氟-4-硝基苯基)吗啉 (13) 的制备 将3,4-二氟硝基苯 (化合物 **12**, 2.00 g, 12.6 mmol)、DMF (20 mL)、吗啉 (1.20 mL, 13.8 mmol, 1.1 equiv)、碳酸钾 (3.50 g, 25.2 mmol, 2.0 equiv) 依次投入至50 mL圆底烧瓶中。随后, 80 ℃条件下搅拌6 h, TLC监测反应, 待反应完全后, 加入二氯甲烷与水, 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤后减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300目硅胶, PE∶EA = 5∶1), 得到2.52 g黄色固体, 产率为88.7%。^{1}H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ_H: 7.97 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 13.2, 2.7 Hz, 1H), 6.91 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.86 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 3.27 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H)。

1.14.2 3-氟-4-吗啉基苯胺 (14) 的制备 将中间体 **13** (1.0 g, 4.4 mmol) 投入至25 mL圆底烧瓶中, 加入10 mL甲醇溶解, 后将10%钯碳 (0.09 g, 0.88 mmol, 0.2 equiv) 缓慢加入反应瓶中, 用氢气置换空气, 室温搅拌约4 h。TLC监测反应, 待反应完全后, 将反应液用带有硅藻土的抽滤漏斗抽滤, 减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300目硅胶, PE∶EA = 3∶1), 得到0.70 g浅粉色固体, 产率为80.7%。^{1}H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ_H: 6.79 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.45～6.38 (m, 2H), 3.85 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.57 (s, 2H), 2.96 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H)。

1.14.3 1-(2-氯乙基)-3-(3-氟-4-吗啉基苯基)脲 (15) 的制备 除用中间体 **14** 替换中间体 **6**, 操作步骤同中间体 **7** 的制备。

1.14.4 1-(3-氟-4-吗啉基苯基)咪唑啉-2-酮 (16) 的制备 除用中间体 **15** 替换中间体 **7**, 操作步骤同中间体 **8** 的制备。

1.14.5 *N*-苄基-2-溴乙酰胺 (18a) 的制备 将苄胺 (2.00 mL, 18.7 mmol)、二氯甲烷 (20 mL)、K_2CO_3 (5.20 g, 37.4 mmol, 2.0 equiv) 依次投入至50 mL圆底烧瓶中, 用氮气置换空气, 在0 ℃条件下搅拌约30 min。将溴乙酰溴 (1.6 mL, 18.7 mmol, 1.0 equiv) 通过恒压滴液漏斗缓慢滴入反应液中, 反应持续搅拌4 h, TLC监测反应, 待反应完全后, 反应液进行抽滤、减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300目硅胶, PE∶EA = 5∶1), 得到2.80 g白色固体, 产率为65.7%。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.77 (s, 1H), 7.30 (dq, *J* = 14.7, 7.8 Hz, 5H), 4.31 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.92 (s, 2H)。

1.14.6 *N*-苄基-2-(3-(3-氟-4-吗啉苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (19a) 的制备 将中间体 **16** (0.10 g, 0.40 mmol)、中间体 **18a** (0.14 g, 0.60 mmol, 1.5 equiv) 溶于4 mL DMF中, 室温搅拌。将氢化钠 (0.03 g, 0.8 mmol, 2.0 equiv) 缓慢加入反应液中, 室温搅拌约6 h。TLC点板监测反应, 待反应完全后, 二氯甲烷与水进行萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥、抽滤后减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300目硅胶, DCM∶MeOH = 20∶1), 得到0.042 g白色固体, 产率为25.9%。HPLC纯度: 96.70%, 熔点: 155.8～157.0 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.62 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 15.6, 2.5 Hz, 1H), 7.36～7.23 (m, 5H), 7.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.01 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.33 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H), 3.79 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.74 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.52 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 2.94 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.67, 157.72, 156.86, 153.64, 139.79, 136.5, 134.5, 128.77, 127.66, 127.28, 119.57, 112.92, 105.84, 66.69, 51.35, 51.32, 47.05, 42.53, 42.47; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{22}H_{25}FN_4O_3Na^+$ $[M+Na]^+$ 435.180 29, found 435.182 29。

1.15 *N*-(3-氯苄基)-2-(3-(3-氟-4-吗啉苯基)-2-氧代咪唑啉-1-基)乙酰胺 (19b) 的制备

除用中间体 **18b** 代替中间体 **18a** 外, 其他步骤及提纯方法同 **19a**, 得到0.046 g白色固体, 产率为27.7%。HPLC纯度: 96.75%, 熔点: 115.8～117.0 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.63 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 16.5, 2.4 Hz, 1H), 7.40～7.30 (m, 3H), 7.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.02 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.80 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.94 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.89, 157.73, 156.85, 153.64, 142.46, 136.58, 136.44, 134.54, 134.42, 133.47, 130.66, 127.46, 127.22, 126.31, 119.63, 119.57, 112.97, 112.93, 106.04, 105.69, 66.68, 51.35, 51.32, 47.08, 42.62, 42.56, 41.92; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{22}H_{24}ClFN_4O_3Na^+$ $[M+Na]^+$ 469.141 32, found 469.142 60。

1.16 *N*-苄基-2-(5-(3-甲氧基苯基)吡啶-2-基)乙酰胺 (22) 的制备

1.16.1 *N*-苄基-2-(5-溴吡啶-2-基)乙酰胺 (21) 的制备 将2-(5-溴吡啶-2-基)乙酸 (中间体 **20**, 1.00 g, 4.63 mmol)、苄胺 (1.50 mL, 13.9 mmol, 3.0 equiv)、1-羟基苯并三唑

(0.810 g, 6.02 mmol, 1.3 equiv)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (1.03 g, 6.9 mmol, 1.5 equiv)、4-二甲氨基吡啶 (0.17 g, 1.4 mmol, 0.3 equiv) 依次投入至 50 mL 圆底烧瓶中。随后, 加入 20 mL DMF 溶解, 80 ℃条件下搅拌 12 h, TLC 监测反应, 待反应完全, 加入二氯甲烷与水萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤后减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300 目硅胶, PE∶EA = 1∶1), 得到 1.00 g 白色固体, 产率为 70.9%。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 8.62 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.37～7.25 (m, 6H), 4.30 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.69 (s, 2H)。

1.16.2 *N*-苄基-2-(5-(3-甲氧基苯基)吡啶-2-基)乙酰胺 (22) 的制备 将中间体 **21** (0.10 g, 0.33 mmol)、3-甲氧基苯硼酸 (0.051 g, 0.39 mmol, 1.2 equiv)、2-二环已基磷-2′,4′,6′-三异丙基联苯 (0.031 g, 0.06 mmol, 0.2 equiv)、三 (二亚苄基丙酮) 二钯 (0.030 g, 0.03 mmol, 0.1 equiv)、氟化铯 (0.25 g, 1.7 mmol, 5.0 equiv) 依次投入至 25 mL 圆底烧瓶中。随后加入 4 mL 1,4-二氧六环与 1 mL 水溶解, 氮气置换空气, 接着, 90 ℃加热搅拌 12 h, TLC 监测反应, 待反应完全, 加入二氯甲烷与水萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤后减压蒸馏, 蒸出溶剂, 柱层析 (200～300 目硅胶, PE∶EA = 1∶1), 得到 0.036 g 白色固体, 产率为 33.0%。HPLC 纯度: 99.40%, 熔点: 94.8～96.5 ℃。^{1}H NMR (300 MHz, chloroform-d) δ_H: 8.76 (s, 1H), 7.88 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.41 (q, J = 7.8 Hz, 2H), 7.32～7.28 (m, 5H), 7.17 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.52 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.87 (s, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, chloroform-d) δ_C: 169.29, 160.20, 154.53, 147.59, 138.80, 138.43, 135.58, 135.03, 130.24, 128.65, 127.60, 127.33, 124.04, 119.50, 113.44, 112.96, 55.40, 44.98, 43.57; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{21}H_{20}N_2O_2H^+$ $[M+H]^+$ 333.159 84, found 333.159 57。

2 药理活性评价及机制研究实验

2.1 目标化合物抗肿瘤活性评价

采用 MTT 法评价所合成的目标化合物对 HeLa 和 HepG2 两种肿瘤细胞株的生长抑制作用。首先, 将处于对数生长期的细胞接种于 96 孔板, 置于 37 ℃且含 5% 二氧化碳的培养箱中孵育 24 h, 然后每孔加入不同浓度待测化合物或阳性对照药继续孵育 72 h。孵育完毕, 每孔 (空白除外) 加入 50 μL MTT 溶液, 置于 37 ℃烘箱中继续孵育 3.5 h。移去培养基和 MTT 混合液, 每孔加入 100 μL DMSO 溶液, 振摇 10 min。使用酶标仪测定每个孔在 490 nm 处的吸光度 (OD) 值。根据公式 (1) 计算肿瘤细胞增殖抑制率:

$$抑制率\ (\%) = (\overline{OD}_{对照} - \overline{OD}_{实验})/(\overline{OD}_{对照} - \overline{OD}_{空白}) \times 100\% \quad (1)$$

其中, $\overline{OD}_{对照}$、$\overline{OD}_{实验}$、$\overline{OD}_{空白}$分别为对照组、实验组和空白组的吸光度平均值。

2.2 评价目标化合物对微管形态的作用

采用免疫荧光实验研究化合物 **22** 对微管形态的影响。选取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 每孔加入 90 μL 培养基 (内含约 3 500 个细胞) 于 96 孔板中, 并将 96 孔板置于 37 ℃且含 5% 二氧化碳的培养箱中孵育 24 h。之后每孔各加入 10 μL 不同浓度 (0.1、0.2 μmol·L^{-1}) 的待测化合物 16 个或 0.1 μmol·L^{-1} 的阳性对照药秋水仙碱, 置于培养箱中孵育 24 h。孵育后, 移去培养基, PBS 洗 3 遍, 每孔加 90 μL 含量为 3.7% 的多聚甲醛溶液, 置于 4 ℃冰箱固定 20 min。固定完毕, 在每孔中加入 0.1% 的 Triton-X 100 溶液 (10 μL), 放置于 4 ℃冰箱孵育 15 min。吸走溶液, PBS 洗 3 遍, 每孔加入 2% BSA 溶液 (90 μL), 继续放置于 37 ℃烘箱中封闭 1 h。吸走 BSA 溶液, PBS 洗 2 遍, 每孔加入 30 μL 提前配置好的 β-tubulin 一抗并于 4 ℃冰箱避光孵育 6 h。PBS 洗 3 遍, 每孔加入 30 μL 提前配置好的 FITC 标记的羊抗兔 IgG 绿色荧光二抗在 37 ℃烘箱中孵育 2 h。PBS 洗 3 遍, 每孔加入 90 μL 提前配置好的 20 μg·mL^{-1} 的 Hoechst33342 溶液, 放置在 37 ℃烘箱中孵育 15 min, 吸走染料, PBS 洗 3 遍, 在倒置荧光显微镜下观察细胞内微管的形态, 并拍照记录。

2.3 评价目标化合物对细胞周期的作用

选取处于对数生长期的 HeLa 细胞, 按照合适的细胞密度均匀加入到 6 孔板中, 将 6 孔板置于 37 ℃且含 5% 二氧化碳的培养箱中孵育 24 h。每孔加入不同浓度的待测化合物, 留有空白对照, 继续将 6 孔板置于 37 ℃且含 5% 二氧化碳的培养箱中继续孵育 24 h。收集所有细胞, 离心 (1 500 r·min^{-1}, 20 min), 吸走上清液, 加入 300 μL 4 ℃预冷 1 h 的 PBS 溶液, 并用移液枪将 EP 管底部沉降的细胞吹打均匀。将细胞混悬液缓慢垂直滴入 10 mL (−20 ℃预冷 6 h) 的 75% 乙醇中固定, 并于−20 ℃条件下固定过夜。固定后以 1 500 r·min^{-1} 离心 10 min, 吸走上清液, 加入约 1 mL 预冷的 PBS 溶液, 离心 (1 500 r·min^{-1}, 10 min)。吸走上清液, 每个 EP 管中加入提前配制好的 300 μL 染色剂 (要先置于 4 ℃冰箱中), 之后在 4 ℃冰箱中避光孵育 1 h, 再次离心, 弃去染料。加入 0.5 mL PBS 溶液, 重悬细胞, 随后用 300 目网筛过滤, 用流式细胞仪以合适的方法和通道检测得出结论。

3 分子对接

采用分子对接模拟化合物 **22** 与靶蛋白的结合模

式。采用Discovery Studio软件, 选取微管蛋白与替巴尼布林的晶体结构6KNZ及文献中通过同源建模获得的c-Src与替巴尼布林的三维结构[29], 采用默认模式制备蛋白及配体分子。采用CDOCKER方法进行分子对接。

作者贡献: 祁献芳负责实验设计与部分实验实施、结果分析与撰写论文; 康悦负责部分实验、结果分析; 齐建国负责研究思路提出及指导、修订论文。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth [J]. Nature, 1984, 312: 237.

[2] Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the *αβ* tubulin dimer by electron crystallography [J]. Nature, 1998, 391: 199-203.

[3] Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9: 790-803.

[4] Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol [J]. Nature, 1979, 277: 665.

[5] Giannakakou P, Sackett DL, Kang YK, et al. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant *β*-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization [J]. J Biol Chem, 1997, 272: 17118-17125.

[6] Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death [J]. J Clin Oncol, 1999, 17: 1061-1070.

[7] Balzer EMZ. Molecular Alterations That Reduce Cortical Containment of Tubulin Microtentacles and Their Impact on Breast Tumor Metastasis [D]. Maryland: University of Maryland, 2009.

[8] Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10: 194-204.

[9] Matsui Y, Nakayama Y, Okamoto M, et al. Enrichment of cell populations in metaphase, anaphase, and telophase by synchronization using nocodazole and blebbistatin: a novel method suitable for examining dynamic changes in proteins during mitotic progression [J]. Eur J Cell Biol, 2012, 91: 413-419.

[10] Jeong YJ, Kang JS, Lee SI, et al. Breast cancer cells evade paclitaxel-induced cell death by developing resistance to dasatinib [J]. Oncol Lett, 2016, 12: 2153-2158.

[11] Chen Z, Geng DW, Yuan TB, et al. Design and evaluation of novel N-substituent diphenylamine derivatives as tubulin colchicine binding site inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2025, 115: 130031.

[12] Jiang FH, Yu M, Wang Y. Design, synthesis and biological evaluation of novel diaryl-substituted fused nitrogen heterocycles as tubulin polymerization inhibitors to overcome multidrug resistance *in vitro* and *in vivo* [J]. Eur J Med Chem, 2025, 283: 117130.

[13] Sun GY, Wang ZY, Li YP, et al. Design and synthesis of isatin derivative payloaded peptide-drug conjugate as tubulin inhibitor against colorectal cancer [J]. Eur J Med Chem, 2025, 285: 117276.

[14] Vairin R, Tamminga C, Shi Z, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-phenyl indole analogues of OXi8006 as colchicine site inhibitors of tubulin polymerization and vascular disrupting agents [J]. Bioorg Med Chem, 2025, 118: 117981.

[15] Cavalli A, Bolognesi ML. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against trypanosoma and leishmania [J]. J Med Chem, 2009, 52: 7339-7359.

[16] Anighoro A, Bajorath J, Rastelli G. Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery [J]. J Med Chem, 2014, 57: 7874-7887.

[17] Sheldrake HM, Patterson LH. Strategies to inhibit tumor associated integrin receptors: rationale for dual and multi-antagonists [J]. J Med Chem, 2014, 57: 6301-6315.

[18] Prati F, Bottegoni G, Bolognesi ML, et al. BACE-1 inhibitors: from recent single-target molecules to multitarget compounds for Alzheimer's disease [J]. J Med Chem, 2018, 61: 619-637.

[19] Yakkala PA, Kamal A. Dual-targeting inhibitors involving tubulin for the treatment of cancer [J]. Bioorg Chem, 2025, 156: 108116.

[20] Baker MA, Hetherington L, Aitken RJ. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa [J]. J Cell Sci, 2006, 119: 3182-3192.

[21] Tomashov-Matar R, Levi M, Shalgi R. The involvement of Src family kinases (SFKs) in the events leading to resumption of meiosis [J]. Mol Cell Endocrinol, 2008, 282: 56-62.

[22] Wagner SMZ. A Role for the Ste20-Like Kinase, SLK, in Cell Migration [D]. Ottawa: University of Ottawa, 2008.

[23] Le XF, Bast RC Jr. Src family kinases and paclitaxel sensitivity [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12: 260-269.

[24] Raji L, Tetteh A, Amin ARMR. Role of c-Src in carcinogenesis and drug resistance [J]. Cancers (Basel), 2024, 16: 32.

[25] Zhang X, Zang Y, Yang H, et al. Preparation of hexahydro-1*H*-furo pyrrol-5-yl ethyl-2-methylphenyl pyridin-2-yl acetamide as dual target inhibitor of tubulin Src kinase: CN, 119306728 [P]. 2025-01-14.

[26] Anbalagan M, Ali A, Jones RK, et al. Peptidomimetic Src/pretubulin inhibitor KX-01 alone and in combination with paclitaxel suppresses growth, metastasis in human ER/PR/HER2-negative tumor xenografts [J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11: 1936-1947.

[27] Kasner MT, Halloran MB, Pan J, et al. A phase Ib dose escalation study of oral monotherapy with KX2-391 in elderly patients

with acute myeloid leukemia [J]. Invest New Drugs, 2022, 40: 773-781.

[28] Schlesinger T, Stockfleth E, Grada A, et al. Tirbanibulin for actinic keratosis: insights into the mechanism of action [J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2022, 15: 2495-2506.

[29] Antonarakis ES, Heath EI, Posadas EM, et al. A phase 2 study of KX2-391, an oral inhibitor of Src kinase and tubulin polymerization, in men with bone-metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2013, 71: 883-892.

[30] Subbaiah MAM, Meanwell NA. Bioisosteres of the phenyl ring: recent strategic applications in lead optimization and drug design [J]. J Med Chem, 2021, 64: 14046-14128.

[31] Yang YD, Engkvist O, Llinàs A, et al. Beyond size, ionization state, and lipophilicity: influence of molecular topology on absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity for druglike compounds [J]. J Med Chem, 2012, 55: 3667-3677.

[32] Liang TT, Zhou XM, Lu L, et al. Structure-activity relationships and antiproliferative effects of 1, 2, 3, 4-4*H*-quinoxaline derivatives as tubulin polymerization inhibitors [J]. Bioorg Chem, 2021, 110: 104793.