

1-[2-(金刚烷-1-基)-1*H*-吲哚-5-基]-3-取代硫脲衍生物作为 CDK9 抑制剂的设计合成及抗胃癌活性研究

于明月^{1,2}, 刘俊华¹, 张浩凡³, 朱德胜^{4*}, 黄建刚¹, 胡鸿雨^{1*} (1. 浙江师范大学行知学院, 浙江 兰溪 321100; 2. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000; 3. 厦门大学药学院, 福建 厦门 361102; 4. 金华中心医院, 浙江 金华 321000)

摘要:目的 设计合成新型的细胞周期蛋白依赖性激酶 9 (CDK9) 抑制剂 1-[2-(金刚烷-1-基)-1*H*-吲哚-5-基]-3-取代硫脲衍生物, 并对其抗胃癌的活性进行研究。方法 金刚烷甲酰氯为起始原料, 通过 6 步反应合成了一系列目标化合物 **7a**~**7m**, 并通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 HRMS 对所有目标化合物进行了结构鉴定。用噻唑蓝 (MTT) 法检测了合成化合物对于胃癌细胞生长的抑制作用, 用二磷酸腺苷-人乙二醛酶 (ADP-Glo) 激酶测定法检测了合成化合物对 CDK9 激酶活性影响, 并用免疫印迹法检测活性化合物对于下游信号的调控作用。结果 表明目标化合物对于胃癌细胞的生长具有一定的抑制活性, 其中化合物 **7i** 活性最优, 其对胃癌细胞系 (SGC-7901) 的 IC₅₀ 值为 (2.26 ± 0.04) μmol · L⁻¹, 且 **7i** 对正常胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 的毒性较小 (IC₅₀ > 100 μmol · L⁻¹)。在体外酶活性实验中, **7i** 在 1 μmol · L⁻¹ 作用下, CDK9 激酶活性为 (21.67 ± 1.47)%, 且在胃癌细胞中 **7i** 呈浓度依赖性地抑制 CDK9 下游蛋白 p-ser2 的表达。最后, 通过分子对接可知 **7i** 能稳定地结合在 CDK9 的活性位点并具有很高的结合亲和力。结论 设计合成的目标化合物是潜在的 CDK9 抑制剂, 具有较好的抗胃癌的活性, 有进一步研究的意义。

关键词: 金刚烷衍生物; 吲哚; 细胞周期依赖性蛋白激酶 9; 胃癌

doi: 10.11669/cpj.2024.21.003 中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)21-2003-08

Design, Synthesis and Anti-Gastric Cancer Activity of 1-(2-adamantan-1-yl-1*H*-indole-5-yl)-3-Substituted Thiourea Derivatives as CDK9 Inhibitors

YU Mingyue^{1,2}, LIU Junhua¹, ZHANG Haofan³, ZHU Desheng^{4*}, HUANG Jiangan¹, HU Hongyu^{1*} (1. Xingzhi College, Zhejiang Normal University, Lanxi, 321100, China; 2. College of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Yichun 336000, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 4. Jinhua Municipal Central Hospital, Jinhua 321000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design and synthesize novel CDK9 inhibitors 1-(2-adamantan-1-yl-1*H*-indole-5-yl)-3-substituted thiourea derivatives and study their anti-gastric cancer activities. **METHODS** A series of target compounds **7a-7m** were synthesized from adamantan formyl chloride by 6-step reactions. The structures of the target compounds were identified by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and HRMS. MTT assay was used to detect the inhibitory effect of synthetic compounds on the growth of gastric cancer cells, ADP-Glo kinase assay was used to detect the effect of synthetic compounds on CDK9 kinase activity and Western blot assay was used to detect the regulatory effect of hit compound on downstream signaling pathways. **RESULTS** The target compounds had certain inhibitory activity on the growth of gastric cancer cells, among which compound **7i** had the best activity on the gastric cancer cell line (SGC-7901) with IC₅₀ value of (2.26 ± 0.04) μmol · L⁻¹, and **7i** had little toxicity on normal gastric epithelial cells (IC₅₀ > 100 μmol · L⁻¹). In addition, **7i** showed specific inhibitory effect on CDK9 kinase activity *in vitro*. Upon 1 μmol · L⁻¹ **7i** treatment, CDK9 kinase activity was only (21.67 ± 1.47)%, and in gastric cancer cells **7i** inhibited CDK9 downstream protein p-ser2 expression in a concentration-dependent manner. Finally, molecular docking study showed that **7i** could stably bind to the active site of CDK9 and had a high binding affinity. **CONCLUSION** This series of compounds have good anti-gastric cancer activity and are worth of further study.

KEY WORDS: adamantan derivatives; indole; CDK9; gastric cancer

胃癌是世界上最常见的癌症之一, 是世界上第三大癌症死亡原因^[1]。中老年患者是胃癌的高发人群, 胃癌一经发现时常处于晚期, 患者的 5 年生存率往往不足 30%^[2-3]。因此, 了解胃癌的发生和发

基金项目: 浙江省公益基金项目资助 (LGF22H300015); 金华市重点研发项目资助 (2021-3-150, 2023-3-082)

作者简介: 于明月, 女, 本科 研究方向: 新药研发 * 通讯作者: 朱德胜, 男, 博士研究生 研究方向: 泌尿系肿瘤的基础研究与外科临床治疗 Tel: (0579)82553226; 胡鸿雨, 男, 博士, 副教授 研究方向: 肿瘤药物设计合成及活性筛选 Tel: (0579)82291190

展,并可能发现新的诊断和预后的生物标志物,对改善胃癌患者的临床结果至关重要。临床上,胃癌的治疗方法通常以手术治疗为主,药物治疗为辅^[4]。尽管化疗能够在一定程度上延长胃癌患者生存期,但传统的化疗药物存在特异性差,毒副作用大,易导致耐药等问题,严重影响了胃癌患者的治疗效果和生存。因此,寻找针对胃癌的具有良好疗效的药物十分重要^[5]。

周期蛋白依赖性激酶(CDKs)是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞周期进程或转录调节中起着重要的作用^[6-9]。最近的研究表明,CDKs在多种癌症中过表达,并最终导致细胞增殖失控和耐药^[10]。细胞周期蛋白依赖性激酶9(CDK9)是周期蛋白依赖性激酶中重要的一员,在稳定RNA转录延伸方面起着重要的作用。CDK9和细胞周期蛋白T共同构成正转录延伸因子b复合物,通过RNA聚合酶II(RNAPII)的磷酸化促进转录延伸^[11-12]。最近的研究表明,CDK9在宫颈癌、前列腺癌、肺癌等多种人类癌症中发挥关键作用^[13-18]。双荧光素酶报告基因实验表明,miR-613通过下调CDK9基因抑制胃癌细胞的转移和进展^[19]。因此,通过靶向CDK9从而干预胃癌的发展发生过程具有一定的治疗前景。

分子杂合技术是药物设计与开发领域中常用的结构修饰策略,将不同生物活性分子中的药效基团拼接,可能产生具有潜在的高活性、低毒性和多重作

用机制的杂合分子。吡啶类化合物是一类重要的杂环化合物,广泛存在于自然界中,吡啶类化合物选择性强和毒副作用小等特点已经凸显出其在抗肿瘤化合物中的重要作用^[20]。金刚烷及其衍生物,具有强的脂溶性,能够很好地使药物进入细胞内发挥作用^[21],还具有抗病毒、抗炎等活性^[22]。

本研究在前期的工作基础上,利用分子杂合方法和片段替换策略,保留了前期发现的CDK9抑制剂3b中必须的吡啶环^[23]和AHPN的金刚烷的药效基团进行分子杂合,设计合成了一系列新型的靶标化合物(图1),以期获得比3b活性更优具CDK9抑制剂1-[2-(金刚烷-1-基)-1*H*-吡啶-5-基]-3-取代硫脲衍生物。其目标化合物7a~7m的合成路线见图2。

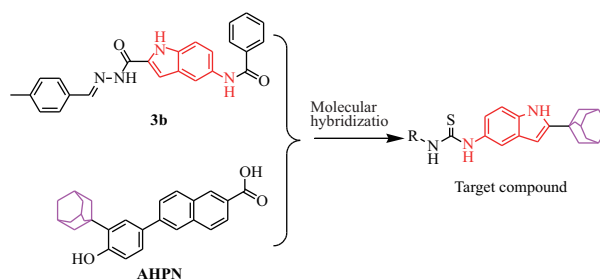


图1 1-[2-(金刚烷-1-基)-1*H*-吡啶-5-基]-3-取代硫脲衍生物的设计

Fig. 1 Design of 1-(2-adamantan-1-yl-1*H*-indole-5-yl)-3-substituted thiourea derivatives

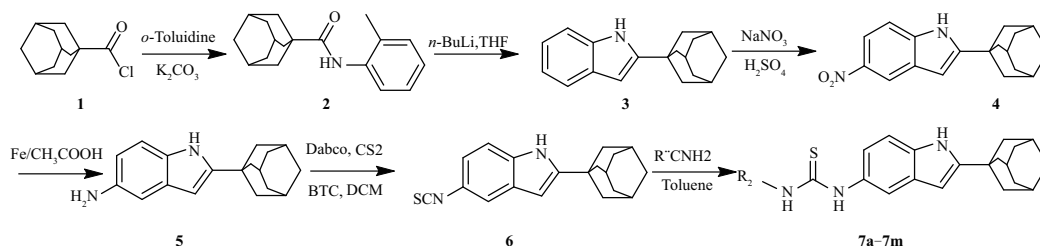


图2 1-[2-(金刚烷-1-基)-1*H*-吡啶-5-基]-3-取代硫脲衍生物7a~7m的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of 1-(2-adamantan-1-yl-1*H*-indole-5-yl)-3-substituted thiourea derivatives 7a-7m

1 仪器与试剂

1.1 主要药品与试剂

噻唑蓝(MTT)粉末(ST1537,法国碧云天生物技术有限公司),p-ser2(13499S,美国Cell Signaling Technology公司), β -actin(81115-1-RR,美国Proteintech Group公司),SGC-7901(法国碧云天生物技术有限公司),CP-H048(中国普诺赛生命科技有限公司),人胃黏膜上皮细胞GES-1(武汉尚恩生物技术有限公司),CDK9/Cyclin T1激酶复合物,激

酶底物由厦门大学药学院馈赠,ADP-GloTM激酶检测试剂盒(V910,美国Promega公司)。

1.2 主要仪器

WRS-1B数字熔点仪,Bruker Avance 600型核磁共振波谱仪(DMSO-*d*₆或CDCl₃为溶剂,TMS为内标)、Agilent 6230质谱仪、酶标仪(美国Thermo公司);化学发光成像仪(美国Bio-Rad公司),Agilent 1260高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)。

2 实验方法

目标化合物的合成过程以金刚烷甲酰氯和邻甲基苯胺为原料反应,得到化合物 2-甲基金刚烷酰苯胺(化合物 2),再与正丁基锂反应得到合成得到 2-金刚烷-1*H*-吡啶(化合物 3)。化合物 3 硝化得到 2-金刚烷-5-硝基-1*H*-吡啶(化合物 4),化合物 4 还原得 2-金刚烷-5-氨基-1*H*-吡啶(化合物 5)。化合物 5 与固体光气得 2-金刚烷-5-异氰酸-1*H*-吡啶(化合物 6)。化合物 6 和不同的硫代异氰酸反应得到目标化合物 7a ~ 7m,合成路线见图 2。其结构经 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HR-MS 表征。

2.1 中间体 2-甲基金刚烷酰苯胺合成(2)

在 50 mL 干燥单口瓶中依次加入甲苯(10 mL),1-金刚烷甲酰氯(0.99 g,5 mmol),2-甲基苯胺(0.54 g,5 mmol),碳酸钾(0.69 g,5 mmol)搅拌升温至 80 °C,TLC 检测反应进程。反应结束,冷却抽滤,水洗,烘干得白色固体产物粗品并用乙醇重结晶,得 2-甲基金刚烷酰苯胺 1.17 g,收率 87%。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.24 ~ 7.18 (m, 2H), 7.17 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.05 (dt, $J = 1.1, 7.4$ Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.11 (brs, 3H), 1.99 (d, $J = 2.6$ Hz, 6H), 1.77 (m, 6H)。

2.2 中间体 2-金刚烷-1*H*-吡啶的合成(3)

参考文献[24]方法在干燥的 25 mL 三口瓶中,分别加入 2'-甲基金刚烷酰苯胺(0.285 g, 10 mmol),15 mL 四氢呋喃溶剂,降温到 0 ~ 5 °C,在氮气保护下滴加正丁基锂(2 mL)。TLC 检测反应,反应结束。用体积分数 5% 稀盐酸调 pH 值至 7.0 ~ 7.5,分液,有机相用无水硫酸钠干燥后,过滤,减压浓缩得到的粗产物用柱层析分离(洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 = 10:1)得 2-金刚烷吡啶 0.166 g,收率 66.1%。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.30 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 0.5, 8.1$ Hz, 1H), 6.88 (dt, $J = 1.1, 7.5$ Hz, 1H), 6.83 ~ 6.77 (m, 1H), 5.98 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H), 1.97 (d, $J = 2.6$ Hz, 3H), 1.93 (d, $J = 2.9$ Hz, 6H), 1.73 (brs, 6H)。

2.3 中间体 2-金刚烷-5-硝基-1*H*-吡啶的合成(4)

参考文献[25]在 25 mL 三口瓶中,0 °C 下加入 2-金刚烷-1*H*-吡啶(0.25 g, 10 mmol)和浓硫酸(0.8 mL),再滴加硝酸钠(0.085 g, 10 mmol)的硫酸(0.8 mL)溶液,滴加结束后,保温反应 1 ~ 2 h, TLC 检测,反应结束。加入大量的冰水,析出黄色固体,过滤,水洗,干燥。粗产物用柱层析分离(洗脱剂为石油醚-乙酸乙酯 = 5:1)得黄色固体产物 2-金

刚烷基-5-硝基-1*H*-吡啶 0.24 g,收率 82.8%。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 11.65 (brs, 1H), 8.44 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 2.2, 9.0$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 2.07 (brs, 3H), 1.98 (brs, 6H), 1.81 ~ 1.67 (m, 6H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 154.0, 140.8, 139.9, 127.7, 116.9, 116.3, 111.4, 98.2, 41.9, 36.6, 34.1, 28.2; ESI-HRMS (+): m/z : $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2^+$ [M + H]⁺ 297.1599,理论值:297.1598。

2.4 中间体 2-金刚烷-5-氨基-1*H*-吡啶的合成(5)

在 250 mL 三口瓶中,依次加入乙醇(100 mL),乙酸(10 mL),水(20 mL),铁粉(8.62 g,0.15 mol);升温至 75 °C,分批加 2-金刚烷基-5-硝基-1*H*-吡啶(11.4 g,0.038 mol),结束后保温反应 2 h,TLC 检测反应。结束后反应液热过滤,滤液冷却后减压浓缩除去溶剂;在加入 80 mL 水后,再在搅拌下加入 80 mL 乙酸乙酯,并用碳酸氢钠调 pH 值为 7 ~ 8;分液,有机相用无水硫酸钠干燥,抽滤,柱层析分离(石油醚-乙酸乙酯 = 21)得红色固体产物 2-金刚烷-5-氨基-1*H*-吡啶 6.90 g,收率 67.0%。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (brs, 1H), 7.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.57 (dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz, 1H), 6.05 (dd, $J = 0.7, 2.2$ Hz, 1H), 3.65 ~ 3.23 (m, 2H), 2.09 (brs, 3H), 1.96 (d, $J = 2.38$ Hz, 6H), 1.78 (q, $J = 12.2$ Hz, 6H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 149.9, 139.3, 130.3, 129.4, 111.6, 110.8, 105.3, 95.5, 42.6, 36.8, 33.7, 28.5; ESI-HRMS (+): m/z : $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2^+$ [M + H]⁺ 267.1858 [M + H]⁺,理论值:267.1856。

2.5 中间体 2-金刚烷-5-硫代异氰酸-1*H*-吡啶的合成(6)

在干燥的 100 mL 的三口瓶,依次加入 2-金刚烷-5-氨基-1*H*-吡啶(4.10 g,15.5 mmol)的甲苯溶液(20 mL),三乙胺(3 mL)。再缓慢滴加 CS_2 (3.50 g, 46.5 mmol)。室温反应 8 h,过滤,干燥后溶于二氯甲烷(30 mL)后,滴加三光气(5.0 g,17 mmol),温度在 0 ~ 5 °C,反应 2 h 后,TLC 检测,反应结束,用柱层析分离(石油醚-乙酸乙酯 = 10:1)得白色固体产物 2-金刚烷基-5-硫代异氰酸-1*H*-吡啶 2.89 g,收率 64.0%。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.40 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 2.14 ~ 2.08 (m, 3H), 1.99 ~ 1.94 (m, 6H), 1.85 ~ 1.74 (m, 6H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 151.4, 134.1,

131. 8, 128. 7, 122. 6, 119. 0, 117. 3, 111. 2, 96. 8, 42. 5, 36. 7, 33. 9, 28. 4; ESI-HRMS (+): m/z : $C_{19}H_{21}N_2S^+ [M + H]^+$ 309. 142 2, 理论值: 309. 142 0。

2. 6 1-(2-(金刚烷-1-基)-1*H*-吡啶-5-基)-3-取代硫脲合成(7a~7m)

在 25 mL 的反应瓶中, 加入 2-金刚烷基-5-硫代异氰酸-1*H*-吡啶(0. 145 g, 5 mmol), 甲苯(10 mL), 取代胺(5 mmol), 升温至 80 °C, TLC 检测反应。冷却, 过滤, 干燥得白色固体产物, 收率 70. 0% ~ 88. 6%。

7a: 白色固体, 收率 70. 1%, 纯度 93. 5%, m. p. 198 ~ 200 °C, 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10. 92 (s, 1H), 9. 25 (brs, 1H), 7. 27 (dd, $J = 3. 2, 4. 95$ Hz, 2H), 6. 83 (dd, $J = 1. 7, 8. 5$ Hz, 1H), 6. 08 (d, $J = 1. 71$ Hz, 1H), 3. 47 ~ 3. 40 (m, 2H), 2. 06 (brs, 3H), 1. 96 (d, $J = 1. 96$ Hz, 6H), 1. 76 (br, 6H), 1. 54 ~ 1. 41 (m, 2H), 1. 32 ~ 1. 19 (m, 6H), 0. 87 (t, $J = 6. 79$ Hz, 3H)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 181. 0, 152. 5, 151. 1, 135. 3, 134. 6, 128. 4, 116. 8, 111. 5, 95. 8, 44. 5, 42. 2, 36. 8, 33. 9, 31. 5, 29. 1, 28. 3, 26. 5, 22. 5, 14. 4; ESI-HRMS (+): m/z : $C_{25}H_{36}N_3S^+ [M + H]^+$ 410. 262 5, 理论值: 410. 262 4。

7b: 白色固体, 收率 78. 4%, 纯度 90. 5%, m. p. 201 ~ 203 °C, 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10. 90 (s, 1H), 9. 21 (s, 1H), 7. 32 (s, 1H), 7. 25 (d, $J = 8. 44$ Hz, 1H), 6. 96 (brs, 1H), 6. 87 (dd, $J = 1. 7, 8. 4$ Hz, 1H), 6. 07 (d, $J = 1. 3$ Hz, 1H), 2. 06 (brs, 3H), 1. 96 (brs, 6H), 1. 89 ~ 1. 83 (m, 2H), 1. 80 ~ 1. 71 (m, 6H), 1. 64 (d, $J = 12. 6$ Hz, 2H), 1. 54 (d, $J = 12. 7$ Hz, 1H), 1. 32 ~ 1. 04 (m, 5H)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 180. 0, 151. 0, 134. 4, 130. 1, 128. 3, 118. 8, 116. 4, 111. 3, 95. 7, 52. 9, 42. 2, 36. 8, 33. 9, 32. 4, 28. 4, 25. 6, 25. 1; ESI-HRMS (+): m/z : $C_{25}H_{34}N_3S^+ [M + H]^+$ 408. 246 9, 理论值: 408. 246 8。

7c: 白色固体, 收率 80. 1%, 纯度 94. 6%, m. p. 221 ~ 223 °C, 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10. 91 (s, 1H), 9. 66 (s, 1H), 9. 35 (brs, 1H), 7. 50 (d, $J = 7. 8$ Hz, 2H), 7. 42 (s, 1H), 7. 33 ~ 7. 25 (m, 3H), 7. 13 ~ 7. 07 (m, 1H), 6. 98 (dd, $J = 1. 8, 8. 5$ Hz, 1H), 6. 10 (d, $J = 1. 6$ Hz, 1H), 2. 07 (brs, 3H), 1. 97 (s, 6H), 1. 84 ~ 1. 66 (m, 6H)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 180. 4, 151. 0, 140. 3, 134. 5, 130. 5, 128. 7, 128. 3, 124. 6, 124. 3, 119. 0, 116. 6, 111. 1, 95. 8,

42. 3, 36. 8, 33. 9, 28. 4; ESI-HRMS (+): m/z : $C_{25}H_{28}N_3S^+ [M + H]^+$ 402. 199 9, 理论值: 402. 199 8。

7d: 白色固体, 收率 78. 8%, 纯度 90. 9%, m. p. 225 ~ 226 °C, 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10. 91 (s, 1H), 9. 54 (s, 1H), 8. 87 (brs, 1H), 7. 42 (d, $J = 1. 5$ Hz, 1H), 7. 30 ~ 7. 24 (m, 2H), 7. 22 (dd, $J = 1. 5, 6. 9$ Hz, 1H), 7. 19 ~ 7. 09 (m, 2H), 6. 98 (dd, $J = 1. 9, 8. 5$ Hz, 1H), 6. 10 (d, $J = 1. 7$ Hz, 1H), 2. 24 (s, 3H), 2. 07 (brs, 3H), 1. 97 (d, $J = 2. 0$ Hz, 6H), 1. 82 ~ 1. 72 (m, 6H)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 181. 1, 151. 0, 138. 8, 135. 3, 134. 6, 130. 6, 128. 7, 128. 3, 126. 6, 126. 3, 119. 2, 116. 9, 111. 2, 95. 8, 42. 3, 36. 8, 33. 9, 28. 4, 18. 4; ESI-HRMS (+): m/z : $C_{26}H_{30}N_3S^+ [M + H]^+$ 416. 215 2, 理论值: 416. 215 5。

7e: 白色固体, 收率 75. 6%, 纯度 94. 0%, m. p. 234 ~ 236 °C, 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10. 91 (s, 1H), 9. 62 (s, 1H), 9. 27 (brs, 1H), 7. 41 (s, 1H), 7. 32 ~ 7. 24 (m, 3H), 7. 19 (t, $J = 8. 1$ Hz, 1H), 6. 97 (dd, $J = 1. 8, 8. 5$ Hz, 1H), 6. 92 (d, $J = 7. 5$ Hz, 1H), 6. 09 (d, $J = 1. 5$ Hz, 1H), 2. 28 (s, 3H), 2. 07 (brs, 3H), 1. 97 (brs, 6H), 1. 83 ~ 1. 63 (m, 6H)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 180. 3, 151. 0, 140. 2, 137. 9, 134. 5, 130. 5, 128. 5, 128. 2, 125. 3, 124. 9, 121. 5, 119. 1, 116. 6, 111. 1, 95. 8, 42. 3, 36. 8, 33. 9, 28. 4, 21. 5; ESI-HRMS (+): m/z : $C_{26}H_{30}N_3S^+ [M + H]^+$ 416. 215 0, 理论值: 416. 215 5。

7f: 白色固体, 收率 79. 5%, 纯度 95. 1%, m. p. 227 ~ 228 °C, 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10. 92 (brs, 1H), 9. 59 (brs, 1H), 9. 26 (brs, 1H), 7. 41 (s, 1H), 7. 35 (d, $J = 8. 0$ Hz, 2H), 7. 27 (d, $J = 8. 4$ Hz, 1H), 7. 11 (d, $J = 8. 0$ Hz, 2H), 6. 97 (d, $J = 7. 7$ Hz, 1H), 6. 09 (s, 1H), 2. 28 (s, 3H), 2. 07 (brs, 3H), 1. 97 (brs, 6H), 1. 81 ~ 1. 70 (m, 6H)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 180. 4, 151. 0, 137. 7, 134. 5, 133. 8, 130. 5, 129. 1, 128. 2, 124. 6, 119. 1, 116. 6, 111. 1, 95. 7, 42. 3, 36. 8, 33. 9, 28. 4, 21. 0; ESI-HRMS (+): m/z : $C_{26}H_{30}N_3S^+ [M + H]^+$ 416. 215 1, 理论值: 416. 215 5。

7g: 白色固体, 收率 80. 1%, 纯度 94. 0%, m. p. 244 ~ 246 °C, 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10. 90 (s, 1H), 9. 50 (s, 1H), 9. 14 (brs, 1H), 7. 41 (d, $J = 0. 9$ Hz, 1H), 7. 33 (d, $J = 8. 9$ Hz, 2H), 7. 27 (d, $J = 8. 4$ Hz, 1H), 6. 97 (dd, $J = 1. 8, 8. 5$ Hz, 1H),

6.88(d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.09(d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 3.74(s, 3H), 2.07(brs, 3H), 1.97(brs, 6H), 1.82 ~ 1.71(m, 6H)。¹³C-NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.7, 156.8, 151.0, 134.5, 133.1, 130.5, 128.3, 126.7, 119.1, 116.7, 113.9, 111.1, 95.7, 55.7, 42.3, 36.8, 33.9, 28.4; ESI-HRMS(+): m/z : $C_{26}H_{30}N_3S^+[M+H]^+$ 432.2106, 理论值:432.2104。

7h: 白色固体, 收率 73.1%, 纯度 96.8%, m. p. 208 ~ 210 °C, ¹H-NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.93(s, 1H), 9.70(brs, 1H), 9.31(brs, 1H), 7.46(dd, $J = 5.1, 8.6$ Hz, 2H), 7.40(s, 1H), 7.27(d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.14(t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.96(dd, $J = 1.4, 8.5$ Hz, 1H), 6.09(d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 2.07(brs, 3H), 1.97(brs, 6H), 1.80 ~ 1.72(m, 6H)。¹³C-NMR(150 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.7, 159.5(d, $J = 238.5$ Hz), 151.0, 136.7, 134.6, 130.3, 128.3, 126.9, 119.0, 116.6, 115.2(d, $J = 21.0$ Hz), 111.2, 95.8, 42.2, 36.8, 33.9, 28.4; ESI-HRMS(+): m/z : $C_{25}H_{27}FN_3S^+[M+H]^+$ 420.1904, 理论值:420.1904。

7i: 白色固体, 收率 79.1%, 纯度 97.6%, m. p. 245 ~ 246 °C, ¹H-NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.94(brs, 1H), 9.78(brs, 1H), 9.44(brs, 1H), 7.52(d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.41(brs, 1H), 7.35(d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.27(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.96(d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.09(s, 1H), 2.07(brs, 3H), 1.97(brs, 6H), 1.81 ~ 1.72(m, 6H)。¹³C-NMR(150 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.4, 151.1, 139.4, 134.6, 128.7, 128.4, 128.2, 126.0, 125.8, 119.0, 116.6, 111.2, 95.8, 42.2, 36.8, 33.9, 28.4; ESI-HRMS(+): m/z : $C_{25}H_{27}ClN_3S^+[M+H]^+$ 436.1605, 理论值:436.1609。

7j: 白色固体, 收率 82.3%, 纯度 97.1%, m. p. 218 ~ 220 °C, ¹H-NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.93(s, 1H), 9.95(s, 1H), 9.71(brs, 1H), 7.78(d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.65(d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.43(s, 1H), 7.28(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.99(dd, $J = 1.7, 8.5$ Hz, 1H), 6.10(d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 2.07(brs, 3H), 1.97(d, $J = 2.0$ Hz, 6H), 1.82 ~ 1.69(m, 6H)。¹³C-NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.3, 151.1, 144.3, 134.6, 130.3, 128.3, 125.7, 123.5, 118.8, 116.5, 111.2, 95.8, 42.2, 36.8, 33.9, 28.4; ESI-HRMS(+): m/z : $C_{26}H_{27}F_3N_3S^+[M+H]^+$ 470.1872, 理论值:470.1872。

7k: 白色固体, 收率 88.6%, 纯度 96.2%, m. p.

242 ~ 243 °C, ¹H-NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.78 ~ 10.94(m, 1H), 9.42(brs, 1H), 8.77(brs, 1H), 7.40(s, 1H), 7.26(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.10(d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.01(s, 1H), 6.98 ~ 6.92(m, 2H), 6.14 ~ 5.94(m, 1H), 2.25(s, 3H), 2.19(s, 3H), 2.05(brs, 3H), 1.96(brs, 6H), 1.82 ~ 1.70(m, 6H)。¹³C-NMR(150 MHz, DMSO- d_6) δ : 151.0, 135.8, 135.1, 134.6, 131.2, 129.4, 128.7, 128.6, 128.3, 126.9, 119.2, 116.9, 95.8, 42.3, 36.8, 33.9, 28.4, 21.0, 18.3; ESI-HRMS(+): m/z : $C_{27}H_{32}N_3S^+[M+H]^+$ 430.2310, 理论值:430.2311。

7l: 白色固体, 收率 72.8%, 纯度 97.1%, m. p. 228 ~ 230 °C, ¹H-NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.94(s, 1H), 9.85(brs, 1H), 8.96(brs, 1H), 7.52(d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 7.42(s, 1H), 7.31 ~ 7.23(m, 2H), 7.07 ~ 7.01(m, 1H), 6.97(dd, $J = 1.8, 8.5$ Hz, 1H), 6.11(d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 2.07(brs, 3H), 1.97(d, $J = 2.2$ Hz, 6H), 1.83 ~ 1.69(m, 6H)。¹³C-NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.6, 161.7, 156.2, 151.1(d, $J = 25.0$ Hz), 134.7, 131.0, 130.2(d, $J = 25.0$ Hz), 129.4, 128.7, 128.3, 124.9, 119.0, 116.8, 111.3, 111.1, 104.5, 95.8, 42.2, 36.8, 33.9, 28.4; ESI-HRMS(+): m/z : $C_{25}H_{26}F_2N_3S^+[M+H]^+$ 438.1812, 理论值:438.1810。

7m: 白色固体, 收率 74.1%, 纯度 97.6%, m. p. 256 ~ 258 °C, ¹H-NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.92(s, 1H), 9.66(brs, 1H), 9.44(brs, 1H), 7.97(dd, $J = 7.9, 15.3$ Hz, 2H), 7.86 ~ 7.79(m, 1H), 7.63 ~ 7.43(m, 5H), 7.30(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.06(dd, $J = 1.9, 8.5$ Hz, 1H), 6.11(d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 2.07(brs, 3H), 1.98(brs, 6H), 1.82 ~ 1.70(m, 6H)。¹³C-NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.1, 151.0, 136.2, 134.6, 134.3, 130.7, 128.5, 128.3, 126.9, 126.5, 126.4, 126.0, 123.7, 119.4, 117.1, 111.2, 95.8, 42.3, 36.8, 33.9, 28.4; ESI-HRMS(+): m/z : $C_{29}H_{30}N_3S^+[M+H]^+$ 452.2149, 理论值:452.2155。

2.7 MTT 法检测细胞的存活率

采用 MTT 法测定了 **7a** ~ **7m** 对胃癌细胞系 (SGC-7901) 和正常胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 体外抗肿瘤活性。取处于对数生长期的状态良好的细胞一瓶, 加入质量分数 0.25% 的胰蛋白酶消化液消化, 使贴壁细胞脱落, 计数, 制成每毫升 2×10^4 ~ 4×10^4 个细胞的悬液。接种于 96 孔板上, 每孔 180 μ L, 置恒温

CO₂培养箱中培养 24 h。换液,加入受试化合物的 DMSO 溶液,每孔 20 μL,再加入体积分数 10% 的血清培养液 80 μL,培养 48 h。将 MTT 加入 96 孔板中,每孔 20 μL,培养箱中反应 4 h。吸去上清液,加入 DMSO,每孔 150 μL,平板摇床上振摇 5 min。用酶联免疫检测仪在波长为 570 nm 处测定每孔的光密度值(OD 值),并按照公式 1 计算对细胞增殖的抑制率。

抑制率% = [(阴性对照组 OD 值 - 受试物组 OD 值) / 阴性对照组 OD 值] × 100% 公式(1)

计算不同浓度下的抑制率,再以此求出各样品的 IC₅₀ 值。

2.8 CDK9 激酶活性检测

本实验使用 ADP-Glo 激酶测定法,测试化合物对 CDK9 激酶活性影响。取 4 μL CDK9/Cyclin T1 激酶复合物 (3 ng · μL⁻¹), 5 μL 激酶底物 (0.2 μg · μL⁻¹), 10 μmol · L⁻¹ 三磷酸腺苷(ATP) 和终浓度 1 μmol · L⁻¹ 的化合物添加至 384 孔板中, 37 °C 孵育 20 min 后室温静置 10 min。然后,将等体积的 ADP-Glo 试剂添加到每个孔中,室温静置 30 min 后将 10 μL 激酶检测试剂添加到孔中,室温静置 30 min 使用多功能酶标仪检测。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western Blot, WB)

细胞接种于 6 孔板中,24 h 后加入不同浓度的化合物 **7I**, 24 h 后,吸去培养基,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗 3 次,加入 1 × Loading Buffer,金属浴 10 min,离心,然后在 Tris-甘氨酸缓冲液中电泳。电泳完毕,进行电转移,使蛋白转到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,封闭 1 h 后加入一抗孵育过夜;孵育之后的膜用三乙醇胺缓冲盐水(TBST)溶液摇洗 3 次,之后加入对应的二抗,室温孵育 1 h 后显影。

2.10 分子对接

本研究采用分子对接方法进一步探索了化合物 **7I** 与 CDK9 的相互作用模式。首先,用于分子对接的 CDK9/cyclinT1 晶体复合物(PDB ID: 7NWK)从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/structure/7NWK>) 下载得到,该晶体分辨率为 2.81 Å。由于从晶体数据库下载得到的蛋白结构没有氢原子,不含电荷信息,部分氨基酸残基或者 loop 环缺失,所以需要对其进行结构准备。使用 Schrödinger 软件(V 2023-1)的 Protein Preparation Wizard 模块以默认参数设置对 CDK9 蛋白结构进行去除水分子和溶剂分子,添加氢原子,分配电荷,补全缺失的氨基酸残基,改变残基的质子化状态,优化蛋白的氢键网络以及

使用 OPLS4 力场对蛋白结构进行能量最小化等处理。使用 Schrödinger 的 LigPrep (LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023) 工具对 **7I** 在 OPLS4 力场下以默认参数进行结构准备,包括加氢、加电荷以及在 pH 值为 7.0 ± 2.0 状态下生成可能的质子化状态等。然后利用 Schrödinger 软件的 Ligand Docking 模块将准备好的 **7I** 分子对接到 CDK9 的 ATP 活性位点。对接盒子的中心位于原晶体配体的质心,对接精度采用高精度的 XP 方法(extra precision),其余参数为软件默认设置。最后使用 Schrödinger 的 MMGBSA 模块计算了 **7I** 和 CDK9 复合物的结合能。Schrödinger 的 Maestro (Version 12.5) 程序用于晶体结构和对接结果分析的主要可视化工具。分子对接结果用 PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.4 Schrödinger, LLC.) 进行渲染和展示。

3 结果与讨论

3.1 化合物构效讨论

采用 MTT 法检测了合成的化合物对于胃癌细胞 SGC-7901 体外活性测试结果见表 1。分别考察了当 R 基为烷基、环烷基、六元取代芳基、芳稠环时,化合物对 SGC-7901 抑制活性的影响。根据表 1,当 R 为己基、环己基、苯基、奈基时, **7c** > (苯基) > **7a** (己基) > **7b** (环己基) > **7m** (奈基); 在苯环的一取代中(**7d** ~ **7j**), 4-氯取代(**7i**) > 4-氟取代(**7h**) > 4-甲氧基取代(**7g**) > 4-三氟甲基取代(**7j**) > 2-甲基取代(**7d**) > 3-甲基取代(**7e**) > 4-甲基取代(**7f**); 在苯环的二取代中(**7k** ~ **7l**), 2,4-二氯取代(**7l**) > 2,4-二甲基取代(**7k**)。其中 **7I** 效果最好,其 IC₅₀ 值为 (2.26 ± 0.04) μmol · L⁻¹。此外, **7I** 对正常胃黏膜上皮细胞(GES-1)的 IC₅₀ 为 (103.24 ± 0.67) μmol · L⁻¹。

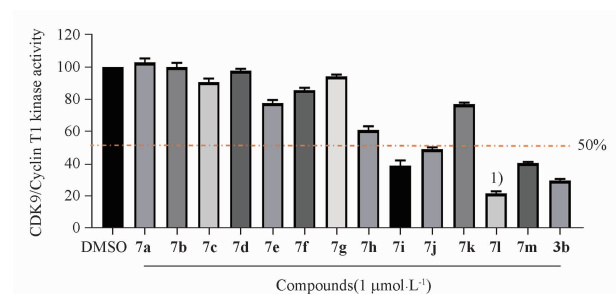
3.2 化合物对 CDK9 激酶活性影响

采用 ADP-Glo 激酶测定法,测试 1 μmol · L⁻¹ 化合物对 CDK9 激酶活性影响,结果见图 3,先导化合物 **3b** 展现出 CDK9 激酶抑制活性,在 1 μmol · L⁻¹ 作用浓度下,CDK9 激酶活性为 (29.68 ± 1.10), 合成的化合物 **7i**, **7j**, **7I** 影响 CDK9 激酶活性(CDK9/Cyclin T1 kinase activity < 50%), 分别为 (**7i**: 39.00 ± 3.29, **7j**: 49.17 ± 1.18, **7I**: 21.67 ± 1.47), 与 MTT 结果一致, **7I** 影响 CDK9 激酶活性最为明显,且与先导化合物 **3b** 相比, **7I** 抑制 CDK9 激酶活性更为显著,提示 **7I** 为潜在的 CDK9 抑制剂,可作为候选药物进行活性验证。

表 1 1-[2-(金刚烷-1-基)-1*H*-吡唑-5-基]-3-取代硫脲的抗肿瘤(SGC-7901)活性。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 Antitumor activities(SGC-7901) of 1-[2-(adamantan-1-yl)-1*H*-indol-5-yl]-3-substituted urea. n = 3, $\bar{x} \pm s$

Compound	Structure R	IC ₅₀ /μmol · L ⁻¹	Compound	Structure R	IC ₅₀ /μmol · L ⁻¹
7a		15.35 ± 0.23	7b		21.24 ± 0.34
7c		10.11 ± 0.12	7d		12.10 ± 0.45
7e		14.56 ± 0.20	7f		17.23 ± 0.11
7g		8.45 ± 0.07	7h		8.09 ± 0.37
7i		7.35 ± 0.11	7j		9.76 ± 0.20
7k		13.18 ± 0.47	7l		2.26 ± 0.04
7m		24.16 ± 0.14	3b ^[23]		7.99 ± 0.66



注:与空白对照组比较,¹⁾P < 0.05。

Note:¹⁾P < 0.05, compared with blank control group.

图 3 化合物 7a ~ 7m 对细胞周期蛋白依赖性激酶 9/细胞周期蛋白 T1 (CDK9/Cyclin T1) 激酶活性影响。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 3 Effects of compounds 7a - 7m on CDK9/cyclin T1 kinase activity. n = 3, $\bar{x} \pm s$

3.3 WB 检测化合物对细胞蛋白表达水平的影响

体外抗肿瘤细胞毒活性及其他生物活性初步评估显示:测试化合物中,化合物 7l 具有相对最佳的抗肿瘤活性,因此对化合物 7l 做进一步的生物活性测试。以不同浓度的 7l 对 SGC-7901 处理 24 h,随后用 WB 检测对 CDK9 的调控情况。CDK9 下游底物丝氨酸二号位 (p-ser2) 的表达与转录活性有关,由图可以看出,7l 可以浓度依赖性地引起 p-ser2 表达降低,表明 CDK9 可能是 7l 的潜在靶点(图 4)。

3.4 7l 与 CDK9 结合模式分析

本研究进一步使用分子对接方法预测了 7l 和 CDK9 的结合模式。分子对接显示,化合物 7l 可以结合在 CDK9 的 ATP 活性口袋中,7l 的三维结构可以很好地契合在 CDK9 的活性口袋,见图 5A。从图 5B 可以看出,化合物 7l 的吡唑环母核和硫脲键

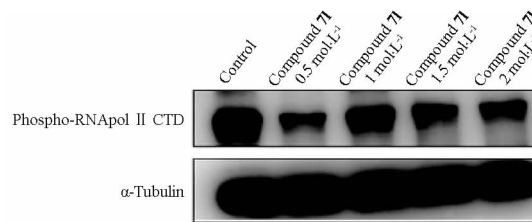
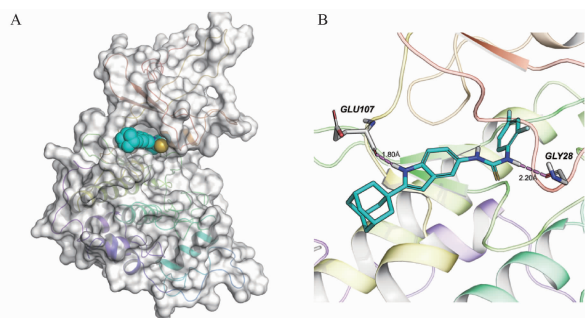


图 4 蛋白免疫印迹法(WB)检测 CDK9 下游蛋白变化

Fig. 4 Western blot analysis of changes of CDK9 downstream protein



A - 7l 与 CDK9 结合的表面示意图;B - 7l 与蛋白结合的三维空间相互作用图。
A - Schematic representation of the surface of 7l binding to CDK9; B - The three-dimensional interaction diagram of 7l binding to the protein.

图 5 化合物 7l 与 CDK9 的结合模式图

Fig. 5 Binding pattern of compound 7l to CDK9

能够稳定地与 CDK9 的关键残基形成相互作用,吡唑环母核 N 原子上的氢作为氢键供体可以和 CDK9 铰链区的 GLU107 的羰基氧原子形成很强的氢键相互作用,其键长为 1.80 Å,说明了化合物 7l 的母核能很好地锚定在 CDK9 活性位点的铰链区。除此之外,7l 硫脲键上的氢原子供体提供了更多的与 CDK9

活性位点氨基酸残基产生相互作用的可能性,对接结果显示硫脲键上的氢原子作为氢键供体与 CDK9 的 GLY28 也形成了距离为 2.20 Å 的氢键相互作用。此外,采用 MMGB-SA 方法计算了 **71** 与 CDK9 的结合自由能为 $-158.01 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,进一步说明了 **71** 与 CDK9 有很高的结合亲和力。

通过分子杂合策略,合成了 13 个新的 1-[2-(金刚烷-1-基)-1*H*-吡啶-5-基]-3-取代硫脲衍生物 **7a** ~ **7m**,其结构经 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 HR-MS 表征。采用 MTT 法检测了合成化合物对于胃癌细胞生长的抑制作用,其中化合物 **71** 活性最优,且 **71** 对正常胃上皮细胞的毒性较小。使用体外激酶实验检测了化合物抑制 CDK9 激酶活性,相比于先导化合物 **3b**,**71** 展现出较强的 CDK9 激酶抑制活性,且 **71** 以浓度依赖的方式抑制胃癌细胞 CDK9 下游蛋白 p-ser2 的表达。最后分子对接表明化合物 **71** 能稳定地结合在 CDK9 的活性位点并具有很高的结合亲和力。在未来的工作中,将会对 **71** 进行进一步研究。

REFERENCES

- [1] YAN X, SONG X, WANG Z. Construction of specific magnetic resonance imaging/optical dual-modality molecular probe used for imaging angiogenesis of gastric cancer[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017, 45(3): 399-403.
- [2] MUSAVI SHENAS S M H, MANSOORI B, MOHAMMADI A, et al. siRNA-mediated silencing of Snail-1 induces apoptosis and alters micro RNA expression in human urinary bladder cancer cell line [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017, 45(5): 969-974.
- [3] LIANG S H, YAN X Z, WANG B L, et al. Increased expression of FOXQ1 is a prognostic marker for patients with gastric cancer [J]. *Tumor Biol*, 2013, 34: 2605-2609. DOI: 10.1007/s13277-013-0808-x.
- [4] SHAW R J, CANTLEY L C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth [J]. *Nature*, 2006, 441 (7092): 424-430.
- [5] SHIBUE T, WEINBERG R A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(10): 611-629.
- [6] MALUMBRES M. Cyclin-dependent kinases [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(6): 1-10.
- [7] MALUMBRES M, BARBACID M. Mammalian cyclin-dependent kinases [J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30(11): 630-641.
- [8] LOYER P, TREMBLEY J H, KATONA R, et al. Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing [J]. *Cell Signal*, 2005, 17(9): 1033-1051.
- [9] KONECNY G E. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for women's cancer treatment [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2016, 28(1): 42-48.
- [10] WANG X, GAO Y, LI Y, et al. Roseotoxin B alleviates cholestatic liver fibrosis through inhibiting PDGF-B/PDGFR-β pathway in hepatic stellate cells [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 458. DOI: 10.1038/s41419-020-2575-0.
- [11] KOHOUTEK J. P-TEFb-the final frontier [J]. *Cell Div*, 2009, 4(1): 1-15.
- [12] WANG S, FISCHER P M. Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, 29(6): 302-313.
- [13] WHITTAKER S R, BARLOW C, MARTIN M P, et al. Molecular profiling and combinatorial activity of CCT068127: a potent CDK2 and CDK9 inhibitor [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(3): 287-304.
- [14] BRÄGELMANN J, DAMMERT M A, DIETLEIN F, et al. Systematic kinase inhibitor profiling identifies CDK9 as a synthetic lethal target in NUT midline carcinoma [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(12): 2833-2845.
- [15] RAHAMAN M H, KUMARASIRI M, MEKONNEN L B, et al. Targeting CDK9: a promising therapeutic opportunity in prostate cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2016, 23(12): T211-T226.
- [16] MITRA P, YANG R M, SUTTON J, et al. CDK9 inhibitors selectively target estrogen receptor-positive breast cancer cells through combined inhibition of MYB and MCL-1 expression [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 9069-9083.
- [17] BAKER A, GREGORY G P, VERBRUGGE I, et al. The CDK9 inhibitor dinaciclib exerts potent apoptotic and antitumor effects in preclinical models of MLL-rearranged acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(5): 1158-1169.
- [18] AJIRO M, SAKAI H, ONOGI H, et al. CDK9 Inhibitor FIT-039 suppresses viral oncogenes E6 and E7 and has a therapeutic effect on hpv-induced neoplasia [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(18): 4518-4528.
- [19] LU Y, TANG L, ZHANG Q, et al. MicroRNA-613 inhibits the progression of gastric cancer by targeting CDK9 [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(5): 980-984.
- [20] WANG Q, WANG C X, LONG X S, et al. Research progress on synthesis and anti-tumor activity of 3-heterocyclic substituted indole derivatives [J]. *Chem Res Appl (化学研究与应用)*, 2022, 34(9): 1955-1964.
- [21] GONG X Y, GUO R C, ZHU J H, et al. Design, synthesis, and preliminary anti-tumor activity of adamantane Schiff base derivatives [J]. *J Changchun Univ Technol (长春工业大学学报)*, 2022, 43(3): 207-212.
- [22] LIN A J, KLAYMAN D L, MILHOUS W K. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives [J]. *J Med Chem*, 1987, 30(11): 2147-2150.
- [23] HONGYU, JUN, ZHEN, et al. Synthesis, structure-activity relationship studies and biological evaluation of novel 2,5-disubstituted indole derivatives as anticancer agents [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2016, 88(5): 766-778.
- [24] HOULIHAN W J, PARRINO V A, UIKE Y. Lithiation of N-(2-alkylphenyl) alkanamides and related compounds. a modified madelung indole synthesis [J]. *J Org Chem*, 1981, 46(22): 4511-4515.
- [25] ROBINSON M W, OVERMEYER J H, YOUNG A M, et al. Synthesis and evaluation of indole-based chalcones as inducers of methuosis, a novel type of nonapoptotic cell death [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(5): 1940-1956.

(收稿日期:2024-04-25)