

厄洛替尼衍生物的合成及抗肿瘤活性研究

赵智伟^{1a,b}, 田思琪^{1a}, 杜宇^{1a}, 王春光², 陈晓杰^{1a,b}, 郝雪琴^{1a,b}

(1.河南科技大学 a.基础医学院;第一附属医院;b.河南省肿瘤表观遗传重点实验室,河南 洛阳 471003;
2.河南湾流生物科技有限公司,河南 洛阳 471000)

摘要:以 2-氨基-4,5-双(2-甲氧基乙氧基)苯甲酸乙酯盐酸盐为起始原料,经过环合、氯化、取代得到厄洛替尼,然后在其端基炔结构上通过点击化学反应与苄基叠氮反应得到 4 种 1,2,3-三氮唑类化合物,其中化合物 5a 对肺癌细胞 HCC827 及其吉非替尼耐药细胞的 HCC827GR 具有一定的抑制效果,优于厄洛替尼,并且引起 HCC827 细胞阻滞在 G2/M 期,引起 HCC827GR 细胞在 G0/G1 期阻滞。

关键词:厄洛替尼;1,2,3-三氮唑;抗肿瘤药物;细胞周期

中图分类号:R914.5

文献标志码:A

厄洛替尼(erlotinib,图 1)是一款经典的表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor,EGFR)小分子抑制剂,于 2004 年被美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration,FDA)批准上市,作为一种口服的可逆性竞争性表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors,EGFR-TKI),能够与突变的 EGFR 的三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate,ATP)结合口袋结合,阻碍 EGFR 磷酸化,从而抑制了下游信号通路激活.其最初被批准用于治疗经传统化疗失败的晚期非小细胞肺癌(Non-small Cell Lung Cancer,NSCLC),与传统化疗药物的临床治疗相比,厄洛替尼治疗后可以使患者中位生存期从 4 月提升到 40 月以上^[1],并且在无进展生存率、治疗有效率、生活质量和耐受性方面均有更好的表现^[2].尽管厄洛替尼在 NSCLC 靶向治疗中显著延缓了疾病的进展,但是与另外两种第一代 EGFR 抑制剂吉非替尼(gefitinib,图 1)^[3-4]和埃克替尼(icotinib,图 1)^[5-6]一样,在用药治疗约 9~14 月后,耐药性问题逐渐显现,几乎所有的肿瘤再次进入进展期,因此如何解决厄洛替尼耐药性问题一直是药学工作者研究的重点^[7-8].

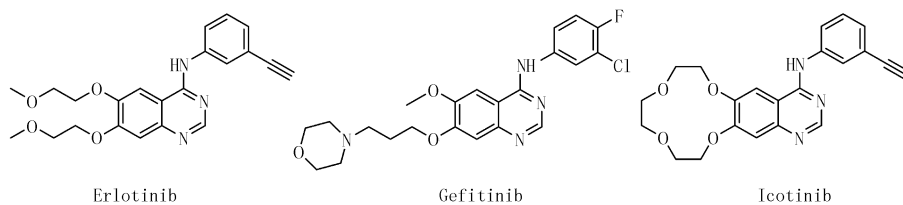


图1 厄洛替尼、吉非替尼和埃克替尼结构式

Fig.1 The structure of erlotinib,gefitinib and icotinib

1,2,3-三氮唑是一种非常重要的含氮杂环化合物,由 3 个氮原子和 2 个碳原子构建成五元杂环^[9],分子式为 C₂H₃N₃.1,2,3-三氮唑具有特殊的平面刚性结构,因而拥有较强的嵌入 DNA 的能力,同时具有大偶极矩,能够与不同生物靶点形成疏水、氢键、范德华力和偶极-偶极键等多种非共价相互作用力^[10].另外,1,2,3-

收稿日期:2022-04-27;修回日期:2022-11-10.

基金项目:河南省自然科学基金(182300410370);河南省科技攻关项目(222102310362).

作者简介:赵智伟(1980-),男,河南洛阳人,河南科技大学副主任医师,主要从事抗肿瘤药物合成研究,E-mail:1980zhaozhiwei@sina.com.

通信作者:郝雪琴,E-mail:haoxueqin@haust.edu.cn.

三氮唑的结构特征允许其作为酰胺、酯、羧酸、烯炔刚性类似物等的电子等价取代物,因此具有广谱的生物活性,常作为重要的分子砌块用于活性化合物的合成,如制备抗菌^[11]、抗疟^[12]、抗真菌^[13]、抗病毒^[14]、抗结核^[15]和抗癌活性化合物^[16]等.在药物化学领域具有广泛的应用,有多种临床药物经 1,2,3-三氮唑修饰改造后增强了原有的生物活性或获得了新的生物活性,例如利用抗人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)药物齐多夫定带有叠氮基团的结构特性,与端基炔类化合物经点击化学反应得到具有 1,2,3-三氮唑的化合物(图 2a),对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有抑制作用^[17].有课题组在苯环或苯胺结构上引入 1,2,3-三氮唑得到化合物 MMG-0358 和 Vertex-AT^[18](图 2(b,c)),作为吲哚胺-2,3-双加氧酶 1(indoleamine-(2,3)-dioxygenase 1, IDO1)抑制剂,这两个化合物都能够深入到 IDO1 的靶点蛋白中,且 1,2,3-三氮唑环能与靶点血红素中的亚铁离子形成氢键作用,三氮唑链接的苯环可以深入到有 Cys129, Leu234 和 Gly262 氨基酸所包围的疏水性口袋中,其中 MMG-0358 苯环上的羟基可以与 Ser167 形成氢键作用;这两个化合物都具有优异的 IDO1 抑制活性,半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})分别达到 $82 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $23 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[18].

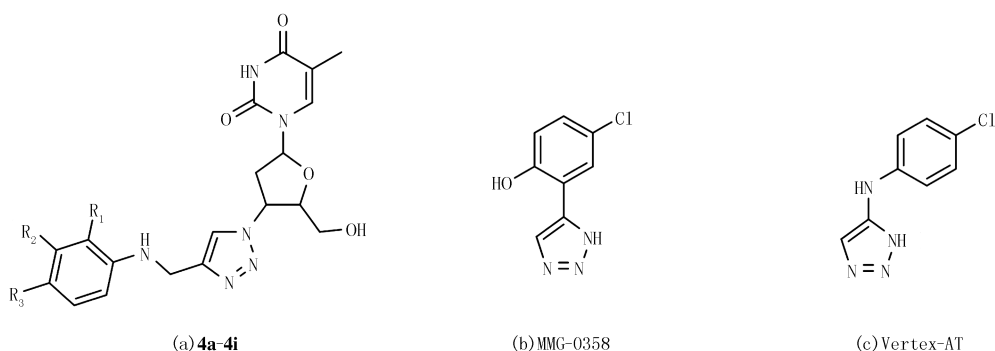


图2 具有1,2,3-三氮唑结构的活性化合物结构

Fig.2 The structure of some 1,2,3-triazole derivatives

为寻找更加新型高效的对突变细胞有抑制作用的抗肿瘤药物,本研究通过点击反应对厄洛替尼进行了改造,与苄基叠氮类化合物反应得到一个结构新颖的厄洛替尼衍生物(图 3),希望其能够在解决耐药性问题方面起到作用.为了进一步探究该新合成的化合物对肺癌细胞 HCC827 以及所对应的耐药性细胞的抑制活性,利用二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5)-dimethylthiazolo(-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazolium bromide, MTT)比色法进行实验,对 HCC827 以及吉非替尼耐药的 HCC827GR 细胞进行了体外抗肿瘤活性检,并以厄洛替尼作为阳性对照药物,研究了其对这两种细胞的细胞周期影响.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州予华仪器有限公司);YRE-2020 旋转蒸发仪(郑州予华仪器有限公司);布鲁克 AV400 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司);LC 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司).

厄洛替尼(99.5%,阿拉丁试剂);2,4-二溴苄基叠氮(99.5%,阿拉丁试剂);3-氯-4-氟苄基叠氮(99%,阿拉丁试剂);2-氟-4-溴苄基叠氮(99%,阿拉丁试剂);3-氯-6-氟苄基叠氮(99%,阿拉丁试剂);五水硫酸铜(98%,国药集团);抗坏血酸钠(99%,国药集团);其余试剂均为市售分析纯.

1.2 合成方法

1.2.1 6,7-二甲氧乙氧基喹唑啉-4-酮的合成(化合物 2)

在带有搅拌的反应瓶中,把 2-氨基-4,5-双(2-甲氧基乙氧基)苯甲酸乙酯盐酸盐(化合物 1)(3.5 g, 0.01 mol)加入甲酰胺 100 mL 中,再加入甲酸铵 2 g(0.03 mol),搅拌均匀后在氮气氛围下,缓慢加热至 $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$,反应约 10 h,薄层色谱法(Thin Layer Chromatography, TLC)监控原料反应完全,冷却至室温,向反应液中加入乙酸乙酯 100 mL 和水 80 mL,搅拌后分出有机相,浓缩后得到 6,7-二甲氧乙氧基喹唑啉-4-酮

2.1 g(化合物 **2**), 收率为 71.4%; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 7.97(s, 1H), 7.47(s, 1H), 7.16(s, 1H), 4.19~4.27(m, 4H), 3.70~3.74(m, 4H), 3.35~3.37(m, 6H).

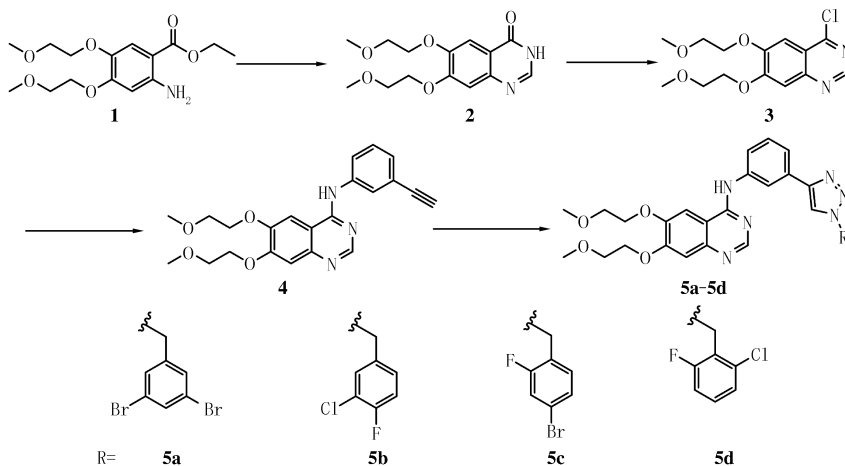


图3 目标化合物的合成路线

Fig.3 The synthetic route of target compounds

1.2.2 4-氯-6,7-二(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉的合成(化合物 **3**)

在带有搅拌的反应瓶中,把 6,7-二甲氧乙氧基喹唑啉-4-酮(化合物 **2**)3 g(0.01 mol)和 *N,N*-二甲基甲酰胺 1 g 加入到二氯亚砷 30 mL 中,搅拌均匀后缓慢升温至 80 °C,反应结束后,在 0~10 °C 条件下加入饱和氢氧化钠溶液 100 mL,调节反应液 pH 到 8~9,搅拌 20 min,用二氯甲烷 50 mL 萃取多次,合并有机相,然后用饱和食盐水洗涤 1 次,再用水洗涤多次,无水硫酸钠干燥后浓缩得到 4-氯-6,7-二(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉 2.3 g(化合物 **3**),收率为 73.7%,LC-MS(ESI): m/z 313[$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

1.2.3 *N*-(3-乙炔苯基)-6,7-双(2-甲氧基乙氧基)-4-喹啉胺的合成(化合物 **4**)

在反应瓶中,把 4-氯-6,7-二(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉(化合物 **3**)3 g(0.01 mol)加入异丙醇 100 mL 中,再加入间氨基苯乙炔 1.3 g(0.011 mol),加热回流,反应 3 h, TLC 监控原料反应完全,置于 0 °C 搅拌 30 min,抽滤后烘干得到 *N*-(3-乙炔苯基)-6,7-双(2-甲氧基乙氧基)-4-喹啉胺(化合物 **4**)2.4 g,收率为 61%; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.48(s, 1H), 8.51(s, 1H), 8.00(s, 1H), 7.91(d, $J=12.0$ Hz, 1H), 7.87(s, 1H), 7.41(t, $J=6.0$ Hz, 1H), 7.17~7.27(m, 2H), 4.29~4.31(m, 4H), 4.21(s, 1H), 3.75~3.80(m, 4H), 3.38(s, 3H), 3.36(s, 3H).

1.2.4 目标化合物的合成(以化合物 **5a** 为例)

在反应瓶中,依次加入 *N*-(3-乙炔苯基)-6,7-双(2-甲氧基乙氧基)-4-喹啉胺(化合物 **4**)0.5 g, 2,4-二溴苄基叠氮 0.5 g, 叔丁醇 10 mL, 水 10 mL, 四氢呋喃 10 mL, 五水硫酸铜 0.25 g, 抗坏血酸钠 0.5 g, 在 70 °C 条件下反应, TLC 监控原料反应完全,加入二氯甲烷 20 mL, 过滤反应液,水相用二氯甲烷萃取两次,合并有机相经无水硫酸镁干燥后,浓缩后用甲醇重结晶得到白色的产品 0.47 g,收率为 55.13%. 化合物 **5a**, $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.58(s, 1H), 8.72(s, 1H), 8.49(s, 1H), 8.28(s, 1H), 7.89~7.99(m, 2H), 7.86(s, 1H), 7.64(s, 2H), 7.57(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.47(t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.24(s, 1H), 5.70(s, 2H), 4.26~4.35(m, 4H), 3.73~3.83(m, 4H), 3.39(s, 3H), 3.36(s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (150 Hz, DMSO-d_6): 156.84, 154.06, 153.39, 148.56, 147.45, 147.22, 140.83, 140.56, 133.73, 131.21, 130.67, 129.51, 123.23, 122.41, 120.83, 119.30, 109.44, 108.68, 103.71, 70.61, 70.54, 68.84, 68.51, 58.88, 58.82, 52.01.

分别采用 3-氯-4-氟苄基叠氮 0.5 g, 2-氟-4-溴苄基叠氮 0.5 g, 2-氟-6-氯苄基叠氮 0.5 g 替换 **5a** 合成过程中的 2,4-二溴苄基叠氮 0.5 g, 得到化合物 **5b**(收率为 71.97%), **5c**(收率为 70.74%), **5d**(收率为 40.1%). 化合物 **5b**, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.55(s, 1H), 8.60(s, 1H), 8.26(s, 1H), 7.90~7.95(m, 2H), 7.54~7.55(m, 2H), 7.44~7.49(m, 2H), 7.28~7.33(m, 2H), 5.75(s, 2H), 4.31~4.33(m, 4H), 3.75~3.81(m, 4H), 3.39(s, 3H), 3.37(s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 Hz, DMSO-d_6): 163.5, 161.1, 153.7, 148.7, 146.9,

140.4, 134.3, 134.2, 133.0, 131.3, 130.0, 129.5, 122.4, 122.3, 120.9, 119.3, 117.6, 117.4, 115.5, 115.3, 70.5, 68.8, 68.5, 58.8, 50.7. 化合物 **5c**, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.58(s, 1H), 8.63(s, 1H), 8.26(s, 2H), 7.91(s, 1H), 7.37~7.66(m, 6H), 5.71(s, 2H), 4.30~4.32(m, 4H), 3.77~3.79(m, 4H), 3.39(s, 3H), 3.37(s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 Hz, DMSO- d_6): 161.7, 159.2, 148.7, 147.0, 140.4, 132.8, 131.2, 129.5, 122.9, 122.7, 122.6, 122.4, 122.2, 120.9, 119.7, 119.4, 119.3, 70.5, 68.8, 68.5, 58.8, 47.2. 化合物 **5d**, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.57(s, 1H), 8.61(s, 1H), 7.89~8.23(m, 3H), 7.34~7.59(m, 6H), 5.78(s, 2H), 4.30~4.33(m, 4H), 3.77~3.81(m, 4H), 3.38(s, 3H), 3.37(s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 Hz, DMSO- d_6): 140.4, 132.3, 132.2, 131.2, 129.4, 126.3, 122.4, 122.2, 121.4, 121.2, 120.9, 119.3, 115.5, 115.3, 104.0, 70.5, 70.5, 68.8, 68.5, 58.8, 45.1.

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析. 计量资料符合正态分布且方差齐, 以均数 \pm 标准差表示, 非正态分布用中位数表示. 组间差异应用 t 检验, 相关性分析采用线性相关分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果分析与讨论

2.1 抗肿瘤活性研究

2.1.1 MTT 法测定化合物对肿瘤细胞增殖的抑制

采用 MTT 法测试 4 个化合物和 erlotinib 对 HCC827 细胞和 HCC827GR 细胞的活性. 首先收集对数期细胞, 调整细胞悬液含量为 $3 \times 10^7/\text{L}$, 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液(边缘孔用无菌 PBS 填充). 5% CO_2 (体积分数), 37 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 加入浓度梯度的药物(0, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 $\mu\text{mol/L}$), 设 5 个复孔. 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 48 h, 倒置显微镜下观察细胞状态. 每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 继续培养 4 h. 终止培养, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入 100 μL 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解. 在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光值, 同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砜), 对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜).

HCC827GR 细胞是 HCC827 细胞通过吉非替尼低浓度长时间培养传代得到的对吉非替尼耐药的细胞, HCC827 细胞和 HCC827GR 细胞对吉非替尼的 IC_{50} 如表 1 所示, HCC827GR 对吉非替尼的 48 h 耐药指数达到 12.06. 化合物 **5a** 对 HCC827 细胞具有良好的活性抑制作用, IC_{50} 达到 8.17 $\mu\text{mol/L}$, 优于 erlotinib ($IC_{50} = 11.81 \mu\text{mol/L}$, 表 2). 化合物 **5a** 对 HCC827GR 细胞同样具有良好的活性抑制作用, IC_{50} 达到 2.38 $\mu\text{mol/L}$, 优于 erlotinib ($IC_{50} > 20 \mu\text{mol/L}$). 说明引入苯基三氮唑后, 针对实体瘤抑制活性方面比对照药物有显著提高^[19]. 4 种化合物中 **5a** 抗肿瘤活性最好, 因此进一步选取化合物 **5a** 研究肿瘤抑制活性.

表 1 HCC827GR 耐药细胞系的耐药指标

Tab. 1 Drug resistance index of HCC827GR cell line

Cell	24 h $IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Resistance index	48 h $IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Resistance index
HCC827	21.39 \pm 1.39	5.61	5.33 \pm 0.42	12.06
HCC827GR	120.25 \pm 10.05		64.26 \pm 7.12	

2.1.2 化合物 **5a** 对 HCC827 和 HCC827GR 细胞周期分布的影响

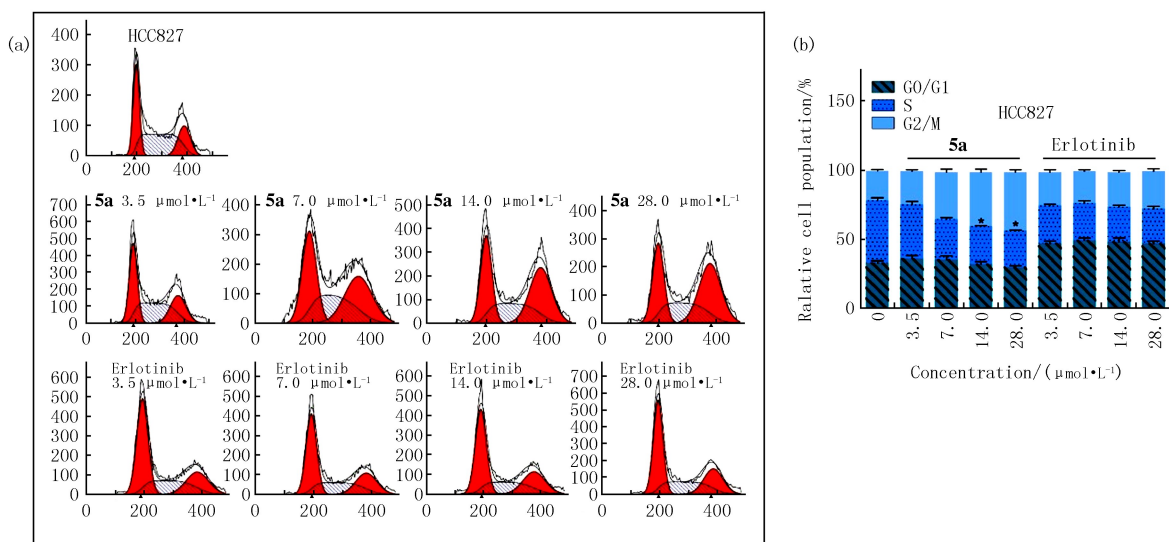
通过流式细胞术进行细胞周期分析, 具体步骤如下: 提前 24 h 将 2 mL 的 HCC827/ HCC827GR 的细胞悬液($1 \times 10^5/\text{孔}$)接种在 6 孔板中培养过夜; 除去原始培养基, 每孔加入 2 mL 含不同浓度化合物 **5a** 和 erlotinib(终浓度为 0, 3.5, 7.0, 14.0, 28.0 $\mu\text{mol/L}$)的完全培养基处理 24 h, 0.1%(体积分数)DMSO(完全培养基稀释)作为对照; 胰蛋白酶消化、离心收集细胞, 用 70%(体积分数)乙醇重悬细胞, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 至少 3 h; PBS 洗涤细胞, 加 100 μL RNaseA 重悬细胞, 室温放置 1 h, 然后用碘化丙啶(Propidium iodide, PI, 最终质量浓度 1.8 $\mu\text{g/mL}$, Biolegend cat: 640945)避光染色 15 min; 将细胞转移到 BD FACSCaliburTM 流式细胞仪检测管中进行检测. 所有结果均使用 FlowJo 软件 v105.3.6 进行分析.

表 2 化合物对 HCC827 及 HCC827GR 细胞毒活性评价

Tab.2 Evaluation of the cytotoxic activity of the compounds against HCC827 and HCC827GR cell lines

Compd. no.	48 h $IC_{50}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	HCC827	HCC827GR
5a	8.17 ± 0.42	2.38 ± 0.17
5b	11.07 ± 0.91	12.19 ± 1.03
5c	16.29 ± 1.35	>20
5d	12.71 ± 0.88	>20
erlotinib	11.81 ± 1.02	>20

为了研究化合物 **5a** 和 elotinib 对细胞周期的影响,采用不同浓度的化合物 **5a** 或 elotinib 处理肺癌细胞 HCC827,经过 24 h 后,通过流式细胞仪检测细胞周期(图 4).在化合物处理 24 h 时,对 HCC827 细胞周期检测显示,和对照相比,用 **5a** 处理时,随着浓度升高(3.5,7.0,14.0 和 28.0 $\mu\text{mol/L}$),G0/G1 期细胞比例变化不明显,S 期细胞比例随着浓度的提高而减少,G2/M 期细胞比例随着浓度的提高而增大,且呈现浓度梯度依赖性;用 erlotinib 处理 HCC827 细胞,在低浓度(3.5 $\mu\text{mol/L}$)的时候,G0/G1 期细胞明显增加,S 期细胞比例明显减少,G2/M 期细胞比例变化不明显,继续升高浓度,细胞各个周期变化均不明显.因此 **5a** 使 HCC827 细胞阻滞在 G2/M 期,erlotinib 对 HCC827 细胞周期阻滞在 G0/G1 期.

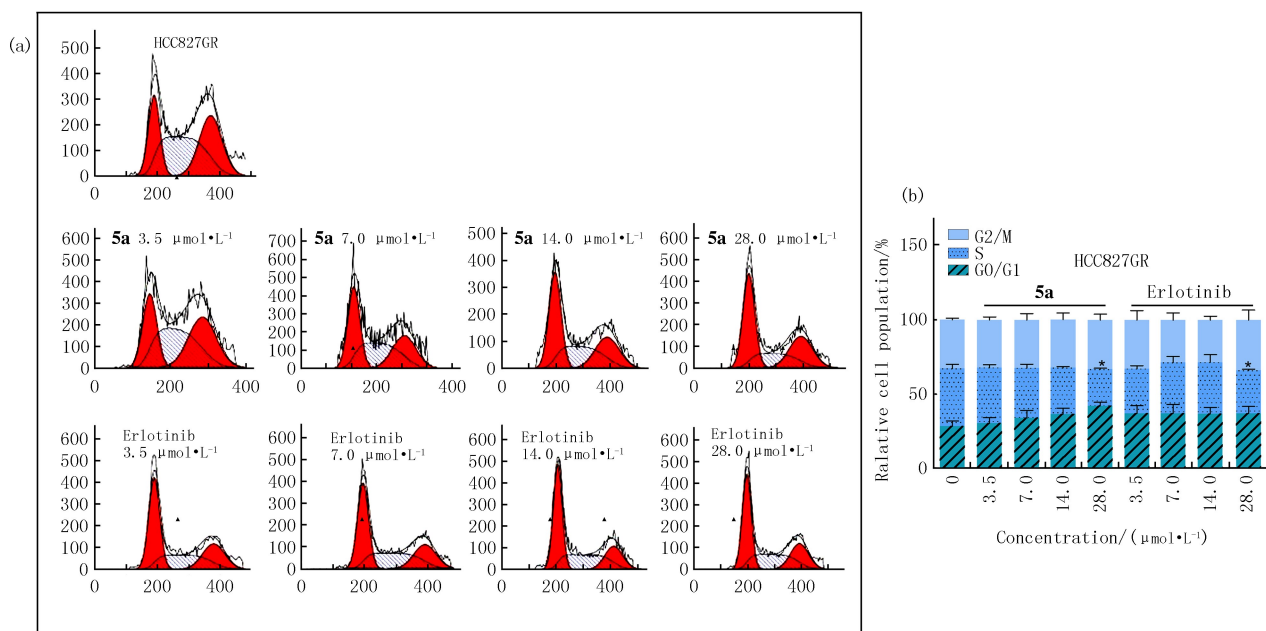


(a) 化合物**5a**和Erlotinib作用于HCC827细胞的流式细胞图(横坐标为Cell number,纵坐标为Propidium iodide);(b)处于不同周期的细胞所占比例的柱状图.采用非配对 t 检验进行显著性比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$.

图4 化合物**5a**和erlotinib对HCC827细胞周期的影响(阴性对照用0.1% DMSO处理细胞)

Fig.4 Cell cycle arrest of compound **5a** and erlotinib on HCC827 cells(compared with cells treated with 0.1% DMSO)

用 DMSO 作为对照,以及不同浓度的 **5a** 和 erlotinib 对耐药性食管癌细胞 HCC827GR 进行处理,通过流式细胞术检测细胞周期时相.在化合物处理 24 h 时,对 HCC827GR 细胞周期检测显示(图 5),和对照相比,用 **5a** 处理后,随着浓度升高(3.5,7.0,14.0 和 28.0 $\mu\text{mol/L}$),G0/G1 细胞比例逐渐升高;S 期细胞比例随着浓度的提高逐渐减少,呈现浓度梯度依赖性;G2/M 期细胞比例随着浓度的提高变化不明显;用 erlotinib 处理时,在低浓度(3.5 $\mu\text{mol/L}$)时 HCC827GR 细胞 G0/G1 期细胞比例有着明显提高,后续随着浓度提高变化不明显;S 期细胞数量比例在随着浓度的提高而减少,呈现浓度梯度依赖性;G2/M 期细胞比例在 3.5 $\mu\text{mol/L}$ 时降低比较明显,后续随着浓度的提高而增加.因此 **5a** 和 erlotinib 使 HCC827GR 细胞阻滞在 G0/G1 期.



(a) 化合物**5a**和erlotinib作用于HCC827GR细胞的流式细胞图(横坐标为Cell number,纵坐标为Propidium iodide);(b)处于不同周期的细胞所占比例的柱状图。采用非配对t检验进行显著性比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图5 化合物**5a**和erlotinib对HCC827GR细胞周期的影响(阴性对照用0.1% DMSO处理细胞)

Fig.5 Cell cycle arrest of compound **5a** and erlotinib on HCC827GR cells(compared with cells treated with 0.1% DMSO)

3 结 论

本文通过对厄洛替尼进行结构修饰,在其端基炔结构上通过点击化学反应与苄基叠氮反应得到4种1,2,3-三氮唑类化合物,其中化合物**5a**对肺癌HCC827细胞及其吉非替尼耐药性的HCC827GR细胞具有一定的抑制效果,优于厄洛替尼,并且对HCC827细胞在G2/M期引起阻滞,对HCC827GR细胞在G0/G1期引起阻滞。

参 考 文 献

- [1] 胡鹏程,耿德临,魏慎海,等.晚期非小细胞肺癌靶向治疗的研究进展[J].山东医药,2020,60(16):102-106. HU P C,GENG H L,WEI S H,et al.[J].Shandong Medical Journal,2020,60(16):102-106.
- [2] 毛龙飞,吴琼,孙格,等.用于临床治疗非小细胞肺癌的EGFR抑制剂的研究进展[J].中国药物化学杂志,2021,31(2):152-161. MAO L F,WU Q,SUN G,et al.Research progress in EGFR-TKIs for clinical treatment of NSCLC[J].Chinese Journal of Medicinal Chemistry,2021,31(2):152-161.
- [3] 卢红,王建军,周芳,等.吉非替尼联合紫杉醇对食管癌细胞体外生长抑制实验研究[J].中华肿瘤防治杂志,2014,21(17):1334-1338. LU H,WANG J J,ZHOU F,et al.Experimental study on growth inhibition of Gefitinib combined with paclitaxel on esophageal carcinoma cells in vitro and in vivo[J].Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment,2014,21(17):1334-1338.
- [4] 罗小平,吴均.吉非替尼与厄洛替尼治疗非小细胞肺癌的疗效观察[J].中国肿瘤临床与康复,2021,28(6):704-706. LUO X P,WU J.Efficacy of gefitinib and erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer[J].Chinese Journal of Clinical Oncology and Rehabilitation,2021,28(6):704-706.
- [5] SHI Y,ZHANG L,LIU X,et al.Icotinib versus gefitinib in previously treated advanced non-small-cell lung cancer(ICOGEN):a randomised,double-blind phase 3 non-inferiority trial[J].The Lancet Oncology,2013,14(10):953-961.
- [6] MAO L F,SUN G,ZHAO Y,et al.Design,synthesis and antitumor activity of icotinib derivatives[J].Bioorganic Chemistry,2020,105:104421.
- [7] ROSELL R,CARCERENY C,GERVAIS R,et al.Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer(EURTAC):a multicentre,open-label,randomised phase 3 trial[J].The Lancet Oncology,2012,13(3):239-246.
- [8] AYYAPPAN S,PRABHAKAR D,SHARMA N.Epidermal growth factor receptor(EGFR)-targeted therapies in esophagogastric cancer

- [J]. *Anticancer Research*, 2013, 33(10):4139-4155.
- [9] 黄国成, 吕早生, 刘明亮, 等. 1,2,3-三氮唑类化合物的抗结核活性[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2018, 39(1):50-58.
HUANG G C, LYU Z S, LIU M L, et al. [J]. *World Notes on Antibiotics*, 2018, 39(1):50-58.
- [10] KUMAR P P, SIVA B, RAO B V, et al. Synthesis and biological evaluation of bergenin-1,2,3-triazole hybrids as novel class of anti-mitotic agents[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 91:103161.
- [11] ASHOUR H F, ABOU-ZEID L A, EL-SAYED M A, et al. 1,2,3-Triazole-Chalcone hybrids: Synthesis, in vitro cytotoxic activity and mechanistic investigation of apoptosis induction in multiple myeloma RPMI-8226[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 189:112062.
- [12] QI Z Y, HAO S Y, TIAN H Z, et al. Synthesis and biological evaluation of 1-(benzofuran-3-yl)-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole derivatives as tubulin polymerization inhibitors[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 94:103392.
- [13] KUMAR R, VATS L, BUA S, et al. Design and synthesis of novel benzenesulfonamide containing 1,2,3-triazoles as potent human carbonic anhydrase isoforms I, II, IV and IX inhibitors[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 155:545-551.
- [14] DA SILVA V D, DE FARIA B M, COLOMBO E, et al. Design, synthesis, structural characterization and in vitro evaluation of new 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole derivatives against glioblastoma cells[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 83:87-97.
- [15] ALLAM M, BHAVANI A K D, MUDIRAJ A, et al. Synthesis of pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4(5H)-ones tethered to 1,2,3-triazoles and their evaluation as potential anticancer agents[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 156:43-52.
- [16] BISTROVIĆA, KRSTULOVIĆ L, HAREJ A, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole amidines as potent multi-target inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 143:1616-1634.
- [17] MAO L F, XU G Q, SUN B, et al. Design, synthesis and antibacterial evaluation of novel 1,2,3-triazole derivatives incorporating 3'-deoxythymidine[J]. *Journal of Chemical Research*, 2017, 41(11):645-649.
- [18] RÖHRIG U F, REYNAUD A, MAJJIGAPU S R, et al. Inhibition mechanisms of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 62(19):8784-8795.
- [19] MAO L F, WANG Z Z, WU Q, et al. Design, synthesis, and antitumor activity of erlotinib derivatives[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13:849364.

Synthesis and antitumor activity of erlotinib derivatives

Zhao Zhiwei^{1a,b}, Tian Siqu^{1a}, Du Yu^{1a}, Wang Chunguang², Chen Xiaojie^{1a,b}, Hao Xueqin^{1a,b}

(1. a. School of Basic Medical Sciences; The First Affiliated Hospital; b. Henan Provincial Key Laboratory of Tumor Epigenetics, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;
2. Henan Wanliu Biotechnology Co., Ltd., Luoyang 471000, China)

Abstract: Erlotinib was obtained from 2-amino-4,5-bis(2-methoxyethoxy)ethyl benzoate hydrochloride by cyclization, chlorination and substitution. Then four erlotinib derivatives were designed and synthesized from erlotinib with azido compounds via click reaction. Their anti-tumor activity were evaluated against HCC827 and HCC827GR tumor cells. Compound **5a** showed a certain inhibitory effect on non-small cell lung cancer HCC827 cell and corresponding gefitinib-resistant cell HCC827GR cell, which was superior to erlotinib. Compound **5a** also can block HCC827 cells in G₂/M phase and HCC827GR cells in G₀/G₁ phase.

Keywords: erlotinib; 1,2,3-triazole; antitumor drugs; cell cycle

[责任编辑 赵晓华 陈留院]