

3-芳基-5-吡唑基-1,2,4-噁二唑类 HIF-1 抑制剂的结构优化与构效关系研究

刘瑶, 李珊, 裘旒, 胡永洲, 曹戟, 盛荣* (浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 对 3-芳基-5-吡唑基-1,2,4-噁二唑类 HIF-1 抑制剂进行结构优化。方法 以 3-芳基-5-对氯苄基吡唑基-1,2,4-噁二唑化合物 **8** 为先导, 对连接链和苯环取代基进行系统改造, 获得全新结构的目标分子, 并测定 HIF-1 抑制活性。结果 所设计的 18 个新化合物均显示出中等到强的 HIF-1 抑制活性, 其中化合物 **11m** 活性最强, IC_{50} 达到 $0.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其作用机制为抑制 HIF-1 α 蛋白表达, 划痕试验显示其能够显著抑制 SKOV3 细胞的侵袭和迁移。结论 3-芳基-5-吡唑基-1,2,4-噁二唑类的构效关系研究为后续 HIF-1 抑制剂研发提供了较为扎实的基础。

关键词: HIF-1 抑制剂; 3-芳基-5-吡唑基-1,2,4-噁二唑; 构效关系研究; 肿瘤转移

中图分类号: R914.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)10-1153-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.10.001

引用本文: 刘瑶, 李珊, 裘旒, 等. 3-芳基-5-吡唑基-1,2,4-噁二唑类 HIF-1 抑制剂的结构优化与构效关系研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(10): 1153-1160.

Structural Modification and SAR Study of 3-Aryl-5-pyrazol-1,2,4-oxadiazole Derivatives as HIF-1 Inhibitor

LIU Yao, LI Shan, QIU Ni, HU Yongzhou, CAO Ji, SHENG Rong* (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design, synthesis and biological evaluation of a series of 3-aryl-5-pyrazol-1,2,4-oxadiazole compounds as HIF-1 inhibitor. **METHODS** Through systematic modification on the linker and the substituents of phenyl ring, a series of novel target compounds were designed and evaluated HIF-1 inhibitory activity based on 3-aryl-5-*para*-Cl-benzyl-pyrazole-1,2,4-oxadiazole derivative **8**. **RESULTS** Eighteen compounds exhibited moderate to good HIF-1 inhibitory activity and compound **11m** was the most potent HIF-1 inhibitor with IC_{50} value of $0.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Further biological evaluation of **11m** revealed that it could inhibit HIF-1 α protein expression and significantly prevented SKOV3 cells hypoxia-driven migration. **CONCLUSION** The SAR study of 3-aryl-5-pyrazol-1,2,4-oxadiazole derivatives as HIF-1 inhibitor pave the way for the further development of HIF-1 inhibitor.

KEYWORDS: HIF-1 inhibitor; 3-aryl-5-pyrazol-1,2,4-oxadiazole; SAR study; tumor metastasis

低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)是机体应对低氧微环境的主要调节因子, 包括 HIF-1、HIF-2、HIF-3 3 种蛋白亚型。其中, HIF-1 由对氧敏感的功能亚基 HIF-1 α 和对氧稳定的结构亚基 HIF-1 β (亦称为芳香烃受体核转运蛋白, aromatic hydrocarbon receptor nuclear transporter, ARNT)组成^[1], 二者均为碱性螺旋-环-螺旋(basic-helix-loop-helix, bHLH)转录因子超家族成员。在常氧条件下, HIF-1 α 氧依赖性降解域(oxygen-dependent degradation domain, DD)中的脯

氨酸残基被脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase, D)羟化, 并通过 pVHL 介导的泛素-蛋白酶体途径迅速降解。而在缺氧条件下, HIF-1 α 蛋白可以与 HIF-1 β 结合, 形成异源二聚体 HIF-1 入核, 在转录共激活因子 p300/CBP 的作用下, 与下游靶基因上的缺氧反应元件(hypoxia response elements, Es)结合, 从而调节上百种下游基因, 包括与肿瘤血管生成相关的促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 与糖代谢相关的葡萄糖转运蛋白

基金项目: 国家自然科学基金项目(21672187); 浙江省自然科学基金项目(LZ17H300002)

作者简介: 刘瑶, 女, 硕士生 Tel: 15027818278 E-mail: liuyao0213@zju.edu.cn *通信作者: 盛荣, 男, 博士, 副教授 Tel: 13018935590 E-mail: shengr@zju.edu.cn

1 (glucose transporter 1, GLUT1), 调节 pH 相关的碳酸酐酶九(carbonic anhydrase IX, CAIX), 与细胞增殖相关的胰岛素样生长因子 2(insulin like growth factor, IGF2), 与肿瘤耐药有关的多药耐药基因 1(multidrug resistance 1, MDR1), 与肿瘤的转移和侵袭有关的转化生长因子- α (transforming growth factor α , TGF- α)和基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)等。而且, 临床研究显示, HIF-1 在乳腺癌、脑癌、结肠癌、肺癌和前列腺癌等肿瘤中过度表达、与肿瘤侵袭性生长、放化疗耐受、患者预后不良密切相关^[2]。因此, 以 HIF-1 为靶点开展抗肿瘤研究, 有可能克服肿瘤对放化疗的耐受, 抑制肿瘤侵袭、转移, 为肿瘤治疗提供新的策略。

根据 HIF-1 信号通路, HIF-1 抑制剂可以通过以下几种途径起效^[3]: ①影响 HIF-1 α mRNA 的转录, 如磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抑制剂 LY294002(**1**); ②减少 HIF-1 α 蛋白的合成, 如表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂吉非替尼(**2**), 拓扑异构酶 I(topoisomerase I, Topo-I)抑制剂拓扑替康(**3**)^[4-6]; ③促进 HIF-1 α 蛋白的降解, 如硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)氧化还原抑制剂 PX-12(**4**); ④干扰 HIF-1 α 亚基与 HIF-1 β 亚基的蛋白-蛋白相互作用, 如吡啶黄(**5**)^[7]; ⑤阻止 HIF-1 与 p300/CBP 的结合, 如吡唑类衍生物 YC-1(**6**), 其还能促进 HIF-1 α 的降解^[8-10]; ⑥阻止 HIF-1 与下

游基因的一段 DNA(即 HRE)的结合, 如棘霉素^[3]。尤其是吡唑类衍生物 BAY 87-2243(**7**)作为 HIF-1 抑制剂, 曾经进入临床一期试验用于实体瘤的治疗^[11]。前期, 课题组以 YC-1 和苄基吡唑衍生物为先导^[12], 设计合成了一系列吡唑-1,2,4-噁二唑类衍生物(**8~10**), 大部分化合物显示出良好的 HIF-1 抑制活性, 尤其是化合物 **10** 能够明显下调 HIF-1 α 蛋白水平, 对人卵巢癌 SKOV3 细胞的体外侵袭转移和体内迁移有显著抑制作用, 且优于对照 YC-1^[13]。化合物 **1~10** 结构式见图 1。

在上述研究的基础上, 课题组进一步以化合物 **8** 为先导物, 首先对其连接链进行修饰, 将亚甲基分别替换为 1,2-亚乙基、酰基、磺酰基及甲酰胺基, 得到目标分子 **11a~11d**, 见图 2; 活性测试结果显示, 甲酰胺基有利于 HIF-1 抑制活性, 因此进一步对苯环部分进行改造, 分别用烷基胺和取代芳胺进行替换, 制得目标分子 **11e~11r**(图 2)。根据目标分子的体外 HIF-1 抑制活性, 优选出 **11m** 进一步开展生物学评价和作用机制研究。

1 化学合成

1.1 合成路线

1.1.1 含不同连接链的目标分子 **11a~11d** 的合成
4-三氟甲氧基苯胺分别与羟胺、5-甲基-吡唑-3-羧酸缩合制得关键中间体 **14**, 后者与 4-氯苯乙醇发生 Mitsunobu 反应制得 **11a**; **14** 分别与 4-氯苯甲酰氯和 4-氯苯磺酰氯缩合可制得 **11b** 和 **11c**, 与 4-氯苯基异氰酸酯缩合可制得 **11d**。合成路线见图 3。

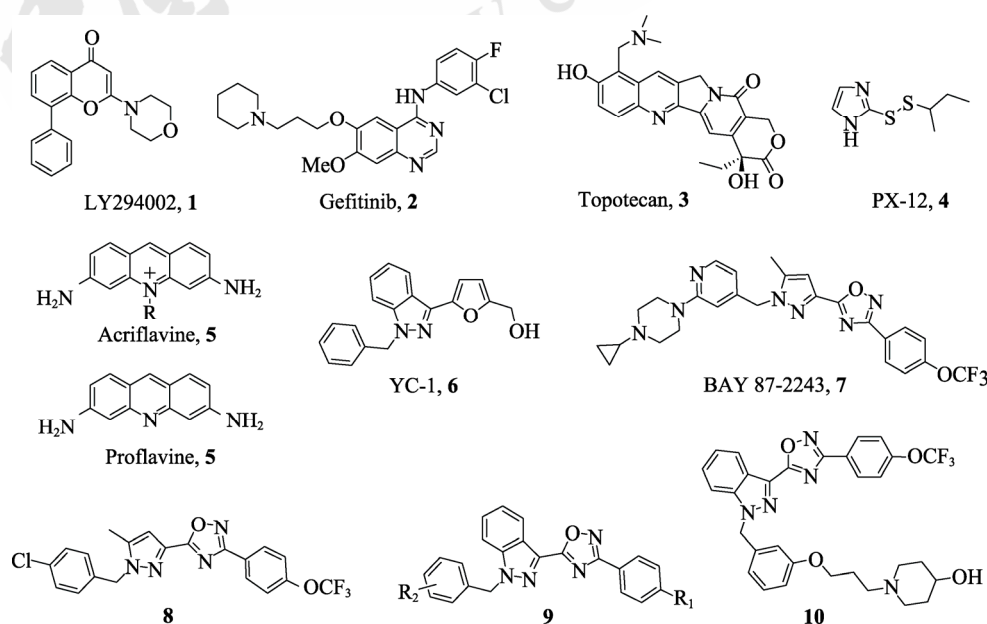


图 1 部分 HIF-1 抑制剂的结构

Fig. 1 Structures of representative HIF-1 inhibitors

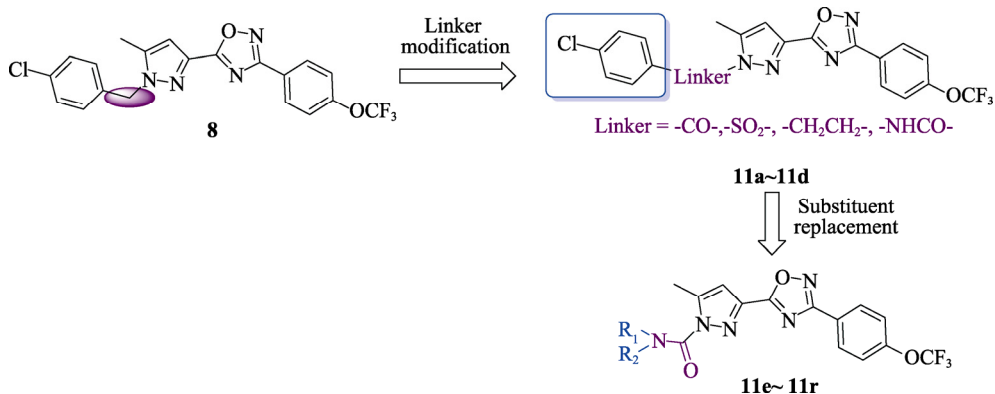


图2 目标化合物设计思路

Fig. 2 Design of target compounds

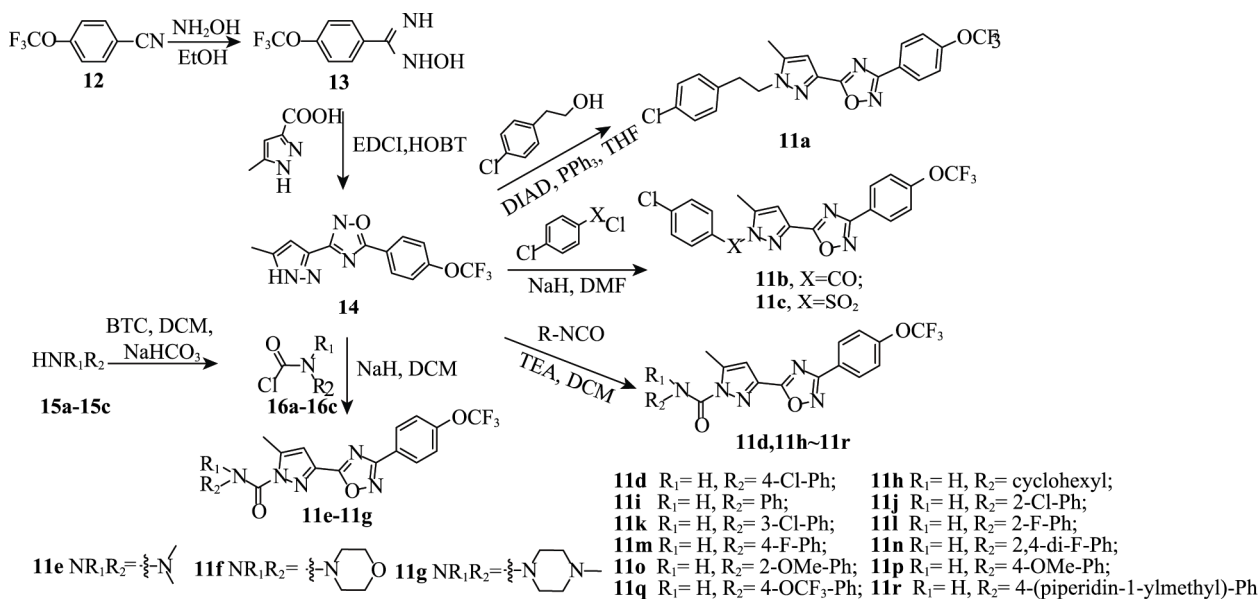


图3 目标化合物合成路线

Fig. 3 Synthetic route to target compounds 11a-11r

1.1.2 目标分子 11e~11r 的合成 分别以 15a~15c (二甲胺、吗啉、*N*-甲基哌嗪) 为起始原料, 首先与三光气在碱性条件下生成氯甲酰胺中间体 16a~16c, 继而与中间体 14 缩合得到目标分子 11e~11g; 各种取代的异氰酸酯与中间体 14 缩合制得目标分子 11h~11r。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 AM-400 MHz 或 AM-500 MHz 核磁共振仪(TMS 内标, 瑞士 Bruker); LC/MS TOF-6224 高效液质联用仪(美国 Agilent); LC/MS-2020 液质联用仪(日本岛津公司); B-540 型熔点测定仪(瑞士 Buchi); IKA C-MAG HS4 型磁力搅拌器(德国艾卡公司)。

1.2.2 试剂 对三氟甲氧基苯腈(货号: BD20271)、5-甲基-1H-吡唑-3-甲酸(货号: BD104660)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCI, 货号:

BD00769847)、1-羟基苯并三唑(HOBT, 货号: BD9926)、4-氯苯乙醇(货号: BD96423)、偶氮二碳酸二异丙酯(DIAD, 货号: BD32842)均购自上海毕得医药科技有限公司; 羟胺水溶液(50%)(货号: E010454)、三苯基磷(货号: W610007)、4-氯苯甲酰氯(货号: W810006)、4-氯苯磺酰氯(货号: C020005)、氢氧化钠(货号: E060138)、4-氯苯基异氰酸酯(货号: W320023)、环己基异氰酸酯(货号: W320022)、3-氯苯基异氰酸酯(货号: W610692)、2-氟苯基异氰酸酯(货号: AD000439)、4-氟苯基异氰酸酯(货号: W610383)、2, 4-二氟苯基异氰酸酯(货号: A021240)、2-甲氧基苯基异氰酸酯(货号: A020957)、4-三氟甲氧基苯基异氰酸酯(货号: W320115)、三乙胺(TEA, 货号: B010737)、二(三氯甲基)碳酸酯(三光气, BTC, 货号: C010027)、二甲胺盐酸盐(货号: B010054)、吗啉(货号:

W320236)、N-甲基哌嗪(货号: E020136)均购自萨恩化学技术(上海)有限公司; 其他有机溶剂均为分析纯, 质量分数 $\geq 95\%$, 均购自杭州方平化工有限公司; 卵巢癌 SKOV3 细胞株和结肠癌 HCT116 细胞株均购于中科院上海细胞典藏中心, 本实验室冻存保留使用; DMEM 培养基(货号: 10565-018)、胎牛血清(货号: 16000-044)均购自美国 Gibco 公司。

1.3 合成方法

1.3.1 4-三氟甲氧基-N-羟基苯甲脒(**13**)的合成 150 mL 圆底烧瓶中加入 4-三氟甲氧基苯甲脒 4.0 g(21 mmol), 乙醇 100 mL, 羟胺水溶液(50%) 20 mL。升温回流 2 h 后冷却至室温, 减压浓缩, 乙酸乙酯提取, 合并有机层, 无水 Na_2SO_4 干燥, 回收溶剂得白色粉末 4.57 g, 产率 97%; 熔点: 107.3~108.8 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.76(s, 1H), 7.79(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.38(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 5.90(s, 2H); ESI-MS: $m/z=221[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.3.2 5-(5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**14**)的合成 50 mL 圆底烧瓶中加入 5-甲基-1*H*-吡唑-3-甲酸 0.8 g(6.36 mmol), 无水 DMF 12 mL, 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCI)1.46 g(7.6 mmol), 1-羟基苯并三唑(HOBt)1.03 g(7.6 mmol), 室温搅拌 0.5 h 后加入 4-三氟甲氧基-N-羟基苯甲脒 1.33 g(6.04 mmol), 升温至 140 °C 反应约 4 h, 冷却至室温后加入水 100 mL, 乙酸乙酯萃取(20 L $\times$ 3), 合并有机层, 依次用水、饱和 NaCl 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压蒸除溶剂得到残留物, 经硅胶柱层析纯化得淡黄色固体 1.55 g, 产率 78%; 熔点: 178.4~179.9 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 13.57(s, 1H), 8.20(d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.60(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.81(s, 1H), 2.34(s, 3H); HRMS-ESI m/z $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值 311.075 0, 实测值 311.075 3。

1.3.3 5-(1-(4-氯苯乙基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11a**)的合成 10 mL 圆底烧瓶中加入中间体 **14** 120 mg(0.39 mmol), 4-氯苯乙醇 54 mg(0.3 mmol), 三苯基膦 144 mg(0.54 mmol), 无水四氢呋喃溶液 10 L。将反应体系置于 0 °C 后, 加入偶氮二甲酸二异丙酯 90 mg(0.45 mmol), 反应升至室温搅拌过夜。减压蒸除大部分有机溶剂, 粗产品用乙酸乙酯萃取, 依次水洗, 饱和 NaCl 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥,

浓缩后经硅胶柱层析纯化得白色固体 33 mg, 产率 24%; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.26(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.34(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.24(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.96(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.67(s, 1H), 4.36(t, $J=7.0$ Hz, 2H), 3.20(t, $J=7.0$ Hz, 2H), 1.98(s, 3H); ESI-MS: $m/z=449[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.3.4 5-(1-(4-氯苯甲酰基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11b**)的合成 25 mL 圆底烧瓶中加入化合物 **14** 1450 mg(0.16 mmol), 无水 DMF 5 mL, 氢化钠 32 mg(0.8 mmol), 冰浴条件下搅拌 0.5 h 后, 加入 4-氯苯甲酰氯 42 mg(0.24 mmol), 室温条件下反应 5 h。减压回收溶剂, 粗产品用乙酸乙酯萃取, 依次水、饱和 NaCl 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压蒸除溶剂, 残留物经硅胶柱层析纯化, 得白色固体 32 mg, 产率 44%; 熔点: 149.6~151.2 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.22(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 8.06(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.51(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.35(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.97(s, 1H), 2.77(s, 3H); ESI-MS: $m/z=449[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.3.5 5-(1-(4-氯苯磺酰基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11c**)的合成 方法同 **11b**, 由 4-氯苯磺酰氯反应制得白色固体 32 mg, 产率 41%; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.19(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 8.05(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.56(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.34(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.79(s, 1H), 2.67(s, 3H); ESI-MS: $m/z=485[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.3.6 5-(1-(*N*-(4-氯苯基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11d**)的合成 25 mL 圆底烧瓶中加入化合物 **14** 100 mg(0.32 mmol), 二氯甲烷 8 mL 和 4-氯异氰酸苯酯 0.05 mL(0.36 mmol), 冰浴条件下搅拌过夜。减压回收溶剂, 残留物用乙酸乙酯萃取, 合并有机层, 依次用水、饱和 NaCl 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压蒸除溶剂后, 粗产物经硅胶柱层析纯化, 得白色固体 56 mg, 产率 38%; 熔点: 155.6~157.3 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9.33(s, 1H), 8.24(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.62(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.42~7.38(m, 4H), 6.91(s, 1H), 2.78(s, 3H); ESI-MS: $m/z=464[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.3.7 5-(1-(*N,N*-二甲基甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11e**)的合成 50 mL 烧瓶中加入三光气 0.3 g(1.0 mmol), 无水二

氯甲烷 15 mL, 冰浴下加入二甲胺盐酸盐 0.13 g (1.5 mmol), 碳酸氢钠 0.43 g (5.1 mmol), 室温搅拌约 8 h, 抽滤除去生成的固体, 得到二甲基胺甲酰氯(**16a**)二氯甲烷溶液。另取一个三颈瓶, 加入中间体 **14** 460 mg (0.2 mmol), 无水二氯甲烷 3 mL, 氢化钠(60%, 40 mg, 1.0 mmol), 冰浴下搅拌 10 min 后, 加入 **16a** 的二氯甲烷溶液, 室温反应 4 h, 加入少量水终止反应, 水相用二氯甲烷萃取, 合并有机层, 依次用水、饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸除溶剂后, 粗产物经硅胶柱层析纯化, 得白色固体 40 mg, 产率 52%; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.23(d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.34(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.83(d, *J*=0.5 Hz, 1H), 3.19(s, 3H), 3.12(s, 3H), 2.54(d, *J*=0.6 Hz, 3H); ESI-MS: *m/z*=382[M+H]⁺。

1.3.8 5-(1-(*N*-吗啉甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11f**)的合成 50 mL 烧瓶中加入三光气 0.3 g (1.0 mmol), 无水二氯甲烷 5 mL, 冰浴下加入吗啉 104 mg (1.2 mmol), 室温搅拌 8 h, 得到吗啉甲酰氯(**16b**)的二氯甲烷溶液。另取一个三颈瓶, 加入中间体 **14** 460 mg (0.2 mmol), 无水二氯甲烷 5 mL, 氢化钠 40 mg (1.0 mmol), 冰浴下搅拌 10 min 后, 将上述吗啉甲酰氯 **16b** 溶液加到反应体系中, 室温反应 6 h, 加入 10 mL 水终止反应, 分层, 水相用二氯甲烷萃取, 合并有机层, 依次用水、饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压浓缩得到的粗品经硅胶柱层析纯化, 得白色固体 32 mg, 产率 38%; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.23(d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.35(d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.85(s, 1H), 3.90~3.59(m, 8H), 2.56(s, 3H); ESI-MS: *m/z*=424[M+H]⁺。

1.3.9 5-(1-(*N*-(4-甲基哌嗪基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11g**)的合成 方法同 **11f**, 用 *N*-甲基哌嗪代替吗啉进行反应, 得到白色固体 34 mg, 产率 39%; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.23(d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.35(d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.84(s, 1H), 3.95~3.50(m, 4H), 2.70~2.45(m, 7H), 2.38(s, 3H); ESI-MS: *m/z*=437[M+H]⁺。

1.3.10 5-(1-(*N*-环己基甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11h**)的

合成 方法同 **11d**, 由环己基异氰酸酯代替 4-氯异氰酸苯酯, 得到白色固体 26 mg, 产率 19%; 熔点: 126.7~127.9 °C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.20(d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.33(d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.29(d, *J*=8.5 Hz, 1H), 6.80(s, 1H), 3.81~3.77(m, 1H), 2.70(s, 3H), 2.07~2.05(m, 2H), 1.83~1.80(m, 2H), 1.69~1.67(m, 1H), 1.45~1.33(m, 4H), 1.27~1.22(m, 1H); ESI-MS: *m/z*=436[M+H]⁺。

1.3.11 5-(1-(*N*-苯基甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11i**)的合成 方法同 **11d**, 由苯基异氰酸酯代替 4-氯异氰酸苯酯, 得到白色固体 56 mg, 产率 41%; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.65(s, 1H), 8.24(d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.75(d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.63(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.42(t, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.20(t, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.16(s, 1H), 2.67(s, 3H); ESI-MS: *m/z*=430[M+H]⁺。

1.3.12 5-(1-(*N*-(2-氯苯基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11j**)的合成 方法同 **11d**, 由 2-氯苯基异氰酸酯代替 4-氯苯基异氰酸酯, 得到白色固体 9 mg, 产率 6.1%; 熔点: 162.7~164.3 °C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.94(s, 1H), 8.29(dd, *J*₁=8.0 Hz, *J*₂=1.5 Hz, 1H), 8.24(d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.47(dd, *J*₁=8.5 Hz, *J*₂=1.5 Hz, 1H), 7.37(d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.34(d, *J*=1.5 Hz, 1H), 7.15(dt, *J*₁=7.5 Hz, *J*₂=1.5 Hz, 1H), 6.91(s, 1H), 2.79(s, 3H); ESI-MS: *m/z*=464[M+H]⁺。

1.3.13 5-(1-(*N*-(3-氯苯基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11k**)的合成 方法同 **11d**, 由 3-氯苯基异氰酸酯代替 4-氯苯基异氰酸酯, 得到白色固体 40 mg, 产率 27%; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.35(s, 1H), 8.24(d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.81(t, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.49(ddd, *J*₁=8.5 Hz, *J*₂=2.0 Hz, *J*₃=1.0 Hz, 1H), 7.37(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.34(t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.21~7.17(m, 1H), 6.91(d, *J*=1.0 Hz, 1H), 2.79(d, *J*=0.5 Hz, 3H); ESI-MS: *m/z*=464[M+H]⁺。

1.3.14 5-(1-(*N*-(2-氟苯基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11l**)的合成 方法同 **11d**, 由 2-氟苯基异氰酸酯代替 4-氯苯基异氰酸酯, 得到白色固体 59 mg, 产率 41%; 熔点: 146.8~148.2 °C; ¹H-NMR (500 MHz,

CDCl₃): δ 9.51(s, 1H), 8.23(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 8.19(t, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.36(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.21~7.16(m, 3H), 6.89(s, 1H), 2.78(s, 3H, CH₃); ESI-MS: $m/z=448[M+H]^+$ 。

1.3.15 5-(1-(*N*-(4-氟苯基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11m**)的合成 方法同 **11d**, 由 4-氟苯基异氰酸酯代替 4-氯苯基异氰酸酯, 得到白色固体 46 mg, 产率 32%; 熔点: 153.8~155.2 °C; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 9.29(s, 1H), 8.24(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.65~7.62(m, 2H), 7.37(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.12(t, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.91(s, 1H), 2.80(s, 3H); ESI-MS: $m/z=448[M+H]^+$ 。

1.3.16 5-(1-(*N*-(2,4-二氟苯基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11n**)的合成 方法同 **11d**, 由 2,4-二氟苯基异氰酸酯代替 4-氯苯基异氰酸酯, 得到白色固体 43 mg, 产率 29%; 熔点: 156.8~158.2 °C; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 9.39(s, 1H), 8.24(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 8.15~8.10(m, 1H), 7.37(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.02~6.96(m, 2H), 6.91(s, 1H), 2.79(s, 3H); ESI-MS: $m/z=466[M+H]^+$ 。

1.3.17 5-(1-(*N*-(2-甲氧基苯基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11o**)的合成 方法同 **11d**, 由 2-甲氧基苯基异氰酸酯代替 4-氯苯基异氰酸酯, 得到白色固体 32 mg, 产率 22%, 熔点: 156.8~158.2 °C; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 9.84(s, 1H), 8.24(d, $J=8.5$ Hz, 1H), 8.24(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.37(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.14(t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.03(t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.96(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.88(s, 1H), 3.99(s, 3H), 2.80(s, 3H); ESI-MS: $m/z=460[M+H]^+$ 。

1.3.18 5-(1-(*N*-(4-甲氧基苯基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11p**)的合成 方法同 **11d**, 由 4-甲氧基苯基异氰酸酯代替 4-氯苯基异氰酸酯, 得到白色固体 54 mg, 产率 37%; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 9.22(s, 1H), 8.24(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.75(dd, $J_1=8.5$ Hz, $J_2=1.5$ Hz, 2H), 7.37(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.95(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.89(s, 1H), 3.83(s, 3H), 2.77(s, 3H); ESI-MS: $m/z=460[M+H]^+$ 。

1.3.19 5-(1-(*N*-(4-三氟甲基苯基)甲酰胺基)-5-甲

基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11q**)的合成 方法同 **11d**, 由 4-三氟甲氧基苯基异氰酸酯代替 4-氯苯基异氰酸酯, 得到白色固体 40 mg, 产率 25%; 熔点: 142.3~143.6 °C; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 9.50(s, 1H), 8.22(d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.80(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.67(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.36(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.90(s, 1H), 2.76(s, 3H); ESI-MS: $m/z=498[M+H]^+$ 。

1.3.20 5-(1-(*N*-(4-(哌啶-1-基)苯基)甲酰胺基)-5-甲基-1*H*-吡唑-3-基)-3-(4-三氟甲氧基苯基)-1,2,4-噁二唑(**11r**)的合成 方法同 **11d**, 由 4-(哌啶-1-基)苯基异氰酸酯代替 4-氯苯基异氰酸酯, 得到白色固体 45 mg, 产率 27%; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃): δ 9.36(s, 1H), 8.24(d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.67(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.45(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.37(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.91(s, 1H), 4.61(s, 2H), 2.79(s, 3H), 1.26(brs, 10H); ESI-MS: $m/z=527[M+H]^+$ 。

2 生物活性

2.1 荧光素酶报告基因试验

稳定转染 HRE-luciferase 质粒的 HCT116 细胞接种于 96 孔板, 每孔 6 000 个细胞, 加入不含血清的完全培养基, 放在含 5%CO₂ 和 20%O₂ 的常氧培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后, 加入梯度浓度的受试化合物在常氧培养箱中再继续培养 1 h, 转至含 5%CO₂ 和 1%O₂ 的低氧培养箱中培养 1 d, 采用 HIF-luciferase 法测定药物抑制细胞增殖能力。酶标仪检测各孔 Luc 值; 记录结果; 按下列公式计算抑制率: 抑制率(%)=(对照组数值-实验组数值)/对照组数值×100%。同时计算 IC₅₀ 值。

2.2 划痕试验

将对数生长期的 SKOV3 细胞消化后, 吹打成单细胞悬液, 接种于 24 孔培养板; 每孔 2×10⁵ 细胞, 每孔加入含 10%血清的完全培养基, 放在含 5%CO₂ 和 20%O₂ 的常氧培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后, 弃去培养基, 每孔加入含 0%血清的完全培养基, 放在常氧培养箱中培养过夜。每孔细胞均进行划痕处理, 弃去培养基, 每孔加入含 3%血清的完全培养基, 加入 30 μmol·L⁻¹ 受试化合物, 放在常氧培养箱中培养 1 h, 再放入含 5%CO₂ 和 1%O₂ 的培养箱中培养 16 h, 显微镜下拍照以评价候选化合物对细胞迁移能力的抑制作用。

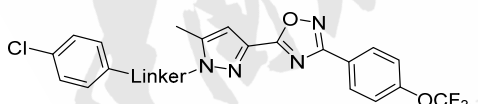
2.3 免疫蛋白印迹试验

采用人结肠癌细胞株 HCT116, 将对数生长期的细胞消化后, 吹打成单细胞悬液, 接种于 6 孔培养板; HCT116 细胞, 每孔 3×10^5 细胞。每孔加入含 10% 血清的完全培养基, 放在常氧培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后, 加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的受试化合物, 并转至含 5% CO_2 和 1% O_2 的低氧培养箱中 24 h, 收集细胞。采用 Western blotting 法测定化合物对细胞内 HIF-1 α 蛋白的影响。

3 结果与讨论

3.1 HIF-1 抑制活性研究

通过构建稳转 HRE-luciferase 质粒的 HCT116-HRE 细胞模型, 采用荧光素酶报告基因实验评价化合物对 HCT116 细胞内 HIF-1 转录抑制活性的影响。细胞内 HIF-1 转录抑制活性结果显示, 连接链的改变对活性影响明显。当连接链为 1,2-亚乙基或磺酰基时, 化合物 **11a**、**11c** 活性丧失 ($IC_{50} > 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 当连接链为羰基时, 化合物 **11b** 对 HIF-1 的转录抑制活性比先导物 **8** 下降 2 倍; 而 *N*-甲酰胺基化合物 **11d** 显示出最佳的 HIF-1 转录抑制活性, IC_{50} 值为 $0.80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 是先导物 **8** 的 3 倍, 结果见图 4。因此, 在保留甲酰胺基的基础上, 对 **11d** 的氯苯片段开展进一步的改造, 共合成 14 个目标分子 **11e~11r**, 其 HIF-1 抑制活性结果见图 5。



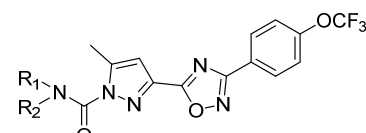
编号	Linker	HRE-Luc $IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a	编号	Linker	HRE-Luc $IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a
11a	CH_2CH_2	>20	11b	CO	5.02
11c	SO_2	>20	11d	NHCO	0.80
8	CH_2	2.44			

图 4 含不同连接链的化合物 **11a~11d** 的 HIF-1 抑制活性
a IC_{50} 值为 3 次实验的平均值。

Fig. 4 HIF-1 inhibitory activities of compounds **11a-11d** with different linker

aThe IC_{50} was the mean values of three independent experiments.

结果表明, 大多数化合物表现出中等到强的 HIF-1 转录抑制活性。NR₁R₂ 的种类对 HIF-1 转录抑制活性影响明显, 当 NR₁R₂ 为脂肪胺, 如二甲胺、吗啉、*N*-甲基哌嗪和环己胺时, 衍生物 **11e~11h** 对 HIF-1 转录抑制活性基本丧失 ($IC_{50} > 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。而当 NR₁R₂ 为取代苯胺时, 化合物的转录抑制活



编号	NR ₁ R ₂	HRE-Luc $IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a	编号	NR ₁ R ₂	HRE-Luc $IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a
11e		>20	11f		>20
11g		>20	11h		>20
11i		3.52	11j		0.85
11k		1.54	11l		0.83
11m		0.35	11n		0.69
11o		0.68	11p		1.52
11q		1.36	11r		1.46
8	—	2.44			

图 5 化合物 **11e~11r** 的 HIF-1 抑制活性

a IC_{50} 值为三次实验的平均值。

Fig. 5 HIF-1 inhibitory activity of compounds **11e-11r**

aThe IC_{50} data were the mean values of three independent experiments.

性普遍较强, 化合物 **11i** 的 IC_{50} 值为 $3.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与先导物 **8** 相当; 化合物 **11j~11r** 对 HIF-1 转录抑制活性的 IC_{50} 值在 $0.35 \sim 1.54 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 其中 4-氟苯基化合物 **11m** 活性最佳, IC_{50} 值为 $0.35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 是先导物的 7 倍, 因此选择其开展进一步的生物学评价。

3.2 划痕试验

侵袭和转移是恶性肿瘤最主要的生物学特征, HIF-1 可调控与细胞侵袭、转移相关的 TGF- α 和 MMP-2 等, 因此, 抑制 HIF-1 的转录活性, 能有效遏制肿瘤细胞迁移。选取化合物 **11m** 开展划痕试验, 考察其对肿瘤细胞(SKOV-3)侵袭转移能力的影响。

化合物 **11m** 在 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下与 SKOV3 肿瘤细胞共同孵育 16 h 后, 其抑制 SKOV3 细胞迁移效果见图 6。对照组培养 16 h 后, 划痕损伤几乎被迁移细胞完全覆盖, 说明模型正常; 而化合物 **11m** 组可显著抑制划痕区域的覆盖, 且其抗肿瘤细胞迁移活性优于先导物 **8**, 说明 **11m** 对肿瘤细胞的迁移有较高的抑制作用。

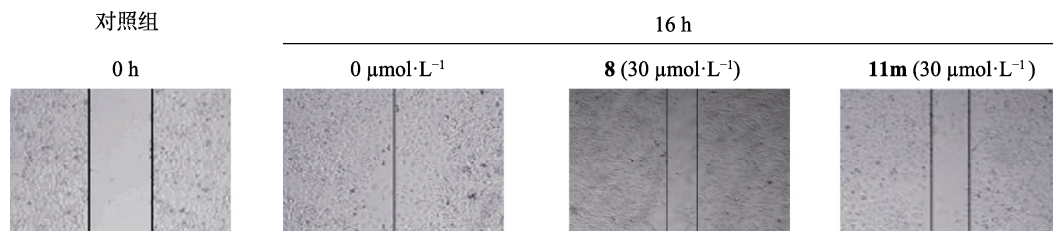


图6 化合物 11m 对 SKOV3 肿瘤细胞侵袭转移的影响

Fig. 6 Effects of compound 11m on SKOV3 cells invasion and metastasis

3.3 化合物 11m 对 HIF-1 α 及 VEGF 的抑制作用评价

HIF-1 α 是 HIF-1 的功能蛋白, 前期研究表明 1,2,4-噁二唑类衍生物 10 能够抑制 HIF-1 α 蛋白的生成^[13], 因此测定化合物 11m 对 HIF-1 α 的影响, 以确定其作用机制。

低氧对照组 (1%O₂, con)HCT116 细胞内 HIF-1 α 蛋白水平比常氧对照组 (20%O₂, con) 显著增加, 见图 7。先导化合物 8 对 HIF-1 α 蛋白有一定的下调作用, 化合物 11m 对 HIF-1 α 蛋白下调作用略优于 8, 与上述划痕试验一致。

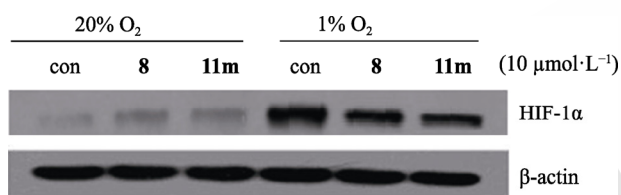


图7 化合物 11m 对 HCT116 细胞内 HIF-1 蛋白的影响

Fig. 7 Effects of compound 11m on HIF-1 α in HCT116 cells

4 结论

本研究对 3-芳基-5-吡唑基-1,2,4-噁二唑类衍生物。体外活性测试表明, 绝大多数化合物表现出中等到强的 HIF-1 转录抑制活性。其中, 化合物 11m 的 IC₅₀ 值为 0.35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比先导物提升 7 倍, 进一步划痕试验证明, 其能够有效抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞的侵袭和迁移, 免疫印迹研究表明, 其通过下调 HIF-1 α 蛋白发挥作用, 上述研究为全新 HIF-1 抑制剂的研发提供了较为扎实的实验基础。

REFERENCES

- [1] SHANNON A M, BOUCHIER-HAYES D J, CONDRON C M, et al. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies[J]. Cancer Treat Rev, 2003, 29(4): 297-307.
- [2] SEMENZA G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721-732.

- [3] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factors: Mediators of cancer progression and targets for cancer therapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 2012, 33(4): 207-214.
- [4] MAYERHOFER M, VALENT P, SPERR W R, et al. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1 α , through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin[J]. Blood, 2002, 100(10): 3767-3775.
- [5] RHO J K, CHOI Y J, LEE J K, et al. Gefitinib circumvents hypoxia-induced drug resistance by the modulation of HIF-1 α [J]. Oncol Rep, 2009, 21(3): 801-807.
- [6] RAPISARDA A, ZALEK J, HOLLINGSHEAD M, et al. Schedule-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1 α protein accumulation, angiogenesis, and tumor growth by topotecan in U251-HRE glioblastoma xenografts[J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 6845-6848.
- [7] LEE K, ZHANG H, QIAN D Z, et al. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization[J]. PNAS, 2009, 106(42): 17910-17915.
- [8] CHUN Y S, YEO E J, CHOI E, et al. Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61(8): 947-954.
- [9] KIM H L, YEO E J, CHUN Y S, et al. A domain responsible for HIF-1 α degradation by YC-1, a novel anticancer agent[J]. Int J Oncol, 2006, 29(1): 255-260.
- [10] LI S H, SHIN D H, CHUN Y S, et al. A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: Stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1 α [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(12): 3729-3738.
- [11] ELLINGHAUS P, HEISLER I, UNTERSCHMANN K, et al. BAY 87-2243, a highly potent and selective inhibitor of hypoxia-induced gene activation has antitumor activities by inhibition of mitochondrial complex I[J]. Cancer Med, 2013, 2(5): 611-624.
- [12] STEPHEN B M H, PHILIP W, MANOJ P. Inhibitors of hypoxia inducible factor (HIF) useful for treating hyperproliferative disorders and diseases associated with angiogenesis: WO, 2008EP03681[P]. 2008-05-08.
- [13] SHENG R, LI S, LIN G Y, et al. Novel potent HIF-1 inhibitors for the prevention of tumor metastasis: Discovery and optimization of 3-aryl-5-indazole-1, 2, 4-oxadiazole derivatives[J]. RSC Adv, 2015, 5(100): 81817-81830.

收稿日期: 2020-07-02

(本文责编: 曹粤锋)