

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 12 月 8 日 (08.12.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/192586 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07D 233/64 (2006.01) A61K 31/496 (2006.01)
C07D 403/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/083610
- (22) 国际申请日: 2016 年 5 月 27 日 (27.05.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510293269.8 2015 年 6 月 2 日 (02.06.2015) CN
- (71) 申请人: 青岛海洋生物医药研究院股份有限公司
(MARINE BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE
OF QINGDAO CO., LTD.) [CN/CN]; 中国山东省青
岛市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266071
(CN)。
- (72) 发明人: 李文保 (LI, Wenbao); 中国山东省青岛市
崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266071
(CN)。 孙天文 (SUN, Tianwen); 中国山东省青
岛市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266071
(CN)。 王世潇 (WANG, Shixiao); 中国山东省青

市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266071
(CN)。 赵建春 (ZHAO, Jianchun); 中国山东省青
岛市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266071
(CN)。 蔡兵 (CAI, Bing); 中国山东省青岛市崂山
区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266071 (CN)。
管华诗 (GUAN, Huashi); 中国山东省青岛市崂山区
香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266071 (CN)。

(74) 代理人: 浙江杭州金通专利事务所有限公司
(ZHEJIANG HANGZHOU JINTONG PATENT
AGENCY CO., LTD); 中国浙江省杭州市武林广场 8
号省科协大楼 19 层刘晓春, Zhejiang 310003 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保
护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,
RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW。

[见续页]

(54) Title: DEUTERIUM-SUBSTITUTED DEHYDROPHENYLHISTIN-LIKE COMPOUND, PREPARATION METHOD THEREOF AND USE IN PREPARATION OF ANTITUMOR DRUG

(54) 发明名称: 氘代脱氢苯基阿克斯丁类化合物及其制备方法和在制备抗肿瘤的药物中的应用

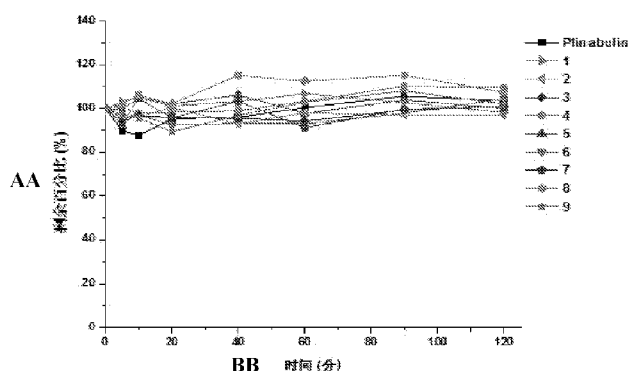
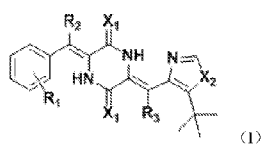


图 1

AA Percent remaining (%)
BB Time (minutes)



(1)

(57) Abstract: Provided are a deuterium-substituted dehydrophenylhistin-like compound, preparation method thereof and use in a preparation of antitumor drugs. The deuterium-substituted dehydrophenylhistin-like compound has a structure of general formula (I), and a synthesis method thereof comprises: firstly conducting a condensation reaction of diacetyldiketopiperazine and an aldehyde intermediate *a* or a deuterated aldehyde compound *b* to form a heterocyclic compound *c* or a deuterium-containing heterocyclic compound *d*, which is then subjected to a condensation reaction with benzaldehyde and a deuterium-substituted benzaldehyde-like compound to form the deuterium-substituted dehydrophenylhistin-like compound. Also provided are a highly effective deuterated aldehyde intermediate with a high deuterium substitution rate and a deuterium-containing heterocycle intermediate, and a synthesis method thereof. An experiment shows that the deuterium-substituted dehydrophenylhistin-like compound provided by the present invention has an effect on tubulin depolymerization and can treat a refractory solid tumor or lymphoma. The present invention provides a method for researching and developing antitumor drugs of the related compound.

(57) 摘要:

[见续页]



(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

本发明提供了氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物及其制备方法和在制备抗肿瘤的药物中的应用, 该类化合物具有通式 (I) 的结构, 其合成方法包括: 先将二乙酰基哌嗪二酮与醛中间体 a 或者氘醛化合物 b 发生缩合反应, 形成杂环化合物 c 或者含氘杂环化合物 d, 再与苯甲醛、氘代苯甲醛类化合物发生缩合反应形成氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物。同时, 本发明也提供了一种高效的高氘代率的氘醛中间体及含氘杂环中间体及其合成方法。经实验证明本发明提供的氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物具有影响微管蛋白解聚, 治疗难治性实体瘤或淋巴瘤的作用, 本发明提供了研究与开发所述相关化合物的抗肿瘤药物的方法,

说明书

氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物及其制备方法和在制备抗肿瘤的药物中的应用

技术领域

本发明属于化学和医药技术领域，涉及医药化合物及其制备方法和应用，具体涉及氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物及其制备方法和在制备抗肿瘤的药物中的应用。

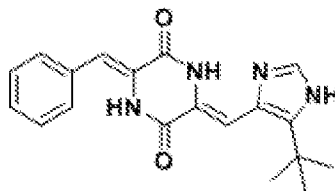
背景技术

众所周知，血管生成对肿瘤的生长和转移至关重要，因此肿瘤血管系统已成为极具价值的肿瘤治疗靶。一般说来，靶向肿瘤脉管系统的抗肿瘤药物主要包括抗血管生成剂和血管阻断剂(VDAs)，前者可抑制肿瘤新血管的生长，而后者则是靶向破坏为肿瘤细胞供应氧和营养的已有血管网。肿瘤血管具有与正常血管不同的异常结构，其内皮细胞增殖迅速，血管壁变薄而具高渗透性，导致高血流阻力。VDAs则可选择性作用于肿瘤血管内皮细胞，干扰其黏结合部位和微管骨架，从而影响内皮细胞的迁移、附着和增殖，导致血管的蛋白渗透性和间隙压力增加，引起血浆渗漏、血管直径减小和血液黏滞度提高，最终致使血流进一步减慢，氧和营养供应阻断，导致肿瘤坏死。

VDAs可分为配体靶向型VDAs和小分子VDAs两种类型，前者由靶向部分(如抗体、肽或生长因子)和效应子部分(可通过不同机制杀死肿瘤)组成，后者又可进一步分为黄酮类和微管蛋白结合剂。由美国Nereus制药公司研制的Plinabulin(KPU-2, NPI-2358, 中文名称：普那布林)便是一种微管蛋白结合剂，是源自海洋曲霉菌的低分子环二肽Phenylahistin或halimide的合成衍生物，可选择性作用于内皮微管蛋白中秋水仙碱结合位点附近，抑制微管蛋白聚合，阻断微管装配，从而破坏内皮细胞骨架，抑制肿瘤血流，但不伤害正常血管系统。

Plinabulin结合到微管蛋白的秋水仙素结合位点附近，作用于MM细胞，使MM细胞停在有丝分裂早期，而诱导细胞死亡。Plinabulin也抑制微管形成，及内皮细胞和MM细胞的迁移，使肿瘤脉管系统功能失常。Plinabulin可诱导癌细胞死亡，但不影响其他正常单核细胞的活力。

Plinabulin的化学结构式如下：



Plinabulin分子式为 $C_{19}H_{20}N_4O_2$ ，分子量336.39，CAS号714272-27-2。具有较好的稳定性。

氘是氢的一种稳定非放射性同位素，重量为2.0144。由于生成的氘代化合物中的氘含量远远高于自然界中0.015%的含量，所以可以将其看做是一种新型的化合物。氘代对于药物的改善也得到了美国专利与商标局的认可，如氘代利莫那班(Rimonabant)、莫沙比利(Mosapride)、奥昔布宁(Oxybutynin)等专利都已经被批准。

研究表明，氘在药物设计中是目前最好的生物电子等排体，并且氘代作用可以减少种群和性别

不同引起的药效和毒性差异、减少病人间的个体差异、通过减少有害代谢物降低不良反应事件的发生、还可以减少基因毒性等，因此氘代作用已被广泛应用于人类临床研究以及药物研发过程中的药代动力学研究。目前国际上已有多家制药企业在从事氘代新药的研发，并已有多个氘代药物进入临床实验，如CTP-347、CTP-499等。

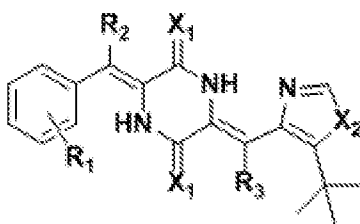
氘的重要特点是其在药物分子中的形状和体积与氢基本上相同，如果药物分子中的氢被选择性的替换为氘，氘代药物一般还会保留原来的生物活性和选择性。实验证明，碳-氘键的结合比碳-氢键更加稳定。携带中子的氘与碳形成的碳-氘键在较低的频率振动，因而强于碳-氢键。这一强度的增加，可直接影响某些药物的吸收、分布、代谢和排泄等属性，从而提高药物的疗效、安全性和耐受性。因此理论认为，如果药物分子中将被分解的某个特定的碳-氢键被氘代为相应的碳-氘键后，将会延缓其分解过程，使氘代药物在身体里作用的时间更长，成为效果更优于原来的药物。

发明内容

本发明的目的在于提供了氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物及其制备方法和在制备抗肿瘤的藥物中的应用，本发明所提供的氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物具有抑制肿瘤细胞的作用，可以用于制备抗肿瘤的藥物。

为实现上述发明目的，本发明采用以下技术方案予以实现：

氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物，其具有通式 (I) 所示结构：



(I)

其中 R₁ 为苯环上的一取代或多取代的取代基，所述 R₁ 选自氢、氘、卤素、羟基、甲氧基、氨基、苯基、氨基甲基苯基、C1-C24 烷基、C2-C24 烯基、C2-C24 炔基、芳基烷基、杂环芳基烷基、C1-C24 的酰基、C1-C24 的烷氧基、羧基、羧酸酯基、酰胺基、N-单取代或 N,N-双取代酰胺基、磺酸基、磺酸酯基、磺酰胺基、N-取代磺酰胺基、烷氧基、芳基烷氧基、烷硫基、氰基、氨基、取代的氨基、硝基、环烷基、环烯基、芳香基、取代的芳香基、芳香杂环基、芳氧基、芳酰基、环氧基、环酰基、芳香硫基或芳磺酰基中的至少一种；

R₂ 为氢或氘，R₃ 为氢或氘；

X₁ 为氧或硫；

X₂ 为 NH、氧或硫。

进一步的：所述氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物具体为：

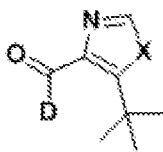
(3Z,6Z)-3-苯基氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯基)氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-苯基肟代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五肟代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-苯亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五肟代苯)肟代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-(4-氟-2,3,5,6-四肟代苯基)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-(4-氟-2,3,5,6-四肟代苯基)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-(3-氟代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-(3-苯甲酰基苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-(3-(4-氟苯甲酰基)苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-(3-(4-甲氧基苯甲酰基)苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 (3Z,6Z)-3-(3-甲氧基苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;
 或(3Z,6Z)-3-(3-三氟甲基苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮。

本发明还提供了合成所述肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的肟醛中间体, 其具有通式(II)所示结构:

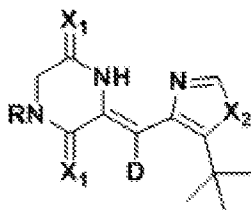


(II)

其中 X 为 NH、氧或硫。

进一步的: 所述肟醛中间体具体为: 5-叔丁基-1H-咪唑-4-肟代甲醛; 5-叔丁基-噁唑-4-肟代甲醛或 5-叔丁基-噻唑-4-肟代甲醛。

本发明还提供了合成所述肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的含肟杂环化合物中间体, 其具有通式(III)所示结构:



(III)

X₁ 为氧或者硫, X₂ 为 NH、氧或者硫;

其中取代基 R 选自 C1-C24 烷基、C2-C24 烯基、C2-C24 炔基、芳基烷基、杂环芳基烷基、C1-C24

的酰基、磺酰基、芳酰基、环酰基、芳磺酰基中的其中至少一种。

进一步的：所述含氧杂环化合物中间体具体为：

(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氧代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-噁唑-4-基)氧代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-噻唑-4-基)氧代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(Z)-1-苯甲酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氧代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

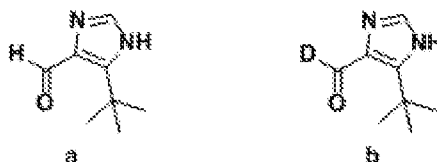
(Z)-1-烯丙基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氧代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(Z)-1-甲磺酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氧代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

或(Z)-1-对甲苯磺酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氧代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮。

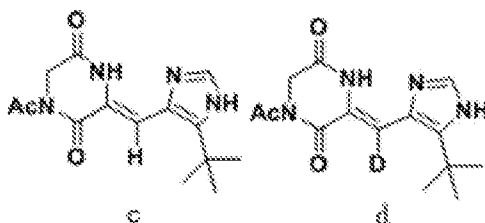
本发明提供了氧代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的制备方法，它包括以下步骤：

(1) 将醛中间体 a 进行还原和氧化反应得到氧醛化合物 b，所述醛中间体 a 和氧醛化合物 b 结构式如下：



(2) 第一步缩合反应：先将二乙酰基哌嗪二酮与所述醛中间体 a 或者氧醛化合物 b 发生缩合反应，形成杂环化合物 c 或者含氧杂环化合物 d；

所述杂环化合物 c 或者含氧杂环化合物 d 结构式如下：



(3) 第二步缩合反应：再将所述杂环化合物 c 或者含氧杂环化合物 d 与第二缩合反应醛发生缩合反应形成氧代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物；所述第二缩合反应醛为苯甲醛、氧代苯甲醛或苯环上带有取代基的苯甲醛衍生物、氧代苯甲醛衍生物。

进一步的：所述醛中间体 a 为咪唑甲醛，所述氧醛化合物 b 为氧代咪唑甲醛。

进一步的：所述步骤(1)中氧醛化合物 b 的制备方法为：将 5-叔丁基-1H-咪唑-4-甲醛经由 NaBD₄ 还原和二氧化锰氧化，得到 5-叔丁基-1H-咪唑-4-氧代甲醛为氧醛化合物 b。

进一步的：所述步骤(2)中含氧杂环化合物 d 的制备方法为：将二乙酰基哌嗪二酮与所述氧醛化合物 b 在 DMF 作溶剂、碳酸铯作碱、N,N-二甲基甲酰胺作溶剂的条件下避光发生缩合反应，形成含氧杂环化合物 d。

药物组合物，含有所述的化合物和药物可接受的载体。

本发明最后提供了所述的氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物在制备抗肿瘤的制剂中的应用。

所述肿瘤包括皮肤癌和白血病。

本发明的优点和技术效果是：本发明提供了氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物，该类化合物合成方法包括：先将二乙酰基哌嗪二酮与醛中间体 a 或者氘醛化合物 b 发生缩合反应，形成杂环化合物 c 或者含氘杂环化合物 d，再与苯甲醛、氘代苯甲醛类化合物发生缩合反应形成氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物。同时，本发明也提供了一种高效的高氘代率的氘醛中间体及含氘杂环中间体及其合成方法。经实验证明本发明提供的氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物具有影响微管蛋白解聚，治疗难治性实体瘤或淋巴瘤的作用，本发明提供了研究与开发所述相关化合物的抗肿瘤药物的方法。

附图说明

图 1 表明了本发明所述化合物 1-9 在血浆中的代谢稳定性；

图 2 表明了本发明所述化合物 1、2、3、4、7 的体外肝微粒体代谢稳定性；

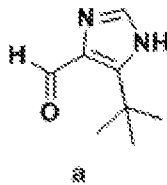
图 3 表明了 Plinabulin（脱氢苯基阿夕斯丁）及其氘代类似物化合物 1、2、3 对 A431 细胞微管蛋白的影响；

图 4 表明了 Plinabulin（脱氢苯基阿夕斯丁）及其氘代类似物化合物 1、2、3 对 A431 细胞微管蛋白荧光强度影响。

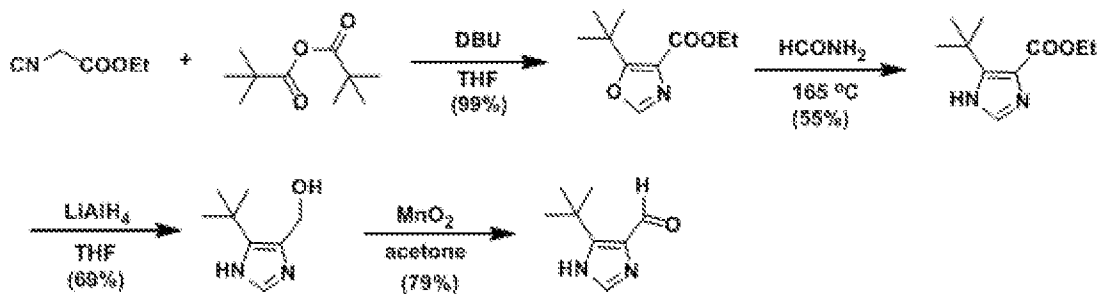
具体实施方式

以下结合具体实施例对本发明的技术方案做进一步详细的说明。

已知化合物 5-叔丁基-1H-咪唑-4-甲醛（醛中间体 a）的合成：



其合成步骤为，第一步是关环成噁唑环；第二步是在甲酰胺中加热处理，成为咪唑环；再经过还原并氧化得到咪唑醛类化合物，反应式如下：



其具体制备过程包括以下步骤：

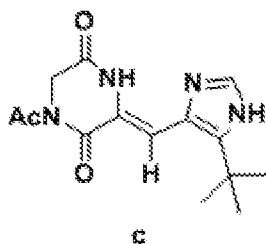
(1) 将异氰基乙酸乙酯（5.8 mL， 53 mmol）溶于 90mL 干燥的四氢呋喃中，加入 DBU（9.5 mL， 63.6 mmol），然后慢慢加入三甲基乙酸酐（12.9 mL， 63.6 mmol），室温下反应过夜，旋干溶剂，乙酸乙酯萃取，10 %碳酸钠溶液淋洗，再用 10 %柠檬酸溶液淋洗，

无水硫酸钠干燥。旋干溶剂，柱层析分离纯化，石油醚：乙酸乙酯 = 15 : 1 为洗脱剂，得到噁唑化合物 10.3g，产率 99%。

(2) 在 250 mL 圆底瓶中加入噁唑化合物 (8.1 g, 41 mmol)，随后加入 60 mL 甲酰胺，165 °C 下加热反应，24 h 后加入 10% 碳酸钠淬灭反应，乙酸乙酯萃取，无水硫酸钠干燥。旋干溶剂，柱层析分离纯化，二氯甲烷：甲醇 = 60 : 1 为洗脱剂，得到咪唑化合物 4.4 g，产率 55%。

(3) 将咪唑化合物 (830 mg, 4.2 mmol) 溶于干燥的四氢呋喃中，-5 °C 下加入四氢铝锂 (479 mg, 12.6 mmol)，0.5 h 后升到室温反应 4 h，加水淬灭，砂芯漏斗抽滤，滤液旋干直接进行下一步反应。把旋干后的还原产物溶于 20 mL 干燥的丙酮中，加入二氧化锰 (3.6 g, 42 mmol)，室温下反应过夜，砂芯漏斗抽滤，旋干溶剂得到化合物 5-叔丁基-1H-咪唑-4-甲醛 351mg，两步产率 55%。

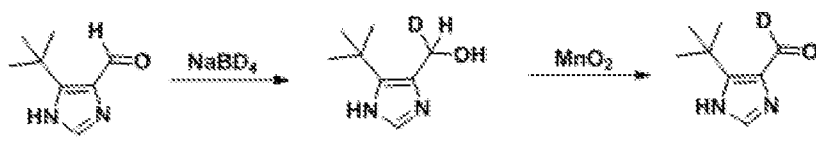
已知化合物杂环中间体 Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮(杂环化合物 c) 的合成：



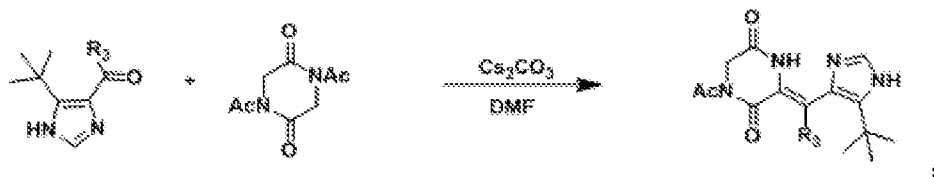
其制备方法为：将 5-叔丁基-1H-咪唑-4-甲醛 (304 mg, 2 mmol)，1,4-二乙酰基哌嗪-2,5-二酮 (792 mg, 4 mmol)，DMF (9 mL)，碳酸铯 (977 mg, 3 mmol) 置于反应瓶中，氮气保护，室温下反应 18 小时(TLC 检测反应完全)。将反应液倒入冷水中，有固体析出，过滤，得浅黄色固体 320 mg，即为所述(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮，收率为 55 %。

本发明所述氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的制备方法包括以下步骤：

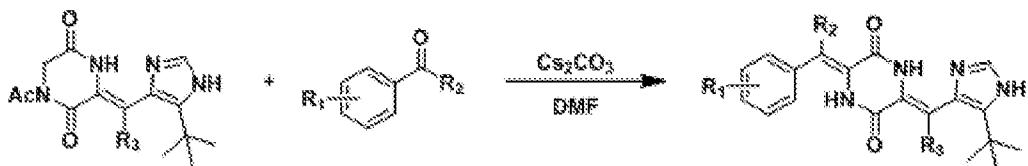
(1) 氘醛化合物 b 的合成：从醛中间体 a 出发，经由 NaBD₄ 还原和二氧化锰氧化，得到氘醛化合物 b，



(2) 第一步缩合反应：先将二乙酰基哌嗪二酮 (DKP) 与所述醛中间体 a 或者氘醛化合物 b 发生缩合反应，形成杂环化合物 c 或者含氘杂环化合物 d；

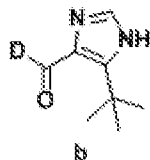


(3) 第二步缩合反应：再将所述杂环化合物 c 或者含氧杂环化合物 d 与第二醛，在避光条件下发生缩合反应，形成氧代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物；所述第二醛为苯甲醛、氧代苯甲醛或苯环上带有取代基的苯甲醛衍生物、氧代苯甲醛衍生物。



实施例 1

中间体 5-叔丁基-1H-咪唑-4-氧代甲醛（氧代化合物 b）的制备，结构式如下：

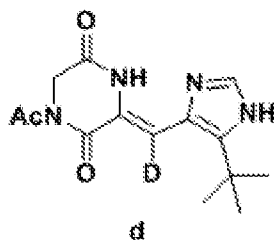


其具体制备过程包括以下步骤：称取 5-叔丁基-1H-咪唑-4-甲醛（304mg, 2 mmol）于 50 mL 干燥单口瓶中，置换氮气保护。向反应瓶中加入干燥乙醇 5 mL，硼氢化钠（420 mg, 10 mmol），置换氮气保护，室温下反应过夜，加水 10 mL 淬灭反应，乙酸乙酯 30 mL 萃取有机相，旋干后直接投入下步反应，加入 10 mL 干燥的丙酮和二氧化锰（1.7 g, 20 mmol），室温下反应过夜，砂芯漏斗抽滤，滤液旋干柱层析纯化，得到 5-叔丁基-1H-咪唑-4-氧代甲醛（199 mg, 1.3 mmol），为白色固体，产率 65 %。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6.97 (s, 1H), 6.66 (s, 1H) 1.05 (s, 9H); MS (ESI) m/z 154.10 ($M + H$)⁺ (calcd for $C_8H_{12}DN_2O$ 154.10)。

实施例 2

(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氧代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮（含氧杂环化合物 d）的制备，结构式如下：



其制备方法为：将 5-叔丁基-1H-咪唑-4-氧代甲醛（306 mg, 2 mmol），1,4-二乙酰基哌嗪-2,5-二酮（792 mg, 4 mmol），无水硫酸镁（800 mg），DMF（9 mL），碳酸铯（977 mg, 3 mmol）置于反应瓶中，氮气保护，室温下反应 18 小时（TLC 检测反应完全）。将反应液倒入冷水中，有固体析出，过滤，得灰白色固体 306 mg，即为所述 (Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氧代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮，收率为 52.58 %。

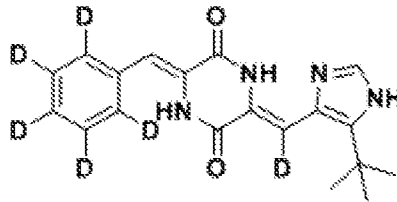
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.37 (s, 1H), 12.00 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 4.31 (s, 2H), 2.48 (s, 3H),

1.39 (s, 9H); MS (ESI) m/z 292.14($M + H$)⁺ (calcd for $C_{14}H_{18}DN_4O_3$ 292.14)。

实施例 3

(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮的制备 (化合物 1)

所述化合物 1 的结构式如下:



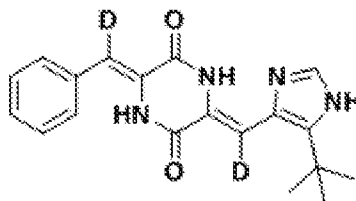
其制备方法为: 将(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮 (250 mg, 0.86 mmol), 2,3,4,5,6-五氘代苯甲醛 (191 mg, 1.72 mmol), 无水硫酸镁 (350 mg), DMF (8 mL), 碳酸铯 (420 mg, 1.29 mmol) 置于反应瓶中, 置换氮气保护, 45°C 反应 24 小时, TLC 检测反应完全。将反应液加入到冷水中, 有黄色固体析出, 过滤, 滤饼依次用水、石油醚: 乙酸乙酯=8:1 的混合溶剂洗涤, 洗涤后的滤饼再用无水乙醇和乙酸乙酯的混合溶剂溶解, 滤去不溶物, 减压浓缩至干, 黄色固体 140 mg 即为所述化合物 1, 收率 47.54 %。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.31 (s, 1H), 12.22 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 1.37 (s, 9H); MS (ESI) m/z 343.2045($M + H$)⁺ (calcd for $C_{19}H_{15}D_6N_4O_2$ 343.2036)。

实施例 4

(3Z,6Z)-3-苯基肟代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮的制备 (化合物 2)

所述化合物 2 的结构式如下:

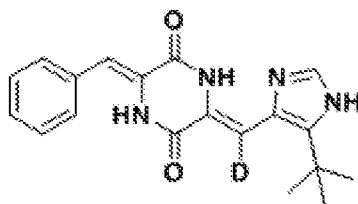


其制备方法为: 将(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮 (200 mg, 0.69 mmol), 苯肟代甲醛 (147 mg, 1.38 mmol), 无水硫酸镁 (280 mg), DMF (5 mL), 碳酸铯 (336 mg, 1.03 mmol) 置于反应瓶中, 氮气保护, 45°C 反应 22 小时, TLC 检测反应完全。将反应液加入到冷水中, 有黄色固体析出, 过滤, 滤饼依次用水、石油醚: 乙酸乙酯=8:1 的混合溶剂洗涤, 洗涤后的滤饼再用无水乙醇和乙酸乙酯的混合溶剂溶解, 过滤, 减压浓缩至干, 得黄色固体 75 mg 即为所述化合物 2, 收率 32.26 %。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.31 (s, 1H), 12.22 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.52 (d, J = 4 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 8 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 8 Hz, 1H), 1.38 (s, 9H); MS (ESI) m/z 339.1788($M + H$)⁺ (calcd for $C_{19}H_{19}D_2N_4O_2$ 339.1785)。

实施例 5**(3Z,6Z)-3-苯亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮的制备 (化合物 3)**

所述化合物 3 的结构式如下:

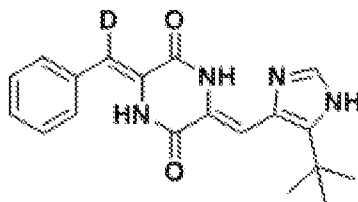


其制备方法为: 将(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮 (150 mg, 0.51 mmol), 苯甲醛 (109 mg, 1.03 mmol), 无水硫酸镁 (210 mg), DMF (5 mL), 碳酸铯 (420 mg, 1.29 mmol) 置于反应瓶中, 氮气保护, 45°C 反应 21 小时, TLC 检测反应完全。将反应液加入到冷水中, 有黄色固体析出, 过滤, 滤饼依次用水、石油醚: 乙酸乙酯=8:1 的混合溶剂洗涤, 洗涤后的滤饼再用无水乙醇和乙酸乙酯的混合溶剂溶解, 滤去不溶物, 减压浓缩至干, 得黄色固体 63 mg 即为所述化合物 3, 收率 36.65 %。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.31 (s, 1H), 12.22 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.52 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 8 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 8 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 1.37 (s, 9H); MS (ESI) m/z 338.1715 ($M + H$) $^+$ (calcd for $C_{19}H_{20}DN_4O_2$ 338.1722)。

实施例 6**(3Z,6Z)-3-苯基氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮的制备 (化合物 4)**

所述化合物 4 的结构式如下:

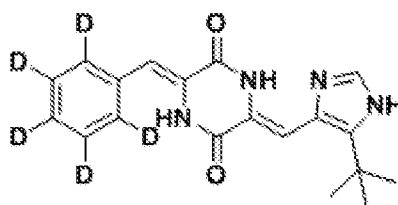


其制备方法为: 将(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮 (290 mg, 1 mmol), 苯氘甲醛 (214 mg, 2 mmol), 无水硫酸镁 (900 mg), DMF (8 mL), 碳酸铯 (261 mg, 0.8 mmol) 置于反应瓶中, 氮气保护, 45°C 反应至完全。将反应液加入到冷水中, 用二氯甲烷提取, 减压浓缩至干, 浓缩物用石油醚: 乙酸乙酯=8:1 的混合溶剂搅拌打浆, 过滤, 滤饼干燥后得黄色固体 183 mg 即为所述化合物 4, 收率为 54.43 %。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.33 (s, 1H), 12.25 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.53 (d, J = 4 Hz, 2H), 7.43 (t, J = 8 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 8 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 1.38 (s, 9H); MS (ESI) m/z 338.1715 ($M + H$) $^+$ (calcd for $C_{19}H_{20}DN_4O_2$ 338.1722)。

实施例 7**(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮的制备 (化合物 5)**

所述化合物 5 的结构式如下:



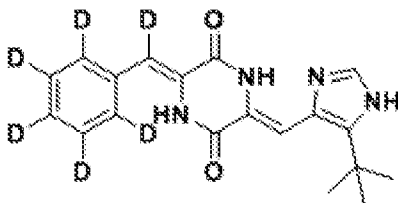
其制备方法为: 将(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)吡嗪-2,5-二酮 (300 mg, 1.03 mmol), 2,3,4,5,6-五氘代苯甲醛 (230 mg, 2.07 mmol), DMF (14 mL), 碳酸铯 (505 mg, 1.55 mmol) 置于反应瓶中, 氮气保护, 于 80°C 反应 6 小时, TLC 跟踪反应至反应完全。将反应液倒入冷水中, 有黄色固体析出。过滤, 滤饼依次用水、石油醚: 乙酸乙酯=8:1 的混合溶剂洗涤, 洗涤后的滤饼再用无水乙醇和二氯甲烷的混合溶剂溶解, 滤去不溶物, 减压浓缩至干, 得黄色固体 229 mg 即为所述化合物 5, 收率 50.22%。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 12.40 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.03 (m, 2H), 1.47 (s, 9H); MS (ESI) m/z 342.1984 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{D}_5\text{N}_4\text{O}_2$ 342.1973)。

实施例 8

(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯基)氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)吡嗪-2,5-二酮的制备 (化合物 6)

所述化合物 6 的结构式如下:



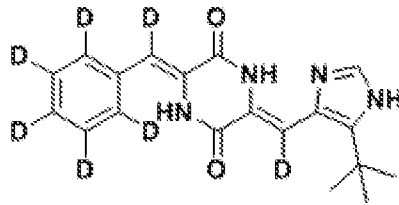
其制备方法为: 将(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)吡嗪-2,5-二酮 (290 mg, 1 mmol), 2,3,4,5,6-五氘代苯基氘代亚甲基 (224 mg, 2 mmol), 无水硫酸镁 (900 mg), DMF (10mL), 碳酸铯 (261 mg, 0.8 mmol) 置于反应瓶中, 氮气保护, 45°C 反应 24 小时, 至反应完全(TLC 检测)。将反应液倒入到冷水中, 有黄色固体析出。用二氯甲烷提取, 减压浓缩至干, 浓缩物用石油醚: 乙酸乙酯=8:1 的混合溶剂搅拌打浆, 过滤, 滤饼干燥后得黄色固体 240 mg 即为所述化合物 6, 收率 70.17%。

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.33 (s, 1H), 12.25 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 1.38 (s, 9H); MS (ESI) m/z 342.2033 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{D}_6\text{N}_4\text{O}_2$ 343.2036)。

实施例 9

(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯基)氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)吡嗪-2,5-二酮的制备 (化合物 7)

所述化合物 7 的结构式如下:



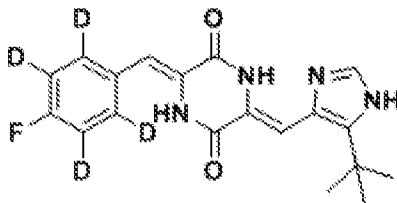
其制备方法为：将(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮 (250 mg, 0.86 mmol), 2,3,4,5,6-五氘代苯氘甲醛 (191 mg, 1.72 mmol), 无水硫酸镁 (350 mg), DMF (8 mL), 碳酸铯 (420 mg, 1.29 mmol) 置于反应瓶中, 置换氮气保护, 45°C反应 24 小时, TLC 检测反应完全。将反应液加入到冷水中, 有黄色固体析出, 过滤, 滤饼依次用水、石油醚: 乙酸乙酯=8:1 的混合溶剂洗涤, 洗涤后的滤饼再用无水乙醇和乙酸乙酯的混合溶剂溶解, 滤去不溶物, 减压浓缩至干, 黄色固体 138 mg 即为所述化合物 7, 收率 47 %。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.30 (s, 1H), 12.22 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 1.37 (s, 9H); MS (ESI) m/z 344.2096 ($M + H$) $^+$ (calcd for $C_{19}H_{14}D_7N_4O_2$ 344.2098)。

实施例 10

(3Z,6Z)-3-(4-氟-2,3,5,6-四氘代苯基)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮的制备 (化合物 8)

所述化合物 8 的结构式如下:



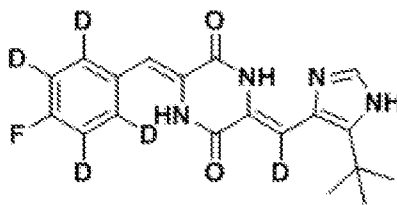
其制备方法为：将(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮 (300 mg, 1.03 mmol), 4-氟-2,3,5,6-四氘代苯甲醛 (265 mg, 2.07 mmol), DMF (6 mL), 碳酸铯 (505 mg, 1.55 mmol) 置于反应瓶中, 氮气保护, 于 80°C反应 5 小时, TLC 检测反应完全。将反应液倒入冷水中, 有黄色固体析出。过滤, 滤饼依次用水、石油醚: 乙酸乙酯=8:1 的混合溶剂洗涤, 洗涤后的滤饼再用无水乙醇和二氯甲烷的混合溶剂溶解, 滤去不溶物, 减压浓缩至干, 得黄色固体 231 mg 即为所述化合物 8, 收率 62.6 %。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.36 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 1.47 (s, 9H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 170.76, 162.93, 160.97, 158.04, 156.74, 140.76, 134.78, 131.48, 129.98, 127.01, 124.23, 113.25, 105.48, 32.35, 31.08 ppm; MS (ESI) m/z 359.1818 ($M + H$) $^+$ (calcd for $C_{19}H_{16}D_4FN_4O_2$ 359.1816)。

实施例 11

(3Z,6Z)-3-(4-氟-2,3,5,6-四氘代苯基)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮的制备 (化合物 9)

所述化合物 9 的结构式如下:

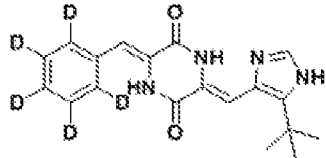
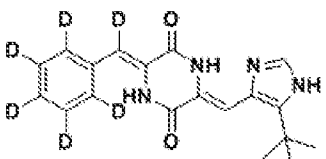
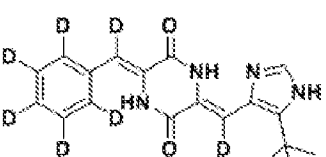
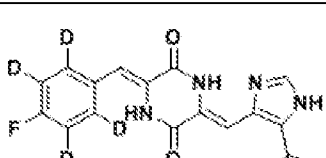
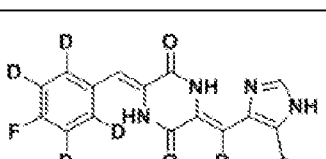


其制备方法为: 将(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮 (250 mg, 0.86 mmol), 4-氟-2,3,5,6-四氘代苯甲醛 (220 mg, 1.72 mmol), 无水硫酸镁 (350 mg), DMF (8 mL), 碳酸铯 (420 mg, 1.29 mmol) 置于反应瓶中, 氮气保护, 45°C 反应 24 小时, TLC 检测反应完全。将反应液倒入冷水中, 有黄色固体析出。过滤, 滤饼依次用水、石油醚: 乙酸乙酯=8:1 的混合溶剂洗涤, 洗涤后的滤饼再用无水乙醇和乙酸乙酯的混合溶剂溶解, 滤去不溶物, 减压浓缩至干, 得黄色固体 144 mg 即为所述化合物 9, 收率为 46.59 %。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.30 (s, 1H), 12.22 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 1.37 (s, 9H); MS (ESI) m/z 360.1886 ($M + H$) $^+$ (calcd for $C_{19}H_{15}D_5FN_4O_2$ 360.1879)。

表1实施例3-11获得化合物的结构式和化学名称

编号	结构式	化学名称
化合物 1		(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮
化合物 2		(3Z,6Z)-3-苯基氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮
化合物 3		(3Z,6Z)-3-苯亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮
化合物 4		(3Z,6Z)-3-苯基氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮

化合物 5		(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮
化合物 6		(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯基)氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮
化合物 7		(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯)氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮
化合物 8		(3Z,6Z)-3-(4-氟-2,3,5,6-四氘代苯基)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮
化合物 9		(3Z,6Z)-3-(4-氟-2,3,5,6-四氘代苯基)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮

实施例 12：体外血浆代谢稳定性实验

Plinabulin（脱氢苯基阿夕斯丁）10 $\mu\text{mol/mL}$ 溶液的配制：取 1mg/mL 溶液吸取 10 μL ，加入 990 μL 的甲醇水（1:1）稀释为 10 $\mu\text{g/mL}$ 溶液，取 10 $\mu\text{g/mL}$ 溶液 337.3 μL ，加入甲醇水（1:1）溶液 662.7 μL ，配置为 1mL 的浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的脱氢苯基阿夕斯丁溶液，实验避光操作。

Wistar 大鼠血浆的制备：取 200g 的大鼠，心脏取血，肝素钠抗凝，8000r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10min，取血浆。

孵育体系 200 μL ，对应 96 孔板，依次加入 180 μL 的血浆和 20 μL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ 的测试样品。样品混均匀后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴振荡器中孵育，分别于 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120min 加入 300 μL 的含内标的乙腈终止液（浓度为 100ng/mL 的普萘洛尔的乙腈溶液）。反应混合溶液 14000rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15min，小心吸取上清液至进样小瓶中，LC-MS 检测每个化合物的剩余量，结果如图 1。图 1 的实验结果表明，合成的氘代系列化合物在血浆中具有与对照脱氢苯基阿夕斯丁相近的稳定性。

实施例 13：体外肝微粒体代谢稳定性实验

溶液的配制 (1) K_2HPO_4 缓冲液的配制： K_2HPO_4 5.7055 g，500 mL 三蒸水溶解，用 HCl 调节 pH 至 7.4，浓度为 50 mmol/L。(2) 大鼠的肝微粒体（浓度为 20 mg/mL）--孵育终浓度为 0.5 mg/mL；

(3) 待测试化合物标准溶液的配制—反应缓冲液稀释至 2 μM , 每孔加入 100 μL , 终浓度为 1 μM 。(4) NADPH 的配制: 称取 NADPH 10.42 mg, 加入 2.5 mL K_2HPO_4 缓冲液溶解, 浓度为 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。(5) 内标普萘洛尔乙腈溶液的配制: 普萘洛尔 2.20 mg 甲醇溶解, 配制浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液, 用乙腈稀释成 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 实验避光操作。

孵育实验: 总体积 1 mL, 含微粒体 25 μL (由 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 稀释至 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), NADPH 200 μL (由 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 稀释至 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 待测化合物溶液 20 μL (由 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 稀释至 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 加入 K_2HPO_4 缓冲液 755 μL 至 1 mL。

各孵育体系置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡器中孵育, 分别在反应 0、5、10、20、40、60、90、120、150、2120、270 min 从体系中取出 50 μL , 加入 100 μL 含 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 普萘洛尔的乙腈终止反应。每组平行三个样品, 将各终止反应样品离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 14000rpm) 15min, 取上清 LC-MS/MS 检测每一个化合物及的剩余量, 结果见图 2, 图 2 实验结果表明, 新合成的化合物 1、2、3、4、7 在体外肝微粒体具有与对照脱氢苯基阿夕斯丁相近的代谢稳定性。

实施例 14: 细胞分析方法

通过 MTT 分析方法测定所选化合物对肿瘤细胞 A431 和 Jurkat 生长的抑制率。

实验材料:

1) 细胞株: 人皮肤癌细胞株 A431 和人急性 T 细胞白血病细胞 Jurkat。细胞生长于 RPMI-1640 培养基和高糖 DMEM(Gibco BRL, Rockville, MD, USA)+10%胎牛血清 (含 2 mM L-glutamine, penicillin and streptomycin) 中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ (5% CO_2 -95% air) 孵箱中生长, 以 0.25%的胰蛋白酶消化传代, 1~2d 换液 1 次。

2) 化合物的溶解与稀释: 根据化合物的分子量和质量, 分别用 DMSO (SIGMA) 配制成 10 mM 的母液, 再以 RPMI-1640 培养基稀释至需要浓度 100 μM (DMSO 含量 $\leq$ 3%)。稀释后的药物 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3) RPMI 1640 细胞培养基, Gibco 公司; 胎牛血清, Hyclone 公司; 细胞消化液, 0.25% Trypsin + 0.02% EDTA

4) MTT 液, MTT 干粉 (Sigma), 用 PBS 充分溶解配成 5 mg/ml, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

实验步骤:

1) 细胞接种: 取对数生长期的细胞, 用胰酶消化后分散成单个细胞, 计数, 将细胞悬液调整至 8.0×10^4 个/mL, 每孔 180 μL 接种于 96 孔板中, 使接种的细胞数量为 4.0×10^3 个/孔。细胞贴壁后, 分别加入含有不同浓度化合物的新鲜培养基, 使化合物浓度分别是 12.5 nM、6.25 nM, 每个浓度设 3 个复孔, 操作时避光, 并调整各浓度所含 DMSO 含量一致。

2) 药物孵育 72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma; 5 mg/mL), 置孵箱孵育 4 h 后去上清, 每孔加 150 μL DMSO 溶解, 用酶标仪测定在 570 nm 下的吸光度值。根据公式: 抑制率 = $[(A_{570} \text{ 对照孔} - A_{570} \text{ 给药孔}) / A_{570} \text{ 对照孔}] \times 100\%$, 计算各浓度的抑制率, 结果见表 2。

表 2 化合物在不同药物浓度下对 2 种人体细胞株的肿瘤抑制率

编号	A431		Jurkat	
	浓度(nM)	抑制率(%)	浓度 (nM)	抑制率(%)
Plinabulin	12.5	91.81	12.5	79.69
	6.25	63.25	6.25	13.75
化合物 1	12.5	95.04	12.5	86.46
	6.25	80.37	6.25	79.91
化合物 2	12.5	94.11	12.5	79.65
	6.25	72.11	6.25	9.11
化合物 3	12.5	93.79	12.5	86.09
	6.25	76.55	6.25	57.68
化合物 4	12.5	91.85	12.5	82.33
	6.25	53.90	6.25	16.04
化合物 5	12.5	66.00	12.5	16.86
化合物 6	12.5	79.28	12.5	73.40
	6.25	16.17	6.25	7.70
化合物 7	12.5	87.73	12.5	64.49

注：A431-人皮肤癌细胞株；Jurkat 人急性 T 细胞白血病细胞。Plinabulin（脱氢苯基阿夕斯丁）为阳性对照。

表 2 实验结果表明，上述化合物 1、2、3、4、5、6、7 均具有与阳性对照 Plinabulin（脱氢苯基阿夕斯丁）接近的抑制肿瘤的活性，其中化合物 1、2、3 在 6.25nM 浓度下对 A431 和 Jurkat 细胞株的抑制率高于 Plinabulin（脱氢苯基阿夕斯丁），说明本发明制得的化合物具有明显的抑制肿瘤的活性，尤其对于皮肤癌和急性 T 细胞白血病。

实施例 15:高内涵成像分析系统

一、实验方案

以 Plinabulin（脱氢苯基阿夕斯丁）为阳性对照，设置浓度为 12.5nM。根据前期数据筛选出 3 种样品，分别是化合物 1、2、3。所有样品设置浓度为 12.5nM。根据特异性免疫荧光染色（Alexa 488）的实验方法，通过高内涵成像分析系统检测所选化合物 1、2、3 对人表皮癌 A431 细胞内微管蛋白表达的影响。

实验材料：

- 1) 细胞株：人表皮癌细胞株 A431
- 2) 培养基：高糖 DMEM+10%胎牛血清
- 3) Trypsin：胰蛋白酶粉末+乙二胺四乙酸二钠（EDTA）
- 4) 多聚甲醛：分析纯
- 5) Triton X-100：纯度>98%

6) Tubulin 抗体: Mouse, Santa Cruz Biotechnology

7) DyLight 488-羊抗鼠 IgG

实验步骤:

1) 取对数生长期细胞, 用胰酶消化后分散成单个细胞, 计数, 以 1.2×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 24h, 细胞贴壁。

2) 细胞贴壁后, 实验组每孔加入含有不同浓度化合物的新鲜培养基, 使化合物浓度为 12.5 nM, 每个浓度设 3 个复孔, 对照组则加入等倍稀释的溶剂 DMSO, 选取 Plinabulin (脱氢苯基阿夕斯丁) 为阳性药, 每组设 3 个复孔, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 饱和湿度的培养箱中培养 24h。

3) 24h 后吸去培养基, PBS 洗 3 次; 4% 多聚甲醛固定 30 min, 吸去多聚甲醛, PBS 洗 3 次; 0.3% Triton X-100, 5% BSA 封闭 30 min, 吸去, PBS 洗 3 次; 加入 Tubulin 抗体 (鼠抗, 1:200 稀释, 4°C 过夜; 吸去, PBS 洗 3 次; 加入 DyLight 488-羊抗鼠 IgG (1:1000 稀释), 室温放置 90 min

4) 高内涵成像分析系统拍照分析。

二、检测结果

检测结果如图 3。空白组和 DMSO 对照组对细胞无影响, 细胞骨架组成部分微管蛋白呈发散状均匀分布在细胞中, 经 Alexa488 染色后, 可观察到绿色荧光均匀分布于细胞内。

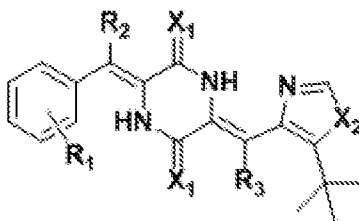
阳性对照 Plinabulin (脱氢苯基阿夕斯丁) 是已知的能够作用于微管蛋白的小分子化合物, 细胞内 Alexa488 染色的微管蛋白荧光强度明显增强, 微管蛋白出现集聚现象, 细胞形态也发生明显变化 (图 3)。样品化合物 1、2、3 作用 A431 细胞 24h 后, 细胞内 Alexa488 染色的微管蛋白荧光强度明显增强, 微管蛋白出现集聚现象, 细胞形态也发生明显变化。经 Hommeny 软件进行数据统计, 结果如图 4 所示, 与空白和对照组相比, 样品化合物 1、2、3 作用后的 Alexa488 荧光强度明显增高, 与阳性对照相比, 样品化合物 1、2、3 效果高与阳性对照。

通过本发明提供的制备方法制得了一系列氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物, 进一步进行上述血浆代谢稳定性实验、体外肝微粒体代谢稳定性实验、对肿瘤细胞的抑制率实验以及对肿瘤细胞内微管蛋白表达的影响等实验, 通过实验结果可以证明本发明所述的氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物对皮肤癌和白血病细胞具有明显的抑制作用, 而且还具有良好的代谢稳定性, 所以可以将其用于制备治疗癌症的药物, 具有良好的市场应用前景。

以上实施例仅用以说明本发明的技术方案, 而非对其进行限制; 尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明, 对本领域的普通技术人员来说, 依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改, 或者对其中部分技术特征进行等同替换; 而这些修改或替换, 并不使相应技术方案的本质脱离本发明所要求保护的技术方案的精神和范围。

权 利 要 求 书

1、氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物，其特征在于：其具有通式 (I) 所示结构：



(I)

其中 R₁ 为苯环上的一取代或多取代的取代基，所述 R₁ 选自氢、氘、卤素、羟基、甲氧基、氨基、苯基、氨基甲基苯基、C1-C24 烷基、C2-C24 烯基、C2-C24 炔基、芳基烷基、杂环芳基烷基、C1-C24 的酰基、C1-C24 的烷氧基、羧基、羧酸酯基、酰胺基、N-单取代或 N,N-双取代酰胺基、磺酸基、磺酸酯基、磺酰胺基、N-取代磺酰胺基、烷氧基、芳基烷氧基、烷硫基、氰基、氨基、取代的氨基、硝基、环烷基、环烯基、芳香基、取代的芳香基、芳香杂环基、芳氧基、芳酰基、环氧基、环酰基、芳香硫基或芳磺酰基中的至少一种；

R₂ 为氢或氘，R₃ 为氢或氘；

X₁ 为氧或硫；

X₂ 为 NH、氧或硫。

2、根据权利要求 1 所述的氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物，其特征在于：所述氘代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物具体为：

(3Z,6Z)-3-苯基氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯基)氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-苯基氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-苯亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(2,3,4,5,6-五氘代苯)氘代亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(4-氟-2,3,5,6-四氘代苯基)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(4-氟-2,3,5,6-四氘代苯基)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(3-氟代苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(3-苯甲酰基苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

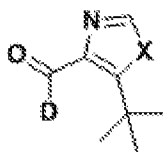
(3Z,6Z)-3-(3-(4-氟苯甲酰基)苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)氘代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮；

(3Z,6Z)-3-(3-(4-甲氧基苯甲酰基)苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;

(3Z,6Z)-3-(3-甲氧基苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;

或(3Z,6Z)-3-(3-三氟甲基苯)亚甲基-6-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮。

3、合成权利要求 1 所述肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的肟醛中间体, 其特征在于: 其具有通式 (II) 所示结构:



(II)

其中 X 为 NH、氧或硫。

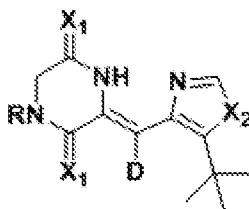
4、根据权利要求 3 所述的合成所述肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的肟醛中间体, 其特征在于: 所述肟醛中间体具体为:

5-叔丁基-1H-咪唑-4-肟代甲醛;

5-叔丁基-噁唑-4-肟代甲醛;

或 5-叔丁基-噻唑-4-肟代甲醛。

5、合成权利要求 1 所述肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的含肟杂环化合物中间体, 其特征在于: 其具有通式 (III) 所示结构:



(III)

X₁ 为氧或者硫, X₂ 为 NH、氧或者硫;

其中取代基 R 选自 C1-C24 烷基、C2-C24 烯基、C2-C24 炔基、芳基烷基、杂环芳基烷基、C1-C24 的酰基、磺酰基、芳酰基、环酰基、芳磺酰基中的其中至少一种。

6、根据权利要求 5 所述的合成所述肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的含肟杂环化合物中间体, 其特征在于: 所述含肟杂环化合物中间体具体为:

(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;

(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-噁唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;

(Z)-1-乙酰基-3-((5-叔丁基-噻唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;

(Z)-1-苯甲酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;

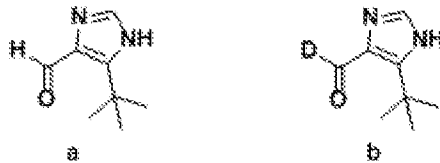
(Z)-1-烯丙基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;

(Z)-1-甲磺酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮;

或(Z)-1-对甲苯磺酰基-3-((5-叔丁基-1H-咪唑-4-基)肟代亚甲基)哌嗪-2,5-二酮。

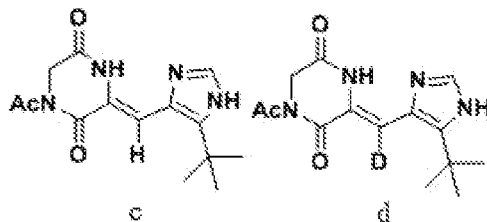
7、一种肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的制备方法，其特征在于它包括以下步骤：

(1) 将醛中间体 a 进行还原和氧化反应得到肟醛化合物 b，所述醛中间体 a 和肟醛化合物 b 结构式如下：



(2) 第一步缩合反应：将二乙酰基哌嗪二酮与所述醛中间体 a 或者肟醛化合物 b 发生缩合反应，形成杂环化合物 c 或者含肟杂环化合物 d；

所述杂环化合物 c 或者含肟杂环化合物 d 结构式如下：



(3) 第二步缩合反应：再将所述杂环化合物 c 或者含肟杂环化合物 d 与第二缩合反应醛发生缩合反应形成肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物；所述第二缩合反应醛为苯甲醛、肟代苯甲醛或苯环上带有取代基的苯甲醛衍生物、肟代苯甲醛衍生物。

8、根据权利要求 7 所述的肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的制备方法，其特征在于：所述醛中间体 a 为咪唑甲醛，所述肟醛化合物 b 为肟代咪唑甲醛。

9、根据权利要求 7 所述的肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的制备方法，其特征在于所述步骤 (1) 中肟醛化合物 b 的制备方法为：将 5-叔丁基-1H-咪唑-4-甲醛经由 NaBD_4 还原和二氧化锰氧化，得到 5-叔丁基-1H-咪唑-4-肟代甲醛为肟醛化合物 b。

10、根据权利要求 7 或 9 所述的肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物的制备方法，其特征在于所述步骤 (2) 中含肟杂环化合物 d 的制备方法为：将二乙酰基哌嗪二酮与所述肟醛化合物 b 在 DMF 作溶剂、碳酸铯作碱、N,N-二甲基甲酰胺作溶剂的条件下避光发生缩合反应，形成含肟杂环化合物 d。

11、药物组合物，含有权利要求 1 所述的化合物和药物可接受的载体。

12、权利要求 1 所述的肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物在制备抗肿瘤的药物中的应用。

13、根据权利要求 12 所述的肟代脱氢苯基阿夕斯丁类化合物在制备抗肿瘤的药物中的应用，其特征在于：所述肿瘤包括皮肤癌和白血病。

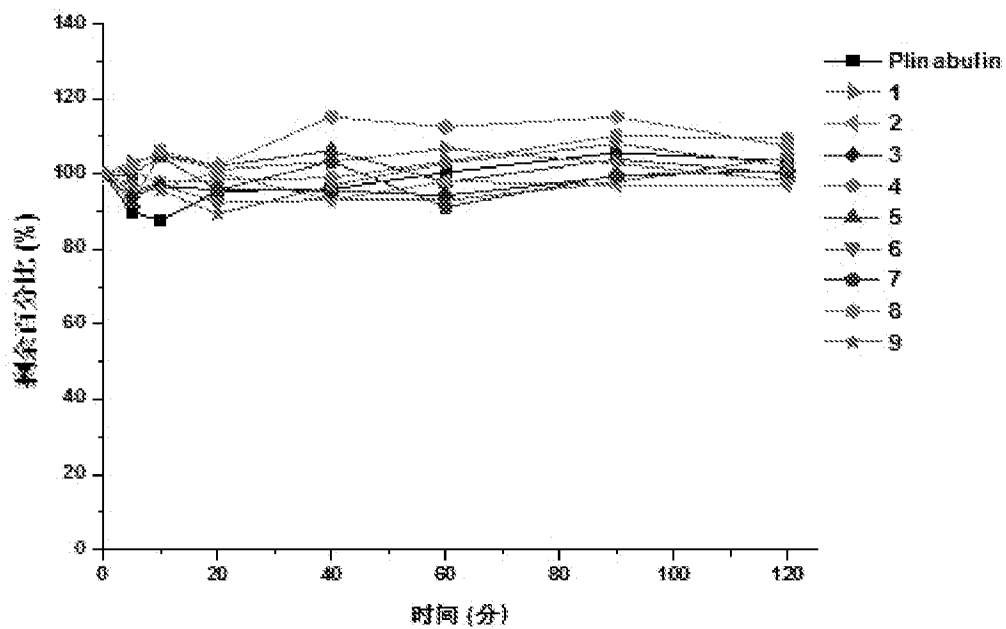


图 1

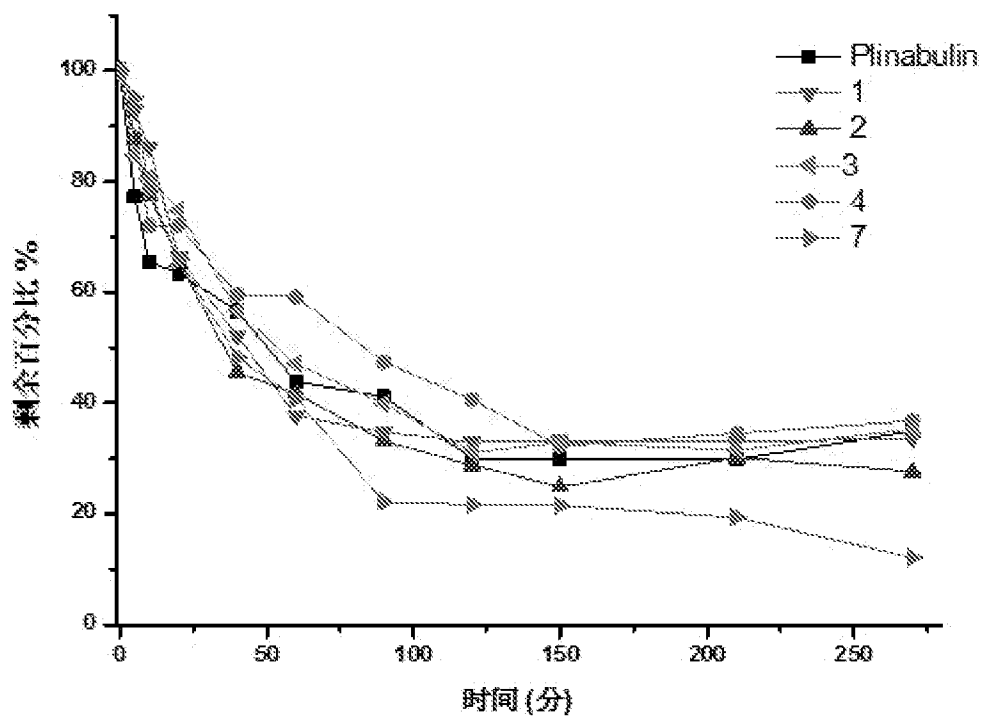


图 2

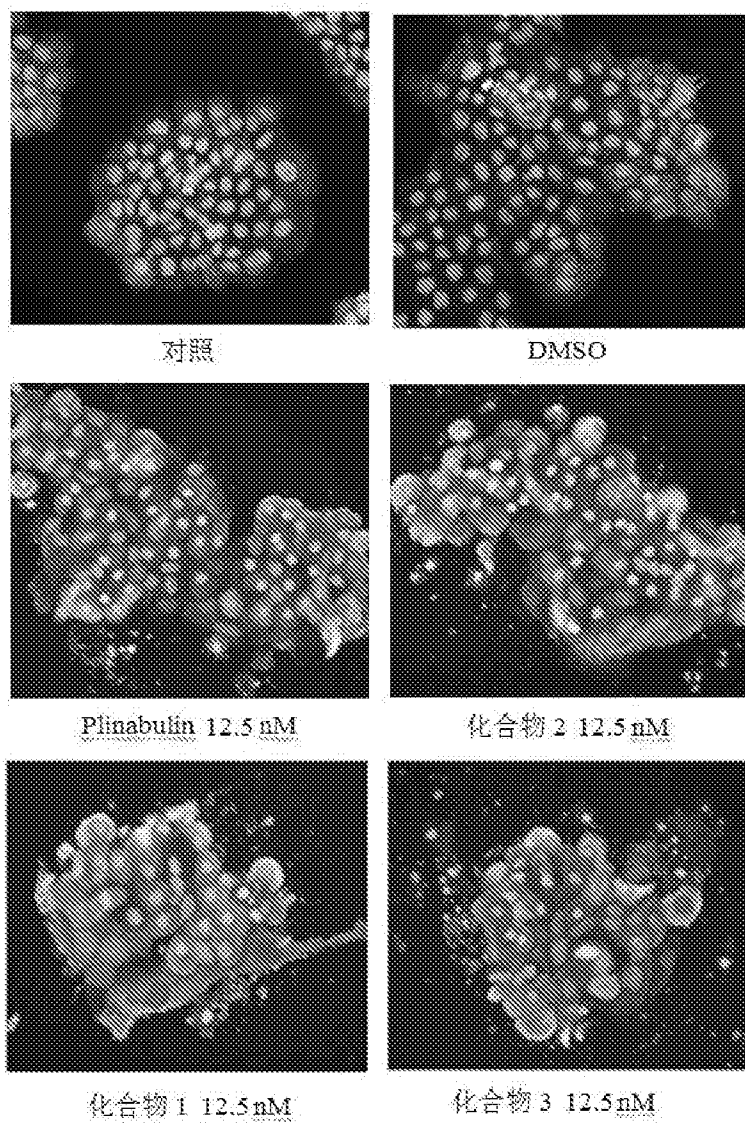


图 3

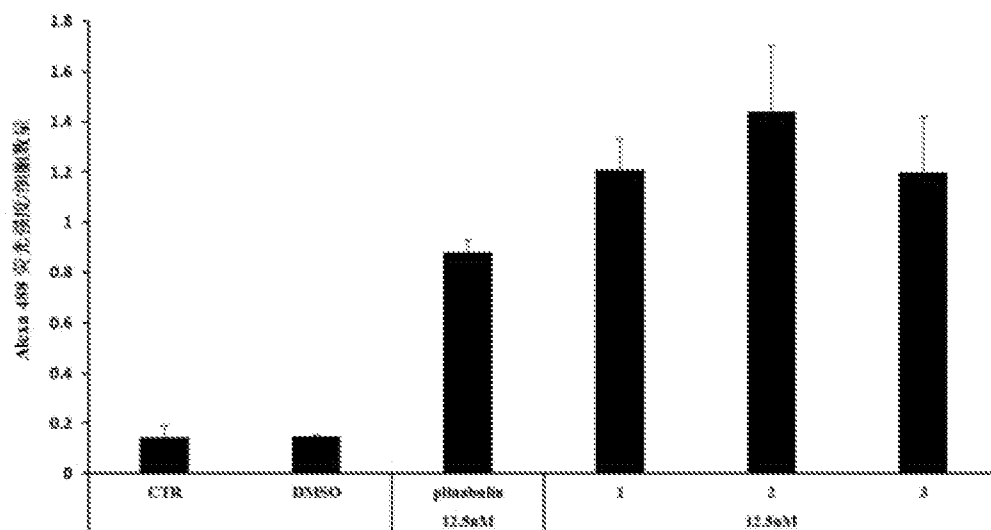


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/083610

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 233/64 (2006.01) i; C07D 403/06 (2006.01) i; C07B 59/00 (2006.01) i; A61K 31/496 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 35/02 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 233/-; C07D 403/-; C07B 59/-; A61K 31/-; A61P 35/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CAPLUS, REGISTRY, CNKI: phenylahistin, piperazine, diketone, dione, cancer, tumor, structure search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008221122 A1 (PALLADINO, M.A. et al.), 11 September 2008 (11.09.2008), see claims, description, and embodiment	1-13
X	WO 2012035436 A1 (TOKYO UNIVERSITY OF PHARMACY AND LIFE SCIENCES et al.), 22 March 2012 (22.03.2012), see claims, and description, embodiments	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 August 2016 (10.08.2016)

Date of mailing of the international search report
19 August 2016 (19.08.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer

FEI, Jia

Telephone No.: (86-10) **01062084374**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/083610

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2008221122 A1	11 September 2008	US 8129527 B2	06 March 2012
WO 2012035436 A1	22 March 2012	None	

A. 主题的分类		
C07D 233/64(2006.01)i; C07D 403/06(2006.01)i; C07B 59/00(2006.01)i; A61K 31/496(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07D 233/-; C07D 403/-; C07B 59/-; A61K 31/-; A61P 35/-		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CAPLUS, REGISTRY, CNKI:苯基阿克斯丁, phenylahistin, 哌嗪, piperazine, 二酮, dione, 癌症, cancer, 肿瘤, tumor, structure search		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US 2008221122 A1 (PALLADINO MICHAEL A等) 2008年 9月 11日 (2008 - 09 - 11) 参见权利要求, 说明书实施例	1-13
X	WO 2012035436 A1 (TOKYO UNIVERSITY OF PHARMACY AND LIFE SCIENCES等) 2012年 3月 22日 (2012 - 03 - 22) 参见权利要求, 说明书实施例	1-13
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2016年 8月 10日		2016年 8月 19日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		费嘉
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)01062084374

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/083610

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
US	2008221122	A1	2008年 9月 11日	US 8129527 B2	2012年 3月 6日
WO	2012035436	A1	2012年 3月 22日	无	