



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103214489 B

(45)授权公告日 2016.10.26

(21)申请号 201310060319.9

(22)申请日 2013.02.25

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103214489 A

(43)申请公布日 2013.07.24

(73)专利权人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72)发明人 周有骏 周峰 李唯 刘嘉

陈莎娜

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

A61K 31/519(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 101631464 A,2010.01.20,

CN 102906094 A,2013.01.30,

US 2011083984 A1,2011.04.14,

CN 1198743 A,1998.11.11,

WO 03050090 A1,2003.06.19,

Mizuhara, Tsukasa 等.Concise synthesis and anti-HIV activity of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles.《Organic & Biomolecular Chemistry》.2012,第10卷(第33期),

Ping Yin 等.Synthesis of 2,4-Diaminoquinazolines and Tricyclic Quinazolines by Cascade Reductive Cyclization of Methyl N-Cyano-2-nitrobenzimidates.《The Journal of Organic Chemistry》.2012,第77卷(第6期),

Renzhong Fu 等.Rapid Access to Pyrimido[5,4-c]isoquinolines via a Sulfur Monoxide Extrusion Reaction.《ORGANIC LETTERS》.2007,第9卷(第4期),

周峰 等.具新生血管抑制及血管阻断双重作用的肿瘤血管靶向药物研究进展.《药学进展》.2013,第37卷(第1期),

审查员 董智云

权利要求书2页 说明书23页

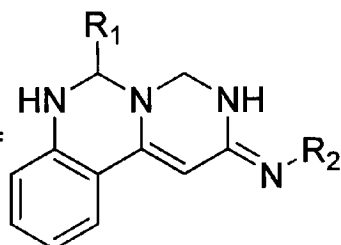
(54)发明名称

一类具有抗肿瘤活性的多靶点激酶抑制剂及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及医药技术领域,是一类具有抗肿瘤活性的化合物及其制备方法和用途。该类化

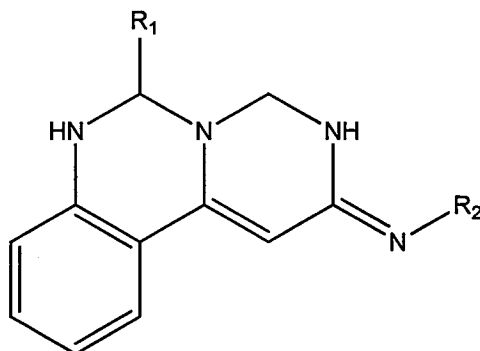
合物的结构通式为:



其中,R₁为烷基、杂环基、取代苯基、取代脂肪环基或脂杂环基,其中的取代基为2,3-亚乙基二氧基,3,4-亚乙基二氧基,2,3-亚甲基二氧基,3,4-亚甲基二氧基,或是各位取代的氢、烷基、烷氧

基、卤素、胺基、羟基、三氟烷基、甲酸酯等;R₂为杂环基、取代苯基,其中苯基的取代为2,3-亚乙基二氧基,3,4-亚乙基二氧基,2,3-亚甲基二氧基,3,4-亚甲基二氧基,或是各位取代的氢、烷基、烷氧基、卤素、胺基、羟基、三氟烷基、甲酸酯等。本发明化合物具有明显的肿瘤细胞毒作用以及广谱的激酶抑制活性,可以用来制备抗肿瘤药物。

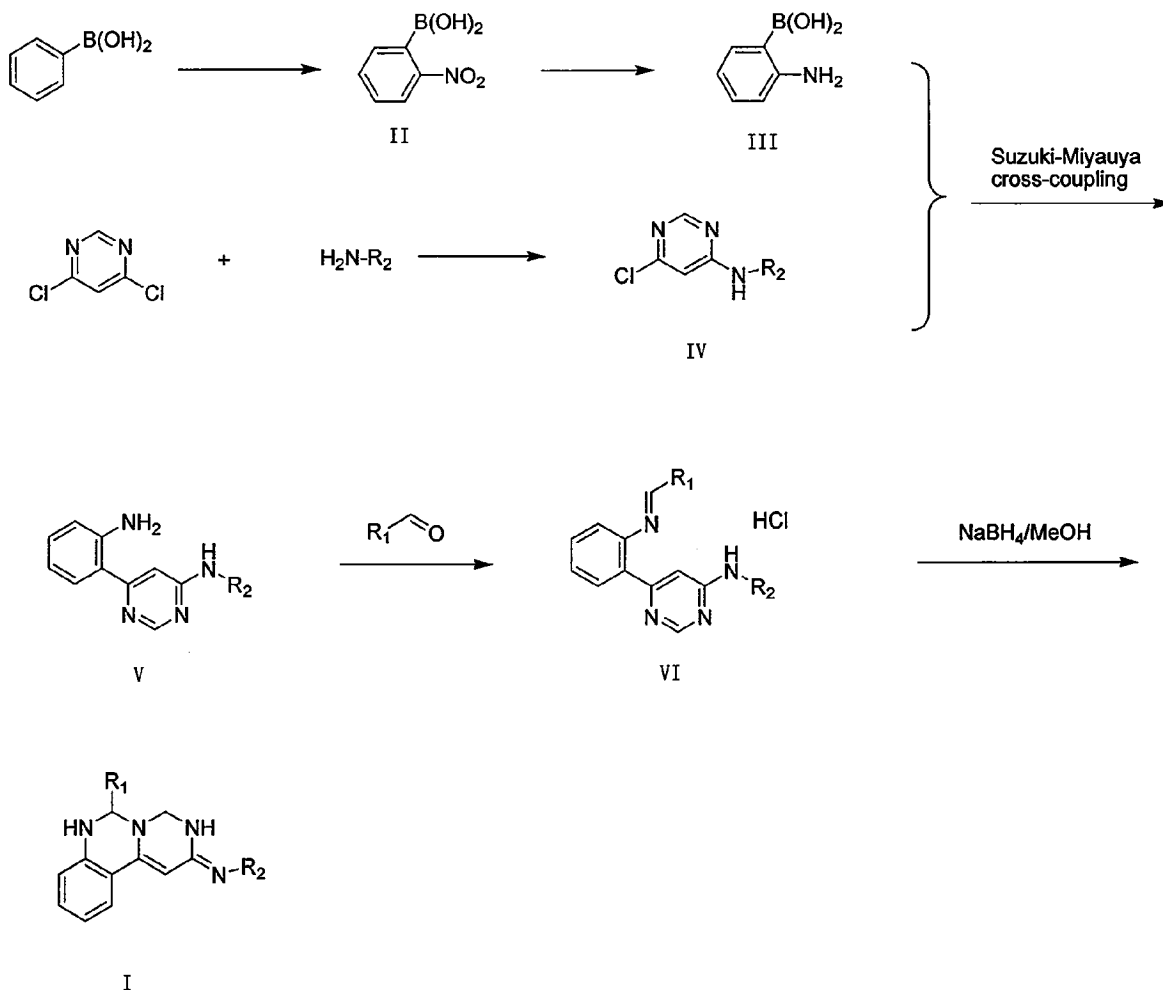
1. N-(6-取代-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)取代苯胺类抗肿瘤化合物或其药学上可接受的加成盐,结构通式如下:



通式中的R₁和R₂基团作如下搭配:

编号	R ₁	R ₂
1	吡啶-4-基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
2	4-(三氟甲基)苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
3	2,6-二氯苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
4	4-(叔丁基)苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
5	吡啶-2-基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
6	4-甲基苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
7	苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
8	3,5-二甲氧基苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
9	2-氟苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
10	4-氟苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
11	2,4-二氯苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
12	2-氯苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
13	苯甲酸酯-4-基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
14	4-氯苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
15	4-溴苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
16	苯并[d][1,3]二氧五环-5-基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
17	噻吩-2-基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
18	4-羟基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
19	3,4-二甲氧基苯基	2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基
20	4-(叔丁基)苯基	苯基
21	4-(叔丁基)苯基	4-甲氧基苯基
22	4-(叔丁基)苯基	4-氯苯基
23	4-(叔丁基)苯基	2,4-二甲基苯基
24	4-(叔丁基)苯基	2,5-二甲氧基苯基
25	4-(叔丁基)苯基	4-(三氟甲基)苯基

2. 权利要求1所述的化合物或其加成盐的制备方法,包括如下步骤:



其中 R_1 和 R_2 基团如权利要求1的定义所述，

(1) 硝基苯硼酸经硝化和还原生成邻胺基苯硼酸(III)；

(2) 2,4-二氯嘧啶与 H_2N-R_2 经取代反应生成6-氯-N-取代苯嘧啶-4-胺(IV)；

(3) 邻胺基苯硼酸(III)与6-氯-N-取代苯嘧啶-4-胺(IV)经Suzuki-Miyauya偶联反应生成6-邻胺基苯基-N-取代苯嘧啶-4-胺(V)；

(4) 6-邻胺基苯基-N-取代苯嘧啶-4-胺(V)与 R_1CHO 经缩合反应生成6-(2-取代甲烯胺基苯基)-N-取代苯嘧啶-4-胺的盐酸盐(VI)；

(5) 各种取代的6-(2-取代甲烯胺基苯基)-N-取代苯嘧啶-4-胺的盐酸盐(VI)经硼氢化钠/甲醇还原环合得到N-(6-取代-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)取代苯胺类化合物(I)；

(6) 按照常规方法制备为药学上可接受的盐的形式,包括其无机盐和有机盐,用于加成的无机酸为盐酸、硫酸、磷酸、二磷酸、氢溴酸、硝酸;有机酸为乙酸、马来酸、富马酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、对甲苯磺酸、水杨酸、草酸。

3. 权利要求1所述的化合物或其加成盐在制备抗肿瘤药物中的应用。

一类具有抗肿瘤活性的多靶点激酶抑制剂及其制备方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及医药技术领域，是关于一类具有抗肿瘤活性的N-(6-取代-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)取代苯胺类化合物的特定化学结构及其制备方法。

背景技术：

[0002] 恶性肿瘤是严重危害人类健康，威胁人类生命的疾病。对恶性肿瘤的防治一直受到各国医学界的高度重视。研究开发新型的抗肿瘤药物始终是各国研究机构的重大研究课题。目前临床应用的抗肿瘤药物种类很多。但大多传统的药物属于细胞毒类药物。这类药物由于选择性较差，毒性大，易产生耐药性等问题，使其临床应用受到限制。因此，研究肿瘤治疗新策略，开发靶向抗肿瘤药物成为各国研究人员重点研究课题。

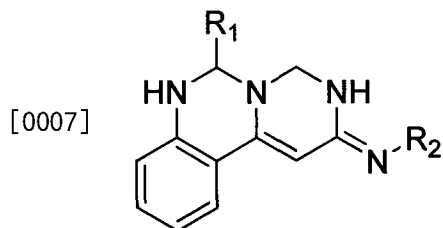
[0003] 研究发现，细胞癌变的本质是细胞信号转导通路的失调导致的细胞无限增生，从而导致了肿瘤的发生。在各种因素参与的信号转导过程中，各种蛋白激酶介导的信号转导异常与肿瘤的发生和发展直接相关。蛋白激酶由于突变或重排，可引起信号转导过程障碍或出现异常，导致细胞生长、分化、代谢和生物学行为异常，引发肿瘤。抑制过度表达的激酶，能够抑制肿瘤生长，发挥抗肿瘤作用。因此，蛋白激酶成为抗肿瘤药物设计、开发的重要药靶。蛋白激酶抑制剂研究成为目前抗肿瘤药物的研究热点。目前已有十多个激酶抑制剂开发上市，如酪氨酸激酶(TK)抑制剂，丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)抑制剂，吉非替尼(易瑞沙)，厄洛替尼(特罗凯)，索拉非尼(多吉美)等，显示出良好的前景。但目前临床应用的激酶抑制剂也存在毒性和耐药性等问题。因此，进一步研究开发新型的，高活性，低毒的抗肿瘤激酶抑制剂用于临床治疗，具有很好的开发前景和社会意义。

发明内容：

[0004] 发明人在抗肿瘤活性药物研究的过程中，发现了一类具有抗肿瘤活性的全新结构类型的N-(6-取代-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)取代苯胺类蛋白激酶抑制剂或药学上可接受的盐类。本发明同时公开了该类化合物的制备方法、医疗用途及其组合物。

[0005] 对该类化合物进行肿瘤相关生物学试验表明，该类化合物具有明显的抗肿瘤活性，特别是对与肿瘤相关的多种激酶具有广谱的抑制活性。

[0006] 本发明的多靶点激酶抑制剂的结构通式为：



[0008] 其中：R₁基团代表

[0009] (1)取代苯基；

[0010] 取代苯基上的取代基可以是位于苯基的2位,3位,4位,5位,6位,取代基可以是单取代,或者是多取代,取代基是指:

[0011] a.H或者是卤素;

[0012] b.1~6个碳原子的直链或者支链烷烃;

[0013] 1~6个碳原子的直链或者支链烷烃是指:甲基、三氟烷基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、叔戊基、正己基;

[0014] c.亲水性取代基:羟基;

[0015] d.吸电子取代基或推电子取代基:氰基、甲酸酯、烷氧基、氨基;

[0016] e.2,3-亚乙基二氧基、3,4-亚乙基二氧基、2,3-亚甲基二氧基、3,4-亚甲基二氧基;

[0017] (2)杂环基,如:呋喃-2-基、呋喃-3-基、噻吩-2-基、噻吩-3-基、吡啶-2-基、吡啶-4-基等;

[0018] (3)1~6个碳原子的直链烷烃或者末端取代的直链烷烃、1~6个碳原子的支链烷烃;

[0019] 1~6个碳原子的直链或者支链烷烃是指:甲基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、叔戊基、正己基;1~6个碳原子的直链烷烃末端取代基可以是多元脂肪环:环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基;

[0020] (4)取代的脂肪环基或脂杂环基;

[0021] 脂肪环基是指:环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基;脂杂环基是指:含一个杂原子的脂肪环基,杂原子可以指:氮原子、氧原子、硫原子,脂肪环基或脂杂环基的取代基位于脂肪环基或脂杂环基上,取代基可以是单取代,或者是多取代,取代基是指:

[0022] a.H或者是卤素;

[0023] b.1~6个碳原子的直链或者支链烷烃;

[0024] 1~6个碳原子的直链或者支链烷烃是指:甲基、三氟烷基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、叔戊基、正己基;

[0025] c.亲水性取代基:羟基;

[0026] d.吸电子取代基或推电子取代基:氰基、甲酸酯、烷氧基、氨基;

[0027] e.2,3-亚乙基二氧基、3,4-亚乙基二氧基、2,3-亚甲基二氧基、3,4-亚甲基二氧基;

[0028] 其中: R_2 基团代表

[0029] (1)取代苯基;

[0030] 取代苯基上的取代基可以是位于苯基的2位,3位,4位,5位,6位。取代基可以是单取代,或者是多取代,取代基是指:

[0031] a.H或者是卤素;

[0032] b.1~6个碳原子的直链或者支链烷烃;

[0033] 1~6个碳原子的直链或者支链烷烃是指:甲基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、叔戊基、正己基;

[0034] c.亲水性取代基:羟基;

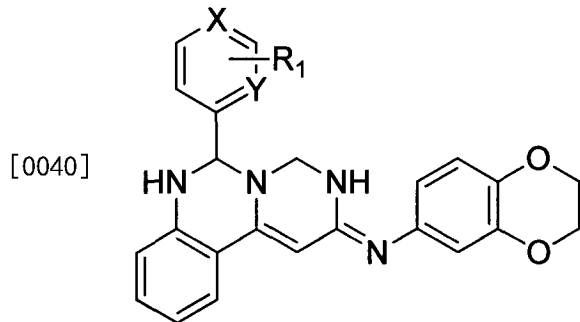
[0035] d.吸电子取代基或推电子取代基:氰基、甲酸酯、烷氧基、氨基;

[0036] e. 2,3-亚乙基二氧基、3,4-亚乙基二氧基、2,3-亚甲基二氧基、3,4-亚甲基二氧基；

[0037] (2) 杂环, 如: 呋喃-2-基、呋喃-3-基、噻吩-2-基、噻吩-3-基、吡啶-2-基、吡啶-4-基等；

[0038] 本发明已合成并被证实具有抗肿瘤活性的部分N-(6-取代-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)取代苯胺类化合物的化学结构见表1。

[0039] 表1部分化合物的结构表征及氢谱、质谱、部分碳谱数据

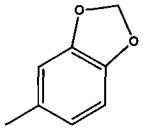


编号	X	Y	R ₁	MS/+ESI	核磁数据 (¹ H NMR/300MHz,DMSO)
1	N	C	H	412.23	¹ H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.51 (d, <i>J</i> = 6.1 Hz, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.43 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz, 2H), 7.37 (dd, <i>J</i> = 11.3, 4.2 Hz, 1H), 6.94 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.89 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 6.87 – 6.82 (m, 2H), 6.80 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 6.08 (s, 1H), 5.80 (s, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.79 (d, <i>J</i> = 10.7 Hz, 1H), 4.28 (s, 4H), 3.35 (s, 1H)
2	C	C	4-CF ₃	479.27	δ 7.73 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H), 7.63 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.44 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.19 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 6.86 (dd, <i>J</i> = 9.6, 7.6 Hz, 1H), 6.76 (ddd, <i>J</i> = 12.6, 9.2, 3.4 Hz, 4H), 5.75 (s, 1H), 5.67 (s, 1H), 4.61 – 4.50 (m, 2H), 4.17 (s, 4H)
3	C	C	2,6-Cl	479.26	δ 7.62 (s, 1H), 7.60 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 7.50 (dd, <i>J</i> = 8.6, 7.5 Hz, 1H), 7.47 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.27 (dd, <i>J</i> = 11.2, 4.2 Hz, 1H), 6.88 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.79 (s, 2H), 6.72 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 6.69 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 6.66 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 4.46 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H), 4.22 (s, 4H), 4.10 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H)
4	C	C	4-CMe ₃	467.33	δ 7.43 (d, <i>J</i> = 3.7 Hz, 5H), 7.28 (s, 1H), 7.13 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.87 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.76 – 6.63 (m, 3H), 5.58 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.35 (d, <i>J</i> = 9.7

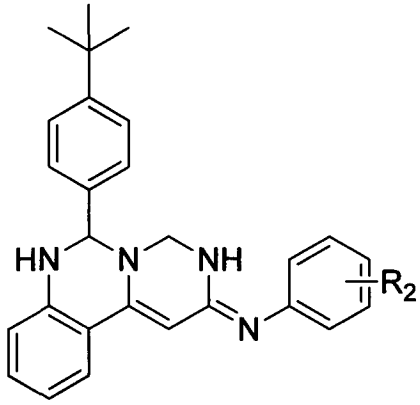
[0041]

					Hz, 1H), 4.26 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 4.14 (d, $J = 1.8$ Hz, 4H), 1.26 (s, 9H)
	5	C N	H	412.24	δ 8.48 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.73 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 7.8, 4.3$ Hz, 2H), 7.26 (t, $J = 6.1$ Hz, 3H), 7.07 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.64 (dd, $J = 16.4, 8.4$ Hz, 3H), 5.48 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.51 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 4.10 (d, $J = 3.1$ Hz, 4H)
	6	C C	4-CH ₃	425.31	δ 7.89 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.36 – 7.22 (m, 3H), 7.16 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.97 (s, 1H), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H), 6.72 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 4.61 (dd, $J = 41.2, 10.5$ Hz, 2H), 4.22 (s, 4H), 2.25 (s, 3H) ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.58, 151.69, 144.44, 143.47, 140.72, 138.10, 136.78, 133.33, 131.42, 129.16, 126.61, 125.04, 118.04, 117.41, 115.79, 115.69, 112.34, 111.46, 80.41, 67.95, 64.18, 64.02, 58.12, 20.66
	7	C C	H	411.22	¹ H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7.97 (s, 1H), 7.45 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.35 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 7.28 – 7.24 (m, 1H), 6.96 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.90 – 6.80 (m, 3H), 6.72 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.94 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 4.65 (dd, $J = 90.2, 10.6$ Hz, 2H), 4.21 (q, $J = 4.9$ Hz, 4H). ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 154.60, 150.56, 147.35, 145.66, 143.72, 141.62, 133.47, 131.73, 128.35, 126.93, 125.70, 124.72, 117.68, 117.59, 116.00, 114.63, 113.35, 110.85, 91.83, 64.16, 64.06, 51.45, 48.79
[0042]	8	C C	3,5-2OCH ₃	471.52	δ 7.88 (s, 1H), 7.43 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.94 – 6.78 (m, 3H), 6.71 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.58 (s, 2H), 6.43 (s, 1H), 5.81 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.72 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 4.21 (s, 4H), 3.80 (s, 3H), 3.64 (s, 3H) ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.46, 154.89, 151.87, 147.75, 143.78, 142.32, 133.98, 129.32, 125.09, 118.10, 117.84, 116.11, 114.80, 114.02, 110.19, 104.14, 98.11, 89.95, 64.17, 55.80, 55.08, 51.08, 48.58
	9	C C	2-F	429.32	δ 9.50 (br s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 1H), 7.34 – 7.22 (m, 3H), 7.21 – 7.12 (m, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.92 – 6.71 (m, 4H), 6.21 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 4.64 (dd, $J = 28.4, 10.4$ Hz, 2H), 4.23 (s, 4H) ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.85 (d, ¹ $J_{CF} = 246.9$ Hz), 156.51, 151.39, 143.85, 143.45, 140.76, 133.41, 131.26, 130.91, 130.85, 126.88, 124.93, 124.57, 118.21, 117.38, 116.12, 115.84, 115.74, 112.04, 111.50, 80.69, 64.18, 64.02, 62.82, 58.18
	10	C C	4-F	429.35	δ 9.73 (br s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.53 – 7.40

					(m, 3H), 7.32 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.21 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.00 – 6.87 (m, 3H), 6.85 – 6.70 (m, 2H), 6.10 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 4.73 (dd, $J = 64.4, 10.7$ Hz, 2H), 4.25 (s, 4H) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.17 (d, $^1J_{\text{CF}} = 245.0$ Hz), 156.63, 152.34, 144.34, 143.66, 141.63, 135.99, 134.01, 129.86, 128.71, 128.60, 125.34, 118.26, 117.66, 116.58, 115.94, 115.66, 115.37, 112.38, 111.84, 79.52, 66.98, 64.19, 64.06, 57.01.
	11	C C	2,4-2Cl	479.37	δ 9.08 (br s, 1H), 7.70 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.56 – 7.32 (m, 4H), 7.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.91 – 6.68 (m, 4H), 5.99 (s, 1H), 5.77 (s, 1H), 4.46 (dd, $J = 18.7, 10.1$ Hz, 2H), 4.19 (s, 4H) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.62, 150.34, 143.57, 139.75, 136.43, 134.56, 133.95, 133.65, 132.88, 129.97, 129.74, 128.28, 124.80, 118.85, 117.39, 116.27, 114.55, 113.27, 110.34, 83.59, 65.66, 64.59, 64.36, 60.33
	12	C C	2-Cl	445.36	δ 9.46 (br s, 1H), 7.69 – 7.49 (m, 3H), 7.47 – 7.33 (m, 3H), 7.27 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.91 – 6.74 (m, 4H), 6.16 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.22 (s, 4H) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.41, 151.61, 143.65, 143.42, 140.61, 136.39, 133.26, 132.15, 131.49, 130.67, 130.06, 128.18, 127.72, 124.85, 118.39, 117.35, 115.93, 115.54, 112.17, 111.33, 81.20, 65.62, 64.17, 64.01, 58.15
[0043]	13	C C	4-COOMe	469.33	δ 8.11 (s, 1H), 7.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.93 – 6.83 (m, 3H), 6.75 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.85 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 4.23 (s, 4H), 3.85 (s, 3H) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.79, 156.62, 151.28, 145.38, 143.95, 143.50, 140.94, 133.58, 131.02, 129.75, 129.48, 126.87, 125.11, 118.29, 117.46, 115.90, 112.27, 111.69, 80.66, 67.20, 64.18, 64.02, 58.27, 52.20
	14	C C	4-Cl	445.36	δ 9.51 (br s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.57 – 7.35 (m, 5H), 7.29 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.92 – 6.78 (m, 3H), 6.74 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 4.71 (dd, $J = 62.2, 10.8$ Hz, 2H), 4.23 (s, 4H) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.58, 151.56, 144.10, 143.54, 141.09, 139.04, 133.68, 133.23, 130.74, 128.64, 128.39, 125.14, 118.26, 117.51, 116.00, 115.90, 112.14, 111.80, 80.34, 66.96, 64.18, 64.03, 57.86
	15	C C	4-Br	489.46	δ 9.48 (br s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.41 – 7.22 (m, 3H), 6.97 (s, 1H), 6.93 – 6.80 (m, 3H), 6.75 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 4.70 (dd, $J = 57.9, 10.5$ Hz, 2H), 4.24 (s, 4H)

					¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.55, 151.46, 144.03, 143.50, 141.01, 139.45, 133.63, 131.54, 130.83, 128.69, 125.09, 121.82, 118.26, 117.48, 115.88, 112.15, 111.73, 80.40, 67.03, 64.16, 64.01, 57.94
16	C	C		455.29	δ 9.44 (br s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.47 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.31 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.05 – 6.65 (m, 8H), 6.00 (s, 2H), 5.89 (s, 1H), 5.79 (s, 1H), 4.63 (dd, <i>J</i> = 45.0, 10.7 Hz, 2H), 4.24 (s, 4H)
					¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.54, 152.12, 147.63, 144.45, 143.58, 141.21, 133.71, 133.40, 130.56, 125.17, 120.33, 118.21, 117.57, 116.13, 115.81, 112.03, 111.93, 108.10, 106.77, 101.33, 79.92, 67.74, 64.18, 64.04, 57.44.
17	C	C	噻吩-2-基	417.39	δ 9.43 (br s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.50 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.43 (dd, <i>J</i> = 5.0, 1.2 Hz, 1H), 7.32 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.11 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.02 – 6.93 (m, 2H), 6.93 – 6.75 (m, 4H), 6.24 (s, 1H), 5.82 (s, 1H), 4.68 (dd, <i>J</i> = 35.6, 10.5 Hz, 2H), 4.24 (s, 4H)
					¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.44, 151.12, 143.72, 143.63, 143.51, 140.99, 133.51, 130.92, 126.66, 126.60, 126.48, 125.01, 118.58, 117.49, 116.21, 115.94, 112.34, 111.74, 80.89, 64.40, 64.18, 64.02, 57.84.
[0044]					
18	C	C	4-OH	427.32	¹ H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.78 (br s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.48 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.27 (m, 1H), 7.23 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 6.92 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.85 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H), 6.84 – 6.73 (m, 4H), 5.88 (s, 2H), 4.57 (dd, <i>J</i> = 56.8, 10.6 Hz, 2H), 4.20 (s, 4H)
					¹³ C NMR (150 MHz, DMSO) δ 160.06, 158.43, 155.22, 146.87, 145.58, 143.80, 135.94, 131.17, 130.80, 129.99, 127.30, 119.99, 119.62, 118.83, 117.70, 117.31, 114.63, 113.51, 80.82, 69.89, 66.04, 65.94, 57.96.
19	C	C	3,4-2OCH ₃	471.34	δ 9.43 (br s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.48 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.30 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.00 – 6.71 (m, 7H), 5.85 (s, 1H), 5.77 (d, <i>J</i> = 4.2 Hz, 1H), 4.59 (dd, <i>J</i> = 37.9, 10.8 Hz, 2H), 4.24 (s, 4H), 3.72(s, 3H) , 3.70(s, 3H)
					¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.54, 152.28, 149.16, 148.83, 144.69, 143.55, 141.10, 133.53, 131.46, 130.77, 125.08, 119.10, 118.17, 117.55, 116.05, 115.83, 112.18, 111.86, 111.57, 110.35, 80.17, 68.16, 64.17, 64.02, 57.52, 55.57, 55.48

[0045]



[0046]

编号	R ₂	MS/+ESI	核磁数据
20	H	409.23	¹ H NMR (300MHz, DMSO) δ 8.16 (s, 1H), 7.60 – 7.22 (m, 11H), 6.89 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.77 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.77 (dd, <i>J</i> = 63.6, 10.8 Hz, 2H), 1.42 – 1.12 (m, 9H) ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.75, 153.56, 151.76, 145.12, 137.14, 136.98, 134.77, 130.14, 126.67, 126.33, 125.99, 123.39, 118.61, 116.38, 112.05, 79.50, 67.86, 57.14, 34.80, 31.47
21	4-OMe	439.28	¹ H NMR (300MHz, DMSO) δ 9.57 (br s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.47 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.40 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H), 7.37 – 7.24 (m, 5H), 7.01 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 6.86 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.76 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.68 (dd, <i>J</i> = 46.3, 10.6 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 1.23 (s, 9H) ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO) δ 157.47, 156.78, 152.72, 151.32, 144.60, 136.53, 134.02, 129.12, 126.29, 125.52, 125.38, 125.26, 118.14, 115.86, 114.82, 111.73, 67.58, 56.81, 55.40, 34.33, 31.00
22	4-Cl	443.29	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.60 (s, 1H), 7.48 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 3H), 7.42 – 7.32 (m, 6H), 7.24 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 6.79 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 6.73 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.71 (s, 1H), 4.55 (dd, <i>J</i> = 29.3, 10.4 Hz, 2H), 1.24 (s, 9H) ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO) δ 156.86, 151.71, 151.26, 144.75, 139.81, 137.48, 133.18, 129.27, 127.07, 125.89, 125.17, 122.78, 118.49, 116.14, 113.30, 82.63, 68.76, 60.31, 34.80, 31.51
23	2,4-2CH ₃	437.39	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.09 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.38 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 7.35 – 7.26 (m, 3H), 7.18 – 7.06 (m, 3H), 6.86 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.72 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 6.00 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 2H), 4.72 (s, 1H), 4.58 (d, <i>J</i> = 10.5 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.22 (s, 9H) ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.98, 153.39, 151.76, 145.02, 137.57, 137.06, 134.54, 132.21, 128.14, 126.95, 126.68, 125.93, 118.53, 116.37, 112.06, 79.17, 78.77, 68.11, 57.04, 34.79, 31.48, 21.06, 17.97
24	2,5-2OCH ₃	469.40	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.08 (s, 1H), 7.49 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.41 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.37 – 7.30 (m, 3H), 7.11 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 6.97 – 6.90 (m, 2H), 6.87 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 6.78 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 6.05 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H), 5.88 (s, 1H), 4.78 (d, <i>J</i> = 10.7 Hz, 1H), 4.60 (d, <i>J</i> = 10.7 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 1.24 (s, 9H) ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.50, 153.69, 153.39, 151.86, 147.84, 145.08, 137.02, 134.64, 126.74, 125.99, 125.07, 118.65, 116.37, 114.04, 113.52, 112.66, 112.03, 79.39, 68.08, 57.04, 56.58, 56.07, 34.81, 31.47
25	4-CF ₃	477.54	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.01 (s, 1H), δ 8.84 (s, 1H), 8.15 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 7.80 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 7.57 (d, <i>J</i>

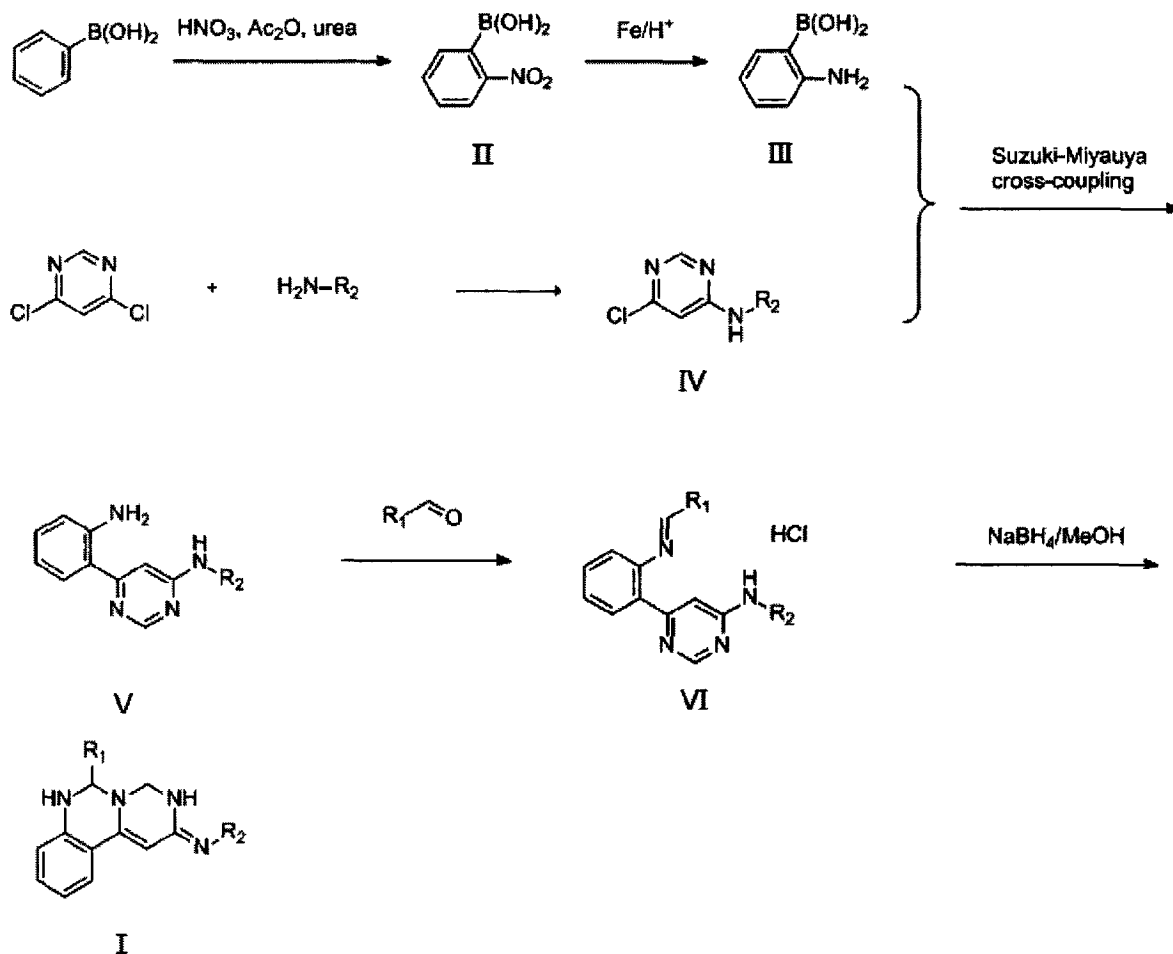
[0047]

= 8.3 Hz, 3H), 7.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.38 – 7.35 (m, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.79 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.16 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.98 (s, 1H), 4.96 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 1.23 (s, 9H)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 156.45, 154.34, 151.90, 145.19, 141.43, 136.79, 135.26, 127.32, 126.60, 126.46, 126.04, 122.95, 118.75, 116.40, 111.87, 79.87, 67.87, 57.08, 34.81, 31.46

[0048] 本发明包括该类化合物的制备方法如下：

[0049] 1、合成路线

[0050]



[0051] 2、具体操作过程为：

[0052] (1) 硝基苯硼酸经硝化和还原生成邻胺基苯硼酸(III)；

[0053] (2) 2,4-二氯嘧啶与取代苯胺经取代反应生成6-氯-N-取代苯嘧啶-4-胺(IV)；

[0054] (3) 邻胺基苯硼酸(III)与6-氯-N-取代苯嘧啶-4-胺(IV)经偶联反应生成6-邻胺基苯基-N-取代苯嘧啶-4-胺(V)；

[0055] (4) 6-邻胺基苯基-N-取代苯嘧啶-4-胺(V)与各种取代甲醛经缩合反应生成6-(2-取代甲烯胺基苯基)-N-取代苯嘧啶-4-胺(VI)的盐酸盐；

[0056] (5) 各种取代的甲烯胺基化合物(VI)经硼氢化钠还原环合得到N-(6-取代-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)取代苯胺类化合物(I)

[0057] (6) 按照常规方法制备为药学上可接受的盐的形式。包括其无机盐和有机盐：无机盐包括(但不限于)盐酸、硫酸、磷酸、二磷酸、氢溴酸、硝酸等；有机酸包括(但不限于)乙酸、马来酸、富马酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、对甲苯磺酸、水杨酸、草酸等。

具体实施方式：

[0058] 下面实施例为本发明的具体描述，但实施例不应看作是对本发明范围的限制。

[0059] 一. 化合物的合成

[0060] 实施例1:中间体6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺的制备

[0061] 1. 邻硝基苯硼酸(II)

[0062] 反应瓶中加入苯硼酸(164mmol)和醋酐(1800ml),于冰盐浴下冷却至-15℃,慢慢滴加含少量尿素的发烟硝酸(31.5g),控制内温低于-10℃,约30min加完。滴完后于-5~0℃下搅拌1.5hr,然后再在5~10℃下搅拌1hr,反应液呈棕色清液。于冰水冷却下,向反应液中慢慢加入碎冰(400g),然后搅拌1hr。减压浓缩反应液,至剩约100ml残液时,加入水(200ml),继续减压浓缩。至剩约80ml残液后,用乙酸乙酯(150ml×3)提取,合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤后浓缩,得褐色油状物。将油状物用甲苯(100ml)回流打浆1hr,冷却至室温后搅拌2hr,过滤,得浅棕色固体。将固体用环己烷/乙酸乙酯(1:1)重结晶,过滤后干燥,得淡黄色化合物(11.5g),收率42%,Mp:138-140℃(分解)。

[0063] 2. 邻胺基苯硼酸(III)

[0064] 反应瓶中加入化合物II(8g,47.9mmol)、乙醇(40ml)和水(60ml),于50℃油浴下保温。氮气保护下,加入铁粉(16g)和浓盐酸(0.5ml),保温反应3hr。反应结束后,向反应液中加入乙醇(80ml),趁热用硅藻土过滤,得浅褐色清液。减压浓缩后为褐色固体,用50%乙醇重结晶,过滤后干燥,得浅灰色化合物(5.5g),收率83%。

[0065] 3. 6-氯-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺

[0066] 反应瓶中加入2,4-二氯嘧啶(14.9g,100mmol)、6-氨基-1,4-苯并二氧杂环(19.6g,130mmol)和异丙醇(150ml),加热回流0.5hr。冷却至室温后,加入浓盐酸(15ml),于室温下搅拌2hr,过滤,用少量异丙醇洗涤,抽干,滤饼于50℃下鼓风干燥得淡紫色固体(17g),收率56.7%。

[0067] 4. 6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺

[0068] 反应瓶中加入化合物III(1.9g,14mmol)、化合物IV(3.0g,10mmol)、固体碳酸钠(5.3g,50mmol)、DME(120ml)、乙醇(16ml)和水(24ml),在氮气保护下,加入三苯基膦氯化钯(0.35g,0.5mmol)。于90℃油浴中保温搅拌1hr,冷却至室温后,分液,水相用DME(100ml×2)提取,合并有机相,无水硫酸钠干燥。有机相减压浓缩后得褐色粘稠物,用二氯甲烷(10ml)重结晶,滤饼干燥后得灰白色固体(2.9g),

[0069] 实施例2:目标化合物N-(6-(吡啶-4-基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物1)

[0070] 反应瓶中加入6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol),4-吡啶甲醛(1.2mmol)和无水乙醇(6ml),搅拌15min。滴加浓盐酸(0.2ml),然后于室温下搅拌2hr,过滤固体,少量乙醇洗涤,抽干,滤饼于50℃下鼓风干燥,得黄色固体6-(2-(吡啶-4-基甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率91%。

[0071] 反应瓶中加入6-(2-(吡啶-4-基甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.7mmol)和无水乙醇(6ml),搅拌15min。然后分三批加入硼氢化钠(1mmol),室温下搅拌1hr,TLC检测无反应物后,将反应液用稀盐酸淬灭,减压浓缩至干。所得固体用凝胶柱层析,甲醇洗脱,馏分浓缩后得黄色固体N-(6-(吡啶-4-基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(1),收率

94%。

[0072] 实施例3:目标化合物N-(6-(4-(三氟甲基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物2)

[0073] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺与4-三氟甲基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-((4-三氟甲基)苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0074] 按实施例2的方法,6-(2-((4-三氟甲基)苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-(三氟甲基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(2),收率43%。

[0075] 实施例4:目标化合物N-(6-(2,6-二氯苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物3)

[0076] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与2,6-二氯苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(2,6-二氯苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率93%。

[0077] 按实施例2的方法,6-(2-(2,6-二氯苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(2,6-二氯苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(3),收率45%。

[0078] 实施例5:目标化合物N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物4)

[0079] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与4-叔丁基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-((4-叔丁基)苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率90%。

[0080] 按实施例2的方法,6-(2-((4-叔丁基)苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(4),收率47%。

[0081] 实施例6:目标化合物N-(6-(吡啶-2-基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物5)

[0082] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与2-吡啶甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(吡啶-2-基甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率95%。

[0083] 按实施例2的方法,6-(2-(吡啶-2-基甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(吡啶-2-基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(5),收率87%。

[0084] 实施例7:目标化合物N-(6-(4-甲基苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物6)

[0085] 按实施例2的方法,6-邻氨基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与4-甲基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-甲基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0086] 按实施例2的方法,6-(2-(4-甲基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-甲基苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(6),收率44%。

[0087] 实施例8:目标化合物N-(6-苯基-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物7)

[0088] 按实施例2的方法,6-邻氨基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0089] 按实施例2的方法,6-(2-(苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-苯基-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(7),收率54%。

[0090] 实施例9:目标化合物N-(6-(3,5-二甲氧基苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物8)

[0091] 按实施例2的方法,6-邻氨基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与3,5-二甲氧基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(3,5-二甲氧基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0092] 按实施例2的方法,6-(2-(3,5-二甲氧基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(3,5-二甲氧基苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(8),收率50%。

[0093] 实施例10:目标化合物N-(6-(2-氟苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物9)

[0094] 按实施例2的方法,6-邻氨基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与2-氟苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(2-氟苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率90%。

[0095] 按实施例2的方法,6-(2-(2-氟苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(2-氟苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(9),收率54%。

[0096] 实施例11:目标化合物N-(6-(4-氟苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物10)

[0097] 按实施例2的方法,6-邻氨基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与4-氟苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-氟苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率95%。

[0098] 按实施例2的方法,6-(2-(4-氟苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-氟苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(10),收率56%。

[0099] 实施例12:目标化合物N-(6-(2,4-二氯苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物11)

[0100] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与2,4-二氯苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(2,4-二氯苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率90%。

[0101] 按实施例2的方法,6-(2-(2,4-二氯苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(2,4-二氯苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(11),收率38%。

[0102] 实施例13:目标化合物N-(6-(2-氯苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物12)

[0103] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与2-氯苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(2-氯苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0104] 按实施例2的方法,6-(2-(2-氯苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(2-氯苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(12),收率54%。

[0105] 实施例14:目标化合物甲基4-(2-((2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)烯胺)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-6-基)苯酸酯(表1中化合物13)

[0106] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与4-甲酰基苯甲酸甲酯(1.2mmol)反应生成黄色固体甲基4-((2-(6-((2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)胺基)嘧啶-4-基)苯基)亚胺)甲基)苯酸酯,收率94%。

[0107] 按实施例2的方法,甲基4-(((2-(6-((2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)胺基)嘧啶-4-基)苯基)亚胺)甲基)苯酸酯用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体甲基4-(2-((2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)烯胺)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-6-基)苯酸酯(13),收率54%。

[0108] 实施例15:目标化合物N-(6-(4-氯苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物14)

[0109] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与4-氯苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-氯苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0110] 按实施例2的方法,6-(2-(4-氯苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-氯苯基)-3,4,6,

7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(14), 收率54%。

[0111] 实施例16:目标化合物N-(6-(4-溴苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物15)

[0112] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与4-溴苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-溴苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率90%。

[0113] 按实施例2的方法,6-(2-(4-溴苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-溴苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(15), 收率50%。

[0114] 实施例17:目标化合物N-(6-(苯并[d][1,3]二氧五环-5-基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物16)

[0115] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与3,4-(亚甲二氧基)苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(苯并[d][1,3]二氧五环-5-基甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0116] 按实施例2的方法,6-(2-(苯并[d][1,3]二氧五环-5-基甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(苯并[d][1,3]二氧五环-5-基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(16),收率43%。

[0117] 实施例18:目标化合物N-(6-(噻吩-2-基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物17)

[0118] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与2-噻吩甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(噻吩-2-基甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0119] 按实施例2的方法,6-(2-(噻吩-2-基甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(噻吩-2-基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(17),收率44%。

[0120] 实施例19:目标化合物N-(6-(4-羟基苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物18)

[0121] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与4-羟基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-羟基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0122] 按实施例2的方法,6-(2-(4-羟基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-羟基苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(18),收率54%。

[0123] 实施例20:目标化合物N-(6-(3,4-二甲氧基苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(表1中化合物19)

[0124] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺(0.32g,1mmol)与3,4-二甲氧基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(3,4-二甲氧基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺,收率97%。

[0125] 按实施例2的方法,6-(2-(3,4-二甲氧基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(3,4-二甲氧基苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二氧六环-6-胺(19),收率50%。

[0126] 实施例21:目标化合物N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)苯胺(表1中化合物20)

[0127] 按实施例1的方法合成化合物,6-邻胺基苯基-N-苯基嘧啶-4-胺。

[0128] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-苯基嘧啶-4-胺(1mmol)与4-叔丁基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-苯基嘧啶-4-胺,收率94%。

[0129] 按实施例2的方法,6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-苯基嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)苯胺(20),收率54%。

[0130] 实施例22:目标化合物N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-4-甲氧基苯胺(表1中化合物21)

[0131] 按实施例1的方法合成化合物,6-邻胺基苯基-N-(4-甲氧基苯基)嘧啶-4-胺。

[0132] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(4-甲氧基苯基)嘧啶-4-胺(1mmol)与4-叔丁基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(4-甲氧基苯基)嘧啶-4-胺,收率94%。

[0133] 按实施例2的方法,6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(4-甲氧基苯基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-4-甲氧基苯胺(21),收率51%。

[0134] 实施例23:目标化合物N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-4-氯苯胺(表1中化合物22)

[0135] 按实施例1的方法合成化合物,6-邻胺基苯基-N-(4-氯苯基)嘧啶-4-胺。

[0136] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(4-氯苯基)嘧啶-4-胺(1mmol)与4-叔丁基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(4-氯苯基)嘧啶-4-胺,收率93%。

[0137] 按实施例2的方法,6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(4-氯苯基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-4-氯苯胺(22),收率51%。

[0138] 实施例24:目标化合物N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-2,4-二甲基苯胺(表1中化合物23)

[0139] 按实施例1的方法合成化合物,6-邻胺基苯基-N-(2,4-二甲基苯基)嘧啶-4-胺。

[0140] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,4-二甲基苯基)嘧啶-4-胺(1mmol)与4-叔丁基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,4-二甲基苯基)嘧啶-4-胺,收率93%。

[0141] 按实施例2的方法,6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,4-二甲基苯基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-2,4-二甲基苯胺(23),收率51%。

[0142] 实施例25:目标化合物N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-2,5-二甲氧基苯胺(表1中化合物24)

[0143] 按实施例1的方法合成化合物,6-邻胺基苯基-N-(2,5-二甲氧基苯基)嘧啶-4-胺。

[0144] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(2,5-二甲氧基苯基)嘧啶-4-胺(1mmol)与4-叔丁基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,5-二甲氧基苯基)嘧啶-4-胺,收率93%。

[0145] 按实施例2的方法,6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(2,5-二甲氧基苯基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-2,5-二甲氧基苯胺(24),收率51%。

[0146] 实施例26:目标化合物N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-4-(三氟甲基)苯胺(表1中化合物25)

[0147] 按实施例1的方法合成化合物,6-邻胺基苯基-N-(4-(三氟甲基)苯基)嘧啶-4-胺。

[0148] 按实施例2的方法,6-邻胺基苯基-N-(4-(三氟甲基)苯基)嘧啶-4-胺(1mmol)与4-叔丁基苯甲醛(1.2mmol)反应生成黄色固体6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(4-(三氟甲基)苯基)嘧啶-4-胺,收率93%。

[0149] 按实施例2的方法,6-(2-(4-叔丁基苯甲烯胺基)苯基)-N-(4-(三氟甲基)苯基)嘧啶-4-胺用硼氢化钠还原环合,生成淡黄色固体N-(6-(4-(叔丁基)苯基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹啉-2-烯基)-4-(三氟甲基)苯胺(25),收率51%。

[0150] 二、本发明化合物的细胞毒试验

[0151] 实验瘤株:A549(人肺腺癌细胞)、HCT116(人结肠癌细胞)、ZR-75-30(人乳腺癌细胞)、MDA-MB-231(人乳腺癌细胞)、HL-60(人白血病细胞)作为筛选对象,均由上海医药工业研究院药理室提供。K562、BGC-823、SMMC-7721、HepG2、HT-29和SK-OV-3均由江苏正大天晴药业股份有限公司提供。

[0152] 培养液及试验器材:

[0153] 样品配制:用DMSO(Merck)溶解后,加入PBS(-)配成1000 μ M的溶液或均匀的混悬液,然后用含DMSO的PBS(-)稀释。终浓度为100、10、1、0.1、0.01、0.001 μ g/ml。

[0154] 培养液:DMEM+10%FBS+双抗

[0155] 其他材料:全波长多功能酶标仪;型号:Varioskan Flash;生产厂商:Thermo scientific;进口96孔培养板等。

[0156] 试验方法:

[0157] MTT法:96孔板每孔加入浓度为 $4-5 \times 10^4$ 个/ml的细胞悬液100 μ l,置37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱内。24h后,加入样品液,10 μ l/孔,设双复孔,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂作用72h。每孔加入5mg/ml

的MTT溶液20 μ l,作用4h后加入溶解液,100 μ l/孔,置培养箱内,溶解后用全波长多功能酶标仪测570nm OD值。并计算细胞抑制率,以相应溶媒作阴性对照。

$$[0158] \quad \text{细胞抑制率} \% = \frac{\text{阴性对照组OD值} - \text{受试物组OD值}}{\text{阴性对照组OD值}} \times 100 \%$$

[0159] 部分化合物细胞毒活性:见表2

[0160] 表2、部分化合物对肿瘤细胞增殖的抑制IC₅₀值(μ M)

编号	A549	HCT116	ZR-75-30	MDA-MB-231	HL-60
1	48.5	45.4	74	NR*	NR*
2	7.4	2.9	2.4	NR*	NR*
3	11.2	6.9	3.8	NR*	NR*
4	2.2	1.1	0.71	NR*	NR*
5	85.6	25.1	28.1	NR*	NR*
6	3.71	2.7	NR*	2.82	61.2
7	7.39	6.25	NR*	2.6	3.6
8	5.39	5.83	NR*	4.67	1.53
9	7.66	22.29	NR*	2.91	4.31
[0161] 10	7.22	9.39	NR*	2.54	2.96
11	5.95	4.82	NR*	3.36	2.9
12	6.89	12.53	NR*	2.83	2.74
13	12.78	3.2	NR*	2.79	5.54
14	5.55	6.74	NR*	2.6	3.39
15	5.78	3.09	NR*	2.74	3.41
16	11.05	21.13	NR*	7.4	5.53
17	14.69	21.32	NR*	4.65	2.52
18	46.71	48.07	NR*	36.79	40.09
19	42.35	54.7	NR*	25.74	12.73
Sorafenib	11.19	1.77	NR*	2.26	3.8

[0162] *NR表示无数据

编号	K562	BGC-823	HepG2	HT-29	SK-OV-3
[0163] 4	3.94 \pm 1.27	4.73 \pm 2.38	3.20 \pm 0.76	1.37 \pm 0.47	3.40 \pm 0.84

[0164] 由此可见,本发明化合物具有抗肿瘤活性,特别是化合物4的细胞毒活性比较显著。

[0165] 三、本发明中化合物4对30种激酶蛋白的抑制试验

[0166] 利用Mobility Shift Assay的方法在Km ATP的情况下,在激酶上对化合物4进行筛选;检测化合物4对激酶的IC₅₀。

[0167] 利用Lance Ultra Assay的方法在Km ATP的情况下,mTOR上对化合物4进行筛选。

[0168] 利用Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay的方法在Km ATP的情况下,P13Ka上对化合物4进行筛选;

[0169] 利用Lanthascreen Assay的方法在Km ATP的情况下,BRAF上对化合物4进行筛选;

[0170] 背景

[0171] 在这个实验中,筛选的最高浓度为200 μ M,3倍梯度稀释,10个浓度2复孔检测。

[0172] 实验激酶蛋白:激酶蛋白见表3,均由睿智化学提供。

[0173] 表3激酶蛋白信息

	名称	品牌	目录号	批号
	ABL	Carna	08-001	06CBS-2988
	AKT1	BPS	40003	1001
	ALK	Carna	08-105	08CBS-0112
	AMPKa1	Carna	02-113	07CBS-2720
	AUR A	Carna	5101	07CBS-0289
	BRAF	Invitrogen	344860	PV3848
	CDK2	Carna	04-103	06CBS-3024
	CHK1	BPS	40039	1001
	cKIT	Millipore	14-559k	1628203
	EGFR	Carna	08-115	10CBS-0157
	EphA1	Carna	08-119	07CBS-2305
	ERK1	Carna	04-142	07CBS-0269
	FGFR1	Carna	08-133	09CBS-0989
	FLT3	Carna	08-154	07CBS-2350
	HER2	Carna	08-016	08CBS-0667
	IGF1R	Invitrogen	PR4654A	924345B
	INSR	Carna	08-142	07CBS-0620
	JAK2	BPS	40450	1003
	MET	Carna	08-151	08CBS-0284
	mTOR	Millipore	14-770	
	p110a/p85a	Invitrogen	PV4788	
[0174]	p38a	Carna	04-152	07CBS-0319
	PDGFRb	BPS	40263	1001
	PDK1	Invitrogen	P3001	35371I
	PKCb1	Carna	01-134	07CBS-1878
	RET	Carna	08-159	06CBS-3284
	SRC	Carna	08-173	05CBS-1367
	TIE2	BPS	40270	1002
	TYK2	Carna	08-147	07CBS-2156
	DMSO	Sigma	D2650	474382
	96孔板	Corning	3365	22008026
	384孔板	Corning	3573	12608008
	P2	吉尔生化	112394	P080222-XY112394
	P4	吉尔生化	112395	P100804-XZ112395
	P6	吉尔生化	116368	P100818-XZ116368
	P7	吉尔生化	117884	P080421-XY117884
	P8	吉尔生化	112396	P080327-XY112396
	P10	英杰	116583	P080804-WY116583
	P13	吉尔生化	114204	P080318-XY114204
	P17	吉尔生化	120357	P080516-XY120357
	P18	吉尔生化	114202	P080319-XY114202
	P19	吉尔生化	112392	P080314-WJ112392
	P21	吉尔生化	116370	P080407-XY116370
	P22	吉尔生化	112393	P080401-XY112393

[0175] 实验方法:

[0176] I.Mobility shift assay

[0177] 1. 配制1x的激酶缓冲液和终止液

[0178] 1). 不含MnCl₂的1倍激酶缓冲液:50mM HEPES,pH7.5,0.0015%Brij-35,10mM MgCl₂,2mM DTT 2). 含MnCl₂的1倍激酶缓冲液:50mM HEPES,pH 7.5,0.0015%Brij-35,10mM MgCl₂,10mM MnCl₂,2mM DTT

[0179] 3). 终止液:100mM HEPES,pH 7.5,0.015%Brij-35,0.2%Coating Reagent#3, 50mM EDTA

[0180] 2. 化合物配制

[0181] 1) 化合物稀释

[0182] 化合物4检测终浓度为200uM,首先配置成50X浓度,即10mM。在96孔板的第一行孔中加入50uL的20mM化合物,加入50uL的100%DMSO,配成100uL的10mM化合物。

[0183] 将配制的10mM化合物加100uL到一个96孔板的第二个孔,第三至第十二孔加入60uL的100%DMSO,从第二孔吸出30uL化合物加到第三个孔,依次向下做3倍稀释,共稀释10个浓度。

[0184] 2) 转移5倍化合物到反应板

[0185] 从上述96孔板的每一孔取10uL到另一块96孔板中,加入90uL超纯水。因此化合物溶解于10%DMSO中。

[0186] 从上述96孔板中取出5uL到一块384孔反应板。因此,384孔反应板中就有5uL的10%DMSO溶解的5倍化合物。阴性对照孔中加入5uL250mM的EDTA。

[0187] 3. 激酶反应

[0188] 1) 配制2.5倍酶溶液

[0189] 将激酶加入1倍激酶缓冲液,形成2.5倍酶溶液。

[0190] 2) 配制2.5倍的底物溶液

[0191] 将FAM标记的多肽和ATP加入1倍激酶缓冲液,形成2.5倍底物溶液。

[0192] 3) 向384孔板中加入酶溶液

[0193] 384孔反应板中已有5uL的10%DMSO溶解的5倍化合物。

[0194] 在384孔反应板中加入10uL的2.5倍酶溶液。

[0195] 室温下孵育10分钟。

[0196] 4) 向384孔板中加入底物溶液

[0197] 在384孔反应板中加入10uL的2.5倍底物溶液。

[0198] 5) 激酶反应和终止

[0199] 28°C下孵育一定时间(由各个激酶决定)。

[0200] 加25uL终止液终止反应。

[0201] 4. Caliper读取数据

[0202] Caliper上读取转化率数据。

[0203] 5. 抑制率计算

[0204] 从Caliper上复制转化率数据。

[0205] 把转化率转化成抑制率数据。其中max是指DMSO对照的转化率,min是指无酶活对照的转化率。

[0206] $\text{Percent inhibition} = (\text{max-conversion}) / (\text{max-min}) * 100.$

[0207] II.mTor激酶反应

[0208] 1. 配制1x的激酶缓冲液

[0209] 1xKinase base buffer, 50mM HEPES, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 1mM EGTA, 3mM MnCl₂, 0.01% Tween-20, 2mM DTT

[0210] 2. 化合物配制

[0211] 1) 化合物检测终浓度为200uM, 首先配置成100倍浓度, 即20mM。将配制的20mM化合物加100uL到一个96孔板的第二个孔, 第三至第十二孔加入60uL的100% DMSO, 从第二孔吸出30uL化合物加到第三个孔, 依次向下做3倍稀释, 共稀释10个浓度。

[0212] 2) 第一孔和第十二孔中分别加入100uL 100% DMSO

[0213] 3) 化合物中间稀释。转移4uL化合物到一个新的96孔板中, 加入96uL的1x的激酶缓冲液, 在振荡板上振荡混匀10分钟。

[0214] 4) 转移化合物到反应板, 从上述96孔板中取出2.5uL到一块384孔反应板。例如, 从96孔板的A1孔转移2.5uL的化合物到384孔板的A1和A2孔中, 96孔板的A2孔转移2.5uL的化合物到384孔板的A3和A4孔中, 依次类推。

[0215] 3. 配制4x激酶溶液

[0216] 1) 使用1倍激酶缓冲液配置4倍mTor溶液。激酶溶液终浓度为2.5nM。

[0217] 2) 转移2.5uL 4倍酶溶液到384孔板反应孔中, 阴性对照孔加入1倍激酶缓冲液。

[0218] 3) 振荡, 混匀, 室温下静置

[0219] 4. 配制2x底物溶液

[0220] 1) 使用1倍激酶缓冲液配置2倍底物溶液。

[0221] 底物溶液终浓度为ULight-4E-BP1 50nM; ATP 10.8uM。

[0222] 2) 转移5uL 2倍底物溶液到384孔板反应孔中起始反应

[0223] 3) 振荡, 混匀。

[0224] 5. 激酶反应

[0225] 将96孔板盖上盖子, 于室温下孵育1小时。

[0226] 6. 反应结果的检测

[0227] 1) 将检测试剂平衡到室温。

[0228] 2) 转移10uL检测试剂到384孔板反应孔中终止反应。

[0229] 3) 在振荡板上轻轻振荡15分钟。室温下平衡1小时。

[0230] 7. 数据读取

[0231] 在Envision读取样品发光数值。

[0232] 8. 曲线拟合

[0233] 1) 从Envision程序上复制发光读数的数据

[0234] 2) 将发光读数的值通过公式转换为抑制百分率。

[0235] $\text{Percent inhibition} = (\text{Lance signal} - \text{min}) / (\text{max} - \text{min}) * 100.$

[0236] “max”为不加酶进行反应的对照样荧光读数; “min”为加入DMSO作为对照的样品荧光读数。

[0237] 3) 将数据导入MS Excel并使用Graphpad5.0进行曲线拟合。

[0238] III.PI3Ka激酶反应

- [0239] 1. 配制1x的激酶缓冲液:50mM HEPES,pH 7.5,3mM MgCl₂,1mM EGTA,100mM NaCl,0.03%CHAPS,2mM DTT
- [0240] 2. 化合物配制
- [0241] 1) 化合物检测终浓度为200uM,首先配置成100倍浓度,即20mM。将配制的20mM化合物加100μl到一个96孔板的第二个孔,第三至第十二孔加入60μl的100%DMSO,从第二孔吸出30μl化合物加到第三个孔,依次向下做3倍稀释,共稀释10个浓度。
- [0242] 2) 化合物中间稀释。转移4μl化合物到一个新的96孔板中,加入96μl的1x的激酶缓冲液,在振板机上振荡混匀10分钟。
- [0243] 3) 转移化合物到反应板,从上述96孔板中取出2.5μl到一块384孔反应板。例如,从96孔板的A1孔转移2.5u1的化合物到384孔板的A1和A2孔中,96孔板的A2孔转移2.5u1的化合物到384孔板的A3和A4孔中,依次类推。
- [0244] 3. 配制4x激酶溶液
- [0245] 1) 使用1倍激酶缓冲液配置4倍PI3Ka溶液。
- [0246] 激酶溶液终浓度为PI3Ka 1.65nM。
- [0247] 2) 转移2.5μl 4倍酶溶液到384孔板反应孔中,阴性对照孔加入1倍激酶缓冲液。
- [0248] 3) 振荡,混匀,室温下静置
- [0249] 4. 配制2x底物溶液
- [0250] 1) 使用1倍激酶缓冲液配置2倍底物溶液。
- [0251] 底物溶液终浓度为PIP2 50uM;ATP 25uM。
- [0252] 2) 转移5μl 2倍底物溶液到384孔板反应孔中起始反应
- [0253] 3) 振荡,混匀。
- [0254] 5. 激酶反应
- [0255] 将96孔板盖上盖子,于室温下孵育1小时。
- [0256] 6. 反应结果的检测
- [0257] 1) 将Kinase-Glo检测试剂平衡到室温。
- [0258] 2) 转移10μl Kinase-Glo检测试剂到384孔板反应孔中终止反应。
- [0259] 3) 在振板机上轻轻振荡15分钟。
- [0260] 7. 数据读取
- [0261] 在Flexstation读取样品发光数值。
- [0262] 8. 曲线拟合
- [0263] 1) 从Flexstation程序上复制发光读数的数据
- [0264] 2) 将发光读数的值通过公式转换为抑制百分率。
- [0265] $\text{Percent inhibition} = (\text{max-conversion}) / (\text{max-min}) * 100.$
- [0266] “max”为不加酶进行反应的对照样荧光读数;“min”为加入DMSO作为对照的样品荧光读数。
- [0267] 3) 将数据导入MS Excel并使用Graphpad 5.0进行曲线拟合。
- [0268] IV.Kinase BRAF激酶反应
- [0269] 1. 配制1x酶缓冲液
- [0270] 用5x激酶缓冲液稀释到1x酶缓冲液

[0271] 2. 化合物配制

[0272] 1) 化合物检测终浓度为200uM, 首先配置成100倍浓度, 即20mM。将配制的20mM化合物加100μl到一个96孔板的第二个孔, 第三至第十二孔加入60μl的100% DMSO, 从第二孔吸出30μl化合物加到第三个孔, 依次向下做3倍稀释, 共稀释10个浓度。

[0273] 2) 第一孔和第十二孔中分别加入100μl 100% DMSO

[0274] 3) 化合物中间稀释。转移4μl化合物到一个新的96孔板中, 加入96μl的1x的激酶缓冲液, 在振荡板上振荡混匀10分钟。

[0275] 4) 转移化合物到反应板, 从上述96孔板中取出2.5μl到一块384孔反应板。例如, 从96孔板的A1孔转移2.5u1的化合物到384孔板的A1和A2孔中, 96孔板的A2孔转移2.5u1的化合物到384孔板的A3和A4孔中, 依次类推。

[0276] 3. 配制2x激酶溶液

[0277] 1) 使用1倍激酶缓冲液配置2倍BRAF溶液。

[0278] 激酶溶液终浓度为: 3.5nM

[0279] 2) 转移5μl 2倍酶溶液到384孔板反应孔中, 阴性对照孔加入1倍激酶缓冲液。

[0280] 3) 振荡, 混匀, 室温下静置

[0281] 4. 配制4x底物溶液

[0282] 1) 使用1倍激酶缓冲液配置4倍底物溶液。

[0283] 底物溶液终浓度为: Fluorescein-MAP2K1 0.2uM; ; ATP 0.5uM;

[0284] 2) 转移2.5μl 4倍底物溶液到384孔板反应孔中起始反应

[0285] 3) 振荡, 混匀。

[0286] 5. 激酶反应

[0287] 将96孔板盖上盖子, 于室温下孵育1小时。

[0288] 6. 反应终止

[0289] 1) 使用Antibody缓冲液配置2倍终止液。

[0290] 终止液终浓度为: Antibody 2nM; EDTA 10mM

[0291] 2) 转移10μl终止液到每个反应孔中, 振荡1分钟, 室温静置30分钟。

[0292] 7. 数据读取

[0293] 在Envision读取样品发光数值。

[0294] 8. 曲线拟合

[0295] 1) 从Envision程序上复制发光读数的数据

[0296] 2) 将发光读数的值通过公式转换为抑制百分率。

[0297] $\text{Percent inhibition} = (\text{max} - \text{sample ratio}) / (\text{max} - \text{min}) * 100.$

[0298] “max”为不加酶进行反应的对照样荧光读数; “min”为加入DMSO作为对照的样品荧光读数。

[0299] 3) 将数据导入MS Excel并使用Graphpad5.0进行曲线拟合。

[0300] 化合物4的激酶抑制活性: 见表4。

[0301] 表4化合物4对30种激酶的抑制IC₅₀值(uM)

	激 酶	化合物 4 的 IC ₅₀ 值
	EphA1	1.52
	RET	10.10
	ABL	8.44
	FGFR1	5.27
	FLT3	0.94
	MET	5.95
	PDGFRb	1.23
	JAK2	9.04
	TYK2	1.60
	INSR	0.88
	EGFR	12.83
	ALK	1.95
	HER2	2.37
	p38a	2.84
[0302]	Tie2	4.11
	ERK1	3.61
	PKCb1	2.66
	PDK1	8.13
	IGF1R	4.20
	CHK1	21.95
	CDK2	6.12
	AUR A	181.77
	AMPKa1	17.32
	AKT1	1.79
	SRC	3.55
	cKit	3.14
	BRAF	14.04
	PI3Ka	>200
	mTor	11.40
	VEGFR-2	1.06

[0303] 由此可见,化合物4对绝大部分激酶均有相当的抑制活性,为广谱性的激酶抑制剂。

[0304] 综上所述,本发明化合物N-(6-取代-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[1,6-c]喹唑啉-2-烯基)取代苯胺类化合物是一类全新结构的具有抗肿瘤活性的化合物,其中部分化合物具有明显的细胞毒作用以及广谱的激酶抑制活性,这为进一步深入研究和开发新的抗肿瘤药物开辟了新的途径和方向。