[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07D 219/10 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02828490.9

[45] 授权公告日 2006 年 10 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1280276C

[22] 申请日 2002.3.7 [21] 申请号 02828490.9

[86] 国际申请 PCT/KR2002/000392 2002.3.7

[87] 国际公布 WO2003/074490 英 2003.9.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.7

[71] 专利权人 三进制药株式会社

地址 韩国首尔

[72] 发明人 曹义焕 郑淳侃 李淳焕 权镐晰 姜东旭

审查员 肖 鹏

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 张晓威

权利要求书 3 页 说明书 27 页

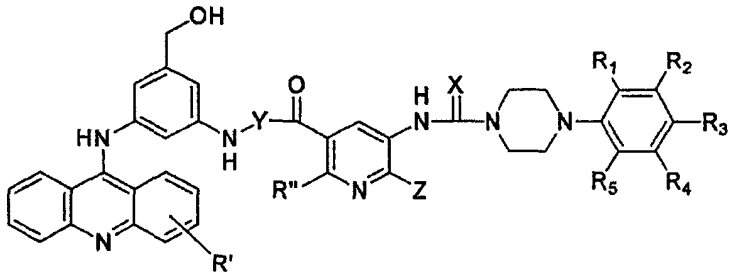
[54] 发明名称

9 – 氨基吖啶衍生物及其制备方法

[57] 摘要

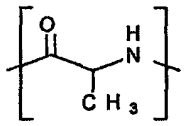
本发明涉及新的 9 – 氨基吖啶衍生物，其显示突出的抗肿瘤活性和低毒性。

1、通式(I)的化合物或其药学可接受的盐



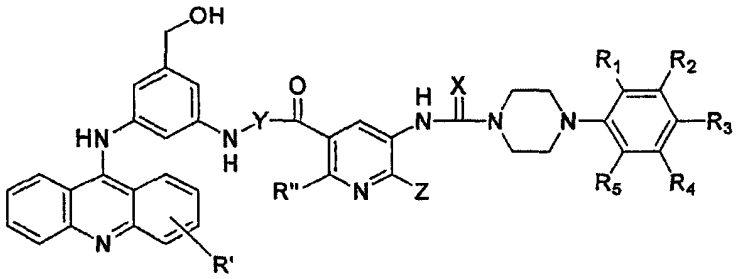
(I)

其中 Y 是键或

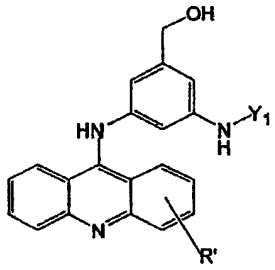


其中 X 是氧或硫，R_1、R_2、R_3、R_4 和 R_5 独立地是氢、卤素、硝基、氨基、羟基、C_1-C_4 低级烷基氨基、C_1-C_8 烷基或 C_1-C_4 低级烷氧基；R'和 R"独立地是 C_1-C_8 烷基或 C_1-C_4 低级烷氧基；并且 Z 是 C_1-C_4 低级烷基、C_1-C_4 低级烷氧基或 C_1-C_4 低级烷基氨基。

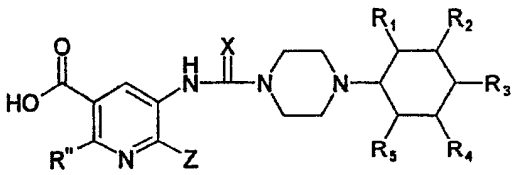
2、以下通式(I)的化合物或其药学可接受的盐的制备方法，所述方法包括使以下通式(a)的化合物与以下通式(b)的化合物反应，得到以下通式(I)的化合物，并且如果需要，将通式(I)的化合物转化成其药学可接受的盐



(I)

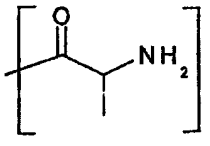


(a)

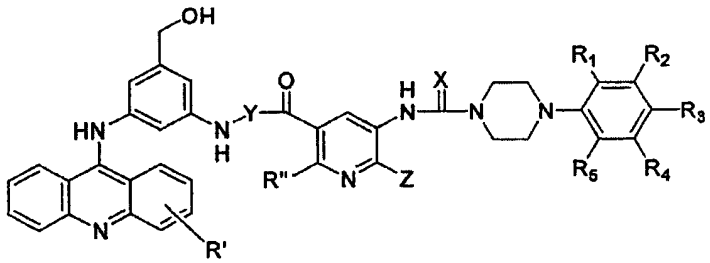


(b)

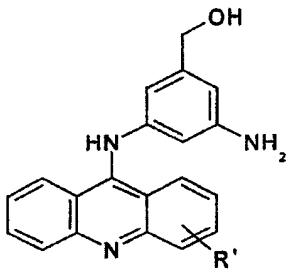
其中 R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R'、R"、X、Y 和 Z 如权利要求 1 中定义，

并且 Y_1 是氢或基团 。

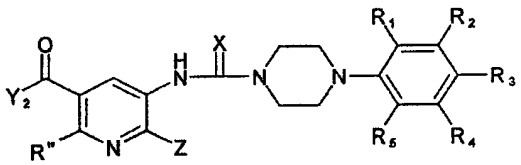
3、以下通式(I)的化合物或其药学可接受的盐的制备方法，所述方法包括使以下通式(c)的化合物与以下通式(d)的化合物反应，得到以下通式(I)的化合物，并且如果需要，将通式(I)化合物转化成其药学可接受的盐



(I)

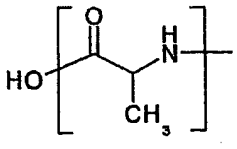


(c)



(d)

其中 R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R'、R"、X、Y 和 Z 如权利要求 1 中定义，并且

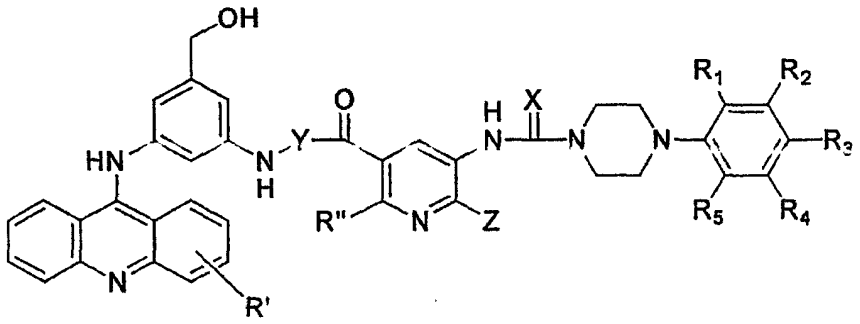
Y_2是-OH或基团 

。

9-氨基吖啶衍生物及其制备方法

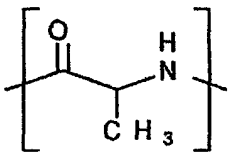
技术领域

本发明涉及通式(I)的新的 9-氨基吖啶衍生物



(I)

其中 Y 是键或



其中 X 是氧或硫，R_1、R_2、R_3、R_4 和 R_5 独立地是氢、卤素、硝基、氨基、羟基、C_1-C_4 低级烷基氨基、C_1-C_8 烷基或 C_1-C_4 低级烷氧基；R'和 R"独立地是 C_1-C_8 烷基或 C_1-C_4 低级烷氧基；并且 Z 是 C_1-C_4 低级烷基、C_1-C_4 低级烷氧基或 C_1-C_4 低级烷基氨基。

在上述定义中，C_1-C_4 低级烷基意指直链或支链烷基，如甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基等。

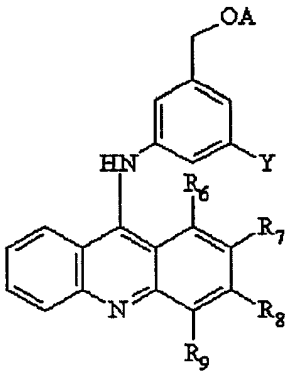
C_1-C_4 低级烷氧基意指甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基等。

C_1-C_4 低级烷基氨基意指甲氨基、乙氨基、丙氨基、丁氨基等。

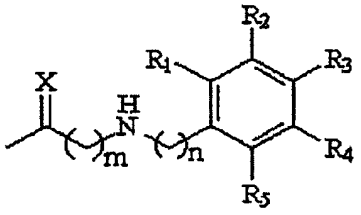
背景技术

WO 00/37447 描述了式(I)的化合物的 9-氨基吖啶衍生物及其制

备方法

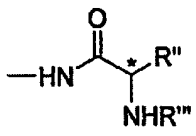


(1)

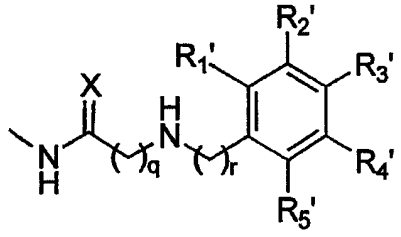


其中 A 是氢或

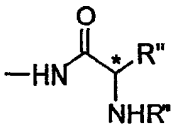
(其中 X 是氧或硫，R_1、R_2、R_3、R_4 和 R_5 独立地是氢、卤素、硝基、氨基、羟基、C_1-C_4 低级烷基羟基、C_1-C_4 低级烷基氨基、C_1-C_8 烷基、C_1-C_4 低级烷氧基或 C_1-C_4 低级烷氧羰基，并且 m 和 n 独立地是 0、1 或 2 的整数)，R_6、R_7、R_8 和 R_9 独立地是 C_1-C_8 烷基、C_1-C_4 低级烷氧基，并且 Y 是氢、氨基、-N=CHR' (其中 R'是氢、苄基、C_1-C_8 烷基或



C_1-C_6 低级烷基氨基)，(其中 R"是氢、苄基、C_1-C_8 烷基或 C_1-C_6 低级烷基氨基，并且 R'"是氢、苄基、C_1-C_8 烷基或氨基保护



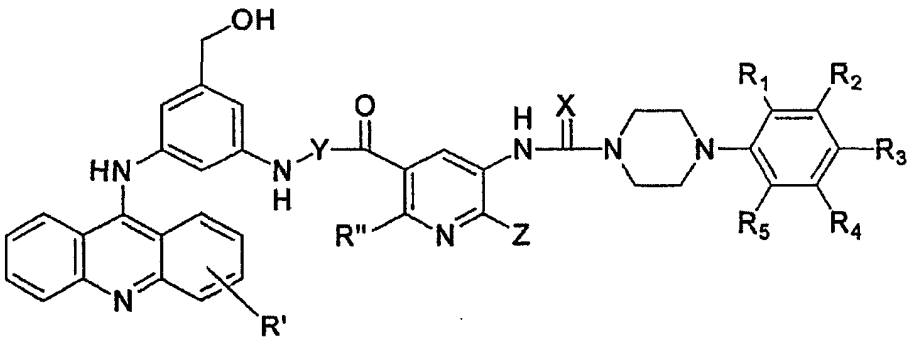
基)或 (其中 X 如上定义，R_1'、R_2'、R_3'、R_4'和 R_5'独立地是氢、卤素、硝基、氨基、羟基、C_1-C_4 低级烷基羟基、C_1-C_4 低级烷基氨基、C_1-C_8 烷基、C_1-C_4 低级烷氧基或 C_1-C_4 低级烷氧羰基，并且 q 和 r 独立地是 0、1 或 2 的整数)，或其药学可接受的盐，以及它们的制备方法。

在以上式(1)的化合物中，其中 Y 是  (R"和 R"'如上定义)，可以有 *l*-型异构体、*d*-型异构体或外消旋形式。

但是，本发明的化合物在 WO 00/37447 中并没有描述。

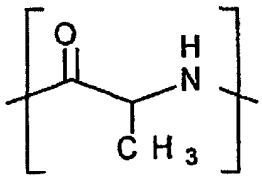
具体实施方式

本发明的发明人已经研究了很长时间，发现具有增强的抗肿瘤活性的新化合物。结果，本发明的发明人已经发现，以上定义的通式(I)化合物或其酸加成盐不仅具有显著的抗肿瘤活性，而且毒性极低。



(I)

其中 Y 是键或



其中 X 是氧或硫，R_1、R_2、R_3、R_4 和 R_5 独立地是氢、卤素、硝基、氨基、羟基、C_1-C_4 低级烷基羟基、C_1-C_4 低级烷基氨基、C_1-C_8 烷基或 C_1-C_4 低级烷氧基；R'和 R"独立地是 C_1-C_8 烷基或 C_1-C_4 低级烷氧基；并且 Z 是 C_1-C_4 低级烷基、C_1-C_4 低级烷氧基或 C_1-C_4 低级烷基氨基。

因此，本发明的一个目的是提供通式(I)的化合物或其酸加成盐，其不仅具有显著的抗肿瘤活性，而且毒性极低。

本发明的另一个目的是提供通式(I)的化合物或其酸加成盐的制

备方法。

本发明的化合物可以通过常规方法与药学可接受的载体混合，给出用于预防或治疗各种肿瘤的药物制剂。

因此，本发明的另一个目的是提供含有有效量的通式(I)的化合物或其酸加成盐作为有效成分的药物制剂。

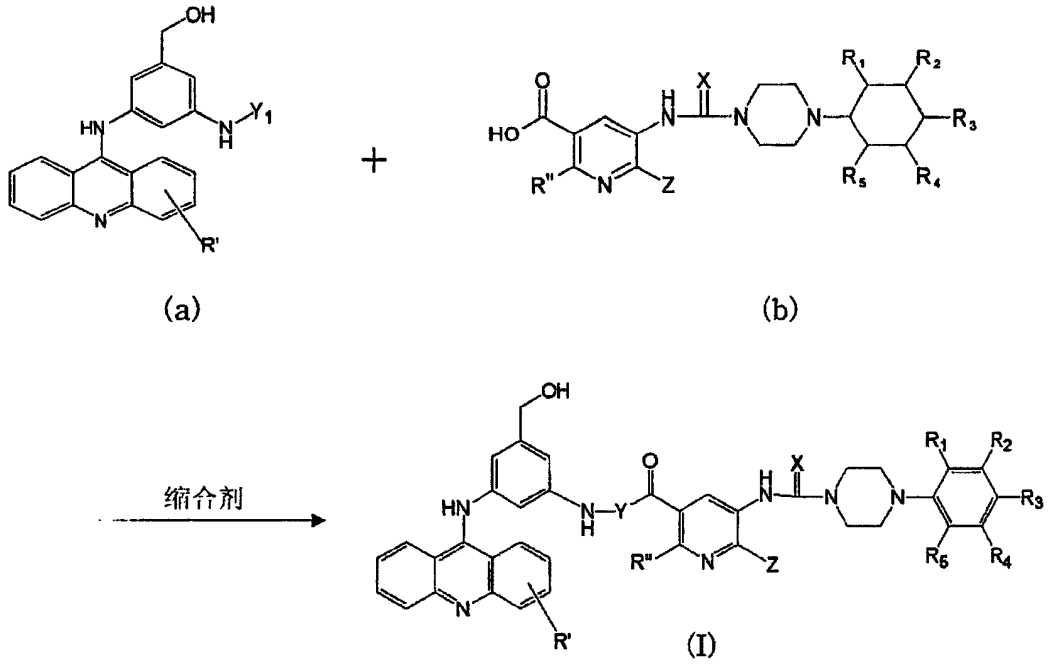
可以与通式(I)的化合物反应形成其酸加成盐的酸是药学可接受的无机酸、有机酸、氨基酸或磺酸；举例来说，无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和硝酸；有机酸如甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、柠檬酸、马来酸和丙二酸；氨基酸如丝氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸和脯氨酸；磺酸如甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸和甲苯磺酸。

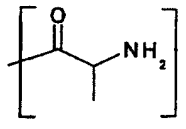
在配方含有有效量的通式(I)的化合物作为有效成分的药物制剂中使用的载体是甜味剂、粘合剂、溶剂、溶解助剂、润湿剂、乳化剂、等渗剂、吸附剂、降解剂、抗氧化剂、防腐剂、润滑剂、填料、香料等；举例来说可以包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、纤维素、甘氨酸、硅石、滑石、硬脂酸、硬脂、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硅酸铝镁、淀粉、明胶、黄蓍胶、海藻酸、海藻酸钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、琼脂、水、乙醇、聚乙二醇、聚乙烯基吡咯烷酮、氯化钠、氯化钾、橙香精(orange essence)、草莓精和香草芳香剂。

通式(I)的化合物的日剂量可以根据年龄、性别和疾病程度变化，但是优选可以每日一次或几次给予 1 毫克至 5000 毫克。

根据本发明的通式(I)的化合物可以按照示意图 I、II 来制备。

示意图 I



其中 R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R'、R"、X、Y 和 Z 如上定义，并且 Y_1 是氢或基团 。

通式(a)和(b)的化合物在常规有机溶剂中于缩合剂和酸存在下反应，有效地给出通式(I)的化合物。

该反应可以优选地在如四氢呋喃、二氯甲烷、氯仿、乙腈、二甲基甲酰胺、吡啶等的常规有机溶剂中进行。

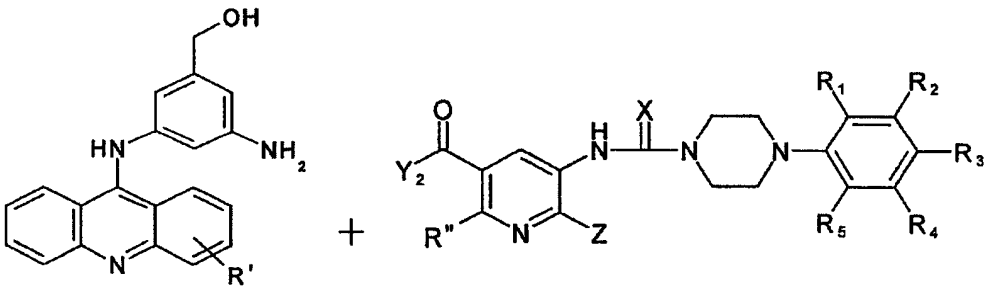
该反应可以优选地在如有机酸或无机酸的常规酸中，在如二环已基碳二亚胺(DCC)、HOBT 或 WSCD 的缩合剂存在下进行。

通式(a)或(b)的化合物是在 J. Med. Chem., 1995, 38, 3226 或 PCT/KR99/00787 中公知的化合物，或者可以通过类似的方法来制备并使用。

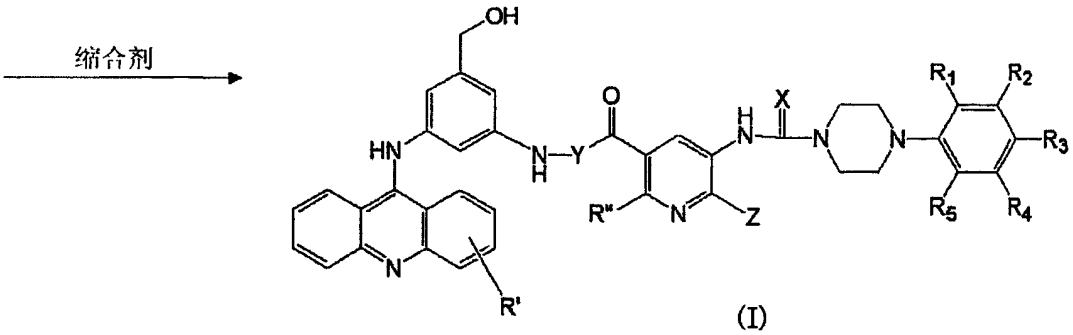
该反应在介于 3℃和溶剂沸点之间的温度，优选 25℃至 50℃下进行 5 至 24 小时，优选 10 至 24 小时的时间。

酸可以使用 1～1.5 当量，优选 1～1.1 当量。

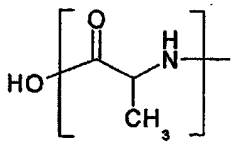
示意图 II



(c) (d)



(I)

其中 R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R'、R"、X、Y 和 Z 如上定义，并且 Y_1 是羟基或基团  。

通式(c)和(d)的化合物在常规有机溶剂中于缩合剂和酸存在下反应，有效地给出通式(I)的化合物。

该反应可以优选地在如四氢呋喃、二氯甲烷、氯仿、乙腈、二甲基甲酰胺、吡啶等的常规有机溶剂中进行。

该反应可以优选地在如有机酸或无机酸的常规酸中，在如二环已基碳二亚胺(DCC)、HOBT 或 WSCD 的缩合剂存在下进行。

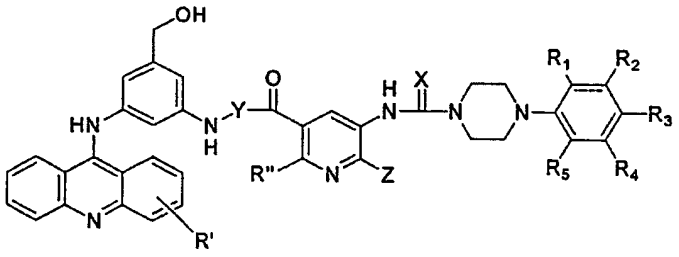
通式(c)或(d)的化合物是在 J. Med. Chem., 1995, 38, 3226 或 PCT/KR99/00787 中公知的化合物，或者可以通过类似的方法来制备并使用。

该反应在介于 3℃和溶剂沸点之间的温度，优选 25℃至 50℃下进行 5 至 24 小时，优选 10 至 24 小时的时间。

酸可以使用 1～1.5 当量，优选 1～1.1 当量。

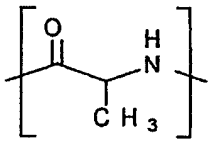
实施例

根据本发明的上述方法制备通式(I)的化合物。



(I)

实施例 1-17：通式(I)的化合物，其中

Y = 

实施例号	R'	R''	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	X	Z
1	H	CH_2CH_3	H	H	H	H	H	O	OCH_3
2	H	CH_2CH_3	H	CH_3	H	CH_3	H	O	OCH_3
3	H	CH_2CH_3	H	OCH_3	H	OCH_3	H	O	OCH_3
4	H	CH_2CH_3	H	F	H	F	H	O	OCH_3
5	H	CH_2CH_3	H	Cl	H	Cl	H	O	OCH_3
6	H	CH_2CH_3	H	F	H	H	H	O	OCH_3
7	H	CH_2CH_3	H	OH	H	OH	H	O	OCH_3
8	H	CH_2CH_3	H	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	O	OCH_3
9	H	$CH_2CH_2CH_3$	H	OCH_3	H	OCH_3	H	O	OCH_3
10	H	$CH_2CH_2CH_3$	H	CH_3	H	CH_3	H	O	OCH_3
11	H	CH_3	H	OCH_3	H	OCH_3	H	S	OCH_3
12	H	CH_2CH_3	H	OCH_3	H	OCH_3	H	S	OCH_3
13	H	$CH_2CH_2CH_3$	H	OCH_3	H	OCH_3	H	S	OCH_3
14	H	CH_2CH_3	H	CH_3	H	CH_3	H	S	OCH_3
15	2-CH_3	CH_2CH_3	H	CH_3	H	CH_3	H	O	OCH_3
16	3,4-CH_3	CH_2CH_3	H	CH_3	H	CH_3	H	O	OCH_3
17	4-OCH_3	CH_2CH_3	H	CH_3	H	CH_3	H	O	OCH_3

实施例 18-29：通式(I)的化合物，其中

Y = 0 (零)

实施例号	R'	R"	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	X	Z
18	H	CH_2CH_3	H	H	H	H	H	O	OCH_3
19	H	CH_2CH_3	H	CH_3	H	CH_3	H	O	OCH_3
20	H	CH_2CH_3	H	OCH_3	H	OCH_3	H	O	OCH_3
21	H	CH_2CH_3	H	F	H	F	H	O	OCH_3
22	H	CH_2CH_3	H	Cl	H	Cl	H	O	OCH_3
23	H	CH_2CH_3	H	F	H	H	H	O	OCH_3
24	H	CH_2CH_3	H	OH	H	OH	H	O	OCH_3
25	H	CH_2CH_3	H	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	O	OCH_3
26	H	CH_2CH_3	H	OCH_3	H	OCH_3	H	S	OCH_3
27	H	CH_2CH_3	H	CH_3	H	CH_3	H	S	OCH_3
28	H	CH_2CH_3	H	F	H	H	H	S	OCH_3
29	H	CH_2CH_3	H	Cl	H	Cl	H	S	OCH_3

实施例 1

4-苯基哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-甲基-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

在吡啶(30 毫升)中溶解 2-乙基-6-甲氧基-5-[(4-苯基哌嗪-1-羰基)氨基]烟酸(0.5 克，1.24 毫摩尔)，并且向其中加入 DCC (0.26 克，1.24 毫摩尔)、DMAP (0.15 克，1.24 毫摩尔)和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺。在室温下搅拌所得混合物 24 小时后。所得产物用柱色谱纯化，得到标题化合物。

收率：68.2%

m.p.：218～220℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.20 (3H, t), 1.38 (3H, d), 2.79 (2H, q), 3.19 (4H, m), 3.61 (4H, m), 3.96 (3H, s), 4.45 (2H, s), 4.53 (1H, m), 6.50 (1H, m), 6.85 (1H, t), 7.01 (4H, d), 7.28 (4H, m), 7.62 (4H, m), 8.00 (3H, d), 8.51 (1H, d), 9.97 (1H, s)

实施例 2

4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：52.3%

m.p.：205～207℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.20 (3H, t), 1.38 (3H, d), 2.79 (2H, q), 3.19 (4H, m), 3.59 (4H, m), 3.75 (6H, s), 3.96 (3H, s), 4.45 (2H, s), 4.53 (1H, m), 5.18 (1H, m), 6.03 (1H, s), 6.14 (2H, s), 6.48 (1H, s), 7.01 (2H, m), 7.30 (3H, m), 7.56 (3H, m), 7.96 (2H, d), 8.18 (1H, m), 8.50 (1H, d), 9.95 (1H, s)

实施例 3

4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：49.1%

m.p.：231～233℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.13 (3H, t), 1.38 (3H, d), 2.12 (1H, s), 2.79 (2H, q), 3.19 (4H, m), 3.59 (4H, m), 3.75 (6H, s), 3.96 (3H, s), 4.46 (2H, s), 4.53 (1H, m), 5.19 (1H, m), 6.03 (1H, s), 6.15 (2H, s), 6.50 (1H, s), 7.04 (2H, m), 7.32 (2H, s), 7.60 (4H, m), 7.96 (1H, s), 8.00 (1H, s), 8.25 (1H, m), 8.51 (1H, d), 9.97 (1H, s)

实施例 4

4-(3,5-二氟苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二氟苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：48.7%

m.p.：202～204℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.20 (3H, t), 1.38 (3H, d), 2.78 (2H, q), 3.30 (4H, m), 3.59 (4H, m), 3.96 (3H, s), 4.45 (2H, s), 4.53 (1H, m), 5.20 (1H, s), 6.54 (2H, m), 6.69 (2H, d), 7.09 (2H, m), 7.33 (2H, s), 7.61 (4H, m), 7.94 (1H, s), 8.04 (1H, s), 8.25 (1H, s), 8.51 (1H, d), 9.99 (1H, s)

实施例 5

4-(3,5-二氯苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二氯苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：47.8%

m.p.：184～186℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.20 (3H, t), 1.38 (3H, d), 2.79 (2H, q), 3.32 (4H, m), 3.59 (4H, m), 3.96 (3H, s), 4.46 (2H, s), 4.54 (1H, m), 5.18 (1H, s), 6.45 (1H, s), 6.92 (1H, s), 7.02 (3H, s), 7.34 (3H, m), 7.50 (3H, m), 7.94 (1H, s), 8.04 (1H, s), 8.22 (1H, m), 8.50 (1H, m), 9.96 (1H, s)

实施例 6

4-(3-氟苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨

基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3-氟苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：53.4%

m.p.：208～210℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.16 (3H, t), 1.48 (3H, d), 2.80 (2H, q), 3.09 (4H, s), 3.48 (4H, m), 3.96 (3H, s), 4.34 (2H, s), 4.81 (1H, m), 6.41 (1H, m), 6.53 (3H, m), 6.86 (1H,m), 6.98 (2H, m), 7.15 (1H, m), 7.17 (2H, m), 7.38 (3H, m), 7.86 (3H, m), 8.35 (1H, m), 9.49 (1H, s)

实施例 7

4-(3-羟基苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3-羟基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：41.9%

m.p.：207～209℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.21 (3H, t), 1.49 (3H, d), 2.81 (2H, q), 3.18 (4H, m), 3.60 (4H, m), 4.02 (3H, s), 4.52 (2H, s), 4.75 (1H, m), 6.41 (3H, m), 6.67 (1H, s), 7.06 (2H, m), 7.16 (2H, m), 7.24 (1H, s), 7.35 (1H, s), 7.47 (1H, d), 7.58 (2H, m), 7.86 (2H, m), 8.08 (2H, d), 8.36 (1H, s), 9.55 (1H, s),

实施例 8

4-(3,4,5-三甲氧基苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基)

酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,4,5-三甲氧基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：44.3%

m.p.：205～207℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.23 (3H, t), 1.50 (3H, d), 2.81 (2H, q), 3.76 (3H, s), 3.83 (6H, s), 4.05 (3H, s), 4.54 (2H, s), 4.73 (1H, m), 6.75 (2H, m), 7.20 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.41 (1H, s), 7.50 (1H, d), 7.66 (2H, m), 7.88 (2H, m), 8.09 (1H, s), 8.14 (2H, m), 8.48 (1H, s), 9.01 (1H, s), 9.77 (1H, s)

实施例 9

4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-2-甲氧基-6-丙基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-丙基-5-{[4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：41.2%

m.p.：220～222℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：0.88 (3H, t), 1.38 (3H, d), 1.68 (2H, m), 2.79 (2H, q), 3.19 (4H, m), 3.59 (4H, m), 3.75 (6H, s), 3.95 (3H, s), 4.45 (2H, s), 4.54 (1H, m), 5.19 (1H, s), 6.04 (1H, s), 6.15 (2H, s), 6.50 (1H, s), 7.04 (2H, m), 7.31 (2H, s), 7.59 (4H, m), 7.98 (3H, d), 8.25 (1H, m), 8.50 (1H, d), 9.56 (1H, s)

实施例 10

4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯

基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-2-甲氧基-6-丙基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-丙基-5-{[4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：42.3%

m.p.：195～197℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6): 0.88 (3H, t), 1.38 (3H, d), 1.67 (2H, m), 2.25 (6H, s), 2.76 (2H, m), 3.15 (4H, m), 3.36 (6H, s), 3.59 (4H, m), 3.95 (3H, s), 4.45 (2H, s), 4.54 (1H, m), 5.19 (1H, m), 6.49 (2H, s), 6.62 (2H, s), 7.05 (2H, m), 7.31 (2H, s), 7.58 (3H, m), 7.96 (3H, d), 8.23 (1H, m), 8.50 (1H, d), 9.96 (1H, s)

实施例 11

N-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]乙基}-5-{[4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-硫羰基]氨基}-6-甲氧基-2-甲基烟酰胺

使用 5-{[4-(3,5-二甲氧基-苯基)-哌嗪-1-硫羰基]-氨基}-2-甲基-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：58.2%

m.p.：181～183℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6): 1.40 (3H, d), 2.54 (3H, s), 3.28 (4H, m), 3.75 (6H, s), 3.90 (3H, s), 4.07 (4H, m), 4.45 (2H, s), 4.55 (1H, m), 5.18 (1H, m), 6.03 (1H, s), 6.15 (2H, s), 6.49 (1H, m), 7.03 (2H, m), 7.31 (3H, m), 7.60 (2H, m), 7.67 (2H, m), 8.25 (2H, m), 8.52 (1H, d), 9.08 (1H, s), 9.99 (1H, s)

实施例 12

N-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]乙基}-5-{[4-(3,5-

二甲氧基苯基)-哌嗪-1-硫羰基]氨基}-2-乙基-6-甲氧基烟酰胺

使用 5-{[4-(3,5-二甲氧基-苯基)-哌嗪-1-硫羰基]-氨基}-2-乙基-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：43.9%

m.p.：177～179℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.20 (3H, t), 1.43 (3H, d), 2.82 (2H, m), 3.19 (2H, m), 3.29 (2H, m), 3.79 (6H, s), 3.93 (3H, s), 4.12 (4H, m), 4.38 (1H, m), 4.45 (1H, m), 4.60 (1H, m), 6.25 (1H, s), 6.58 (3H, d), 7.08 (3H, m), 7.45 (2H, m), 7.84 (6H, m), 8.34 (1H, m), 8.72 (1H, s), 9.77 (1H, s)

实施例 13

N-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]乙基}-5-{[4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-硫羰基]氨基}-6-甲氧基-2-丙基烟酰胺

使用 5-{[4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-硫羰基]-氨基}-2-丙基-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：46.5%

m.p.：168～170℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：0.90 (3H, t), 1.38 (3H, d), 1.69 (2H, m), 2.83 (2H, m), 3.28 (4H, m), 3.75 (6H, s), 3.91 (3H, s), 4.13 (4H, m), 4.46 (2H, s), 4.55 (1H, m), 6.03 (1H, s), 6.15 (2H, s), 6.53 (1H, s), 7.08 (3H, m), 7.31 (2H, s), 7.60 (3H, m), 7.66 (2H, m), 7.76～8.35 (2H, m), 8.53 (1H, d), 9.07 (1H, s), 9.99 (1H, s)

实施例 14

N-{1-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]乙基}-5-{[4-(3,5-二甲基苯基)哌嗪-1-硫羰基]氨基}-2-乙基-6-甲氧基烟酰胺

使用 5-{[4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-硫羰基]-氨基}-2-甲基-6-甲氧基烟酸和 N-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-2-氨基丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：47.7%

m.p.：198～200℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.21 (3H, t), 1.41 (3H, d), 2.30 (6H, s), 2.82 (2H, q), 3.17 (2H, m), 3.27 (2H, m), 3.90 (3H, s), 4.07 (4H, m), 4.32 (2H, s), 4.45 (1H, m), 4.60 (1H, m), 6.25 (1H, s), 6.58 (3H, d), 7.08 (3H, m), 7.45 (2H, m), 7.84 (6H, m), 8.34 (1H, m), 8.72 (1H, s), 9.77 (1H, s)

实施例 15

4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羧酸(6-乙基-5-{1-[3-羟甲基-5-(2-甲基吖啶-9-基-氨基)-苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 2-氨基-N-[3-羟甲基-5-(2-甲基吖啶-9-基-氨基)-苯基]-丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：51.3%

m.p.：164～166℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.18 (3H, t), 1.52 (3H, d), 2.05 (1H, s), 2.17 (2H, m), 2.22 (1H, s), 2.28 (6H, s), 2.82 (2H, m), 3.10 (4H, m), 3.63 (4H, m), 4.00 (3H, s), 4.42 (2H, s), 4.85 (1H, m), 6.51 (3H, m), 6.56 (1H, s), 7.00 (3H, m), 7.43 (2H, m), 7.78 (4H, m), 8.48 (1H, m), 9.53 (1H, s)

实施例 16

4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(3,4-二甲基吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 2-氨基-N-[3-(3,4-二甲基吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：53.9%

m.p.：176～178℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.21 (3H, t), 1.52 (3H, d), 2.28 (6H, s), 2.39 (3H, s), 2.74 (3H, s), 2.83 (2H, q), 3.05 (4H, m), 3.48 (4H, m), 3.99 (3H, s), 4.30 (2H, s), 4.89 (1H, m), 6.41 (1H, m), 6.49 (2H, s), 6.56 (1H, s), 6.85 (1H, m), 7.05 (4H, m), 7.54 (1H, m), 7.73 (1H, m), 7.92 (2H, m), 8.42 (1H, s), 9.31 (1H, s)

实施例 17

4-(3,5-二甲基苯基)哌嗪-1-羧酸(5-{1-[3-(4-甲氧基吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基)酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和 2-氨基-N-[3-(4-甲氧基吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基]-丙酰胺进行与实施例 1 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：50.8%

m.p.：178～179℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.18 (3H, t), 1.50 (3H, t), 2.27 (6H, s), 2.82 (2H, q), 3.12 (4H, m), 3.53 (4H, m), 3.98 (3H, s), 4.14 (1H, m), 4.42 (2H, s), 4.81 (1H, m), 6.52 (4H, m), 6.89 (4H, m), 7.18 (2H, m), 7.41 (3H, m), 7.93 (1H, m), 8.37 (1H, s), 9.31 (1H, s)

实施例 18

4-苯基-哌嗪-1-羧酸{5-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基}酰胺

在 DMF (100 毫升)中溶解 2-乙基-6-甲氧基-5-[(4-苯基哌嗪-1-羰基)氨基]烟酸(6.48 克，15.7 毫摩尔)，并且向其中加入 WSCD (3 克，15.7 毫摩尔)、HOBT (2.12 克，15.7 毫摩尔)和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇。在室温下搅拌所得混合物 24 小时，并且减压除去所用溶剂。然后，所得产物用柱色谱纯化，得到标题化合物。

收率：73.2%

m.p.：187～189℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.24 (3H, t), 2.82 (2H, q), 3.02 (4H, m), 3.62 (4H, m), 3.99 (3H, s), 4.49 (2H, s), 5.28 (1H, t), 6.85 (2H, m), 7.02 (2H, m), 7.27 (4H, m), 7.45 (1H, m), 7.55 (2H, m), 7.77 (4H, m), 8.03 (2H, s), 8.09 (2H, m), 10.39 (1H, s)

实施例 19

4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羧酸{5-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基}酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：69.5%

m.p.：178～180℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.89 (3H, t), 2.28 (6H, s), 2.70 (2H, q), 3.31 (4H, m), 3.71 (4H, m), 3.99 (3H, s), 4.51 (2H, s), 5.28 (1H, t), 6.69 (1H, s), 6.89 (1H, s), 7.08 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.71 (1H, s), 7.87 (1H, s), 8.04 (3H, m), 8.18 (3H, m), 8.37 (2H, m), 10.46 (1H, s), 11.55 (1H,s), 12.28 (1H, s), 14.88 (1H, s)

实施例 20

4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-羧酸{5-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯

基氨基甲酰基]-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基}酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：70.2%

m.p.：170～172℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.25 (3H, t), 2.84 (2H, q), 3.24 (4H, m), 3.66 (4H, m), 3.76 (6H, s), 4.04 (3H, s), 4.58 (2H, s), 5.28 (1H, t), 6.02 (1H, s), 6.08 (1H, s), 6.90 (1H, s), 7.26 (2H, m), 7.34 (1H, m), 7.42 (1H, m), 7.58 (1H, s), 7.62 (2H, m), 7.75 (2H, m), 7.88 (1H, d), 8.03 (2H, m), 8.23 (2H, m), 8.37 (1H, s), 10.06 (1H, s)

实施例 21

4-(3,5-二氟苯基)-哌嗪-1-羧酸{5-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基}酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二氟苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：68.8%

m.p.：184～186℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.24 (3H, t), 2.79 (2H, q), 3.31 (4H, m), 3.59 (4H, m), 3.98 (3H, s), 4.47 (2H, s), 5.19 (1H, t), 6.53 (2H, m), 6.70 (2H, d), 7.07 (1H, m), 7.38 (3H, m), 7.51 (3H, m), 8.05 (3H, m), 10.23 (1H, s), 10.93 (1H, s)

实施例 22

4-(3,5-二氯苯基)-哌嗪-1-羧酸{5-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基}酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,5-二氯苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：71.2%

m.p.：210～212℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.25 (3H, t), 2.83 (2H, q), 3.30 (4H, m), 3.66 (4H, m), 4.03 (3H, s), 4.53 (2H, s), 5.41 (1H, t), 6.63 (1H, s), 6.79 (3H, m), 7.11 (2H, m), 7.23 (1H, m), 7.42 (1H, m), 7.55 (4H, m), 7.71 (1H, s), 8.09 (2H, m), 8.32 (1H, s), 9.74 (1H, s)

实施例 23

4-(3-氟苯基)-哌嗪-1-羧酸{5-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基}酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3-氟苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：72.1%

m.p.：186～188℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.25 (3H, t), 2.84 (2H, q), 3.28 (4H, m), 3.67 (4H, m), 4.04 (3H, s), 4.55 (2H, s), 5.39 (1H, t), 6.63 (2H, m), 6.69 (2H, m), 7.22 (4H, m), 7.33 (1H, m), 7.44 (1H, m), 7.63 (4H, m), 8.17 (2H, m), 8.37 (1H, s), 9.66 (1H, s)

实施例 24

4-(3-羟基苯基)-哌嗪-1-羧酸{5-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基}酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3-羟基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反

应程序，得到标题化合物。

收率：70.6%

m.p.：196～198℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.25 (3H, t), 2.80 (2H, q), 3.14 (4H, m), 3.59 (4H, m), 3.98 (3H, s), 4.47 (2H, s), 5.21 (1H, t), 6.28 (1H, d), 6.37 (1H, s), 6.45 (1H, d), 6.61 (1H, m), 7.04 (1H, t), 7.22 (2H, m), 7.44 (2H, m), 7.58 (1H, m), 7.71 (2H, m), 7.75 (1H, m), 8.06 (3H, m), 9.20 (1H, s), 10.27 (1H, s)

实施例 25

4-(3,4,5-三甲氧基苯基)-哌嗪-1-羧酸{5-[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基氨基甲酰基]-6-乙基-2-甲氧基吡啶-3-基}酰胺

使用 2-乙基-5-{[4-(3,4,5-三甲氧基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：66.8%

m.p.：190～192℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.26 (3H, t), 2.85 (2H, q), 3.14 (4H, m), 3.59 (4H, m), 3.78 (3H, s), 3.84 (6H, s), 4.11 (3H, s), 4.57 (2H, s), 5.34 (1H, t), 6.71 (1H, s), 6.77 (2H, s), 7.21 (2H, s), 7.35 (1H, m), 7.65 (4h, m), 7.88 (3H, m), 8.04 (1H, s), 8.14 (2H, m), 8.56 (1H, s), 8.92 (1H, s), 9.07 (1H, s)

实施例 26

N-[(3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基)-5-{[4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-硫羰基]-氨基}-2-乙基-6-甲氧基烟酰胺

使用 5-{[4-(3,5-二甲氧基苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-2-甲基-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：69.8%

m.p.：176～178℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.27 (3H, t), 2.90 (2H, q), 3.32 (4H, m), 3.99 (3H, s), 4.10 (4H, m), 4.53 (2H, s), 5.35 (1H, s), 6.03 (1H, s), 6.05 (2H, d), 6.61 (1H, s), 7.19 (3H, m), 7.39 (1H, m), 7.55 (2H, m), 7.72 (2H, m), 8.11 (4H, m), 9.16 (1H, s)

实施例 27

N-[(3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基)-5-{[4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-硫羰基]-氨基}-2-乙基-6-甲氧基烟酰胺

使用 5-{[4-(3,5-二甲基苯基)-哌嗪-1-硫羰基]-氨基}-2-甲基-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：71.2%

m.p.：170～172℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.28 (3H, t), 2.27 (6H, s), 2.90 (2H, q), 3.28 (4H, m), 3.99 (3H, s), 4.11 (4H, m), 4.55 (2H, s), 5.39 (1H, t), 6.54 (3H, m), 6.70 (1H, s), 7.15 (2H, m), 7.32 (1H, m), 7.47 (1H, m), 7.60 (2H, m), 7.76 (2H, m), 8.02 (1H, s), 8.13 (2H, m), 8.42 (1H, s), 9.70 (1H, s)

实施例 28

N-[(3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基)-5-{[4-(3-氟苯基)-哌嗪-1-硫羰基]-氨基}-2-乙基-6-甲氧基烟酰胺

使用 5-{[4-(3-氟苯基)-哌嗪-1-羰基]-氨基}-2-甲基-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：70.8%

m.p.：176～178℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.26 (3H, t), 2.87 (2H, q), 3.36 (4H, m), 3.94 (3H, s), 4.09 (4H, m), 4.46 (2H, s), 5.21 (1H, t), 6.61 (2H, m), 6.82 (2H, m), 7.26 (4H, m), 7.46 (1H, s), 7.66 (3H, m), 7.71 (1H, s), 8.05 (2H, m), 9.10 (1H, s), 10.27 (1H, s)

实施例 29

N-[(3-(吖啶-9-基-氨基)-5-羟甲基苯基)-5-{4-(3,5-二氯苯基)-哌嗪-1-硫羰基}-氨基]-2-乙基-6-甲氧基烟酰胺

使用 5-{[4-(3,5-二氯苯基)-哌嗪-1-硫羰基]-氨基}-2-甲基-6-甲氧基烟酸和[3-(吖啶-9-基-氨基)-5-氨基苯基]-甲醇进行与实施例 18 相同的反应程序，得到标题化合物。

收率：69.8%

m.p.：174～176℃

^{1}H NMR (DMSO-d_6)：1.26 (3H, t), 2.86 (2H, q), 3.42 (4H, m), 3.93 (3H, s), 4.07 (4H, m), 4.47 (2H, s), 5.2 (1H, t), 6.54 (1H, s), 6.91 (1H, s), 6.99 (2H, m), 7.11 (2H, m), 7.43 (2H, s), 7.58 (3H, m), 7.72 (2H, m), 8.03 (2H, m), 9.09 (1H, s), 10.24 (1H, s)

测试根据本发明在实施例中制备的化合物对肿瘤的药理活性。体外测试化合物对 5 种人肿瘤细胞系和 2 种白血病肿瘤细胞系的抗肿瘤活性。

测试方法和结果如下：

实验 1：对人肿瘤细胞系的体外抗肿瘤作用

A. 肿瘤细胞系： A549 (人非小肺细胞)

SKOV-3 (人卵巢细胞)

HCT-15 (人结肠细胞)

XF-498 (人 CNS 细胞)

SKMEL-2 (人黑素瘤细胞)

B. 方法：SRB 测定法

a. 在 37℃下，使用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基在 5% CO_2 的培养箱中培养人实体肿瘤细胞系，A549 (非小肺细胞)、SKMEL-2 (黑素瘤)、HCT-15 (结肠)、SKOV-3 (卵巢)和 XF-498 (CNS)，并且每周连续转移培养一次或两次。将细胞培养物溶解在 0.25%胰蛋白酶 (trysin)和 3 毫摩尔 CDTA PBS(-)的溶液中，从而分离粘在培养基中的细胞。

b. 向 96 孔板的每个孔中加入 5×10^3～2×10^4 个细胞，并且在 37℃下在 5% CO_2 的培养箱中培养 24 小时。

c. 在少量 DMSO 中溶解每种样品药物，并且用所用的培养基稀释至实验规定的浓度，并且调节 DMSO 的最终浓度在 0.5%以下。

d. 通过抽吸除去上面 b 中培养了 24 小时的每个孔中的培养基。向每个孔中加入在 c 中准备的药物样品各 200 微升，并且培养 48 小时。在加入药物的时间点收集 Tz (时间零点)板。

e. 根据 SPR 测定法，在 Tz 板和培养结束板中进行用 TCA 固定细胞、用 0.4% SRB 溶液染色、用 1%乙酸洗涤，并且用 10 毫摩尔 Tris 溶液洗脱染料，然后在 520 纳米处测量 OD 值。

C. 结果计算

a. 通过在加入药物的时间点测量 SRB 蛋白值来确定时间零点(Tz)值。

b. 用未用药物处理的孔的 OD 值确定对照值(C)。

c. 用药物处理孔的 OD 值确定药物处理试验值(T)。

d. 用生长刺激、从 Tz、C 和 T 值计算的净生长抑制和净杀死来估计药物作用。

e. 如果 $T \geq Tz$，通过 $100\times(T-Tz)/(C-Tz)$来计算细胞响应函数；并且如果 $T < Tz$，通过 $100\ (T-Tz)/Tz$ 来计算。结果表示在下面的表 1 中。

* 参考文献

1) P. Skehan, R. Strong, D Scudiero, A. Monks, J. B. Mcmahan, D. T. Vistica, J. Warren, H. Bokesh, S. Kenney 和 M. R. Boyd: Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 30, 612 (1989).

2) L. V. Rubinstein, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, R. M. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks 和 M. R. Boyd: J. Natl. Cancer Inst., 82, 1113 (1990).

3) P. Skehan, R. Strong, D. Scudiero, A. Monks, J. B. Mcmahan, D. T. Vistica, J. Warren, H. Bokesch, S. Kenney 和 M. R. Boyd.: J. Natl. Cancer Inst., 82, 1107 (1990).

D. 结果

发现本发明的化合物具有与抗人实体肿瘤细胞系的对照，顺铂相等或更优越的抗肿瘤活性 ED_{50}(微克/毫升)。

表 1 ED_{50}(微克/毫升)

实施例号	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF-498	HCT-15
2	0.12	0.12	0.01	0.18	0.19
3	0.12	0.19	0.03	0.18	0.13
9	0.24	0.19	0.15	0.15	0.15
16	0.08	0.14	0.02	0.09	0.07
19	0.21	0.17	0.18	0.38	0.27
顺铂	0.81	0.71	0.71	0.77	3.03

实验 2：对动物白血病细胞的体外抗肿瘤作用

A．材料：

肿瘤细胞系：P388 (小鼠淋巴肿瘤细胞)

B．方法：染料排除测定法

1) 将在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养的 P 388 细胞的浓度调节为每毫升 1×10^6 个细胞/ml。

2) 向细胞培养基中加入浓度以对数剂量比例稀释的每份样品药物，并且在37℃下在5% CO_2的培养箱中培养48小时，然后使用台盼蓝通过染料排除测试测量活细胞数目。

3) 确定每个与对照相比表现出50%细胞生长抑制(IC_{50})的样品化合物的浓度，并列于下面的表2中。

*参考文献

1) P. Skehan, R. Strong, D. Scudiero, A. Monks, J. B. Mcmahan, D. T. Vistica, J. Warren, H. Bokesch, S. Kenney 和 M. R. Boyd.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 30, 612 (1989).

2) L. V. Rubinstein, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, R. M. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks 和 M. R. Boyd.: J. Natl. Cancer Inst., 82, 1113 (1990)

3) P. Skehan, R. Strong, D. Scudiero, J. B. Mcmahan, D. T. Vistica, J. Warren, H. Bokesch, S. Kenney 和 M. R. Boyd.: J. Natl. Cancer Inst., 82, 1107 (1990)

C. 结果

作为本发明的化合物对P388小鼠癌细胞的抗肿瘤活性IC_{50}(微克/毫升)测量的结果，发现所测试的化合物具有等于或高于对照药物丝裂霉素C的抗肿瘤活性。

表2

实施例号	P388 (微克/毫升)
2	0.3
3	1.0
4	0.9
9	0.4
16	0.3
丝裂霉素C	1.1

实验 3：对小鼠白血病 P388 细胞的体内抗肿瘤作用

A．实验材料：使用 BDF1 小鼠

B．实验方法

1) 将在 DBA/2 小鼠内连续转移培养的白血病 P388 细胞以 1×10^6 个细胞/0.1 毫升的剂量移植入一组小鼠中，该组包括 8 只 6 周龄 BDF1 小鼠。

2) 将样品药物溶解在 PBS 中，或者悬浮在 0.5%吐温 80 中，然后分别在第 1、5 和 9 天以各自规定的浓度注射入小鼠的腹腔中。

3) 每天观察，测量所测试的小鼠的存活时间。抗肿瘤活性如下确定：使用每个测试组的平均存活时间计算与对照组相比，药物处理组的平均存活天数的增加率(T/C%)。

结果示于下面的表 3 中。

表 3

实施例号	剂量(mg/kg)	MST(天)	T/C(%)
2	100	22.0	200.0
	50	>60.0	>545.5
	25	>60.0	>545.5
3	100	11.6	100.0
	50	>60.0	>545.5
	25	17.0	154.5

实验 4. 急性毒性试验(LD_{50})

a). 方法：Litchfield-Wilcoxon 方法

在室温，23±1℃和 60±5%的湿度下，用固体饲料和水自由饲养 6 周龄 ICR 小鼠(雄性 30±2.0 克)。向小鼠的腹腔中注射入样品药物。每组包括 6 只小鼠。观察 14 天，记录外观和寿命或它们的死亡。此外，

通过解剖从死亡的小鼠观察可见的损伤。通过 Litchfield-wilcoxon 方法计算 LD_{50} 值。

b) 结果

如下表所示，与顺铂相比，本发明的化合物明显安全，因此可以大大克服已知化合物的许多问题，如剂量的限制、不利的毒性副作用等。

表 4

实施例号	LD_{50} (mg/kg)	
	ip	*iv*
2		80
3		80
顺铂	9.7	

工业应用性

如上所述，相对于已知的抗癌药，本发明的化合物安全得多，并且还具有优越得多的抗肿瘤活性，因此预期该化合物用作新的抗癌药。