



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102796109 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201110133877. 4

5、10-11.

(22) 申请日 2011. 05. 23

CN 102014913 A, 2011. 04. 13, 全文.

(73) 专利权人 复旦大学

US 2007167470 A1, 2007. 07. 19, 全文.

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

US 5747498 A, 1998. 05. 05, 说明书第 1-5
栏.

(72) 发明人 赵伟利 董肖椿 张卫星 王锋

WO 2006081741 A1, 2006. 08. 10, 权利要求

李剑 赵逸超 赵风 王雯

1、17、25-27, 说明书第 1-4、7 页.

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

Venkateshappa Chandregowda,
等. Synthesis and in vitro antitumor
activities of novel 4-anilinoquinazoline
derivatives. 《European Journal of Medicinal
Chemistry》. 2008, 第 44 卷 (第 7 期), 第
3046-3055 页.

务所 (普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

审查员 李军勇

(51) Int. Cl.

C07D 491/107(2006. 01)

C07D 495/10(2006. 01)

C07D 405/12(2006. 01)

A61K 31/517(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101003515 A, 2007. 07. 25, 权利要求

1-2、9、12, 说明书第 1-10 页.

CN 101289445 A, 2008. 10. 22, 权利要求 1、

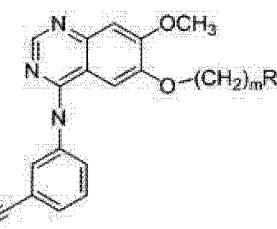
权利要求书3页 说明书8页

(54) 发明名称

4- 氨基喹唑啉化合物及其制备方法和用途

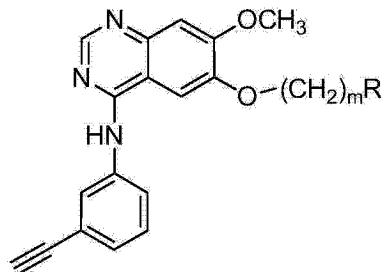
(57) 摘要

本发明属药物合成领域, 涉及通式 (I) 的 4- 氨基喹唑啉化合物, 尤其涉及一种 6 位有四元杂环取代的 4-(3- 乙炔基苯基氨基)-7- 甲氧基 - 喹唑啉类化合物, 及其制备方法和在医学上的应用。本发明的化合物通过体外抗肿瘤活性测试, 结果显示, 所述的化合物具有良好的抗肿瘤活性, 可进一步制备新的抗肿瘤药物。



(I).

1. 4-氨基喹唑啉化合物, 其特征是, 所述的化合物为6位有四元杂环取代的4-(3-乙炔基苯基氨基)-7-甲氧基-喹唑啉类化合物, 具有通式(I)的结构,



(I)

其中

$m = 2$ 或 3 ,



$X = O$,

$Y = O$ 或 NH

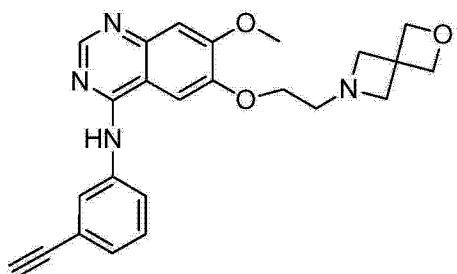
$X_1 = O$ 或 S 或 SO 或 SO_2 ,

$X_2 = CH_2$,

$Y_1 = N$,

$Y_2 = CH_2$ 。

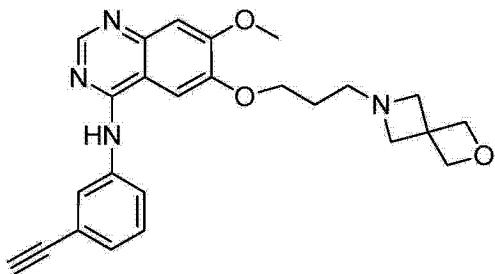
2. 根据权利要求1所述的4-氨基喹唑啉化合物, 其特征是, 所述的化合物为具有下述结构的化合物1,



1

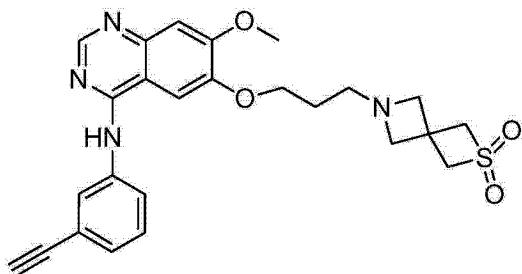
。

3. 根据权利要求1所述的4-氨基喹唑啉化合物, 其特征是, 所述的化合物为具有下述结构的化合物2,



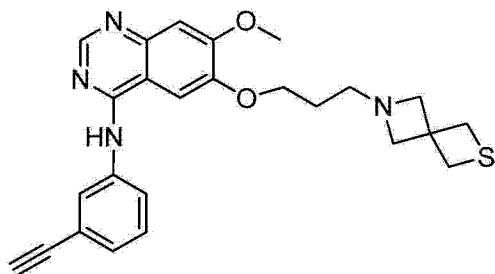
2 .

4. 根据权利要求 1 所述的 4- 氨基喹唑啉化合物, 其特征是, 所述的化合物为具有下述结构的化合物 3,



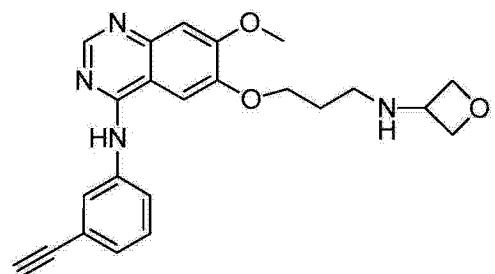
3 .

5. 根据权利要求 1 所述的 4- 氨基喹唑啉化合物, 其特征是, 所述的化合物为具有下述结构的化合物 4,



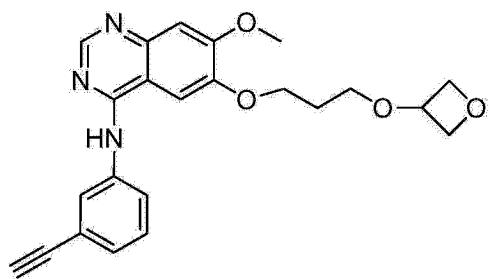
4 .

6. 根据权利要求 1 所述的 4- 氨基喹唑啉化合物, 其特征是, 所述的化合物为具有下述结构的化合物 5,



5 .

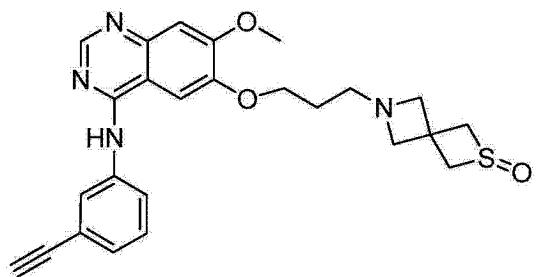
7. 根据权利要求 1 所述的 4- 氨基喹唑啉化合物, 其特征是, 所述的化合物为具有下述结构的化合物 6,



6

。

8. 根据权利要求 1 所述的 4-氨基喹唑啉化合物，其特征是，所述的化合物为具有下述结构的化合物 7，



7

。

9. 权利要求 1 的 4-氨基喹唑啉化合物在制备治疗恶性肿瘤药物中的用途。

10. 按权利要求 9 的用途，其特征在于，所述的恶性肿瘤是酪氨酸激酶功能失调所致的相关肿瘤，其为脑癌、肺癌、肾癌、骨癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈部癌症、食道癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、子宫颈癌或甲状腺癌。

4- 氨基喹唑啉化合物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属药物合成领域,涉及新型的 4- 氨基喹唑啉化合物,制备方法和应用。具体涉及一种 6 位有四元杂环取代的 4-(3- 乙炔基苯基氨基)-7- 甲氧基 - 喹唑啉类化合物,及其制备方法和在医学上的应用。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤已成为严重危害人民生命健康的常见病。据不完全统计,全世界每年约有 2000 万的新发病例;我国每年的新发病例约为 160-200 万,死亡 130 万。统计显示,由于肿瘤早期具有转移的能力,临床确诊的原发肿瘤患者中约 50% 的患者已产生远位转移,且肿瘤细胞增长快、易变异,从而产生多药耐药,导致化疗失败,据有关统计,其中 90% 以上与肿瘤细胞的多药耐药相关。目前临床实践应用的抗肿瘤药物远不能满足治疗的要求。

[0003] 研究显示,酪氨酸激酶受体是参与细胞信号转化的细胞膜上的跨膜蛋白。它们拥有控制诸如细胞生长,变异,血管生成和抑制细胞凋亡等重要功能的生长因子信号,从细胞表面传到细胞内。其中一类这样的酪氨酸激酶受体是表皮生长因子受体(EGFR) 酪氨酸激酶,这些受体在许多人体肿瘤中过度表达,如脑、肺、肾、肝、膀胱、胃、胰腺、乳腺、头颈部、食道、前列腺、结肠、卵巢、子宫颈或甲状腺。

[0004] EGFR 表达于多种肿瘤细胞,它和其配体 EGF 结合后,激活细胞浆部分的激酶,导致 EGFR 羧基端的酪氨酸磷酸化,然后通过不同的信号传导途径调节多种基因的转录,从而调控肿瘤细胞的增值、分化、凋亡等。因此,有关 EGFR 受体酪氨酸激酶抑制剂能阻断癌细胞增值,转移等相关的 EGFR 信号传导,从而达到临床治疗肿瘤的目的。

[0005] 目前市场上有两种 EGFR 激酶抑制剂,其中,吉非替尼(易瑞沙)在 2003 年被美国 FDA 批准用于晚期非小细胞肺癌的治疗;盐酸厄洛替尼(特罗凯)在 2004 年被美国 FDA 批准用于晚期非小细胞肺癌和胰腺癌的治疗。

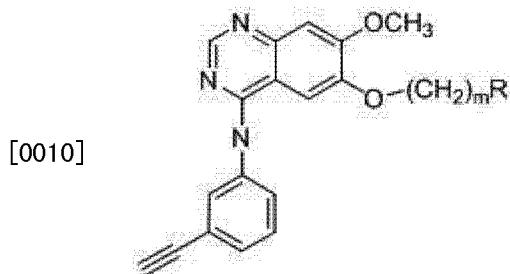
[0006] 尽管上述两种 EGFR 激酶抑制剂显示有不错的疗效,但不断增张的抗药性,以及治疗人群个体之间的差异,迫使人们不断去研究和发展新的安全有效的小分子化合物用以抑制 EGFR 激酶。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供具有良好抗肿瘤活性的新的 4- 氨基喹唑啉化合物,具体涉及一种 6 位有四元杂环取代的 4-(3- 乙炔基苯基氨基)-7- 甲氧基 - 喹唑啉类化合物。

[0008] 本发明的另一目的是提供上述新的 4- 氨基喹唑啉化合物的制备方法,尤其涉及制备 6 位有四元杂环取代的 4-(3- 乙炔基苯基氨基)-7- 甲氧基 - 喹唑啉类化合物的方法。

[0009] 本发明的 4- 氨基喹唑啉化合物具有下述通式(I)的结构:

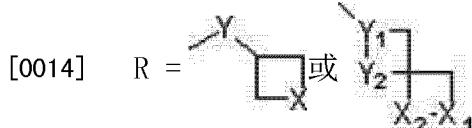


[0011]

(I)

[0012] 其中

[0013] $m = 1$ 或 2 或 3 ,



[0015] $X = \text{CH}_2$ 或 O 或 NH 或 S 或 SO 或 SO_2 ,

[0016] $Y = \text{CH}_2$ 或 O 或 NH 或 S 或 SO 或 SO_2 ,

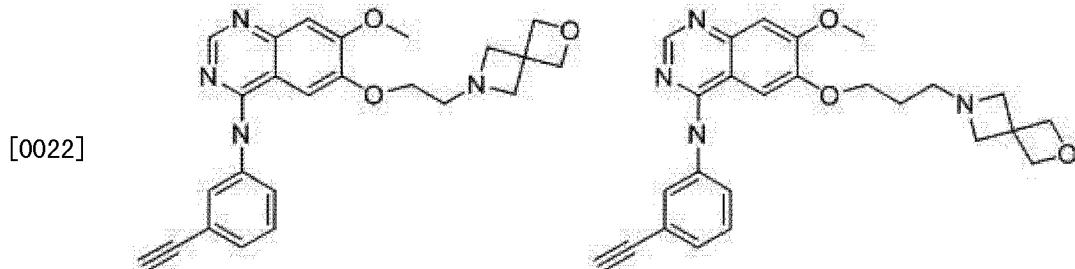
[0017] $X_1 = \text{CH}_2$ 或 O 或 NH 或 S 或 SO 或 SO_2 ,

[0018] $X_2 = \text{CH}_2$ 或 O 或 NH 或 S 或 SO 或 SO_2 ,

[0019] $Y_1 = \text{CH}$ 或 N ,

[0020] $Y_2 = \text{CH}_2$ 或 O 或 NH 或 S 或 SO 或 SO_2 。

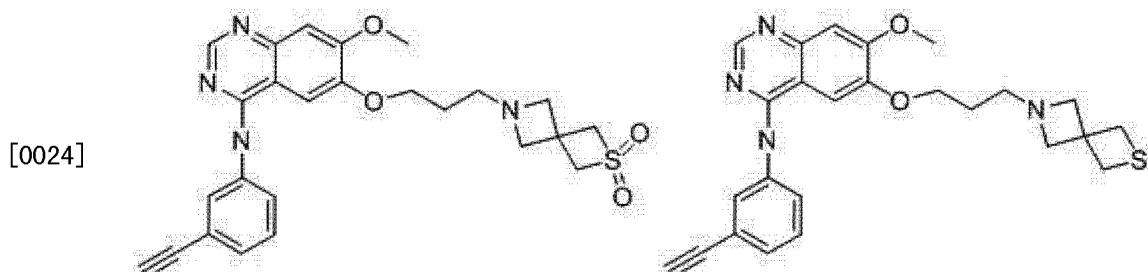
[0021] 本发明中, 优选的化合物具有下述化合物 1、2、3、4、5、6、7 的结构:



[0023]

1

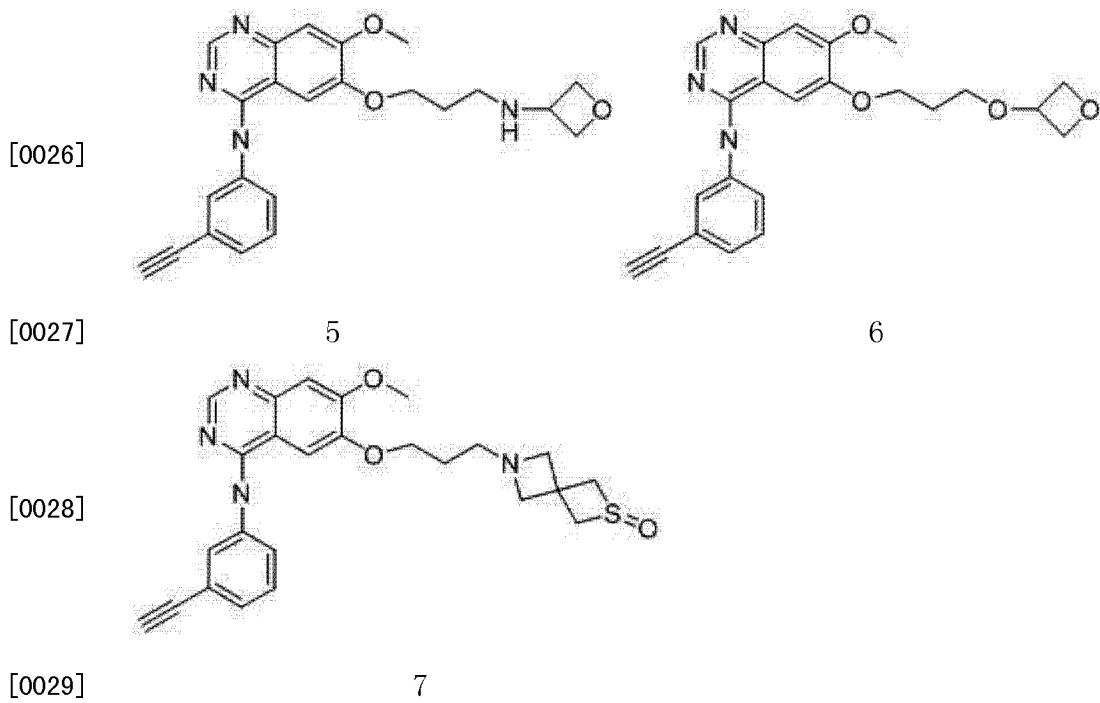
2



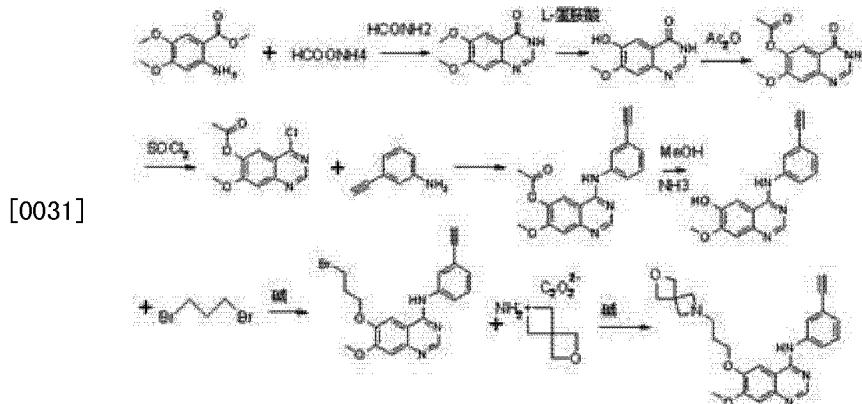
[0025]

3

4



[0030] 本发明中,以化合物 2 为例,其制备过程如下:



[0032] 本发明所述的化合物通过体外抗肿瘤活性测试,结果显示,所述的化合物具有良好的抗肿瘤活性,可进一步研制开发为新型的抗肿瘤药物。

[0033] 本发明通过初步药效学研究,对 A549 肺癌肿瘤株和 BXPC3 胰腺癌肿瘤株进行体外抗肿瘤活性测试,结果显示,其中化合物化合物 1、2、4 和 6 对于 A549 肺癌肿瘤株的体外抗肿瘤 IC_{50} 值均小于 $1 \mu M$,化合物 1、2 和 7 对于 BXPC3 胰腺癌肿瘤株的体外抗肿瘤 IC_{50} 值均小于 $3 \mu M$,优于或相当阳性对照抗肿瘤药物埃罗替尼,结果表明,本发明所述的化合物具有较好的抗肿瘤活性,可以进一步研制开发新型抗肿瘤药物。

[0034] 本发明中,所采用的药效学试验方法,是本领域技术与人员所熟知的方法;

[0035] 本发明中,所采用的肺癌肿瘤株和胰腺癌肿瘤株是本领域技术可通过市购的途径所获得的。

[0036] 本发明的 4-氨基喹唑啉化合物尤其可制备治疗恶性肿瘤药物,鉴于酪氨酸激酶受体是参与细胞信号转化的细胞膜上的跨膜蛋白。它们拥有控制诸如细胞生长,变异,血管生成和抑制细胞凋亡等重要功能的生长因子信号,从细胞表面传到细胞内。其中的酪氨酸激酶受体是表皮生长因子受体(EGFR) 酪氨酸激酶,这些受体在许多人体肿瘤中过度表达,

如脑、肺、肾、肝、膀胱、胃、胰腺、乳腺、头颈部、食道、前列腺、结肠、卵巢、子宫颈或甲状腺。故，本发明所述的恶性肿瘤包括酪氨酸激酶功能失调所致的相关肿瘤，包括脑癌、肺癌、肾癌、骨癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈部癌症、食道癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、子宫颈癌或甲状腺癌。

具体实施方式

[0037] 实施例 1：合成化合物 1，(3-乙炔基-苯基)-{7-甲氧基-6-[3-(2-氧杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷-6-基)-乙氧基]- 噻唑啉-4-基}-胺

[0038] 1) 合成 6,7-二甲氧基-3H- 噻唑啉-4-酮

[0039] 2-氨基-4,5-二甲氧基安息香酸甲酯 (31.5g, 149.1mmol) 和甲酸胺 (9.45 g, 149.0 mmol) 在甲酰胺 (105ml) 溶液，在 200 ° C 加热反应 2 小时。然后冷却至室温，过滤反应液，滤饼用水洗，干燥后得到产物 (26.3 g, 85.6 %)。

[0040] 2) 合成 6-羟基-7-甲氧基-3H- 噻唑啉-4-酮。

[0041] 将 6,7-二甲氧基-3H- 噻唑啉-4-酮 (26.3 g, 127.5mmol) 和 L-蛋氨酸 (22.8 g, 153.0 mmol) 加入到放有甲磺酸 (175.0 mL) 溶液 的反应瓶中，然后加热在 100 ° C 搅拌反应 22 小时至反应结束。冷却反应液到室温后，将反应液倒入盛有 1L 冰的容器中，继续用 40 % NaOH 溶液中和，有固体生成。收集滤饼并水洗后干燥，得到产品 (23.6 g, 96.3 %)。

[0042] 3) 合成 7-甲氧基-4-酮-3,4-二氢- 噻唑啉-6-羟基醋酸酯。

[0043] 在反应瓶中加入 6-羟基-7-甲氧基-3H- 噻唑啉-4-酮 (23.1 g, 120.0 mmol) , 180.0 mL 醋酸酐和 23.1mL 吡啶。加热在 100 ° C 反应三小时至反应结束。将反应液倒在盛有 1L 冰的容器中搅拌 30 分钟，收集固体并干燥，得到白色产品 (16.7 g, 59.4 %)。

[0044] 4) 合成 4-氯-7-甲氧基- 噻唑啉-6-羟基醋酸酯。

[0045] 在反应瓶中加入 7-甲氧基-4-酮-3,4-二氢- 噻唑啉-6-羟基醋酸酯 (16.7 g, 71.3 mmol) 和 23.0 mL SOCl₂ , 以及 0.1 mL DMF。在 100 ° C 下加热反应三小时。反应结束后，浓缩反应液，在油状物中加入 100.0 mL 乙酸乙酯并搅拌 30 分钟，收集固体。将固体用饱和 NaHCO₃ 溶液 (300 mL) 中和，然后用乙酸乙酯提取混合液。将有机相合并后干燥，经浓缩得到产品 (6.9 g)。

[0046] 5) 合成 4-(3-乙炔基-苯基胺)-7-甲氧基- 噻唑啉-6-羟基醋酸酯。

[0047] 在反应瓶中 4-氯-7-甲氧基- 噻唑啉-6-羟基醋酸酯 (6.4 g, 25.3 mmol) , 130.0 mL 异丙醇和 3-乙炔基-苯胺 (2.96 g, 25.3 mmol)。在 110 ° C 加热反应三小时至反应结束。冷却反应液至室温，过滤反应液，得到的固体滤饼就是产品 (8.43 g, 100 %)。

[0048] 6) 合成 4-(3-乙炔基-苯基胺)-6-羟基-7-甲氧基- 噻唑啉

[0049] 在反应瓶中加入 4-(3-乙炔基-苯基胺)-7-甲氧基- 噻唑啉-6-羟基醋酸酯 (11.11g, 33.3mmol), 330.0 mL 甲醇 和氨水 (15M, 22.2 mL, 33.3 mmol)。室温搅拌反应 18 小时后，继续在 100 ° C 加热反应 1.5 小时。反应液冷却至室温后，收集滤饼干燥后，得到产品 (7.92 g, 83%)。

[0050] 7) 合成 [6-(3-溴-丙氧基)-7-甲氧基- 噻唑啉-4-基]-(3-乙炔基-苯

基)-胺。

[0051] 在反应瓶中加入 4-(3-乙炔基-苯基胺)-6-羟基-7-甲氧基-喹唑啉 (100 mg), K_2CO_3 (500 mg,) , 1,3-二溴丙烷 (0.3 ml) 和 10 ml 乙腈。在 100° C 和微波下加热反应 30 分钟。将反应液过滤后,浓缩滤液得到油状物,50ml 石油醚加入油状物中搅拌 30 分钟,过滤得到黄色滤饼即为产品 (60 mg).

[0052] 8) 合成 [6-(2-溴-乙氧基)-7-甲氧基-喹唑啉-4-基]- (3-乙炔基-苯基)-胺。

[0053] 在反应瓶中加入 4-(3-乙炔基-苯基胺)-6-羟基-7-甲氧基-喹唑啉 (100 mg), K_2CO_3 (500 mg,) , 1,2-二溴乙烷 (0.3 ml) 和 10 ml 乙腈。在 100° C 和微波下加热反应 30 分钟。将反应液过滤后,浓缩滤液得到油状物,50ml 石油醚加入油状物中搅拌 30 分钟,过滤得到黄色滤饼即为产品 (45 mg).

[0054] 9) 合成化合物 1, (3-乙炔基-苯基)-{7-甲氧基-6-[3-(2-氧杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷-6-基)-乙氧基]- 喹唑啉-4-基}-胺

[0055] 在反应瓶中加入 [6-(2-溴-乙氧基)-7-甲氧基-喹唑啉-4-基]- (3-乙炔基-苯基)-胺 (50 mg), 乙腈(10ml), Na_2CO_3 (250 mg) 和 2-氧杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷草酸盐 (50 mg)。在 70° C 加热反应 1 小时,由制备 HPLC 得到产品 (14 mg)。 LC-MS (m/z) : 417 (M+)。 ^1H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) : 2.81 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 2H), 3.40 (s, 4H), 3.95 (s, 3H), 4.08 (t, $J=6\text{Hz}$, 2H), 4.21 (s, 1H), 4.62 (s, 4H), 7.21 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.99 (m, 1H), 8.51 (s, 1H), 9.48 (s, 1H)。 ^{13}C NMR (CD₃OD, 400 MHz) : 39.560, 55.152, 56.729, 64.016, 67.681, 77.330, 80.832, 82.948, 101.935, 105.822, 109.045, 122.828, 125.610, 127.298, 128.485, 139.249, 146.387, 148.387, 152.541, 155.386, 157.020。

[0056] 实施例 2:合成化合物 2, (3-乙炔基-苯基)-{7-甲氧基-6-[2-(2-氧杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷-6-基)-丙氧基]- 喹唑啉-4-基}-胺

[0057] 在反应瓶中加入 [6-(3-溴-丙氧基)-7-甲氧基-喹唑啉-4-基]- (3-乙炔基-苯基)-胺 (50 mg), 乙腈(10ml), Na_2CO_3 (250 mg) 和 2-氧杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷草酸盐 (50 mg)。在 70° C 加热反应 1 小时,由制备 HPLC 得到产品 (34 mg)。 LC-MS (m/z) : 431 (M+)。 ^1H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) : 1.81 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 2H), 2.49 (m, 2H), 3.28 (s, 4H), 3.94 (s, 3H), 4.15 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 2H), 4.21 (s, 1H), 4.60 (s, 4H), 7.21 (m, 2H), 7.41 (t, $J=8\text{Hz}$, 1H), 7.82-7.99 (m, 3H) , 8.50 (s, 1H), 9.53 (s, 1H)。 ^{13}C NMR (CD₃OD, 400 MHz) : 26.71, 38.859, 55.126, 55.401, 62.938, 66.690, 77.360, 80.853, 82.992, 101.897, 105.757, 109.099, 122.774, 125.539, 127.237, 128.471, 139.282, 146.202, 148.962, 152.420, 155.321, 156.928。

[0058] 实施例 3:合成化合物 3, {6-[3-(2-砜杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷-6-基)-丙氧基]-7-甲氧基-喹唑啉-4-基}- (3-乙炔基-苯基)-胺

[0059] 在反应瓶中加入 [6-(3-溴-丙氧基)-7-甲氧基-喹唑啉-4-基]- (3-乙炔基-苯基)-胺 (50 mg), 乙腈(10ml), Na_2CO_3 (250 mg) 和 2-砜杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷草酸盐 (50 mg)。在 70° C 加热反应 1 小时,由制备 HPLC 得到产品 (6 mg)。 LC-MS (m/z) : 479 (M+)。 ^1H NMR (CD₃OD, 400 MHz) : 1.98 (m, 2H), 2.75-2.79 (m, 2H), 3.52 (m, 4H),

4.01(s, 3H), 4.23(m, 2H), 4.30(m, 4H), 7.19(s, 1H), 7.21–7.29(m, 1H), 7.40(t, J=8Hz, 1H), 7.74–7.80(m, 2H), 7.93(m, 1H), 8.45(s, 1H)。¹³C NMR (CD₃OD, 400 MHz): 24.818, 26.760, 55.169, 64.065, 66.722, 72.952, 77.304, 102.015, 105.799, 109.179, 122.859, 125.684, 127.355, 128.513, 139.243, 146.322, 149.098, 152.490, 155.480, 157.116。

[0060] 实施例4:合成化合物4, (3-乙炔基-苯基)-{7-甲氧基-6-[3-(2-硫杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷-6-基)-丙氧基]-喹唑啉-4-基}-胺

[0061] 在反应瓶中加入[6-(3-溴-丙氧基)-7-甲氧基-喹唑啉-4-基]-(3-乙炔基-苯基)-胺(50 mg), 乙腈(10ml), Na₂CO₃ (250 mg) 和2-硫杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷草酸盐(50 mg)。在70°C加热反应1小时,由制备HPLC得到产品(9 mg)。LC-MS (m/z): 447(M+)。¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 1.95(m, 2H), 2.74(m, 2H), 3.34(m, 4H), 3.50(m, 4H), 3.59(s, 1H), , 4.02(s, 3H), 4.23(t, J=6Hz, 2H) , 7.19(s, 1H), 7.28(m, 1H), 7.39(t, J=8Hz, 1H), 7.75–7.80(m, 2H), 7.92(s, 1H), 8.45(s, 1H)。¹³C NMR (CD₃OD, 400 MHz): 26.391, 35.740, 43.307, 48.09355.177, 55.270, 66.742, 77.313, 82.926, 102.061, 105.819, 109.158, 122.767, 125.634, 127.313, 128.490, 139.257, 146.296, 148.932, 152.488, 155.361, 157.049。

[0062] 实施例5:合成化合物5, (3-乙炔基-苯基)-{7-甲氧基-6-[3-(杂氧环丁烷-3-基氨基)--丙氧基]-喹唑啉-4-基}-胺

[0063] 在反应瓶中加入[6-(3-溴-丙氧基)-7-甲氧基-喹唑啉-4-基]-(3-乙炔基-苯基)-胺(50 mg), 乙腈(10ml), Na₂CO₃ (250 mg) 和3-氨基杂氧环丁烷(50 mg)。在100°C微波加热反应1小时,由制备HPLC得到产品(3 mg)。LC-MS (m/z): 405(M+)。¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 2.15(m, 3H), 2.85(m, 2H), 3.56(s, 1H), 4.00(m, 2H), 4.05(s, 3H), 4.28(m, 2H), 4.55(m, 2H), 7.23(s, 1H), 7.30(m, 1H), 7.40(m, 1H), 7.75–7.95(m, 3H), 8.45(s, 1H)。

[0064] 实施例6:合成化合物6, (3-乙炔基-苯基)-{7-甲氧基-6-[3-(杂氧环丁烷-3-基氧基)--丙氧基]-喹唑啉-4-基}-胺

[0065] 在反应瓶中加入[6-(3-溴-丙氧基)-7-甲氧基-喹唑啉-4-基]-(3-乙炔基-苯基)-胺(50 mg), 乙腈(10ml), Na₂CO₃ (250 mg) 和3-羟基杂氧环丁烷(50 mg)。在100°C微波加热反应1小时,由制备HPLC得到产品(17 mg)。LC-MS (m/z): 406(M+)。¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 2.19(m, 3H), 3.56(s, 1H), 3.67(m, 2H), 4.05(s, 3H), 4.41(m, 2H), 4.63(m, 4H), 7.25(s, 1H), 7.36(m, 1H), 7.44(t, J=8Hz, 1H), 7.75(m, 1H), 7.40(m, 1H), 7.91(m, 2H), 8.59(s, 1H)。

[0066] 实施例7:合成化合物7, (3-乙炔基-苯基)-{7-甲氧基-6-[3-(2-亚砜杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷-6-基)-丙氧基]-喹唑啉-4-基}-胺

[0067] 在反应瓶中加入[6-(3-溴-丙氧基)-7-甲氧基-喹唑啉-4-基]-(3-乙炔基-苯基)-胺(50 mg), 乙腈(10ml), Na₂CO₃ (250 mg) 和2-亚砜杂-6-氮杂-螺[3.3]庚烷草酸盐(50 mg)。在100°C微波加热反应1小时,由制备HPLC得到产品(6 mg)。LC-MS (m/z): 463(M+)。¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 1.99(m, 2H), 2.99(m, 2H), 3.33(m, 2H), 3.65(m, 4H), 3.98(m, 2H), 4.01(s, 3H), 4.24(m, 2H), 7.18(s, 1H), 7.21–7.27(m, 1H),

7.37 (m, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.80 (m, 1H), 8.00 (m, 1H), 8.45 (s, 1H)。¹³C NMR (CD₃OD, 400 MHz): 26.081, 30.755, 55.023, 60.741, 64.165, 65.165, 66.677, 77.347, 82.883, 102.119, 105.833, 109.150, 122.803, 125.675, 127.392, 128.520, 139.208, 146.269, 148.860, 152.526, 155.349。

[0068] 实施例 8 :体外抗肿瘤细胞活性测试

[0069] 体外抗肿瘤细胞活性测试采用磺基罗丹明 B (sulfo-hodamine B, SRB) 染色法。SRB 法敏感、准确、特别适用于大规模药物筛选等优点,已被美国国立肿瘤研究所 (NCI) 列为标准的抗肿瘤筛选方法之一。SRB 是一种蛋白质结合染料,可与蛋白质中的碱性氨基酸结合,其颜色的变化与活细胞中的蛋白成正比。

[0070] 取处于指数增长期的肿瘤细胞种在 96 孔板里,培养 24 h 使细胞贴壁,去除上清,加 200 μL / 孔带药新鲜培养基:化合物事先溶解在 DMSO 或者生理盐水里,当测试时用完全培养基稀释成所需浓度。每个浓度设 6 个复孔,并设空白对照孔(只加培养基)和阴性对照,同样设 6 个复孔。继续培养至试验设计时间,终止培养,去除上清,每孔加 10% 三氯乙酸 200 μL,4℃ 条件固定 1 h。用二次蒸馏水冲洗 5 遍,自然晾干后每孔加入 4 mg / mL SRB 溶液,室温下染色 15min,弃上清,用 1% 乙酸冲洗 5 遍以去除非特异性结合的染料。每孔加入 100 μL 10mM Tris 溶液,在 A490 波长下测 OD 值,并按下列公式计算被测物对癌细胞生长的抑制率。

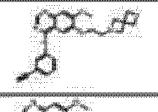
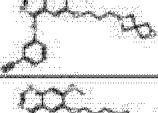
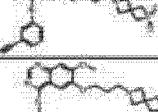
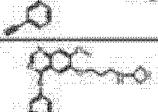
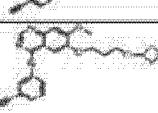
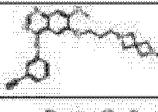
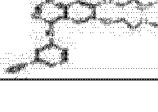
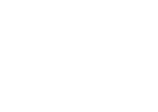
$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{治疗组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

[0072] 并以化合物浓度的对数和抑制率作回归方程,计算 IC₅₀,结果表明,本发明中化合物显示出较好的抗肿瘤的活性(如表 1 所示),对于 A549 肺癌肿瘤株和 BXPC3 胰腺癌肿瘤株具有体外抗肿瘤活性,其中化合物 1、2、4 和 6 对于 A549 肺癌肿瘤株的体外抗肿瘤 IC₅₀ 值均小于 1 μM,化合物 1、2 和 7 对于 BXPC3 胰腺癌肿瘤株的体外抗肿瘤 IC₅₀ 值均小于 3 μM,优于或相当阳性对照抗肿瘤药物埃罗替尼,本发明的化合物可以进一步研制开发新型抗肿瘤药物。

[0073] 表 1 是本发明化合物的抗肿瘤细胞活性结果。

[0074] 表 1

[0075]

化合物	化学结构式	抑制A549肺癌	
		细胞活性	
		IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
1		0.78	2.77
2		0.864	0.965
3		22.4	—
4		0.0536	33.8
5		4.89	65.1
6		0.00354	—
7		—	0.0243
埃罗替尼		0.282	1.48