

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01815934.6

[51] Int. Cl.

C07D 207/40 (2006.01)

C07D 209/42 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 235/24 (2006.01)

C07C 235/38 (2006.01)

C07D 213/69 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1315805C

[51] Int. Cl. (续)

C07D 213/64 (2006.01)

C07C 271/26 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2001.9.19 [21] 申请号 01815934.6

[30] 优先权

[32] 2000.9.19 [33] US [31] 09/666,160

[86] 国际申请 PCT/US2001/029160 2001.9.19

[87] 国际公布 WO2002/030894 英 2002.4.18

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.19

[73] 专利权人 斯皮罗根公司

地址 英国怀特岛

[72] 发明人 摩西·李

[56] 参考文献

US5985908A 1999.11.16

WO99/19298A1 1999.4.22

US6060608A 2000.5.9

US5843937A 1998.12.1

审查员 刘广南

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

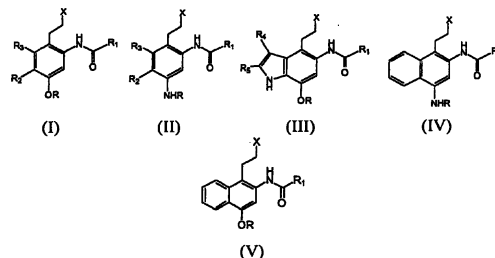
权利要求书 5 页 说明书 129 页

[54] 发明名称

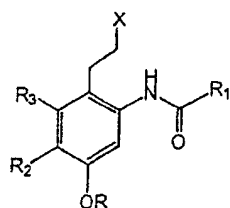
CC-1065 和多卡米新的非手性类似物的组合
物及其使用方法

[57] 摘要

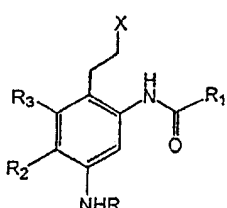
本发明涉及新的 DNA 小沟和序列选择性烷化剂 (+) - CC1065 和多卡米新的非手性 seco - 类似物, 如通式 (I)、(II)、(III)、(IV) 和 (V) 所示, 其中 X 为良好的离去基团, 如氯化物、溴化物、碘化物、甲磷酸酯、甲苯磺酸酯、乙酸酯、季铵部分、硫醇、烷基次硫酸基或烷基磺酰基, 优选为氯化物、溴化物或碘化物基团, R₁ 为增强非手性 seco - 环丙烷吡啶 (CI) 或非手性 seco - 多卡米新与特定的 DNA 序列的相互作用的适宜的小沟结合剂, R 和 R₂ - R₅ 在权利要求 1 中定义。



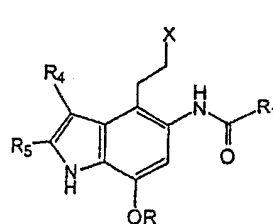
1. 下式的化合物



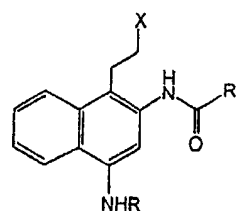
通式 I



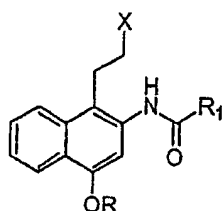
通式 II



通式 III



通式 IV

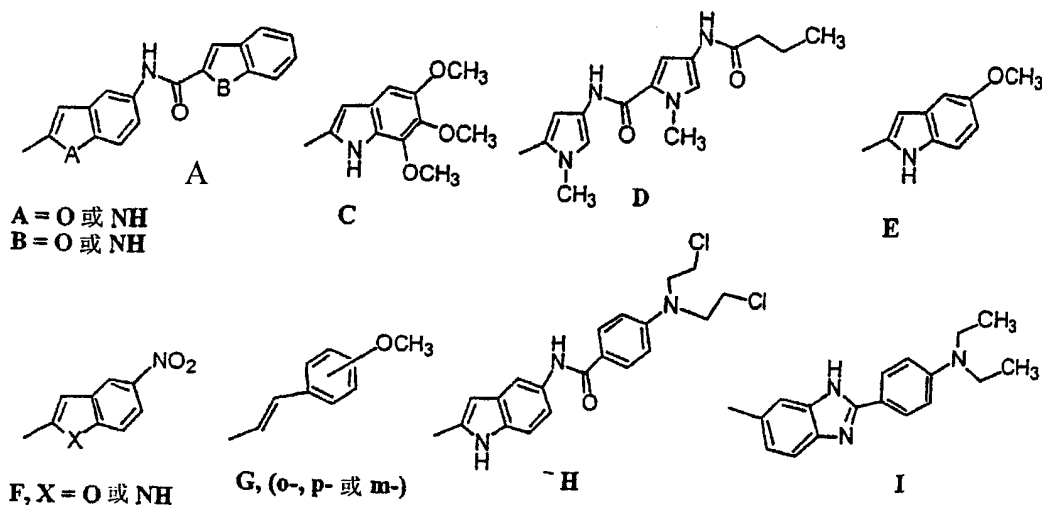


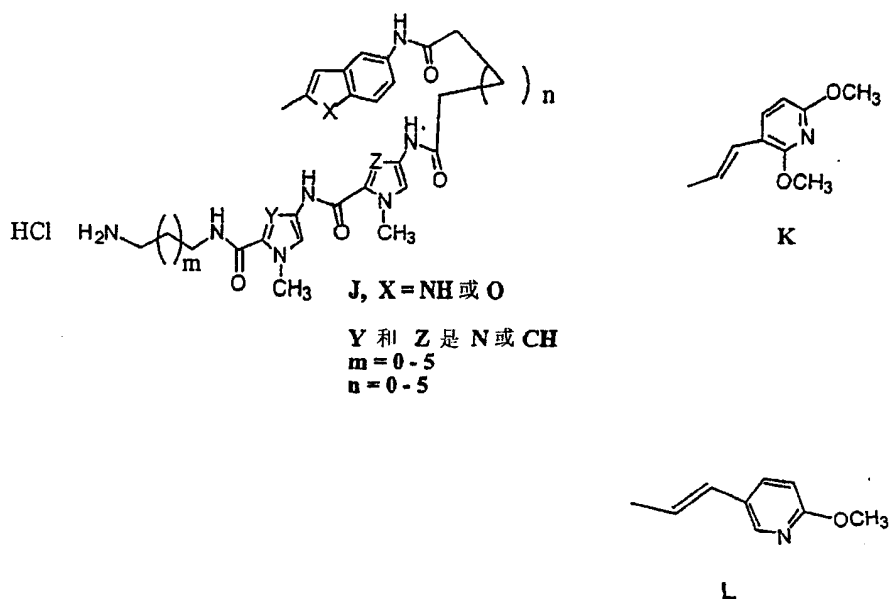
通式 V

其中：

X 为选自氯、溴、碘、巯基、季铵部分、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、乙酸酯、C₁-C₆ 烷基次硫酰基和 C₁-C₆ 烷基磺酰基的离去基团；

R₁ 为选自叔丁氧基、苄氧基、9-芴基甲氧基和如下所示的基团 A、C、D、E、F、G、H、I、J、K 和 L 的适宜小沟结合剂；





R₂ 和 R₃ 选自氢、C₁—C₅ 烷基和己基；

R₄ 和 R₅ 选自氢原子、三氟甲基部分和甲氧羰基；

R 选自苄基、苄氧羰基、氢原子、4-硝基苄氧羰基和 N'-甲基哌嗪基-N-羰基。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 X 为氯、溴或碘。

3. 权利要求 1 的化合物，其中 R₂ 和 R₃ 均为氢。

4. 权利要求 1 的化合物，其中 R₄ 和 R₅ 独立地为甲氧羰基或三氟甲基。

5. 根据权利要求 1 的化合物，其中 R₂ 和 R₃ 为直链或支链 C₁—C₅ 烷基，其包括乙基、丙基、丁基或戊基。

6. 一种适于治疗对烷化剂治疗敏感的癌症的药物组合物，所述组合物包含权利要求 1 的化合物及药学可接受的载体。

7. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物选自：

N-(2-(2-氯乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺

N-(2-(2-溴乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺

N-[2-(2-溴乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)苯基]-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰

胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺

4-(2-氯乙基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吡啶-2-酰胺基]
苯酚

4-(2-氯乙基)-3-(5-硝基吡啶-2-酰胺基)苯酚

4-(2-氯乙基)-3-[[5-[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]苯并呋喃-2-
酰胺基]吡啶-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲
酰胺基]吡啶-2-酰胺基]苯酚

4-(2-溴乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶
-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-O-(N-甲基哌嗪-N'-氨基甲酰基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰
胺基)吡啶-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]苯酚

4-(氯乙基)-3-[2-(4-N,N-(二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)苯酚

4-(2-氯乙基)-3-(5-甲氧基吡啶-2-酰胺基)苯酚

4-(2-氯乙基)-3-(2-甲氧基肉桂酰胺基)苯酚

4-(2-氯乙基)-3-(3-甲氧基肉桂酰胺基)苯酚

4-(2-氯乙基)-3-(4-甲氧基肉桂酰胺基)苯酚

4-(2-氯乙基)-3-(2,6-二甲氧基-5-吡啶基)-E-乙烯-1-基酰胺基)苯酚

4-(2-氯乙基)-7-羟基-5-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)吡啶-2,3-二羧
酸二甲酯

4-(2-氯乙基)-7-羟基-5-[5-(苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]吡啶
-2,3-二羧酸二甲酯

4-(2-氯乙基)-7-羟基-2-三氟甲基-5-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)吡
啶-3-羧酸甲酯

4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯胺
4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)-1-萘胺
N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺盐酸盐
N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基咪唑-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺盐酸盐
N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基咪唑-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺盐酸盐
4-(2-氯乙基)-3-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)-1-萘胺
4-(2-氯乙基)-3-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)-1-萘胺
4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]-1-萘胺
4-(2-氯乙基)-3-(5-甲氧基吲哚-2-酰胺基)-1-萘胺
N-(丁氧羰基)-4-(2-氯乙基)-3-硝基-1-萘胺
4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)-1-萘酚, 和
O-苄基-4-(2-氯乙基)-3-(丁氧基酰胺基)苯酚。

8. 权利要求 7 的化合物, 其中该化合物为 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)-1-萘胺。

9. 权利要求 7 的化合物, 其中该化合物为 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯酚。

10. 权利要求 1 的化合物用于制备抗癌烷化剂的用途。

11. 权利要求 10 的用途, 其中该抗癌烷化剂用于以约 0.1 至约 100 mg/kg 患者体重的量给药。

12. 一种将权利要求 1-9 之任一项目的非手性断裂烷基化药效团递送至选择性 DNA 序列的体外方法, 所述方法包括将该药效团缀合于

DNA 小沟结合剂以形成缀合物，并使该选择性序列与该缀合物接触足以完成该缀合物与该选择性序列的结合的时间。

CC-1065 和多卡米新的非手性类似物的组合物及其使用方法

相关申请

本申请为美国专利申请 09/666,160 的部分继续申请, 该申请引入本文作参考。

技术领域

本发明涉及新的(+)-CC1065 和多卡米新(duocarmycins)的非手性 *seco*-类似物和含有所述非手性类似物的药物组合物。(+) -CC1065 和多卡米新的非手性类似物用作抗癌药。

背景技术

近来受到很大关注的一类化合物是通过烷基化特定的 DNA 序列而发挥它们的抗癌活性的 DNA 小沟结合剂(1a)。小沟相互作用试剂比嵌入剂和大沟结合剂更具吸引力, 因为小沟一般仅被水合作用隆起(spine of hydration)侵占, 因而抗癌药更易接近。另外, 小沟中的共价修饰对细胞的毒性一般大于它们的大沟烷基化对应物, 如他莫司汀对 L-苯基丙氨酸芥子(1b)。具有有效的抗癌活性的小沟和 AT 序列选择性烷基化剂的实例是(+)-CC-1065(1c、d、e、2)和多卡米新(2、3)。CC-1065 和多卡米新, 例如(+)-多卡米新 SA (或 DUMSA) (2)和表 1 所述的物质, 属于一组天然产物, 具有不可思议的有效的细胞毒性(在抗培养物中的小鼠 L1210 白血病细胞生长的 PM 范围内的计算(ca.) IC₅₀ 值)

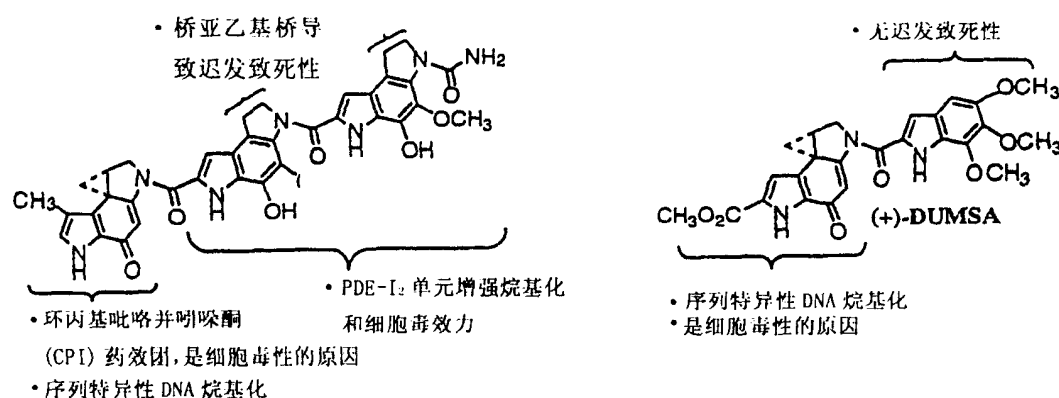


表 1. (+)-CC1065 和多卡米新 SA (DUMSA) 的结构和生物性质的概要

这些化合物分别从泽耳链霉菌(*Streptomyces zelensis*)(4)和链霉菌属(*Streptomyces sp.*)(5)的发酵肉汤中分离, 主要通过特定的 DNA 序列的小沟中的腺嘌呤-N3 基团反应而获得它们的抗癌活性。从热切割的 DNA 药物加合物中分离腺嘌呤-CC1065 加合物(6)和腺嘌呤-多卡米新 SA 加合物(7)证实了腺嘌呤-N3 共价反应。(+) -CC1065 表现出对烷基化侧翼具有 5'-A 或 5'-T 残基的腺嘌呤-N3 基团的优先选择。对三种富含碱基 AT 的烷基化位点的序列优先选择的顺序为: 5'-AAAA = 5'-TTAA > 5'-TAAA > 5'-ATAA (烷基化位点由下划线碱基表示)。此外, 该化合物表现出对第四个 5'-碱基是 A 或 T 残基的强烈优先选择, 对第五个 5'-碱基是 A 或 T 碱的较弱的优先选择, 对烷基化位点前的 3'-碱基是嘌呤的弱的优先选择。对于(+)-CC-1065, 提出了共有序列 5'-PuNTTAA-3'和 5'-AAAAA-3' (6,8)。虽然(+)-CC1065 和(+)-DUMSA 一般具有类似的序列选择性, 但观察到了某些细微的差异, 特别是 CC1065 缺乏在 5'-GCAAAA 的烷基化(2、3、7)。

CC1065 和多卡米新与特定的 DNA 序列反应的机理仍是一个激烈争议的主题(9)。对于它们的序列选择性 DNA 烷基化, 已经提出了两种模型。Boger 小组提出的“非共价结合模型”建议稳定 DNA 烷基化的力是 CC1065 的环丙基吡咯并吡啶酮(CPI)亚单元和 DNA 的腺嘌呤-N3 之间的空间电子控制的共价键形成, 和稳定来自 CC1065 的

PDE-1 亚单元和 DUMSA 的 TMI (三甲氧基咪唑)单元的疏水和范德华接触的非共价相互作用的组合(9)。在 Hurley 及其同事提出的“烷基化位点模型”中(10)，化合物如(+)-CC1065 的共价序列特异性归因于共有序列的独特构象特征，在所述共有序列中序列具有足够的柔性以采用用于识别药物分子的瞬间弯曲构象。而且，独特构象提供可以通过一般酸催化活化 CPI 系统的磷酸盐上的酸性质子。在任一种情况下，¹H-NMR 研究都表明，(+)-CC1065 有效地烷基化双链体 5'-GGCGGAGTTAGG-3'的腺嘌呤-N3(在斜体字序列中带下划线的 A 残基上烷基化)，并诱导 TTA 序列上的 17-22°弯曲(11)。类似地，用 d-(GACTAATTGAC). d-(GTCATTAGTC)的 DUMSA 的¹H-NMR 研究同样表明，药物在与小沟结合时发生显著的构象变化，这随后提高它的共价活性(11d)。已推测 DNA 的这些构象变化在 DNA 中俘获可能与基团表达和复制的生物控制有关的结构(12)。最近报道了关于用于 DNA 烷基化的多卡米新 SA 药效团的活化的密度功能和从头开始研究(13)。在该研究中，作者发现二氢咪唑-酰氨基-N-键(X₂)的扭转不足以解释与溶剂解相比 DNA 烷基化的百万倍增强。

即使(+)-CC1065 具有强力细胞毒性质，它作为抗癌药的有用性受阻于其治疗剂量下小鼠中迟发致死性的限制的毒性(4b)。有趣地，DUMSA 不存在这种毒副作用(2a)，而且它具有最大的溶剂解稳定性且在这类化合物中最有效(2、14)。借助于由 Upjohn 科学家合成的大量 CC1065 类似物(1a、b、4c)，已明确定义了构效关系(10b、11)，且发现桥亚乙基桥(见图 1)是不期望的迟发致死性的原因。这些桥亚乙基参加与小沟底上的腺嘌呤-H2 原子的有利的范德华和疏水相互作用，其稳定药物-DNA 复合物(11a、b)。已提出(+)-CC1065 及其 CDPI2 类似物(见表 2)的迟发致死性是它们不能“可逆地”烷基化 DNA 的结果(7、15)。由于桥亚乙基导致的这些化合物的强非共价结合可以防止烷基化发生后的逆反应(7、15a)，或者保持药物结合以使其再烷基

化相同的位点(15b)。与此建议一致,缺少桥亚乙基桥的 CC1065 类似物,如阿多来新(15b)和 DUMSA (15a、16),不存在迟发毒性的问题,但它们仍表现出有效的抗癌活性。

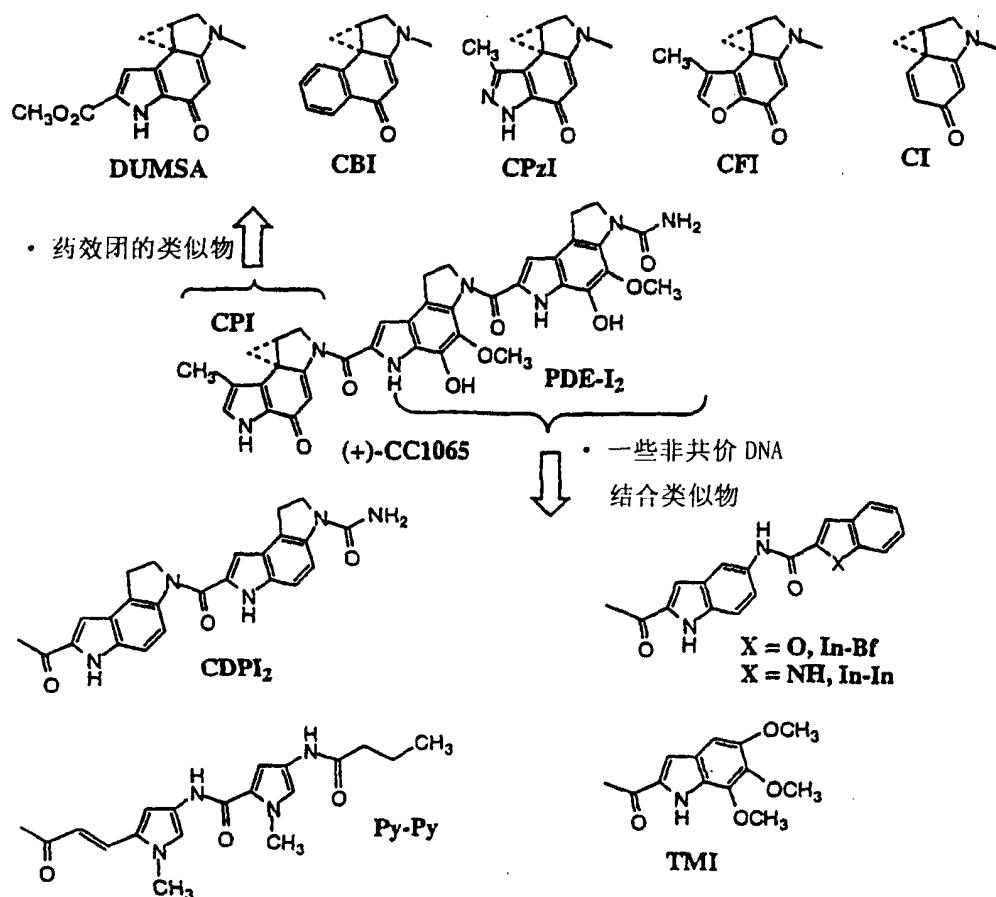


表 2. (+)-CC1065 和多卡米新的类似物的报道的结构。CBI 为环丙基苯并吲哚酮, CPzI 为环丙基吡唑并吲哚酮, CFI 为环丙基呋喃并吲哚酮, 而 CI 为环丙基吲哚酮。

阿多来新(1b、4c、17、专利 1)、卡折来新(18)、比折来新(19、专利 2)和 KW2189 (20、专利 3)是目前正在进行癌症治疗临床试验的 (+)-CC1065 和多卡米新的类似物的实例。阿多来新的一期临床试验已表明对黑素瘤患者的部分反应(17e)。卡折来新是一种前药,它在氨基甲酸酯水解时提供 *seco*-前药 U76073,此前药容易环化成对应的含环丙烷的 CPI “药物” U76074 (18)。值得注意的是,卡折来新比阿多来

新具有更高的对 L1210 白血病的体内抗癌活性($150 \pm 8\%$ ILS, 2/6 存活对 $90 \pm 11\%$, 0/6 存活) (18)。此结果可能归因于卡折来新更低的毒性, 因此它可以以更高的剂量给药($400 \mu\text{g/kg}$, 阿多来新为 $100 \mu\text{g/kg}$) (18)。比折来新是一种结合两个 *seco*-CPI 烷基化单元的 DNA 链间交联剂, 且比(+)-CC1065 本身更有效约 20–30 倍($\text{IC}_{50}(\text{L1210}) = 1\text{pM}$ 对 20 pM) (19)。KW2189, 一种半合成多卡米新 B2 衍生物, 具有改善的抗癌活性、水溶性和稳定性, 已在日本被选择用于临床评价(20)。其活化机理还涉及氨基甲酸酯基团的水解释放 *seco*-前药, 该前药环化产生含环丙烷的实际药物, 或 DU-86。

这些临床研究的化合物的生物性质表明, *seco*-前药的活性与它们的含环丙烷的 CPI 对应物相同, 但不导致(+)-CC1065 表现出的迟发毒性。因为 *seco*-前药比药物本身更为稳定且更容易处理, 本文中描述了带有这种类型的药效团的化合物。此外, 吲哚-苯并呋喃(In-Bf) (4c)、吲哚-吲哚(In-In) (4c)、三甲氧基吲哚(TMI) (3)以及远端霉素(Distamycin)的类似物如表 2 给出的 α, α' -联吡咯(Py-Py) (21)非共价结合单元将被引入本发明的化合物的结构中。选择这些 DNA 结合单元, 是因为已证明它们提高这类化合物的细胞毒效力, 且它们不存在迟发毒性问题。

除了在 CC1065 的非共价部分的系统修饰以外, 还进行药效团的改变, 以阐明此类化合物发挥其活性的机理。表 2 示出了 CC1065 和多卡米新 SA (DUMSA)的 CPI 单元的类似物(1–4), 如已设计并制备了 CBI (环丙基苯并吲哚酮) (2、3、22)、CFI (环丙基呋喃并吲哚酮) (23)、CPzI (环丙基吡唑并吲哚酮) (24)和 CI (环丙基吲哚酮) (2、3、25)。这些药效团的构效关系研究已表明具有最大溶剂解稳定性的类似物也表现出最有效的抗癌活性(9b、14)。而且, 还已证明, 表 3 所示的含氨基的 *seco*-CI 和 CBI 类似物与母体 *seco*-CI 和 CBI 化合物在抑制癌细胞生长方面同样有效(26)。

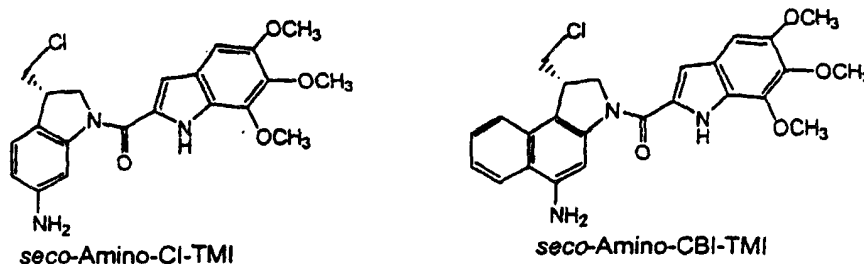


表 3. CI 和 CBI 的 *seco*-氨基类似物的结构

已经研究了手性中心对此类化合物的生物活性的影响。DUMSA 的非天然(-)-(R)对映体在烷基化 DNA 方面比天然(+)-(S)对映体的有效性差 10 倍,这与(-)-对映体的细胞毒性低 10 倍一致(2、7)。与 (+)-CC1065 类似, (+)-DUMSA 的结合取向在富含 AT 的 3—5 碱基对位点为 3'→5', 而相反的对映体取向在 5'→3'方向。值得注意的是,虽然(-)-CC1065 表现出比(+)-对映体慢的 DNA 烷基化速率,但它们的总 DNA 烷基化效率相同,它们的体外和体内抗癌活性也相同(27)。对 CPI-CDPII 和 CPI-PDE-II(一般结构参见表 2)的两种对映体的进一步研究揭示,它们的细胞毒性差别系数为约 150 倍,天然(+)-异构体更有利(2a、27b)。对于 CPI-In-In 的对映体,天然(+)-异构体具有约 250 倍的更强细胞毒性(27c)。

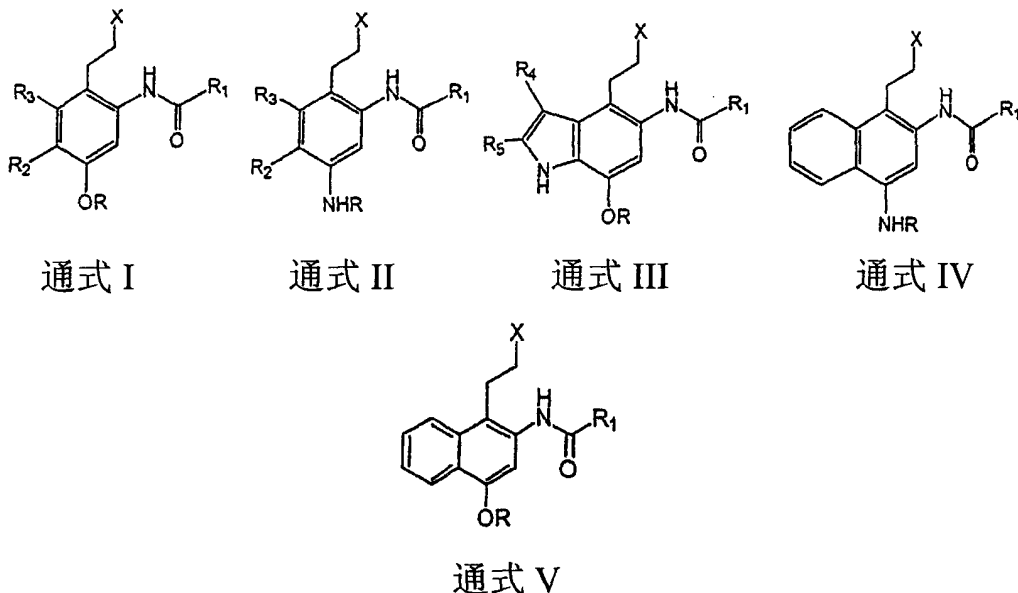
因此,必须制备对映体纯化合物,并在能够将它们开发成临床药物之前进行生物学评价十分关键(28a)。目前,光学纯形式的这类化合物的合成要求化学拆分步骤,所述拆分步骤通过手性柱 HPLC 分离进行(29),或者通过分别使用正相 HPLC 和重结晶法分离中间产物的非对映异构扁桃酸酯(2、21、30a、b)或 N-BOC-L-色氨酸酯进行。还报道了使用脂酶催化的酯化反应拆分用于合成光学活性 CPI 的外消旋醇中间产物(31)。虽然这些方法至少在小规模上是可行的,但它们是效率低的,因为在化学拆分步骤中,必须弃去所有不期望的对映体。而且,已报道在分别使用不对称硼氢化或 Sharpless 二羟基化方法制备 CFI (23)、CBI (32)和多卡米新 A (29)中,仅有不多的不对称诱导。

因此本发明中所述的 CC-1065 和多卡米新的非手性类似物将代表对用于治疗疾病如癌症的这类小沟结合剂的开发的目前的状况的显著改善。本文中所述的非手性类似物的合成不仅减少了化学拆分步骤，还可以简化它们与 DNA 的相互作用，并保留它们的细胞毒效力和抗癌活性。本发明中所述的目标化合物的设计基于以下报导，即 4-(2-卤代乙基)苯酚(卤化物 = Cl、Br 和 I)能够产生 DNA 烷基化作用和细胞毒活性(28b)。也已证明 4-(2-卤代乙基)苯酚容易除去 HX 以产生螺(2,5)辛-1,4-二烯-3-酮中间产物，该中间产物最终烷基化 DNA (28c)。

在本文中，描述了一系列多卡米新、CC-1065 和阿多来新的非手性 *seco*-类似物的制备和生物学性质和 DNA 相互作用性质的评价。本发明的 *seco*-非手性化合物的结构如通式 I、II、III 和 IV 所示。非手性化合物由缀合于大量非共价 DNA 结合亚单元的非手性药效团组成，包括但不限于吲哚-吲哚、吲哚-苯并呋喃、吡咯-吡咯、三甲氧基吲哚、N-芥子(H)以及表 4 中所示的“发夹”(J)基团。“发夹”亚单元的设计基于最近的发现，即多卡米新 A 和远端霉素 (33a、b)或 lexitropsins (33c、d)的 1:1 和并排复合物表现出高度 DNA 序列烷基化特异性。此外，已证明与远端霉素和 lexitropsins 有关的“发夹”多卡米新-寡肽缀合物表现出可预测的和高水平的序列特异性(34)。此外，已广泛研究了衍生自 lexitropsins 的并排和发夹寡肽。这些研究揭示，并排吡咯-吡咯对识别 A/T 或 T/A 碱基对。吡咯-咪唑对特异性识别 C/G 碱基对，而咪唑-吡咯对与 G/C 碱基对特异性结合(35)。最近我们还证明，咪唑-咪唑对将识别特定 DNA 序列内的 G/C 或 C/G (36)。而且，发现并排咪唑-咪唑对甚至对错配的 T/G 碱基对具有更大的选择性，提供了开发靶向于这些错配的 DNA 碱基对的分子的独特机会(37)。

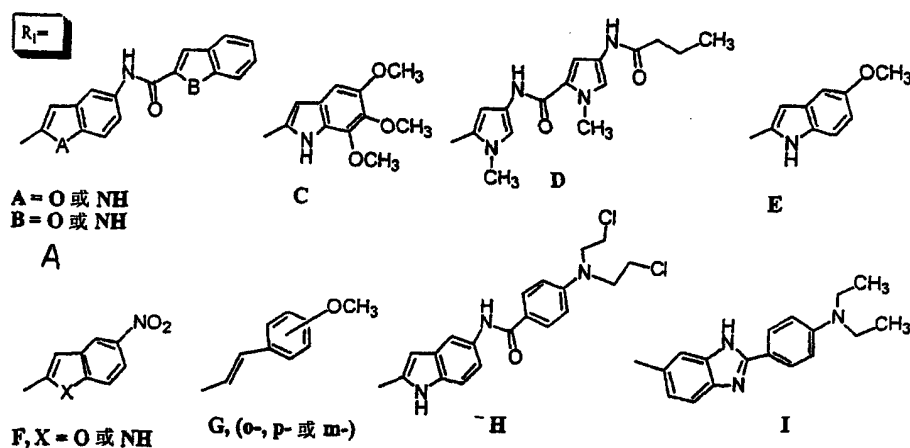
发明内容

本发明涉及 DNA 小沟烷化剂(+)-CC1065 和多卡米新的新的非手性类似物，如通式 I、II、III、IV 和 V 所示：



其中 X 为良好的离去基团，如氯化物、溴化物、碘化物、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、乙酸酯、季铵部分、硫醇、烷基次硫酰基(alkylsulfoxyl)或烷基磺酰基，优选为氯化物、溴化物或碘化物基团。

R_1 为增强非手性 *seco*-环丙烷吲哚(CI)或非手性 *seco*-多卡米新与特定的 DNA 序列的相互作用的适宜的小沟结合剂。DNA 结合剂的实例在表 4 中给出。优选的 DNA 结合剂为基团 A、C、D、E、F、G、H、I、J、K 和 L。 R_1 还可以包括以下：叔丁氧基、苄氧基、9-芴基甲氧基或其它常见的胺保护基。



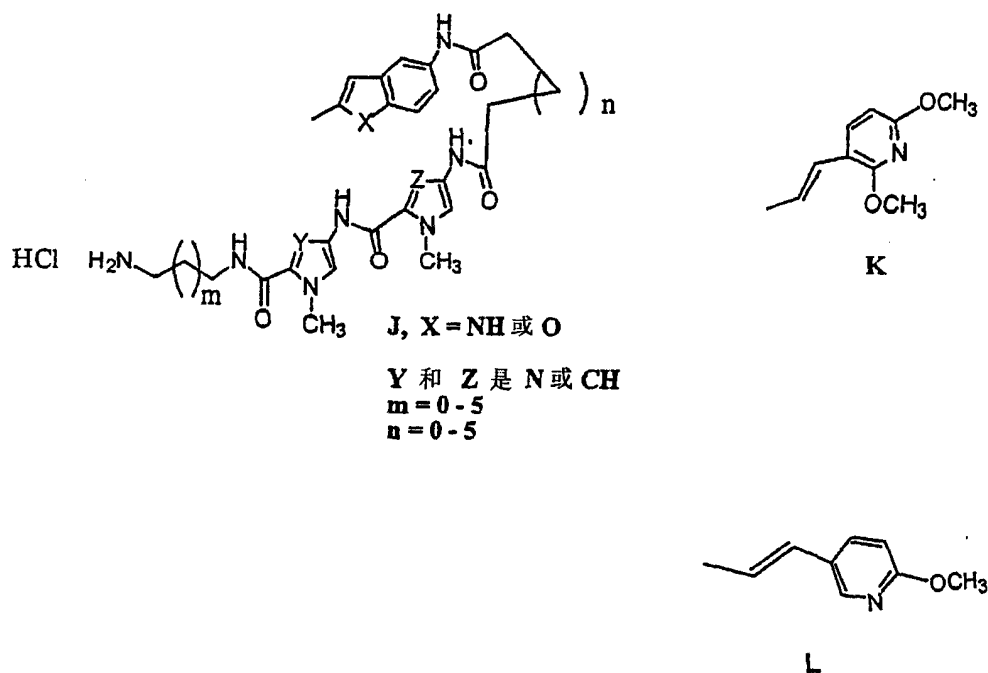


表 4. 本发明所述化合物中的小沟结合组分的实例

R_2 和 R_3 可以是氢或短链烷基(C_1-C_5)基团, 优选均为氢原子。烷基可以是直链或支链的, 包括基团如乙基、丙基、丁基、戊基和己基。

R_4 和 R_5 可以是氢原子、短烷基、三氟甲基部分和烷氧羰基。优选的 R_4 和 R_5 基团为甲氧羰基和三氟甲基。

R 可以是苄基、苄氧羰基、氢原子、4-硝基苄氧羰基或 N' -甲基哌嗪基-N-羰基。

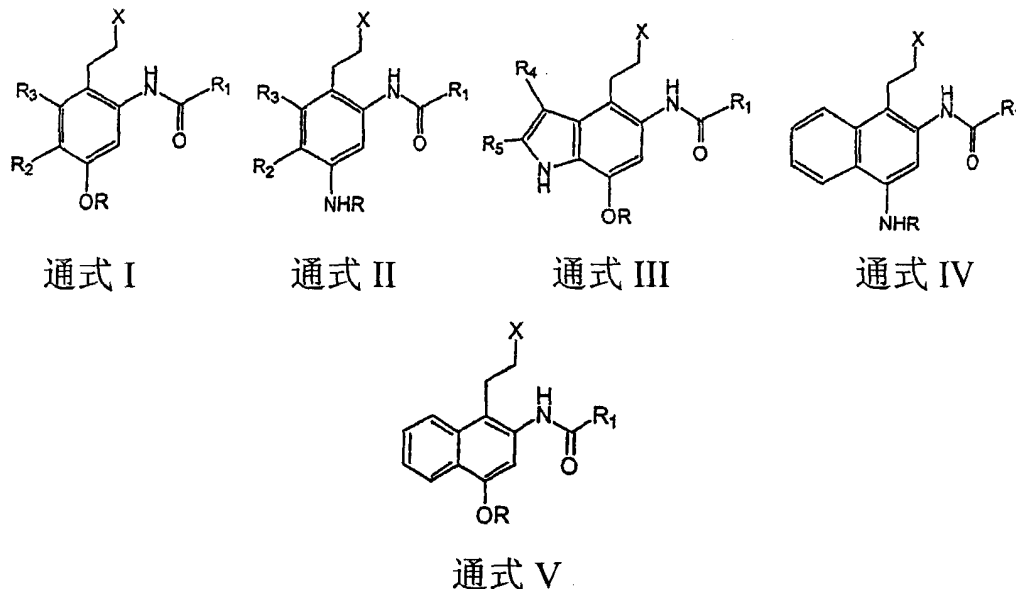
本发明的另一方面涉及通过在一定时间内和足以抑制癌生长的条件下给予患者本发明的化合物而用于治疗癌症的方法。

本发明的另一方面涉及本发明所述的化合物用于识别和靶向于特定的 DNA 序列, 包括致病基团的调控区内的序列的方法。这些试剂可以用于鉴定基因组中的独特序列, 并用作潜在的基因调控工具 (38)。

本发明的另一方面提供含有本发明的化合物和药物载体的药物组合物。

具体实施方案

本发明涉及新的 DNA 小沟和序列选择性烷化剂(+)-CC1065 和多卡米新的非手性类似物, 如通式 I、II、III、IV 和 V 所示:



其中 X 为良好的离去基团, 如氯化物、溴化物、碘化物、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、乙酸酯、季铵部分、硫醇、烷基次硫酰基或烷基磺酰基, 优选为氯化物、溴化物或碘化物基团。

R_1 为增强非手性 *seco*-环丙烷吲哚(CI)或非手性 *seco*-多卡米新与特定的 DNA 序列的相互作用的适宜的小沟结合剂。DNA 结合剂的实例在表 4 中给出。优选的 DNA 结合剂为基团 A、C、D、E、F、G、H、I。 R_1 还可以包括以下: 叔丁氧基、苄氧基、9-苄基甲氧基或其它常见的胺保护基。

优选的化合物为以上通式 I、II、III、IV 和 V 的化合物, 其中 X 为选自氯、溴、碘、巯基、季铵部分、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、乙酸酯、 C_1 - C_6 烷基次硫酰基和 C_1 - C_6 烷基磺酰基的离去基团; R_1 为选自叔丁氧基、苄氧基、9-苄基甲氧基和前文所示的基团 A、C、D、E、F、G、H、I、J、K 和 L 的适宜小沟结合剂; R_2 和 R_3 选自氢和直链或支链 C_1 - C_6 烷基; R_4 和 R_5 选自氢原子、三氟甲基部分和甲氧羰基; R 选自苄基、苄氧羰基、氢原子、4-硝基苄氧羰基和 N'-甲基哌嗪基-N-

羰基。

本发明的优选的化合物列于以下。

N-(2-(2-氯乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺

N-(2-(2-溴乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺

N-[2-(2-溴乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)苯基]-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺

4-(2-氯乙基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吲哚-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-3-(5-硝基吲哚-2-酰胺基)苯酚

4-(2-氯乙基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吲哚-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-3-[[5-[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]苯并呋喃-2-酰胺基]吲哚-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吲哚-2-酰胺基]苯酚

4-(2-溴乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-O-(N-甲基哌嗪-N'-氨基甲酰基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚

4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚

4-(氯乙基)-3-[2-(4-N,N-(二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-酰胺基]苯酚

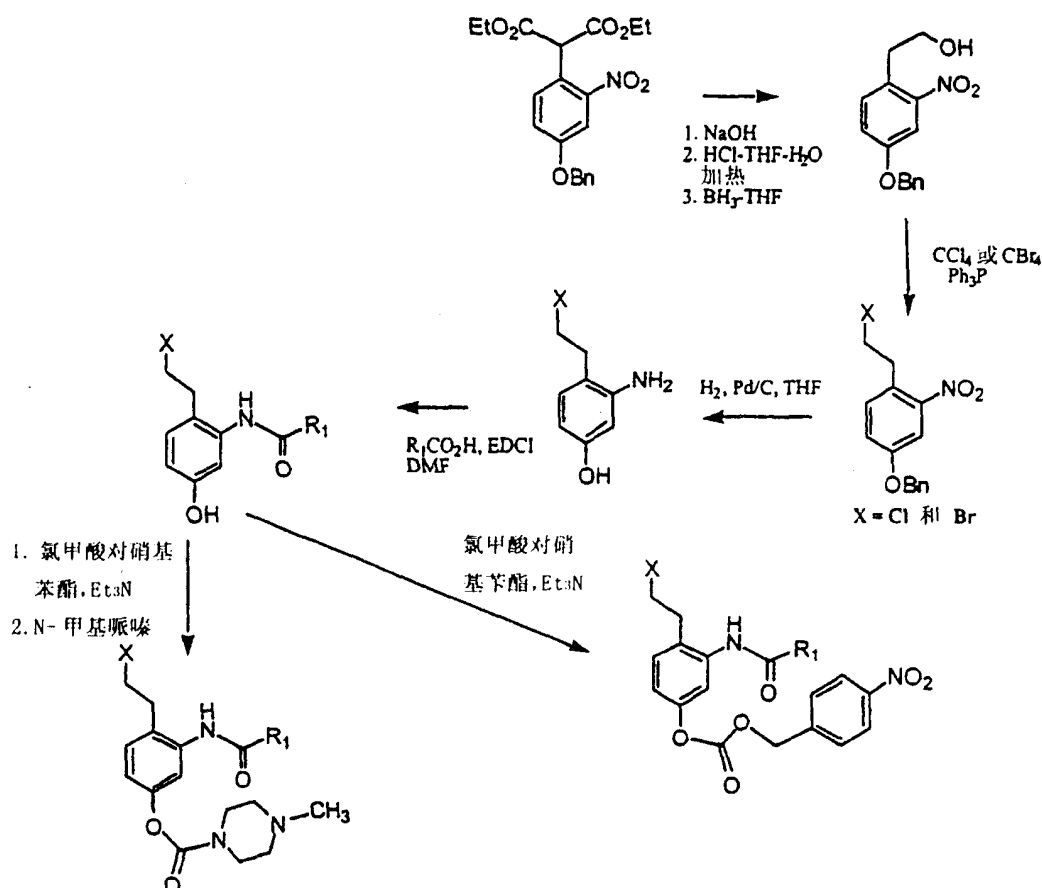
4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯酚

4-(2-氯乙基)-3-(5-甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯酚
4-(2-氯乙基)-3-(2-甲氧基肉桂酰胺基)苯酚
4-(2-氯乙基)-3-(3-甲氧基肉桂酰胺基)苯酚
4-(2-氯乙基)-3-(4-甲氧基肉桂酰胺基)苯酚
4-(2-氯乙基)-3-(2,6-二甲氧基-5-吡啶基)-E-乙烯-1-基酰胺基)苯酚
4-(2-氯乙基)-7-羟基-5-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)吲哚-2,3-二羧酸二甲酯
4-(2-氯乙基)-7-羟基-5-[5-(苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]吲哚-2,3-二羧酸二甲酯
4-(2-氯乙基)-7-羟基-2-三氟甲基-5-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)吲哚-3-羧酸甲酯
4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯胺
4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)-1-萘胺
N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺盐酸盐
N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基咪唑-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺盐酸盐
N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基咪唑-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺盐酸盐
4-(2-氯乙基)-3-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)-1-萘胺
4-(2-氯乙基)-3-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)-1-萘胺
4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]-1-萘胺
4-(2-氯乙基)-3-(5-甲氧基吲哚-2-酰胺基)-1-萘胺
N-(丁氧羰基)-4-(2-氯乙基)-3-硝基-1-萘胺

4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)-1-萘酚

O-苄基-4-(2-氯乙基)-3-(丁氧基酰胺基)苯酚。

属于本发明通式 I 的化合物可以由本领域中的已知方法制备。路线 1 描述和说明了一般合成方法。



路线 1. 属于通式 I 的本发明的化合物的合成

提出的非手性 *seco*-CI 化合物的合成方法起始于容易获得的 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)丙二酸二乙酯的反应(4c)。在乙醇中用 NaOH 处理 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)丙二酸二乙酯(25—80℃)，优选进行回流，然后酸化并温和加热(25—100℃)，优选进行回流，溶液给出期望的 4-苄氧基-2-硝基苯乙酸，收率为 95%。在 0—50℃ 下，优选在室温下，在 THF 中用硼烷选择性还原羧酸，产生 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙醇，收率为 95%。然后在 0—50℃ 下，优选在室温下，在 CH₂Cl₂

中用三苯基膦和四氯化碳将醇氯化，得到 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯，收率为 97%。在将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙醇与三苯基膦和四氯化碳在乙腈中反应后，获得 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基溴，收率为 92%。在大气压和 0—50℃下，优选在室温下，使用 10% Pd/C 在 THF 中催化还原 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯和 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基溴，分别得到 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯和 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基溴。在 0—50℃下，优选在室温下，将 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基溴与 5-(苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-羧酸在 EDCI [1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐]和 DMF 的存在下直接偶联，得到化合物 4-(2-溴乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚，对于用硅胶柱色谱纯化后的两步骤而言，收率为低收率 2%。类似地，将 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯与 5-(苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-羧酸在 EDCI 的存在下偶联，得到 4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚，对于柱色谱后的两步骤而言，收率为 28%。

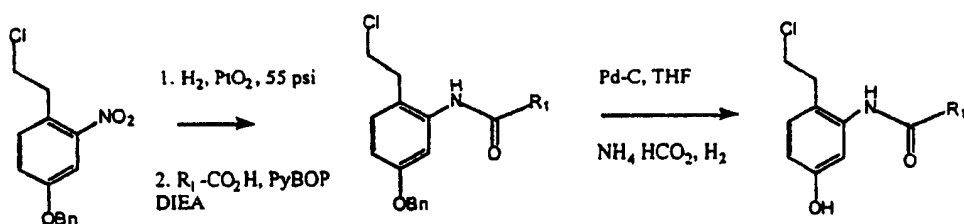
在 0—50℃下，优选在 5℃下，将 4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚与氯甲酸 4-硝基苄酯在三乙胺的存在下反应，得到期望的前药 4-(2-氯乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚，收率为 84%。此外，将 4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚与氯甲酸 4-硝基苄酯反应，然后在 0—50℃下，优选在 5℃下与 N-甲基哌嗪和三乙胺反应，随后逐渐暖至室温，得到氨基甲酸酯前药 4-(2-氯乙基)-O-(N-甲基哌嗪-N'-氨基甲酰基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚，硅胶柱纯化后收率为 37%。

在含有纺锤菌素部分的非手性 *seco*-化合物的制备中，在 0—50℃下，优选在室温下，将 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯与 N-甲基-4-(N-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺)-吡咯-2-羧酸在 DMF 中在 EDCI 的存在

下反应,得到期望的化合物 N-(2-(2-氯乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺,在硅胶柱纯化后收率为6%。类似地,将 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基溴与 N-甲基-4-(N-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺)-吡咯-2-羧酸偶联,得到 N-(2-(2-溴乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺,收率为40%。然后在 0—50℃下,优选在 5℃下,将 N-(2-(2-溴乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基-吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺在三乙胺的存在下与氯甲酸 4-硝基苄酯反应,得到前药 N-[2-(2-溴乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)苯基]-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺,收率为12%。

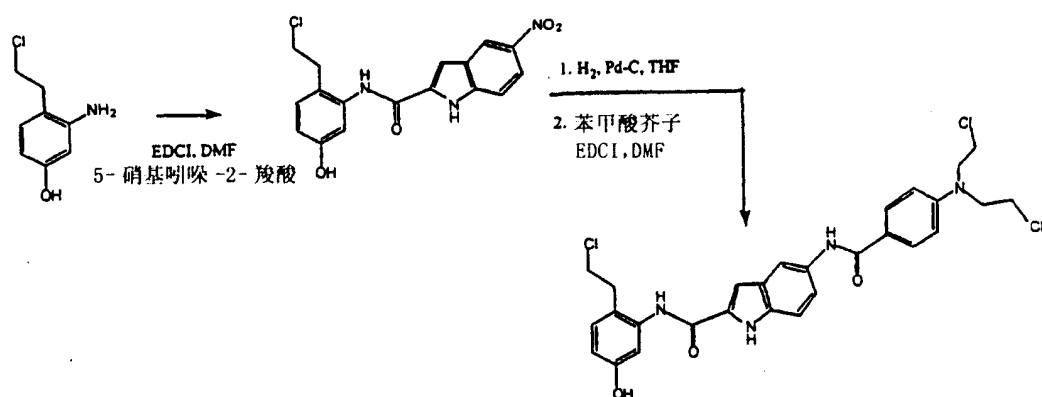
在 0—50℃下,优选在室温下,将 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯与 2-(4-(N,N-二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-羧酸偶联,或者 5,6,7-三甲氧基吲哚-2-羧酸与 EDCI 偶联,在柱色谱后,分别得到期望的化合物 4-(2-氯乙基)-3-[2-(4-N,N-(二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-酰胺基]苯酚和 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯酚,收率分别为11%和13%。

本发明的化合物的另一种合成路线如路线 2 所示。例如,也通过在氧化铂上,在 10—100 psi 下,优选在 55 psi 下,在 0—35℃下,优选在室温下进行催化氢化而将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯的硝基选择性还原成氨基,从而制备 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-氨基)苯酚。将所得的胺在 0—50℃下,优选在室温下,在 PyBOP (六氟磷酸苯并三唑-1-氧基三吡咯烷基~~磷~~)和二异丙基乙基胺的存在下偶联,得到苄基 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯基醚,收率为66%。通过在大气压和 0—50℃下,优选在室温下,在 10% Pd-C 上进行催化氢化而除去苄基,得到 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯酚,收率为50%。



路线 2. 非手性 *seco*-CI 衍生物的合成

路线 3 示出了含苯甲酸芥子的本发明的通式 I 化合物的类似物的制备。

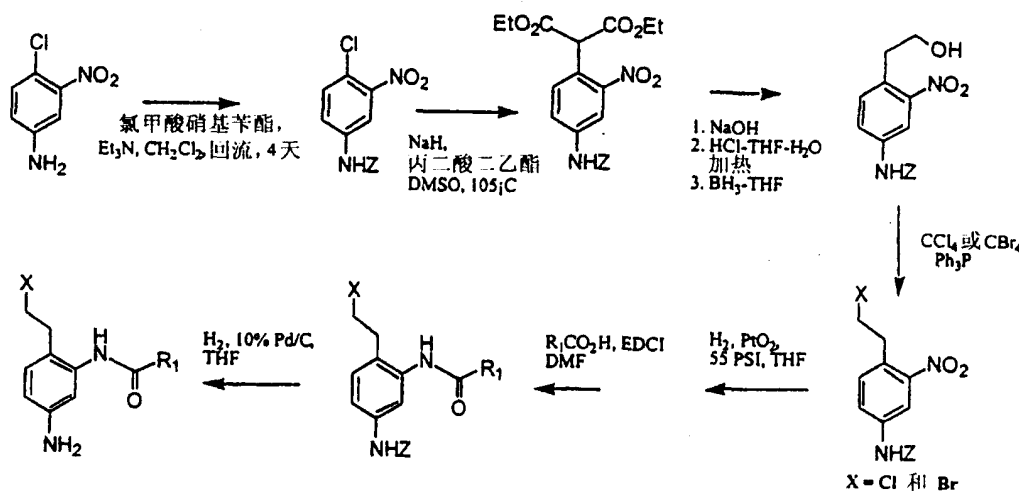


路线 3: 含苯甲酸芥子的本发明的通式 I 化合物的类似物的制备

在 0—50℃ 下, 优选在室温下, 将 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯在 DMF 中与 5-硝基吲哚-2-羧酸和 EDCI 偶联, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(5-硝基吲哚-2-酰胺基)苯酚, 收率为 14%。然后在 0—50℃ 下, 优选在室温下, 用 5% Pd-C 在 THF 中催化氢化 4-(2-氯乙基)-3-(5-硝基吲哚-2-酰胺基)苯酚, 得到胺, 在 0—50℃ 下, 优选在室温下, 将该胺直接与苯甲酸芥子(p-N,N-双(2-氯乙基)氨基苯甲酸)和 EDCI 反应, 得到期望的化合物 4-(2-氯乙基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吲哚-2-酰胺基]苯酚, 收率为 24%。在 0—50℃ 下, 优选在 5℃ 下, 将 4-(2-氯乙基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吲哚-2-酰胺基]苯酚与氯甲酸 4-硝基苄酯和三乙胺反应, 在硅胶柱色谱后, 得到前药 4-(2-氯乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲

酰胺基]吡啶-2-酰胺基]苯酚, 收率为 13%。使用 IR、 ^1H -NMR (^1H 和 ^{13}C) 谱, 以及 FAB 质谱, 包括精确质量测定, 证实了制备的所有化合物的结构。

属于本发明所述的通式 II 的化合物可以由本领域中已知的方法合成。路线 4 中给出一般合成路线。

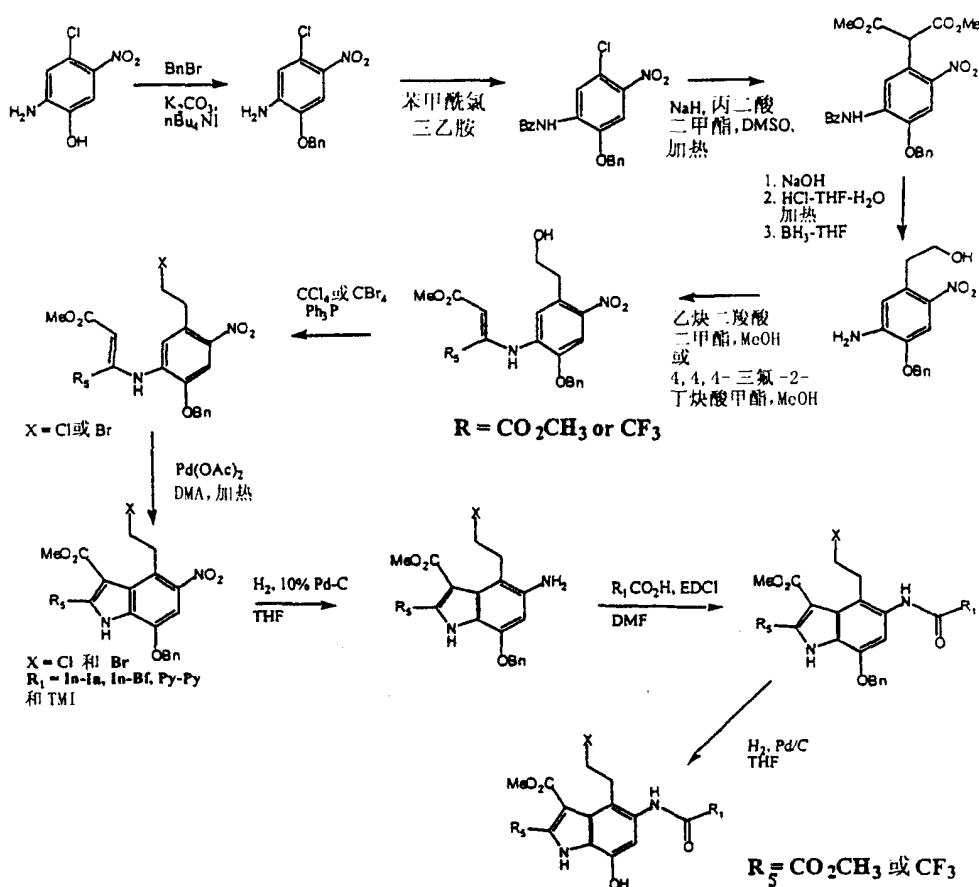


路线 4. 通式 II 的化合物的合成

在合成通式 II 的化合物中, 将 4-氯-3-硝基苯胺用作原料。用苄氧羰基或“Z”保护基保护胺部分。通过以下方法以 46% 的收率得到期望的黄色固体产物: 在 30—100°C 下, 优选在回流下, 在干燥管下加热苯胺与氯甲酸苄酯和三乙胺, 用蒸馏的二氯甲烷作为溶剂。受保护的氯化物与丙二酸二乙酯和氢化钠在无水二甲亚砜中在 50—150°C 下, 优选在 110°C 下, 在氮气氛围下反应, 得到期望的二酯, 收率为 63%。通过以下方法以 91% 的收率将二酯转化为乙酸部分: 在 50—100°C 下, 优选在回流下, 将在乙醇中的二酯和 10% 氢氧化钠水溶液加热 4 小时。在酸处理后, 提供酸一种粘稠的黄色油。通过用硼烷/THF 在 0—50°C 下, 优选在 5°C 下, 在氮气氛围下用蒸馏的 THF 作为溶剂进行还原, 然后逐渐暖至室温, 而将羧酸转化成伯醇。以 93% 的收率得到无色油状醇。然后通过氮气氛围和 0—50°C 下, 优选在室温下与三苯基

膦、四氯化碳和作为溶剂的蒸馏的二氯甲烷反应，而将此醇转化成对应的伯氯化物。以 81% 的收率得到氯化物橙色/黄色油。通过在 10—100 psi 下，优选在 55 psi 下，在 0—35℃ 下，优选在室温下，在 PtO₂ 上进行氢化而将氯化物的硝基部分还原成胺。将不稳定的胺立即在 0—50℃ 下，优选在室温下，在六氟磷酸三吡咯烷基膦(PyBOP)和蒸馏的 N,N-二异丙基乙基胺的存在下，用蒸馏的二氯甲烷作为溶剂，偶联于 5,6,7-三甲氧基吲哚羧酸(TMI)。以 36% 的收率得到澄清的泡沫状产物。通过在担载在碳上的 10% Pd 上，在 THF 中，在 0—35℃ 下，优选在室温下进行氢化而除去 Z 保护基。得到粘稠的无色油的非手性氨基 *seco*-CI TMI 化合物，收率为 80%。

属于本发明的通式 III 的化合物也可以由现有技术已知的方法制备。路线 5 描述和说明了一般合成方法。



路线 5. 属于通式 III 的本发明的化合物的合成

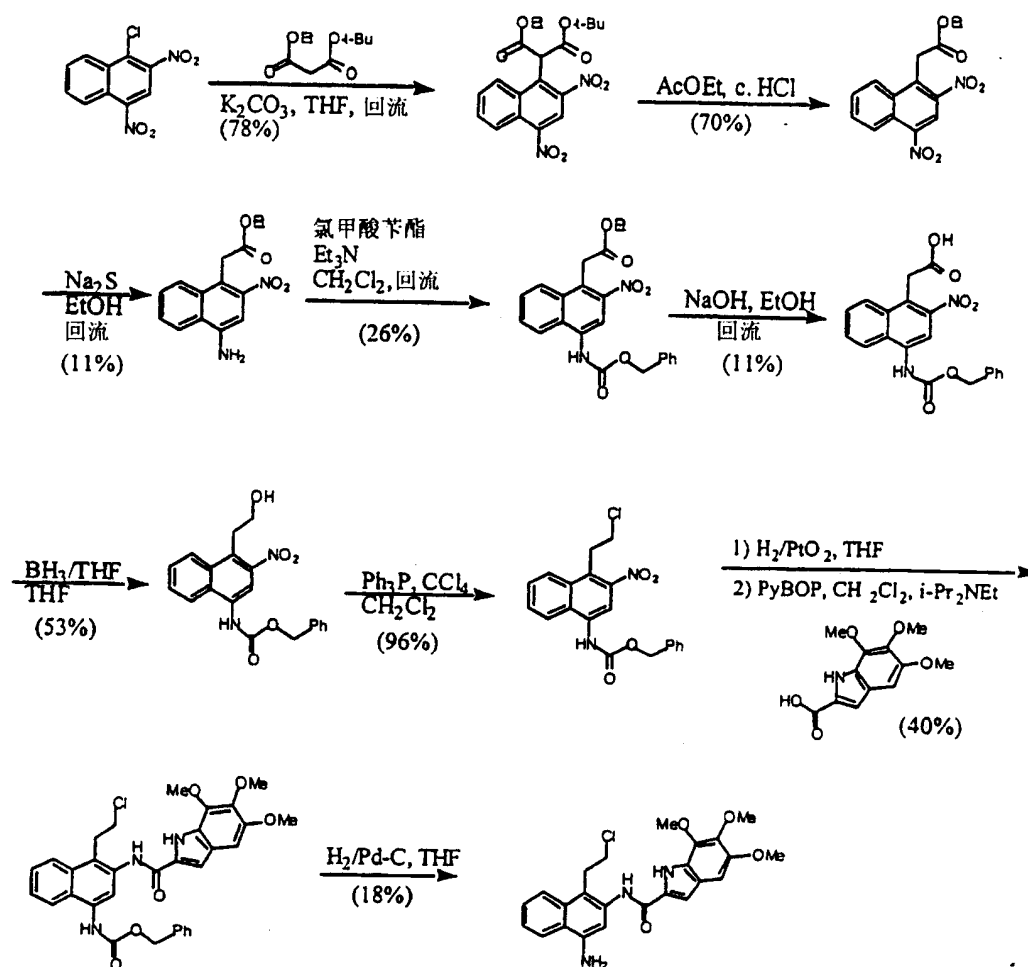
通式 III 的化合物的合成起始于在 0—50℃下，优选在室温下，2-氨基-4-氯-5-硝基苯酚在碳酸钾和四-N-丁基溴化铵的存在下，在 DMF 中与苄基溴的反应，以 56%的收率得到 2-苄氧基-5-氯-4-硝基苯胺。然后在 25—80℃，优选在回流下，在三乙胺的存在下，将 2-苄氧基-5-氯-4-硝基苯胺与苯甲酰氯反应，得到 N-(2-苄氧基-5-氯-4-硝基苯基)苯甲酰胺，收率为 85%。在 DMSO 溶液中，在 80—150℃下，优选在 110℃下，将 N-(2-苄氧基-5-氯-4-硝基苯基)苯甲酰胺与通过丙二酸二甲酯与氢化钠在 DMSO 中的反应产生的丙二酸二甲酯钠阴离子反应过夜，得到 2-(5-苯甲酰胺基-4-苄氧基-2-硝基)苯基丙二酸二甲酯，收率为 36%。当在 25-100℃，优选在回流下，用 NaOH 在乙醇中处理 2-(5-苯甲酰胺基-4-苄氧基-2-硝基)苯基丙二酸二甲酯时，随后用 HCl 酸化并在 25—100℃下，优选在回流下温和加热，得到期望的化合物 2-(5-氨基-4-苄氧基-2-硝基)苯乙酸，收率为 93%。在 0—50℃下，优选在 5℃下处理 2-(5-氨基-4-苄氧基-2-硝基)苯乙酸，然后逐渐暖至室温，用硼烷在 THF 中将羧酸基团选择性还原成醇，得到 2-(5-氨基-4-苄氧基-2-硝基)苯乙醇，收率为 52%。

在 25-100℃下，优选与丁炔二酸二甲酯在甲醇中回流，加热 2-(5-氨基-4-苄氧基-2-硝基)苯乙醇，得到 2-[2-苄氧基-5-(2-羟基乙基)-4-硝基苯胺基]苹果酸二甲酯，收率为 96%。然后在 0—50℃下，优选在室温下，用四氯化碳在二氯甲烷中和三苯基膦处理 2-[2-苄氧基-5-(2-羟基乙基)-4-硝基苯胺基]苹果酸二甲酯，得到 2-[2-苄氧基-5-(2-氯乙基)-4-硝基苯胺基]苹果酸二甲酯，收率为 85%。接着，在 40—120℃下，优选在 70℃下，用乙酸钯(II)在 N,N-二甲基乙酰胺中处理 2-[2-苄氧基-5-(2-氯乙基)-4-硝基苯胺基]苹果酸二甲酯，得到 7-苄氧基-4-(2-氯乙基)-5-硝基吡啶-2,3-二羧酸二甲酯，收率为 23%。在氢的大气压和 0—35℃下，优选在室温下，用 10%担载于碳上的钯在 THF 中处理 7-苄氧基-4-(2-氯乙基)-5-硝基吡啶-2,3-二羧酸二甲酯，得到胺

中间产物，将其在 0—50℃下，优选在室温下，与 5,6,7-三甲氧基吡啶-2-二羧酸和 5-(苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-羧酸在室温下的 DMF 中的 EDCI 的存在下直接偶联三天，得到目标非手性 *seco*-多卡米新类似物 4-(2-氯乙基)-7-羟基-5-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)吡啶-2,3-二羧酸二甲酯和 4-(2-氯乙基)-7-羟基-5-[5-(苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]吡啶-2,3-二羧酸二甲酯，收率分别为 20%和 16%。

在含有三氟甲基的类似物的合成中，将 2-(5-氨基-4-苄氧基-2-硝基)苯乙醇与 4,4,4-三氟-2-丁炔酸甲酯在甲醇中，在 30—75℃下，优选在回流下反应，得到 3-[2-苄氧基-5-(2-羟基乙基)-4-硝基苯胺基]-4,4,4-三氟-2-丁烯酸甲酯，收率为 87%。然后在 0—50℃下，优选在室温下，将 3-[2-苄氧基-5-(2-羟基乙基)-4-硝基苯胺基]-4,4,4-三氟-2-丁烯酸甲酯与四氯化碳在二氯甲烷中和三苯基膦反应，得到 3-[2-苄氧基-5-(2-氯乙基)-4-硝基苯胺基]-4,4,4-三氟-2-丁烯酸甲酯，收率为 57%。然后，在 50—120℃下，优选在 70℃下，用乙酸钡(II)在 N,N-二甲基乙酰胺中处理 3-[2-苄氧基-5-(2-氯乙基)-4-硝基苯胺基]-4,4,4-三氟-2-丁烯酸甲酯，得到 7-苄氧基-4-(2-氯乙基)-2-三氟甲基-5-硝基吡啶-3-羧酸甲酯，收率为 29%。在氢的大气压和 0—35℃下，优选在室温下，用 10%担载于碳上的钯在 THF 中处理 7-苄氧基-4-(2-氯乙基)-5-硝基吡啶-2-三氟甲基-3-羧酸甲酯，得到胺中间产物，将其在 0—50℃下，优选在室温下，在室温下的 DMF 中的 EDCI 的存在下直接与 5,6,7-三甲氧基吡啶-2-羧酸偶联三天，得到目标非手性 *seco*-多卡米新类似物 4-(2-氯乙基)-7-羟基-2-三氟甲基-5-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)吡啶-3-羧酸甲酯，收率为 2%。

本发明所述的通式 IV 的化合物也使用现有技术中已知的方法制备，路线 6 给出了一般路线。



路线 6. 通式 IV 的化合物的制备

在 20—150℃下，优选在 110℃下，将 1-氯-2,4-二硝基萘(39)与具有氢化钠的丙二酸叔丁酯乙酯在 DMSO 中反应，得到二酯，收率为 78%。在 0—100℃下，优选在室温下，用盐酸处理不对称的二酯，得到乙酯，收率为 70%。在 20—100℃下，优选在回流下，用硫化钠还原 4-硝基，然后在 0—70℃下，优选在 0℃下，用苄氧羰基“Z”基团保护氨基，得到受保护的酯，收率分别为 11%和 26%。在 0—100℃下，优选在回流温度下水解酯，然后在 0—50℃下，优选在室温下，用硼烷还原羧酸，得到期望的醇，收率分别为 11%和 58%。在 0—50℃下，优选在室温下，用四氯化碳和三苯基膦处理醇，得到氯化物，收率为 96%。在 10—100 psi 下，优选在 55 psi 和 0—35℃下，优选

在室温下，在 PtO_2 上将硝基氢化还原，得到胺中间产物。将胺在 0—50℃ 下，优选在室温下，在 PyBOP 和 Hunig 碱的存在下与三甲氧基吲哚-2-羧酸偶联，得到期望的酰胺，收率为 40%。通过在大气压下，在 0—35℃ 下，优选在室温下，在 10% Pd/C 上进行氢化除去 Z 保护基，得到期望的非手性 *seco*-氨基 CI-TMI 产物，收率为 18%。

本发明的化合物用作抗癌药。

可以由现有技术已知的方法确定共价加合物的形成。例如，可以通过热诱导的 DNA 链断裂的形成来确定 DNA 的小沟中嘌呤-N3 的烷基化(40)，而本发明的化合物的共价序列特异性可以使用 Taq 聚合酶终止测定来确定(41)。

本发明的化合物可以用作抗癌药。具体而言，它们表现出对肿瘤细胞的细胞抑制性质，从而使它们可以用于抑制多种癌症，例如癌(carcinomas)，如乳癌、肺癌、膀胱癌、胰腺癌、结肠癌、卵巢、结肠、直肠、前列腺和子宫内膜癌症的生长。本发明的化合物可以应用的其它癌症为，例如，肉瘤，如软组织和骨肉瘤，以及血液恶性病如白血病。

可以将本发明的化合物在体外递送至选择性 DNA 序列，递送方法包括将该药效团缀合于 DNA 小沟结合剂以形成缀合物，并使该选择性序列与该缀合物接触足以完成该缀合物与该选择性序列的结合的时间。

本发明的化合物可以通过常规途径给药，例如通过静脉内注射输液(如果可溶的话)、肌内、鼻内、皮内、皮下、肠胃外、肠内给药等。根据给药的途径，药物组合物可能需要保护性包衣。

本发明的药物组合物一般通过常规方法制备，并以药学适宜的形式给药。例如，用于静脉内注射输液的溶液可以含有无菌水作为载体，或者优选它们为无菌等渗盐水或糖水溶液的形式。

用于肌内注射的悬浮液或溶液可能同时含有活性化合物和药学可接受的载体，如无菌水、橄榄油、油酸乙酯、乙二醇和可能需要的适宜量的盐酸利多卡因。

在局部施用形式，如用于皮肤病治疗的乳膏、洗液或糊剂中，可以将活性成分与常规油性或乳化赋形剂混合。

固体口服形式，如片剂和胶囊可以同时含有活性成分；稀释剂，如乳糖、右旋糖、蔗糖、纤维素、玉米淀粉和马铃薯淀粉；润滑剂，如二氧化硅、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁或钙和/或聚乙二醇；粘合剂，如淀粉、阿拉伯胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮；崩解剂，如淀粉、藻酸、藻酸盐、羟乙酸淀粉钠；泡腾混合物；染料；甜味剂；润湿剂，如卵磷脂、聚山梨醇酯、硫酸月桂酯；和一般用于药物配方的无毒和药理学非活性的物质。所述药物制剂可以以已知的方式制备，例如通过混合、制粒、压片、糖包衣或薄膜包衣制备。

剂量取决于患者的年龄、体重和病症以及给药途径。例如，适宜的成人给药剂量范围可以为约 0.1 至约 200–250 mg pro 剂量，每日 1–4 次。

以下实施例说明而不限本发明。

实施例 1

2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基溴和 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯的制备

将 EtOH (45 mL)和 10% NaOH (60 mL)加到含有 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)丙二酸二乙酯(4c) (2.00 g, 5.17 mmol)的圆底烧瓶中，产生暗棕色溶液。使溶液回流 3 小时，并通过 TLC (CHCl₃)检查，此时溶液为浅黄色且是澄清的。减压下除去 EtOH 形成黄色悬浮液，并加入足量的 THF (30 mL)以产生澄清的黄色溶液，将该溶液置于冰浴中并搅拌。将 6 M HCl (30 mL)缓慢加到溶液中以达到 pH 1。将浅橙色溶液再回流 1 小时，此时形成两层。收集上层 THF 层，并用 CHCl₃ (100 mL)萃取水溶液。合并有机层并用无水硫酸钠干燥。然后将溶液过滤，并将滤液浓缩产生 4-苄氧基-2-硝基苯乙酸，为橙色固体。然后将该固体置于高真空中并干燥(1.41 g, 4.91 mmol, 95%)。Mp 145–152 °C，TLC (CHCl₃) R_f = 0.15；¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) 7.76 (d, 2.7,

1H), 7.41 (m, 5H), 7.26 (d, 8.7, 1H), 7.21 (dd, 2.7, 8.7, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.00 (s, 2H); IR (CHCl₃ cast) 3400—2600 (br), 3100, 1698, 1601, 1526, 1523, 1453, 1376, 1349, 1240, 1180, 1022, 848, 815, 760, 712; EI-MS *m/z* (相对密度) 287 (M⁺, 10)。C₁₅H₁₃NO₅ 的准确质量(EI-MS): 计算 287.0794, 实测 287.0799。

将 4-苄氧基-2-硝基苯乙酸(6.38 g, 22.2 mmol)溶于新鲜蒸馏和无水的 THF (60 mL)中, 并在冰浴中在 N₂ 下搅拌。5 分钟后, 用套管将硼烷(55.6 mL, 55.5 mmol, 1 M 溶液, 在 THF 中)转移到置于搅拌着的溶液上方的滴液漏斗中。随后将 BH₃-THF 溶液缓慢加到该溶液中, 产生大量泡腾。将红色溶液在冰浴中搅拌 10 分钟, 然后在室温下搅拌 4 小时。通过 TLC (10% MeOH/CHCl₃)检查反应。将水(150 mL)缓慢加到烧瓶中, 直至泡腾不再发生。用无水硫酸钠干燥有机层并进行重力过滤。然后浓缩该溶液, 产生棕色的油。柱色谱(SiO₂, 10—60% EtOAc/5% CHCl₃ 用于溶解/己烷梯度洗脱)得到 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙醇(5.72 g, 21.0 mmol, 95%), 为褐色固体。Mp 48—52°C; TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.61; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) 7.54 (d, 2.5, 1H), 7.42 (m, 5H), 7.31 (d, 8.5, 1H), 7.17 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.91 (br q, 6.5, 2H), 3.65 (br t, 6.5, OH), 3.10 (t, 6.5, 2H); IR (neat) 3400, 3050, 2965, 2921, 2858, 1622, 1523, 1453, 1344, 1240, 1039, 804。EI-MS *m/z* (相对密度) 273 (M⁺, 14)。C₁₅H₁₅NO₄ 的准确质量(EI-MS): 计算 273.1001, 实测 273.0992。

将三苯基膦(1.98 g, 7.55 mmol)、CCl₄ (2.18 mL, 22.62 mmol)和无水 CH₂Cl₂ (13.7 mL)加到在圆底烧瓶中的 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙醇(1.03 g, 3.77 mmol)中。形成带粉色沉淀, 但在 30 分钟后溶解的红色溶液。在氮正压下将溶液搅拌过夜。通过 TLC (20%乙酸乙酯/石油醚)检查该溶液, 然后用旋转蒸发仪浓缩。用硅胶柱色谱和 10% 乙酸乙酯、5% CHCl₃ 和 85%石油醚溶剂系统纯化棕色油状残余物。

分离 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯，为稠的黄色油，该油在离心机中放置后固化(1.06 g, 3.64 mmol, 97%收率)。Mp 38—40℃；TLC (20% 乙酸乙酯/己烷) $R_f = 0.53$ ； $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 7.51 (d, 2.5, 1H), 7.33 (m, 5H), 7.23 (d, 8.5, 1H), 7.10 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.70 (t, 7.0, 2H), 3.20 (t, 7.0, 2H)； $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) 158.1, 149.5, 135.7, 143.0, 128.7, 128.4, 127.5, 125.1, 120.4, 110.7, 70.6, 44.0, 35.8；IR (neat) 3092, 3038, 2962, 2919, 2865, 1618, 1570, 1532, 1499, 1451, 1343, 1294, 1197, 1160, 1062, 1019, 906, 847, 809, 739, 696, 652；EI-MS m/z (相对密度) 291 (M^+ , 10)； M^+ 和 $\text{M}^+ + 2$ 的同位素模式与一个氯原子的存在一致。 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}^{35}\text{ClNO}_3$ 的准确质量(EI-MS)：计算 291.0662，实测 291.0667。

将 Pd/C 10% (45 mg) 加到 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯(132 mg, 0.453 mmol)中。然后将混合物悬浮在冰箱冷冻的 THF (30 mL) 中。将悬浮液脱气，用氢净化三次，并在大气压和室温下还原。3 小时后，通过 TLC (10% MeOH/ CHCl_3) 检查溶液，在 C 盐上抽滤该溶液。用更多的 CH_2Cl_2 洗涤滤器残余物，并在减压下将滤液浓缩，得到 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯，为白色固体(60.7 mg, 0.354 mmol, 78%)。Mp 96—100℃；TLC (10% MeOH/ CHCl_3) $R_f = 0.34$ ； $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 在 1 滴 DMSO- d_6 中, 500 MHz) 8.20 (br s, 1H), 6.85 (d, 8.0, 1H), 6.27 (dd, 2.5, 8.0, 1H), 6.26 (d, 2.5, 1H), 4.00 (br s, 2H), 3.66 (t, 8.5, 2H), 2.90 (t, 8.5, 2H)；IR (neat) 3139, 3020, 2954, 1622, 1594, 1513, 1464, 1560, 1306, 1265, 1246, 1197, 1175, 1079, 1049, 973, 848, 793, 722, 596, 646；EI-MS m/z (相对密度) 171 (M^+ , 28)； M^+ 和 $\text{M}^+ + 2$ 的同位素模式与一个氯原子的存在一致。 $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClNO}$ 的准确质量(EI-MS)：计算 171.0451，实测 171.0444。

将 2-(2-氨基-4-苄氧基苯基)乙基氯(448 mg, 1.71 mmol)、DMAP (21 mg, 0.17 mol)、二叔丁基碳酸氢酯(di-*t*-butyl dicarbonate, 447 mg,

2.05 mmol)溶于无水乙腈(5 mL)中。在室温下,在干燥管中将该溶液搅拌 60 小时。除去溶剂后,在氯仿(30 mL)和水(10 mL)中分配残余物。用 0.1 M HCl (5 mL)洗涤有机层,然后干燥。浓缩有机层,得到油状残余物,该残余物通过硅胶色谱(氯仿)纯化,得到期望的产物 O-苄基-4-(2-氯乙基)-3-(丁氧基酰胺基)苯酚,为白色固体(213 mg, 34.5%)。TLC (CHCl₃) R_f = 0.60; ¹H-NMR (CDCl₃) 7.48 (s br, 1H), 7.43 (d, 7.5, 2H), 7.38 (t, 7.5, 2H), 7.37 (d, 2.5, 1H), 7.32 (t, 7.5, 1H), 7.06 (d, 8.5, 1H), 6.71 (dd, 2.5, 8.5), 5.05 (s, 2H), 3.69 (t, 7.0, 2H), 2.99 (t, 7.0, 2H), 1.53 (s, 9H)。

将三苯基膦(1.92 g, 7.33 mmol)、CBR₄ (7.28 g, 21.96 mmol)和无水 CH₃CN (16.6 mL)加到含有 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙醇(1.00 g, 3.66 mmol)的圆底烧瓶中。得到红色溶液,将该红色溶液在氮正压下搅拌过夜。通过 TLC (20% EtOAc/己烷)检查该溶液,并在旋转蒸发器中浓缩。通过真空 kugelrohr 蒸馏(60°C, 0.25 mm Hg)除去过量的 CBr₄。柱色谱(SiO₂, 10% EtOAc/5% CHCl₃/85%石油醚梯度洗脱)得到 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基溴,为褐色固体(1.33 g, 3.56 mmol, 92%)。Mp 30—34°C; TLC (20% EtOAc/己烷) R_f = 0.48; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) 7.52 (d, 2.5, 1H), 7.34 (m, 5H), 7.24 (d, 8.5, 1H), 7.11 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.57 (t, 7.0, 2H), 3.30 (t, 7.0, 2H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) 158.0, 149.4, 135.6, 133.8, 128.7, 128.4, 127.5, 125.8, 120.5, 110.8, 70.6, 35.9, 32.0; IR (neat) 3070, 3027, 2919, 2855, 1618, 1570, 1526, 1499, 1451, 1408, 1381, 1343, 1289, 1262, 1240, 1149, 1025, 842, 804, 733, 695; EI-MS *m/z* (相对密度) 335 (M⁺, 9); M⁺和 M⁺+2 的同位素模式与一个溴原子的存在一致。C₁₅H₁₄NO₃Br 的准确质量(EI-MS): 计算 335.0157, 实测 335.0160。

在圆底烧瓶中将 Pd/C 10% (270 mg)和 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)

乙基溴(540 mg, 1.6 mmol)一起搅拌。将混合物悬浮在冰箱冷冻的 THF (15 mL)中。然后将该溶液脱气, 净化三次, 并在大气压和室温下还原(24 h)。通过 TLC (10% MeOH/CHCl₃)检查该溶液, 并在 C 盐上进行抽滤。用 CH₂Cl₂ 洗涤滤垫, 并将滤液真空浓缩, 得到沉淀, 将该沉淀与无水 CH₂Cl₂ (5 mL)共蒸发两次。将 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基溴, 一种米色固体置于高真空中, 直至进一步使用(540 mg, 2.50 mmol, 100%)。Mp 160–166°C; TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.27; ¹H-NMR (CDCl₃ 在 1 滴 DMSO 中, 500 MHz) 7.21 (br s, 1H), 7.14 (d, 8.0, 1H), 7.10 (d, 2.0, 1H), 6.87 (dd, 2.0, 8.0), 3.83 (t, 7.5, 2H), 3.17 (t, 7.5, 2H); IR (neat) 3335, 3008, 2921, 1622, 1561, 1502, 1464, 1442, 1289, 1191, 1137, 1082, 847, 820; EI-MS *m/z* (相对密度) 135 (M⁺-HBr, 85)。C₈H₉NO 的准确质量(EI-MS): 计算 135.0684, 实测 135.0678。

实施例 2

N-(2-(2-氯乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺及其衍生物的制备

将冷甲醇(100 mL)加到 N-甲基-4-(N-甲基-4-硝基吡咯-2-酰胺)吡咯-2-羧酸甲酯(3.00 g, 9.8 mmol)和 5% Pd/C (1.2 g)的混合物中。将反应混合物氢化 18 小时, 并通过 TLC (10% MeOH/CHCl₃)检查。还原完成后, 用 C 盐和烧结漏斗抽滤该胺, 将滤液旋转蒸发至干并共蒸发两次。

用注射器通过隔膜将蒸馏的二氯甲烷(30 mL)和丁酰氯(1.00 mL, 10.8 mmol)加到滴液漏斗中。然后将胺溶于无水 THF (75 mL)并加入 Et₃N (1.5 mL, 10.8 mmol)。将胺混合物在冰浴中搅拌 5 分钟, 然后缓慢滴入丁酰氯混合物。得到浅桃色混合物, 并在燥石膏干燥管下搅拌过夜(18 h)。然后将水(100 mL)和氯仿(100 mL)加到烧瓶中, 并搅拌内

容物。将该溶液加到分液漏斗中。加入两勺盐，振荡分液漏斗并通气。收集有机层，并用氯仿再萃取水层一次(50 mL)。然后用无水硫酸钠干燥合并的氯仿萃取物。将溶液重力过滤到 500 mL 圆底烧瓶中，并旋转蒸发至干，形成浅褐色泡沫。柱色谱(SiO_2 , 0—2% MeOH/ CHCl_3 梯度洗脱)得到 N-甲基-4-(N-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺)吡咯-2-羧酸甲酯，为米色泡沫(6.51 g, 18.8 mmol, 82%)。Mp 85—95℃; TLC (10% MeOH/ CHCl_3) R_f = 0.48; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) 7.43 (br s, 1H), 7.41 (d, 1.5, 1H), 7.08 (d, 2.0, 1H), 6.99 (br s, 1H), 6.72 (d, 2.5, 1H), 6.62 (d, 2.0, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.30 (t, 4.5, 2H), 1.75 (六重峰, 4.5, 2H), 1.00 (t, 4.5, 3H); IR (KBr) 3292, 3126, 2954, 1709, 1658, 1578, 1556, 1442, 1404, 1251, 1197, 1153, 1109, 1060, 749; MS (FAB) m/z (相对密度) 347 ($\text{M} + \text{H}^+$, 50), 346 (M^+ , 50)。 $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_7$ 的准确质量(FAB-MS): 计算 347.1719, 实测 347.1736。

将化合物 N-甲基-4-(N-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺)吡咯-2-羧酸甲酯(2.00 g, 5.78 mmol)溶于甲醇(70 mL)和 10% NaOH (70 mL)中，并将该溶液加热回流 3 小时。回流后，将甲醇层旋转蒸发。然后将冰和水(40 mL)加到该溶液中。随后将 3 摩尔 HCl (约 50 mL)缓慢加入，直至溶液达到 pH 1。在冰浴中冷却反应混合物后，通过抽滤收集沉淀的 N-甲基-4-(4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-羧酸，并在真空烘箱中干燥(50℃, 在 0.2 mm Hg 下)过夜，得到米黄色粉末(1.58 g, 4.76 mmol, 82%)。Mp 130—142℃; TLC (10% MeOH/ CHCl_3) R_f = 0.21; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 和 3 滴 DMSO, 300 MHz) 11.0 (br s, 1H), 7.85 (br s, 1H), 7.59 (br s, 1H), 7.45 (d, 1.7, 1H), 7.14 (d, 1.7, 1H), 6.79 (d, 1.7, 1H), 6.68 (d, 1.7, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 2.30 (t, 6.9, 2H), 1.75 (六重峰, 6.9, 2H), 1.00 (t, 6.9, 3H); IR (KBr) 3433, 3124, 2954, 1649, 1572, 1436, 1403, 1256, 1201, 1164, 1109,

1054; FAB-MS (NBA) m/z (相对密度) 333 ($M + H^+$, 60), 332(M^+ , 72)。

$C_{16}H_{21}N_4O_4$ 的准确质量(FAB-MS): 计算 333.1563, 实测 333.1559。

N-(2-(2-氯乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺

将 EDCI (838 mg, 4.37 mmol)、N-甲基-4-(N-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺)吡咯-2-羧酸(485 mg, 1.46 mmol)和无水 DMF (10 mL)加到含有 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯(250 mg, 1.46 mmol)的反应烧瓶中。在 N_2 气氛和室温下将该溶液搅拌 48 小时。在 40℃ 和 0.1 mm Hg 下使用 kugelrohr 装置除去溶剂, 留下褐色油。用 $CHCl_3$ (100 mL)和水 (25 mL)分配油状残余物。用 $CHCl_3$ 将水层萃取三次(每次 70 mL), 用 5%碳酸氢钠水溶液洗涤合并的有机层并干燥(Na_2SO_4)。浓缩滤液, 得到残余物, 通过硅胶柱色谱, 使用 10%乙酸乙酯/ $CHCl_3$ 溶剂系统纯化该残余物, 其中 EtOAc 百分比每 50 mL 升高 10%增量, 直至达到 100% EtOAc, 每 50 mL 向其中加入 10%增量的 MeOH。得到期望的化合物, 为白色固体(41.6 mg, 0.084 mmol, 6%)。Mp 130—134℃; TLC (10% MeOH/ $CHCl_3$) R_f = 0.16; 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) 8.10 (br s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.04 (d, 8.0, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.08 (dd, 2.0, 8.0, 1H), 6.45 (d, 1.5, 1H), 4.25 (t, 7.7, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.01 (t, 7.7, 2H), 2.33 (t, 7.5, 2H), 1.77 (六重峰, 8.0, 2H), 1.00 (t, 8.0, 3H); IR (neat) 3390, 2965, 2921, 1638, 1572, 1447, 1404, 1256, 1197, 1153, 1093, 1044, 864, 793, 679; FAB-MS (NBA) m/z (相对密度) 450 ($M + H^+ - HBr$, 8), 449 ($450 - H^+$, 8)。 $C_{24}H_{27}N_5O_4$ 的准确质量(FAB-MS): 计算 449.2063, 实测 449.2080。

将 EDCI (1.49 g, 7.5 mmol)、N-甲基-4-(N-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺)-吡咯-2-羧酸(830 mg, 2.50 mmol)和无水 DMF (12 mL)加到含

有 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基溴(250 mg, 1.15 mmol)的反应烧瓶中。将该溶液保持在 N₂ 气氛下并搅拌(48 h)。使用 kugelrohr 装置除去 DMF。然后用 CHCl₃ (100 mL)和水(25 mL)分配保留的油状残余物。用 EtOAc (100 mL)萃取水层, 用 NaHCO₃ 洗涤并干燥(Na₂SO₄)。浓缩滤液, 得到残余物, 通过柱色谱, 使用 20% EtOAc/CHCl₃ 溶剂系统纯化该残余物, 其中乙酸乙酯每 50 mL 以 10%的增量增加, 直至达到 100% EtOAc, 每 50 mL 以 10%的增量向其中加入 MeOH, 得到 N-(2-(2-溴乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺, 为米色泡沫(230 mg, 0.462 mmol, 40%)。Mp 138—150°C; TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.13; ¹H-NMR (CDCl₃ 在 1 滴 DMSO-d₆ 中, 500 MHz) 9.85 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 7.39 (br s, 1H), 7.33 (d, 2.0, 1H), 7.14 (d, 2.0, 1H), 7.02 (d, 8.0, 1H), 6.87 (d, 2.0, 1H), 6.69 (d, 2.0, 1H), 6.41 (dd, 2.5, 8.0, 1H), 4.22 (t, 8.5, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.99 (t, 8.0, 2H), 2.21 (t, 7.0, 2H), 1.59 (六重峰, 7.5, 2H), 0.895 (t, 7.5, 3H); IR (液体石蜡) 3368, 3270, 3125, 1632, 1600, 1262, 1202, 1153, 1093, 1039, 864, 804, 728; FAB-MS (NBA) *m/z* (相对密度) 450 (M + H⁺ - HBr, 10), 449 (450 - H⁺, 10)。C₂₄H₂₈N₅O₄ 的准确质量(FAB-MS): 计算 450.2141, 实测 450.2147, C₂₄H₂₇N₅O₄ 的准确质量(FAB-MS): 计算 449.2063, 实测 449.2082。

将氯甲酸对硝基苄酯(60.9 mg, 0.282 mmol)加到 N-(2-(2-溴乙基)-4-羟基苯基)-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺(60 mg, 0.113 mmol)的溶液中, 并溶于无水 CH₂Cl₂ (6 mL)中。必须将溶液稍稍加热以溶解混合物。将三乙胺(32 μL)加到用橡胶隔膜密封的溶液中, 同时在冰浴中在氮气气氛下搅拌。将该溶液搅拌过夜, 并通过 TLC (10% MeOH/CHCl₃)检查反应。用 CHCl₃ (150 mL)稀释反应混合物, 并用 5% NaHCO₃ (30 mL)和盐水(30 mL)洗涤。收集有机

层，并用无水硫酸钠干燥。将溶液重力过滤，并浓缩滤液产生黄色固体，通过制备 TLC (10% CHCl₃)将该固体纯化，得到 N-[2-(2-溴乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)苯基]-1-甲基-4-(1-甲基-4-丁酰胺基吡咯-2-酰胺基)吡咯-2-酰胺，为白色粉末(8.4 mg, 0.013 mmol, 12%)。Mp 115–120°C；TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.55；¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) 8.25 (d, 9.0, 2H), 7.78 (br s, 1H), 7.59 (d, 8.5, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.27 (d, 1.5, 1H), 7.26 (br s, 1H), 7.19 (d, 8.5, 1H), 7.04 (d, 2.0, 1H), 7.02 (br s, 1H), 6.82 (dd, 2.0, 8.0, 1H), 6.67 (d, 1.5, 1H), 6.52 (d, 2.0, 1H), 5.33 (s, 2H), 4.35 (t, 8.0, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.14 (t, 8.0, 3H), 2.30 (t, 7.5, 2H), 1.75 (六重峰, 7.5, 2H), 1.00 (t, 7.5, 3H); IR (neat) 3412, 3126, 2954, 1758, 1658, 1643, 1583, 1523, 1440, 1402, 1348, 1320, 1239, 1156, 1099, 1060, 1017, 804, 771, 735; FAB-MS (NBA) *m/z* (相对密度) 629 (M + H⁺ - HBr, 2)。C₃₂H₃₃N₆O₈ 的准确质量(FAB-MS): 计算 628.2281, 实测 628.2277。

实施例 3

4-(2-氯乙基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吡啶-2-酰胺基]苯酚及其衍生物的制备

在室温和大气压下在无水 THF (10 mL)中氢化 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯(310 mg, 1.81 mmol)、10% Pd-C (233 mg)的悬浮液。过滤除去催化剂，并浓缩滤液得到胺，为白色固体。加入 5-硝基吡啶-2-羧酸(372 mg, 1.81 mmol)、EDCI (1.04 g, 5.42 mmol)和无水 DMF (10 mL)。在氮气氛和室温下将反应混合物搅拌两天。使用 Kugelrohr 装置(0.1 mm Hg, 60□)除去溶剂，并用 CHCl₃ 和水分配残余物。用乙酸乙酯萃取水层(两次)。干燥合并的有机萃取物(Na₂SO₄)。通过硅胶色谱(0—>50%乙酸乙酯:氯仿每 50 mL)纯化褐色油状残余物，分离 4-(氯

乙基)-3-(5-硝基吡啶-2-酰胺基)苯酚, 为黄色固体(70 mg, 14%)。Mp 290—300℃(分解, 然后熔化); TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.43; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) 10.98 (s br, 1H, 吡啶-NH), 8.87 (s br, 1H, 酰胺基-NH), 8.67 (d, 2.0, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.17 (dd, 2.0, 9.0, 1H), 7.55 (d, 9.0, 1H), 7.20 (d, 2.5, 1H), 7.11 (d, 8.5, 1H), 6.77 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 3.78 (t, 7.5, 2H), 3.08 (t, 7.5, 2H)。IR (neat) 3391, 3261, 2929, 2858, 1658, 1616, 1545, 1462, 1379, 1326, 1249, 1154, 1071, 804, 739; FAB-MS (NBA) *m/z* (相对密度) 360 (M + H⁺, 4)。C₁₇H₁₅N₃O₄³⁵Cl 的准确质量: 计算 360.0751, 实测 360.0762。

在大气压和室温下, 在新蒸馏的 THF (20 mL)中将 4-(2-氯乙基)-3-(5-硝基吡啶-2-酰胺基)苯酚(250 mg, 0.69 mmol)和 10% Pd-C (187 mg)的悬浮液氢化过夜。用 C 盐滤垫抽滤悬浮液并真空浓缩滤液, 得到胺, 为黄色固体。将 p-N,N-双-(2-氯乙基)氨基苯甲酸(219 mg, 0.84 mmol)、EDCI (436 mg, 2.28 mmol)和新蒸馏的无水 DMF (10 mL)加到该固体中。在氮气氛围和室温下将反应混合物搅拌两天。用 Kugelrohr 装置(0.1 mm Hg, 60℃)浓缩反应混合物, 并在氯仿和水中分配残余物。再用乙酸乙酯萃取水层两次。用无水硫酸钠干燥合并的有机层并浓缩。通过柱色谱(0—>10%甲醇, 在氯仿中; 硅胶)纯化残余物。获得 4-(2-氯乙基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吡啶-2-酰胺基]苯酚, 为白色固体(96 mg, 24%)。Mp 80—90℃; TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.52; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) 11.65 (d, 1.0, 1H, 吡啶-NH), 9.84 (s, 1H, 酰胺基-NH), 9.49 (s, 1H, 酚-OH), 8.12 (d, 2.0, 1H), 7.90 (d, 9.0, 2H), 7.51 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 7.39 (d, 9.0, 1H), 7.30 (d, 1.0, 1H), 7.17 (d, 8.5, 1H), 6.85 (d, 9.0, 2H), 6.78 (d, 2.5, 1H), 6.68 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 3.78 (m, 8H), 3.75 (t, 7.5, 2H), 2.97 (t, 7.5, 2H); IR (neat) 3390, 3019, 2965, 2921, 2856, 1643, 1600, 1539, 1513, 1464, 1447, 1256, 1229,

1180, 1153, 1093, 1044, 1017, 870, 799; Uv-vis (乙醇) 220 ($=1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 310 ($\epsilon = 3.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); FAB-MS (NBA) m/z (相对密度 573 ($M + H^+$, 1)). $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3^{35}\text{Cl}_3$ 的准确质量: 计算 573.1227, 实测 573.1232。

在 0℃ 和干燥管内, 将氯甲酸硝基苄酯(20.3 mg, 0.094 mmol)加到在水 THF (5 mL)和无水三乙胺(17.5 μL , 0.12 mmol)中的 4-(2-氯乙基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吡啶-2-酰胺基]苯酚(36 mg, 0.063 mmol)溶液中。将溶液保持在氮气氛围下, 并暖至室温过夜。此时加入更多量的氯甲酸硝基苄酯(10.2 mg, 0.047 mmol)。0.5 小时后, 浓缩反应混合物, 将残余物置于乙酸乙酯中, 用 5% NaHCO_3 洗涤溶液, 然后干燥(Na_2SO_4)。通过制备 TLC (10% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$)纯化残余物, 得到 4-(2-氯乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)-3-[[5-(4-双-(2-氯乙基)氨基)苯甲酰胺基]吡啶-2-酰胺基]苯酚, 为米色固体(6.1 mg, 13%)。Mp 192–98℃; TLC (10% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$) $R_f = 0.51$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) 9.11 (s br, 1H, 吡啶-NH), 8.34 (s br, 1H, 酰胺基-NH), 8.27 (d, 8.5, 2H), 8.17 (d, 2.0, 1H), 7.90 (d, 2.0, 1H), 7.84 (d, 8.5, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.62 (d, 8.5, 2H), 7.44 (d, 8.5, 1H), 7.39 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 7.28 (d, 8.5, 1H), 7.07 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 6.75 (d, 9.0, 2H), 5.37 (s, 2H), 3.83 (t, 7.0, 2H), 3.69 (t, 7.0, 2H); IR (neat) 3379, 3019, 2954, 2922, 2856, 1736, 1643, 1605, 1513, 1453, 1376, 1261, 1218, 1066, 1017, 897, 788; FAB-MS (NBA) m/z (相对密度) 752 ($M + H^+$, 1)。 $\text{C}_{36}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7^{35}\text{Cl}_3$ 的准确质量: 计算 752.1446, 实测 752.1391。

实施例 4

4-(2-溴乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]苯酚和 4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]苯酚和它们的衍

生物的制备

将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基溴(300 mg, 0.893 mmol)溶于冷冻的 THF (20 mL)中。将 10% Pd/C (0.150 g)加到该溶液中,然后在真空下用 H₂ 净化三次。在 H₂ 下,在室温和大气压下将溶液搅拌 16 小时。通过烧结漏斗中的 C 盐滤垫过滤溶液,并用 CH₂Cl₂ 洗涤。减压浓缩滤液并与无水 CH₂Cl₂ 共蒸发两次。将 5-(苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-羧酸(0.286 g, 0.894 mmol)和 EDCI (0.514 g, 2.68 mmol)加到该胺中,然后溶于无水 DMF (10 mL)中。在 N₂ 正压和室温下将溶液搅拌三天。用 Kugelrohr 装置(40°C, 0.1 mm Hg)除去 DMF。将油状残余物溶于氯仿(200 mL)、乙酸乙酯(50 mL)中,并用水(50 mL)和 5%碳酸氢钠(20 mL)洗涤。收集有机层,用硫酸钠干燥,重力过滤,并减压浓缩。用硅胶柱纯化 4-(2-溴乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]苯酚。产物为米色固体(8.1 mg, 0.016 mmol, 2%)。Mp = 285—290°C; TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.50; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) 11.70 (s, 1H), 10.45 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.18 (d, 1.5, 1H), 7.83 (d, 8.0, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.73 (dd, 1.0, 8.0, 1H), 7.60 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 7.51 (dt, 1.0, 8.0, 1H), 7.47 (d, 8.5, 1H), 7.38 (dt, 1.0, 8.0, 1H), 7.15 (d, 2.0, 1H), 7.07 (d, 8.0, 1H), 6.47 (dd, 2.0, 8.0, 1H), 4.52 (t, 7.5, 2H), 3.12 (t, 7.5, 2H); IR (neat) 3346, 3120, 2943, 1660, 1616, 1589, 1512, 1423, 1414, 1305, 1251, 1153, 1049, 810, 739, 619; FAB-MS (NBA) *m/z* (相对密度) 438 (M + H⁺ - HBr, 3)。C₂₆H₂₀N₃O₄ 的准确质量: 计算 438.1454, 实测 438.1440。

将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯(0.4068 g, 1.40 mmol)溶于冷冻的 THF (-20°C)中。将 10% Pd/C (0.200 g)加到该溶液中,然后在真空下用 H₂ 净化三次。在 H₂ 下,在室温下和在大气压下将溶液搅拌 45 小时。通过烧结漏斗中的 C 盐滤垫过滤溶液,并用 CH₂Cl₂ 洗涤。减

压浓缩滤液，并与无水 CH_2Cl_2 共蒸发，得到白色固体。将 5-(苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-羧酸(0.36 g, 1.12 mmol)和 EDCI (0.81 g, 4.20 mmol)加到胺中，然后将其溶于无水 DMF 中。在 N_2 正压和室温下将溶液搅拌四天。使用 Kugelrohr 装置(40°C , 0.1 mm Hg)除去 DMF。将油状残余物溶于氯仿(200 mL)中并用水(50 mL)和 5%碳酸氢钠(50 mL)洗涤。收集有机层。用氯仿(200 mL)萃取水层三次。收集有机层，用硫酸钠干燥，重力过滤，并减压浓缩。用硅胶柱纯化产物。以 100% 氯仿和乙酸乙酯梯度跑柱。获得 4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]苯酚，为米色固体。可以用 CH_2Cl_2 /石油醚沉淀产物(299 mg, 0.632 mmol, 28%)。Mp = $233-235^\circ\text{C}$; TLC (10% MeOH/ CHCl_3) R_f = 0.37; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 500 MHz) 11.74 (d, 1.5, 1H, 吡啶-NH), 10.44 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 9.48 (s, 1H), 8.17 (d, 1.0, 1H), 7.83 (d, 8.0, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.73 (d, 8.5, 1H), 7.58 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 7.51 (dt, 1.0, 8.0, 1H), 7.44 (d, 8.0, 1H), 7.38 (t, 8.0, 1H), 7.33 (d, 1.0, 1H), 7.17 (d, 9.0, 1H), 6.79 (d, 2.5, 1H), 5.67 (dd, 2.5, 9.0, 1H), 3.75 (t, 7.5, 2H), 2.98 (t, 7.5, 2H); IR (neat) 3401, 3259, 3041, 2965, 2921, 1643, 1594, 1534, 1446, 1301, 1256, 1230, 1094, 1051, 804, 739; UV-vis (乙醇) 218 ($\epsilon = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 290 ($\epsilon = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); FAB-MS (NBA) m/z (相对密度) 474 ($\text{M} + \text{H}^+$, 2)。 $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4^{35}\text{Cl}$ 的准确质量: 计算 474.1221, 实测 474.1219。

在 N_2 下将无水三乙胺(0.045 mL, 0.322 mmol)加到 4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]苯酚(74.1 mg, 0.156 mmol)，并溶于蒸馏的 CH_2Cl_2 (20 mL)中，然后将其置于冰浴中。将氯甲酸 4-硝基苄酯(0.087 g, 0.4025 mmol)加到溶液中，并在 N_2 下在冰浴中搅拌。加入无水 THF (2 mL)，声处理内容物至完全溶解混合物。在冰浴中将该溶液搅拌 40 分钟，然后在室温下搅拌 20 分钟。20

分钟后通过 TLC 表明反应未完全, 将更多的氯甲酸 4-硝基苄酯(0.087 g)加到此混合物中并搅拌 3 小时。用氯仿(50 mL)稀释混合物, 并用饱和 NaCl 和 5%碳酸氢钠萃取。用乙酸乙酯萃取水洗涤物。合并有机层, 用硫酸钠干燥, 重力过滤, 并减压浓缩, 得到黄褐色固体。用 1%甲醇、99%氯仿跑硅胶柱来纯化产物。获得 4-(2-氯乙基)-O-(4-硝基苄基碳酸基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚, 为米色固体(85.7 mg, 0.131 mmol, 84%)。Mp = 192—195°C; TLC (5% MeOH/CHCl₃) R_f= 0.50; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) 9.25 (s br, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.26 (d, 8.5, 1H), 7.91 (d, 2.0, 1H), 7.72 (d, 8.0, 1H), 7.614 (s, 1H), 7.612 (d, 8.5, 1H), 7.58 (d, 8.0, 1H), 7.47 (m, 3H), 7.34 (dt, 1.0, 8.0, 1H), 7.29 (d, 8.5, 1H), 7.08 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 5.37 (s, 2H), 3.89 (t, 6.0, 2H), 3.20 (t, 6.0, 2H); IR (neat) 3401, 3281, 2959, 2871, 1758, 1660, 1643, 1594, 1523, 1442, 1344, 1229, 1169, 1055, 804, 739; FAB-MS (NBA) *m/z* (相对密度) 653 (M + H⁺, 3)。C₃₄H₂₆N₄O₈³⁵Cl 的准确质量: 计算 653.1439, 实测 653.1428。

将三乙胺(0.113 mL, 0.810 mmol)加到 4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]苯酚(191.8 mg, 0.405 mmol)中, 然后溶于无水 CH₂Cl₂ (50 mL)中。将氯甲酸对硝基苄酯(0.204 mmol, 1.013 mL)加到该溶液中。在 N₂ 正压下搅拌溶液, 并在冰浴中搅拌 20 分钟。在室温下将该溶液搅拌 2 小时。在冰浴中再次冷却该溶液, 并将 N-甲基哌嗪(0.11 mL, 1.215 mmol)加到该溶液中。在室温下将该溶液搅拌 22 小时, 然后回流 1 小时。用氯仿(50 mL)稀释溶液, 并用饱和 NaCl 洗涤。收集有机层, 用硫酸钠干燥, 重力过滤, 并减压浓缩。用氯仿甲醇梯度, 起始于氯仿和每 50mL 溶剂 1%增量的甲醇, 在硅胶柱上将产物纯化。合并收集的部分并浓缩, 得到 4-(2-氯乙基)-O-(N-甲基哌嗪-N'-氨基甲酰基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]

苯酚, 为白色泡沫(90 mg, 0.15 mmol, 37%)。Mp = 208—210°C; TLC (5% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.13; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) 9.34 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.719 (d, 7.0, 1H), 7.719 (d, 1.5, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.58 (d, 8.5, 1H), 7.46 (m, 3H), 7.34 (t, 8.0, 1H), 7.23 (d, 8.0, 1H), 7.02 (dd, 2.5, 8.0, 1H), 3.84 (t, 6.5, 2H), 3.70 (s br, 2H), 3.60 (s br, 2H), 3.15 (t, 6.5, 2H), 2.46 (s br, 4H), 2.34 (s, 3H); IR (Neat) 3389, 3270, 3124, 2965, 1711, 1662, 1648, 1592, 1537, 1423, 1261, 1232, 864, 799, 749, 668; FAB-MS (NBA) *m/z* (相对密度) 600 (M + H⁺, 18)。C₃₂H₃₁N₅O₅³⁵Cl 的准确质量: 计算 600.2014, 实测 600.2009。

实施例 5

4-(2-氯乙基-3-[2-(4-N,N-(二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-酰胺基]苯酚的制备

将 3,4-二硝基苯甲酸(5.01 g, 23.6 mmol)、CH₃OH (150 mL)和 H₂SO₄ (20 mL)的溶液加热回流 22.5 小时。加入 H₂O (50 mL)后, 形成白色固体。然后用 CHCl₃ (3 × 100 mL)萃取产物, 并用饱和 NaHCO₃ (27 mL)和 H₂O (80 mL)的混合物洗涤合并的有机层。用无水 Na₂SO₄ 干燥有机层, 并减压除去溶剂, 得到 3,4-二硝基苯甲酸甲酯, 为白色固体(4.77 g, 89.4%)。Mp 85—86°C; TLC (2.5% MeOH ? CHCl₃) R_f = 0.76; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) 8.58 (d, 8.3, 1H), 8.45 (d, 8.3, 1H), 8.42 (d, 8.3, 1H), 4.00 (s, 3H); IR (液体石蜡) $\nu_{\max}$ 1731, 1600, 1553, 1461, 1376, 1292。

将 3,4-二硝基苯甲酸甲酯(1 g, 4.42 mmol)和 10% Pd/C (250 mg)溶于 CH₃OH (60 mL), 并在 H₂ 下搅拌过夜。然后通过 C 盐真空过滤反应混合物, 并用旋转蒸发仪浓缩, 得到二胺。在与无水 CH₂Cl₂ 一起共蒸发残余物两次(每次 10 mL)后, 将其直接用于下一步。

将 3,4-二氨基苯甲酸甲酯(0.73 g, 4.42 mmol)、4-(二乙基氨基)苯甲醛(3.0 g, 16.9 mmol)溶于硝基苯(30 mL)中,并在 145℃油浴中回流过夜。然后使用 Kugelrohr 装置(60□, 0.1 mm Hg)真空除去硝基苯。将保留的油状残余物溶于 CHCl₃ 中,并用水(3×50 mL)洗涤。干燥合并的有机层(Na₂SO₄),过滤并浓缩。然后通过柱色谱,使用 1% MeOH/CHCl₃ 溶剂系统纯化粗油,得到 2-(4-(N,N-二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-羧酸甲酯,为黄色固体(1.17 g, 82%收率)。TLC (2.5% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.26; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 9.87 (s br, 1H), 8.30 (s br, 1H), 7.94 (dd, 1.5, 8.5, 1H), 7.91 (d, 8.5, 2H), 7.60 (s br, 1H), 6.72 (d, 8.5, 2H), 3.42 (q, 7.0, 4H), 1.21 (t, 7.0, 6H); IR (neat) 3508, 2063, 2920, 1712, 1611, 1504, 1434, 1360, 1307, 1269, 1205, 1157, 1082, 1008, 821, 751。

将 10% NaOH (7.0 mL)和 EtOH (30 mL)加到 2-(4-(N,N-二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-羧酸甲酯(0.500 g, 1.54 mmol)中。将混合物回流 4 小时。将混合物冷却并蒸馏出乙醇。然后加入 6 M HCl 直至混合物达到 pH 1,此时黄色结晶从溶液中沉淀出。用冰浴将悬浮液冷却。然后抽滤出米色固体 2-(4-(N,N-二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-羧酸,并在 60℃下在真空烘箱中干燥过夜(0.37g, 77.8%收率)。Mp = 300—304℃; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃ 和 3 滴 DMSO-d₆) 8.33 (d, 1.0, 1H), 8.20 (d, 9.3, 2H), 8.03 (dd, 1.0, 8.7, 1H), 7.72 (d, 8.7, 1H), 6.77 (d, 9.3, 2H), 3.46 (q, 7.2, 4H), 1.24 (t, 7.2, 6H); IR (液体石蜡) 3477; 1712, 1606, 1296, 1269, 1157, 767, 724。

将 2-(4-(N,N-二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-羧酸(0.350 g, 1.13 mmol)、2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯(0.300 g, 1.75 mmol)、EDCI (0.592 g, 3.08 mmol)溶于无水 DMF (15 mL)中,并将其在室温和 N₂ 下搅拌三天。然后通过 Kugelrohr 装置(0.1 mm Hg, <70℃)除去 DMF,将残余的粗产物溶于 CHCl₃ 中,并用水(3 × 40 mL)洗涤。收集有机层,

干燥(Na_2SO_4), 过滤并浓缩。通过柱色谱, 使用溶剂梯度 10—50% $\text{EtOAc}/\text{CHCl}_3$ 进行纯化, 得到 4-(2-氯乙基)-3-[2-(4-N,N-(二乙基)氨基苯基)苯并咪唑-6-酰胺基]苯酚, 为白色固体(0.07 g, 13%收率)。Mp = 223°C ; TLC (10% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$) $R_f = 0.43$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 和 2 滴 DMSO-d_6) δ 8.78 (s br, 1H), 8.65 (s br, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.14 (d, 9.0, 2H), 7.83 (d, 8.5, 1H), 6.76 (d, 9.0, 2H), 6.73 (dd, 2.0, 8.0, 1H), 3.77 (t, 6.5, 2H), 3.45 (q, 7.5, 4H), 3.07 (t, 7.5, 2H), 1.23 (t, 7.5, 6H); IR (液体石蜡) 3408, 1607, 1493, 1379, 1306, 1254, 1202, 1156, 1093, 1021, 798, 663, 616; FAB-MS (NBA) m/z (相对密度) 463 ($\text{M} + \text{H}^+$, 5)。 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2^{35}\text{Cl}$ 的准确质量: 计算 463.1901, 实测 463.1901。

实施例 6

4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基咪唑-2-氨基)苯酚及其类似物的制备

通过前述的方法合成 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯(449 mg, 1.72 mmol)。此化合物相当不稳定, 快速用 5,6,7-三甲氧基咪唑-2-羧酸(429.0 mg, 1.71 mmol)、3 当量 EDCI (987.7 mg, 5.16 mmol) 和 DMF (15 mL) 将其处理。在氮气下将溶液搅拌三天。用 Kugelrohr 装置(60°C , 1mm Hg)除去 DMF, 并用 CHCl_3 (200 mL) 和 H_2O (75 mL) 分配油状残余物。然后干燥有机层(Na_2SO_4), 过滤并浓缩。柱色谱(1.5% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ 梯度洗脱)纯化得到 4-(氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基咪唑-2-酰胺基)苯酚, 为米色固体(77.8 mg, 11%收率)。Mp = $48-50^\circ\text{C}$; TLC (10% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$) $R_f = 0.43$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 9.71 (s br, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.99 (d, 2.5, 1H), 7.18 (s br, 1H), 7.09 (d, 8.5, 1H), 6.95 (d, 2.0, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.72 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 4.11 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (t, 6.0, 2H), 3.09 (t, 6.0, 2H); IR (KBr) 3362, 3062, 2958, 2916, 2854, 1649, 1540,

1503, 1457, 1410, 1374, 1306, 1259, 1239, 798, 756; FAB MS (NBA) m/z (相对密度) 404 (M^+ , 2), 405 ($M + H^+$, 3)。对于 $C_{20}H_{22}N_2O_5^{35}Cl_2$ 的准确质量: 计算 405.1217, 实测 405.1216。 $C_{20}H_{22}N_2O_5Cl$ 的分析: C, 59.33; H, 5.23; N, 6.92。实测: C, 59.56; H, 5.33; N, 7.13。

将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯(1.005 g, 3.44 mmol)、氧化铂(PtO_2) (200 mg)和冰箱冷冻的 THF (50 mL)加到氢化烧瓶中。然后将室内抽空, 用 H_2 净化三次, 并在 55 psi 下振荡 1 小时。然后在 C 盐上过滤溶液, 用旋转蒸发仪浓缩, 并将残余物与无水 CH_2Cl_2 共蒸发两次(每次 5 mL)。得到米色、薄片状固体, 将其置于真空下。将所得的 2-(2-氨基-4-苄氧基苯基)乙基氯溶于无水 CH_2Cl_2 (50 mL)中, 然后通过隔膜将其加到在无水 CH_2Cl_2 (440 mL)中的 5,6,7-三甲氧基吡啶-2-羧酸(961 mg, 3.83 mmol)和六氟磷酸苯并三唑-1-氧基-三吡咯烷基磷(PyBOP) (2.00g, 3.84 mmol)的搅拌着的悬浮液中。用 N_2 冲洗反应混合物, 并在室温下搅拌 10 分钟。使用注射器加入新鲜蒸馏的干燥 N,N -二异丙基乙基胺(1.5 mL, 8.6 mmol), 此时悬浮液变成黄色溶液。在室温和 N_2 下将溶液搅拌过夜。通过 TLC (16:1 CH_2Cl_2 /EtOAc)检查反应后, 用 100 mL CH_2Cl_2 稀释溶液, 并用水(100 mL)洗涤一次, 用 10% HCl (1 M) (100 mL)洗涤一次, 用饱和 $NaHCO_3$ 水溶液(100 mL)洗涤一次, 并用饱和 NaCl (100 mL)洗涤一次。收集有机层, 用无水硫酸钠干燥, 并浓缩。用 16:1 CH_2Cl_2 /EtOAc 硅胶柱纯化产物。然后收集产物, 并快速用 10% NaOH (100 mL)洗涤, 并用水(100 mL)洗涤一次。收集有机层, 用无水硫酸钠干燥, 并浓缩, 得到苄基 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)苯基醚, 为浅黄色泡沫(1.13 g, 2.29 mmol, 66%)。TLC (16:1 CH_2Cl_2 /EtOAc) R_f = 0.38; 1H -NMR (500 MHz $CDCl_3$) 9.19 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.62 (d, 3.0, 1H), 7.45 (d, 7.5, 2H), 7.39 (t, 7.5, 2H), 7.33 (t, 7.5, 1H), 7.15 (d, 8.5, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.85 (dd, 3.0, 8.5, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.09 (s, 2H),

4.08 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (t, 6.5, 2H), 3.10 (t, 6.5, 2H); IR (neat) 3296, 3073, 2970, 2924, 2850, 1751, 1709, 1644, 1579, 1537, 1499, 1467, 1411, 1304, 1261, 1234, 1099, 1025, 914, 797, 732; EI-MS (相对密度) 494 (M^+ , 20), 458 ($M^+ - HCl$, 100)。

将 25% NH_4HCO_2 (17.60 mL, 0.0697 mmol)和 THF (100 mL)的水溶液加到含有苄基 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯基醚(2.17 g, 4.38 mmol)的烧瓶中。在冰浴中将该溶液搅拌 10 分钟。将 Pd/C 10% (450 mg)加到冷冻的溶液中。然后将烧瓶在 H_2 下搅拌过夜。混合物的 TLC 分析(2.5% MeOH/ $CHCl_3$)表明完成脱苄基反应。用 C 盐将溶液过滤,并用旋转蒸发仪浓缩。将所得的油溶于 $CHCl_3$ (100 mL)中,用水(100 mL)洗涤一次,并用盐水(100 mL)洗涤一次。用无水硫酸钠干燥有机层,重力过滤,并用旋转蒸发仪浓缩。用硅胶柱纯化所得的黄色油,从 0.5% MeOH/ $CHCl_3$ 开始。每 100 mL 以 0.5%增量增加 MeOH 的百分比。收集产物并浓缩,得到 4-(2-氯乙基)-3(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯酚,为白色泡沫(880 mg, 2.17 mmol, 50%)。

将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯(250 mg, 0.856 mmol)、10% Pd/C (75 mg)悬浮在冷冻的($-20^\circ C$) THF (30 mL)中。抽空烧瓶,用 H_2 净化三次,并在大气压和室温下搅拌 24 小时。用 C 盐过滤溶液并浓缩。将所得的绿色油状残余物与 CH_2Cl_2 (5 mL)一起共蒸发两次,得到浅绿色、薄片状固体。然后将所得的 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯置于高真空下。将 5-甲氧基吲哚-2-羧酸(180 mg, 0.941 mmol)和 EDCI (495 mg, 2.56 mmol)加到火焰干燥的 100 mL 圆底烧瓶中。用隔膜密封烧瓶并用 N_2 冲洗。通过隔膜加入无水 DMF (10 mL)。将溶液搅拌 10 分钟。将溶于无水 DMF (3 mL)中的胺加到反应混合物中。在室温和 N_2 下将澄清的浅褐色悬浮液搅拌三天。用 EtOAc (50 mL)稀释溶液,并通过瓷漏斗过滤。将滤液加到分液漏斗中,并用水(100 mL)洗

涤三次。然后用无水硫酸钠干燥有机层，重力过滤，并用旋转蒸发仪浓缩，得到深褐色油。在硅胶柱上，使用 1% MeOH/CHCl₃ 纯化粗产物，得到 4-(2-氯乙基)-3-(5-甲氧基吡啶-2-酰胺基)苯酚，为米色残余物(29 mg, 0.0842 mmol, 10%)。Mp = 64–70°C; TLC (1% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.42; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 9.08 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.56 (d, 2.5, 1H), 7.36 (d, 9.0, 1H), 7.12 (d, 8.5, 1H), 7.10 (d, 2.0, 1H), 7.01 (dd, 3.0, 8.0, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.73 (dd, 3.0, 8.0, 1H), 5.38 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (t, 6.5, 2H), 3.11 (t, 6.5, 2H); IR (neat) 3290, 3050, 2957, 2916, 1653, 1618, 1534, 1508, 1472, 1451, 1223, 1093, 1026, 907, 798, 715; EI-MS (相对密度) 344 (M⁺, 20), 308 (M⁺ - HCl, 100); C₁₈H₁₇N₂O₃³⁵Cl 的准确质量: 计算 334.0928, 实测 344.0914。

将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯(250 mg, 0.856 mmol)、10% Pd/C (75 mg)悬浮在冷冻的(-20°C) THF (30 mL)中。抽空烧瓶并用 H₂ 净化三次，在大气压和室温下搅拌 24 小时。用 C 盐过滤溶液并浓缩。将所得的绿色油状残余物与 CH₂Cl₂ (5 mL)一起共蒸发两次，得到浅绿色、薄片状固体。然后将所得的 2-(2-氨基-4-羟基苯基)乙基氯置于高真空下。将 2-甲氧基肉桂酸(168 mg, 0.942 mmol)和 EDCI (492 mg, 2.57 mmol)加到火焰干燥的烧瓶中。用隔膜密封烧瓶，并用 N₂ 冲洗。通过隔膜加入无水 DMF (10 mL)。将该溶液搅拌 10 分钟。将溶于无水 DMF (3 mL)中的胺加到反应混合物中。在室温和 N₂ 下将澄清的浅褐色悬浮液搅拌三天。用 EtOAc (100 mL)稀释溶液，并通过瓷漏斗过滤。将滤液加到分液漏斗中，并用水(100 mL)洗涤四次。然后用无水硫酸钠干燥有机层，重力过滤，并用旋转蒸发仪浓缩，得到浅褐色油状残余物。用 0.5% MeOH/CHCl₃ 硅胶柱纯化粗产物。使用梯度溶剂系统，起始于 0.5% MeOH/CHCl₃。在 50 mL 后将 MeOH 百分比增加至 1%，然后每 50 mL 增加 1%，得到 4-(2-氯乙基)-3-(2-甲氧基肉桂

酰胺基)苯酚, 为米色泡沫(70.4 mg, 0.213 mmol, 25%)。Mp = 70°C; TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.61; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 8.01 (d, 16.0, 1H), 7.53 (d, 6.5, 1H), 7.49 (s br, 1H), 7.36 (t, 7.0, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.08 (d, 8.0, 1H), 6.98 (t, 7.5, 1H), 6.93 (d, 7.5, 1H), 6.69 (dd, 2.0, 6.5, 1H), 6.68 (d, 16.0, 1H), 5.35 (s br, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.76 (t, 6.5, 2H), 3.05 (t, 6.5, 2H); IR (neat) 3253, 3071, 3011, 2925, 2839, 1648, 1614, 1541, 1485, 1459, 1248, 1209, 1162, 1101, 1028, 753; EI-MS (相对密度) 331 (M⁺, 2), 295 (M⁺ - HCl, 35); C₁₈H₁₈NO₃³⁵Cl 的准确质量: 计算 331.0975, 实测 331.0970。

将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯(250 mg, 0.856 mmol)、10% Pd/C (75 mg)悬浮在冷冻的(-20°C) THF (30 mL)中。抽空烧瓶并用 H₂ 净化三次, 在大气压和室温下将其搅拌 24 小时。用 C 盐过滤溶液并浓缩。将所得的绿色油状残余物与 CH₂Cl₂ (5 mL)一起共蒸发两次, 得到浅绿色、薄片状固体。将 4-甲氧基肉桂酸(168 mg, 0.942 mmol)和 EDCI (492 mg, 2.57 mmol)加到火焰干燥的烧瓶中。用隔膜密封烧瓶并用 N₂ 冲洗。通过隔膜加入无水 DMF (10 mL)。将溶液搅拌数分钟。将溶于无水 DMF (3 mL)中的胺加到反应混合物中。在室温和 N₂ 下将澄清的浅黄色悬浮液搅拌三天。用 EtOAc (100 mL)稀释溶液, 通过瓷漏斗过滤。将滤液加到分液漏斗中, 并用水(100 mL)洗涤四次。然后用无水硫酸钠干燥有机层, 重力过滤, 并用旋转蒸发仪浓缩, 得到浅黄色固体。将该固体悬浮在 0.5% MeOH/CHCl₃ 中, 并通过赫尔什漏斗过滤, 得到浅褐色固体(50.9 mg)。然后用 0.5% MeOH/CHCl₃ 硅胶柱纯化滤液。使用梯度溶剂系统, 起始于 0.5% MeOH/CHCl₃。在 50mL 后将 MeOH 百分比增加到 1%, 然后每 50 mL 增加 1%, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(4-甲氧基肉桂酰胺基)苯酚, 为浅褐色/黄色固体 (23.3 mg; 总产量 74.2 mg, 0.22 mmol, 26%)。Mp = 210–213°C;

TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f 0.60; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 8.60 (s br, 1H), 8.08 (s br, 1H), 7.58 (d, 16.0, 1H), 7.48 (m, 2H), 6.97 (d, 8.0, 1H), 6.84 (m, 2H), 6.62 (d br, 7.0, 1H), 6.49 (d br, 16.0, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.62 (t, 7.5, 2H), 2.95 (t, 7.5, 2H); IR (液体石蜡) 3295, 3183, 3063, 1644, 1588, 1545, 1511, 1282, 1265, 1226, 1175, 1020, 968, 856, 826; EI-MS (相对密度) 331(M⁺, 3), 295 (M⁺, 29)。

将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯(250 mg, 0.856 mmol)、10% Pd/C (75 mg)悬浮在冷冻的(-20℃) THF (30 mL)中。抽空烧瓶并用 H₂ 净化三次, 然后在大气压和室温下搅拌 24 小时。用 C 盐过滤溶液并浓缩。将所得的绿色油状残余物与 CH₂Cl₂ (5 mL)一起共蒸发, 得到浅绿色、薄片状固体。将 3-甲氧基肉桂酸(168 mg, 0.942 mmol, 25%) 和 EDCI (492 mg, 2.57 mmol)加到火焰干燥的烧瓶中。用隔膜密封烧瓶并用 N₂ 冲洗。通过隔膜加入无水 DMF (10 mL)。将溶液搅拌数分钟。将溶于无水 DMF (3 mL)中的胺加到反应混合物中。在室温和 N₂ 下将澄清的浅黄色悬浮液搅拌三天。用 EtOAc (100 mL)稀释溶液并通过瓷漏斗过滤。将滤液加到分液漏斗中, 并用水(100 mL)洗涤四次。然后用无水硫酸钠干燥有机层, 重力过滤并浓缩, 得到浅褐色油状残余物, 该残余物在冷藏时固化。将产物悬浮在 0.5% MeOH/CHCl₃ 中, 并通过赫尔什漏斗过滤, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(3-甲氧基肉桂酰胺基)苯酚, 为黄色固体(54.7 mg)。然后将滤液溶于 0.5% MeOH/CHCl₃ 中并用 0.5% MeOH/CHCl₃ 硅胶柱纯化。在 50 mL 后将 MeOH 百分比增加到 1%, 然后以每 50 mL 1%增量增加, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(3-甲氧基肉桂酰胺基)苯酚, 为浅黄色固体(45.9 mg; 总产量 100.6 mg, 0.303 mmol, 35%)。Mp = 220℃; TLC (10% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.64; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 7.73 (d, 16.0, 1H), 7.48 (s br, 1H), 7.32 (t, 8.0, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.22 (d, 8.0, 1H), 7.10 (d, 8.5, 1H), 7.08 (d, 2.0, 1H), 6.94 (dd, 2.0, 8.0, 1H), 6.70 (d, 7.0, 1H), 6.53 (d, 16.0,

1H), 4.90 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.77 (t, 6.5, 2H), 3.05 (t, 6.5, 2H); IR (液体石蜡) 3356, 3252, 2727, 1709, 1640, 1597, 1541, 1295, 1244, 1200, 1162, 1045, 959, 856, 718; EI-MS (相对密度) 331 (M^+ , 5), 295($M^+ - HCl$, 32)。

将 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯(250 mg, 0.856 mmol)、10% Pd/C (75 mg)悬浮在冷冻的(-20℃) THF (30 mL)中。抽空烧瓶并用 H_2 净化三次, 并在大气压和室温下搅拌 24 小时。用 C 盐过滤溶液并浓缩。将所得的绿色油状残余物与 CH_2Cl_2 (5 mL)一起共蒸发, 得到浅绿色、薄片状固体。将 3-(2,6-二甲氧基-5-吡啶基)丙烯酸(245 mg, 1.09 mmol)和 EDCI (570 mg, 2.97 mmol)加到火焰干燥的烧瓶中。用隔膜密封烧瓶并用 N_2 冲洗。通过隔膜加入无水 DMF (15 mL)。将溶液搅拌数分钟。将溶于无水 DMF (3 mL)中的胺加到反应混合物中。在室温和 N_2 下将澄清的浅黄色悬浮液搅拌三天。用 EtOAc (100 mL)稀释该溶液, 并通过瓷漏斗过滤。将滤液加到分液漏斗中, 并用水(100 mL)洗涤四次。然后用无水硫酸钠干燥有机层, 重力过滤, 并用旋转蒸发器浓缩, 得到油, 用 0.5% MeOH/ $CHCl_3$ 硅胶柱纯化该油。使用梯度溶剂系统, 起始于 0.5% MeOH/ $CHCl_3$ 。50 mL 后将 MeOH 百分比增加到 1%, 然后每 50 mL 增加 1%, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(2,6-二甲氧基-5-吡啶基)-E-乙烯-1-基酰胺基)苯酚, 为浅黄色固体(39.7mg, 0.10 mmol, 12%)。Mp = 153—155℃; TLC (10% MeOH/ $CHCl_3$) R_f 0.55; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 7.80 (d, 15.5, 1H), 7.69 (d, 8.0, 1H), 7.53 (s br, 1H), 7.44 (s br, 1H), 7.08 (d, 8.5, 1H), 6.68 (dd, 1.0, 8.0, 1H), 6.61 (d, 15.5, 1H), 6.36 (d, 8.0, 1H), 5.91 (s br, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.75 (t, 7.5, 2H), 3.04 (t, 7.5, 2H); IR (液体石蜡) 3273, 3180, 1652, 1594, 1483, 1386, 1319, 1261, 1213, 1097, 1018, 800。

实施例 7

发夹化合物的合成

N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺及类似物

将非手性 2-(4-苄氧基-2-硝基苯基)乙基氯化物(0.500 g, 1.71 mmol)溶于冰箱冷冻的 THF (30 mL)中, 并加入 PtO_2 (0.150 g)。搅拌反应物, 同时真空脱气, 然后与氢气接触。重复脱气/氢接触循环三次, 此时在氢气下, 在 50 psi 下, 在室温下继续将反应物搅拌 1 小时。用 C 盐过滤胺溶液, 并进行减压浓缩。然后与无水 CH_2Cl_2 (5 mL)一起共蒸发三次。得到黄褐色油, 并将其置于高真空下, 用箔覆盖 30 分钟。然后将 5-硝基苯并呋喃-2-羧酸(0.394 g, 1.90 mmol)和 PyBOP (0.999 g, 1.92 mmol)悬浮在无水 CH_2Cl_2 (220 mL)中。然后将胺溶于无水 CH_2Cl_2 (30 mL)中, 并通过注射器经隔膜加到悬浮液中。将反应物搅拌 10 分钟, 此时将无水 N,N-二异丙基乙基胺(0.75 mL, 4.29 mmol)加到悬浮液中。该溶液变澄清黄色。用箔覆盖其并在氮气下, 在室温下将溶液搅拌两天。将溶液真空过滤, 并用水(1 × 75 mL)、10% HCl (1 × 75 mL)、饱和碳酸氢钠(1 × 75 mL)和盐水(1 × 75 mL)洗涤滤液。用硫酸钠干燥有机层, 真空过滤, 并减压浓缩, 得到黄色固体。使用 5—20% EtOAc/己烷溶剂系统在硅胶柱上纯化残余物, 得到期望的产物 2-(4-苄氧基-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)苯基)乙基氯, 为黄色固体 (0.173 g, 22%收率)。 $R_f = 0.22$ (20% EtOAc/己烷) M.p. 109-113°C; IR (neat) 3370, 3088, 3032, 2945, 2858, 1690, 1531, 1337, 1270, 1168, 1101, 1025, 753, 610; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 8.67 (d, 2.0, 1H), 8.64 (s br, 1H), 8.39 (dd, 2.0, 9.0, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.70 (d, 9.0, 1H), 7.65 (d, 2.5, 1H), 7.45 (d, 8.0, 2H), 7.40 (t, 8.0, 2H), 7.36 (t, 8.0, 1H), 7.19 (d, 8.5, 1H), 6.89 (dd, 2.5, 8.5,

1H), 5.10 (s, 2H), 3.83 (t, 6.5, 2H), 3.14 (t, 6.5, 2H)。FAB-MS (NBA) 451 ($M + H^+$, 11)。C₂₄H₁₉N₂O₅Cl + H 的准确质量: 计算 451.1060; 实测 451.1050。

将非手性 2-(4-苄氧基-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)苯基)乙基氯 (0.099 g, 0.220 mmol) 和 PtO₂ (0.030 g) 的混合物悬浮在冰箱冻冷的 THF (25 mL) 中, 在 50 psi 和室温下将悬浮液氢化(同时振荡) 45 分钟。用 C 盐过滤悬浮液, 并减压浓缩滤液。因为胺中间产物不稳定, 因而将它直接使用。

将 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]戊二酰胺一羧酸(0.132 g, 0.256 mmol)、EDCI (0.084 g, 0.439 mmol) 和 1-羟基苯并三唑水合物[HOBT] (0.030 g, 0.220 mmol) 加到上述胺中, 然后将其溶于 DMF (7.5 mL) 中。借助声处理进行溶解, 并在氮气和室温下将悬浮液搅拌三天, 同时用箔覆盖烧瓶。此时, 通过 Kugelrohr 装置(0.1 mm Hg, 60□)除去 DMF。在硅胶柱上, 用 CHCl₃ 至 7% MeOH/CHCl₃ 溶剂系统纯化残余物, 得到期望的产物 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(3-苄氧基-2-(2-氯乙基)苯基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺, 为褐色固体(0.108 g, 52%收率)。R_f = 0.08 (5% MeOH/CHCl₃)。M. p. 80—84°C。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 10.21 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 5.09 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.78 (s, 3H)。FAB-MS (NBA) 949 ($M + H^+$, 1)。FAB-MS (NBA + K⁺) 987 ($M + K^+$, 1)。C₅₀H₅₇N₈O₉Cl + Na 的准确质量: 计算 971.3835, 实测 971.3821。

将 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(3-苄氧基-2-(2-氯乙基)苯基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺(0.108 g, 0.114 mmol)溶于冰箱冷冻的 THF (20 mL) 中。将 10% Pd/C (0.070 g) 加入该溶液中。搅拌反应物, 同时真空脱气, 随后

与氢气接触。重复脱气/氢接触循环三次，此时在氢气和室温下将反应物继续搅拌一天。此时 TLC 分析表明反应没有完全，因此重复上述脱气过程，并再次在氮气下将反应物搅拌一天。此时，TLC 表明反应完全。用 C 盐过滤反应物。用 THF 洗涤 C 盐，真空除去溶剂。所得的是米色油状薄膜 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺(0.080 g, 82% 收率)。R_f = 0.31 (10% MeOH/CHCl₃)。IR (neat) 3630, 3308, 3058, 2965, 2910, 1634, 1516, 1424。¹H-NMR (500 MHz, MDSO-d₆) 10.10 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 8.19 (d, 1.5, 1H), 7.96 (t, 6.0, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.62 (d, 9.0, 1H), 7.54 (dd, 2.0, 9.0, 1H), 7.15 (m, 2H), 6.85 (d, 2.0, 1H), 6.82 (d, 1.5, 1H), 6.77 (t br, 6.0, 1H), 6.76 (d, 2.0, 1H), 6.67 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.73 (t, 6.5, 2H), 3.13 (q, 6.5, 2H), 2.93 (t, 6.5, 2H), 2.90 (t, 6.5, 2H), 2.39 (t, 6.5, 2H), 2.32 (t, 6.5, 2H), 1.91 (五重峰, 6.5, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.45 (s, 9H)。FAB-MS (NBA) 859(M + H⁺, 1)。

将 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺(0.080 g, 0.093 mmol)溶于无水乙酸乙酯(通过分子筛 3 Å) (20 mL)中，同时进行声处理。在氮气氛和室温下，将无水 3 M 盐酸/乙酸乙酯(10 mL)加到澄清的浅黄色溶液中，溶液立即变浑浊。在将反应物搅拌 3—4 小时后，停止搅拌并将沉淀在冰箱中放置 1 小时。用巴斯德移液管取出一些 HCl/EtOAc。在预先称重的试管中将残余的沉淀物溶液离心。然后再次用无水乙酸乙酯(6 mL)洗涤在试管中收集的固体。然后尽可能地除去乙酸乙酯。重复此操作三次，然后用一张纸和橡皮带覆盖试管。然后在真空烘箱(0.1 mm Hg, 40℃)中将覆盖的试管

和内容物干燥过夜,得到米黄色固体 N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺盐酸盐(0.038 g, 52%收率)。M.p. 220—224 °C。IR (液体石蜡) 3288, 3114, 1654, 1572, 1193, 1143, 1091, 810, 707。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 10.04 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.17 (d, 1.5, 1H), 8.02 (t, 6.0, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.62 (d, 9.0, 1H), 7.52 (dd, 2.0, 9.0, 1H), 7.53—7.67 (m, 3H, -NH₃⁺), 7.14 (m, 3H), 7.06 (d, 8.5, 1H), 6.85 (d, 1.5, 1H), 6.83 (d, 1.5, 1H), 6.68 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.73 (t, 7.0, 2H), 3.18 (q, 6.5, 2H), 3.08 (t, 7.0, 2H), 2.93 (t, 6.5, 2H), 2.79 (t, 6.5, 2H), 2.39 (t, 6.5, 2H), 2.31 (t, 6.5, 2H), 1.91 (五重峰, 6.5, 2H), 1.52 (m, 4H)。FAB-MS (NBA) 759 (M⁺, 1)。C₃₉H₄₄N₈O₇Cl₂ 的准确质量: 计算 759.3021, 实测 759.2997。

将 2-(4-苄氧基-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)苯基)乙基氯(0.219 g, 0.486 mmol)与 PtO₂ (0.060 g)的混合物悬浮在冰箱冷冻的 THF (25 mL)中, 在 50 psi 和室温下将悬浮液氢化(同时振荡) 1 小时。用 C 盐过滤悬浮液, 并减压浓缩滤液。将胺等量分到两个烧瓶中。因为胺中间产物不稳定, 因此将其直接使用。

将 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基咪唑-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]戊二酰胺一羧酸(0.133 g, 0.258 mmol)、EDCI (0.093 g, 0.486 mmol)和 1-羟基苯并三唑水合物[HOBt] (0.033 g, 0.244 mmol)加到 2-(4-苄氧基-2-(5-氨基苯并呋喃-2-酰胺基)苯基)乙基氯(0.243 mmol)中, 然后将其溶于 DMF (15 mL)中。借助声处理进行溶解, 并在氮气和室温下将悬浮液搅拌两天, 同时用箔覆盖烧瓶。此时, 通过 Kugelrohr 装置(0.1 mm Hg, 60 °C)除去 DMF。将所得的油溶于 CHCl₃ 中, 用水(1×75 mL)洗涤, 然后用盐水(1 × 75 mL)洗涤, 并用硫酸钠

干燥。然后将其过滤并减压浓缩，得到产物 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基咪唑-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(3-苄氧基-2-(2-氯乙基)苯基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺，为褐色油(0.125 g, 51%收率)。R_f = 0.40 (10% MeOH/CH₂Cl₂)。IR (液体石蜡) 3309, 3190, 1685, 1644, 1536, 1260, 1168, 1096, 1014, 809, 723。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 10.24 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.19 (d, 1.5, 1H), 7.90 (t, 6.5, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.62 (d, 8.5, 1H), 7.55 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.44 (d, 8.0, 2H), 7.39 (t, 8.0, 2H), 7.33 (t, 8.0, 1H), 7.30 (d, 8.5, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.02 (d, 1.5, 1H), 6.94 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 6.90 (d, 1.5, 1H), 6.79 (t br, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.76 (t, 6.5, 2H), 3.21 (q, 6.5, 2H), 2.98 (t, 6.5, 2H), 2.90 (t, 6.5, 2H), 2.38 (t, 6.5, 2H), 2.32 (t, 6.5, 2H), 1.91 (五重峰, 6.5, 2H), 1.45 (五重峰, 6.5, 2H), 1.35 (s, 9H)。

将 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基咪唑-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(3-苄氧基-2-(2-氯乙基)苯基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺(0.125 g, 0.132 mmol)溶于冰箱冷冻的 THF (20 mL)中。将 10% Pd/C (0.100 g)加入该溶液中。搅拌反应物，同时真空脱气，随后与氢气接触。重复脱气/氢接触循环三次，此时在氢气氛和室温下将反应物继续搅拌一天。此时，TLC 分析表明反应完全。用 C 盐过滤反应物。用 THF 洗涤 C 盐，并真空除去溶剂。通过制备 TLC，使用 10% MeOH/CHCl₃ 溶剂系统纯化所得的油。除去上部条带，得到期望的产物 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基咪唑-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺，为无色油状薄膜(0.050 g, 44%收率)。R_f = 0.30 (10% MeOH/CHCl₃)。IR (neat) 3283, 3114, 2919, 2852, 1654, 1526, 1465, 1245, 1107, 799, 743, 610。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 9.83 (s,

1H), 9.48 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.92 (t, 6.5, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.63 (d, 8.0, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.54 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.22 (d, 8.5, 1H), 7.00 (d, 8.5, 1H), 6.89 (d, 1.5, 1H), 6.79 (t br, 1H), 6.76 (d, 1.5, 1H), 6.67 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.73 (t, 6.5, 2H), 3.22 (q, 6.5, 2H), 3.08 (t, 6.5, 2H), 2.93 (t, 6.5, 2H), 2.91 (t, 6.5, 2H), 2.38 (t, 6.5, 2H), 2.32 (t, 6.5, 2H), 1.91 (五重峰, 6.5, 2H), 1.45 (五重峰, 6.5, 2H), 1.35 (s, 9H)。FAB-MS (NBA) 860 ($M + H^+$, 1)。

将 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基咪唑-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺(0.050 g, 0.058 mmol)溶于无水乙酸乙酯(20 mL), 同时进行声处理。在氮气氛下将无水 3 M 盐酸/乙酸乙酯(15 mL)加到澄清的浅黄色溶液中, 该溶液立即变混浊。将反应物搅拌 2.5 小时后, 停止搅拌, 使沉淀物沉降。通过移液管取出一些 HCl/EtOAc (10 mL)。用无水 EtOAc (10 mL)将固体洗涤两次, 每次用移液管除去 EtOAc。用轻微氮气流除去剩余的溶剂。进一步在高真空(0.1 mm Hg)和室温下干燥固体。所得产物是白色固体, N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基咪唑-4-(N-甲基吡咯-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺盐酸盐(0.036 g, 81%收率)。M.p. 190—210°C。IR (液体石蜡) 3247, 3149, 1659, 1542, 1306, 1255, 1199, 1096, 809, 727, 610。¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) 10.18 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 9.49 (s br, 1H), 8.19 (d, 1.5, 1H), 8.01 (t, 6.5, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.67 (s br, 3H, $-NH_3^+$), 7.62 (d, 8.5, 1H), 7.55 (dd, 2.0, 8.5, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.25 (d, 1.5, 1H), 7.15 (d, 8.5, 1H), 6.92 (d, 1.5, 1H), 6.77 (d, 2.5, 1H), 6.66 (dd, 2.5, 8.5, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.73 (t, 6.5, 2H), 3.25 (q, 6.5, 2H), 2.93 (t, 6.5, 2H), 2.80 (m, 2H), 2.40 (t, 6.5,

2H), 2.33 (t, 6.5, 2H), 1.91 (五重峰, 6.5, 2H), 1.52 (m, 4H)。FAB-MS (NBA) 760 (M^+ , 1)。C₃₇H₄₃N₉O₇Cl₂ 的准确质量: 计算 760.2974, 实测 760.2971。

将 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基咪唑-2-酰胺基)-2-酰胺基)]戊二酰胺一羧酸(0.133 g, 0.258 mmol)、EDCI (0.093 g, 0.486 mmol)和 1-羟基苯并三唑水合物[HOBt] (0.033 g, 0.244 mmol) 加到 2-(4-苄氧基-2-(5-氨基苯并呋喃-2-酰胺基)苯基)乙基氯(0.243 mmol)中, 然后将其溶于 DMF (15 mL)中。借助声处理进行溶解, 并在氮气和室温下将悬浮液搅拌两天, 同时用箔覆盖烧瓶。此时, 通过 Kugelrohr 装置(0.1 mm Hg, 60□)除去 DMF。将所得的油溶于 CHCl₃ 中, 用水(1 × 75 mL)洗涤, 然后用盐水(1 × 75 mL)洗涤, 并用硫酸钠干燥。然后过滤并减压浓缩, 得到产物 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基咪唑-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(3-苄氧基-2-(2-氯乙基)苯基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺, 为褐色油(0.166 g, 68% 收率)。R_f = 0.40 (10% MeOH/CHCl₃)。

将 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基咪唑-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(3-苄氧基-2-(2-氯乙基)苯基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺(0.166 g, 0.175 mmol)溶于冰箱冷冻的 THF (20 mL)中。将 10% Pd/C (0.100 g)加到该溶液中。搅拌反应物, 同时真空脱气, 随后与氢气接触。重复脱气/氢接触循环三次, 此时在氢气氛和室温下将反应物继续搅拌一天。此时, TLC 表明反应完全。用 C 盐过滤反应物。用 THF 洗涤 C 盐, 并真空除去溶剂。通过制备 TLC, 使用 10% MeOH/CHCl₃ 溶剂系统纯化所得的油。除去上部条带, 得到期望的产物 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基咪唑-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺, 为黄褐色(ten)残余物(0.076 g, 50%收率)。R_f = 0.28 (10% MeOH/CHCl₃)。

将 N-[(N-BOC-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基咪唑-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺(0.076 g, 0.088 mmol)溶于无水乙酸乙酯(20 mL)中, 同时进行声处理。在氮气氛下, 将无水 3 M 盐酸/乙酸乙酯(15 mL)加到澄清的浅黄色溶液中, 该溶液立即变混浊。将反应物搅拌 2.5 小时后, 停止搅拌并使沉淀沉降。通过移液管取出一些 HCl/EtOAc (10 mL)。用无水 EtOAc (10 mL)将固体洗涤两次, 每次用移液管除去 EtOAc。用氮气流除去剩余的溶剂。进一步在高真空(0.1 mm Hg)和室温下干燥固体。所得产物是白色固体, N-[(N-(4-氨基丁基)-N-甲基吡咯-4-(N-甲基咪唑-2-酰胺基)-2-酰胺基)]-N-[5-(4-(2-氯乙基)苯酚-3-基)苯并呋喃-2-酰胺基]]戊二酰胺盐酸盐(0.062 g, 91%收率)。M.p. 172—182℃(分解)。IR (液体石蜡) 3370, 3175, 1700, 1654, 1527, 1296, 1224, 1153, 968, 712, 600。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 10.23 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 9.48 (s br, 1H), 8.19 (d, 1.5, 1H), 8.03 (t, 6.5, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.68 (s br, 3H, -NH₃⁺), 7.64 (d, 8.0, 1H), 7.56 (dd, 2.0, 8.0, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.14 (d, 8.5, 1H), 6.88 (d, 1.5, 1H), 6.74 (d, 2.5, 1H), 6.68 (d, 2.5, 8.0, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.73 (t, 6.5, 2H), 3.18 (m, 2H), 2.94 (t, 6.5, 2H), 2.80 (q br, 5.5, 2H), 2.39 (t, 6.5, 2H), 2.38 (t, 6.5, 2H), 1.91 (五重峰, 6.5, 2H), 1.51 (m, 4H)。FAB-MS (NBA) 760 (M⁺, 1)。C₃₇H₄₃N₉O₇Cl₂ 的准确质量: 计算 760.2974, 实测 760.2980。

实施例 8

4-(2-氯乙基)-7-羟基-5-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)吡啶-2,3-二羧酸二甲酯及其类似物的合成

将 2-氨基-4-氯-5-硝基苯酚(20.03 g, 0.133 mol)、无水碳酸钾(20.0

g, 0.145 mol)和四丁基碘化铵(0.025 g, 0.068 mmol)加到无水 500 mL, 并用隔膜覆盖。加入新鲜蒸馏的无水 DMF (90 mL), 然后加入苄基溴 (13.8 mL, 0.116 mol), 并在室温和 N_2 下将反应物搅拌过夜。然后通过用 Kugelrohr 装置(50°C, 0.25 mm Hg)除去 DMF 而浓缩溶液。将油状残余物溶于 $CHCl_3$ 中, 抽滤除去过量的碳酸钾, 并用水洗涤。用旋转蒸发仪浓缩滤液直至余下黄色固体。首先用氯仿硅胶柱纯化粗产物。从开始的几个部分中收集产物, 2-苄氧基-5-氯-4-硝基苯胺。然后在硅胶柱上, 使用 20%乙酸乙酯/己烷洗脱剂纯化产物。收集产物, 用旋转蒸发仪浓缩, 并在高真空下干燥, 得到 2-苄氧基-5-氯-4-硝基苯胺, 为黄色固体(13.44 g, 48.34 mmol, 56%)。Mp 98—103°C。TLC (20%乙酸乙酯/己烷) $R_f = 0.38$; 500 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$) 7.68 (s, 1H), 7.42 (m, 5H), 6.72 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.52 (s br, 2H); IR (液体石蜡) 3469, 3378, 3355, 1613, 1567, 1522, 1483, 1464, 1377, 1217, 1126; EI-MS m/z (相对密度) 278 (M^+ , 11)。 $C_{13}H_{11}N_2O_3Cl$ 的准确质量: 计算 278.0458, 实测 278.0468。

将 2-苄氧基-5-氯-4-硝基苯胺(31.63 g, 0.0828 mmol)在干燥的 250 mL 圆底烧瓶中溶于 300 mL 无水二氯甲烷中, 并用隔膜密封。然后加入三乙胺(13.2 mL, 0.0947 mol, 1.1 当量)。随后将苯甲酰氯(31.1 mL, 0.268 mol, 3 当量)在自均衡滴液漏斗中加到无水二氯甲烷(100 mL)中, 同时用干燥管覆盖。将苯甲酰氯溶液滴加到圆底烧瓶中。在加入苯甲酰氯溶液后将反应混合物搅拌 15 分钟。然后在干燥管下将溶液回流过夜。用氯仿(100 mL)稀释溶液, 并用 5%碳酸氢钠(100 mL)和水(100 mL)洗涤。用无水硫酸钠干燥有机层, 重力过滤, 并用旋转蒸发仪浓缩。将乙醚(150 mL)加到固体中, 形成悬浮液, 然后将其抽滤, 得到 N-(2-苄氧基-5-氯-4-硝基苯基)苯甲酰胺, 为桃色固体(31.63 g, 0.0828 mol, 85%)。Mp 158-160°C; TLC (氯仿) $R_f = 0.62$; 500 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$) 8.89 (s, 1H), 8.74 (s br, 1H), 7.80 (d, 8.0, 2H),

7.68 (s, 1H), 7.58 (t, 8.0, 1H), 7.48 (t, 8.0, 2H), 7.44 (m, 5H), 5.25 (s, 2H); IR (液体石蜡) 3416, 3378, 1670, 1586, 1529, 1517, 1499, 1335, 1259, 1194. EI-MS m/z (相对密度) 382(M⁺, 7). C₂₀H₁₅N₂O₄Cl 的准确质量: 计算 382.0720, 实测 382.0712.

将所有的玻璃器皿在烘箱中干燥过夜或进行火焰干燥。在 N₂ 下将在矿物油和无水己烷(5 mL)中的 60% NaH (0.632 g, 15.6 mmol)分散体加到 250 mL 圆底烧瓶中。将悬浮液搅拌 10 分钟, 然后使其沉降。用注射器从烧瓶中小心除去己烷。将干燥和新鲜蒸馏的 DMSO (20 mL)加到 NaH 中。搅拌混合物并将其置于冰浴中。通过注射器缓慢加入干燥和新鲜蒸馏的丙二酸二甲酯(1.92 mL, 16.4 mmol)。产生 H₂, 并通过将小针插入隔膜而释放过量压力, 同时加入丙二酸二甲酯。然后将溶液暖至室温。将无水 N-(2-苄氧基-5-氯-4-硝基苯基)苯甲酰胺 (2.00 g, 5.24 mmol)置于 100 mL 圆底烧瓶中, 用隔膜覆盖, 并用 N₂ 冲洗。在 N₂ 下将无水 DMSO (20 mL)加到桃色固体中。通过在设定于 100℃的油浴中搅拌数分钟而将固体溶于 DMSO 中。然后通过注射器将橙色溶液转移入丙二酸二甲酯阴离子溶液中。用针排出反应烧瓶中的过量 N₂ 和 H₂ 气。将暗橙色溶液置于油浴(100℃)中并搅拌过夜。用 Kugelrohr 装置除去 DMSO。然后将余下的褐色淤浆溶于氯仿(200 mL)中, 并用水(3 × 75 mL)洗涤。加入乙醇(15 mL)破坏乳液。然后用盐水(3 × 75 mL)洗涤有机层。用硫酸钠干燥有机层, 重力过滤, 并用旋转蒸发仪浓缩。将内容物溶于氯仿中, 并用 5%氯仿/15%乙酸乙酯/80%己烷硅胶柱纯化。将收集的产物与原料混合, 从而再次在硅胶柱上用 100%氯仿纯化, 得到 2-(5-苯甲酰胺基-4-苄氧基-2-硝基)苯基丙二酸二甲酯, 为黄色油, 该油在冰箱中放置后固化(0.88 g, 1.90 mmol, 36%)。Mp = 140—143℃; TLC (20%乙酸乙酯/己烷) R_f = 0.34。500 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) 8.80 (s, 1H), 8.75 (s br, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.79 (d, 7.5, 2H), 7.57 (t, 7.5, 1H), 7.47 (t, 7.5, 2H), 7.45 (m,

5H), 5.37 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 3.84 (s, 6H); IR (neat) 3424, 3036, 2952, 2922, 2845, 1753, 1689, 1586, 1540, 1510, 1480, 1453, 1434, 1415, 1335, 1259, 1198, 1156, 1099, 1072, 1057, 1027. EI-MS m/z (相对密度) 478 (M^+ , 15). $C_{25}H_{22}N_2O_8$ 的准确质量: 计算 478.1376, 实测 478.1374。

在 250 mL 圆底烧瓶中, 将 2-(5-苯甲酰胺基-4-苄氧基-3-硝基)苯基丙二酸二甲酯(1.59 g, 3.41 mmol)溶于甲醇(40 mL)中, 并缓慢加入 10% NaOH (24 mL), 得到深褐色溶液。将溶液回流 3 小时, 得到黄色溶液。用旋转蒸发仪除去甲醇, 得到黄色悬浮液。加入 THF (50 mL), 得到澄清的黄色溶液, 将该溶液置于冰浴中并搅拌 5 分钟。缓慢加入 6 M HCl (13 mL), 直至达到 pH~1。反应溶液变成亮黄色, 并回流 1 小时。将圆底烧瓶冷却至室温, 并用氯仿(75 mL)稀释溶液。将混合物加到分液漏斗中并收集有机层。然后用氯仿(3 × 50 mL)萃取水层。合并有机层, 用硫酸钠干燥, 重力过滤, 并用旋转蒸发仪浓缩, 得到 2-(5-氨基-4-苄氧基-2-硝基)苯乙酸, 为黄色固体(1.25 g, 4.14 mmol, 93%)。Mp = 191–194°C; TLC (5% MeOH:CHCl₃) R_f = 0.20; 500 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) 11.50 (s br, 1H), 8.08 (d, 8.0, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.61 (t, 8.0, 1H), 7.47 (t, 8.0, 2H), 7.43 (m, 5H), 6.52 (s, 1H), 5.15 (s, 2H), 3.97 (s, 2H); IR (液体石蜡) 3500, 3401, 1704, 1681, 1616, 1597, 1533, 1290, 1263, 1236; EI-MS m/z (相对密度) 302 (M^+ , 15), 258 (M^+ - CO₂, 16)。C₁₅H₁₄N₂O₅ 的准确质量: 计算 302.0903, 实测 302.0894。

将所有的玻璃器皿进行火焰干燥或在烘箱中干燥过夜。将 2-(5-氨基-4-苄氧基-2-硝基)苯乙酸(5.70 g, 18.8 mmol)溶于无水和新鲜蒸馏的 THF (120 mL)中, 并在 N₂ 下在冰浴中搅拌 5 分钟。通过注射器将硼烷(45.2 mL, 45.2 mmol, 1 M THF 溶液)转移入放在搅拌着的溶液上的滴液漏斗中。然后将 BH₃-THF 溶液缓慢加到该溶液中, 产生

大量泡腾。在冰浴中将暗橙色溶液搅拌 10 分钟，然后在室温下搅拌 6 小时。通过 TLC (5.0% MeOH/CHCl₃)检查反应。将水缓慢而小心地加到烧瓶中，直至泡腾不再发生。然后用乙酸乙酯(每次 100 mL)将溶液萃取三次。收集有机层，用硫酸钠干燥，重力过滤，并浓缩，得到 2-(5-氨基-4-苄氧基-2-硝基)苯乙醇，为橙色固体。用硅胶氯仿柱纯化固体(2.82 g, 9.79 mmol, 52%)。TLC (5% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.33。M.p. = 114—116℃。500 MHz ¹H NMR (CDCl₃) 7.73 (s, 1H), 7.43 (m, 5H), 6.56 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 3.93 (t, 5.5, 2H), 3.18 (t, 5.5, 2H)。IR (neat) 3470, 3375, 3080, 2925, 2852, 1620, 1576, 1524, 1488, 1296, 1263, 1226。EI-MS *m/z* (相对密度) 288 (M⁺, 20)。C₁₅H₁₆N₂O₄ 的准确质量：计算 288.1110，实测 288.1111。

将 2-(5-氨基-4-苄氧基-2-硝基)苯乙醇(0.051 g, 0.174 mmol)置于 50 mL 圆底烧瓶中，并在真空烘箱(50℃, 0.25 mm Hg)中干燥。一旦干燥，用隔膜密封圆底烧瓶，用 N₂ 冲洗，将其溶于甲醇(2 mL)中，得到黄色溶液。然后加入乙炔二羧酸二甲酯(0.11 mL, 0.87 mmol)。然后将隔膜用冷凝器和干燥管代替，并温和回流过夜。然后将溶液减压浓缩成黄色油。随后通过在 CHCl₃ 中跑硅胶柱纯化此黄色油，得到 2-N-[2-苄氧基-5-(2-羟基乙基)-4-硝基苯胺基]苹果酸二甲酯，为黄色固体(0.073 g, 0.170 mmol, 96%)。Mp = 100—105℃；TLC (2.5% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.40；500 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) 9.88 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.49 (d, 7.0, 2H), 7.41 (t, 7.0, 2H), 7.35 (t, 7.0, 1H), 6.59 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.90 (q, 6.0, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.10 (t, 6.0, 2H), 1.80 (d, 6.0, 1H)；IR (neat) 3300, 2921, 2855, 1738, 1684, 1609, 1584, 1529, 1454, 1437, 1383, 1333, 1283, 1220, 1133, 1066, 1028。EI-MS *m/z* (相对密度) 430 (M⁺, 32)。C₂₁H₂₂N₂O₈ 的准确质量：计算 430.1376，实测 430.1369。

将三苯基膦(0.610 g, 2.32 mmol)、CCl₄ (0.67 mL, 6.96 mmol)和

无水 CH_2Cl_2 (20 mL)加到在圆底烧瓶中的 2-N-[2-苄氧基-5-(2-羟基乙基)-4-硝基苯胺基]苹果酸二甲酯(0.50 g, 1.16 mmol)中。用 N_2 冲洗该黄色溶液并搅拌过夜。通过 TLC (30%乙酸乙酯/石油醚)检查该溶液,然后减压浓缩。通过在 30%乙酸乙酯/石油醚溶剂系统中跑硅胶柱纯化残余物,得到 2-N-[2-苄氧基-5-(2-氯乙基)-4-硝基苯胺基]苹果酸二甲酯,为黄色固体(0.44 g, 0.98 mmol, 85%)。M.p. = 93—96°C; TLC (20%乙酸乙酯/石油醚) R_f = 0.70; 500 MHz ^1H -NMR (CDCl_3) 9.83 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.49 (d, 7.5, 2H), 7.41 (t, 7.5, 2H), 7.35 (t, 7.5, 1H), 6.59 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.80 (t, 6.5, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.30 (s, 6.5, 2H); IR (neat) 3280, 3102, 2953, 2851, 1741, 1681, 1606, 1583, 1532, 1453, 1438, 1387, 1331, 1285, 1220, 1183, 1131, 1066, 1024, 787, 740, 694。EI-MS m/z (相对密度) 448 (M^+ , 20)。 $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7^{35}\text{Cl}$ 的准确质量: 计算 448.1037, 实测 448.1031。

在圆底烧瓶中,在高真空下干燥 2-N-[2-苄氧基-5-(2-羟基乙基)-4-硝基苯胺基]苹果酸二甲酯(0.519 g, 1.16 mmol)。加入乙酸钡 II (0.52 g, 2.32 mmol), 然后用隔膜覆盖烧瓶, 并用 N_2 冲洗。然后通过注射器在 N_2 下加入无水二甲基乙酰胺(60 mL)。随后在真空下将溶液脱气三次, 并用 N_2 净化。然后在 70°C 的油浴中将溶液搅拌 3.5 小时。然后用 CHCl_3 (200 mL)稀释溶液, 并用水(50 mL)洗涤三次。用硫酸钠干燥有机层, 重力过滤, 并用旋转蒸发仪浓缩。在高真空 Kugelrohr 蒸馏(50°C, 0.25 mm Hg)下除去二甲基乙酰胺。通过在 5%氯仿/15%乙酸乙酯/80%石油醚溶剂系统中跑硅胶柱纯化残余物, 得到 7-苄氧基-4-(2-氯乙基)-5-硝基吡啶-2,3-二羧酸二甲酯, 为黄色固体(0.119 g, 0.267 mmol, 23%)。M.p. = 122—128°C; TLC (30%乙酸乙酯/石油醚) R_f = 0.35; 500 MHz ^1H -NMR (CDCl_3) 9.39 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.47 (m, 5H), 5.26 (s, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.81 (t, 8.0,

2H), 3.47 (t, 8.0, 2H); IR (neat) 3282, 3103, 3080, 2959, 2923, 2851, 1726, 1623, 1583, 1534, 1458, 1336, 1260, 1171, 1077, 1018, 803. EI-MS m/z (相对密度) 446 (M^+ , 6), 415 (2). $C_{21}H_{19}N_2O_7Cl$ 的准确质量: 计算 446.0881, 实测 446.0873。

将 10% Pd/C (0.035 g) 加到 7-苄氧基-4-(2-氯乙基)-5-硝基吡啶-2,3-二羧酸二甲酯(0.0718 g, 0.161 mmol)中, 并将冷冻的 THF (5 mL) 快速加到烧瓶中。将混合物在减压下放置, 并用 H_2 净化三次。在 H_2 和室温以及大气压下搅拌反应物, 直至由 TLC 分析表明没有剩余原料。通过烧结漏斗中的 C 盐滤垫过滤溶液, 并用 THF 洗涤。减压浓缩胺溶液, 并将残余物与无水 CH_2Cl_2 (每次 3 mL) 一起共蒸发两次。将 EDCI (0.0617 g, 0.322 mmol) 和 5,6,7-三甲氧基吡啶-2-羧酸(0.0404 g, 0.161 mmol) 加到该胺中。用隔膜密封烧瓶, 并用 N_2 冲洗。然后将混合物溶于无水 DMF (6 mL) 中, 并在 N_2 下搅拌三天。然后用乙酸乙酯(150 mL) 稀释该黄色溶液, 用水洗涤三次(每次 100 mL) 并用 5% $NaHCO_3$ (50 mL) 洗涤。收集有机层, 用硫酸钠干燥, 重力过滤并减压浓缩。用氯仿硅胶柱纯化化合物, 其中使溶剂系统每 25 mL 溶剂增加 0.5% MeOH/氯仿, 得到 4-(2-氯乙基)-7-羟基-5-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)吡啶-2,3-二羧酸二甲酯, 为米色固体(17.8 mg, 0.032 mmol, 20% 收率)。Mp = 166°C (分解); TLC (2.5% MeOH/ $CHCl_3$) R_f = 0.23; 500 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$) 9.24 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.50 (s br, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.10 (s br, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.90 (t, 7.0, 2H), 3.31 (t, 7.0, 2H); IR (neat) 3282, 3090, 2954, 2918, 2851, 1730, 1713, 1685, 1610, 1535, 1510, 1476, 1415, 1376, 1307, 1262, 1204, 1096, 1050, 1030, 802. FAB-MS m/z (相对密度) 560 ($M^+ + H^+$, 3), 559 (M^+ , 2). $C_{26}H_{26}N_3O_9^{35}Cl$ 的准确质量: 计算 559.1358, 实测 559.1350。

将 10% Pd/C (0.035 g) 加到 7-苄氧基-4-(2-氯乙基)-5-硝基吲哚-2,3-二羧酸二甲酯(0.0708 g, 0.159 mmol)中, 并将冷冻的 THF (7 mL) 快速加到烧瓶中。减压下放置混合物, 用 H₂ 净化三次。在 H₂ 和室温以及大气压下搅拌反应物, 直至 TLC 分析表明没有原料剩余。通过烧结漏斗中的 C 盐滤垫过滤溶液, 并用 THF 洗涤。减压浓缩胺溶液, 并将残余物与无水 CH₂Cl₂ (每次 3 mL) 一起共蒸发两次。将 EDCI (0.0914 g, 0.477 mmol) 和 5-(苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-二羧酸(0.051 g, 0.159 mmol) 加到该胺中。覆盖烧瓶, 并用 N₂ 冲洗。然后加入无水 DMF (6 mL)。然后在室温和 N₂ 下将溶液搅拌三天。然后用乙酸乙酯 (150 mL) 稀释该黄色溶液, 用水洗涤三次(每次 100 mL) 并用 5% NaHCO₃ (50 mL) 洗涤。收集有机层, 用硫酸钠干燥, 重力过滤并减压浓缩。加入二氯甲烷(20 mL)后, 产物沉淀。将悬浮液离心并从沉淀的产物中除去有机层。用氯仿柱纯化母液, 其中使溶剂系统每 25 mL 增加 1% MeOH/氯仿, 得到 4-(2-氯乙基)-7-羟基-5-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基]吲哚-2,3-二羧酸二甲酯, 为米色固体(0.0155 g, 0.0247 mmol, 16%)。Mp = 174–180°C(分解); TLC (5% MeOH/CHCl₃) R_f = 0.25; 500 MHz ¹H-NMR (CDCl₃ + 1 滴 DMSO-d₆) 10.95 (s, 1H), 10.92 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 7.72 (d, 8.5, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.59 (d, 8.5, 1H), 7.499 (s, 1H), 7.492 (s, 1H), 7.64 (t, 8.5, 1H), 7.35 (s, 3H), 7.32 (t, 8.5, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.01 (d, 1.5, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.80 (t, 7.5, 2H), 3.29 (t, 7.5, 2H); IR (neat) 3331, 3121, 2956, 1735, 1722, 1675, 1595, 1545, 1478, 1365, 1256, 1231, 1205, 1159, 1109; FAB-MS (NBA) *m/z* (相对密度) 629 (M + H⁺, 3), 628 (M⁺, 2)。C₃₂H₂₅N₄O₈³⁵Cl 的准确质量: 计算 628.1361, 实测 628.1349。

将 2-(3-氨基-4-苄氧基-6-硝基)苯乙醇(0.100 g, 0.347 mmol)置于 25 mL 圆底烧瓶中, 并在真空烘箱(50°C, 0.25 mm Hg)中干燥。将圆

底烧瓶密封，用 N_2 冲洗，并加入无水甲醇(6 mL)，得到黄色溶液。然后加入 4,4,4-三氟-2-丁炔酸甲酯(0.26 g, 1.74 mmol)。用冷凝器和干燥管代替隔膜，并温和回流 7 小时。然后在减压下将溶液浓缩至黄色油。然后通过 CH_2Cl_2 中跑硅胶柱纯化黄色油，得到 3-[2-苄氧基-5-(2-羟基乙基)-4-硝基苯胺基]-4,4,4-三氟-2-丁烯酸甲酯，为黄色油，该油在冷藏后结晶。总产量：0.133 g (0.302 mmol, 87%)。M.p. = 72—74°C。TLC (5%甲醇/氯仿) R_f = 0.60。500 MHz ^1H -NMR (CDCl_3) 9.94 (s br, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.48 (d, 7.0, 2H), 7.40 (t, 7.0, 2H), 7.35 (t, 7.0, 1H), 7.14 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.92 (t, 6.0, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.14 (t, 6.0, 2H)。IR (neat) 3431, 3040, 2957, 1743, 1686, 1642, 1616, 1581, 1528, 1296, 1260, 1217, 1142, 1020, 805, 739, 696。FAB-MS (NBA) m/z (相对密度) 441($\text{M} + \text{H}^+$, 4), 440(M^+ , 4)。 $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_6\text{F}_3$ 的准确质量：计算 440.1195，实测 440.1198。

将三苯基膦(2.57 g, 9.77 mmol)、 CCl_4 (2.83 mL, 29.3 mmol)和无水 CH_2Cl_2 (55 mL)加到在圆底烧瓶中的 3-[2-苄氧基-5-(2-羟基乙基)-4-硝基苯胺基]-4,4,4-三氟-2-丁烯酸甲酯(2.10 g, 4.89 mmol)中。用 N_2 冲洗该黄色溶液，并搅拌过夜。通过 TLC (20%乙酸乙酯/石油醚)检查该溶液，然后减压浓缩。通过在 10%乙酸乙酯/石油醚溶剂系统中跑硅胶柱纯化残余物，得到 3-[2-苄氧基-5-(2-氯乙基)-4-硝基苯胺基]-4,4,4-三氟-2-丁烯酸甲酯。总产量：1.25 g (2.71 mmol, 57%)。M.p. = 105—110°C。TLC (20%乙酸乙酯/石油醚) R_f = 0.69。500 MHz ^1H -NMR (CDCl_3) 10.04 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.48 (d, 7.5, 2H), 7.41 (t, 7.5, 2H), 7.35 (t, 7.5, 1H), 7.14 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 5.23 (s, 2H), 3.80 (t, 6.5, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.33 (t, 6.5, 2H)。IR (neat) 2415, 3050, 2956, 1730, 1687, 1640, 1615, 1585, 1530, 1334, 1296, 1215, 1143, 1024, 815, 739, 696。EI-MS (相对密度)

458 (M^+ , 6)。C₂₀H₁₈O₅N₂³⁵ClF₃ 的准确质量：计算 458.0856，实测 458.0853。

在高真空下，在圆底烧瓶中干燥 3-[2-苄氧基-5-(2-氯乙基)-4-硝基苯胺基]-4,4,4-三氟-2-丁烯酸甲酯(0.035 g, 0.0763 mmol)。加入乙酸钡 II (0.034 g, 0.153 mmol)，然后用隔膜覆盖烧瓶，并用 N₂ 冲洗。然后通过注射器在 N₂ 下加入无水二甲基乙酰胺(20 mL)。随后在真空下将溶液脱气三次，30 分钟，并用 N₂ 净化。然后在 68℃ 的油浴中将溶液搅拌 6 小时 15 分钟。然后用 CHCl₃ (100 mL) 稀释溶液，并用水(100 mL)洗涤三次。用硫酸钠干燥有机层，重力过滤并用旋转蒸发仪浓缩。在高真空 Kugelrohr 蒸馏(50℃, 0.25 mm Hg)下除去二甲基乙酰胺。在硅胶柱上，使用二氯甲烷作为溶剂纯化残余物，得到 7-苄氧基-4-(2-氯乙基)-5-硝基-2-三氟甲基吡啶-3-羧酸甲酯，为黄色固体。总产量：0.010 g (0.022 mmol, 29%)。TLC (二氯甲烷) R_f = 0.75。500 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) 9.24 (s br, 1H), 7.46 (m, 5H), 7.44 (s, 1H), 5.26 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.82 (t, 7.5, 2H), 3.63 (t, 7.5, 2H)。IR (neat) 3036, 2952, 2915, 2850, 1732, 1713, 1695, 1576, 1534, 1503, 1451, 1337, 1259, 865, 802。EI-MS (相对密度) 456 (M^+ , 3), 420 (M^+ - HCl, 3)。C₂₀H₁₆O₉N₂³⁵ClF₃ 的准确质量：计算 456.0700，实测 456.0695。

将 10% Pd/C (0.023 g) 加到 7-苄氧基-4-(2-氯乙基)-5-硝基-2-三氟甲基吡啶-3-羧酸甲酯(0.0468 g, 0.102 mmol) 中，并将冷冻的 THF (7 mL) 快速加到烧瓶中。在减压下放置混合物，并用 H₂ 净化三次。在 H₂ 和室温以及大气压下搅拌反应物，直至 TLC 分析表明反应完全。通过烧结漏斗中的 C 盐滤垫过滤溶液，并用 THF 洗涤。减压浓缩胺溶液，并将其与无水 CH₂Cl₂ (2 mL) 一起共蒸发两次。将 EDCI (0.040 g, 0.208 mmol) 和 5,6,7-三甲氧基吡啶-2-羧酸(0.026 g, 0.104 mmol) 加到该胺中。覆盖烧瓶，并用 N₂ 冲洗。将该胺溶于无水 DMF (6 mL) 中，然后在 N₂ 下将溶液搅拌四天。然后用乙酸乙酯(100 mL) 稀释该

黄色溶液，用水洗涤三次(100 mL)并用 5% NaHCO₃ (75 mL)洗涤。收集有机层，用硫酸钠干燥，重力过滤并减压浓缩。然后通过 2.5% 甲醇/氯仿中进行制备 TLC 纯化残余物，得到粗产物。进一步通过在二氯甲烷中进行制备 TLC 纯化产物，得到 4-(2-氯乙基)-7-羟基-2-三氟甲基-5-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)吡啶-3-羧酸甲酯，为黄色固体。总产量：0.001 g (0.002 mmol, 2%)。TLC (二氯甲烷) R_f = 0.56。500 MHz ¹H NMR (CDCl₃): 9.53 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 9.07 (s, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 4.12 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.87 (t, 8.0, 2H), 3.72 (t, 8.0, 2H)。IR (Neat) 3018, 2965, 2922, 2847, 1729, 1531, 1472, 1344, 1253, 1227, 1178, 1109, 1002, 799。

实施例 9

非手性氨基 *seco*-CI 类似物的合成

4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)苯胺的合成

在燥石膏干燥管下，将两个相等批量的 4-氯-3-硝基苯胺(各 20.0 g, 0.116 mol)分别溶于新鲜蒸馏的二氯甲醇(在 P₂O₅ 上)(各 150 mL)和无水三乙胺(各 1.1 eq., 18 mL, 0.128 mol)中。在冰浴中冷冻每一批反应混合物，并缓慢加入氯甲酸苄酯(各 50 mL, 0.348 mol)。将所得的混合物加热回流四天，然后将它们合并并浓缩。进一步在真空下，用 Kugelrohr 装置(0.1 mm Hg, 60℃)浓缩残余物，得到稠的油。将该油状物质溶于氯仿(300 mL)中，并用盐水(100 mL)洗涤。用硫酸钠干燥有机层，并真空浓缩。在硅胶柱上，使用 2.5% 甲醇/氯仿作为溶剂纯化粗产物。分离总产量为 32.2 g (46% 收率)的 N-苄氧羰基-4-氯-3-硝基苯胺，为黄色油，其在冻藏后固化。 R_f = 0.61 (20% 乙酸乙酯/己烷)。IR (neat) 3424, 3100, 3060, 3025, 2918, 2865, 1603, 1528, 1493, 1448, 1395, 1351, 1231, 1204, 1146, 1071, 1027, 960,

894, 841, 805, 734, 694. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 7.28 (t, 9.0, 2H), 7.24 (s br, 1H), 7.22 (t, 9.0, 1H), 7.16 (d, 8.0, 1H), 7.13 (d, 9.0, 2H), 6.98 (d, 3.0, 1H), 6.73 (dd, 3.0, 8.0, 1H), 4.60 (s, 2H).

在保持在氮气氛下的干燥反应烧瓶中, 用无水己烷洗涤氢化钠 (1.5 g 60%矿物油悬浮液, 0.038 mol)。除去己烷, 并加入无水二甲亚砜 (15 mL)。在冰浴中冷却反应混合物, 并缓慢加入丙二酸二乙酯 (4.0 mL, 0.0325 mol)。在单独的烧瓶中, 将 N-苄氧羰基-4-氯-3-硝基苯胺 (1.0 g, 3.3 mmol) 溶于无水二甲亚砜 (15 mL) 中, 并将其缓慢加到冷冻的氢化物/丙二酸酯反应混合物中。在 105–115°C 的油浴中将所得的溶液加热 64 小时。使用 Kugelrohr 装置 (0.1 mm Hg, 60□) 蒸馏除去溶剂, 得到粘稠的残余物, 将该残余物用氯仿 (300 mL) 溶解。用水 (每次 150 mL) 将有机层洗涤两次, 然后用硫酸钠干燥。浓缩有机层, 得到油状残余物, 通过硅胶色谱, 使用 5–10% 乙酸乙酯/己烷梯度溶剂系统纯化该油状残余物。分离期望的产物, ((N-苄氧羰基)-3-硝基苯胺-4-基)丙二酸二乙酯, 为橙色油, 该油在冷藏后固化 (0.88 g, 63%)。R_f = 0.44 (20% 乙酸乙酯/己烷)。IR (neat) 3400, 3061, 3030, 2978, 2937, 1732, 1623, 1534, 1446, 1394, 1358, 1301, 1228, 1150, 1000. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 7.13–7.30 (m, 8H), 6.84 (dd, 3.0, 8.0, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.16 (q, 6.5, 4H), 3.39 (s, 1H), 1.20 (t, 6.5, 6H)。

将在乙醇 (15 mL) 和 10% NaOH (aq) (18 mL) 中的 ((N-苄氧羰基)-3-硝基苯胺-4-基)丙二酸二乙酯 (0.500 g's, 1.16 mmol) 溶液回流 4 小时。此时, 真空除去乙醇并加入 THF (20 mL)。在冰浴中冷冻溶液后, 用 6 M HCl 将溶液调节至 pH 1。然后将溶液回流 1 小时。在从双相混合物中除去 THF (使用移液管) 后, 用氯仿 (2 × 100 mL) 萃取水层。用硫酸钠干燥合并的有机相, 然后在真空下浓缩至深褐色油。在硅胶上用氯仿对粗产物进行色谱, 得到 ((N-苄氧羰基)-3-硝基苯胺-4-

基)乙酸,为黄色油状残余物(0.35 g, 91%)。R_f = 0.29 (10%甲醇/氯仿)。纯化的产物的 IR (neat) 3025, 2927, 1714, 1630, 1532, 1453, 1399, 1351, 1297, 1235, 1199, 1071, 965, 903, 734, 694。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 7.95 (s, 1H), 7.42 (d, 3.0, 1H), 7.27 (t, 8.0, 2H), 7.21 (t, 7.5, 1H), 7.16 (d, 7.0, 2H), 7.01 (d, 8.5, 1H), 6.84 (dd, 3.0, 8.0, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.82 (s, 2H)。

将((N-苄氧羰基)-3-硝基苯胺-4-基)乙酸(0.35 g, 1.06 mmol)溶于无水 THF (5 mL)中,并保持在氮气下,然后在冰浴中冷却溶液。缓慢加入硼烷-THF 复合物溶液(3.6 mL 1.0 M 溶液, 3.6 mmol),在室温下将混合物搅拌 2.5 小时。缓慢地用水终止反应混合物。除去 THF 层,用二氯甲醇(3 × 100 mL)萃取水相。用硫酸钠干燥合并的有机相,然后在真空下浓缩至油。在硅胶上,使用梯度溶剂系统(氯仿至 5%甲醇/氯仿)对粗产物进行色谱,得到 2-((N-苄氧羰基)-3-硝基苯胺-4-基)乙醇,为稠的无色油(0.33 g, 93%)。R_f = 0.59 (10%甲醇/氯仿)。IR (neat) 3565, 3352, 3060, 3024, 2927, 2856, 1621, 1528, 1453, 1395, 1351, 1302, 1235, 1199, 1156, 1036, 960, 894, 845, 810, 734, 699。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 7.27 (t, 7.5, 2H), 7.22 (t, 7.0, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.19 (d, 3.0, 1H), 7.16 (d, 7.5, 2H), 7.07 (d, 8.5, 1H), 6.83 (dd, 3.0, 8.5, 1H), 4.61 (s, 2H), 3.80 (t, 6.5, 2H), 2.93 (t, 6.5, 2H)。

将四氯化碳(0.6 mL, 3.85 mmol)加到保持在氮气下的在新鲜蒸馏的二氯甲烷(15 mL)中的 2-((N-苄氧羰基)-3-硝基苯胺-4-基)乙醇(0.33 g, 1.04 mmol)和三苯基膦(0.55 g, 2.09 mmol)的溶液中。在室温下将反应混合物搅拌一天后,将其浓缩至油。在硅胶柱上,用氯仿纯化油状残余物,得到 2-((N-苄氧羰基)-3-硝基苯胺-4-基)乙基氯,为稠的橙色/黄色油(0.27 g, 81%)。R_f = 0.80 (5%甲醇/氯仿)。IR (neat) 3344, 3060, 3025, 2963, 2927, 2865, 1626, 1528, 1493, 1453, 1399,

1346, 1262, 1235, 1076, 1027, 965, 898, 805, 734, 699, 668.
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 7.27 (t, 8.0, 2H), 7.25 (d, 3.0, 1H),
7.22 (s, 1H), 7.21 (t, 8.5, 1H), 7.16 (d, 7.5, 2H), 7.07 (d, 8.5,
1H), 6.82 (dd, 3.0, 8.5, 1H), 4.62 (s, 2H), 3.68 (t, 7.0, 2H), 3.11
(t, 7.0, 2H)。

将 2-((N-苄氧羰基)-3-硝基苯胺-4-基)乙基氯(1.01 g)与 PtO₂ (250 mg)的混合物悬浮在冷冻的 THF (60 mL)中, 在 55 psi 和室温下将悬浮液氢化(同时振荡) 1 小时。用 C 盐过滤悬浮液, 并减压浓缩滤液。将油状残余物与无水 CH₂Cl₂ 一起共蒸发(两次), 然后保持在高真空中。因为胺中间产物不稳定, 因此将其直接使用。

将 3-氨基-2-((N-苄氧羰基)苯胺-4-基)乙基氯(169 mg, 0.55 mmol)样品溶于无水 CH₂Cl₂ (20 mL)中。然后将该溶液加到在保持在氮气下的无水 CH₂Cl₂ (55 mL)中的 5,6,7-三甲氧基-2-羧酸(150 mg, 0.60 mmol)和六氟磷酸苯并三唑-1-氧基-三吡咯烷基磷(PyBOP) (296 mg, 0.57 mmol)的搅拌着的悬浮液中。加入新鲜蒸馏的 N,N-二异丙基乙基胺(0.22 mL, 1.28 mmol), 将所得的澄清溶液在室温下搅拌过夜。此时, 用 CH₂Cl₂ (100 mL)稀释反应混合物, 然后用水(50 mL)、1 M HCl (50 mL)、饱和 NaHCO₃ (50 mL)洗涤, 随后用盐水(50 mL)洗涤。然后用硫酸钠干燥有机层并浓缩。在硅胶柱上, 使用 2.5% EtOAc/CH₂Cl₂ 溶剂系统纯化残余物, 得到 2-(N-苄氧羰基)-3-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)苯胺-4-基)乙基氯, 为澄清的无色泡沫(106 mg, 36%)。M.p. 70—74°C。R_f = 0.55 (16:1 CH₂Cl₂:EtOAc)。IR (neat) 3291, 3060, 3007, 2936, 2829, 1776, 1621, 1577, 1537, 1497, 1461, 1448, 1408, 1364, 1235, 1111, 1049, 991, 832, 747。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 9.11 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.26—7.14 (m, 7H), 6.94 (d, 8.5, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.66 (s br, 1H), 6.50 (dd, 3.0, 8.5, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.69 (t, 6.5, 2H), 2.95 (t, 6.5, 2H)。

$C_{28}H_{28}N_3O_6Cl$ 的分析: 计算 C, 62.51, H, 5.25, N, 7.81; 实测 C, 72.77, H, 5.01, N, 8.02。

将 2-(N-苄氧羰基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯胺-4-基)乙基氯(187 mg, 0.35 mmol)与 10% Pd/C (95 mg)合并, 然后悬浮在 THF (20 mL, 冷冻的)中。净化悬浮液(三次), 并在氢气下, 在大气压和室温下保持三天。第一天过后加入更多量的 THF (6 mL)。用 C 盐过滤悬浮液, 并真空浓缩该黄色溶液。在硅胶柱上, 使用 MeOH-CHCl₃ 梯度(0—6%)溶剂系统纯化黄褐色残余物, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)苯胺(117 mg, 80%), 为澄清和稠的无色油。 $R_f = 0.21$ (32:1, CH₂Cl₂:EtOAc)。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) 9.80 (1H, s), 8.22 (1H, s), 7.11 (1H, s), 6.87 (1H, d, 8.5 Hz), 6.85 (1H, s), 6.72 (1H, s), 6.42 (1H, dd, 8.5, 3.0 Hz), 4.42 (2H, s br), 3.93 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.64 (2H, t, 6.5 Hz), 2.90 (2H, t, 6.5 Hz)。 $C_{20}H_{22}N_3O_4Cl \cdot H_2O$ 的分析: 计算 C, 56.94, H, 5.73, N, 9.96; 实测 C, 56.55, H, 6.01, N, 10.22。

实施例 10

非手性氨基 *seco*-CBI 类似物的合成

4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)-1-萘胺和类似物的制备

将 K₂CO₃ (4.04 g, 29.22 mmol)加到在 THF (50 mL)中的 1-氯-2,4-二硝基萘(6.04 g, 23.91 mmol)和丙二酸叔丁酯乙酯(5.0 g, 26.50 mmol)的溶液中, 并将混合物加热回流过夜。将混合物冷却并过滤, 然后减压浓缩滤液。闪蒸色谱(20—50% AcOEt-石油醚梯度洗脱)得到(2,4-二硝基萘-1-基)丙二酸叔丁酯乙酯(7.6 g, 54%), 为浅红色固体。M.p. 86—88℃; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.65 (s, 1H), 8.55 (dd, 0.5, 8.5, 1H), 8.36 (dd, 0.5, 9.0, 1H), 7.89 (dt, 1.0, 8.0, 1H), 7.81 (dt,

1.5, 9.0, 1H), 5.64 (s, 1H), 4.26 (q, 7.0, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.24 (t, 7.0, 3H); IR (neat) 2980, 1745, 1537, 1368, 1346, 1306, 1253, 1147, 1027, 850, 832, 801, 774, 761 cm^{-1} . FAB-MS (NBA) m/z 405 ($M + H^+$, 5)。

将浓 HCl (1.5 mL)加到在 AcOEt (6 mL)中的(2,4-二硝基萘-1-基)丙二酸叔丁酯乙酯(0.60 g, 1.48 mmol)的溶液中, 并将混合物搅拌过夜。用 AcOEt (30 mL)稀释混合物, 用 H_2O (10 mL)、饱和 NaHCO_3 水溶液(10 mL)和饱和 NaCl 水溶液(10 mL)洗涤。将有机层干燥(Na_2SO_4), 并减压浓缩。重结晶(乙醚)得到(2,4-二硝基萘-1-基)乙酸乙酯(0.31 g, 69%), 为浅橙色固体。M.p. 132-134°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.71 (s, 1H), 8.61 (d, 8.5, 1H), 8.30 (d, 8.5, 1H), 7.92 (dt, 1.0, 8.5, 1H), 7.86 (dt, 1.5, 8.5, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.22 (q, 7.5, 2H), 1.27 (t, 7.5, 3H); 304 (M^-); IR (neat) 3087, 2989, 1732, 1528, 1422, 1355, 1204, 1169, 1027, 889, 832, 779 cm^{-1} . FAB-MS (NBA) m/z 305($M + H^+$)。

将 Na_2S (60%, 4.27 g, 32.87 mmol)加到在 EtOH (200 mL)中的(2,4-二硝基萘-1-基)乙酸乙酯(10.0 g, 32.87 mmol)的回流溶液中, 并搅拌 0.5 小时。将此混合物倾入水(200 mL)中, 浓缩并用 AcOEt (300 mL)萃取。用 H_2O (100 mL)和饱和 NaCl 水溶液(50 mL)洗涤有机层。用 AcOEt (100 mL)萃取各水层。用饱和 NaCl 水溶液(50 mL)洗涤合并的有机层, 干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩。闪蒸色谱(20% AcOEt-石油醚)得到(4-氨基-2-硝基萘-1-基)乙酸乙酯(1.0 g, 11%), 为深紫色固体。M.p. 93-100°C(分解); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.08 (d, 8.0, 1H), 7.86 (d, 7.5, 1H), 7.66 (t, 7.0, 1H), 7.62 (t, 7.0, 1H), 7.20 (s, 1H), 4.40 (brs, 2H), 4.26 (s, 2H), 4.20 (q, 7.0, 2H), 1.26 (t, 7.0, 3H); IR (neat) 3459, 3379, 3255, 2980, 1728, 1634, 1590, 1515, 1466, 1439, 1368, 1337, 1249, 1200, 1156, 1027, 841,

756 cm^{-1} 。FAB-MS (NBA) m/z 274(M^+)。

在 0℃和氮气氛下，将氯甲酸苄酯(1.56 mL, 10.94 mmol)缓慢加到在水 CH₂Cl₂ (20 mL)中的(4-氨基-2-硝基萘-1-基)乙酸乙酯(1.0 g, 3.65 mmol)和 Et₃N (0.56 mL, 4.01 mmol)的溶液中。将混合物加热回流三天并浓缩。将残余物溶于 AcOEt (50 mL)中，并用 H₂O (10 mL)和饱和 NaCl 水溶液(25 mL)洗涤。将有机层干燥(Na₂SO₄)并在减压下浓缩。闪蒸色谱(20% AcOEt-石油醚至 CHCl₃)得到[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(0.39 g, 26%)，为橙色固体。M.p. 160—164℃; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.09 (d, 8.5, 1H), 7.88 (d, 8.0, 1H), 7.66 (t, 8.0, 1H), 7.60 (t, 7.0, 1H), 7.46 (d, 7.5, 2H), 7.41 (t, 7.5, 2H), 7.35 (t, 7.5, 1H), 7.07 (s, 1H), 4.92 (brs, 1H), 4.52 (d, 4.0, 2H), 4.24 (s, 2H), 4.19 (q, 7.0, 2H), 1.26 (t, 7.5, 3H); IR (neat) 3397, 2927, 1723, 1594, 1537, 1515, 1439, 1333, 1200, 1124, 1027, 823, 752, 703 cm^{-1} 。

将在 H₂O (20 mL)中的 NaOH (0.17 g, 4.31 mmol)溶液加到在 EtOH (20 mL)中的[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(0.8 g, 1.96 mmol)的悬浮液中，并将混合物加热回流 2 小时。将 EtOH 蒸发并用 Et₂O (10 mL)洗涤。用 6 M HCl 将水层酸化(pH 1)。将所得的沉淀过滤并使其静置过夜，得到[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙酸(0.66 g, 89%)，为橙色固体。M.p. 170—172℃(分解); ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 8.40 (d, 8.5, 1H), 8.13 (d, 9.0, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.41 (d, 7.5, 2H), 7.32 (t, 7.0, 2H), 7.22 (t, 8.0, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.55 (d, 5.5, 2H), 4.04 (s, 2H); ESMS m/z 337 ($\text{M} - \text{CO}_2 + \text{H}^+$), 673 ($(\text{M} - \text{CO}_2) \times 2 + \text{H}^+$); IR (液体石蜡) 3405, 2652, 1696, 1590, 1515, 1461, 1439, 1377, 1333, 1249, 1120, 929, 832, 792, 752, 699 cm^{-1} 。FAB-MS (NBA) m/z 336 ($\text{M} - \text{CO}_2^+$)。

在 N₂ 气氛下，将 BH₃-THF 复合物(1.0 M 溶液, 0.13 mL, 0.13 mmol)

加到在 THF (5 mL)中的[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙酸(40.0 mg, 0.11 mmol)的溶液中, 并搅拌过夜。用饱和 NH_4Cl 水溶液(1 mL)处理反应混合物, 并用 AcOEt (20 mL)萃取。用饱和 NaCl 水溶液(5 mL)洗涤有机层, 干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩。闪蒸色谱(25% AcOEt -石油醚)得到 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙醇(21.2 mg, 53%), 为暗红色固体。M.p. 128—130°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.24 (d, 9.0, 1H), 7.88 (d, 8.0, 1H), 7.66 (t, 7.5, 1H), 7.60 (t, 7.5, 1H), 7.45 (d, 7.5, 2H), 7.41 (t, 7.5, 2H), 7.35 (t, 7.5, 1H), 6.92 (s, 1H), 4.87 (brs, 1H), 4.50 (d, 5.0, 2H), 4.05 (t, 8.5, 2H), 3.40 (t, 7.0, 2H), 1.84 (brs, 1H); IR (neat) 3406, 2936, 2892, 1594, 1519, 1435, 1342, 1124, 1036, 912, 823, 752, 699 cm^{-1} 。FAB-MS (NBA) m/z 322 ($\text{M} - \text{CO}_2^+$), ESMS m/z 323 ($\text{M} - \text{CO}_2 + \text{H}^+$), 645 ($(\text{M} - \text{CO}_2) \times 2 + \text{H}^+$)。

在 N_2 气氛下将 CCl_4 (0.2 mL, 2.18 mmol)加到在 CH_2Cl_2 (5 mL)中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙醇(0.1 g, 0.27 mmol)和 Ph_3P (0.29 g, 1.09 mmol)的溶液中, 并搅拌 3 小时。闪蒸色谱(10% AcOEt -石油醚)得到 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙基氯(0.1 g, 96%), 为橙色固体。M.p. 122—124°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.18 (d, 8.5, 1H), 7.89 (d, 8.5, 1H), 7.70 (t, 7.0, 1H), 7.62 (t, 7.0, 1H), 7.45 (d, 7.0, 2H), 7.41 (t, 7.5, 2H), 7.35 (t, 7.5, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.93 (brs, 1H), 4.51 (d, 5.0, 2H), 3.86 (t, 8.0, 2H), 3.56 (t, 8.5, 2H); IR (neat) 3087, 3033, 2927, 2856, 1594, 1519, 1439, 1342, 1124, 752, 699 cm^{-1} 。FAB-MS (NBA) m/z 340 ($\text{M} - \text{CO}_2^+$), ESMS m/z 341($\text{M} - \text{CO}_2 + \text{H}^+$)。

将在 THF (10 mL)中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙基氯(0.1 g, 0.26 mmol)的溶液加到在冷冻的 THF (10 mL)中的 PtO_2 (50 mg)的悬浮液中, 并在 55 psi 和室温下将悬浮液氢化(并振荡) 1 小时。

用 C 盐过滤悬浮液，并减压浓缩滤液，得到浅黄色固体(90.0 mg)。

在 N₂ 气氛下，将在 CH₂Cl₂ (15 mL)中的还原的化合物(90.0 mg, 0.25 mmol)的溶液加到在 CH₂Cl₂ (25 mL)中的 5,6,7-三甲氧基-2-羧酸(71.78 mg, 0.29 mmol)和六氟磷酸苯并三唑-1-氧基-三吡咯烷基磷(PyBOP) (0.14 g, 0.27 mmol)的悬浮液中。然后将蒸馏的 N,N-二异丙基乙基胺(0.1 mL, 0.60 mmol)加到此混合物中。将澄清的溶液搅拌过夜。浓缩反应混合物，用 AcOEt (20 mL)稀释，并用 10% HCl (5 mL)、饱和 NaHCO₃ 水溶液(5 mL)、饱和 NaCl 水溶液(5 mL)洗涤，干燥 (Na₂SO₄)并减压浓缩。闪蒸色谱(5% AcOEt-CH₂Cl₂)得到 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯(62.0 mg, 41%)，为浅黄色泡沫：mp 58-62°C；¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.31 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.85 (d, 8.0, 1H), 7.83 (d, 7.5, 1H), 7.30—7.54 (m, 8H), 7.15 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 4.68 (brs, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.96 (t, 6.0, 2H), 3.95 (s, 5H), 3.91 (s, 3H), 3.52 (t, 6.5, 2H); IR (neat) 3406, 3308, 2936, 1772, 1648, 1590, 1532, 1493, 1466, 1413, 1306, 1240, 1226, 1107, 1049, 996, 907, 827, 756, 734, 699 cm⁻¹。FAB-MS (NBA) *m/z* 544 (M - CO₂⁺), ESMS *m/z* 544 (M - CO₂⁺)。

将在 THF (10 mL)中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯(60.0 mg, 0.10 mmol)的溶液加到在冷冻的 THF (10 mL)中的 10% Pd/C (50 mg)的悬浮液中，并在 H₂ 气氛和室温下将悬浮液氢化三天。用 C 盐过滤悬浮液，并减压浓缩滤液。制备 TLC (50% AcOEt-石油醚)单独 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)-1-萘胺(8.2 mg, 18%)，为浅黄色固体。M. p. 182°C(分解)；¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.40 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.85 (d, 8.5, 1H), 7.83 (d, 8.0, 1H), 7.53 (t, 7.5, 1H), 7.46 (t, 8.5, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 4.25 (brs, 2H), 4.08 (s,

3H), 3.98 (t, 6.5, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.54 (t, 6.5, 2H); IR (neat) 3326, 2927, 2856, 1626, 1590, 1536, 1501, 1466, 1408, 1302, 1240, 1107, 1049, 1000, 907, 832, 756 cm^{-1} 。FAB HRMS (NBA) m/z 454.1549 ($M + H^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}_4$ 要求 454.1534)。 $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4\text{Cl}\cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ 的分析计算: C, 62.20; H, 5.40; N, 9.07, 实测: C, 62.39; H, 5.71; N, 8.68。

将在 THF (10 mL) 中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)-萘-1-基]乙酸乙酯(0.1 g, 0.16 mmol) 的溶液加到在冷冻的 THF (10 mL) 中的 10% Pd/C (0.1 g) 的悬浮液中, 并在 H_2 气氛和室温下将悬浮液氢化三天。用 C 盐过滤悬浮液, 并减压浓缩滤液。用二异丙醚将残余物结晶, 得到 2-[4-氨基-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)-萘-1-基]乙酸乙酯(0.064 g, 84%), 为白色固体: mp 182–186 $^{\circ}\text{C}$ (分解); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.40 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.94 (d, 8.5, 1H), 7.86 (d, 8.5, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.55 (t, 8.0, 1H), 7.46 (t, 8.0, 1H), 7.19 (brs, 1H), 6.88 (s, 1H), 4.39 (t, 7.0, 2H), 4.23 (brs, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.41 (t, 7.0, 2H), 2.10 (s, 1.5, 3H); FAB-MS (NBA) m/z 478 ($M + H^+$), IR (neat) ν_{max} 3341, 1727, 1639, 1591, 1536, 1505, 1466, 1410, 1304, 1243, 1106, 1046, 758 cm^{-1} 。

将在 THF (10 mL) 中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙醇(0.14 g, 0.25 mmol) 的溶液加到在冷冻的 THF (10 mL) 中的 10% Pd/C (0.1 g) 的悬浮液中, 并在 H_2 气氛和室温下将悬浮液氢化三天。用 C 盐过滤悬浮液, 并减压浓缩滤液。用二异丙醚将残余物结晶, 得到 2-[4-氨基-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙醇(0.083 g, 76%), 为浅黄色固体: mp 172–180 $^{\circ}\text{C}$ (分解); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.85 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 7.86 (d, 8.5, 1H), 7.86 (d, 8.0, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.50 (t, 8.0, 1H), 7.43

(t, 8.5, 1H), 7.03 (d, 2.0, 1H), 6.84 (s, 1H), 4.18 (t, 5.5, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.33 (t, 7.0, 2H); FAB-MS (NBA) m/z 435 ($M + H^+$), IR (neat) $\nu_{\max}$ 3291, 2936, 1638, 1595, 1541, 1509, 1464, 1432, 1410, 1305, 1264, 1106, 1047, 996, 909, 833, 757, 731 cm^{-1} 。

在 N_2 气氛和室温下, 将 5-甲氧基-2-羧酸(0.23 g, 1.19 mmol)、1-羟基-苯并三唑(0.16 g, 1.19 mmol)和 1-[3-(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.23 g, 1.19 mmol)加到在吡啶(3 mL)中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-氨基萘-1-基]乙酸乙酯(0.3 g, 0.79 mmol)中的溶液中, 然后将混合物搅拌两天, 并在 60°C 下加热两天。用 AcOEt (50 mL) 稀释反应混合物, 并用 10% HCl (10 mL)、饱和 NaHCO_3 水溶液(10 mL)、饱和 NaCl 水溶液(20 mL)洗涤, 干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩, 得到褐色泡沫 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-甲氧基吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.52 g, quant.): mp $98-110^\circ\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.41 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.96 (d, 8.5, 1H), 7.85 (d, 8.0, 1H), 7.55 (t, 7.0, 1H), 7.47 (d, 8.0, 2H), 7.43 (t, 9.0, 1H), 7.39 (t, 7.5, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.20 (brs, 1H), 7.13 (d, 1.5, 1H), 6.99 (dd, 9.0, 1.0, 1H), 6.99 (dd, 9.0, 1.5, 1H), 4.69 (brs, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.41 (t, 7.0, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.42 (t, 7.0, 2H), 2.15 (s, 3H); FAB-MS (NBA) m/z 507 ($M - \text{CO}_2^+$), IR (neat) $\nu_{\max}$ 3272, 1728, 1647, 1592, 1530, 1476, 1453, 1236, 1213, 1162, 1030, 909, 841, 807, 759, 733, 699 cm^{-1} 。

在室温下, 将碳酸钾(0.13 g, 0.91 mmol)加到在甲醇:四氢呋喃 = 1:1 (10 mL)中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-甲氧基吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.5 g, 0.91 mmol)的溶液中, 并搅拌过夜。用 AcOEt (100 mL)稀释反应混合物, 并用 H_2O (20 mL)、饱和 NaCl 水溶液(20 mL)洗涤, 然后干燥有机层(Na_2SO_4), 并减压浓缩, 得到褐色泡沫 2-[4-(N-

苄氧羰基氨基)-2-(5-甲氧基吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙醇(0.42 g, 94%): mp 198°C(分解); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 10.18 (s, 1H), 8.26 (d, 8.5, 1H), 7.97 (d, 8.5, 1H), 7.51 (t, 7.0, 1H), 7.43 (d, 8.5, 1H), 7.39 (d, 7.5, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.28 (t, 7.5, 2H), 7.18 (t, 7.5, 1H), 7.11 (brs, 1H), 7.08 (d, 2.5, 1H), 6.91 (t, 6.0, 1H), 6.86 (dd, 9.0, 2.5, 1H), 6.81 (s, 1H), 5.35 (t, 4.5, 1H), 4.47 (d, 5.5, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (m, 2H), 3.11 (t, 6.0, 2H); FAB-MS (NBA) m/z 465 ($M - \text{CO}_2^+$), IR (neat) ν_{max} 3272, 2945, 2874, 1646, 1594, 1528, 1479, 1453, 1422, 1404, 1261, 1213, 1162, 1030, 841, 805, 758, 734, 699 cm^{-1} .

在冰浴中将甲磺酰氯(0.24 mL, 3.14 mmol)加到在 THF (20 mL) 中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-甲氧基吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙醇 (0.4 g, 0.78 mmol) 和三乙胺(0.44 mL, 3.14 mmol) 的溶液中, 并搅拌 1 小时。用 CH_2Cl_2 (50 mL) 稀释反应混合物, 用 H_2O (10 mL) 和饱和 NaCl 水溶液(20 mL) 洗涤, 然后干燥有机层(Na_2SO_4), 并减压浓缩。用硅胶柱(30% AcOEt-石油醚)纯化残余物, 得到黄色泡沫 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-甲氧基吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(0.28 g, 61%): mp 160°C(分解); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.09 (brs, 1H), 8.36 (brs, 1H), 7.89 (d, 9.0, 1H), 7.87 (d, 9.0, 1H), 7.57 (t, 8.5, 1H), 7.48 (d, 7.5, 2H), 7.40 (t, 7.5, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.00 (d, 8.5, 1H), 7.00 (d, 9.0, 1H), 4.70 (brs, 2H), 4.61 (t, 6.0, 2H), 4.50 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.54 (t, 6.0, 2H), 2.84 (s, 3H); FAB-MS (NBA) m/z 543 ($M - \text{CO}_2^+$), IR (neat) ν_{max} 3400, 1643, 1591, 1530, 1479, 1453, 1351, 1231, 1213, 1173, 1142, 1076, 1031, 974, 947, 841, 805, 761, 734, 699 cm^{-1} .

在室温和 N_2 气氛下, 将 LiCl (0.39 g, 9.19 mmol) 加到在无水 DMF (3 mL) 中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-甲氧基吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]

甲磺酸乙酯(0.27 g, 0.46 mmol)的溶液中, 并搅拌三天。用 AcOEt (100 mL)稀释反应混合物, 并用 H₂O (20 mL)和饱和 NaCl 水溶液(5 mL)洗涤, 然后干燥有机层(Na₂SO₄)并减压浓缩。闪蒸色谱(30% AcOEt-石油醚)得到 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯(0.16 g, 66%), 为黄色泡沫: mp 182°C(分解); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.28 (brs, 1H), 8.55 (brs, 1H), 7.87 (d, 8.5, 2H), 7.55 (dt, 1.0, 7.5, 1H), 7.46 (d, 7.5, 2H), 7.39 (t, 7.5, 2H), 7.33 (t, 7.0, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.11 (d, 2.5, 1H), 6.98 (d, 9.0, 1H), 6.98 (d, 8.5, 1H), 4.68 (brs, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.00 (t, 6.5, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.57 (t, 6.5, 2H); FAB-MS (NBA) *m/z* 484 (M - CO₂⁺); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3406, 3282, 1645, 1591, 1529, 1475, 1453, 1422, 1399, 1249, 1213, 1164, 1029, 758, 733, 701 cm⁻¹。

将在 THF (10 mL)中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯(68 mg, 0.13 mmol)的溶液加到在冷冻的 THF (10 mL)中的 10% Pd/C (100 mg)的悬浮液中, 并在 H₂ 气氛和室温下将悬浮液氢化过夜。用 C 盐过滤悬浮液, 并将滤液减压浓缩。用乙醚将残余物结晶, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(5-甲氧基吲哚-2-酰胺基)-1-萘胺(40 mg, 78%), 为白色固体: mp 228°C(分解); ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 9.95 (s, 1H), 8.11 (d, 8.5, 1H), 7.96 (d, 8.0, 1H), 7.52 (t, 7.0, 1H), 7.41 (t, 7.0, 1H), 7.35 (d, 9.0, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.89 (d, 9.0, 1H), 6.67 (s, 1H), 5.83 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.73 (t, 8.0, 2H), 3.37 (t, 8.0, 2H); FAB-MS (NBA) *m/z* 394 (M + H⁺); IR (液体石蜡) $\nu_{\max}$ 3296, 1652, 1592, 1533, 1462, 1260, 1094, 1020, 800 cm⁻¹。

在室温下将乙酸酐(4.0 mL, 42.39 mmol)加到在无水吡啶(33 mL)中的 2-[4-氨基-2-硝基萘-1-基]乙醇(3.3 g, 14.21 mmol)的溶液中, 并搅拌 2 小时。用 AcOEt (100 mL)稀释混合物。用 H₂O (30 mL)、饱和

NaHCO₃ 水溶液 (30 mL)、饱和 NaCl 水溶液(30 mL)洗涤有机层，然后干燥有机层(Na₂SO₄)并减压浓缩。闪蒸色谱(33% AcOEt-石油醚)得到 2-[4-氨基-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(1.0 g, 26%)，为橙色固体；mp 108—110℃；¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.33 (d, 8.5, 1H), 7.84 (dd, 8.0, 0.5, 1H), 7.70 (dt, 7.5, 0.5, 1H), 7.64 (dt, 8.5, 1.5, 1H), 7.11 (s, 1H), 4.44 (t, 8.0, 2H), 4.38 (brs, 2H), 3.49 (t, 8.0, 2H), 2.06 (d, 0.5, 3H); FAB-MS (NBA) *m/z* 274 (M⁺), IR (neat) 3381, 1728, 1636, 1589, 1516, 1469, 1437, 1342, 1241, 1041, 754 cm⁻¹。

在室温下，将二叔丁基碳酸氢酯(3.18 g, 14.57 mmol)加到在无水吡啶(10 mL)中的 2-[4-氨基-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(1.0 g, 3.65 mmol)的溶液中，并搅拌过夜。浓缩混合物，并用 AcOEt (100 mL)稀释。用 H₂O (30 mL)和饱和 NaCl 水溶液(30 mL)洗涤有机层，然后将有机层干燥(Na₂SO₄)并减压浓缩。闪蒸色谱(25% AcOEt-石油醚)得到 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(1.0 g, 73%)，为黄色固体；mp 122-124℃；¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.40 (d, 8.0, 2H), 7.94 (d, 8.0, 1H), 7.73 (t, 7.0, 1H), 7.70 (t, 7.5, 1H), 7.00 (brs, 1H), 4.45 (t, 7.5, 2H), 3.55 (t, 7.5, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.58 (s, 9H); FAB-MS (NBA) *m/z* 374 (M⁺), FABHR (NBA) *m/z* 374.1487 (M⁺, C₁₉H₂₂N₂O₆ 要求 374.1478); IR (neat) 1735, 1598, 1527, 1367, 1342, 1234, 1156, 1040, 893, 760 cm⁻¹。

将在 THF (40 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(1.0 g, 2.67 mmol)的溶液加到在冷冻的 THF (10 mL)中的 10% Pd-C (0.1 g)的悬浮液中，并在 55 psi 和室温下将悬浮液氢化(同时振荡) 1 小时。用 C 盐过滤悬浮液，并将滤液减压浓缩，得到 2-[2-氨基-4-(N-叔丁氧羰基氨基)萘-1-基]乙酸乙酯，为橙色泡沫。用二异丙醚洗涤化合物，得到浅黄色固体(0.48 g, 52%); mp 138—140℃；¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.86 (d, 9.0, 1H), 7.72 (d, 8.5, 1H),

7.56 (brs, 1H), 7.46 (t, 7.0, 1H), 7.27 (m, 1H), 6.85 (brs, 1H), 4.26 (t, 8.0, 2H), 4.22 (brs, 2H), 3.24 (t, 7.5, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.56 (s, 9H); FAB-MS (NBA) m/z 344 (M^+), IR (neat) $\nu_{\max}$ 3379, 2977, 1727, 1626, 1534, 1504, 1456, 1391, 1367, 1238, 1158, 1043, 894, 758, 730 cm^{-1} 。

在 N_2 气氛和室温下, 将(2E)-3-[6-甲氧基(3-吡啶基)]丙-2-烯酸(0.18 g, 1.00 mmol)、1-羟基-苯并三唑(0.14 g, 1.00 mmol)和 1-[3-(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.19 g, 1.00 mmol)加到在吡啶(4 mL)中的 2-[2-氨基-4-(N-叔丁氧羰基氨基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.23 g, 0.67 mmol)的溶液中, 然后将混合物搅拌两天, 并在 60°C 下加热三天。用 AcOEt (50 mL)稀释反应混合物, 并用 H_2O (10 mL)和饱和 NaCl 水溶液(20 mL)洗涤, 然后将有机层干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩。用乙醚洗涤残余物, 得到白色固体 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.19 g, 56%): mp 208—212 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.62 (brs, 2H), 8.38 (s, 1H), 7.95 (d, 8.0, 1H), 7.92 (d, 8.5, 1H), 7.87 (dd, 8.5, 2.5, 1H), 7.79 (d, 15.5, 1H), 7.55 (t, 7.5, 1H), 7.49 (t, 7.5, 1H), 6.81 (m, 3H), 4.27 (t, 7.5, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.40 (t, 8.0, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.55 (s, 9H); FAB-MS (NBA) m/z 506 ($M + \text{H}^+$), FABHR (NBA) m/z 506.2300 ($M + \text{H}^+$, $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_6$ 要求 506.2291); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3256, 2980, 1736, 1688, 1661, 1601, 1537, 1497, 1384, 1287, 1236, 1161, 1026, 830, 756, 732 cm^{-1} 。

在 N_2 气氛和室温下, 将(2E)-3-[2,6-二甲氧基(3-吡啶基)]丙-2-烯酸(0.21 g, 1.00 mmol)、1-羟基-苯并三唑(0.14 g, 1.00 mmol)和 1-[3-(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.19 g, 1.00 mmol)加到在吡啶(4 mL)中的 2-[2-氨基-4-(N-叔丁氧羰基氨基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.23 g, 0.67 mmol)的溶液中, 然后将混合物搅拌两天, 并在 60°C 下加热

三天。用 AcOEt (50 mL)稀释反应混合物,并用 H₂O (10 mL)和饱和 NaCl 水溶液(20 mL)洗涤,然后将有机层干燥(Na₂SO₄)并减压浓缩。用乙醚洗涤残余物,得到白色固体 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.22 g, 61%): mp 228—230°C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.56 (s br, 1H), 8.45 (s br, 1H), 7.98 (d, 8.0, 1H), 7.91 (d, 8.0, 1H), 7.87 (d, 15.5, 1H), 7.75 (d, 8.0, 1H), 7.54 (t, 7.0, 1H), 7.48 (t, 7.5, 1H), 6.94 (d, 15.5, 1H), 6.77 (brs, 1H), 6.37 (d, 8.0, 1H), 4.30 (t, 8.0, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.41 (t, 7.5, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.55 (s, 9H); FAB-MS (NBA) *m/z* 536 (M + H⁺), FABHR (NBA) *m/z* 536.2392 (M + H⁺, C₂₉H₃₄N₃O₇ 要求 536.2397); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3252, 2979, 1736, 1688, 1656, 1620, 1595, 1537, 1503, 1484, 1455, 1422, 1387, 1366, 1321, 1280, 1241, 1162, 1098, 1040, 1014, 903, 812, 756, 732 cm⁻¹。

在室温下,将碳酸钾(0.06 g, 0.45 mmol)加到在甲醇(4 mL)和四氢呋喃(10 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.19 g, 0.38 mmol)的溶液中,并搅拌过夜。用 AcOEt (100 mL)稀释反应混合物,并用 H₂O (20 mL)、饱和 NaCl 水溶液(20 mL)洗涤,然后将有机层干燥(Na₂SO₄)并减压浓缩,得到 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙醇,为浅褐色泡沫(0.17g, 97%): mp 116—120°C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.21 (brs, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.83 (brs, 2H), 7.68 (d, 8.0, 1H), 7.54 (d, 15, 1H), 7.40 (m, 2H), 6.81 (brs, 1H), 6.72 (d, 8.5, 1H), 6.36 (d, 15.5, 1H), 4.02 (brs, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.25 (brs, 2H), 2.88 (brs, 1H), 1.55 (s, 9H); FAB-MS (NBA) *m/z* 464 (M + H⁺), IR (neat) $\nu_{\max}$ 3271, 2979, 1694, 1662, 1601, 1538, 1497, 1384, 1311, 1288, 1231, 1160, 1026, 909, 830, 732 cm⁻¹。

在室温下, 将碳酸钾(0.07 g, 0.49 mmol)加到在甲醇(4 mL)和四氢呋喃(10 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.22 g, 0.41 mmol)的溶液中, 并搅拌过夜。用 AcOEt (100 mL)稀释反应混合物, 并用 H₂O (20 mL)、饱和 NaCl 水溶液(20 mL)洗涤, 然后将有机层干燥(Na₂SO₄)并减压浓缩, 得到浅褐色泡沫 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙醇(0.20 g, 99%): mp 164—168℃; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.92 (brs, 1H), 8.27 (brs, 1H), 7.90 (d, 8.0, 1H), 7.80 (d, 15, 1H), 7.68 (d, 8.0, 1H), 7.47 (m, 2H), 6.73 (brs, 1H), 6.59 (d, 15.5, 1H), 6.33 (d, 8.0, 1H), 4.08 (brs, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.33 (t, 5.5, 2H), 1.55 (s, 9H); FAB-MS (NBA) *m/z* 494 (M + H⁺), IR (neat) $\nu_{\max}$ 3272, 1692, 1656, 1594, 1484, 1457, 1422, 1388, 1321, 1280, 1248, 1160, 1040, 1015, 761, 730 cm⁻¹。

在冰浴中将甲磺酰氯(0.1 mL, 1.29 mmol)加到在 CH₂Cl₂:THF = 1:1 (6 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙醇(0.16 g, 0.35 mmol)和三乙胺(0.2 mL, 1.43 mmol)的溶液中, 并搅拌 1 小时。用 AcOEt (50 mL)稀释反应混合物, 并用 H₂O (10 mL)和饱和 NaCl 水溶液(10 mL)洗涤, 然后将有机层干燥(Na₂SO₄)并减压浓缩。用乙醚洗涤残余物, 得到白色固体 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(0.17 g, 90%): mp 224℃(分解); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.34 (s, 1H), 8.29 (brs, 1H), 8.10 (brs, 1H), 7.92 (d, 8.0, 1H), 7.88 (d, 8.0, 1H), 7.84 (d, 8.5, 1H), 7.79 (d, 16.0, 1h), 7.56 (t, 7.0, 1H), 7.52 (t, 6.5, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.79 (d, 8.5, 1H), 6.65 (d, 15.5, 1H), 4.55 (t, 6.5, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.54 (t, 6.5, 2H), 2.94 (s, 3H), 1.56 (s, 9H); FAB-MS (NBA) *m/z* 542 (M + H⁺), IR (neat) $\nu_{\max}$ 3248, 2980, 1688, 1660, 1626, 1601, 1532, 1497, 1384, 1356,

1288, 1249, 1229, 1173, 1023, 974, 953, 828, 756, 733 cm^{-1} 。

在冰浴中将甲磺酰氯(0.1 mL, 1.29 mmol)加到在 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{THF} = 1:1$ (6 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙醇(0.17 g, 0.34 mmol)和三乙胺(0.2 mL, 1.43 mmol)的溶液中, 并搅拌 1 小时。用 AcOEt (50 mL)稀释反应混合物, 并用 H_2O (10 mL)和饱和 NaCl 水溶液(10 mL)洗涤, 然后将有机层干燥 (Na_2SO_4)并减压浓缩。用乙醚洗涤残余物, 得到黄色固体 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(0.18 g, 93%): mp 200 $^{\circ}\text{C}$ (分解); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.27 (s br, 1H), 7.91 (d, 8.5, 2H), 7.84 (d, 15.5, 1H), 7.72 (d, 8.0, 1H), 7.56 (t, 9.0, 1H), 7.51 (t, 7.5, 1H), 7.28 (m, 1H), 6.84 (s br, 1H), 6.79 (d, 15.5, 1H), 6.36 (d, 8.0, 1H), 4.55 (t, 6.5, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.55 (t, 6.5, 2H), 2.92 (s, 3H), 1.55 (s, 9H); FAB-MS (NBA) m/z 572 ($\text{M} + \text{H}^+$), IR (neat) ν_{max} 3388, 3246, 2980, 1688, 1656, 1594, 1532, 1485, 1457, 1422, 1388, 1355, 1321, 1280, 1249, 1226, 1173, 1098, 1040, 1014, 952, 814, 761, 725 cm^{-1} 。

在室温和 N_2 气氛下, 将 LiCl (0.69 g, 16.28 mmol)加到在无水 DMF (3 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(0.15 g, 0.28 mmol)的溶液中, 并搅拌三天。将 H_2O (20 mL)加到反应混合物中, 并过滤沉淀。用 MeOH 洗涤固体, 得到 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙基氯(0.12 g, 91%), 为白色固体: mp 220 $^{\circ}\text{C}$ (分解); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.31 (s, 1H), 8.05 (brs, 1H), 7.89 (brs, 1H), 7.82 (d, 8.5, 1H), 7.72 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.78 (d, 7.0, 1H), 6.58 (d, 16.0, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.74 (brs, 2H), 3.49 (brs, 2H), 3.40 (brs, 1H), 1.57 (s, 9H); FAB-MS (NBA) m/z 482 (M

+ H⁺), FABHR (NBA) m/z 482.1841 (M + H⁺, C₂₆H₂₉ClN₃O₄ 要求 482.1847); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3224, 2997, 1715, 1687, 1652, 1617, 1602, 1544, 1501, 1402, 1384, 1310, 1289, 1242, 1165, 1024, 979, 831, 754, 734 cm⁻¹。

在室温和 N₂ 气氛下, 将 LiCl (0.72 g, 17.00 mmol) 加到在无水 DMF (3 mL) 中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(0.16 g, 0.28 mmol) 的溶液中, 并搅拌四天。将 AcOEt (10 mL) 和 H₂O (20 mL) 加到反应混合物中, 并将沉淀过滤, 得到 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙基氯(0.12 g, 84%), 为白色固体: mp 202°C(分解); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.14 (brs, 1H), 7.93 (t, 7.5, 2H), 7.85 (d, 15.5, 1H), 7.72 (d, 8.5, 1H), 7.69 (brs, 1H), 7.57 (t, 7.5, 1H), 7.53 (t, 8.0, 1H), 6.83 (brs, 1H), 6.68 (d, 15, 1H), 6.36 (d, 7.5, 1H), 4.06 (brs, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.88 (t, 7.0, 2H), 3.57 (t, 7.0, 2H), 1.55 (s, 9H); FAB-MS (NBA) m/z 512 (M + H⁺), FABHR (NBA) m/z 512.1965 (M + H⁺, C₂₇H₃₁ClN₃O₅ 要求 512.1952); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3219, 1688, 1656, 1621, 1594, 1541, 1501, 1484, 1453, 1404, 1386, 1320, 1284, 1250, 1162, 1098, 1075, 1016, 810, 752 cm⁻¹。

在室温下, 将在 AcOEt (3 mL, 9 mmol) 中的 3 N HCl 加到在无水 CH₂Cl₂ (10 mL) 中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙基氯(0.12 g, 0.25 mmol) 的悬浮液中, 并将所得的溶液搅拌过夜。将沉淀过滤, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(3-氮杂-4-甲氧基肉桂酰胺基)-1-萘胺二盐酸盐(0.11 g, 100%), 为浅黄色固体: mp 230 °C(分解); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 10.20 (s, 1H), 8.45 (d, 2.5, 2H), 8.19 (d, 8.0, 1H), 8.08 (d, 8.0, 1H), 8.03 (dd, 8.5, 2.5, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.62 (d, 15.5, 1H), 7.05 (d, 15.5, 1H), 6.93 (d, 8.5, 1H), 5.27 (brs, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.81 (t, 8.5,

2H), 3.59 (t, 8.5, 2H); FAB-MS (NBA) m/z 382 ($M + H^+$), FABHR (NBA) m/z 382.1334 ($M + H^+$, $C_{21}H_{21}ClN_3O_2$ 要求 382.1322); IR (液体石蜡) $\nu_{\max}$ 3370, 1671, 1636, 1606, 1556, 1511, 1461, 1377, 1329, 1233, 1186, 1008, 974, 839, 764, 721 cm^{-1} 。

在室温下, 将在 AcOEt (3 mL, 9 mmol) 中的 3 N HCl 加到在无水 CH_2Cl_2 (10 mL) 中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)萘-1-基]乙基氯(0.12 g, 0.23 mmol) 的溶液中, 将所得的溶液搅拌过夜。将沉淀过滤, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(3-氮杂-2,4-二甲氧基肉桂酰胺基)-1-萘胺二盐酸盐(0.11 g, 97%), 为黄色固体: mp 150—160 $^{\circ}\text{C}$ (分解); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ 9.93 (s, 1H), 8.13 (d, 8.5, 1H), 8.05 (d, 7.5, 1H), 7.95 (d, 8.5, 1H), 7.66 (d, 16.0, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.60 (t, 7.0, 1H), 7.53 (brs, 1H), 6.97 (d, 16.0, 1H), 6.50 (d, 7.5, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.92 (m, 5H), 3.77 (t, 7.5, 2H), 3.52 (t, 8.0, 2H); FAB-MS (NBA) m/z 412 ($M + H^+$), FABHR (NBA) m/z 412.1413 ($M + H^+$, $C_{22}H_{23}ClN_3O_3$ 要求 412.1428); IR (液体石蜡) $\nu_{\max}$ 1594, 1543, 1461, 1385, 1322, 1250, 1097, 1018, 751 cm^{-1} 。

在 N_2 气氛和室温下, 将羧酸(0.38 g, 1.19 mmol)、1-羟基-苯并三唑(0.16 g, 1.19 mmol)和 1-[3(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.23 g, 1.19 mmol)加到在吡啶(3 mL)中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-氨基萘-1-基]乙酸乙酯(0.3 g, 0.79 mmol) 的溶液中, 然后将混合物搅拌三天。将 1 M HCl (10 mL)加到反应混合物中, 然后将沉淀过滤, 并用水和 MeOH 洗涤, 得到浅褐色固体 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.64 g, quant.): mp 150—156 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.52 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.97 (d, 8.5, 1H), 7.85 (d, 8.5, 1H), 7.72 (d, 8.0, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.59 (d, 8.5, 1H), 7.55 (t, 7.5, 1H), 7.31—7.49 (m, 11H), 7.22 (s, 1H), 4.52 (s,

1H), 4.40 (t, 7.0, 2H), 3.49 (s, 2H), 3.42 (t, 7.0, 2H), 2.16 (s, 3H); FAB-MS (NBA) m/z ($M - CO_2^+$), IR (neat) $\nu_{\max}$ 3402, 1728, 1654, 1592, 1534, 1475, 1448, 1426, 1302, 1245, 1142, 1076, 1031, 881, 810, 739, 699 cm^{-1} 。

在室温下, 将碳酸钾(0.13 g, 0.94 mmol)加到在甲醇:四氢呋喃 = 1:1 (40 mL)中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.64 g, 0.94 mmol)的溶液中, 并搅拌过夜。将沉淀过滤并用 MeOH 洗涤, 得到 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙醇(0.32 g, 53%), 为浅黄色固体: mp 180—185°C 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 8.26 (d, 8.5, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.97 (d, 8.5, 1H), 7.82 (d, 7.5, 1H), 7.74 (t, 8.0, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.49 (t, 7.5, 2H), 7.34—7.41 (m, 9H), 7.29 (t, 7.5, 2H), 7.19 (t, 7.0, 2H), 6.88 (brs, 1H), 4.47 (s, 2H), 3.96 (brs, 2H), 3.69 (brs, 2H); FAB-MS (NBA) m/z ($M - CO_2^+$), IR (液体石蜡) $\nu_{\max}$ 3263, 1642, 1595, 1542, 1456, 1404, 1377, 1330, 1267, 1231, 1169, 1138, 1029, 872, 827, 805, 740, 704, 668 cm^{-1} 。

在冰浴中将甲磺酰氯(0.15 mL, 1.88 mmol)加到在吡啶(3 mL)中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙醇(0.3 g, 0.47 mmol)的悬浮液中, 并搅拌 1 小时。用 AcOEt (50 mL)稀释反应混合物, 然后用 1 M HCl (10 mL)、饱和 $NaHCO_3$ 水溶液(10 mL)和饱和 NaCl 水溶液(10 mL)洗涤有机层。将有机层干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩, 得到褐色油 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(0.32 g, 95%); 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 9.33 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.90 (d, 9.0, 1H), 7.87 (d, 8.5, 1H), 7.71 (d, 8.5, 1H), 7.44—7.60 (m, 9H), 7.39 (t, 7.5, 2H), 7.22—7.35 (m, 4H), 7.12 (s, 1H), 4.60 (t, 6.5, 2H), 4.48 (s, 2H), 3.54 (t, 6.0,

2H), 2.88 (s, 3H); FAB-MS (NBA) m/z ($M - CO_2^+$), IR (neat) $\nu_{\max}$ 3202, 1639, 1590, 1536, 1404, 1351, 1258, 1231, 1171, 1076, 1045, 969, 947, 748 cm^{-1} 。

在室温和 N_2 气氛下, 将 LiCl (0.35 g, 8.37 mmol) 加到在无水的 DMF (6 mL) 中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯 (0.3 g, 0.42 mmol) 的溶液中, 并搅拌三天。用 AcOEt (100 mL) 稀释反应混合物, 并用 H_2O (20 mL) 和饱和 NaCl 水溶液 (10 mL) 洗涤, 然后将有机层干燥 (Na_2SO_4) 并减压浓缩。闪蒸色谱 (30% AcOEt-石油醚) 得到 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯 (84 mg, 30%), 为黄色固体: mp 180°C (分解); 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 8.31 (d, 8.5, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.00 (d, 8.5, 1H), 7.82 (d, 8.0, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.72 (d, 8.5, 1H), 7.58 (t, 8.5, 2H), 7.49 (t, 7.0, 2H), 7.43 (d, 8.5, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.37 (d, 7.0, 2H), 7.28 (t, 8.0, 2H), 7.20 (d, 7.0, 1H), 7.06 (t, 5.5, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.48 (d, 5.5, 2H), 3.74 (t, 7.5, 2H), 3.33 (t, 7.5, 2H); FAB-MS (NBA) m/z ($M - CO_2^+$); IR (液体石蜡) $\nu_{\max}$ 3365, 3206, 3022, 1609, 1639, 1516, 1406, 1403, 1260, 748 cm^{-1} 。

将在 THF (10 mL) 中的 2-[4-(N-苄氧羰基氨基)-2-(5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯 (70 mg, 0.11 mmol) 的溶液加到在冷冻的 THF (10 mL) 中的 10% Pd/C (50 mg) 的悬浮液中, 并在 H_2 气氛和室温下将悬浮液氢化过夜。用 C 盐过滤悬浮液, 并减压浓缩滤液。用乙醚结晶残余物, 得到 4-(2-氯乙基)-3-[5-(5-苯并呋喃-2-酰胺基)吡啶-2-酰胺基]-1-萘胺 (16 mg, 29%), 为浅黄色固体: mp 216°C (分解); 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 10.44 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.11 (d, 8.5, 1H), 7.97 (d, 8.5, 1H), 7.83 (d, 7.5, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.72 (d, 8.5, 1H), 7.58 (dd, 2.0, 8.5, 1H),

7.53 (t, 8.0, 1H), 7.50 (t, 7.5, 1H), 7.35—7.46 (m, 5H), 6.68 (s, 1H), 5.83 (brs, 1H), 3.75 (t, 7.5, 2H), 3.38 (t, 7.5, 2H); FAB-MS (NBA) m/z ($M + H^+$); IR (液体石蜡) $\nu_{\max}$ 3434, 1707, 1593, 1534, 1462, 1378, 1260, 1122, 1074, 1022, 953, 914, 861, 801, 743 cm^{-1} 。

在 N_2 气氛和室温下, 将 5-硝基-2-苯并呋喃羧酸(2.25 g, 10.86 mmol)、N, N-二异丙基乙基胺(1.9 mL)、1-羟基-苯并三唑(1.47 g, 10.86 mmol)和 1-[3-(二甲基氨基)-丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(2.08 g, 10.86 mmol)加到在吡啶(30 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-氨基萘-1-基]乙酸乙酯(1.5 g, 7.24 mmol)的溶液中, 然后将混合物搅拌两天, 并在 60°C 下加热三天。浓缩反应混合物, 并向残余物中加入 H_2O (50 mL)。将沉淀过滤, 得到浅褐色固体 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(2.1 g, 54%): mp $199-200^\circ\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 10.63 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.38 (d, 9.0, 1H), 8.20 (d, 8.0, 1H), 8.12 (d, 8.0, 1H), 7.98 (s, 2H), 7.62 (s, 2H), 7.57 (t, 7.5, 1H), 4.22 (t, 6.5, 2H), 1.92 (d, 2.0, 3H), 1.49 (d, 2.0, 9H); TOFMS 534 ($M + H^+$), TOFHR m/z 534.1864 ($M + H^+$, $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_8$ 要求 534.1876); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3285, 3102, 2977, 2873, 1731, 1683, 1622, 1598, 1530, 1498, 1446, 1392, 1366, 1345, 1274, 1235, 1159, 1069, 1044, 1004, 953, 896, 824, 804, 750, 731, 684 cm^{-1} 。

在室温下, 将碳酸钾(0.65 g, 4.72 mmol)加到在甲醇(40 mL)和四氢呋喃(40 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(2.1 g, 3.94 mmol)的溶液中, 并搅拌过夜。将反应混合物过滤, 并蒸发滤液。用硅胶柱($\text{AcOEt}/\text{石油醚} = 1/2$)纯化残余物, 得到浅褐色固体 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)萘-1-基]乙醇(0.7 g, 36%): mp 200°C ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 10.25 (s, 1H), 8.51 (d, 2.0, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.32 (dd,

2.0, 9.0, 1H), 7.89 (d, 8.5, 1H), 7.81 (d, 8.5, 1H), 7.60 (d, 9.0, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.49 (d, 7.0, 1H), 7.46 (d, 8.0, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.15 (brs, 2H), 3.49 (dq, 3.0, 7.0, 2H), 2.75 (s, 1H), 1.58 (s, 9H); TOFMS 492 ($M + H^+$); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3295, 1670, 1601, 1527, 1498, 1392, 1344, 1277, 1238, 1158, 1070, 894, 821, 732, 684, 668 cm^{-1} 。

在冰浴中将甲磺酰氯(0.5 mL, 6.47 mmol)加到在 THF (30 mL)中的 2-4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(5-硝基苯并呋喃-2-苯甲酰氨基)萘-1-基]乙醇(1.5 g, 3.05 mmol)和三乙胺(0.85 mL, 6.10 mmol)的溶液中, 并搅拌 0.5 小时。用 AcOEt (50 mL)稀释反应混合物, 并用 H_2O (10 mL)和饱和 NaCl 水溶液(10 mL)洗涤, 然后将有机层干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩, 得到黑色油 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(1.8 g, quant); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.91 (s, 1H), 8.67 (t, 2.0, 1H), 8.40 (t, 2.0, 1H), 8.38 (t, 2.0, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.96 (t, 8.5, 2H), 7.79 (d, 9.0, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.62 (t, 7.5, 1H), 7.58 (t, 7.0, 1H), 6.96 (s, 1H), 4.62 (t, 6.0, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.61 (t, 5.0, 2H), 1.56 (d, 2.5, 9H); TOFMS 570 ($M + H^+$); IR (neat) $\nu_{\max}$ 2979, 1719, 1623, 1597, 1528, 1498, 1346, 1274, 1232, 1173, 1070, 952, 898, 822, 749, 684, 668 cm^{-1} 。

在室温和 N_2 气氛下, 将 LiCl (5.17 g, 0.12 mol)加到在无水 DMF (60 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(1.8 g, 3.05 mmol)的溶液中, 并搅拌三天。将 H_2O (20 mL)加到反应混合物中, 并将沉淀过滤, 得到 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯(0.52 g, 混合物)。将在 THF (10 mL)中的 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(5-硝基苯并呋喃-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯(0.52 g, 混合物)的溶液加到在冷冻的 THF (10 mL)中的 10% Pd-C (0.5 g)的悬浮液中, 并在 55 psi 和室温下将悬

浮液氢化(同时振荡) 1 小时。用 C 盐过滤悬浮液, 并将滤液减压浓缩。用 MeOH 洗涤残余物, 得到白色固体(80 mg, 5.5%, 来自 2-[4-(N-叔丁氧羰基氨基)-2-(5-氨基苯并呋喃-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯)。mp 240°C(分解); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 10.35 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.12 (t, 10.0, 2H), 7.62 (t, 7.5, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.56 (t, 8.5, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.38 (d, 9.0, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.81 (d, 9.0, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.82 (t, 7.5, 2H), 3.51 (t, 7.5, 2H); TOFMS 480 ($\text{M} + \text{H}^+$); IR (neat) ν_{max} 3369, 2962, 2927, 2865, 1718, 1624, 1580, 1540, 1500, 1466, 1394, 1366, 1237, 1259, 860, 756, 668 cm^{-1} 。

实施例 11

非手性 *seco*-CBI 类似物的合成

4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基呋喃-2-酰胺基)-1-萘酚的制备

在室温下, 将 2-[4-氨基-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(1.0 g, 3.65 mmol) 加到 35% H_2SO_4 (50 mL) 中, 并搅拌过夜完全成盐。将 NaNO_2 (0.33 g, 4.74 mmol) 在低于 +3°C 的冷水(1 mL) 中的溶液加到悬浮液中, 并将混合物搅拌 5 分钟。将少量尿素结晶加到该混合物中以分解任何过量的 NaNO_2 。将在低于 +10°C 的水(总体积为 140 mL) 中的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14.09 g, 58.33 mmol) 的溶液加到该冷的混合物中。在剧烈搅拌下, 将 Cu_2O (0.48 g, 3.35 mmol) 加到该混合物中, 并搅拌 3 小时。

用 AcOEt (200 mL) 萃取混合物。用水(50 mL) 和饱和 NaCl 水溶液 (50 mL) 洗涤有机层, 然后干燥(Na_2SO_4) 并蒸发。用硅胶柱(AcOEt: 石油醚 = 1:6) 纯化残余物, 得到 2-[4-羟基-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(0.42 g, 42%), 为黄色固体。Mp 96-100°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.99 (d, 8.5, 1H), 7.86 (d, 8.0, 1H), 7.66 (t, 7.0, 1H), 7.55 (t, 7.5, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.34 (q, 7.0, 2H), 4.29 (s, 2H), 1.38 (t,

7.5, 3H); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3351, 2983, 1708, 1595, 1517, 1430, 1374, 1338, 1251, 1215, 1156, 1081, 1023, 847, 772, 757 cm^{-1} 。

在室温下, 将无水 K_2CO_3 (0.50 g, 3.68 mmol) 加到在丙酮(4 mL) 中的 2-[4-羟基-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(0.42 g, 1.53 mmol) 和苄基溴 (0.44 mL, 3.68 mmol) 的溶液中, 并将混合物搅拌过夜。将反应混合物过滤, 并浓缩滤液。用 AcOEt (50 mL) 稀释残余物, 并将 N-甲基哌啶(3 mL) 加到混合物中, 以除去任何过量的苄基溴。用水(10 mL)、1 M HCl (10 mL)、饱和 NaHCO_3 水溶液(10 mL) 和饱和 NaCl 水溶液(10 mL) 洗涤混合物, 然后干燥(Na_2SO_4) 并蒸发, 得到 2-[4-苄氧基-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(0.35 g, 63%), 为黄色固体。Mp 128—130°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.44 (dd, 0.5, 8.0, 1H), 8.10 (d, 8.5, 1H), 7.71 (t, 7.0, 1H), 7.66 (t, 7.0, 1H), 7.54 (d, 7.0, 2H), 7.46 (t, 7.5, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.40 (t, 7.0, 1H), 5.32 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 4.21 (q, 7.0, 2H), 1.27 (t, 7.0, 3H); EIMS m/z 365 (M^+); IR (neat) $\nu_{\max}$ 2980, 1725, 1592, 1524, 1512, 1469, 1451, 1426, 1371, 1331, 1252, 1202, 1159, 1111, 1022, 842, 770, 756, 724, 690 cm^{-1} 。

在 N_2 气氛和 0°C 下, 将 DIBAL-H (1.0 M, 3.84 mL, 3.84 mmol) 缓慢加到在 THF (4 mL) 中的 2-[4-苄氧基-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯 (0.35 g, 0.96 mmol) 的溶液中, 并搅拌 15 分钟。将混合物缓慢倾入冷冻的 1 N HCl (10 mL) 中, 并用 AcOEt (50 mL) 萃取混合物。用 1 M HCl (10 mL)、饱和 NaHCO_3 水溶液(10 mL) 和饱和 NaCl 水溶液(10 mL) 洗涤有机层, 然后将有机层干燥(Na_2SO_4) 并蒸发, 得到 2-[4-苄氧基-2-硝基萘-1-基]乙醇(0.33 g, quant.), 为褐色固体。Mp 82—90°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.43 (d, 8.5, 1H), 8.25 (d, 9.0, 1H), 7.71 (t, 7.0, 1H), 7.65 (t, 7.0, 1H), 7.54 (d, 8.0, 2H), 7.45 (t, 7.5, 2H), 7.40 (t, 7.0, 1H), 7.19 (s, 1H), 5.29 (s, 2H), 4.08 (t, 6.5, 2H), 3.49 (t, 6.5, 2H); EIMS m/z 323 (M^+); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3368, 2929, 1593,

1526, 1513, 1463, 1423, 1363, 1337, 1271, 1240, 1161, 1103, 1039, 829, 755, 697 cm^{-1} 。

在室温下将乙酸酐(0.35 mL, 3.71 mmol)加到在无水吡啶(3 mL)中的 2-[4-苄氧基-2-硝基萘-1-基]乙醇(0.3 g, 0.93 mmol)的溶液中, 并搅拌过夜。浓缩混合物并将其溶于 AcOEt (50 mL)中。用 1 M HCl (10 mL)、饱和 NaHCO_3 水溶液(10 mL)和饱和 NaCl 水溶液(10 mL)洗涤有机层, 然后将有机层干燥(Na_2SO_4)并浓缩。用硅胶柱(AcOEt:石油醚 = 1:6)纯化残余物, 得到 2-[4-苄氧基-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(0.21 g, 62%), 为黄色固体。mp 82—87°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.43 (d, 8.5, 1H), 8.33 (d, 8.5, 1H), 7.33 (dt, 1.0, 7.5, 1H), 7.66 (dt, 1.0, 7.0, 1H), 7.54 (d, 7.5, 2H), 7.45 (t, 7.5, 2H), 7.40 (t, 7.0, 1H), 7.28 (s, 1H), 5.30 (s, 2H), 4.47 (t, 7.0, 2H), 3.55 (t, 7.0, 2H), 2.06 (s, 3H); EIMS m/z 388 ($\text{M} + \text{Na}^+$); IR (neat) ν_{max} 1738, 1593, 1527, 1514, 1466, 1424, 1365, 1337, 1235, 1104, 1043, 770, 752, 698 cm^{-1} 。

将在 THF (30 mL)中的 2-[4-苄氧基-2-硝基萘-1-基]乙酸乙酯(0.2 g, 0.55 mmol)的溶液加到在 THF (10 mL)中的 PtO_2 (100 mg)的悬浮液中, 并在 55 psi 和室温下将悬浮液氢化(同时振荡)1 小时。用 C 盐过滤悬浮液, 并将滤液减压浓缩, 得到 2-[4-苄氧基-2-氨基萘-1-基]乙酸乙酯, 为褐色固体(0.18 g, 97.58%)。Mp 76—82°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.24 (d, 8.0, 1H), 7.80 (d, 8.5, 1H), 7.22—7.53 (m, 7H), 6.41 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 4.25 (t, 8.0, 2H), 3.21 (t, 8.0, 2H), 2.11 (s, 3H); EIMS m/z 335 (M^+); IR (neat) ν_{max} 3378, 2927, 1731, 1624, 1600, 1516, 1454, 1410, 1366, 1239, 1158, 1133, 1028, 827, 759, 698 cm^{-1} 。

在 N_2 气氛和室温下, 将 5,6,7-三甲氧基-2-羧酸(0.18 g, 0.72 mmol)、1-羟基-苯并三唑(0.10 g, 0.72 mmol)和 1-[3-(二甲基氨基)丙

基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.27 g, 1.43 mmol)加到在吡啶(3 mL)中的 2-[4-苄氧基-2-氨基萘-1-基]乙酸乙酯(0.16 g, 0.48 mmol)的溶液中, 然后将混合物搅拌三天并加热两天。用 AcOEt (50 mL)稀释反应混合物, 并用 10% HCl (10 mL)、饱和 NaHCO₃ 水溶液(10 mL)、饱和 NaCl 水溶液(10 mL)洗涤, 干燥(Na₂SO₄)并减压浓缩。用硅胶柱(AcOEt:石油醚 = 1:4)纯化残余物, 得到橙色泡沫 2-[4-苄氧基-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯(0.10 g, 37%): mp 55—65°C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.40 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.39 (d, 8.0, 1H), 7.93 (d, 8.5, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.71 (dd, 3.5, 5.5, 1H), 7.57 (d, 7.5, 2H), 7.54 (dd, 3.5, 5.8, 1H), 7.44 (t, 7.5, 2H), 7.37 (t, 7.5, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 5.31 (s, 2H), 4.42 (t, 7.0, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.44 (t, 7.0, 2H), 2.17 (s, 3H); FAB-MS (NBA) *m/z* 569 (M + H⁺), FABHR (NBA) *m/z* 568.2204 (M + H⁺, C₃₃H₃₂N₂O₇ 要求 568.2210); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3293, 2963, 2933, 1731, 1634, 1593, 1538, 1503, 1465, 1409, 1370, 1306, 1239, 1111, 1075, 1048, 999, 909, 832, 761, 736, 699 cm⁻¹。

在室温下, 将碳酸钾(29.15 mg, 0.21 mmol)加到在 MeOH (2 mL) 中的 2-[4-苄氧基-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙酸乙酯 (0.10 g, 0.18 mmol)的溶液中, 并搅拌过夜。用 AcOEt (50 mL)稀释反应混合物, 并用 H₂O (10 mL)、饱和 NaCl 水溶液(20 mL)洗涤, 然后将有机层干燥(Na₂SO₄)并减压浓缩, 得到黄色油 2-[4-苄氧基-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙醇(82 mg, 87%); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.96 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.39 (d, 8.0, 1H), 7.85 (d, 8.5, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.71 (dd, 3.5, 5.8, 1H), 7.57 (d, 7.5, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.43 (t, 7.5, 2H), 7.36 (t, 7.0, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.30 (s, 2H), 4.21 (t, 6.0, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.37 (t, 5.0, 2H); EIMS *m/z* 527 (M + H⁺); IR (neat)

$\nu_{\max}$ 3272, 2932, 1726, 1644, 1594, 1540, 1505, 1464, 1409, 1370, 1263, 1236, 1127, 1103, 1049, 997, 831, 760, 701 cm^{-1} 。

在冰浴中将甲磺酰氯(0.05 mL, 0.61 mmol)加到在 CH_2Cl_2 (2 mL) 中的 2-[4-苄氧基-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙醇(80 mg, 0.15 mmol)和三乙胺(0.09 mL, 0.61 mmol)的溶液中, 然后将混合物搅拌 1 小时。用 CH_2Cl_2 (50 mL) 稀释反应混合物, 并用 H_2O (10 mL) 和饱和 NaCl 水溶液(20 mL)洗涤, 然后将有机层干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩, 得到褐色油 2-[4-苄氧基-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(0.11 g, quant): ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.24 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.41 (d, 8.0, 1H), 7.85 (d, 8.5, 1H), 7.71 (dd, 3.5, 5.5, 1H), 7.60 (t, 7.0, 1H), 7.48—7.56 (m, 3H), 7.44 (t, 8.0, 2H), 7.37 (t, 7.5, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 5.28 (s, 2H), 4.63 (t, 6.5, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.56 (t, 6.5, 2H), 2.86 (s, 3H); EIMS m/z 509 ($\text{M} - \text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}^+$); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3330, 3099, 2933, 2874, 1725, 1649, 1592, 1537, 1502, 1466, 1411, 1369, 1306, 1238, 1174, 1127, 1076, 1048, 998, 972, 951, 833, 796, 751, 702 cm^{-1} 。

在室温和 N_2 气氛下, 将 LiCl (0.29 g, 6.94 mmol) 加到在无水 DMF (2 mL) 中的 2-[4-苄氧基-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]甲磺酸乙酯(0.11 g, 0.17 mmol)的溶液中, 并搅拌三天。用 AcOEt (100 mL) 稀释反应混合物, 并用 H_2O (20 mL) 和饱和 NaCl 水溶液(10 mL)洗涤, 然后干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩。用硅胶柱(AcOEt :石油醚 = 1:4)纯化残余物, 得到白色固体 2-[4-苄氧基-2-(5,6,7-三甲氧基吲哚-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯(75 mg, 81%): mp 180—184 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.23 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.42 (d, 7.5, 1H), 7.84 (d, 8.5, 1H), 7.53—7.60 (m, 4H), 7.49 (t, 8.0, 1H), 7.44 (t, 7.0, 2H), 7.38 (t, 7.5, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 5.29 (s, 2H), 4.10 (s, 3H),

4.05 (t, 6.0, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.60 (t, 6.0, 2H); EIMS m/z 545 (M^+); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3271, 2932, 1722, 1634, 1592, 1537, 1503, 1464, 1409, 1370, 1306, 1258, 1237, 1111, 1076, 1050, 998, 910, 830, 761, 736, 700 cm^{-1} 。

将在 THF (10 mL) 中的 2-[4-苄氧基-2-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)萘-1-基]乙基氯(70 mg, 0.13 mmol)的溶液加到在冷冻的 THF (10 mL) 中的 10% Pd/C (50 mg) 的悬浮液, 并在 H_2 气氛和室温下将悬浮液氢化过夜。用 C 盐过滤悬浮液, 并减压浓缩滤液。用乙醚结晶残余物, 得到 4-(2-氯乙基)-3-(5,6,7-三甲氧基吡啶-2-酰胺基)-1-萘酚(54 mg, 91%), 为白色固体: mp 212 $^{\circ}\text{C}$ (分解); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.55 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.33 (d, 8.0, 1H), 7.82 (d, 8.5, 1H), 7.78 (brs, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.57 (t, 7.0, 1H), 7.48 (t, 7.5, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 4.13 (s, 3H), 4.06 (t, 6.0, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.61 (t, 6.0, 2H); FAB-MS (NBA) m/z 455 ($M + \text{H}^+$), FABHR (NBA) m/z 454.1290 ($M + \text{H}^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_5$ 要求 454.1296); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3416, 3193, 3149, 2936, 1621, 1592, 1524, 1435, 1411, 1383, 1328, 1267, 1244, 1197, 1126, 1096, 1054, 852, 821, 758, 743 cm^{-1} 。

实施例 12

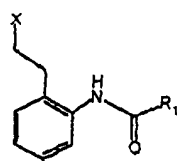
对人慢性髓性白血病细胞的细胞毒性研究

研究了本发明的化合物对培养物中的癌细胞的生长的细胞毒性, 并在表 1 中给出结果。使用 MTT 四唑鎓染料测定确定细胞毒性(42)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 在含有 5% CO_2 的湿气氛中, 将 K562 人慢性髓性白血病细胞保持在补充有 10% 胎牛血清和 2 mM 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中, 并用特定剂量的药物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下并在暗处培养 1 小时或连续培养三天。通过离心(5 分钟, 300 g)终止培养, 并用不含药物的培养

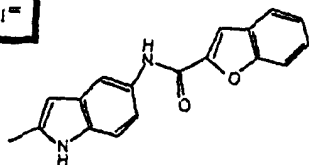
基将细胞洗涤一次。在适宜的药物处理后，将细胞转移入 96 孔微滴板中， 10^4 细胞/孔，8 孔/样品。然后在 37℃ 下，将板保持在暗处和含有 5% CO_2 的湿气氛中。测定基于活细胞将黄色可溶性四唑鎓盐，溴化 3,4,5-二甲基噻唑-2,5-二苯基四唑翁(MTT, Sigma Chemical Co.)还原成不溶性紫色甲臜沉淀的能力。在将板培养四天(以使对照细胞的数目增加 10 倍)后，将 20 μL 在磷酸盐缓冲盐水中的 5 mg/mL MTT 溶液加到各孔中，并将平板再培养 5 小时。然后在 300 g 下将平板离心 5 分钟，并从细胞团中吸出大部分培养基，余下 10–20 μL /孔。将 200 μL DMSO 加到各孔中，并将样品搅拌以确保完全混合。然后在 Titertek Multiscan ELISA 平板读数器上在 550 nm 的波长处读取光密度，并建立剂量反应曲线。对于每一曲线， IC_{50} 值读取为将最终光密度降低至对照值的 50% 所需要的剂量。

表 1. 本发明的化合物对 K562 细胞的体外细胞毒性数据 IC_{50} (μM)

化合物	1 小时接触	连续接触(3 天)
1	12.1 $\pm$ 1.8	1.47 $\pm$ 0.8
2	23.8 $\pm$ 9.7	1.6 $\pm$ 0.9
3	8.76 $\pm$ 3.8	0.37 $\pm$ 0.15
6	>30	未测定
7	>100	3.64 $\pm$ 0.05
8	36.9	1.81
9	14.9 $\pm$ 7.3	2.7 $\pm$ 1.1
10	19.0 $\pm$ 3.8	2.6 $\pm$ 0.9
11	12.6 $\pm$ 3.1	1.5 $\pm$ 0.34
12	13.1 $\pm$ 5.9	1.4 $\pm$ 0.05
13	24.4 $\pm$ 21.1	1.75 $\pm$ 0.35
14	29.1 $\pm$ 14.6	2.03 $\pm$ 0.84
16	>30	1.97 $\pm$ 1.0
22	0.31 $\pm$ 0.22	0.25 $\pm$ 0.096
24		1.30 $\pm$ 0.3
25	0.018	0.045
26	0.017	0.15



通式 I

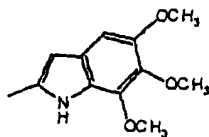


X=Cl, R=H, 1

X=Br, R=H, 2

X=Cl, R=4-硝基苄基-碳酸基, 13

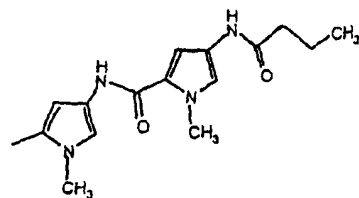
X=Cl, R=N-甲基哌嗪基-N'-氨基甲酰基, 14



X=Cl, R=H, 3

X=Br, R=H, 4

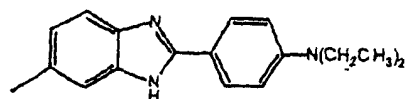
X=I, R=H, 5



X=Cl, R=H, 6

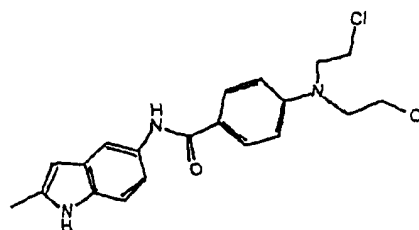
X=Br, R=H, 7

X=Br, R=4-硝基苄基-碳酸基, 15



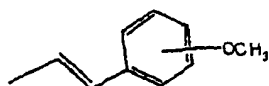
X=Cl

R=H, 8



X=Cl, R=H, 9

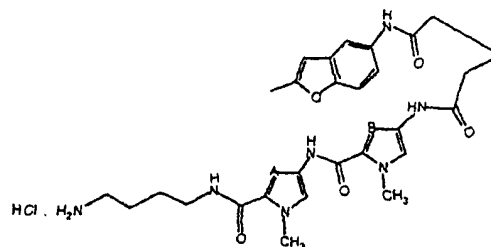
X=Cl, R=4-硝基苄基-碳酸基, 16



X=Cl, R=H, o-OMe, 10

X=Br, R=H, m-OMe, 11

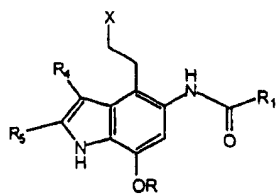
X=I, R=H, p-OMe, 12



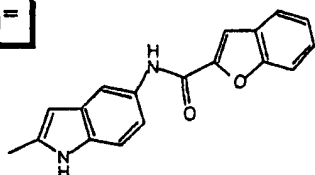
X=Cl, R=H, A=B=CH, 17

X=Cl, R=H, A=CH, B=N, 18

X=I, R=H, A=N, B=CH, 19



通式 III

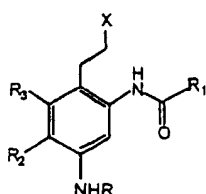
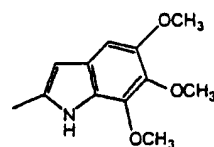


X=Cl, R=H, $R_4=R_5=CO_2CH_3$, 20

X=Cl, R=H, $R_4=CO_2CH_3$, $R_5=CF_3$, 21

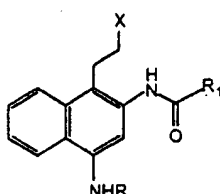
X=Cl, R=H, $R_4=R_5=CO_2CH_3$, 22

X=Cl, R=H, $R_4=CO_2CH_3$, $R_5=CF_3$, 23



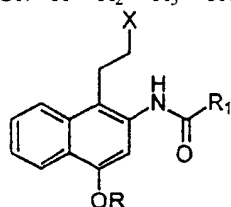
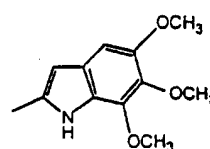
通式 II

X=Cl, R=R₂=R₃=H, 24



通式 IV

X=Cl, R=H, 25



通式 V

X=Cl, R=H, 26

细胞毒性研究的结果表明,本发明的化合物具有显著的抑制培养物中的人白血病细胞的生长的活性。该数据还表明,细胞与所述药物的长期接触导致活性的一些增强。

实施例 13

对人结肠、前列腺和乳癌细胞的细胞毒性研究

人结肠腺癌细胞系, LS 174T 得自欧洲动物细胞培养物保藏所 (European Collection of Animal Cell Cultures), CAMR, Porton Down, UK。在 37℃ 下, 在 5% CO₂, 95% 空气湿润的培养箱中, 在补充有 1% 非必需氨基酸、10% 热失活胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、50 IU/ml 青霉素、50 mg/ml 链霉素的 Eagle's MEM 中常规培养 LS174T 细胞。以 1000 细胞/孔的密度将细胞接种在 96 孔微滴板中。确定最佳的接种密度以确保整个实验期间对照孔中的指数生长, 并在通过磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB) 测定(43)分析时得到在 492 nm 处的吸光

度和细胞数目之间的线性关系。接种 24 小时后，将细胞与药物(浓度范围 0.01—500 μM)一起培养 1 小时或连续培养三天。将细胞洗涤一次，然后在不含药物的培养基中培养六天。在培养结束时，通过 SRB 测定确定细胞生长，通过测定它们的总细胞蛋白含量而对活细胞进行定量。从剂量反应曲线，三次样条内插而计算 IC_{50} (提供 50%体外存活率的药物浓度)，剂量反应曲线通过绘制抑制百分比对 $\log$ 摩尔药物浓度的曲线而获得。对 PC3 (人前列腺癌细胞)和 MCF-7 (人乳癌细胞)的生长进行类似的研究。

表 2. 本发明的化合物的体外细胞毒性数据 IC_{50} (μM)

化合物	1 小时接触			连续接触		
	LS174T MCF-7	PC3	MCF-7	LS174T	PC3	
1	18.0	82.4	>50.0	2.27	3.0	3.43
3	3.6	7.09	20.42	0.39	0.46	0.94
7	236.6			nd		
9	2.9			nd		
10	>10			3.51		
11	>10			7.28		
12	>10			1.43		
13	487.3			nd		
15	224.7			nd		
16	45.4			nd		
22	1.86	0.35	0.97	4.0 nM	0.05	0.13

这些细胞毒性研究的结果进一步证明了本发明的化合物的抗培养物中的癌细胞生长的活性。在接触 1 小时后，非手性 *seco*-前药 1 和 9 表现出与对 K562 细胞类似的对 LS174T 细胞的活性。类似地，对于 K562 和 LS174T 细胞，化合物 7，一种含溴的化合物在接触 1 小时后无活性。这可能归因于固有的更高反应性和因此更低的在水溶液中的稳定性。4-硝基苄基碳酸基衍生物，化合物 13—15 的显著更低的细胞毒性进一步证明具有游离的 C_4 -羟基对于化合物表现出有效活性的必要性。此结果与所报道的证据，即 *seco*-CC1065 和多卡米新

通过形成它们的对应的含环丙烷的药物而与 DNA 反应。在我们的情况下, 4-硝基苄基碳酸基阻止 HCl 的容易的消除以形成活性含环丙烷的药物。

实施例 14

对鼠 L1210 白血病和 P815 肥大细胞瘤细胞的细胞毒性研究

P815 和 L1210 细胞系得自美国典型培养物保藏中心(American Type Tissue Culture Collection, ATCC)。将该细胞系在补充有 10%胎牛血清、Hepes 缓冲液(2 mM, Mediatech Cellgro, 25-060-CI)、L-谷氨酰胺(2 mM, Mediatech Cellgro)和青霉素/链霉素(50000 单位青霉素, 50000 mg 链霉素, Atlanta Biologicals)的 Delbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Atlanta Biologicals)中生长。将细胞保持在 37°C 和 5%湿润 CO₂ 气氛下。用血细胞计数器对培养的细胞计数, 并将其以 8×10^5 细胞/mL 的浓度再悬浮在新鲜 DMEM 中。将细胞悬浮液(100 μ L)加到 96 孔平底细胞培养板中。在此浓度下, 将 80000 个细胞接种在各孔中。将药物溶液(溶于 DMSO 并在 DMEM 中稀释)加到各孔中(5 μ L/孔), 得到 1×10^{-4} — 1×10^{-12} M 的浓度范围。为每种药物浓度的孔一式四份。将板在 37°C 下, 在 5% CO₂ 气氛中培养 72 小时。将 MTT (溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓)溶于 PBS 中(5 mg/ml)。在指定的细胞培养期后, 将 10 μ L 此储备 MTT 溶液加到各孔中, 并进一步在 37°C 下, 在 5% CO₂ 气氛中培养 4 小时。在此最后培养之后, 将 100 μ L 酸异丙醇溶液(16 μ L 12.1 N HCl, 在 5 mL 异丙醇中)加到各孔中。通过将细胞悬浮液吸上和吸下而将孔内容物完全混合, 并将板在室温下静置 15 分钟以充分产生紫色。在 Dynatech 平板读数器上, 使用 Dynex Revelation 3.2 软件, 和测试波长 570 nm 与参比波长 630 nm 处对该板读数。由根据吸光度数据的平均值(4 点/浓度)产生的曲线外推出 50%抑制生长的剂量(IC₅₀)。

表 A3. 非手性试剂的 IC₅₀ 值(μM)

化合物	P815	L1210
1	43	23
3	5.6	1.5
17	61	64
18	>100	>100
19	>100	>100
22	5.4	4.2
25	0.068	0.18
26		0.055

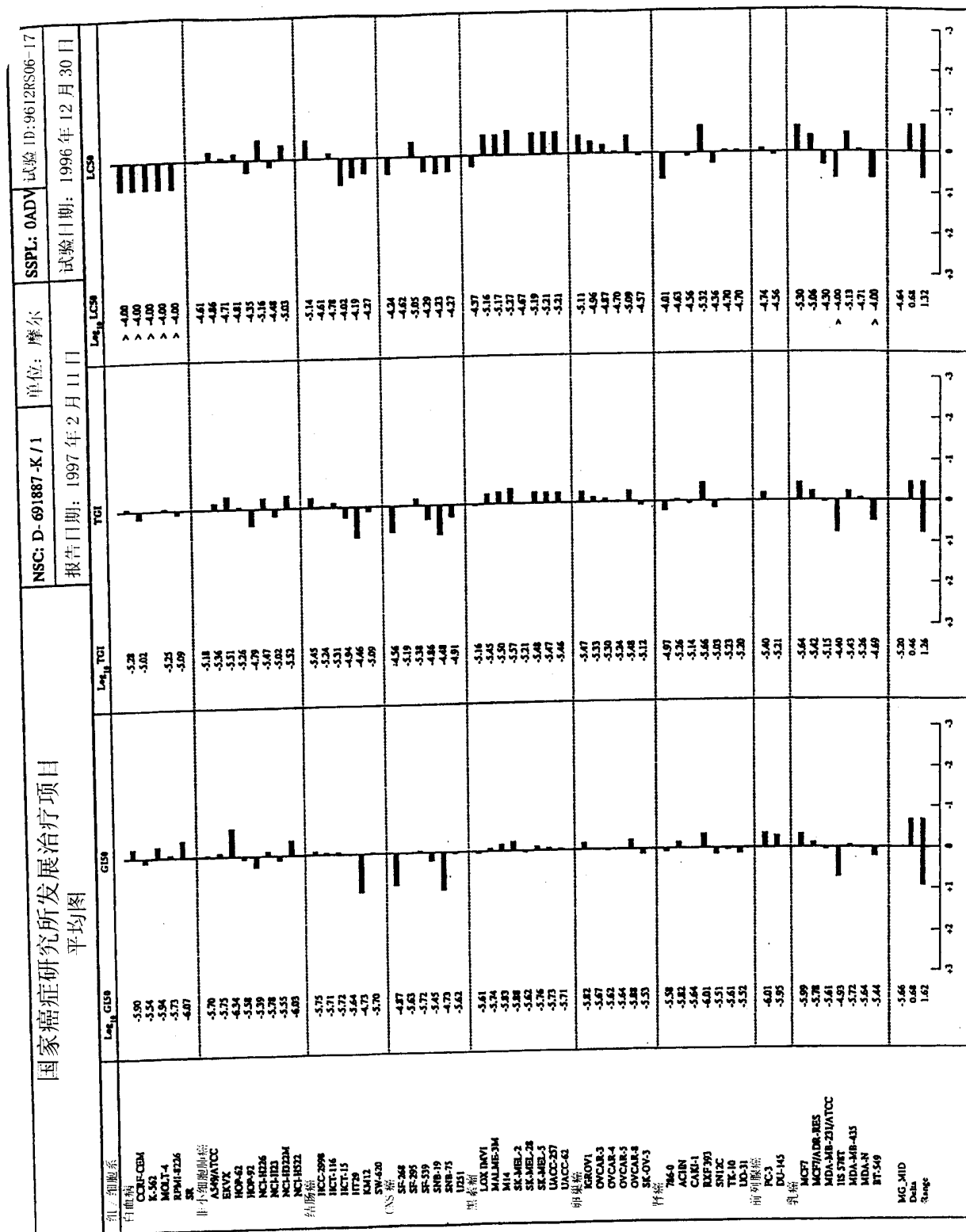
实施例 15

NCI 体外细胞毒性筛选

还在国家癌症研究所(National Cancer Institute), Bethesda, MD 测试了本发明的化合物对 60 种人癌细胞系小组的活性(44)。使用 48 小时接触并测定磺酰罗丹明 B 产生的颜色的光密度来进行细胞毒性研究。由剂量反应曲线得到 GI₅₀ (50%抑制生长所需的药物浓度)、TGI (总生长抑制)和 IC₅₀ (杀死 50%细胞所需的浓度)。将化合物 1、3、7、9、22、25 和 26 提交到 NCI, 以下示出化合物 1、3、22、25 和 26 的结果。

国家癌症研究所发展治疗项目																
体外试验结果																
NSC: D-691887-K/1					试验 ID: 9612RS06-17					试验类型: 08			单位: 摩尔			
报告日期: 1997年2月11日					试验日期: 1996年12月30日					QNS:			MC:			
COMI: SK-II-149					染色试剂: Dual Pass					SSPL: OADV						
组/细胞系	时间 点	对照	Log10 浓度					生长百分比					GI50	TGI	LC50	
			-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0				
白血细胞系																
CCRF-CEM	0.308	1.031	1.013	1.048	0.728	0.240	0.266	98	102	58	-22	-13	1.26E-06	5.28E-06	>1.00E-04	
K-562	0.370	1.799	1.749	1.748	1.714	0.364	0.352	96	96	94	-2	-5	2.88E-06	9.59E-06	>1.00E-04	
MOLT-4	0.313	1.586	1.515	1.433	0.984	0.284	0.363	94	88	54	-9	4	1.14E-06		>1.00E-04	
RPMI-8226	1.054	2.299	2.449	2.266	2.030	0.775	0.622	112	97	78	-26	-41	1.86E-06	5.59E-06	>1.00E-04	
SR	0.315	1.317	1.318	1.298	0.780	0.301	0.294	100	98	46	-5	-7	8.52E-07	8.12E-06	>1.00E-04	
非小细胞肺癌																
A549/ATCC	0.227	1.186	1.151	1.177	0.978	0.188	-0.004	96	99	78	-17	-100	1.98E-06	6.58E-06	2.48E-05	
ERVK	0.343	0.810	0.785	0.790	0.725	0.188	0.069	95	96	82	-45	-80	1.78E-06	4.41E-06	1.37E-05	
HOP-62	0.412	1.102	1.008	1.034	0.612	0.287	0.008	86	90	29	-30	-98	4.53E-07	3.07E-06	1.95E-05	
HOP-82	0.512	0.698	0.686	0.738	0.725	0.309	0.039	94	121	115	-40	-92	2.62E-06	5.53E-06	1.56E-05	
NCI-H226	0.802	3.148	3.157	3.041	2.937	1.365	0.079	100	95	91	24	-90	4.09E-06	1.62E-05	4.44E-05	
NCI-H23	0.578	1.530	1.704	1.672	1.402	0.133	0.224	118	115	85	-77	-61	1.67E-06	1.38E-06	6.84E-06	
NCI-H322M	0.572	1.467	1.492	1.477	1.400	0.563	0.029	103	101	93	-2	-95	2.83E-06	9.60E-06	3.30E-05	
NCI-H522	0.358	0.771	0.761	0.766	0.558	0.168	0.072	98	99	48	-53	-80	9.33E-07	3.00E-06	9.33E-06	
结肠癌																
KCC-2998	0.303	1.137	1.106	1.109	1.053	0.082	0.010	96	97	90	-73	-97	1.76E-06	3.56E-06	7.22E-06	
KCT-116	0.282	2.199	2.171	2.103	1.827	0.209	0.032	99	95	81	-26	-89	1.94E-06	5.73E-06	2.43E-05	
HCT-15	0.265	1.398	1.252	1.615	1.223	0.164	0.023	87	119	85	-38	-91	1.91E-06	4.89E-06	1.67E-05	
HT29	0.185	1.246	1.202	1.159	0.995	0.219	0.091	96	92	76	3	-51	2.29E-06	1.15E-05	9.66E-05	
HM12	0.205	1.222	1.152	1.103	1.042	1.230	0.032	93	88	82	101	-85	1.88E-05	3.50E-05	6.50E-05	
SN-620	0.225	1.240	1.199	1.151	0.985	0.209	0.077	96	91	75	-7	-66	2.01E-06	8.19E-06	5.35E-05	
CNS 癌																
SF-268	0.454	1.240	1.144	1.143	0.987	1.008	0.053	88	88	68	70	-88	1.34E-05	2.78E-05	5.73E-05	
SF-295	0.468	1.745	1.640	1.673	1.631	0.388	0.020	92	94	91	-21	-96	2.32E-06	6.46E-06	2.42E-05	
SF-539	0.168	0.698	0.657	0.805	0.659	0.073	-0.003	92	120	82	-57	-100	1.92E-06	4.16E-06	9.00E-06	
SNB-19	0.288	0.943	0.970	0.981	0.914	0.369	0.072	104	106	96	12	-75	3.53E-06	1.38E-05	5.16E-05	
SNB-75	0.477	0.611	0.551	0.602	0.564	0.616	0.021	56	93	65	104	-96	1.86E-05	3.32E-05	5.90E-05	
U251	0.265	1.262	1.279	1.277	1.029	0.335	0.077	102	101	77	7	-71	2.41E-06	1.23E-05	5.39E-05	
黑色素瘤																
LOX IMVI	0.246	1.413	1.483	1.428	1.324	0.203	0.075	106	101	92	-17	-70	2.43E-06	6.93E-06	4.22E-05	
MALME-3M	0.540	0.887	0.892	0.893	0.875	0.116	0.027	102	102	97	-79	-95	1.84E-06	3.56E-06	6.87E-06	
M14	0.233	0.878	0.831	0.819	0.726	0.058	0.003	93	91	76	-75	-99	1.49E-06	3.19E-06	6.81E-06	
SK-MEL-2	0.508	0.937	0.852	0.942	0.806	0.035	0.017	80	101	69	-93	-97	1.32E-06	2.67E-06	5.43E-06	
SK-MEL-28	0.481	1.411	1.437	1.448	1.362	0.354	0.010	103	104	97	-27	-98	2.40E-06	6.10E-06	2.14E-05	
SK-MEL-5	0.274	0.823	0.851	0.844	0.777	0.045	0.008	105	104	92	-83	-97	1.73E-06	3.34E-06	6.44E-06	
UACC-257	0.481	1.149	1.161	1.177	1.168	0.046	0.016	102	104	103	-90	-97	1.88E-06	3.40E-06	6.18E-06	
UACC-62	0.503	1.384	1.386	1.419	1.465	0.040	0.007	100	104	109	-92	-99	1.97E-06	3.49E-06	6.18E-06	
卵巢癌																
IGROV1	0.332	1.178	1.121	1.164	0.963	0.115	0.019	93	98	75	-65	-94	1.50E-06	3.41E-06	7.77E-06	
OVCAR-3	0.703	1.729	1.666	1.751	1.711	0.366	0.010	94	102	98	-48	-99	2.13E-06	4.69E-06	1.09E-05	
OVCAR-4	0.399	0.705	0.789	0.752	0.729	0.219	0.072	128	115	108	-45	-82	2.39E-06	5.06E-06	1.35E-05	
OVCAR-5	0.412	0.850	0.823	0.828	0.825	0.292	0.006	94	95	94	-29	-99	2.28E-06	5.80E-06	2.00E-05	
OVCAR-8	0.488	1.785	1.713	1.709	1.336	0.188	0.179	94	94	65	-61	-63	1.32E-06	3.28E-06	8.12E-06	
SK-OV-3	0.746	1.478	1.414	1.491	1.521	0.642	0.010	91	102	106	-14	-99	2.93E-06	7.66E-06	2.67E-05	
肾癌																
786-0	0.266	1.399	1.382	1.410	1.227	0.283	0.132	98	101	85	2	-50	2.62E-06	1.07E-05	9.83E-05	
ACHN	0.282	0.884	0.853	0.920	0.603	0.218	0.010	95	106	67	-23	-96	1.53E-06	5.55E-06	2.34E-05	
CAKI-1	0.380	1.087	1.052	0.959	0.993	0.325	0.020	95	82	87	-14	-95	2.30E-06	7.19E-06	2.77E-05	
RMT 393	0.552	1.005	1.022	0.888	0.778	0.015	0.034	104	74	50	-97	-94	9.82E-07	2.18E-06	4.77E-06	
SN12C	0.437	1.410	1.419	1.429	1.419	0.425	0.102	101	102	101	-3	-77	3.10E-06	9.41E-06	4.35E-05	
TK-10	0.697	1.617	1.650	1.603	1.628	0.483	0.032	104	98	101	-31	-95	2.45E-06	5.82E-06	1.99E-05	
UD-31	0.761	1.472	1.510	1.488	1.636	0.534	0.026	105	102	123	-30	-97	3.00E-06	6.38E-06	2.00E-05	
前列腺癌																
PC-3	0.424	1.359	1.326	1.339	0.885	0.285	0.004	96	98	49	-33	-99	9.69E-07	3.99E-06	1.82E-05	
DU-145	0.330	0.854	0.859	0.873	0.610	0.283	0.013	101	104	53	-14	-96	1.12E-06	6.16E-06	2.74E-05	
乳腺癌																
MCF7	0.137	0.624	0.677	0.693	0.389	0.008	-0.002	111	114	52	-94	-100	1.03E-06	2.27E-06	5.00E-06	
MCF7/ADR-RES	0.646	1.698	1.622	1.662	1.488	0.269	0.288	93	97	80	-58	-55	1.45E-06	3.79E-06	8.70E-06	
MDA-MB-231/ATCC	0.353	0.912	0.875	0.894	0.864	0.297	0.124	94	97	92	-16	-65	2.43E-06	7.10E-06	4.96E-05	
HS 578T	0.290	0.714	0.617	0.682	0.669	0.311	0.179	77	92	89	57	-38	1.18E-05	3.96E-05	>1.00E-04	
MDA-MB-435	0.313	1.378	1.454	1.407	1.338	0.090	0.019	107	103	96	-71	-94	1.89E-06	3.75E-06	7.45E-06	
MDA-N	0.198	1.178	1.175	1.203	1.151	0.130	0.026	100	103	97	-35	-87	2.28E-06	5.47E-06	1.97E-05	
BT-549	0.573	1.413	1.495	1.439	1.422	0.650	0.457	110	103	101	9	-20	3.60E-06	2.05E-05	>1.00E-04	

表 5. 化合物 1 对 60 种癌细胞系的 GI₅₀、TGI 和 LC₅₀ 值

表 6. 化合物 1 对 60 种癌细胞系的 GI_{50} 、 TGI 和 LC_{50} 值的图示

国家癌症研究所发展治疗项目 体外试验结果														
NSC: D-698038-U/1			试验 ID: 9709RS89-18			试验类型: 08			单位: 摩尔					
报告日期: 1997 年 11 月 3 日			试验日期: 1997 年 9 月 8 日			QNS:			MC:					
COMI: SC-III-147			染色试剂: SRB Dual-P			SSPL: OADV								
组 / 细胞系	时间 零点	对照	-8.0	平均光密度 -7.0 -6.0	Log10 浓度 -5.0 -4.0	生长百分比 -8.0 -7.0 -6.0 -5.0 -4.0					GI50	TGI	LC50	
白血病														
CCRF-CRM	0.184	0.579	0.573	0.431	0.281	0.322	0.271	98	62	25	35	22	2.13E-07	>1.00E-04
HL-60 (TB)	0.548	2.582	2.457	2.480	1.273	0.528	0.398	94	93	36	-4	-27	5.73E-07	8.08E-06
K-562	0.163	1.643	1.758	0.955	0.249	0.210	0.150	108	54	6	3	-8	1.19E-07	1.93E-05
MOLT-4	0.155	0.893	0.743	0.662	0.387	0.369	0.365	80	69	31	29	28	3.17E-07	>1.00E-04
RPMT-8226	0.484	1.991	1.883	1.822	0.689	0.509	0.391	93	89	14	2	-19	3.28E-07	1.20E-05
SR	0.236	1.178	0.981	0.890	0.302	0.454	0.381	79	69	7	23	15	2.05E-07	>1.00E-04
非小细胞肺癌														
A549/ATCC	0.147	0.948	0.950	0.928	0.100	0.259	0.202	100	98	-32	14	7	2.32E-07	>1.00E-04
EKVX	0.449	1.218	1.250	1.384	1.163	0.400	0.103	104	123	93	-11	-77	2.59E-06	7.87E-06
HOP-62	0.569	1.572	1.567	1.554	0.620	0.583	0.227	100	98	5	1	-40	3.30E-07	1.05E-05
HOP-92	0.320	0.623	0.659	0.664	0.339	0.319	0.177	125	113	6	0	-45	3.90E-07	8.96E-06
HCT-H226	0.762	1.669	1.590	1.730	1.686	0.269	0.652	91	107	102	-65	-14	2.05E-06	4.09E-06
HCT-H23	0.503	1.847	1.714	1.729	0.992	0.375	0.388	90	91	36	-26	-23	5.64E-07	3.87E-06
HCT-H322M	0.474	1.521	1.594	1.560	1.408	0.493	0.423	107	104	89	2	-11	2.81E-06	1.38E-05
HCT-H460	0.195	1.568	1.592	1.500	0.487	0.251	0.114	102	95	21	4	-42	4.08E-07	1.23E-05
HCT-H522	0.417	0.651	0.491	0.432	0.175	0.208	0.111	32	6	-58	-50	-73	<1.00E-08	1.26E-07
结肠癌														
COLO 205	0.159	1.082	1.008	1.070	0.352	0.021	0.010	92	99	21	-87	-94	4.23E-07	1.56E-06
HCC-2998	0.177	0.772	0.752	0.690	0.150	0.080	0.005	97	86	-15	-55	-87	2.28E-07	7.11E-07
HCT-116	0.290	2.239	2.303	2.033	0.924	0.478	0.142	103	89	33	10	-51	4.93E-07	1.44E-05
HCT-15	0.137	1.367	1.222	1.332	0.544	0.270	0.182	88	97	33	11	4	5.45E-07	>1.00E-04
HT29	0.092	0.805	0.763	0.730	0.216	0.168	0.099	94	90	17	11	1	3.53E-07	>1.00E-04
HML2	0.155	0.899	0.939	0.855	0.108	0.211	0.025	105	94	-31	8	-84	2.26E-07	4.24E-05
SW-620	0.121	0.891	0.762	0.728	0.059	0.140	0.038	83	79	-51	2	-69	1.66E-07	.
CNS 癌														
SF-248	0.567	1.427	1.398	1.373	0.674	0.652	0.426	97	94	12	10	-25	3.45E-07	1.92E-05
SF-295	0.413	1.467	1.467	1.385	0.263	0.301	0.203	100	92	-36	-27	-51	2.13E-07	5.21E-07
SF-539	0.197	0.898	0.796	0.851	0.084	0.058	0.018	85	93	-58	-71	-91	1.94E-07	4.15E-07
SNB-19	0.380	1.186	1.147	1.242	0.571	0.517	0.024	95	107	24	17	-94	4.83E-07	1.42E-05
SNB-75	0.392	0.900	0.915	0.904	0.606	0.203	0.028	103	101	42	-48	-93	7.36E-07	2.93E-06
U251	0.098	0.637	0.608	0.508	0.044	0.126	0.001	91	73	-55	5	-99	1.52E-07	.
黑色素瘤														
LOX IMVI	0.051	0.853	0.836	0.723	0.128	0.138	0.068	98	84	10	11	2	2.86E-07	>1.00E-04
MALME-3M	0.955	1.247	0.922	1.102	0.416	0.158	0.116	-3	51	-56	-84	-88	.	8.70E-07
M14	0.236	1.349	1.310	1.578	0.613	0.034	0.020	97	121	34	-86	-92	6.51E-07	1.92E-06
SK-MEL-2	0.466	1.199	1.226	1.153	0.714	0.098	0.063	104	94	34	-79	-87	5.36E-07	1.99E-06
SK-MEL-28	0.281	1.010	0.946	1.018	0.682	0.045	0.019	91	101	55	-84	-93	1.09E-06	2.49E-06
SK-MEL-5	0.016	0.909	0.869	0.692	0.038	0.044	0.004	96	76	2	3	-75	2.23E-07	1.10E-05
UACC-257	0.363	1.300	1.311	1.333	0.561	0.057	0.034	101	103	21	-84	-91	4.46E-07	1.59E-06
UACC-62	0.284	1.210	1.196	1.215	0.564	0.053	0.032	99	101	30	-82	-89	5.25E-07	1.87E-06
卵巢癌														
IGROV1	0.216	0.634	0.578	0.496	0.077	0.167	0.099	87	67	-65	-23	-94	1.35E-07	3.23E-07
OVCAR-3	0.603	0.858	0.891	0.771	0.116	0.210	0.034	113	66	-81	-65	-94	1.29E-07	2.82E-07
OVCAR-4	0.374	0.960	1.017	0.964	0.650	0.329	0.106	110	101	47	-12	-72	8.80E-07	6.25E-06
OVCAR-5	0.267	0.784	0.804	0.864	0.415	0.350	0.111	104	115	29	16	-59	5.66E-07	1.64E-05
OVCAR-8	0.188	1.050	0.966	0.940	0.481	0.238	0.095	90	87	34	6	-49	5.00E-07	1.27E-05
SK-OV-3	0.713	1.374	1.414	1.388	0.673	0.754	0.052	106	102	-6	6	-93	3.05E-07	3.70E-05
肾癌														
786-0	0.186	1.032	0.973	0.958	0.096	0.243	0.062	93	91	-49	7	-67	1.97E-07	5.94E-05
A498	0.783	1.383	1.457	1.469	1.460	0.381	0.166	112	114	112	-50	-78	2.42E-06	4.91E-06
ACHN	0.261	1.232	1.198	1.130	0.074	0.307	0.195	87	90	-72	5	-25	1.76E-07	.
CARK-1	0.464	1.439	1.529	1.553	0.978	0.396	0.094	109	112	53	-15	-80	1.10E-06	6.06E-06
RKF 393	0.608	1.166	1.202	1.203	0.271	0.121	0.008	106	107	-55	-80	-99	2.24E-07	4.55E-07
SN12C	0.329	1.230	1.147	1.207	0.908	0.420	0.124	91	97	64	10	-62	1.83E-06	1.38E-05
TK-10	0.429	1.123	1.220	1.278	0.974	0.285	0.096	114	122	79	-34	-78	1.80E-06	5.01E-06
UO-31	0.389	1.306	1.255	1.360	0.167	0.442	0.367	95	106	-57	6	-6	2.21E-07	.
前列腺癌														
PC-3	0.251	1.146	1.067	0.978	0.447	0.303	0.072	91	81	22	6	-71	3.35E-07	1.19E-05
DU-145	0.252	0.551	0.533	0.393	0.148	0.140	0.010	94	47	-41	-45	-96	8.63E-08	3.42E-07
乳腺癌														
MCF7	0.079	0.611	0.530	0.358	0.095	0.090	0.021	85	52	3	2	-73	1.12E-07	1.06E-05
MDA-MB-RES	0.597	1.009	0.933	0.961	0.722	0.189	0.191	82	88	30	-68	-68	4.58E-07	2.03E-06
MDA-MB-231/ATCC	0.375	0.863	0.829	0.860	0.527	0.417	0.256	93	99	31	9	-32	5.30E-07	1.63E-05
HS 578T	0.746	1.459	1.528	1.507	1.362	0.741	0.637	110	107	86	-1	-15	2.61E-06	9.81E-06
MDA-MB-435	0.142	0.926	1.043	0.891	0.063	0.086	0.002	115	96	-56	-39	-99	2.00E-07	4.27E-07
MDA-N	0.211	1.360	1.253	1.363	0.236	0.072	0.047	91	100	2	-66	-77	3.25E-07	1.08E-06
BT-549	0.613	1.744	1.683	1.714	1.425	0.787	0.315	95	97	72	15	-49	2.43E-06	1.74E-05

表 7. 化合物 3 对 60 种癌细胞系的 GI₅₀、TGI 和 LC₅₀ 值

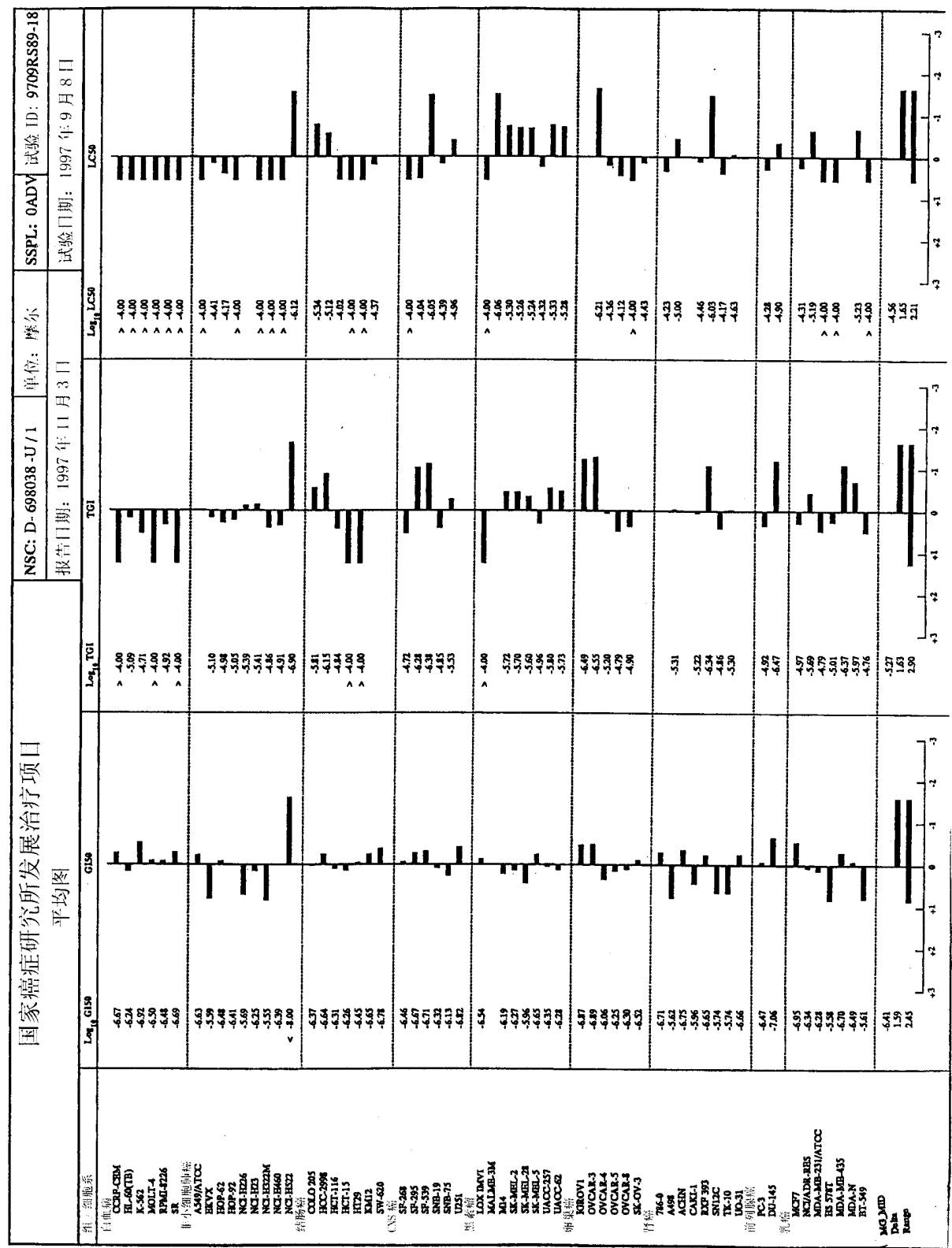


表 8. 化合物 3 对 60 种癌细胞系的 GI₅₀、TGI 和 LC₅₀ 值的图示

国家癌症研究所发展治疗项目																			
体外试验结果																			
NSC: D-702842-R/1					试验 ID: 9805RC37-29					试验类型: 08					单位: 摩尔				
报告日期: 1998 年 6 月 17 日					试验日期: 1998 年 5 月 18 日					QNS:					MC:				
COMI: KD-II-93					染色试剂: SRB Dual-P					SSPL: OADV									
组 / 细胞系	时间	对照	-8.3	-7.3	-6.3	-5.3	-4.3	-8.3	-7.3	-6.3	-5.3	-4.3	GI50	TGI	LC50				
白血病	零点																		
CCRF-CEM	0.172	1.590	1.269	0.786	0.447	0.425	0.408	77	43	19	18	17	3.18E-08	>5.00E-05	>5.00E-05				
HL-60 (TB)	0.274	0.937	0.838	0.629	0.341	0.335	0.297	85	54	10	9	3	6.04E-08	>5.00E-05	>5.00E-05				
K-562	0.037	0.816	0.767	0.635	0.374	0.302	0.320	94	77	43	34	36	3.15E-07	>5.00E-05	>5.00E-05				
MOLT-4	0.107	1.531	0.969	0.503	0.408	0.396	0.424	61	28	21	20	22	1.05E-08	>5.00E-05	>5.00E-05				
RPMI-8226	0.254	2.010	1.892	1.790	0.656	0.525	0.482	93	87	23	15	13	1.90E-07	>5.00E-05	>5.00E-05				
SR	0.099	1.140	0.631	0.393	0.315	0.376	0.311	51	28	21	27	20	5.60E-09	>5.00E-05	>5.00E-05				
非小细胞肺癌																			
A549/ATCC	0.097	0.796	0.855	0.745	0.091	0.180	0.130	108	93	-6	12	5	1.35E-07		>5.00E-05				
ERVK	0.385	0.790	0.797	0.800	0.388	0.248	0.265	102	102	1	-62	-83	1.64E-07	5.14E-07	3.25E-06				
HOP-62	0.321	0.800	0.764	0.703	0.212	0.197	0.239	92	80	-34	-39	-88	9.14E-08	2.51E-07	8.51E-06				
HOP-92	0.386	0.916	0.922	0.902	0.449	0.368	0.240	101	97	12	-5	-38	1.79E-07	2.57E-06	>5.00E-05				
NCI-H226	0.687	0.849	0.856	0.798	0.428	0.309	0.167	104	69	-38	-55	-76	7.48E-08	2.21E-07	2.55E-06				
NCI-H23	0.425	1.458	1.280	1.006	0.516	0.439	0.320	83	56	9	1	-25	6.75E-08	5.63E-06	>5.00E-05				
NCI-H322M	0.662	1.470	1.410	1.434	0.793	0.611	0.520	93	96	16	-8	-22	1.87E-07	2.38E-06	>5.00E-05				
NCI-H460	0.261	1.557	1.347	1.213	0.369	0.310	0.081	84	73	8	4	-69	1.14E-07	5.64E-06	2.74E-05				
NCI-H522	0.412	0.668	0.600	0.560	0.141	0.058	0.015	74	58	-66	-86	-96	5.77E-08	1.47E-07	3.73E-07				
结肠癌																			
COLO 205	0.103	0.841	0.801	0.753	0.332	0.276	0.250	95	88	31	23	20	2.33E-07	>5.00E-05	>5.00E-05				
HCC-2998	0.356	0.933	0.880	0.844	0.262	0.245	0.044	81	85	-27	-31	-88	1.02E-07	2.89E-07	1.08E-05				
HCT-116	0.308	1.358	1.237	0.964	0.175	0.281	0.127	88	62	-43	-9	-59	6.56E-08	1.95E-07	3.32E-05				
HCT-15	0.110	1.399	1.323	1.275	0.686	0.299	0.208	93	89	35	-4	-33	2.59E-07	4.00E-06	>5.00E-05				
HT29	0.162	0.641	0.565	0.463	0.110	0.067	0.073	84	63	-32	-59	-55	6.81E-08	2.28E-07	2.34E-06				
KM12	0.343	1.017	0.969	0.903	0.161	0.132	0.072	93	83	-53	-62	-79	8.74E-08	2.03E-07	4.74E-07				
SW-620	0.156	0.984	0.871	0.745	0.231	0.285	0.139	86	71	9	16	-11	1.09E-07	1.90E-05	>5.00E-05				
CNS 癌																			
SF-268	0.619	1.255	1.126	0.697	0.358	0.227	0.258	80	12	-42	-63	-58	1.38E-08	8.40E-08	1.17E-06				
SF-295	0.190	1.172	1.234	0.918	0.331	0.301	0.201	106	74	14	11	1	1.26E-07	>5.00E-05	>5.00E-05				
SF-539	0.144	0.489	0.451	0.403	0.077	0.024	0.014	89	75	-47	-84	-90	8.04E-08	2.07E-07	6.08E-07				
SNB-19	0.550	1.658	1.533	1.475	0.788	0.629	0.513	89	83	21	7	-7	1.73E-07	1.64E-05	>5.00E-05				
SNB-75	0.559	0.787	0.735	0.697	0.314	0.088	0.275	77	60	-44	-84	-51	6.28E-08	1.90E-07	7.11E-07				
U251	0.162	1.119	1.011	0.867	0.271	0.275	0.097	89	74	11	12	-40	1.20E-07	8.44E-06	>5.00E-05				
黑色素瘤																			
LOX IMVI	0.316	1.155	0.995	0.869	0.289	0.242	0.124	81	66	-9	-23	-61	8.17E-08	3.84E-07	2.56E-05				
M14	0.162	0.529	0.547	0.445	0.050	0.017	0.013	105	77	-69	-90	-92	7.64E-08	1.68E-07	3.68E-07				
SK-MEL-2	0.493	1.019	0.963	0.951	0.109	0.129	0.066	89	87	-78	-74	-87	8.39E-08	1.69E-07	3.39E-07				
SK-MEL-28	0.160	0.605	0.567	0.568	0.223	0.143	0.091	91	92	14	-11	-43	1.72E-07	1.82E-06	>5.00E-05				
SK-MEL-5	0.217	0.779	0.700	0.451	0.213	0.265	0.177	86	42	-2	9	-19	3.23E-08		>5.00E-05				
UACC-257	0.191	0.860	0.865	0.855	0.235	0.317	0.172	101	99	6	19	-10	1.70E-07	2.25E-05	>5.00E-05				
UACC-62	0.505	1.566	1.455	1.311	0.213	0.110	0.056	90	76	-58	-78	-89	7.82E-08	1.85E-07	4.36E-07				
卵巢癌																			
IGROV1	0.280	0.884	0.709	0.650	0.115	0.182	0.056	71	61	-59	-35	-80	6.21E-08	1.62E-07					
OVCAR-3	0.194	0.817	0.800	0.734	0.220	0.273	0.035	97	87	4	13	-82	1.39E-07	6.80E-06	2.30E-05				
OVCAR-8	0.228	0.780	0.702	0.585	0.155	0.080	0.082	86	65	-32	-65	-64	7.09E-08	2.33E-07	1.76E-06				
SK-OV-3	0.183	0.890	0.912	0.817	0.434	0.307	0.085	103	90	35	17	-54	2.69E-07	8.81E-06	4.46E-05				
肾癌																			
786-O	0.246	0.823	0.789	0.722	0.245	0.182	0.124	94	82	-1	-26	-50	1.23E-07	4.92E-07	>5.00E-05				
A498	0.334	1.628	1.569	1.607	0.395	0.348	0.061	95	98	5	1	-82	1.64E-07	5.15E-06	2.07E-05				
ACHN	0.202	1.015	0.959	0.590	0.204	0.229	0.122	93	48	0	3	-40	4.46E-08	5.95E-06	>5.00E-05				
CAKI-1	0.115	0.543	0.529	0.472	0.168	0.159	0.069	97	83	12	10	-40	1.47E-07	8.01E-06	>5.00E-05				
RXF 393	0.102	0.472	0.449	0.313	0.167	0.077	0.036	94	57	18	-25	-65	7.47E-08	1.31E-06	2.15E-05				
SN12C	0.205	0.809	0.750	0.714	0.340	0.261	0.103	90	84	22	9	-50	1.79E-07	7.17E-06	>5.00E-05				
TK-10	0.263	1.847	1.845	1.879	0.759	0.607	0.394	100	102	31	22	8	2.72E-07	>5.00E-05	>5.00E-05				
UO-31	0.231	1.008	0.981	0.935	0.123	0.274	0.290	96	91	-47	5	8	9.88E-08		>5.00E-05				
前列腺癌																			
PC-3	0.328	0.822	0.730	0.598	0.347	0.223	0.039	81	55	4	-32	-88	6.17E-08	6.40E-07	1.05E-05				
乳腺癌																			
MCF7	0.117	0.879	0.654	0.415	0.160	0.161	0.057	70	39	6	6	-51	2.24E-08	6.31E-06	4.75E-05				
NCI/ADR-RES	0.456	0.951	0.934	0.836	0.534	0.193	0.269	97	77	16	-58	-41	1.37E-07	8.17E-07					
MDA-MB-231/ATCC	0.261	0.827	0.822	0.767	0.351	0.328	0.319	99	89	16	12	10	1.71E-07	>5.00E-05	>5.00E-05				
HS 578T	0.706	0.917	0.982	0.964	0.416	0.189	0.328	130	122	-41	-73	-54	1.38E-07	2.80E-07	9.46E-07				
MDA-MB-435	0.243	1.328	1.288	1.300	0.216	0.176	0.166	96	97	-11	-28	-32	1.37E-07	3.95E-07	>5.00E-05				
MDA-N	0.188	0.971	0.893	0.897	0.230	0.183	0.250	90	91	5	-3	8	1.50E-07		>5.00E-05				
BT-549	0.355	1.309	1.225	1.170	0.757	0.591	0.218	91	85	42	25	-39	3.29E-07	1.23E-05	>5.00E-05				
T-47D	0.116	0.437	0.436	0.354	0.209	0.221	0.160	100	74	29	33	14	1.71E-07	>5.00E-05	>5.00E-05				

表 9. 化合物 22 对 60 种癌细胞系的 GI₅₀、TGI 和 LC₅₀ 值

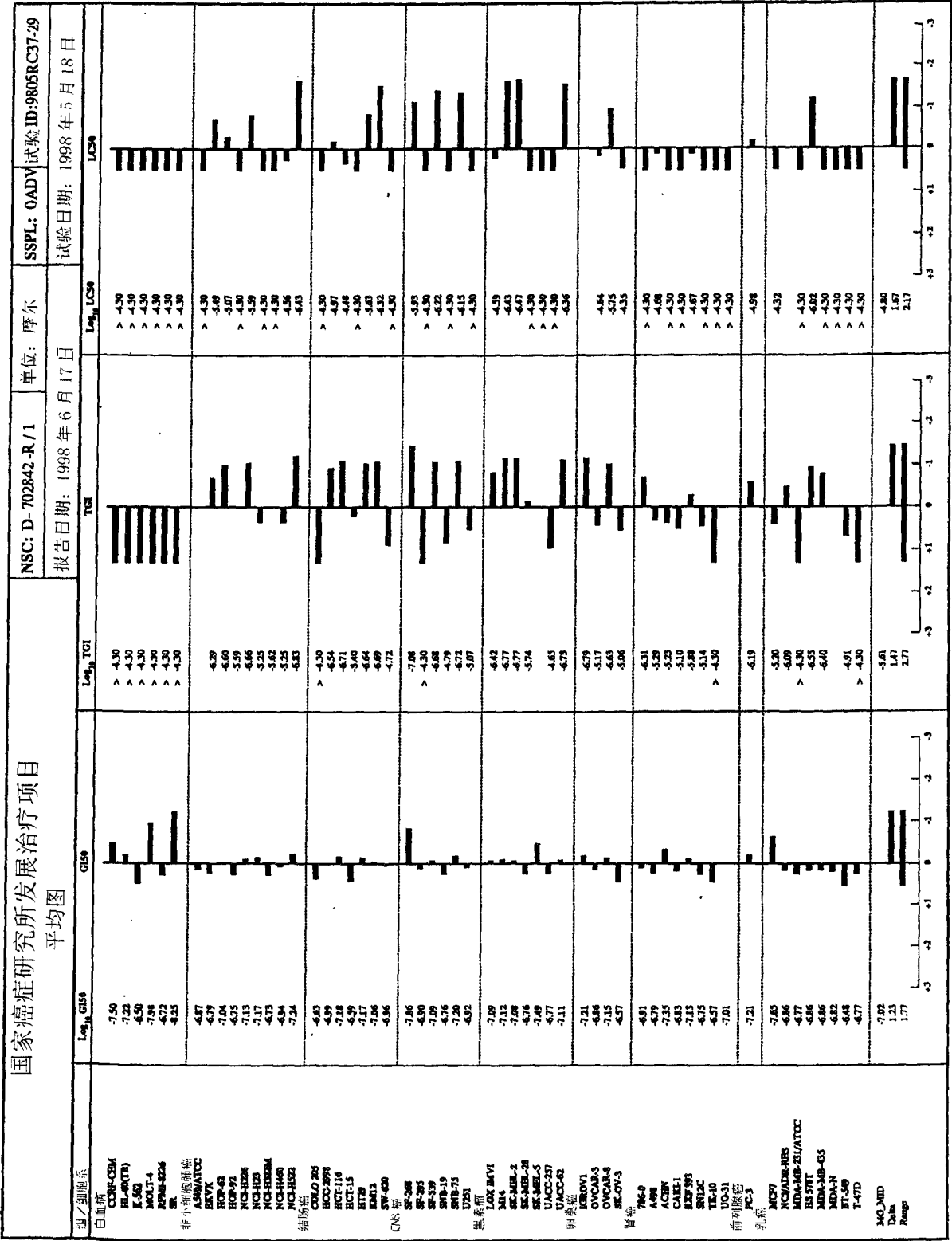


表 10. 化合物 22 对 60 种癌细胞系的 GI₅₀、TGI 和 LC₅₀ 值的图示

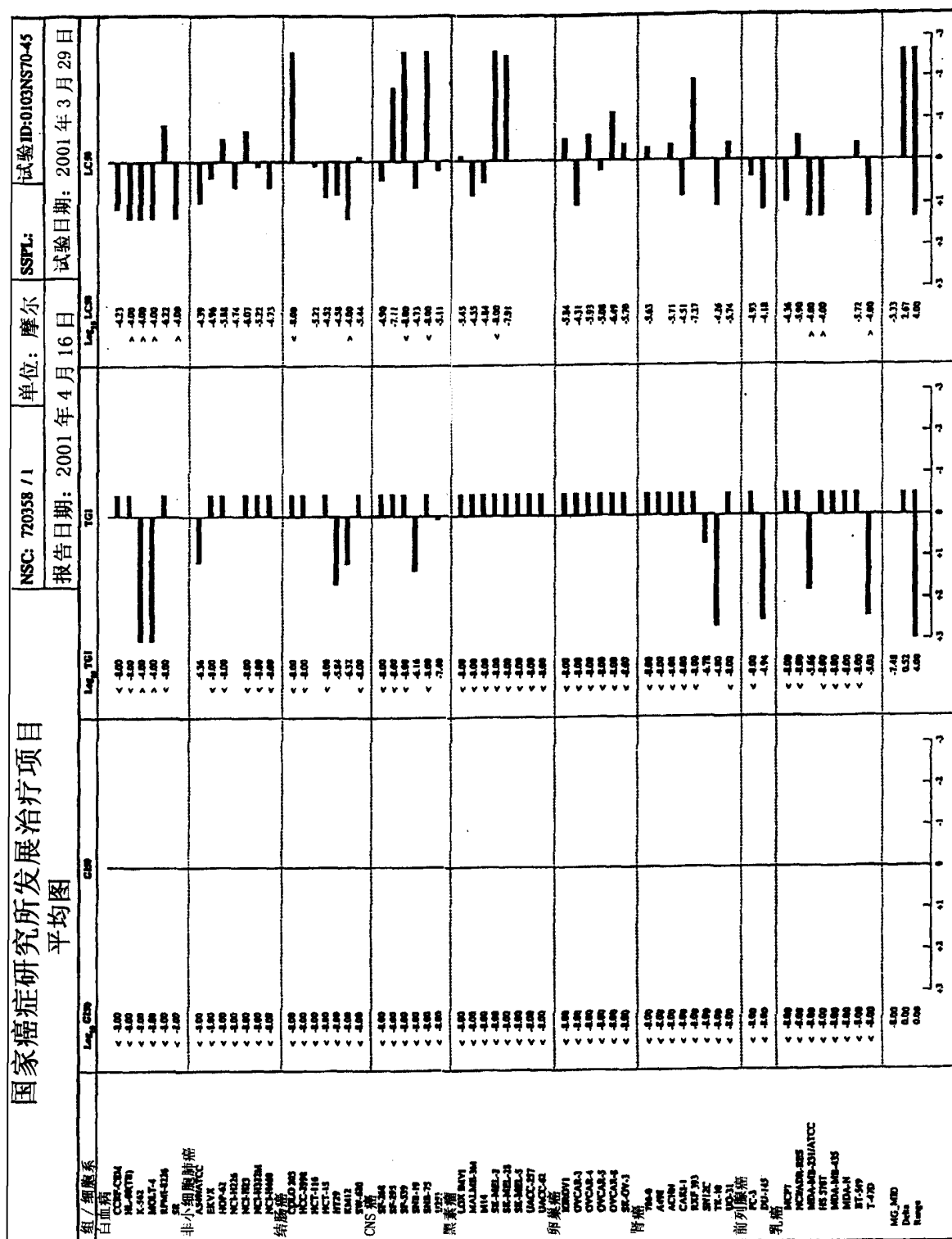


表 12. NCI 对化合物 26 进行的体外抗癌筛选

来自 NCI 细胞毒性筛选的结果清楚地表明，本发明的化合物对多种人癌细胞具有显著的细胞毒效力。尽管化合物 1、3、22、25 和 26 具有相当不同的结构，这两类化合物都表现出多种相似的生物性质。首先，它们在微摩尔范围内表现出活性。第二，这些化合物都没有对白血病细胞表现出强活性，但它们对实体瘤细胞表现出强活性。

第三，它们黑素瘤细胞具有活性，且在一定程度上对乳房、卵巢和肺细胞也具有活性。基于这些化合物的新结构和这些化合物的独特生物学特征，它们可以被生物评价委员会选择用于体内中空纤维测定(45)。

实施例 16

初步体内试验的中空纤维测定

发展治疗项目(Developmental Therapeutics Program)的生物试验分部(Biological Testing Branch)已采用初步体内筛选工具用于评价由大规模体外细胞筛选鉴定的化合物的可能的抗癌活性。为了进行这些测定，在聚偏二氟乙烯(PVDF)中空纤维中培养人肿瘤细胞，将各细胞系样品分别植入小鼠的两个生理区室(腹膜内和皮下)。各试验小鼠接受总共 6 个代表 3 种不同癌细胞系的纤维(3 个腹膜内和 3 个皮下)。分别在两种试验剂量下，通过腹膜内途径，使用 QD×4 治疗方案，用可能的抗肿瘤化合物治疗三只小鼠。载体对照由 6 只仅接受化合物稀释剂的小鼠组成。在最后一天治疗后的那天收集纤维培养物。为了评价抗癌效果，使用甲臢染料(MTT)转化测定来确定每种细胞系的活细胞质量。由此可以用化合物治疗的样品的平均光密度除以载体对照的平均光密度来计算% T/C。此外，可以测定每份样品的细胞质量的净增长，而在植入小鼠的当天评价纤维培养物样品的活细胞质量。因此，可以评价受试化合物的细胞抑制和杀细胞的能力。

一般而言，测试每种化合物对最少 12 种人癌细胞系的活性。这代表总共 4 项实验，因为每项实验包括 3 个细胞系。数据报道为 2 种化合物剂量对每种细胞系的% T/C，计算腹膜内和皮下样品的独立的值。

根据几种中空纤维测定标准，选择用于进一步在标准皮下异种移植模型中进行体内试验的化合物。这些包括：(1) 48 种可能的试验

组合(12种细胞系 $\times$ 2个位点 $\times$ 2个化合物剂量)中的50或小于10种的% T/C; (2) 在24种可能的组合中的最小4种的相隔活性(腹膜内药物/皮下培养物); 和/或 (3) 在任一移植部位的一种或多种细胞系的净细胞杀死。为了简化评价, 采用允许快速观察给定化合物的活性的点系统。为此, 将值2设计为每种化合物导致存活细胞质量的50%或更大减少的剂量。分别给腹膜内和皮下样品打分, 以可以评价标准(1)和(2)。具有组合的IP + SC分值 ≥ 20 , SC分值 ≥ 8 或者一种或多种细胞系的净细胞杀死的化合物优选用于异种移植物试验。这些标准通过比较 > 80 种在中空纤维测定和异种移植物试验中随机选择的化合物而得到统计学认证。这种比较表明, 如果中空纤维测定用作最初体内筛选工具, 则丢失活性化合物的可能性很小。除了这些标准以外, 其它因素(例如独特的结构、作用机理)可能导致提议将不满足这些标准的化合物用于标准异种移植物试验。

化合物3的实验仍在进行中。但是, 化合物1的研究已完成, 且结果如下: 对人H522肺癌, IP分值为8, SC分值为10, 从而IP + SC分值为18, 并观察到显著的细胞杀死。基于这些结果, NCI的生物评价委员会已进一步选择化合物1用于使用在裸鼠中的人肿瘤异种移植物进行的体内试验。该计划将观察至少三种不同的实体瘤, 其中一种为H522肺癌。用化合物25进行的中空纤维研究得到的复合分值为54 (IP = 46, SC = 8), 并观察到细胞杀死。此化合物目前正在NCI进行抗两种乳癌(MDA-MB-231和MDA-MB-435)以及肺癌(NCI-H23)的异种移植物试验。

实施例 17

pBR322链切口测定(nicking assay)

当化合物与DNA小沟中的嘌呤-N3共价结合时, 加合物是热不稳定的。它容易被水解产生DNA链(2)。因此, 腺嘌呤-N3 (或鸟嘌呤

-N3)烷基化加合物的形成可以通过超螺旋 pBR322 DNA (形式 I)热转化为切口开放的闭路 DNA (形式 II)来检测, 这种转化是单链断裂的形成的结果。然后可以通过琼脂糖凝胶电泳分离这两种不同形式的 pBR322 DNA, 每种形式的相对量可以由亚甲蓝染色的凝胶的密度测定来确定(39)。超螺旋形式的 pBR322 DNA 比开放的环状形式更为紧密, 结果它进一步沿着凝胶移向阳极。

将溶于 N,N-二甲基乙酰胺(DMA)的药物溶液制成 0.10 mM 浓度, 并总保存在冰箱中。

由 Tris HCl (0.661 g)、Tris 碱(0.097 g)用蒸馏水稀释至 100 mL 体积制备 25 °C 和 0.010 M 的 pH 7.4 的 Tris 缓冲液。然后将 EDTA-Na₂·2H₂O (0.186 g)和 KCl (3.72 g)加到 Tris HCl 溶液中, 并用蒸馏水稀释至 500 mL 体积。由 20 倍于用去离子水稀释至 3 升体积的 TBE 的 Carolina Lot # 4020602 电泳缓冲液制备 TBE 溶液。由溶于 TBE 缓冲液(40 mL)中的琼脂糖低 EEO (0.32 g)制备琼脂糖凝胶, 并在微波炉中加热至溶解。

购自 Pharmacia Biotech 的 pBR322 DNA (100 µg/100 µL)处在缓冲液(10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA)中。由从大肠杆菌(*E. coli*) HB101 分离的质粒 DNA, 通过碱溶胞产物法制备 DNA, 并用 Sepharacryl S-100 色谱纯化, 然后进行 CsCl-溴化乙锭离心。

通过向 Eppendorf 管中加入 DNA (10 µL)、Tris-EDTA KCl 缓冲液(18 µL)和浓度为 100 µM 的化合物(2 µL)制备烷基化样品。在 40 °C 下将样品培养 40 小时。移出样品, 然后离心 1 分钟。将 10% SDS (月桂基硫酸钠)(2 µL)、50%甘油(5 µL)和溴酚蓝(2 µl)加到这些样品中。用涡流混合器将管内容物混合, 然后离心以合并样品。用 TBE-缓冲液在室内覆盖琼脂糖凝胶。将样品装入琼脂糖凝胶, 或者当区带为沿凝胶下行约 3/4 时, 使样品在 40 V 下行进 3 小时。

移出凝胶并用亚甲蓝染色(45 分钟)。此时, 将染色的凝胶在水室

内放置过夜。使用密度测定确定各区带，即形式 I 和 II 的密度。将非手性化合物 1、3 和 9 进行此研究，结果如表 4 所示。

表 A4. 关于本发明化合物的 DNA 烷基化研究

化合物 1	形式 I DNA (%)	形式 II DNA (%)
对照 pBR322	87±2	13±1
0.1 mM	73±2	27±4
化合物 3	形式 I DNA (%)	形式 II DNA (%)
对照 pBR322	79±1	21±1
0.1 mM	51±3	49±4
化合物 9	形式 I DNA (%)	形式 II DNA (%)
对照 pBR322	78±4	22±4
0.1 mM	48±4	52±4
化合物(1.0 mM)	形式 I DNA (%)	形式 II DNA (%)
对照 pBR322	32.7±5	67.3±5
17		定量
18		定量
19		定量
化合物 24	形式 I DNA (%)	形式 II DNA (%)
对照 pBR322	86±5	14±6
0.1 mM		定量
化合物 25	形式 I DNA (%)	形式 II DNA (%)
对照 pBR322	64±4	36±5
0.1 mM		定量
化合物 26	形式 I (%)	形式 II (%)
对照 pBR322	46	54
0.1 mM	0	定量

表 A4 的结果表明，在 40℃ 下将药物-DNA 溶液培养 40 小时后产生 DNA 链断裂。链断裂作为加合物 A-N3 或 G-N3 部位的热裂解

反应的结果形成,从而证明这些化合物优先与小沟结合并在小沟内烷基化。

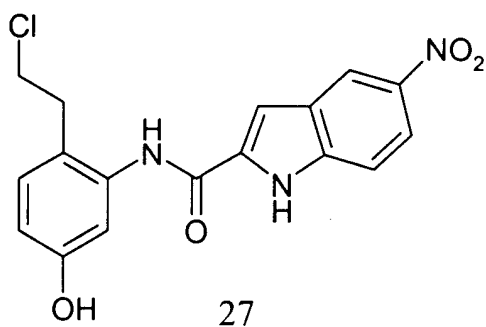
实施例 18

Taq 聚合酶终止测定

使用 Taq 聚合酶终止测定研究本发明的化合物在特定序列烷基化 DNA 的能力。所用的方法以前由 Ponti 等人描述(41)。在药物/DNA 培养前,用适宜的限制酶将质粒 pBR322 DNA 线性化,以终止引物下游 Taq。在扩增前使用 T4 多核苷酸激酶和 $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (5000 Ci/mmol, Amersham. UK)对寡脱氧核苷酸引物进行 5'-端标记。通过 Bio-Rad 旋转柱进行洗脱而纯化标记的引物。标识为 SCA 的合成引物 5'-GCAGCAGATTACGCGCAGAA-3'与 3090—3109 位的互补链结合,并用于检查底部链的烷基化。标识为 SRM 的引物 5'-GCATTGGTAACTGTCAGACC-3'与序列 3303—3284 结合并用于检查顶部链。在含 0.5 μg 模板 DNA、50 pmol 标记的引物、250 μM 各 dNTP、1U “Red Hot” Taq 聚合酶、20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、75 mM Tris-HCl, pH 9.0、0.01% Tween、2.5 mM MgCl_2 和 0.01%明胶的总体积 100 μL 中进行 DNA 的线性扩增。在最初 94 $^\circ\text{C}$ 下变性 4 分钟后,循环条件如下:94 $^\circ\text{C}$ 持续 1 分钟,60 $^\circ\text{C}$ 持续 1 分钟和 72 $^\circ\text{C}$ 持续 1 分钟,总共 30 次循环。扩增后,将样品乙醇沉淀,并用 70%乙醇洗涤。将样品溶于装有染料的甲酰胺中,在 90 $^\circ\text{C}$ 下加热 2 分钟,在冰上冷却,并在 80 cm $\times$ 20 cm $\times$ 0.4 mm 6%丙烯酰胺变性测序凝胶 (Sequagel, National Diagnostics)上,在 2500—3000 V 下电泳 3 小时。将凝胶干燥,并使 x-射线薄膜与凝胶(Hyperfilm, Amersham. UK)接触。在 Bio-Rad GS-670 成像光密度计上进行密度测定。

表 13 和 14 中给出的化合物 1、2 和 27 的凝胶分别在 Pvu II 片段、Sca I 片段上操作。这些化合物的每一种都具有非手性“弹头”,它

们的差异仅在于 2 含有溴而不是氯离去基团。三种化合物的非共价结合部分也类似，除了化合物 27 含有 5-硝基吲哚基而不是 1 和 2 共有的更大的吲哚-苯并呋喃基。结果证明这些特征是显著的。化合物 1 和 2 都显示出比 27 更强的序列选择性，推测其可能是由于化合物 1 和 2 与 DNA 的更大的非共价结合相互作用导致的。



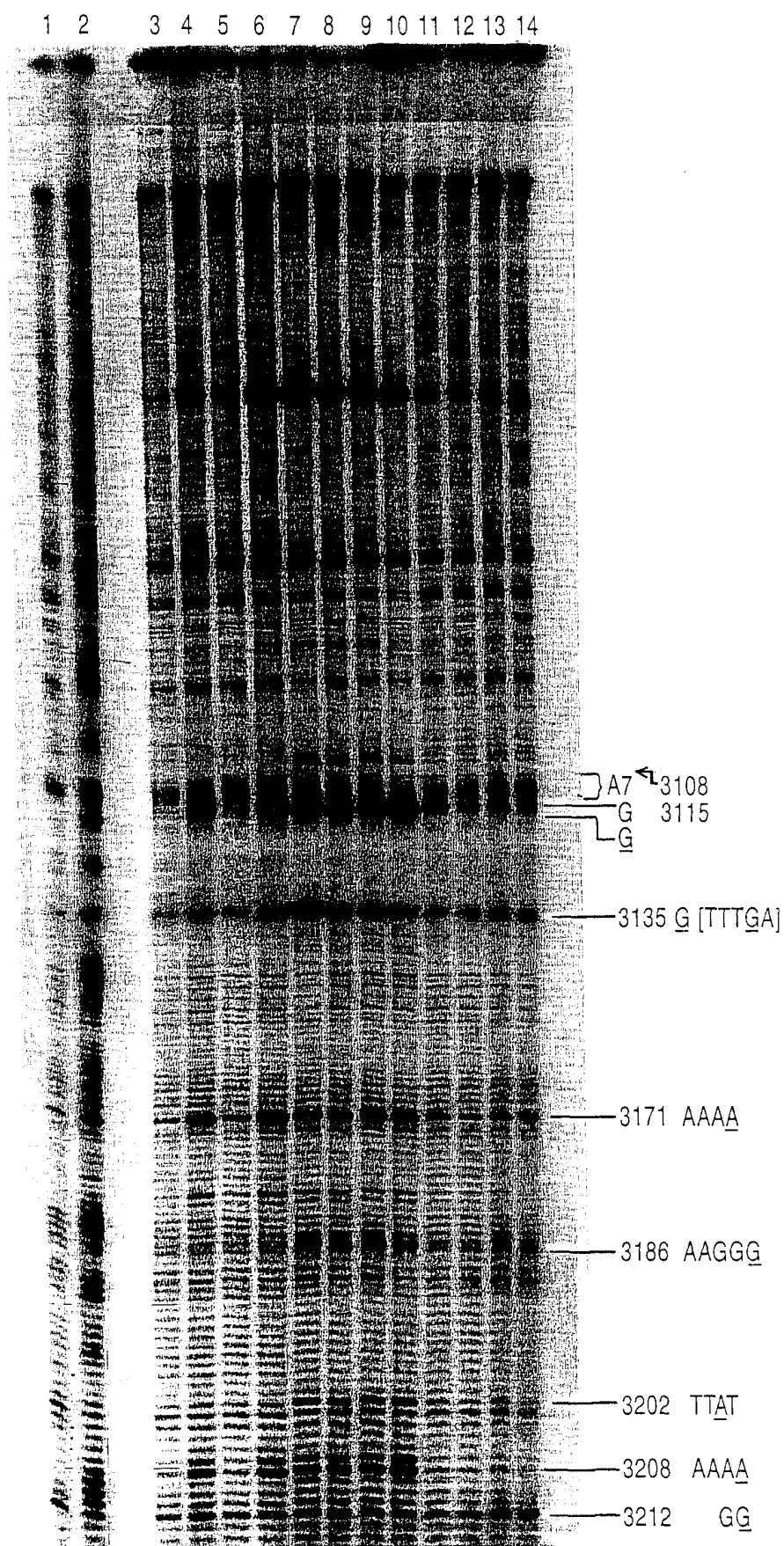


表 13. Taq DNA 聚合酶终止测定，使用 Pvu II 引物；泳道 1，对照 DNA；泳道 2，100 μ M 苯丁酸氮芥处理；泳道 3，化合物 27，10 μ M，5 小时；泳道 4，化合物 27，100 μ M，5 小时；泳道 5，化合物 27，10 μ M，8 小时；泳道 6，化合物 27，100 μ M，8 小时；泳道 7，化合物 1，10 μ M，5 小时；泳道 8，化合物 1，100 μ M，5 小时；泳道 9，化合物 1，10 μ M，8 小时；泳道 10，化合物 1，100 μ M，8 小时；泳道 11，化合物 2，10 μ M，5 小时；泳道 12，化合物 2，100 μ M，5 小时；泳道 13，化合物 2，10 μ M，8 小时；泳道 14，化合物 2，100 μ M，8 小时。

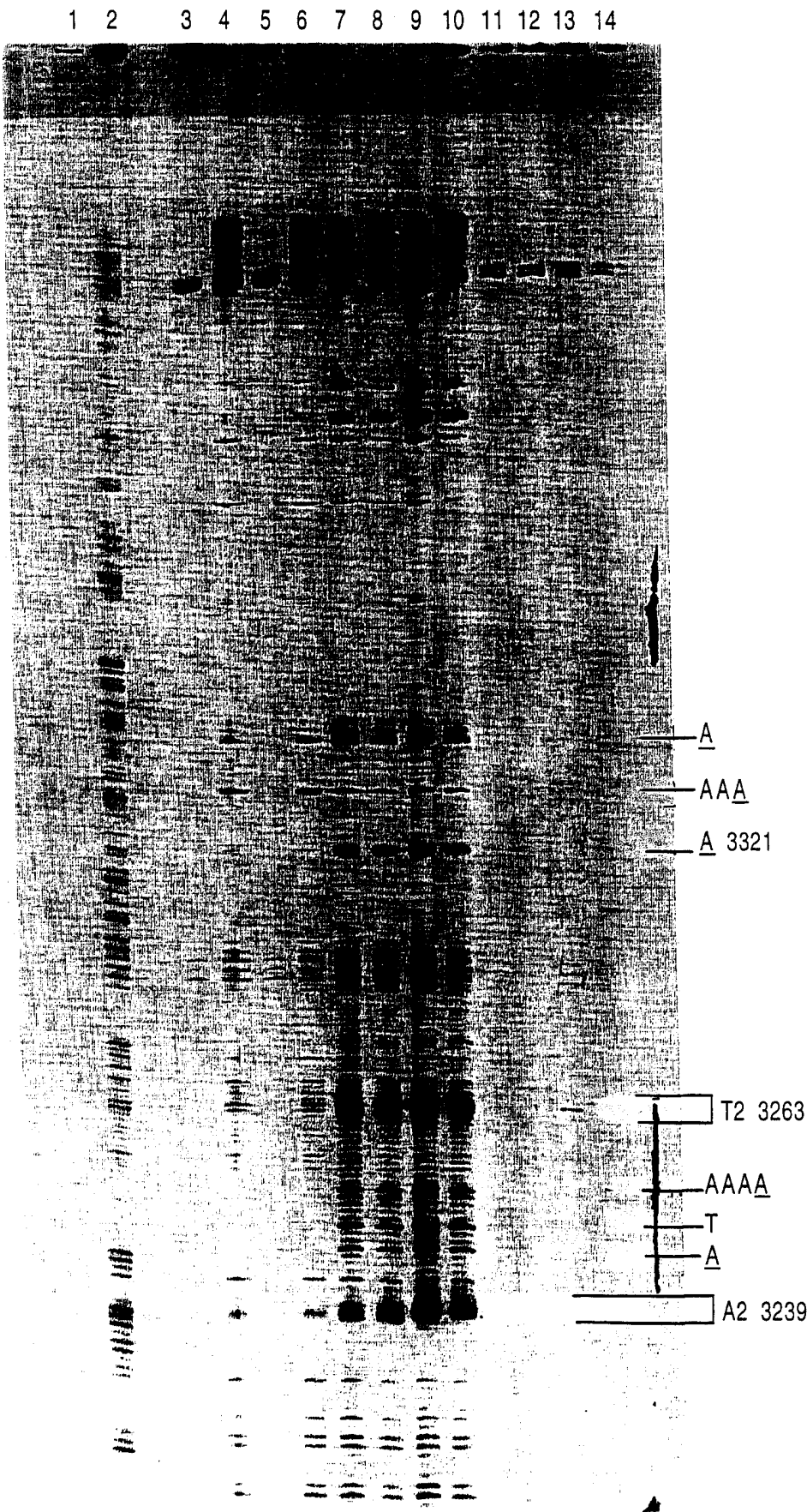


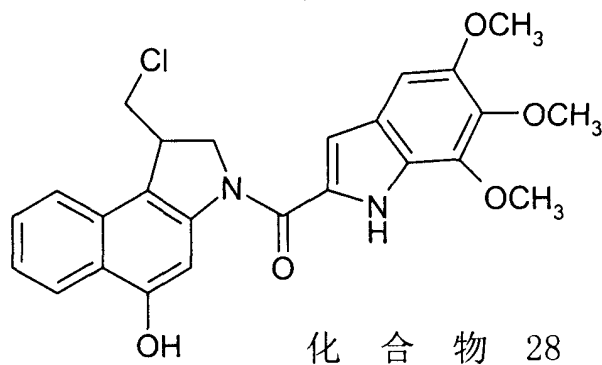
表 14. Taq DNA 聚合酶终止测定, 使用 Sca II 引物; 泳道 1, 对照 DNA; 泳道 2, 100 μ M 苯丁酸氮芥处理; 泳道 3, 化合物 27, 10 μ M, 5 小时; 泳道 4, 化合物 27, 100 μ M, 5 小时; 泳道 5, 化合物 27, 10 μ M, 8 小时; 泳道 6, 化合物 27, 100 μ M, 8 小时; 泳道 7, 化合物 1, 10 μ M, 5 小时; 泳道 8, 化合物 1, 100 μ M, 5 小时; 泳道 9, 化合物 1, 10 μ M, 8 小时; 泳道 10, 化合物 1, 100 μ M, 8 小时; 泳道 11, 化合物 2, 10 μ M, 5 小时; 泳道 12, 化合物 2, 100 μ M, 5 小时; 泳道 13, 化合物 2, 10 μ M, 8 小时; 泳道 14, 化合物 2, 100 μ M, 8 小时。

对于表 13 中所示的 Pvu II 片段, 在 5'-AAAAA (#3207, 3208)、5'-TTAT (#3202)、5'-AAGGG (#3186)、5'-AAAA (#3171)和 G (#3115) 中发现强烷基化位点。对于 Sea I DNA 片段, 在 AA (#3239)、TT (#3263) 和 A (#3321) 中发现强烷基化位点。对 Pvu II 和 sca I 片段进行类似的 Taq DNA 聚合酶终止测定, 并与 CC-1065 和阿多来新进行比较。结果(未示出)表明 CC-1065 和阿多来新以及本发明的化合物的共价序列选择性的类似性, 除了发夹化合物(17、18 和 19)以外。发夹化合物优先烷基化不同的 DNA 序列。具体而言, 根据 Taq DNA 聚合酶终止测定, 发夹化合物 17—19 不烷基化 5'-AAAAA 序列, CC-1065 和多卡米新的类似物大部分的主要烷基化位点。相反, 它们在 3'-ATTT-5' 序列表现出烷基化选择性。对于化合物 18, 在 3'-GCAACG-5'发现附加和独特的强烷基化位点。对于化合物 19, 独特但更弱的烷基化位点位于 3'-(G)CA-5'。由于本发明所述化合物, 特别是使用新的序列特异性识别和烷基化基元的发夹化合物的独特的序列特异性, 它们可能具有用于鉴定基因组中的特定序列和用于调控基因表达的潜在应用。

表 13 和 14 中的结果还表明, 在烷基化 DNA, 因而阻断 Taq DNA 聚合酶活性方面, 含溴的类似物 2 比相应的氯代化合物 1 效率低。这可能是溴化物是更好的离去基团, 因而具有更大的溶剂解活性的结

果。

表 15 给出对化合物 25、26 和化合物 28 (*seco*-CBI-三甲氧基吲哚参比化合物)进行的 Taq DNA 聚合酶终止测定的结果。这些结果表明与表 13 和 14 所述的化合物类似的共价 DNA AT 序列选择性, 优先在五个连续的 A (865)AAAA 序列的序列选择性。



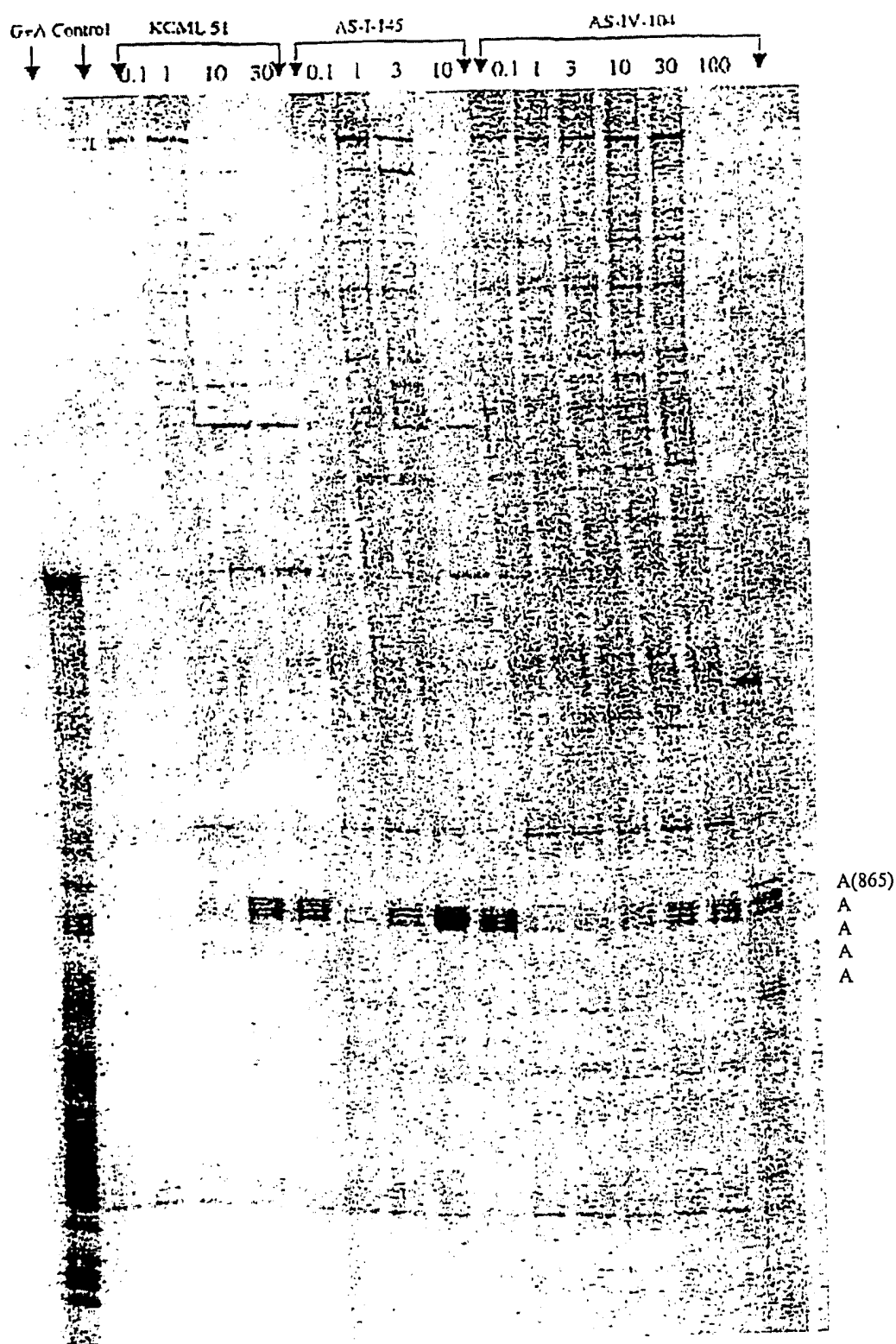


表 15. 化合物 25 和 26 的 Taq DNA 聚合酶终止测定。KCML 是参比化合物; *seco*-CBI-三甲氧基吲哚, 化合物 28。泳道对应于以 μM 为单位的不同浓度的化合物。

引用的专利

1. Kelly, R. C.; Warpehoski, M. A.; Wierenga, W. Analogs of Antibiotic CC-1065, Namely 1,2,8,8a-Tetrahydrocyclopropa[c]pyrrolo[3.2-e]indole -4-(5H)-ones and Related Compounds with Light-absorbing , Antibacterial, and antitumor Activities. March 27, 1990. 美国专利 4,912,227
2. Aristoff, P. A. CC-1065 Analogs having Two CPI Subunits Useful as Antitumor Agents. March 21, 1990. 欧洲专利申请 EP 359,454
3. Yutaka, K.; Youichi, U.; Hiromitsu, S.; Hiroshi, S.; Eiji, K.; Makoto, M.; Satoru, N. Preparation of DC-88A Derivatives. January 9 1991. 欧洲专利申请 EP 406,749
4. Denny, W. A.; Tercel, M. Preparation of *seco* precursors of cyclopropyl indoles as anticancer drugs. 1998, WO 9707097 A1 970227

引用的参考文献

1. (a) Advances in DNA Sequence Specific Agents Vol. 3, Jones, G. B.; Palumbo, M. Eds., JAI Press Inc., Greenwich, CT, 1998.(b) Arcamone, F. M.; Animai, F.; Barbieri, B.; Confliglicchi, E.; D'Alessio, R.; Geroni, C.; Giuliani, F. C.; Lazzari, E.; Menozzi, M.; Mongelli, N.; Penco, S.; Verini, M. A. Synthesis, DNA-Binding Properties, and Antitumor Activity of Novel Distamycin Derivatives. J. Med. Chem. 1989,32,774-778. (c) Li, L. H.; Wallace, T. L.; DeKoning, T. F.; Warpehoski, M. A.; Kelly, R. C.; Prairie, M. D.; Drueger, W. C. Structure and Activity Relationship of Several Novel CC-1065 Analogs. Invest. New Drugs 1987,5,329-337. (d) Li, L. H.; Kelly, R. C.; Warpehoski, M. A.; McGovern, J. P.; Gebhard, I.; DeKoning, T. F. Adozelesin, a Selected Lead among Cyclopropylpyrroloindole Analogs of the DNA-Binding Antibiotic, CC-1065. Invest. New Drugs 1991,9,137-148.

- (e) Warpehoski, M the DNA Sequence Selectivity of CC- 065 in Advances in DNA Sequen Specific Agents Vol. 1, Hurley, L. H. Ed., JAI Press, Inc., Greenwich, CT, 1992,217-245.
2. (a). Boger, D. L.; Johnson, D. S. CC-1065 and the Duocarmycins: Understanding their Biological Function through Mechanistic Studies. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996,35, 1438-1474. (b) Boger, D. L.; Johnson, D. S. CC-1065 and the Duocarmycins: Unraveling the Keys to a New Class of Natural Derived DNA Alkylating Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995,92,3642-3649.
3. (a) Boger, D. L. The Duocarmycins: Synthetic and Mechanistic Studies. *Acc. Cheili. Res.* 1995,28,20-29. (b) Boger, D. L. Duocarmycins: A New Class of Sequence Selective DNA Minor Groove Alkylating Agents. *Chemtracts: Org. Chem.* 1991,4,329349.
4. (a) Hanka, L. J.; Dietz, A.; Gerpheide, S. A.; Kuentzel, S. L.; Martin, D. G. CC-1065 (NSC-298223), a New Antitumor Antibiotic. Production in-vivo Biological Activity, Microbiological Assays, and Taxonomy of the Producing Microorganism. *J. Antibiot.* 1978,31,1211-1217. (b) McGovern, J. P.; Clarke, G. L.; Pratte, E. A.; DeKoning, T. F. Preliminary Toxicity Studies with the DNA-Binding Antibiotic, CC-1065 *J. Antibiot.* 1983,37,63-70. (c) Warpehoski, M. A.; Gebhard, J.; Kelly, R. C.; Krueger, W. C.; Li, L. H.; McGovern, J. P. Stereoelectronic Factors Influencing the Biological Activity and DNA Interaction of Synthetic Antitumor Agents Modeled on CC-1065. *J. Med. Chenz.* 1988,31, 590-603.
5. (a) Ichimura, H.; Ogawa, T.; Takahashi, K.; Kobayashi, E.; Kawamoto, I.; Yasuzawa, T.; Takahashi, I.; Nakano, H. Duocarmycin SA , A New Antibiotic from Streptonzyces sp. *J. Antibiot.* 1990,43,1037-1038. (b) Yaszawa, T.; Saitoh, Y.; Ichimura, M.; Takahashi, I.; Sano, H. Structure of Duocarmycin SA, A Potent Antitumor Antibiotic. *J. Antibiot.* 1991, 44,445-447. (c) Yasuzawa, T.; Muroi, K.; Ichimura, M.; Takahashi, I.; Ogawa, T.; Takahashi, K.; Sano, H.; Saitoh, Y. Duocarmycins, Potent Antitumor Antibiotics by Streptomyces sp. Structures and Chemistry. *Chem. Pharm. Bull.* 1995,43,378-391. (d) Ichimura, M.; Ogawa, T.; Takahashi, K.; Mihara, A.; Takahashi, I.; Nakano, H. Interconversion and Stability of Duocarmycins, a New Family of Antitumor Antibiotics: Correlation to

Their Cytotoxic and Antimicrobial Activities In-vitro. *Oncol. Res.* 1993,5,165-171. (e) Gomi, K.; Kobayashi, E.; Miyoshi, K.; Ashizawa, T.; Okamoto, A.; Ogawa, T.; Katsumata, S.; Mihara, A.; Okabe, M.; Hirata, T. Anticellular and Antitumor Activity of Duocarmycins. *Jpn. J. Cancer Res.* 1992,83,113-120.

6. Hurley, L. H.; Reynolds, V. S.; Swenson, D. H.; Petzold, G. L.; Scahill, T. A. Reaction of the Antitumor Antibiotic CC-1065 with DNA: Structure of a DNA Adduct with DNA Sequence Specificity. *Science* 1984,226,843-844.

7. Boger, D. L.; Johnson, D. S.; Yun, W. (+)-and ent- (-)-Duocarmycin SA and (+)-and ent- (-)-N-BOC-DSA DNA Alkylation Properties. Alkylation Site Models that Accomodate the Offset AT-Rich Adenine N3 Alkylation Selectivity of the Enantiomeric Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 1994,116,1635-1656.

8. Reynolds, V. L.; Molineux, I. J.; Kaplan, D. J.; Swenson, D. H.; Hurley, L. H. Reaction of the Antitumor Antibiotic CC-1065 with DNA Location of the Site of Thermally Induced Strand Breakage and Analysis of DNA Sequence Specificity. *Biochemistry* 1985,24,62286237.

9. (a) Schnell, J. R.; Ketchum, R. R.; Boger, D. L.; Chazin, W. J. Binding-Induced Activation of DNA Alkylation by Duocarmycin SA: insights from the structure of an indole derivative-DNA adduct. *J. Am. Chem. Soc.* 1999,121,5645-5652. (b) Boger, D. L.; Bollinger, B.; Hertzog, D. L.; Douglas, S. J.; Cai, H.; Mesini, P.; Garbaccio, R. M.; Jin, Q.; Kitos, P. A. Reversed and Sandwiched Analogs of Duocarmycin SA: Establishment of the Origin of the Sequence-Selective Alkylation of DNA and New Insights into the Source of Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 1997,119,4987-4998 (c) Boger, D. L.; Garbaccio, R. M. Catalysis of the CC-1065 and Duocarmycin DNA Alkylation Reaction: DNA Binding Induced Conformational Change in the Agent Results in Activation. *Bioorg. Med. Chem.* 1997, 5,263-276. (d) Boger, D. L.; Garbaccio, R. M. Are the Duocarmycin and CC-1065 DNA alkylation reactions acid catalyzed? Solvolysis pH-rate profiles suggest they are not. *J. Org. Chem.* 1999,64,5666-5669. (e) Boger, D. L.; Santillan, A. Jr.; Searcey, M.; Jin, Q. Synthesis and evaluation of Duocarmycin and CC-1065 analogues containing modifications in the subunit linking amide. *J. Org. Chem.* 1999,64,5241-5244.

10. (a) Warpehoski, M. A.; Hurley, L. H. Sequence Selectivity of DNA at Covalent Modification. *Chem. Res. Toxicol.* 1988, 1,315-333. (b) Lin,

C. H.; Sun, D.; Hurley, L. H. (+)-CC-1065 Produces Bending of DNA that Appears to Resemble Adenine/Thymine Tracts. *Chem. Res. Toxicol.* 1991,4,21-26. (c) Warpehoski, M. A.; Harper, D. E. Acid-Dependent Electrophilicity of Cyclopropylpyrroloindoles. Nature's Masking Strategy for a Potent DNA Alkylator. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994,116,7573-7580. (d) Schahill, T. A.; Jensen, R. M.; Swenson, D. H. Hatzenbuehler, N. T.; Petzold, G.; Wierenga, W.; Brahme, N. D. An NMR Study of the Covalent and Noncovalent Interaction of CC-1065 and DNA. *Biochemistry* 1990, 29,2852-2860.

11. (a) Hurley, L. H.; Draves, P. H. Molecular Aspects of the Interaction of (+)-CC-1065 with DNA. in *Molecular Aspects of Anti-cancer Drug-DNA Interactions* Vol. 1, Neidle, S.; Waring, M. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1993,89-133. (b) Lin, C. H.; Hill, C. G.; Hurley, L. H. Characterization of a 12-mer Duplex d (GGCGGAGTTAGG)-(CCTAACTCCGCC) Containing a Highly Reactive (+)-CC-1065 Sequence by ¹H- and ³¹P-NMR, Hydroxyl-Radical Footprinting, and NOESY Restrained Molecular Dynamics Calculations. *Chem. Res. Toxicol.* 1992,5,167-182. (c) Powers, R.; Gorenstein, D. G. Two-Dimensional ¹H- and ³¹P-NMR Spectra and Restrained Molecular Dynamics Structure of a Covalent CPI-CDPI2-Oligodeoxynucleotide Decamer Complex. *Biochemistry*, 1990,29,9994-10008. (d) Eis, P. S.; Smith, J. A.; Rydzewski, J. M.; Case, D. A.; Boger, D. L.; Chazin, W. J. High Resolution Solution Structure of a DNA Duplex Alkylated by the Antitumor Agent Diocarmycin SA. *J. Mol. Biol.* 1997,272,237-252.

12. (a) Travers, A. A. Why Bend DNA? *Cell* 1990,60,177-180. (b) Hurley, L. H.; Sun D. (+)-CC-1065 as a Probe for Intrinsic and Protein-Induced Bending of DNA. *J. Mol. Recogn.* 1994,7,123-132. (c) Han, F. X.; Hurley, L. H. A Model for the T-Antigen-Induced Structural Alteration of the SV40 Replication Origin Based Upon Experiments with Specific Probes for Bent, Straight and Unwound DNA. *Biochemistry* 1996, 35,7993-8001. (d) Sun, D.; Hurley, L. H.; Harshey, R. M. Structure Distortions Induced by Integrated Host Factor (IHF) and the H' Site of Phage X Probed by (+)-CC-1065, Pluramycin, and KMnO₄ and by DNA Cyclization Studies. (+)-CC-1065 as a Structural Probe for Muγ Transposase-Induced Bending of DNA. *Biochemistry* 1996, 35,10815-10827. (e) Ding, Z. M.; Harshey, R. M.; Hurley, L. H. *Nucl. Acids Res.* 1993,21,4281-4287.

13. Kirschner, K. N.; Lee, M.; Stanley, R. C.; Bowen, J. P. Density functional and ab Initio studies on N-acetylDuocarmycin SA: insight into its DNA interactions properties. *Bioorg. Med. Chem.* 2000,8,329-335.
14. Boger, D. L.; McKie, J. A.; Han, N.; Tarbie, C. M.; Riggs, H. W.; Kitos, P. A. A Hammett Correlation for CC-1065 and Duocarmycin Analogs: Magnitude of Substitute Electronic Effects on Functional Reactivity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996,6,659-664, and references therein.
15. (a) Boger, D. L.; Yun, W. Reversibility of the Duocarmycin A and SA DNA Alkylation Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 1993,115,9872-9873. (b) Warpehoski, M. A.; Harper, E.; Mitchell, M. A.; Monroe, T. J. Reversibility of the Covalent Reaction of CC12065 and Analogues with DNA. *Biochemistry* 1992,31,2502-2508.
16. Asai, A.; Nagamura, S.; Saito, H.; Takahashi, I.; Nakano, H. The Reversible DNA Alkylating Activity of Duocarmycin and Its Analogues. *Nucl. Acids Res.* 1994,22,88-93.
17. (a) Hightower, R. D.; Sevin, B. U.; Pevras, J. P.; Untch, M.; Angioli, R.; Averette, H. In Vitro Evaluation of the Novel Chemotherapeutic Agents U-73975, U-77779, and U80244. *Gynecol. Oncol.* 1992,42,186-190. (b) Cote, S.; Momparler, R. L. Evaluation of the Antineoplastic Activity of Adozelesin Alone and in Combination with 5-Aza-2'-deoxycytidine and Cytosin Arabinoside on DLD-1 Human Colon Carcinoma Cells. *Anti-Cancer Drugs* 1993,4,327-333. (c) Fleming, G. F.; Ratain, S. M.; O'Brien, R. L.; Schilsky, P. C.; Ramos, R.; Richards, J. M.; Vogelzang, N. J.; Kasunic, D. A.; Earhart, R. H. Phase I Study of Adozelesin Administered by 24-Hour Continuous Intravenous Infusion. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994,86,368-372. (d) Foster, B. J.; Larusso, P. M.; Poplin, E.; Zalupski, M.; Valdivieso, M.; Wozniak, A.; Flaherty, L.; Kasunic, D. A.; Earhart, R. H.; Baker, L. H. Phase I Trial of Adozelesin Using the Treatment Schedule of Daily x5 Every 3 Weeks. *Invest. New Drugs* 1996,13,321-326. (e) Burris, H.; Earhart, R.; Kuhn, J.; Shaffer, D.; Smith, L.; Weiss, G.; Kusanic, D.; Radbury, G.; Campbell, L.; Von Hoff, D. A Phase I Trial of Adozelesin, a Novel DNA Sequence-Specific Alkylating Agent. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1992,33,265. (f) Burris, H. A.; Dleras, V. C.; Tunca, M.; Earhart, R. H.; Eckardt, J. R.; Rodriguez, G. I.; Shaffer, D. S.; Fields, S. M.; Campbell, E.; Scaaf, L.; Kasunic, D.; Von Hoff, D. D. Phase I study with the DNA sequence specific agent adozelesin. *Anti-cancer Drugs*

1997,8,588-596. (g) Foster, B. J.; LoRusso, P. M.; Poplin, E.; Zalupski, M.; Valdivieso, M.; Wozniak, A.; Flaherty, L.; Kasunic, D. A.; Earhart, R. H.; Baker, L. H. Phase I trial of adozelesin using the treatment schedule of daily x5 every 3 weeks. *Invest. New Drugs* 1996,13,321-326.

18. (a) Li, L. H.; Dekoning, J. F.; Kelly R. C.; Krueger, W. C.; McGovern, J. P.; Padbury, G. E.; Petzold, G. L.; Wallace, T. L.; Ouding, R. J.; Praire, M. D.; Gebhard, I. Cytotoxicity and Antitumor Activity of Carzelesin, a Prodrug Cyclopropyrroloindole Analogue. *Cancer Res.* 1992,52,4904-4913. (b) van Tellingen, O.; Punt, C. J. A.; Awada, A.; Wagener, D. J. T.; Piccart, M. J.; Groot, Y.; Scaaf, L. J.; Henrar, R. E. C. Nooijen, W. J.; Beijnen, J. H. A clinical pharmacokinetics study of carzelesin given by short term intravenous infusion in a phase I study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1998,41,377-384.

19. (a) Walker, D. L.; Reid, F. M.; Ames, M. M. Preclinical Pharmacology of Bizelesin, a Potent Bifunctional Analog of the DNA-Binding Antibiotic CC-1065. *Cancer C/MH Mer. Pharmacol.* 1994,34,317-322. (b) Volpe, D. A.; Tomaszewski, J. E.; Parchment, R. E.; Garg, A.; Flora, K. P.; Murphy, M. J.; Grieshaber, C. K. Myelotoxic Effects of the Bifunctional Alkylating Agent Bizelesin on Human, Canine and Murine Myeloid Progenitor Cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996,39,143-149. (c) Pitot, H. C. IV; Erlichman, C.; Reid, J. M.; Sloan, J. A.; Ames, M. M.; Bagniewski, P. G.; Atherton-Skaff, P.; Adjei, A. A.; Rubin, J.; Rayson, D.; Goldberg, R. M. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1999,40,91.

20. (a) Nagamura, S.; Kobayashi, E.; Gomi, K.; Saito, H. Studies on the Active Metabolite (DU-86) of KW-2189, A Novel Derivative of Duocarmycin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6,2147-2150, and references therein. (b) Alberts, S. R.; Erlichman, C.; Reid, J. M.; Ames, M. M.; Sloan, J. A.; Richardson, R. L. Phase I trial of KW2189 in solid tumors using a 50day administration schedule. *Proc. Am. Assoc. cancer Res.* 1996,37,393. (c) Abbruzzese, J. L.; Madden, T.; Newman, R. A. Phase I clinical and pharmacokinetic trial of KW2189. *Proc. Am. Assoc. cancer Res.* 1996,37,165. (d) Niitani, H.; Horikoshi, N.; Hasegawa, K.; Fukuoka, M.; Kudoh, S.; Hino, M. Phase I study of KW2189, a derivative of new anticancer antibiotic Duocarmycin. *Proc. Am. Assoc. cancer Res.* 1995,36,243. (e) Amishiro, N.; Nagamura, S.; Murakata, C.; Okamoto, A.; Kobayashi, E.; Asada, M.; Gomi,

K.; Tamaoki, T.; Okabe, M.; Yamaguchi, N.; Yamaguchi, K.; Saito, H. Synthesis and antitumor activity of Duocarmycin derivatives: modification at C-8 position of Aring pyrrole compounds bearing the simplified DNA-binding groups. *Bioorg. Med. Chem.* 2000,8,381-391. (f) Asai, A.; Nagamura, S.; Kobayashi, E.; Gomi, K.; Saito, H. Synthesis and antitumor activity of water-soluble Duocarmycin B1 prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999,9,2995-2998.

21. (a) Wang, Y.; Gupta, R.; Huang, L.; Luo, W.; Lown, J. W. Design, Synthesis, Cytotoxic Properties and Preliminary DNA Sequencing Evaluation of CPI-N-Methylpyrrole Hybrids. Enhancing Effect of a Trans Double Bond Linker and Role of the Terminal Amide Functionality on Cytotoxic Potency. *Anti-Cancer Drug Des.* 1996, 11, 15-34. (b) Fregeau, N. L.; Wang, Y.; Pon, R. T.; Wylie, W. A.; Lown, J. W. Characterization of a CPI Lexitropsin Conjugate-Oligonucleotide Covalent Complex by ¹H-NMR and Restrained Molecular Dynamics Simulation. *J. Am. Chem. Soc.* 1995,117,8917-8925.

22. Boger, D. L.; Han, N.; Tarby, C. M.; Boyce, C. W.; Cai, H.; Jin, Q.; Kites, P. A. Synthesis, Chemical Properties, and Preliminary Evaluation of Substituted CBI Analogs of CC1065 and the Duocarmycins Incorporating the 7-Cyano-1, 2,9,9a-tetrahydrocyclopropa [c] benz [e] indol-4-one Alkylation Subunit: Hammett Quantitation of the Magnitude of Electronic Effects on Functional Reactivity. *J. Org. Chem.* 1996,61,4894-4912.

23. Mohamadi, F.; Spees, M. M.; Staten, G. S.; Marder, P.; Kipka, J. K.; Johnson, D. A. Total Synthesis and Biological Properties of Novel Antineoplastic (Chloromethyl) furanoindolines: An Asymmetric Hydroboration Method Synthesis of the Alkylation Subunits. *J. Med. Chem.* 1994,37,232-239.

24. Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Pinedo de las Infantas, M. J.; Romagnoli, R.; Spatullo, G.; Cozzi, P.; Mongelli, N. Synthesis, Chemical Solvolytic Stability and Preliminary Biological Evaluation of (-)-N-BOC-CPzI: A Pyrazole Analog of the Left-Hand Segment of the Antitumor Agent CC-1065. *Anti-Cancer Drug Design* 1997,12,67-74.

25. (a) Boger, D. L.; Munk, S. A.; Zarrinmayeh, H.; Ishizaki, T.; Hought, J.; Bina, M. An Alternative and Convenient Strategy for Generation of Substantial Quantities of Singly 5'-³²P-End Labeled Double-Stranded DNA for Binding Studies: Development of a Protocol for Examination of Functional Features of (+)-CC-1065 and the

Duocarmycins that Contribute to Their Sequence-Selective DNA Alkylation Properties. *Tetrahedron* 1991,47,2661-2682. (b) Boger, D. L.; Ishizaki, T.; Zarrinmayeh, H.; Munk, S. A.; Kitos, P. A.; Suntorwart, O. Duocarmycin-Pyrindamycin DNA Alkylation Properties and Identification, Synthesis, and Evaluation of Agents Incorporating the Pharmacophore of the Duocarmycin-Pyrindamycin Alkylation Subunit. Identification of the CC-1065 Duocarmycin Common Chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* 1990,112,8961-8971.

26. (a) Atwell, G. J.; Tercel, M.; Boyd, M.; Wilson, W. R.; Denny, W. A. Synthesis and cytotoxicity of 5-amino-1-(chloromethyl)-3-[(5,6,7-trimethoxyindol-2-yl) carbonyl]-1,2-dihydro-3H-benz (e) indole (amino-*seco*-CBI-TMI) and related 5-alkylamino analogues: New DNA minor groove alkylating agents. *J. Org. Chem.* 1998,63,9414-9420. (b) Milbank, J. B. J.; Tercel, M.; Atwell, G. J.; Wilson, W. R.; Hogg, A.; Denny, W. A. Synthesis of 1-Substituted 3-(Chloromethyl)-6-aminoineole (6-Amino-*seco*-CI) DNA Minor Groove Alkylation Agents and Structure-Activity Relationships for their Cytotoxicity. *J. Med. Chem.* 1999,42,649-658. (c) Tercel, M.; Gieseg, M. A.; Denny, W. A.; Wilson, W. R. Synthesis and cytotoxicity of amino-*seco*-DSA: an amino analogue of the DNA alkylating agent Duocarmycin SA. *J. Org. Chem.* 1999,64,5946-5953.

27. (a) Hurley, L. H.; Warpehoski, M. A.; Lee, C. S.; McGovern, J. P.; Scahill, T. A.; Kelley, R. C.; Mitchell, M. A.; Wienieski, N. A.; Gebhard, J.; Johnson, P. D.; Bradford, V. S. Sequence Specificity of DNA Alkylation by the Unnatural Enantiomer of CC-1065 and Its Synthetic Analogs. *J. Am. Chem. Soc.* 1990,112,4633-4649. (b) Boger, D. L.; Coleman, R. S.; Invergo, B. J.; Sakya, S. M.; Ishizaki, T.; Munk, S. A.; Zarrinmayeh, H.; Kitos, P. A.; Thompson, S. C. Synthesis and Evaluation of Aborted and Extended CC-1065 Functional Analogues: (+)-and (-)-CPI-PDEi, (+)-and (-)-CPI-CDPII, and (frizz (+y , and (-)-CPI-CDPI3. Preparation of Key Partial Structures and Definition of an Additional Functional Role of the CC-1065 Central and Right-Hand Subunits. *J. Am. Chem. Soc.* 1990,112,4623-4632. (c) Warpehoski, M. A.; McGovern, P.; Mitchell, M. A.; Hurley, L. H. Contrasting Mechanisms for the Sequence Recognition of DNA by (+)-and (-)-CC-1065. In *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions* Pullman, B.; Jortner, J. Eds., Kluwers Academic Publishers, Netherlands, 1990,531-550.

28. (a) Stinson, S. C. FDA May Confer New Status on Enantiomers. Client. & Eng. Nelt7s June 21997, 28-29. (b) White, R. H.; Parsons, P. G.; Prakash, A. S.; Young, D. J. The In-vitro and DNA Alkylating Ability of the Simplest Functional Analogues of the *seco* CC-1065 Alkylating Subunit. Bioorg, Med. Client. Lett. 1995,5,1869-1874. (c) Baird, R.; Winstein, S. Neighboring Carbon and Hydrogen. LI. Dienones and Arl-3 Participation. Isolation and Behavior of Spiro (2,5) octa-1, 4-diene-3-one. J. Am. Client. Soc. 1963,85,567-578.
29. Boger, D. L.; McKie, J. A.; Nishi, T.; Ogiku, T. Total Synthesis of (+)-Duocarmycin A, epi- (+)-Duocarmycin A and Their Unnatural Enantiomers: Assessment of Chemical and Biological Properties. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 311-325.
30. (a) Warpehoski, M. A. Total Synthesis of U-71,184, A Potent New Antitumor Agent Modeled on CC-1065. Tetrahedron Lett. 1986,27,4103-4106. (b) Boger, D. L.; McKie, J. A. An Efficient Synthesis of 1, 2,9,9a-Tetrahydropropa [c] benzo [e] indol-4-one (CBI): An Enhanced and Simplified Analog of the CC-1065 and Duocarmycin Alkylation Subunits. J. Org. Clivent. 1995,60,1271-1275. (c) Lukhtanov, E. A.; Kutyavin, I. V.; Gorn, V. V.; Reed, M. W.; Adams, A. D.; Lucas, D. D. Meyer, R. B. Jr. Sequence and Structure Dependence of the Hybridization-Triggered Reaction of Oligonucleotides Bearing Conjugated Cyclopropapyrroloindole. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 6214-6225.
31. Ling, L.; Lown, J. W. Enzymatic Preparation of Optically Active Precursors of CPI, the DNA Alkylation Subunit of the Naturally Occurring Antitumor Antibiotic CC-1065. J. C. S. Client. Commun. 1996,1559-1560.
32. Aristoff, P. A.; Johnson, P. D. Synthesis of CBI-PDE-I Dimer, the Benzannelated Analogue of CC-1065. J. Org. Chem. 1992,57,6234-6239.
33. (a) Sugiyama, H.; Lian, C.; Isomura, M.; Saito, I.; Wang, A. H-J. Distamycin A modulates the sequence specificity of DNA alkylation by Duocarmycin A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996,93,14405-14410. (b) Fujiwara, T.; Tao, Z-F.; Ozeki, Y.; Saito, I.; Wang, A. H-J.; Lee, M.; Sugiyama, H. Modulation of Sequence specificity of Duocarmycin-dependent DNA alkylation by pyrrole-imidazole triamides. J. Am. Chem. Soc. 1999,121,7706-7707. (c) Tao, Z-F.; Fujiwara, T.; Saito, I.; Sugiyama, H. Sequencespecific DNA

alkylation by hybrid molecules between segment A of Duocarmycin A and pyrrole/imidazole diamide. *Angew. Chem. Intl. Ed.* 1999,38,650-653.

(d) Tao, Z-F.; Saito, I.; Sugiyama, H. Highly cooperative DNA dialkylation by the homodimer of imidazole-pyrrole diamide-CPI conjugate with vinyl linker. *J. Am. Chem. Soc.* 2000,122, 1602-1608.

34. (a) Tao, Z-F.; Fujiwara, T.; Saito, I.; Sugiyama, H. Rational design of sequence-specific DNA alkylating agents based on Duocarmycin A and pyrrole-imidazole hairpin polyamides. *J. Am. Chem. Soc.* 1999,121,4961-4967. (b) Tao, Z-F.; Fujiwara, T.; Saito, I.; Sugiyama, H. Sequence-specific alkylation of DNA by Duocarmycin A and its novel derivatives bearing Py/Im polyamides. *Nucleosides & Nucleotides* 1999,18,1615-1616.

35. (a) White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. Recognition of the four Watson-Crick base pairs in the minor groove by synthetic ligands. *Nature* 1998, 391,468-471. (b) Urbach, A. R.; Szewczyk, J. W.; White, S.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. Sequence selectivity of 3-hydroxypyrrole/Pyrrole ring pairings in the minor groove. *J. Am. Chem. Soc.* 1999,121,11621-11629.

36. Yang, X-L.; Kaenzig, C.; Lee, M.; Wang, A. H-J. Binding of AR-1-144, a tri-imidazole DNA minor groove binder, to CCGG sequence analyzed by NMR spectroscopy. 1999, *Eur. J. Biochem.* 1999,263,646-655.

37. Yang, X-L.; Hubbard IV, R. B.; Lee, M.; Tao, Z-F.; Sugiyama, H.; Wang, A. H-J. Imidazole-imidazole pair as a minor groove recognition motif for T: G mismatched base pairs. *Nucl. Acids Res.* 1999,27,4283-4190.

38. (a) Gottesfeld, J. M.; Neely, L.; Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. Regulation of gene expression by small molecules. *Nature* 1997,387,202-205. (b) Mapp, A. K.; Ansari, A. Z.; Ptashe, M.; Dervan, P. B. Activation of gene expression by small molecule transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000,97,3930-3935.

39. Ullman, F.; Bruck, W. 2,4-Dinitro-a-naphthol. *Ber.* 1909,41,3932-3939; *Chem. Abstr.* 1909,3,435. Talen, H. W. Replacement of the halogen atom or the alkyl group in 1-chloro-, 1-methoxy-, 1-ethoxy-2,4-dinitro-, and-2,4,5-trinitronaphthalenes by various other groups. *Rec. Trav. Chine.* 1928,47,346-362.

-
40. Hartley, J. A.; Webber, J.; Wyatt, M. D.; Bordenick, N.; Lee, M. Novel Cytotoxic DNA Sequence and Minor Groove Targeted Photosensitizers: Conjugates of Pyrene and Netropsin Analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 1995,3,623-629.
41. Ponti, M.; Forrow, S. M.; Souhami, R. L.; D'Incalci, M.; Hartley, J. A. Measurement of the Sequence Specificity of Covalent DNA Modification by Antineoplastic Agents Using Taq DNA Polymerase. *Nucl. Acids Res.* 1991, 19, 2929-2933.
42. Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gadzar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B.; Evaluation of a Tetrazolium-based Semi-automated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Res.* 1987,47,936-946.
43. Skehan, P.; Storen, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Visitica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, S. K.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990,82 1107-1112.
44. (a) Boyd, R. B. Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen. *Principles & Practices of Oncology* 1989,3,1-12. (b) Boyd, R. B. The NCI In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. In *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval* Teicher, B. Ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1997,23-42.
45. Hollingshead, M. G.; Alley, M. C.; Camalier, R. F.; Abbott, B. J.; Mayo, J. G.; Malspeis, L.; Grever, M. R. In Vivo Cultivation of Tumor Cells in Hollow Fibers. *Life Sciences* 1995,57,131-141.