



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103113365 B

(45) 授权公告日 2015.06.17

(21) 申请号 201310056546.4

审查员 张建宏

(22) 申请日 2013.02.22

(73) 专利权人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市工业园区仁爱路  
199 号

(72) 发明人 李环球 许芸芸

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

代理人 范晴

(51) Int. Cl.

C07D 417/14(2006.01)

A61K 31/517(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页

(54) 发明名称

罗丹宁喹唑啉胺复合物及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种式(I)的化合物

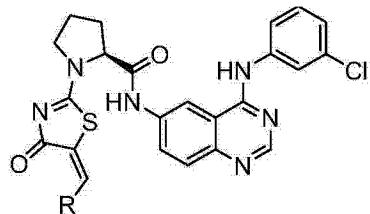


或其药学上可接受的

I

盐;其中R为芳基或杂环基,其可任选被一个或多个选自下列的基团所取代:C1-8烷基、C1-8烷氧基、卤素、硝基、C1-8氨基烷基、C1-8烷基氨基、C1-8硫代烷基、C1-8卤代烷基、C1-8卤代烷氧基、苯基、卤代苯基。经活性研究证实:该化合物具有与阳性药物埃罗替尼类似的活性,可以应用于治疗肿瘤包括实体瘤等的药物方面。

1. 一种式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，



1

其中，所述的式(I)的化合物选自(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧代-5-(噻吩-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-([1,1'-联苯]-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧代-5-(5-溴-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧代-5-(6-溴-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧代-5-(2-氯-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧代-5-(6-甲基-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧代-5-(2-氯苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-氯苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(4-氯苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(3-氯苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-溴苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-氟苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-甲氧基苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(4-甲氧基苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(3-溴苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-硝基苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺。

2. 一种药物组合物，其特征在于所述药物组合物包括权利要求 1 中的化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的稀释剂或载体。

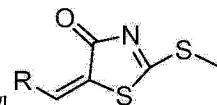
3. 一种权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗肿瘤的药物方面的应用。

4. 一种制备权利要求 1 所述的化合物的方法，其特征在于所述方法包括以下步骤：

(1) 在酸性条件下使式 (II) 的化合物  $\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{II}$  与罗丹宁发生羟醛缩合反应形成式



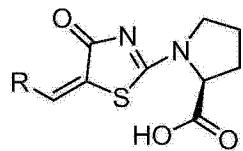
III ;



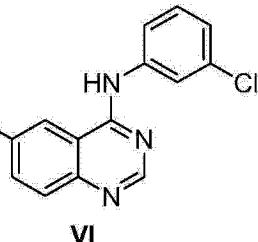
(2) 式 (III) 化合物与碘甲烷发生甲基化反应形成式 (IV) 的化合物

IV ;

(3) 式 (IV) 的化合物与 L- 脯氨酸发生亲核取代反应形成式 (V) 的化合物



V ;



(4) 式 (V) 的化合物与式 (VI) 的喹唑啉胺 发生反应, 形成式

(I) 的化合物；

其中所有步骤中 R 基团如权利要求 1 定义。

## 罗丹宁喹唑啉胺复合物及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于制药技术领域,具体涉及一种罗丹宁喹唑啉胺复合物及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 肿瘤是严重危害人类生命健康的重大疾病,目前,临床治疗上常用的抗肿瘤药物主要是细胞毒类药物,这类抗癌药具有难以避免的选择性差、毒副作用强、易产生耐药性等缺点,极大地制约了临床效用的发挥。近年来,随着生命科学的研究的飞速进展,恶性肿瘤细胞内的信号转导、细胞周期的调控、细胞凋亡的诱导、血管生成以及细胞与胞外基质的相互作用等各种基本过程正逐步被阐明。以一些与肿瘤细胞增殖及凋亡相关的细胞信号转导通路的关键酶作为药物筛选靶点,发现选择性作用于特定靶点、抗肿瘤活性好、毒副作用小的新型小分子先导药物已成为当今抗肿瘤药物研究开发的重要方向。罗丹宁是一种硫代喹唑烷酮类化合物,在医药、生物领域中具有十分重要的地位,对肿瘤有很好的药效。

[0003] 申请人前期研究发现的罗丹宁酰基磺酰胺衍生物,这些新型衍生物对 Bcl-2 蛋白具有很好的亲和性(Bcl-2 :Ki=20nM, Bcl-xL :Ki=15nM);并对多种肿瘤细胞株有较好的促进凋亡作用并且克服了现有抗肿瘤药 ABT737 水溶性差的缺点,参见 2011 年 5 月 18 日公开的中国专利申请 201110003962.9,名称为罗丹宁衍生物作为抗肿瘤药物的应用。而喹唑啉胺也是一类非常好的抗肿瘤药物,目前市场上的抗肿瘤药物吉非替尼和埃罗替尼都是喹唑啉胺类的小分子化合物。

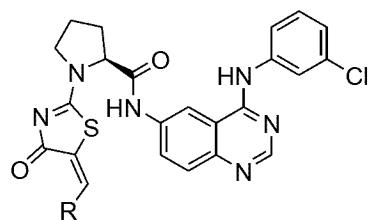
### 发明内容

[0004] 本发明目的在于提供一种罗丹宁喹唑啉胺复合物,提供了一种新的抗肿瘤药物,为预防和治疗肿瘤疾病提供了新的选择。

[0005] 为了解决现有技术中的这些问题,本发明提供的技术方案是:

[0006] 一种式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,

[0007]



I ;

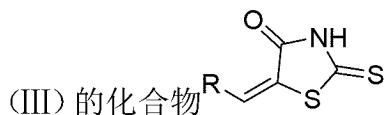
[0008] 其中 R 为芳基或杂环基,其可任选被一个或多个选自下列的基团所取代:C1-8 烷基、C1-8 烷氧基、卤素、硝基、C1-8 氨基烷基、C1-8 烷基氨基、C1-8 硫代烷基、C1-8 卤代烷基、C1-8 卤代烷氧基、苯基、卤代苯基。

[0009] 优选的,芳基选自苯基、萘基。

- [0010] 优选的，杂环基选自吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、喹啉基或咪唑基。
- [0011] 优选的，所述芳基或杂环基任选被一个或多个选自下列的基团所取代：C1-4 烷基、卤素、C1-4 烷氧基、硝基、C1-4 卤代烷基、C1-4 卤代烷氧基、苯基、卤代苯基。
- [0012] 优选的，所述芳基或杂环基任选被一个或多个选自下列的基团所取代：甲基、乙基、卤素、甲氧基、乙氧基、硝基、苯基。
- [0013] 优选的，所述的式(I)的化合物选自(S, E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧化-5-(噻吩-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-([1,1'-联苯]-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧化-5-(5-溴-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧化-5-(6-溴-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧化-5-(2-氯-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧化-5-(6-甲基-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧化-5-(喹啉-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-氯苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(4-氯苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-溴苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-氟苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-甲氧基苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(4-甲氧基苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-硝基苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺、(S,E)-1-(5-(2-硝基苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺。
- [0014] 本发明的另一目的在于提供一种药物组合物，其特征在于所述药物组合物包括所述的化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的稀释剂或载体。
- [0015] 本发明的又一目的在于提供一种所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗肿瘤的药物方面的应用。
- [0016] 本发明的又一目的在于提供一种制备式(I)的化合物方法，其特征在于所述方法包括以下步骤：

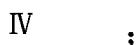
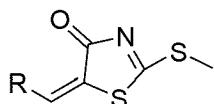


[0017] (1) 在酸性条件下使式(II)的化合物与罗丹宁发生羟醛缩合反应形成式 II



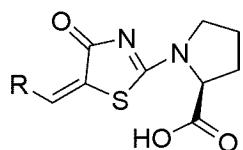
[0018] (2) 式(III)化合物与碘甲烷发生甲基化反应形成式(IV)的化合物

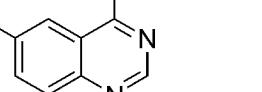
[0019]



[0020] (3) 式(IV)的化合物与 L-脯氨酸发生亲核取代反应形成式(V)的化合物

[0021]



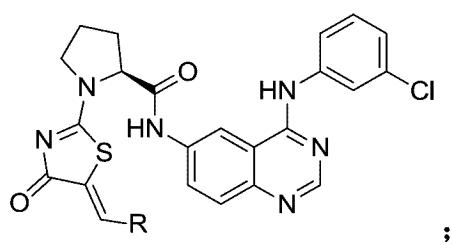
[0022] (4) 式(V)的化合物与式(VI)的喹唑啉胺  发生反应, 形成

式(I)的化合物;

[0023] 其中所有步骤中 R 基团如权利要求 1 定义。

[0024] 本发明提供了一类罗丹宁衍生物与喹唑啉胺的复合物, 它有如下通式:

[0025]



;

[0026] 式中: R 选自杂环基、取代杂环基、取代芳基、芳基。

[0027] 优选的式(I)的化合物中, R 选自噻吩基、卤代噻吩基、吡啶基、卤代吡啶基、苯基、卤代苯基、硝基苯基、甲基苯基、三氟甲基苯基、甲氧基苯基、联苯基、萘基、卤代苯基。当 R 选自取代芳基时, 芳基上的取代位置可以是间位、邻位、对位。

[0028] 本发明涉及罗丹宁衍生物与喹唑啉胺的复合物以及这些化合物的制备方法和用途。本发明人进一步寻找到高活低毒且生物利用度高的小分子抗肿瘤先导化合物，克服肿瘤细胞的耐药性，在中国专利申请 201110003962.9，名称为罗丹宁衍生物作为抗肿瘤药物的应用的研究工作基础上，本发明人设计并合成了罗丹宁衍生物与喹唑啉胺的复合物，并研究其作为新型小分子抗肿瘤先导药物的可能性。本发明的目的在于发明一类新的化合物，即罗丹宁衍生物与喹唑啉胺的复合物以及这些化合物的制备方法和用途。

[0029] 本发明中的各基团一般具有如下意义：

[0030] 术语“烷基”指直链或支链；C<sub>1-n</sub> 烷基则表示 1-n 个碳原子的饱和的脂烃基，包括直链和支链基团(例如“C<sub>1-20</sub> 烷基”，是指该基团为烷基，且烷基的碳链碳原子数量在 1 ~ 20 之间，即含 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子等，直至包括 20 个碳原子的烷基。而该 1-20 的限制并不包括烷基上的取代的碳原子数，如取代烷氨基中的“烷基”，当没有特别限制其碳原子数时，仅指其中指明的烷基部分的碳原子数为 1-20，而并不包括烷基上的取代基的碳原子数以及氨基上的其他取代基的碳原子数。而采用“C<sub>1-8</sub> 烷基”的表述则表示该烷基中含有 1 ~ 8 个碳原子的烷基。)

[0031] 术语“烷氧基”为通过氧原子连接的烷基；如 C<sub>1-8</sub> 烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基；C<sub>1-8</sub> 烷氧基，是指烷氧基中的烷基的碳原子数为 1 ~ 8。

[0032] 卤代烷基，表示卤素原子取代的烷基，该取代包括单取代和多取代，其中烷基的概念如上所述。C<sub>1 ~ 8</sub> 卤代烷基，是指卤代烷基中的烷基的碳原子数为 1 ~ 8。卤代烷基指烷基上 H 原子被卤素原子取代的基团；如全氟烷基是指烷基上的 H 全部被 F 取代的基团。

[0033] 烷基氨基的结构为：烷基 -NH-。氨基烷基的结构为 :NH<sub>2</sub>- 烷基 -。硫代烷基是指具有硫原子取代的烷基。

[0034] 杂环基，是指含有 N、O、S 等杂原子的由 3 到 8 个环原子的环状基团，在该基团中，杂原子可以只含有 N 原子，也可以含有 O 或 S 原子。其中杂原子的数目可以为一个，也可以为多个。该杂环可以为饱和的类环烷结构，也可以为不饱和的芳环类结构。更具体地，该术语含氮杂环基包括但不限于吡咯基、四氢吡咯基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、哌嗪基、嘧啶基、咪唑基、吡啶基、噻吩基、喹啉基等。

[0035] 应清楚的是，某些式(I)化合物可呈现互变异构现象。式(I)化合物可以以未溶剂化的形式存在，也可以以溶剂化的形式存在。甚至，本发明某些式(I)化合物可以存在多晶现象。

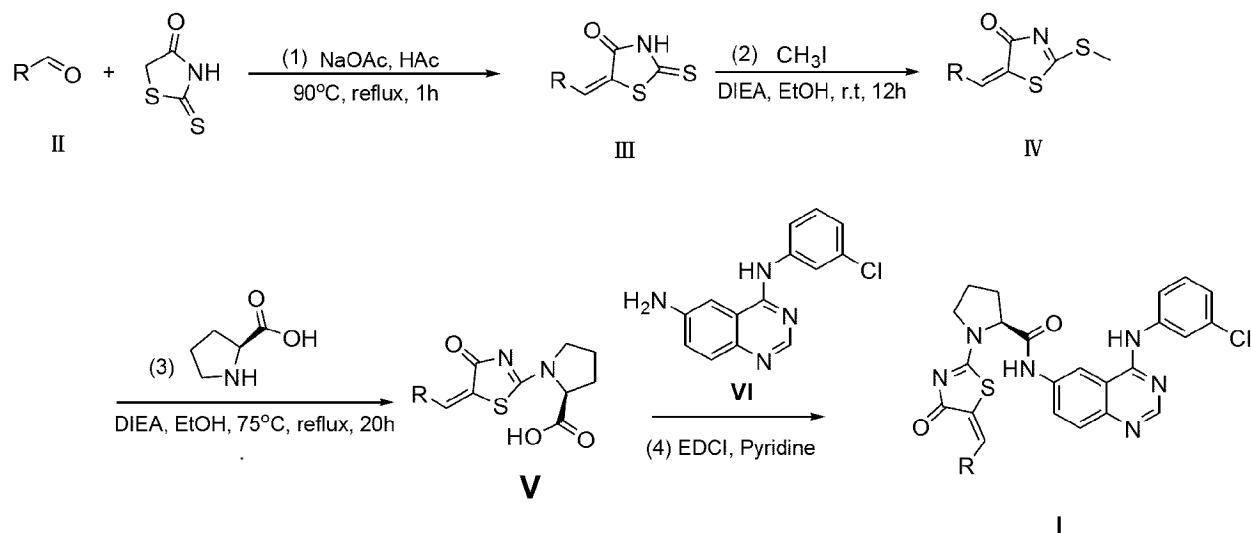
[0036] 式(I)化合物的适合的药学上可接受的盐可以是式(I)化合物的酸加成盐，可以是以下无机或有机酸所生成的酸 - 加成盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、三氟乙酸、柠檬酸或马来酸；可以是具有足够酸性的式(I)化合物的盐，如碱金属盐或碱土金属盐(钙盐、镁盐或铵盐等)。式(I)化合物的另一种适合的药学上可接受的盐可以是在给予式(I)化合物后在人或动物体内形成的盐。

[0037] 本发明的又一目的在于提供一种药物组合物，其特征在于所述药物组合物包括化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的稀释剂或载体。

[0038] 可将本发明的化合物以前药的形式给药。前药是指经过生物体内转化后才具有药理作用的化合物。可使用前药改变本发明化合物的物理化学性质或药物动力学方面性质。当本发明的化合物含有可连接改变性质基团的适当基团或取代基团时，可形成前药。

[0039] 本发明的式(I)的化合物按照如下路线进行合成：

[0040]



[0041] 其具体合成试验可以按照如下步骤进行：(1) 羟醛缩合反应：将取代醛 II (10mmol, 1eq)，罗丹宁 (10mmol, 1eq)，无水醋酸钠 (35mmol, 3.5eq) 加入到 250ml 圆底烧瓶中，加入 100ml 醋酸，90℃条件下回流搅拌反应 24h, N<sub>2</sub>保护。将反应液降至室温，加入 360ml 水，析出黄色固体，抽滤，水洗，红外灯下干燥。得黄色固体产物 III。

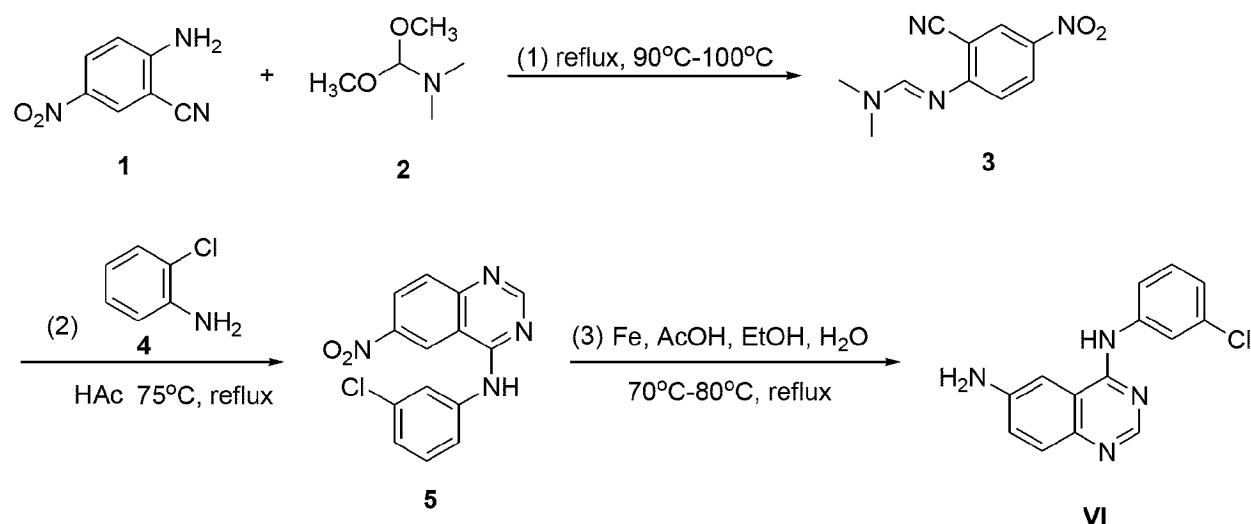
[0042] (2) 采用经典的甲基化反应原理，以碘甲烷作为甲基化试剂对底物进行甲基化。将 III (1mmol, 1eq), DIEA (1.5mmol, 1.5eq) 加入到 100ml 圆底烧瓶中，加入 50ml 无水乙醇，搅拌下加入碘甲烷 (1.5mmol, 1.5eq)，室温下搅拌反应过夜。加水析出大量晶体，抽滤，所得固体用 DCM 溶解，干法柱层析，洗脱剂体系 :PE:EA=30:1. 得黄色固体 IV。

[0043] (3) 因甲硫基较容易离去，以脯氨酸为亲核试剂取代底物中的甲硫基，得到中间体。将 IV (0.5mmol, 1eq), L-脯氨酸 (0.5mmol, 1eq), DIEA (0.5mmol, 1eq) 加入到 50ml 圆底烧瓶中，加入 5ml 无水乙醇，在 75℃下回流搅拌 20h. 在反应液中加入 2mol/L HCl 淬灭反应，EA 萃取，减压浓缩，有刺激性臭味，干法柱层析，洗脱剂体系 :DCM:MeOH=50:1 (常压) 体系。得产物 V。

[0044] (4) 经典的形成酰胺键的反应，分别以羧酸和伯胺为反应底物在常用的缩合剂 EDCI 作用下合成酰胺产物。将 V (0.1mmol, 2eq), 喹唑啉胺 VI (0.053mmol, 1eq) 加入到 25ml 的茄形瓶中，加入 Pyridine 0.5ml 溶解，加入 EDCI (0.2mmol, 2eq)，室温下搅拌反应 12h, TLC 监测。反应液用 EA 稀释，饱和 NaCl 溶液洗 4 次，水洗多次，减压浓缩，干法柱层析，洗脱剂体系 :PE:EA=1 :1. 得产物 I。

[0045] 其中喹唑啉胺 VI 可以按照如下步骤路线进行合成：

[0046]



[0047] 具体的实验步骤可以为：

[0048] (1) Mannich 反应：以性质更活泼的 N,N-二甲基二甲缩醛代替 DMF 与底物进行亲核加成 - 消除反应形成 Mannich 碱。将 1(30mmol, 1eq)加入到 2(10ml, 75.3mmol, 2.51eq) 中，在 100°C 下加热回流 2h，反应完后室温下冷却将沉淀过滤用乙醚洗，置红外下干燥，得产物 3。

[0049] (2) 成环反应：将 3 (11mmol, 1.1eq) 加入到烧瓶中，加入乙酸 20ml，缓慢加入 4 (10mmol, 1eq)，在 75°C 下回流 2h，将得到的黄色沉淀用热的乙酸趁热过滤，热的乙醚洗，置红外下干燥。得产物 5。

[0050] (3) 还原反应：以常用试剂醋酸作为供氢体在还原铁粉的作用下将硝基还原成伯胺。将 5 (6.66mmol, 1eq), Fe 粉 (53.72mmol, 6.7eq) 和醋酸 (89.80mmol, 13.5eq) 加入到乙醇水溶液中 (77.8%, 180ml)，在 75°C 下加热回流两小时，反应完冷却至室温，倒入烧杯中，加入 40ml 浓氨水进行碱化，硅胶过滤将反应液减压浓缩，除去乙醇，用乙酸乙酯萃取三遍，合并有机相，干燥，过滤旋干。柱层析得产物喹唑啉胺 VI。

[0051] 为制备相应的药物组合物，除了至少一种本发明的活性物质外，还使用载体材料、填料、溶剂、稀释剂、着色剂或粘结剂。助剂的选择及其用量取决于该药物的给药途径，如口服、静脉注射、腹腔注射、皮内、肌肉、鼻内或局部使用。片剂、包衣片、胶囊、颗粒剂、滴剂、液体剂型以及糖浆剂等形式的制剂适于口服，而溶液、悬浮剂、喷雾剂等适用于非肠道、局部和吸入给药。给患者或实验动物给药剂量根据患者或动物的体重、施用方式、指症和病症情况给药。

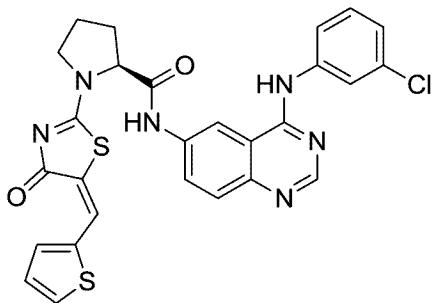
[0052] 本发明的化合物经药物活性研究证实，该化合物具有与阳性药物埃罗替尼类似的活性，可以应用于治疗肿瘤包括实体瘤等的药物方面。

### 具体实施方式

[0053] 以下结合具体实施例对上述方案做进一步说明。应理解，这些实施例是用于说明本发明而不限于限制本发明的范围。实施例中采用的实施条件可以根据具体厂家的条件做进一步调整，未注明的实施条件通常为常规实验中的条件。

[0054] 实施例 1：(S,E)-N-((4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)-1-(4-氧化-5-(噻吩-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0055]

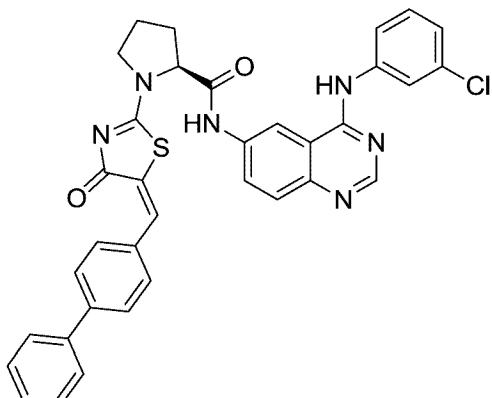


[0056] 将 嘴 吩 -2- 甲 醛(10mmol, 1eq), 罗 丹 宁 (10mmol, 1eq), 无 水 醋 酸 钠 (35mmol, 3.5eq) 加入到 250ml 圆底烧瓶中, 加入 100ml 醋酸, 90 °C 条件下回流搅拌反应 24h, N2 保护. 将反应液降至室温, 加入 360ml 水, 析出黄色固体, 抽滤, 水洗, 红外灯下干燥, 得黄色固体产物. 将得到的产物(1mmol, 1eq), DIEA(1.5mmol, 1.5eq) 加入到 100ml 圆底烧瓶中, 加入 50ml 无水乙醇, 搅拌下加入碘甲烷(1.5mmol, 1.5eq), 室温下搅拌反应过夜. 加水析出大量晶体, 抽滤, 所得固体用 DCM 溶解, 干法柱层析, 洗脱剂体系 :PE:EA=30:1. 得黄色固体. 将得到的黄色固体(0.5mmol, 1eq), L- 脯氨酸 (0.5mmol, 1eq), DIEA(0.5mmol, 1eq) 加入到 50ml 圆底烧瓶中, 加入 5ml 无水乙醇, 在 75 °C 下回流搅拌 20h. 在反应液中加入 2mol/L HC1 淬灭反应, EA 萃取, 减压浓缩, 有刺激性臭味, 干法柱层析, 洗脱剂体系 :DCM:MeOH=50:1(常压) 体系. 得黄色固体. 将得到的固体(0.1mmol, 2eq), 喹唑啉胺 (0.053mmol, 1eq) 加入到 25ml 的茄形瓶中, 加入 Pyridine0.5ml 溶解, 加入 EDCI(0.2mmol, 2eq), 室温下搅拌反应 12h, 反应完, 反应液用 EA 稀释, 饱和 NaCl 溶液洗 4 次, 水洗多次, 减压浓缩, 干法柱层析, 洗脱剂体系 :PE:EA=1 :1. 得目标产物. 产率 35%。

[0057] Mp214–215°C . ESI-MS :560.0856. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.75 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.01 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.94 (d, J=4.6Hz, 2H), 7.69 (d, J=8.7Hz, 1H), 7.60 (d, J=4.9Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.30 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.22 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.06 (d, J=7.6Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.90 (s, 1H), 2.64 (d, J=23.3Hz, 2H), 2.50 (s, 1H), 2.30 (s, 1H)。

[0058] 实施例 2 :(S, E)-1- (5- ((1,1'-联苯 )-4- 基亚甲基) -4- 氧代 -4,5- 二氢噻唑 -2- 基) -N- (4- ((3- 氯苯基) 氨基) 噻唑啉 -6- 基) 吡咯烷 -2- 甲酰胺

[0059]



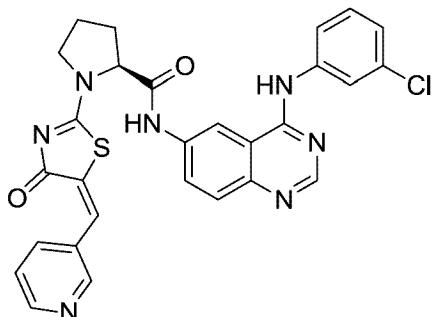
[0060] 制备方法同实施例 1。以 4- 苯基 - 苯甲醛代替嘴吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合

物,产率 42%。

[0061] Mp203–204 °C . ESI-MS :630. 1605.  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10. 78(s, 1H), 8. 62(s, 1H), 8. 53(s, 1H), 8. 03(d,  $J=8. 0\text{Hz}$ , 1H), 7. 95(s, 1H), 7. 83(s, 1H), 7. 74 – 7. 66(m, 3H), 7. 62(d,  $J=8. 6\text{Hz}$ , 4H), 7. 47(t,  $J=7. 4\text{Hz}$ , 2H), 7. 40(d,  $J=7. 5\text{Hz}$ , 1H), 7. 31(d,  $J=8. 2\text{Hz}$ , 1H), 7. 22(s, 1H), 7. 06(d,  $J=7. 9\text{Hz}$ , 1H), 5. 48(s, 1H), 4. 12(d,  $J=6. 9\text{Hz}$ , 1H), 3. 92(s, 1H), 2. 79 – 2. 46(m, 3H), 2. 33(s, 1H)。

[0062] 实施例 3 : (S,E)-N- (4- ((3- 氯苯基)氨基)喹唑啉 -6- 基 -1- (4- 氧代 -5- (吡啶 -3- 基亚甲基) -4,5- 二氢噻唑 -2- 基) 吡咯烷 -2- 甲酰胺

[0063]

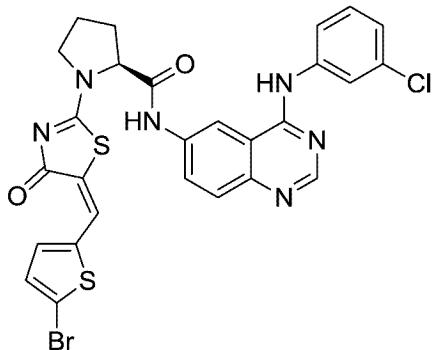


[0064] 制备方法同实施例 1。以吡啶 -3- 甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 38%。

[0065] Mp230–231°C . ESI-MS :555. 1244.  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO)  $\delta$  10. 64(s, 1H), 8. 79(s, 1H), 8. 58(dd,  $J=29. 4, 10. 6\text{Hz}$ , 3H), 8. 01(d,  $J=7. 6\text{Hz}$ , 1H), 7. 92(s, 1H), 7. 83(d,  $J=8. 2\text{Hz}$ , 1H), 7. 76(s, 1H), 7. 68(d,  $J=8. 9\text{Hz}$ , 1H), 7. 41(dd,  $J=8. 0, 5. 0\text{Hz}$ , 1H), 7. 30(d,  $J=8. 2\text{Hz}$ , 1H), 7. 23(d,  $J=8. 9\text{Hz}$ , 2H), 7. 06(d,  $J=8. 1\text{Hz}$ , 1H), 5. 44(dd,  $J=8. 5, 3. 9\text{Hz}$ , 1H), 4. 09(t,  $J=14. 1\text{Hz}$ , 1H), 3. 89(dd,  $J=17. 6, 7. 5\text{Hz}$ , 1H), 2. 69(d,  $J=7. 5\text{Hz}$ , 1H), 2. 64(d,  $J=11. 6\text{Hz}$ , 1H), 2. 51(dd,  $J=17. 7, 10. 1\text{Hz}$ , 1H), 2. 38 – 2. 23(m, 1H)。

[0066] 实施例 4 : (S, E)-N- (4- ((3- 氯苯基) 氨 基) 喹 咪 啉 -6- 基) -1- (4- 氧 代 -5- (5- 溴 - 噻 哌 -2- 基亚甲基) -4,5- 二 氢 噻 哌 -2- 基) 吡 咯 烷 -2- 甲 酰 胺

[0067]



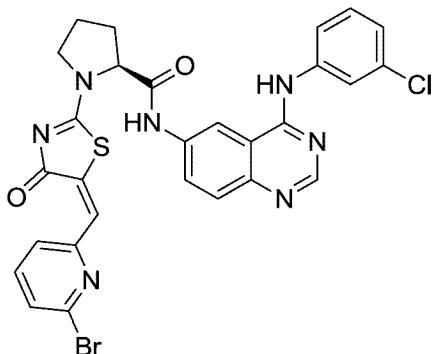
[0068] 制备方法同实施例 1。以 5- 溴 - 噻 哌 -2- 甲 酰 胺 代替 噻 哌 -2- 甲 酰 胺, 得 到 黄 色 目 标 化 合 物, 产 率 52%。

[0069] Mp194–195°C . ESI-MS :637–9961.  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10. 68(s, 1H), 8. 54(d,  $J=23. 0\text{Hz}$ , 2H), 8. 03 – 7. 88(m, 2H), 7. 79(s, 1H), 7. 67(d,  $J=9. 0\text{Hz}$ , 1H), 7. 30(d,  $J=8. 0\text{Hz}$ , 1H), 7. 22(d,  $J=8. 7\text{Hz}$ , 2H), 7. 09(dt,  $J=12. 5, 5. 8\text{Hz}$ , 3H), 5. 39(dd,  $J=8. 1, 4. 1\text{Hz}$ , 1H), 4. 09(dd,

$J=19.6, 12.2\text{Hz}, 1\text{H})$ ,  $3.87(\text{dd}, J=17.4, 7.2\text{Hz}, 1\text{H})$ ,  $2.72 - 2.43(\text{m}, 3\text{H})$ ,  $2.33 - 2.23(\text{m}, 1\text{H})$ 。

[0070] 实施例 5 : (S, E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基-1-(4-氧化-5-(6-溴-吡啶-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0071]

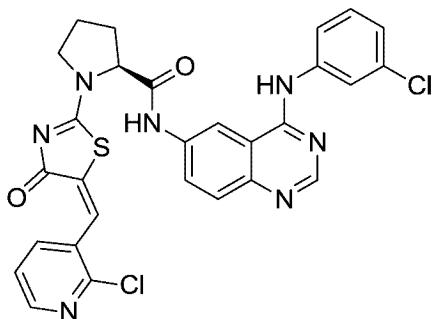


[0072] 制备方法同实施例 1。以 6-溴-吡啶-2-甲醛代替噻吩-2-甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 47%。

[0073] Mp 260–261 °C. ESI-MS : 633.0349.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.75 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.96 (d,  $J=11.6\text{Hz}$ , 2H), 7.71 (d,  $J=9.1\text{Hz}$ , 1H), 7.61 – 7.56 (m, 2H), 7.43 (d,  $J=7.9\text{Hz}$ , 1H), 7.37 (d,  $J=7.5\text{Hz}$ , 1H), 7.30 (d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 7.22 (d,  $J=8.5\text{Hz}$ , 2H), 7.06 (d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 5.48 (dd,  $J=8.3, 4.1\text{Hz}$ , 1H), 4.14 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 1H), 3.98 (dd,  $J=17.8, 7.6\text{Hz}$ , 1H), 2.73 – 2.44 (m, 3H), 2.35 – 2.23 (m, 1H)。

[0074] 实施例 6 : (S, E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基-1-(4-氧化-5-(2-氯-吡啶-3-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0075]

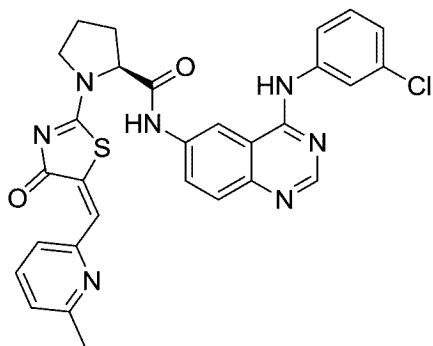


[0076] 制备方法同实施例 1。以 2-氯-吡啶-3-甲醛代替噻吩-2-甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 46%。

[0077] Mp 188–189 °C. ESI-MS : 590.4830.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.60 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.41 (d,  $J=4.8\text{Hz}$ , 1H), 8.08 – 8.01 (m, 2H), 7.93 (d,  $J=8.9\text{Hz}$ , 2H), 7.68 (d,  $J=9.1\text{Hz}$ , 1H), 7.40 – 7.34 (m, 1H), 7.30 (t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 7.25 – 7.18 (m, 2H), 7.07 (d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 5.43 (s, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.88 (s, 1H), 2.82 – 2.38 (m, 3H), 2.31 (s, 1H)。

[0078] 实施例 7 : (S, E)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基-1-(4-氧化-5-(6-甲基-吡啶-2-基亚甲基)-4,5-二氢噻唑-2-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0079]

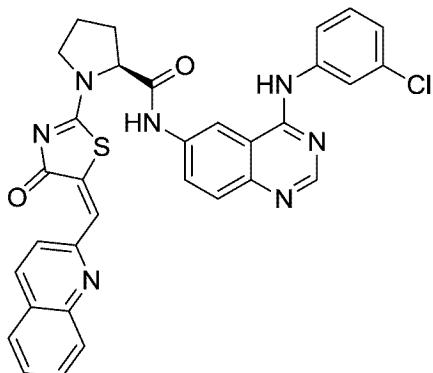


[0080] 制备方法同实施例 1。以 6- 甲基 - 吡啶 -2- 甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 23%。

[0081] Mp197–198°C . ESI-MS :569. 1401. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10. 84 (s, 1H), 8. 64 (s, 1H), 8. 52 (s, 1H), 8. 02 (d, J=7. 5Hz, 1H), 7. 97 (s, 1H), 7. 73 (d, J=9. 5Hz, 1H), 7. 67 (s, 1H), 7. 61 (t, J=7. 7Hz, 1H), 7. 30 (d, J=8. 1Hz, 1H), 7. 23 (dd, J=13. 7, 8. 2Hz, 4H), 7. 11 (d, J=7. 7Hz, 1H), 7. 05 (d, J=7. 6Hz, 1H), 5. 51 (s, 1H), 4. 14 (s, 1H), 3. 96 (d, J=9. 8Hz, 1H), 2. 66 (s, 3H), 2. 51 (s, 3H), 2. 29 (s, 1H)。

[0082] 实施例 8 : (S,E)-N- (4- ((3- 氯苯基)氨基)喹唑啉 -6- 基 -1- (4- 氧代 -5- (喹唑啉 -2- 基亚甲基) -4, 5- 二氢噻唑 -2- 基) 吡咯烷 -2- 甲酰胺

[0083]

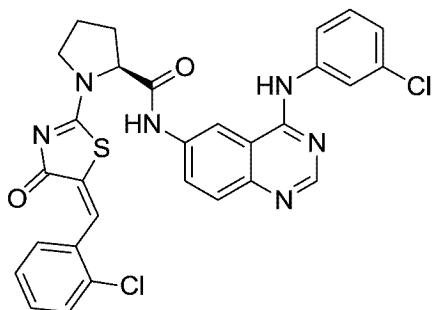


[0084] 制备方法同实施例 1。以喹唑啉 -2- 甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 23%。

[0085] Mp217–218°C . ESI-MS :605. 1401. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10. 84 (s, 1H), 8. 63 (s, 1H), 8. 50 (s, 1H), 8. 23 (d, J=8. 4Hz, 1H), 8. 17 (d, J=8. 4Hz, 1H), 7. 98 (d, J=6. 2Hz, 2H), 7. 85 – 7. 72 (m, 4H), 7. 58 (t, J=7. 5Hz, 1H), 7. 51 (d, J=8. 4Hz, 1H), 7. 28 (s, 1H), 7. 26 – 7. 20 (m, 2H), 7. 03 (d, J=8. 1Hz, 1H), 5. 54 (dd, J=8. 3, 4. 0Hz, 1H), 4. 21 (dd, J=14. 1, 9. 3Hz, 1H), 4. 07 – 3. 99 (m, 1H), 2. 76 – 2. 49 (m, 3H), 2. 38 – 2. 27 (m, 1H)。

[0086] 实施例 9 : (S, E)-1- (5- (2- 氯苯基 -4- 基亚甲基) -4- 氧代 -4, 5- 二氢噻唑 -2- 基) -N- (4- ((3- 氯苯基)氨基)喹唑啉 -6- 基) 吡咯烷 -2- 甲酰胺

[0087]

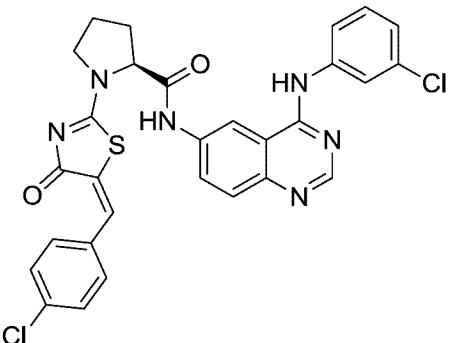


[0088] 制备方法同实施例 1。以 2- 氯苯甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 54%。

[0089] Mp 181–182 °C . ESI-MS : 588.0902.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.70 (s, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 42.3Hz, 2H), 8.13 (s, 1H), 8.05 (d,  $J$  = 8.2Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.66 (dd,  $J$  = 22.7, 8.3Hz, 2H), 7.45 (d,  $J$  = 7.6Hz, 1H), 7.34 (ddd,  $J$  = 22.3, 15.7, 7.8Hz, 3H), 7.21 (d,  $J$  = 8.6Hz, 2H), 7.06 (d,  $J$  = 7.9Hz, 1H), 5.45 (dd,  $J$  = 8.5, 4.0Hz, 1H), 4.06 (t,  $J$  = 12.2Hz, 1H), 3.87 (dd,  $J$  = 17.4, 7.5Hz, 1H), 2.81 – 2.43 (m, 3H), 2.30 (dd,  $J$  = 12.4, 5.8Hz, 1H)。

[0090] 实施例 10 : (S, E)-1-(5-(4-氯苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0091]

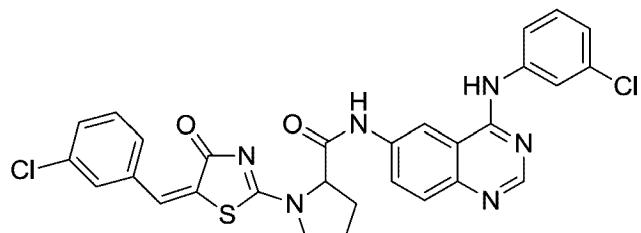


[0092] 制备方法同实施例 1。以对氯苯甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 19%。

[0093] Mp 172–173 °C . ESI-MS : 588.0902.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.70 (s, 1H), 8.56 (d,  $J$  = 28.7Hz, 2H), 8.03 (d,  $J$  = 8.2Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.74 – 7.63 (m, 2H), 7.44 (q,  $J$  = 8.7Hz, 4H), 7.29 (t,  $J$  = 8.1Hz, 1H), 7.20 (d,  $J$  = 9.4Hz, 2H), 7.06 (d,  $J$  = 7.8Hz, 1H), 5.45 (dd,  $J$  = 8.5, 3.9Hz, 1H), 4.13 – 4.02 (m, 1H), 3.89 (dd,  $J$  = 17.6, 7.3Hz, 1H), 2.77 – 2.44 (m, 3H), 2.37 – 2.23 (m, 1H)。

[0094] 实施例 11 : (S, E)-1-(5-(3-氯苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0095]

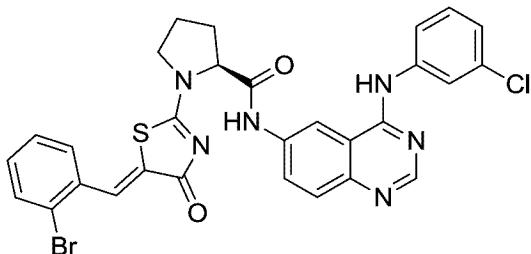


[0096] 制备方法同实施例 1。以间氯苯甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 23%。

[0097] Mp 182–183 °C . ESI-MS : 588.0902.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.68 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.01 (d,  $J=7.9\text{Hz}$ , 1H), 7.94 (s, 1H), 7.68 (d,  $J=11.9\text{Hz}$ , 1H), 7.50 (s, 1H), 7.39 (s, 2H), 7.30 (d,  $J=7.9\text{Hz}$ , 1H), 7.21 (d,  $J=10.2\text{Hz}$ , 2H) – , 7.06 (d,  $J=7.5\text{Hz}$ , 1H), 5.37 (d,  $J=57.4\text{Hz}$ , 1H), 4.17 – 3.67 (m, 2H), 2.78 – 2.39 (m, 2H), 2.31 (s, 1H), 1.93 (s, 1H)。

[0098] 实施例 12 : (S, E)-1-(5-(2-溴苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0099]

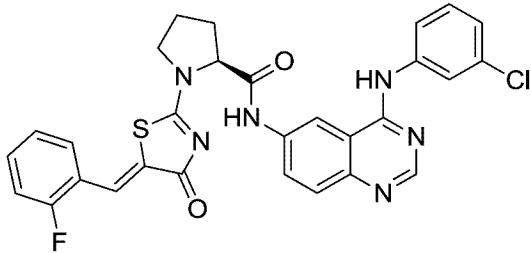


[0100] 制备方法同实施例 1。以 2-溴苯甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 37%。

[0101] Mp 200–201 °C . ESI-MS : 632.0397.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.68 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.10 – 8.03 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.72 – 7.58 (m, 3H), 7.42 (t,  $J=7.3\text{Hz}$ , 1H), 7.30 (t,  $J=8.2\text{Hz}$ , 1H), 7.23 (d,  $J=8.1\text{Hz}$ , 3H), 7.07 (d,  $J=8.1\text{Hz}$ , 1H), 5.44 (d,  $J=4.6\text{Hz}$ , 1H), 4.04 (s, 1H), 3.86 (d,  $J=10.1\text{Hz}$ , 1H), 2.78 – 2.58 (m, 2H), 2.48 (s, 1H), 2.31 (s, 1H)。

[0102] 实施例 13 : (S, E)-1-(5-(2-氟苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0103]

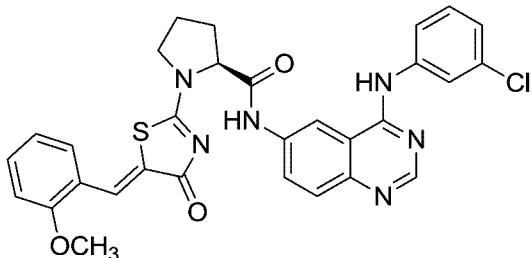


[0104] 制备方法同实施例 1。以 2-氟苯甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 32%。

[0105] Mp 182–183 °C . ESI-MS : 572.1198.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.73 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.01 (dd,  $J=23.3, 17.2\text{Hz}$ , 3H), 7.73 – 7.55 (m, 2H), 7.41 (dd,  $J=12.7, 6.6\text{Hz}$ , 1H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 7.25 – 7.19 (m, 2H), 7.16 – 7.10 (m, 1H), 7.06 (d,  $J=7.3\text{Hz}$ , 1H), 5.46 (dd,  $J=8.4, 4.1\text{Hz}$ , 1H), 4.08 (dd,  $J=11.8, 6.5\text{Hz}$ , 1H), 3.90 (t,  $J=8.8\text{Hz}$ , 1H), 2.78 – 2.44 (m, 3H), 2.36 – 2.25 (m, 1H)。

[0106] 实施例 14 : (S,E)-1-(5-(2-甲氧基苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0107]

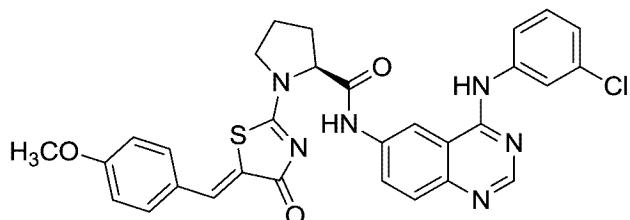


[0108] 制备方法同实施例 1。以 2- 甲氧基苯甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 43%。

[0109] Mp252–253 °C . ESI-MS :584.1397.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.02 (d,  $J=7.4\text{Hz}$ , 1H), 7.96 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.53 (d,  $J=8.1\text{Hz}$ , 1H), 7.38 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 1H), 7.30 (d,  $J=8.1\text{Hz}$ , 3H), 7.24 – 7.21 (m, 2H), 7.04 (s, 2H), 6.92 (d,  $J=8.3\text{Hz}$ , 1H), 5.43 (s, 1H), 4.03 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.54 (d,  $J=61.3\text{Hz}$ , 4H), 2.26 (s, 1H)。

[0110] 实施例 15 : (S,E)-1-(5-(4-甲氧基苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0111]

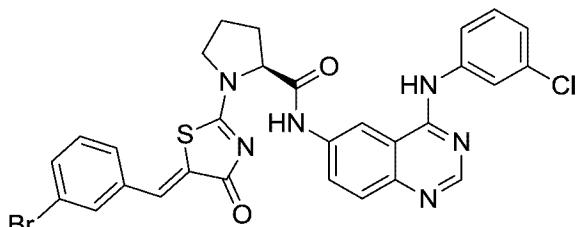


[0112] 制备方法同实施例 1。以 4- 甲氧基苯甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 33%。

[0113] Mp176–177°C . ESI-MS :584.1397.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.82 (s, 1H), 8.58 (d,  $J=46.2\text{Hz}$ , 2H), 8.08 – 7.91 (m, 2H), 7.76 – 7.65 (m, 2H), 7.49 (d,  $J=8.7\text{Hz}$ , 2H), 7.30 (d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 7.20 (d,  $J=9.3\text{Hz}$ , 2H), 7.05 (d,  $J=7.7\text{Hz}$ , 1H), 6.97 (d,  $J=8.7\text{Hz}$ , 2H), 5.45 (d,  $J=4.4\text{Hz}$ , 1H), 4.06 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 2.62 (dd,  $J=51.5, 26.0\text{Hz}$ , 4H), 2.29 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H)。

[0114] 实施例 16 : (S, E)-1-(5-(3-溴苯基-4-基亚甲基)-4-氧化-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0115]



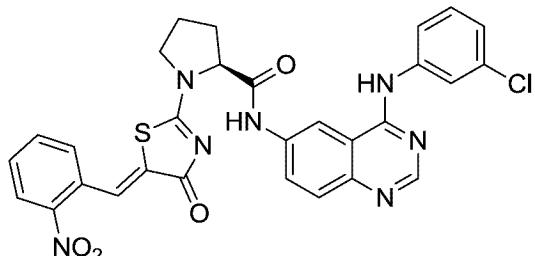
[0116] 制备方法同实施例 1。以 3- 溴苯甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 42%。

[0117] Mp184–185°C . ESI-MS :632.0397.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.68 (s, 1H), 8.56 (d,  $J=22.6\text{Hz}$ , 2H), 8.07 – 7.90 (m, 2H), 7.68 (d,  $J=13.6\text{Hz}$ , 3H), 7.53 (d,  $J=7.5\text{Hz}$ , 1H), 7.45 (d,  $J=$

7.4Hz, 1H), 7.36 – 7.28(m, 2H), 7.22(d, J=9.6Hz, 2H), 7.07(d, J=7.8Hz, 1H), 5.44(s, 1H), 4.10(s, 1H), 3.92(s, 1H), 2.76 – 2.45(m, 3H), 2.31(s, 1H)。

[0118] 实施例 17 : (S, E)-1-(5-(2-硝基苯基-4-基亚甲基)-4-氧代-4,5-二氢噻唑-2-基)-N-(4-((3-氯苯基)氨基)喹唑啉-6-基)吡咯烷-2-甲酰胺

[0119]



[0120] 制备方法同实施例 1。以 2- 硝基苯甲醛代替噻吩 -2- 甲醛, 得到黄色目标化合物, 产率 53%。

[0121] Mp187–188°C . ESI-MS : 599. 1143. <sup>1</sup>H NMR(400MHz, Acetone) δ 10.63(s, 1H), 8.65(s, 1H), 8.53(s, 1H), 8.16 – 8.02(m, 3H), 7.94(s, 1H), 7.76 – 7.63(m, 3H), 7.61 – 7.54(m, 1H), 7.31(t, J=8.1Hz, 1H), 7.22(d, J=8.7Hz, 2H), 7.08(d, J=7.9Hz, 1H), 5.41(dd, J=8.6, 4.1Hz, 1H), 3.99(d, J=7.7Hz, 1H), 3.79(dt, J=9.1, 6.0Hz, 1H), 2.78 – 2.42(m, 3H), 2.30(dd, J=12.5, 5.6Hz, 1H)。

[0122] 实施例 18 :体外抗肿瘤活性研究

[0123] 采用 MTT[3-(4,5)-双甲基-2-噻唑-(2,5)-苯基溴化四氮唑蓝]法来测定硫脲类衍生物对人体肝癌细胞株(Hep-G2)和人黑素瘤细胞株(A16-F10)的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

[0124] (1)培养液(每升)的配制 :①悬浮细胞 :RPMI-1640 培养粉一袋(10.4g), 新生牛血清 100ml, 青霉素溶液(20 万 U/ml)0.5ml, 链霉素溶液(20 万 U/ml)0.5ml, 加三蒸水溶解后, 用 5.6% 的 NaHCO<sub>3</sub>溶液调 PH 值至 7.2–7.4, 最后定容至 1000ml。过滤灭菌。②贴壁细胞 : 同上, 再加入 NaHCO<sub>3</sub>2.00g, HEPES2.38g。

[0125] (2)D-Hanks 缓冲液(每升)的配制 :NaCl8.00g, KCl0.40g, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O0.06g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.06g, NaHCO<sub>3</sub>0.35g。高压灭菌。

[0126] (3)胰蛋白酶液的配制 :利用 D-Hanks 缓冲液配成浓度为 0.5% 胰蛋白酶液。过滤除菌。

[0127] (4)实验药液的配制 :将测试样品用少量的三蒸水溶解配成储备液, 一般按实验最高浓度的 10 倍配制储备液。根据化合物溶解性不同, 可用三蒸水直接溶解, 或用少量 DMSO 助溶, 再加三蒸水溶解。DMSO 在培养液中的浓度不宜过大, 加药后的每孔细胞悬液中 DMSO 的终浓度一般不超过 0.05%–0.1%。储备液保存于 -20℃ 冰箱中备用。

[0128] (5)人肝癌细胞 HepG2 的培养 :为悬浮生长细胞, 常规培养于 RPMI-1640 培养液内(含 10% 小牛血清、100U/ml 链霉素), 置于 37°C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 每隔 3–4 天传代一次。传代时将原瓶中培养液转移至离心管中, 1000rpm 离心 5min, 弃去原培养液, 加入等量新鲜培养液, 吹打均匀, 移取适量至新鲜培养瓶中, 再补充新鲜培养液至原体积(培养液体积约为培养瓶容量的 1/10)。

[0129] (6) 人体黑素瘤细胞 A16-F10 的培养 : 为贴壁生长细胞, 常规培养于 RPMI-1640 培养液内(含 10% 小牛血清、100U/ml 链霉素), 置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每隔 3-4 天传代一次。传代时先弃去原培养液, 再用 D-Hanks 缓冲液洗涤 ; 然后用 0.5% 胰蛋白酶消化 30 秒左右, 加入少量新鲜培养液终止消化 ; 吹打, 使贴壁细胞从培养瓶壁上脱落下来 ; 移取适量至新鲜培养瓶中, 再补充新鲜培养液至原体积(培养液体积约为培养瓶容量的 1/10)。

[0130] (7) 细胞孵育 : 取对数生长期的 2 种肿瘤细胞, 调细胞悬液浓度为 1-1.5×10<sup>5</sup> 个/ml-1。在 96 孔培养板中每孔加细胞悬液 100 μl, 置 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h。培养 24h 后, 分别按设计加入药液。

[0131] (8) 加药 : 将测试药液按照最终浓度的浓度梯度分别加入到各个孔中, 每个浓度设 6 个平行孔。实验分为药物试验组(分别加入不同浓度的测试药)、对照组(只加培养液和细胞, 不加测试药)和空白组(只加培养液, 不加细胞和测试药)。将加药后的 96 孔板置于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48h。阳性对照药物的活性按照测试样品的方法测定。

[0132] (9) 存活细胞的测定 : 在培养了 48h 后的 96 孔板中, 每孔加 MTT 40 μl(用 D-Hanks 缓冲液配成 4mg/ml)。在 37℃ 放置 4h 后, 移去上清液。每孔加 150 μl DMSO, 振荡 5min, 使 formazan 结晶溶解。最后, 利用自动酶标仪在 570nm 波长处检测各孔的光密度(OD 值)。

[0133] 抑制率的计算 : 细胞生长的抑制率按照下列公式计算 :

[0134] 生长抑制率 = (1 - 存活率) × 100% = [1 - (OD<sub>实验</sub> - OD<sub>空白</sub>) / (OD<sub>对照</sub> - OD<sub>空白</sub>)] × 100% (OD<sub>实验</sub> 表示测试药物组的平均光密度, OD<sub>对照</sub> 表示对照组的平均光密度, OD<sub>空白</sub> 表示对照组的平均光密度)。

[0135] 半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)定义为当 50% 的肿瘤细胞存活时的药物浓度。根据测定的光密度(OD 值), 制作细胞生长抑制率的标准曲线, 在标准曲线上求得其对应的药物浓度。

[0136] 测得的 IC<sub>50</sub> 见表 1 所示。

[0137] 表 1 本发明所列硫脲类化合物的对肿瘤细胞的抑制 IC<sub>50</sub> 值 (μM)

[0138]

Compound	IC <sub>50</sub> (μM)		Compound	IC <sub>50</sub> (μM)	
	Hep-G2	A16-F10		Hep-G2	A16-F10
1	3.2 ± 0.12	2.5 ± 0.06	10	9.5 ± 0.25	11.3 ± 0.74
2	4.3 ± 0.13	5.4 ± 0.04	11	10.0 ± 0.21	9.2 ± 0.87
3	10.2 ± 0.42	18.8 ± 0.38	12	2.9 ± 0.86	7.7 ± 0.45
4	10.9 ± 0.11	19.4 ± 0.78	13	20.0 ± 0.18	16.6 ± 0.37
5	15.6 ± 0.27	13.9 ± 0.67	14	29.2 ± 0.37	24.8 ± 0.86
6	22.1 ± 0.82	20.2 ± 0.66	15	11.0 ± 0.21	16.7 ± 0.53
7	18.2 ± 0.21	13.6 ± 0.47	16	15.5 ± 0.15	13.8 ± 0.34
8	29.8 ± 0.51	27.8 ± 0.89	17	26.5 ± 0.23	24.1 ± 0.97
9	19.1 ± 0.76	15.6 ± 0.54	埃罗替尼	0.2	0.4

[0139] 上述实例只为说明本发明的技术构思及特点, 其目的在于让熟悉此项技术的人是能够了解本发明的内容并据以实施, 并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所做的等效变换或修饰, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。