



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108884021 B

(45) 授权公告日 2021.06.01

(21) 申请号 201780021502.4

(22) 申请日 2017.01.31

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108884021 A

(43) 申请公布日 2018.11.23

(30) 优先权数据
10-2016-0011622 2016.01.29 KR
10-2016-0011626 2016.01.29 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2017/001034 2017.01.31

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/131500 KO 2017.08.03

(73) 专利权人 恩科森株式会社
地址 韩国首尔市江南区永东大路85街20-7-5楼5-3

(72) 发明人 徐荣皓

(74) 专利代理机构 北京锺维联合知识产权代理有限公司 11579

代理人 罗银燕

(51) Int.Cl.
C07C 233/64 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A61K 31/166 (2006.01)
C07D 241/04 (2006.01)
C07B 55/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2006109075 A2, 2006.10.19
US 2007265268 A1, 2007.11.15
WO 2006117669 A1, 2006.11.09
WO 2011154708 A1, 2011.12.15
Tim N. Barrett, 等. Synthesis of C-5-substituted resorcylicates and resorcinamides.《Tetrahedron》.2014,第70卷(第38期),全文.

审查员 李国娟

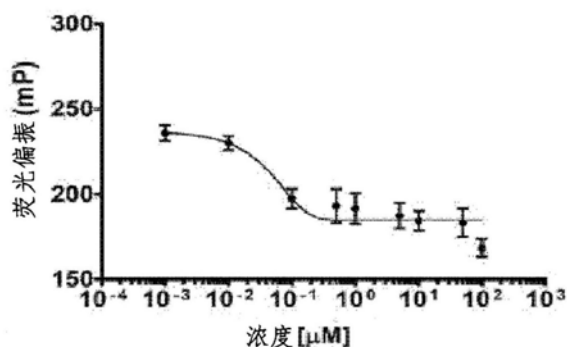
权利要求书1页 说明书32页 附图3页

(54) 发明名称

具有HSP90抑制活性的新型化合物或其药学上可接受的盐及其医疗用途

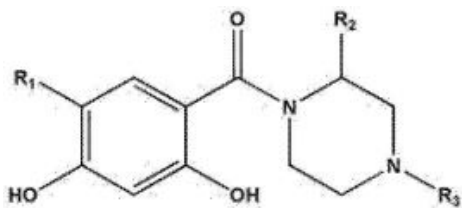
(57) 摘要

本发明涉及具有HSP90抑制活性的新型化合物或其药学上可接受的盐及其医药用途,以及包含二羟基苯基化合物或苯甲酰胺化合物的组合物,其是本发明所述具有HSP90抑制活性的新型化合物,可有效抑制HSP90,因此可有效地用作对HSP90介导的疾病进行预防或治疗的药物组合物或用于对HSP90介导的疾病进行预防或改善的保健食品,上述疾病选自由癌症疾病、退行性神经疾病和病毒感染所组成的组。



1. 由以下化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐：

[化学式1]



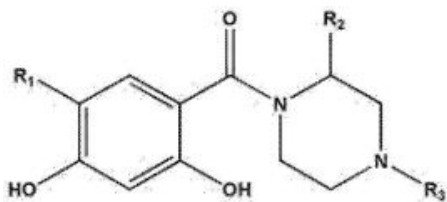
其中R₁是C1-C4烷基，

R₂是苯基，并且

R₃是甲基。

2. 一种用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行治疗的药物组合物，所述药物组合物包含由以下化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分：

[化学式1]



其中R₁是C1-C4烷基，

R₂是苯基，并且

R₃是甲基。

3. 如权利要求2所述的用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行治疗的药物组合物，其中，所述热休克蛋白90介导的疾病是选自于由癌症疾病、退行性神经疾病和病毒感染所组成的组中的一种或多种疾病。

4. 如权利要求3所述的用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行治疗的药物组合物，其中所述癌症疾病选自于由非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、皮肤癌、头颈癌、脑癌、喉癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、甲状腺癌、肾癌、直肠癌、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和血癌所组成的组。

具有HSP90抑制活性的新型化合物或其药学上可接受的盐及其医疗用途

技术领域

[0001] 本发明涉及具有HSP90抑制活性的新型化合物或其药学上可接受的盐及其医药用途。

背景技术

[0002] HSP90蛋白是真核细胞中最丰富的伴侣蛋白之一，并且负责与细胞生长分化和存活相关的各种蛋白的稳定化和活性调节。被称为客户蛋白的HSP90底物蛋白含有超过50种诱发癌症的蛋白。如果HSP90活性被抑制，则HSP90客户蛋白被蛋白酶体降解。

[0003] 因此，HSP90活性抑制剂可以同时降低各种诱发癌症的蛋白的活性，因此作为能够应用于多种癌症的抗癌剂而备受关注。特别是，已报道HSP90是具有抗性的癌症的有效疗法，因为它同时降低了各种诱发癌症的蛋白的活性。

[0004] 此外据报道，HSP90抑制剂可用作退行性神经疾病的治疗剂，因为引起退行性神经疾病的蛋白也存在于HSP90客户蛋白中。

[0005] HSP90抑制剂始于天然物质格尔德霉素 (GA) 的开发。在1994年已经发现GA通过抑制HSP90导致Src (客户蛋白) 的分解，此后已经积极地开发了靶向HSP90的抑制剂。然而，虽然GA具有强的抗癌作用，但具有肝毒性、溶解性和稳定性的问题。为了弥补这类问题，开发了诸如Tanespimycin (17-AAG)、alvespimycin (17-DMAG) 和retaspimycin的GA衍生物，但GA的结构特征尚未解决上述问题。已经在临床阶段研究了各种结构的HSP90抑制剂，但是由于尚未开发出FDA批准的药物，因此需要新的和强效的化合物。

发明内容

[0006] [技术问题]

[0007] 因此，本发明的目的是提供新型二羟基苯基化合物或苯甲酰胺化合物。

[0008] 同时，本发明的另一个目的是提供用于对HSP90介导的疾病进行预防或治疗的药物组合物，其包含新型二羟基苯基化合物或苯甲酰胺化合物作为活性成分。

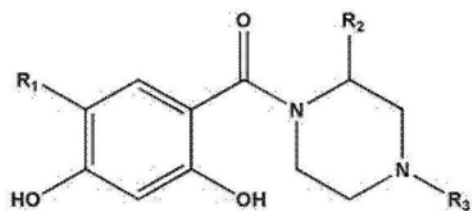
[0009] 此外，本发明的另一个目的是提供用于对HSP90介导的疾病进行预防或改善的保健食品，其包含新型二羟基苯基化合物或苯甲酰胺化合物作为活性成分。

[0010] [技术方案]

[0011] 为了实现上述目的，本发明提供由以下化学式1表示的二羟基苯基化合物、其立体异构体、其外消旋混合物或其药学上可接受的盐：

[0012] [化学式1]

[0013]



[0014] 在化学式1中，

[0015] R_1 是选自于由卤素、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种，[0016] R_2 是选自于由C3-C6环烷基、苯基、卤素、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种，并且[0017] R_3 是C1-C4烷基或C1-C4烷氧基。

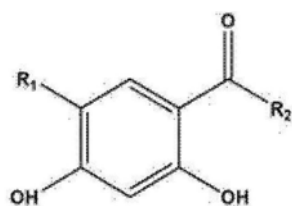
[0018] 同时，本发明提供用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行预防或治疗的药物组合物，其包含由上述化学式1表示的二羟基苯基化合物、其立体异构体、其外消旋混合物或药学上可接受的盐作为活性成分。

[0019] 此外，本发明提供用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行预防或改善的保健功能食品，其包含由上述化学式1表示的二羟基苯基化合物、其立体异构体、其外消旋混合物或药学上其可接受的盐作为活性成分。

[0020] 此外，本发明提供由以下化学式2表示的苯甲酰胺化合物或其药学上可接受的盐：

[0021] [化学式2]

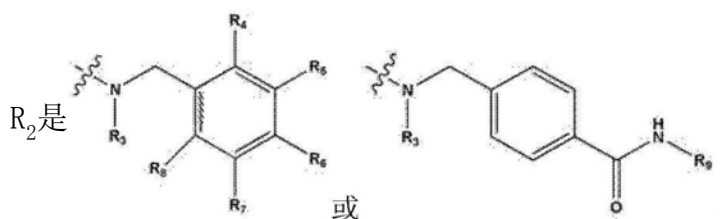
[0022]



[0023] 在化学式2中，

[0024] R_1 是卤素或C1-C4烷基，

[0025]

[0026] R_3 和 R_4 可以彼此相同或不同，并且是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种，[0027] R_5 和 R_6 可以彼此相同或不同，并且是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种，或者 R_5 和 R_6 彼此连接形成五元环或六元环，[0028] R_7 是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种，[0029] R_8 是H或卤素，[0030] R_9 是选自于由C1-C4烷基、C1-C4烷氧基和苄基所组成的组中的任意一种。

[0031] 同时，本发明提供用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行预防或治疗的药物组合物，其包含由上述化学式2表示的苯甲酰胺化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分。

[0032] 此外,本发明提供用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行预防或改善的保健功能食品,其包含由上述化学式2表示的苯甲酰胺化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分。

[0033] [有益效果]

[0034] 作为本发明所述的具有HSP90抑制活性的新型化合物,包含二羟基苯基化合物或苯甲酰胺化合物的组合物可有效抑制HSP90,因此可用作对HSP90介导的疾病进行预防或治疗的药物组合物或用于对HSP90介导的疾病进行预防或改善的健康功能食品,上述疾病选自于由癌症疾病、退行性神经疾病和病毒感染所组成的组。

附图说明

[0035] 图1显示了根据本发明的实施例1的化合物17确认HSP90抑制活性的结果。

[0036] 图2A显示了通过各种浓度的化合物17抑制非小细胞肺癌细胞的增殖速率的结果,图2B是确认非小细胞肺癌细胞存活抑制的结果。

[0037] 图3显示了在各种浓度下,化合物17抑制非小细胞肺癌细胞的集落形成的结果。

[0038] 图4显示了在非小细胞肺癌细胞上以具有各种浓度的化合物17处理后蛋白表达的变化结果。

[0039] 图5是显示本发明所述化合物2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺的HSP90抑制作用的图。

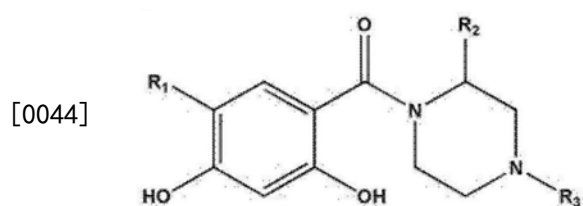
具体实施方式

[0040] 在下文中,将详细描述本发明。

[0041] 本发明的发明人研究了显示热休克蛋白90 (HSP90) 抑制作用的化合物,合成了由下式1表示的化合物,并通过确认其HSP90抑制作用完成了本发明。

[0042] 因此,本发明提供由以下化学式1表示的二羟基苯基化合物、其立体异构体、其外消旋混合物或其药学上可接受的盐:

[0043] [化学式1]



[0045] 其中, R_1 是选自于由卤素、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,

[0046] R_2 是选自于由C3-C6环烷基、苯基、卤素、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,并且

[0047] R_3 是C1-C4烷基或C1-C4烷氧基。

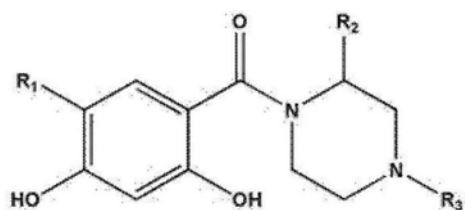
[0048] 在由化学式1表示的二羟基苯基化合物中, R_1 是C1-C4烷基, R_2 是苯基, R_3 是C1-C4烷基。

[0049] 本发明还涉及用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行预防或治疗的药物组合物,其包含由以下化学式1表示的二羟基苯基化合物、其立体异构体、其外消旋混合物或

其药学上可接受的盐作为有效成分：

[0050] [化学式1]

[0051]



[0052] 其中, R_1 是选自于由卤素、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,

[0053] R_2 是选自于由C3-C6环烷基、苯基、卤素、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种, 并且

[0054] R_3 是C1-C4烷基或C1-C4烷氧基。

[0055] 在由化学式1表示的二羟基苯基化合物中, R_1 是C1-C4烷基, R_2 是苯基, R_3 是C1-C4烷基。

[0056] 热休克蛋白90介导的疾病是选自于由癌症疾病、退行性神经疾病和病毒感染所组成的组中的一种或多种疾病。

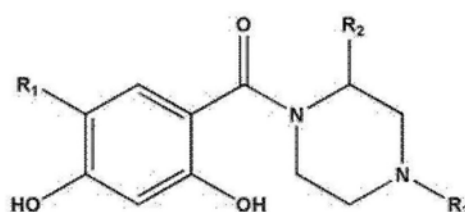
[0057] 上述癌症可选自于由非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、皮肤癌、头颈癌、脑癌、喉癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、甲状腺癌、肾癌、直肠癌、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴瘤细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和血癌所组成的组, 但不限于此。

[0058] 上述退行性神经疾病选自于由中风、瘫痪、记忆丧失、记忆障碍、痴呆、健忘、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、匹克氏病、Creutzfeldt-Kacob病、亨廷顿氏病和肌萎缩侧索硬化症所组成的组, 但不限于此。

[0059] 同时, 本发明还涉及用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行预防或改善的保健功能食品, 其包含由以下化学式1表示的二羟基苯基化合物、其立体异构体、其外消旋混合物或药学上其可接受的盐作为活性成分:

[0060] [化学式1]

[0061]



[0062] 其中, R_1 是选自于由卤素、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,

[0063] R_2 是选自于由C3-C6环烷基、苯基、卤素、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种, 并且

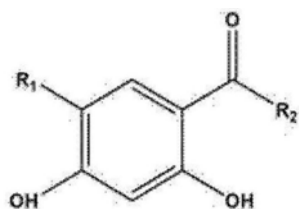
[0064] R_3 是C1-C4烷基或C1-C4烷氧基。

[0065] 同时, 本发明的发明人还研究了显示热休克蛋白90 (HSP90) 抑制作用的化合物, 合成了由以下化学式2表示的化合物, 并确认其HSP90抑制作用以完成本发明。

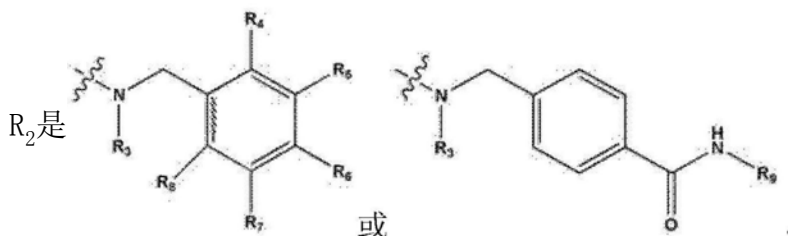
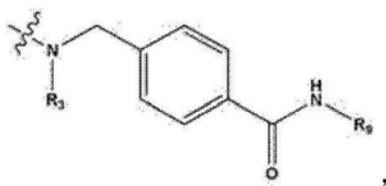
[0066] 因此, 本发明提供由以下化学式2表示的苯甲酰胺化合物或其药学上可接受的盐:

[0067] [化学式2]

[0068]

[0069] 其中R₁是卤素或C1-C4烷基,

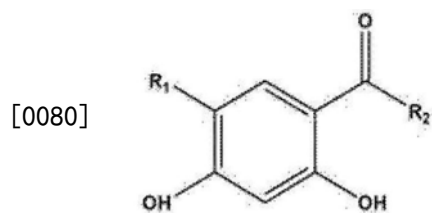
[0070]

[0071] R₃和R₄可以彼此相同或不同,并且是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,[0072] R₅和R₆可以彼此相同或不同,并且是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,或者R₅和R₆彼此连接形成五元环或六元环,[0073] R₇是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,[0074] R₈是H或卤素,[0075] R₉是选自于由C1-C4烷基、C1-C4烷氧基和苄基所组成的组中的任意一种。[0076] 在由化学式2表示的苯甲酰胺化合物中,R₁是卤素或C1-C4烷基,R₂是R₃是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,并且R₉是选自于由C1-C4烷基、C1-C4烷氧基和苄基所组成的组中的任意一种。

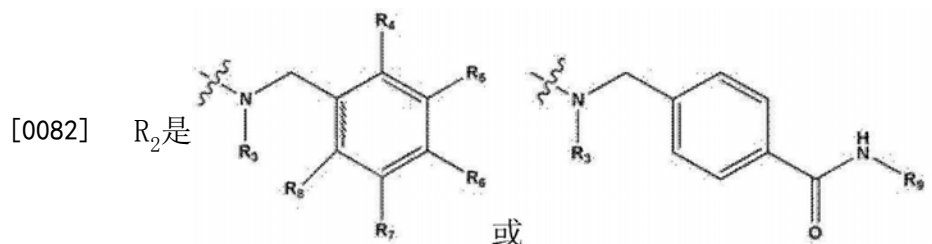
[0077] 由化学式2表示的苯甲酰胺化合物可以是选自于由以下化合物所组成的组中的任意一种:N-苄基-5-氯-2,4-二羟基苯甲酰胺、N-苄基-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-(4-甲氧基苄基)-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-N-(3,4-二甲氧基苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、N-(苄并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基甲基)-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(3,4,5-三甲氧基苄基)苯甲酰胺、5-氯-N-(2-氯-3,4,5-三甲氧基苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、N-(2-溴-3,4,5-三甲氧基苄基)-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(3-甲基苄基)苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(2-甲基苄基)苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-甲基苄基)苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-甲基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺、5-氯-N-(4-(乙基氨基甲酰基)苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺、2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(甲基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺、N-(4-(乙基氨基甲酰基)苄基)-2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺、2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺和N-苄基-2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺;优选2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺。

[0078] 此外,本发明还提供用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行预防或治疗的药物组合物,其包含由以下化学式2表示的苯甲酰胺化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分:

[0079] [化学式2]



[0081] 其中, R_1 是卤素或C1-C4烷基,



[0083] R_3 和 R_4 可以彼此相同或不同,并且是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,

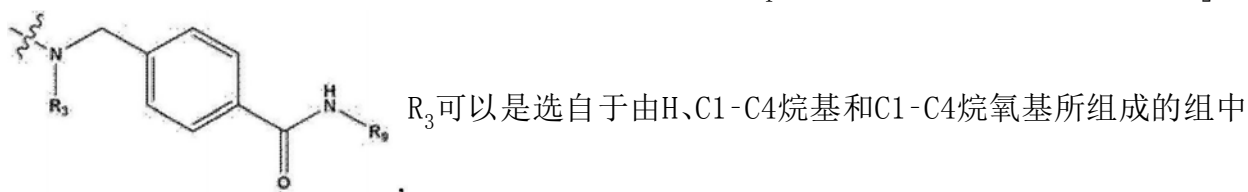
[0084] R_5 和 R_6 可以彼此相同或不同,并且是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,或者 R_5 和 R_6 彼此连接形成五元环或六元环,

[0085] R_7 是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,

[0086] R_8 是H或卤素,

[0087] R_9 是选自于由C1-C4烷基、C1-C4烷氧基和苄基所组成的组中的任意一种。

[0088] 在由化学式2表示的苯甲酰胺化合物中, R_1 可以是卤素或C1-C4烷基, R_2 是



的任意一种,并且 R_9 可以是选自于由C1-C4烷基、C1-C4烷氧基和苄基所组成的组中的任意一种。

[0089] 由化学式2表示的苯甲酰胺化合物可以是选自于由以下化合物所组成的组中的任意一种:N-苄基-5-氯-2,4-二羟基苯甲酰胺、N-苄基-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-(4-甲氧基苄基)-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-N-(3,4-二甲氧基苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、N-(苄并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基甲基)-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(3,4,5-三甲氧基苄基)苯甲酰胺、5-氯-N-(2-氯-3,4,5-三甲氧基苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、N-(2-溴-3,4,5-三甲氧基苄基)-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(3-甲基苄基)苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(2-甲基苄基)苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-甲基苄基)苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-(甲基氨基甲酰基)苄基)苯甲

酰胺、5-氯-N-(4-(乙基氨基甲酰基)苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺、2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(甲基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺、N-(4-(乙基氨基甲酰基)苄基)-2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺、2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺和N-苄基-2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺;优选2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺。

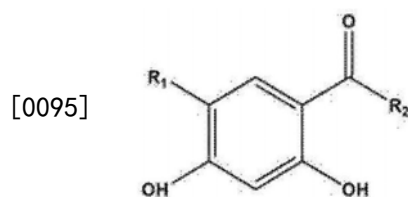
[0090] 上述热休克蛋白90介导的疾病是选自于由癌症疾病、退行性神经疾病和病毒感染所组成的组中的至少一种。

[0091] 上述癌症疾病可以是选自于由非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、皮肤癌、头颈癌、脑癌、喉癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、甲状腺癌、肾癌、直肠癌、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和血癌所组成的组中的任意一种,但不限于此。

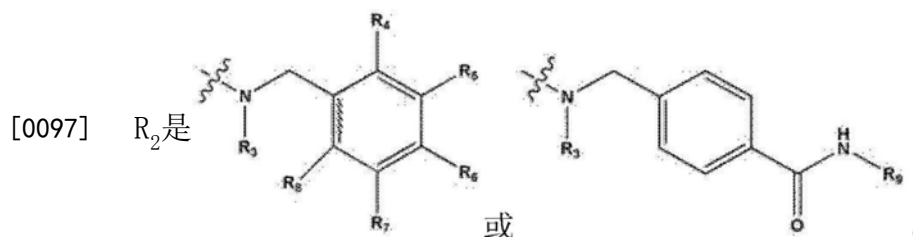
[0092] 上述退行性神经疾病可以是选自于由中风、瘫痪、记忆丧失、记忆障碍、痴呆、健忘、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、匹克氏病、Creutzfeld-Kacob病、亨廷顿氏病和肌萎缩侧索硬化症所组成的组中的任意一种,但是不限于此。

[0093] 此外,本发明提供用于对热休克蛋白90 (HSP90) 介导的疾病进行预防或改善的保健功能食品,其包含由以下化学式2表示的苯甲酰胺化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分:

[0094] [化学式2]



[0096] 其中 R_1 是卤素或C1-C4烷基,



[0098] R_3 和 R_4 可以彼此相同或不同,并且是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,

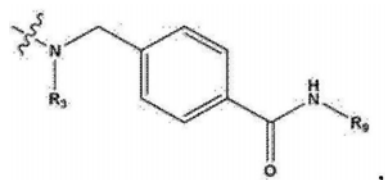
[0099] R_5 和 R_6 可以彼此相同或不同,并且是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,或者 R_5 和 R_6 彼此连接形成五元环或六元环,

[0100] R_7 是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的任意一种,

[0101] R_8 是H或卤素,

[0102] R_9 是选自于由C1-C4烷基、C1-C4烷氧基和苄基所组成的组中的任意一种。

[0103] 在由化学式2表示的苯甲酰胺化合物中, R_1 可以是卤素或C1-C4烷基, R_2 可以是



R_3 可以是选自于由H、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基所组成的组中的

任意一种, R_9 是选自于由C1-C4烷基、C1-C4烷氧基和苄基所组成的组中的任意一种。

[0104] 由化学式2表示的苯甲酰胺化合物可以是选自于由以下化合物所组成的组中的任意一种: N-苄基-5-氯-2,4-二羟基苯甲酰胺、N-苄基-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-(4-甲氧基苄基)-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-N-(3,4-二甲氧基苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、N-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基甲基)-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(3,4,5-三甲氧基苄基)苯甲酰胺、5-氯-N-(2-氯-3,4,5-三甲氧基苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、N-(2-溴-3,4,5-三甲氧基苄基)-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(3-甲基苄基)苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(2-甲基苄基)苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-甲基苄基)苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-(甲基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺、5-氯-N-(4-(乙基氨基甲酰基)苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺、5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺、2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(甲基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺、N-(4-(乙基氨基甲酰基)苄基)-2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺、2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺和N-苄基-2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺;优选2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺。

[0105] 本发明所述的药物组合物可以进一步包含通常用于制备药物组合物的合适的载体、赋形剂或稀释剂。

[0106] 可用于本发明的载体、赋形剂或稀释剂的实例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、海藻酸盐/酯、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁或矿物油等。

[0107] 根据常规方法,本发明所述的药物组合物可以配制成口服制剂,例如粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、悬浮液、乳液、糖浆、气溶胶等、外用剂、栓剂和无菌注射溶液。

[0108] 在制剂的情况下使用稀释剂或赋形剂,例如常用的填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等。用于口服给药的固体制剂包括片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂等,其可含有至少一种赋形剂,例如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等。

[0109] 除了简单的赋形剂外,还使用润滑剂、如硬脂酸镁和滑石粉。用于口服给药的液体制剂的实例包括悬浮液、内部溶液(internal solution)、乳液、糖浆等;并且除了常用的简单稀释剂水和液体石蜡之外,还可以包括各种赋形剂,例如润湿剂、甜味剂、芳香剂和防腐剂。

[0110] 用于胃肠外给药的制剂包括无菌水溶液、非水溶液、悬浮液、乳液、冻干制剂和栓剂。非水溶液或悬浮剂的实例包括丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)、可注射酯(如油酸乙酯)等。可以使用Witepsol、聚乙二醇、吐温61、可可脂、月桂、甘油明胶等作为栓剂的基质。

[0111] 此外,根据给药途径、疾病程度、性别、体重、年龄等,可以增加或减少本发明所述药物组合物的剂量。因此,剂量不以任何方式限制本发明的范围。

[0112] 可将药物组合物以各种途径给予哺乳动物,例如大鼠、小鼠、家畜、人等。可以预期所有给药方式,例如通过口服、直肠或静脉内、肌内、皮下、气管内、子宫内或脑室内注射。

[0113] 可将本发明的二羟基苯基化合物或苯甲酰胺化合物以药学上可接受的盐的形式使用,可将由药学上可接受的游离酸形成的酸加成盐用作该盐。作为游离酸,可以使用无机酸和有机酸。作为无机酸,可以使用盐酸、溴酸、硫酸、亚硫酸、磷酸等;作为有机酸,可以使用柠檬酸、乙酸、马来酸、富马酸、乙醇酸、甲磺酸、乙酸、乙醇酸、琥珀酸、酒石酸、4-甲苯磺酸、半乳糖醛酸、扑酸(embonic acid)、谷氨酸、柠檬酸和天冬氨酸。优选地,使用盐酸作为无机酸,使用甲磺酸作为有机酸。

[0114] 此外,本发明的二羟基苯基化合物或苯甲酰胺化合物不仅包括药学上可接受的盐,还包括可通过常规方法制备的所有盐、水合物和溶剂化物。

[0115] 根据本发明的加成盐可以通过常规方法制备,例如,通过将化学式1的二羟基苯基化合物溶解在可与水混溶的有机溶剂(如丙酮、甲醇、乙醇、乙腈等)中,加入有机酸或加入无机酸的酸性水溶液,然后沉淀或结晶。随后,可以从混合物中蒸除溶剂或过量的酸,然后干燥以获得另外的盐,或者可以将沉淀的盐抽滤。

[0116] 可将本发明所述的保健功能食品以粉末、颗粒、片剂、胶囊、糖浆或饮料的形式提供。除了保健功能食品之外,可一起使用的其它食品或食品添加剂可以是由上述化学式1或2表示的化合物,并且可以根据常规方法适当地使用。待混合的活性成分的量可根据其使用目的(例如,预防、健康或治疗)适当确定。

[0117] 保健功能食品中包含的由化学式1或2表示的化合物可以根据药物组合物的有效剂量使用,但可以出于健康和卫生目的或长期以小于上述范围使用,并且只要活性成分在安全性方面没有问题,可以以超过上述范围量使用。

[0118] 对保健功能食品的种类没有特别限制。保健功能食品的实例包括肉、香肠、面包、巧克力、糖果、点心、糕点、比萨饼、拉面、其它面条、口香糖、乳制品(包括冰淇淋)、汤、饮料、茶、饮品、酒精饮料和维生素复合物。

[0119] 在下文中,将参考以下实施例详细描述本发明。然而应该注意的是,以下实施例是对本发明的说明,而非意在限制本发明的范围。提供本发明的实施例是为了向本领域技术人员更充分地描述本发明。

[0120] I. 二羟基苯基化合物的合成和生物活性的评估

[0121] <参考例1>

[0122] 1. 试剂和实验室设备

[0123] 所有试剂和溶剂均购自制造商,无需进一步纯化即可使用。

[0124] 处理湿度敏感化合物的所有实验均在氩气氛下进行。

[0125] 使用旋转蒸发器在减压下进行浓缩或溶剂去除。

[0126] 在预涂硅胶F254TLC板(硅胶F254TLC板,E,Merck)上进行分析性薄层层析,并通过用碘气染色使UV光可视化。

[0127] 柱色谱可以在二氧化硅上(Merck硅胶40-63 μ m)以中等压力进行,或在Biotage SP1快速纯化系统(Biotage SP1)中使用预填充的硅胶小柱(Biotage)进行。

[0128] 使用Bruker制造的ARX-300 (300MHz以上) 进行NMR分析。

[0129] 以百万分之一记录化学位移(δ)。使用样品溶剂的氘锁信号作为参比,并以赫兹(Hz)记录偶合常数(J)。

[0130] 分裂模式缩写为:s,单峰;d,二重峰;t,三重峰;q,四重峰;dd,双二重峰;m,多重峰。

[0131] 2.细胞培养

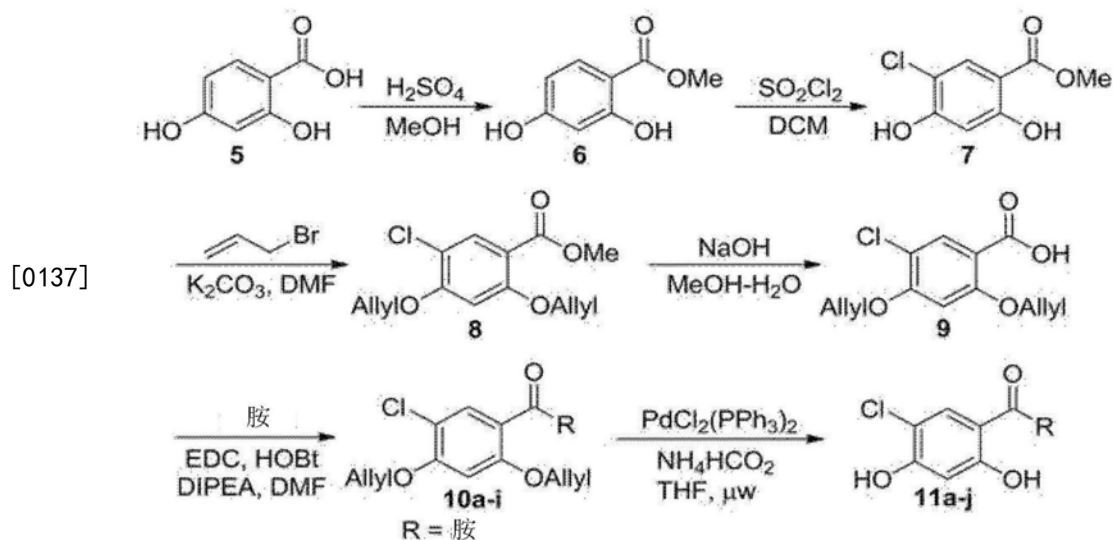
[0132] 在含有25mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)的RPMI 1640和含有L-谷氨酰胺(含有链霉素(500mg/mL)、青霉素(100单位/mL)和10%胎牛血清(FBS))的RPMI 1640中,培养乳腺癌细胞Sk-Br3(韩国细胞系)和非小细胞肺癌H1975细胞(ATCC)。

[0133] 将细胞在37℃和5%CO₂的潮湿气氛下培养。

[0134] <实施例1>二羟基苯基化合物的合成

[0135] 化合物5-9、化合物10a-10i和化合物11a-11j以下面的反应方案1的方式合成。

[0136] [反应方案1]



[0138] 用硫酸的甲醇溶液处理2,4-二羟基苯甲酸(5),得到2,4-二羟基苯甲酸酯(6),产率99%。

[0139] 2,4-二羟基苯甲酸酯(6)和磺酰氯的氯化反应使得形成氯化产物(7)及其区域异构体3-氯-2,4-二羟基苯甲酸甲酯,摩尔比为10:1。通过硅胶色谱法小心地除去形成的区域异构体。

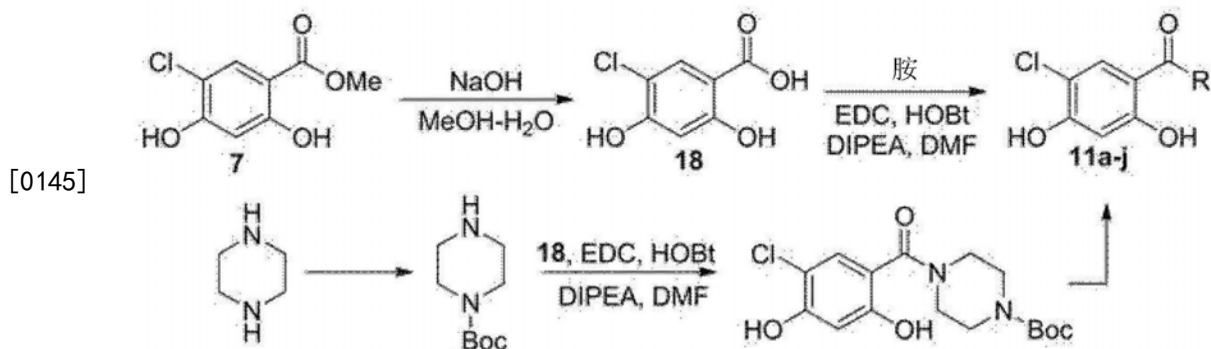
[0140] 在碳酸钾存在下用烯丙基溴保护化合物7,得到烯丙基保护的酯8,产率99%。

[0141] 此后,使用水和氢氧化钠的甲醇溶液将酯8以97%的产率转化为羧酸9。

[0142] 此外,羧酸9与各种胺之间的酰胺偶联反应在二异丙基乙胺(DIPEA)存在下,在二氯乙烷(EDC)、羟基苯并三唑(HOBT)或二甲基甲酰胺(DMF)中进行,得到酰胺10a-10j。

[0143] 最后,在微波辐射下使用PdCl₂(PPh₃)₂和甲酸铵除去芳基保护基,得到化合物11a-11j。

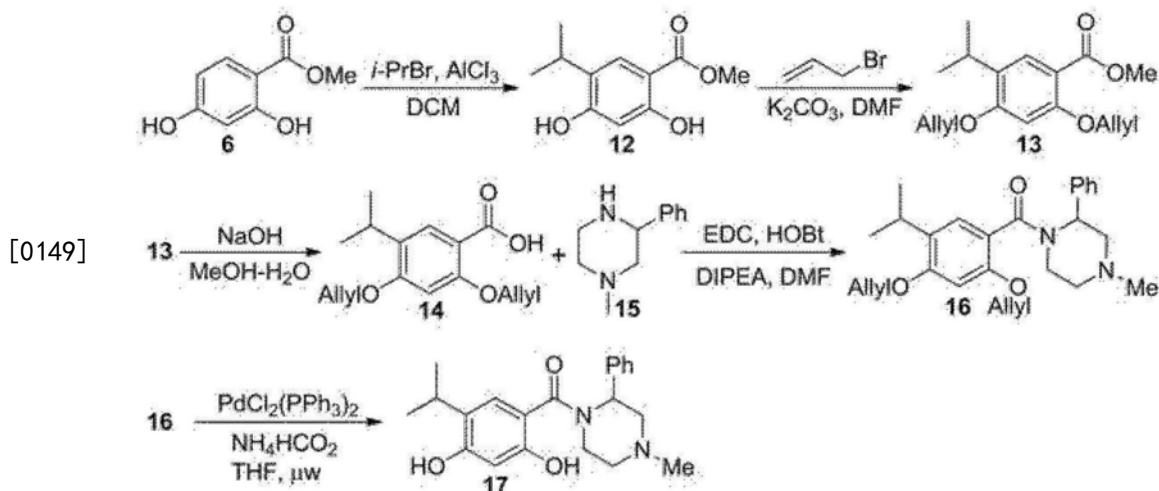
[0144] [反应方案2]



[0146] 使用上述合成的羧酸酯7获得化合物11a、11d和11g-11i。

[0147] 在无芳基保护的情况下,使用氢氧化钠的甲醇溶液将羧酸酯7转化为羧酸18。

[0148] [反应方案3]



[0150] 2,4-二羟基苯甲酸甲酯(6)的Friedel-Crafts烷基化使用异丙基溴和氯化铝进行。

[0151] 在碳酸钾存在下用芳基溴保护化合物12,得到酯13,用氢氧化钠将其转化,得到羧酸14,产率58%。

[0152] 在DIPEA存在下,羧酸14与1-甲基-3-苯基哌嗪(15)的酰胺偶联反应在EDC、HOBT或DMF中进行,得到酰胺16。

[0153] 最后,在微波辐射下使用 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ 和甲酸铵除去芳基保护基,得到化合物17。

[0154] 1. 2,4-二羟基苯甲酸甲酯(6)

[0155] 在氩气下,将2,4-二羟基苯甲酸(10.2g, 66.0mmol)和硫酸(5mL)的甲醇(MeOH, 40mL)溶液用回流冷凝器在100℃下搅拌12小时。将混合物冷却至室温,在压力下浓缩并倒入处于冰浴中的40mL H_2O 中。

[0156] 将得到的白色固体溶解在乙酸乙酯中,然后用饱和 NaHCO_3 溶液洗涤以过滤。将有机层用 Na_2SO_4 干燥并施加压力,以86%的产率得到化合物6。

[0157] $R_f=0.20$ (2:8乙酸乙酯:己烷). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 10.97 (s, 1H), 7.74 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 6.40 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.37 (dd, $J=8.8\text{Hz}$, 2.4Hz, 1H), 5.36 (s, 1H), 3.91 (s, 1H).

[0158] 2. 5-氯-2,4-二羟基苯甲酸甲酯(7)

[0159] 在氩气下,将化合物6(10.0g,59.5mmol)和磺酰氯(4.30mL,59.5mmol)的二氯甲烷(CH_2Cl_2)溶液在0℃下搅拌24小时。

[0160] 将混合物用10%NaOH中和至pH 5,在压力下浓缩,然后用乙酸乙酯萃取。

[0161] 将有机层用饱和 NaHCO_3 溶液洗涤三次,用 Na_2SO_4 干燥并在压力下浓缩,得到化合物7,产率为45%。

[0162] $R_f=0.26$ (2:8乙酸乙酯:己烷)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 10.84 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 3.92 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 169.6, 162.5, 157.3, 130.3, 111.5, 106.8, 104.3, 52.6

[0163] 3. 2,4-双(烯丙氧基)-5-氯苯甲酸甲酯(8)

[0164] 在氩气下,将化合物7(6.09g,30.00mmol)、芳基溴(6.75ml,78.02mmol)和碳酸钾(10.78mL,78.02mmol)在DMF中的混合物在室温下搅拌24小时。将混合物在压力下浓缩并用乙酸乙酯萃取。

[0165] 将有机层用饱和 NaHCO_3 溶液洗涤三次,用 Na_2SO_4 干燥并在压力下浓缩,得到化合物8,产率为100%。

[0166] $R_f=0.30$ (2:8乙酸乙酯:己烷)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.80 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 5.99-5.91 (m, 2H), 5.45 (dd, $J=17.2\text{Hz}$, 1.2Hz, 1H), 5.39 (dd, $J=17.2\text{Hz}$, 0.8Hz, 1H), 5.25 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 5.23 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 4.51 (dd, $J=14.8\text{Hz}$, 5.2Hz, 4H), 3.77 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 164.7, 158.7, 157.7, 133.0, 132.2, 131.7, 118.1, 117.4, 113.9, 112.6, 99.4, 69.7, 51.6

[0167] 4. 2,4-双(烯丙氧基)-5-氯苯甲酸(9)

[0168] 将化合物8(9.43g,37.99mmol)同25ml甲醇与25ml氢氧化钠水溶液(5g,10%)在室温下搅拌30小时。将混合物用1N HCl中和至pH 6并用乙酸乙酯萃取三次。

[0169] 将有机层用 Na_2SO_4 干燥并在压力下浓缩,得到化合物9,产率80%。

[0170] $R_f=0.11$ (4:6乙酸乙酯:己烷)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.16 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.10-5.99 (m, 2H), 5.51-5.35 (m, 2H), 4.76-4.65 (m, 4H)。

[0171] 5. (2,4-双(烯丙氧基)-5-氯苯基)(吡咯烷-1-基)甲酮(10a)

[0172] 将化合物9(0.36g,11.33mmol)、吡咯烷(0.13ml,1.60mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺(0.41g,2.00mmol)、1-羟基苯并三唑(0.22g,1.60mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.23mL,1.33mmol)溶解在4ml DMF中,并在微波辐射(使用Biotage Initiator)下在120℃搅拌3小时。

[0173] 将混合物溶于乙酸乙酯中,用水洗涤有机层,用 Na_2SO_4 干燥并在压力下浓缩。此后,使用MPLC(Biotage SNAP HP-Sil柱)以65%的产率获得化合物10a。

[0174] $R_f=(3:7$ 乙酸乙酯:己烷)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 7.26 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.15-6.02 (m, 2H), 5.51 (d, $J=17.2\text{Hz}$, 1H), 5.43 (d, $J=17.2\text{Hz}$, 1H), 5.32 (t, $J=11.2\text{Hz}$, 11.2Hz, 2H), 4.68 (dd, $J=17.2\text{Hz}$, 4.4Hz, 4H), 3.70 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 6.8Hz, 2H), 3.33 (s, 2H), 2.02-1.89 (m, 4H)。 ^{13}C NMR (100MHz, MeOD) δ 167.2, 155.7, 154.2, 132.8, 132.6, 128.4, 119.8, 116.7, 116.4, 114.1, 99.41, 69.4, 69.2, 45.7, 33.4, 25.4, 24.2

[0175] 6. (2,4-双(烯丙氧基)-5-氯苯基)(哌啶-1-基)甲酮(10b)

[0176] 将化合物9(0.30g,1.12mmol)、哌啶(0.12ml,1.23mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺

(0.46g, 2.23mmol)、1-羟基苯并三唑(0.15g, 1.12mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.19mL, 1.12mmol)溶于4mL DMF中,并在微波辐射(Biotage Initiator)下在120℃搅拌3小时。

[0177] 将混合物溶于乙酸乙酯中,用水洗涤有机层,用Na₂SO₄干燥并在压力下浓缩。此后,使用MPLC(Biotage SNAP HP-Sil柱)以44%的产率获得化合物10b。

[0178] $R_f=0.21$ (3:7乙酸乙酯:己烷)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.23 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.06-5.92 (m, 2H), 5.44 (d, J=17.6Hz, 1H), 5.37 (d, J=17.2Hz, 1H), 5.31 (d, J=10.8Hz, 1H), 5.26 (d, J=10.4Hz, 1H), 5.59 (d, J=4.8Hz, 2H), 4.52 (t, J=4.4Hz, 5.2Hz, 2H), 3.66 (dd, J=17.2Hz, 1.6Hz, 1H), 3.19 (dd, J=12.0Hz, 7.6Hz, 2H), 1.614 (s, 4H), 1.48 (d, J=42.8Hz, 2H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 166.3, 155.3, 154.0, 132.8, 132.5, 129.4, 120.3, 118.3, 117.9, 115.2, 99.9, 70.2, 69.8, 48.2, 42.9, 26.5, 25.8, 24.7。

[0179] 7. (2,4-双(烯丙氧基)-5-氯苯基)(吗啉代)甲酮(10c)

[0180] 将化合物9(0.50g, 1.85mmol)、吗啉(0.18mL, 2.04mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺(0.76g, 3.70mmol)、1-羟基苯并三唑(0.55g, 1.85mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.32mL, 1.85mmol)溶解在4mL DMF中,并在微波辐射下在120℃搅拌3小时。

[0181] 将混合物溶解在乙酸乙酯中,用水洗涤有机层,用Na₂SO₄干燥,并在压力下浓缩。此后,使用MPLC(Biotage SNAP HP-Sil柱)以68%的产率获得化合物10c。

[0182] $R_f=0.20$ (4:6乙酸乙酯:己烷)。 $R_f=0.21$ (3:7乙酸乙酯:己烷)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.27 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.07-5.93 (m, 2H), 5.44 (dd, J=17.2Hz, 1.2Hz, 1H), 5.36 (dd, J=17.2Hz, 1.6Hz, 1H), 5.32 (dd, J=4Hz, 2.8Hz, 2H), 5.29 (dd, J=10.4Hz, 1.2Hz, 2H), 4.56 (dd, J=30.8Hz, 4.0Hz, 4H)。

[0183] 8. (2,4-双(烯丙氧基)-5-氯苯基)(4-甲基哌嗪-1-基)甲酮(10e)

[0184] 将化合物9(0.30g, 1.12mmol)、1-甲基哌嗪(0.19mL, 1.67mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺(0.46g, 2.23mmol)、1-羟基苯并三唑(0.15g, 1.12mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.19mL, 1.12mmol)溶解在4mL DMF中,并在微波辐射(Biotage Initiator)下在120℃搅拌3小时。

[0185] 将混合物溶于乙酸乙酯中,用水洗涤有机层,用Na₂SO₄干燥并在压力下浓缩。此后,使用MPLC(Biotage SNAP HP-Sil柱)以64%的产率获得化合物10e。

[0186] $R_f=0.14$ (9:1乙酸乙酯:甲醇)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.24 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.06-5.90 (m, 2H), 5.43 (dd, J=17.2Hz, 1.2Hz, 1H), 5.34 (dd, J=17.2Hz, 1.2Hz, 1H), 5.30 (dd, J=10.4Hz, 0.8Hz, 1H), 5.25 (dd, J=10.4Hz, 1.2Hz, 1H), 4.58 (d, J=4Hz, 2H), 4.50 (s, 2H), 3.76 (d, J=61.6Hz, 2H), 3.27 (d, J=15.2Hz, 2H), 2.27 (d, J=35.2Hz, 4H), 2.27 (s, 3H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 166.4, 155.5, 154.0, 132.5, 132.4, 129.6, 119.4, 118.3, 118.1, 115.2, 99.6, 70.1, 69.8, 55.3, 54.8, 46.9, 46.2, 41.8

[0187] 9. 1-(4-(2,4-双(烯丙氧基)-5-氯苯基)哌嗪-1-基)乙酮(10f)

[0188] 将化合物9(0.30g, 1.12mmol)、1-乙基哌嗪(0.21mL, 1.67mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺(0.46g, 2.23mmol)、1-羟基苯并三唑(0.15g, 1.12mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.19mL, 1.12mmol)溶解在4mL DMF中,并在微波辐射(Biotage Initiator)下在120℃搅拌3小时。

[0189] 将混合物溶于乙酸乙酯中,用水洗涤有机层,用Na₂SO₄干燥并在压力下浓缩。此后,

使用MPLC(Biotage SNAP HP-Sil柱)以86%的产率获得化合物10f。

[0190] $R_f=0.20$ (9:1乙酸乙酯:甲醇)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.25 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.04-5.93 (m, 2H), 5.42 (dd, $J=17.2\text{Hz}, 1.2\text{Hz}, 1\text{H}$), 5.32 (d, $J=15.1\text{Hz}, 1\text{H}$), 5.26 (d, $J=14.4\text{Hz}, 2\text{H}$), 4.54 (d, $J=32.8\text{Hz}, 2\text{H}$), 3.77-3.18 (m, 8H), 2.07 (d, $J=23.6\text{Hz}, 3\text{H}$)。

[0191] 10. (5-氯-2,4-二羟基苯基)(吡咯烷-1-基)甲酮(11a)

[0192] 在 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (23mg) 和4ml甲酸铵的THF溶液(150mg)的存在下,在微波辐射下,将化合物10a (0.23g, 0.72mmol) 在120℃搅拌30分钟。

[0193] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释,并将有机层用水洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥,在压力下浓缩,通过使用MPLC以29%的产率获得化合物11a。

[0194] $R_f=0.26$ (3:7乙酸乙酯:己烷)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.20 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 4.24 (s, 2H), 3.15 (t, $J=1.6\text{Hz}, 1.6\text{Hz}, 4\text{H}$), 1.77 (t, $J=6.4\text{Hz}, 6.8\text{Hz}, 4\text{H}$)。 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 169.0, 158.9, 156.3, 129.4, 111.5, 110.9, 104.2, 49.3, 49.1, 48.3, 48.1。

[0195] 11. (5-氯-2,4-二羟基苯基)(哌啶-1-基)甲酮(11b)

[0196] 在 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (17mg) 和4ml甲酸铵的THF溶液(150mg)的存在下,在微波辐射下,将化合物10b (0.17g, 0.50mmol) 在120℃搅拌30分钟。

[0197] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释,并将有机层用水洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥,在压力下浓缩,然后使用MPLC以28%的产率获得化合物11b。

[0198] $R_f=0.27$ (5:5乙酸乙酯:己烷)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 7.04 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 3.45 (s, 4H), 1.62 (d, $J=4.8\text{Hz}, 2\text{H}$), 1.55 (d, $J=4.4\text{Hz}, 4\text{H}$)。 ^{13}C NMR (100MHz, MeOD) δ 169.2, 156.0, 154.9, 129.8, 116.9, 112.2, 104.4, 36.8, 34.5, 26.8, 25.2

[0199] 12. (5-氯-2,4-二羟基苯基)(吗啉代)甲酮(11c)

[0200] 在 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (42mg) 和4ml甲酸铵的THF溶液(150mg)的存在下,在微波辐射下,将化合物10c (0.42g, 1.25mmol) 在120℃搅拌30分钟。

[0201] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释,并将有机层用水洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥,在压力下浓缩,然后使用MPLC以49%的产率获得化合物11c。

[0202] $R_f=0.24$ (4:6乙酸乙酯:己烷)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 7.16 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 3.69 (d, $J=4.0\text{Hz}, 4\text{H}$), 3.57 (s, 4H)

[0203] 13. (5-氯-2,4-二羟基苯基)(4-甲基哌嗪-1-基)甲酮(11e)

[0204] 在 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (25mg) 和4ml甲酸铵的THF溶液(150mg)的存在下,在微波辐射下,将化合物10e (0.25g, 0.72mmol) 在120℃搅拌30分钟。

[0205] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释,并将有机层用水洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥,在压力下浓缩,然后使用MPLC以两步获得化合物11e,产率为30%。

[0206] $R_f=0.20$ (7:3乙酸乙酯:甲醇)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 7.13 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 3.59 (d, $J=8.0\text{Hz}, 6\text{H}$), 3.52 (s, 2H), 2.10 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (125MHz, DMSO) δ 165.9, 154.4, 153.4, 128.9, 116.0, 109.9, 103.5, 54.5, 45.6, 40.4

[0207] 14. 1-(4-(5-氯-2,4-二羟基苯甲酰基)哌嗪-1-基)乙酮(11f)

[0208] 在微波辐射下,在 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (17mg) 和4ml甲酸铵的THF溶液(150mg)的存在下,将化合物10f (0.17g, 0.45mmol) 在120℃搅拌30分钟。

[0209] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释,并将有机层用水洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥,在压力

下浓缩,然后使用MPLC以两步获得化合物11f,产率为61%。

[0210] $R_f=0.14$ (9:1乙酸乙酯:甲醇)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 7.14 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 3.60 (s, 4H), 2.51 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 4.8Hz, 4H), 2.35 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (125MHz, DMSO) δ 168.4, 166.2, 154.5, 153.4, 129.2, 115.9, 110.1, 103.5, 45.7, 40.9, 21.2

[0211] 15. 5-氯-2,4-二羟基苯甲酸(18)

[0212] 将化合物7 (1.98g, 9.76mmol) 同30ml 甲醇与30ml 氢氧化钠的 H_2O 溶液 (6g) 在室温下搅拌24小时。将混合物用3N HCl中和至pH 6并用乙酸乙酯萃取三次。

[0213] 将有机层用 Na_2SO_4 干燥并减压浓缩,得到化合物18,产率100%。

[0214] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.75 (s, 1H), 6.40 (s, 1H)。 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 171.5, 162.0, 158.9, 131.5, 112.1, 105.8, 103.6。

[0215] 16. (5-氯-2,4-二羟基苯基)(哌嗪-1-基)甲酮(11d)

[0216] 将化合物18 (0.21g, 1.13mmol)、1-哌嗪甲酸叔丁酯 (0.32g, 1.69mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (0.46g, 2.26mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺 (0.46g, 2.23mmol)、1-羟基苯并三唑 (0.15g, 1.13mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (0.20mL, 1.13mmol) 溶于4ml DMF中,并在微波辐射下在120℃搅拌3小时。

[0217] 将混合物溶解在乙酸乙酯中,用1N HCl溶液洗涤有机层,用 Na_2SO_4 干燥,并在压力下浓缩。此后,使用MPLC (Biotage SNAP HP-Sil柱) 以69%的产率合成中间体化合物。

[0218] $R_f=0.23$ (乙酸乙酯:己烷:5:5)。

[0219] 在10ml 6N HCl溶液和10ml THF的存在下,将中间体化合物在室温下搅拌24小时。将反应用乙酸乙酯稀释后,用水洗涤有机层,用 Na_2SO_4 干燥,并在压力下浓缩。通过MPLC纯化,分两步得到化合物11d,产率32%。

[0220] ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 7.13 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.74 (s, 4H), 3.21 (d, $J=4.4\text{Hz}$, 4H)。 ^{13}C NMR (100MHz, MeOD) δ 169.7, 157.1, 155.2, 131.0, 115.5, 113.2, 104.7, 62.9, 44.7

[0221] 17. 4-(5-氯-2,4-二羟基苯甲酰基)哌嗪-2-酮(11g)

[0222] 将化合物18 (0.30g, 1.12mmol)、哌啶 (0.12mL, 1.23mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺 (0.46g, 2.23mmol)、1-羟基苯并三唑 (0.15g, 1.12mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (0.19mL, 1.12mmol) 溶于4ml DMF中,并在微波辐射下于120℃搅拌3小时。

[0223] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释,并将有机层用水洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥,在压力下浓缩,使用MPLC以44%的产率获得化合物11g。

[0224] $R_f=0.21$ (3:7乙酸乙酯:己烷)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO) δ 10.07 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.53 (s, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.19 (s, 2H)

[0225] 18. 1-(5-氯-2,4-二羟基苯甲酰基)吡咯烷-3-酮(11h)

[0226] 将化合物18 (0.05g, 0.27mmol)、3-吡咯烷酮盐酸盐 (0.05g, 0.41mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (0.11g, 0.55mmol)、1-羟基苯并三唑 (0.04g, 0.27mmol)、N,N-二异丙基乙胺 (0.20mL, 1.13mmol) 和N,N'-二环己基碳二亚胺 (0.10mL, 0.55mmol) 溶于4ml DMF中,并在微波辐射下在120℃搅拌3小时 (Biotage Initiator)。

[0227] 用1N HCl溶液洗涤有机层,用 Na_2SO_4 干燥,在压力下浓缩并通过MPLC纯化,得到化合物11h,产率10%。

[0228] $R_f=0.21$ (5:5 乙酸乙酯:己烷). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 11.04 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 4.21 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 7.6Hz, 2H), 4.14 (s, 2H), 2.67 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 8.0Hz, 2H).

[0229] 19. 1-(5-氯-2,4-二羟基苯甲酰基)哌啶-4-酮 (11i)

[0230] 将化合物18 (0.20g, 1.09mmol)、4-哌啶酮 (0.25g, 1.63mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (0.42g, 2.17mmol)、1-羟基苯并三唑 (0.15g, 1.09mmol)、N,N-二异丙基乙胺 (0.39mL, 2.17mmol) 溶于4mL DMF中, 在微波辐射 (Biotage Initiator) 下于120℃搅拌3小时。

[0231] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释, 有机层用1N HCl溶液洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥, 在压力下浓缩, 然后通过使用MPLC以3%的产率获得化合物11i。

[0232] $R_f=0.21$ (6:4 乙酸乙酯:己烷). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 10.14 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 3.97 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 6.0Hz, 4H), 2.58 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 6.4Hz, 4H).

[0233] 20. (5-氯-2,4-二羟基苯基) (4-甲基-2-苯基哌嗪-1-基) 甲酮 (11j)

[0234] 将化合物18 (0.20g, 1.05mmol)、1-甲基-3-苯基哌嗪 (0.28g, 1.58mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (0.40g, 2.10mmol)、1-羟基苯并三唑 (0.14g, 1.05mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (0.19mL, 1.05mmol) 溶于4mL DMF中, 并在微波辐射 (Biotage Initiator) 下在120℃搅拌3小时。

[0235] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释, 有机层用1N HCl溶液洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥, 在压力下浓缩并通过MPLC纯化, 得到化合物11j, 产率为23%。

[0236] $R_f=0.21$ (8:2 乙酸乙酯:己烷). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.46 (d, $J=4.4\text{Hz}$, 2H), 7.37 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 7.2Hz, 2H), 7.27 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 6.8Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.58 (s, 1H), 4.24 (s, 1H), 3.24 (d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H), 3.22 (t, $J=12.4\text{Hz}$, 10.4Hz, 1H), 2.81 (d, $J=10.8\text{Hz}$, 1H), 2.50 (dd, $J=12.0\text{Hz}$, 4.0Hz, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.21-2.14 (m, 1H).

[0237] 21. 2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸甲酯 (12)

[0238] 将化合物6 (3.9g, 23.0mmol)、2-溴丙烷 (4.3mL, 46.0mmol) 和氯化铝 (6.1g, 46.0mmol) 溶解在 CH_2Cl_2 中, 然后在氩气下, 在微波辐射下 (Biotage Initiator) 于50℃用回流冷凝器搅拌24小时。

[0239] 每6小时向反应混合物中加入3-溴丙烷 (4.3mL, 46.0mmol) 三次。

[0240] 将混合物用10%NaOH中和至pH 5, 在压力下浓缩并用乙酸乙酯萃取。

[0241] 将有机层用饱和 NaHCO_3 溶液洗涤三次, 用 Na_2SO_4 干燥, 在压力下浓缩并通过柱纯化, 得到化合物12, 产率为45%。

[0242] $R_f=0.21$ (1:4 乙酸乙酯:己烷). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 10.8 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.53 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.15-3.08 (m, 1H), 1.25 (d, $J=10.8\text{Hz}$, 6H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 170.7, 161.6, 159.6, 128.1, 127.1, 105.7, 103.2, 52.2, 26.7, 22.8

[0243] 22. 2,4-双(烯丙氧基)-5-异丙基苯甲酸甲酯 (13)

[0244] 将化合物12 (2.1g, 10.3mmol)、烯丙基溴 (2.3mL, 26.8mmol) 和碳酸钾 (3.7g, 26.8mmol) 溶解在DMF中并搅拌18小时。

[0245] 将混合物用乙酸乙酯稀释, 有机层用 H_2O 洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 并在压力下浓缩, 得

到化合物13,产率84%。

[0246] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 7.71 (s, 1H) , 6.41 (s, 1H) , 6.10-5.97 (m, 2H) , 5.50 (dd, $J=17.2\text{Hz}$, 1.6Hz, 1H) , 5.41 (dd, $J=17.2\text{Hz}$, 1.2Hz, 1H) , 5.27 (d, $J=10.8\text{Hz}$, 2H) , 4.56 (dd, $J=9.6\text{Hz}$, 4.8Hz, 4H) , 3.84 (s, 1H) , 3.26-3.19 (m, 1H) , 1.19 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 6H) .

[0247] 23. 2,4-双(烯丙氧基)-5-异丙基苯甲酸(14)

[0248] 将化合物13 (2.5g, 8.6mmol) 同30ml 甲醇与30ml 氢氧化钠的 H_2O 溶液 (1.7g, 43.1mmol) 在室温下搅拌24小时。

[0249] 将混合物用乙酸乙酯稀释, 有机层用3N HCl溶液洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 在压力下浓缩, 用柱进行纯化, 得到化合物14, 产率58%。

[0250] $R_f=0.18$ (1:4 乙酸乙酯: 己烷) . ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 7.97 (s, 1H) , 6.43 (s, 1H) , 6.10-5.97 (m, 2H) , 5.47-5.39 (m, 2H) , 5.30 (d, $J=10.8\text{Hz}$, 2H) , 4.73 (d, $J=5.6\text{Hz}$, 2H) , 4.57 (d, $J=4.8\text{Hz}$, 2H) , 3.26-3.19 (m, 1H) , 1.18 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 6H) .

[0251] 24. (2,4-双(烯丙氧基)-5-异丙基苯基)(4-甲基-2-苯基哌嗪-1-基)甲酮(16)

[0252] 将化合物14 (0.18g, 0.66mmol) 、1-甲基-3-苯基哌嗪 (0.18g, 0.99mmol) 、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (0.25g, 1.33mmol) 、1-羟基苯并三唑 (0.09g) 和N,N-二异丙基乙胺 (0.09mL, 0.66mmol) 溶于4ml DMF中, 在微波辐射 (Biotage Initiator) 下于120℃搅拌3小时。

[0253] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释, 有机层用1N HCl溶液洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥, 在压力下浓缩并通过MPLC纯化, 得到化合物16, 产率92%。

[0254] $R_f=0.24$ (3:7 乙酸乙酯: 己烷) .

[0255] 25. (2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(4-甲基-2-苯基哌嗪-1-基)甲酮(17)

[0256] 在 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (10mg) 和4ml 甲酸铵的THF溶液 (227mg) 存在下, 将化合物16 (0.26g, 0.61mmol) 在微波辐射下于120℃搅拌30分钟。

[0257] 将反应混合物用乙酸乙酯稀释, 并将有机层用水洗涤。将其用 Na_2SO_4 干燥, 在压力下浓缩, 然后使用MPLC以两步获得化合物17, 产率为15%。

[0258] $R_f=0.32$ (8:2 乙酸乙酯: 己烷) . ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 7.45 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H) , 7.37 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 7.6Hz, 2H) , 7.25 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 7.6Hz, 1H) , 6.99 (s, 1H) , 6.40 (s, 1H) , 5.58 (s, 1H) , 4.24 (s, 1H) , 3.44 (t, $J=8.8\text{Hz}$, 12.0Hz, 1H) , 3.30 (t, $J=12.4\text{Hz}$, 10.4Hz, 1H) , 3.05-3.00 (m, 1H) , 2.79 (d, $J=10.8\text{Hz}$, 1H) , 2.47 (dd, $J=12.0\text{Hz}$, 4.0Hz, 1H) , 2.30 (s, 3H) , 2.22-2.16 (m, 1H) , 0.95 (dd, $J=20.0\text{Hz}$, 6.0Hz, 6H) . ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 171.5, 158.1, 138.8, 128.9, 127.3, 127.1, 126.4, 109.1, 103.9, 60.6, 55.4, 45.6, 26.1, 22.5, 21.1, 19.9, 14.3

[0259] <实施例2>二羟基苯基化合物的生物活性的评价

[0260] 1. 确认HSP90抑制作用

[0261] 通过荧光偏振测定 (FP测定) 证实实施例1中合成的二羟基苯基化合物的HSP90抑制作用。

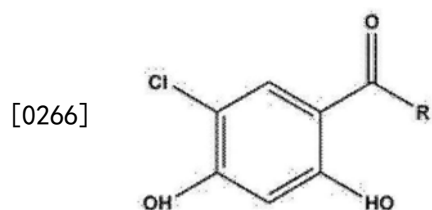
[0262] 将HFB缓冲液 (100mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸) pH 7.3、2M KCl、1M MgCl_2 、1M Na_2MoO_4 、100%NP40)、HSP90 α N末端结构域 (2 μM) 蛋白、FITC (异硫氰酸荧光素) 标记的格尔德霉素 (GA) 抑制剂 (500nM) 和各种浓度 (0.001 μM 、0.01 μM 、0.1 μM 、0.5 μM 、1 μM 、5 μM 、

10 μ M、50 μ M、100 μ M)的化合物加入每个孔中。

[0263] 此后,将板在4℃下孵育14小时。在495nm的激发波长和530nm的发射波长下测量毫偏振单位(millipolarization units)的偏振值。

[0264] 使用Prism软件(版本5.0,Graphpad Software,San Diego,CA)分析所有实验数据。另外,使用Chemdraw软件计算的tPSA(拓扑极性表面积)和LogP的测量值示于下表1和2中。

[0265] [化学式3]



[0267] 化合物11a至11i由化学式3表示。

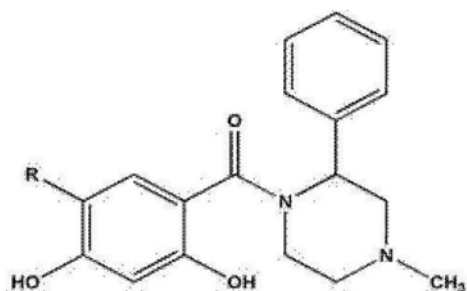
[0268] [表1]

[0269]

编号	R	化合物	HSP90 (FP) (IC ₅₀ ; μ M)	10 μ M 时的抑制率 (%)	30 μ M 时的抑制率 (%)	tPSA	LogP
1		11a	0.348	8.1	22.1	60.7	1.13
2		11b	0.541	7.6	26.3	60.7	1.69
3		11c	0.383	24.3	44.0	70	0.66
4		11d	5.59	0	0	72.8	0.65
5		11e	0.253	26.3	48.7	64	1.23
6		11f	3.21	0	10.5	81.1	0.25
7		11g	1.37	0	0	89.9	0.45
8		11h	3.92	0	0	77.8	0.84
9		11i	0.670	12.5	48.2	77.8	0.6

[0270] [化学式4]

[0271]



[0272] 化合物11j和17由以上化学式4表示。

[0273] [表2]

[0274]

编号	R	化合物	HSP90 (FP) (IC ₅₀ ; μM)	10μM 时的抑制率 (%)	30μM 时的抑制率 (%)	tPSA	LogP
10	Cl	11j	0.070	-	-	64.01	3.22
11	异丙基	17	0.0495	72.08	77.58	64.01	3.80

[0275] 结果,如表2所示,化合物17对HSP90的IC₅₀为0.0495μM,H1975的IC₅₀为98μM。

[0276] 另外,通过FP分析确认的化合物17的HSP90抑制活性如图1所示。升高浓度的化合物17增加了FITC-格尔德霉素/HSP90α(N-末端结构域)蛋白响应,并记录FP读数。

[0277] 如表2所示,化合物17以浓度依赖性方式显示出HSP90抑制活性。

[0278] 2. 确认细胞增殖和存活抑制

[0279] 接下来,用化合物17处理非转移性肺癌细胞,并通过MTS[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑鎓,内盐]分析来测量细胞增殖率或细胞存活率。

[0280] 将细胞以3000细胞/孔(Sk-Br3)和2000细胞/孔(H1975)分配在96孔板中,每孔加入100μL培养基,然后孵育过夜。

[0281] 第二天,向各孔中加入浓度为0、0.01μM、0.1μM、1μM、5μM、10μM、30μM、50μM或70μM的化合物17或1%DMSO载体(对照),并在37℃下培养1天、2天和3天。

[0282] 使用Promega Cell Titer 96Aqueous One Solution细胞增殖测定来评估细胞增殖。

[0283] 在化合物和细胞培养后,向每个孔中加入20μL测定底物溶液,并在37℃下再孵育1小时。

[0284] 通过使用酶标仪(Tecan Infinite F200Proplate reader)测量490nm处的吸光度来确认细胞增殖。

[0285] 向各孔中加入浓度为0、0.01μM、0.1μM、1μM、5μM、10μM、30μM、50μM或70μM的化合物17或1%DMSO载体(对照组),并在37℃下孵育72小时并在490nm处测定吸光度,测量值表示为占仅用DMSO培养的细胞其吸光度的百分比,以确认细胞存活。

[0286] 结果如图2所示,随着时间的推移,细胞的增殖速率以化合物17的浓度依赖性方式被抑制(图2A),并且还观察到细胞死亡(图2B)。

[0287] 3. 确认H1975集落形成抑制作用

[0288] 用化合物17以0.05μM或0.5μM的浓度处理H1975细胞3周,然后进行克隆形成测定(clogenic assay)。

[0289] 首先,将RPMI 1640培养基(10%FBS、0.48%琼脂)加入到6孔板中并硬化,然后将10000个细胞(H1975)分配到含有RPMI 1640培养基(10%FBS、0.33%琼脂)的培养基中,并进行固化。固化后,用浓度为0.05 μ M或0.5 μ M的化合物处理细胞24小时,随后培养3周,然后用结晶紫染色溶液确认菌落形成。

[0290] 结果如图3所示,即使在0.05 μ M的低浓度下,化合物17也抑制了H1975的集落形成。

[0291] 4. 蛋白表达分析

[0292] 将重组HSP90从pET-15b质粒(Novagen)表达到大肠杆菌BL21(DE3)细胞(BioLabs)中。

[0293] 使用含有2.5mg/mL(500 μ l/200ml)氨苄西林的LB肉汤培养基,以180rpm的速度振荡,使新菌落生长直至吸光度达到 $A_{600}=0.5$ 。

[0294] 此后,通过异丙基- β -D-吡喃半乳糖苷(最终浓度1mM)诱导蛋白表达。

[0295] 将温度降至18 $^{\circ}$ C后,将细胞振荡孵育过夜,通过离心(4000rpm,20分钟,4 $^{\circ}$ C)获得细胞沉淀(cell pellet)。

[0296] 将细胞沉淀悬浮在NTA(次氨基三乙酸)缓冲液(含有20mM Tris pH 8.0、0.5M NaCl)中,在冰中超声处理并离心以获得上清液(14000rpm,99分钟,4 $^{\circ}$ C)。

[0297] 用Histidine Trap柱和镍-次氨基乙酸纯化带有His标签的蛋白,并通过FPLC(快速蛋白液相色谱:Pharmacia)分离。

[0298] 为了鉴定HSP蛋白,通过蛋白免疫印迹(western blotting)对蛋白进行分析。

[0299] 通过PD10柱从纯化的蛋白中除去盐,并在Vivaspin 20中浓缩至2.4mg/ml,并储存在-70 $^{\circ}$ C。

[0300] 接下来,将细胞分配到100mm培养皿(1×10^6 /皿)中,并粘附到底部表面过夜。向细胞中加入浓度为0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M或1 μ M的化合物17,然后进一步培养24小时。

[0301] 另外,用DMSO(1%)或格尔德霉素(1 μ M)作为对照对细胞进行处理,并培养24小时。

[0302] 收获培养的细胞并在冰冷冷却的裂解缓冲液(23mM Tris-HCl pH 7.6、130mM NaCl、1%NP40、1%脱氧胆酸钠、0.1%SDS(十二烷基硫酸钠))裂解,将30 μ g裂解物通过SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)分离并转移至PVDF膜(Bio-Rad)。

[0303] 用含有5%脱脂乳的TBST(含有Tris缓冲盐水的吐温20)将膜封闭,并与各一抗[EGFR(表皮生长因子受体)、Her2(人表皮生长因子受体2型)、Met、N-钙粘蛋白、E-钙粘蛋白、 α -微管蛋白、乙酰- α -微管蛋白、蛋白激酶B(Akt)、c-Raf、Cdk4(细胞周期蛋白依赖性激酶4)、HSP90、HSP70、PARP(聚ADP-核糖聚合酶)、半胱天冬酶3、切割的半胱天冬酶3、截短的半胱天冬酶8、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bax或 β -肌动蛋白,购自Cell Signaling Technology(USA)]进行孵育。

[0304] 在与辣根过氧化物酶缀合的二抗结合后,通过ECL(电化学发光,GE healthcare, USA)使蛋白可视化。

[0305] 结果如图4所示,化合物17以浓度依赖性方式抑制HSP蛋白,以确认EGFR、Her2、Met、Akt、c-Raf、Cdk4的HSP90客户蛋白的降解,并且大多数客户蛋白在500nm下变性。

[0306] II. 苯甲酰胺化合物的合成和生物活性的评价

[0307] <参考例2>试剂和实验装置

[0308] 使用了购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)、Acros Organics(Thermo Fisher

Scientific In,Gell,Belgium)、Alfa Aesar(A Johnson Matthey Company,Karlsruhe, Germany)和Daejung (Daejeonghwageum Co.,Kyunggi-do,韩国)的试剂。化合物合成在氩气或大气中进行,在某些情况下使用微波(Biotage®,Uppsala,Sweden)。萃取、重结晶、柱色谱和MPLC(中压液相色谱)用于对合成后的产物进行纯化。将硅胶60(0.040-0.063mm)用作柱色谱的填料,将SNAP小柱(KP-Sil 25g或KP-C18-HS 30g)用于MPLC。

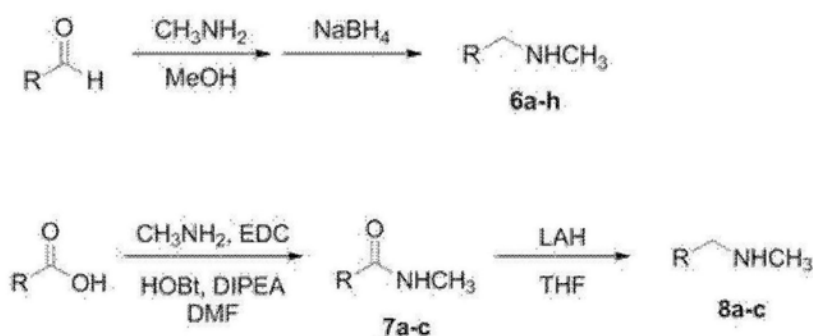
[0309] 通过Bruker spectrospin 400光谱仪(Bruker co,Billerica,Massachusetts, USA)使用 ^1H NMR和 ^{13}C NMR光谱鉴定每种化合物的结构。使用 CDCl_3 、 CD_3OD 或二甲基亚砜(DMSO)- d_6 作为溶剂,化学位移值(δ)以ppm表示,峰以d(二重峰)、t(三重峰)、m(多重峰)和dd(双二重峰)表示。

[0310] 使用供电装置(BioRad co,Hercules,CA)、图像分析仪(Fuji,Tokyo,Japan)和酶标仪(TECAN,Mannedorf,Switzerland)评估生物活性。

[0311] <实施例3>苯甲酰胺类化合物的合成

[0312] 以与下面反应方案4相同的方式合成化合物6a-6h和8a-8c。

[0313] [反应方案4]



[0314]

编号	R	化合物	编号	R	化合物	编号	R	化合物
1		6a	5		6e	8		6h
2		6b				9		7a, 8a
3		6c	6		6f	10		7b, 8b
4		6d	7		6g	11		7c, 8c

[0315] 1.胺合成方法I (6a-h)

[0316] 将1当量的每种醛和1.5当量的40%甲胺蒸馏水溶液溶解在MeOH中,并在室温下搅拌30分钟。在0℃下缓慢加入0.5当量的硼氢化钠(NaBH_4),然后搅拌1小时。此后,将 H_2O 加入混合物中,通过减压蒸馏除去MeOH,并用二氯甲烷(DCM)萃取三次。将DCM层用 Na_2SO_4 干燥并过滤,通过减压蒸馏除去溶剂,得到6a-h,产率为32.0-76.4%。

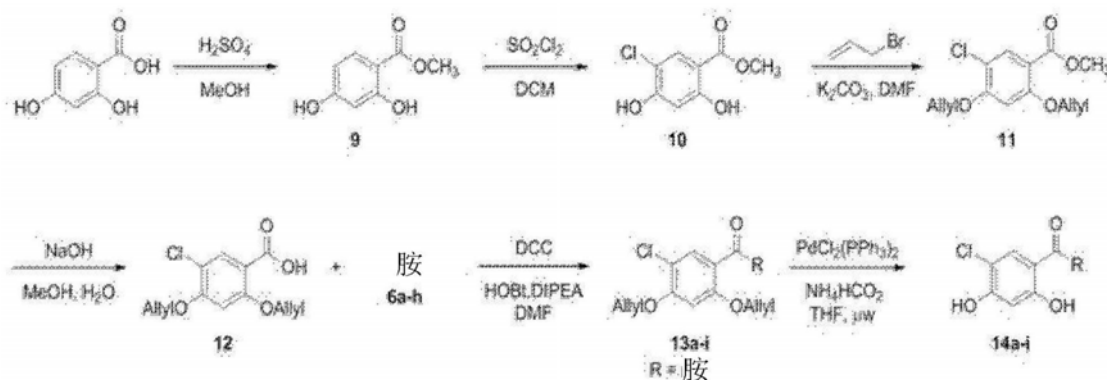
[0317] 2.胺合成方法II (8a-c)

[0318] 将1当量的苯甲酸、1.5当量的40%甲胺蒸馏水溶液、2当量的EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺)或DCC(N,N'-二环己基碳二亚胺)、1当量的HOBT(羟基苯并三唑)和

1当量的DIPEA (N,N-二异丙基乙胺) 溶解在二甲基甲酰胺 (DMF) 中,并在120℃和20bar下微波反应3小时。溶解在乙酸乙酯 (EA) 中并用1N HCl饱和水溶液洗涤数次后,将EA层用 Na_2SO_4 干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC或柱色谱法纯化后,将1当量纯化的化合物溶于四氢呋喃 (THF) 中,在0℃下缓慢加入3当量的氢化铝锂 (LAH) 并搅拌12小时。用10% NaOH饱和水溶液和 H_2O 淬灭反应,并用乙醚萃取。乙醚层用 Na_2SO_4 干燥并过滤,减压蒸馏除去溶剂。通过柱色谱纯化后,得到8a-c,产率为22.5%、88.7%。

[0319] 以与下面反应方案5中相同的方式合成化合物14a-14i。

[0320] [反应方案5]



[0321]

编号	R	化合物	编号	R	化合物	编号	R	化合物
1		14a	4		14d	7		14g
2		14b	5		14e	8		14h
3		14c	6		14f	9		14i

[0322] 3. 2,4-二羟基苯甲酸甲酯 (9)

[0323] 将2,4-二羟基苯甲酸 (10.00g, 64.88mmol) 和5mL硫酸 (H_2SO_4) 加入到40mL MeOH中,并在100℃下回流24小时。在室温下冷却后,通过减压蒸馏除去溶剂,并在0℃下加入 H_2O 。将得到的白色固体溶解在EA中,并用饱和 NaHCO_3 水溶液洗涤。将EA层用 Na_2SO_4 干燥并过滤,通过减压蒸馏除去溶剂,得到化合物9,产率为85%。

[0324] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 11.0 (s, 1H), 7.73 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.41-6.37 (m, 2H), 5.78 (s, 1H), 3.92 (s, 3H)。

[0325] 4. 5-氯-2,4-二羟基苯甲酸甲酯 (10)

[0326] 将化合物8 (8.30g, 49.41mmol) 和磺酰氯 (SO_2Cl_2) (4.11mL, 56.83mmol) 加入到DCM中,并在室温下搅拌24小时。通过减压蒸馏除去溶剂,溶解在EA中,用饱和 NaHCO_3 水溶液洗涤,用 Na_2SO_4 干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。使用EA:己烷=1:9的溶剂混合物,通过柱色谱纯化,得到化合物10,产率32.5%。

[0327] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 10.8 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.91

[0328] 5. 2,4-双(烯丙氧基)-5-氯苯甲酸甲酯 (11)

[0329] 将化合物9 (1.10g, 5.46mmol)、烯丙基溴 (1.23mL, 14.20mmol) 和 K_2CO_3 (1.96g,

14.20mmol) 溶解在DMF中。在氩气下, 将其在室温下搅拌12小时, 然后溶解在EA中并用饱和NaHCO₃水溶液洗涤。将EA层用Na₂SO₄干燥, 减压蒸馏除去溶剂, 得到化合物11, 产率83%。

[0330] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.85 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.44-5.95 (m, 2H), 5.50-5.40 (m, 2H), 5.30-5.26 (m, 2H), 4.58-4.45 (m, 4H), 3.81 (s, 3H)。

[0331] 6. 2,4-双(烯丙氧基)-5-氯苯甲酸(12)

[0332] 将化合物8 (1.27g, 5.64mmol) 和NaOH (1.12g, 28.1mmol) 加入到H₂O (20mL) 和MeOH (20mL) 中, 并在室温下搅拌8小时, 然后将其溶解在EA中并用3N HCl洗涤。将EA层用Na₂SO₄干燥, 然后通过减压蒸馏除去溶剂, 得到化合物12, 产率为74%。

[0333] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.16 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.10-5.99 (m, 2H), 5.51-5.35 (m, 2H), 4.76-4.65 (m, 4H)。

[0334] 7. N-苄基-5-氯-2,4-二羟基苯甲酰胺(14a)

[0335] 将化合物12 (0.50g, 1.86mmol)、苄胺 (0.26g, 1.86mmol)、HOBt (0.25g, 1.86mmol)、DCC (0.77g, 3.72mmol) 和DIPEA (0.32mL, 1.86mmol) 溶解在DMF中, 微波反应在80℃和20bar下进行3小时。通过减压蒸馏除去DMF, 通过MPLC (R_f=0.19, EA:己烷=1:4) 纯化得到化合物13a。将化合物13a溶解在THF中, 并向其中加入PdCl₂(PPh₃)₂ (20mg) 和NH₄HCO₃ (200mg), 然后在120℃和20bar下微波反应30分钟。

[0336] 将其溶解在EA中, 用H₂O洗涤, 并将EA层用Na₂SO₄干燥, 然后过滤。减压蒸馏除去溶剂, 用MPLC (R_f=0.13, EA:己烷=3:7) 纯化, 得到化合物14a, 产率53.2%。

[0337] ¹H NMR (400MHz, MeOD) δ 7.77 (s, 1H), 7.29-7.26 (m, 4H), 7.22-7.19 (m, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.50 (s, 2H)。 ¹³C NMR (100MHz, MeOD) δ 165.2, 157.0, 154.2, 135.3, 125.2, 124.7, 123.7, 123.4, 108.1, 104.9, 100.2, 39.1。

[0338] 8. N-苄基-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺(14b)

[0339] 将化合物12 (0.30g, 1.12mmol)、化合物6a (0.21g, 1.67mmol)、HOBt (0.15g, 1.12mmol)、DCC (0.46g, 2.23mmol) 和DIPEA (0.19mL, 1.12mmol) 溶解在DMF中, 微波反应在80℃和20bar下进行3小时。然后将其溶解在EA中并用H₂O洗涤, 并将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤, 然后通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC (R_f=0.31, EA:己烷=3:7) 纯化, 得到化合物13b。将化合物13b溶解在THF中, 并向其中加入PdCl₂(PPh₃)₂ (20mg) 和NH₄HCO₃ (200mg), 然后在120℃和20bar下微波反应30分钟。溶解在EA中并用H₂O洗涤后, 将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤, 并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC (R_f=0.28, EA:己烷=2:3) 纯化, 以62.5%的产率获得化合物14b。

[0340] ¹H NMR (400MHz, MeOD) δ 7.35-7.24 (m, 5H), 7.16 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 2.89 (s, 3H)。

[0341] 9. 5-氯-2,4-二羟基-N-(4-甲氧基苄基)-N-甲基苯甲酰胺(14c)

[0342] 将化合物12 (0.30g, 1.12mmol)、化合物6b (0.18g, 1.67mmol)、HOBt (0.15g, 1.12mmol)、DCC (0.46g, 2.23mmol) 和DIPEA (0.19mL, 1.12mmol) 溶解在DMF中, 微波反应在80℃和20bar下进行3小时。减压蒸馏除去DMF, 通过MPLC纯化得到化合物 (R_f=0.20, EA:己烷=3:7)。将化合物13c溶解在THF中, 并向其中加入PdCl₂(PPh₃)₂ (20mg) 和NH₄HCO₃ (200mg), 然后在120℃和20bar下微波反应30分钟。溶解在EA中并用H₂O洗涤后, 将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤, 并通过减压蒸馏除去溶剂。

[0343] 通过MPLC ($R_f=0.30$, EA:己烷=2:3) 纯化,得到化合物14c,产率63.8%。

[0344] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.27 (s, 1H), 7.20 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.90 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 6.62 (s, 1H), 4.64 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.03 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 171.1, 159.6, 159.3, 155.2, 129.0, 128.8, 128.0, 114.4, 111.1, 110.5, 105.2, 55.4.

[0345] 10. 5-氯-N-(3,4-二甲氧基苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺 (14d)

[0346] 将化合物12 (0.33g, 1.23mmol)、化合物6c (0.33g, 1.84mmol)、HOBt (0.17g, 1.23mmol)、DCC (0.51g, 2.46mmol) 和DIPEA (0.22mL, 1.23mmol) 溶解在DMF中,微波反应在120℃和20bar下进行3小时。通过MPLC ($R_f=0.26$, EA:己烷=2:3) 纯化获得化合物13d。将化合物13d溶解在THF中,并向其中加入 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (20mg) 和 NH_4HCO_3 (200mg),然后在120℃和20bar下微波反应30分钟。溶解在EA中并用 H_2O 洗涤后,将EA层用 Na_2SO_4 干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC ($R_f=0.22$, EA:己烷=1:1) 纯化,得到化合物14d,产率63.8%。

[0347] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.31 (s, 1H), 6.88-6.81 (m, 3H), 6.66 (s, 1H), 4.65 (s, 2H), 3.88 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 6H), 3.07 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 170.5, 155.3, 149.1, 148.3, 131.9, 131.8, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 119.3, 111.0, 110.5, 105.1, 55.7.

[0348] 11. N-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基甲基)-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺 (14e)

[0349] 将化合物12 (0.30g, 1.12mmol)、化合物6d (0.28g, 1.67mmol)、HOBt (0.15g, 1.12mmol)、DCC (0.46g, 2.23mmol) 和DIPEA (0.19mL, 1.12mmol) 溶解在DMF中,微波反应在80℃和20bar下进行3小时。通过减压蒸馏除去DMF,然后通过MPLC ($R_f=0.25$, EA:己烷=3:7) 纯化得到化合物13e。将化合物13e溶解在THF中,加入 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (20mg) 和 NH_4HCO_3 (200mg),然后在120℃和20bar下微波反应30分钟。在EA中溶解并用 H_2O 洗涤后,将EA层用 Na_2SO_4 干燥并过滤,通过减压蒸馏除去溶剂,通过MPLC纯化 ($R_f=0.23$, EA:己烷=2:3) 获得化合物14e,产率为78.6%。

[0350] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.28 (s, 1H), 6.79-6.72 (m, 3H), 6.60 (s, 1H), 5.96 (s, 2H), 4.59 (s, 2H), 3.03 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ

[0351] 12. 5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(3,4,5-三甲氧基苄基) 苯甲酰胺 (14f)

[0352] 将化合物12 (0.30g, 1.12mmol)、化合物6e (0.35g, 1.23mmol)、HOBt (0.15g, 1.12mmol)、DCC (0.46g, 2.23mmol) 和DIPEA (0.19mL, 1.12mmol) 溶解在DMF中,微波反应在80℃和20bar下进行3小时。通过MPLC ($R_f=0.20$, EA:己烷=2:3) 纯化获得化合物13f。将化合物13f溶解在THF中,向其中加入 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (20mg) 和 NH_4HCO_3 (200mg),然后在120℃和20bar下微波反应30分钟。在EA中溶解并用 H_2O 洗涤后,将EA层用 Na_2SO_4 干燥并过滤,通过减压蒸馏除去溶剂,通过MPLC ($R_f=0.26$, EA:己烷=3:2) 纯化得到化合物14f,产率为67.0%。

[0353] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.23 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 4.59 (s, 2H), 3.80 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 9H), 3.02 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 171.2, 158.7, 155.4, 153.6, 137.3, 132.0, 128.8, 111.6, 110.8, 105.1, 104.5, 61.0, 56.2.

[0354] 13. 5-氯-N-(2-氯-3,4,5-三甲氧基苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺 (14g)

[0355] 将化合物12 (0.20g, 0.74mmol)、化合物6f (0.27g, 1.12mmol)、HOBt (0.10g, 0.74mmol)、DCC (0.31g, 1.49mmol) 和DIPEA (0.15mL, 0.74mmol) 溶解在DMF中,微波反应在

120℃和20bar下进行3小时。用EA洗涤并用H₂O洗涤后,将EA层用Na₂SO₄干燥,过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂,通过MPLC (R_f=0.26,EA:己烷=3:7) 纯化得到化合物13g。将化合物13g溶解在THF中,加入PdCl₂(PPh₃)₂ (20mg) 和NH₄HCO₃ (200mg),然后在120℃和20bar下微波反应30分钟,用Na₂SO₄干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC (R_f=0.20,EA:己烷=1:1) 纯化,得到化合物14g,产率41.9%。

[0356] ¹H NMR (400MHz,CDCl₃) d 7.21 (s,1H),6.75 (s,1H),6.47 (s,1H),4.75 (s,2H),3.90 (d,J=9.2Hz,6H),3.83 (s,3H),3.03 (s,3H). ¹³C NMR (100MHz,CDCl₃) d 171.1,156.3,155.4,152.5,150.0,142.4,132.0,129.3,128.9,119.2,113.0,111.3,107.0,104.2,61.2,56.1,49.8.

[0357] 14. N-(2-溴-3,4,5-三甲氧基苄基)-5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺 (14h)

[0358] 将化合物12 (0.19g,0.69mmol)、化合物6g (0.30g,1.03mmol)、HOBt (0.09g,0.69mmol)、DCC (0.28g,1.38mmol) 和DIPEA (0.12mL,0.69mmol) 溶解在DMF中,微波反应在120℃和20bar下进行3小时。溶解在EA中并用H₂O洗涤后,将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC (R_f=0.24,EA:己烷=3:7) 纯化获得化合物13h。

[0359] 将化合物13h溶解在THF中,并向其中加入PdCl₂(PPh₃)₂ (20mg) 和NH₄HCO₃ (200mg),然后在120℃和20bar下微波反应30分钟。溶解在EA中并用H₂O洗涤后,将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC (R_f=0.24,EA:己烷=1:1) 纯化,得到化合物14h,产率为20.5%。

[0360] ¹H NMR (400MHz,CDCl₃) d 7.15 (s,1H),6.69 (s,1H),6.42 (s,1H),4.68 (s,2H),3.83 (d,J=6.0Hz,6H),3.77 (d,3H),2.98 (s,3H). ¹³C NMR (100MHz,CDCl₃) d 160.8,155.2,153.4,151.4,143.0,130.9,128.6,110.7,110.3,105.4,61.4,61.3,60.7,56.5.

[0361] 15. 5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(3-甲基苄基) 苯甲酰胺 (14i)

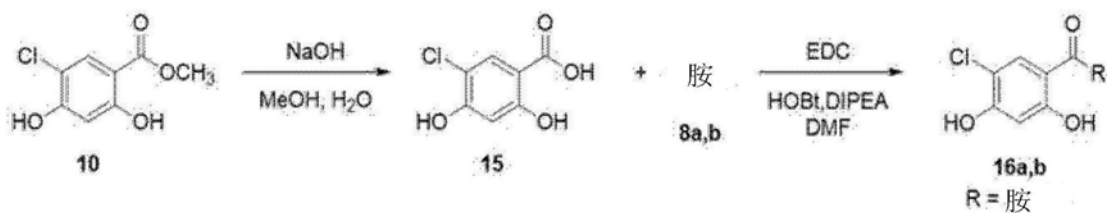
[0362] 将化合物12 (0.25g,0.93mmol)、化合物6h (0.19g,1.40mmol)、HOBt (0.13g,0.93mmol)、DCC (0.39g,1.86mmol) 和DIPEA (0.17mL,0.93mmol) 在DMF中,微波反应在120℃和20bar下进行3小时。在EA中溶解并用H₂O洗涤后,将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤,通过减压蒸馏除去溶剂,通过MPLC (R_f=0.22,EA:己烷=1:4) 纯化获得化合物13i。

[0363] 将化合物13i溶解在THF中,并向其中加入PdCl₂(PPh₃)₂ (20mg) 和NH₄HCO₃ (200mg),并在120℃和20bar下进行微波反应30分钟。在EA中溶解并用H₂O洗涤后,将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤,通过减压蒸馏除去溶剂,通过MPLC (R_f=0.20,EA:己烷=3:7) 纯化得到化合物14i,产率为68.7%。

[0364] ¹H NMR (400MHz,CDCl₃) d 7.31 (s,1H),7.28 (d,J=7.6Hz,1H),7.15 (d,J=7.6Hz,1H),7.10-7.09 (m,2H),6.65 (s,1H),4.70 (s,2H),3.08 (s,3H),2.38 (s,3H). ¹³C NMR (100MHz,CDCl₃) d 171.3,160.0,155.2,138.8,136.0,128.9,128.8,128.7,128.3,124.6,110.9,110.4,105.2,36.8.

[0365] 以与下面反应方案6中相同的方式合成化合物16a和16b。

[0366] [反应方案6]



[0367]

编号	R	化合物
10		16a
11		16b

[0368] 16. 5-氯-2,4-二羟基苯甲酸 (15)

[0369] 将化合物9 (1.98g, 9.77mmol) 和NaOH (1.95g, 48.80mmol) 加入到H₂O (30mL) 和MeOH (30mL) 中, 并在室温下搅拌12小时。将其溶解在EA中, 用3N HCl饱和水溶液洗涤, 并将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤。减压蒸馏除去溶剂, 通过MPLC纯化, 得到化合物15, 产率100%。

[0370] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.76 (s, 1H), 6.41 (s, 1H) .

[0371] 17. 5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(2-甲基苄基) 苯甲酰胺 (16a)

[0372] 将化合物15 (0.17g, 0.92mmol)、化合物8a (0.19g, 1.40mmol)、HOBT (0.12g, 0.92mmol)、EDC (0.35g, 1.86mmol) 和DIPEA (0.16mL, 0.92mmol) 溶解在DMF中, 微波反应在120℃和20bar下进行3小时。将其溶解在EA中, 用1N HCl饱和水溶液洗涤, 用Na₂SO₄干燥并过滤。减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC (R_f=0.23, EA:己烷=1:4) 纯化残余物, 得到化合物16a, 产率为90.5%。

[0373] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.25-7.24 (m, 4H), 6.65 (s, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.27 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 160.9, 155.2, 136.4, 134.0, 131.0, 128.7, 128.0, 127.4, 126.7, 110.7, 110.2, 105.3, 19.2.

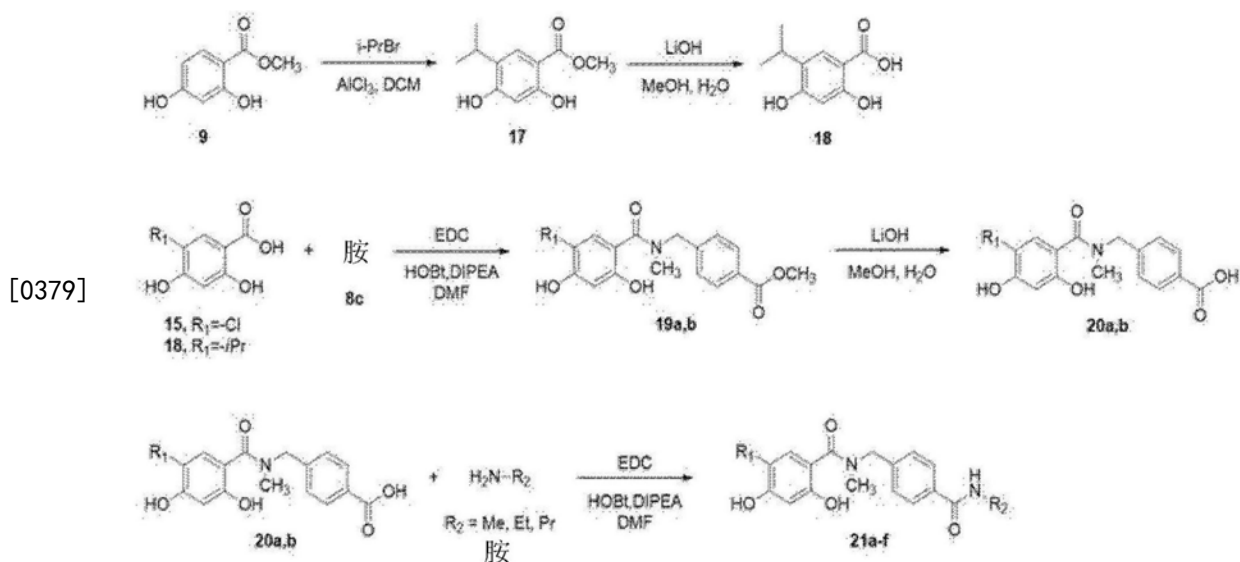
[0374] 18. 5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-甲基苄基) 苯甲酰胺 (16b)

[0375] 将化合物15 (0.21g, 1.12mmol)、化合物8b (0.23g, 1.69mmol)、HOBT (0.15g, 1.12mmol)、EDC (0.43g, 2.25mmol) 和DIPEA (0.20mL, 1.12mmol) 溶解在DMF中, 微波反应在120℃和20bar下进行3小时。将其溶解在EA中, 用1N HCl饱和水溶液洗涤, 然后用Na₂SO₄干燥EA层, 过滤。减压蒸馏除去溶剂, 通过MPLC (R_f=0.23, EA:己烷=1:4) 纯化得到化合物16b, 产率26.0%。

[0376] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.28 (s, 1H), 7.17 (t, J=9.2Hz, 9.2Hz, 4H), 6.63 (s, 1H), 4.67 (s, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.35 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 160.1, 155.0, 137.7, 133.0, 129.7, 128.6, 128.5, 127.6, 127.3, 110.9, 110.2, 105.2, 21.2.

[0377] 与下面反应方案7中相同的方式合成化合物21a-21f。

[0378] [反应方案7]



[0380] 19. 2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸甲酯 (17)

[0381] 将化合物9 (10.70g, 63.50mmol)、AlCl₃ (16.90g, 127.0mmol) 和2-溴丙烷 (11.90mL, 127.0mmol) 溶解在DCM (125mL) 中, 并在氩气注入下在50℃下回流24小时。在6小时内分别加入2当量的AlCl₃和2-溴丙烷。用饱和10%NaOH水溶液将反应混合物调节至pH 6, 减压蒸馏除去溶剂, 将残余物溶于EA中, 用饱和NaHCO₃水溶液洗涤。将EA层用Na₂SO₄干燥, 过滤并通过减压蒸馏除去溶剂。使用以EA:己烷=1:9混合的溶剂, 通过柱色谱法纯化, 得到化合物17, 产率为34.5%。

[0382] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 12.61 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 3.22-3.12 (m, 1H), 2.61 (s, 3H), 1.27 (d, J=6.8Hz, 6H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 170.7, 161.6, 159.6, 128.1, 127.1, 105.7, 103.2, 52.2, 26.7, 22.8.

[0383] 20. 2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸 (18)

[0384] 将化合物17 (4.60g, 21.90mmol) 和LiOH (10g) 在70℃下加入H₂O (30mL) 和MeOH (30mL) 中, 并回流12小时。将其溶解在EA中, 并用3N HCl饱和水溶液洗涤。将EA层用Na₂SO₄干燥, 过滤并通过减压蒸馏除去溶剂, 得到化合物18, 产率为60.5%。

[0385] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.68 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 3.19-3.12 (m, 1H), 1.17 (d, J=4.0Hz, 6H).

[0386] 21. 4-((5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸甲酯 (19a) 和4-((2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸甲酯 (19b)

[0387] 将1当量的化合物12或18、1.5当量的化合物8c、1当量的HOBt、2当量的EDC和1当量的DIPEA溶解在DMF中, 并在120℃和20bar下进行微波反应3小时。溶解在EA中并用H₂O洗涤后, 将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤, 然后通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC根据每种化合物的条件纯化获得化合物19a或19b, 产率分别为76.1%、81.7%。

[0388] 19a: ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 8.03 (d, J=6.6Hz, 2H), 7.35 (d, J=6.6Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.07 (s, 3H).

[0389] 19b: ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 8.05 (d, J=6.7Hz, 2H), 7.37 (d, J=6.7Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.76 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.13-3.04 (m, 1H), 3.05 (s, 3H), 0.94 (d, J=5.3Hz, 6H).

[0390] 22. 4-((5-氯-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸(20a)和4-((2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸(20b)

[0391] 将1当量的化合物19a或19b和LiOH(2.0g)加入到H₂O(20mL)和MeOH(20mL)中,并在室温下搅拌3小时。将其溶解在EA中并用3N HCl饱和水溶液洗涤。将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤,通过减压蒸馏除去溶剂,得到化合物20a和20b,产率分别为84.8%和88.1%。

[0392] 20a: ¹H NMR(500MHz,CDCl₃) d 8.13(d,J=6.66Hz,2H),7.41(d,J=6.6Hz,2H),7.30(s,1H),6.68(s,1H),4.79(s,2H),3.12(s,3H)。

[0393] 20b: ¹H NMR(500MHz,MeOD) d 8.00(d,J=6.5Hz,2H),7.41(d,J=5.8Hz,2H),7.0(s,1H),6.34(s,1H),4.86(s,2H),3.18-3.11(m,1H),3.0(s,3H),1.11(d,J=5.2Hz,6H)。

[0394] 23. 5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-(甲基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺(21a)

[0395] 将化合物20a(0.27g,0.79mmol)、40%甲胺蒸馏水溶液(0.10mL,1.18mmol)、HOBt(0.11g,0.79mmol)、EDC(0.30g,1.58mmol)和DIPEA(0.14mL,0.79mmol)溶解在DMF中,并在120℃和20bar下进行微波反应2小时。将其溶解在EA中,用1N HCl饱和水溶液洗涤,用Na₂SO₄干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC(C18柱,R_f=0.21,H₂O:MeOH=4:1)纯化,以16.7%的产率获得化合物21a。

[0396] ¹H NMR(500MHz,CDCl₃) d 7.78(d,J=6.6Hz,2H),7.36(d,J=6.6Hz,2H),7.30(s,1H),6.68(s,1H),4.75(s,2H),3.09(s,3H),3.03(d,J=3.8Hz,3H)。

[0397] 24. 5-氯-N-(4-(乙基氨基甲酰基)苄基)-2,4-二羟基-N-甲基苯甲酰胺(21b)

[0398] 将化合物20a(0.27g,0.79mmol)、70%乙胺H₂O溶液(0.10mL,1.18mmol)、HOBt(0.11g,0.79mmol)、EDC(0.30g,1.58mmol)、DIPEA(0.14mL,0.79mmol)溶解于DMF中,微波反应在120℃和20bar下进行2小时。在EA中溶解并用1N HCl饱和水溶液洗涤后,将EA层用Na₂SO₄干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC(C18柱,R_f=0.21,H₂O:MeOH=4:1)纯化,得到化合物21b,产率31.2%。

[0399] ¹H NMR(500MHz,CDCl₃) d 7.78(d,J=6.6Hz,2H),7.35(d,J=6.6Hz,2H),7.30(s,1H),6.67(s,1H),4.75(s,2H),3.54-3.49(m,2H),2.96(s,3H),1.26(t,J=5.8Hz,5.8Hz,3H)。 ¹³C NMR(100MHz,CDCl₃) d

[0400] 25. 5-氯-2,4-二羟基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺(21c)

[0401] 将化合物20a(0.26g,0.76mmol)、丙胺(0.10mL,1.14mmol)、HOBt(0.10g,0.76mmol)、EDC(0.30g,1.52mmol)和DIPEA(0.10mL,0.76mmol)溶解在DMF中,微波反应在120℃和20bar下进行3小时。在EA中溶解并用1N HCl饱和水溶液洗涤后,将EA层用Na₂SO₄干燥,过滤并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC(C18柱,R_f=0.21,H₂O:MeOH=7:3)纯化,得到化合物21c,产率45.5%。

[0402] ¹H NMR(500MHz,CDCl₃) d 7.78(d,J=6.6Hz,2H),7.35(d,J=6.6Hz,2H),7.28(s,1H),6.67(s,1H),4.75(s,2H),3.46-3.42(m,2H),3.09(s,3H),1.67-1.62(m,2H),1.00(t,J=5.9Hz,5.9Hz,H)。

[0403] 26. 2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(甲基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺(21d)

[0404] 将化合物20b(0.21g,0.62mmol)、40%甲胺蒸馏水溶液(0.08mL,0.93mmol)、HOBt(0.08g,0.62mmol)、EDC(0.23g,1.24mmol)和DIPEA(0.11mL,0.62mmol)溶解在DMF中,并在

120℃和20bar下进行微波反应3小时。将其溶解在EA中,用1N HCl饱和水溶液洗涤,用Na₂SO₄干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC (C18柱, R_f=0.21, H₂O:MeOH=7:3) 纯化,得到化合物21d,产率为36.1%。

[0405] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.79 (d, J=6.5Hz, 2H), 7.36 (d, J=6.4Hz, 2H), 7.08 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 6.46 (s, 2H), 3.08 (s, 3H), 3.06-3.03 (m, 1H), 0.98 (d, J=5.3Hz, 6H)。

[0406] 27. N-(4-(乙基氨基甲酰基)苄基)-2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺 (21e)

[0407] 将化合物20b (0.22g, 0.64mmol)、70%乙胺蒸馏水溶液 (0.08mL, 0.97mmol)、HOBt (0.09g, 0.64mmol)、EDC (0.25g, 1.29mmol) 和DIPEA (0.12mL, 0.64mmol) 溶解在DMF中,并在120℃和20bar下进行微波反应3小时。将其溶解在EA中,用1N HCl饱和水溶液洗涤,用Na₂SO₄干燥并过滤,并通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC (C18柱, R_f=0.21, H₂O:MeOH=7:3) 纯化,以24.3%的产率获得化合物21e。

[0408] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.78 (d, J=6.6Hz, 2H), 7.33 (d, J=6.6Hz, 2H), 7.05 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.52-3.47 (m, 2H), 3.07-3.05 (m, 1H), 3.05 (s, 3H), 1.27-1.23 (m, 3H), 0.98 (d, J=5.4Hz, 6H)。

[0409] 28. 2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基-N-(4-(丙基氨基甲酰基)苄基)苯甲酰胺 (21f)

[0410] 将化合物20b (0.22g, 0.64mmol)、丙胺 (0.08mL, 0.96mmol)、HOBt (0.09g, 0.64mmol)、EDC (0.25g, 1.28mmol)、DIPEA (0.11mL, 0.64mmol) 溶解在DMF中,微波反应在120℃和20bar下进行3小时。将其溶解在EA中,用1N HCl饱和水溶液洗涤,用Na₂SO₄干燥并过滤,然后通过减压蒸馏除去溶剂。通过MPLC (C18柱, R_f=0.21, H₂O:MeOH=7:3) 纯化,得到化合物21f,产率为22.3%。

[0411] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, J=6.6Hz, 2H), 7.29 (d, J=6.6Hz, 2H), 7.02 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.41-3.37 (m, 2H), 3.07-3.05 (m, 1H), 3.02 (s, 3H), 1.63 (s, 2H), 0.97-0.92 (m, 9H)。

[0412] 29. N-苄基-2,4-二羟基-5-异丙基-N-甲基苯甲酰胺 (21g)

[0413] 将2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸 (0.33g, 1.70mmol)、N-甲基苯胺 (0.33g, 2.54mmol)、EDC (0.65g, 3.30mmol) 和DIPEA (0.30mL, 1.70mmol) 溶解在DMF中,微波反应在120℃和20bar下进行3小时。将其溶解在EA中,用1N HCl饱和水溶液洗涤,用Na₂SO₄干燥并过滤,然后通过减压蒸馏除去溶剂。使用EA:己烷=1:4 (R_f=0.18) 的混合溶剂纯化后,得到化合物21g,产率15.5%。

[0414] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 10.5 (s, 1H), 7.42-7.39 (m, 2H), 7.34-7.29 (m, 3H), 6.38 (s, 1H), 5.34 (s, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.06-2.95 (m, 1H), 0.96 (d, J=5.4Hz, 6H)。

[0415] <实施例4>苯甲酰胺化合物的生物活性的评价

[0416] 1. 评估对HSP90的结合能力

[0417] 进行荧光偏振测定以证实所合成的化合物随着浓度与HSP90的结合能力。将1M二硫苏糖醇 (DTT) 10mg/m:BGG (牛γ球蛋白) 加入到六氟苯 (HFB) 缓冲液 (20mM HEPES pH 7.3、50mM KCl、5mM的MgCl₂、20mM的Na₂MoO₄、0.01%NP40、三次蒸馏水) 并混合。然后,加入100nM 藤黄酸 (GA)-FITC (异硫氰酸荧光素) 并在室温下反应10分钟。将各100μL混合物分配到96孔板的对照孔中,向其余的混合物中加入2μL HSP90α,并分配各100μL至其他孔。将各98μL分

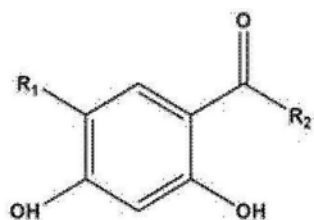
配到待处理化合物的孔中,然后以5mM、2.5mM、500μM、50μM、25μM、5μM、500nM或50nM每一浓度加入各2μL。在反应1、4、6或18小时后,通过酶标仪在495/530nm处测量荧光偏振。化合物与HSP90的结合能力表示为mP(毫偏振单位=1000mP单位)。结果如下表3所示。

[0418] 2.细胞活力的测量

[0419] 为了在吉非替尼耐药的H1975细胞(ATCC)中确认细胞活力随所合成的化合物浓度的变化情况,进行MTS[3-(4,5-二甲基噁唑-2-基)-5-(3-甲基哌啶-3-基)-羧基甲氧基苯基]-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑鎓盐,内盐]分析。当培养细胞至占据培养皿底部的80%时,将细胞分离并用RPMI 1640培养基稀释至 1.5×10^3 细胞/孔的浓度。将各100μL悬浮液加入96孔板的每个孔中,并培养14小时。然后,将培养基更换为用各浓度的化合物处理的培养液(1a-g:0、1μM、5μM、10μM、30μM、50μM或100μM;14a-i、16a、b、21a-f:0、0.01μM、0.1μM、1μM、5μM、10μM、30μM、50μM、70μM或100μM),培养3天。将各20μL MTS溶液分配到每个孔中,并在37℃下在提供有5%CO₂的培养箱中反应1小时。使用酶标仪在490/690nm处测量吸光度1小时,并且根据浓度计算细胞活力,以百分比(%)和IC₅₀(μM)计。结果如下表3所示。

[0420] [化学式2]

[0421]

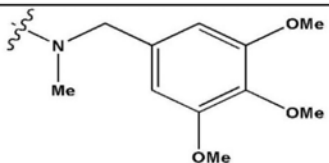
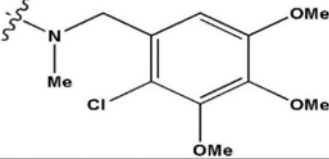
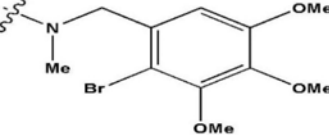
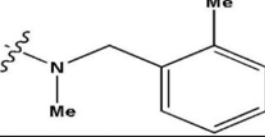
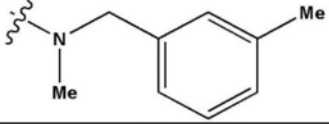
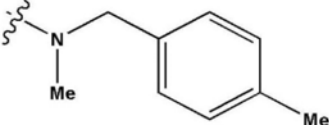
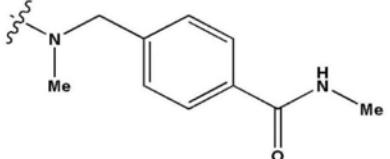
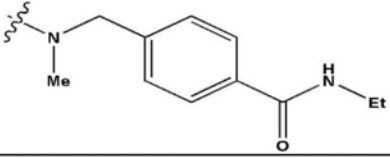
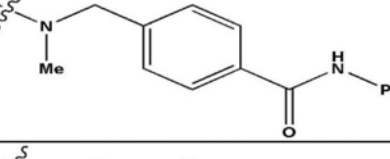
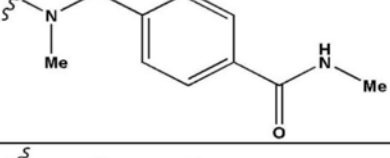
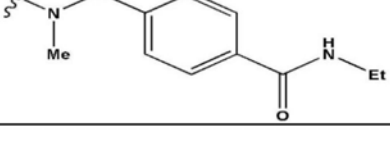


[0422] [表3]

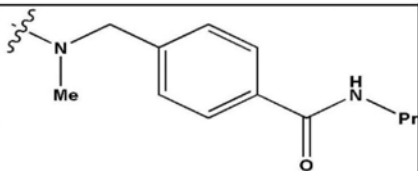
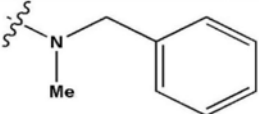
[0423]

化合物	R ₁	R ₂	HSP90 (FP) (IC ₅₀ ; nM)	H1975 (EC ₅₀ ; μM)
14a	Cl		6683	86.2
14b	Cl		413	35.5
14c	Cl		135	16.7
14d	Cl		362	33.4
14e	Cl		585	103

[0424]

14f	Cl		1461	73.1
14g	Cl		429	33.8
14h	Cl		528	34.3
14i	Cl		995	47.5
16a	Cl		830	49.3
16b	Cl		558	34.3
21a	Cl		496.0	34.8
21b	Cl		611.5	21.7
21c	Cl		454.0	20.8
21d	异丙基		11.4	0.83
21e	异丙基		6.5	0.46

[0425]

21f	异丙基		5.3	0.42
21g	异丙基		33	4.1

[0426] 表3中所示的本发明所述苯甲酰胺化合物14a-14i、16a、16b和21a-21f与HSP90之间的结合能力的测量结果表明,除14a和14f之外的其余化合物在纳摩尔水平的浓度具有高的结合能力。其中,化合物21f显示出最佳的结合能力,IC₅₀为5.3nM。

[0427] 此外,在表3中所示的H1975细胞中测量的化合物细胞活力的测量结果证实,所有苯甲酰胺化合物以时间依赖性方式抑制细胞增殖。特别地,化合物21f表现出良好的功效,EC₅₀为420nM。

[0428] 3. 蛋白表达分析

[0429] 选择具有良好功效的化合物21f,并确认HSP90客户蛋白在相同细胞系中的增殖效应,其中使用了HSP90客户蛋白为Her2(人EGFR相关2)、EGFR(表皮生长因子受体)、Met和c-Raf。

[0430] 将对吉非替尼具有抗性的H1975细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)的培养基中培养24小时,将细胞细胞分离、收获并用RPMI 1640培养基稀释至 5×10^5 细胞/孔。将各5mL悬浮液加入6mm培养皿中,并培养24小时。然后,将培养基更换为用各浓度的化合物(21f:0、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M或1 μ M;GA:1 μ M)处理的培养液,培养24小时。培养后,收获细胞并在4℃下以1300rpm离心5分钟,除去上清液。用磷酸盐缓冲盐水洗涤沉淀,在相同条件下再次离心,除去上清液。将裂解缓冲液加入剩余的沉淀中,并以5分钟的间隔涡旋振荡30分钟。通过在4℃以16000rcf离心4分钟分离上清液,并使用BCA(牛血清白蛋白)试剂盒对蛋白进行定量。使用10、12%运行凝胶和4%堆积凝胶(10mA/凝胶)进行SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)。将分离的蛋白在100V下转移至免疫印迹PVDF膜(聚偏二氟乙烯膜)75分钟。用5%脱脂乳溶液将膜封闭2小时,然后加入处于0.1%吐温-20溶液中的以1:750-1,000的比例稀释的一抗,并在4℃下反应12小时。用TBS-T(Tris缓冲盐水和吐温20)洗涤三次后,使用ECL(增强化学发光)溶液用图像分析仪进行检测。

[0431] 图5所示的结果证实,通过用化合物21f处理,HSP90客户蛋白的增殖以浓度依赖性方式被抑制。对于Her2、Met和Akt,在0.5 μ M时表达显著降低;对于EGFR,在0.1 μ M时表达显著降低。此外,HSP70的表达也在0.5 μ M时增加。

[0432] 虽然已经结合目前认为是实用的示例性实施方式描述了本发明,但应理解的是,本发明不限于所公开的实施方式,相反,本发明旨在涵盖所附权利要求的精神和范围内所包括的各种修改和等同布置。

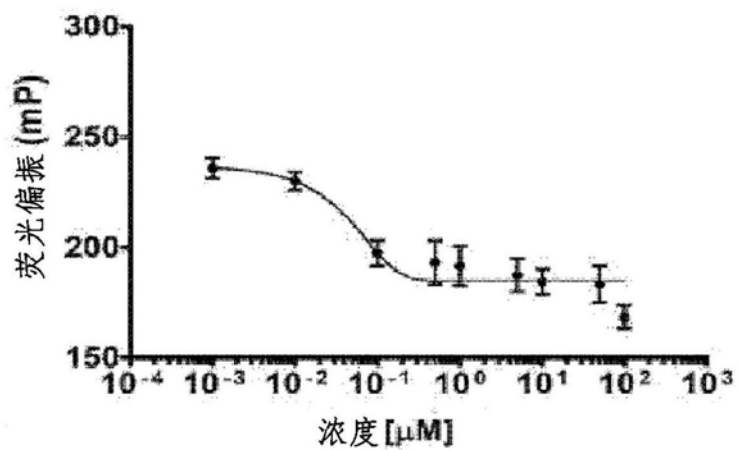


图1

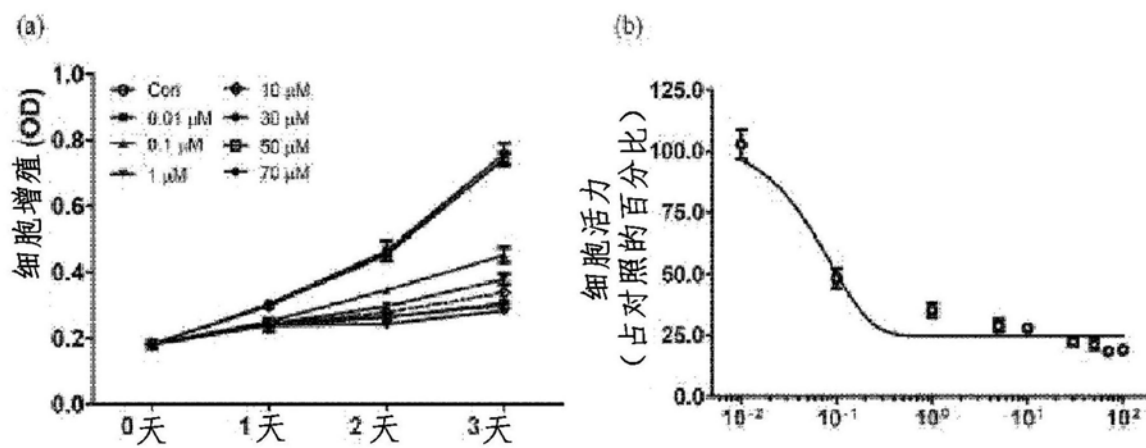


图2

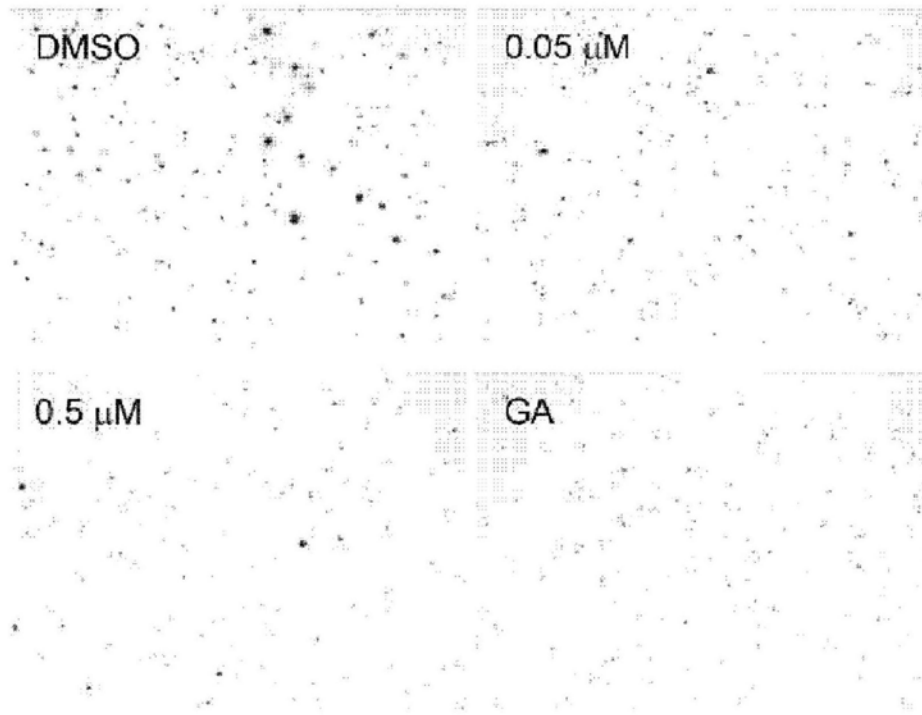


图3

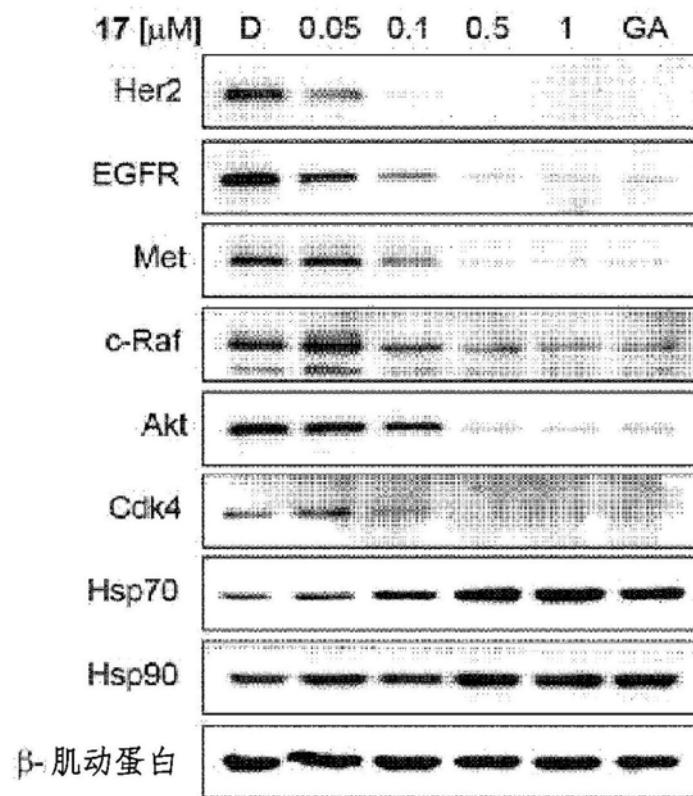


图4

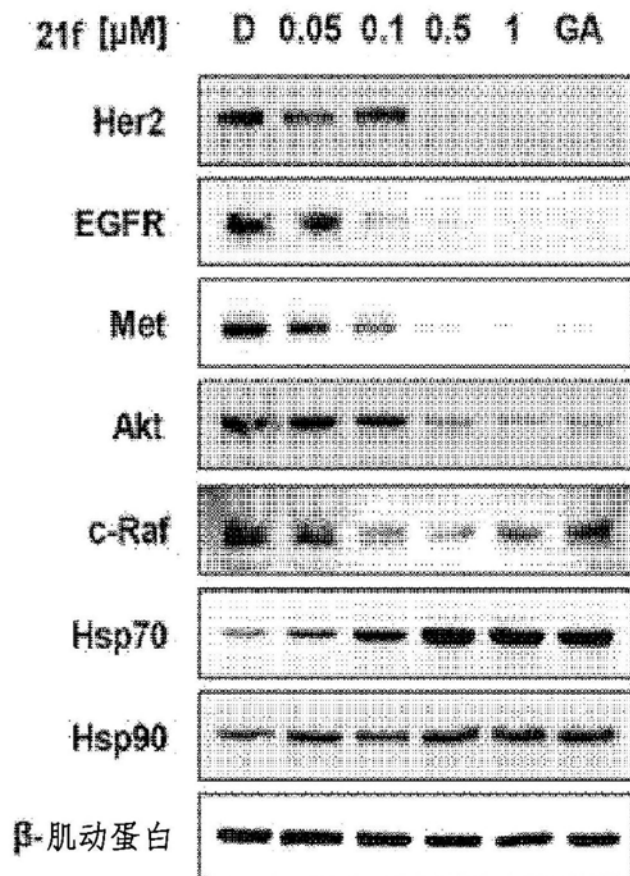


图5