

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101906076 B

(45) 授权公告日 2013.03.13

(21) 申请号 200910223861.5

(22) 申请日 2009.11.24

(66) 本国优先权数据

200910143978.2 2009.06.04 CN

(73) 专利权人 深圳微芯生物科技有限责任公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新中  
一道十号深圳生物孵化基地2号楼  
601-606室

(72) 发明人 鲁先平 李志斌 山松 余金迪  
宁志强

(74) 专利代理机构 北京安博达知识产权代理有  
限公司 11271

代理人 徐国文

(51) Int. Cl.

C07D 239/88 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1933839 A, 2007.03.21, 说明书第  
1, 63-67, 459, 476-478 页, 实施例 546、权利要求

1.

WO 2005/021553 A1, 2005.03.10, 第  
2-3, 8, 18, 26-30, 34 页, 实施例 43-50、权利要求  
1.

Jean-Christophe Harmange, et al..  
Naphthamides as Novel and Potent Vascular  
Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine  
Kinase Inhibitors: Design, Synthesis, and  
Evaluation. 《J. Med. Chem.》.2008, 第 51 卷 (第  
6 期), 第 1649-1667 页.

Juan Du, et al..Molecular modeling  
studies of vascular endothelial growth  
factor receptor tyrosine kinase inhibitors  
using QSAR and docking. 《Journal of  
Molecular Graphics and Modelling》.2009, 第  
27 卷 (第 5 期), 第 642-654 页.

审查员 冯清伟

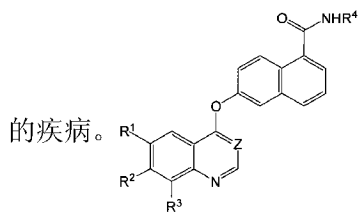
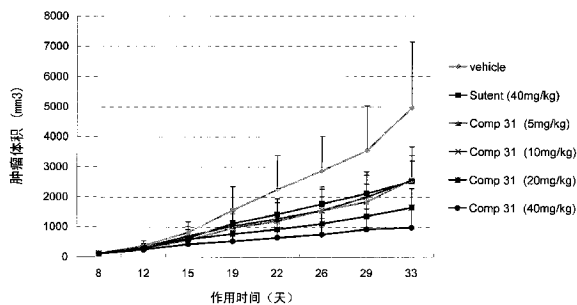
权利要求书 3 页 说明书 43 页 附图 3 页

(54) 发明名称

作为蛋白激酶抑制剂和组蛋白去乙酰化酶抑  
制剂的萘酰胺衍生物、其制备方法及应用

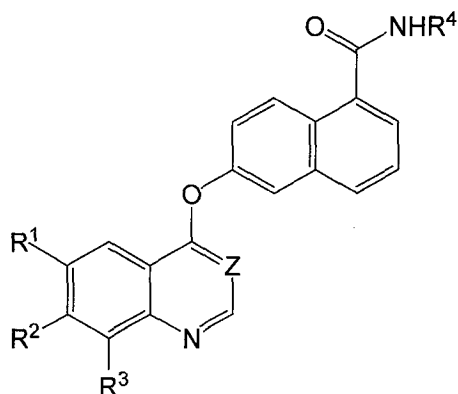
(57) 摘要

本发明涉及一种萘酰胺的衍生物、其制备方  
法及应用,其结构如通式 (I) 所示,其中, R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>  
、R<sup>4</sup>和 Z 的定义同说明书。该类化合物同时具有  
蛋白激酶抑制活性和组蛋白去乙酰化酶抑制活性  
,可以用于治疗与蛋白激酶活性异常或组蛋白去  
乙酰化酶活性异常相关的疾病,包括炎症、自身免  
疫性疾病、癌症、神经系统疾病和神经退化性疾病  
、心血管疾病、代谢病、过敏、哮喘以及与激素相关



(I)

1. 一种具有通式 (I) 的化合物, 其特征在于:



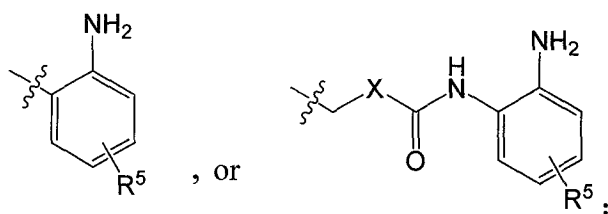
(I)

其中,

Z 为 CH 或 N;

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 分别为氢、卤素、甲基、甲氧基或三氟甲基;

R<sup>4</sup> 为



X 为苯环或吡啶环;

R<sup>5</sup> 为一个或多个取代基, 选自氢、卤素、甲基、甲氧基或三氟甲基;

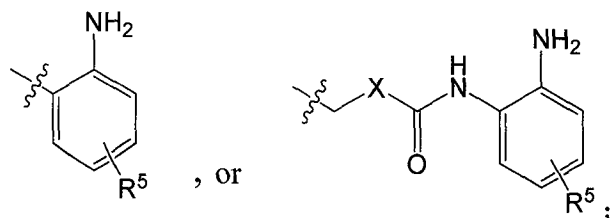
包括其游离形式、盐的形式、对映异构体或非对映异构体。

2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于所述化合物为:

Z 为 CH;

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 分别为氢、卤素、甲基、甲氧基或三氟甲基;

R<sup>4</sup> 为



X 为苯环或吡啶环;

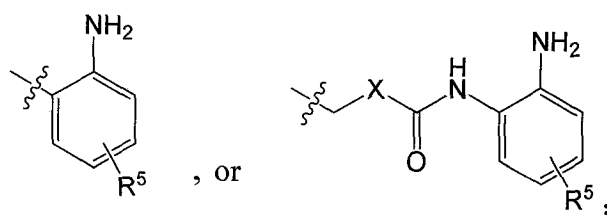
R<sup>5</sup> 为一个或多个取代基, 选自氢、卤素、甲基、甲氧基或三氟甲基。

3. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于所述化合物为:

Z 为 CH;

$R^1$ 、 $R^2$  和  $R^3$  分别为氢或甲氧基；

$R^4$  为



X 为苯环或吡啶环；

$R^5$  为一个或多个取代基，选自氢、卤素、甲基、甲氧基或三氟甲基。

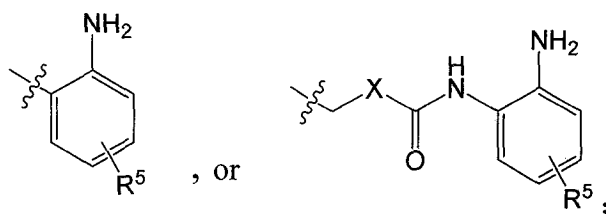
4. 如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于所述化合物为：

Z 为 CH；

$R^1$ 、 $R^2$  分别为氢或甲氧基；

$R^3$  为 H；

$R^4$  为



X 为苯环或吡啶环；

$R^5$  为一个或多个取代基，选自氢、卤素、甲基、甲氧基或三氟甲基。

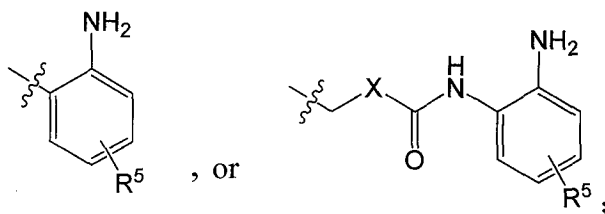
5. 如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于所述化合物为：

Z 为 CH；

$R^1$ 、 $R^2$  分别为氢或甲氧基；

$R^3$  为 H；

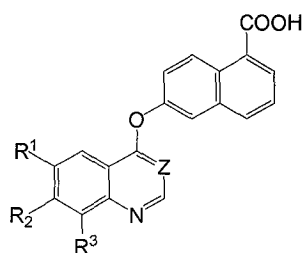
$R^4$  为



X 为苯环或吡啶环；

$R^5$  为 H 或 F。

6. 一种如权利要求 1 所述的具有通式 (I) 化合物的制备方法，该方法是将通式 (II) 化合物



(II)

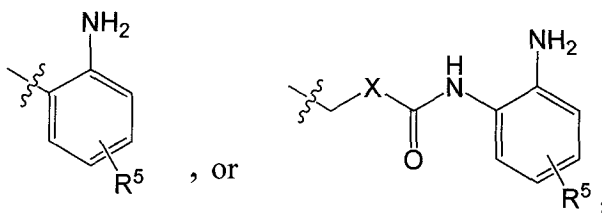
与通式 (III) 化合物



(III)

在有机溶剂和肽缩合剂存在下进行缩合反应得到通式 (I) 化合物, 其中, Z 为 CH 或 N;  
R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 分别为氢、卤素、甲基、甲氧基或三氟甲基;

R<sup>4</sup> 为



X 为苯环或吡啶环;

R<sup>5</sup> 为一个或多个取代基, 选自氢、卤素、甲基、甲氧基或三氟甲基。

7. 如权利要求 6 所述的化合物的制备方法, 其特征在于: 所述肽缩合剂选自 1- 乙基-3-(3-二甲胺丙基) 碳二亚胺 (EDC)、N, N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 或 N, N'-碳酰二咪唑 (CDI)。

8. 如权利要求 6 的所述的化合物的制备方法, 其特征在于: 所述有机溶剂选自苯、甲苯、四氢呋喃、1,4- 二氧六环、二氯甲烷、氯仿或 N, N- 二甲基甲酰胺。

9. 一种用于治疗与蛋白激酶活性异常或组蛋白去乙酰化酶活性异常相关的疾病的药用制剂, 其特征在于, 该制剂包括作为活性组分的权利要求 1 所述通式 (I) 的化合物以及药用辅料。

10. 如权利要求 9 所述的药用制剂, 其特征在于: 所述制剂为片剂、胶囊、粉剂、液剂、针剂、膏剂。

11. 如权利要求 1 所述的化合物在制备用于治疗炎症、自身免疫性疾病、癌症和神经系统疾病、过敏、哮喘、心血管疾病及代谢病, 或与激素相关的疾病的药物中的应用。

12. 如权利要求 9 所述的药用制剂在制备用于治疗炎症、自身免疫性疾病、癌症和神经系统疾病、过敏、哮喘、心血管疾病及代谢病, 或与激素相关的疾病的药物中的应用。

13. 如权利要求 9 所述的药用制剂, 其特征在于: 所述制剂的剂型规格为 0.0001 ~ 200mg。

## 作为蛋白激酶抑制剂和组蛋白去乙酰化酶抑制剂的萘酰胺 衍生物、其制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及同时具有蛋白激酶抑制活性和组蛋白去乙酰化酶抑制活性的萘酰胺衍生物的合成、制备及其在治疗与蛋白激酶活性异常以及组蛋白去乙酰化酶活性异常相关的疾病方面的临床应用。

### 背景技术

[0002] 蛋白激酶是催化蛋白磷酸化的一类酶,特别是催化蛋白中特定的酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基上的羟基的磷酸化。蛋白激酶在调节许多细胞生理过程中都起到关键作用,包括代谢、细胞增殖、细胞分化、细胞存活、环境-主体反应、免疫应答和血管生成。许多疾病都与由蛋白激酶调节所引发的异常的细胞反应有关。这些疾病包括炎症、自身免疫性疾病、癌症、神经系统疾病和神经退化性疾病、心血管疾病、代谢病、过敏、哮喘以及与激素相关疾病(Tan, S-L., 2006, *J. Immunol.*, 176 :2872-2879 ;Healy, A. et al., 2006, *J. Immunol.*, 177 :1886-1893 ;Salek-Ardakani, S. et al., 2005, *J. Immunol.*, 175 :7635-7641 ;Kim, J. et al., 2004, *J. Clin. Invest.*, 114 :823-827)。因此,人们一直致力于寻求能够有效地治疗这些疾病的蛋白激酶抑制剂。

[0003] 蛋白激酶通常分为两类,即蛋白酪氨酸激酶 (PTKs) 和丝氨酸-苏氨酸激酶 (STKs)。

[0004] 蛋白酪氨酸激酶 (PTKs) 可分为两类,即非跨膜酪氨酸激酶和跨膜生长因子受体酪氨酸激酶 (RTKs)。目前,至少已经确定了 RTKs 的 19 种不同的亚族,如表皮生长因子受体 (EGFR),血管内皮生长因子受体 (VEGFR),血小板源生长因子受体 (PDGFR) 和纤维母细胞生长因子受体 (FGFR)。

[0005] 表皮生长因子受体 (EGFR) 家族包含了四种跨膜酪氨酸激酶生长因子受体,即 HER1、HER2、HER3 和 HER4。当一组特定的配体与受体结合后,促进了 EGFR 的二聚,并且导致受体中酪氨酸残基的自磷酸化 (Arteaga, C-L., 2001, *Curr. Opin. Oncol.*, 6 :491-498)。一旦受体自磷酸化后,EGFR 转导通路的几个下游信号就被激活了。EGFR 的信号转导通路与肿瘤生成的过程密切相关,包括细胞循环进程、细胞凋亡的抑制、肿瘤细胞的运动、入侵和转移。EGFR 的激活也刺激了血管内皮生长因子 (VEGF),它是血管生成的主要诱导体 (Petit, A-M. et al., 1997, *Am. J. Pathol.*, 151 :1523-1530)。在实验模型中,EGFR 介导的信号转导通路的下调与肿瘤的发生密切相关 (Wikstrand, C-J. et al., 1998, *J Natl Cancer Inst.*, 90 :799-800)。在许多人体肿瘤中可以观察到突变导致的 EGFR 蛋白的连续扩增激活和过度表达,包括胸部、肺部、卵巢和肾脏的肿瘤。这些突变是肿瘤浸润的决定因素 (Wikstrand, C-J. et al., 1998, *J Natl Cancer Inst.*, 90 :799-800)。EGFR 过度表达在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中是非常常见的。EGFR 的活性可以通过使用抗-EGFR 抗体进行阻断胞外配体结合域或通过使用小分子抑制 EGFR 酪氨酸激酶来进行抑制,从而达到抑制 EGFR 通路下游组分的目的 (Mendelsohn, J., 1997, *Clin. Can. Res.*, 3 :2707-2707)。

[0006] 几乎所有的实体瘤和间质瘤在低氧情况下都会分泌血管内皮生长因子 (VEGF)。它对血管内皮是高度专一的,并且对血管增殖和渗透都能起到调节作用。VEGF 水平的过度表达与微血管密度的增加、癌症复发和存活率降低均密切相关 (Parikh, A-A., 2004; , Hematol. Oncol. Clin. N. Am., 18 :951-971 Parikh, A-A., 2004; , Hematol. Oncol. Clin. N. Am., 18 :951-971)。对 VEGF 受体来说有 6 种不同的配体:VEGF-A 到 E 和胎盘生长因子。配体与内皮细胞上的特定受体(主要是 VEGFR-2)相结合。VEGF-A 与 VEGFR-1 的结合引起内皮细胞的迁移,与 VEGFR-2 的结合引起内皮细胞增殖、渗透和存活,VEGFR-3 被认为调节淋巴血管生成。VEGF 与 VEGFR-2 受体的结合导致了细胞内酪氨酸激酶区域的活化和自磷酸化,并进一步触发了细胞内一连串信号的产生 (Parikh, A-A., 2004, Hematol. Oncol. Clin. N. Am., 18 :951-971)。

[0007] 丝氨酸-苏氨酸激酶 (STKs) 主要存在于细胞内。也存在少数几种 STKs 类型的受体激酶。STKs 是胞液激酶最常见的形式,它们在细胞质部位执行它们的功能,而不是细胞质中的细胞器和细胞骨架。

[0008] 糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,包含了  $\alpha$  和  $\beta$  两种异构形式,这两种异构形式各自以独特的基因编码。人们发现 GSK-3 能够使许多调控蛋白磷酸化,并可以调节它们的活性。GSK-3 与多种疾病相关,包括糖尿病、老年痴呆症、中枢神经系统障碍如狂躁抑郁障碍和神经退化疾病、心肌肥大等 (Haq, et al., 2000, J. Cell Biol., 151 :117)。

[0009] Aurora-2 是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,它与人体癌症密切相关,如结肠癌、乳房癌和其它实体瘤。人们认为它与调节细胞循环的蛋白磷酸化有关。尤其,有丝分裂过程中,Aurora-2 在控制染色体的准确分离上起了作用。细胞周期的异常调节可以导致细胞增殖和其它异常。在人体结肠癌组织中,人们发现 Aurora-2 蛋白被过度表达 (Schumacher, et al., 1998, J. Cell Biol., 143 :1635-1646 ;Kimura et al., 1997, J. Biol. Chem., 272 : 13766-13771)。

[0010] 细胞周期依赖性激酶 (CDKs) 是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,它调节哺乳动物的细胞分裂。目前,人们已经确定了九个激酶亚基 (CDK 1-9)。每一个激酶都和一个特定的调节对象相结合,一起构成了活性催化位点。增殖失控是癌细胞的一个特点,在许多重要的实体瘤中,常常发生 CDK 功能的异常调节。人们对 CDK2 和 CDK4 尤其感兴趣,因为在许多人体肿瘤中,它们的活动常常被异常地调节。

[0011] Raf 激酶是一种 ras 肿瘤蛋白的下游效应蛋白。它是由细胞表面到细胞核的信号转导通路的一个关键调节器。抑制 Raf 激酶与在体内和体外抑制许多人体肿瘤的生长密切相关 (Monia et al., 1996, Nat. Med., 2 :668-675)。

[0012] 其它的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶包括蛋白激酶 A、B 和 C。这些激酶(即 PKA, PKB 和 PKC) 在信号转导通路中起着关键作用。

[0013] 人们一直致力于寻求具有蛋白激酶抑制活性并能治疗与蛋白激酶活性异常相关疾病的小分子化合物。文献报道的化合物有环状化合物(美国专利 US 7, 151, 096)、双环化合物(美国专利 US 7, 189, 721)、三环化合物(美国专利 US 7, 132, 533)、(2-羟基吡啶基-3-亚甲基)乙酸衍生物(美国专利 US 7, 214, 700)、3-(4-酰胺吡咯基-2-基亚甲基)-2-吡啶满酮衍生物(美国专利 US 7, 179, 910)、稠合吡啶衍生物(美国专利

US7, 166, 597)、胺基咪唑化合物(美国专利US 7, 157, 476)、吡咯取代的2-咪唑满酮化合物(美国专利US 7, 125, 905)、三唑化合物(美国专利US 7, 115, 739)、吡唑基胺基取代的喹唑啉化合物(美国专利US 7, 098, 330)和咪唑化合物(美国专利US 7, 041, 687)等。有几个蛋白激酶抑制剂已被FDA批准用于癌症治疗,如 Glivec、Sutent 和 Sorafenib。临床使用表明,与传统的化疗相比,这些药物优势明显。由此激发人们基于机理对治疗方法进行改进,优化化合物分子骨架,以期发现具有更好口服生物利用度、更高的抗癌活性和更低毒性的新化合物。

## 发明内容

[0014] 本发明目的之一在于公开一类具有蛋白激酶选择性抑制活性和同时具有组蛋白去乙酰化酶抑制活性的萘酰胺衍生物;

[0015] 本发明目的之二在于公开这一类所述的化合物的制备方法;

[0016] 本发明目的之三在于公开这一类所述的化合物作为治疗与蛋白激酶活性异常以及组蛋白去乙酰化酶活性异常相关的疾病方面的临床应用。

[0017] 组蛋白去乙酰化酶(HDAC)蛋白在调控体内的基因表达方面起着关键作用,它改变转录因子到染色体组DNA的可达性。尤其是HDAC去除组蛋白中乙酰化赖氨酸残基的乙酰基,从而导致核小体重构(Grunstein, M., 1997, Nature, 389 :349-352)。由于HDAC蛋白在基因表达中起着关键作用,所以它们与许多细胞功能密切相关,包括细胞周期调控、细胞增殖、分化、基因程序化表达和癌症发生(Ruijter, A-J-M., 2003, Biochem. J., 370 :737-749; Grignani, F., 1998, Nature, 391 :815-818; Lin, R-J., 1998, 391 :811-814; Marks, P-A., 2001, Nature Reviews Cancer, 1 :194)。由组蛋白去乙酰化酶失调所致的异常去乙酰化与许多临床疾病密切相关,如鲁-泰(Rubinstein-Taybi)二氏综合征、脆性X染色体综合症、神经退化性疾病、心血管与代谢疾病、类风湿、白血病和其它各种癌症(Langley B et al., 2005, Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders, 4 :41-50)。试验表明,HDAC抑制剂能够抑制人类及动物体内的肿瘤的生长,包括肺癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌和淋巴瘤等(Dokmanovic, M., 2005, J. Cell Biochem., 96 :293-304)。

[0018] 依据序列同源性,哺乳动物的HDACs可以分为三类。第一类由酵母Rpd3-类蛋白组成(HDAC 1, 2, 3, 8 和 11)。第二类由酵母HDA1-类蛋白组成(HDAC 4, 5, 6, 7, 9 和 10)。第三类由酵母SIR2-类蛋白组成(SIRT 1, 2, 3, 4, 5, 6 和 7)。

[0019] HDAC1的活性和细胞增殖(癌症的标志)相关。哺乳动物细胞通过siRNA降低HDAC1表达,具有抗增殖性(Glaser, K-B., 2003, Biochem. Biophys. Res. Comm., 310 :529-536)。HDAC1基因敲除鼠是胚胎致死的,其结果导致干细胞生长速度的改变(Lagger, G., 2002, EMBO J., 21 :2672-2681)。HDAC1过度表达的老鼠细胞显示G<sub>2</sub>和M期延长及生长速度降低(Bartl S., 1997, Mol. Cell Biol., 17 :5033-5043)。因此,试验数据表明,HDAC1与细胞周期调控及细胞增殖密切相关。

[0020] HDAC2调控许多胎心肌蛋白异构体的表达。HDAC2缺乏或是通过化学方法抑制组蛋白去乙酰化酶可以阻止胚胎基因的再表达,减少心室肥大。抗肥大和肌醇多磷酸盐-5-磷酸酶f(Inpp5f)编码基因表达增加有关,这种增加导致胸腺瘤滤过性病毒的原癌基因(Akt)和3-磷酸肌醇-依赖的蛋白激酶-1失活,激活了糖原合成酶激酶3β(Gsk3β)。

相反, HDAC2 转基因鼠心室肥大增加, 这与失活的 Gsk3 $\beta$  有关。通过化学方法抑制活化的 Gsk3 $\beta$  使得 HDAC2- 缺乏的成人对心室肥大的刺激变得敏感。这些结果表明, 在心脏中 HDAC2 是 HDAC 抑制剂的一个重要的分子靶标。HDAC2 和 Gsk3 $\beta$  都是调控通路的组成部分, 这为治疗心室肥大和心力衰竭提供了极具吸引力的治疗靶标 (Trivedi, C-M., 2007, *Nat. Med.*, 13 :324-331)。

[0021] HDAC3 在正常小肠的增殖隐窝细胞中表达最多。在结肠癌细胞系中 HDAC3 表达沉默导致细胞生长抑制、细胞存活降低和细胞凋亡增加。沉默 HDAC2 表达可以观察到类似的效果, 而对于 HDAC1, 效果则没有那么显著。HDAC3 基因沉默也选择性的引起碱性磷酸酯酶的表达 (结肠细胞成熟的标志)。HDAC3 的过度表达抑制基础转录及丁酸酯诱导的 P21 转录, 而沉默 HDAC3 则刺激 P21 基因启动子的活性和表达。这些发现表明 HDAC3 是在人体结肠癌中进行下调的基因, 是结肠细胞成熟和 P21 表达的一种新型的调节剂 (Wilson, A-J., 2006, *J. Biol. Chem.*, 281 :13548-13558)。

[0022] HDAC6 是 HDAC 家族的一个亚型, 它脱去  $\alpha$ -微管蛋白的乙酰基, 增加细胞运动性。在九组口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 的细胞系和正常的口腔角化细胞 (NOKs) 上运用定量实时逆转录聚合酶链反应和 Western Blots 技术分析, 与 NOKs 相比, HDAC6 mRNA 和蛋白表达水平在所有的癌细胞中都升高了。通过免疫荧光法分析, 在 OSCC 细胞系的细胞质中检测到了 HDAC6 蛋白。和 OSCC 细胞系相似, 在早期的人体 OSCC 肿瘤中 HDAC6 上调明显, mRNA 达 74%, 蛋白达 51%。通过对临床变量的分析, 人们发现临床肿瘤的发展阶段和 HDAC6 的表达状态相关。分析表明, HDAC6 的表达水平在肿瘤早期 (I 和 II 期) 和晚期 (III 和 IV 期) 存在显著差异 ( $P = 0.014$ )。这些结果表明 HDAC6 的表达可能和肿瘤的恶性程度有关, 这也为设计新的治疗方法提供了线索 (Sakuma, T., 2006, *Int. J. Oncol.*, 29 :117-124)。

[0023] HDAC 使功能染色体表观基因沉默是许多病理过程的主要机制之一。其中, 功能相关基因被 HDAC 抑制或重调, 导致在终末分化、成熟和生长控制中表型缺失, 并且丧失组织功能。例如, 肿瘤抑制基因经常在癌症的发展过程中被沉默, HDAC 抑制剂能够诱导这些肿瘤抑制基因的表达, 从而抑制肿瘤细胞生长和分化 (Glaros S et al., 2007, *Oncogene June 4 Epub ahead of print*; Mai, A, et al., 2007, *Int J. Biochem Cell Bio.*, April 4, Epub ahead of print; Vincent A. et al., 2007, *Oncogene*, April 30, Epub ahead of print; our unpublished results)。结构基因 (如与 Friedreich's 运动失调相关的 FXN 基因和与脊柱肌肉萎缩相关的 SMN 基因) 的抑制可以被 HDAC 抑制剂逆转, 使得 FXN 和 SMN 基因重新表达, 并恢复组织功能 (Herman D et al., 2006, *Nature Chemical Biology*, 2(10) :551-8; Avila AM et al., 2007, *J Clinic Investigation*, 117(3)659-71; de Bore J, 2006, *Tissue Eng.* 12(10) :2927-37)。HDAC 抑制剂在染色体 6p21-22 重调 HDAC “热点” 程序, 诱导整个 MHC II 家族基因表达, 进一步延伸了免疫识别和免疫响应的表观基因调控 (Gialitakis M et al., 2007, *Nucleic Acids Res.*, 34(1) :765-72)。

[0024] 目前已经确定了几类 HDAC 抑制剂, 包括: 1) 短链脂肪酸, 如丁酸和苯丁酸; 2) 有机羟肟酸, 如 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) 和 trichostatin A (TSA); 3) 含有 2-氨基-8-氧-9,10-环氧癸酰基 (AOE) 的环四肽, 如 trapoxin 和 HC-toxin; 4) 不含 2-氨基-8-氧-9,10-环氧癸酰基的环四肽, 如 apicidin 和 FK228; 5) 苯酰胺类, 如 MS-275 (欧洲专利 EP0847992A1, 美国专利 2002/0103192A1, 世界专利 02/26696A1, 世界专



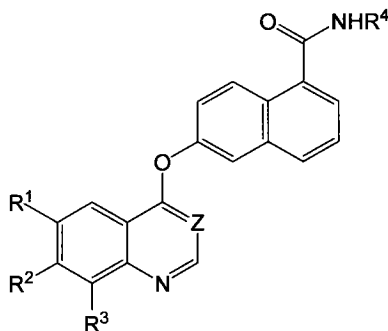
利 01/70675A2, 世界专利 01/18171A2)。尽管 HDAC 是一个极具前景的药物靶标, 但目前 Merck 公司研制的 SAHA 仅仅局限于对皮肤 T 细胞淋巴瘤的治疗, 而对实体瘤疗效并不明显。因此, 有必要继续研制新的化合物, 使其具有更强的 HDAC 抑制活性、更强的抗癌活性、更好的 HDAC 亚型选择性和更低的毒性。

[0025] 靶向治疗一直为抗癌药物研发人员所推崇。人们希望设计药物, 它既能准确的到达肿瘤细胞的某个特定靶标并杀死肿瘤细胞, 同时又对正常细胞又没有伤害。然而, 肿瘤细胞能够运用多种生物引发器和通路来进行生长和传播。在一个靶点对肿瘤细胞进行打击, 它们会沿着新的生长通路重组和重新部署。由此人们发展了组合靶向治疗, 并正在成为癌症治疗的新范例。几个多靶点激酶抑制剂现正在研发中, 其中 Sorafenib 和 Sutent 已经在美国获得批准上市。Sorafenib (Bayer 公司开发) 是第一个同时以 RAF/MEK/ERK 通路 (与细胞增殖有关) 和 VEGFR2/PDGFR $\beta$  级联信号通路 (与血管生成有关) 为靶点的药物, 该药在 2005 年 12 月获得批准用于治疗晚期肾癌。尽管这些靶向治疗药物在治疗一些实体瘤时是有效的, 但是在治疗其它实体瘤时, 疗效并不理想且具有毒副作用。

[0026] 本发明所述的化合物, 结合了 RTK 抑制剂的抗血管生成和抗增殖活性以及 HDAC 抑制剂的所具有的诱导分化、免疫调节、阻碍细胞周期、促使细胞凋亡的活性, 旨在对实体瘤具有更好的疗效, 同时克服市售的 RTK 抑制剂的毒副作用, 如高血压、QT 间期延长、甲状腺退化、皮疹和皮肤变色、疼痛等。

[0027] 本发明所述的化合物, 其化学结构如通式 (I) 所示:

[0028]



(I)

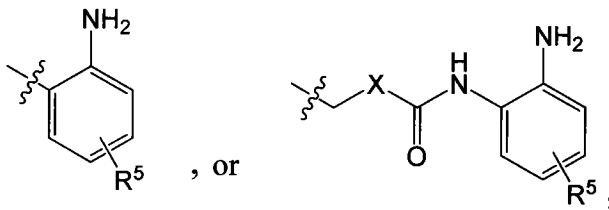
[0029] 其中,

[0030] Z 为 CH 或 N;

[0031] R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 分别为氢、卤素、烷基、烷氧基或三氟甲基;

[0032] R<sup>4</sup> 为

[0033]



[0034] X 为苯环或吡啶环;

[0035] R<sup>5</sup> 为一个或多个取代基, 选自氢、卤素、烷基、烷氧基或三氟甲基;

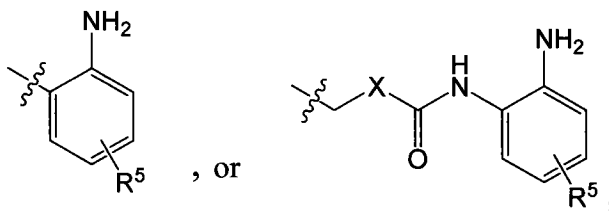
[0036] 包括其游离形式、盐的形式、对映异构体、非对映异构体或水合物。较优地,所述化合物如式(I)所示,其中,

[0037] Z为CH;

[0038]  $R^1$ 、 $R^2$ 和 $R^3$ 分别为氢、卤素、烷基、烷氧基或三氟甲基;

[0039]  $R^4$ 为

[0040]



[0041] X为苯环或吡啶环;

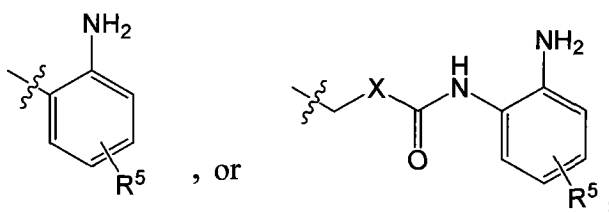
[0042]  $R^5$ 为一个或多个取代基,选自氢、卤素、烷基、烷氧基或三氟甲基。再优地,所述化合物如式(I)所示,其中,

[0043] Z为CH;

[0044]  $R^1$ 、 $R^2$ 和 $R^3$ 分别为氢或烷氧基;

[0045]  $R^4$ 为

[0046]



[0047] X为苯环或吡啶环;

[0048]  $R^5$ 为一个或多个取代基,选自氢、卤素、烷基、烷氧基或三氟甲基。更优地,所述化合物如式(I)所示,其中,

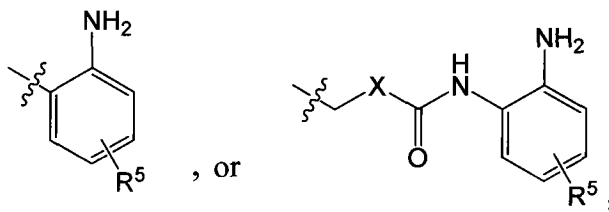
[0049] Z为CH;

[0050]  $R^1$ 、 $R^2$ 分别为氢或甲氧基;

[0051]  $R^3$ 为H;

[0052]  $R^4$ 为

[0053]



[0054] X为苯环或吡啶环;

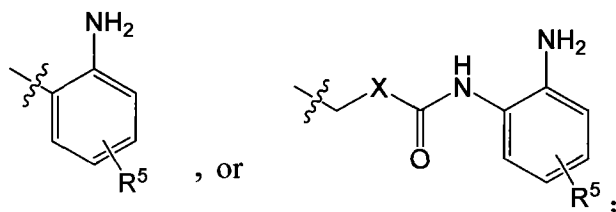
[0055]  $R^5$ 为一个或多个取代基,选自氢、卤素、烷基、烷氧基或三氟甲基。最优地,Z为CH;

[0056]  $R^1$ 、 $R^2$ 分别为氢或甲氧基;

[0057]  $R^3$ 为H;

[0058]  $R^4$ 为

[0059]



[0060] X 为苯环或吡啶环；

[0061] R<sup>5</sup> 为 H 或 F。

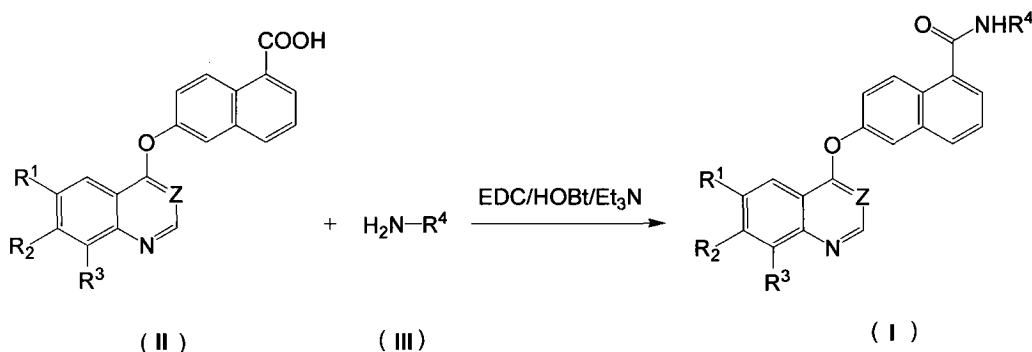
[0062] 本发明所述的“卤素”，为氟、氯、溴、碘；

[0063] 本发明所述的“烷基”，包括直链、支链或环状烷基，如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、特丁基、正戊基、异戊基、正己基、异己基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基等；

[0064] 本发明所述的“烷氧基”，是指烷基与氧原子相连所形成的基团，其中，氧原子具有自由成键能力，如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基、异丙氧基、特丁氧基、环丙氧基、环己基氧基等；

[0065] 本发明所述的化合物的制备方法如下：

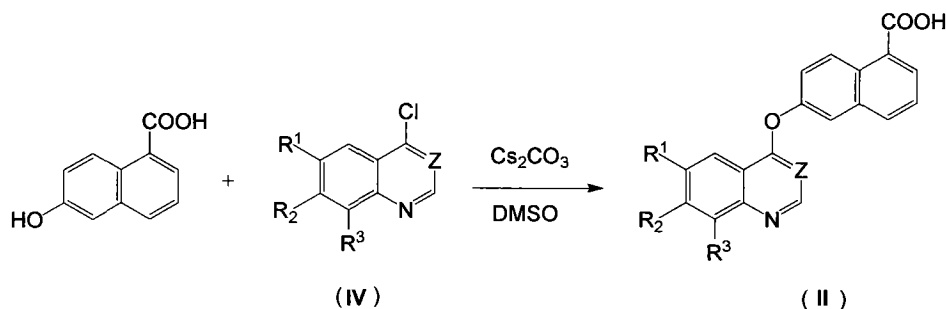
[0066]



[0067] 将化合物 (II) 与化合物 (III) 进行缩合反应得到目标化合物 (I)。该缩合反应以肽缩合剂为催化剂，如 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基) 碳二亚胺 (EDC), N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC), N,N'-碳酰二咪唑 (CDI) 等。反应温度为 0 ~ 80℃，反应时间为 4 ~ 72 小时。反应所用溶剂为常用溶剂，如苯、甲苯、四氢呋喃、二氧六环、二氯甲烷、氯仿、N,N-二甲基甲酰胺等。必要时，也可以加入碱如氢氧化钠、三乙胺或吡啶。

[0068] 化合物 (II) 可以通过如下方法制备：

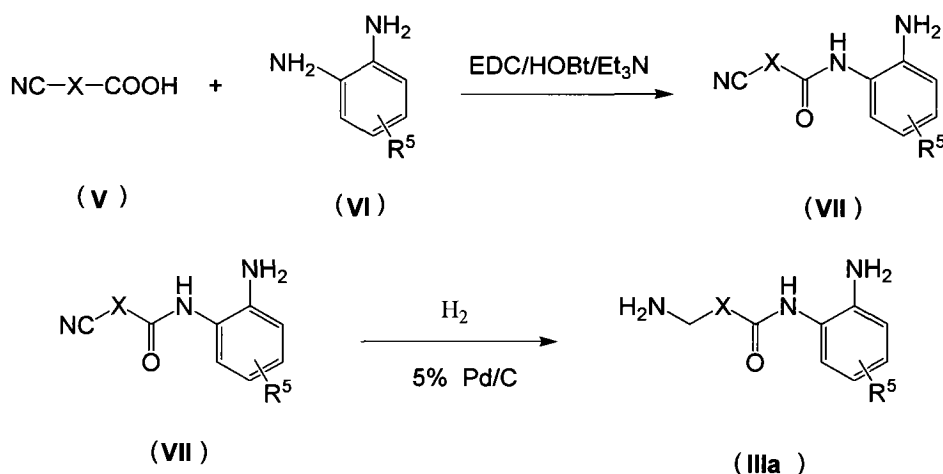
[0069]



[0070] 将市售的 6-羟基萘酸、碳酸铯和具有指定取代基的 4-氯喹啉 (IV) 于 DMSO 溶剂中加热得到萘酸 (II)。反应温度为 130 ~ 140℃，反应时间为 3 ~ 24 小时。

[0071] 化合物 (III) 可直接购得或通过如下方法制备：

[0072]



[0073] 将市售的化合物 (V) 与化合物 (VI) 进行缩合反应得到化合物 (VII)。该缩合反应以肽缩合剂为催化剂, 如 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基) 碳二亚胺 (EDC),  $N,N'$ -二环己基碳二亚胺 (DCC),  $N,N'$ -碳酰二咪唑 (CDI) 等。反应温度为  $0 \sim 60^\circ\text{C}$ , 反应时间为  $2 \sim 72$  小时。反应所用溶剂为常用溶剂, 如苯、甲苯、四氢呋喃、二氧六环、二氯甲烷、氯仿、 $N,N$ -二甲基甲酰胺等。必要时, 也可以加入碱如氢氧化钠、三乙胺或吡啶。

[0074] 将化合物 (VII) 溶于甲醇, 以  $5\%$  钯碳为催化剂, 催化氢化得到化合物 (IIIa)。该反应在室温进行。必要时, 可在反应体系中加入酸, 如硫酸。

[0075] 通式 (I) 所述的化合物可以采用常见的分离方法进行纯化, 如萃取、重结晶、柱层析等。

[0076] 通式 (I) 所述的化合物同时具有蛋白激酶抑制活性和组蛋白去乙酰化酶抑制活性, 可以用于治疗与蛋白激酶活性异常以及组蛋白去乙酰化酶活性异常相关的疾病, 尤其对血癌和实体瘤具有优异疗效。

[0077] 通式 (I) 所述的化合物被加工成常用的药用制剂, 如片剂、胶囊、粉剂、糖浆、液剂、悬浮剂、针剂、膏剂。该制剂含有作为活性组分的通式 (I) 的化合物, 以及药用载体、辅料或稀释剂。该制剂中通常含有  $0.5 \sim 70\%$  的活性成分, 较佳含量为  $1 \sim 20\%$ 。

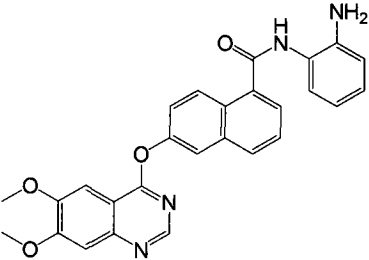
[0078] 本发明所说的药用载体、辅料或稀释剂, 包括《药用赋形剂手册》(美国药学会, 1986 年 10 月) 或化学工业出版社出版的《药用辅料手册》(Handbook of Pharmaceutical Excipients, 原著第四版) 所列的载体填料, 但并不局限于这些载体填料。

[0079] 本发明所述的通式 (I) 化合物, 在临床上可以通过口服或注射方式对哺乳动物 (包括人) 进行用药, 其中尤以口服方式最佳。用药剂量为每日  $0.0001 \sim 200\text{mg/kg}$  体重, 较佳用药剂量为每日  $0.01 \sim 100\text{mg/kg}$  体重, 最佳用药剂量为每日  $0.1 \sim 50\text{mg/kg}$  体重, 同时, 最佳剂量视个体而定, 通常开始时剂量较小, 然后逐渐增加用量。

[0080] 本发明所述的代表性化合物如表 1 所示。化合物编号与实施例部分中的“实施例编号”相一致, 即表 1 中化合物 1 的合成在“实施例 1”中得到描述, 表 1 中化合物 44 的合成在“实施例 44”中得到描述。

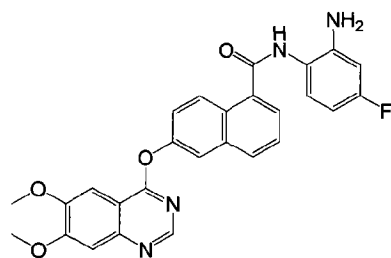
[0081] 表 1 本发明代表性化合物

[0082]

编号	结构	命名
16		N-(2-氨基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺

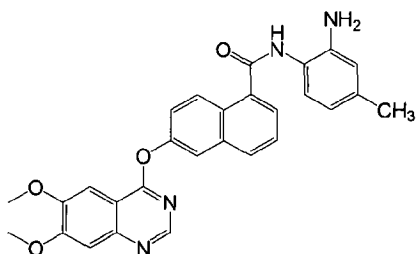
[0083]

17



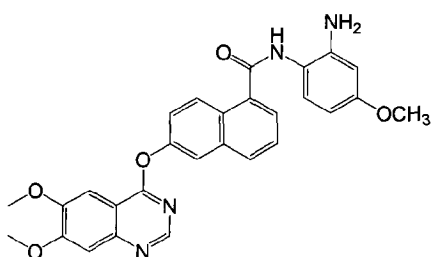
N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-  
(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘  
酰胺

18



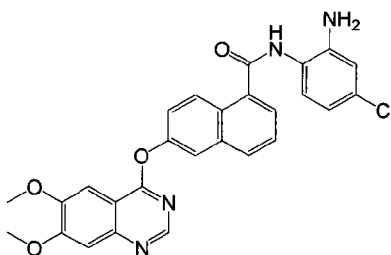
N-(2-氨基-4-甲基苯基)-6-  
(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘  
酰胺

19



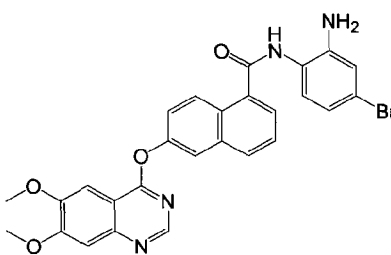
N-(2-氨基-4-甲氧基苯基)-6-  
(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘  
酰胺

20



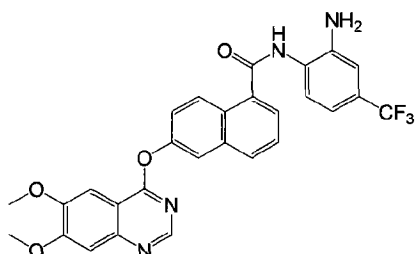
N-(2-氨基-4-氯苯基)-6-  
(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘  
酰胺

21



N-(2-氨基-4-溴苯基)-6-  
(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘  
酰胺

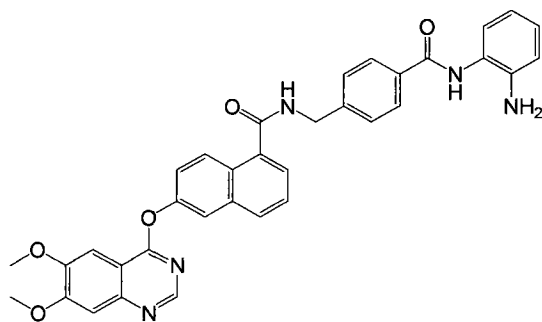
22



N-(2-氨基-4-三氟甲基苯基)-6-  
(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘  
酰胺

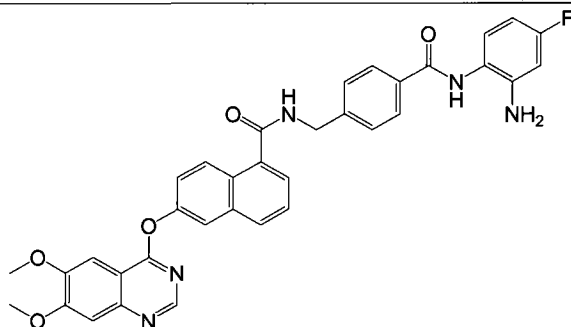
[0084]

23



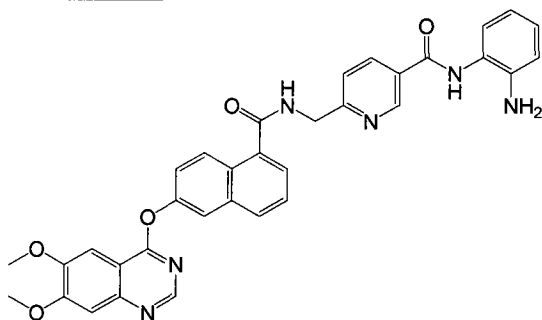
**N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)-苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺**

24



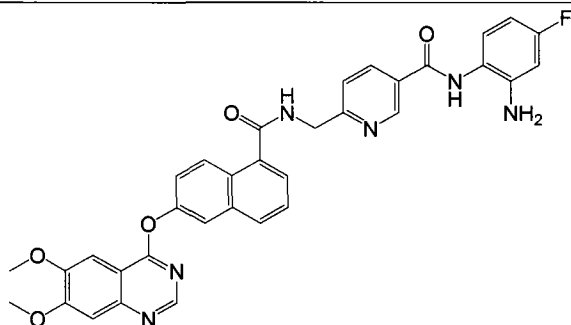
**N-(4-((2-氨基-4-氟苯基)氨基甲酰基)-苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺**

25



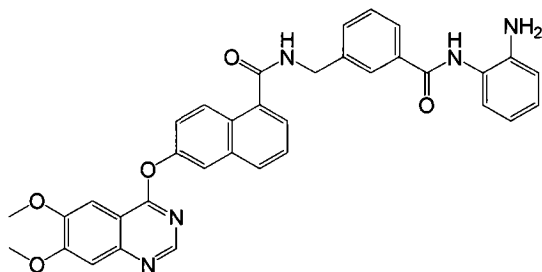
**N-(2-氨基苯基)-6-((2-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺**

26



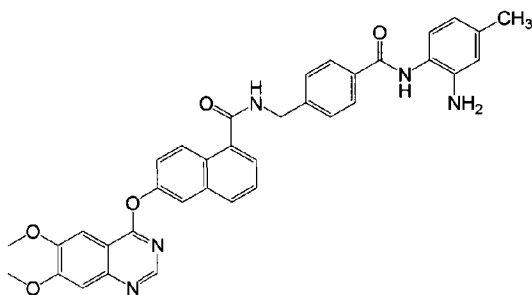
**N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-((2-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺**

27



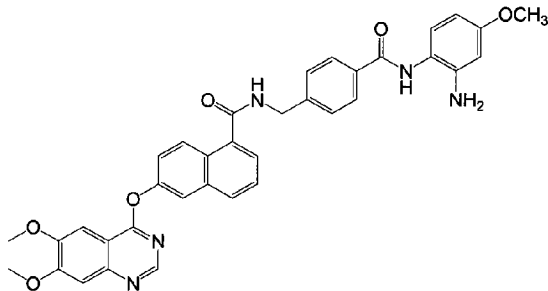
**N-(3-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)-苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺**

28



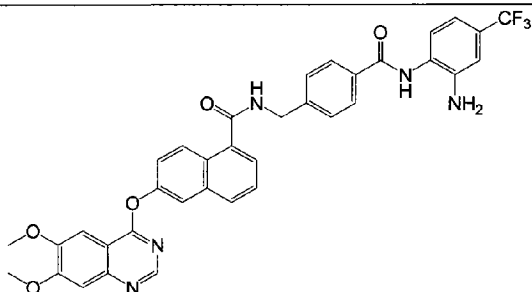
**N-(4-((2-氨基-4-甲基苯基)-氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺**

29



**N-(4-((2-氨基-4-甲氧基苯基)-氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺**

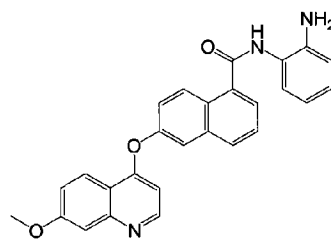
30



**N-(4-((2-氨基-4-三氟甲基苯基)-氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺**

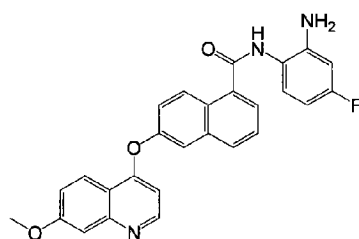
[0085]

31



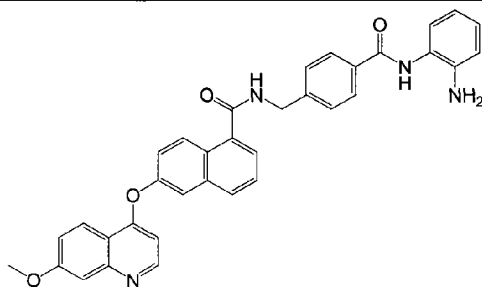
**N-(2-氨基-4-甲氧基苯基)-6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺**

32



**N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺**

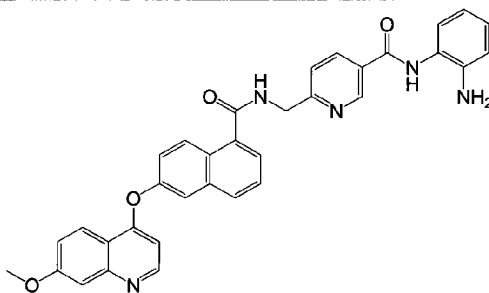
33



**N-(4-((2-氨基-4-甲氧基苯基)-氨基甲酰基)苄基)-6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺**

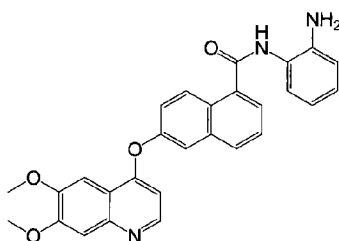


34



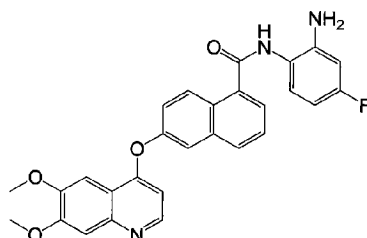
**N-(2-氨基苯基)-6-((2-(7-  
甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)  
烟酰胺**

35



**N-(2-氨基苯基)-6-(6,7-  
二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺**

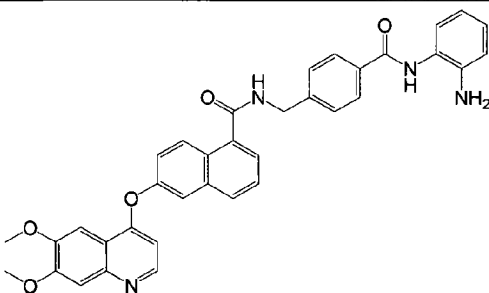
36



**N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-  
(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰  
胺**

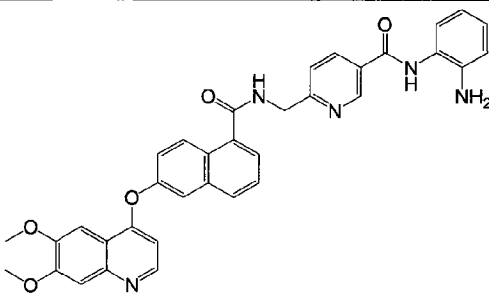
[0086]

37



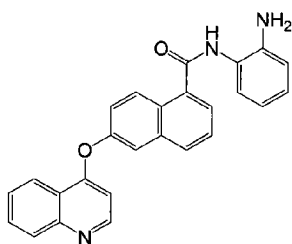
**N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)-  
苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-  
氧)-1-萘酰胺**

38



**N-(2-氨基苯基)-6-((2-(6,7-  
二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲  
基)烟酰胺**

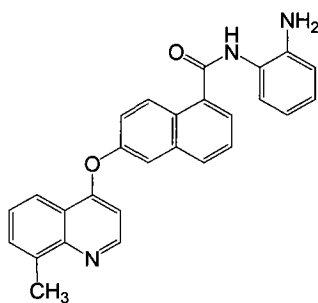
39



**N-(2-氨基苯基)-6-(喹啉-  
4-氧)-1-萘酰胺**

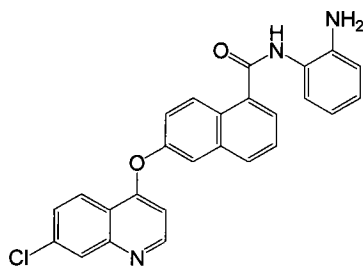
[0087]

40



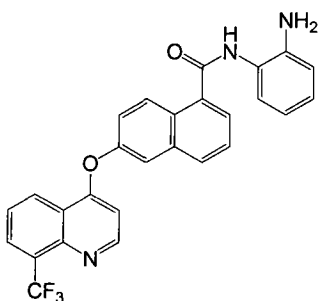
N-(2-氨基苯基)-6-(8-甲基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺

41



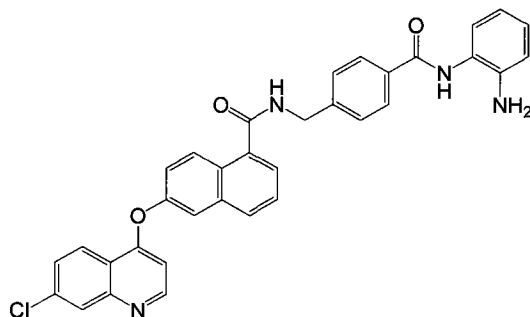
N-(2-氨基苯基)-6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酰胺

42



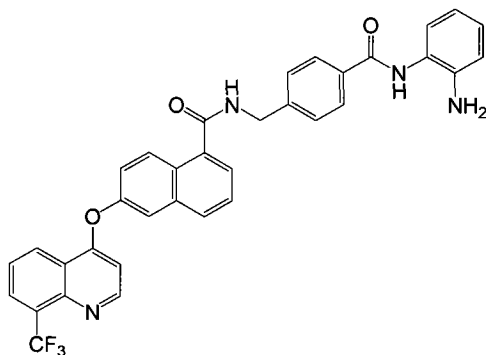
N-(2-氨基苯基)-6-(8-(三氟甲基)喹啉-4-氧)-1-萘酰胺

43



N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)-苄基)-6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酰胺

44



N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)-苄基)-6-(8-(三氟甲基)喹啉-4-氧)-1-萘酰胺

## 附图说明

[0088] 图1 化合物 31 对人 A549 肺癌裸鼠移植性肿瘤的抑制活性,其中 Vehicle 表示载体, Sutent 表示现有药物舒尼替尼, comp31 表示化合物 31。

[0089] 图 2 化合物 31 对人 HCT-8 肠癌裸鼠移植性肿瘤的抑制活性,其中 Vehicle 表示载体, Sutent 表示现有药物舒尼替尼, comp31 表示化合物 31。

[0090] 图 3 化合物 31 对人 SMMC-7721 肝癌裸鼠移植性肿瘤的抑制活性,其中 Vehicle 表示载体, Sutent 表示现有药物舒尼替尼, comp31 表示化合物 31。

[0091] 图 4 化合物 33 和 34 对人 HCT-8 肠癌裸鼠移植性肿瘤的抑制活性,其中 Vehicle 表示载体, Sutent 表示现有药物舒尼替尼, comp33 表示化合物 33, comp34 表示化合物 34。

[0092] 图 5 化合物 33 和 37 对人 HCT-8 肠癌裸鼠移植性肿瘤的抑制活性,其中 Vehicle 表示载体, Sutent 表示现有药物舒尼替尼, comp33 表示化合物 33, comp37 表示化合物 37。

[0093] 图 6 化合物 33 和 37 对人 SMMC-7721 肝癌裸鼠移植性肿瘤的抑制活性,其中 Vehicle 表示载体, Sutent 表示现有药物舒尼替尼, comp33 表示化合物 33, comp37 表示化合物 37。

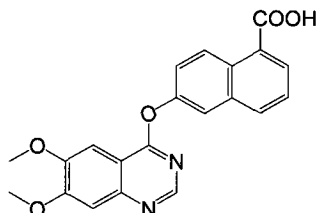
### 具体实施方式

[0094] 下面结合实例进一步阐明本发明的内容,但本发明的保护范围并不仅仅局限于这些实例。本发明所述的百分比除特别注明外,均为重量百分比。说明书中所描述的数值范围,如计量单位、反应条件、化合物物理状态或百分比,均是为了提供明白无误的书面参考。本领域熟练技术人员在实践本专利时,使用在此范围之外或有别于单个数值的温度、浓度、数量、碳原子数等,仍然可以得到预期的结果。

[0095] 实施例 1

[0096] 6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸的制备

[0097]

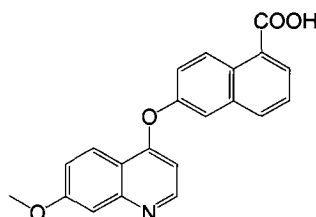


[0098] 将 6-羟基-1-萘酸 (1.43g, 7.6mmol) 溶于 38mL DMSO, 然后加入碳酸铯 (7.5g, 22.9mmol) 和 4-氯-6,7-二甲氧基-喹唑啉 (2.05g, 9.14mmol)。该反应液在 140°C 下加热 3 小时。反应结束后冷却至室温。加入 40mL 水稀释。用 2N 盐酸中和至 pH = 6.5。将析出的固体过滤、水洗、干燥。用甲醇重结晶得棕色固体 6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸 (1.68g, 产率 59%)。LC-MS (m/z) 377 (M+1)。

[0099] 实施例 2

[0100] 6-(7-甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸的制备

[0101]



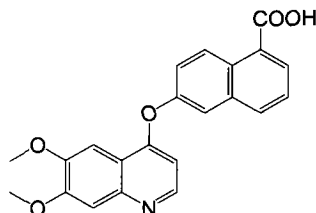
[0102] 以 6-羟基-1-萘酸 (1.43g, 7.6mmol) 和 4-氯-7-甲氧基喹唑啉 (1.77g, 9.14mmol)

为原料,按照实施例 1 中的类似步骤制得棕色固体 6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (1.73g,产率 66%)。LC-MS(m/z) 346(M+1)。

[0103] 实施例 3

[0104] 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸的制备

[0105]

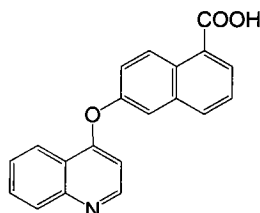


[0106] 以 6-羟基-1-萘酸 (1.43g,7.6mmol) 和 4-氯-6,7-二甲氧基喹啉 (2.04g,9.14mmol) 为原料,按照实施例 1 中的类似步骤制得棕色固体 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (1.95g,产率 68%)。LC-MS(m/z) 376(M+1)。

[0107] 实施例 4

[0108] 6-(喹啉-4-氧)-1-萘酸的制备

[0109]

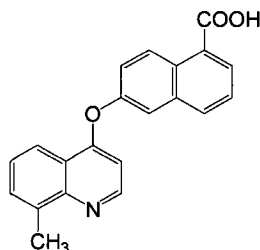


[0110] 以 6-羟基-1-萘酸 (1.43g,7.6mmol) 和 4-氯喹啉 (1.49g,9.14mmol) 为原料,按照实施例 1 中的类似步骤制得棕色固体 6-(喹啉-4-氧)-1-萘酸 (1.24g,产率 52%)。LC-MS(m/z) 316(M+1)。

[0111] 实施例 5

[0112] 6-(8-甲基喹啉-4-氧)-1-萘酸的制备

[0113]

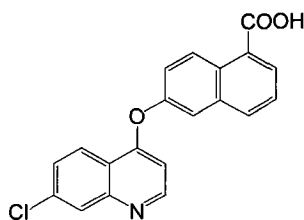


[0114] 以 6-羟基-1-萘酸 (1.43g,7.6mmol) 和 4-氯-8-甲基喹啉 (1.62g,9.14mmol) 为原料,按照实施例 1 中的类似步骤制得棕色固体 6-(8-甲基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (1.25g,产率 55%)。LC-MS(m/z) 330(M+1)。

[0115] 实施例 6

[0116] 6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酸的制备

[0117]

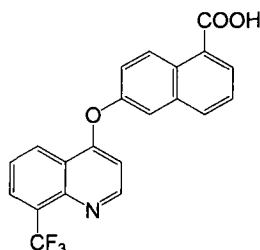


[0118] 以 6-羟基-1-萘酸 (1.43g, 7.6mmol) 和 4,7-二氯喹啉 (1.81g, 9.14mmol) 为原料, 按照实施例 1 中的类似步骤制得棕色固体 6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酸 (1.57g, 产率 59%)。LC-MS(m/z) 350 (M+1)。

[0119] 实施例 7

[0120] 6-(8-(三氟甲基)喹啉-4-氧)-1-萘酸的制备

[0121]

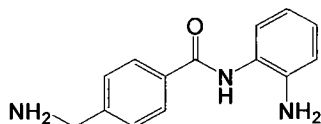


[0122] 以 6-羟基-1-萘酸 (1.43g, 7.6mmol) 和 4-氯-8-(三氟甲基)喹啉 (2.12g, 9.14mmol) 为原料, 按照实施例 1 中的类似步骤制得棕色固体 6-(8-(三氟甲基)喹啉-4-氧)-1-萘酸 (1.43g, 产率 49%)。LC-MS(m/z) 384 (M+1)。

[0123] 实施例 8

[0124] 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)苯酰胺的制备

[0125]



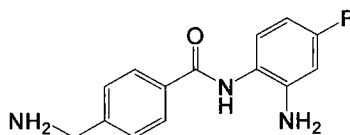
[0126] 将 4-氰基苯甲酸 (294mg, 2mmol) 溶于 8ml DMF 中, 然后加入 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐 (768mg, 4mmol)、1-羟基苯并三唑 (324mg, 2.4mmol)、三乙胺 (808mg, 8mmol) 和邻苯二胺 (432mg, 4mmol)。混合物在室温下搅拌 20 小时。然后用 400ml 盐水稀释。真空抽滤收集固体。固体用水洗涤。真空干燥得灰色固体 N-(2-氨基苯基)-4-氰基苯酰胺 (364mg, 产率 77%)。LC-MS(m/z) 238 (M+1)。

[0127] 将 N-(2-氨基苯基)-4-氰基苯酰胺 (237mg, 1mmol) 溶于 40ml 甲醇中, 然后加入硫酸 (196mg, 1mmol) 和 5% 钨碳 (0.20g)。混合物通氢气搅拌直至反应完成。反应液经硅藻土过滤, 滤液用 1N NaOH 溶液 (2ml) 中和。过滤。滤液真空浓缩得灰色固体 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)苯酰胺 (232mg, 产率 96%)。LC-MS(m/z) 242 (M+1)。

[0128] 实施例 9

[0129] 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-氟苯基)苯酰胺的制备

[0130]

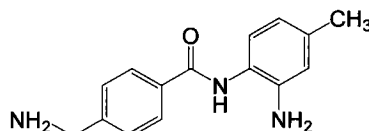


[0131] 以 4-氨基苯甲酸 (294mg, 2mmol) 和 4-氟邻苯二胺 (302mg, 2.4mmol) 为原料, 按照实施例 8 中的类似步骤制得棕色固体 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-氟苯基)苯酰胺 (186mg, 产率 72%)。LC-MS(m/z) 260 (M+1)。

[0132] 实施例 10

[0133] 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-甲基苯基)苯酰胺的制备

[0134]

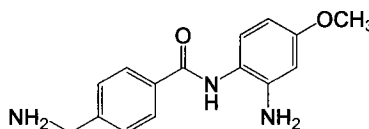


[0135] 以 4-氨基苯甲酸 (294mg, 2mmol) 和 4-甲基邻苯二胺 (293mg, 2.4mmol) 为原料, 按照实施例 8 中的类似步骤制得灰色固体 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-甲基苯基)苯酰胺 (173mg, 产率 68%)。LC-MS(m/z) 256 (M+1)。

[0136] 实施例 11

[0137] 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-甲氧基苯基)苯酰胺的制备

[0138]

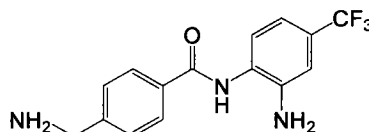


[0139] 以 4-氨基苯甲酸 (294mg, 2mmol) 和 4-甲氧基邻苯二胺 (331mg, 2.4mmol) 为原料, 按照实施例 8 中的类似步骤制得灰色固体 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-甲氧基苯基)苯酰胺 (192mg, 产率 71%)。LC-MS(m/z) 272 (M+1)。

[0140] 实施例 12

[0141] 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-三氟甲基苯基)苯酰胺的制备

[0142]

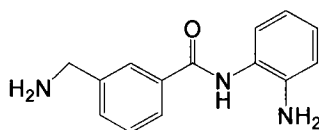


[0143] 以 4-氨基苯甲酸 (294mg, 2mmol) 和 4-三氟甲基邻苯二胺 (422mg, 2.4mmol) 为原料, 按照实施例 8 中的类似步骤制得灰色固体 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-三氟甲基苯基)苯酰胺 (195mg, 产率 63%)。LC-MS(m/z) 310 (M+1)。

[0144] 实施例 13

[0145] 3-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)苯酰胺的制备

[0146]



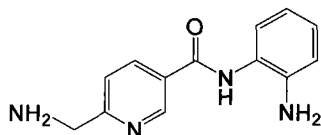
[0147] 以 3-氨基苯甲酸 (294mg, 2mmol) 和邻苯二胺 (432mg, 4mmol) 为原料, 按照实施

例 8 中的类似步骤制得灰色固体 3-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)苯酰胺 (140mg, 产率 58%)。LC-MS(m/z) 242 (M+1)。

[0148] 实施例 14

[0149] 6-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)烟酰胺的制备

[0150]

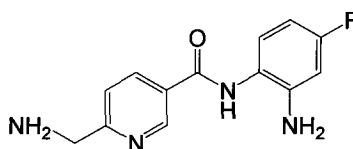


[0151] 以 6-氰基烟酸 (296mg, 2mmol) 和邻苯二胺 (864mg, 8mmol) 为原料, 按照实施例 8 中的类似步骤制得灰色固体 6-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)烟酰胺 (157mg, 产率 65%)。LC-MS(m/z) 243 (M+1)。

[0152] 实施例 15

[0153] 6-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-氟苯基)烟酰胺的制备

[0154]

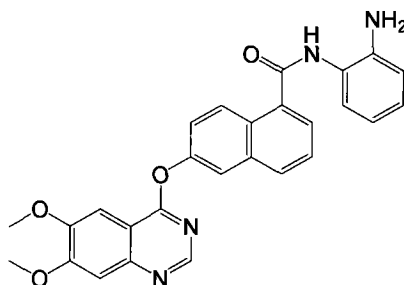


[0155] 以 6-氰基烟酸 (296mg, 2mmol) 和 4-氟邻苯二胺 (302mg, 2.4mmol) 为原料, 按照实施例 8 中的类似步骤制得灰色固体 6-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-氟苯基)烟酰胺 (135mg, 产率 52%)。LC-MS(m/z) 261 (M+1)。

[0156] 实施例 16

[0157] N-(2-氨基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0158]

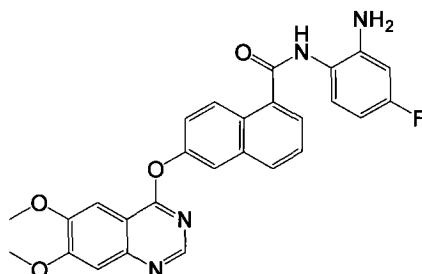


[0159] 将 6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 溶于 4mL DMF 中, 然后加入 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐 (38.4mg, 0.2mmol)、1-羟基苯并三唑 (16.2mg, 0.12mmol)、三乙胺 (40.4mg, 0.4mmol) 和邻苯二胺 (43.2mg, 0.4mmol)。混合物在室温下搅拌 20 小时。然后用 200ml 盐水稀释。真空抽滤收集固体。固体用水洗涤。真空干燥得褐色固体 N-(2-氨基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺 (39.1mg, 产率 84%)。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.01(s, 6H, 2×OCH<sub>3</sub>), 4.97(s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.65(t, J = 7.2Hz, 1H, Ar-H), 6.82(d, J = 7.0Hz, 1H, Ar-H), 7.00(t, J = 7.1Hz, 1H, Ar-H), 7.38(d, J = 7.1Hz, 1H, Ar-H), 7.42(s, 1H, Ar-H), 7.60(dd, J = 2.4 and 9.2Hz, 1H, Ar-H), 7.64-7.68(m, 2H, Ar-H), 7.87(d, J = 6.7Hz, 1H, Ar-H), 7.97(d, J = 2.3Hz, 1H, Ar-H), 8.09(d, J = 8.2Hz, 1H, Ar-H), 8.38(d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.54(s, 1H, Ar-H), 9.85(s, 1H, benzene-NH)。

LC-MS(m/z) 467 (M+1)。

[0160] 实施例 17

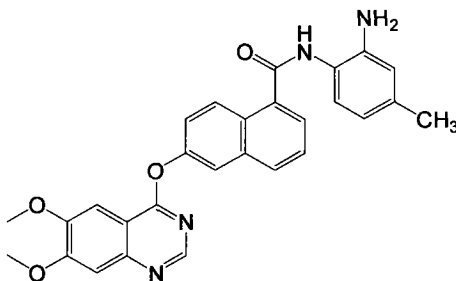
[0161] N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备  
[0162]



[0163] 以 6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-氟邻苯二胺 (15.1mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺 (43.1mg, 产率 89%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.01 (s, 6H, 2×OCH<sub>3</sub>), 5.28 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.41 (td, J = 2.6 and 8.5Hz, 1H, Ar-H), 6.59 (dd, J = 2.6 and 11.2Hz, 1H, Ar-H), 7.35 (td, J = 1.8 and 7.5Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (s, 1H, Ar-H), 7.59 (dd, J = 2.2 and 8.4Hz, 1H, Ar-H), 7.63-7.67 (m, 2H, Ar-H), 7.89 (d, J = 6.9Hz, 1H, Ar-H), 7.96 (d, J = 1.9Hz, 1H, Ar-H), 8.08 (d, J = 8.2Hz, 1H, Ar-H), 8.38 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.54 (s, 1H, Ar-H), 9.77 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS(m/z) 485 (M+1)。

[0164] 实施例 18

[0165] N-(2-氨基-4-甲基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备  
[0166]



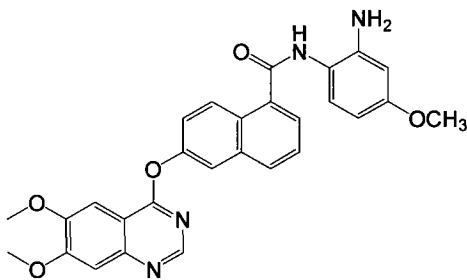
[0167] 以 6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-甲基邻苯二胺 (14.6mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基-4-甲基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺 (39.4mg, 产率 82%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (isomer ratio 0.77/0.23) δ 2.21 (s, 1H, Ar-CH<sub>3</sub>), 4.01 (s, 6H, 2×OCH<sub>3</sub>), 4.77 (s, 0.23×2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 4.89 (s, 0.77×2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.46 (d, J = 7.6Hz, 0.77×1H, Ar-H), 6.64 (s, 0.77×1H, Ar-H), 6.73 (d, J = 7.9Hz, 0.23×1H, Ar-H), 6.81 (s, 0.23×1H, Ar-H), 7.24 (d, J = 8.1Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (s, 1H, Ar-H), 7.58-7.66 (m, 3H, Ar-H), 7.85 (d, J = 6.7Hz, 1H, Ar-H), 7.97 (s, 1H, Ar-H), 8.08 (d, J = 7.9Hz, 1H, Ar-H), 8.38 (d, J = 9.0Hz, 1H, Ar-H), 8.54 (s, 1H, Ar-H), 9.77 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS(m/z) 481 (M+1)。

[0168] 实施例 19

[0169] N-(2-氨基-4-甲氧基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备



[0170]

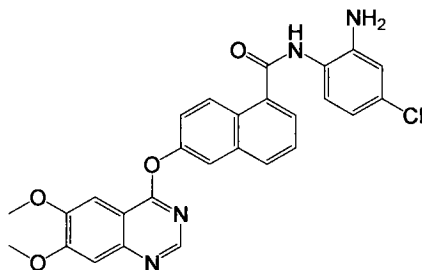


[0171] 以 6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-甲氧基邻苯二胺 (16.5mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基-4-甲氧基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺 (43.2mg, 产率 87%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.70 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.01 (s, 6H, 2×OCH<sub>3</sub>), 5.00 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.23 (dd, J = 2.6 and 8.6Hz, 1H, Ar-H), 6.40 (d, J = 2.6Hz, 1H, Ar-H), 7.22 (d, J = 8.6Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (s, 1H, Ar-H), 7.59 (dd, J = 2.2 and 9.1Hz, 1H, Ar-H), 7.62-7.66 (m, 2H, Ar-H), 7.86 (d, J = 6.9Hz, 1H, Ar-H), 7.96 (d, J = 2.0Hz, 1H, Ar-H), 8.07 (d, J = 8.2Hz, 1H, Ar-H), 8.38 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.54 (s, 1H, Ar-H), 9.70 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 497 (M+1)。

[0172] 实施例 20

[0173] N-(2-氨基-4-氯苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0174]

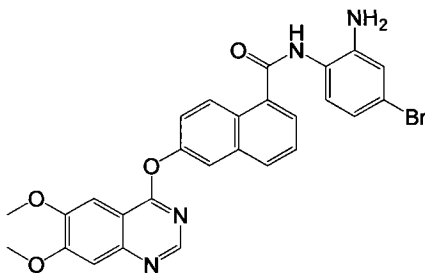


[0175] 以 6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-氯邻苯二胺 (17.1mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基-4-氯苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺 (42.9mg, 产率 83%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.01 (s, 6H, 2×OCH<sub>3</sub>), 5.31 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.65 (d, J = 8.3Hz, 1H, Ar-H), 6.86 (d, J = 1.9Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (s, 1H, Ar-H), 7.58-7.67 (m, 4H, Ar-H), 7.89 (d, J = 6.8Hz, 1H, Ar-H), 8.01 (s, 1H, Ar-H), 8.09 (d, J = 8.1Hz, 1H, Ar-H), 8.37 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.55 (s, 1H, Ar-H), 9.84 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 501 (M+1)。

[0176] 实施例 21

[0177] N-(2-氨基-4-溴苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0178]

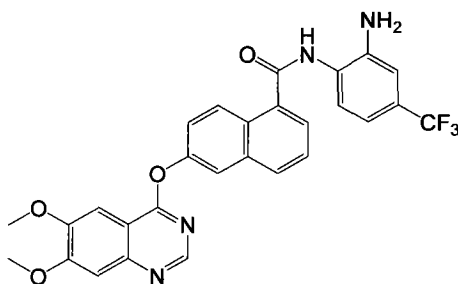


[0179] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-溴邻苯二胺 (22.4mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基-4-溴苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (42.0mg, 产率 77%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.01 (s, 6H, 2×OCH<sub>3</sub>), 5.31 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.77 (d, J = 8.3Hz, 1H, Ar-H), 7.01 (s, 1H, Ar-H), 7.41 (s, 1H, Ar-H), 7.58-7.65 (m, 5H, Ar-H), 7.89 (d, J = 7.0Hz, 1H, Ar-H), 8.00 (s, 1H, Ar-H), 8.14 (d, J = 10.2Hz, 1H, Ar-H), 8.37 (d, J = 9.1Hz, 1H, Ar-H), 8.54 (s, 1H, Ar-H), 9.84 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 545 (M+1)。

[0180] 实施例 22

[0181] N-(2-氨基-4-三氟甲基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0182]

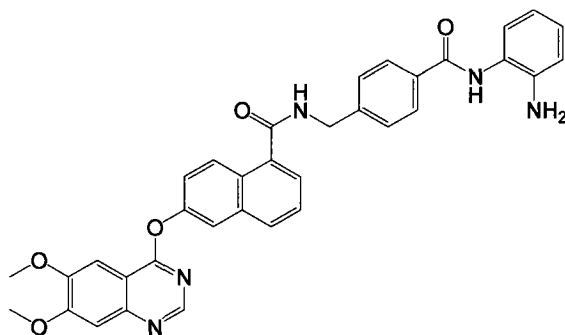


[0183] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-三氟甲基邻苯二胺 (21.1mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基-4-三氟甲基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (42.3mg, 产率 79%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.01 (s, 6H, 2×OCH<sub>3</sub>), 5.72 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.92 (d, J = 8.5Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (s, 1H, Ar-H), 7.59-7.65 (m, 3H, Ar-H), 7.90-7.96 (m, 2H, Ar-H), 7.98 (s, 1H, Ar-H), 8.10 (d, J = 8.3Hz, 1H, Ar-H), 8.17 (d, J = 7.3Hz, 1H, Ar-H), 8.39 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.54 (s, 1H, Ar-H), 9.90 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 535 (M+1)。

[0184] 实施例 23

[0185] N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0186]

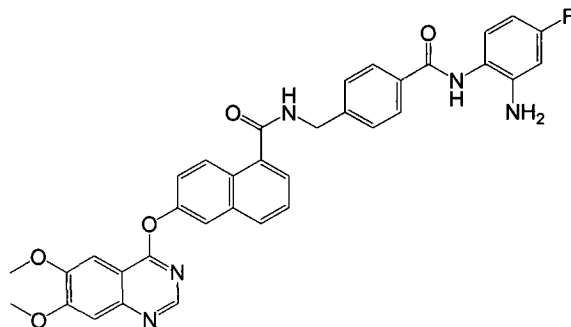


[0187] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)苯酰胺 (28.9mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (43.1mg, 产率 72%)。LC-MS(m/z) 600 (M+1)。

[0188] 实施例 24

[0189] N-(4-((2-氨基-4-氟苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0190]

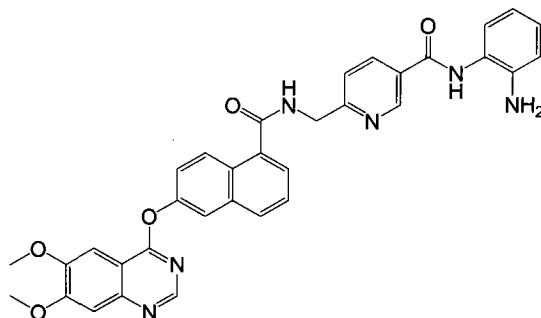


[0191] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-氟苯基)苯酰胺 (31.1mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(4-((2-氨基-4-氟苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (46.3mg, 产率 75%)。LC-MS(m/z) 618 (M+1)。

[0192] 实施例 25

[0193] N-(2-氨基苯基)-6-((2-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺的制备

[0194]



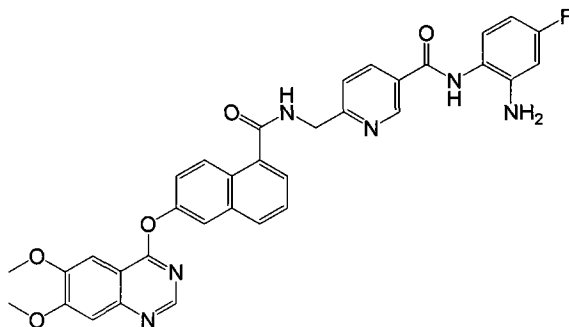
[0195] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 6-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)烟酰胺 (29.0mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制

得棕色固体 N-(2-氨基苯基)-6-((2-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺 (41.4mg, 产率 69%)。LC-MS(m/z) 601(M+1)。

[0196] 实施例 26

[0197] N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-((2-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺的制备

[0198]

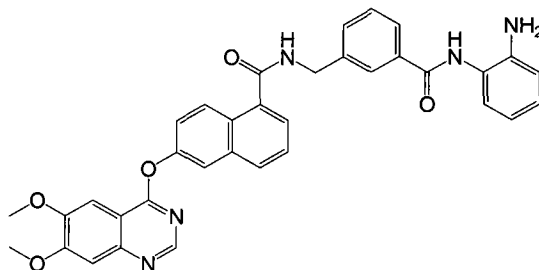


[0199] 以 6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 6-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-氟苯基)烟酰胺 (31.2mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-((2-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺 (43.3mg, 产率 77%)。LC-MS(m/z) 619(M+1)。

[0200] 实施例 27

[0201] N-(3-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0202]

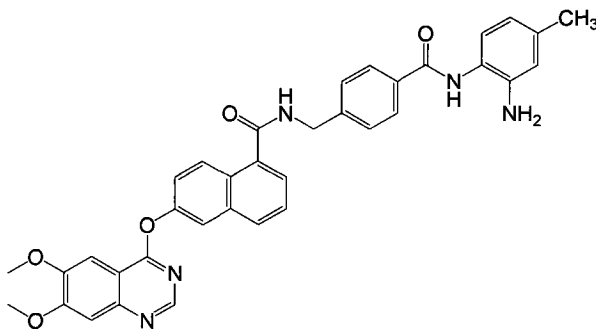


[0203] 以 6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 3-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)苯酰胺 (28.9mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(3-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺 (48.5mg, 产率 81%)。LC-MS(m/z) 600(M+1)。

[0204] 实施例 28

[0205] N-(4-((2-氨基-4-甲基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0206]

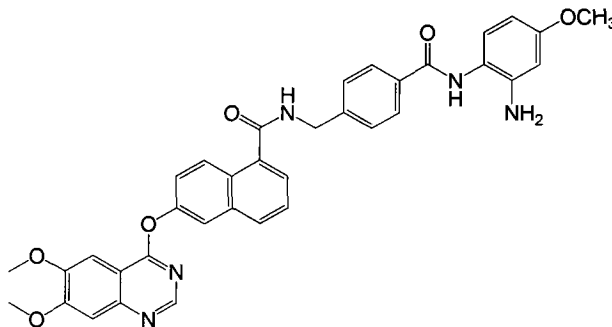


[0207] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-甲基苯基)苯酰胺 (30.6mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(4-((2-氨基-4-甲基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (52.7mg, 产率 86%)。LC-MS(m/z) 614(M+1)。

[0208] 实施例 29

[0209] N-(4-((2-氨基-4-甲氧基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0210]

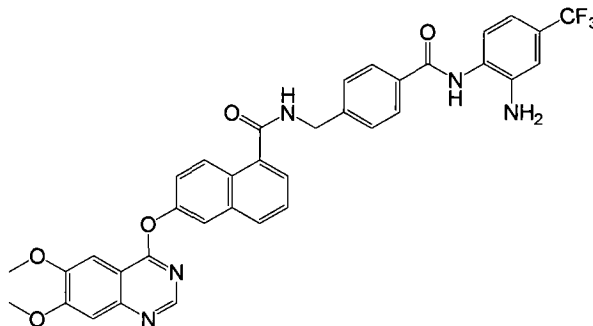


[0211] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-甲氧基苯基)苯酰胺 (32.5mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(4-((2-氨基-4-甲氧基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (51.6mg, 产率 82%)。LC-MS(m/z) 630(M+1)。

[0212] 实施例 30

[0213] N-(4-((2-氨基-4-三氟甲基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0214]



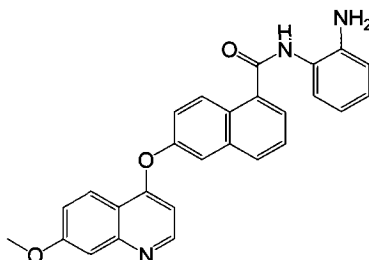
[0215] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.6mg, 0.1mmol) 和 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基-4-三氟甲基苯基)苯酰胺 (37.1mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中

的类似步骤制得棕色固体 N-(4-((2-氨基-4-三氟甲基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (46.7mg, 产率 70%)。LC-MS (m/z) 668 (M+1)。

[0216] 实施例 31

[0217] N-(2-氨基苯基)-6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0218]

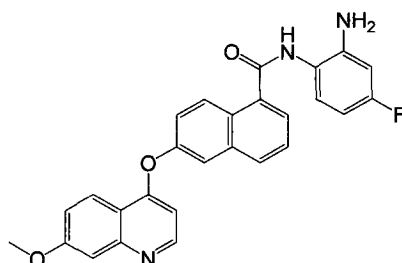


[0219] 以 6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (34.5mg, 0.1mmol) 和邻苯二胺 (43.2mg, 0.4mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基苯基)-6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (39.6mg, 产率 91%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.97 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.60 (d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 6.64 (t, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 6.82 (d, J = 7.8Hz, 1H, Ar-H), 6.99 (t, J = 7.4Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (dd, J = 2.5 and 9.1Hz, 1H, Ar-H), 7.38 (d, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 7.45 (d, J = 2.4Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (dd, J = 2.4 and 9.2Hz, 1H, Ar-H), 7.65 (t, J = 7.8Hz, 1H, Ar-H), 7.87-7.88 (m, 2H, Ar-H), 8.07 (d, J = 8.2Hz, 1H, Ar-H), 8.25 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.43 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.65 (d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 9.84 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 436 (M+1)。

[0220] 实施例 32

[0221] N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0222]

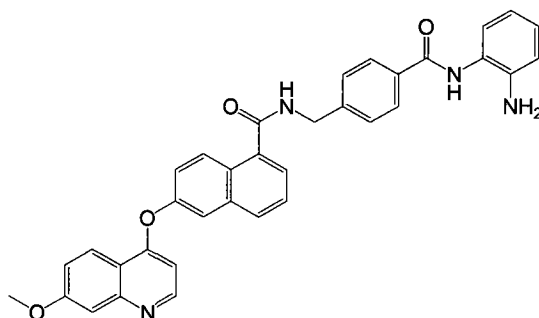


[0223] 以 6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (34.5mg, 0.1mmol) 和 4-氟邻苯二胺 (15.1mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (33.1mg, 产率 73%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5.27 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.41 (td, J = 2.5 and 8.4Hz, 1H, Ar-H), 6.57-6.61 (m, 2H, Ar-H), 7.30-7.36 (m, 2H, Ar-H), 7.45 (d, J = 2.2Hz, 1H, Ar-H), 7.56 (dd, J = 2.2 and 9.2Hz, 1H, Ar-H), 7.65 (t, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 7.87-7.91 (m, 2H, Ar-H), 8.07 (d, J = 8.3Hz, 1H, Ar-H), 8.24 (d, J = 9.1Hz, 1H, Ar-H), 8.43 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.65 (d, J = 5.1Hz, 1H, Ar-H), 9.75 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 454 (M+1)。

[0224] 实施例 33

[0225] N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0226]

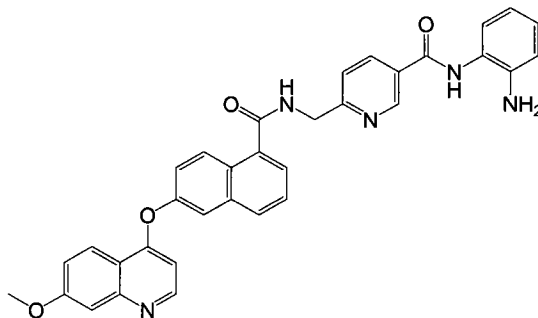


[0227] 以 6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (34.5mg, 0.1mmol) 和 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)苯酰胺 (28.9mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)-苄基)-6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (48.3mg, 产率 85%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.64 (d, J = 5.6Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.87 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.58-6.62 (m, 2H, Ar-H), 6.78 (dd, J = 1.2 and 7.8Hz, 1H, Ar-H), 6.97 (td, J = 1.4 and 8.1Hz, 1H, Ar-H), 7.18 (d, J = 7.0Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (dd, J = 2.5 and 9.2Hz, 1H, Ar-H), 7.44 (d, J = 2.4Hz, 1H, Ar-H), 7.53-7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.62 (t, J = 8.0Hz, 1H, Ar-H), 7.72 (d, J = 6.1Hz, 1H, Ar-H), 7.86 (d, J = 2.5Hz, 1H, Ar-H), 7.98-8.06 (m, 3H, Ar-H), 8.24 (d, J = 9.1Hz, 1H, Ar-H), 8.39 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.64 (d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 9.21 (t, J = 6.0Hz, 1H, -CONH), 9.61 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 569 (M+1)。

[0228] 实施例 34

[0229] N-(2-氨基苯基)-6-((2-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺的制备

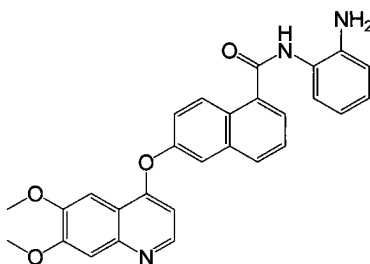
[0230]



[0231] 以 6-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (34.5mg, 0.1mmol) 和 6-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)烟酰胺 (29.0mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基苯基)-6-((2-(7-甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺 (46.6mg, 产率 82%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.74 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.95 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.60 (m, 2H, Ar-H), 6.79 (s, 1H, Ar-H), 6.98 (s, 1H, Ar-H), 7.17 (s, 1H, Ar-H), 7.31 (d, J = 8.6Hz, 1H, Ar-H), 7.44 (s, 1H, Ar-H), 7.58-7.63 (m, 3H, Ar-H), 7.77 (s, 1H, Ar-H), 7.87 (s, 1H, Ar-H), 8.05 (d, J = 5.6Hz, 1H, Ar-H), 8.24 (d, J = 8.3Hz, 1H, Ar-H), 8.33 (s, 1H, Ar-H), 8.47 (d, J = 7.5Hz, 1H, Ar-H), 9.13 (s, 1H, Ar-H), 9.25 (s, 1H, -CONH), 9.77 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 570 (M+1)。

[0232] 实施例 35

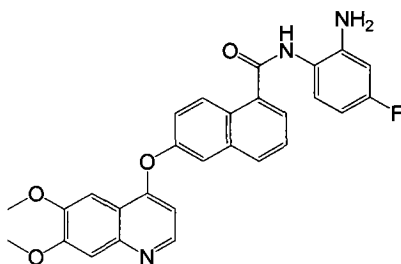
[0233] N-(2-氨基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备  
[0234]



[0235] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.5mg, 0.1mmol) 和邻苯二胺 (43.2mg, 0.4mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (40.0mg, 产率 86%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.93 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.99 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.56 (d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 6.63 (t, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 6.81 (d, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 6.98 (t, J = 7.2Hz, 1H, Ar-H), 7.36 (d, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 7.43 (s, 1H, Ar-H), 7.56-7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.65 (t, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 7.87-7.90 (m, 2H, Ar-H), 8.08 (d, J = 8.0Hz, 1H, Ar-H), 8.43 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.49 (d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 9.87 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 466 (M+1)。

[0236] 实施例 36

[0237] N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备  
[0238]

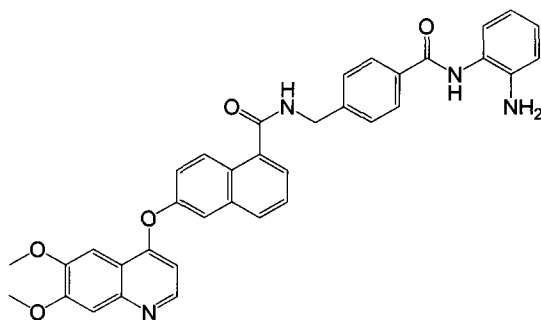


[0239] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.5mg, 0.1mmol) 和 4-氟邻苯二胺 (15.1mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基-4-氟苯基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (39.1mg, 产率 81%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.93 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5.31 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.40 (s, 1H, Ar-H), 6.55-6.59 (m, 2H, Ar-H), 7.30 (d, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (s, 1H, Ar-H), 7.54-7.57 (m, 2H, Ar-H), 7.64 (t, J = 8.0Hz, 1H, Ar-H), 7.89-7.91 (m, 2H, Ar-H), 8.07 (d, J = 8.0Hz, 1H, Ar-H), 8.42 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.49 (d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 9.79 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 484 (M+1)。

[0240] 实施例 37

[0241] N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备  
[0242]



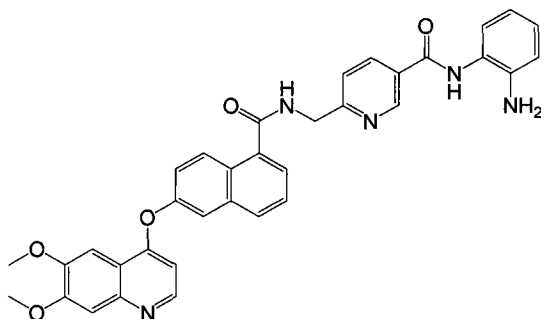


[0243] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.5mg, 0.1mmol) 和 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)苯酰胺 (28.9mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (49.0mg, 产率 82%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.93 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.63 (d, J = 5.6Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.90 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.56-6.59 (m, 2H, Ar-H), 6.78 (d, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 6.96 (t, J = 8.1Hz, 1H, Ar-H), 7.17 (d, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (s, 1H, Ar-H), 7.53-7.55 (m, 4H, Ar-H), 7.62 (t, J = 8.0Hz, 1H, Ar-H), 7.71 (d, J = 6.8Hz, 1H, Ar-H), 7.87 (s, 1H, Ar-H), 7.98-8.06 (m, 3H, Ar-H), 8.39 (d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.49 (d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 9.26 (t, J = 6.0Hz, 1H, -CONH), 9.66 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 599 (M+1)。

[0244] 实施例 38

[0245] N-(2-氨基苯基)-6-((2-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺的制备

[0246]

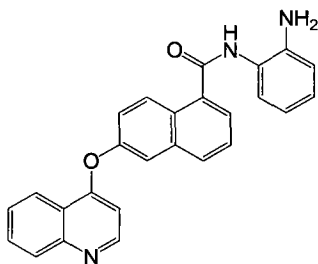


[0247] 以 6-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (37.5mg, 0.1mmol) 和 6-(氨基甲基)-N-(2-氨基苯基)烟酰胺 (29.0mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基苯基)-6-((2-(6,7-二甲氧基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺)甲基)烟酰胺 (47.9mg, 产率 80%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.93 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.73 (d, J = 5.6Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.97 (s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.57 (m, 2H, Ar-H), 6.77 (d, J = 6.4Hz, 1H, Ar-H), 6.98 (t, J = 8.1Hz, 1H, Ar-H), 7.16 (d, J = 5.6Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (s, 1H, Ar-H), 7.55-7.63 (m, 4H, Ar-H), 7.62 (t, J = 8.0Hz, 1H, Ar-H), 7.76 (d, J = 6.8Hz, 1H, Ar-H), 7.88 (s, 1H, Ar-H), 8.06 (s, 1H, Ar-H), 8.33 (s, 1H, Ar-H), 8.45-8.48 (m, 2H, Ar-H), 9.12 (s, 1H, Ar-H), 9.30 (t, J = 6.0Hz, 1H, -CONH), 9.80 (s, 1H, benzene-NH). LC-MS (m/z) 600 (M+1)。

[0248] 实施例 39

[0249] N-(2-氨基苯基)-6-(喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0250]

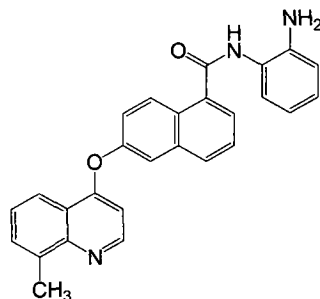


[0251] 以 6-(喹啉-4-氧)-1-萘酸 (31.5mg, 0.1mmol) 和邻苯二胺 (43.2mg, 0.4mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基苯基)-6-(喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (35.6mg, 产率 88%)。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.97(s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.65(t, J = 7.3Hz, 1H, Ar-H), 6.75(d, J = 5.1Hz, 1H, Ar-H), 6.82(d, J = 7.8Hz, 1H, Ar-H), 7.00(t, J = 7.1Hz, 1H, Ar-H), 7.38(d, J = 7.5Hz, 1H, Ar-H), 7.59(dd, J = 2.3 and 9.2Hz, 1H, Ar-H), 7.64-7.71(m, 2H, Ar-H), 7.83-7.92(m, 3H, Ar-H), 8.08(d, J = 8.4Hz, 2H, Ar-H), 8.37(d, J = 7.9Hz, 1H, Ar-H), 8.45(d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.73(d, J = 5.1Hz, 1H, Ar-H), 9.85(s, 1H, benzene-NH). LC-MS(m/z) 406 (M+1)。

[0252] 实施例 40

[0253] N-(2-氨基苯基)-6-(8-甲基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0254]

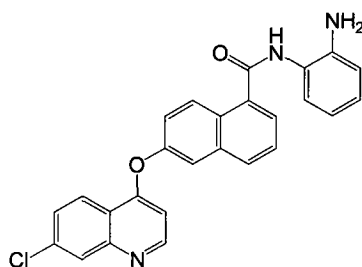


[0255] 以 6-(8-甲基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (32.9mg, 0.1mmol) 和邻苯二胺 (43.2mg, 0.4mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基苯基)-6-(8-甲基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (37.7mg, 产率 90%)。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.76(s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 4.97(s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.64(t, J = 7.1Hz, 1H, Ar-H), 6.78(d, J = 5.0Hz, 1H, Ar-H), 6.82(d, J = 7.8Hz, 1H, Ar-H), 6.99(t, J = 7.3Hz, 1H, Ar-H), 7.38(d, J = 7.5Hz, 1H, Ar-H), 7.55-7.58(m, 2H, Ar-H), 7.65(t, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 7.71(d, J = 7.0Hz, 1H, Ar-H), 7.87-7.89(m, 2H, Ar-H), 8.07(d, J = 8.2Hz, 1H, Ar-H), 8.20(d, J = 7.9Hz, 1H, Ar-H), 8.44(d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.76(d, J = 5.0Hz, 1H, Ar-H), 9.84(s, 1H, benzene-NH). LC-MS(m/z) 420 (M+1)。

[0256] 实施例 41

[0257] N-(2-氨基苯基)-6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0258]

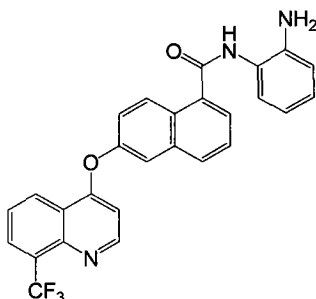


[0259] 以 6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酸 (35.0mg, 0.1mmol) 和邻苯二胺 (43.2mg, 0.4mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基苯基)-6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (33.2mg, 产率 83%)。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.97(s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.65(t, J = 7.4Hz, Ar-H), 6.77(d, J = 5.5Hz, 1H, Ar-H), 6.82(d, J = 7.2Hz, 1H, Ar-H), 7.00(t, J = 7.0Hz, 1H, Ar-H), 7.38(d, J = 7.2Hz, 1H, Ar-H), 7.60(dd, J = 2.6 and 9.2Hz, 1H, Ar-H), 7.67-7.74(m, 2H, Ar-H), 7.89(d, J = 7.4Hz, 1H, Ar-H), 7.94(d, J = 2.4Hz, 1H, Ar-H), 8.09(d, J = 8.2Hz, 1H, Ar-H), 8.13(d, J = 2.1Hz, 1H, Ar-H), 8.41(d, J = 9.0Hz, 1H, Ar-H), 8.46(d, J = 9.6Hz, 1H, Ar-H), 8.76(d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 9.85(s, 1H, benzene-NH). LC-MS(m/z) 440(M+1)。

[0260] 实施例 42

[0261] N-(2-氨基苯基)-6-(8-(三氟甲基)喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0262]

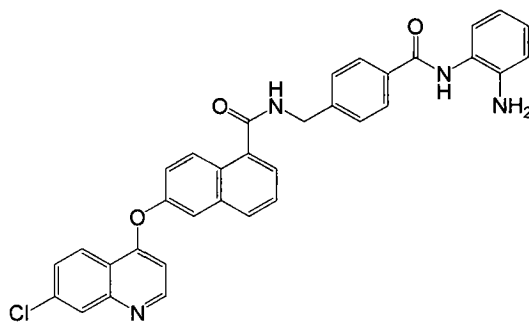


[0263] 以 6-(8-三氟甲基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (39.8mg, 0.1mmol) 和邻苯二胺 (43.2mg, 0.4mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(2-氨基苯基)-6-(8-三氟甲基喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (38.3mg, 产率 81%)。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.98(s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.65(t, J = 7.3Hz, 1H, Ar-H), 6.83(d, J = 7.6Hz, 1H, Ar-H), 6.89(d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 7.00(t, J = 7.2Hz, 1H, Ar-H), 7.38(d, J = 7.5Hz, 1H, Ar-H), 7.62(dd, J = 2.4 and 9.2Hz, 1H, Ar-H), 7.68(t, J = 7.7Hz, 1H, Ar-H), 7.83(t, J = 7.9Hz, 1H, Ar-H), 7.90(d, J = 7.0Hz, 1H, Ar-H), 7.97(d, J = 2.3Hz, 1H, Ar-H), 8.10(d, J = 8.3Hz, 1H, Ar-H), 8.29(d, J = 7.1Hz, 1H, Ar-H), 8.47(d, J = 9.2Hz, 1H, Ar-H), 8.70(d, J = 7.8Hz, 1H, Ar-H), 8.87(d, J = 5.2Hz, 1H, Ar-H), 9.86(s, 1H, benzene-NH). LC-MS(m/z) 474(M+1)。

[0264] 实施例 43

[0265] N-(4-((2-氨基苯基)氨基甲酰基)苄基)-6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0266]

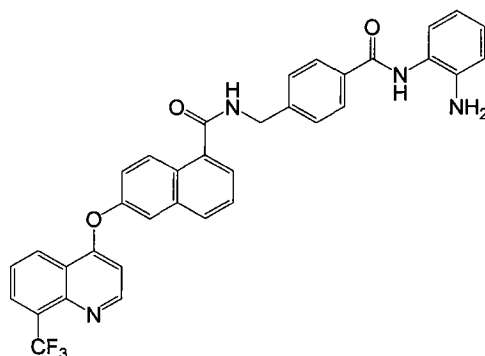


[0267] 以 6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酸 (35.0mg, 0.1mmol) 和 4-(氨基甲基)-N-(2-氨基苄基)苯酰胺 (28.9mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(4-((2-氨基苄基)氨基甲酰基)苄基)-6-(7-氯喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (42.4mg, 产率 74%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.64(d, J = 5.8Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.87(s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.60(t, J = 7.0Hz, 1H, Ar-H), 6.75-6.79(m, 2H, Ar-H), 6.97(t, J = 7.5Hz, 1H, Ar-H), 7.18(d, J = 7.7Hz, 1H, Ar-H), 7.53-7.59(m, 3H, Ar-H), 7.66(t, J = 8.0Hz, 1H, Ar-H), 7.70-7.74(m, 2H, Ar-H), 7.92(d, J = 2.0Hz, 1H, Ar-H), 7.99(d, J = 7.9Hz, 2H, Ar-H), 8.06(d, J = 8.2Hz, 1H, Ar-H), 8.13(s, 1H, Ar-H), 8.39-8.42(m, 2H, Ar-H), 8.75(d, J = 5.1Hz, 1H, Ar-H), 9.22(t, J = 5.6Hz, 1H, -CONH), 9.62(s, 1H, benzene-NH). LC-MS(m/z) 573(M+1)。

[0268] 实施例 44

[0269] N-(4-((2-氨基苄基)氨基甲酰基)苄基)-6-(8-(三氟甲基)喹啉-4-氧)-1-萘酰胺的制备

[0270]



[0271] 以 6-(8-三氟甲基喹啉-4-氧)-1-萘酸 (38.3mg, 0.1mmol) 和 6-(氨基甲基)-N-(2-氨基苄基)烟酰胺 (29.0mg, 0.12mmol) 为原料, 按照实施例 16 中的类似步骤制得棕色固体 N-(4-((2-氨基苄基)氨基甲酰基)苄基)-6-(8-(三氟甲基)喹啉-4-氧)-1-萘酰胺 (47.3mg, 产率 78%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.64(d, J = 5.6Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.87(s, 2H, benzene-NH<sub>2</sub>), 6.60(t, J = 7.2Hz, 1H, Ar-H), 6.78(d, J = 7.8Hz, 1H, Ar-H), 6.89(d, J = 5.1Hz, 1H, Ar-H), 6.97(t, J = 7.2Hz, 1H, Ar-H), 7.18(d, J = 7.9Hz, 1H, Ar-H), 7.53-7.66(m, 4H, Ar-H), 7.74(d, J = 6.9Hz, 1H, Ar-H), 7.83(t, J = 7.9Hz, 1H, Ar-H), 7.95-8.08(m, 4H, Ar-H), 8.29(d, J = 7.0Hz, 1H, Ar-H), 8.42(d, J = 9.1Hz, 1H, Ar-H), 8.69(d, J = 8.3Hz, 1H, Ar-H), 8.86(d, J = 5.0Hz, 1H, Ar-H), 9.22(t, J = 5.5Hz, 1H, -CONH), 9.61(s, 1H, benzene-NH). LC-MS(m/z) 607(M+1)。

[0272] 实施例 45 片剂的制备

[0273] 处方 (1000 片) :

- [0274] 化合物 31 : 5g  
[0275] 微晶纤维素 : 90g  
[0276] 羧甲基淀粉钠 : 5g  
[0277] 4%聚维酮 K30 无水乙醇溶液 : 50g  
[0278] 滑石粉 : 0.5g

[0279] 制备工艺:将化合物 31 过 100 目筛,将微晶纤维素、羧甲基淀粉钠和滑石粉过 80 目筛,称取处方量的微晶纤维素和羧甲基淀粉钠,混合均匀,然后将化合物 31 与其按等量递加法混匀,加入 4%聚维酮 K30 无水乙醇溶液适量制粒,干燥后加入处方量滑石粉混匀,压片即得。

#### [0280] 实施例 46 胶囊剂的制备

- [0281] 处方(1000 粒):  
[0282] 化合物 31 : 5g  
[0283] 微晶纤维素 : 55g  
[0284] 乳糖 : 35g  
[0285] 羧甲基淀粉钠 : 5g  
[0286] 硬脂酸镁 : 0.5g

[0287] 制备工艺:将化合物 31 过 100 目筛,将微晶纤维素、乳糖、羧甲基淀粉钠和硬脂酸镁过 80 目筛,称取处方量的微晶纤维素、乳糖和羧甲基淀粉钠,混合均匀,然后将化合物 31 与其按等量递加法混匀,加入处方量硬脂酸镁混匀,灌装胶囊即得。

#### [0288] 实施例 47 注射液的制备

- [0289] 处方:  
[0290] 化合物 31 : 1.00mg  
[0291] 药用 DMSO : 0.10ml  
[0292] 药用乙醇 : 1.00ml  
[0293] 制备工艺:将化合物 31 溶于药用 DMSO,加入药用乙醇即得。

#### [0294] 实施例 48

##### [0295] 通式 (I) 化合物 PDGF 和 VEGF 配体依赖性细胞增殖试验

##### [0296] (一)PDGF 依赖性细胞增殖:

[0297] 采用稳定表达人 PDGFR $\beta$  的小鼠 NIH-3T3 成纤维工程细胞株来评价 PDGF 依赖的细胞增殖。PDGFR $\beta$ NIH-3T3 细胞以 5000 每孔的密度分种于 96 孔微孔板,24 小时后换成无血清培养基培养过夜。加入待测化合物和 PDGF BB(50ng/ml),继续在无血清培养基中培养 72 小时。细胞增殖情况根据说明用 MTS 方法 (Promega) 进行检测。在 CO<sub>2</sub> 培养箱 37°C 培养 2 小时,然后在 ELISA 酶标仪上测量 490nm 的吸收值。

##### [0298] (二)VEGF 依赖性细胞增殖:

[0299] HUVEC 细胞以 6000 每孔的密度分种于 96 孔微孔板,24 小时后换成无血清培养基中培养 2 小时。加入待测化合物和 VEGF 165(50ng/ml),继续在无血清培养基中培养 72 小时。细胞增殖情况根据说明用 MTS 方法 (Promega) 进行检测。在 CO<sub>2</sub> 培养箱 37°C 培养 2 小时,然后在 ELISA 酶标仪上测量 490nm 的吸收值。

[0300] 实验结果见表 2。

[0301] 表 2

样品 (化合物)	GI <sub>50</sub> nM (PDGF 配体依赖细胞增殖)	GI <sub>50</sub> nM (VEGF 配体依赖细胞增殖)
16	48	3
17	40	3
18	15	7
[0302] 19	11	23
20	23	6
21	19	5
22	372	3
23	148	18

	25	69	13
	31	46	5
	32	20	2
	33	300	8
	34	248	90
	35	5	1
	36	3	2
[0303]	37	159	4
	38	74	25
	39	32	107
	40	1000	1000
	41	479	105
	42	48	1000
	43	1000	288
	44	1000	1000

[0304] 实施例 49

[0305] 通式 (I) 化合物体外抑制 HDAC 总酶活性和

[0306] 体外抑制 HDAC 亚型活性的试验。

[0307] 一、体外 HDAC 总酶活性的测定：

[0308] 体外 HDAC 总酶活性的测定是我们采用 BIOMOL 公司的 HDAC Fluorimetric Assay/DrugDiscovery Kit 对抑制剂的体外抑制活性进行测试。实验的原理如下：一种特殊的底物 Fluor deLys 在组蛋白去乙酰化酶（实验中采用 HeLa 细胞的核提取物，富含多种亚型的 HDAC）的作用下会去掉一个乙酰基，暴露出游离的氨基，当加入 Developer 后会产生一种可诱导的荧光。这种荧光的激发波长为 360nm，发射波长为 460nm。底物去乙酰化越充分，诱导的荧光值就越高，在无抑制剂情况下的荧光值为对照；而当有抑制剂存在的时候，被诱导的荧光值会降低，而无酶时（相当于酶活性完全被抑制）的荧光值为空白。而一般抑制后的荧光值会介于对照和空白之间。在分析时我们将空白作为 0，对照作为 1 进行计算，值越小则说明抑制活性越高。

[0309] 1. 将实验缓冲液，稀释后的 trichostatinA 及被测试的抑制剂加入微孔板适当的

孔中。下表中列出了不同实验类型每种试剂的用量。

[0310]

试剂	实验缓冲液	HeLa 提取液 (稀释液)	抑制剂 (5x)	Fluor de Lys™ 底 物 (2x)
空白	25 μ l	0	0	25 μ l
对照	10 μ l	15ul	0	25 μ l
Trichostatin A	0	15 μ l	10ul	25 μ l
测试样品	0	15 μ l	10 μ l	25 μ l

[0311] 2. 将稀释的 HeLa 核蛋白提取物加入那些除标记为“空白”以外的所有孔中。

[0312] 3. 让稀释后的 Fluor de Lys™ 底物和微孔板中的样品平衡到 25℃。

[0313] 4. 将稀释后的底物 (25 μ l) 加入每一个孔中并混合均匀以启动 HDAC 反应。

[0314] 5. 在室温反应 30 分钟, 然后加入 Fluor de Lys™ 显影剂 (50 μ l) 终止反应。将微孔板在室温 (25℃) 孵育 10-15 分钟。

[0315] 6. 在激发波长为 369 纳米, 发射波长为 451 纳米的荧光酶标仪上读取荧光值。

[0316] 二、报告基因对抑制剂 HDAC 亚型选择性的测定：

[0317] HDAC 不同亚型可以与不同的转录因子结合, 参与不同基因的表达调控中。选择合适转录因子的调控元件构建成报告基因, 可以用来评估抑制剂对 HDAC 亚型的选择性抑制作用。在转染前一天将 HeLa 细胞种入 96 孔板使转染时密度达到 50-80% 的融合。在荧光素酶基因上游插入了 p21- 启动子调控序列的报告基因质粒分别使用 FuGene6 (Roche) 转染试剂, 根据操作说明进行转染。同时为了校正转染效率, 共转染了绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达质粒。在转染 24 小时后加入化合物或溶剂对照 (DMSO)。再过 24 小时后收集并裂解细胞, 按照操作说明使用荧光素酶 (Promega) 检测试剂盒对荧光素酶的量进行评估。同时进一步测定 GFP 的含量, 对转染效率进行校正。

[0318] 实验结果见表 3。

[0319] 表 3

[0320]



样品 (化合物)	30 $\mu$ M 下 HDAC 总酶抑制活性 (%)	10 $\mu$ M 下 HDAC I 类 (P21 报告基因) 诱导倍数
CS055	50.4	33
16	8.6	1.3
17	22.5	1.1
18	17.1	1.1
19	21.9	1.4
20	21.9	1.5

[0321]

21	18.6	1.1
22	17	1.1
23	49.4	11.3
25	47.9	12.1
31	10.1	1.6
32	21.7	1.8
33	39.1	2.8
34	38.8	5.0
35	19.3	1.2
36	14.4	1.2
37	35.9	3.0
38	39.3	3.1
39	15.9	1.2
40	22.2	1.3
41	19.3	1.1
42	6.2	1.3
43	38.7	6.1
44	35.1	3.2

[0322] CS055 :西达本胺,深圳微芯生物科技有限责任公司研制的 HDAC 抑制剂,具有优异的抗肿瘤活性,正进行临床 2 期试验。

[0323] 实施例 50

[0324] 通式 (I) 化合物对肿瘤细胞增殖的抑制试验。

[0325] 将肿瘤细胞用胰酶消化后,以 3000 个每孔的密度分种于 96 孔微孔板,在含 10% FBS 的完全培养基里培养 24 小时。加入待测化合物和溶剂对照,最终化合物浓度为 100nmol/L 到 100  $\mu$  mol/L。然后在完全培养基里培养 72 小时。根据说明书的方法加入 MTS 试剂 (Promega),在 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2 小时,然后在 ELISA 酶标仪上读取 490nm 的吸收值。

[0326] 实验结果见表 4。

[0327] 表 4

[0328]

样品 (化合物)	GI <sub>50</sub> μM (A-498)	GI <sub>50</sub> μM (A549)	GI <sub>50</sub> μM (Bel-7402)	GI <sub>50</sub> μM (HCT-8)	GI <sub>50</sub> μM (MCF-7)
CS055	12.08	11.15	18.93	7.711	3.865
16	30.0	30.0	30.0	12.3	30.0
17	30.0	30.0	30.0	3.0	30.0
18	nd	nd	nd	nd	nd
19	nd	nd	nd	nd	nd
20	nd	nd	nd	nd	nd
21	nd	nd	nd	nd	nd
22	nd	nd	nd	nd	nd
23	14.7	30.0	30.0	5.7	4.3
25	14.7	30.0	30.0	4.9	6.1
31	9.5	17.3	30.0	6.6	10.2
32	7.5	8.3	17.3	6.6	15.9
33	1.9	2.1	2.8	1.5	2.0
34	7.9	11.2	17.7	5.5	5.2
35	9.1	7.7	19.5	8.9	13.3
36	4.2	7.4	12.1	4.1	8.9
37	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
38	6.9	30.0	30.0	8.0	9.4
39	nd	nd	nd	nd	nd
40	nd	nd	nd	nd	nd
41	nd	nd	nd	nd	nd
42	nd	nd	nd	nd	nd
43	nd	nd	nd	nd	nd
44	nd	nd	nd	nd	nd

[0329] nd\* :未测定；

[0330] CS055 :西达本胺,深圳微芯生物科技有限责任公司研制的 HDAC 抑制剂,具有优异的抗肿瘤活性,正在进行临床 2 期试验。

[0331] 实施例 51

[0332] 化合物 31 对人 A549 肺癌裸鼠移植性肿瘤的抑制试验

[0333] 选用裸鼠,雌性,14-16g,经正常饲养观察 3 天如无异常,以 50 只常规腋下接种人 A549 肺癌后饲养观察,确认瘤细胞着床增殖且瘤块直径大于 6mm 时随机分组,8 只 / 组,共 6 组,其中受试药物 4 个给药浓度共四组,溶剂对照一组,阳性对照药 Sutent 一组。即日口服给药,1 次 / 日,共 24 次,化合物 31 的给药剂量为 5、10、20 和 40mg/kg 体重。每周 2 次称量动物体重及测量肿瘤体积。给药 24 次后次日处死动物剥取肿瘤称瘤重,按公式: [(对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重] × 100%, 计算各组肿瘤抑制率。实验结果见表 5 和图 1。

[0334] 表 5

分组 <sup>a</sup>	剂量 (mg/kg)	体重 (g)		瘤重 (g)	TGI (%) <sup>b</sup>	P
		起始	结束			
溶剂	-	20.3±0.9	25.4±2.3	4.20±0.75	-	-
[0335] Sutent	40	20.3±1.4	24.4±2.3	2.06±0.71	50.9	<0.001
化合物 31	40	20.0±0.9	22.6±2.4	1.06±0.54	74.8	<0.001
化合物 31	20	20.6±1.1	24.2±0.7	1.50±0.41	64.3	<0.001
化合物 31	10	19.9±1.3	25.1±1.3	2.13±0.51	49.4	<0.001
化合物 31	5	21.1±0.6	24.6±1.3	2.20±0.57	47.6	<0.001

[0336] <sup>a</sup> 每组 8 只裸鼠。<sup>b</sup> 肿瘤生长抑制率。

[0337] 实施例 52

[0338] 化合物 31 对人 HCT-8 肠癌裸鼠移植性肿瘤的抑制试验

[0339] 选用裸鼠,雌性,18-20g,经正常饲养观察 3 天如无异常,以 50 只常规腋下接种人 HCT-8 肠癌后饲养观察,确认瘤细胞着床增殖且瘤块体积不小于 100mm<sup>3</sup> 时随机分组,8 只 / 组,共 6 组,其中受试药物 4 个给药浓度共四组,溶剂对照一组,阳性对照药 Sutent 一组。即日口服给药,1 次 / 日,共 24 次,化合物 31 的给药剂量为 2.5、5、10 和 20mg/kg 体重。每周 2 次称量动物体重及测量肿瘤体积。给药 20 次后次日处死动物剥取肿瘤称瘤重,按公式: [(对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重] × 100%, 计算各组肿瘤抑制率。实验结果见表 6 和图 2。

[0340] 表 6

分组 <sup>a</sup>	剂量 (mg/kg)	体重 (g)		瘤重 (g)	TGI (%) <sup>b</sup>	P
		起始	结束			
溶剂	-	20.8±1.0	22.1±2.1	4.78±1.99	-	-
Sutent	40	21.5±0.7	22.4±1.1	0.23±0.07	95.3	<0.001
[0341] 化合物 31	20	20.5±1.3	22.5±1.6	0.19±0.06	96.1	<0.001
化合物 31	10	20.7±1.1	23.7±0.8	0.46±0.15	90.3	<0.001
化合物 31	5	21.6±1.4	24.8±1.5	0.78±0.25	83.8	<0.001
化合物 31	2.5	20.3±0.8	24.5±1.1	2.18±1.28	54.5	<0.001

[0342] <sup>a</sup> 每组 8 只裸鼠。<sup>b</sup> 肿瘤生长抑制率。

[0343] 实施例 53

[0344] 化合物 31 对人 SSMC7721 肝癌裸鼠移植性肿瘤的抑制试验

[0345] 选用裸鼠, 雌性, 18-20g, 经正常饲养观察 3 天如无异常, 以 50 只常规腋下接种人 SSMC7721 肝癌后饲养观察, 确认瘤细胞着床增殖且瘤块体积不小于 100mm<sup>3</sup> 时随机分组, 8 只 / 组, 共 6 组, 其中受试药物 4 个给药浓度共四组, 溶剂对照一组, 阳性对照药 Sutent 一组。即日口服给药, 1 次 / 日, 共 24 次, 化合物 31 的给药剂量为 2.5、5、10 和 20mg/kg 体重。每周 2 次称量动物体重及测量肿瘤体积。给药 24 次后次日处死动物剥取肿瘤称瘤重, 按公式: [(对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重] × 100%, 计算各组肿瘤抑制率。实验结果见表 7 和图 3。

[0346] 表 7

分组 <sup>a</sup>	剂量 (mg/kg)	体重 (g)		瘤重 (g)	TGI (%) <sup>b</sup>	P
		起始	结束			
溶剂	-	20.8±0.8	25.1±1.5	3.36±0.41	-	-
Sutent	40	21.0±0.8	24.8±1.2	1.00±0.68	70.3	<0.001
[0347] 化合物 31	20	20.2±1.7	21.0±2.2	0.53±0.28	84.4	<0.001
化合物 31	10	20.4±1.6	23.6±1.5	0.70±0.45	79.2	<0.001
化合物 31	5	20.8±1.2	24.8±1.5	1.16±0.55	65.4	<0.001
化合物 31	2.5	20.1±0.9	23.2±2.1	1.63±0.70	51.7	<0.001

[0348] <sup>a</sup> 每组 8 只裸鼠。<sup>b</sup> 肿瘤生长抑制率。

[0349] 实施例 54

[0350] 化合物 33、34 对人 HCT-8 肠癌裸鼠移植性肿瘤的抑制试验

[0351] 选用裸鼠, 雌性, 18-20g, 经正常饲养观察 3 天如无异常, 以 50 只常规腋下接种人 HCT-8 肠癌后饲养观察, 确认瘤细胞着床增殖且瘤块体积不小于 100mm<sup>3</sup> 时随机分组, 8 只 / 组, 共 6 组, 其中受试药物化合物 33、34 各 2 个给药浓度共四组, 溶剂对照一组, 阳性对照

药 Sutent 一组。即日口服给药,1 次/日,共 20 次。每周 2 次称量动物体重及测量肿瘤体积。给药 20 次后次日处死动物剥取肿瘤称瘤重,按公式:[(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重]×100%,计算各组肿瘤抑制率。实验结果见表 8 和图 4。

[0352] 表 8

分组 <sup>a</sup>	剂量 (mg/kg)	体重 (g)		瘤重 (g)	TGI (%) <sup>b</sup>	P
		起始	结束			
溶剂	-	19.4±1.6	21.2±2.4	4.08±0.95	-	-
Sutent	40	20.6±1.2	22.1±1.5	0.44±0.15	89.1	<0.001
化合物 33	60	19.4±0.8	21.4±1.5	1.98±0.61	51.5	<0.001
化合物 33	30	19.0±1.3	21.1±2.2	2.31±0.43	43.3	<0.001
化合物 34	60	19.6±1.1	21.6±2.3	2.74±0.77	32.7	<0.001
化合物 34	30	19.7±1.2	21.2±1.9	3.95±0.73	3.07	>0.05

[0354] <sup>a</sup> 每组 8 只裸鼠。<sup>b</sup> 肿瘤生长抑制率。

[0355] 实施例 55

[0356] 化合物 33、37 对人 HCT-8 肠癌裸鼠移植性肿瘤的抑制试验

[0357] 选用裸鼠,雌性,18-20g,经正常饲养观察 3 天如无异常,以 50 只常规腋下接种人 HCT-8 肠癌后饲养观察,确认瘤细胞着床增殖且瘤块体积不小于 100mm<sup>3</sup> 时随机分组,8 只/组,共 6 组,其中受试药物化合物 33、37 各 2 个给药浓度共四组,溶剂对照一组,阳性对照药 Sutent 一组。即日口服给药,化合物 33 两个剂量组 2 次/日,间隔 6 小时,其余各组 1 次/日,共 20 天。每周 2 次称量动物体重及测量肿瘤体积。给药 20 天后次日处死动物剥取肿瘤称瘤重,按公式:[(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重]×100%,计算各组肿瘤抑制率。实验结果见表 9 和图 5。

[0358] 表 9

分组 <sup>a</sup>	剂量 (mg/kg)	体重 (g)		瘤重 (g)	TGI (%) <sup>b</sup>	P
		起始	结束			
溶剂	-	21.1±0.7	23.4±1.5	6.13±0.28	-	-
Sutent	40	21.3±0.6	23.7±0.8	0.29±0.08	95.3	<0.001
化合物 33	60×2	20.1±0.9	19.0±1.8	0.45±0.05	92.6	<0.001
化合物 33	30×2	21.1±1.2	22.6±1.6	0.73±0.36	88.1	<0.001
化合物 37	60	20.8±0.8	24.1±2.1	3.36±0.80	45.1	<0.001
化合物 37	30	20.6±0.8	23.6±2.2	3.89±1.19	36.5	<0.001

[0360] <sup>a</sup> 每组 8 只裸鼠。<sup>b</sup> 肿瘤生长抑制率。

[0361] 实施例 56

[0362] 化合物 33、37 对人 SSMC7721 肝癌裸鼠移植性肿瘤的抑制试验

[0363] 选用裸鼠,雌性,18-20g,经正常饲养观察 3 天如无异常,以 50 只常规腋下接种人 SSMC7721 肝癌后饲养观察,确认瘤细胞着床增殖且瘤块体积不小于 100mm<sup>3</sup> 时随机分组,8 只/组,共 6 组,其中受试药物化合物 33、37 各 2 个给药浓度共四组,溶剂对照一组,阳性对照药 Sutent 一组。即日口服给药,1 次/日,共 30 次。每周 2 次称量动物体重及测量肿瘤体积。给药 30 次后次日处死动物剥取肿瘤称瘤重,按公式:[(对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重]×100%,计算各组肿瘤抑制率。实验结果见表 10 和图 6。

[0364] 表 10

分组 <sup>a</sup>	剂量 (mg/kg)	体重 (g)		瘤重 (g)	TGI (%) <sup>b</sup>	P
		起始	结束			
溶剂	-	21.1±0.4	24.5±1.6	2.25±0.85	-	-
Sutent	40	21.2±1.1	24.0±0.6	0.88±0.39	61.1	<0.001
化合物 33	60	21.4±1.3	25.4±2.8	1.48±0.89	34.4	>0.05
化合物 33	30	20.8±0.5	24.0±1.7	1.63±0.47	27.8	>0.05
化合物 37	60	21.4±0.6	24.3±1.1	1.28±0.51	43.3	<0.05
化合物 37	30	20.7±1.2	25.3±0.9	1.45±0.58	35.6	<0.05

[0367] <sup>a</sup> 每组 8 只裸鼠。<sup>b</sup> 肿瘤生长抑制率。

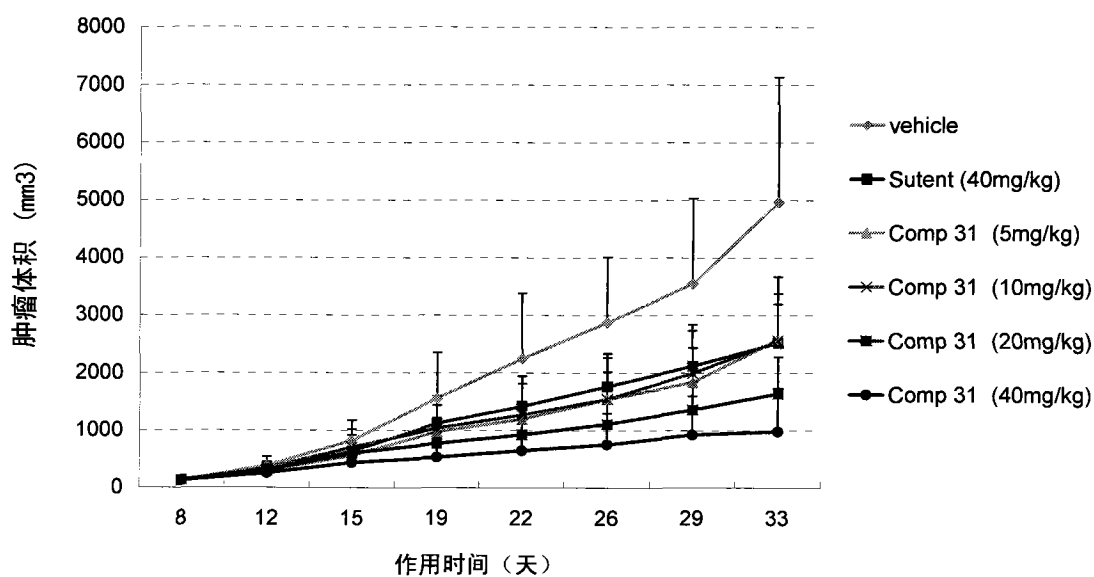


图 1

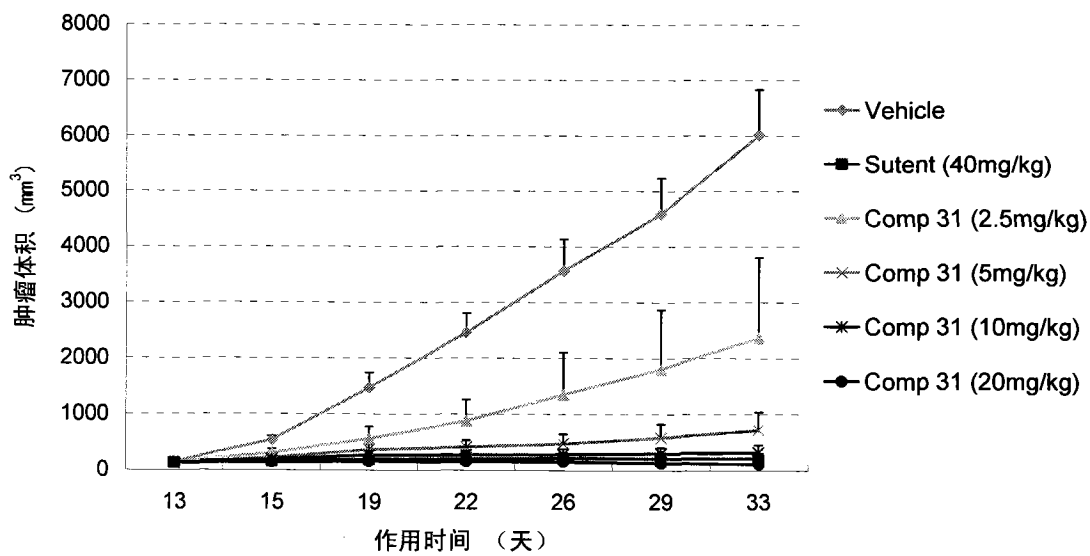


图 2



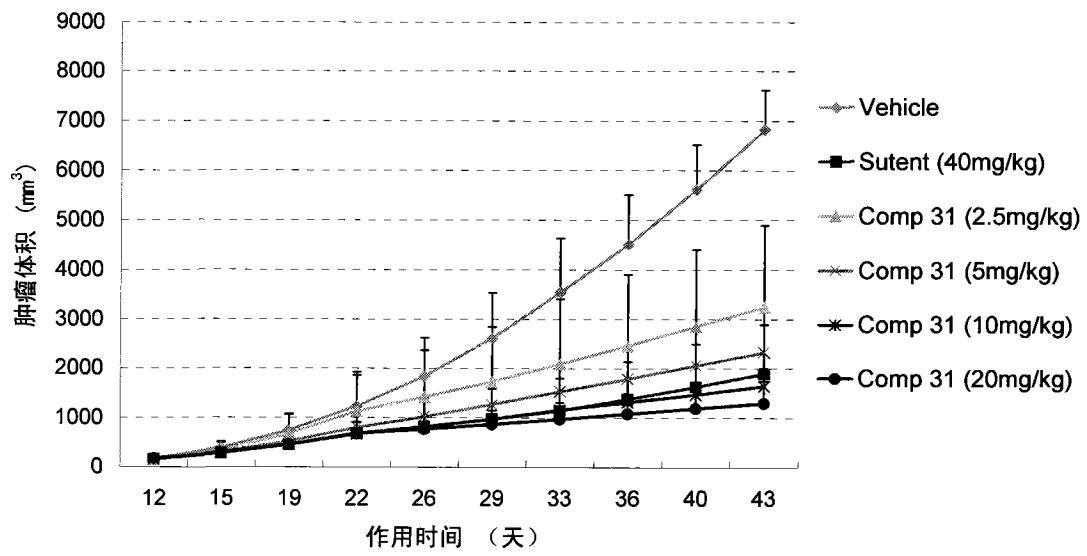


图 3

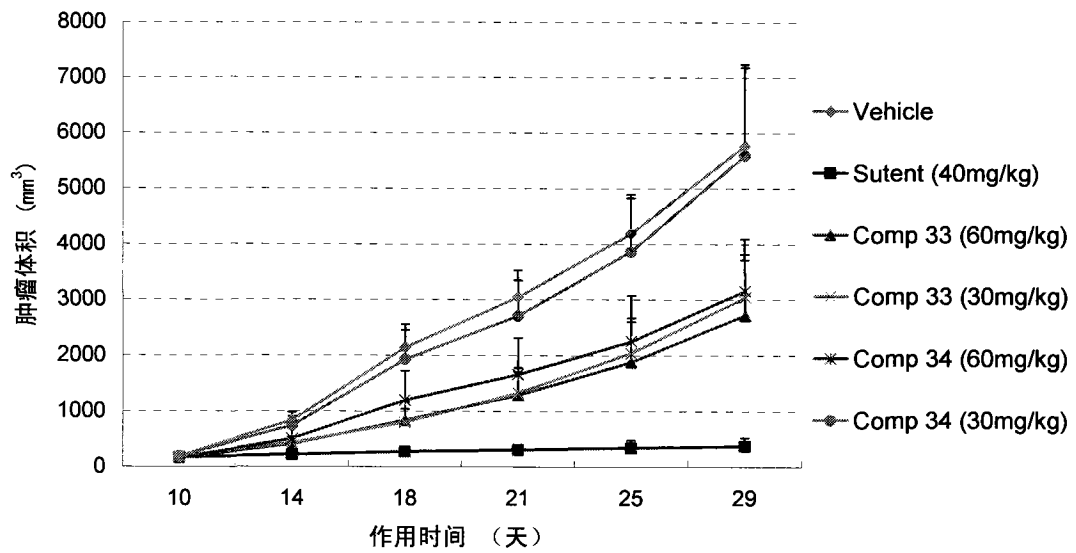


图 4

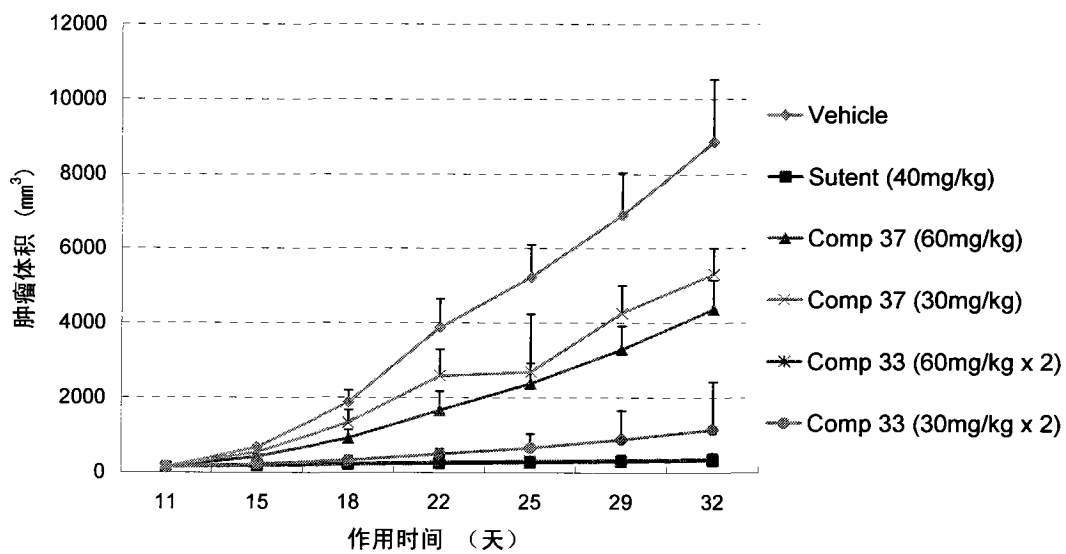


图 5

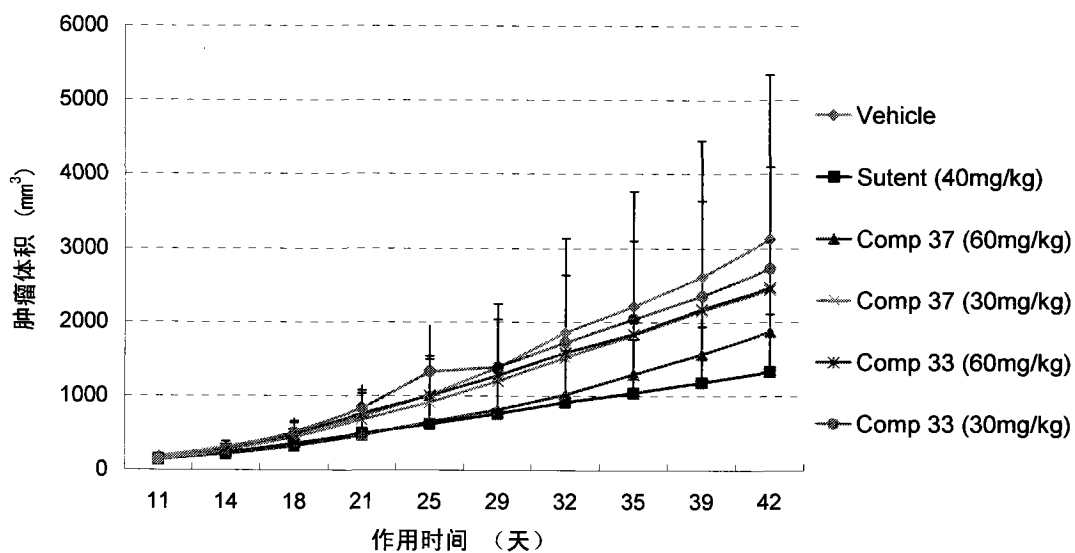


图 6