



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109734700 B

(45) 授权公告日 2021.09.28

(21) 申请号 201910032140.X

C07D 211/58 (2006.01)

(22) 申请日 2019.01.14

A61K 31/454 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 31/4468 (2006.01)

申请公布号 CN 109734700 A

A61K 31/4545 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.05.10

审查员 周静

(73) 专利权人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道639号

(72) 发明人 徐云根 纪德重 张晶晶 朱启华
梁亭亭 柏英 王致斌

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 柏尚春

(51) Int. Cl.

C07D 401/12 (2006.01)

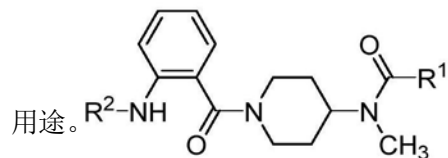
权利要求书1页 说明书25页

(54) 发明名称

含苯甲酰哌啶结构的SMO抑制剂及其制备方法
与用途

(57) 摘要

本发明公开了一种苯甲酰哌啶类衍生物及其制备方法和用途,所述苯甲酰哌啶类衍生物是一类含有N-甲基-N-(1-(2-氨基苯甲酰基)哌啶-4-基)酰胺结构的化合物,其结构如式I所示。本发明还公开了所述苯甲酰哌啶类衍生物的制备方法。本发明还公开了所述苯甲酰哌啶类衍生物在制备SMO蛋白抑制剂中的应用,以及含有这些化合物的药物组合物在制备抗肿瘤药物方面的



I

1. 一种苯甲酰基哌啶类衍生物,其特征在于,为如下所示化合物I-9和I-13:

代号	化学名	结构式
I-9	N-甲基-N-(1-(2-(苯氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	
I-13	N-甲基-N-(1-(2-((2-甲氧基苯基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	

2. 一种药物组合物,其特征在于,其包含权利要求1所述的苯甲酰基哌啶类衍生物或其药学上可接受的盐,和药学上可接受的辅料。

3. 权利要求1所述苯甲酰基哌啶类衍生物或其药学上可接受的盐在制备SMO蛋白抑制剂药物中的用途。

4. 权利要求1所述苯甲酰基哌啶类衍生物或其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的用途,所述肿瘤为髓母细胞瘤。

含苯甲酰哌啶结构的SMO抑制剂及其制备方法与用途

技术领域

[0001] 本发明属于药物化学技术领域,具体涉及一类含有N-甲基-N-(1-(2-氨基苯甲酰基)哌啶-4-基)酰胺结构的SMO蛋白抑制剂,它们的制备方法,以及含有这些化合物的药物组合物及其在制备抗肿瘤药物方面的用途。

技术背景

[0002] 肿瘤是危害人类健康的重大疾病。随着发病率和死亡率的逐年提升,恶性肿瘤已经成为全球首要的死亡原因和重要的公共卫生问题。化学治疗是临床治疗肿瘤的主要手段之一,因此抗肿瘤药物的研究一直是医药行业研究的重点和热点。

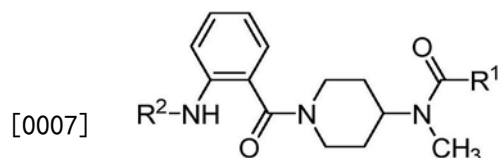
[0003] 干细胞是近年来方兴未艾的生物医学研究新领域,具有重大的临床应用价值。进入21世纪以来,随着肿瘤干细胞理论不断完善,研究者对于肿瘤为何难以彻底治愈有了新的认识。大量证据表明肿瘤组织中存在的肿瘤干细胞对现有的化疗及放疗措施不敏感,且这部分细胞具有重新分化形成肿瘤细胞的能力,因此,靶向杀伤肿瘤干细胞将成为能否彻底治愈癌症的关键因素。

[0004] 鉴于肿瘤干细胞与成体干细胞的基本特性十分相似,那么靶向体细胞发育的关键通路就可以成为杀伤肿瘤干细胞的手段。目前针对与发育相关的通路Notach、Hedgehog和Wnt抑制剂的研究已经取得了一系列成果,其中针对Hedgehog通路中关键蛋白SMO的抑制剂已被FDA批准上市用于治疗基底细胞癌。然而,临床研究发现由于SMO蛋白(D473H)突变,患者对已上市的药物很快产生了耐药性。因此,开发针对SMO突变耐药的第二代SMO抑制剂,给当前研究领域带来了新的机遇与挑战。

发明内容

[0005] 发明目的:本发明提供了一种含有N-甲基-N-(1-(2-氨基苯甲酰基)哌啶-4-基)酰胺结构的苯甲酰基哌啶类衍生物,并提供了该衍生物的具体制备方法和应用于制备SMO蛋白抑制剂的制药应用。

[0006] 技术方案:本发明公开了一种如通式I所示的苯甲酰基哌啶类衍生物,或其药学上可接受的盐:



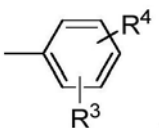
I

[0008] 其中:

[0009] R^1 选自取代或非取代的苯基,其中,取代的苯基是被一个、两个或多个选自如下的取代基取代的苯基:卤素、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CN$ 、C1-C6烷氧基、 $-CHO$ 、 $-CF_3$ 、 $-CONH_2$ 、C1-C6烷酰基、 $-SO_2CH_3$ 、 $-NHCOCH_3$ 、 $-NHCOC_2H_5$ 、 $-CH_2CONH_2$ 或 $-NHCONH_2$;

[0010] R^2 选自取代或非取代的五元或六元芳杂环基,或者取代或非取代的C6-C12芳烃基,其中,取代的五元或六元芳杂环基是被一个、两个或多个选自如下的取代基取代的五元或六元芳杂环基:卤素、C1-C6烷基、-CN、-NH₂、-NHC(O)CH₃、C1-C6烷酰基、C1-C6烷氧基或-COOH;取代的C6-C12芳烃基是被一个、两个或多个选自如下的取代基取代的C6-C12芳烃基:卤素、C1-C6烷基、-CN、-NH₂、-NHC(O)CH₃、C1-C6烷酰基、C1-C6烷氧基或-COOH。

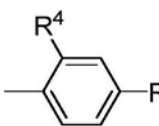
[0011] 作为优选:

[0012] R^1 选自  , 其中 R^3 和 R^4 各自独立选自-H、卤素、-NO₂、-NH₂、-CN、-OCH₃、-

CHO、-CF₃、-CONH₂、-COCH₃、-SO₂CH₃、-NHC(O)CH₃、-NHC(O)CH₂CH₃、-CH₂CONH₂或-NHCONH₂;

[0013] R^2 选自取代或非取代的五元或六元含N芳杂环基,或者取代或非取代的苯基或联苯基,其中,取代的五元或六元含N芳杂环基是被一个、两个或多个选自如下的取代基取代的五元或六元含N芳杂环基:卤素、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CN、-NH₂、-NHC(O)CH₃、-COCH₃、-COCH₂CH₃、-COCH₂CH₂CH₃、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂CH₃或-COOH;取代的苯基或联苯基是被一个、两个或多个选自如下的取代基取代的苯基或联苯基:卤素、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CN、-NH₂、-NHC(O)CH₃、-COCH₃、-COCH₂CH₃、-COCH₂CH₂CH₃、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂CH₃或-COOH。

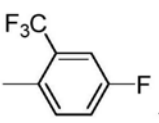
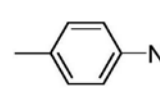
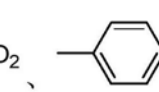
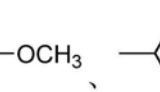
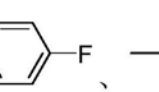
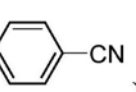
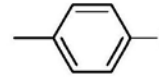
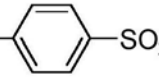
[0014] 进一步优选:

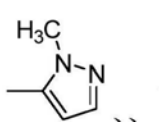
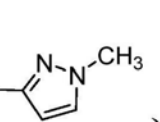
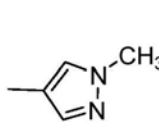
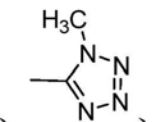
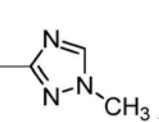
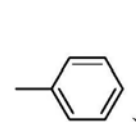
[0015] R^1 选自  , 其中 R^3 选自-H、卤素、-NO₂、-NH₂、-CN、-OCH₃、-CHO、-CF₃、-

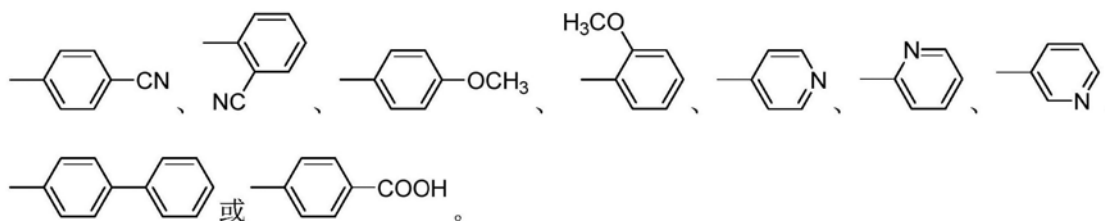
CONH₂、-COCH₃、-SO₂CH₃、-NHC(O)CH₃、-NHC(O)CH₂CH₃、-CH₂CONH₂或-NHCONH₂; R^4 选自-H或-CF₃;

[0016] R^2 选自取代或非取代的五元或六元含N芳杂环基,或者取代或非取代的苯基或联苯基,其中,取代的五元或六元含N芳杂环基是被一个、两个或多个选自如下的取代基取代的五元或六元含N芳杂环基:卤素、-CH₃、-CN、-NH₂、-NHC(O)CH₃、-COCH₃、-OCH₃或-COOH;取代的苯基或联苯基是被一个、两个或多个选自如下的取代基取代的苯基或联苯基:卤素、-CH₃、-CN、-NH₂、-NHC(O)CH₃、-COCH₃、-OCH₃或-COOH。

[0017] 更优选地:

[0018] R^1 选自  ,  ,  ,  ,  ,  ,  或  ;

[0019] R^2 选自  ,  ,  ,  ,  ,  ,



[0020] 以上优选或者进一步优选或者更优选的基团，并不必然代表这些基团同时优选，比如优选中， R^1 可以作为仅有的优选， R^2 可以不优选，当然 R^1 和 R^2 也可以同时优选。

[0021] 术语“芳烃基”指的是芳烃类化合物基团，如苯基，联苯基，萘基，蒽基，菲基等。

[0022] 术语“芳杂环基”指的是含有N、S或O等杂原子的芳杂环类化合物基团，如菲啶基，吡啶基，二苯并咪唑，吡咯基，三唑基，吡啶基，吡嗪基，咪唑基，嘧啶基或喹啉基等。

[0023] 术语“C1-C6烷基”指的是碳原子个数为1至6的直链或支链烷基，如甲基，乙基，丙基，异丙基，正丁基，异丁基，仲丁基，叔丁基等。

[0024] 术语“C1-C6烷酰基”指的是碳原子个数为1至6的直链或支链烷酰基，如C1烷酰基指的是乙酰基，C2烷酰基指的是丙酰基。

[0025] 术语“C1-C6烷氧基”指的是碳原子个数为1至6的直链或支链烷氧基，如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基，正丁氧基，异丁氧基，仲丁氧基，叔丁氧基等。

[0026] 术语“取代”指的是单取代或多取代。

[0027] 优选的，本申请所述苯甲酰哌啶类衍生物选自I-1至I-17：

代号	化学名	结构式
[0028] I-1	N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯	

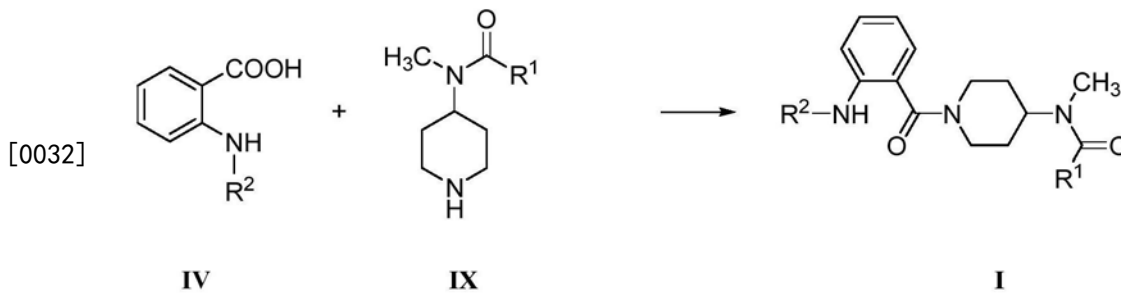
	甲酰胺	
I-2	N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-硝基苯甲酰胺	
I-3	N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-甲氧基苯甲酰胺	
I-4	N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-氟基苯甲酰胺	
I-5	N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-氰基苯甲酰胺	
I-6	N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-三氟甲基苯甲酰胺	
I-7	N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-乙酰基苯甲酰胺	
I-8	N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-甲磺基苯甲酰胺	
I-9	N-甲基-N-(1-(2-(苯氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	

[0029]

I-10	N-甲基-N-(1-(2-((4-氰基)苯氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	
I-11	N-甲基-N-(1-(2-((2-氰基苯基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	
I-12	N-甲基-N-(1-(2-((4-甲氧基苯基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	
I-13	N-甲基-N-(1-(2-((2-甲氧基苯基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	
I-14	N-甲基-N-(1-(2-(吡啶-4-基氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	
I-15	N-甲基-N-(1-(2-(吡啶-2-基氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	
I-16	N-甲基-N-(1-(2-([1,1'-二苯基]-4-基氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	
I-17	N-甲基-N-(1-(2-((4-甲氧基苯基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺	

[0030]

[0031] 所述苯甲酰基哌啶类衍生物的制备方法,包括由化合物IV与IX经缩合反应制备化合物I:

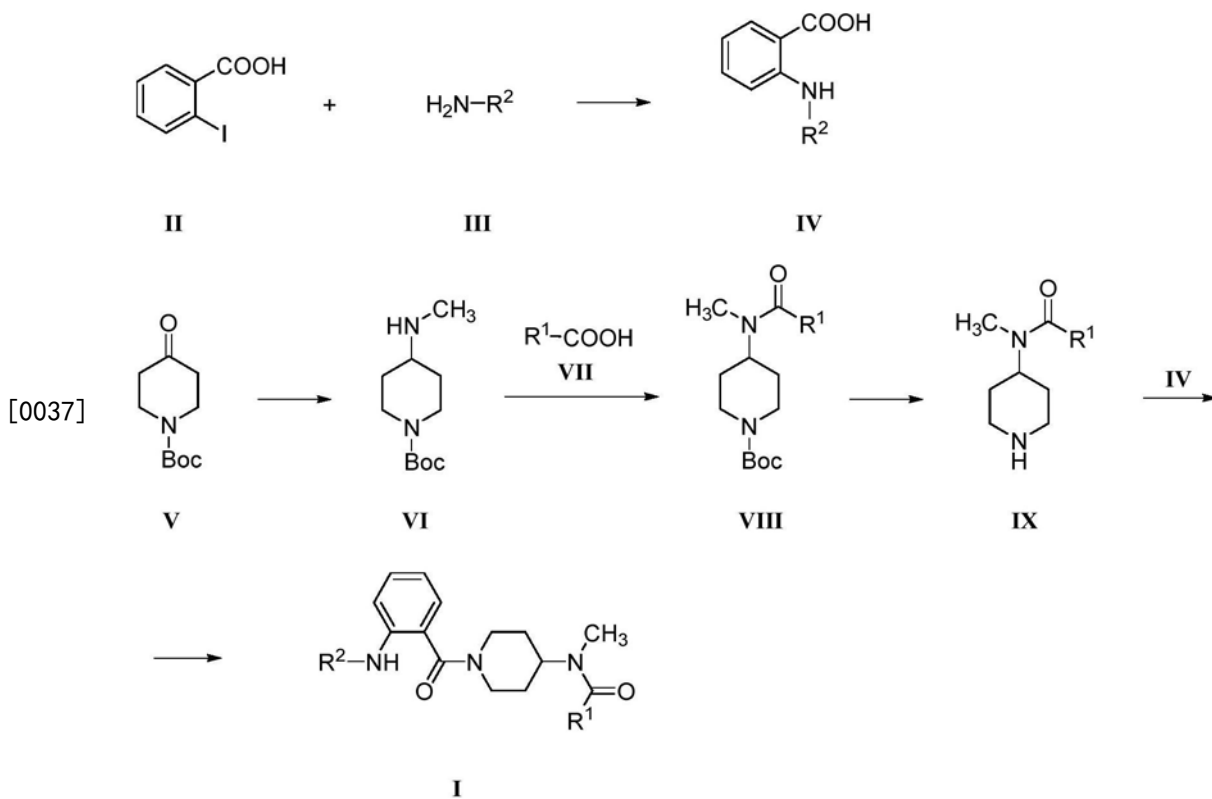


[0033] 优选地,所述苯甲酰基哌啶类衍生物的制备方法,包括以下步骤:

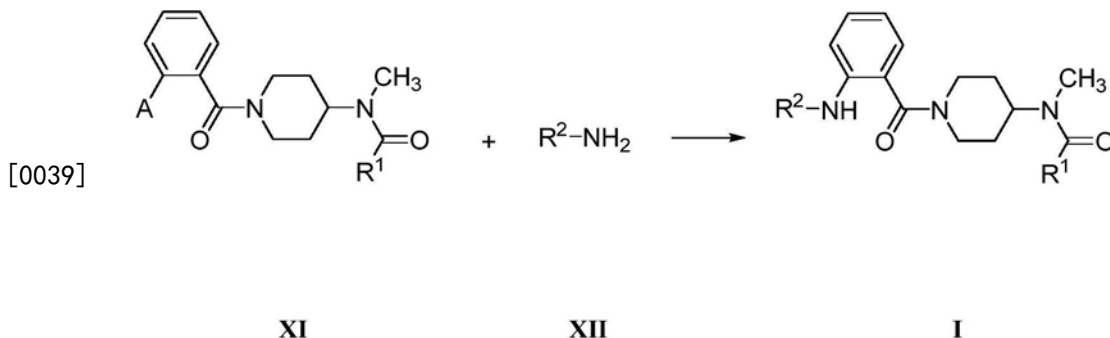
[0034] (1) 化合物II与III经Buchwald-Hartwig反应制备中间体IV;

[0035] (2) 化合物V经还原胺化反应制备VI;再由化合物VI与VII经缩合反应制备化合物VIII;再由化合物VIII脱去保护基制备化合物IX;

[0036] (3) 化合物IX与中间体IV经缩合反应制备化合物I:

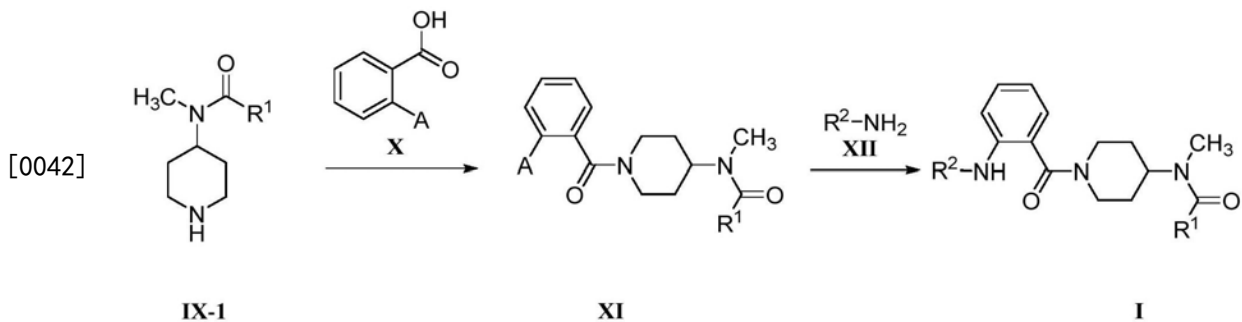


[0038] 或者,所述苯甲酰基哌啶类衍生物的制备方法,包括由化合物XI与XII经Buchwald-Har twig反应制备化合物I:



[0040] 其中,A为卤素。

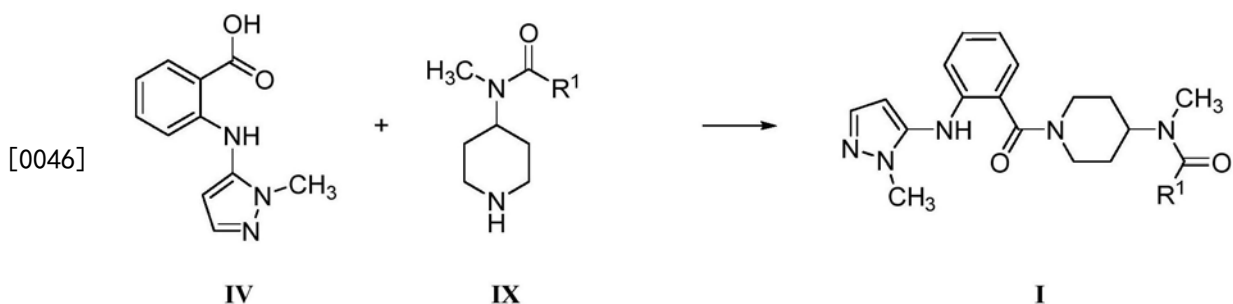
[0041] 优选,包括由化合物IX-1与X经缩合反应制备化合物XI;再由化合物XI与XII经Buchwald-Hartwig反应制备化合物I。

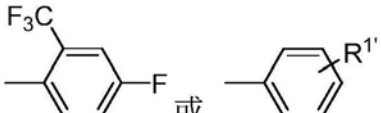


[0043] 其中,A为卤素。

[0044] 例如,可通过下列方法制备:

[0045] 通式I化合物的制备方法一:

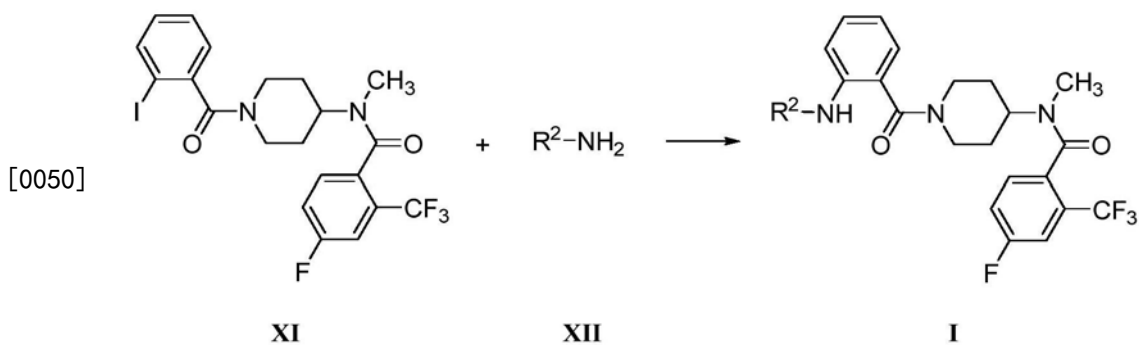


[0047] 其中R¹代表  , 其中R^{1'}代表-NO₂、-OCH₃、-F、-CN、-CF₃、-

COCH₃或-SO₂CH₃。

[0048] 进一步的,由化合物IV与IX经缩合反应制备化合物I的过程:所用缩合剂选自六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI)、二环己基碳二亚胺(DCC)或N,N'-羰基二咪唑(CDI),优选EDCI;所用溶剂选自二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N-二甲基乙酰胺(DMAC)或二甲亚砜(DMSO),优选二氯甲烷;反应温度选自0℃~50℃,优选20℃~30℃;反应时间为4h~48h,优选8h~16h。所述化合物IV:化合物IX:缩合剂(摩尔比)配比为1:1:1~1:10:10,优选1:1:1~1:2:2。

[0049] 通式I化合物的制备方法二:



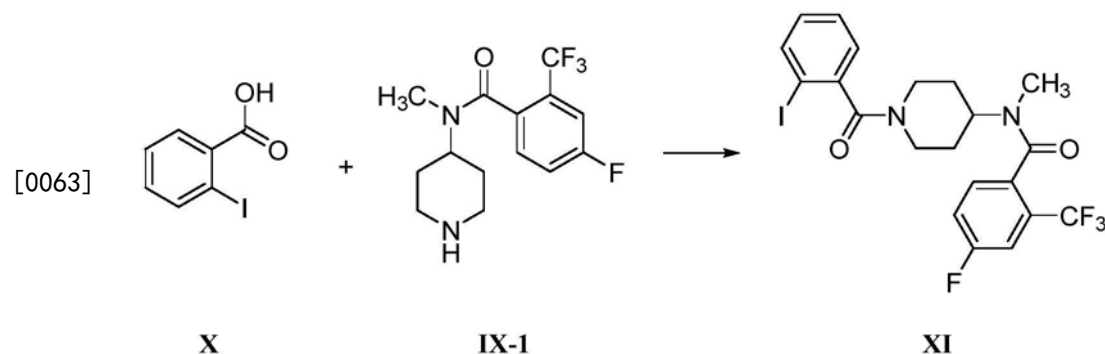
COCH₃或-SO₂CH₃。

[0059] 进一步的,由化合物V经还原胺化反应制备化合物VI的过程:所用还原剂选自硼氢化钠(NaBH₄)、三乙酰氧基硼氢化钠(NaBH(OAc)₃)或氰基硼氢化钠(NaBH₃CN),优选氰基硼氢化钠;所用溶剂选自乙酸乙酯、甲醇、四氢呋喃、氯仿、乙腈、二氯甲烷、甲苯或其中任意两种或三种溶剂的混合溶剂,优选甲醇;反应温度选自0℃~50℃,优选20℃~30℃;反应时间为4h~24h,优选8h~16h。所述化合物V:甲胺:还原剂(摩尔比)配比为1:1:1~1:10:5,优选1:1.5:1.5~1:3:3。

[0060] 由化合物VI与VII经缩合反应制备化合物VIII的过程:所述的化合物VII为2-三氟甲基-4-氟苯甲酸、4-硝基苯甲酸、4-甲氧基苯甲酸、4-氟苯甲酸、4-氰基苯甲酸、4-三氟甲基苯甲酸、4-甲酰基苯甲酸、4-甲砒基苯甲酸;所用氯化试剂选自氯化亚砷(SOCl₂)、三氯氧磷(POCl₃)、五氯化磷(PCl₅)或草酰氯((COCl)₂),优选草酰氯;所用缚酸剂选自三乙胺、N,N-二异丙基乙胺(DIEA)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、吡啶、乙酸钠、碳酸钠或碳酸钾,优选三乙胺;所用溶剂选自甲醇、乙醇、二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃或其中任意两种或三种溶剂的混合溶剂,优选二氯甲烷;反应温度选自0℃~50℃,优选0℃~30℃;反应时间为0.5h~5h,优选1h~2h。所述化合物VI:化合物VII:氯化试剂:缚酸剂(摩尔比)配比为1:1:1:2~5:1:5:10,优选1:1:1:2~2:1:2:4。

[0061] 由化合物VIII脱去保护基制备化合物IX的过程:所用的脱保护试剂选自氯化氢、溴化氢、硫酸或三氟乙酸,优选三氟乙酸;溶剂为甲醇、乙醇、二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃或任意两者的混合溶剂,优选二氯甲烷;反应温度选自0℃~50℃,优选20℃~30℃;反应时间为0.5h~5h,优选1h~2h。

[0062] 本发明通式I化合物制备方法中的关键中间体XI的制备方法,包括:



[0064] 进一步的,由化合物X与IX-1经缩合反应制备化合物XI的过程:所用氯化试剂选自氯化亚砷(SOCl₂)、三氯氧磷(POCl₃)、五氯化磷(PCl₅)或草酰氯((COCl)₂),优选草酰氯;所用缚酸剂选自三乙胺、N,N-二异丙基乙胺(DIEA)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、吡啶、乙酸钠、碳酸钠或碳酸钾,优选三乙胺;所用溶剂选自甲醇、乙醇、二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃或其中任意两种或三种溶剂的混合溶剂,优选二氯甲烷;反应温度选自0℃~50℃,优选0℃~30℃;反应时间为1h~10h,优选3h~6h。所述化合物X:化合物IX-1:氯化试剂:缚酸剂(摩尔比)配比为1:1:1:1~5:1:5:5,优选1:1:1:1~2:1:2:2。

[0065] 本发明还公开了一种药物组合物,其含有上述通式I化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的辅料。所述的化合物可以添加药学上可接受的辅料制成常见的药用制剂,如片剂、胶囊、糖浆、悬浮剂,可以加入香料、甜味剂、液体或固体填料或稀释剂等常用药

用辅料。

[0066] 本发明所述的通式I的苯甲酰哌啶类衍生物或其药学上可接受的盐在制备SMO蛋白抑制剂药物中的应用。

[0067] 本发明所述的通式I的苯甲酰哌啶类衍生物及其立体异构体、水合物、溶剂合物或结晶在制备SMO蛋白抑制剂药物中的应用也在本发明的保护范围内。

[0068] 本发明所述的通式I的苯甲酰哌啶类衍生物或其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用也在本发明的保护范围内。

[0069] 进一步的,其中SMO蛋白抑制剂用于制备治疗恶性肿瘤的药物。

[0070] 有益效果:本发明公开了一种新的通式I所示的苯甲酰哌啶类衍生物,药理实验显示,本发明的化合物I可以对SMO蛋白产生良好的抑制作用,可用于制备治疗Hedgehog通路过度活化的恶性肿瘤的药物;本发明还公开了所述苯甲酰哌啶类衍生物的制备方法。

具体实施方式

[0071] 下面结合具体实施例对本申请作出详细说明。

[0072] 实施例1

[0073] N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺(I-1)的合成

[0074] 2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)-苯甲酸(IV)的合成

[0075] 将邻碘苯甲酸(II)(5.00g,20.00mmol),1-甲基-1H-5-氨基吡唑(III)(1.90g,20.00mmol),碳酸钾(5.50g,40.00mmol)和CuI(0.76g,4.00mmol)溶于DMF(20.00ml),控温在100~105℃搅拌8h。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:1)检测原料II反应完,停止加热,冷却至室温。将反应液倾倒入水(60.00ml)中,搅拌20min后用1.00mol/L HCl调节反应体系pH=5~6,析出褐色固体,抽滤,烘干,得褐色固体3.10g,产率70%,m.p.134~139℃。

[0076] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 10.77-8.78 (m, 2H, NH, ArH), 8.14-7.30 (m, 3H, ArH), 6.89 (s, 1H, ArH), 6.46 (s, 1H, ArH), 3.85 (s, 3H, CH_3) .

[0077] 4-(甲氨基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯(VI)的合成

[0078] 将N-Boc-哌啶-4-酮(V)(1.00g,5.00mmol)和甲胺醇溶液(1.00ml)溶于甲醇中(10.00ml),用醋酸调节pH=5~6,室温搅拌1h。于冰浴下分批加入氰基硼氢化钠(0.48g,7.60mmol),室温反应12h。TLC(二氯甲烷:甲醇=10:1)检测原料V反应完。旋干甲醇,用饱和NaOH溶液调节pH=9,用二氯甲烷(10.00ml x 3)萃取,无水硫酸钠干燥,过滤,旋干溶剂得淡黄色油状物1.00g,产率100%。

[0079] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.98 (d, $J=10.20\text{Hz}$, 2H, Boc- NCH_2), 2.74 (t, $J=12.20\text{Hz}$, 2H, Boc NCH_2), 2.48-2.43 (m, 1H, NHCH), 2.38 (s, 3H, NHCH_3), 1.79 (d, $J=12.20\text{Hz}$, 2H, NHCHCH_2), 1.39 (s, 9H, Boc-H), 1.17 (dd, $J=20.20, 10.20\text{Hz}$, 2H, NHCHCH_2) .

[0080] 4-(4-氟-N-甲基-2-(三氟甲基)苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯(VIII-1)的合成

[0081] 将2-三氟甲基-4-氟苯甲酸(VII-1)(3.00g,14.40mmol)溶于二氯甲烷(5.00ml),加入2滴DMF后冷却至0℃,滴入草酰氯(1.50ml,17.30mmol),移置室温搅拌30min,旋干二氯甲烷得到酰氯备用。

[0082] 将N-Boc-4-甲氨基哌啶(VI) (3.70g, 17.30mmol) 溶于二氯甲烷(20.00ml)中,加入三乙胺(3.00ml, 21.60mmol),冷却至0℃,滴入酰氯的二氯甲烷溶液后移置室温搅拌1h。TLC(石油醚:乙酸乙酯=3:1)检测反应完。分别用1.00mol/L HCl,饱和碳酸氢钠水溶液,饱和食盐水洗涤反应液,无水硫酸钠干燥,经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=6:1)分离,得无色油状物5.33g,产率91.30%。

[0083] Major rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.44-7.39 (m, 1H, ArH), 7.32-7.29 (m, 2H, ArH), 4.73 (m, 1H, CH₃NCH), 4.25 (m, 2H, BocNCH₂), 2.88-2.82 (m, 2H, BocNCH₂), 2.63 (s, 3H, NCH₃), 1.79-1.63 (m, 4H, CH₃N(CH₂)₂), 1.46 (s, 9H, Boc-H)。

[0084] Minor rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.44-7.39 (m, 1H, ArH), 7.32-7.29 (m, 2H, ArH), 4.15-4.11 (m, 2H, BocNCH₂), 3.23 (s, 1H, CH₃NCH), 2.98 (s, 3H, NCH₃), 2.51-2.35 (m, 2H, BocNCH₂), 1.79-1.63 (m, 4H, CH₃N(CH₂)₂), 1.43 (s, 9H, Boc-H)。

[0085] 4-氟-N-甲基-N-(哌啶-4-基)-2-三氟甲基苯甲酰胺(IX-1)的合成

[0086] 将化合物VIII-1(4.33g, 10.70mmol)溶于二氯甲烷(20.00ml),室温下加入三氟乙酸(5.00ml),室温搅拌1h。TLC(二氯甲烷:甲醇=10:1)检测原料已反应完,旋干溶剂,加入水(15.00ml),用饱和NaOH溶液调节pH=9,用二氯甲烷(15.00ml x 3)萃取,无水硫酸钠干燥,旋干得淡黄油状物3.20g,产率98%。

[0087] Major rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.46-7.41 (m, 1H, ArH), 7.33-7.30 (m, 2H, ArH), 5.66 (br, 1H, NH), 4.78 (m, 1H, CH₃NCH), 3.44-3.40 (m, 2H, HNCH₂), 2.98-2.90 (m, 2H, BocNCH₂), 2.68 (s, 3H, NCH₃), 2.09-1.58 (m, 4H, CH₃N(CH₂)₂)。

[0088] Minor rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.46-7.41 (m, 1H, ArH), 7.33-7.30 (m, 2H, ArH), 5.66 (brs, 1H, NH), 3.27-3.13 (m, 3H, CH₃NCHCH₂CH₂NH), 3.02 (s, 3H, NCH₃), 2.51-2.37 (m, 2H, BocNCH₂), 2.09-1.58 (m, 4H, CH₃N(CH₂)₂)。

[0089] N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺(I-1)的合成

[0090] 将中间体IV(500.00mg, 2.30mmol)和中间体IX-1(699.00mg, 2.30mmol)溶于二氯甲烷(20.00ml),加入HOBt(372.00mg, 2.76mmol),再分批加入EDCI(530.00mg, 2.76mmol),室温搅拌12h。TLC(二氯甲烷:甲醇=25:1)检测原料IX-1反应完,停止反应,依次用1.00mol/L HCl(10.00ml x 2)、饱和碳酸氢钠(10.00ml x 2)、饱和食盐水(10.00ml x 2)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩至干,残留物经柱层析(二氯甲烷:甲醇=200:1~100:1)分离,得到墨绿色固体0.74g,收率64.00%, m.p. 206~207℃。

[0091] Major rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.47-7.41 (m, 2H, ArH), 7.34-7.29 (m, 3H, ArH), 7.27-7.12 (m, 2H, ArH, NH), 6.91-6.75 (m, 2H, ArH), 6.06 (s, 1H, ArH), 5.00-4.81 (m, 1H, CH₃NCH), 4.80-4.12 (m, 2H, CON(CH₂)₂), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.29-3.03 (m, 2H, CON(CH₂)₂), 2.67 (s, 3H, CH₃), 1.84 (m, 4H, NCH(CH₂)₂)。

[0092] Minor rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.47-7.41 (m, 2H, ArH), 7.34-7.29 (m, 3H, ArH), 7.27-7.12 (m, 2H, ArH), 6.91-6.75 (m, 2H, ArH), 6.06 (s, 1H, ArH), 4.80-4.12 (m, 2H, CON(CH₂)₂), 3.70 (s, 3H, CH₃), 3.43-3.60 (m, 1H, CH₃NCH), 3.02 (s, 3H, CH₃), 2.64-2.55 (m, 2H, CON(CH₂)₂), 1.84 (m, 4H, NCH(CH₂)₂)。

[0093] Major rotamer:¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.54, 167.52, 161.65 (d, J=

251.50Hz), 143.59, 138.09, 130.89, 128.91, 128.80, 128.50, 128.40, 127.68, 122.30 (q, $J=276.20\text{Hz}$), 119.18, 118.65 (d, $J=36.10\text{Hz}$), 118.47, 114.64, 113.95 (ddd, $J=25.30, 9.20, 4.70\text{Hz}$), 98.11, 50.54, 34.46, 31.11, 28.64, 27.95.

[0094] Minor rotamer: ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169.54, 167.52, 161.65 (d, $J=251.50\text{Hz}$), 143.59, 138.09, 131.02, 128.91, 128.80, 128.50, 128.40, 127.54, 122.30 (q, $J=276.20\text{Hz}$), 119.18, 118.65 (d, $J=36.10\text{Hz}$), 118.47, 114.64, 113.95 (ddd, $J=25.30, 9.20, 4.70\text{Hz}$), 98.25, 56.13, 34.46, 29.41, 28.99, 27.02.

[0095] HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{F}_4\text{N}_5\text{O}_2$: 504.2023; found 504.2008.

[0096] IR (cm^{-1}): 3345.86, 1630.91, 1589.00, 1559.42, 1503.80, 1467.52, 1445.43, 1422.09, 1367.50, 1330.25, 1319.31, 1271.16, 1210.59, 1171.33, 1074.76, 1040.48, 1008.04, 904.29, 859.78, 760.33, 659.16, 606.26.

[0097] 实施例2

[0098] N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-硝基苯甲酰胺 (I-2) 的合成

[0099] 4-(N-甲基-4-硝基苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (VIII-2) 的合成

[0100] 以4-硝基苯甲酸 (VII-2) (2.40g, 14.40mmol) 为原料, 操作同VIII-1, 经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=6:1) 分离, 得淡黄色固体4.30g, 产率:82%, m.p. 152~153°C.

[0101] ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.31 (d, $J=7.90\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.58 (d, $J=7.20\text{Hz}$, 2H, ArH), 4.72 (s, 1H, CONCH), 4.26 (brs, 2H, CONCHCH₂), 3.01 (brs, 2H, CONCHCH₂), 1.77 (s, 3H, CONCH₃), 1.49 (brs, 4H, BocN(CH₂)₂), 1.49 (s, 9H, Boc-H).

[0102] N-甲基-4-硝基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺 (IX-2) 的合成

[0103] 以VIII-2 (4.89g, 10.70mmol) 为原料, 操作同IX-1, 得淡黄色油状物2.70g, 产率:97%。N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-硝基苯甲酰胺 (I-2) 的合成

[0104] 以IV (500.00mg, 2.30mmol), IX-2 (605.00mg, 2.30mmol) 为原料, 操作同I-1, 经柱层析(二氯甲烷:甲醇=200:1~100:1) 分离, 得淡黄色固体659.00mg, 产率:62%, m.p. 91~92°C.

[0105] ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.31 (d, $J=8.40\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.58 (d, $J=8.40\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.47 (s, 1H, ArH), 7.30-7.16 (m, 3H, ArH, NH), 6.90-6.81 (m, 2H, ArH), 6.04 (s, 1H, ArH), 4.85 (s, 1H, CH₃NCH), 4.69-4.30 (m, 2H, CONCH₂), 3.73 (s, 3H, CH₃), 3.14-3.01 (m, 2H, CONCH₂), 2.84 (s, 3H, CH₃), 1.89-1.74 (m, 4H, CONCH(CH₂)₂).

[0106] ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.06, 169.34, 148.38, 144.18, 142.61, 138.58, 131.44, 128.11, 127.87, 127.74, 127.67, 123.95, 118.91, 115.14, 98.42, 51.62, 34.94, 32.08, 29.97, 29.02.

[0107] HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_4$: 463.2094; found 463.2081.

[0108] IR (cm^{-1}): 3243.39, 2934.42, 1625.07, 1557.39, 1522.37, 1445.61, 1351.24, 1328.59, 1274.16, 1070.27, 1016.01, 924.94, 856.70, 759.52, 698.26.

[0109] 实施例3

[0110] N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-甲氧基

苯甲酰胺 (I-3) 的合成

[0111] 4-(4-甲氧基-N-甲基苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (VIII-3) 的合成

[0112] 以4-甲氧基苯甲酸 (VII-3) (2.20g, 14.40mmol) 为原料, 操作同VIII-1, 经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=6:1) 分离, 得白色固体4.40g, 产率: 88%, m.p. 116~117°C.

[0113] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.39 (d, $J=8.50\text{Hz}$, 2H, ArH), 6.94 (d, $J=8.60\text{Hz}$, 2H, ArH), 4.62 (brs, 1H, CONCH), 4.25-4.21 (m, 2H, CONCH CH_2), 3.87 (s, 3H, OCH $_3$), 2.91 (s, 3H, NCH $_3$), 2.77 (brs, 1H, ONCH CH_2), 1.73 (brs, 4H, BocN(CH $_2$) $_2$), 1.51 (s, 9H, Boc-H).

[0114] 4-甲氧基-N-甲基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺 (IX-3) 的合成

[0115] 以VIII-3 (3.70g, 10.70mmol) 为原料, 操作同IX-1, 得无色油状物2.56g, 产率: 96.30%。N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡啶-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)4-甲氧基苯甲酰胺 (I-3) 的合成

[0116] 以IV (500.00mg, 2.30mmol), IX-3 (570.00mg, 2.30mmol) 为原料, 操作同I-1, 经柱层析 (二氯甲烷: 甲醇=200:1~100:1) 分离, 得淡黄色固体740.00mg, 产率: 72%, m.p. 162~163°C.

[0117] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.47 (d, $J=1.80\text{Hz}$, 1H, ArH), 7.38 (d, $J=8.70\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.29 (s, 1H, NH), 7.24-7.21 (m, 2H, ArH), 6.94 (d, $J=8.70\text{Hz}$, 2H, ArH), 6.87 (t, $J=7.40\text{Hz}$, 1H, ArH), 6.81 (d, $J=8.20\text{Hz}$, 1H, ArH), 6.05 (d, $J=1.70\text{Hz}$, 1H, ArH), 4.76-4.32 (m, 3H, NCH $_3$ CH, CON(CH $_2$) $_2$), 3.86 (s, 3H, OCH $_3$), 3.73 (s, 3H, CH $_3$), 3.16-2.96 (m, 2H, CON(CH $_2$) $_2$), 2.91 (s, 3H, CH $_3$), 1.93-1.74 (m, 4H, NCH $_3$ CH(CH $_2$) $_2$).

[0118] $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.63, 169.97, 160.73, 144.08, 139.87, 138.59, 131.30, 128.94, 128.68, 128.11, 119.88, 118.90, 115.04, 113.78, 98.49, 55.33, 50.97, 34.95, 29.74, 29.43, 27.61.

[0119] HRMS (ESI): m/z [M+H] $^+$. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_3$: 448.2349; found 448.2338.

[0120] IR (cm^{-1}): 3469.03, 3242.52, 2959.32, 2926.25, 1618.90, 1589.14, 1562.60, 1512.59, 1442.84, 1429.01, 1362.50, 1325.73, 1303.34, 1255.14, 1168.93, 1068.02, 1031.51, 1007.47, 926.08, 846.61, 762.88, 593.99.

[0121] 实施例4

[0122] N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡啶-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-氟基苯甲酰胺 (I-4) 的合成

[0123] 4-(4-氟-N-甲基苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (VIII-4) 的合成

[0124] 以4-氟苯甲酸 (VII-4) (2.00g, 14.40mmol) 为原料, 操作同VIII-1, 经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=6:1) 分离, 得淡黄色油状物3.68g, 产率: 76%.

[0125] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.53-7.34 (m, 2H, ArH), 7.15-7.08 (m, 2H, ArH), 4.67 (s, 1H, CONCH), 4.23 (s, 2H, CONCH CH_2), 3.27-3.00 (m, 2H, CONCH CH_2), 2.88 (s, 3H, NCH $_3$), 1.72 (brs, 4H, ONCH CH_2), 1.49 (s, 9H, Boc-H).

[0126] 4-氟-N-甲基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺 (IX-4) 的合成

[0127] 以VIII-4 (3.60g, 10.70mmol) 为原料, 操作同IX-1, 得淡黄色油状物2.47g, 产率: 98%。N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡啶-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-氟基苯甲酰胺 (I-4) 的合成

[0128] 以IV (500.00mg, 2.30mmol), IX-4 (543.00mg, 2.30mmol) 为原料, 操作同I-1, 经柱层析(二氯甲烷:甲醇=200:1~100:1) 分离, 得灰色固体, 产率:58%, m.p.87~88°C。

[0129] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.47-7.42 (m, 3H, ArH), 7.28-7.20 (m, 3H, ArH, NH), 7.15-7.09 (m, 2H, ArH), 6.89-6.80 (m, 2H, ArH), 6.04 (s, 1H, ArH), 5.02-4.60 (m, 1H, CH_3NCH), 4.60-4.20 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.72 (s, 3H, CH_3), 3.23-2.97 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.89 (s, 3H, CH_3), 1.92-1.80 (m, 4H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$) .

[0130] $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.75, 170.01, 163.34 (d, $J=250.20\text{Hz}$), 144.12, 139.86, 138.57, 132.59, 131.35, 129.00, 128.11, 119.73, 118.91, 115.63 (d, $J=21.70\text{Hz}$), 115.09, 98.46, 45.05, 34.94, 29.66, 29.36, 28.83.

[0131] HRMS (ESI): m/z [M+H] $^+$. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{FN}_5\text{O}_2$: 436.2149; found 436.2141.

[0132] IR (cm^{-1}): 3522.58, 3271.66, 2939.39, 2859.62, 1624.01, 1557.39, 1445.79, 1368.77, 1325.66, 1274.19, 1222.40, 1158.03, 1065.48, 1005.75, 926.05, 894.43, 848.71, 760.00, 729.00, 583.85.

[0133] 实施例5

[0134] N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-氰基苯甲酰胺(I-5)的合成

[0135] 4-(4-氰基-N-甲基苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯(VIII-5)的合成

[0136] 以4-氰基苯甲酸(VII-5) (2.10g, 14.4mmol) 为原料, 操作同VIII-1, 经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=6:1) 分离, 得白色固体3.50g, 产率:71%, m.p.120~121°C。

[0137] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.76 (d, $J=8.00\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.51 (d, $J=7.30\text{Hz}$, 2H, ArH), 4.71 (s, 1H, CONCH), 4.27 (brs, 2H, CONCHCH_2), 3.00-2.89 (m, 1H, CONCHCH_2), 2.81 (s, 3H, NCH_3), 2.51 (s, 1H, CONCHCH_2), 1.77-1.71 (m, 4H, $\text{BocN}(\text{CH}_2)_2$), 1.50 (s, 9H, Boc-H) .

[0138] 4-氰基-N-甲基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺(IX-5)的合成

[0139] 以VIII-5 (3.67g, 10.70mmol) 为原料, 操作同IX-1, 得无色油状物2.40g, 产率:92%。N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-氰基苯甲酰胺(I-5)的合成

[0140] 以IV (500.00mg, 2.30mmol), IX-5 (559.00mg, 2.30mmol) 为原料, 操作同I-1, 经柱层析(二氯甲烷:甲醇=200:1~100:1) 分离, 得黄绿色固体559.00mg, 产率:55%, m.p.204~205°C。

[0141] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.74 (d, $J=7.50\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.61-7.35 (m, 3H, ArH), 7.29-7.20 (m, 3H, ArH, NH), 6.9-6.81 (m, 2H, ArH), 6.04 (s, 1H, ArH), 4.92-4.72 (m, 1H, CH_3NCH), 4.69-4.24 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.72 (s, 3H, CH_3), 3.22-2.97 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.83 (s, 3H, CH_3), 1.98-1.81 (m, 4H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$) .

[0142] $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.04, 169.58, 144.17, 140.84, 139.84, 138.58, 132.49, 131.42, 128.11, 127.57, 127.48, 118.91, 117.94, 115.13, 113.58, 98.43, 51.55, 34.94, 32.14, 29.04, 27.93.

[0143] HRMS (ESI): m/z [M+H] $^+$. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_2$: 443.2195; found 443.2185.

[0144] IR (cm^{-1}): 3294.45, 2938.25, 2868.83, 2230.93, 1504.66, 1586.66, 1556.58, 1447.14, 1368.27, 1329.95, 1203.61, 1069.66, 1021.24, 856.78, 757.43, 656.91, 558.69.

[0145] 实施例6

[0146] N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-三氟甲基苯甲酰胺(I-6)的合成

[0147] 4-(N-甲基-4-(三氟甲基)苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯(VIII-6)的合成

[0148] 以4-三氟甲基苯甲酸(VII-6)(2.70g,14.40mmol)为原料,操作同VIII-1,经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=6:1)分离,得白色固体3.89g,产率:70%,m.p.122~123°C。

[0149] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.71 (d, $J=8.00\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.52 (d, $J=7.60\text{Hz}$, 2H, ArH), 4.73 (s, 1H, CONCH), 4.27 (s, 2H, CONCHCH₂), 3.00 (s, 1H, CONCHCH₂), 2.81 (s, 3H, NCH₃), 2.52 (s, 1H, CONCHCH₂), 1.77 (brs, 4H, BocN(CH₂)₂), 1.49 (s, 9H, Boc-H)。

[0150] 4-三氟甲基-N-甲基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺(IX-6)的合成

[0151] 以VIII-6(4.10g,10.70mmol)为原料,操作同IX-1,得无色油状物2.88g,产率:94%。N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-三氟甲基苯甲酰胺(I-6)的合成

[0152] 以IV(500.00mg,2.30mmol),IX-6(658.00mg,2.30mmol)为原料,操作同I-1,经柱层析(二氯甲烷:甲醇=200:1~100:1)分离,得黄绿色固体703.00mg,产率:63%,m.p.187~188°C。

[0153] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.70 (d, $J=7.40\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.60-7.38 (m, 3H, ArH), 7.35-7.20 (m, 3H, ArH, NH), 6.89-6.80 (m, 2H, ArH), 6.04 (s, 1H, ArH), 5.04-4.74 (m, 1H, CH₃NCH), 4.72-4.26 (m, 2H, CON(CH₂)₂), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.30-3.02 (m, 2H, CON(CH₂)₂), 2.85 (s, 3H, CH₃), 2.06-1.82 (m, 4H, CH(CH₂)₂)。

[0154] $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.68, 170.02, 144.14, 140.08, 139.85, 138.57, 131.39, 128.10, 127.19, 126.98, 125.69, 121.35 (q, $J=271.20\text{Hz}$), 119.55, 118.90, 115.10, 98.45, 51.34, 34.93, 32.05, 30.03, 29.14。

[0155] HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺. Calcd for C₂₅H₂₇F₃N₅O₂: 486.2117; found 486.2101。

[0156] IR (cm⁻¹): 3326.03, 2940.53, 1624.30, 1582.28, 1556.33, 1446.57, 1369.62, 1325.64, 1276.02, 1170.31, 1123.75, 1071.10, 1016.11, 925.88, 854.57, 757.17, 663.81。

[0157] 实施例7

[0158] N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-乙酰基苯甲酰胺(I-7)的合成

[0159] 4-(4-乙酰基-N-甲基苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯(VIII-7)的合成

[0160] 以4-乙酰基苯甲酸(VII-7)(2.40g,14.40mmol)为原料,操作同VIII-1,经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=6:1)分离,得淡黄色固体2.70g,产率:52%,m.p.101~102°C。

[0161] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.02 (d, $J=8.10\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.48 (d, $J=7.60\text{Hz}$, 2H, ArH), 4.72 (s, 1H, CONCH), 4.25 (brs, 2H, CONCHCH₂), 2.94-2.89 (m, 1H, CONCHCH₂), 2.80 (s, 3H, NCH₃), 2.64 (s, 3H, COCH₃), 2.50-2.43 (m, 1H, CONCHCH₂), 1.76 (brs, 4H, BocN(CH₂)₂), 1.48 (s, 9H, Boc-H)。

[0162] 4-乙酰基-N-甲基-N-(哌啶-4-基)-苯甲酰胺(IX-7)的合成

[0163] 以VIII-7(3.85g,10.70mmol)为原料,操作同IX-1,得淡黄色油状物2.58g,产率:93%。N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-乙酰基苯

甲酰胺 (I-7) 的合成

[0164] 以 IV (500.00mg, 2.30mmol), IX-7 (598.00mg, 2.30mmol) 为原料, 操作同 I-1, 经柱层析 (二氯甲烷: 甲醇 = 200:1 ~ 100:1) 分离, 得褐色固体 538.00mg, 产率: 51%, m.p. 177 ~ 178°C。

[0165] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.02 (d, $J=8.00\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.50-7.40 (m, 3H, ArH), 7.40-7.13 (m, 3H, ArH, NH), 6.89-6.80 (m, 2H, ArH), 6.04 (s, 1H, ArH), 5.03-4.72 (m, 1H, CH_3NCH), 4.69-4.28 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.72 (s, 3H, CH_3), 3.30-3.02 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.84 (s, 3H, CH_3), 2.64 (s, 3H, COCH_3), 2.03-1.70 (m, 4H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$) .

[0166] $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.63, 170.56, 170.01, 144.15, 140.92, 139.85, 138.58, 137.82, 131.38, 128.58, 128.10, 127.00, 126.77, 118.90, 115.10, 98.48, 51.36, 34.94, 32.04, 29.67, 29.19, 26.62.

[0167] HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_3$: 460.2349; found 460.2338.

[0168] IR (cm^{-1}): 3327.23, 2944.82, 2865.06, 1683.88, 1616.87, 1556.60, 1504.68, 1468.81, 1366.06, 1327.17, 1265.23, 1079.76, 1065.61, 1013.66, 863.06, 851.80, 757.45, 602.99.

[0169] 实施例 8

[0170] N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-甲砒基苯甲酰胺 (I-8) 的合成

[0171] 4-(N-甲基-4-(甲磺酰基)苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (VIII-8) 的合成

[0172] 以 4-甲砒基苯甲酸 (VII-8) (3.10g, 14.40mmol) 为原料, 操作同 VIII-1, 经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 3:1) 分离, 得白色固体 3.90g, 产率: 69%, m.p. 196 ~ 197°C。

[0173] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.01 (d, $J=8.10\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.57 (d, $J=7.40\text{Hz}$, 2H, ArH), 4.69 (m, 1H, CONCH), 4.44-4.00 (m, 2H, CONCHCH_2), 3.07 (s, 3H, SO_2CH_3), 3.03-2.81 (m, 2H, CONCHCH_2), 2.77 (s, 3H, NCH_3), 1.85-1.60 (m, 4H, $\text{BocN}(\text{CH}_2)_2$), 1.46 (s, 9H, Boc-H) .

[0174] 4-甲砒基-N-甲基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺 (IX-8) 的合成

[0175] 以 VIII-8 (4.20g, 10.70mmol) 为原料, 操作同 IX-1, 得无色油状物 3.00g, 产率: 96%。N-甲基-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-4-甲砒基苯甲酰胺 (I-8) 的合成

[0176] 以 IV (500.00mg, 2.30mmol), IX-8 (681.00mg, 2.30mmol) 为原料, 操作同 I-1, 经柱层析 (二氯甲烷: 甲醇 = 150:1) 分离, 得深绿色固体 831.00mg, 产率: 73%, m.p. 107 ~ 108°C。

[0177] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.03 (d, $J=7.70\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.59 (d, $J=7.80\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.47 (s, 1H, NH), 7.32-7.23 (m, 3H, ArH), 6.89-6.80 (m, 2H, ArH), 6.04 (s, 1H, ArH), 4.99-4.81 (m, 1H, CH_3NCH), 4.68-4.23 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.72 (s, 3H, SO_2CH_3), 3.23-2.95 (m, 5H, CONCH_3 , $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.83 (s, 3H, CH_3), 2.06-1.62 (m, 4H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$) .

[0178] $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.03, 169.66, 144.11, 141.92, 141.59, 139.90, 138.53, 131.43, 128.13, 128.01, 127.88, 127.76, 118.96, 115.16, 98.40, 51.53, 44.39, 34.94, 32.21, 29.67, 29.02.

[0179] HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$: 496.2019; found 496.2004.

[0180] IR (cm^{-1}): 3457.23, 3343.06, 2927.76, 1624.62, 1586.54, 1556.50, 1446.95,

1428.07, 1369.76, 1326.92, 1312.89, 1277.30, 1152.58, 1065.37, 1006.97, 957.64, 853.66, 785.69, 752.34, 682.56, 553.70.

[0181] 实施例9

[0182] N-甲基-N-(1-(2-(苯氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺(I-9)的合成

[0183] 将化合物X(2.00g, 8.00mmol)溶于二氯甲烷(10.00ml), 加入2滴DMF后冷却至0℃, 滴入草酰氯(0.80ml, 9.60mmol), 移置室温搅拌30min, 旋干二氯甲烷得到酰氯备用。

[0184] 将IX-1(2.40g, 8.00mmol)溶于二氯甲烷(20ml)中, 加入三乙胺(1.70ml, 12.00mmol), 冷却至0℃, 滴入酰氯的二氯甲烷溶液后移置室温搅拌5h。TLC(石油醚:乙酸乙酯=3:1)检测反应完。分别用1NHCl, 饱和碳酸氢钠水溶液, 饱和食盐水洗涤反应液, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干溶剂, 经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=8:1)分离, 得淡黄色固体3.70g, 产率86%, m.p. 85~86℃。

[0185] Major rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.91-7.81 (m, 1H, ArH), 7.45-7.36 (m, 2H, ArH), 7.36-7.28 (m, 2H, ArH), 7.24-7.17 (m, 1H, ArH), 7.14-7.02 (m, 1H, ArH), 5.00-4.75 (m, 1H, CH_3NCH), 4.23 (brs, 2H, NCHCH_2), 3.07 (br, 2H, NCHCH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.75 (m, 4H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$).

[0186] Minor rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.91-7.81 (m, 1H, ArH), 7.45-7.36 (m, 2H, ArH), 7.36-7.28 (m, 2H, ArH), 7.24-7.17 (m, 1H, ArH), 7.14-7.02 (m, 1H, ArH), 4.23 (brs, 2H, NCHCH_2), 3.38 (m, 1H, CH_3NCH), 3.02 (s, 3H, CH_3), 2.41 (brs, 2H, NCHCH_2), 1.75 (m, 4H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$).

[0187] N-甲基-N-(1-(2-(苯氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺(I-9)的合成

[0188] 将XI(500.00mg, 0.90mmol), 苯胺(XII-1)(84.00mg, 0.90mmol), 醋酸钯(20.00mg, 0.09mmol)和BINAP(112.00mg, 0.18mmol)溶于甲苯(10.00ml), 氮气保护下加热100℃搅拌12h。TLC(二氯甲烷:甲醇=35:1)检测原料反应完全。将反应液冷却, 硅藻土抽滤后旋干溶剂, 经柱层析(洗脱剂:二氯甲烷:甲醇=300:1~100:1)分离, 得淡黄色固体300.00mg, 收率:67%, m.p. 164~165℃。

[0189] Major rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.45-7.38 (m, 2H, ArH), 7.30-7.20 (m, 6H, ArH), 7.14-7.03 (m, 2H, ArH), 6.96-6.87 (m, 2H, ArH), 4.88-4.78 (m, 1H, CH_3NCH), 4.67-4.00 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.16-2.91 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.47 (s, 3H, CH_3), 1.76-1.58 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0190] Minor rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.45-7.38 (m, 2H, ArH), 7.30-7.20 (m, 6H, ArH), 7.14-7.03 (m, 2H, ArH), 6.96-6.87 (m, 2H, ArH), 4.67-4.00 (brs, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.4.-3.30 (m, 1H, CH_3NCH), 2.83 (s, 3H, CH_3), 2.72-2.56 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 1.76-1.58 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0191] Major rotamer: $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169.35, 167.44, 161.60 (d, $J=250.10\text{Hz}$), 142.01, 141.26, 141.22, 129.94, 128.95, 128.88, 128.79, 128.47, 128.36, 127.31, 123.64, 120.78, 119.68, 118.97 (d, $J=21.30\text{Hz}$), 117.66, 113.89 (dq, $J=9.40, 4.20\text{Hz}$), 50.35, 30.78, 28.45, 27.69.

[0192] Minor rotamer: ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 169.33, 167.44, 161.60 (d, $J=250.10\text{Hz}$), 142.01, 141.26, 141.22, 130.03, 128.95, 128.88, 128.79, 128.47, 128.36, 127.15, 123.64, 120.97, 119.68, 118.97 (d, $J=21.30\text{Hz}$), 117.66, 113.89 (dq, $J=9.40, 4.20\text{Hz}$), 56.08, 29.18, 28.75, 26.81.

[0193] HRMS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_2$: 500.1961; found 500.1949.

[0194] IR (cm^{-1}) : 3044.25, 2943.95, 2867.26, 1635.00, 1594.22, 1511.76, 1450.29, 1325.89, 1279.31, 1173.89, 1136.30, 1040.50, 995.21, 906.81, 877.35, 877.35, 691.71, 500.18.

[0195] 实施例10

[0196] N-甲基-N-(1-(2-((4-氰基)苯氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺(I-10)的合成

[0197] 以XI (500.00mg, 0.90mmol), 4-氰基苯胺(XII-2) (106.00mg, 0.90mmol), 为原料, 操作同I-9, 经柱层析(洗脱剂: 二氯甲烷: 甲醇 = 300:1~100:1)分离, 得白色粉末 297.00mg, 产率63%, m.p. 226~227 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0198] Major rotamer: ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 7.53 (s, 1H, ArH), 7.48-7.45 (m, 3H, ArH), 7.41-7.34 (m, 2H, ArH), 7.29-7.27 (m, 2H, ArH), 7.09 (t, $J=6.00\text{Hz}$, 1H, ArH), 7.04-7.01 (m, 2H, ArH), 4.84-4.75 (m, 1H, CH_3NCH), 4.68-3.70 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.24-2.90 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.46 (s, 3H, CH_3), 1.76-1.69 (m, 2H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$), 1.69-1.58 (m, 2H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0199] Minor rotamer: ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 7.53 (s, 1H, ArH), 7.48-7.45 (m, 3H, ArH), 7.41-7.34 (m, 2H, ArH), 7.29-7.27 (m, 2H, ArH), 7.09 (t, $J=6.00\text{Hz}$, 1H, ArH), 7.04-7.01 (m, 2H, ArH), 4.68-3.70 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.42-3.27 (m, 1H, CH_3NCH), 2.85 (s, 3H, CH_3), 2.72-2.57 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 1.76-1.69 (m, 2H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$), 1.69-1.58 (m, 2H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0200] Major rotamer: ^{13}C -NMR (125MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 169.05, 167.96, 162.14 (d, $J=251.40\text{Hz}$), 147.27, 138.81, 133.73, 131.63, 131.31, 130.56, 129.31 (d, $J=8.00\text{Hz}$), 128.50 (q, $J=7.50\text{Hz}$), 128.04, 124.9 (q, $J=281.20\text{Hz}$), 122.8, 121.05, 119.52 (d, $J=21.20\text{Hz}$), 119.51, 115.67, 114.43 (d, $J=22.50\text{Hz}$), 102.13, 50.82, 31.27, 28.88, 28.23.

[0201] Minor rotamer: ^{13}C -NMR (125MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 169.05, 167.53, 162.21 (d, $J=250.00\text{Hz}$), 146.95, 139.02, 133.73, 131.63, 131.31, 130.70, 129.31 (d, $J=8.00\text{Hz}$), 128.50 (q, $J=7.50\text{Hz}$), 127.96, 124.9 (q, $J=281.20\text{Hz}$), 122.63, 120.64, 119.52 (d, $J=21.20\text{Hz}$), 119.51, 115.86, 114.43 (d, $J=22.50\text{Hz}$), 102.45, 56.42, 28.88, 28.23, 27.26.

[0202] HRMS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}_2$: 525.1914 found 525.1898.

[0203] IR (cm^{-1}) : 3492.63, 3290.46, 2955.75, 2926.25, 2215.65, 1633.13, 1583.44, 1516.89, 1449.56, 1411.71, 1367.00, 1319.46, 1280.89, 1161.66, 1140.82, 1040.35, 1009.21, 904.82, 873.92, 846.23, 740.45, 544.11.

[0204] 实施例11

[0205] N-甲基-N-(1-(2-((2-氰基苯基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺(I-11)的合成

[0206] 以XI (500.00mg, 0.90mmol), 2-氰基苯胺(XII-3) (106.00mg, 0.90mmol) 为原料, 操作同I-9, 经柱层析(洗脱剂: 二氯甲烷: 甲醇=200:1~100:1) 分离, 得白色粉末240.00mg, 产率51%, m.p. 187~188°C。

[0207] Major rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.54-7.49 (m, 1H, ArH), 7.45-7.35 (m, 4H, ArH), 7.33-7.27 (m, 4H, ArH), 7.13-7.08 (m, 1H, ArH), 6.97-6.89 (m, 1H, ArH), 4.88-4.78 (m, 1H, CH_3NCH), 4.60-3.46 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.25-2.95 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.55 (s, 3H, CH_3), 1.90-1.57 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$) .

[0208] Minor rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.54-7.49 (m, 1H, ArH), 7.45-7.35 (m, 4H, ArH), 7.33-7.27 (m, 4H, ArH), 7.13-7.08 (m, 1H, ArH), 6.97-6.89 (m, 1H, ArH), 4.60-3.46 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.40-3.28 (m, 1H, CH_3NCH), 2.89 (s, 3H, CH_3), 2.70-2.64 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 1.90-1.57 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$) .

[0209] Major rotamer: $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168.25, 167.45, 161.59 (d, $J=251.10\text{Hz}$), 145.71, 138.20, 133.40, 132.75, 131.29, 129.96, 128.94, 128.83, 128.48, 128.38, 127.70, 125.32 (q, $J=183.70\text{Hz}$), 122.50, 120.31, 120.04, 119.84, 119.00 (d, $J=21.50\text{Hz}$), 116.63, 113.87 (dq, $J=14.70, 5.00\text{Hz}$), 50.35, 30.93, 28.67, 27.76.

[0210] Minor rotamer: $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168.25, 167.45, 161.59 (d, $J=251.10\text{Hz}$), 145.71, 138.20, 133.47, 132.83, 131.29, 130.06, 128.94, 128.83, 128.48, 128.38, 127.50, 125.32 (q, $J=183.70\text{Hz}$), 122.42, 120.31, 120.04, 119.84, 119.00 (d, $J=21.50\text{Hz}$), 116.63, 113.87 (dq, $J=14.70, 5.00\text{Hz}$), 56.04, 28.67, 27.76, 26.86.

[0211] HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}_2$: 525.1914; found 525.1899.

[0212] IR (cm^{-1}): 3461.31, 3300.38, 2935.60, 2219.24, 1633.64, 1589.08, 1516.10, 1448.85, 1422.55, 1366.81, 1326.76, 1166.45, 1122.68, 1040.00, 1005.65, 905.71, 876.54, 757.01.

[0213] 实施例12

[0214] N-甲基-N-(1-(2-((4-甲氧基苯基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺(I-12)的合成

[0215] 以XI (500.00mg, 0.90mmol), 4-甲氧基苯胺(XII-4) (111.00mg, 0.90mmol) 为原料, 操作同I-9, 经柱层析(洗脱剂: 二氯甲烷: 甲醇=200:1~100:1) 分离, 得白色粉末476.00mg, 产率61%, m.p. 165~166°C。

[0216] Major rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.45-7.39 (m, 1H, ArH), 7.31 (d, $J=6.50\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.25-7.00 (m, 5H, ArH), 6.85 (d, $J=8.90\text{Hz}$, 2H, ArH), 6.82-6.74 (m, 1H, ArH), 4.91-4.80 (m, 1H, CH_3NCH), 4.72-4.20 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.20-2.96 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.81-1.59 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$) .

[0217] Minor rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.45-7.39 (m, 1H, ArH), 7.31 (d, $J=6.50\text{Hz}$, 2H, ArH), 7.25-7.00 (m, 5H, ArH), 6.85 (d, $J=8.90\text{Hz}$, 2H, ArH), 6.82-6.74 (m, 1H, ArH), 4.72-4.20 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.41-3.30 (m, 1H, CH_3NCH), 2.92 (s, 3H, CH_3), 2.80-2.62 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 1.81-1.59 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$) .

[0218] Major rotamer: $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.18, 167.94, 162.12 (d, $J=250.00\text{Hz}$), 155.47, 144.10, 135.03, 131.83, 130.60, 129.40, 129.34, 127.89, 122.76 (q, J

=270.00Hz), 122.48, 121.74, 119.46 (d, J=21.60Hz), 118.51, 115.73, 114.74, 114.40 (d, J=24.80Hz), 55.56, 51.00, 31.42, 29.05, 28.39.

[0219] Minor rotamer: ^{13}C -NMR (125MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.25, 167.58, 162.18 (d, J=249.00Hz), 155.57, 144.13, 134.88, 131.91, 130.69, 129.40, 129.34, 127.73, 122.76 (q, J=270.00Hz), 122.48, 121.50, 119.46 (d, J=21.60Hz), 118.51 (s), 115.73, 114.74, 114.40 (d, J=24.80Hz), 56.66, 55.56, 29.84, 29.39, 27.39.

[0220] HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_3$: 530.2067; found 530.2056.

[0221] IR (cm^{-1}): 3374.40, 2934.04, 1636.33, 1587.02, 1513.36, 1367.21, 1328.60, 1318.48, 1247.04, 1170.35, 1136.40, 1038.64, 1004.04, 905.98, 876.43, 767.36, 749.28, 519.68.

[0222] 实施例13

[0223] N-甲基-N-(1-(2-((2-甲氧基苯基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺 (I-13) 的合成

[0224] 以 XI (500.00mg, 0.90mmol), 2-甲氧基苯胺 (XII-5) (111.00mg, 0.90mmol) 为原料, 操作同 I-9, 经柱层析 (洗脱剂: 二氯甲烷: 甲醇 = 300:1 ~ 100:1) 分离, 得白色粉末 276.00mg, 产率 58%, m.p. 219 ~ 220°C.

[0225] Major rotamer: ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.45-7.35 (m, 2H, ArH), 7.29-7.25 (m, 4H, ArH), 7.17-7.00 (m, 1H, ArH), 7.00-6.91 (m, 1H, ArH), 6.88-6.84 (m, 3H, ArH), 5.10-4.10 (m, 3H, CH_3NCH , $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.16-2.90 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.44 (s, 3H, CH_3), 1.85-1.47 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0226] Minor rotamer: ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.45-7.35 (m, 2H, ArH), 7.29-7.25 (m, 4H, ArH), 7.17-7.00 (m, 1H, ArH), 7.00-6.91 (m, 1H, ArH), 6.88-6.84 (m, 3H, ArH), 5.08-4.09 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.38-3.23 (m, 1H, CH_3NCH), 2.77 (s, 3H, CH_3), 2.69-2.61 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 1.85-1.47 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0227] Major rotamer: ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169.07, 167.40, 161.58 (d, J=250.80Hz), 148.41, 140.33, 131.75, 129.70, 128.91, 128.80, 128.35, 127.28, 127.16, 120.24, 120.08, 120.10, 120.04, 118.98 (d, J=21.10Hz), 118.09, 114.90, 113.87 (ddd, J=13.80, 8.80, 4.10Hz), 110.24, 55.21, 50.34, 30.66, 28.36, 27.59.

[0228] Minor rotamer: ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169.07, 167.40, 161.58 (d, J=250.80Hz), 148.41, 140.33, 131.75, 129.77, 128.91, 128.80, 128.35, 127.16, 127.12, 120.24, 120.08, 120.10, 120.04, 118.98 (d, J=21.10Hz), 118.09, 114.90, 113.87 (ddd, J=13.80, 8.80, 4.10Hz), 110.32, 56.08, 55.21, 29.09, 28.63, 26.65.

[0229] HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_3$: 530.2067; found 530.2058.

[0230] IR (cm^{-1}): 3355.27, 2991.15, 1639.17, 1589.19, 1516.19, 1420.47, 1367.24, 1327.27, 1278.32, 1244.99, 1169.44, 1130.41, 1074.06, 1039.91, 906.12, 874.10, 751.72, 642.40, 606.02, 560.94.

[0231] 实施例14

[0232] N-甲基-N-(1-(2-(吡啶-4-基氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺 (I-14) 的合成以 XI (500.00mg, 0.90mmol), 4-氨基吡啶 (XII-6) (85.00mg, 0.90mmol) 为

原料,操作同I-9,经柱层析(洗脱剂:二氯甲烷:甲醇=150:1~100:1)分离,得淡黄色粉末198.00mg,产率44%,m.p.136~137℃。

[0233] Major rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.40-8.19 (m, 2H, ArH) , 7.49-7.29 (m, 7H, ArH, NH) , 7.21-7.15 (m, 1H, ArH) , 6.93-6.78 (m, 2H, ArH) , 5.07-4.48 (m, 2H, CH₃NCH, CON (CH₂)₂) , 4.19-3.68 (m, 1H, CON (CH₂)₂) , 3.25-2.91 (m, 2H, CON (CH₂)₂) , 2.41 (s, 3H, CH₃) , 1.92-1.43 (m, 4H, NCH (CH₂)₂) .

[0234] Minor rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.40-8.19 (m, 2H, ArH) , 7.49-7.29 (m, 7H, ArH, NH) , 7.21-7.15 (m, 1H, ArH) , 6.93-6.78 (m, 2H, ArH) , 5.07-4.48 (m, 1H, CON (CH₂)₂) , 4.19-3.68 (m, 1H, CON (CH₂)₂) , 3.42-3.27 (m, 1H, CH₃NCH) , 2.85 (s, 3H, CH₃) , 2.69-2.58 (m, 2H, CON (CH₂)₂) , 1.92-1.43 (m, 4H, NCH (CH₂)₂) .

[0235] Major rotamer:¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 168.88, 167.95, 162.13 (d, J=247.60Hz) , 150.24, 131.63, 130.42, 129.35, 129.24, 128.89 (d, J=7.90Hz) , 127.85, 123.53, 123.32, 122.33, 122.00, 119.45 (d, J=21.20Hz) , 114.38 (d, J=20.20Hz) , 109.94, 109.80, 50.70, 31.17, 28.81, 28.15.

[0236] Minor rotamer:¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 168.88, 167.95, 162.13 (d, J=247.60Hz) , 150.24, 131.63, 130.57, 129.35, 129.24, 128.89 (d, J=7.90Hz) , 127.85, 123.53, 123.32, 122.33, 122.00, 119.45 (d, J=21.20Hz) , 114.38 (d, J=20.20Hz) , 109.94, 109.80, 56.39, 29.58, 29.19, 27.24.

[0237] HRMS (ESI) :m/z [M+H]⁺. Calcd for C₂₆H₂₅F₄N₄O₂: 501.1914; found 501.1900.

[0238] IR (cm⁻¹) : 3263.74, 2930.64, 1631.34, 1592.68, 1515.28, 1422.00, 1410.90, 1370.34, 1321.60, 1282.23, 1267.24, 1214.83, 1171.03, 1134.24, 1072.83, 1041.27, 997.24, 905.95, 817.03, 757.23, 528.80.

[0239] 实施例15

[0240] N-甲基-N-(1-(2-(吡啶-2-基氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺(I-15)的合成以XI(500.00mg, 0.90mmol), 2-氨基吡啶(XII-7)(85.00mg, 0.90mmol)为原料,操作同I-9,经柱层析(洗脱剂:二氯甲烷:甲醇=150:1~100:1)分离,得淡黄色粉末162.00mg,产率36%,m.p.155~156℃。

[0241] Major rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.30-8.16 (m, 1H, ArH) , 8.01 (d, J=8.3Hz, 1H, ArH) , 7.84-7.66 (m, 2H, ArH) , 7.57-7.25 (m, 5H, ArH, NH) , 7.17-6.96 (m, 1H, ArH) , 6.96-6.67 (m, 2H, ArH) , 4.89-4.77 (m, 1H, CH₃NCH) , 4.74-3.65 (m, 2H, CON (CH₂)₂) , 3.21-2.93 (m, 2H, CON (CH₂)₂) , 2.50 (s, 3H, CH₃) , 1.93-1.50 (m, 4H, NCH (CH₂)₂) .

[0242] Minor rotamer:¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.30-8.16 (m, 1H, ArH) , 8.01 (d, J=8.30Hz, 1H, ArH) , 7.84-7.66 (m, 2H, ArH, NH) , 7.57-7.25 (m, 5H, ArH) , 7.17-6.96 (m, 1H, ArH) , 6.96-6.67 (m, 2H, ArH) , 4.74-3.65 (m, 2H, CON (CH₂)₂) , 3.42-3.23 (m, 1H, CH₃NCH) , 2.84 (s, 3H, CH₃) , 2.69-2.61 (m, 2H, CON (CH₂)₂) , 1.93-1.50 (m, 4H, NCH (CH₂)₂) .

[0243] Major rotamer:¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 122.64, 169.54, 162.13 (d, J=258.70Hz) , 155.39, 148.07, 148.01, 138.77, 137.66, 130.43, 129.38, 129.28, 128.96, 128.86, 127.50, 121.82, 121.35, 119.42 (d, J=20.90Hz) , 115.37, 114.50 (d, J=4.50Hz) , 109.98, 50.84, 31.26, 28.94, 28.16.

[0244] Minor rotamer: ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 122.64, 169.54, 162.13 (d, $J=258.70\text{Hz}$), 155.39, 148.07, 148.01, 138.77, 137.75, 130.52, 129.38, 129.28, 128.96, 128.86, 127.37, 121.82, 121.35, 119.42 (d, $J=20.90\text{Hz}$), 115.54, 114.17 (d, $J=4.10\text{Hz}$), 109.98, 56.50, 29.16, 28.45, 27.23.

[0245] HRMS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}_2$: 501.1914; found 501.1903.

[0246] IR (cm^{-1}) : 3392.33, 2920.35, 2861.36, 2861.36, 1592.16, 1511.12, 1434.99, 1367.46, 1329.28, 1307.24, 1173.57, 1132.21, 1075.27, 1038.87, 907.50, 862.63, 759.68, 644.57, 603.31, 523.19.

[0247] 实施例16

[0248] N-甲基-N-(1-(2-([1,1'-二苯基]-4-氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺 (I-16) 的合成

[0249] 以 XI (500.00mg, 0.90mmol), 4-苯基苯胺 (XII-8) (152.00mg, 0.90mmol) 为原料, 操作同 I-9, 经柱层析 (洗脱剂: 二氯甲烷: 甲醇 = 300:1~100:1) 分离, 得黄色粉末 340.00mg, 产率 66%, m.p. 112~113 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0250] Major rotamer: ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 7.62-7.49 (m, 5H, ArH), 7.49-7.38 (m, 3H, ArH), 7.38-7.25 (m, 5H, ArH, NH), 7.19-7.16 (m, 3H, ArH), 6.99 (t, $J=7.50\text{Hz}$, 1H, ArH), 4.91-4.84 (m, 1H, CH_3NCH), 4.82-3.79 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.30-2.95 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.52 (s, 3H, CH_3), 1.84-1.73 (m, 2H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$), 1.69-1.62 (m, 2H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0251] Minor rotamer: ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 7.62-7.49 (m, 5H, ArH), 7.49-7.38 (m, 3H, ArH), 7.38-7.25 (m, 5H, ArH, NH), 7.19-7.16 (m, 3H, ArH), 6.99 (t, $J=7.50\text{Hz}$, 1H, ArH), 4.82-3.79 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.47-3.28 (m, 1H, CH_3NCH), 2.89 (s, 3H, CH_3), 2.73-2.64 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 1.84-1.73 (m, 2H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$), 1.69-1.62 (m, 2H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0252] Major rotamer: ^{13}C -NMR (125MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 169.81, 167.92, 162.09 (d, $J=249.87\text{Hz}$), 141.99, 141.62, 140.69, 134.08, 131.77 (dd, $J=4.30, 2.30\text{Hz}$), 130.48, 129.32 (d, $J=8.10\text{Hz}$), 128.92 (dd, $J=16.10, 7.30\text{Hz}$), 128.72, 127.97, 127.88, 126.67, 126.46, 122.99 (q, $J=261.25\text{Hz}$), 120.33, 119.43 (d, $J=20.80\text{Hz}$), 118.49, 118.28, 118.24, 114.35 (dd, $J=24.80, 4.60\text{Hz}$), 50.89, 31.27, 28.94, 28.21.

[0253] Minor rotamer: ^{13}C -NMR (125MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 169.77, 167.54, 162.21 (d, $J=250.25\text{Hz}$), 141.81, 141.66, 140.63, 134.31, 131.77 (dd, $J=4.30, 2.30\text{Hz}$), 130.58, 129.32 (d, $J=8.10\text{Hz}$), 128.92 (dd, $J=16.10, 7.30\text{Hz}$), 128.77, 128.03, 127.71, 126.75, 126.50, 122.99 (q, $J=261.250\text{Hz}$), 120.33, 119.43 (d, $J=20.80\text{Hz}$), 118.49, 118.28, 118.24, 114.35 (dd, $J=24.80, 4.60\text{Hz}$), 56.59, 29.72, 29.31, 27.27.

[0254] HRMS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_2$: 576.2274; found 576.2257.

[0255] IR (cm^{-1}) : 3376.30, 3028.90, 2930.00, 2858.81, 1631.67, 1596.56, 1523.77, 1423.06, 1369.58, 1320.85, 1279.21, 1170.45, 1134.23, 1072.03, 1040.87, 1005.23, 905.16, 838.02, 762.81, 698.13, 501.94.

[0256] 实施例17

[0257] N-甲基-N-(1-(2-((4-甲酰基苯基)氨基)苯甲酰基)哌啶-4-基)-2-三氟甲基-4-氟苯甲酰胺 (I-17) 的合成

[0258] 以XI (500.00mg, 0.90mmol), 4-氨基苯甲酸(XII-9) (123.00mg, 0.90mmol) 为原料, 操作同I-9, 经柱层析(洗脱剂: 二氯甲烷: 甲醇=150:1~100:1) 分离, 得白色粉末210.00mg, 产率43%, m.p. 178~179°C。

[0259] Major rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.16-7.92 (m, 2H, ArH), 7.55-7.51 (m, 2H, ArH), 7.46-7.30 (m, 4H, ArH), 7.22-7.01 (m, 3H, ArH), 4.87-4.79 (m, 1H, CH_3NCH), 4.40-3.54 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.17-2.93 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.41 (s, 3H, CH_3), 1.93-1.41 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0260] Minor rotamer: $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.16-7.92 (m, 2H, ArH), 7.55-7.51 (m, 2H, ArH), 7.46-7.30 (m, 4H, ArH), 7.22-7.01 (m, 3H, ArH), 4.40-3.54 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 3.39-3.32 (m, 1H, CH_3NCH), 3.17-2.93 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)_2$), 2.80 (s, 3H, CH_3), 1.93-1.41 (m, 4H, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$).

[0261] Major rotamer: $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.84, 169.34, 167.99, 162.09 (d, $J=250.50\text{Hz}$), 156.98, 148.45, 139.09, 132.16, 130.46, 129.36, 129.26, 128.98, 127.81, 124.42 (q, $J=206.30\text{Hz}$), 122.78, 121.53, 120.43, 119.46 (d, $J=20.80\text{Hz}$), 114.88, 114.37 (d, $J=20.60\text{Hz}$), 50.73, 31.16, 28.81, 28.10.

[0262] Minor rotamer: $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.72, 169.34, 167.99, 162.09 (d, $J=250.50\text{Hz}$), 156.98, 148.45, 139.09, 132.16, 130.58, 129.36, 129.26, 128.98, 127.68, 124.42 (q, $J=206.30\text{Hz}$), 122.78, 121.32, 120.74, 119.46 (d, $J=20.80\text{Hz}$), 114.88, 114.37 (d, $J=20.60\text{Hz}$), 56.41, 29.63, 29.15, 27.20.

[0263] HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_4$: 544.1859; found 544.1845.

[0264] IR (cm^{-1}): 3474.93, 3307.19, 3067.85, 2933.28, 2507.37, 1707.76, 1522.02, 1593.82, 1451.29, 1411.14, 1370.89, 1326.58, 1280.08, 1173.88, 1134.95, 1072.94, 1041.42, 905.55, 844.43, 769.54, 750.47, 660.97, 500.78.

[0265] 上述制备所得部分化合物的药理学实验及结果如下:

[0266] 一、Gli-luciferase实验

[0267] ①实验原理

[0268] 用慢病毒稳定转染方式将一个由12xGLI-binding site驱动的火光素酶基因firefly导入NIH/3T3细胞中, 同时将一个CMV启动子驱动的海肾荧光素酶基因renilla导入。其中firefly用于检测Hedgehog信号的转录活性, renilla作为报告基因的内参基因。用Hedgehog配体可以显著提高该细胞系的Hedgehog通路转录活性。

[0269] ②实验材料

[0270] ShhFlashII/NIH3T3细胞系: Life Technologies

[0271] 96孔板: Corning Costar#3595

[0272] DMEM培养基: Life Technologies

[0273] Dual-Glo® Luciferase Substrate: Promega

[0274] Stop&Glo® Substrate: Promega

[0275] 酶标仪: Thermo Electro Co.

[0276] CO2培养箱: ESCO Micro Pte.Ltd.

[0277] 细胞计数器: Thermo Electro Co.

[0278] ③实验方法

[0279] (1) 将购买到含有胰酶的ShhFlashII/NIH3T3单细胞悬浮液进行细胞计数。

[0280] (2) 96孔板每孔接种100 μ l含有2x10⁴数量的细胞。[0281] (3) 将细胞在37 $^{\circ}$ C, 95%湿度, 5%CO₂的培养箱中培养3天。

[0282] (4) 配置含有待测物或shh配体的DMEM培养液。

[0283] (5) 将细胞培养液吸去, 加入待测物培养液培养48h。

[0284] (6) 移去培养液, 加入50 μ l/孔 Dual-Glo[®] Luciferase Substrate, 在暗中培养10min。

[0285] (7) 用酶标仪读取Gli-luciferase读数。

[0286] (8) 加入50 μ l Stop&Glo[®]Substrate, 在暗中培养10min。

[0287] (9) 用酶标仪读取Renilla Luciferase读数。

[0288] (10) 将Firefly的读数用内标Renilla的读数归一化, 计算IC₅₀。

[0289] ④实验结果

[0290] 对本发明部分化合物进行Hedeghog通路的抑制活性的筛选, 结果见表1。

[0291] 表1. 部分受试化合物对Gli-luciferase的IC₅₀值

编号	Gli-luc reporter (nM)	编号	Gli-luc reporter (nM)
I-1	123.40	I-10	3809
I-2	286.20	I-11	7638
I-3	544.90	I-12	703.80
I-5	4805	I-13	158.20
I-6	1322	I-16	1327
I-7	1907	Vismodegib	17.25
I-9	34.07		

[0293] 表1结果显示, 本发明化合物对Hedeghog通路有较好的抑制活性, 其中化合物I-9活性最好, 对Gli-luc reporter的IC₅₀值为34.07nM。

[0294] 二、Doay细胞系活力测定试验

[0295] ①受试药物

[0296] 化合物I-1、I-9、I-13、LY2940680

[0297] ②实验材料

[0298] 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (GIBCO, Invitrogen Corporation, NY, USA)、DMEM培养基 (GIBCO, Invitrogen Corporation, NY, USA)、青霉素 (Sigma, St. Louis, MO, USA)、链霉素 (Sigma, St. Louis, MO, USA)、MTT试剂, 碧云天生物技术有限公司。

[0299] FORMA700型超低温冰箱, Thermo公司; YC-300L型药品储存柜, 中科美菱低温科技有限责任公司; Direct-Q with pump型超纯水仪, Millopore公司; SW-CJ-2FD型超净化工作台: 苏州净化设备有限公司; Forma 3111型水套式CO₂培养箱: Thermo Electron company;

Berthold LB941微孔板式多功能酶标仪,Berthold公司。

[0300] Doay cell line购自American Tissue Culture Collection(ATCC,Rockville, MD,USA)。

[0301] ③实验方法

[0302] 试验分组情况及药物浓度选择

[0303] I类化合物(化合物I-1、I-9、I-13)浓度选择:0 μ M,0.01 μ M,0.10 μ M,1 μ M,5 μ M,10 μ M。

[0304] 化合物均用DMSO助溶,0 μ M为含等体积的DMSO作为空白对照组,DMSO的终浓度不超过0.10% (v/v)。

[0305] 细胞培养条件

[0306] 细胞传代培养10-15代,培养条件为含有青霉素(终浓度为100U/ml)、链霉素(终浓度为100 μ g/ml)、10%FBS的DMEM培养基,当细胞融合至90%时,弃去旧培养基,用2ml PBS洗涤细胞2次,弃去PBS后加入2ml的0.25% (w/v) Trypsin-0.53mM EDTA混合消化液,置显微镜下观察,约30s,当细胞变圆后迅速加入2ml完全培养基终止消化,轻轻吹打,收集细胞。800rpm,4 $^{\circ}$ C,离心5min,弃去上清液,用完全培养基重悬细胞,分瓶培养,隔天换液。

[0307] MTT试验

[0308] 将对数生长期细胞以 1×10^5 cells/孔接种于96孔板,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下培养,直至细胞90%融合后,用无血清的DMEM培养基孵育2h使细胞同步化。随后,弃去上清,分别加入浓度为(0 μ M,0.01 μ M,0.10 μ M,1 μ M,5 μ M,10 μ M)的HG-I类化合物完全DMEM培养基孵育72h。孵育结束前4h,每孔加入20 μ l MTT溶液(5mg/ml)。孵育结束后,弃去各孔上清液,每孔加入150 μ l DMSO,细胞振荡仪上振荡10min,待结晶物充分溶解后用酶标仪测定OD₅₇₀。

[0309] 抑制率=(对照组OD值-实验组OD值)/对照组OD值 \times 100%。

[0310] ④实验结果

[0311] 对本发明部分化合物进行人髓母瘤细胞(Daoy)体外抗增殖活性试验,结果见表2。

[0312] 表2.受试化合物对人髓母瘤细胞Daoy的抗增殖作用

	化合物	IC ₅₀ (μ M)
	I-1	0.51 \pm 0.05
[0313]	I-9	0.48 \pm 0.05
	I-13	0.40 \pm 0.02
	LY2940680	0.79 \pm 0.06

[0314] 结果显示,受试化合物对人髓母细胞瘤细胞Daoy的增殖均有较好的抑制作用,其中化合物I-1、I-9和I-13的抗增殖作用优于阳性对照LY2940680。