



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101812097 A

(43) 申请公布日 2010.08.25

(21) 申请号 201010167113.2

(22) 申请日 2010.04.17

(71) 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路  
238 号

(72) 发明人 朱伟明 徐志红 张亚鹏 王义  
刘培培

(51) Int. Cl.

C07H 15/26 (2006.01)

C07D 403/14 (2006.01)

C07D 487/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 13 页

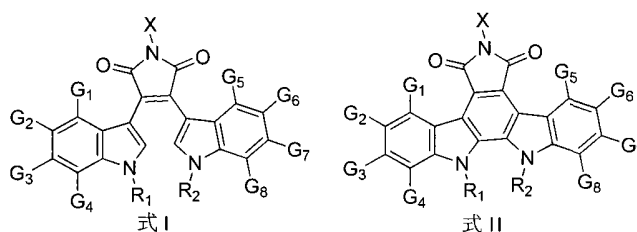
(54) 发明名称

吡啶唑啉和双吡啶马来酰亚胺生物碱及其制  
备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及吡啶唑啉和双吡啶马来酰亚胺类  
生物碱及其制备方法和用途。本发明从吡啶和吡  
啶乙酸出发,经化学反应制备了结构新颖的上述  
类型的化合物。经实验证实,该类化合物具有肿瘤  
细胞毒活性和蛋白激酶 C(PKC) 抑制活性,可作为  
细胞增殖抑制剂或抗肿瘤剂。

## 1. 式 I、式 II 化合物

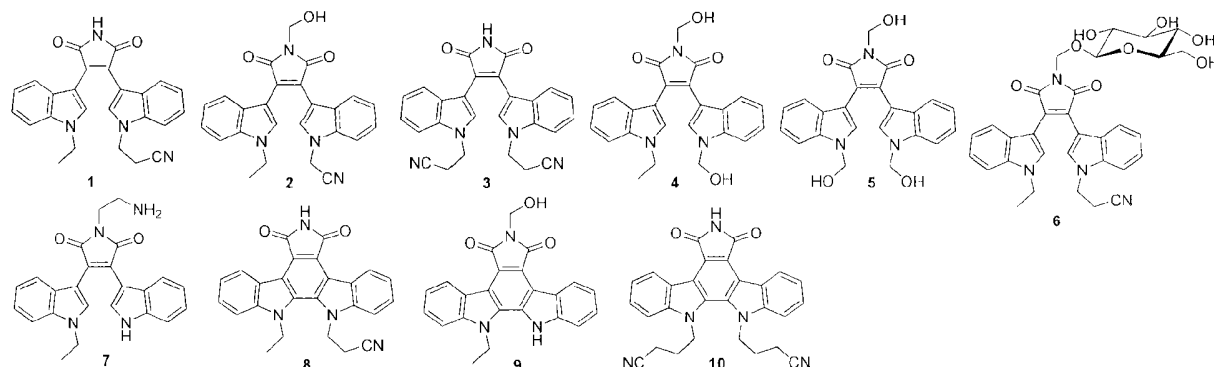


其中  $G_1 \sim G_8$  均可代表  $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 。X 代表  $-H$ 、 $-(CH_2)_nOY$ 、 $-(CH_2)_nNH_2$ 、 $-(CH_2)_nAr$  ( $Y = -H$ 、Glycosyl、amino acids,  $n = 1-4$ )， $R_1$ 、 $R_2 = -H$ 、 $-Et$ 、 $-(CH_2)_mCN$  ( $m = 1-4$ )。

2. 权利要求 1 所述的式 I、式 II 化合物的药学上可接受的有机或无机酸的盐。例如可以由盐酸、硫酸、磷酸、甲酸、乙酸、丙酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、杏仁酸、苹果酸、樟脑磺酸以及类似的已知可以接受的酸形成盐。

3. 权利要求 1 所述的式 I、式 II 化合物的前药形式，如磷酸酯、氨基甲酸酯等，当以这种形式给药时，其在体内转变为活性形式起效。

4. 权利要求 1 所述的式 I、式 II 化合物，其中化合物 1-10 的  $G_1 \sim G_8$  为氢， $R_1 = -Et$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CN$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CN$ ， $R_2 = -H$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2CH_2CN$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CN$ ，X =  $-H$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2OGlc$ ，结构式分别为：



5. 权利要求 1 所述的二吲哚取代的马来酰亚胺衍生物 (I) 的制备方法，其特征在于按以下步骤进行：带有氮位烷基取代的吲哚与氮位具有烷基取代的吲哚乙酸发生 Perkin 缩合反应得到通式 I 中 N-X 为氧原子取代的该类化合物，其它该类衍生物由所得到的通式 I 中 N-X 为氧原子取代的化合物进行氨解和羟甲基化得到。

6. 权利要求 1 所述的吲哚吡啶衍生物 (II) 的制备方法，其特征在于按以下步骤进行：得到的二吲哚取代的马来酰亚胺衍生物 (I)，进行光照环化或 DDQ 氧化环化反应得到。

7. 如权利要求 5 所述的制备方法，其特征在于按以下步骤进行：①将吲哚与不同的烷基化（包括苄基）试剂反应得到氮位烷基取代的吲哚；②将吲哚乙酸与不同的烷基化试剂反应得到氮位烷基取代的吲哚乙酸；③得到的氮位烷基取代的吲哚利所得到的氮位烷基取代的吲哚乙酸在草酰氯、三乙胺、二氯甲烷条件下发生 Perkin 缩合得到通式 II 中 N-X 为氧原子取代的该类化合物；④得到的通式 I 中 N-X 为氧原子的该类化合物在六甲基二硅胺脒 (HMDS)、N,N-二甲基甲酰胺、甲醇条件下氨解或在其它相应条件下氨解，以及随后对其进行羟甲基化修饰得到二吲哚取代的马来酰亚胺衍生物 (I)；⑤苄基保护的通式 I 化合物采用与  $O_2$ 、DMSO、t-BuOK/THF 氧化脱除苄基。

8. 权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于按以下步骤进行:得到的二吡啶取代的马来酰亚胺衍生物(I),在丙酮、高压汞灯光照以及碘单质作为催化剂的条件下进行光照环化反应得到,或者在对甲基苯磺酸的催化下,在苯溶剂中与 DDQ 发生氧化关环得到。

9. 权利要求 1 所述的式 I、式 II 化合物在制备细胞增殖抑制剂或肿瘤细胞杀伤剂及其在制备抗肿瘤药物中的用途。

## 吡啶唑啉和双吡啶马来酰亚胺生物碱及其制备方法和应用

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及一种具有蛋白激酶 C(PKC) 抑制活性并具有抗肿瘤作用的吡啶唑啉和双吡啶马来酰亚胺生物碱,本发明公开了其制备方法,及其在肿瘤治疗的应用。

### 背景技术：

[0002] 恶性肿瘤是危害人类生命健康的重大疾病,其发病率每年成上升趋势。传统的细胞毒类药物多存在疗效差、毒副作用大、易产生耐药性等问题,限制其临床使用。近年来,针对细胞受体、关键基因和调控分子的分子靶向药物,特别是多靶点联合阻断细胞信号传导的药物开发成为抗肿瘤药物新的发展方向。研究表明,蛋白激酶 C(Protein Kinase C, PKC) 在多种肿瘤细胞中高表达,对肿瘤细胞的生长、增殖和分化起重要作用,是重要的细胞信号传导分子 (Jussi K., Vesa A., Juha P., Protein kinase C(PKC) family in cancer progression, Cancer Lett. 2006, 235, 1-10; Hoffman J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C, FASEB J. 1997, 11: 649-669; Czifra G. T. I., Marincsak R., et al Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase C  $\delta$ . Cell Signal 2006, 18: 1461-1472; Steinberg S. F., Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C  $\delta$ . Biochem 2004, 384: 449-459.)。因此,一些能够封闭 PKC 活性、阻断细胞因子与受体结合、或干扰细胞信号传导通路的 PKC 的小分子抑制剂可以开发为新一代的抗肿瘤药物。目前已有 6 种吡啶唑啉生物碱类 PKC 抑制剂进入了 I-III 期临床研究,其中 Lestaurtinib (Cephalon 公司) 已被 FDA 于 2006 年 4 月核准作为孤儿药 (患者人数少于 20 万人或盛行率小于万分之一),用于治疗急性骨髓性白血病 (AML),表明此类化合物具有广阔的成药前景 (ClinicalTrials.gov (a service of the US National Institutes of Health). Available at <http://clinicaltrials.gov>; Further information available at <http://www.cephalon.com>; Undevia S. D., Vogelzang N. J., et al, Phase I clinical trial of CEP-2563 dihydrochloride, a receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with refractory solid tumors. Invest New Drugs, 2004, 22, 449-458.)。我们从一株新的海洋来源的马杜拉属放线菌 *Actinomadura* sp. 007 的发酵物中发现一个新的吡啶唑啉生物碱 ACT-007 (ZHD-0501), 具有较强的肿瘤细胞增殖抑制活性, 对 A549、P388、HL-60 和 BEL-7402 的  $IC_{50}$  分别为 0.05、0.82、0.69 和 0.91  $\mu$ M (Xiaoxian Han, Chengbin Cui, Qianqun Gu, Weiming Zhu, Hongbing Liu, Jingyan Gu and Hiroyuki Osada, ZHD-0501, a novel naturally occurring staurosporine analog from *Actinomadura* sp 007. Tetrahedron Lett 2005, 46 (36): 6137-6140)。为了获得活性更好、毒性更低的化合物, 我们保留吡啶唑啉母核结构, 并在三个氮原子位点进行结构修饰, 合成了一系列新的具有细胞毒和 PKC 抑制活性的吡啶唑啉生物碱的衍生物和与之结构类似的二吡啶取代的马来酰亚胺衍生物。

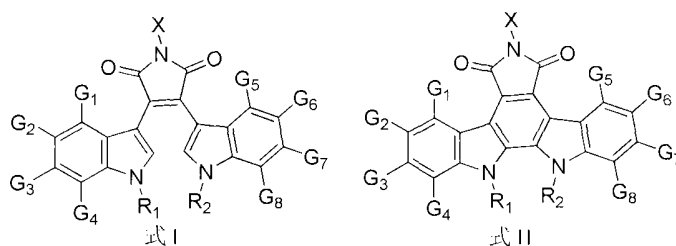
**发明内容：**

[0003] 本发明旨在提供一类吲哚咔唑类化合物以及一类二吲哚取代的马来酰亚胺衍生物，它们对肿瘤细胞以及调节肿瘤细胞代谢、增长、生殖和分化的关键激酶——蛋白激酶C(PKC) 具有良好的抑制活性，从而治疗与之相关的肿瘤，是潜在的治疗癌症药物。

[0004] 本发明的目的还在于提供一类新化合物的制备方法及其新化合物在制备肿瘤细胞增殖抑制剂或抗肿瘤药物中的用途。

[0005] 本发明合成了一类二吲哚取代的马来酰亚胺类生物碱和一类吲哚咔唑生物碱，其结构如式 I、式 II 所示：

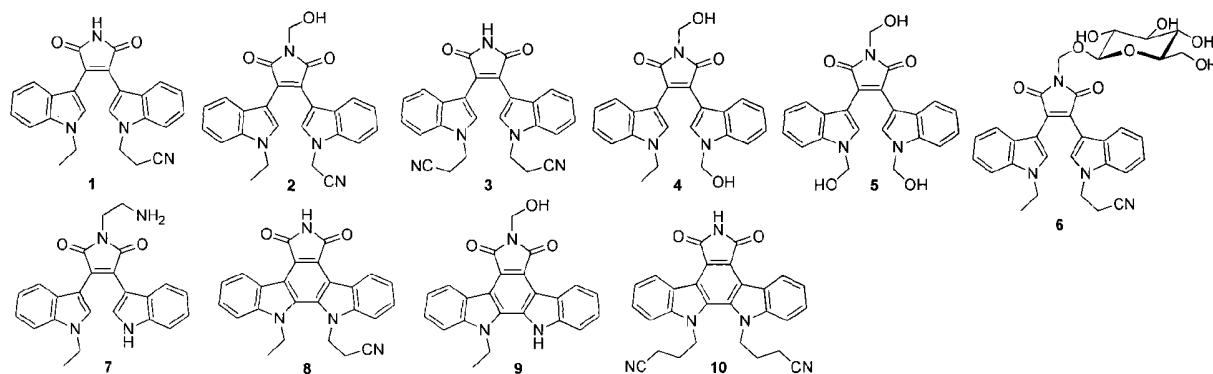
[0006]



[0007] 其结构特征是：式 I、式 II 化合物的基本骨架分别为双吲哚马来酰亚胺和吲哚咔唑，其中  $G_1 \sim G_8$  均可代表  $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 。X 代表  $-H$ 、 $-(CH_2)_nOY$ 、 $-(CH_2)_nNH_2$ 、 $-(CH_2)_nAr$  ( $Y = -H$ , glycosyl, amino acids,  $n = 1-4$ )， $R_1, R_2 = -H$ 、 $-Et$ 、 $-(CH_2)_mCN$  ( $m = 1-4$ )、 $-CH_2OH$ ；药学上可接受的有机或无机酸的盐，包括盐酸、硫酸、磷酸、甲酸、乙酸、丙酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、杏仁酸、苹果酸、樟脑磺酸等；前药形式如磷酸酯、氨基甲酸酯等，当以这种形式给药时，其在体内转变为活性形式起效。

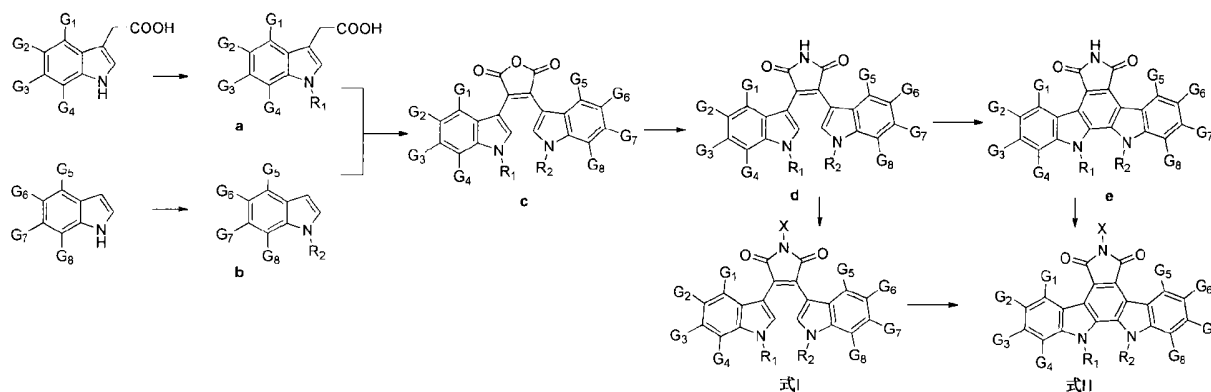
[0008] 优选的本发明化合物是所述的式 I 化合物 1~7 及式 II 化合物 8~10，其中  $G_1 \sim G_8 = -H$ ， $R_1 = -Et$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CN$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CN$ ， $R_2 = -H$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2CH_2CN$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CN$ ， $X = -H$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2OGlc$ ，结构式分别为：

[0009]



[0010] 上述发明中优选的吲哚咔唑类衍生物以及二吲哚取代的马来酰亚胺衍生物是由吲哚和吲哚乙酸经下列化学合成方法制备而得：

[0011]



[0012] 本发明采用 MTT 和 SRB 法测试了式 I、式 II 化合物对 HL-60、BEL-7402 和 A549 细胞株的抗肿瘤活性。实验证实,式 I、式 II 化合物对 HL-60 肿瘤细胞有较好的增殖抑制作用,对 BEL-7402 和 A549 也有一定增殖抑制作用。因此本发明的式 I、式 II 化合物可用作细胞增殖抑制剂或肿瘤细胞杀伤剂。

[0013] 采用荧光偏振法测试了化合物对 PKC  $\beta$  II 的抑制活性,结果表明式 I、式 II 化合物对 PKC  $\beta$  II 具有一定的抑制作用,其中优选的化合物 9 对 PKC  $\beta$  II 的 IC<sub>50</sub> 值约 3.3  $\mu$ M,故本发明的式 I、式 II 化合物可用作靶向抗肿瘤药物。

[0014] 本发明的药物可以通过口服给药和注射给药,也适合其它的给药方式,如经皮给药等。药物可以制成片剂、胶囊、粉剂、颗粒、锭剂、栓剂或口服液或无菌胃肠外悬液等液体制剂形式。还有大或小容量注射剂、冻干粉剂等针剂形式。上述剂型的药物均可按照药学领域的常规方法制备。

[0015] 本发明的式 I、式 II 化合物与各种药物可接受的载体、赋形剂或辅料配伍,可制成抗肿瘤药物,用于肿瘤的治疗,载体包括药学领域常规的稀释剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、吸收促进剂、表面活性剂、吸附载体、润滑剂等。

[0016] 式 I、式 II 化合物还可作为抑制细胞增殖的低分子生物探针用于生命科学研究,作为探针应用时,式 I、式 II 化合物可溶于甲醇、水或含水甲醇中,也可溶于二甲基亚砜的含水溶液中加入应用。

## 具体实施方式：

[0017] 【实施例 1】化合物 1 ~ 10 的制备

[0018] 化合物 1 的制备

[0019] i) 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)acetic acid (1a) 的制备

[0020] 氩气保护下,在 250mL 三口瓶中,加氢化钠 (4g, 100mmol, 60% 分散在石蜡中),加 80mL 四氢呋喃在 0℃ 搅拌悬浮,加入 30mL 四氢呋喃溶解的吲哚-3-乙酸 (3.5g, 20mmol),搅拌半小时后,滴加 30mL 四氢呋喃溶解的碘乙烷 (5mL, 60mmol),缓慢升至室温,反应过夜后,降至 0℃ 下,滴加 10 滴甲醇,再加适量水至得亮黄色溶液,乙酸乙酯萃取,水层加浓盐酸后再萃取,合并有机层,并用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥,真空蒸干,后经过硅胶柱分离 (石油醚: 乙酸乙酯 8 : 1) 得产物 (1a) 3.87g, 收率 95.4%。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.59 (d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.30 (d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.20 (dt, 1H, J = 0.9Hz, 8.2Hz, Ar-H), 7.10 (dt, 1H, J = 1.0Hz, 8.2Hz, Ar-H), 7.07 (s, 1H, Ar-H), 4.10 (q, 2H, J = 7.3Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.77 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-COOH), 1.41 (t, 3H, J = 7.3Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  178.6, 135.9, 127.6,

126.1, 121.7, 119.2, 119.0, 109.4, 106.0, 40.8, 31.1, 15.4. ESI-MS  $m/z$  202.1  $[M-H]^-$ .

[0021] ii) 3-(1H-indol-1-yl)propanenitrile(1b) 的制备

[0022] 氩气保护下, 在 100mL 三口瓶中加氢化钠 (360mg, 9.0mmol, 60% 分散在石蜡中) 后加入 30mL 乙腈, 在 0℃ 搅拌悬浮, 滴加 10mL 乙腈溶解的吡啶 (702mg, 6.0mmol), 搅拌反应 30min 后, 缓慢滴加 10mL 乙腈溶解的 3-溴代丙腈 (744  $\mu$ L, 9.0mmol), 缓慢升至室温反应 24 小时后, 将反应液倒入 100mL 冰水中, 乙酸乙酯萃取 (100mL  $\times$  3), 无水  $Na_2SO_4$  干燥, 真空蒸干, 硅胶柱分离 (石油醚: 乙酸乙酯: 15: 1), 得无色油状产物 (1b) 949mg, 收率 94%。 $^1H$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  7.65(d, 1H,  $J$  = 7.8Hz, Ar-H), 7.30(d, 1H,  $J$  = 7.8Hz, Ar-H), 7.25(t, 1H,  $J$  = 7.8Hz, Ar-H), 7.15(t, 1H,  $J$  = 6.8Hz, Ar-H), 7.13(d, 1H,  $J$  = 3.2Hz, Ar-H), 6.55(d, 1H,  $J$  = 3.2, Ar-H), 4.42(t, 2H,  $J$  = 6.9Hz,  $N-CH_2-CH_2$ ), 2.78(t, 2H,  $J$  = 6.9Hz,  $-CH_2-CN$ ).  $^{13}C$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  135.4, 129.1, 127.5, 122.3, 121.6, 120.2, 117.4, 108.7, 103.0, 42.2, 19.2.

[0023] iii) 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-[1-(2-cyanoethyl)-1H-indol-3-yl] maleic anhydride(1c) 的制备

[0024] 用 60mL  $CH_2Cl_2$  溶解的化合物 (1b) (988mg, 5.81mmol), 在 0℃ 下滴加 5mL  $CH_2Cl_2$  溶解的草酰氯 (1107mg, 8.72mmol) 后反应 2h, 升至室温, 真空抽干后得黄色晶体。在 100mL 三口瓶中加入化合物 (1a) (1180mg, 5.81mmol), 并用 15mL  $CH_2Cl_2$  溶解, 加入三乙胺 (1176mg, 11.64mmol), 后在搅拌下将上步所生成的黄色晶体用 30mL  $CH_2Cl_2$  溶解 (有部分黄色晶体不溶) 后导入, 反应液由淡黄色变为橙色, 瓶中有白雾生成, 反应过夜后为深橙红色, 真空抽干溶剂, 经硅胶柱分离 (石油醚: 乙酸乙酯 = 2: 1), 得红色粉末 (1c) 530mg, 收率 23%。 $^1H$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  7.84(s, 1H, Ar-H), 7.66(s, 1H, Ar-H), 7.35(d, 1H,  $J$  = 8.3Hz, Ar-H), 7.34(d, 1H,  $J$  = 8.3Hz, Ar-H), 7.22(dt, 1H,  $J$  = 1.0Hz, 7.3Hz, Ar-H), 7.16(dt, 1H,  $J$  = 1.4Hz, 7.5Hz, Ar-H), 7.11(d, 1H,  $J$  = 7.8Hz, Ar-H), 6.90(dt, 1H,  $J$  = 1.0Hz, 7.8Hz, Ar-H), 6.89(d, 1H,  $J$  = 8.2Hz, Ar-H), 6.82(dt, 1H,  $J$  = 1.0Hz, 7.3Hz, Ar-H), 4.47(t, 2H,  $J$  = 6.9Hz,  $N-CH_2-CH_2-$ ), 4.23(q, 2H,  $J$  = 7.3Hz,  $-CH_2-CH_3$ ), 2.85(t, 2H,  $J$  = 6.9Hz,  $-CH_2-CH_2-CN$ ), 1.51(t, 3H,  $J$  = 7.3Hz,  $-CH_2-CH_3$ ).  $^{13}C$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  166.7, 166.6, 136.2, 135.5, 132.8, 131.5, 129.6, 126.2, 126.0, 125.6, 123.4, 122.9, 122.8, 122.5, 121.3, 120.8, 116.5, 110.0, 109.1, 106.7, 105.0, 42.4, 41.7, 19.0, 15.1. ESI-MS  $m/z$  410.2  $[M+H]^+$ .

[0025] iv) 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-[1-(2-cyanoethyl)-1H-indol-3-yl] maleimide(1) 制备

[0026] 在密封的单口瓶中, 用 4mL DMF 溶解化合物 (1c) (230mg, 0.56mmol), 将 HMDS (12mL, 57mmol) 和 MeOH (1.2mL, 28.5mmol) 混合后, 注入到单口瓶中, 反应液即由红色变为淡黄色混浊物, 渐变为澄清液, 颜色渐变为橙红色。反应过夜后, 倒入 25mL 冷水中, 乙酸乙酯萃取 (50mL  $\times$  3), 无水  $Na_2SO_4$  干燥, 真空蒸干。硅胶柱分离 (纯氯仿) 得橙红色粉末 (1) 219mg, 收率 95%。 $^1H$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  7.75(s, 1H, Ar-H), 7.58(s, 1H, Ar-H), 7.51(s, 1H, N-H), 7.31(d, 1H,  $J$  = 8.2Hz, Ar-H), 7.29(d, 1H,  $J$  = 8.2Hz, Ar-H), 7.16(t, 1H,  $J$  = 7.3Hz, Ar-H), 7.11(t, 1H,  $J$  = 8.2Hz, Ar-H), 7.09(d, 1H,  $J$  = 8.2Hz, Ar-H), 6.88(d, 1H,  $J$  = 8.2Hz, Ar-H), 6.85(t, 1H,  $J$  = 7.4Hz, Ar-H), 6.77(t, 1H,  $J$  = 7.3Hz, Ar-H), 4.45(t, 2H,  $J$  = 6.9Hz,  $N-CH_2-CH_2-$ ), 4.20(q, 2H,  $J$  = 7.3Hz,  $-CH_2-CH_3$ ), 2.80(t, 2H,  $J$  = 6.9Hz,  $-CH_2-CH_2-CN$ ), 1.48(t, 3H,  $J$  = 7.3Hz,  $-CH_2-CH_3$ ).  $^{13}C$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  171.8, 171.7, 136.0, 135.4, 131.7, 130.6, 129.5,

126.6, 126.3, 125.9, 123.0, 122.7, 122.3, 122.2, 120.8, 120.2, 116.7, 109.6, 108.8, 107.3, 105.4, 42.3, 41.5, 18.9, 15.2. HR-ESIMS  $[M-H]^-$  m/z 407.1493 (计算值 407.1508)。

**[0027] 化合物 2 的制备**

**[0028]** 以化合物 1 的制备方法, 溴代乙腈为原料, 可得 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1-cyanomethyl-1H-indol-3-yl)maleimide (2d), 在 15mL 反应瓶中加入 (2d) (84mg, 0.21mmol) 和  $\text{NaHCO}_3$  (36mg, 0.42mmol), 加入甲醛溶液 (1mL, 37%), 50℃ 搅拌反应 10 小时后倒入冷水中。乙酸乙酯萃取, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 真空蒸干, 硅胶柱分离 (石油醚: 乙酸乙酯: 2: 1), 得红色粉末的 N-hydroxymethyl-2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1-cyanomethyl-1H-indol-3-yl)maleimide (2) 60mg, 收率 67%。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.66 (s, 1H, Ar-H), 7.52 (s, 1H, Ar-H), 7.30 (d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.29 (d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.16 (t, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 7.10 (t, 1H, J = 7.6Hz, Ar-H), 6.92 (d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 6.90 (d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 6.79 (t, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 6.77 (t, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 5.20 (d, 2H, J = 7.8Hz,  $\text{N-CH}_2\text{-OH}$ ), 4.91 (s, 2H,  $\text{N-CH}_2\text{-CN}$ ), 4.12 (q, 2H, J = 7.4Hz,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2.04 (s, 1H,  $-\text{OH}$ ), 1.41 (t, 3H, J = 7.4Hz,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ )。  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.7, 171.6, 136.1, 135.7, 132.0, 130.7, 129.7, 126.5, 126.2, 125.0, 123.5, 122.8, 122.5, 122.4, 121.3, 120.6, 114.1, 109.8, 109.2, 108.2, 105.5, 61.7, 41.6, 34.5, 15.3. HR-ESIMS  $[M+H]^+$  m/z 425.1632 (计算值 425.1614)。

**[0029] 化合物 3 的制备**

**[0030] i) 2-[1-(2-cyanoethyl)-1H-indol-3-yl]acetic acid (3a) 的制备**

**[0031]** 氩气保护下, 在 100mL 三口瓶中, 加氢化钠 (1.6g, 40mmol, 60% 分散在石蜡中), 40mL DMF 在 0℃ 搅拌悬浮, 加入 10mL DMF 溶解的吡啶-3-乙酸 (1.4g, 8mmol), 搅拌半小时后, 滴加 10mL DMF 溶解的溴丙腈 (2.0mL, 24mmol), 缓慢恢复至室温, 反应过夜后, 降至 0℃ 下, 滴加 10mL 甲醇, 再加适量水至得亮黄色溶液, 用 30mL 乙醚萃取, 分出有机层, 水层用 6N 盐酸酸化至弱酸性, 乙酸乙酯萃取, 合并乙酸乙酯, 用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 真空蒸干, 后经硅胶柱分离 (石油醚: 乙酸乙酯 3: 1) 得产物 (3a) 653mg, 收率 36%。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  12.2 (s, 1H,  $-\text{COOH}$ ), 7.54 (d, 1H, J = 8.3Hz, Ar-H), 7.53 (d, 1H, J = 7.7Hz, Ar-H), 7.34 (s, 1H, Ar-H), 7.17 (t, 1H, J = 7.7Hz, Ar-H), 7.06 (t, 1H, J = 7.5Hz, Ar-H), 4.46 (t, 2H, J = 6.6Hz,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ), 3.66 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ ), 3.00 (t, 2H, J = 6.6Hz,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$ )。  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  173.4, 136.3, 128.3, 127.5, 122.0, 119.6, 119.6, 119.5, 110.3, 108.6, 41.6, 31.3, 19.2. ESI-MS m/z 227.2  $[M-H]^-$ 。

**[0032] ii) 2,3-bis[1-(2-cyanoethyl)-1H-indol-3-yl]maleic anhydride (3c) 制备**

**[0033]** 以化合物 1c 的制备方法, 化合物 1b (485mg, 2.85mmol)、草酰氯 (543mg, 4.28mmol)、化合物 3a (650mg, 2.85mmol) 和三乙胺 (576mg, 5.7mmol) 为原料制得红色粉末 (3c) 472mg, 收率 41%。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.06 (s, 2H, Ar-H), 7.62 (d, 2H, J = 7.3Hz, Ar-H), 7.08 (t, 2H, J = 7.3Hz, Ar-H), 6.80 (d, 2H, J = 7.8Hz, Ar-H), 6.71 (t, 2H, J = 7.8Hz, Ar-H), 4.62 (t, 4H, J = 6.9Hz,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ), 3.06 (t, 4H, J = 6.9Hz,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$ )。  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  166.8, 136.1, 133.3, 128.5, 126.2, 123.0, 122.0, 121.0, 119.0, 111.1, 105.6, 42.1, 19.0. ESI-MS m/z 435.2  $[M+H]^+$ 。

**[0034] iii) 2,3-bis[1-(2-cyanoethyl)-1H-indol-3-yl]maleimide (3) 的制备**



[0035] 以化合物 1 的制备方法,从化合物 3c(300mg,0.69mmol)、HMDS(5.8mL,27.6mmol)、MeOH(0.55mL,13.8mmol) 制得橙红色粉末 (3) 269mg,收率 87%。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.0(s, 1H, NH), 7.94(s, 2H, Ar-H), 7.55(d, 2H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.02(t, 2H, J = 7.8Hz, Ar-H), 6.77(d, 2H, J = 7.8Hz, Ar-H), 6.65(t, 2H, J = 7.8Hz, Ar-H), 4.59(t, 4H, J = 6.4Hz, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.04(t, 4H, J = 6.4Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CN)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 173.3, 136.0, 132.2, 128.1, 126.7, 122.5, 121.7, 120.5, 119.0, 110.7, 106.3, 42.0, 19.1. HR-ESIMS [M+H]<sup>+</sup>m/z 434.1596(计算值 434.1617)。

[0036] 化合物 4 的制备

[0037] i) 1-benzyl-1H-indole 的合成

[0038] 在 100mL 三口瓶中,将 NaH(300mg,7.5mmol,60% dispersion in mineral oil) 用 30mL DMF 悬浮,-5℃ 下缓慢滴加 10mL DMF 溶解的吲哚(585mg,5mmol),升至室温反应 30min 再降至 -5℃。滴加溴化苄(0.89mL,7.5mmol),滴加完毕,-5℃ 下搅拌反应 30min,反应完全,加入 10mL 甲醇,后加 100mL 饱和氯化铵溶液,CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取(100mL×3),合并有机层,无水硫酸钠干燥,真空蒸干,硅胶柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯 100:1)得 1.02g 乳白色固体的 1-benzyl-1H-indole,收率 99%。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76(d, 1H, J = 7.7Hz, Ar-H), 7.33-7.38(m, 4H, Ar-H), 7.27(dt, 1H, J = 0.9Hz, 6.8Hz, Ar-H), 7.22(dt, 1H, J = 0.9Hz, 6.9Hz, Ar-H), 7.20(t, 1H, J = 3.2Hz, Ar-H), 7.18(d, 2H, J = 6.8Hz, Ar-H), 6.65(dd, 1H, J = 0.9Hz, 3.2Hz, Ar-H), 5.37(s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-)。<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 137.7, 136.5, 128.9, 128.9, 128.4, 127.8, 127.0, 126.9, 121.9, 121.2, 119.7, 119.7, 109.9, 101.9, 50.2. ESI-MS m/z 208.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0039] ii) 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1-benzyl-1H-indol-3-yl)maleic anhydride(4c) 的制备

[0040] 以化合物 1c 的制备方法,从化合物 1-benzyl-1H-indole(356mg,1.72mmol)、草酰氯(328mg,2.58mmol)、化合物 1a(349mg,1.72mmol) 和 Et<sub>3</sub>N(347mg,3.44mmol) 为原料,制得红色固体 (4c) 299mg,收率 39%。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.02(s, 1H, Ar-H), 7.94(s, 1H, Ar-H), 7.53(d, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 7.44(d, 1H, J = 7.8Hz, Ar-H), 7.33(t, 2H, J = 6.4Hz, Ar-H), 7.27(t, 1H, J = 6.8Hz, Ar-H), 7.20(d, 2H, J = 5.9Hz, Ar-H), 7.11(t, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 7.05(t, 1H, J = 6.8Hz, Ar-H), 6.91(d, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 6.88(d, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 6.75(t, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 6.73(t, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 5.52(s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-), 4.29(q, 2H, J = 6.4Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.34(t, 3H, J = 6.8Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 167.0, 166.9, 137.9, 136.6, 136.3, 133.9, 133.3, 129.2, 129.2, 128.8, 128.1, 127.8, 127.6, 127.6, 126.2, 125.9, 122.9, 122.8, 122.2, 122.0, 120.8, 120.7, 111.5, 111.1, 105.3, 104.7, 50.0, 40.5, 15.7. ESI-MS m/z 447.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0041] iii) 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1-benzyl-1H-indol-3-yl)maleimide(4d) 的制备

[0042] 以化合物 1 的制备方法,从化合物 4c(260mg,0.58mmol)、HMDS(2.44mL, 11.7mmol)、MeOH(0.23mL,5.8mmol) 制得红色粉末状固体 (4d) 248mg,收率 96%。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.90(s, 1H, Ar-H), 7.83(s, 1H, Ar-H), 7.46(d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.36(d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.32(t, 2H, J = 7.6Hz, Ar-H), 7.26(t, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H),

7.17 (d, 2H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , Ar-H), 7.04 (t, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 6.97 (t, 1H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , Ar-H), 6.84 (d, 1H,  $J = 8.2\text{Hz}$ , Ar-H), 6.82 (d, 1H,  $J = 7.7\text{Hz}$ , Ar-H), 6.65 (t, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 6.64 (t, 1H,  $J = 7.4\text{Hz}$ , Ar-H), 5.49 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-), 4.26 (q, 2H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.34 (t, 3H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  173.4, 173.4, 138.2, 136.4, 136.0, 132.8, 132.0, 129.1, 129.1, 128.5, 128.0, 127.5, 127.4, 127.4, 126.7, 126.4, 122.4, 122.2, 121.8, 121.7, 120.2, 120.1, 111.1, 110.7, 106.0, 105.4, 49.9, 41.3, 15.8. ESI-MS/ $m/z$  446.2 [M+H]<sup>+</sup>.

[0043] iv) 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1H-indol-3-yl)maleimide

[0044] 将化合物 4d (100mg, 0.225mmol) 用 DMSO (0.85mL) 溶解, 搅拌条件下, 滴加 1M 的 *t*-BuOK/THF 溶液 (8.4mL, 8.4mmol), 滴加完毕, 向反应液中通入 O<sub>2</sub>, 鼓泡 30min, 加饱和氯化铵溶液终止反应, 乙酸乙酯萃取 (100mL  $\times$  3), 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 真空蒸干。硅胶柱层析分离 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 乙酸乙酯 6 : 1) 得红色粉末 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1H-indol-3-yl)maleimide 70.5mg, 收率 89%。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  11.68 (d, 1H,  $J = 1.8\text{Hz}$ , NH-Indole), 10.93 (s, 1H, NH), 7.76 (d, 1H,  $J = 2.8\text{Hz}$ , Ar-H), 7.73 (s, 1H, Ar-H), 7.46 (d, 1H,  $J = 8.3\text{Hz}$ , Ar-H), 7.37 (d, 1H,  $J = 8.2\text{Hz}$ , Ar-H), 7.04 (t, 1H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , Ar-H), 6.98 (t, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 6.90 (d, 1H,  $J = 8.2\text{Hz}$ , Ar-H), 6.74 (d, 1H,  $J = 8.3\text{Hz}$ , Ar-H), 6.69 (t, 1H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , Ar-H), 6.62 (t, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 4.23 (q, 2H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.30 (t, 3H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  173.6, 173.5, 136.6, 136.0, 131.9, 129.9, 128.4, 127.7, 126.6, 125.7, 122.2, 122.1, 121.9, 121.6, 120.1, 119.9, 112.3, 110.6, 106.1, 105.5, 41.2, 15.8. ESI-MS  $m/z$  356.1 [M+H]<sup>+</sup>.

[0045] v) N-hydroxy-2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1-hydroxy-1H-indol-3-yl)maleimide (4)

[0046] 以化合物 2 的制备方法, 从 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1H-indol-3-yl)maleimide (100mg, 0.28mmol)、NaHCO<sub>3</sub> (71mg, 0.84mmol) 制得红色粉末状固体 (4) 111mg, 收率 95%。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.99 (s, 1H, Ar-H), 7.72 (s, 1H, Ar-H), 7.56 (d, 1H,  $J = 8.2\text{Hz}$ , Ar-H), 7.49 (d, 1H,  $J = 8.2\text{Hz}$ , Ar-H), 7.07 (t, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 7.05 (t, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 7.02 (d, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 6.74 (t, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 6.68 (t, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 6.64 (d, 1H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 6.62 (t, 1H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-OH), 6.32 (t, 1H,  $J = 6.4\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-OH), 5.61 (d, 2H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , -N-CH<sub>2</sub>-OH), 4.98 (d, 2H,  $J = 6.4\text{Hz}$ , indole-N-CH<sub>2</sub>-OH), 4.25 (q, 2H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.30 (t, 3H,  $J = 7.3\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  171.6, 171.5, 136.1, 136.0, 132.6, 132.1, 127.8, 127.4, 126.8, 126.4, 122.4, 122.3, 121.9, 121.7, 120.5, 120.3, 111.4, 110.7, 105.7, 105.4, 69.7, 60.8, 41.3, 15.8. HR-ESIMS [M+H]<sup>+</sup> $m/z$  416.1598 (计算值 416.1610)。

[0047] 化合物 5 的制备

[0048] i) N-methyl-3,4-dibromomaleimide 的制备

[0049] 在 50mL 两口瓶中, 将 NaH (30mg, 0.75mmol) 用 5mL DMF 悬浮搅拌, -5℃ 下滴加 5mL DMF 溶解的 3,4-dibromomaleimide (127.5mg, 0.5mmol), 低温反应 30min 后, 滴加碘甲烷 (47  $\mu$ L, 0.75mmol), 低温反应 30min, 滴加饱和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液终止反应, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取, 有机层蒸干, 硅胶柱层析分离 (石油醚 : 乙酸乙酯 30 : 1) 得白色晶体 92mg, 收率 69%。<sup>1</sup>H

NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.12(s, 3H, -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  164.1, 164.1, 129.5, 129.5, 25.6.

[0050] ii) N-methyl-3,4-di(1H-indol-3-yl)maleimide 的制备

[0051] 在 50mL 两口瓶中置镁丝 (128mg, 5.3mmol), 室温下用 5mL THF 悬浮搅拌, 滴加溴代乙烷 (396  $\mu$ L, 5.3mmol), 室温反应 20min 后升至 45℃ 反应 30min, 滴加 8mL 甲苯溶解的吡啶 (622mg, 5.3mmol), 反应 1h 后, 缓慢滴加 8mL 甲苯溶解的 N-methyl-3,4-dibromomaleimide (286mg, 1.1mmol), 后升至 110℃ 回流 2h, 降至 -5℃ 下滴加饱和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液终止反应, 乙酸乙酯萃取, 有机层浓缩, 硅胶柱层析分离 (石油醚: 乙酸乙酯 3: 1) 得红色固体粉末 N-methyl-3,4-di(1H-indol-3-yl)maleimide 263mg, 收率 73%。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  11.70(s, 2H, NH), 7.77(d, 2H, J = 2.3Hz, Ar-H), 7.38(d, 2H, J = 8.2Hz, Ar-H), 6.98(t, 2H, J = 7.7Hz, Ar-H), 6.82(d, 2H, J = 7.8Hz, Ar-H), 6.64(t, 2H, J = 7.8Hz, Ar-H), 3.04(s, 3H, -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  172.4, 136.6, 129.7, 127.6, 125.9, 122.2, 121.5, 119.9, 112.3, 106.2, 24.5. ESI-MS m/z 342.1 [M+H]<sup>+</sup>.

[0052] iii) 3,4-di(1H-indol-3-yl)maleic anhydride 的制备

[0053] 在 50mL 单口瓶中, 用 20mL 10% 的 KOH 溶液悬浮 N-methyl-3,4-dibromomaleimide (120mg, 0.35mmol), 110℃ 下回流 30min 后冷却至室温, 滴加 2N 盐酸酸化, 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 真空浓缩, 硅胶柱层析分离 (纯 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 得红色固体 104mg, 收率 90%。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  11.93(d, 2H, J = 2.8Hz, NH), 7.86(d, 2H, J = 2.8Hz, Ar-H), 7.44(d, 2H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.04(t, 2H, J = 8.2Hz, Ar-H), 6.87(d, 2H, J = 7.7Hz, Ar-H), 6.71(t, 2H, J = 7.7Hz, Ar-H). <sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  167.1, 136.7, 131.1, 125.8, 125.5, 122.6, 121.7, 120.4, 112.7, 105.5. ESI-MS m/z 329.1 [M+H]<sup>+</sup>.

[0054] iv) 3,4-di(1H-indol-3-yl)maleimide 的制备

[0055] 以化合物 (1) 的制备方法, 从 3,4-di(1H-indol-3-yl)maleic anhydride (100mg, 0.3mmol)、HMDS (6.4mL, 30.5mmol)、MeOH (0.61mL, 15.2mmol) 制得橙红色粉末 3,4-di(1H-indol-3-yl)maleimide 70mg, 收率 71%。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  11.65(brs, 2H, NH), 10.89(brs, 1H, NH), 7.72(d, 2H, J = 2.8Hz, Ar-H), 7.36(d, 2H, J = 8.2Hz, Ar-H), 6.96(dt, 2H, J = 8.2Hz, 1.0Hz, Ar-H), 6.79(d, 2H, J = 7.8Hz, Ar-H), 6.61(dt, 2H, J = 8.2, 1.0Hz, Ar-H). <sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  173.6, 136.4, 129.6, 128.2, 125.9, 122.1, 121.4, 119.8, 112.3, 106.1. ESI-MS m/z 328.2 [M+H]<sup>+</sup>.

[0056] v) N, N, N-trihydroxy-3,4-di(1H-indol-3-yl)maleimide (5) 的制备

[0057] 以化合物 2 的制备方法, 从 3,4-di(1H-indol-3-yl)maleimide (76.5mg, 0.23mmol)、NaHCO<sub>3</sub> (98mg, 1.17mmol) 和甲醛溶液制得红色粉末状固体 (5) 96mg, 收率 99%。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.95(s, 2H, Ar-H), 7.55(d, 2H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.03(t, 2H, J = 7.3Hz, Ar-H), 6.76(d, 2H, J = 8.2Hz, Ar-H), 6.64(t, 2H, J = 7.3Hz, Ar-H), 5.60(s, 4H, indole-CH<sub>2</sub>-OH), 4.98(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH). <sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  171.6, 136.0, 132.4, 127.6, 127.0, 122.4, 121.5, 120.6, 111.4, 105.9, 69.7, 60.9. HR-ESIMS [M+Na]<sup>+</sup> m/z 440.1236 (计算值 440.1222)。

[0058] 化合物 6 的制备

[0059] i) 1,2,3,4,6-penta-O-acetylglucose

[0060] 在 100mL 单口瓶中, 加葡萄糖 (2g, 11.1mmol)、无水乙酸钠 (2.5g, 30.5mmol)、乙酸

酐 12.5mL, 110℃回流, 原料至回流温度时溶解, 反应液澄清, 反应 5min 后又变浑浊, 30min 后反应完全, 趁热将反应液倒入约 100g 碎冰中, 搅拌产生大量白色固体, 冰溶解后抽滤, 无水乙醇重结晶, 得白色粉末 4.1g, 收率 95%。

[0061] ii) 2,3,4,6-tetra-O-acetylglucose

[0062] 在 N<sub>2</sub> 保护下, 在 50mL 两口瓶中, 用 10mL 无水 THF 溶解 1,2,3,4,6-penta-O-acetylglucose (525mg, 1.35mmol), -5℃下滴加苄胺 (0.22mL, 2.02mmol), 缓慢升至室温, 反应过夜, 点板检测反应完全, 真空蒸干, 硅胶柱层析 (石油醚: 乙酯: 3: 1) 得白色固体 441mg, 收率 94%。

[0063] iii) 1-O-(2,2,2-trichloro-1-iminoethxyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetylglucose

[0064] 在两口瓶中 N<sub>2</sub> 保护下, 用 5mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶解 2,3,4,6-tetra-O-acetylglucose (390mg, 1.12mmol), -5℃下滴加三氯乙腈 (1.35mL, 13.45mmol), 滴加催化量的 DBU, 反应液由微黄色变为浅黄色, 反应 30min 后, 真空蒸干, 硅胶柱层析 (石油醚: 乙酯 4: 1) 得乳白色固体 381mg, 收率 70%。

[0065] iv) O-[2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-[1-(2-cyanoethyl)-1H-indol-3-yl]maleimiomethyl]-α-D-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl)glucopyranosides (6d)

[0066] 将化合物 1-O-(2,2,2-trichloro-1-iminoethxyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetylglucose (10mg, 22.8 μmol) 和化合物 (1) (7.5mg, 15.2 μmol) 气泵抽干后加到 15mL 两口瓶中, 在干燥器中抽 3h。分子筛用马弗炉烘干后粉碎, 粉末用酒精喷灯烧 30min, 气泵抽冷后加约 200mg 至反应瓶中, 加入 5mL 干燥的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 气泵换 N<sub>2</sub> 三次, 降至 -20℃下反应 20min, 滴加 2 μL BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, 立即由红色变为紫色, 继而回复红色, 升至室温反应 10h, 反应完全。降至 -5℃, 加 10mg NaHCO<sub>3</sub> 终止反应, 抽滤, 蒸干溶剂, 凝胶柱层析 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>OH 1: 1) 得 16.7mg 红色固体 6d, 收率 95%。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.79 (s, 1H, Ar-H), 7.61 (s, 1H, Ar-H), 7.31 (d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.30 (d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.17 (t, 1H, J = 8.3Hz, Ar-H), 7.11 (t, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 7.08 (d, 1H, J = 8.2Hz, Ar-H), 6.86 (d, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 6.85 (t, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 6.77 (t, 1H, J = 7.3Hz, Ar-H), 5.36/5.28 (d, 2H, J = 11.5Hz, N-CH<sub>2</sub>-O), 5.19 (t, 1H, J = 10.0Hz, Glc-C3-H), 5.10 (t, 1H, J = 10.0Hz, Glc-C2-H), 5.00 (t, 1H, J = 10.0Hz, Glc-C4-H), 4.86 (d, 1H, J = 8.2Hz, Glc-C1-H), 4.46 (t, 2H, J = 7.3Hz, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CN), 4.21 (q, 2H, J = 7.3Hz, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.18/4.03 (dd, 2H, J = 2.8Hz, 12.4Hz, Glc-C6-H<sub>2</sub>), 3.70 (dt, 1H, J = 3.7Hz, 10.1Hz, Glc-C5-H), 2.82 (t, 2H, J = 7.3Hz, -CH<sub>2</sub>-CN), 1.94-1.99 (s, 12H, 4-COCH<sub>3</sub>), 1.49 (t, 3H, J = 7.3Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 171.4, 171.3, 170.8, 170.4, 169.5, 169.4, 136.2, 135.5, 131.9, 130.9, 129.0, 126.5, 125.9, 125.8, 123.2, 122.8, 122.5, 122.4, 121.0, 120.5, 116.8, 109.8, 109.0, 107.3, 105.5, 100.0, 73.0, 72.1, 71.2, 68.1, 66.2, 61.6, 42.4, 41.6, 20.8, 20.7, 20.6, 20.6, 19.0, 15.3. ESI-MSm/z 791.4 [M+Na]<sup>+</sup>。

[0067] v) O-[2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-[1-(2-cyanoethyl)-1H-indol-3-yl]maleimiomethyl]-α-D-glucopyranoside (6)

[0068] 在单口瓶中, 将样品 6d 用 1mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶解, 加 4mL 无水甲醇, 0℃搅拌下滴加 NaOMe/MeOH, 至 pH 9~10, 升至室温反应 30min, 点板反应完全, 0℃下加饱和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液终止反应。乙酸乙酯萃取, 蒸干, 凝胶柱层析 (CH<sub>3</sub>OH) 分离得红色固体, 收率 100%。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$  7.94 (s, 1H, Ar-H), 7.87 (s, 1H, Ar-H), 7.60 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, Ar-H), 7.48 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, Ar-H), 7.06 (t, 1H,  $J = 7.8$  Hz, Ar-H), 7.04 (t, 1H,  $J = 7.3$  Hz, Ar-H), 6.82 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz, Ar-H), 6.78 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 6.68 (t, 2H,  $J = 7.8$  Hz, Ar-H), 5.20/5.14 (d, 2H,  $J = 11.0$  Hz, N-CH<sub>2</sub>-O), 5.10 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz, Glc-C1-H), 4.99 (d, 1H,  $J = 3.7$  Hz, Glc-C2-OH), 4.92 (d, 1H,  $J = 3.7$  Hz, Glc-C3-OH), 4.60 (t, 2H,  $J = 6.7$  Hz, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 4.47 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, Glc-C6-OH), 4.41 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, Glc-C4-OH), 4.27 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.62 (m, 1H, Glc-C2-H), 3.48 (m, 1H, Glc-C3-H), 3.11 (m, 2H, Glc-C6-H<sub>2</sub>), 3.09 (m, 1H, Glc-C4-H), 3.04 (t, 2H,  $J = 6.7$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CN), 2.95 (m, 1H, Glc-C5-H), 1.34 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  171.5, 171.4, 136.1, 136.0, 132.5, 132.4, 128.4, 126.7, 126.4, 126.3, 122.6, 122.4, 122.0, 121.8, 120.5, 120.4, 119.0, 110.9, 110.7, 106.2, 105.3, 103.0, 77.6, 77.3, 73.8, 70.2, 66.2, 61.4, 41.9, 41.3, 19.1, 15.8. HR-ESIMS [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  623.2139 (计算值 623.2118)。

[0069] 化合物 7 的制备

[0070] i) 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1H-indol-3-yl)maleic anhydride (7c) 的制备

[0071] 在 50mL 单口瓶中, 用 20mL 10% 的 KOH 溶液悬浮化合物 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1H-indol-3-yl)maleimide (50mg, 0.14mmol), 110 °C 下回流 40min 后冷却至室温, 滴加 2N 盐酸酸化, 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 真空浓缩, 硅胶柱层析分离 (纯 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 得红色固体 (7c) 43mg, 收率 86%。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  11.96 (s, 1H, NH), 7.89 (d, 1H,  $J = 2.8$  Hz, Ar-H), 7.83 (s, 1H, Ar-H), 7.52 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 7.44 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 7.10 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, Ar-H), 7.05 (t, 1H,  $J = 7.7$  Hz, Ar-H), 6.98 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, Ar-H), 6.78 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz, Ar-H), 6.77 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz, Ar-H), 6.70 (t, 1H,  $J = 7.1$  Hz, Ar-H), 4.25 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.30 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  167.1, 167.0, 136.8, 136.2, 133.1, 131.3, 128.7, 127.9, 126.1, 125.2, 122.7, 122.7, 122.2, 121.9, 120.7, 120.5, 112.8, 111.0, 105.5, 104.8, 41.4, 15.7. ESI-MS  $m/z$  357.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0072] ii) N-(2-aminoethyl)-2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1H-indol-3-yl)maleimide (7) 的制备

[0073] 在 10mL 单口瓶中, 用 2mL DMF 将化合物 7c (40mg, 0.11mmol) 溶解, 搅拌下加入乙二胺 (75  $\mu$ L, 1.1mmol), 反应液由红色变为橙黄色, 室温反应过夜, 又恢复橙红色, 水与乙酸乙酯萃取, 有机层蒸干, 硅胶柱层析分离 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH : 10 : 1) 得红色固体 (7) 42.5mg, 收率 95%。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  11.89 (brs, 1H, NH), 7.80 (s, 1H, Ar-H), 7.72 (s, 1H, Ar-H), 7.47 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 7.41 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 7.05 (t, 1H,  $J = 7.1$  Hz, Ar-H), 6.99 (t, 1H,  $J = 7.1$  Hz, Ar-H), 6.97 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, Ar-H), 6.75 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, Ar-H), 6.72 (t, 1H,  $J = 7.7$  Hz, Ar-H), 6.63 (t, 1H,  $J = 7.1$  Hz, Ar-H), 4.3-4.7 (brs, 2H, -NH<sub>2</sub>), 4.23 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.73 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 2.97 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 1.30 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  172.3, 172.2, 136.7, 136.0, 131.9, 129.9, 127.8, 127.0, 126.6, 125.5, 122.3, 122.2, 122.1, 121.7, 120.1, 119.9, 112.5, 110.7, 106.1, 105.6, 41.2, 39.4, 38.5, 15.8. HR-ESIMS [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$

z399.1826 (计算值 399.1821)。

**[0074] 化合物 8 的制备**

**[0075]** 在敞口石英瓶中,用 1.0L 丙酮溶解化合物 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-[1-(2-cyanoethyl)-1H-indol-3-yl]maleimide(1) (50mg,0.12mmol),加催化量的  $I_2$ ,在 250W 汞灯下照射搅拌 24h,真空蒸去大部分溶剂后倒入到 100mL 饱和的  $Na_2S_2O_3$  溶液中,搅拌 10min,乙酸乙酯萃取 (50mL $\times$ 3),无水  $Na_2SO_4$  干燥,真空蒸干,硅胶柱分离 (石油醚:乙酸乙酯 3:1),得黄色荧光粉末 3-(13-ethyl-5,7-dioxo-6,7-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-12(13H)-yl)propanenitrile(8)42mg,收率 87%。 $^1H$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.21(s,1H, N-H),9.14(d,1H, J = 6.9Hz, Ar-H),9.13(d,1H, J = 6.9Hz, Ar-H),7.98(d,1H, J = 8.2Hz, Ar-H),7.92(d,1H, J = 8.2Hz, Ar-H),7.67(t,1H, J = 6.9Hz, Ar-H),7.66(t,1H, J = 7.3Hz, Ar-H),7.47(t,1H, J = 7.7Hz, Ar-H),7.44(t,1H, J = 7.3Hz, Ar-H),5.06(t,2H, J = 6.4Hz, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-),4.73(q,2H, J = 6.9Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>),2.69(t,2H, J = 6.4Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CN),1.06(t,3H, J = 6.9Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)。  $^{13}C$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.2,171.2,144.9,143.7,133.5,133.1,128.3,128.2,125.6,125.4,124.3,124.0,122.6,122.0,121.9,121.2,120.9,120.8,118.3,113.4,113.3,44.1,43.9,16.5,14.0. HR-ESIMS[M-H]<sup>-</sup> m/z405.1337 (计算值 405.1352)。

**[0076] 化合物 9 的制备**

**[0077]** i) 12-ethyl-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7(6H)-dione(9e)

**[0078]** 在 250mL 单口瓶中,将化合物 2-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(1H-indol-3-yl)maleimide(400mg,1.13mmol)、DDQ(282mg,1.24mmol)、p-TsOH(214mg,1.13mmol) 用 100mL 苯溶解,  $N_2$  保护条件下回流 30min,蒸干溶剂,100mL 乙酸乙酯重新溶解,分别用饱和  $NaHSO_3$  溶液、水、盐洗,有机层用无水  $Na_2SO_4$  干燥,蒸干,凝胶柱层析分离 ( $CH_2Cl_2$ : MeOH 1:1) 得黄色粉末 (9e)280mg,产率 70%。 $^1H$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.91(s,1H, NH),10.99(s,1H, NH),9.08(d,1H, J = 6.6,16.3. Hz, Ar-H),9.07(t,1H, J = 7.2Hz, Ar-H),7.78(d,1H, J = 8.3Hz, Ar-H),7.72(d,1H, J = 8.3Hz, Ar-H),7.55(t,1H, J = 7.2Hz, Ar-H),7.54(t,1H, J = 7.2Hz, Ar-H),7.34(d,1H, J = 7.7Hz, Ar-H),7.33(t,1H, J = 7.2Hz, Ar-H),4.88(q,2H, J = 6.6Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>),1.40(t,3H, J = 6.6Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)。  $^{13}C$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.7,171.6,141.6,141.0,139.7,129.7,128.6,127.3,125.5,125.2,124.9,121.8,121.5,120.7,120.5,120.3,117.3,116.4,112.5,110.1,39.6,16.3. ESI-MSm/z354.1[M+H]<sup>+</sup>。

**[0079]** ii) 12-ethyl-6-(hydroxymethyl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7(6H)-dione(9)

**[0080]** 将化合物 9e(100mg) 用 4ml 甲醛溶液悬浮,85℃下搅拌反应 48h,乙酸乙酯和水萃取,有机层用无水  $Na_2SO_4$  干燥,蒸干。硅胶柱层析分离 (石油醚:乙酸乙酯 2:1) 得黄色粉末 (9)110mg,产率 98%。 $^1H$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.06(s,1H, NH),9.15(d,1H, J = 7.8Hz, Ar-H),9.12(d,1H, J = 8.2Hz, Ar-H),7.85(d,1H, J = 8.7Hz, Ar-H),7.83(d,1H, J = 8.3Hz, Ar-H),7.64(dt,1H, J = 1.4Hz,7.5Hz, Ar-H),7.60(dt,1H, J = 1.4Hz,7.6Hz, Ar-H),7.41(dt,1H, J = 1.0Hz,6.9Hz, Ar-H),7.39(dt,1H, J = 1.0Hz,6.9Hz, Ar-H),6.36(t,1H, J = 6.8Hz, -OH),5.09(d,2H, J = 6.8Hz, -CH<sub>2</sub>-OH),4.97(q,2H, J = 6.9Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>),1.45(t,

3H,  $J = 6.9\text{Hz}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  169.1, 169.1, 141.2, 140.6, 129.3, 128.2, 127.1, 127.1, 124.5, 124.1, 121.1, 120.9, 120.5, 120.4, 118.8, 118.6, 116.9, 116.0, 112.2, 109.9, 59.9, 40.1, 15.7. HR-ESIMS  $[\text{M}-\text{H}]^- m/z$  382.1189 (计算值 382.1192)。

[0081] 化合物 10 的制备

[0082] 以化合物 3 的制备方法, 用溴代丁腈为原料, 可得 2,3-bis[1-(3-cyanopropyl)-1H-indol-3-yl]maleimide(10d)。以化合物 8 的制备方法, 从化合物 10d(50.0mg, 0.108mmol)、 $\text{I}_2$ (2.0mg, 0.008mmol) 制得黄色粉末 4,4'-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-8,9-diyl)dibutanenitrile(10) 23mg, 收率 45%。 $^1\text{H}$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.2(s, 1H, NH), 9.14(d, 2H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 7.89(d, 2H,  $J = 8.2\text{Hz}$ , Ar-H), 7.66(t, 2H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 7.44(t, 2H,  $J = 7.8\text{Hz}$ , Ar-H), 4.81(t, 4H,  $J = 6.9\text{Hz}$ ,  $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 2.13(t, 4H,  $J = 6.9\text{Hz}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CN}$ ), 1.71(m, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.2, 144.3, 133.2, 128.1, 125.5, 123.9, 122.2, 121.6, 120.5, 120.2, 113.3, 47.5, 24.2, 14.2. HR-ESIMS  $[\text{M}-\text{H}]^- m/z$  458.1604 (计算值 458.1617)。

[0083] 【实施例 2】抗肿瘤活性的测试

[0084] 1 细胞毒活性

[0085] 1.1 测试方法

[0086] 被测样品溶液的配制: 测试样品为上述实施例 1 中合成的单体化合物 1 ~ 10。准确称取适量样品, 用 DMSO 配制成所需浓度的溶液, 供活性测试。

[0087] 细胞系及细胞的继代培养: 活性测试采用 A549、BEL-7402 和 HL-60 细胞系。各种细胞均用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 在 37℃ 通入 5% 二氧化碳的培养箱中继代培养。

[0088] 细胞增殖抑制活性测试方法

[0089] 本发明采用 MTT 法, 测试评价了被测试样品对 HL-60 癌细胞增殖的抑制活性。活细胞线粒体中脱氢酶能够代谢还原黄色的溴化 3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑为蓝紫色的不溶于水的 formazan, formazan 的多少可通过酶标仪测定其吸收度求得。由于 formazan 的量与活细胞数成正比, 所以可根据吸收度求出活细胞的数目, 从而了解药物抑制或杀伤肿瘤细胞的能力。活性测试时, 取对数生长期的 HL-60 细胞, 用新鲜的 RPMI-1640 培养基配制成密度为每毫升  $5 \times 10^4$  个细胞的细胞悬液, 按每孔 200  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中, 在 37℃ 下培养 24 小时后, 每孔加入 2  $\mu\text{L}$  不同浓度的样品溶液, 继续培养 72 小时。然后加入 20  $\mu\text{L}$  含 MTT 的 RPMI-1640 溶液 (5mg/L), 再培养 4 小时, 移出 150  $\mu\text{L}$  培养液后加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解 formazan, 在 540nm 处测定其吸收度。按照  $\text{IR}\% = (\text{OD}_{\text{空白对照}} - \text{OD}_{\text{样品}}) / \text{OD}_{\text{空白对照}} \times 100\%$  式计算每个浓度下的细胞增殖抑制率 (IR%)。

[0090] 本发明采用 SRB 法, 测试评价了被测试样品对 A549 和 BEL-7402 癌细胞增殖的抑制活性。SRB 是一种蛋白质结合染料, 可与生物大分子中的碱性氨基酸结合, 其结合产物在 515nm 波长的 OD 读数与细胞数呈良好的线性关系, 故可用作细胞数的定量。取对数生长期的 A549 和 BEL7402, 用新鲜的 RPMI-1640 培养基配制成密度为每毫升  $2 \times 10^5$  个细胞的细胞悬液, 按每孔 200  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中, 每孔加入 2  $\mu\text{L}$  不同浓度的样品溶液, 32℃ 下培养 17h。然后每孔加入 80% 三氯醋酸 50  $\mu\text{L}$ , 置于 4℃ 固定 1h, 用水冲洗 5 次并空气干燥。每孔加入 0.4% SRB 的醋酸溶液 50  $\mu\text{L}$  并在室温静置 30min。用 1% 醋酸水清洗 4 次, 除去未

结合的游离 SRB 染料。每孔加入 150  $\mu$  L Tris 缓冲液 (10 mmol/L, pH 10.5) 溶解蛋白结合染料, 在 520 nm 处测定其吸收度。按照  $IR\% = (OD_{\text{空白对照}} - OD_{\text{样品}}) / OD_{\text{空白对照}} \times 100\%$  式计算每个浓度下的细胞增殖抑制率 (IR%)。

[0091] 1.2 实验结果

[0092] 由活性测试结果发现, 双咪唑马来酰亚胺化合物的活性比其关环后得到的相应的咪唑吡唑化合物的抗肿瘤活性强, 可能与后者水溶性差, 分子柔性小有关。此外, 取代基的长短对活性有一定的影响, 当取代基长度适中时, 活性最佳。

[0093] 表 1. 化合物 1 ~ 10 的对人肿瘤细胞的增殖抑制活性 ( $IC_{50}$ ,  $\mu$  M)

[0094]

Tumor cell lines	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HL-60	0.07	8.6	1.0	2.7	> 100	> 100	3.2	11.0	9.0	> 100
A549	/	8.9	4.5	4.6	/	> 100	> 50	/	8.6	> 100
BEL-7402	12	/	/	/	/	/	/	14.0	21.0	/

[0095] 2PKC 抑制活性测试: 利用荧光偏振方法, 测试化合物对蛋白激酶 PKC  $\beta$  II 的抑制活性, 结果表明 MDZ-03(9) 对 PKC  $\beta$  II 具有明显抑制作用, 其  $IC_{50}$  值约 3.3  $\mu$  M。

[0096] 3 结论

[0097] 化合物 1 ~ 10 对人来源的癌细胞具有抗肿瘤作用, 其中化合物 1、3 对 HL-60 细胞表现出较强的抑制活性, 化合物 9 还具有较强的 PKC  $\beta$  II 的抑制活性, 预示着其在预防和治疗肿瘤药物方面具有广泛的前景。因此, 本发明的式 I、式 II 化合物可作为抗肿瘤剂 (即抗肿瘤药物) 用于肿瘤的治疗, 也可作为细胞增殖抑制的低分子生物探针用于探索生命现象本质的生命科学实验研究中。