



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102850337 A

(43) 申请公布日 2013.01.02

(21) 申请号 201110180791.7

(22) 申请日 2011.06.30

(71) 申请人 四川大学

地址 610041 四川省成都市人民南路三段  
17 号四川大学华西药学院

(72) 发明人 何菱 邓昱星 李举联

(74) 专利代理机构 成都立信专利事务所有限公  
司 51100

代理人 濮家蔚

(51) Int. Cl.

C07D 413/04 (2006.01)

A61K 31/423 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

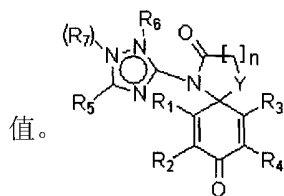
权利要求书 2 页 说明书 13 页

### (54) 发明名称

多氮唑联螺烯酮类化合物及其制备方法和用  
途

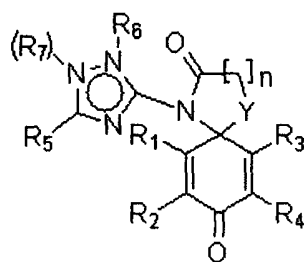
### (57) 摘要

多氮唑联螺烯酮类化合物及其制备方法和用  
途。多氮唑联螺烯酮类化合物的结构如式 (I) 所  
示, 式中各取代基 R 可以同时或分别为氢、烃基、  
烃氧基、卤元素等, Y 为 -O-、-S-、-NH-, n = 1 或  
2。实验显示, 该多氮唑联螺烯酮类化合物具有显  
著的抗肿瘤活性, 具有作为抗肿瘤药物的应用价  
值。



(I)

1. 多氮唑联螺烯酮类化合物, 结构如式 (I) 所示,

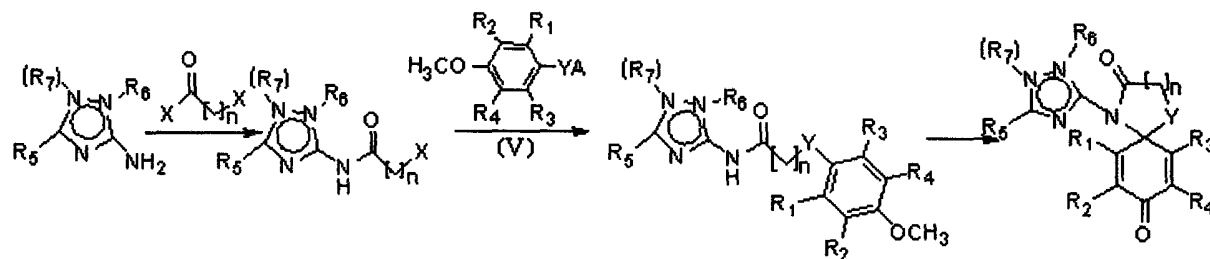


(I)

式中:  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  同时或分别为 H,  $C_{1-3}$ -烷基,  $C_{1-3}$ -烷氧基或卤元素;  $R_5$ 、 $R_6$  同时或分别为 H,  $C_{1-3}$ -烷基, 卤元素, 苯基或是由甲基、甲氧基、卤元素、氨基、硝基单取代或非邻位二取代的苯基, 萘基或是由甲基、甲氧基、卤元素、氨基、硝基的  $\alpha$ 、 $\beta$  单取代或二取代的萘基, 噻吩 2-基, 喹啉 6-基, 或是由甲基、甲氧基、卤元素、氨基、硝基单取代的噻吩 2-基, 或是由甲基、甲氧基、卤元素、氨基、硝基单取代的喹啉 6-基;  $R_7$  为 H 或  $C_{1-3}$ -烷基, 且  $R_6$  和  $R_7$  不同时存在; Y 为 -O-、-S-、-NH-;  $n = 1$  或 2。

2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征是所说式 (I) 中的  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中的卤元素为 Cl 或 Br;  $R_5$ 、 $R_6$  同时或分别为 H,  $C_{1-3}$ -烷基, Cl, Br, 苯基, 噻吩 2-基或喹啉 6-基。

3. 制备权利要求 1 或 2 所述多氮唑联螺烯酮类化合物的方法, 其特征是按下述步骤进行, 反应式中的  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、Y 和  $n$  与权利要求 1 相同:



(II)

(III)

(IV)

(I)

1': 将 5-氨基-三唑环衍生物原料 (II) 与卤代酰卤在有机碱性环境中反应, 得到相应中间体 (III);

2': 将上步的中间体 (III) 与式 (V) 化合物反应, 得到相应的中间体 (IV), 其中, 式 (V) 化合物中的 YA 为 -ONa、-SNa 或 -NH<sub>2</sub>;

3': 将中间体 (IV) 在氧化剂和催化剂下环合后, 得到相应的目标产物 (I), 所说的氧化剂包括碘苯醋酸酯、三氟乙酰碘苯、碘氧苯、四醋酸铅或二氧化锰, 所说的催化剂包括氯化铜、碘化亚铜、溴化铜、三氟甲烷磺酸铜或醋酸铯中的至少一种, 反应溶剂为氯仿、二甲基甲酰胺、四氢呋喃、1,2-二氯乙烷、甲苯、丙酮或二氯甲烷中的至少一种。

4. 如权利要求 3 所述的制备方法, 其特征是所说的第 1' 步反应在以二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、四氯化碳、N,N-二甲基甲酰胺或甲苯为介质的反应环境进行。

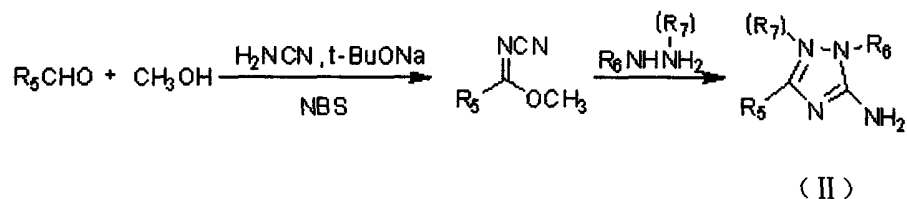
5. 如权利要求 3 所述的制备方法, 其特征是所说第 1' 步的有机碱性环境为在乙二胺、N,N-二甲基乙二胺、1,8-二氮杂二环 [5.4.0] 十一稀-7、NaH、叔丁醇钾或三乙胺中的至少一种存在下的反应介质环境。

6. 如权利要求 3 所述的制备方法, 其特征是所说的第 1' 步反应中所说的卤代酰卤成

分包括氯乙酰氯、溴乙酰氯、氯丙酰氯、溴丙酰氯中的一种。

7. 如权利要求 3 所述的制备方法,其特征是所说的第 2' 步反应在二甲基亚砆、四氢呋喃、丙酮、氯仿、二氯甲烷或二甲基甲酰胺为反应介质中进行。

8. 如权利要求 3 至 7 之一的制备方法,其特征是所说的 5-氨基-三唑环衍生物原料 (II) 按下述方式制备得到:



1': 将甲醛衍生物和氰胺加入甲醇中,依次加入叔丁醇钠和 N-溴代丁二酰亚胺反应得到相应的氰亚胺酯中间体;

2': 将氰亚胺酯中间体和肼类衍生物在甲醇、乙醇、二甲基甲酰胺、甲苯、或二甲基亚砆反应介质中充分反应,得到所说的 5-氨基-三唑衍生物原料 (II)。

9. 如权利要求 3 至 7 之一的制备方法,其特征是所说的式 (V) 化合物为将对-甲氧基苯酚衍生物或对-甲氧基苯硫酚衍生物溶于四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、甲苯、乙酸乙酯、二氯甲烷或氯仿中,用 NaH、LiAlH<sub>4</sub>、NaBH<sub>4</sub>、NaOH 或 KOH 制备得到相应的对-甲氧基苯酚钠或对-甲氧基苯硫酚钠类的化合物。

10. 以权利要求 1 或 2 的多氮唑联螺烯酮类化合物作为抗肿瘤药物的应用。

## 多氮唑联螺烯酮类化合物及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本申请涉及一种多氮唑联螺烯酮类衍生物及其制备方法和作为抗肿瘤药物的应用。

### 背景技术

[0002] 抗肿瘤药物目前是药物研发领域十大最受关注的药物之一。抗肿瘤药物的研究, 尤其如何获得基于不同构效关系、不同作用靶点的不具抗药性的新型抗肿瘤药物的研究, 是具有重大意义的。

[0003] 研究发现, 多氮唑类化合物是常具有多种生物活性的结构单元, 在医药、农药等方面甚至常成为其分子中的关键活性结构单元, 特别是 1,2,4-三唑类化合物, 又是其中重要的一类结构。例如在一些抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗结核、抗癌、抗抑郁、抗惊厥、抗炎、镇痛等药物的结构中, 1,2,4-三唑具有相当广泛的生物活性。不少 1,2,4-三唑衍生物已经作为临床药物, 如抗肿瘤药伏氯唑 (Vorzole)、来曲唑 (Letrozole)、阿纳司唑 (Anastrozole) 等药物结构中, 都具有 1,2,4-三唑结构单元。

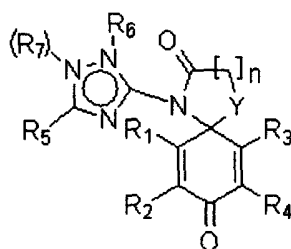
[0004] 已有的研究表明 3-苯基喹唑啉酮、苯并噁唑 [2.3-b] 喹唑啉酮、苯并硫氮唑 [2.3-b] 喹唑啉酮、苯并 [b] 萘并 [2.3-d] 呋喃-6,11-二酮、5H-苯并 [b] 萘并 [2.3-d] 吡咯-6,11-二酮等化合物体外活性筛选显示具有良好的抗肿瘤活性。而这些化合物的共同特点, 是都包含醌型结构单元、氮原子和三环结构。

### 发明内容

[0005] 针对上述情况, 本发明首先提供了一种新的多氮唑联螺烯酮类杂环化合物, 并进一步提供其制备方法, 以及该化合物在抗肿瘤方面的应用。

[0006] 本发明的多氮唑联螺烯酮类化合物, 结构如式 (I) 所示:

[0007]



(I)

[0008] 式 (I) 中的  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  可以同时或分别为 H,  $C_{1-3}$ -烷基,  $C_{1-3}$ -烷氧基或卤元素;  $R_5$ 、 $R_6$  可以同时或分别为 H,  $C_{1-3}$ -烷基, 卤元素, 苯基或是由甲基、甲氧基、Cl、Br、氨基、硝基以 2-,3-,4-位的单取代、或如 2-,4-位、2-,5-位、3-,5-位、2-,6-位等非邻位形式的二取代的苯基, 萘基或是由甲基、甲氧基、卤元素、氨基、硝基的  $\alpha$ -、 $\beta$ -单取代或二取代的萘基, 噻吩 2-基, 喹啉 6-基, 或是由甲基、甲氧基、卤元素、氨基、硝基以 3-,4-,5-位

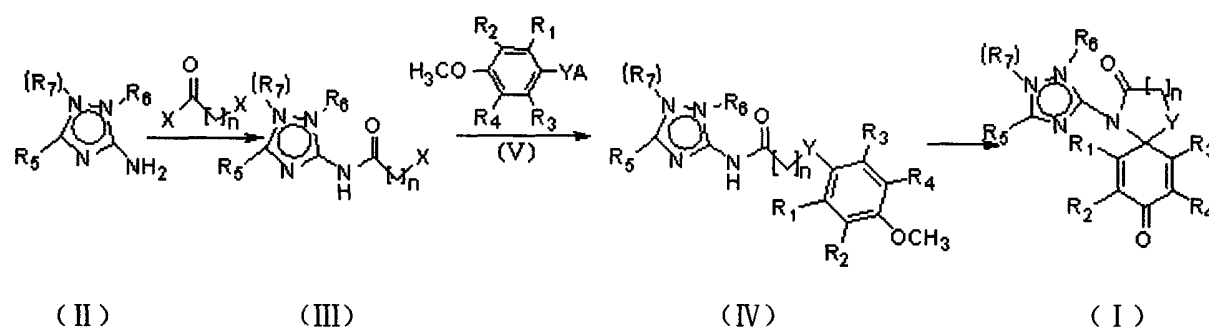
单取代的噻吩 2-基,或是由甲基、甲氧基、卤元素、氨基、硝基以 2-、3-、4-、5-、7-、8- 为单取代的喹啉 6-基; $R_7$  可以为 H 或  $C_{1-3}$ - 烃基,并且由于其所在的三氮唑环可因双键易位而存在有不同的异构体形式,因此  $R_6$  和  $R_7$  在三氮唑环的各异构体中是不同时存在的; $Y$  可以为  $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ ;  $n = 1$  或  $2$ 。

[0009] 上述式 (I) 化合物结构中,各取代基中所说的卤元素,都以最常用且稳定性高的 Cl 或 Br 作为优选。

[0010] 此外,上述的式 (I) 化合物结构中, $R_5$ 、 $R_6$  优选为同时或分别为 H、 $C_{1-3}$ - 烃基、Cl、Br、苯基、噻吩 2-基或喹啉 6-基。

[0011] 上述式 (I) 多氮唑联螺烯酮类化合物的基本制备方法,可以按下述方式进行。反应式中的  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $Y$  和  $n$  与上述式 (I) 化合物中的各对应取代基相同:

[0012]



[0013] 1': 将 5-氨基-三唑环衍生物原料 (II) 与卤代酰卤在有机碱性环境中反应,得到相应中间体 (III);

[0014] 2': 将上步的中间体 (III) 与式 (V) 化合物反应,得到相应的中间体 (IV),其中,式 (V) 化合物中的  $YA$  为  $-ONa$ 、 $-SNa$  或  $-NH_2$ ;

[0015] 3': 将中间体 (IV) 在氧化剂和催化剂下环合后,得到相应的目标产物 (I)。所说的氧化剂包括碘苯醋酸酯、三氟乙酰碘苯、碘氧苯、四醋酸铅或二氧化锰;所说的催化剂包括氯化铜、碘化亚铜、溴化铜、三氟甲烷磺酸铜或醋酸铈中的至少一种。反应介质可以选择包括氯仿、 $N,N$ -二甲基甲酰胺 (DMF)、四氢呋喃 (THF)、1,2-二氯乙烷、甲苯、丙酮或二氯甲烷等多种溶剂中的至少一种。实验显示,此步反应在  $-15^{\circ}\text{C} \sim 100^{\circ}\text{C}$  的宽温度条件下都可以顺利进行和完成。如需要,此步反应完成后,还可以进一步将反应溶液用聚酰胺或硅胶等常用方法进行分离纯化,即可得到纯化的式 (I) 结构产物。

[0016] 上述第 1' 步由 5-氨基-三唑环衍生物原料 (II) 与卤代酰卤制备相应中间体 (III) 的反应,一般在包括二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、四氯化碳、 $N,N$ -二甲基甲酰胺 (DMF) 或甲苯等多种介质中进行都是允许的。所说的有机碱性环境,可以选择通常使用的如乙二胺、 $N,N$ -二甲基乙二胺、1,8-二氮杂二环 [5.4.0] 十一稀-7 (DBU)、 $\text{NaH}$ 、叔丁醇钾或三乙胺中至少一种存在下所形成的碱性条件。所说的卤代酰卤,可以选择如氯乙酰氯、溴乙酰氯、氯丙酰氯、溴丙酰氯等中的任何一种。

[0017] 对上述中间体 (III) 的进一步具体制备方法和过程,可以参照如 Banks, M.B. et. : Enantiospecific preparation of [(2,6)-endo]-5-aza-1,10,10-trimethyl-3-oxatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one by a nitrene-mediated route from [(1)-endo]-(-)-borneol and its utility as a chiral auxiliary in some

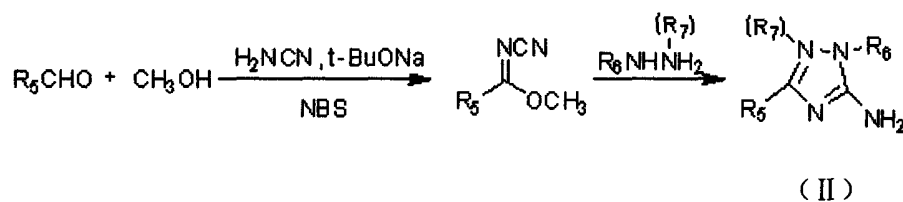
asymmetric transformations(Tetrahedron 1992,48, (37),7979-8006) 等已有文献报道的方式进行。

[0018] 上述第 2' 步由所说的中间体 (III) 与式 (V) 化合物制备中间体 (IV) 的反应,通常可以选择在包括二甲基亚砜 (DMSO)、四氢呋喃 (THF)、丙酮、氯仿、二氯甲烷或 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 等在内的多种反应介质中进行。该步反应在很宽的温度范围内,例如在室温~100℃的条件下,都可以顺利地进行和完成。如需要,反应完成后,还可以进一步对反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取后,再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即可得到纯化的中间体 (IV) 产物。此步制备中间体 (IV) 更为具体的操作,还可以参照如 Palazzo,G. et. : Synthesis and Pharmacological Properties of 1-Substituted 3-Dimethylaminoalkoxy-1H-indazoles(Journal Of Medicinal Chemistry 1966,9, (1),38-41) 等文献报道的内容。

[0019] 该步反应中所说的用于与中间体 (III) 反应的式 (V) 化合物结构中的 YA,可以为 -ONa、-SNa,即相应的酚钠或硫酚钠结构时,其制备可以采用已为熟知的方法,将相应对-苯酚衍生物或对-苯硫酚衍生物溶于四氢呋喃 (THF)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、甲苯、乙酸乙酯、二氯甲烷或氯仿中,用 NaH、LiAlH<sub>4</sub>、NaBH<sub>4</sub>、NaOH 或 KOH 制备得到。

[0020] 在上述的制备方法中,所说的 5-氨基-三唑环衍生物原料 (II) 按下述方式制备得到:

[0021]



[0022] 1' :将甲醛衍生物和氰胺加入甲醇中,依次缓慢加入叔丁醇钠和 N-溴代丁二酰亚胺反应得到相应的氰亚胺酯中间体。具体的制备过程,可以参照如 Yin, P. et. :Highly efficient cyanoimidation of aldehydes(Organic Letters 2009,11, (23),5482-5485) 等文献报道的内容。

[0023] 2' :将上步的氰亚胺酯中间体和肼,在甲醇、乙醇、DMF、甲苯、或 DMSO 反应介质中充分反应,即得到所说的 5-氨基-三唑衍生物原料 (II)。具体制备方法可以参考包括如 Barluenga, J. et. :Developments in Pd Catalysis:Synthesis of 1H-1,2,3-Triazoles from Sodium Azide and Alkenyl Bromides(Angewandte Chemie International Edition 2006,45, (41),6893-6896)、Lipshutz, B. H. et. :Heterogeneous Copper-in-Charcoal-Catalyzed Click Chemistry(Angewandte Chemie International Edition 2006,45, (48),8235-8238),以及 Zarguil, A. et. :Easy access to triazoles, triazolopyrimidines, benzimidazoles and imidazoles from imidates(Tetrahedron Letters 2008,49, (41),5883-5886) 等各文献报道的内容。

[0024] 本发明通过上述过渡金属催化氮宾的转移反应,可以高区域选择性地形成三唑联螺烯酮衍生物,且制备过程简单,反应条件温和,适应性宽。

[0025] 实验结果表明,本发明上述式 (I) 结构的多氮唑联螺烯酮类化合物,对多种癌细胞都显示出显著的抗肿瘤活性,具有可作为抗肿瘤药物的应用价值。

[0026] 以下通过实施例的具体实施方式再对本发明的上述内容作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。在不脱离本发明上述技术思想情况下,根据本领域普通技术知识和惯用手段做出的各种替换或变更,均应包括在本发明的范围内。

## 具体实施方式

[0027] 实施例 1

[0028] 4-(1,3-二苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]癸-6,9-二烯-3,8-二酮化合物(LHDYX-1)的制备

[0029] 1) 依次将苯甲醛、氰胺加入甲醇中,再于冰水浴下依次缓慢加入叔丁醇钾、N-溴代丁二酰亚胺,于 20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到相应的氰亚胺酯产物。收率 70-85%。

[0030] 2) 将氰亚胺酯、苯肼加入甲醇中,20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应溶液放入冰箱冷却,抽滤,真空干燥,即得到相应的 1,3-二苯基-5-氨基-三唑。收率 65-85%。

[0031] 3) 将 1,3-二苯基-5-氨基-三唑加入新蒸二氯甲烷中,再以依次滴加入三乙胺、氯乙酰氯,-15℃~100℃下搅拌 3~48 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 2-氯-N-(1,3-二苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)乙酰胺。收率 70-85%。

[0032] 4) 将对甲氧基苯酚溶于重蒸过的 THF 溶液中,加入 NaH,室温~100℃搅拌 1~6 小时,旋干 THF,加入(III)和溶剂 DMF,混合物于 30℃~140℃搅拌 2~6 小时。反应后的反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取,再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 N-(1,3-二苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-2-(4-甲氧基苯氧)乙酰胺。收率 80-95%。

[0033] 5) 将(IV)、碘苯醋酸酯、氯化铜加入反应瓶中,加入二氯甲烷,混合物于 -15℃~100℃搅拌 4~48 小时,反应后的反应溶液用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,得到产物 4-(1,3-二苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]辛-6,9-二烯-3,8-二酮。收率 85-99%。检测结果:

[0034]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$  (ppm):

[0035] 4.56(s, 2H), 6.14(d,  $J = 10.0\text{Hz}$ , 2H), 6.56(d,  $J = 10.0\text{Hz}$ , 2H), 7.42-7.45(m, 3H), 7.50-7.56(m, 5H), 8.05-8.07(m, 2H)

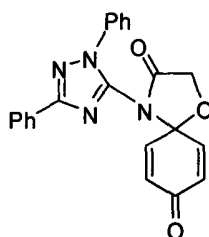
[0036]  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz)  $\delta$  (ppm):

[0037] 66.0, 88.1, 124.8, 126.4, 128.6, 129.6, 129.8, 129.9, 129.9, 131.1, 136.3, 141.7, 142.2, 161.8, 170.3, 183.5

[0038] HRMS(ESI)  $m/z$  (%) for  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3$  (M+H):

[0039] Calcd. 385.1301 Found. 385.1293。产物的结构为:

[0040]



## [0041] 实施例 2

[0042] 4-(1-甲基-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]癸-6,9-二烯-3,8-二酮(LHDYX-2)的制备

[0043] 1) 依次将苯甲醛、氰胺加入甲醇中,再于冰水浴下依次缓慢加入叔丁醇钾、N-溴代丁二酰亚胺,于 20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到相应的氰亚胺酯产物。收率 70-85%。

[0044] 2) 将氰亚胺酯、甲基胍加入甲醇中,20℃~50℃下搅拌 3~24 小时,反应溶液放入冰箱冷却,抽滤,真空干燥,即得到相应的 1-甲基-3-苯基-5-氨基-三唑。收率 50-65%。

[0045] 3) 将 1-甲基-3-苯基-5-氨基-三唑加入新蒸二氯甲烷中,再以依次滴加入三乙胺、氯乙酰氯, -15℃~100℃下搅拌 3~48 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 2-氯-N-(1-甲基-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)乙酰胺。收率 65-80%。

[0046] 4) 将对甲氧基苯酚溶于重蒸过的 THF 溶液中,加入 NaH,室温~100℃搅拌 1~6 小时,旋干 THF,加入(III)式结构化合物和溶剂 DMF,混合物于 30℃~140℃搅拌 2~6 小时。反应后的反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取,再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 N-(1-甲基-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-2-(4-甲氧基苯氧)乙酰胺。收率 70-85%。

[0047] 5) 将(IV)式结构化合物、碘苯醋酸酯、氯化铜加入反应瓶中,加入二氯甲烷,混合物于 -15℃~100℃搅拌 4~48 小时,反应后的反应溶液用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,得到产物 4-(1-甲基-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]辛-6,9-二烯-3,8-二酮。收率 80-95%。检测结果:

[0048]  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}) \delta$  (ppm):

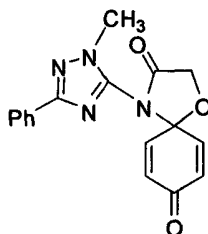
[0049] 3.88(s, 3H), 4.64(s, 2H), 6.35(d,  $J = 10.0\text{Hz}$ , 2H), 6.90(d,  $J = 10.0\text{Hz}$ , 2H), 7.39(br, 3H), 7.90-7.91(m, 2H)

[0050]  $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 100\text{MHz}) \delta$  (ppm):

[0051] 36.1, 65.8, 88.0, 125.9, 128.5, 139.5, 130.1, 131.4, 141.7, 143.0, 160.6, 168.9, 183.6 HRMS(ESI)  $m/z$  (%) for  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$  (M+Na):

[0052] Calcd. 345.0964 Found. 345.0988。产物的结构为:

[0053]



## [0054] 实施例 3

[0055] 4-(1-甲基-5-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-3-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]癸-6,9-二烯-3,8-二酮(LHDYX-3)的制备

[0056] 1) 依次将苯甲醛、氰胺加入甲醇中,再于冰水浴下依次缓慢加入叔丁醇钾、N-溴代丁二酰亚胺,于 20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离



纯化,即得到相应的氰亚胺酯产物。收率 70-85%。

[0057] 2) 将氰亚胺酯、甲基肼加入甲醇中, 50℃~90℃下搅拌 3~24 小时, 反应溶液放入冰箱冷却, 抽滤, 真空干燥, 即得到相应的 1-甲基-5-苯基-3-氨基-三唑。收率 35-50%。

[0058] 3) 将 1-甲基-5-苯基-3-氨基-三唑加入新蒸二氯甲烷中, 再以依次滴加入三乙胺、氯乙酰氯, -15℃~100℃下搅拌 3~48 小时, 反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化, 即得到产物 2-氯-N-(1-甲基-5-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-3-基)乙酰胺。收率 65-80%。

[0059] 4) 将对甲氧基苯酚溶于重蒸过的 THF 溶液中, 加入 NaH, 室温~100℃搅拌 1~6 小时, 旋干 THF, 加入 (III) 式结构化合物和溶剂 DMF, 混合物于 30℃~140℃搅拌 2~6 小时。反应后的反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取, 再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化, 即得到产物 N-(1-甲基-5-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-3-基)-2-(4-甲氧基苯氧)乙酰胺。收率 75-85%。

[0060] 5) 将 (IV) 式结构化合物、碘苯醋酸酯、氯化铜加入反应瓶中, 加入二氯甲烷, 混合物于 -15℃~100℃搅拌 4~48 小时, 反应后的反应溶液用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化, 得到产物 4-(1-甲基-5-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-3-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]辛-6,9-二烯-3,8-二酮。收率 70-80%。检测结果:

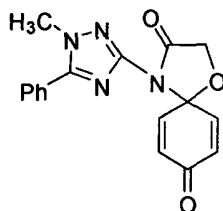
[0061]  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}) \delta (\text{ppm})$  :

[0062] 3.96 (s, 3H), 4.61 (s, 2H), 6.31 (d,  $J = 10.0\text{Hz}$ , 2H), 6.90 (d,  $J = 10.0\text{Hz}$ , 2H), 7.49-7.50 (m, 3H), 7.57-7.59 (m, 2H)

[0063] HRMS (ESI)  $m/z$  (%) for  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$  (M+Na) :

[0064] Calcd. 345.0964. Found. 345.0965。产物的结构为:

[0065]



[0066] 实施例 4

[0067] 4-(1,3-二苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-6-甲氧基-1-氧-4-氮螺[4.5]癸-6,9-二烯-3,8-二酮 (LHDYX-4) 的制备

[0068] 1) 依次将苯甲醛、氰胺加入甲醇中, 再于冰水浴下依次缓慢加入叔丁醇钾、N-溴代丁二酰亚胺, 于 20℃~70℃下搅拌 3~24 小时, 反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化, 即得到相应的氰亚胺酯产物。收率 65-85%。

[0069] 2) 将氰亚胺酯、苯肼加入甲醇中, 20℃~70℃下搅拌 3~24 小时, 反应溶液放入冰箱冷却, 抽滤, 真空干燥, 即得到相应的 1,3-二苯基-5-氨基-三唑。收率 65-80%。

[0070] 3) 将 1,3-二苯基-5-氨基-三唑加入新蒸二氯甲烷中, 再以依次滴加入三乙胺、氯乙酰氯, -15℃~100℃下搅拌 3~48 小时, 反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化, 即得到产物 2-氯-N-(1,3-二苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)乙酰胺。收率 65-75%。

[0071] 4) 将邻甲氧基苯酚溶于重蒸过的 THF 溶液中, 加入 NaH, 室温~100℃搅拌 1~6

小时,旋干 THF,加入 (III) 和溶剂 DMF,混合物于 30℃~140℃搅拌 2~6 小时。反应后的反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取,再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 N-(1,3-二苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-2-(4-甲氧基苯氧)乙酰胺。收率 75-85%。

[0072] 5) 将 (IV) 式结构化合物、碘苯醋酸酯、氯化铜加入反应瓶中,加入二氯甲烷,混合物于 -15℃~100℃搅拌 4~48 小时,反应后的反应溶液用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,得到产物 4-(1,3-二苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-6-甲氧基-1-氧-4-氮螺[4.5]辛-6,9-二烯-3,8-二酮。收率 80-95%。检测结果:

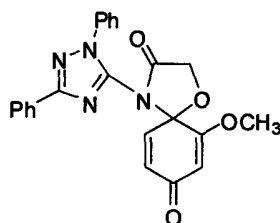
[0073]  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}) \delta (\text{ppm})$  :

[0074] 3.69(s, 3H), 4.51(d, J = 14.4Hz, 1H), 4.70(d, J = 14.4Hz, 1H), 5.47(d, J = 1.6Hz, 1H),

[0075] 6.10(dd, J = 10.0Hz, 1.6Hz, 1H), 6.30(d, J = 10Hz, 1H), 7.41-7.44(m, 3H),

[0076] 7.51-7.55(m, 5H), 8.02-8.05(m, 2H)。产物的结构为:

[0077]



[0078] 实施例 5

[0079] 4-(3-(4-硝基苯基)-1-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]癸-6,9-二烯-3,8-二酮的制备

[0080] 1) 依次将对硝基苯甲醛、氰胺加入甲醇中,再于冰水浴下依次缓慢加入叔丁醇钾、N-溴代丁二酰亚胺,于 20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到相应的氰亚胺酯产物。

[0081] 2) 将氰亚胺酯、苯肼加入甲醇中,20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应溶液放入冰箱冷却,抽滤,真空干燥,即得到相应的 3-(4-硝基苯基)-1-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-胺。

[0082] 3) 将 3-(4-硝基苯基)-1-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-胺加入新蒸二氯甲烷中,再以依次滴加入三乙胺、氯乙酰氯, -15℃~100℃下搅拌 3~48 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 2-氯-N-(3-(4-硝基苯基)-1-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)乙酰胺。

[0083] 4) 将对甲氧基苯酚溶于重蒸过的 THF 溶液中,加入 NaH,室温~100℃搅拌 1~6 小时,旋干 THF,加入 (III) 式结构化合物和溶剂 DMF,混合物于 30℃~140℃搅拌 2~6 小时。反应后的反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取,再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 N-(3-(4-硝基苯基)-1-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-2-(4-甲氧基苯氧)乙酰胺。

[0084] 5) 将 (IV) 式结构化合物、碘苯醋酸酯、氯化铜加入反应瓶中,加入二氯甲烷,混合物于 -15℃~100℃搅拌 4~48 小时,反应后的反应溶液用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,得到产物 4-(3-(4-硝基苯基)-1-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺

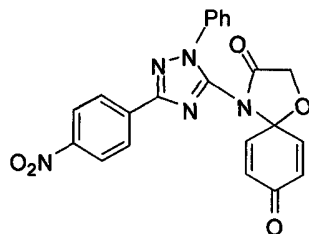
[4.5] 辛-6,9-二烯-3,8-二酮。检测结果：

[0085]  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}) \delta$  (ppm)：

[0086] 4.58(s, 2H), 6.16(d,  $J = 10.0\text{Hz}$ , 2H), 6.57(d,  $J = 10.0\text{Hz}$ , 2H), 7.51-7.52(m, 2H),

[0087] 7.57-7.59(m, 3H), 8.24(d,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 2H), 8.30(d,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 2H)。产物的结构为：

[0088]



[0089] 实施例 6

[0090] 4-(1-乙基-5-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-3-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]癸-6,9-二烯-3,8-二酮的制备

[0091] 1) 依次将苯甲醛、氰胺加入甲醇中,再于冰水浴下依次缓慢加入叔丁醇钾、N-溴代丁二酰亚胺,于  $20^\circ\text{C} \sim 70^\circ\text{C}$  下搅拌 3 ~ 24 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到相应的氰亚胺酯产物。收率 70-80%。

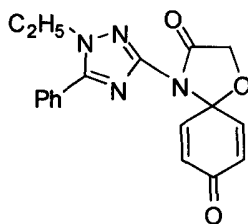
[0092] 2) 将氰亚胺酯、乙基肼加入甲醇中,  $50^\circ\text{C} \sim 90^\circ\text{C}$  下搅拌 3 ~ 24 小时,反应溶液放入冰箱冷却,抽滤,真空干燥,即得到相应的 1-乙基-5-苯基-3-氨基-三唑。收率 35-45%。

[0093] 3) 将 1-乙基-5-苯基-3-氨基-三唑加入新蒸二氯甲烷中,再以依次滴加入三乙胺、氯乙酰氯,  $-15^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$  下搅拌 3 ~ 48 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 2-氯-N-(1-乙基-5-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-3-基)乙酰胺。收率 65-80%。

[0094] 4) 将对甲氧基苯酚溶于重蒸过的 THF 溶液中,加入 NaH,室温  $\sim 100^\circ\text{C}$  搅拌 1 ~ 6 小时,旋干 THF,加入 (III) 式结构化合物和溶剂 DMF,混合物于  $30^\circ\text{C} \sim 140^\circ\text{C}$  搅拌 2 ~ 6 小时。反应后的反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取,再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 N-(1-乙基-5-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-3-基)-2-(4-甲氧基苯氧)乙酰胺。收率 70-80%。

[0095] 5) 将 (IV) 式结构化合物、碘苯醋酸酯、氯化铜加入反应瓶中,加入二氯甲烷,混合物于  $-15^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$  搅拌 4 ~ 48 小时,反应后的反应溶液用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,得到产物 4-(1-乙基-5-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-3-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]辛-6,9-二烯-3,8-二酮。收率 65-75%。产物的结构为：

[0096]



## [0097] 实施例 7

[0098] 4-(1-乙基-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]癸-6,9-二烯-3,8-二酮的制备

[0099] 1) 依次将苯甲醛、氰胺加入甲醇中,再于冰水浴下依次缓慢加入叔丁醇钾、N-溴代丁二酰亚胺,于 20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到相应的氰亚胺酯产物。收率 70-85%。

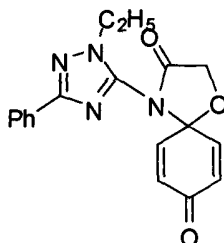
[0100] 2) 将氰亚胺酯、乙基胍加入甲醇中,20℃~50℃下搅拌 3~24 小时,反应溶液放入冰箱冷却,抽滤,真空干燥,即得到相应的 1-乙基-3-苯基-5-氨基-三唑。收率 50-65%。

[0101] 3) 将 1-乙基-3-苯基-5-氨基-三唑加入新蒸二氯甲烷中,再以依次滴加入三乙胺、氯乙酰氯, -15℃~100℃下搅拌 3~48 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 2-氯-N-(1-乙基-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)乙酰胺。收率 65-75%。

[0102] 4) 将对甲氧基苯酚溶于重蒸过的 THF 溶液中,加入 NaH,室温~100℃搅拌 1~6 小时,旋干 THF,加入 (III) 式结构化合物和溶剂 DMF,混合物于 30℃~140℃搅拌 2~6 小时。反应后的反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取,再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 N-(1-乙基-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)2-(4-甲氧基苯氧)乙酰胺。收率 70-80%。

[0103] 5) 将 (IV) 式结构化合物、碘苯醋酸酯、氯化铜加入反应瓶中,加入二氯甲烷,混合物于 -15℃~100℃搅拌 4~48 小时,反应后的反应溶液用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,得到产物 4-(1-乙基-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]辛-6,9-二烯-3,8-二酮。收率 80-95%。产物的结构为:

[0104]



## [0105] 实施例 8

[0106] 4-(1-(4-甲氧基苯基)-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]癸-6,9-二烯-3,8-二酮的制备

[0107] 1) 依次将苯甲醛、氰胺加入甲醇中,再于冰水浴下依次缓慢加入叔丁醇钾、N-溴代丁二酰亚胺,于 20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到相应的氰亚胺酯产物。收率 70-85%。

[0108] 2) 将氰亚胺酯、对甲氧基苯胍加入甲醇中,20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应溶液放入冰箱冷却,抽滤,真空干燥,即得到相应的 1-(4-甲氧基苯基)-3-苯基-5-氨基-三唑。收率 65-75%。

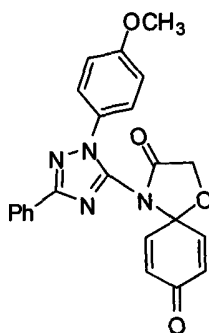
[0109] 3) 将 1-(4-甲氧基苯基)-3-苯基-5-氨基-三唑加入新蒸二氯甲烷中,再以依次滴加入三乙胺、氯乙酰氯, -15℃~100℃下搅拌 3~48 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 2-氯-N-(1-(4-甲氧基苯基)-3-苯基-1H-1,2,4-三氮

唑-5-基)乙酰胺。收率 65-80%。

[0110] 4) 将对甲氧基苯酚溶于重蒸过的 THF 溶液中,加入 NaH,室温~100℃搅拌 1~6 小时,旋干 THF,加入 (III) 和溶剂 DMF,混合物于 30℃~140℃搅拌 2~6 小时。反应后的反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取,再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 N-(1-(4-甲氧基苯基)-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-2-(4-甲氧基苯氧)乙酰胺。收率 80-90%。

[0111] 5) 将 (IV)、碘苯醋酸酯、氯化铜加入反应瓶中,加入二氯甲烷,混合物于 -15℃~100℃搅拌 4~48 小时,反应后的反应溶液用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,得到产物 4-(1-(4-甲氧基苯基)-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]辛-6,9-二烯-3,8-二酮。收率 70-85%。产物的结构为:

[0112]



[0113] 实施例 9

[0114] 4-(1-(2,4-二氯苯基)-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]癸-6,9-二烯-3,8-二酮的制备

[0115] 1) 依次将苯甲醛、氰胺加入甲醇中,再于冰水浴下依次缓慢加入叔丁醇钾、N-溴代丁二酰亚胺,于 20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到相应的氰亚胺酯产物。收率 70-85%。

[0116] 2) 将氰亚胺酯、2,4-二氯苯肼加入甲醇中,20℃~70℃下搅拌 3~24 小时,反应溶液放入冰箱冷却,抽滤,真空干燥,即得到相应的 1-(4-甲氧基苯基)-3-苯基-5-氨基-三唑。收率 60-75%。

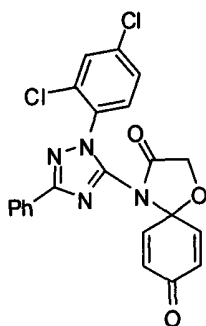
[0117] 3) 将 1-(2,4-二氯苯基)-3-苯基-5-氨基-三唑加入新蒸二氯甲烷中,再以依次滴加入三乙胺、氯乙酰氯, -15℃~100℃下搅拌 3~48 小时,反应后用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 2-氯-N-(1-(2,4-二氯苯基)-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)乙酰胺。收率 65-75%。

[0118] 4) 将对甲氧基苯酚溶于重蒸过的 THF 溶液中,加入 NaH,室温~100℃搅拌 1~6 小时,旋干 THF,加入 (III) 和溶剂 DMF,混合物于 30℃~140℃搅拌 2~6 小时。反应后的反应溶液用水洗涤、乙酸乙酯提取,再用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,即得到产物 N-(1-(2,4-二氯苯基)-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-2-(4-甲氧基苯氧)乙酰胺。收率 80-90%。

[0119] 5) 将 (IV)、碘苯醋酸酯、氯化铜加入反应瓶中,加入二氯甲烷,混合物于 -15℃~100℃搅拌 4~48 小时,反应后的反应溶液用聚酰胺或硅胶等方法进行分离纯化,得到产物 4-(1-(2,4-二氯苯基)-3-苯基-1H-1,2,4-三氮唑-5-基)-1-氧-4-氮螺[4.5]辛-6,

9-二烯-3,8-二酮。收率 65-80%。产物的结构为：

[0120]



[0121] 实施例 10

[0122] CCK-8 法测定体外肿瘤细胞抑制实验

[0123] 1. 实验材料

[0124] BALB/c nu/nu 裸小鼠 [动物合格证号 SCXK(川)09-2006] 由四川大学华西医学中心动物中心提供, 雄性, SPF 级, 6 ~ 8 周龄。

[0125] 2. 实验方法

[0126] 1) 癌细胞培养

[0127] 癌细胞 X1 和 X2 生长于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养。每 2-3 天用 0.25% 胰酶消化进行传代。

[0128] 2) CCK-8 实验

[0129] 取对数期生长的皮肤癌 A431 细胞、结肠癌 HCT116 细胞、胃癌 MKN45 细胞、卵巢癌 SKOV-3 细胞, 按  $5 \times 10^4$ /mL 接种于 96 孔培养板, 每孔接种 200  $\mu$ L, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖型培养液培养 24h 后, 更换培养液, 对上述细胞分别给予如下处理: 1) 对照组: 每孔加入 DMEM 高糖型培养液 200  $\mu$ L, 共设 6 个复孔; 2) 给药组: 实验浓度范围为 50  $\mu$ M、5  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、0.5  $\mu$ M、0.05  $\mu$ M 和 0.005  $\mu$ M, 每一浓度设 6 个复孔, 给药后 24h、48h 及 72h 每孔加入 20  $\mu$ L CCK-8 溶液 (购于碧云天生物技术研究), 37℃ 继续培养 3h。在酶标仪上, 选取 450nm 波长测定每孔吸光值。每个时间点和每个浓度均重复实验三次。

[0130] 抑制率 = (1 - 给药组吸光值 / 对照组吸光值)  $\times$  100%。

[0131] 实验结果如表 1 所示。

[0132] 表 1 LHDYX-1 细胞实验结果 (IC<sub>50</sub>)

[0133]

	皮肤癌 A431 细胞	结肠癌 HCT116 细胞	卵巢癌 SKOV-3 细胞
LHDYX-1	39.7nM	0.12uM	0.86uM
阿霉素 (Doxorubicin)	89nM	6.97uM	2.32uM

[0134] 表 1 结果显示, 本发明实施例 1 的化合物 LHDYX-1, 对癌细胞有不同程度的抑制活性, 且对癌细胞的抑制作用高于目前临床中已广泛使用抗肿瘤药物阿霉素 (Doxorubicin)。

[0135] 实施例 11

[0136] CCK-8 法测定体外肿瘤细胞抑制实验

[0137] 实验材料及方法

[0138] 以人乳腺癌MDA-MB-231细胞为实验细胞。化合物DYX-2,DYX-5,DYX-6,DYX-7用分析纯二甲基亚砷(DMSO)溶解后配制成5mM溶液,加含10%小牛血清的DMEM高糖型培养基稀释至500 μ M,过滤除菌,再稀释成六个浓度的系列溶液。取96孔培养板,每孔接种200 μ L含10000个细胞。继续培养24小时,吸去旧的培养基,加药,实验药物分别是LHDYX-1,LHDYX-2,LHDYX-3,LHDYX-4。每种药物设6个平行孔,空白对照组不加药物,也设6个平行孔。最终给药浓度为50 μ M,5 μ M,2.5 μ M,0.5 μ M,0.05 μ M,0.005 μ M。继续培养24小时、48小时、72小时后,每孔加入20 μ L CCK-8溶液,再继续培养3.5小时后,用酶标仪测量细胞液的吸光度值(OD值),测量波长为450nm,计算细胞生长抑制率。每组实验重复三次。抑制率计算公式:

[0139] 抑制率%=(1-给药组OD值/细胞对照组OD值)×100%

[0140] 实验结果是否如表2~表4所示。

[0141] 表2LHDYX-1,LHDYX-3对人乳腺癌MDA-MB-231细胞的IC50值

[0142]

	24h	48h	72h
LHDYX-1	26.03uM	2.88uM	0.34uM
LHDYX-3		2.96uM	1.46uM

[0143] 表3LHDYX-2对人乳腺癌MDA-MB-231细胞的抑制率

[0144]

	50 μ M	5 μ M	0.5 μ M	0.05 μ M
24h	100%	39.92%	17.12%	19.11%
48h	93.49%	94.70%	76.38%	19.02%
72h	96.39%	96.25%	95.27%	39.44%

[0145] 表4LHDYX-4对人乳腺癌MDA-MB-231细胞的抑制率

[0146]

	50 μ M	5 μ M
24h	42.02%	—
48h	98.39%	4.30%
72h	100%	17.23%

[0147] 注:“—”表示无抑制作用。

[0148] 表2~表4的实验结果显示,本发明的化合物对人乳腺癌MDA-MB-231细胞都具有不同程度的抑制活性。其中化合物LHDYX-1于72小时对MDA-MB-231细胞的IC50值达到0.34uM;化合物LHDYX-2浓度5 μ M,72小时抑制率达到96.25%;化合物LHDYX-4浓度

50  $\mu$  M, 72 小时抑制率达到 100%。