



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108003111 A

(43)申请公布日 2018.05.08

(21)申请号 201711340795.0

(22)申请日 2017.12.14

(71)申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

(72)发明人 王卫 盛春泉 方堃 张永强

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司

公司 31266

代理人 马莉华 徐迅

(51)Int.Cl.

C07D 271/08(2006.01)

C07D 413/12(2006.01)

A61K 31/4245(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

权利要求书3页 说明书19页 附图1页

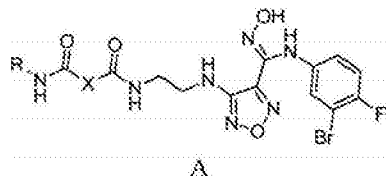
(54)发明名称

一种HDAC1和IDO1双靶点抑制剂及其制备方法和应用

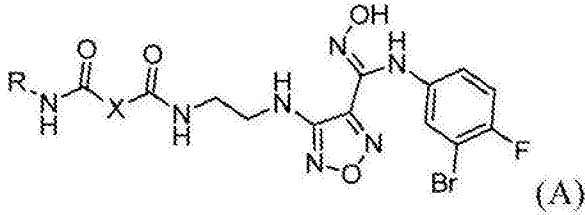
(57)摘要

本发明公开了一种HDAC1和IDO1双靶点抑制剂及其制备方法和应用。本发明的抑制剂,结构如通式A所示,各取代基的定义如说明书和权利要求书所述。药理实验表明,本发明的化合物不仅表现出良好的HDAC1和IDO1酶抑制活性,而且具有一定广谱的体外抗肿瘤活性。体内实验表明,化合物能够有效地下调体内IDO1活性,并且能够明显的延缓肿瘤生长,可以应用于IDO1介导的色氨酸代谢途径的病理学特征的肿瘤疾病。该类化合物作为首次报道的基于HDAC1和IDO1的双靶点抗肿瘤药物,具有进一步开发和研究价值。

CN 108003111 A



1. 通式A所示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中,R为羟基或氨基苯基;

X为-R<sub>1</sub>-苯基-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-、-(4-8元杂环基)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-(4-8元杂环基)-苯基-、-苯基-或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-苯基-;

R<sub>1</sub>为CH=CH,

各n独立为2-8的整数,各m独立为0-4的整数。

2. 如权利要求1所述的化合物,其特征在于,所述4-8元杂环基选自:吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噻吩基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基。

3. 如权利要求1所述的化合物,其特征在于,R<sub>1</sub>是m-CHCH或p-CHCH。

4. 如权利要求1所述的化合物,其特征在于,所述的药学上可接受的盐包括通式A所示的化合物与选自下组的酸形成的酸加成盐:盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、萘磺酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、马来酸或琥珀酸、富马酸、水杨酸、苯基乙酸、杏仁酸。

5. 如权利要求1所述的化合物,其特征在于,R为羟基或2-氨基苯基。

6. 如权利要求1所述的化合物,其特征在于,所述化合物为:

N<sup>1</sup>-(2-(2-氨基苯基)-N<sup>4</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)二酰胺、

N<sup>2</sup>-(2-(2-氨基苯基)-N<sup>5</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)吡啶-2,5-二甲酰胺、

N<sup>2</sup>-(2-(2-氨基苯基)-N<sup>5</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)噻吩-2,5-二甲酰胺、

N<sup>1</sup>-(2-(2-氨基苯基)-N<sup>3</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)二酰胺、

N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>4</sup>-羟基二酰胺、

N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(E)-3-(羟胺)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯甲酰胺、

N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-3-(E)-3-(羟胺)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯甲酰胺、

(Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(5-(羟胺)-5-氧代戊基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺、

(Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(6-(羟胺)-6-氧代戊基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺、

(Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(7-(羟胺)-7-氧代戊基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺、

N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>5</sup>-羟基戊二酰亚胺、

N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>6</sup>-羟基己二酰二胺、

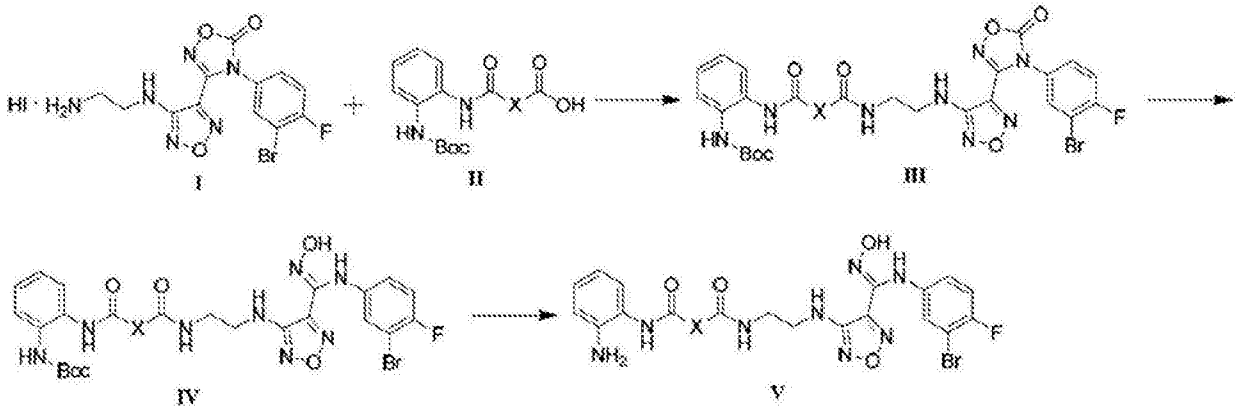
N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>7</sup>-羟基庚二酰二胺、

N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>8</sup>-羟基辛二酰二胺、

(Z)-N<sup>1</sup>-(4-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-N<sup>7</sup>-羟基庚二酰二胺、或

(Z)-N<sup>1</sup>-(4-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-N<sup>8</sup>-羟基辛二酰二胺。

7. 如权利要求1所述的化合物的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

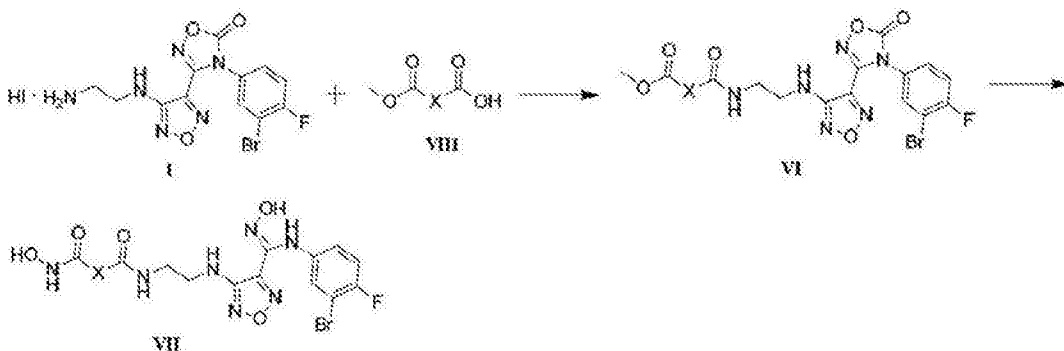


(i) 化合物I与化合物II缩合得到化合物III;

(ii) 化合物III水解得到化合物IV;

(iii) 化合物IV脱去Boc保护基团得到化合物V所示的通式A所示的化合物,

或者



(i') 化合物I与化合物VIII缩合得到;

(ii') 化合物VI在NH<sub>2</sub>OH的MeOH中反应得到化合物VII所示的通式A所示的化合物,

各种中X的定义如权利要求1所述。

8. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含:

权利要求1所述的通式A所示的化合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

9. 如权利要求1所述的通式A所示的化合物或其药学上可接受的盐或权利要求8所述的药物组合物的用途,其特征在于,用于:

i) 制备组蛋白去乙酰化酶1抑制剂;

ii) 制备吲哚胺-2,3-双加氧酶1抑制剂;

iii) 制备治疗与组蛋白去乙酰化酶1及吲哚胺-2,3-双加氧酶1相关疾病的药物。

10. 如权利要求9所述的用途,其特征在于,所述相关疾病选自:肺癌、黑色素瘤、肝癌、肾癌、白血病、非小细胞肺癌、前列腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、胰腺癌、卵巢癌、睾丸癌、乳腺癌、膀胱癌、胆囊癌、骨髓增生异常综合症、淋巴瘤、食管癌、甲状腺滤泡癌、胃肠道癌、中枢或外周神经系统肿瘤。

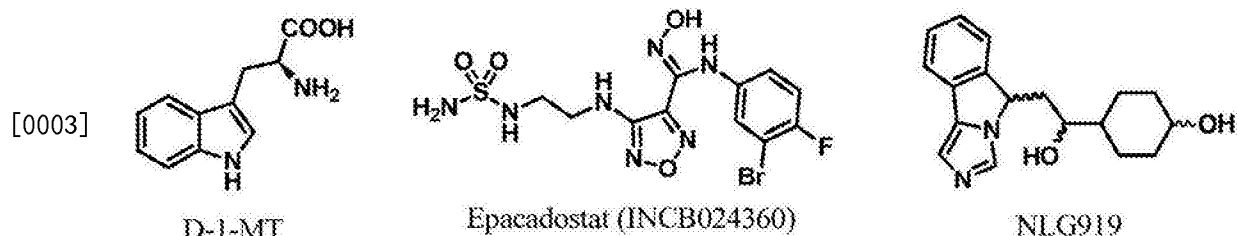
## 一种HDAC1和ID01双靶点抑制剂及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种组蛋白去乙酰化酶1 (HDAC1) 和吲哚胺-2,3-双加氧酶1 (ID01) 双靶点抑制剂及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 吲哚胺2,3-双加氧酶1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, ID01) 是一种含亚铁血红素的酶, 是参与色氨酸代谢的犬尿氨酸途径的限速酶。ID01在肿瘤细胞中的表达水平要明显高于正常组织, 它促使细胞内的色氨酸含量下降和有毒代谢物的累积, 进而抑制效应T细胞的活化与增殖。鉴于ID01在肿瘤的免疫耐受中起着重要的作用, ID01抑制剂在肿瘤疾病的治疗中有很好的应用前景。其中D-1-MT, INCB24360和NLG919目前已进入临床研究阶段。



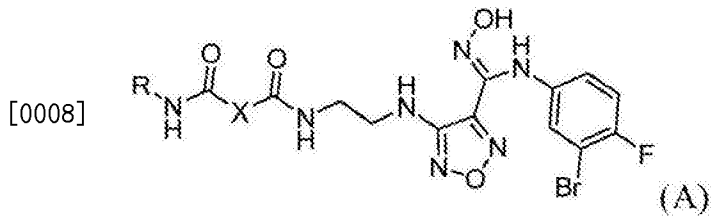
[0004] 表观遗传学是目前遗传学研究的热点, 其主要包括组蛋白乙酰化、磷酸化、泛素化及DNA甲基化等, 其在基因转录调节中起着重要作用。组蛋白是人类染色体的基本组成单位, 组蛋白的转录后修饰在基因表达中起决定性的作用, 乙酰化是其中一种重要的修饰方式。大量研究表明, 癌细胞中的组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 过量表达造成的乙酰化失衡导致了肿瘤的发生, 而通过抑制HDAC可以很好地抑制肿瘤的生成。目前主要的HDAC抑制剂大致可分为四大类: 1、异羟肟酸类 (vorinostat); 2、苯甲酰胺类 (MS-275); 3、环肽类 (FK228); 4、短链脂肪酸 (丙戊酸)。

[0005] 多靶点抑制肿瘤信号转导是肿瘤治疗和药物开发的新方向, 多项研究结果表明, 多靶点药物的治疗效果优于单靶点药物。由于组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (HDACi) 具有和其他抗癌药物使用的协同性以及本身的结构柔性, 目前已有多种多靶点HDACi作为抗肿瘤药物进入临床研究阶段。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种组蛋白去乙酰化酶1 (HDAC1) 和吲哚胺-2,3-双加氧酶1 (ID01) 双靶点抑制剂及其制备方法和应用。

[0007] 本发明的第一方面, 提供一种通式A所示的化合物或其药学上可接受的盐:



[0009] 其中,R为羟基或氨基苯基;

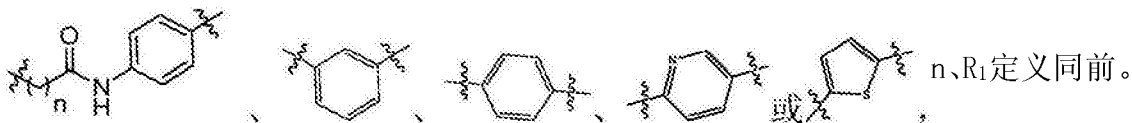
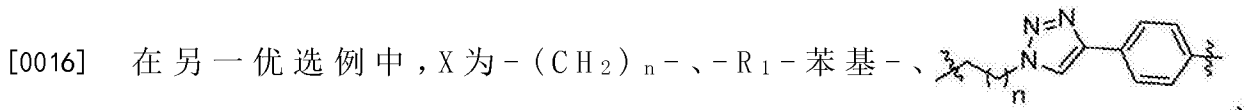
[0010] X为-R<sub>1</sub>-苯基-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-、-(4-8元杂环基)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-(4-8元杂环基)-苯基-、-苯基-或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-苯基-;

[0011] R<sub>1</sub>为CH=CH,

[0012] 各n独立为2-8的整数,各m独立为0-4的整数。

[0013] 在另一优选例中,所述4-8元杂环基选自:吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噻吩基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基。

[0014] 在另一优选例中,R<sub>1</sub>是m-CHCH或p-CHCH。



[0017] 在另一优选例中,所述的药学上可接受的盐包括通式A所示的化合物与选自下组的酸形成的酸加成盐:盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、萘磺酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、马来酸或琥珀酸、富马酸、水杨酸、苯基乙酸、杏仁酸。

[0018] 在另一优选例中,R为羟基或2-氨基苯基。

[0019] 在另一优选例中,所述化合物为实施例中制备的化合物,为:

[0020] N<sup>1</sup>-(2-氨基苯基)-N<sup>4</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)二酰胺、

[0021] N<sup>2</sup>-(2-氨基苯基)-N<sup>5</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)吡啶-2,5-二甲酰胺、

[0022] N<sup>2</sup>-(2-氨基苯基)-N<sup>5</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)噻吩-2,5-二甲酰胺、

[0023] N<sup>1</sup>-(2-氨基苯基)-N<sup>3</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)二酰胺、

[0024] N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>4</sup>-羟基二酰胺、

[0025] N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-((E)-3-(羟胺)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯甲酰胺、

[0026] N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N<sup>7</sup>-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙

基)-3-(E)-3-(羟胺)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯甲酰胺、

[0027] (Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(5-(羟胺)-5-氧代戊基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺、

[0028] (Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(6-(羟胺)-6-氧代戊基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺、

[0029] (Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(7-(羟胺)-7-氧代戊基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺、

[0030] N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>5</sup>-羟基戊二酰亚胺、

[0031] N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>6</sup>-羟基己二酰二胺、

[0032] N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>7</sup>-羟基庚二酰二胺、

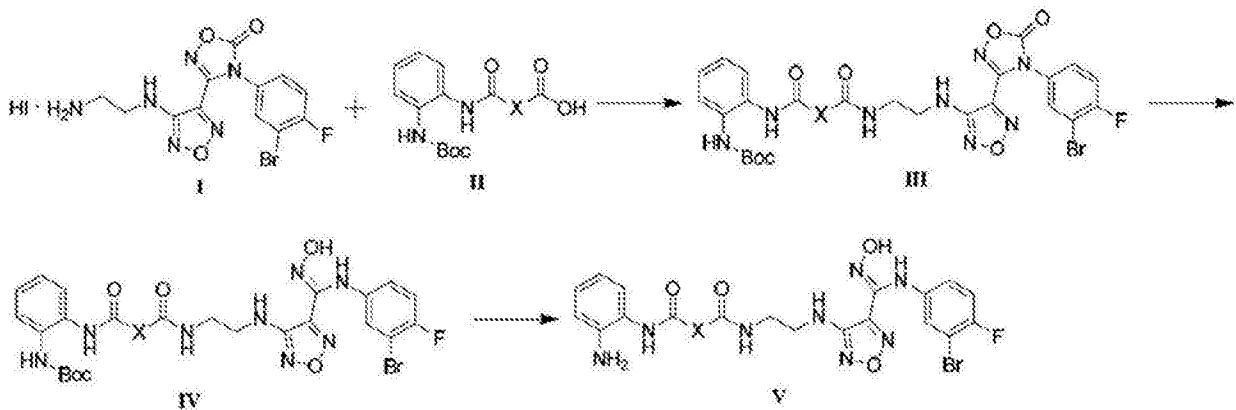
[0033] N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>8</sup>-羟基辛二酰二胺、

[0034] (Z)-N<sup>1</sup>-(4-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-N<sup>7</sup>-羟基庚二酰二胺、或

[0035] (Z)-N<sup>1</sup>-(4-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-N<sup>8</sup>-羟基辛二酰二胺。

[0036] 本发明的第二方面,提供第一方面所述的化合物的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0037]

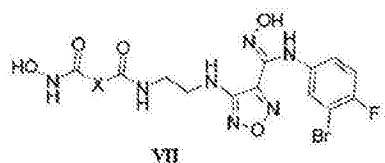
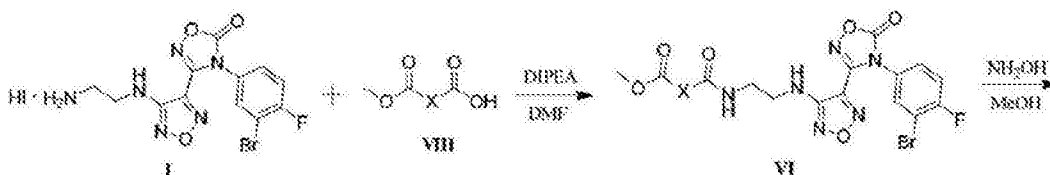
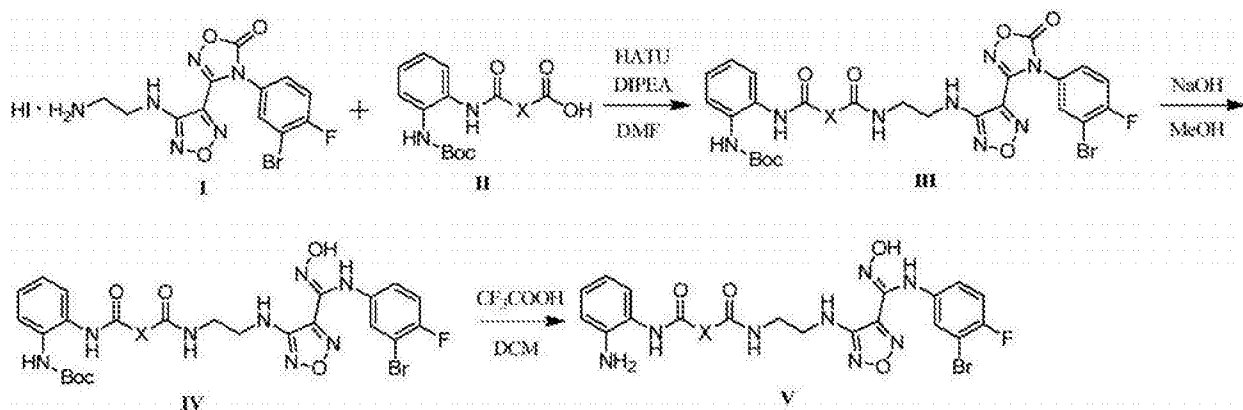
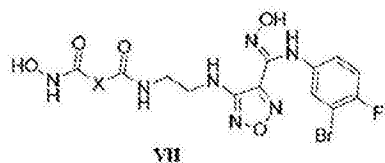
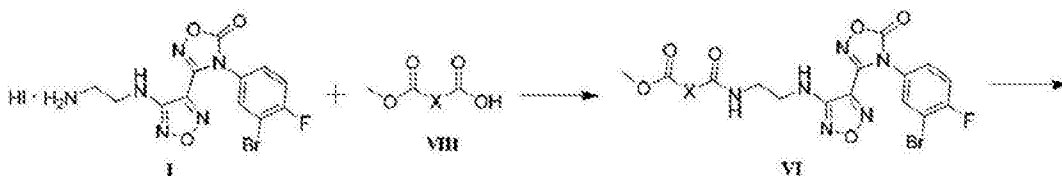


[0038] (i) 化合物I与化合物II缩合得到化合物III;

[0039] (ii) 化合物III水解得到化合物IV;

[0040] (iii) 化合物IV脱去Boc保护基团得到化合物V所示的通式A所示的化合物,

[0041] 或者





[0052] 本发明的第三方面,提供一种药物组合物,包含:

[0053] 通式A所示的化合物或其药学上可接受的盐,以及

[0054] 药学上可接受的载体。

[0055] “药学上可接受的载体”是指一种或多种相容性固体或液体填料或凝胶物质,它们适合于人使用,而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此指的是组合物中各组份能和本发明的活性成分(式A化合物或其药学上可接受的盐)以及它们之间相互掺和,而不明显降低活性成分的药效。药学上可接受的载体部分例子有纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素钠、纤维素乙酸酯等)、明胶、滑石、固体润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁)、硫酸钙、植物油(如豆油、芝麻油、花生油、橄榄油等)、多元醇(如丙二醇、甘油、甘露醇、山梨醇等)、乳化剂(如吐温<sup>®</sup>)、润湿剂(如十二烷基硫酸钠)、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、无热原水等。

[0056] 本发明的化合物和药物组合物可以是多种形式,可以通过如胶囊、片剂、颗粒剂、溶液状、粉剂、散剂或糖浆等形式口服给药或以注射剂的形式非口服给药,本发明的化合物和药物组合物可以存在于适宜的固体或液体载体中和适宜的用于注射或滴注的消毒器具中。上述制剂可通过常规制药方法制备。

[0057] 本发明的化合物和药物组合物可用于哺乳动物临床使用,包括人和动物,可以通过口、鼻或胃肠道等途径给药。最优选的给药途径为口服。

[0058] 本发明的第四方面,提供第一方面所述的通式A所示的化合物或其药学上可接受的盐或第三方面所述的药物组合物的用途,用于:

[0059] i) 制备组蛋白去乙酰化酶1抑制剂;

[0060] ii) 制备吡啶胺-2,3-双加氧酶1抑制剂;

[0061] iii) 制备治疗与组蛋白去乙酰化酶1及吡啶胺-2,3-双加氧酶1相关疾病的药物。

[0062] 在另一优选例中,所述相关疾病选自:肺癌、黑色素瘤、肝癌、肾癌、白血病、非小细胞肺癌、前列腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、胰腺癌、卵巢癌、睾丸癌、乳腺癌、膀胱癌、胆囊癌、骨髓增生异常综合症、淋巴瘤、食管癌、甲状腺滤泡癌、胃肠道癌、中枢或外周神经系统肿瘤。

[0063] 在另一优选例中,所述治疗包括对肿瘤细胞的杀伤作用,以及在小鼠肿瘤模型中延缓肿瘤生长。

[0064] 在另一优选例中,所述相关疾病为具有吡啶胺-2,3-双加氧酶1介导的色氨酸代谢途径的病理学特征的疾病。

[0065] 药理实验表明,本发明的化合物不仅表现出良好的HDAC1和IDO1酶抑制活性,而且具有一定广谱的体外抗肿瘤活性。体内实验表明,化合物能够有效地下调体内IDO1活性,并且能够明显的延缓肿瘤生长,可以应用于IDO1介导的色氨酸代谢途径的病理学特征的肿瘤疾病。该类化合物作为首次报道的基于HDAC1和IDO1的双靶点抗肿瘤药物,具有进一步的开发和研究价值。

[0066] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。说明书中所揭示的各个特征,可以被任何提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。限于篇幅,在此不再一一赘述。

## 附图说明

[0067] 图1为化合物1在细胞水平对HDAC1抑制活性结果。

## 具体实施方式

[0068] 本申请的发明人经过广泛而深入地研究,首次研发出一种通式A所示的化合物,能够作为组蛋白去乙酰化酶1 (HDAC1) 和吲哚胺-2,3-双加氧酶1 (IDO1) 双靶点抑制剂,具有抗肿瘤活性。在此基础上,完成了本发明。

[0069] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件(如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件)或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0070] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0071] 实施例1

[0072] 实施例1:  $N^1$ -(2-氨基苯基)- $N^4$ -(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)二酰胺的合成(1)

[0073] 步骤a:叔丁基(2-(4-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯甲酰氨基)苯基)氨基甲酸酯的合成。

[0074] 化合物3-(4-((2-氨基乙基))氨基)-1,2,5-恶二唑-3-基)-4-(3-溴-4-氟苯基)-1,2,4-恶二唑-5(4H)-酮氢碘酸盐(0.20g,0.4mmol)与4-((2-((叔丁氧羰基)氨基)苯基)氨基甲酰)苯甲酸(0.15g,0.4mmol)溶于DMF中,加入HATU(0.15g,0.4mmol)和DIPEA(0.18mL,1mmol),室温搅拌过夜后,反应液倒入冰水中,乙酸乙酯萃取,饱和氯化钠水溶液洗,无水硫酸钠干燥,浓缩得粗产物,经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂:二氯甲烷/甲醇=120:1-100:1)得白色固体0.16g,收率52%。 $^1\text{H}$  NMR(DMSO- $d_6$ ,600MHz)  $\delta$ :9.93(s,1H),8.77(t,J=5.5Hz,1H),8.73(s,1H),8.12(dd,J=6.3,2.5Hz,1H),8.06(d,J=8.4Hz,2H),8.00(d,J=8.5Hz,2H),7.73-7.76(m,1H),7.61(t,J=8.8Hz,1H),7.57(t,J=6.5Hz,2H),7.24(td,J=7.6,1.6Hz,1H),7.18(td,J=7.9,1.4Hz,1H),6.71(t,J=5.7Hz,1H),3.56-3.59(m,2H),3.50-3.53(m,2H),1.47(s,9H)。

[0075] 步骤b:叔丁基(2-(4-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯甲酰氨基)苯基)氨基甲酸酯的合成。

[0076] 化合物 $N^1$ -(2-氨基苯基)- $N^4$ -(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)二酰胺(0.17g,0.24mmol)溶于甲醇(10mL)中,加入2M NaOH(1.2mL,2.4mmol)后,40°C条件下搅拌2小时。TCL点板检测反应完全,反应液浓缩蒸干剩余甲醇,加入少量水,2M HCl调pH至7,静置后有固体析出,抽滤的到白色固体0.14g,收率86%。无需纯化,直接用于下一步。

[0077] 步骤c:  $N^1$ -(2-氨基苯基)- $N^4$ -(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)二酰胺的合成。

[0078] 化合物(0.10g, 0.14mmol)溶于二氯甲烷(15mL)中, 三氟乙酸(0.21mL, 2.87mmol)加入后, 40℃条件下搅拌2小时。TCL点板检测反应完全, 反应液浓缩蒸干剩余二氯甲烷, 用饱和碳酸钠溶液中和剩余的三氟乙酸, 析出的固体过滤后, 经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=120:2)得白色固体0.06g, 收率77%。

[0079] 实施例2:  $N^2$ -(2-氨基苯基)- $N^5$ -(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)吡啶-2,5-二甲酰胺的合成(2)

[0080] 步骤a: 叔丁基(2-(5-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)吡啶酰胺)苯基)氨基甲酸酯的合成。

[0081] 操作与投料与实施例1步骤a相同。

[0082] 步骤b: 叔丁基(2-(5-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)吡啶酰胺)苯基)氨基甲酸酯的合成。

[0083] 操作与投料与实施例1步骤b相同。

[0084] 步骤c:  $N^2$ -(2-氨基苯基)- $N^5$ -(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)吡啶-2,5-二甲酰胺的合成。

[0085] 操作与投料与实施例1步骤c相同, 柱层析得到白色固体0.16g, 收率62%。

[0086] 实施例3:  $N^2$ -(2-氨基苯基)- $N^5$ -(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)噻吩-2,5-二甲酰胺的合成(3)

[0087] 步骤a: 叔丁基(2-(5-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)噻吩-2-甲酰胺)苯基)氨基甲酸酯的合成。

[0088] 操作与投料与实施例1步骤a相同。

[0089] 步骤b: 叔丁基(2-(5-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)噻吩-2-甲酰胺)苯基)氨基甲酸酯的合成。

[0090] 操作与投料与实施例1步骤b相同。

[0091] 步骤c:  $N^2$ -(2-氨基苯基)- $N^5$ -(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)噻吩-2,5-二甲酰胺的合成。

[0092] 操作与投料与实施例1步骤c相同, 柱层析得到白色固体0.13g, 收率57%。

[0093] 实施例4:  $N^1$ -(2-氨基苯基)- $N^3$ -(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)二酰胺的合成(4)

[0094] 步骤a: 叔丁基(2-(3-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯甲酰氨基)苯基)氨基甲酸酯的合成。

[0095] 操作与投料与实施例1步骤a相同。

[0096] 步骤b: 叔丁基(2-(3-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)- $N'$ -羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯甲酰氨基)苯基)氨基甲酸酯的合成。

[0097] 操作与投料与实施例1步骤b相同。

[0098] 步骤c: N<sup>1</sup>-(2-氨基苯基)-N<sup>3</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)二酰胺的合成。

[0099] 操作与投料与实施例1步骤c相同,柱层析得到白色固体0.22g,收率76%。

[0100] 实施例5: N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>4</sup>-羟基二酰胺的合成(5)

[0101] 步骤a: 4-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯甲酸甲酯的合成。

[0102] 化合物4-(甲酯基)苯甲酸(0.20g,1.1mmol)和3-(4-((2-氨基乙基)氨基)-1,2,5-恶二唑-3-基)-4-(3-溴-4-氟苯基)-1,2,4-恶二唑-5(4H)-酮氢碘酸盐(0.56g,1.1mmol)溶于DMF(10mL)中,HATU(0.42g,1.1mmol)和DIPEA(0.58mL,3.3mmol)依次加入后,常温搅拌24小时。TCL点板检测反应完全,反应液倒入冰水中,乙酸乙酯萃取(3×100mL),有机相合并后水洗,饱和氯化钠洗,干燥,经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂:二氯甲烷/甲醇=120:2)得白色固体0.32g,收率53%。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>,600MHz) δ:8.79(t,J=5.4Hz,1H),8.12(dd,J=6.2,2.5Hz,1H),8.06(d,J=8.3Hz,2H),7.97(d,J=8.4Hz,2H),7.73-7.76(m,1H),7.76(t,J=8.8Hz,1H),6.69(t,J=5.8Hz,1H),3.90(s,3H),3.54-3.57(m,2H),3.48-3.51(m,2H)。

[0103] 步骤b: N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>4</sup>-羟基二酰胺的合成。

[0104] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.07g,收率78%。

[0105] 实施例6: N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-((E)-3-(羟胺)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯甲酰胺(6)

[0106] 步骤a: (E)-3-(4-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)丙烯酸甲酯的合成。

[0107] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0108] 步骤b: N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-((E)-3-(羟胺)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯甲酰胺的合成。

[0109] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.26g,收率63%。

[0110] 实施例7: N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-3-((E)-3-(羟胺)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯甲酰胺(7)

[0111] 步骤a: (E)-3-(3-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)丙烯酸甲酯的合成。

[0112] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0113] 步骤b: N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-3-((E)-3-(羟胺)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯甲酰胺的合成。

[0114] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.28g,收率74%。

[0115] 实施例8: (Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(5-(羟胺)-5-氧代戊基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺的合成(8)

[0116] 步骤a: 5-(4-(4-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-1H-1,2,3-三氮唑-1-基)戊酸

甲酯的合成。

[0117] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0118] 步骤b: (Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(5-(羟胺)-5-氧代戊基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺的合成。

[0119] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.11g,收率83%。

[0120] 实施例9: (Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(6-(羟胺)-6-氧代己基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺的合成(9)

[0121] 步骤a: 6-(4-(4-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-1H-1,2,3-三氮唑-1-基)己酸甲酯的合成。

[0122] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0123] 步骤b: (Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(6-(羟胺)-6-氧代己基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺的合成。

[0124] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.14g,收率79%。

[0125] 实施例10: (Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(7-(羟胺)-7-氧代庚基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺的合成(10)

[0126] 步骤a: 7-(4-(4-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-1H-1,2,3-三氮唑-1-基)庚酸甲酯的合成。

[0127] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0128] 步骤b: (Z)-N-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-4-(1-(7-(羟胺)-7-氧代庚基)-1H-1,2,3-三氮唑-4-基)苯甲酰胺的合成。

[0129] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.07g,收率69%。

[0130] 实施例11: N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>5</sup>-羟基戊二酰二胺的合成(11)

[0131] 步骤a: 5-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基)-5-氧代戊酸甲酯的合成。

[0132] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0133] 步骤b: N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>5</sup>-羟基戊二酰二胺的合成。

[0134] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.09g,收率58%。

[0135] 实施例12: N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>6</sup>-羟基己二酰二胺的合成(12)

[0136] 步骤a: 6-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基)-6-氧代己酸甲酯的合成。

[0137] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0138] 步骤b: N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)

氨基)乙基)-N<sup>6</sup>-羟基己二酰二胺的合成。

[0139] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.06g,收率47%。

[0140] 实施例13:N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>7</sup>-羟基庚二酰二胺的合成(13)

[0141] 步骤a:7-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基)-7-氧代庚酸甲酯的合成。

[0142] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0143] 步骤b:N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>7</sup>-羟基庚二酰二胺的合成。

[0144] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.04g,收率43%。

[0145] 实施例14:N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>8</sup>-羟基辛二酰二胺的合成(14)

[0146] 步骤a:8-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基)-8-氧代辛酸甲酯的合成。

[0147] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0148] 步骤b:N<sup>1</sup>-(2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)-N<sup>8</sup>-羟基辛二酰二胺的合成。

[0149] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.05g,收率46%。

[0150] 实施例15:(Z)-N<sup>1</sup>-(4-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-N<sup>7</sup>-羟基庚二酰二胺(15)

[0151] 步骤a:7-((4-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)氨基)-7-氧代庚酸甲酯的合成。

[0152] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0153] 步骤b:(Z)-N<sup>1</sup>-(4-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-N<sup>7</sup>-羟基庚二酰二胺的合成。

[0154] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.08g,收率71%。

[0155] 实施例16:(Z)-N<sup>1</sup>-(4-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-N<sup>8</sup>-羟基辛二酰二胺(16)

[0156] 步骤a:8-((4-((2-((4-(4-(3-溴-4-氟苯基)-5-羰基-4,5-二氢-1,2,4-恶二唑-3-基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)氨基)-8-氧代辛酸甲酯的合成。

[0157] 操作与投料与实施例5步骤a相同。

[0158] 步骤b:(Z)-N<sup>1</sup>-(4-((2-((4-(N-(3-溴-4-氟苯基)-N'-羟基甲脒基)-1,2,5-恶二唑-3-基)氨基)乙基)氨基甲酰)苯基)-N<sup>8</sup>-羟基辛二酰二胺的合成。

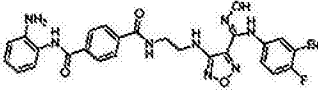
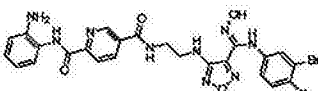
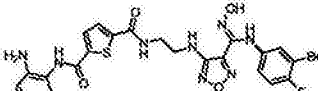
[0159] 操作与投料与实施例1步骤b相同,柱层析得到白色固体0.05g,收率68%。

[0160] 表1实施例1-16产物的结构表征数据

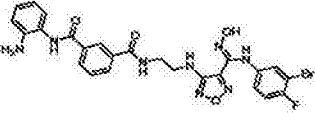
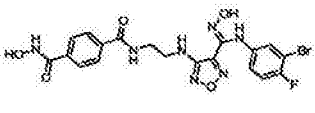
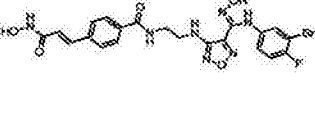
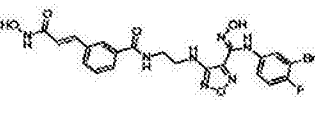
[0161]

| 序号 | 结构 | <sup>1</sup> HNMR, <sup>13</sup> CNMR和MS |
|----|----|--|
|----|----|--|

[0162]

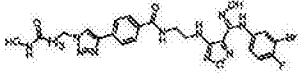
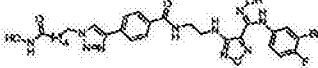
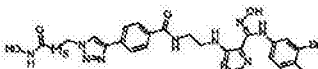
|   |   |   |
|---|---|---|
| 1 |    | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.45 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.77 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.19 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.14-7.16 (m, 1H), 7.00 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.78-6.82 (m, 2H), 6.62 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.37 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.94 (s, 2H), 3.53-3.56 (m, 2H), 3.45-3.49 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) $\delta$ : 166.47, 165.18, 156.20, 155.01, 153.43, 143.72, 140.50, 139.73, 138.51, 137.37, 137.21, 128.24, 127.62, 127.27, 127.14, 125.30, 123.50, 121.93, 116.64, 116.47, 116.32, 107.53, 44.06, 38.63; HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{BrFN}_8\text{O}_4$ ( $M + H$ ): 599.0987; found 599.0988. |
| 2 |  | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.38 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.96 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.39 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.14 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 6.1, 2.5$ Hz, 1H); 6.95 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 6.81 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 6.74-6.77 (m, 1H), 6.63 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.34 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.51-3.55 (m, 2H), 3.42-3.46 (m, 2H); HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{BrFN}_9\text{O}_4$ ( $M + H$ ): 600.0884, found 600.0886.  |
| 3 |  | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.43 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.78 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 7.17 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.12-7.15 (m, 2H), 7.00 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.75-6.79 (m, 1H), 6.64 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.34 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.46-3.50 (m, 2H), 3.41-3.45 (m, 2H); HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{BrFN}_8\text{O}_4\text{S}$ ( $M + H$ ): 605.0496; found 605.0495.  |

[0163]

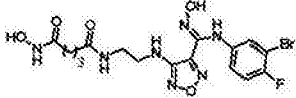
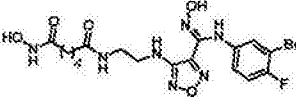
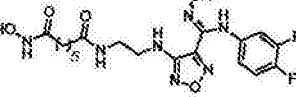
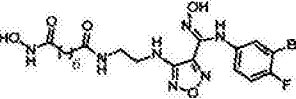
|   |   |  |
|---|---|--|
| 4 |    | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.41 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.76 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.11 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.13 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 5.9, 2.5$ Hz, 1H), 7.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.87 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.70-6.75 (m, 2H), 6.33 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.49-3.52 (m, 2H), 3.40-3.44 (m, 2H); HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{BrFN}_8\text{O}_4$ ( $M + \text{H}$ ): 599.0987; found 599.0988.   |
| 5 |    | $^1\text{H NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}-d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 7.88 (q, $J = 8.4$ Hz, 4H), 7.16 (q, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.05 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.84-6.87 (m, 1H), 3.70 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.58 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}-d_6$ , 150 MHz) $\delta$ : 168.69, 165.43, 156.04, 155.73, 154.44, 140.70, 139.39, 137.67, 136.52, 135.83, 127.10, 126.73, 126.43, 122.50, 115.30, 107.37, 43.61, 38.55; HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{BrFN}_7\text{O}_5$ ( $M + \text{H}$ ): 522.0533; found 522.0537.   |
| 6 |  | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.43 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.65 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.14 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.10-7.13 (m, 1H), 6.74-6.80 (m, 1H), 6.54 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.32 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.48-3.51 (m, 2H), 3.40-3.44 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) $\delta$ : 166.57, 162.82, 156.18, 154.95, 153.37, 140.51, 139.61, 138.55, 138.15, 135.15, 128.28, 127.68, 125.19, 121.84, 121.65, 116.30, 107.51, 44.09, 38.59. HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{BrFN}_7\text{O}_5$ ( $M + \text{H}$ ): 546.0570; found 546.0571. |
| 7 |  | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.40 (s, 1H), 10.77 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.67 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.45-7.50 (m, 2H), 7.12 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 6.0, 2.7$ Hz, 1H), 6.73-6.76 (m, 1H), 6.52 (d, $J = 15.65$ Hz, 1H), 6.31 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.47-3.51 (m, 2H), 3.39-3.43 (m, 2H); HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{BrFN}_7\text{O}_5$ ( $M + \text{H}$ ): 546.0570; found 546.0571.   |



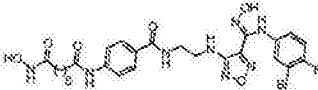
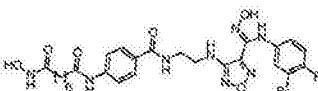
[0164]

|    |   |  |
|----|---|--|
| 8  |    | <sup>1</sup> H NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) $\delta$ : 11.42 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.67 (s, 2H), 8.63 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H), 7.92 (s, 4H), 7.15 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 7.12 (dd, <i>J</i> = 6.1, 2.8 Hz, 1H), 6.75-6.78 (m, 1H), 6.34 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 4.41 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 3.49-3.52 (m, 2H), 3.41-3.45 (m, 2H), 2.00 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.82-1.87 (m, 2H), 1.47-1.52 (m, 2H); <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150 MHz) $\delta$ : 169.15, 166.69, 156.19, 155.50, 153.41, 146.01, 140.50, 139.71, 138.52, 133.92, 128.40, 125.27, 122.56, 121.96, 116.40, 107.43, 49.78, 44.15, 38.55, 32.04, 29.66, 22.58; HRMS (ESI, positive) <i>m/z</i> calcd for C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> BrFN <sub>10</sub> O <sub>5</sub> (M + H): 647.1255; found 647.1253. |
| 9  |  | <sup>1</sup> H NMR (CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) $\delta$ : 8.44 (s, 1H), 7.90-7.96 (m, 4H), 7.15 (dd, <i>J</i> = 5.9, 2.7 Hz, 1H), 7.02 (t, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 6.83-6.86 (m, 1H), 4.49 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 3.71 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 2H), 3.58 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H), 2.13 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.98-2.02 (m, 2H), 1.68-1.72 (m, 2H), 1.37-1.43 (m, 2H); <sup>13</sup> C NMR (CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150 MHz) $\delta$ : 169.77, 167.44, 154.53, 154.25, 152.92, 144.92, 139.17, 137.90, 136.18, 132.10, 126.19, 124.91, 123.70, 120.96, 120.14, 113.82, 105.88, 48.42, 42.20, 37.03, 30.56, 27.96, 24.00, 23.11; HRMS (ESI, positive) <i>m/z</i> calcd for C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> BrFN <sub>10</sub> O <sub>5</sub> (M + H): 661.1475; found 661.1477.                |
| 10 |  | <sup>1</sup> H NMR (CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) $\delta$ : 8.42 (s, 1H), 7.87-7.93 (m, 4H), 7.12 (dd, <i>J</i> = 6.1, 2.8 Hz, 1H), 7.00 (t, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 6.80-6.83 (m, 1H), 4.46 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 3.68 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 3.55 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 2.08 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 1.94-2.00 (m, 2H), 1.59-1.64 (m, 2H), 1.35-1.42 (m, 4H); HRMS (ESI, positive) <i>m/z</i> calcd for C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> BrFN <sub>10</sub> O <sub>5</sub> (M + H): 675.1568; found 675.1569.  |

[0165]

|    |   |   |
|----|---|---|
| 11 |    | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.46 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.20 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J = 6.1, 2.7$ Hz, 1H), 6.76-6.79 (m, 1H), 6.21 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 3.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H), 2.08 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 1.97 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 1.69-1.75 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) $\delta$ : 172.02, 168.78, 155.62, 154.54, 152.95, 139.94, 139.26, 138.02, 124.84, 121.48, 115.90, 107.00, 43.72, 37.33, 34.69, 31.72, 21.32; HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{BrFN}_7\text{O}_5$ ( $M + H$ ): 490.0615; found 490.0617.                           |
| 12 |    | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.49 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.19 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J = 6.0, 2.6$ Hz, 1H), 6.77-6.80 (m, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.27 (s, 4H), 2.07 (s, 2H), 1.94 (s, 2H), 1.47 (s, 4H); HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{BrFN}_7\text{O}_5$ ( $M + H$ ): 504.0772; found 504.0775.  |
| 13 |  | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.46 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.18 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 6.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.76-6.78 (m, 1H), 6.21 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.26 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 2.05 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.91 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.43-1.48 (m, 4H), 1.19-1.23 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) $\delta$ : 172.98, 169.60, 156.11, 155.00, 153.42, 140.42, 139.72, 138.52, 125.28, 121.92, 116.40, 107.48, 44.25, 37.74, 35.73, 32.63, 28.74, 25.41; HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{BrFN}_7\text{O}_5$ ( $M + H$ ): 518.0928; found 518.0930. |
| 14 |  | $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta$ : 11.45 (s, 1H), 10.33 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.28 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.22 (dd, $J = 6.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.75-6.79 (m, 1H), 6.22 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.24 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 2.06 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.43-1.48 (m, 4H), 1.18-1.24 (m, 4H); HRMS (ESI, positive) $m/z$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{BrFN}_7\text{O}_5$ ( $M + H$ ): 518.0928; found 518.0930.  |

[0166]

|    |  |   |
|----|--|---|
| 15 |   | <sup>1</sup> H NMR (CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) $\delta$ : 7.81 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.70 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.15 (dd, <i>J</i> = 6.0, 2.7 Hz, 1H), 7.03 (t, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.83-6.85 (m, 1H), 3.68 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H), 3.55 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.43 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 2.14 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 1.72-7.77 (m, 2H), 1.67-1.72 (m, 2H), 1.14-1.47 (m, 2H); <sup>13</sup> C NMR (CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150 MHz) $\delta$ : 171.80, 169.91, 167.39, 154.53, 154.22, 152.92, 140.32, 139.16, 137.88, 136.18, 127.62, 126.31, 124.89, 120.94, 117.44, 113.80, 105.90, 42.25, 36.96, 34.86, 30.64, 26.75, 23.51, 23.42; HRMS (ESI, positive) <i>m/z</i> calcd for C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> BrFN <sub>8</sub> O <sub>6</sub> (M + H): 637.1361; found 637.1362. |
| 16 |  | <sup>1</sup> H NMR (CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) $\delta$ : 7.77 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.66 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.11 (dd, <i>J</i> = 6.0, 2.7 Hz, 1H), 7.00 (t, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.79-6.82 (m, 1H), 3.65 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 3.52 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 2.38 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 2.09 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 1.67-1.73 (m, 2H), 1.60-1.65 (m, 2H), 1.36-1.42 (m, 4H); HRMS (ESI, positive) <i>m/z</i> calcd for C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> BrFN <sub>8</sub> O <sub>6</sub> (M - H): 647.1388; found 647.1389.   |

[0167] 实施例17:本发明化合物对HDAC1抑制活性测试(IC<sub>50</sub>)。

[0168] 所合成的化合物用荧光共振能量转移(FRET)法测定对HDAC1的抑制活性,并与阳性对照药比较,筛选出活性较好的化合物。HDAC1通过纯化或直接购买试剂盒获得。

[0169] 在反应孔中加入酶,对照孔中加入反应缓冲液,在反应孔中加入溶解在DMSO中的样品,使用非接触式纳升级声波移液系统(Echo550;纳升级)进行孵育。在每一个反应孔中加入荧光底物旋转震荡。30℃密封孵育1-2小时。加入含有TMP26的显色剂中止反应,产生荧光。使用EnVision多标记微孔板检测仪(Perkin Elmer)检测荧光强度(激发光:490nm,发射光:520nm)。显色达到稳定后读取端点数值。使用GraphPad Prism 5软件进行百分数(相对于DMSO对照组)以及半数抑制率的计算。

[0170] 表2目标化合物HDAC1抑制活性

| 化合物  | IC <sub>50</sub> (nM) | 化合物 | IC <sub>50</sub> (nM) |
|------|-----------------------|-----|-----------------------|
| SAHA | 14.4 ± 3.4            | 9   | 66.5 ± 4.9            |

[0171]

|        |   |                |    |              |
|--------|---|----------------|----|--------------|
| [0172] | 1 | 66.5 ± 3.3     | 10 | 23.5 ± 1.5   |
|        | 2 | 604.4 ± 44.2   | 11 | 121.1 ± 9.1  |
|        | 3 | 1429.5 ± 325.6 | 12 | 308.1 ± 10.5 |
|        | 4 | 632.7 ± 53.8   | 13 | 9.2 ± 0.08   |
|        | 5 | 262.4 ± 16.7   | 14 | 47.7 ± 5.3   |
|        | 6 | 46.2 ± 5.9     | 15 | 37.9 ± 5.7   |
|        | 7 | 70.5 ± 3.8     | 16 | 26.3 ± 2.2   |
|        | 8 | 894.8 ± 93.6   |    |              |

[0173] 本发明化合物的IC<sub>50</sub>值如表2所示,绝大部分测试化合物表现出纳摩尔水平的抑酶活性,其中化合物13表现出优于良性对照药SAHA的抑酶活性。

[0174] 实施例18:本发明化合物对ID01抑制活性测试(IC<sub>50</sub>)。

[0175] ID01催化氧化裂解L-色氨酸的吡啶环生成N'-甲酰犬尿氨酸。在50mM的磷酸钾磷酸钾缓冲液(pH 6.5)中,加入20mM抗败血酸,3.5μM亚甲基蓝,0.2mg/mL过氧化氢酶,底物2mM色氨酸和不同浓度的抑制剂。

[0176] 依据上述方法计算得到待测化合物不同浓度对ID01酶的抑制率,用Prism GraphPad软件计算IC<sub>50</sub>。

[0177] 表3化合物ID01抑制活性

| 化合物       | %抑制率(1 μM)<br>或IC <sub>50</sub> (nM) | 化合物 | %抑制率(1 μM)<br>或IC <sub>50</sub> (nM) |
|-----------|--------------------------------------|-----|--------------------------------------|
| INCB24360 | 77.8 ± 6.4                           | 9   | 87%                                  |
| 1         | 69.0 ± 7.1                           | 10  | 209.6 ± 18.7                         |
| 2         | 260.3 ± 13.5                         | 11  | 133.0 ± 14.1                         |
| [0178] 3  | 76%                                  | 12  | 122.5 ± 10.5                         |
| 4         | 79%                                  | 13  | 113.4 ± 11.2                         |
| 5         | 95%                                  | 14  | 139.8 ± 13.3                         |
| 6         | 167.9 ± 8.7                          | 15  | 89%                                  |
| 7         | 27.0 ± 3.5                           | 16  | 143.9 ± 11.9                         |
| 8         | 88%                                  |     |                                      |

[0179] 本发明化合物的IC<sub>50</sub>值(部分化合物单浓度抑制率)如表3所示,测试化合物表现出中等到优秀的抑制活性,其中化合物1表现出最佳的抑酶活性。

[0180] 实施例19:本发明化合物在细胞水平对HDAC1抑制活性测试。

[0181] 6孔板每孔加入浓度为 $3 \times 10^6$ 个/mL的HCT116细胞悬液2mL,置37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内。24小时后,含不同浓度化合物的培养基加入,DMSO组作为空白对照,孵育12小时后,倒掉培养基,用预冷的PBS洗三次,加入裂解液,于冰上裂解30分钟,用刮棒将细胞刮于培养瓶的一侧,用枪将细胞碎片和裂解液移至1.5ml离心管中,于4℃下12000rpm离心5分钟。收集上

清液,并加入适量浓缩的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,沸水浴加热3-5分钟,以充分变性蛋白。上样,电泳以及转膜后,室温封闭2小时,一抗和二抗分别孵育后,美国LI-COR公司的Odyssey双色红外荧光成像系统检测。

[0182] 实验结果:本发明化合物的免疫印迹试验结果如图1所示,化合物1随着浓度的增大,组蛋白3的乙酰化水平逐渐提高,说明化合物1在细胞水平能够有效的抑制HDAC1活性。

[0183] 实施例20:本发明化合物在细胞水平对IDO1抑制活性测试( $EC_{50}$ )。

[0184] 细胞水平抑制活性测定采用HeLa细胞,培养基为高糖DMEM,含50U/mL青霉素,50U/mL链霉素。96孔板每孔加入浓度为 $6 \times 10^3$ 个/mL的HeLa细胞悬液100 $\mu$ L,置37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱内。24小时后,含IFN- $\gamma$  (Sangon Biotech#C600039,50ng/mL)和不同浓度化合物的培养基(200 $\mu$ L)加入,孵育48小时后,取140 $\mu$ L上清液到另一96孔板中,加入10 $\mu$ L 6.1N三氟乙酸,在50 $^{\circ}$ C加热30分钟是生成的甲酰犬尿氨酸完全转化为犬尿氨酸,然后12000rpm离心10分钟,取100 $\mu$ L上清液与等体积2% (w/v)对二甲氨基苯甲醛的乙酸溶液混合显色,最后采用酶标仪在490nm下检测吸光度值。

[0185] 依据上述方法计算得到待测化合物不同浓度的有效抑制率,用Prism GraphPad软件计算 $EC_{50}$ 。

[0186] 实验结果:本发明化合物的 $EC_{50}$ 值如表4所示,测试结果显示大部分化合物都表现出低微摩尔水平的细胞活性,整体优于其分子水平的活性,其中化合物1表现出最佳的细胞水平IDO抑制活性。

[0187] 表4目标化合物细胞水平IDO抑制活性

| 化合物       | HeLa<br>( $EC_{50}$ , $\mu$ M) | 化合物 | HeLa<br>( $EC_{50}$ , $\mu$ M) |
|-----------|--------------------------------|-----|--------------------------------|
| INCB24360 | 0.029 $\pm$ 0.005              | 9   | 4.99 $\pm$ 0.78                |
| 1         | 0.41 $\pm$ 0.023               | 10  | 4.11 $\pm$ 0.64                |
| 2         | 0.54 $\pm$ 0.032               | 11  | 2.06 $\pm$ 0.54                |
| 3         | 1.56 $\pm$ 0.11                | 12  | 2.40 $\pm$ 0.43                |
| 4         | 2.68 $\pm$ 0.23                | 13  | 0.81 $\pm$ 0.13                |
| 5         | 1.64 $\pm$ 0.16                | 14  | 0.51 $\pm$ 0.075               |
| 6         | 1.31 $\pm$ 0.17                | 15  | 1.22 $\pm$ 0.68                |
| 7         | 4.27 $\pm$ 0.26                | 16  | 2.09 $\pm$ 0.24                |
| 8         | 11.87 $\pm$ 1.12               |     |                                |

[0190] 实施例21:本发明化合物的体外抗肿瘤活性测试( $IC_{50}$ )。

[0191] 对本发明的化合物进行了五种肿瘤细胞增殖抑制能力测试,测试方法采用常规的CCK8法。将对于对数生长期的肿瘤细胞(LLC,CT-26,A549,HCT116和HT-29)用胰酶消化,然后用培养基(DMEM+10%FBS或者PRMI1640+10%FBS)将细胞稀释悬浮成单细胞悬液,调整细胞密度为 $6-10 \times 10^4$ 个/mL,每孔加入100 $\mu$ L接种于96孔板中,置37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养24小时,在分别加入不同浓度的化合物,每个浓度平行三个复孔,并设置实验组和对照组,继

续孵育48小时后,向每孔加入10 $\mu$ L CCK8溶液,然后37 $^{\circ}$ C下避光孵育1-4小时后,用MK-2全自动酶标仪测450nm OD值。计算半数抑制浓度IC<sub>50</sub>。

[0192] 本发明化合物对肿瘤细胞半数抑制浓度IC<sub>50</sub>值如表5所示,测试结果显示这一系列化合物表现出中等到优秀的抗肿瘤活性,对HCT116细胞株活性要优于对其他肿瘤细胞株,其中化合物1,6和14表现出与对照药SAHA相当的IC<sub>50</sub>值。

[0193] 表5目标化合物细胞对肿瘤细胞的半数抑制浓度IC<sub>50</sub>(单位: $\mu$ mol/L)

[0194]

| 化合物        | LLC              | CT-26            | A549              | HCT116           | HT-29            |
|------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| SAHA       | 9.68 $\pm$ 0.15  | 5.97 $\pm$ 0.85  | 2.63 $\pm$ 0.54   | 3.07 $\pm$ 0.55  | 1.78 $\pm$ 0.89  |
| INCB024360 | >100             | >100             | >100              | >100             | >100             |
| 1          | 17.62 $\pm$ 1.06 | 59.84 $\pm$ 8.51 | 16.73 $\pm$ 2.12  | 5.12 $\pm$ 0.43  | 11.71 $\pm$ 1.54 |
| 2          | 15.13 $\pm$ 1.85 | 23.3 $\pm$ 4.35  | 20.65 $\pm$ 5.66  | 6.36 $\pm$ 1.25  | 12.24 $\pm$ 3.11 |
| 3          | 18.34 $\pm$ 4.21 | 38.82 $\pm$ 7.71 | 14.52 $\pm$ 3.27  | 7.12 $\pm$ 1.72  | 20.26 $\pm$ 6.07 |
| 4          | 31.38 $\pm$ 5.67 | 25.51 $\pm$ 4.35 | 27.76 $\pm$ 7.73  | 16.18 $\pm$ 3.12 | 46.42 $\pm$ 9.43 |
| 5          | >100             | >100             | 89.79 $\pm$ 6.99  | 28.08 $\pm$ 6.44 | 68.01 $\pm$ 7.19 |
| 6          | 21.64 $\pm$ 2.16 | 12.79 $\pm$ 3.13 | 25.56 $\pm$ 6.84  | 5.89 $\pm$ 0.54  | 14.15 $\pm$ 2.01 |
| 7          | 53.30 $\pm$ 8.97 | 38.94 $\pm$ 7.56 | 41.66 $\pm$ 8.46  | 12.44 $\pm$ 2.53 | 23.31 $\pm$ 4.12 |
| 8          | >100             | >100             | >100              | 37.53 $\pm$ 7.59 | >100             |
| 9          | >100             | >100             | >100              | >100             | >100             |
| 10         | 35.95 $\pm$ 7.66 | 90.18 $\pm$ 5.85 | 45.48 $\pm$ 10.55 | 29.44 $\pm$ 8.12 | 23.88 $\pm$ 2.73 |

[0195]

|    |                   |                   |                  |                  |                  |
|----|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| 11 | >100              | >100              | >100             | 80.24 $\pm$ 8.46 | >100             |
| 12 | >100              | >100              | >100             | 85.37 $\pm$ 7.91 | >100             |
| 13 | 90.11 $\pm$ 13.05 | 95.46 $\pm$ 20.28 | 40.66 $\pm$ 9.56 | 17.46 $\pm$ 5.61 | 28.74 $\pm$ 4.84 |
| 14 | 56.58 $\pm$ 5.68  | 97.45 $\pm$ 15.34 | 36.03 $\pm$ 8.95 | 4.70 $\pm$ 0.38  | 14.88 $\pm$ 3.09 |
| 15 | >100              | >100              | >100             | >100             | >100             |
| 16 | 43.64 $\pm$ 8.39  | 43.28 $\pm$ 4.86  | 14.66 $\pm$ 3.11 | 17.01 $\pm$ 5.17 | 32.06 $\pm$ 7.42 |

[0196] 实施例22:本发明化合物对小鼠肺癌肿瘤模型治疗效果研究

[0197] 细胞系:小鼠肺癌细胞(LLC)。

[0198] 实验动物:八周龄C57BL/6雌性小鼠购置上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号:SCXK-2013-0016。

[0199] 小鼠肿瘤模型建立、分组及给药:LLC细胞被注射于小鼠前肢腋下,每只注射1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞。肿瘤体积达到50mm<sup>3</sup>时开始给药,本实验小鼠共分为5组,每组6只。分别口服给予羧甲基纤维素(0.5%CMC)、INCB24360(100mg/kg,bid)、SAHA(100mg/kg,bd)和化合物1(100mg/kg,bid),连续给药14天。治疗过程中每4天监测肿瘤体积变化,肿瘤体积计算公式:(宽度<sup>2</sup> $\times$ 长度)/2。

[0200] 化合物体内肿瘤模型治疗效果如表6所示,化合物1表现出较好的体内抗肿瘤活

性,体内抑瘤率要优于良性药SAHA,与INCB24360相当。

[0201] 表6肿瘤体积

[0202]

| 组别         | 平均肿瘤体积mm <sup>3</sup> |
|------------|-----------------------|
| 空白组        | 3220.77               |
| INCB24360组 | 1471.32               |
| SAHA组      | 1888.34               |
| 化合物1组      | 1416.25               |

[0203] 实施例23:本发明化合物对于小鼠体内ID01活性的影响

[0204] 实验动物:八周龄C57BL/6雌性小鼠购置上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号:SCXK-2013-0018。

[0205] 体内ID0抑制活性可以通过犬尿氨酸(Kyn)含量变化来反应。本实验小鼠共5只,给药前禁食4小时,通过口服给予化合物1(100mg/kg)后,在不同时间点处死小鼠,通过眼眶穿刺采血,加入含EDTA-3K的样品管,4℃,3000rpm离心15min后,取上清液低温保存。然后将60μL血浆与240μL(含内标物50ng/mL)甲醇-1%三氟乙酸混合涡旋5分钟,5800rpm离心10min后,取上清液50μL与等体积的水混合后用于进样分析,通过LC-MS/MS(API 6500)检测kyn含量。

[0206] 表7血液中犬尿氨酸(Kyn)含量(单位:nmol/L)

[0207]

| 化合物 | 0h      | 0.5h    | 1h      | 2h      | 3h      | 5h     | 8h     |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| Kyn | 1467.27 | 1402.43 | 1147.88 | 1260.74 | 1140.67 | 900.53 | 561.93 |

[0208] 化合物1对小鼠体内ID01活性结果如表7所示,测试结果显示化合物1在给药后0.5h到8h之间,血液中Kyn浓度随着时间的延长逐渐下降,在8小时达到最低值,说明化合物1在体内能够抑制ID01活性,化合物1的体内抗肿瘤活性是通过免疫介导的。

[0209] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

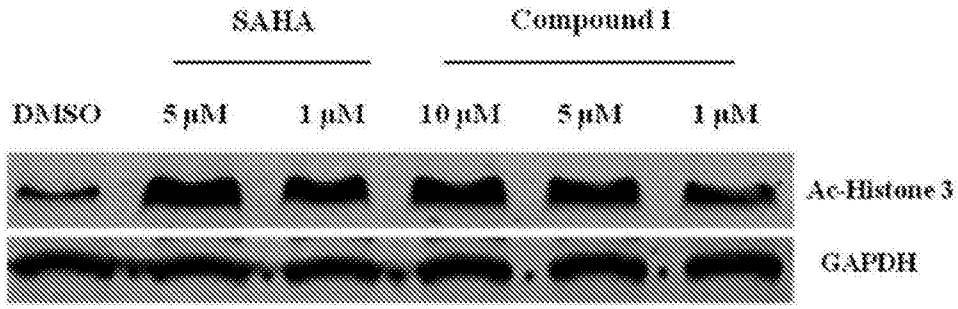


图1