



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103992326 B

(45)授权公告日 2016.09.28

(21)申请号 201410235377.5

A61K 31/5517(2006.01)

(22)申请日 2014.05.29

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103992326 A

(43)申请公布日 2014.08.20

(73)专利权人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72)发明人 盛春泉 张万年 方堃 王胜正

董国强 缪震元 姚建忠 李振钢

武善超

(74)专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 赵青

(51)Int.Cl.

C07D 487/14(2006.01)

C07D 487/22(2006.01)

C07D 495/22(2006.01)

A61K 31/519(2006.01)

(56)对比文件

CN 102311434 A,2012.01.11,全文.

CN 101787025 A,2010.07.28,全文.

宁微微.新型喹唑啉酮类先导物的设计、合成及抑制人顶体酶活性研究.《药学实践杂志》.2010,第28卷(第4期),第296-298、312页.

Kun Fang,et al.,.Design, synthesis and biological evaluation of E-ring modified evodiamine derivatives as novel antitumor agents.《Chinese Chemical Letters》.2014,第25卷第978-982页.

Leszek Brzechffa, et al.,.The Peripheral Synthesis of Medium-Ring Diaza Heterocycles via  $\beta$ -Elimination Reactions.《The Journal of Organic Chemistry》.1975,第40卷(第21期),第3062-3064页.

审查员 刘辰

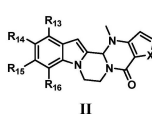
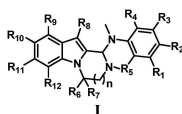
权利要求书6页 说明书30页 附图1页

## (54)发明名称

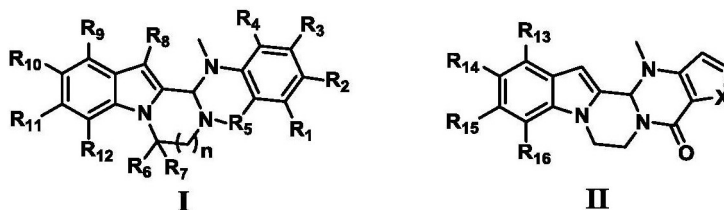
吲哚并六氢吡嗪并喹唑啉酮类抗肿瘤化合物及其制备方法

## (57)摘要

本发明涉及医药技术领域,具体涉及一类吲哚并六氢吡嗪并喹唑啉酮类抗肿瘤化合物及其制备方法。本发明的吲哚并六氢吡嗪并喹唑啉酮类化合物,其化学结构式如通式I或通式II所示,该类化合物是通过吴茱萸碱进行了系统的骨架跃迁设计与合成得到一类吴茱萸碱新骨架化合物,是新发现的一类全新结构的拓扑异构酶I/微管蛋白双重抑制剂,具有明显抗肿瘤活性。本发明还提供了该类化合物在制备拓扑异构酶I/微管蛋白双重抑制剂和抗肿瘤药物中的应用。



1. 一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物, 及其药学上可接受的盐, 该化合物的结构如通式I或通式II所示:



其中:

R<sub>1</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>9</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>15</sub>、R<sub>16</sub>表示: 氢;

R<sub>2</sub>表示: 氢、卤素、甲氧基、甲基;

R<sub>3</sub>表示: 氢、甲氧基、氨基;

R<sub>5</sub>表示: 羰基、硫羰基;

R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>表示: 氢、甲基;

R<sub>8</sub>表示: 氢、卤素、甲氧基、羟甲基;

R<sub>10</sub>表示: 氢、甲氧基、卤素、甲基、羟基;

R<sub>11</sub>表示: 氢、卤素、甲氧基、甲硫基;

R<sub>12</sub>表示: 氢、甲氧基、羟基;

R<sub>14</sub>表示: 氢、甲氧基、羟基;

n表示: 1, 2;

X表示: 硫、氮甲基。

2. 根据权利要求1所述的一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物, 及其药学上可接受的盐, 其特征在于,

该化合物的结构如通式I所示, 其中R<sub>1</sub>至R<sub>12</sub>各取代基及n的组合如下:

化 合 物	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>	R <sub>11</sub>	R <sub>12</sub>	n
1	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
2	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	H	H	H	1
3	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1

4	H	Cl	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
5	H	Br	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
6	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	Cl	H	H	1
7	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	H	Cl	H	1
8	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	F	H	H	1
9	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	1
10	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	-CO-	H	H	H	H	H	H	H	1
11	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	-CO-	H	H	H	H	H	H	H	1
12	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
13	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	Br	H	H	1
14	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	Br	H	H	1
15	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	-CO-	H	H	H	H	Br	H	H	1
16	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	Cl	H	H	1
17	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	1
18	H	CH <sub>3</sub>	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
19	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	1
20	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	H	-SCH <sub>3</sub>	H	1
21	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OH	H	H	1
22	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OH	1
23	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	1
24	H	H	-NH <sub>2</sub>	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
25	H	H	H	H	-CO-	H	H	Br	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	1
26	H	F	H	H	-CO-	H	H	Br	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
27	H	F	H	H	-CO-	H	H	-CHO	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
28	H	F	H	H	-CO-	H	H	-CH <sub>2</sub> OH	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
29	H	CH <sub>3</sub>	H	H	-CO-	H	H	-CHO	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
30	H	CH <sub>3</sub>	H	H	-CO-	H	H	-CH <sub>2</sub> OH	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
31	H	H	H	H	-CS-	H	H	H	H	F	H	H	1
32	H	H	H	H	-CO-	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1

33	H	F	H	H	-CO-	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
34	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	2
35	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OH	H	H	2

3. 根据权利要求1所述的一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物, 及其药学上可接受的盐, 其特征在于,

该化合物的结构如通式 II 所示, 其中R<sub>13</sub>至R<sub>16</sub>各取代基及X的组合如下:

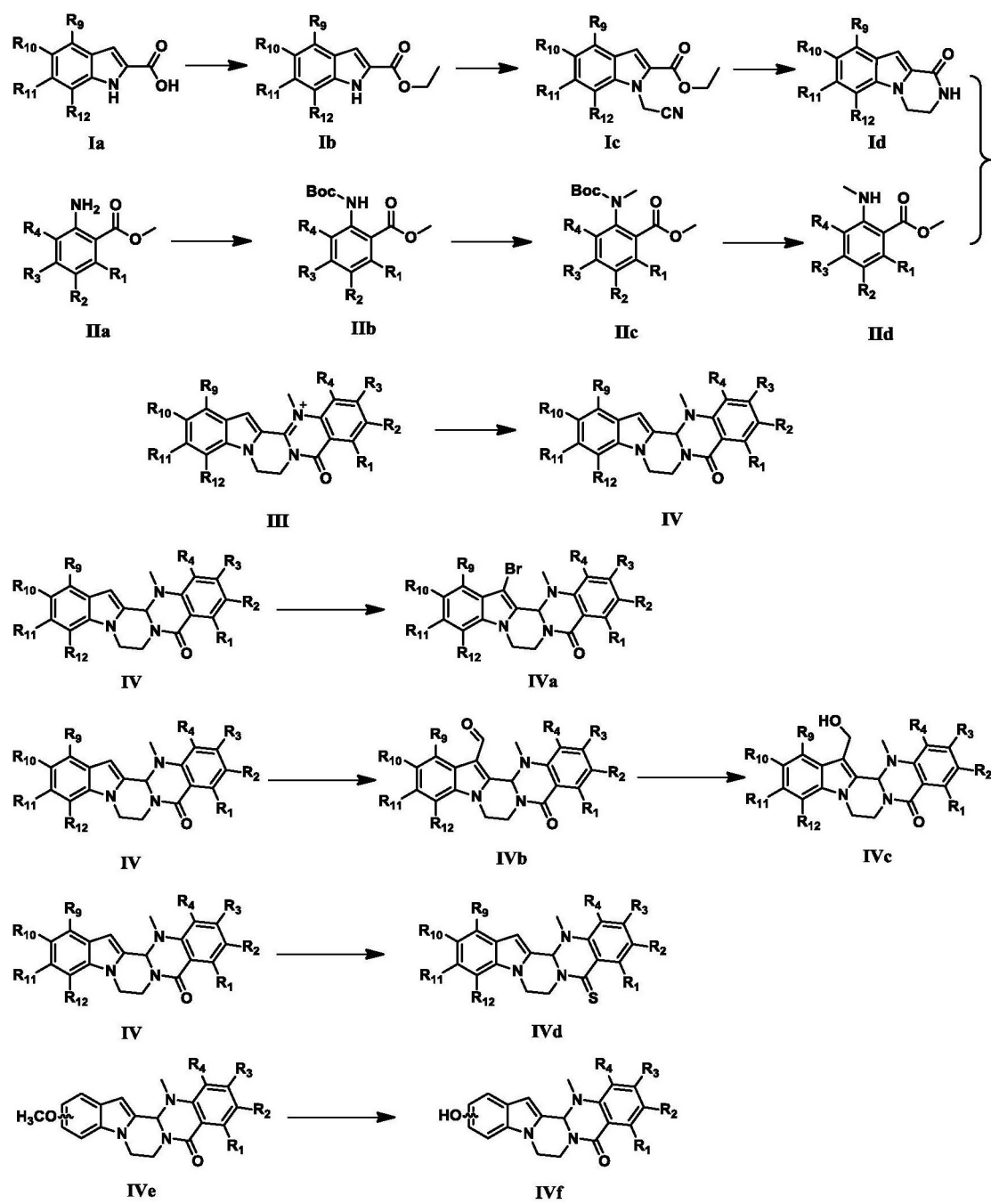
化合物	R <sub>13</sub>	R <sub>14</sub>	R <sub>15</sub>	R <sub>16</sub>	X
36	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	-NCH <sub>3</sub>
37	H	-OH	H	H	-NCH <sub>3</sub>
38	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	S
39	H	-OH	H	H	S

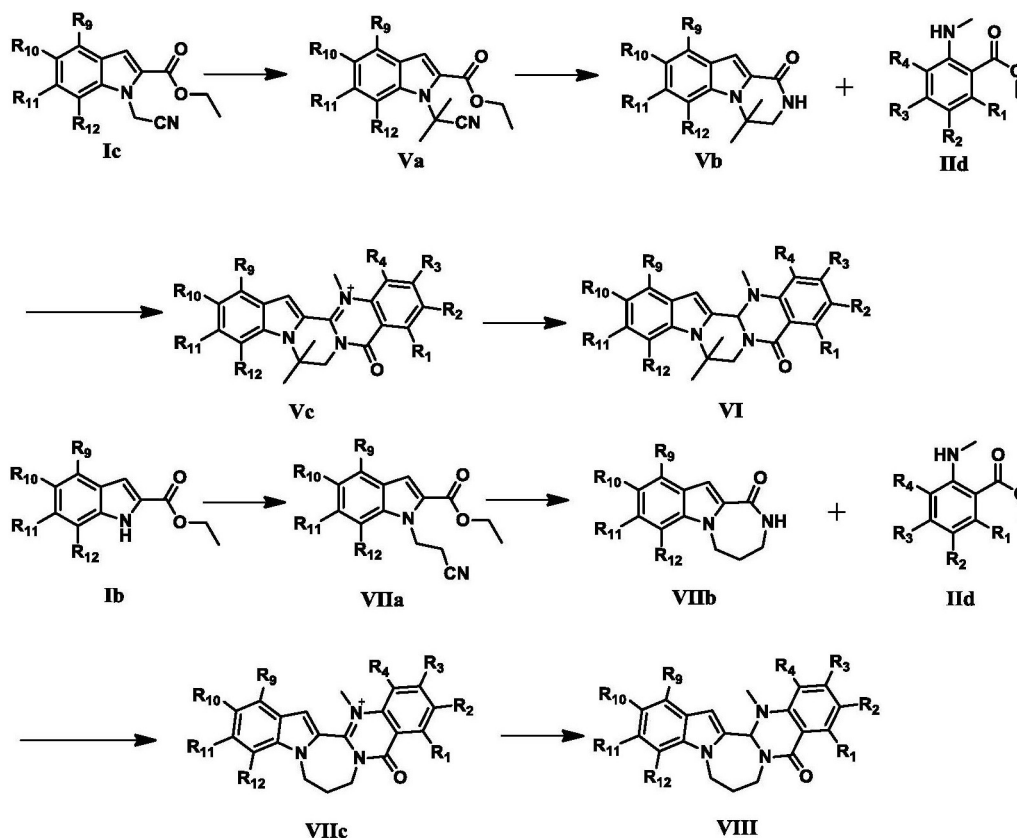
4. 根据权利要求1至3任一项所述的一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物, 及其药学上可接受的盐, 其特征在于, 所述的药学上可接受的盐包括其有机酸盐或无机酸盐。

5. 根据权利要求4所述的一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物, 及其药学上可接受的盐, 其特征在于, 所述的有机酸盐或无机酸盐中, 有机酸为乙酸、马来酸、富马酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、对甲苯磺酸、水杨酸, 或草酸; 无机酸为盐酸、硫酸、磷酸、二磷酸、氢溴酸, 或硝酸。

6. 如权利要求1所述的一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物, 及其药学上可接受的盐的制备方法, 该制备方法的反应流程如下:







具体步骤为：

#### A. 化合物IV的制备

取代的吲哚-2-羧酸Ia在乙醇中回流18小时,得到取代的吲哚-2-羧酸乙酯Ib;

取代的吲哚-2-羧酸乙酯Ib在NaH作用下与溴乙腈0-5℃反应半小时,再在室温下反应7小时得到取代的1-氰甲基-1H-吲哚-2-羧酸乙酯Ic;

取代的1-氰甲基-1H-吲哚-2-羧酸乙酯Ic在硼氢化钠和二氯化钴的作用下,0-5℃反应一小时,再回流4小时得到取代的3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吲哚-1(2H)-酮Id;

取代的2-氨基苯甲酸甲酯IIa在二氯甲烷中与Boc酸酐反应10小时得到取代的2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯IIb;

取代的2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯IIb在NaH作用下与碘甲烷反应10小时得到取代的2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯IIc;

取代的2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯IIc在三氟乙酸的作用下反应2小时得到取代的2-甲氨基苯甲酸甲酯IIId;

取代的3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吲哚-1(2H)-酮Id和取代的2-甲氨基苯甲酸甲酯IIId在三氯氧磷作用下,微波条件130℃,45分钟得到取代的化合物III,进一步在硼氢化钠作用下得到取代的反向吴茱萸碱IV;

#### B. 化合物IVa制备

化合物IV溶于四氯化碳中,加入AIBN和NBS,加热回流3.5小时得到目标化合物IVa;

#### C. 化合物IVb制备

化合物IV在DMF中与三氯氧磷反应3小时得到目标化合物IVb;

#### D. 化合物IVc制备

化合物IVb溶于适量甲醇,加入硼氢化钠反应1小时得到目标化合物IVc;

E. 化合物IVd制备

化合物IV溶于甲苯中,加入劳森试剂,加热回流4小时,得到目标化合物IVd;

F. 化合物IVf制备

化合物IVe溶于二氯甲烷中,在三溴化硼作用下-78℃反应半小时,在室温反应2小时得到目标化合物IVf;

G. 化合物VI制备

取代的1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯(Ic)溶于THF中,0℃条件下加入碘甲烷和三甲基硅烷钠,再室温反应24小时得到化合物Va,进一步参照化合物IV的合成方法得到目标化合物VI;

H. 化合物VIII制备

取代的吡啶-2-羧酸乙酯Ib在苄基三甲基氢氧化铵作用下与烯丙腈先回流一小时,再室温过夜得到取代的1-(2-氰乙基)-1H-吡啶-2-羧酸乙酯VIIa;

取代的1-(2-氰乙基)-1H-吡啶-2-羧酸乙酯VIIa在硼氢化钠和二氯化钴的作用下,0-5℃反应一小时,再回流4小时得到取代的化合物VIIb;

取代的化合物VIIb和取代的2-甲氨基苯甲酸甲酯IIId在三氯氧磷作用下,微波条件130℃,45分钟得到取代的化合物VIIc,进一步在硼氢化钠作用下得到取代的反向吴茱萸碱VIII。

7. 如权利要求1所述的一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物,及其药学上可接受的盐在制备拓扑异构酶抑制剂中的应用。

8. 如权利要求1所述的一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物,及其药学上可接受的盐在制备微管蛋白酶抑制剂中的应用。

9. 如权利要求1所述的一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物,及其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用。

10. 根据权利要求9所述的一类吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物,及其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述的肿瘤为肺癌、肠癌,或乳腺癌。

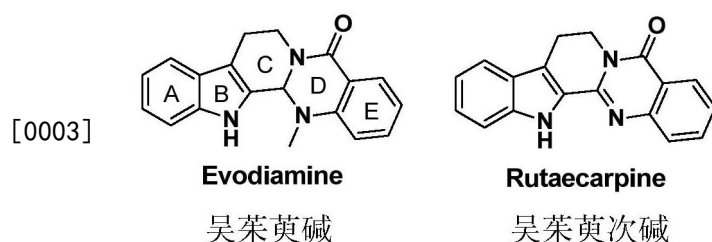
## 吲哚并六氢吡嗪并喹唑啉酮类抗肿瘤化合物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体涉及一类吲哚并六氢吡嗪并喹唑啉酮类抗肿瘤化合物及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 吴茱萸(学名Tetradium ruticarpum)是芸香科植物,别名吴萸、茶辣等,主要生长于中国长江以南的温暖地带。吴茱萸和疏毛吴茱萸的干燥近成熟果实是一种传统中药,主要用于治疗散热止痛、降逆止呕,肝胃虚寒或胃脘疼痛等症。吴茱萸含有的生物碱成分主要包括吴茱萸碱(Evodiamine)和吴茱萸次碱(Rutaecarpine),化学结构式如下所示:



[0004] 近年来,吴茱萸碱作为抗肿瘤先导化合物的研究有了较大的进展。其多靶点的抗肿瘤作用与诱导细胞凋亡、抑制癌细胞的侵袭和转移、阻滞细胞周期于G2/M期等机制有关。

[0005] 本申请人前期设计合成得到一批具有优秀抗肿瘤活性的吴茱萸碱衍生物,并发现它们对拓扑异构酶I(Top1)和拓扑异构酶II(Top2)具有双重抑制作用,已经申请的专利如下:中国专利CN201010117531.0,发明名称为“取代吴茱萸碱类抗肿瘤和抗真菌化合物及其制备方法”,授权公布号为CN101787025B;中国专利CN201110188588.4,发明名称为“吴茱萸碱类化合物及其制备方法与应用”,授权公布号为CN102311434B。

[0006] 骨架跃迁(Scaffold Hopping)是一种常用的药物分子设计策略,通常是对先导化合物核心结构进行改造得到新颖的化合物骨架。本申请人拟对吴茱萸碱进行生物电子等排、骨架替换、扩环和缩环等系统的骨架跃迁设计与合成,从中寻找到具有优秀抗肿瘤活性的新化合物。

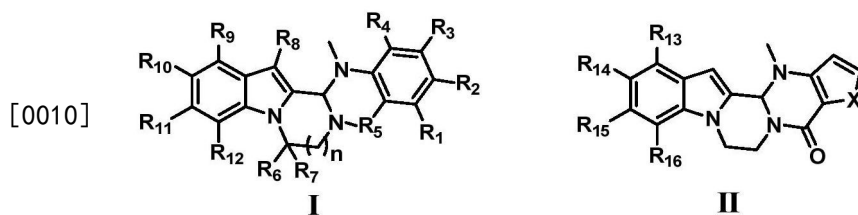
### 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一类新的吲哚并六氢吡嗪并喹唑啉酮类化合物,本发明的另一目的是提供该类吲哚并六氢吡嗪并喹唑啉酮类化合物的制备方法,本发明的第三目的是提供该类吲哚并六氢吡嗪并喹唑啉酮类化合物的制药用途。

[0008] 在前期研究中,发明人通过生物电子等排、骨架替换、扩环和缩环等方式对吴茱萸碱进行了系统的骨架跃迁设计与合成,得到数种吴茱萸碱类新骨架,并发现反向吴茱萸碱(与吴茱萸碱的不同在于B、C环的拼接方式)是拓扑异构酶I/微管蛋白双重抑制剂,并且在体外抗肿瘤活性中表现出中等的抗肿瘤活性。本发明进一步对反向吴茱萸碱进行结构修饰,获得一类具有较强抗肿瘤活性的反向吴茱萸碱衍生物。

[0009] 本发明的第一方面,一类吲哚并六氢吡嗪并喹唑啉酮类化合物(本发明的化合物

在下文中也被称为“反向吴茱萸碱衍生物”),包括其消旋体、d-型或l-型异构体,及其药学上可接受的盐,该化合物的结构如通式I或通式II所示:



[0011] 本发明化合物母环上的取代基可以是单取代,也可以是多取代,R<sub>1</sub>至R<sub>16</sub>取代基表述如下:

[0012]  $R_1$ 、 $R_4$ 、 $R_9$ 、 $R_{12}$ 独立地表示下列基团：氢、卤素、低级卤代烷基、低级烷基、羟基、低级羟基烷基、低级烷氧基、低级链烯基、氨基、低级烷基氨基、硝基、低级硝基烷基、氰基、低级氰基烷基、酰胺基、环烷基、取代芳基、低级酰胺基烷基、胍基、低级胍基烷基、叠氮基：

[0013] R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>独立地表示下列基团：氢、卤素、低级卤代烷基、低级烷基、低级羟基烷基、低级链烯基、低级链炔基、低级烷基氧基、低级链炔基氧基、甲硫基、氨基、低级烷基氨基、硝基、低级硝基烷基、氰基、低级氰基烷基、酰胺基、低级酰胺基烷基、低级环烷基酰胺基、环烷基、取代芳基、胍基、低级胍基烷基、叠氮基、低级叠氮基烷基；

[0014] 优选R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>独立地表示下列基团：氢、卤素、羟基、低级烷基、低级烷氧基、甲硫基、氨基；

[0015] R<sub>5</sub>表示下列基团:亚甲基、羰基、硫羰基;

[0016] R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>独立地表示下列基团：氢、甲基；

[0017] R<sub>8</sub>表示下列基团：氢、卤素、羟基、羧基、酯基、低级卤代烷基、低级烷基、低级羟基烷基、低级链烯基、低级链炔基、低级链炔基氧基、氨基、甲醛基、羟甲基、低级烷基氨基、硝基、低级硝基烷基、氰基、低级氰基烷基、酰胺基、低级酰胺基烷基、低级环烷基酰胺基、肼基、低级肼基烷基、叠氮基、低级叠氮基烷基；

[0018] 优选R<sub>8</sub>表示下列基团:氢、卤素、甲醛基、羟甲基;

[0019] n表示:1,2;

[0020]  $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $R_{16}$ 独立地表示下列基团：氢、卤素、低级卤代烷基、低级烷基、羟基、低级羟基烷基、低级烷氧基、低级链烯基、氨基、低级烷基氨基、硝基、低级硝基烷基、氰基、低级氰基烷基、酰胺基、环烷基、取代芳基、低级酰胺基烷基、胍基、低级胍基烷基、叠氮基：

[0021] 优选R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub>、R<sub>15</sub>、R<sub>16</sub>表示下列基团：氢、低级烷氧基、羟基；

[0022] X表示下列基团:硫、氧、氮、氮甲基;

[0023] 优选X表示下列基团:硫、氮甲基;

[0024] 本文中与烷基和烷氧基有关的术语“低级”指含1至6个碳原子的直链或支链饱和脂肪烃基团;与链烯基或链炔基有关的术语“低级”指含2至6个碳原子和一个或多个双键或三键的基团;环烷基是指含3至7个碳的环;芳基指单、二或三环烃化合物,其中至少一个环为芳香环,每个环含最多7个碳原子。

[0025] 上述取代反向吴茱萸碱类化合物可以为其消旋体,也可以为其d-型或l-型异构体。

[0026] 经试验抗肿瘤效果较好化合物R<sub>1</sub>至R<sub>16</sub>具体的取代基详见表1和表2。

[0027] 表1 优选化合物的化学结构(通式I)

[0028]

序 号	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>	R <sub>11</sub>	R <sub>12</sub>	n
1	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
2	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	H	H	H	1
3	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1

[0029]

4	H	Cl	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
5	H	Br	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
6	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	Cl	H	H	1
7	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	H	Cl	H	1
8	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	F	H	H	1
9	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	1
10	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	-CO-	H	H	H	H	H	H	H	1
11	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	-CO-	H	H	H	H	H	H	H	1
12	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
13	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	Br	H	H	1
14	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	Br	H	H	1
15	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	-CO-	H	H	H	H	Br	H	H	1
16	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	Cl	H	H	1
17	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	1
18	H	CH <sub>3</sub>	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
19	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	1
20	H	F	H	H	-CO-	H	H	H	H	H	-SCH <sub>3</sub>	H	1
21	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OH	H	H	1
22	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OH	1
23	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	1
24	H	H	-NH <sub>2</sub>	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
25	H	H	H	H	-CO-	H	H	Br	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	1
26	H	F	H	H	-CO-	H	H	Br	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
27	H	F	H	H	-CO-	H	H	-CHO	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
28	H	F	H	H	-CO-	H	H	-CH <sub>2</sub> OH	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
29	H	CH <sub>3</sub>	H	H	-CO-	H	H	-CHO	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
30	H	CH <sub>3</sub>	H	H	-CO-	H	H	-CH <sub>2</sub> OH	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
31	H	H	H	H	-CS-	H	H	H	H	F	H	H	1
32	H	H	H	H	-CO-	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1

[0030]

33	H	F	H	H	-CO-	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	1
34	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	2
35	H	H	H	H	-CO-	H	H	H	H	-OH	H	H	2

[0031] 表2 优选化合物的化学结构(通式 II)

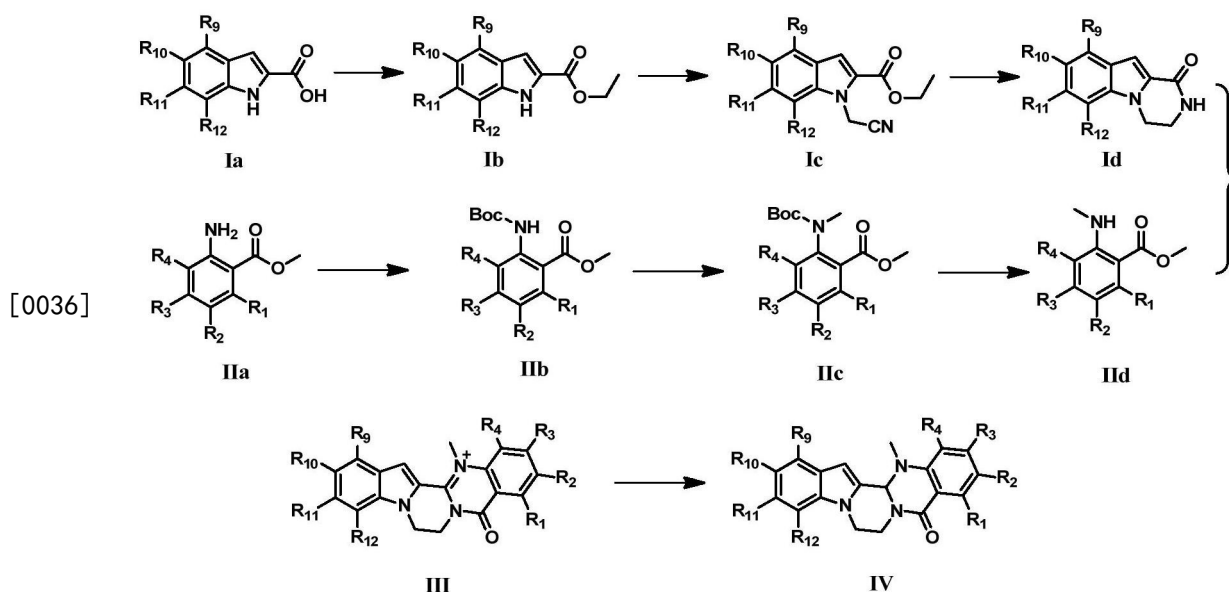
[0032]

序号	R <sub>13</sub>	R <sub>14</sub>	R <sub>15</sub>	R <sub>16</sub>	X
36	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	-NCH <sub>3</sub>
37	H	-OH	H	H	-NCH <sub>3</sub>
38	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	S
39	H	-OH	H	H	S

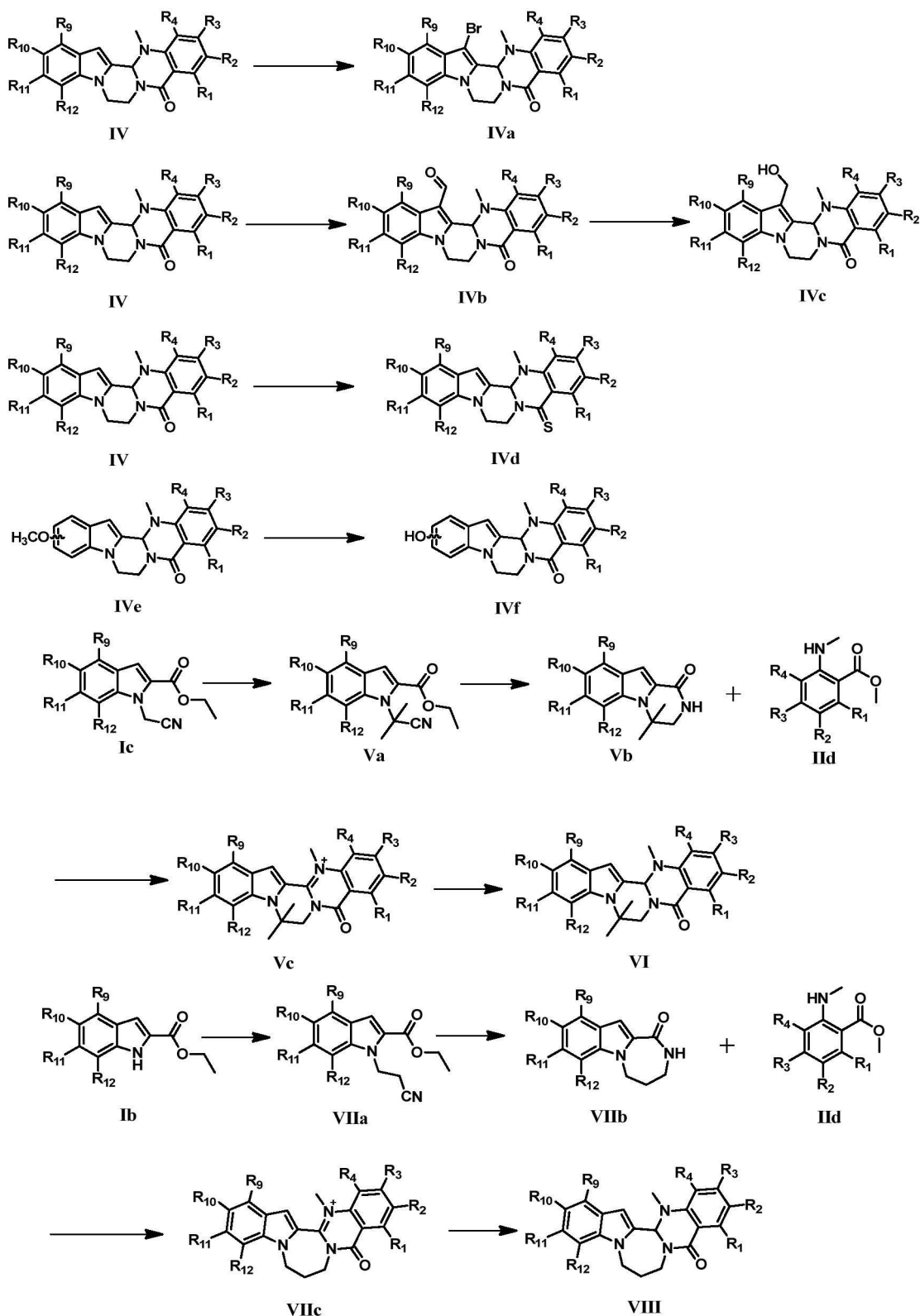
[0033] 上述反向吴茱萸碱类化合物可按照常规方法制备成药用盐的形式。

[0034] 本发明的吲哚并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物,包括其消旋体、d-型或l-型异构体,及其药学上可接受的盐,所述的药学上可接受的盐包括其有机酸盐及无机酸盐:无机酸包括(但不限于)盐酸、硫酸、磷酸、二磷酸、氢溴酸、硝酸等,有机酸包括(但不限于)乙酸、马来酸、富马酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、对甲苯磺酸、水杨酸、草酸等。

[0035] 本发明的第二方面,是提供了上述的吲哚并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物,包括其消旋体、d-型或l-型异构体,及其药学上可接受的盐的制备方法,该制备方法的反应流程如下:







[0037]

[0038] 具体步骤为:

[0039] 1、化合物IV的制备

[0040] 取代的吲哚-2-羧酸(Ia)在乙醇中回流18小时,得到取代的吲哚-2-羧酸乙酯(Ib)。

[0041] 取代的吲哚-2-羧酸乙酯(Ib)在NaH作用下与溴乙腈0-5℃反应半小时,再 在室温

下反应7小时得到取代的1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯(Ic)。

[0042] 取代的1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯(Ic)在硼氢化钠和二氯化钴的作用下,0-5℃反应一小时,再回流4小时得到取代的3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮(Id)。

[0043] 取代的2-氨基苯甲酸甲酯(IIa)在二氯甲烷中与Boc酸酐反应10小时得到取代的2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯(IIb)。

[0044] 取代的2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯(IIb)在NaH作用下与碘甲烷反应10小时得到取代的2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯(IIc)。

[0045] 取代的2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯(IIc)在三氟乙酸的作用下反应2小时得到取代的2-甲氨基苯甲酸甲酯(IId)。

[0046] 取代的3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮(Id)和取代的2-甲氨基苯甲酸甲酯(IId)在三氯氧磷作用下,微波条件130℃,45分钟得到取代的化合物III,进一步在硼氢化钠作用下得到取代的反向吴茱萸碱(IV)。

[0047] 2、化合物IVa制备

[0048] 化合物IV溶于四氯化碳中,加入AIBN和NBS,加热回流3.5小时得到目标化合物IVa。

[0049] 3、化合物IVb制备

[0050] 化合物IV在DMF中与三氯氧磷反应3小时得到目标化合物IVb。

[0051] 4、化合物IVc制备

[0052] 化合物IVb溶于适量甲醇,加入硼氢化钠反应1小时得到目标化合物IVc。

[0053] 5、化合物IVd制备

[0054] 化合物IV溶于甲苯中,加入劳森试剂,加热回流4小时,得到目标化合物IVd。

[0055] 6、化合物IVf制备

[0056] 化合物IVe溶于二氯甲烷中,在三溴化硼作用下-78℃反应半小时,在室温反应2小时得到目标化合物IVf。

[0057] 7、化合物VI制备

[0058] 取代的1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯(Ic)溶于THF中,0℃条件下加入碘甲烷和三甲基硅烷钠,再室温反应24小时得到化合物Va,进一步参照化合物IV的合成方法得到目标化合物VI。

[0059] 8、化合物VIII制备

[0060] 取代的吡啶-2-羧酸乙酯(Ib)在苄基三甲基氢氧化铵作用下与烯丙腈先回流一小时,再室温过夜得到取代的1-(2-氰乙基)-1H-吡啶-2-羧酸乙酯(VIIa)。

[0061] 取代的1-(2-氰乙基)-1H-吡啶-2-羧酸乙酯(VIIa)在硼氢化钠和二氯化钴的作用下,0-5℃反应一小时,再回流4小时得到取代的化合物VIIb。

[0062] 取代的化合物VIIb和取代的2-甲氨基苯甲酸甲酯(IId)在三氯氧磷作用下,微波条件130℃,45分钟得到取代的化合物VIIc,进一步在硼氢化钠作用下得到取代的反向吴茱萸碱(VIII)。

[0063] 本发明的化合物可进一步制备药学上可接受的盐。如化合物溶于乙酸乙酯中,滴加饱和的HCl乙酸乙酯溶液制备盐酸盐。

[0064] 本发明的化合物制备d-型或l-型异构体,可采用手性柱拆分的方法得到。

[0065] 本发明的第三方面,是提供了上述是提供了上述的吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物,包括其消旋体、d-型或l-型异构体,及其药学上可接受的盐在制备拓扑异构酶抑制剂中的应用。特别是Top1。

[0066] 本发明还提供了上述是提供了上述的吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物,包括其消旋体、d-型或l-型异构体,及其药学上可接受的盐在制备微管蛋白抑制剂中的应用。

[0067] 本发明的化合物可以制备拓扑异构酶I/微管蛋白双重抑制剂。

[0068] 本发明选取部分化合物进行Top1的酶活性抑制试验,试验方法采用凝胶电泳法(Journal of medicinal chemistry55.17(2012):7593-7613)。具体实验方法和实验结果参照实施例41。

[0069] 本发明选取部分化合物进行微管蛋白酶活性抑制实验。具体实验方法和实验结果参照实施例42。

[0070] 进一步地,本发明还提供了上述的吡啶并六氢吡嗪并喹啉酮类化合物,包括其消旋体、d-型或l-型异构体,及其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0071] 所述的肿瘤为肺癌、肠癌、乳腺癌等。

[0072] 对本发明的化合物进行了肿瘤细胞增殖抑制试验,试验方法采用常规的MTT法,细胞株选用A549(人肺癌细胞)、HCT116(人肠癌细胞)、MDA-MB-435(人乳腺癌细胞)。培养液为DMEM+15%NBS+双抗。以上实验结果表明,本发明的化合物具有良好的抗肿瘤活性,部分化合物的抗肿瘤活性优于喜树碱,因此本发明化合物及其盐类可以用于制备抗肿瘤药物。

[0073] 本发明化合物的药理活性使其可以用于制备抗肿瘤药物。该药物组合物可以是固体形式或是液体形式。

## 附图说明

[0074] 图1是部分化合物浓度100 $\mu$ M时抑制Top1介导的DNA解螺旋作用,

[0075] 其中:条带1,超螺旋质粒DNA(pBR322);条带2,DNA+Top1;条带3,DNA+Top1+CPT;条带5-11,DNA+Top1+化合物(34,33,25,17,1,3,6和9)。

## 具体实施方式

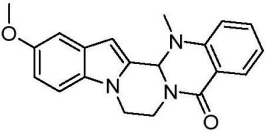
[0076] 现结合实施例,对本发明作详细描述,但本发明的实施不仅限于此。本发明所用试剂和原料均市售可得或可按文献方法制备。

[0077] 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,或按照制造厂商所建议的条件。

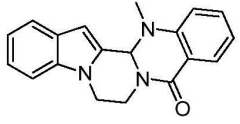
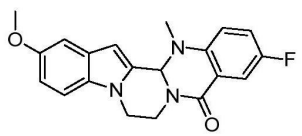
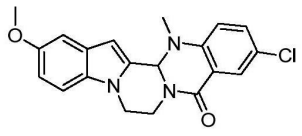
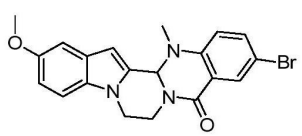
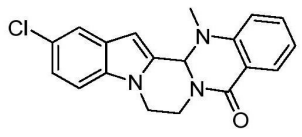
[0078] 以下实施例所涉化合物对应通式(I)和(II),<sup>1</sup>HNMR和MS数据详见表3。表3中序号1-39为化合物编号,不仅一一对应于表1和表2中的序号,同时也对应下面的实施例1-39制备的具体化合物。

[0079] 表3 优选化合物<sup>1</sup>HNMR和MS数据

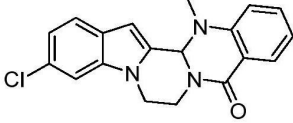
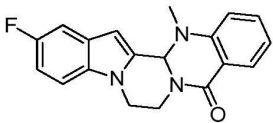
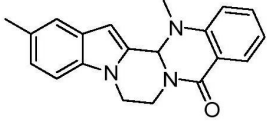
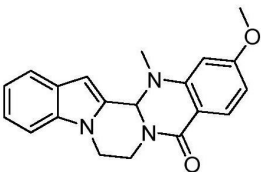
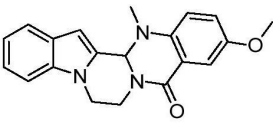
[0080]

序号	结构	<sup>1</sup> H-NMR
1		<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, <i>d</i> <sup>6</sup> -DMSO) $\delta$ = 7.66 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.43 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.28 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.88 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 6.75-6.79 (m, 2H), 6.30 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 4.72 (dd, <i>J</i> = 5.40, 13.7 Hz, 1H), 3.13-4.16 (m, 1H), 3.95-3.99 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.56-3.61 (m, 1H), 3.23 (s, 3H). ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 334.27 [M+H].

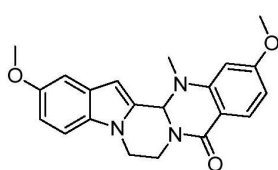
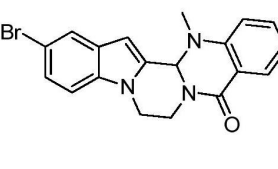
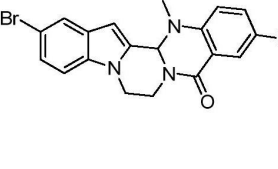
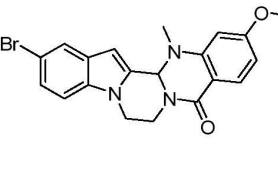
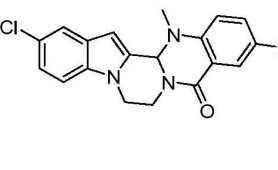
[0081]

2		$^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ = 6.92-7.98 (m, 8H), 6.49 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 4.96-5.02 (m, 1H), 4.20-4.24 (m, 2H), 3.39-3.49 (m, 1H), 3.06 (s, 3H). $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) $\delta$ = 29.72, 36.87, 40.77, 71.39, 100.06, 109.17, 115.21, 117.93, 120.05, 120.52, 120.96, 122.31, 127.58, 128.95, 132.74, 134.00, 136.69, 148.38, 164.41. ESI-MS (m/z): 304.16 [M+H].
3		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.39 (dd, $J$ = 3.2, 8.9 Hz, 1H), 7.32-7.36 (m, 1H), 7.29 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 7.00 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 6.97 (dd, $J$ = 4.3, 9.1 Hz, 1H), 6.79 (dd, $J$ = 9.1, 8.8 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 4.69 (dd, $J$ = 4.8, 13.6 Hz, 1H), 4.18-4.21 (m, 1H), 3.95-4.00 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.57-3.62 (m, 1H), 3.14 (s, 3H). MS (ESI) m/z: 352.35 (M+H).
4		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.57 (d, $J$ = 2.6 Hz, 1H), 7.47 (dd, $J$ = 2.6, 8.8 Hz, 1H), 7.28 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 6.99 (d, $J$ = 2.5 Hz, 1H), 6.93 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 6.79 (dd, $J$ = 2.5, 8.8 Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 4.71 (dd, $J$ = 5.5, 13.6 Hz, 1H), 4.15-4.18 (m, 1H), 3.94-4.00 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.58-3.63 (m, 1H), 3.24 (s, 3H). MS (ESI) m/z: 368.16 (M+H).
5		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.69 (d, $J$ = 2.5 Hz, 1H), 7.58 (dd, $J$ = 2.5, 8.8 Hz, 1H), 7.28 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 6.98 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 6.88 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 6.79 (dd, $J$ = 2.5, 8.8 Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.71 (dd, $J$ = 5.5, 13.6 Hz, 1H), 4.15-4.18 (m, 1H), 3.94-3.99 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.58-3.63 (m, 1H), 3.24 (s, 3H). MS (ESI) m/z: 414.32 (M+H).
6		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.65 (dd, $J$ = 1.4, 7.7 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.41-7.45 (m, 2H), 7.14 (dd, $J$ = 1.6, 8.7 Hz, 1H), 6.89 (d, $J$ = 8.4 Hz, 1H), 6.76 (t, $J$ = 7.6 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 4.73 (dd, $J$ = 5.4, 10.7 Hz, 1H), 4.19-4.23 (m, 1H), 4.00-4.05 (m, 1H), 3.59-3.64 (m, 1H), 3.26 (s, 3H). MS (ESI) m/z: 338.43 (M+H).

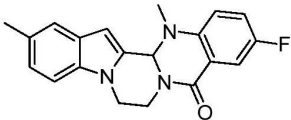
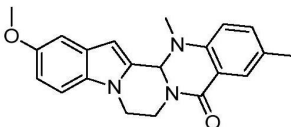
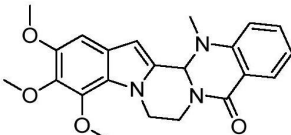
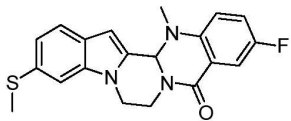
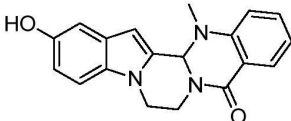
[0082]

7		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.65-7.67 (m, 1H), 7.53-7.54 (m, 1H), 7.49 (d, $J$ = 8.4 Hz, 1H), 7.43-7.46 (m, 1H), 7.06 (dd, $J$ = 1.9, 8.3 Hz, 1H), 6.89 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1H), 6.75-6.78 (m, 1H), 6.39 (t, $J$ = 1.1 Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.73 (dd, $J$ = 5.4, 13.4 Hz, 1H), 4.21-4.24 (m, 1H), 3.99-4.05 (m, 1H), 3.59-3.65 (m, 1H), 3.27 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 338.28 (M+H).
8		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.67 (dd, $J$ = 1.6, 7.7 Hz, 1H), 7.43-7.46 (m, 1H), 7.41 (dd, $J$ = 4.4, 8.9 Hz, 1H), 7.26 (dd, $J$ = 2.6, 9.8 Hz, 1H), 7.00 (td, $J$ = 9.4, 2.5 Hz, 1H), 6.90 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 6.75-6.78 (m, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 4.75 (dd, $J$ = 5.4, 13.6 Hz, 1H), 4.20-4.22 (m, 1H), 4.00-4.06 (m, 1H), 3.59-3.65 (m, 1H), 3.26 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 322.49 (M+H).
9		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.66 (d, $J$ = 7.5 Hz, 1H), 7.42-7.45 (m, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.97 (d, $J$ = 8.2 Hz, 1H), 6.89 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 6.76 (t, $J$ = 3.5 Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 4.73 (dd, $J$ = 5.3, 15.6 Hz, 1H), 4.15-4.18 (m, 1H), 3.96-4.01 (m, 1H), 3.57-3.63 (m, 1H), 3.25 (s, 3H), 2.34 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 318.36 (M+H).
10		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ = 7.89 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 7.59 (dt, $J$ = 7.9, 0.96 Hz, 1H), 7.33 (dq, $J$ = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.24-7.27 (m, 1H), 7.73-7.16 (m, 1H), 6.47 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 6.45-6.46 (m, 1H), 6.33 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.99-5.03 (m, 1H), 4.17-4.26 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.41-3.46 (m, 1H), 3.14 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 334.57 (M+H).
11		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.51 (d, $J$ = 7.7 Hz, 1H), 7.42 (dd, $J$ = 8.3, 0.8 Hz, 1H), 7.24 (d, $J$ = 3.1 Hz, 1H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.11 (dd, $J$ = 8.9, 3.1 Hz, 1H), 7.04-7.07 (m, 1H), 6.97 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 4.69-4.72 (m, 1H), 4.26-4.29 (m, 1H), 4.01-4.06 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.58-3.63 (m, 1H), 3.05 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 334.57 (M+H).

[0083]

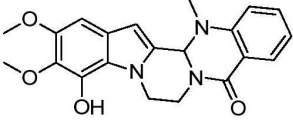
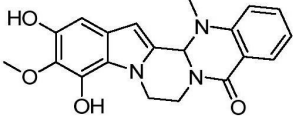
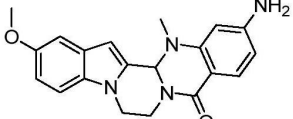
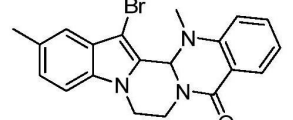
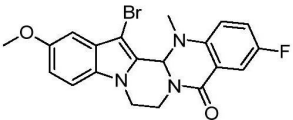
12		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ = 7.90 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 7.21 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 7.05 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 6.91 (dd, $J$ = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.46 (dd, $J$ = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 6.33 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.97-5.00 (m, 1H), 4.12-4.22 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.39-3.44 (m, 1H), 3.12 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 364.44 (M+H).
13		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.65 (d, $J$ = 1.8 Hz, 1H), 7.63 (d, $J$ = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 7.40-7.43 (m, 1H), 7.36 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 7.23 (dd, $J$ = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 6.87 (d, $J$ = 8.1 Hz, 1H), 6.74 (t, $J$ = 7.3 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 4.71 (dd, $J$ = 13.7, 5.3 Hz, 1H), 4.19 (dd, $J$ = 12.0, 5.4 Hz, 1H), 3.97-4.03 (m, 1H), 3.56-3.62 (m, 1H), 3.23 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 382.42 (M+H).
14		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.67 (d, $J$ = 1.7 Hz, 1H), 7.35-7.39 (m, 2H), 7.30-7.34 (m, 1H), 7.25 (dd, $J$ = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 6.94-6.97 (m, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 4.66-4.72 (m, 1H), 4.21-4.25 (m, 1H), 3.98-4.03 (m, 1H), 3.57-3.63 (m, 1H), 3.15 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 400.58 (M+H).
15		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.64 (d, $J$ = 2.0 Hz, 1H), 7.54-7.55 (m, 1H), 7.34 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 7.23 (dd, $J$ = 8.7, 1.9 Hz, 1H), 6.29-6.31 (m, 4H), 4.68 (dd, $J$ = 13.7, 5.8 Hz, 1H), 4.13-4.16 (m, 1H), 3.95-4.00 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.54-3.59 (m, 1H), 3.26 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 412.26 (M+H).
16		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.52 (d, $J$ = 1.9 Hz, 1H), 7.41 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 7.37 (dd, $J$ = 8.8, 3.1 Hz, 1H), 7.33 (td, $J$ = 8.7, 3.1 Hz, 1H), 7.13 (dd, $J$ = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 6.96 (dd, $J$ = 9.1, 4.3 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.69 (dd, $J$ = 13.5, 5.1 Hz, 1H), 4.23 (dd, $J$ = 12.1, 4.6 Hz, 1H), 3.99-4.04 (m, 1H), 3.57-3.63 (m, 1H), 3.15 (s, 3H).; MS (ESI) $m/z$ : 356.62 (M+H).

[0084]

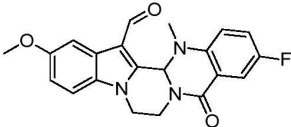
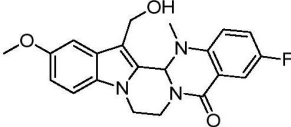
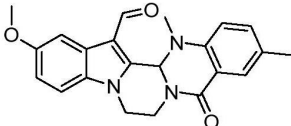
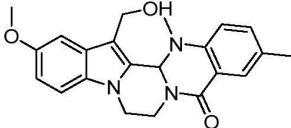
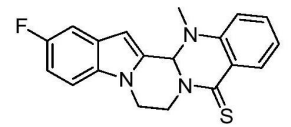
17		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.37 (dd, $J$ = 8.9, 3.1 Hz, 1H), 7.32 (td, $J$ = 8.8, 3.1 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.93-6.96 (m, 2H), 6.29 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 4.68 (dd, $J$ = 13.7, 5.1 Hz, 1H), 4.16-4.20 (m, 1H), 3.93-3.99 (m, 1H), 3.55-3.61 (m, 1H), 3.13 (s, 3H), 2.32 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 336.35 (M+H).
18		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.46-7.47 (m, 1H), 7.27 (d, $J$ = 9.0 Hz, 1H), 7.24-7.26 (m, 1H), 6.97 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 6.82 (d, $J$ = 8.4 Hz, 1H), 6.77 (dd, $J$ = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 4.69 (dd, $J$ = 13.4, 4.7 Hz, 1H), 4.15 (dd, $J$ = 11.9, 4.4 Hz, 1H), 3.95 (dd, $J$ = 11.9, 5.5 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.53-3.59 (m, 1H), 3.15 (s, 3H), 2.17 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 348.42 (M+H).
19		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.67 (dd, $J$ = 1.5, 7.6 Hz, 1H), 7.42-7.45 (m, 1H), 6.88 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.76 (d, $J$ = 7.3 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.65 (dd, $J$ = 4.6, 13.7 Hz, 1H), 4.43-4.46 (m, 1H), 4.11-4.16 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.73 (s, 6H), 3.54-3.57 (m, 1H), 3.19 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 394.28 (M+H).
20		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.42 (dd, $J$ = 8.3, 0.4 Hz, 1H), 7.38 (dd, $J$ = 8.9, 3.1 Hz, 1H), 7.31-7.35 (m, 2H), 6.99 (dd, $J$ = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 6.96 (dd, $J$ = 9.0, 4.3 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.31 (d, $J$ = 1.0 Hz, 1H), 4.69 (dd, $J$ = 13.56, 4.3 Hz, 1H), 4.23-4.26 (m, 1H), 3.98-4.03 (m, 1H), 3.57-3.62 (m, 1H), 3.15 (s, 3H), 2.49 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 366.42 (M-H).
21		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 8.80 (s, 1H), 7.65 (dd, $J$ = 1.6, 7.7 Hz, 1H), 7.41-7.44 (m, 1H), 7.16 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 6.87 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 6.79 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 6.75 (t, $J$ = 7.6 Hz, 1H), 6.64 (dd, $J$ = 2.3, 8.6 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.16 (s, 1H), 4.71 (dd, $J$ = 5.6, 13.5 Hz, 1H), 4.08-4.11 (m, 1H), 3.90-3.95 (m, 1H), 3.56-3.59 (m, 1H), 3.23 (s, 3H). ESI-MS ( $m/z$ ): 318.53 (M-H).



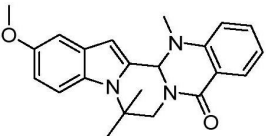
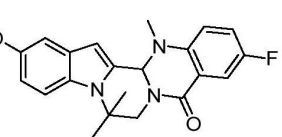
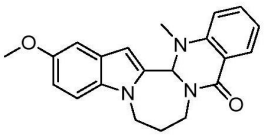
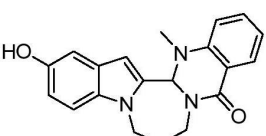
[0085]

22		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 8.30 (s, 1H), 7.67 (dd, $J$ = 1.5, 7.7 Hz, 1H), 7.41-7.44 (m, 1H), 6.86 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1H), 6.75-6.78 (m, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 6.14 (d, $J$ = 1.1 Hz, 1H), 4.64 (dd, $J$ = 4.5, 13.5 Hz, 1H), 4.42-4.45 (m, 1H), 4.07-4.11 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.51-3.56 (m, 1H), 3.19 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 378.14 (M-H).
23		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 8.74 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.67 (dd, $J$ = 1.6, 7.7 Hz, 1H), 7.41-7.44 (m, 1H), 6.85 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1H), 6.74-6.77 (m, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 6.06 (d, $J$ = 1.08 Hz, 1H), 4.64 (dd, $J$ = 4.6, 13.4 Hz, 1H), 4.39-4.42 (m, 1H), 4.03-4.08 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.50-3.55 (m, 1H), 3.18 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 364.13 (M-H).
24		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.29 (d, $J$ = 8.4 Hz, 1H), 7.25 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 6.97 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 6.76 (dd, $J$ = 2.5, 8.9 Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.93 (dd, $J$ = 2.0, 8.4 Hz, 1H), 5.89 (d, $J$ = 1.8 Hz, 1H), 5.81 (s, 2H), 4.64 (dd, $J$ = 5.5, 13.7 Hz, 1H), 4.03-4.07 (m, 1H), 3.88-3.93 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.47-3.52 (m, 1H), 3.18 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 349.35 (M+H).
25		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.78 (d, $J$ = 7.7 Hz, 1H), 7.47-7.50 (m, 1H), 7.43 (d, $J$ = 8.5 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.11 (d, $J$ = 8.4 Hz, 1H), 7.08 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 6.97 (t, $J$ = 7.5 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 4.64 (dd, $J$ = 3.5, 13.4 Hz, 1H), 4.40-4.42 (m, 1H), 4.03-4.08 (m, 1H), 3.35-3.38 (m, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.40 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 430.42 (M+H).
26		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.57 (dd, $J$ = 8.8, 3.0 Hz, 1H), 7.53 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 7.26 (td, $J$ = 8.76, 3.1 Hz, 1H), 7.26 (m, 1H), 6.98 (dd, $J$ = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.93 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 4.66-4.69 (m, 1H), 4.49-4.52 (m, 1H), 4.08-4.13 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.37-3.43 (m, 1H), 2.78 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 432.30 (M+H).

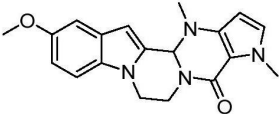
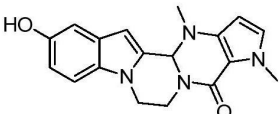
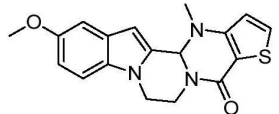
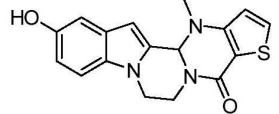
[0086]

27		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 10.17 (s, 1H), 7.67 (d, $J$ = 2.5 Hz, 1H), 7.58 (dd, $J$ = 8.9, 2.9 Hz, 1H), 7.56 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 7.44 (td, $J$ = 8.7, 3.0 Hz, 1H), 7.35-7.38 (m, 1H), 6.97 (dd, $J$ = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.67 (dd, $J$ = 13.6, 2.8 Hz, 1H), 4.55 (d, $J$ = 12.0 Hz, 1H), 4.12-4.17 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.44-3.49 (m, 1H), 2.61 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 380.37 (M+H).
28		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.55 (dd, $J$ = 8.8, 3.1 Hz, 1H), 7.36-7.41 (m, 2H), 7.22-7.25 (m, 1H), 7.20 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 6.84 (dd, $J$ = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 4.64-4.71 (m, 3H), 4.58-4.61 (m, 1H), 4.41-4.44 (m, 1H), 3.99 (td, $J$ = 11.8, 3.7 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.26-3.30 (m, 1H), 2.57 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 382.15 (M+H).
29		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 10.17 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.67 (d, $J$ = 2.5 Hz, 1H), 7.55 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 7.36-7.38 (m, 1H), 7.18 (d, $J$ = 8.2 Hz, 1H), 6.97 (d, $J$ = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.59 (s, 1H), 4.66-4.70 (m, 1H), 4.51-4.55 (m, 1H), 4.12-4.17 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.44-3.49 (m, 1H), 2.65 (s, 3H), 2.30 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 376.28 (M+H).
30		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.66 (s, 1H), 7.37 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 7.33 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 7.20 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 7.07 (d, $J$ = 8.2 Hz, 1H), 6.84 (dd, $J$ = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 4.64-4.70 (m, 3H), 4.62 (d, $J$ = 13.8 Hz, 1H), 4.42 (d, $J$ = 10.1 Hz, 1H), 3.99 (dt, $J$ = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.22-3.27 (m, 1H), 2.59 (s, 3H), 2.29 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 378.18 (M+H).
31		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 8.20 (dd, $J$ = 1.3, 8.0 Hz, 1H), 7.44-7.48 (m, 2H), 7.29 (dd, $J$ = 2.3, 9.7 Hz, 1H), 7.03 (dt, $J$ = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.96 (d, $J$ = 8.1 Hz, 1H), 6.82 (t, $J$ = 7.2 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.56 (dd, $J$ = 5.0, 13.6 Hz, 1H), 4.36-4.39 (m, 1H), 4.23-4.28 (m, 1H), 4.02-4.08 (m, 1H), 3.15 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 338.11 (M+H).

[0087]

32		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.67 (dd, $J$ = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.52 (d, $J$ = 9.1 Hz, 1H), 7.40-7.44 (m, 1H), 6.98 (d, $J$ = 2.5 Hz, 1H), 6.87 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 6.77 (td, $J$ = 7.5, 0.9 Hz, 1H), 6.72 (dd, $J$ = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 4.68 (d, $J$ = 13.7 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.35 (d, $J$ = 13.8 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.47 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 362.14 (M+H).
33		$^1\text{H}$ NMR (600MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ = 7.71 (dd, $J$ = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 7.49 (d, $J$ = 9.0 Hz, 1H), 7.18 (td, $J$ = 8.6, 3.0 Hz, 1H), 7.07 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 6.96 (dd, $J$ = 9.0, 4.3 Hz, 1H), 6.87 (dd, $J$ = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.66 (d, $J$ = 13.6 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.27 (d, $J$ = 13.6 Hz, 1H), 2.78 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.67 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 380.17 (M+H).
34		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.60 (dd, $J$ = 1.5, 7.6 Hz, 1H), 7.46-7.49 (m, 1H), 7.36 (d, $J$ = 9.0 Hz, 1H), 6.94 (d, $J$ = 8.2 Hz, 1H), 6.88 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 6.77 (t, $J$ = 7.56 Hz, 1H), 6.73 (dd, $J$ = 2.5, 8.9 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.56 (s, 1H), 4.62-4.66 (m, 2H), 4.14 (dd, $J$ = 12.3, 14.2 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.21 (d, $J$ = 13.9 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 2.07 (d, $J$ = 12.7, 1H), 1.55-1.64 (m, 1H). MS (ESI) $m/z$ : 348.18 (M+H).
35		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 8.67 (s, 1H), 7.60 (dd, $J$ = 1.5, 7.6 Hz, 1H), 7.46-7.49 (m, 1H), 7.24 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 6.93 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 6.76 (t, $J$ = 14.9 Hz, 1H), 6.66 (d, $J$ = 2.2 Hz, 1H), 6.60 (dd, $J$ = 2.3, 8.8 Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.55 (s, 1H), 4.57-4.64 (m, 2H), 4.08-4.13 (m, 2H), 3.17 (s, 3H), 2.05 (d, $J$ = 12.4 Hz, 1H), 1.57-1.64 (m, 1H). ESI-MS ( $m/z$ ): 334.16 [M+H].

[0088]

36		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.35 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 7.06 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 6.91 (dd, $J$ = 0.4, 2.8 Hz, 1H), 6.81 (dd, $J$ = 2.5, 8.9 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.81 (d, $J$ = 2.7 Hz, 1H), 4.45-4.49 (m, 1H), 4.27-4.30 (m, 1H), 3.93-3.98 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.30-3.35 (m, 1H), 2.62 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 337.25 (M+H).
37		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 8.75 (s, 1H), 7.23 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 6.90 (dd, $J$ = 0.5, 2.7 Hz, 1H), 6.86 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 6.68 (dd, $J$ = 2.3, 8.7 Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.89 (d, $J$ = 1.0 Hz, 1H), 5.79 (d, $J$ = 2.7 Hz, 1H), 4.45-4.48 (m, 1H), 4.21-4.24 (m, 1H), 3.89-3.94 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.29-3.34 (m, 1H), 2.62 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 323.15 (M+H).
38		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 7.81 (d, $J$ = 5.3 Hz, 1H), 7.32 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 7.04 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 6.96 (d, $J$ = 5.3 Hz, 1H), 6.81 (dd, $J$ = 2.5, 8.9 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 4.54-4.57 (m, 1H), 4.20-4.23 (m, 1H), 3.94-3.99 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.45-3.50 (m, 1H), 3.07 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 340.15 (M+H).
39		$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $d^6$ -DMSO) $\delta$ = 8.76 (s, 1H), 7.81 (d, $J$ = 5.3 Hz, 1H), 7.20 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 6.95 (d, $J$ = 5.3 Hz, 1H), 6.84 (d, $J$ = 2.2 Hz, 1H), 6.67 (dd, $J$ = 2.3, 8.7 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 4.53-4.56 (m, 1H), 4.15-4.17 (m, 1H), 3.89-3.95 (m, 1H), 3.43-3.48 (m, 1H), 3.08 (s, 3H). MS (ESI) $m/z$ : 326.20 (M+H).

[0089] 实施例1:2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮

[0090] A、1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯制备

[0091] 化合物5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸(5g, 25.9mmol, 1equiv)溶于乙醇(80mL)中, 加入浓硫酸(4mL), 回流18小时。反应液冷却, 浓缩, 固体析出后, 过滤, 水洗, 干燥, 得到棕色固体5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯4g, 不经纯化 直接用于下一步反应。将其溶于DMF(40mL)中, 0℃条件下, 氢化钠(1.1g, 27.4mmol, 1.5equiv)分批加入, 继续搅拌30分钟后, 滴加溴乙腈(4.38g, 36.48mmol, 2equiv, 溶于10mL的DMF中), 常温过夜。反应完后, 倒入150mL水中, 乙酸乙酯(50mL×3)萃取, 饱和氯化钠水溶液(50mL×3)洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得粗产物, 经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=10:1-8:1)得白色固体1-氰甲基-

5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯4.2g,两步收率62%。

[0092] B、8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮制备

[0093] 化合物1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯(2g,7.7mmol,1equiv)溶于无水甲醇(30mL)和无水THF(15mL)中,加入二氯化钴(2g,15.4mmol,2equiv),冰浴条件下将硼氢化钠(1.85g,77mmol,10equiv)分批加入,升至室温,搅拌一小时后,加热到60℃,继续搅拌4小时。反应液经硅藻土过滤,二氯甲烷洗,滤液浓缩,再经硅胶柱层析纯化(洗脱剂:二氯甲烷/甲醇=130:1-100:1),得到白色固体8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮0.9g,收率51%。

[0094] C、2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯制备

[0095] 将2-氨基苯甲酸甲酯(1.9g,12.7mmol,1equiv)溶于二氯甲烷(100mL)中,Boc酸酐(4.2g,19.1mmol,1.5equiv),DMAP(0.15g,1.27mmol,0.1equiv),室温搅拌过夜。反应完全后,经硅胶柱层析纯化(洗脱剂:石油醚/乙酸乙酯=130:1-100:1),得到白色固体2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯1.3g,收率41%。

[0096] D、2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯制备

[0097] 2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯(1.0g,3.9mmol,1equiv)溶于DMF(25mL)中,冰浴条件下,分批加入氢化钠(0.24g,5.8mmol,1.5equiv),搅拌0.5小时后,加入碘甲烷(0.8g,12.7mmol,1.5equiv),升至室温后,搅拌过夜。反应完全后,加入水(100mL)稀释,乙酸乙酯(50mL×3)萃取,饱和氯化钠水溶液(50mL×3)洗,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得粗产物,经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂:石油醚/乙酸乙酯=50:1)得白色固体2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯0.7g,收率67%。

[0098] E、2-甲氨基苯甲酸甲酯制备

[0099] 化合物3-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯(0.5g,1.8mmol,1equiv)和三氟乙酸(4.1g,36mmol,20equiv)加入二氯甲烷(50mL)中,室温搅拌2小时后,浓缩,加入饱和碳酸钠水溶液中和至PH到7,乙酸乙酯(50mL×3)萃取,饱和氯化钠水溶液(50mL×3)洗,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到无色油状物2-甲氨基苯甲酸甲酯0.25g,收率86%。

[0100] F、2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮制备

[0101] 30mL的微波反应瓶中,加入化合物2-甲氨基苯甲酸甲酯(0.2g,1.21mmol,1equiv),化合物8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮(0.26g,1.21mmol,1equiv),三氯氧磷(1mL)和干燥甲苯(20mL),微波条件130℃,45分钟,反应完后蒸干溶剂,不经纯化直接用于下一步反应。将上步产物溶于20mL乙醇中,加入硼氢化钠(0.14g,3.63mmol,3equiv),室温搅拌2小时,蒸干溶剂,加入50mL水稀释,用二氯甲烷萃取(50mL×3),有机相合并,无水硫酸钠干燥,浓缩,再经硅胶柱层析纯化(洗脱剂:石油醚/乙酸乙酯=2:1),得到白色固体2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.1g,两步收率27%。

[0102] 实施例2:14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0103] 按照实施例1的方法,在步骤A中以1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-

氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤F中以3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到黄色粉末14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.37g,总收率36.5%。

[0104] 实施例3:11-氟-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0105] 按照实施例1的方法,在步骤C中以5-氟-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯,得到淡黄色粉末11-氟-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.33g,总收率23.2%。

[0106] 实施例4:11-氯-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0107] 按照实施例1的方法,在步骤C中以5-氯-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氯苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氯苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氯苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氯苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-氯-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以5-氯-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯得到淡黄色粉末11-氯-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.25g,总收率15.3%。

[0108] 实施例5:11-溴-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0109] 按照实施例1的方法,在步骤C中以5-溴-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-溴苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-溴苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-溴苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-溴苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-溴-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以5-溴-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯得到淡黄色粉末11-溴-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.23g,总收率17.4%。

[0110] 实施例6:2-氯-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0111] 按照实施例1的方法,在步骤A中以5-氯-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-5-氯-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-5-氯-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到8-氯-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤F中以8-氯-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到白色粉末2-氯-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.15g,总收率23.2%。

[0112] 实施例7:3-氯-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0113] 按照实施例1的方法,在步骤A中以6-氯-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-6-氯-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-6-氯-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到7-氯-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤F中以7-氯-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到白色粉末3-氯-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.32g,总收率33.7%。

[0114] 实施例8:2-氟-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0115] 按照实施例1的方法,在步骤A中以5-氟-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-(氰甲基)-5-氟-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-(氰甲基)-5-氟-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-(氰甲基)-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到8-氟-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤F中以8-氟-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到白色粉末2-氟-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.15g,总收率23.2%。

[0116] 实施例9:2,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0117] 按照实施例1的方法,在步骤A中以5-甲基-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-5-甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-5-甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到8-甲基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤F中以8-甲基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到淡黄色粉末2,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.17g,总收率15.3%。

[0118] 实施例10:12-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0119] 按照实施例1的方法,在步骤A中以1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤C中以4-甲氧基-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到4-甲氧基-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,以4-甲氧基-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯得到白色粉末12-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.23g,总收率23.5%。

[0120] 实施例11:11-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0121] 按照实施例1的方法,在步骤A中以1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤C中以5-甲氧基-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-甲氧基苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-甲氧基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-甲氧基苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-甲氧基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-甲氧基-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,以5-甲氧基-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯得到浅绿色粉末11-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.22g,总收率24.9%。

[0122] 实施例12:2,12-二甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0123] 按照实施例1的方法,在步骤C中以4-甲氧基-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到4-甲氧基-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中,以4-甲氧基-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯得到黄色粉末2,12-二甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.11g,总收率13.2%。

[0124] 实施例13:2-溴-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0125] 按照实施例1的方法,在步骤A中以5-溴-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-5-溴-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-5-溴-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到8-溴-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤F中以8-溴-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到白色粉末2-溴-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.35g,总收率32.4%。

[0126] 实施例14:2-溴-11-氟-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0127] 按照实施例1的方法,在步骤A中以5-溴-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-5-溴-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-5-溴-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到8-溴-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤C中以5-氟-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以5-氟-2-甲氨基苯甲酸



甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯,以8-溴-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到白色粉末2-溴-11-氟-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.27g,总收率32.6%。

[0128] 实施例15:2-溴-12-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0129] 按照实施例1的方法,在步骤A中以5-溴-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-5-溴-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-5-溴-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到8-溴-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤C中以4-甲氧基-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-4-甲氧基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到4-甲氧基-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以8-溴-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,以4-甲氧基-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯得到白色粉末2-溴-12-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.17g,总收率18.5%。

[0130] 实施例16:2-氯-11-氟-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0131] 按照实施例1的方法,在步骤A中以5-氯-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-5-氯-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-5-氯-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到8-氯-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤C中以5-氟-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯,以8-氯-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到浅黄色粉末2-氯-11-氟-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.22g,总收率25.6%。

[0132] 实施例17:11-氟-2,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0133] 按照实施例1的方法,在步骤A中以5-甲基-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-5-甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-5-甲基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到8-甲基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤C中以5-氟-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧

羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯,以8-甲基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到黄色粉末11-氟-2,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.29g,总收率30.3%。

[0134] 实施例18:2-甲氧基-11,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0135] 按照实施例1的方法,在步骤C中以5-甲基-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-甲基苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-甲基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-甲基苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-甲基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-甲基-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以5-甲基-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯,以8-甲基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到黄色粉末2-甲氧基-11,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.24g,总收率28.7%。

[0136] 实施例19:2,3,4-三甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0137] 按照实施例1的方法,在步骤A中以5,6,7-三甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-5,6,7-三甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-5,6,7-三甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到6,7,8-三甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤F中以6,7,8-三甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到黄色粉末2,3,4-三甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.21g,总收率23.4%。

[0138] 实施例20:11-氟-14-甲基-3-甲硫基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0139] 按照实施例1的方法,在步骤A中以6-甲硫基-1H-吡啶-2-羧酸代替5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸,得到1-氰甲基-6-甲硫基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯,步骤B中以1-氰甲基-6-甲硫基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到7-甲硫基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,在步骤C中以5-氟-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯,在步骤F中以5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯,以7-甲硫基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮得到白色粉末11-氟-14-甲基-3-甲硫基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.11g,总收率13.5%。

[0140] 实施例21:2-羟基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉

### 啉-9(7H)-酮的合成

[0141] 化合物2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮(0.2g,0.6mmol,1equiv)溶于二氯甲烷(20mL)中。在氮气保护,-78℃条件下缓慢加入三溴化硼(0.06mL,0.6mmol,2equiv)。反应液先在-78℃条件下反应30分钟,然后再慢慢升至室温反应2小时。反应完全后,冰浴条件下加入甲醇(1mL)淬灭反应,再加入饱和碳酸氢钠水溶液(50mL),调pH到7-8,二氯甲烷萃取(50mL×3),饱和氯化钠(50mL×3)洗,无水硫酸钠干燥,然后蒸干溶剂,直接用硅胶柱层析(洗脱剂:二氯甲烷/甲醇=100:1)得到黄色粉末2-羟基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮0.10g,收率49.3%。

[0142] 实施例22:2-羟基-3,4-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮的合成

[0143] 按照实施例21的方法,以2,3,4-三甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮代替2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮,得到黄色粉末2-羟基-3,4-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮0.04g,收率15.3%。

[0144] 实施例23:2,4-二羟基-3-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮的合成

[0145] 按照实施例21的方法,以2,3,4-三甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮代替2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮,得到褐色粉末2,4-二羟基-3-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮0.03g,收率12.4%。

[0146] 实施例24:12-氨基-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮的合成

[0147] A、4-硝基-2-甲氨基苯甲酸甲酯制备

[0148] 按照实施例1的方法,在步骤C中以4-硝基-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-4-硝基苯甲酸甲酯,步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-4-硝基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-4-硝基苯甲酸甲酯,在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-4-硝基苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到4-硝基-2-甲氨基苯甲酸甲酯。

[0149] B、4-氨基-2-甲氨基苯甲酸甲酯制备

[0150] 化合物4-硝基-2-甲氨基苯甲酸甲酯(1.0g,5.1mmol),加入20mL DMF溶解,再加入0.12g Pd/C(1%),反应体系氢气排空6次,室温反应过夜,反应完后,用油泵蒸干溶剂,柱层析(二氯甲烷:甲醇=100:2)得到黄色粉末4-氨基-2-甲氨基苯甲酸甲酯0.76g,收率90.1%。

[0151] C、12-氨基-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮制备

[0152] 按照实施例1的方法,在步骤F中以4-氨基-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯,得到黄色粉末12-氨基-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉啉-9(7H)-酮0.13g,总收率23.6%。

[0153] 实施例25:15-溴-2-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0154] 化合物2,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮(0.1g,0.3mmol,1equiv)、AIBN(5mg,0.03mmol,0.1equiv)和NBS(56mg,0.3mmol,1equiv)加入四氯化碳(10mL)中,加热回流3.5小时,蒸干溶剂,经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂:石油醚/乙酸乙酯=3:1)得到白色粉末15-溴-2-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.03g,收率22.4%。

[0155] 实施例26:15-溴-11-氟-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0156] 按照实施例25的方法,将11-氟-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮代替2,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮得到黄色粉末15-溴-11-氟-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.04g,收率35.3%。

[0157] 实施例27:11-氟-2-甲氧基-14-甲基-7,9,14,14a-四氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-15-甲酰基咪唑的合成

[0158] 化合物11-氟-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮(0.1g,0.3mmol,1equiv)和三氯氧磷(66μL,2.5equiv)溶于DMF(10mL)中,室温搅拌3小时,用2M的氢氧化钠溶液调PH至7,固体析出后,过滤,水洗,干燥得到白色粉末11-氟-2-甲氧基-14-甲基-7,9,14,14a-四氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-15-甲酰基咪唑0.1g,收率86.7%。

[0159] 实施例28:11-氟-15-羟甲基-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0160] 化合物11-氟-2-甲氧基-14-甲基-7,9,14,14a-四氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-15-甲酰基咪唑(0.1g,0.3mmol,1equiv)和NaBH<sub>4</sub>(12mg,0.6mmol,2equiv)溶于甲醇(10mL)中,室温搅拌1小时后,加入水(15mL),固体析出后,过滤,干燥得到白色粉末11-氟-15-(四氢甲基)-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.09g,收率90.1%。

[0161] 实施例29:2-甲氧基-11,14-二甲基-7,9,14,14a-四氢-6H-吡啶[2',1,3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-15-甲酰基咪唑的合成

[0162] 按照实施例27的方法,用2-甲氧基-11,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮代替11-氟-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮,得到白色粉末2-甲氧基-11,14-二甲基-7,9,14,14a-四氢-6H-吡啶[2',1,3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-15-甲酰基咪唑0.11g,收率82.3%。

[0163] 实施例30:15-羟甲基-2-甲氧基-11,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0164] 按照实施例28的方法,用2-甲氧基-11,14-二甲基-7,9,14,14a-四氢-6H-吡啶[2',1,3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-15-甲酰基咪唑代替11-氟-2-甲氧基-14-甲基-7,9,14,14a-四氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-15-甲酰基咪唑,得到白色粉末15-羟甲基-2-甲氧基-11,14-二甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9

(7H)-酮0.13g, 收率93.5%。

[0165] 实施例31: 2-氟-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-硫酮的合成

[0166] 化合物2-氟-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮(0.2g, 0.6mmol, 1equiv)和劳森试剂(0.12g, 0.3mmol, 0.5equiv)加入甲苯(10mL)中, 加热回流4小时, 蒸干剩余溶剂, 经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=5:1)得到黄色粉末2-氟-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-硫酮0.08g, 收率37.8%。

[0167] 实施例32: 2-甲氧基-6,6,14-三甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0168] A、1-(2-异丁氧基)-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯制备

[0169] 1-氧甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯(2.0g, 7.7mmol, 1equiv)溶于THF(60mL)中, 0℃条件下加入碘甲烷(2g, 7.7mmol, 1equiv), 再加入三甲基硅烷钠(1M, 溶于THF)20.4mL, 反应液慢慢升至常温后, 再搅拌24小时。反应完全后加入饱和的氯化铵水溶液50mL, 乙酸乙酯(50mL×3)萃取, 饱和氯化钠水溶液(50mL×3)洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得粗产物, 经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=8:1)得白色粉末1-(2-异丁氧基)-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯1.2g, 收率55.3%。

[0170] B、2-甲氧基-6,6,14-三甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮制备

[0171] 按照实施例1的方法, 步骤B中以1-(2-异丁氧基)-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氧甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到8-甲氧基-4,4-二甲基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮, 在步骤F中以8-甲氧基-4,4-二甲基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮, 得到白色粉末2-甲氧基-6,6,14-三甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.17g, 总收率35.5%。

[0172] 实施例33: 11-氟-2-甲氧基-6,6,14-三甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮的合成

[0173] 按照实施例1的方法, 在步骤C中以5-氟-2-氨基苯甲酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯, 得到2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯, 步骤D中以2-((叔丁氧羰基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯, 在步骤E中以2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-5-氟苯甲酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯, 在步骤F中以8-甲氧基-4,4-二甲基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡嗪[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮, 以5-氟-2-甲氨基苯甲酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯, 得到白色粉末2-甲氧基-6,6,14-三甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮0.06g, 总收率35.3%。

[0174] 实施例34: 2-甲氧基-15-甲基-7,8,15,15a-四氢吡啶[2',1',3,4][1,4]二氮杂卓[2,1-b]喹啉-10(6H)-酮的合成

[0175] A、1-(2-氧乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯制备

[0176] 5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯(0.2g, 0.9mmol, 1equiv)溶于10mL的1,4-二氧六环中,加入苄基三甲基氢氧化铵(50uL)和烯丙腈(0.22mL, 3.5equiv),先回流一小时,再室温过夜反应,蒸干剩余溶剂,加入二氯甲烷(50mL),饱和氯化钠水溶液(50mL×3)洗,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到白色粉末1-(2-氰乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯0.21g,总收率81.6%。

[0177] B、2-甲氧基-15-甲基-7,8,15,15a-四氢吡啶[2',1',3,4][1,4]二氮杂卓[2,1-b]喹啉-10(6H)-酮制备

[0178] 按照实施例1的方法,步骤B中以1-(2-氰乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯代替1-氰甲基-5-甲氧基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯得到9-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1H-[1,4]二氮杂卓[1,2-a]吡啶-1-酮,在步骤F中以9-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1H-[1,4]二氮杂卓[1,2-a]吡啶-1-酮代替8-甲氧基-3,4-二氢吡啶[1,2-a]吡啶-1(2H)-酮,得到白色粉末2-甲氧基-15-甲基-7,8,15,15a-四氢吡啶[2',1',3,4][1,4]二氮杂卓[2,1-b]喹啉-10(6H)-酮0.13g,总收率36.7%。

[0179] 实施例35:2-羟基-15-甲基-7,8,15,15a-四氢吡啶[2',1',3,4][1,4]二氮杂卓[2,1-b]喹啉-10(6H)-酮的合成

[0180] 按照实施例21的方法,以2-甲氧基-15-甲基-7,8,15,15a-四氢吡啶[2',1',3,4][1,4]二氮杂卓[2,1-b]喹啉-10(6H)-酮代替2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡啶[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮,得到浅黄色粉末2-羟基-15-甲基-7,8,15,15a-四氢吡啶[2',1',3,4][1,4]二氮杂卓[2,1-b]喹啉-10(6H)-酮0.15g,收率48.3%。

[0181] 实施例36:11-甲氧基-3,14-甲基-6,7,13b,14-四氢吡咯[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡啶[1,2-a]吡啶-4(3H)-酮的合成

[0182] 按照实施例1的方法,在步骤C中以3-氨基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲酯,得到3-((叔丁氧羰基)氨基)-1H-吡咯-2-羧酸甲酯,步骤D中以3-((叔丁氧羰基)氨基)-1H-吡咯-2-羧酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到3-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯,在步骤E中以3-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到1-甲基-3-甲氨基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯,在步骤F中以1-甲基-3-甲氨基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯得到黄色粉末11-甲氧基-3,14-甲基-6,7,13b,14-四氢吡咯[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡啶[1,2-a]吡啶-4(3H)-酮0.35g,总收率36.1%。

[0183] 实施例37:11-羟基-3,14-二甲基-6,7,13b,14-四氢吡咯[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡啶[1,2-a]吡啶-4(3H)-酮的合成E13

[0184] 按照实施例21的方法,以11-甲氧基-3,14-甲基-6,7,13b,14-四氢吡咯[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡啶[1,2-a]吡啶-4(3H)-酮代替2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡啶[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮,得到黄色粉末11-羟基-3,14-二甲基-6,7,13b,14-四氢吡咯[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡啶[1,2-a]吡啶-4(3H)-酮0.21g,收率56.2%。

[0185] 实施例38:11-甲氧基-14-甲基-6,7,13b,14-四氢-4H-噻吩[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡啶[1,2-a]吡啶-4-酮合成

[0186] 按照实施例1的方法,在步骤C中以3-氨基噻吩-2-羧酸甲酯代替2-氨基苯甲酸甲

酯,得到3-((叔丁氧羰基)氨基)噻吩-2-羧酸甲酯,步骤D中以3-((叔丁氧羰基)氨基)噻吩-2-羧酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)氨基)苯甲酸甲酯得到3-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)噻吩-2-羧酸甲酯,在步骤E中以3-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)噻吩-2-羧酸甲酯代替2-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯得到3-甲氨基噻吩-2-羧酸甲酯,在步骤F中以3-甲氨基噻吩-2-羧酸甲酯代替2-甲氨基苯甲酸甲酯得到棕色粉末11-甲氧基-14-甲基-6,7,13b,14-四氢-4H-噻吩[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡嗪[1,2-a]吡啶-4-酮0.29g,总收率31.7%。

[0187] 实施例39:11-羟基-14-甲基-6,7,13b,14-四氢-4H-噻吩[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡嗪[1,2-a]吡啶-4-酮的合成

[0188] 按照实施例21的方法,以11-甲氧基-14-甲基-6,7,13b,14-四氢-4H-噻吩[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡嗪[1,2-a]吡啶-4-酮代替2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮,得到黄色粉末11-羟基-14-甲基-6,7,13b,14-四氢-4H-噻吩[3'',2'',4',5']嘧啶[2',1',3,4]吡嗪[1,2-a]吡啶-4-酮0.17g,收率62.3%。

[0189] 实施例40:化合物3盐酸盐的合成

[0190] 取11-氟-2-甲氧基-14-甲基-14,14a-二氢-6H-吡啶[2',1',3,4]吡嗪[2,1-b]喹啉-9(7H)-酮(化合物3)0.2g(0.34mmol)溶于15mL的乙酸乙酯中,滴加饱和的HCl乙酸乙酯溶液,固体析出后过滤,干燥,得到化合物3的盐酸盐为白色固体粉末0.19g。其他化合物的钠盐制备参照实施例40的方法。

[0191] 实施例41:本发明化合物的拓扑异构酶I的酶活性抑制试验

[0192] 选取部分化合物进行拓扑异构酶I的酶活性抑制试验,试验方法采用凝胶电泳法(Journal of medicinal chemistry55.17(2012):7593-7613)。

[0193] 试验材料:小牛胸腺DNA拓扑异构酶I、负超螺旋DNA质粒pBR322:均购自Takara公司。

[0194] 仪器:凝胶电泳采用BioRad公司PowerPac电泳仪和Sub-Cell Model96电泳槽,凝胶扫描定量采用BioRad公司的Gel Doc EZ全自动凝胶成像系统。

[0195] 其它材料:

[0196] 琼脂糖:GENE TECH进口分装

[0197] DMSO:Merck

[0198] 10×buffer缓冲液:Takara

[0199] 0.1%BSA:Takara

[0200] EtBr:GENE TECH

[0201] 样品配置:待测样品用DMSO(Merck)溶解,按所需稀释成不同浓度待测溶液。

[0202] 试验方法:

[0203] a)用1×TAE溶液配制成浓度为0.8%的琼脂糖凝胶。

[0204] b)依次向1.5mL样品管中加入10μL水,2μL buffer,2μL 0.1%BSA,Top10.5U, DNA0.5μL,不同的药物0.2μL,定容到20μL。

[0205] c)将样品管放入37℃水浴中,孵化15分钟。

[0206] d)加入3.5μL6×loading buffer至样品管中。

- [0207] e)60V电泳40~50min,用0.5 $\mu$ g/mL EtBr染色15min,凝胶成像系统观察电泳结果。
- [0208] 选取的化合物包括:化合物34,33,25,17,1,3,6和9。测试浓度为100 $\mu$ M。如下图1所示,所测试的化合物在100 $\mu$ M下能够明显抑制Top1对DNA的解螺旋作用。
- [0209] 因此,反向吴茱萸碱衍生物可以作为新型的Top1抑制剂进行深入研究。
- [0210] 实施例42:本发明的化合物3在酶水平对微管蛋白活性IC<sub>50</sub>值
- [0211] 实验材料:
- [0212] 供试品:化合物3;阳性对照品:秋水仙碱(Cochicine);阴性对照品:二甲基亚砷。
- [0213] 实验方法:
- [0214] 采用浊度法检测药物对体外微管聚集的作用,微管聚集体系内含0.1MMES,pH6.6,10mM MgCl<sub>2</sub>,1mM GTP,1mM EGTA,3.4M甘油。反应液先在冰上预孵育,加入不同浓度的药物,不加入药物的作为对照组,DMSO的浓度为4%(v/v)。在最后加入10mM微管蛋白后,立刻置于37℃进行聚集反应,在340nm下用连续扫描且带有恒温装置的分光光度计DU640每隔1分钟测定吸收值,共测30分钟。选取加入微管开始聚集前稳定的吸光度值为本底,再选取加入化合物后经过20至30分钟微管蛋白聚集处于稳态的吸光度值计算平均值,待测化合物对微管蛋白的抑制率依据以下方程进行计算:
- [0215] %抑制率={1-(OD药物-OD本底)/(OD对照-OD本底)}\*100
- [0216] 依据上述计算方法得到待测化合物多个浓度对微管蛋白聚集的抑制率,使用logistic方程对数据进行拟合,得到IC<sub>50</sub>值。
- [0217] 实验结果:
- [0218] 优选化合物3的IC<sub>50</sub>值如表4所示,测试化合物表现出一定的微管蛋白抑制活性。因此,反向吴茱萸碱衍生物可以作为新型微管蛋白抑制剂进行深入研究。
- [0219] 表4 化合物的IC<sub>50</sub>值
- [0220]
- | 化合物        | Tubulin      |
|------------|--------------|
| Colchicine | 10.8 $\mu$ M |
| 3          | 26.3 $\mu$ M |
- [0221] 实施例43:本发明化合物的抗肿瘤活性试验
- [0222] 对本发明的化合物进行了肿瘤细胞增殖抑制试验,试验方法采用常规的MTT法(如吕秋军主编《新药药理学研究方法》,2007:242-243)。
- [0223] 细胞株选用A549(人肺癌细胞)、HCT116(人肠癌细胞)、MDA-MB-435(人乳腺癌细胞),均购自中科院细胞所。
- [0224] 培养液为DMEM+15%NBS+双抗。
- [0225] 样品液配制:用DMSO(Merck)溶解后,加入PBS(-)配成100 $\mu$ g/mL的溶液或均匀的混悬液,然后用DMSO的PBS(-)稀释,最终浓度分别为10 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、0.1 $\mu$ g/mL、0.01 $\mu$ g/mL、0.001 $\mu$ g/mL、0.0001 $\mu$ g/mL。
- [0226] 将上市的抗肿瘤药物喜树碱以同样的条件配成对照品溶液。
- [0227] 96孔板每孔加入浓度为3 $\times$ 10<sup>4</sup>个/mL的细胞悬液100 $\mu$ L,即3000个细胞/孔,置37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内。24小时后,分别加入样品液和对照品液,10 $\mu$ L/孔,37℃作用72小时。每孔加入5mg/mL的MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑翁溴化物)溶液20 $\mu$ L,作



用4小时后加入溶解液DMSO,100 $\mu$ L/孔,置培养箱内,次日用MK-2全自动酶标仪测570nm OD值。计算半数抑制浓度IC<sub>50</sub>。

[0228] 试验结果详见表5,其中,样品是指相应实施例中制备的反向吴茱萸碱类化合物,如化合物1表示在实施例1中所得到的反向吴茱萸碱类化合物,同理类推。

[0229] 表5 化合物对肿瘤细胞的半数抑制浓度IC<sub>50</sub>(单位: $\mu$ mol/L)

[0230]

样品	A549	HCT116	MDA-MB-435	样品	A549	HCT116	MDA-MB-435
化合物 1	2.67	11.99	20.15	化合物 21	14.53	16.88	44.31
化合物 2	21.48	48.48	>200	化合物 22	>200	>200	>200
化合物 3	158.83	0.002	1.08	化合物 23	>200	>200	>200
化合物 4	>200	61.36	>200	化合物 24	>200	>200	>200
化合物 5	>200	>200	>200	化合物 25	14.13	3.38	12.39
化合物 6	27.73	4.49	13.58	化合物 26	12.3	9.22	89.1
化合物 7	>200	>200	>200	化合物 27	59.2	>200	>200
化合物 8	>200	>200	>200	化合物 28	6.65	5.66	22.8
化合物 9	>200	0.03	13.35	化合物 29	>200	18.1	70.5
化合物 10	24.3	124.2	>200	化合物 30	72.19	5.88	41.5
化合物 11	15.6	49.2	168.2	化合物 31	>200	>200	>200
化合物 12	30.8	180.5	>200	化合物 32	180.9	6.22	86.4
化合物 13	15.2	7.32	15.9	化合物 33	>200	1.56	10.72
化合物 14	>200	28.5	97.6	化合物 34	111.48	>200	>200
化合物 15	>200	>200	>200	化合物 35	32.09	196.47	56.00
化合物 16	53.0	6.71	142.9	化合物 36	>200	189.78	206.04
化合物 17	22.8	0.06	1.07	化合物 37	>200	>200	>200
化合物 18	>200	19.4	>200	化合物 38	47.02	9.51	44.63
化合物 19	>200	>200	>200	化合物 39	30.39	105.96	66.84
化合物 20	8.35	9.44	85.8	CPT	28.1	0.003	2.14

[0231] CPT=喜树碱(Camptothecine)

[0232] 以上实验结果表明,本发明的化合物具有良好的抗肿瘤活性,部分化合物的抗肿瘤活性优于喜树碱,因此本发明化合物及其盐类可以用于制备抗肿瘤药物。

[0233] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可作出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

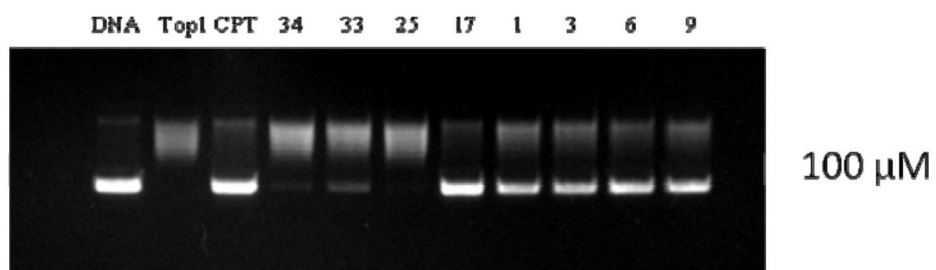


图1