



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109071433 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780022811.3

(22)申请日 2017.04.10

(30)优先权数据

62/320,654 2016.04.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2017/050432 2017.04.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/177316 EN 2017.10.19

(71)申请人 3R瓦洛公司

地址 加拿大魁北克省

(72)发明人 杰维斯·贝鲁布

卡洛斯·雷耶斯-莫雷诺

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C07D 207/452(2006.01)

A61K 31/4035(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

C07D 207/456(2006.01)

C07D 209/48(2006.01)

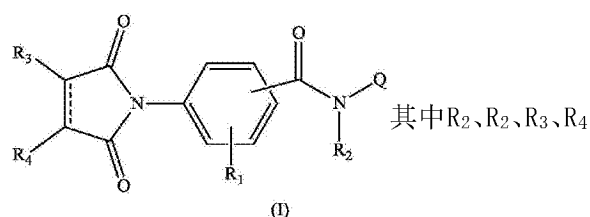
权利要求书19页 说明书30页 附图28页

(54)发明名称

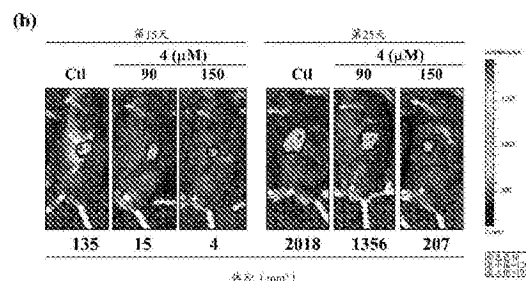
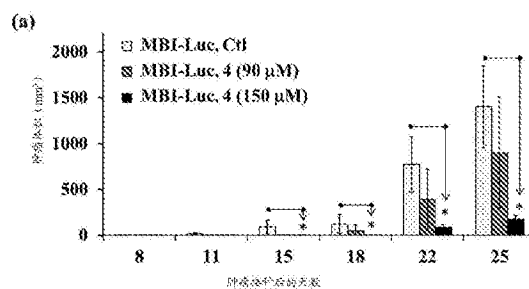
用作抗炎剂、抗转移剂和/或抗癌剂的氨基苯甲酸衍生物

(57)摘要

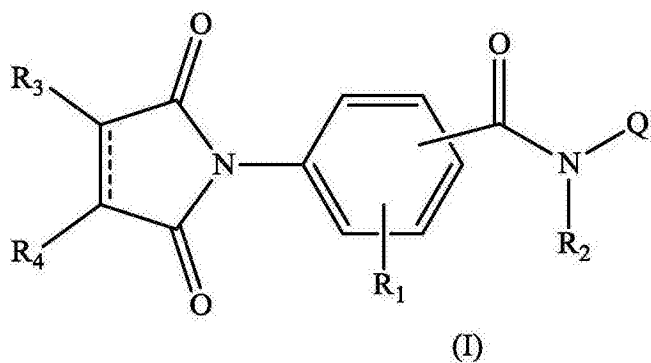
提供了式(I)的化合物



和Q可代表多种不同的可能性。这些化合物可用作抗癌剂以及抗炎剂、抗增殖剂和/或抗转移剂。



1. 式 (I) 的化合物:

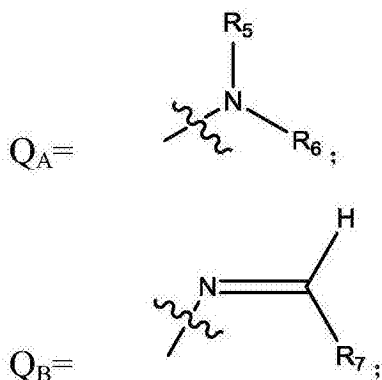


其中

R_1 为 H、烷基或卤素;

R_2 为 H, 或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

Q 为 Q_A 或 Q_B ;



= 单键或双键;

R_5 为 H, 或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R_6 为 H、Boc, 或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R_7 为取代或未取代的选自 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员;

R_3 和 R_4 独立地选自 H、 $-SR_8$ 和 $-NR_9R_{10}$,

或者, R_3 和 R_4 结合在一起形成 5-7 元环, 其任选地包含选自 N、S 和 O 的杂原子;

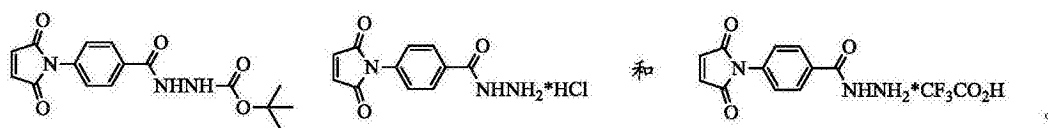
R_8 为 H、 C_1 - C_8 烷基、 $-(CH_2)_nNHBoc$ 或 $-(CH_2)_nNH_2$, 其中 $n=1\sim6$;

R_9 为 H 或 C_1 - C_8 烷基;

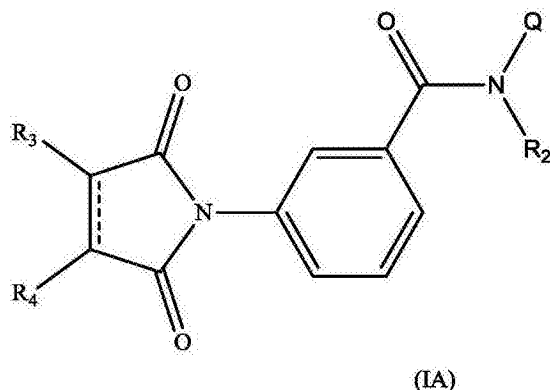
R_{10} 为 H、 C_1 - C_8 烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基;

其中, R_2 、 R_5 、 R_6 和 R_7 , 当被取代时, 被选自 $-OR_9$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、 $-NO_2$ 、 C_1 - C_8 烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代;

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药，前提是所述化合物不同于



2. 如权利要求1所述的化合物，其中所述化合物为式 (IA) 的化合物：



其中R₂、R₃、R₄和Q是如权利要求1中所定义的。

3. 如权利要求2所述的化合物，其中

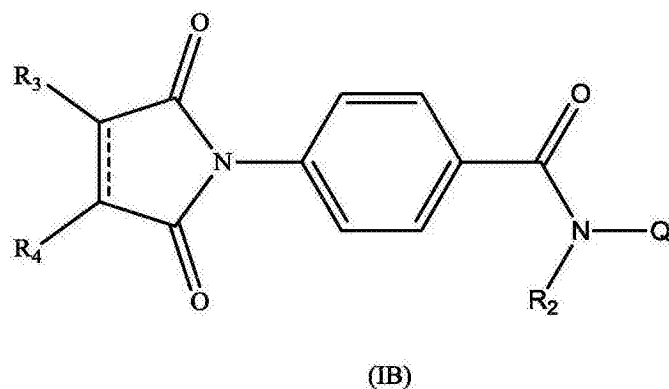
R₂为H，或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员；

Q为Q_A；

R₃为H，或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员；以及

R₄为Boc、H，或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员。

4. 如权利要求1所述的化合物，其中所述化合物为式 (IB) 的化合物：



其中R₂、R₃、R₄和Q是如权利要求1中所定义的。

5. 如权利要求4所述的化合物，其中

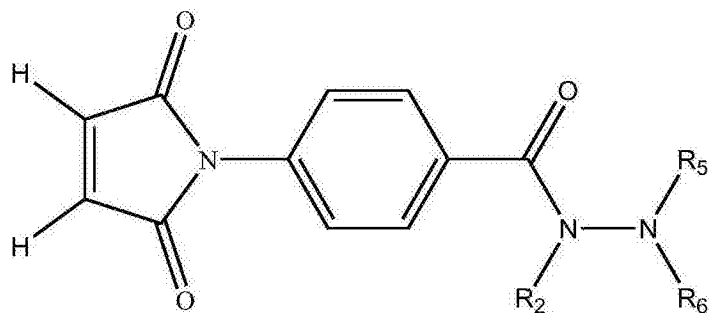
R₂为H，或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员；

Q为Q_A；

R₃为H，或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员；以及

R₄为Boc、H，或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员。

6. 如权利要求1所述的化合物，其中所述化合物为式 (IC) 的化合物：



(IC)

其中R₂、R₅和R₆是如权利要求1中所定义的。

7. 如权利要求6所述的化合物, 其中

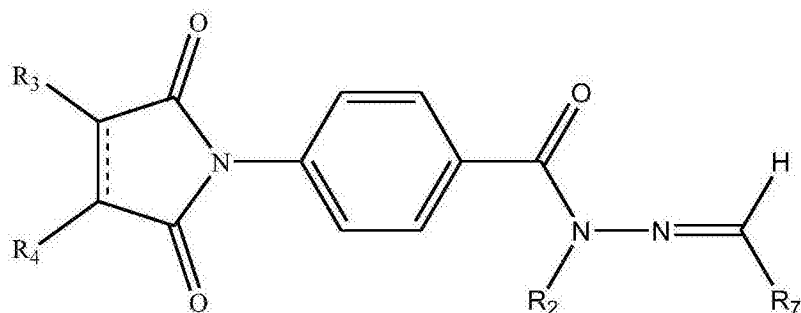
R₂为H, 或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;

Q为Q_A;

R₅为H, 或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员; 以及

R₆为Boc、H, 或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员。

8. 如权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物为式 (ID) 的化合物:



(ID)

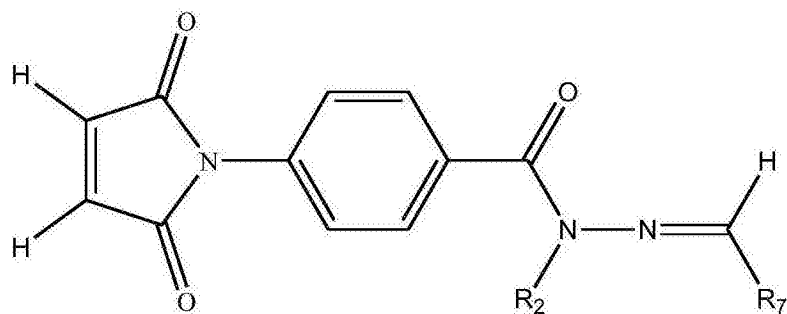
其中R₂、R₃、R₄和R₇是如权利要求1中所定义的。

9. 如权利要求8所述的化合物, 其中

R₂为H, 或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员; 以及

R₇为未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₆环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员。

10. 如权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物为式 (IE) 的化合物:



(IE)

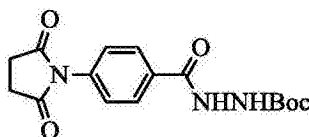
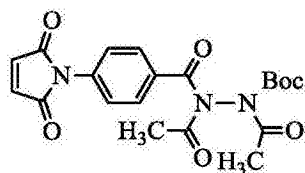
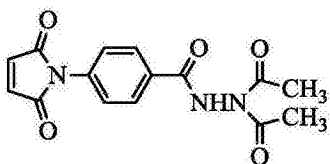
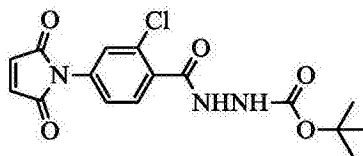
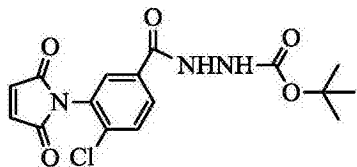
其中R₂和R₇是如权利要求1中所定义的。

11. 如权利要求10所述的化合物, 其中

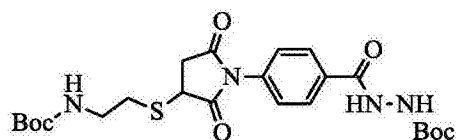
R₂为H, 或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员; 以及

R₇为未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₆环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员。

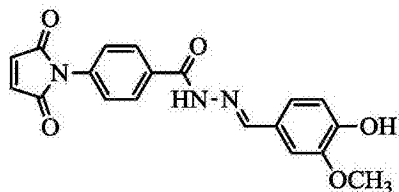
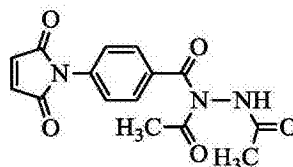
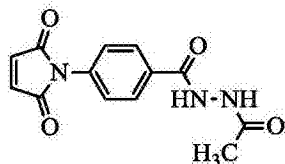
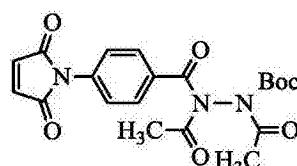
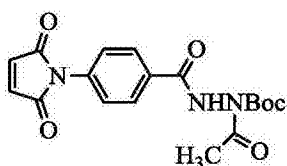
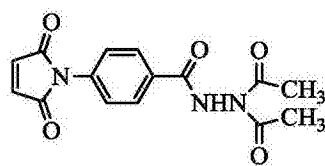
12. 如权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物选自:



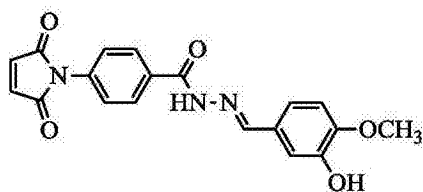
和



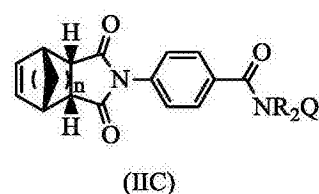
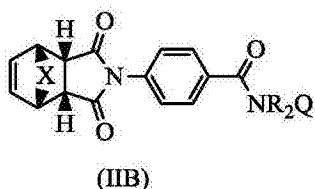
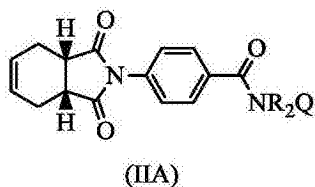
13. 如权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物选自:



和

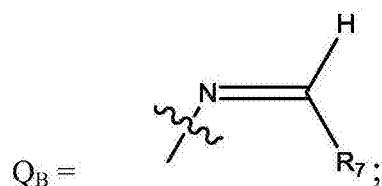
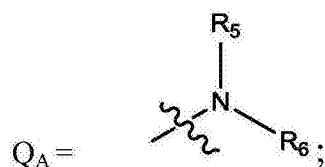


14. 式 (IIA)、式 (IIB) 或式 (IIC) 的化合物:



其中

Q为Q_A或Q_B;



R₂为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R₅为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R₆为H、Boc,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R₇为取代或未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₈环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员;

R₉为H或C₁-C₈烷基;

X为O、S或NR₂;

n为1、2或3;

其中,R₂、R₅、R₆和R₇,当被取代时,被选自-OR₉、-F、-Cl、-Br、-I、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、-NO₂、C₁-C₈烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代;

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药。

15. 权利要求1至14中任一项所述的化合物,其用于医药学。

16. 权利要求1至14中任一项所述的化合物,其用于降低罹患选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的风险。

17. 权利要求1至14中任一项所述的化合物,其用于治疗选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症。

18. 权利要求1至14中任一项所述的化合物,其用作抗癌剂。

19. 权利要求1至14中任一项所述的化合物,其用作抗炎剂。

20. 权利要求1至14中任一项所述的化合物,其用作抗转移剂。

21. 权利要求1至14中任一项所述的化合物,其用作抗增殖剂。

22. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物用于治疗选自黑色素瘤、乳腺癌、

子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的用途。

23. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物用于降低罹患选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的风险的用途。

24. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物用于抑制选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的癌症细胞生长的用途。

25. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物用于抑制选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的癌症肿瘤生长和/或癌症肿瘤大小的用途。

26. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物用于减少和/或预防选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的癌症肿瘤转移的用途。

27. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物在制造用于治疗选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的药物中的用途。

28. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物在制造用于降低罹患选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的风险的药物中的用途。

29. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物在制造用于抑制选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的癌症细胞生长的药物中的用途。

30. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物在制造用于抑制选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的癌症肿瘤生长和/或癌症肿瘤大小的药物中的用途。

31. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物在制造用于减少和/或预防选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的癌症肿瘤转移的药物中的用途。

32. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物用作抗癌剂的用途。

33. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物用作抗炎剂的用途。

34. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物用作抗转移剂的用途。

35. 权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物用作抗增殖剂的用途。

36. 治疗癌症或选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物。

37. 在个体中降低罹患癌症的风险或降低罹患至少一种癌症的风险的方法,所述癌症例如选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌,所述方法包括向所述个体施用有效量的权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物。

38. 抑制癌症细胞生长的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物。

39. 如权利要求38所述的方法,其中,相对于未治疗的个体,所述癌症细胞生长被至少抑制约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

40. 抑制癌症细胞生长的方法,所述方法包括使癌症细胞与有效量的权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物接触。

41. 如权利要求40所述的方法, 其中, 相对于未处理的癌症细胞, 所述细胞的相对STAT1活化至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

42. 如权利要求40或41所述的方法, 其中, 相对于未处理的癌症细胞, 所述细胞的相对STAT3活化至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

43. 如权利要求40至42中任一项所述的方法, 其中, 相对于未处理的癌症细胞, 所述细胞的CD40表达至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

44. 如权利要求40至43中任一项所述的方法, 其中, 相对于未处理的癌症细胞, 所述细胞的MHC-II表达至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

45. 如权利要求40至44中任一项所述的方法, 其中, 相对于未处理的癌症细胞, 所述细胞的NO产生至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

46. 如权利要求40至45中任一项所述的方法, 其中, 相对于未处理的细胞, 所述细胞的TNF α /NF κ B和/或IL6/STAT3信号传导途径至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

47. 如权利要求40至46中任一项所述的方法, 其中, 相对于未处理的细胞, 所述细胞的LPS活化的NF κ B信号传导途径至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

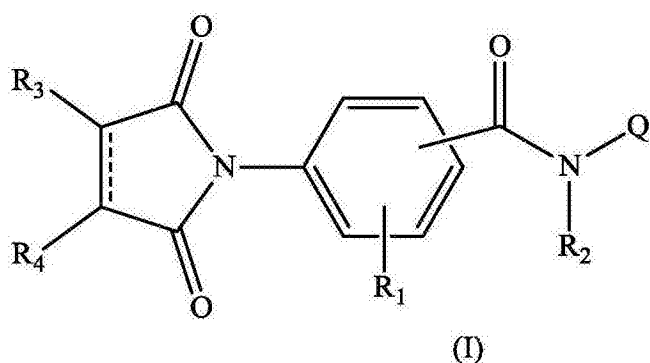
48. 抑制癌症肿瘤生长和/或癌症肿瘤大小的方法, 所述方法包括向有需要的个体施用有效量的权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物。

49. 如权利要求48所述的方法, 其中, 相对于未治疗的个体, 所述肿瘤生长和/或肿瘤大小至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%。

50. 减少和/或预防癌症肿瘤转移的方法, 所述方法包括向有需要的个体施用有效量的权利要求1至14中任一项所述的至少一种化合物。

51. 如权利要求50所述的方法, 其中, 相对于未治疗的个体, 肿瘤转移的数量至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%。

52. 式(I)的化合物

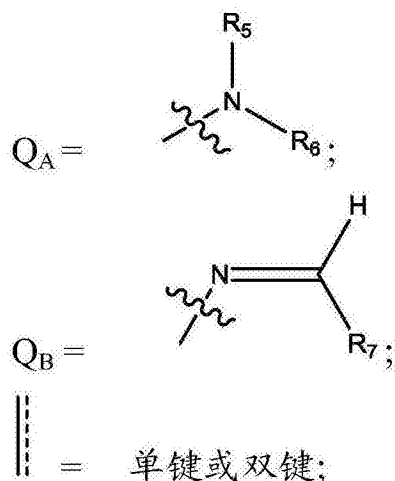


其中

R₁为H、烷基或卤素;

R₂为H, 或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

Q为Q_A或Q_B;



R_5 为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R_6 为H、Boc,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R_7 为取代或未取代的选自 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员;

R_3 和 R_4 独立地选自H、 $-SR_8$ 和 $-NR_9R_{10}$,

或者, R_3 和 R_4 结合在一起以形成5-7元环,其任选地包含选自N、S和O的杂原子;

R_8 为H、 C_1 - C_8 烷基、 $-(CH_2)_nNHBoc$ 或 $-(CH_2)_nNH_2$,其中 $n=1\sim6$;

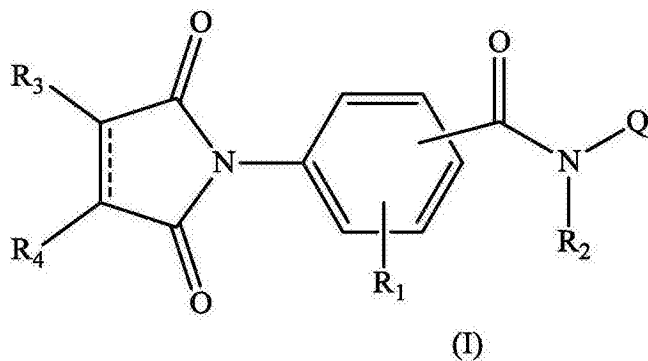
R_9 为H或 C_1 - C_8 烷基;

R_{10} 为H、 C_1 - C_8 烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基;

其中, R_2 、 R_5 、 R_6 和 R_7 ,当被取代时,被选自 $-OR_9$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、 $-NO_2$ 、 C_1 - C_8 烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代;

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药,用于选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的治疗。

53. 式(I)的化合物



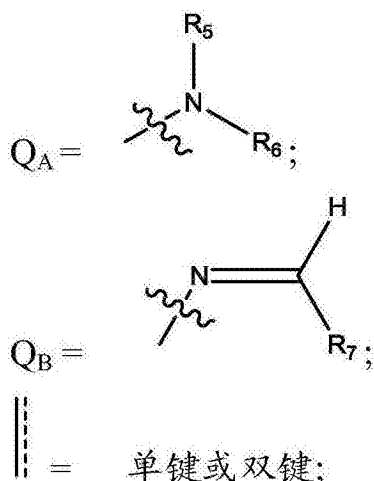
其中

R_1 为H、烷基或卤素;

R_2 为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成

员；

Q为Q_A或Q_B；



R₅为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R₆为H、Boc,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R₇为取代或未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₈环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员；

R₃和R₄独立地选自H、-SR₈和-NR₉R₁₀,

或者,R₃和R₄结合在一起以形成5-7元环,其任选地包含选自N、S和O的杂原子；

R₈为H、C₁-C₈烷基、-(CH₂)_nNHBoc或-(CH₂)_nNH₂,其中n=1~6；

R₉为H或C₁-C₈烷基；

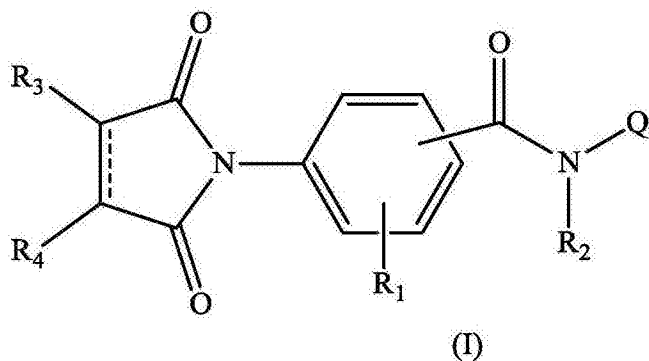
R₁₀为H、C₁-C₈烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基；

其中,R₂、R₅、R₆和R₇,当被取代时,被选自-OR₉、-F、-Cl、-Br、-I、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、-NO₂、C₁-C₈烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代；

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药,

用于抑制癌症细胞生长,所述癌症选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌。

54. 式(I)的化合物

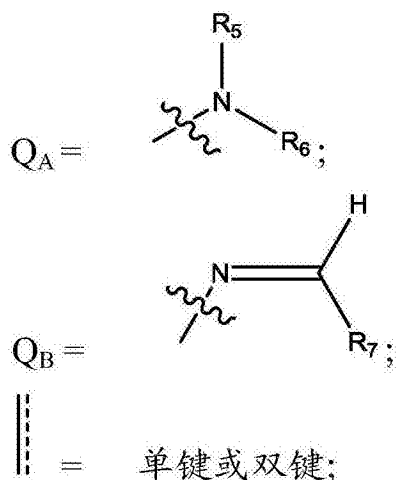


其中

R₁为H、烷基或卤素；

R₂为H，或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

Q为Q_A或Q_B；



R₅为H，或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R₆为H、Boc，或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R₇为取代或未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₈环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员；

R₃和R₄独立地选自H、-SR₈和-NR₉R₁₀，

或者，R₃和R₄结合在一起以形成5-7元环，其任选地包含选自N、S和O的杂原子；

R₈为H、C₁-C₈烷基、-(CH₂)_nNHBoc或-(CH₂)_nNH₂，其中n=1~6；

R₉为H或C₁-C₈烷基；

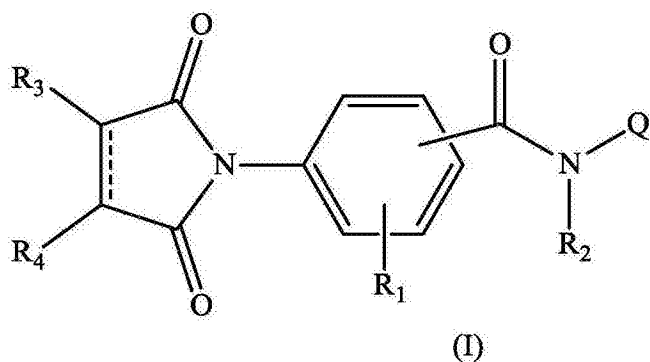
R₁₀为H、C₁-C₈烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基；

其中，R₂、R₅、R₆和R₇，当被取代时，被选自-OR₉、-F、-Cl、-Br、-I、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、-NO₂、C₁-C₈烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代；

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药，

用于抑制癌症肿瘤生长和/或癌症肿瘤大小，所述癌症选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌。

55. 式(I)的化合物

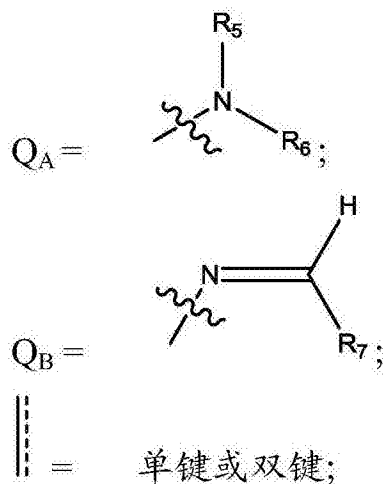


其中

R_1 为H、烷基或卤素；

R_2 为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

Q为 Q_A 或 Q_B ；



R_5 为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R_6 为H、Boc,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R_7 为取代或未取代的选自 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员；

R_3 和 R_4 独立地选自H、 $-SR_8$ 和 $-NR_9R_{10}$ ，

或者， R_3 和 R_4 结合在一起以形成5-7元环，其任选地包含选自N、S和O的杂原子；

R_8 为H、 C_1 - C_8 烷基、 $-(CH_2)_nNHBoc$ 或 $-(CH_2)_nNH_2$ ，其中 $n=1\sim6$ ；

R_9 为H或 C_1 - C_8 烷基；

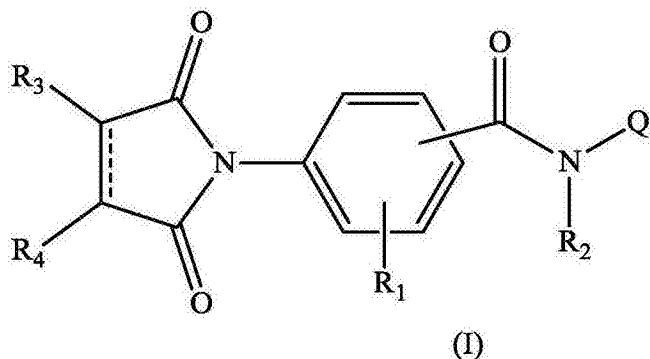
R_{10} 为H、 C_1 - C_8 烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基；

其中， R_2 、 R_5 、 R_6 和 R_7 ，当被取代时，被选自 $-OR_9$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、 $-NO_2$ 、 C_1 - C_8 烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代；

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药，用于减少和/或预防癌症肿瘤转移，所述癌症选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、

前列腺癌和膀胱癌。

56. 治疗癌症或选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的至少一种式(I)的化合物:

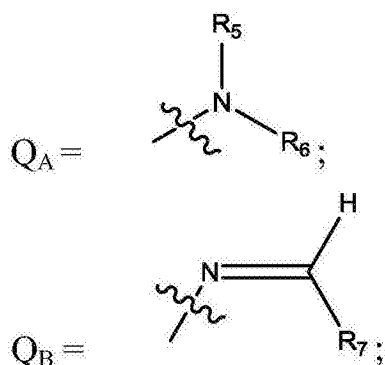


其中

R₁为H、烷基或卤素;

R₂为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

Q为Q_A或Q_B;



= 单键或双键;

R₅为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R₆为H、Boc,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R₇为取代或未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₈环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员;

R₃和R₄独立地选自H、-SR₈和-NR₉R₁₀,

或者,R₃和R₄结合在一起以形成5-7元环,其任选地包含选自N、S和O的杂原子;

R₈为H、C₁-C₈烷基、-(CH₂)_nNHBoc或-(CH₂)_nNH₂,其中n=1~6;

R₉为H或C₁-C₈烷基;

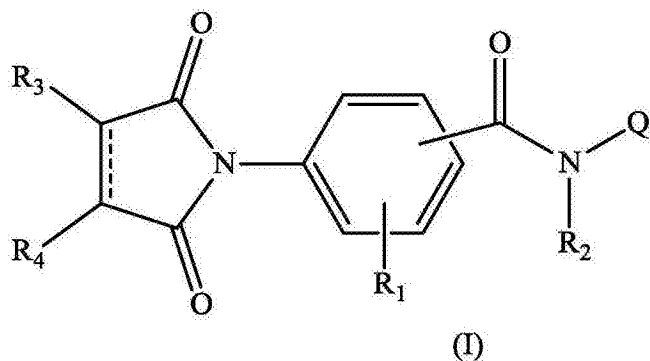
R₁₀为H、C₁-C₈烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基;

其中,R₂、R₅、R₆和R₇,当被取代时,被选自-OR₉、-F、-Cl、-Br、-I、乙酰基、丙炔酰基、丁酰

基、异丁酰基、苯甲酰基、 $-\text{NO}_2$ 、 C_1 - C_8 烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代；

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药。

57. 抑制癌症细胞生长的方法，所述癌症选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌，所述方法包括向有需要的个体施用有效量的至少一种式 (I) 的化合物：

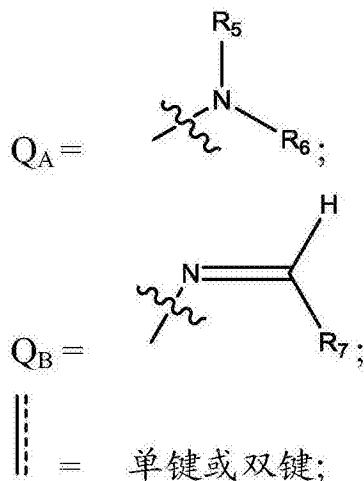


其中

R_1 为H、烷基或卤素；

R_2 为H，或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

Q为 Q_A 或 Q_B ；



R_5 为H，或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R_6 为H、Boc，或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R_7 为取代或未取代的选自 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员；

R_3 和 R_4 独立地选自H、 $-\text{SR}_8$ 和 $-\text{NR}_9\text{R}_{10}$ ，

或者， R_3 和 R_4 结合在一起以形成5-7元环，其任选地包含选自N、S和O的杂原子；

R_8 为H、 C_1 - C_8 烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NHBoc}$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ，其中 $n=1\sim6$ ；

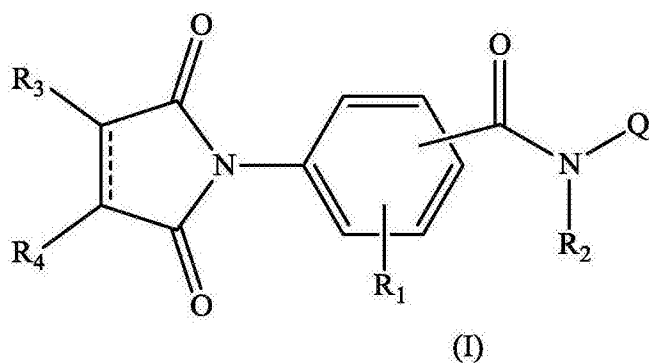
R_9 为H或 C_1 - C_8 烷基；

R_{10} 为H、 C_1 - C_8 烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基；

其中, R_2 、 R_5 、 R_6 和 R_7 , 当被取代时, 被选自 $-OR_9$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、 $-NO_2$ 、 C_1 - C_8 烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代;

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药。

58. 抑制癌症肿瘤生长和/或癌症肿瘤大小的方法, 所述癌症选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌, 所述方法包括向有需要的个体施用有效量的至少一种式(I)的化合物:

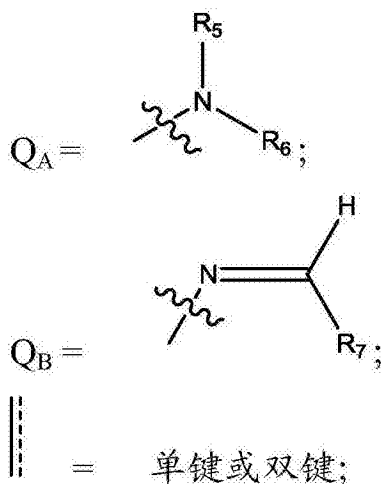


其中

R_1 为H、烷基或卤素;

R_2 为H, 或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

Q为 Q_A 或 Q_B ;



R_5 为H, 或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R_6 为H、Boc, 或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

R_7 为取代或未取代的选自 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员;

R_3 和 R_4 独立地选自H、 $-SR_8$ 和 $-NR_9R_{10}$,

或者, R_3 和 R_4 结合在一起以形成5-7元环, 其任选地包含选自N、S和O的杂原子;

R_8 为H、 C_1 - C_8 烷基、 $-(CH_2)_nNHBOc$ 或 $-(CH_2)_nNH_2$, 其中 $n=1\sim6$;

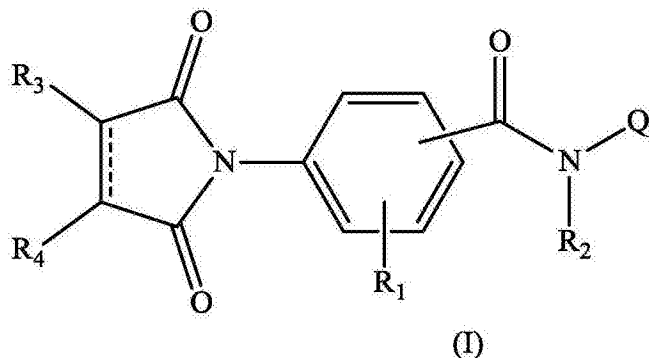
R₉为H或C₁-C₈烷基；

R₁₀为H、C₁-C₈烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基；

其中，R₂、R₅、R₆和R₇，当被取代时，被选自-OR₉、-F、-Cl、-Br、-I、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、-NO₂、C₁-C₈烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代；

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药。

59. 减少和/或预防癌症肿瘤转移的方法，所述癌症选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌，所述方法包括向有需要的个体施用有效量的至少一种式(I)的化合物：

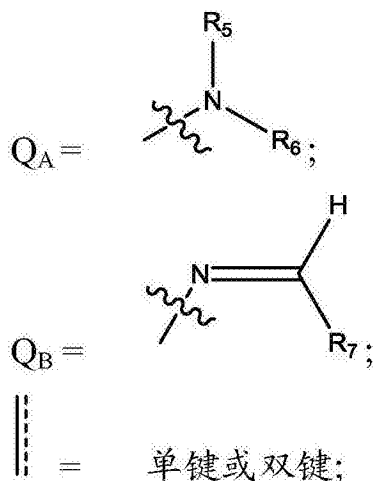


其中

R₁为H、烷基或卤素；

R₂为H，或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

Q为Q_A或Q_B；



R₅为H，或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R₆为H、Boc，或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员；

R₇为取代或未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₈环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员；

R₃和R₄独立地选自H、-SR₈和-NR₉R₁₀，

或者, R_3 和 R_4 结合在一起以形成5-7元环,其任选地包含选自N、S和O的杂原子;

R_8 为H、 C_1 - C_8 烷基、 $-(CH_2)_nNHBoc$ 或 $-(CH_2)_nNH_2$,其中 $n=1\sim 6$;

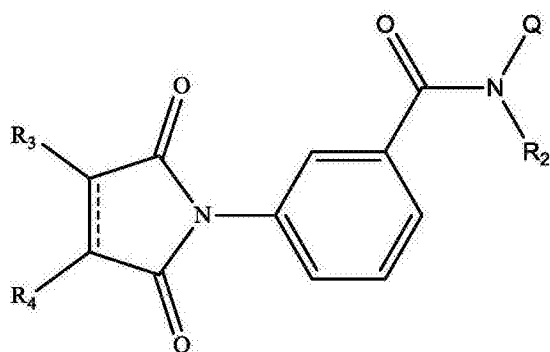
R_9 为H或 C_1 - C_8 烷基;

R_{10} 为H、 C_1 - C_8 烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基;

其中, R_2 、 R_5 、 R_6 和 R_7 ,当被取代时,被选自 $-OR_9$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、 $-NO_2$ 、 C_1 - C_8 烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代;

或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药。

60. 如权利要求52至55中任一项所述的化合物或权利要求56至59中任一项所述的方法,其中所述化合物为式(IA)的化合物:



(IA)

其中 R_2 、 R_3 、 R_4 和 Q 是如权利要求52至55中任一项所定义的。

61. 如权利要求60所述的化合物或方法,其中

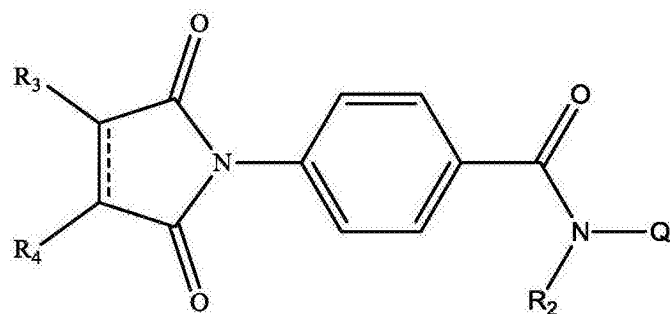
R_2 为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;

Q 为 Q_A ;

R_5 为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;以及

R_6 为Boc、H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员。

62. 如权利要求52至55中任一项所述的化合物或权利要求56至59中任一项所述的方法,其中所述化合物为式(IB)的化合物:



(IB)

其中 R_2 、 R_3 、 R_4 和 Q 是如权利要求1中所定义的。

63. 如权利要求62所述的化合物或方法,其中

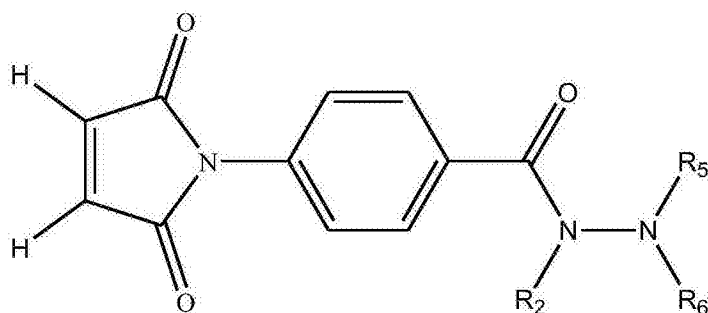
R_2 为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;

Q 为 Q_A ;

R₅为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;以及

R₆为Boc、H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员。

64. 如权利要求52至55中任一项所述的化合物或权利要求56至59中任一项所述的方法,其中所述化合物为式 (IC) 的化合物:



(IC)

其中R₂、R₅和R₆是如权利要求1中所定义的。

65. 如权利要求64所述的化合物或方法,其中

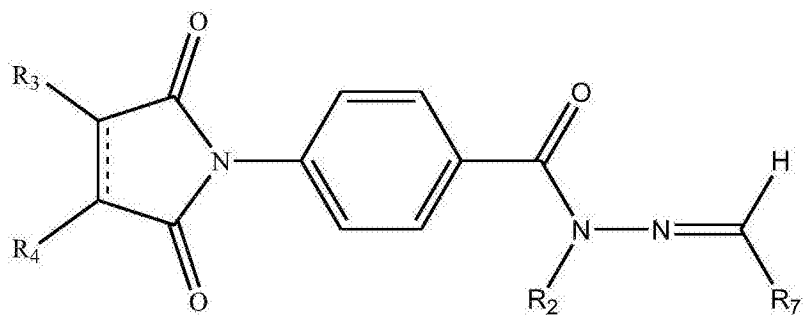
R₂为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;

Q为Q_A;

R₅为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;以及

R₆为Boc、H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员。

66. 如权利要求52至55中任一项所述的化合物或权利要求56至59中任一项所述的方法,其中所述化合物为式 (ID) 的化合物:



(ID)

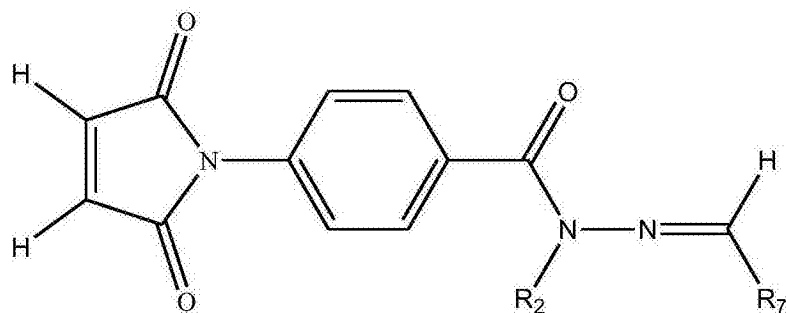
其中R₂、R₃、R₄和R₇是如权利要求1中所定义的。

67. 如权利要求66所述的化合物或方法,其中

R₂为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;以及

R₇为未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₆环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员。

68. 如权利要求52至55中任一项所述的化合物或权利要求56至59中任一项所述的方法,其中所述化合物为式 (IE) 的化合物:



(IE)

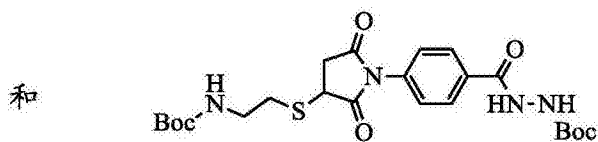
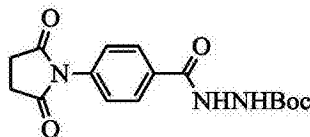
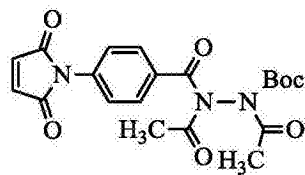
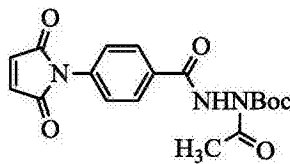
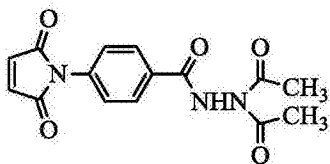
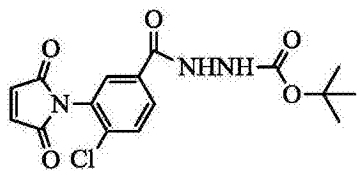
其中R₂和R₇是如权利要求1中所定义的。

69. 如权利要求68所述的化合物或方法, 其中

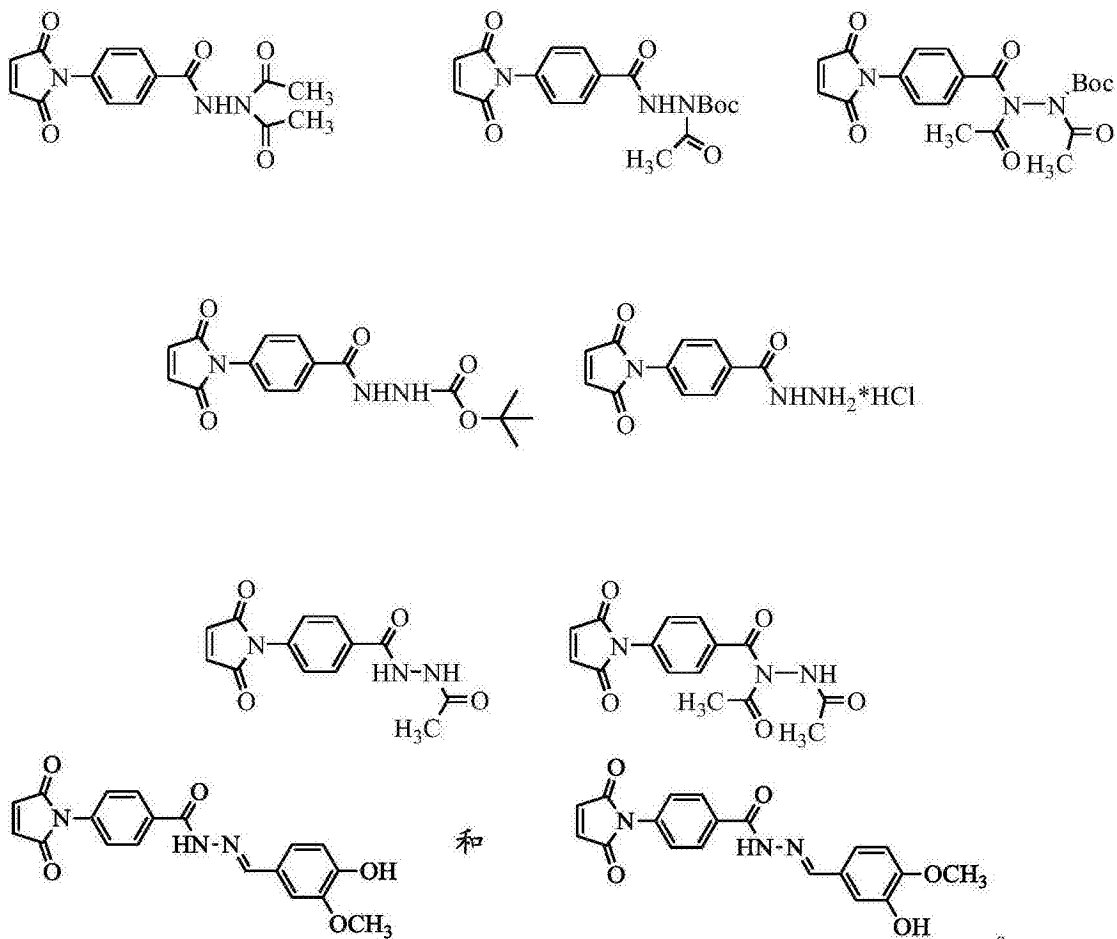
R₂为H, 或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员; 以及

R₇为未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₆环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员。

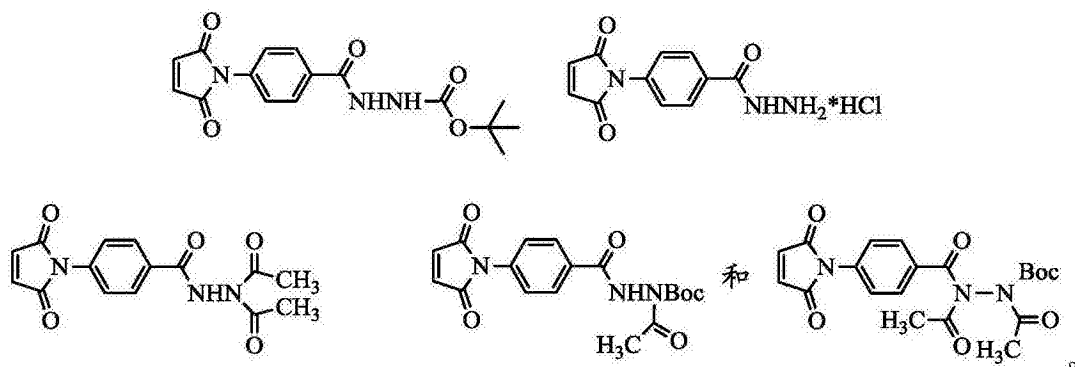
70. 如权利要求52至55中任一项所述的化合物或权利要求56至59中任一项所述的方法, 其中所述化合物选自:



71. 如权利要求52至55中任一项所述的化合物或权利要求56至59中任一项所述的方法, 其中所述化合物选自:



72. 如权利要求52至55中任一项所述的化合物或权利要求56至59中任一项所述的方法, 其中所述化合物选自



用作抗炎剂、抗转移剂和/或抗癌剂的氨基苯甲酸衍生物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年4月11日提交的申请号为62/320,654的美国临时申请的优先权,其公开内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及活性剂领域。更具体地,本公开涉及抗炎剂、抗转移剂、抗增殖剂和抗癌剂。本公开还涉及使用这些药剂治疗癌症的方法。

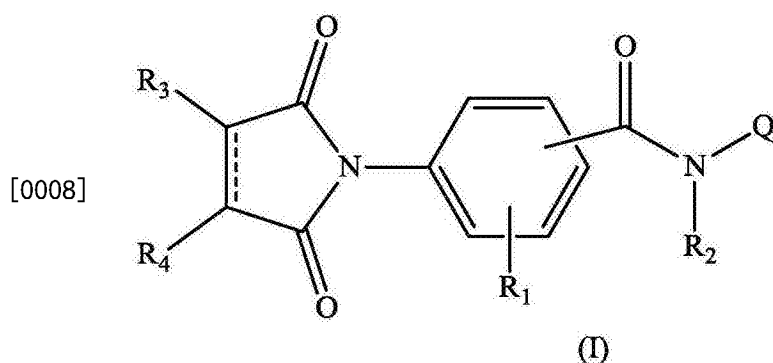
背景技术

[0004] 有多种方法用于治疗癌症。¹最常见的是:手术、化疗、放射治疗、靶向治疗和免疫治疗。¹⁻⁶其他方法基于干细胞移植、光动力疗法和低温疗法。¹激光是当今局部癌症手术期间的有用工具。这些方法中的许多方法非常有效。然而,大多数却存在重大的副作用。^{7,8}因此,需要发现替代治疗方法和治疗方式。特别地,可以同时攻击不同阶段(起始、增殖、转移等)的癌症的化合物和治疗方案是非常令人感兴趣的。

[0005] 尿路上皮膀胱癌(UBC)是北美地区所有癌症中第五位最常见的恶性肿瘤。尽管大多数可检测的肿瘤最初是非肌肉浸润性的并且通常是通过手术切除可治愈的,但是其中27%-30%表现出以高组织学分级和肌肉浸润为特征的致死表型。最近的研究还提供了充分的证据,表明UBC膀胱内疗法响应受主要炎症细胞(主要是巨噬细胞)的浸润和关键炎症介质(包括细胞因子TNF α 和IL6以及转录因子NF κ B和STAT3)的活化的影响。考虑到炎症介质在UBC生长、传播以及对细胞死亡的抗性中的关键功能,它们可能代表潜在的药物靶标以提高免疫疗法和化疗剂的功效。

[0006] 发明概述

[0007] 根据一个方面,包括式(I)的化合物:

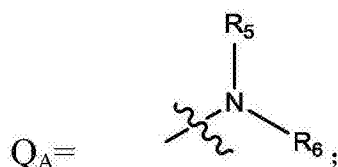


[0009] 其中

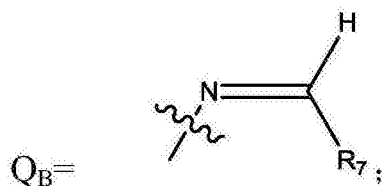
[0010] R₁为H、烷基或卤素;

[0011] R₂为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

[0012] Q为Q_A或Q_B;



[0013]



= 单键或双键;

[0014] R_5 为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

[0015] R_6 为H、Boc,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

[0016] R_7 为取代或未取代的选自 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员;

[0017] R_3 和 R_4 独立地选自H、 $-SR_8$ 和 $-NR_9R_{10}$,

[0018] 或者, R_3 和 R_4 结合在一起以形成5-7元环,其任选地包含选自N、S和O的杂原子;

[0019] R_8 为H、 C_1 - C_8 烷基、 $-(CH_2)_nNHBOC$ 或 $-(CH_2)_nNH_2$,其中 $n=1\sim6$;

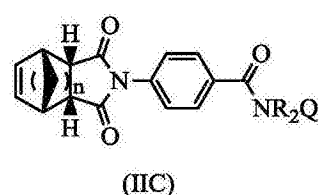
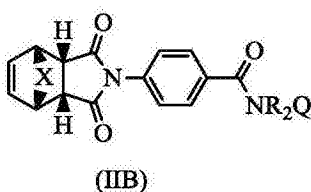
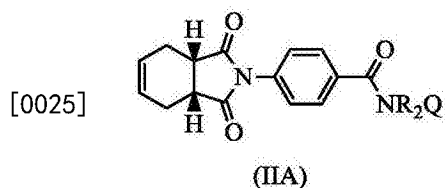
[0020] R_9 为H或 C_1 - C_8 烷基;

[0021] R_{10} 为H、 C_1 - C_8 烷基、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基;

[0022] 其中, R_2 、 R_5 、 R_6 和 R_7 ,当被取代时,被选自 $-OR_9$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、 $-NO_2$ 、 C_1 - C_8 烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代;

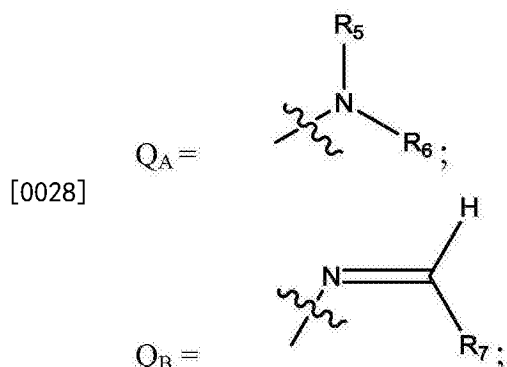
[0023] 或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或前药。

[0024] 根据另一方面,提供了式(IIA)、式(IIB)或式(IIC)的化合物:



[0026] 其中

[0027] Q为 Q_A 或 Q_B ;



[0029] R_2 为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

[0030] R_5 为H,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

[0031] R_6 为H、Boc,或者取代或未取代的选自乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基和苯甲酰基的成员;

[0032] R_7 为取代或未取代的选自 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员;

[0033] R_9 为H或 C_1 - C_8 烷基;

[0034] X为O、S或 NR_2 ;

[0035] n为1、2或3;

[0036] 其中, R_2 、 R_5 、 R_6 和 R_7 ,当被取代时,被选自 $-OR_9$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、乙酰基、丙炔酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、 $-NO_2$ 、 C_1 - C_8 烷基、甲氧羰基-或烷氧羰基-中的至少一个取代基取代;

[0037] 或其对映异构体、非对映异构体、外消旋混合物,药学上可接受的盐,溶剂合物或前药。

[0038] 根据另一方面,包括包含药学上可接受的载体和本公开的至少一种化合物的组合物。

[0039] 根据另一方面,包括治疗癌症或选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤中的至少一种癌症的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的本公开的至少一种化合物。

[0040] 根据另一方面,包括在个体中降低罹患癌症的风险或降低罹患至少一种癌症的风险的方法,所述癌症例如选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤,所述方法包括向个体施用有效量的本公开的至少一种化合物。

[0041] 根据另一方面,包括抑制癌症细胞生长的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的本公开的至少一种化合物。例如,所述癌症可选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤。

[0042] 根据另一方面,包括抑制癌症细胞生长的方法,所述方法包括使癌症细胞与有效量的本公开的至少一种化合物接触。例如,所述癌症可选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤。

[0043] 根据另一方面,包括抑制癌症肿瘤生长和/或癌症肿瘤大小的方法,所述方法包括

向有需要的个体施用有效量的本公开的至少一种化合物。例如,所述癌症可选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤。

[0044] 根据另一方面,包括减少和/或预防癌症肿瘤转移的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的本公开的至少一种化合物。例如,所述癌症可选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤。

[0045] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物用于治疗癌症或用于治疗选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤的至少一种癌症的用途。

[0046] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物用于降低罹患癌症的风险或用于降低罹患选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤的至少一种癌症的风险的用途。

[0047] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物用于抑制癌症细胞生长的用途。例如,所述癌症可选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤。

[0048] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物用于抑制选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤的至少一种的癌症肿瘤生长和/或癌症肿瘤大小的用途。

[0049] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物用于减少和/或预防选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤的至少一种癌症的癌症肿瘤转移的用途。

[0050] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物在制造用于治疗癌症或用于治疗选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤的至少一种癌症的药物中的用途。

[0051] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物在制造用于降低罹患癌症的风险或用于降低罹患选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤的至少一种癌症的风险的药物中的用途。

[0052] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物在制造用于抑制癌症细胞生长的药物中的用途。例如,所述癌症可选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤。

[0053] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物在制造用于抑制癌症肿瘤细胞生长和/或癌症肿瘤大小的药物中的用途。例如,所述癌症可选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤。

[0054] 根据另一方面,包括本公开的至少一种化合物在制造用于抑制癌症肿瘤转移的药物中的用途。例如,所述癌症可选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌和黑色素瘤。

附图说明

[0055] 以下附图以非限制性方式表示具体实施方案的实例,其中:

[0056] 图1表示图像(a)和图解分析(b),示出蛋白质印迹分析以确定人巨噬细胞(M ϕ s)中磷酸化STAT1和STAT3的表达水平,所述人巨噬细胞(M ϕ s)用载剂(DMSO)或化合物4和化合物5(均为0 μ M、10 μ M和50 μ M)预处理30分钟,然后立即(t=0)或在用50U/mL的IFN γ 或25ng/mL的IL6活化30分钟后洗涤和回收。通过每个样品的光密度分析计算磷酸化/未磷酸化蛋白质的比率,以评估pSTAT1或pSTAT3的相对活化。化合物4和化合物5有效抑制了IFN γ 诱导的STAT1活化和IL6诱导的STAT3活化。*p<0.05和**p<0.01表示各处理之间的显著差异;

[0057] 图2表示图像(a)和图解分析(b),示出流式细胞仪分析以确定未处理和用化合物4

(10 μ M) 和化合物5 (25 μ M) 预处理的静息和IFN γ 活化的人巨噬细胞中MHC-II和CD40表面抗原的表达水平。化合物4和化合物5有效抑制了IFN γ 诱导的CD40和MHC-II表达。 $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 表示各处理之间的显著差异;

[0058] 图3表示图像 (a) 和图解分析 (b), 示出划痕伤口愈合试验以确定人巨噬细胞单层的运动性, 所述人巨噬细胞单层用载剂 (DMSO) 或化合物4 (10 μ M) 和化合物5 (25 μ M) 培养3小时, 然后用载剂 (PBS) 或25ng/mL的IL6活化48小时。通过荧光显微镜在 $t=0h$ 和 $t=48h$ 获得划痕图像。对于每种不同的处理, 随机取五个视野。所有观察均在5倍放大率下进行。细胞运动性表示为, $t=48h$ 时运动细胞相对于 $t=0h$ 时的运动细胞的对照百分比 (%)。化合物4和化合物5有效抑制了IFN γ 诱导的STAT1活化和IL6诱导的STAT3活化。 $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 表示各处理之间的显著差异;

[0059] 图4为在用载剂 (DMSO) 和衍生物4和衍生物5预处理后经IFN γ 和TNF α 促炎刺激后巨噬细胞样J774A.1细胞中NO产生的图示。化合物4和化合物5有效抑制了组合的IFN γ /TNF α 诱导的NO合成。 $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 表示各处理之间的显著差异;

[0060] 图5为在用载剂 (DMSO) 和衍生物4和衍生物5预处理后经IFN γ 和TNF α 促炎刺激后鼠UBC细胞系MB49-I的NO产生的图示。10 μ M和15 μ M的化合物4和化合物5有效抑制了组合的IFN γ /TNF α 诱导的NO合成。 $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 表示各处理之间的显著差异;

[0061] 图6是在用载剂 (DMSO) 和不同浓度的抗炎衍生物4和5预处理后经IFN γ 和TNF α 促炎刺激后鼠UBC细胞系MB49-I上的相对细胞活性的图示。低剂量 (10 μ M、25 μ M和37.5 μ M) 的化合物4和化合物5对MB49-I细胞中组合的IFN γ 和TNF α 的抗增殖活性几乎没有影响或没有影响。 $*p<0.05$ 表示使用组合的IFN γ 和TNF α 加上化合物4或5与单独使用组合的IFN γ 和TNF α 的处理之间的显著差异;

[0062] 图7涉及用不同浓度的载剂 (DMSO) 或化合物4 (0 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、30 μ M和50 μ M) 处理 (3小时) 后MB49和MB49-I细胞系的24小时相对细胞活性。化合物4对细胞存活的负面影响不是由UBC MB49或MB49-I细胞的细胞死亡率增加引起的, 而是由细胞增殖停止引起的。 $*p<0.05$ 表示与对照 (不含化合物4) 相比的显著差异;

[0063] 图8涉及 (a) 蛋白质印迹分析: 化合物4以低至10 μ M的剂量有效抑制了鼠UBC MB49-I细胞中的TNF α /NF κ B和IL6/STAT3信号传导途径; (b) 荧光素酶试验: 50 μ M的化合物4有效抑制了NF κ B活化。在CMV启动子和NF κ B转录响应元件的串联重复序列的控制下, 用编码萤火虫荧光素酶报告基因的NF κ B-响应荧光素酶构建体转染MB49-I细胞。 $*p<0.01$ 表示与对照相比的显著差异;

[0064] 图9涉及 (a) 微浸润试验: 化合物4有效抑制了M1诱导的人UBC T24细胞浸润 (Boyden室中的基质胶); (b) 运动性测定: 30 μ M的化合物4有效抑制了人UBC T24细胞中IL6诱导的运动性 (划痕试验)。 $*p<0.05$ 表示与对照 (M1DMSO) 相比的显著差异;

[0065] 图10为基于3D球体的肿瘤浸润试验的细胞分析: 30 μ M的化合物4有效抑制MDA-MB-241细胞 (一种高浸润性人乳腺癌细胞系) 的浸润活性, 从而证明化合物4的抗浸润作用是没有细胞特异性的。 $*p<0.01$ 表示与第0天相比的显著差异;

[0066] 图11涉及3周内C57B1/6J小鼠 ($n=4$) 中以不同浓度 (0 μ M、90 μ M、150 μ M和300 μ M) 间歇性腹腔内 (i.p.) 注射化合物4的急性毒性试验。治疗对正常发育和活性 (a) 以及器官重量 (b) 和红细胞压积 (c) 没有明显作用;

[0067] 图12表示在3周内以不同浓度(0 μ M、90 μ M、150 μ M和300 μ M)周期性i.p.注射化合物4的治疗结束时,C57B1/6J小鼠中肝脏组织学分析的图像。即使在较高剂量下,治疗也不会引起肝功能异常的特征,如肝细胞损伤、炎症、纤维化和脂肪变性(苏木精和曙红,放大100倍和400倍)。这些结果显示抗炎治疗没有毒性证据,表明在这些小鼠中浓度高达300 μ M的化合物4是良好耐受的;

[0068] 图13涉及体内靶向研究,示出在携有被异位植入动物(n=6)右侧腹的MB49-I肿瘤的C57B1/6J雄性小鼠中,以不同浓度(0 μ M、90 μ M和150 μ M)间歇性腹腔内注射化合物4的作用。150 μ M的治疗显著地影响皮下植入小鼠的MB49-I细胞的肿瘤发展。与对照相比* $p < 0.01$;

[0069] 图14涉及在携有被异位植入动物(n=6)的MB49-I肿瘤的C57B1/6J雄性小鼠中,以不同浓度(0 μ M、90 μ M和150 μ M)间歇性腹腔内注射化合物4的抗转移作用。150 μ M的治疗显著降低了皮下植入的MB49-I肿瘤的大小(a)和肺转移的数量(b)。肺标本的组织学检查表明,MB49-I肿瘤细胞浸润诱导对照小鼠肺部的多灶性纤维化病变(如箭头所示),而在用150 μ M的化合物4治疗的小鼠的肺中未发现转移灶,并具有良好肺泡的正常组织学。与对照相比* $p < 0.01$;

[0070] 图15涉及体内靶向试验,示出在携有被原位植入动物(n=6)膀胱的MB49-I肿瘤的C57B1/6J雌性小鼠中,间歇性腹腔内注射化合物4的作用。(a)代表正常的年龄匹配的小鼠的膀胱和在研究结束时(肿瘤植入后第16天)对照(Ct1)及经治疗的携有肿瘤的小鼠的手术回收的膀胱的图像。(b)图示了以150 μ M的浓度每两周腹腔内注射一次化合物4,在两周内,完全消除了肌层浸润性MB49-I肿瘤的发展(n=6)。与对照相比* $p < 0.5$ 。

[0071] 图16涉及促炎性IL6和TNF α 在MB49和MB49-I细胞产生iNOS蛋白(a)和NO分子(b)中的调节作用。这些结果表明,相对于高浸润性MB49-I细胞,非肌层浸润性UBC MB49细胞产生低水平的iNOS和NO,对TNF α 响应,但对IL6不响应。这些结果有力地支持了以下观点:通过炎症途径TNF α /NF κ B的NO产生可为体内MB49-I肿瘤演进提供允许环境。与对照相比* $p < 0.01$;

[0072] 图17涉及体内研究,示出通过shRNA的基态表达和TNF α 诱导的iNOS表达的缺失(a)和NO产生(b)会影响荧光素酶表达的在C57B1/6J雌性老鼠的膀胱中异位植入的MB49-I肿瘤的发展(c)。这些结果有力地表明,MB49-I肿瘤可能高度依赖于功能性iNOS/NO系统的存在,以在C57B1/6J小鼠中发展。与对照相比* $p < 0.01$;

[0073] 图18涉及体内靶向研究,示出在携有被异位植入动物(n=6)右侧腹的非肌层浸润性MB49肿瘤的C57B1/6J雄性小鼠中,以不同浓度(0 μ M、90 μ M和150 μ M)间歇性腹腔内注射化合物4的作用。90 μ M和150 μ M浓度下的治疗显著减小了皮下植入的MB49肿瘤的大小。这些结果表明,化合物4高效地阻止了UBC肿瘤的发展,产生非常低水平的iNOS蛋白和NO分子。与对照相比* $p < 0.001$;

[0074] 图19涉及C57B1/6J雄性小鼠中异位植入的MB49肿瘤的体内治疗性靶向后,化合物4在腹膜巨噬细胞中的抗炎作用。90 μ M和150 μ M的治疗显著降低了腹膜巨噬细胞中的NO产生(a)和尿素合成和释放(b)。在研究结束时(肿瘤植入后第26天)回收腹膜巨噬细胞。对促炎性M1巨噬细胞的极化以通过iNOS活性的NO产生为特征,而通过精氨酸酶-1活性的尿素合成则与对抗炎M2巨噬细胞的极化有关。这些结果有力地表明,化合物4对膀胱肿瘤的体内治疗性靶向可能是通过诱导“炎症性无能”状态而直接影响小鼠巨噬细胞的极化,这是通常可在正常肠巨噬细胞中观察到的过程。* $p < 0.05$ 和** $p < 0.01$ 表示各治疗之间的显著差异。

[0075] 图20涉及关于化合物4的抗炎活性的结构-功能关系研究。(a) 化合物4和化合物12的化学结构。(b) 用载剂(DMSO)和化合物4(30 μ M)和化合物12(10 μ M、20 μ M、37.5 μ M和50 μ M)在不同浓度下预处理后,MB49-I细胞中LPS/IFN γ 诱导的NO产生的图示。即使在较高浓度下,化合物12也不影响LPS/IFN γ 诱导的NO的合成。这些结果表明,分子左侧的杂环中的双键对于化合物4对巨噬细胞和肿瘤细胞的NO产生的抑制作用是重要的。 $*p<0.01$ 表示与阳性对照(DMSO+LPS/IFN γ)相比的显著差异;

[0076] 图21涉及化合物4、8、10和11对MB49-I细胞中的NO产生的对比效果。(a) 化合物4、8、10和11的化学结构;(b) 用载剂(DMSO)和化合物4、8、10和11在20 μ M和37.5 μ M预处理后,MB49-I细胞中IFN/LPS诱导的NO产生的图示。这些结果表明,对于抑制NO产生,相同浓度(20 μ M和37.5 μ M)下,化合物8比化合物4更有效。 $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 表示各处理之间的显著差异;

[0077] 图22为图像(a)和图解分析(b),示出蛋白质印迹分析以确定鼠巨噬细胞(RAW 264.7细胞)中磷酸化STAT1的表达水平,所述鼠巨噬细胞用载剂(DMSO)或化合物4、8、10和11(在20 μ M和37.5 μ M浓度下)预处理90分钟,然后用5ng/mL的IFN γ 活化15分钟后洗涤和回收。通过每个样品的光密度分析计算p-STAT1/STAT1的比值,以评估转录因子STAT1的相对活化。这些结果显示,对于抑制RAW 264.7细胞中IFN γ 活化的STAT1信号传导途径,化合物8比其他化合物更有效。 $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 表示各处理之间的显著差异;

[0078] 图23为图像(a)和图解分析(b),示出蛋白质印迹分析以确定鼠巨噬细胞(RAW 264.7细胞)中磷酸化I κ B的表达水平,所述鼠巨噬细胞用载剂(DMSO)或化合物4、8、10和11(在20 μ M和37.5 μ M浓度下)预处理90分钟,然后用100ng/mL的LPS活化15分钟后洗涤和回收。通过每个样品的光密度分析计算p-I κ B/I κ B的比值,以评估I κ B蛋白(转录因子NF κ B的负调节因子)的相对失活。这些结果表明,所有化合物都有效抑制了RAW 264.7细胞中LPS活化的NF κ B信号传导途径。 $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 表示各处理之间的显著差异;

[0079] 图24为图像和图解分析,示出化合物4和化合物8对鼠UBC MB49-I细胞(a),鼠巨噬细胞RAW 264.7细胞(b)和人巨噬细胞THP-1细胞(c)的细胞存活率的对比效果。用载剂(DMSO)以及化合物4和化合物8以不同浓度预处理细胞90分钟,然后洗涤并在24小时孵育后计数以估算活细胞数量。这些结果表明,化合物8的细胞毒性作用低于化合物4的细胞毒性作用。 $*p<0.05$ 表示各处理之间的显著差异;

[0080] 图25涉及化合物4和化合物8在异位植入C57B1/6J雄性小鼠中的MB49-I肿瘤的发展中的对比抗癌活性。体内靶向研究显示,对于减小肌层浸润性MB49-I肿瘤(n=6)的肿瘤体积,相同浓度(150 μ M)下,18天的化合物8的间歇性腹腔内注射比化合物4更有效。在研究结束时(肿瘤植入后第20天),手术回收肿瘤。这些结果表明,对于抑制高浸润性MB49-I肿瘤的发展,化合物8比化合物4更有效。 $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 表示各治疗之间的显著差异。

[0081] 发明详述

[0082] 本公开涉及在体外和体内显示出抗炎、抗转移、抗增殖和抗癌特性的小的氨基苯甲酸衍生物地发现。本公开描述了从易得的邻-、间-和对-苯甲酸制备这些衍生物的合成方法及其在几种类型的癌症的治疗中的生物学应用。另外,本公开还涉及包含这些化合物的不同药物组合物。本公开的所述化合物和所述药物组合物已经显示出对各种类型的癌症具有抗癌活性。进一步地,本公开还提供了针对癌症的新型治疗方式。可以有利地使用这些化

合物的独特生物学特性以提供对癌症具有抗癌活性的化合物,上述癌症包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌和膀胱癌。

[0083] 术语“治疗有效量”、“有效量”或“足量”的本公开中的化合物,是足以在施用于个体(包括哺乳动物,例如人)时产生有益或所需结果(包括临床结果)的量,因此“有效量”或其同义词取决于其应用的情形。例如,在治疗癌症的情形中,例如,其是与不施用化合物获得的响应相比该化合物足以实现癌症的此类治疗的量。本公开的给定化合物的将对应于有效量的量将根据各种因素而变化,如给定的药物或化合物、药剂配方、给药途径、疾病或病症的类型、被治疗的个体或宿主的身份等,尽管如此,但可以被本领域技术人员常规地确定。此外,如本文所用,本公开的化合物的“治疗有效量”、“有效量”或“足量”是与对照相比,抑制、阻断或减弱个体的癌症的量(例如,由临床症状或癌症细胞的量来决定)。

[0084] 如本文所用的术语“个体”包括动物界的所有成员(包括人)。根据一个实施方案,个体为人。

[0085] 如本文所用的术语“烷基”意为包括1~n个碳原子的直链和/或支链的饱和烷基,包括(取决于n)甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、2,2-二甲基丁基、正戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、正己基等,其中n为基团中的最大碳原子数。

[0086] 如本文所用的表述“天然氨基酸的烷基组分”是指天然氨基酸的一个部分,其包含在氨基酸的羰基碳和氨基酸的氮原子之间。

[0087] 如本文所用的表述“本公开的化合物”是指,本公开中呈现的式I、式IA、式IB、式IC、式ID、式IE、式IIA、式IIB和IIC的化合物、其异构体如立体异构体(例如,对映异构体、非对映异构体,包括外消旋混合物)或互变异构体,或是指这些化合物的药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物和/或前药、这些后述化合物的异构体、或这些后述化合物的外消旋混合物。表述“本公开的化合物”也指,本段中提及的各种化合物或变体的混合物。

[0088] 如本公开所用的术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

[0089] 需要明确的是,本公开包括其所描述的化合物的异构体,外消旋混合物,药学上可接受的盐,溶剂合物,水合物和前药,以及包含两种以上所述化合物的混合物。

[0090] 本公开的化合物可具有至少一个不对称中心。当根据本文的化合物具有多于一个不对称中心时,它们可以以非对映异构体的形式存在。应理解,所有这些异构体及其以任何比例的混合物,都包括在本公开的范围内。应理解,尽管本公开的化合物的立体化学可如本文列出的任何给定化合物来提供,但此类化合物还可包含一定量(例如小于30%、小于20%、小于10%或小于5%)的具有可替代的立体化学的本公开的化合物。

[0091] 术语“适当的”,例如,“适当的抗衡阴离子”或“适当的反应条件”意为,特定基团或条件的选择将取决于要进行的具体的合成操作和分子的特性,但所述选择应在本领域技术人员的技能范围内。本文描述的所有工艺步骤均在适于提供所示产物的条件下进行。本领域技术人员应当理解,所有反应条件,包括例如反应溶剂、反应时间、反应温度、反应压力、反应物比率以及反应是否应在无水或惰性气氛下进行,是可以改变的,以优化预期产物的产率,这是他们力所能及的。

[0092] 表述“药学上可接受的”意指与诸如动物或人的个体的治疗相容。

[0093] 表述“药学上可接受的盐”意指与诸如动物或人的个体的治疗相适用或相容的酸

加成盐或碱加成盐。

[0094] 如本文所用的表述“药学上可接受的酸加成盐”意为,本公开的任何化合物的任何无毒的有机或无机盐,或其任何中间体。形成适当的盐的示例性无机酸包括盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸,以及金属盐,例如正磷酸氢钠和硫酸氢钾。形成适当的盐的示例性有机酸包括一元羧酸、二元羧酸和三元羧酸,例如乙醇酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、马来酸、苯甲酸、苯乙酸、肉桂酸和水杨酸,以及磺酸,如对甲苯磺酸和甲磺酸。可以形成一元酸盐或二元酸盐,且这些盐可以以水合、溶剂合或基本上无水的形式存在。通常,本公开的化合物的酸加成盐更易溶于水和各种亲水性有机溶剂,并且与其游离碱形式相比通常表现出更高的熔点。适当的盐的选择对于本领域技术人员来说是已知的。其他非药学上可接受的盐,例如,草酸盐,可例如用于本公开的化合物的离析中、用于实验室用途或用于随后转化为药学上可接受的酸加成盐。在本公开的实施方案中,药学上可接受的酸加成盐为盐酸盐。

[0095] 如本文所用的术语“药学上可接受的碱加成盐”意为,本公开的任何酸化合物的任何无毒的有机或无机碱加成盐、或其任何中间体。可以形成碱加成盐的本公开的酸性化合物包括,例如,其中R为CO₂H。形成适当的盐的示例性无机碱包括氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化镁或氢氧化钡。形成适当的盐的示例性有机碱包括脂肪族、脂环族或芳香族的有机胺,例如甲胺、三甲胺和甲基吡啶或氨。适当的盐的选择对于本领域技术人员来说是已知的。其他非药学上可接受的碱加成盐可用于例如本公开的化合物的离析中、用于实验室用途或用于随后转化为药学上可接受的酸加成盐。

[0096] 预期化合物盐的形成是采用标准技术实现的。例如,在适当的溶剂中用酸或碱处理中性化合物,并通过过滤、萃取或任何其它适当的方法分离形成的盐。

[0097] 如本文所用的术语“溶剂合物”意为,其中适当的溶剂的分子结合入晶格中的本公开的化合物。适当的溶剂在给药剂量下是生理学上可耐受的。适当的溶剂的实例为乙醇、水等。当水作溶剂时,该分子被称为“水合物”。本公开的化合物的溶剂合物的形成将根据所述化合物和所述溶剂合物而变化。通常,溶剂合物是通过将化合物溶解在适当的溶剂中并通过冷却或使用抗溶剂来分离而形成的。溶剂合物一般在环境条件下干燥或共沸。

[0098] 本公开的化合物包括前药。通常,此类前药是在体内易于转化成其理论上衍生的化合物的这些化合物的功能性衍生物。本公开的化合物的前药可以是由可用的羟基或氨基形成的常规酯。例如,本公开的化合物中的可用OH或氮可以在碱存在下,任选地在惰性溶剂中用活化酸来酰化(例如,吡啶中的酰氯)。一些用作前药的常见酯为苯基酯、脂肪族(C₈-C₂₄)酯、酰氧基甲基酯、氨基甲酸酯和氨基酸酯。在某些情况下,本公开的化合物的前药是化合物中的一个或多个羟基被掩蔽为可在体内转化为羟基的化合物。用于选择和制备适当的前药的常规方法描述于例如“Design of Prodrugs”,H.Bundgaard编,Elsevier,1985中。

[0099] 本公开的化合物包括放射性标记形式,例如,通过在结构内并入²H、³H、¹⁴C、¹⁵N或放射性卤素如¹²⁵I而标记的化合物。本公开的化合物的放射性标记的化合物可采用本领域已知的标准方法制备。

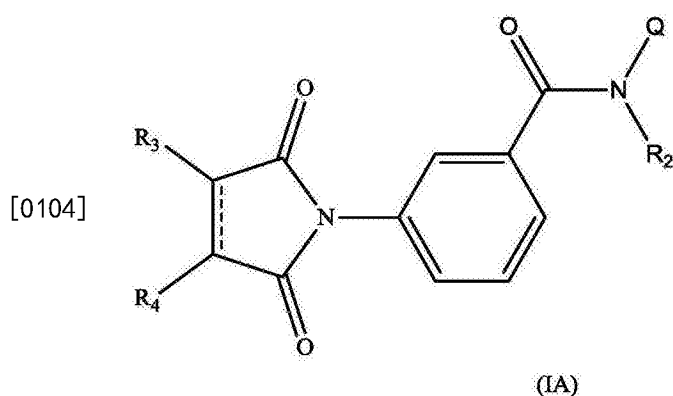
[0100] 如本文所用且在本领域中充分理解的,“治疗”或“处理”是获得有益或预期结果(包括临床结果)的手段。有益或预期的临床结果可包括但不限于一种或多种症状或状况的缓解或改善、疾病程度的减轻,疾病的稳定(即不恶化)状态、预防疾病传播、疾病演进的延

迟或减缓、疾病状态的改善或缓和,以及缓解(无论是部分还是全部),无论是否可检测或观察到的。“治疗”或“处理”还可以意味着与未接受治疗的情况的预期存活相比,延长存活。

[0101] “缓和”疾病或病症意味着,与未治疗病症相比,病症或疾病状态的程度和/或不期望的临床表现减轻和/或演进的时间进程减慢或延长。

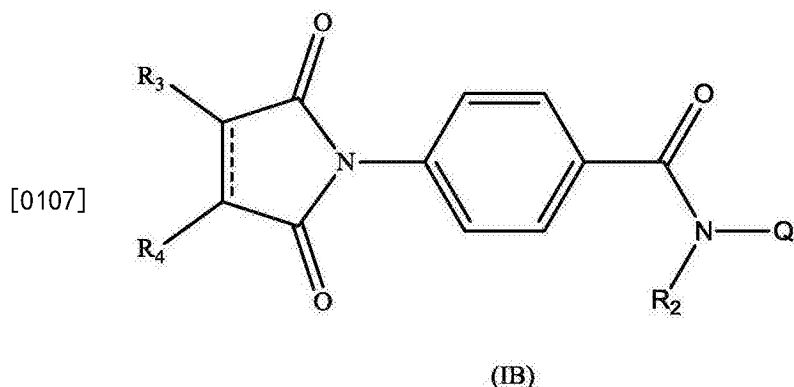
[0102] 在理解本公开的范围时,如本文所使用的术语“包含”及其衍生词旨在用作开放式术语,其指定所规定的特征、元素、组分、基团、整数和/或步骤的存在,但不排除其他未规定的特征、元素、组分、基团、整数和/或步骤的存在。前述内容也适用于具有相似含义的词语,例如术语“包括”,“具有”及其衍生词。最后,如本文所使用的诸如“基本上”、“约”和“近似”的程度术语意味着修饰的术语的合理偏差量,使得不会显著改变最终结果。如果这种偏差不会否定其所修饰的词的含义,则这些程度术语应当被解释为包括所修饰的术语的至少±5%的偏差。

[0103] 在本公开的一个实施方案中,包括式(IA)的化合物:



[0105] 其中R₂、R₃、R₄和Q如前述限定。

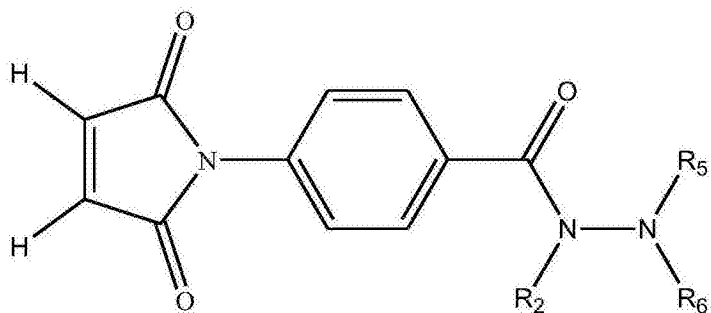
[0106] 在本公开的另一个实施方案中,包括式(IB)的化合物:



[0108] 其中R₂、R₃、R₄和Q如前述限定。

[0109] 在本公开的又一个实施方案中,包括式(IC)的化合物:

[0110]

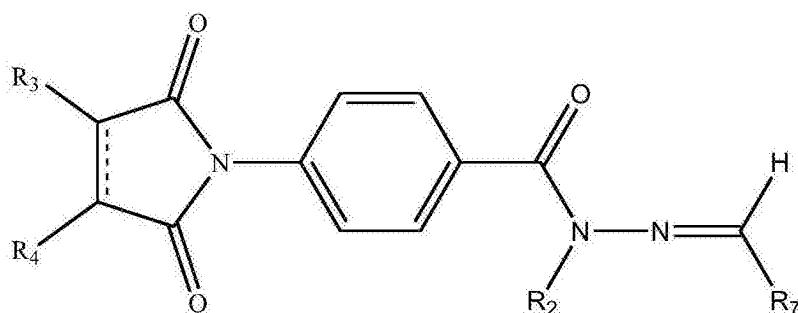


(IC)

[0111] 其中R₂、R₅和R₆如前述限定。

[0112] 在本公开的又一个实施方案中,包括式(ID)的化合物:

[0113]

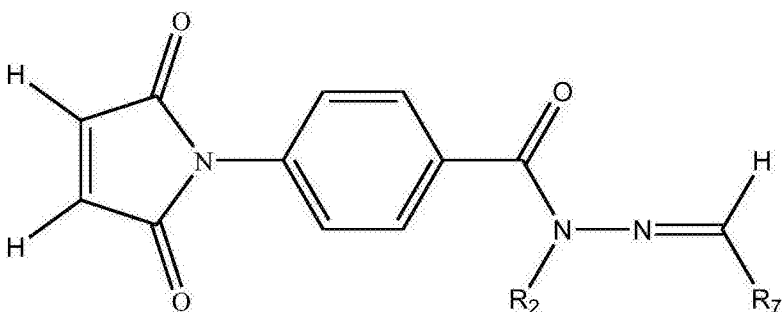


(ID)

[0114] 其中R₂、R₃、R₄和R₇如前述限定。

[0115] 在本公开的又一个实施方案中,包括式(IE)的化合物:

[0116]



(IE)

[0117] 其中R₂和R₇如前述限定。

[0118] 在本公开的又一个实施方案中,

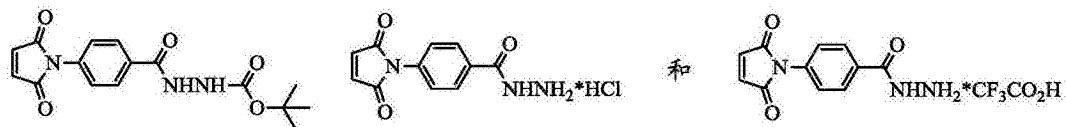
[0119] R₂为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;[0120] Q为Q_A;[0121] R₅为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;以及[0122] R₆为Boc、H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员。

[0123] 在本公开的另一个实施方案中,

[0124] R₂为H,或未取代的选自乙酰基和丙炔酰基的成员;以及[0125] R₇为未取代的选自C₁-C₈烷基、C₃-C₆环烷基、苯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、萘基、喹啉基和异喹啉基的成员。

[0126] 例如,在本公开的又一个实施方案中,式(I)的化合物如前所定义,条件是,所述化合物不同于

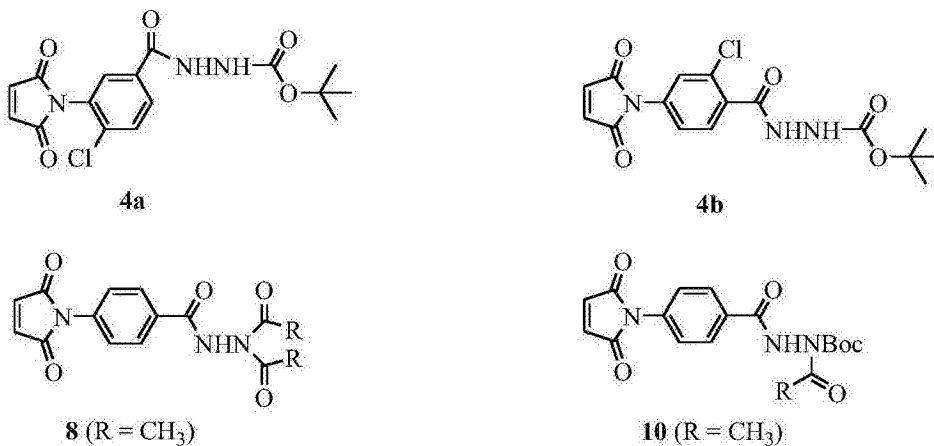
[0127]



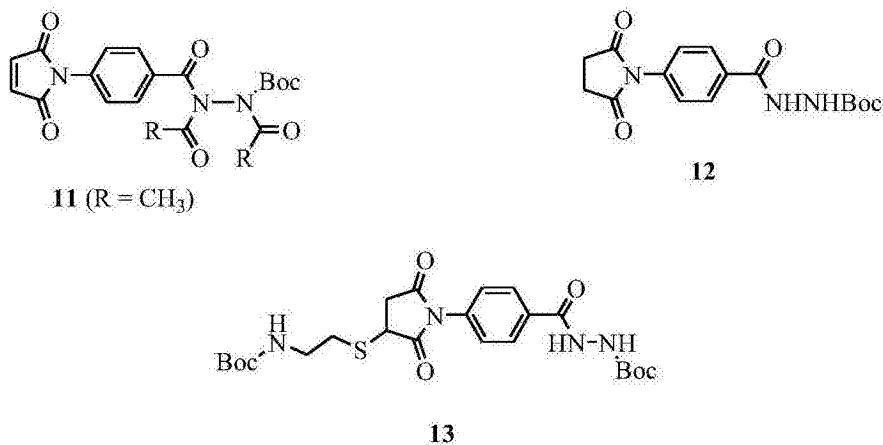
[0128] 然而,根据一个实施方案,上述三种排除的化合物并不排除在如前所述的各种用途和方法的范围之外。

[0129] 根据另一个实施方案,上述三种排除的化合物被排除在如前所述的各种用途和方法的范围之外。

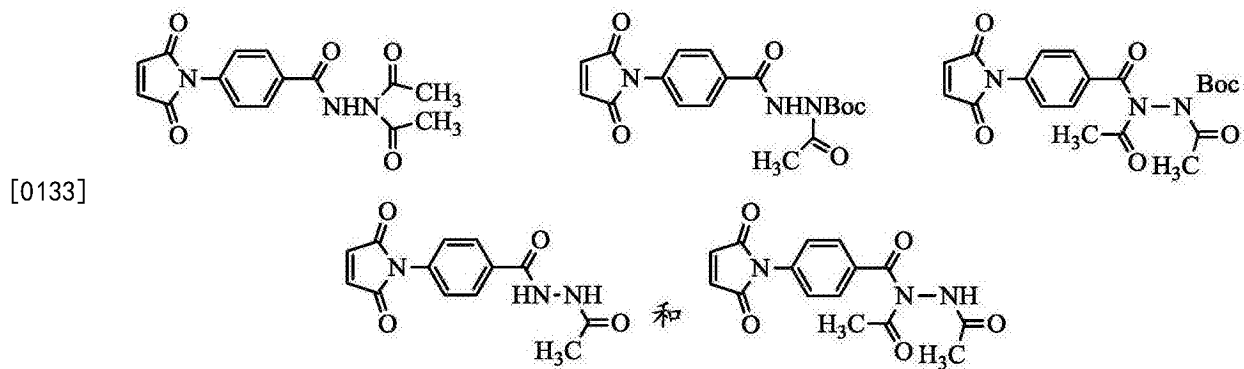
[0130] 在本公开的又一个实施方案中,包括下式的化合物:



[0131]

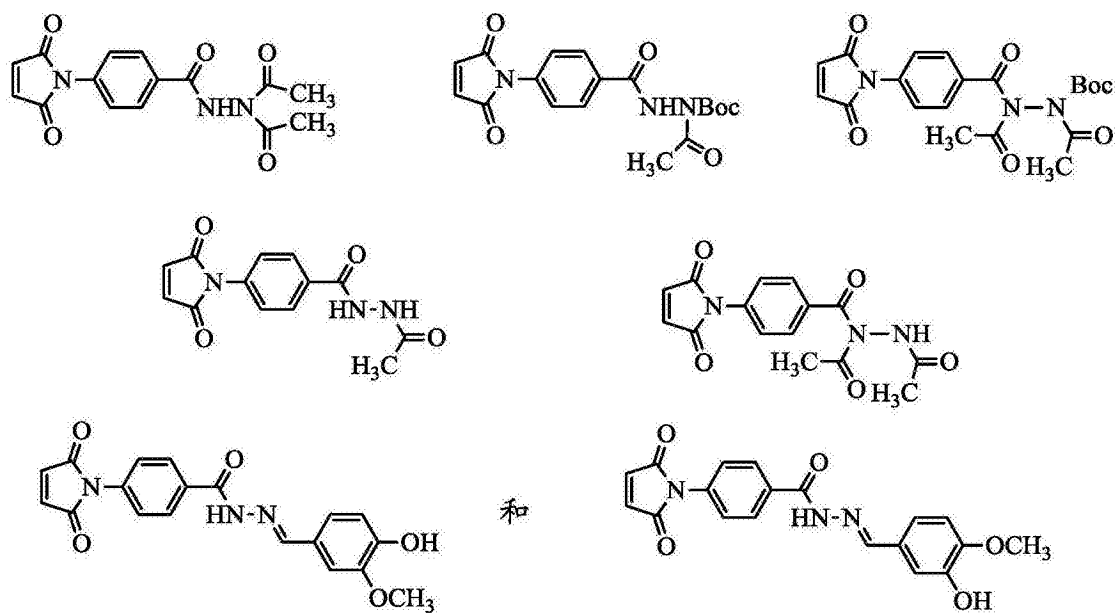


[0132] 例如,化合物可选自

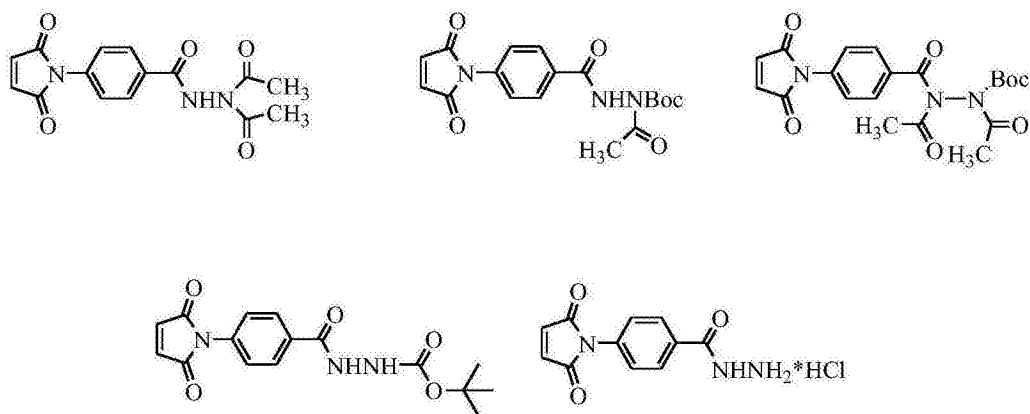


[0134] 例如, 化合物可选自

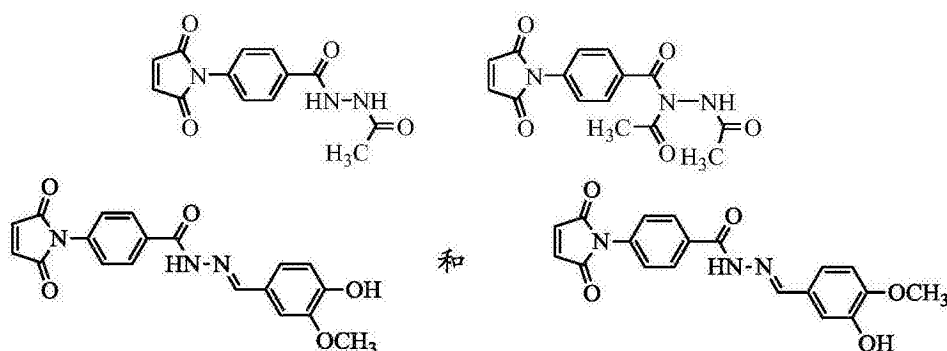
[0135]



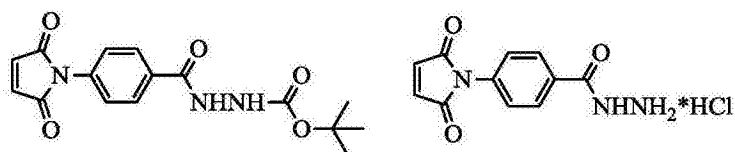
[0136] 例如, 化合物可选自



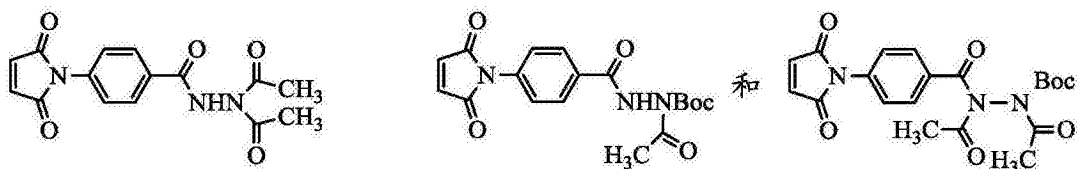
[0137]



[0138] 例如,化合物可选自



[0139]

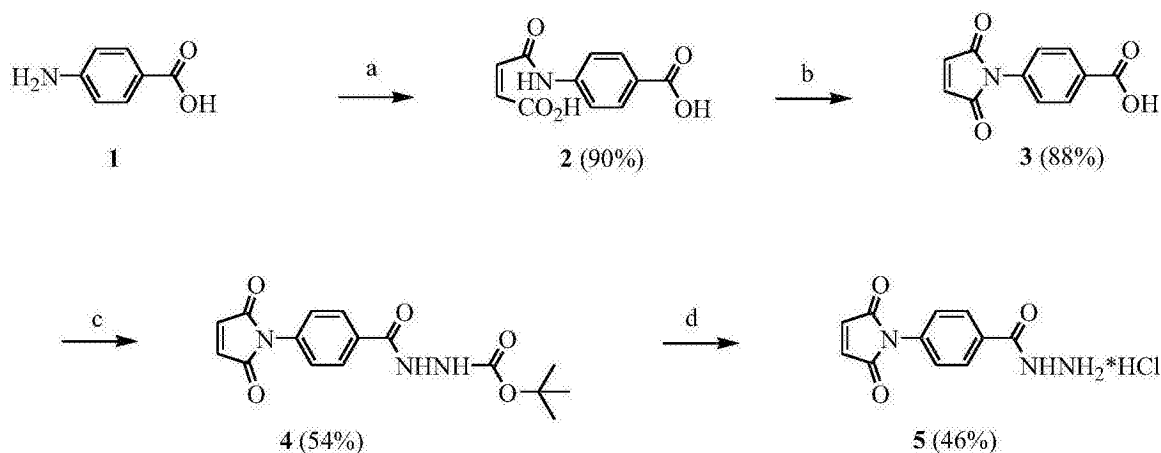


[0140] 图式1~4表示用于制备本公开的化合物的合成路线的实例。每个步骤的反应条件直接在图式中呈现。

[0141] 使用对氨基苯甲酸 (1) 为起始材料, 衍生物4以三步反应序列制备 (图式1)⁹⁻¹¹。对氨基苯甲酸 (1或PABA) 首先与马来酸酐 (MA) 在无水丙酮中反应, 得到二酸 (2), 产率为90%。用乙酸酐和乙酸钠环化形成马来酰亚胺, 在用水来水解混合酸酐中间体后得到化合物3, 产率为89%。最后, 在吡啶存在下用氯甲酸异丁酯活化酸3, 然后用胍基甲酸叔丁酯处理, 得到预期的抗炎衍生物4, 产率为54%。衍生物4在乙醚中用盐酸脱保护, 重结晶后, 得到盐酸盐5, 产率为46%。实施例1示出化合物4和化合物5的制备。该反应顺序可用于从未取代或取代的邻-、间-和对-苯甲酸起始材料开始生成其它衍生物。因此, 该方法分别使得实施例2和3中所示的N'-[3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-吡咯-1-基)-4-氯-苯甲酰基]-胍基甲酸叔丁酯 (4a) 和N'-[4-(2,5-二氧代-2,5-二氢-吡咯-1-基)-2-氯-苯甲酰基]-胍基甲酸叔丁酯 (4b) 得以合

成。

[0142]

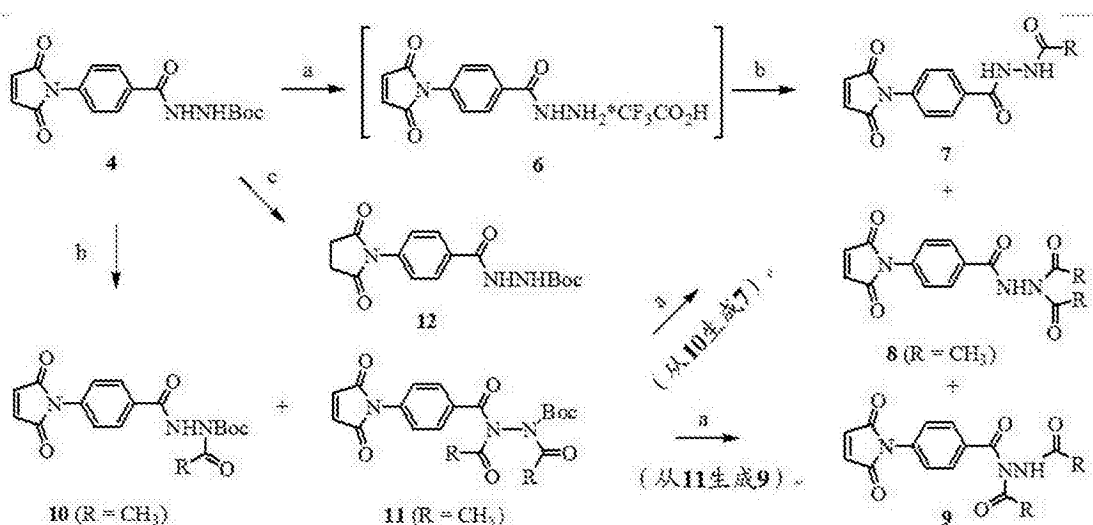


[0143] 反应物和条件:a) 马来酸酐(MA),无水丙酮,甲醇,22°C,1h;b) 1) Ac₂O, AcONa, 50°C, 2h; 2) H₂O, 70°C, 2h;c) 1) 氯甲酸异丁酯, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 1h和22°C, 1h; 2) 胍基甲酸叔丁酯, CH₂Cl₂, 22°C, 12h;d) HCl, 二氧六环, 22°C, 5h。

[0144] 图式1

[0145] 衍生物4的进一步转化可以产生具有抗炎、抗转移、抗增殖和抗癌活性的新化合物(图式2)。然而,衍生物4的催化氢化导致化合物12失去其抗炎活性(参见实施例4)。另外,将化合物4在二氯甲烷中用三氟乙酸处理后,转化为其三氟乙酸盐6。原料6可与乙酰氯或乙酸酐(或任何相关的酸酐或酰氯)反应,得到衍生物8。需要注意的是,在实施例5中很可能会生成未分离的衍生物7和衍生物9。或者,可以用相关的酸酐或酰氯来酰化化合物4,得到化合物10和化合物11。有趣的是,使用乙酰氯,化合物4高效地转化为二乙酰化衍生物11(R=CH₃),使用乙酸酐,则反应的主要产物是单乙酰化衍生物10(R=CH₃)。衍生物10可以脱保护得到衍生物7,衍生物11可以得到衍生物9。通过两步序列,由化合物4高效地生成化合物7和化合物9是可能的。

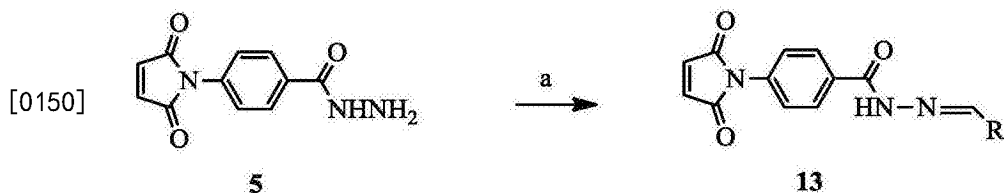
[0146]



[0147] 反应物和条件:a) TFA, CH₂Cl₂, 22°C, 0.5h;b) 相关酸酐或酰氯, EtOAc, 22°C, 30min ~ 2h;c) H₂, Pd/C, CH₃OH, 22°C, 3h。

[0148] 图式2

[0149] 图式3示出按照Taha等人¹²描述的流程得到烷基肼或芳基肼衍生物13的方法。据此,在酸性条件下并在丁醇(或其它溶剂)中回流,化合物5可以采用相关的醛(烷基醛(直链或支链)、苯甲醛或取代的苯甲醛或其它芳醛)处理,得到通式结构13的预期衍生物。

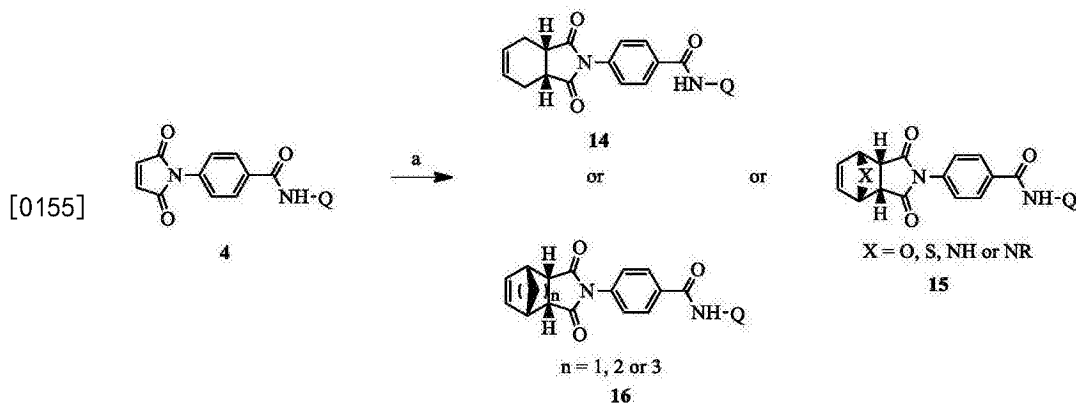


[0151] R=烷基或芳基(未取代的或取代的)

[0152] 反应物和条件:a) RCHO, H⁺, 丁醇, 回流, 1~5h

[0153] 图式3

[0154] 在图式4中,衍生物4(或本文所述的任何其他马来酰亚胺)可以与适当的二烯(丁二烯(未取代的或取代的)、环戊二烯、环己二烯、环庚二烯、呋喃、噻吩、吡咯、N-烷基吡咯)反应,得到预期的环加成物(Diels-Alder产物),如14、15和16。如实施例10中所描述的,该反应可以在加压或不加压下,通过加热纯的试剂(二烯和亲二烯体)或试剂溶液进行。



[0156] 相关二烯=丁二烯(未取代的或取代的)、环戊二烯、环己二烯、呋喃、噻吩、吡咯、N-烷基吡咯

[0157] 反应物及条件:a) 相关二烯, 甲苯, Δ , 3h。

[0158] 图式4

[0159] 如本领域技术人员可以理解的,上述合成图式并非是可以合成本申请中所描述和要求保护的化合物的所有方法的综合列举。其他方法也可以被用于制备本公开的化合物。

[0160] 可通过添加适当的官能团来修饰本公开的化合物以增强选择性生物学特性。这些修饰为本领域已知的,并且包括将生物渗透增加到给定的生物系统(例如,血液、淋巴系统、中枢神经系统)、增加口服利用度、增加溶解度以允许通过注射来给药、改变代谢和改变排泄率的那些修饰。

[0161] 本公开的化合物可含有一个或多个不对称碳原子,因此可以以外消旋体和外消旋混合物、单一对映异构体、非对映异构混合物和单独的非对映异构体形式存在。这些化合物的所有这些异构形式明确地包括在本公开之中。每个立体碳可以为R构型或S构型。

[0162] 已经发现,本文公开的小的氨基苯甲酸衍生物显示出抗炎、抗转移、抗增殖和/或抗癌特性以及良好的毒性特征,并且可以用于例如治疗恶性肿瘤(如人体内),如肌层-浸润

性和浅表性UBC肿瘤。

[0163] 本文提供的一个方面是治疗癌症或选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的方法,所述方法包括向有此需要的个体施用有效量的本文所限定的至少一种化合物。

[0164] 另一方面是在个体中降低罹患癌症的风险或降低罹患至少一种癌症的风险的方法,所述癌症例如选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌,所述方法包括向个体施用有效量的本文所限定的至少一种化合物。

[0165] 又一方面是抑制癌症细胞生长的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的本文所限定的至少一种化合物。

[0166] 例如,相对于未治疗的患者,所述癌症细胞生长至少被抑制约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0167] 另一方面是抑制肿瘤生长和/或减小肿瘤大小的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的本文所限定的至少一种化合物。

[0168] 例如,以重量和/或体积测量肿瘤大小。

[0169] 例如,相对于未治疗的患者,所述肿瘤生长和/或肿瘤大小至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%。

[0170] 例如,向有此需要的个体施用有效量的本文公开的至少一种化合物中增加了选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的演进时间。

[0171] 例如,本文的化合物用于降低选罹患选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症的风险。

[0172] 例如,所述化合物用于治疗选自黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和膀胱癌中的至少一种癌症。

[0173] 例如,所述化合物用作抗癌剂。

[0174] 例如,所述化合物用作抗炎剂。

[0175] 例如,所述化合物用作抗转移剂。

[0176] 如本文所述,几种化合物,即衍生物4、5、8、10、11和12,在巨噬细胞和UBC细胞上测试其抗炎、抗转移和/或抗癌特性。

[0177] 如本文所示,目前公开的化合物显示出抗炎特性。

[0178] 参见图1~图10,进行了用化合物4和5测试人巨噬细胞和UBC细胞的体外研究以研究所述化合物对促炎性细胞因子的抗炎特性。如图1所示,在预处理的人巨噬细胞中,IFN γ 诱导的STAT1活化和IL6诱导的STAT3活化降低。类似地,发现化合物4和化合物5有效减少了IFN γ 诱导的CD40和MHC-II的表达,如图2所示。另外,参见图3,进行了划痕伤口愈合试验,发现化合物4和5有效抑制人巨噬细胞中IFN γ 诱导的STAT1活化和IL6诱导的STAT3活化。

[0179] 一个方面提供了降低癌症细胞的抗炎特性的方法,所述方法包括使癌症细胞与本文所限定的至少一种化合物接触。

[0180] 例如,相对于未处理的细胞,用本文公开的化合物处理的细胞的相对STAT1活化至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0181] 例如,相对于未处理的细胞,用本文公开的化合物处理的细胞的相对STAT3活化至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0182] 例如,相对于未处理的细胞,用本文公开的化合物处理的细胞的CD40表达至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0183] 例如,相对于未处理的细胞,用本文公开的化合物处理的细胞的MHC-II表达至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0184] 现参考图4和图5,通过测量用炎性信号IFN γ /TNF α 刺激的鼠巨噬细胞样细胞中的一氧化氮(NO)产生来评估化合物4和化合物5的抗炎活性。发现化合物4和化合物5有效减少了IFN γ /TNF α 诱导的NO产生。

[0185] 例如,相对于未处理的细胞,用本文公开的化合物处理的细胞的NO产生至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0186] 参见图6和图7,表明化合物4和化合物5在用IFN γ /TNF α 刺激的UBC细胞中具有抗增殖特性。

[0187] 一个方面提供了诱导癌症细胞的抗增殖特性的方法,所述方法包括使癌症细胞与本文所限定的至少一种化合物接触。

[0188] 例如,相对于未处理的细胞,用本文公开的化合物处理的细胞的活性至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0189] 例如,相对于未处理的癌症细胞,所述癌症细胞生长被至少抑制10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0190] 现参见图8,表明化合物4抑制鼠UBC细胞中的TNF α /NF κ B和IL6/STAT3信号传导途径。还在人UBC细胞中测试了化合物4,表明其抑制IL6诱导的运动性,如图9所示。类似地,参见图10,用化合物4处理人乳腺癌细胞系,其显示出抗浸润特性,从而证明化合物4不是细胞特异性的。

[0191] 例如,相对于未处理的细胞,采用本文公开的化合物处理的细胞的TNF α /NF κ B和/或IL6/STAT3信号传导途径至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0192] 例如,相对于未处理的细胞,采用本文公开的化合物处理的细胞的浸润力至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0193] 还进行了体内研究以评估化合物4在UBC的异位和原位的鼠模型中的抗癌、抗增殖和抗转移活性。

[0194] 如图11所示,小鼠的急性毒性研究表明,采用化合物4的治疗对正常发育和活力以及器官重量和红细胞压积没有明显影响,表明在小鼠中的耐受性。类似地,参见图12,在用不同浓度的化合物4治疗的小鼠的肝脏组织学分析中,未发现与化合物4相关的毒性证据。

[0195] 例如,用本文公开的化合物治疗的个体具有与对照的未治疗的个体类似的体重。如本文所用的“类似的体重”意指体重损失的差异不大于10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0196] 例如,采用本文公开的化合物治疗的个体具有与对照的未治疗的个体类似的红细胞压积。如本文所用的“类似的红细胞压积”意指红细胞压积水平的差异不大于5%、4%、3%、2%或1%。

[0197] 如本文所证明的,本文的化合物显示出抗增殖和抗转移活性。

[0198] 参见图13和图14,相对于未治疗的小鼠,异位植入UBC肿瘤并采用化合物4治疗的

雄性小鼠的肿瘤增殖和转移数量显著下降。在携有原位植入的尿路上皮膀胱癌肿瘤的雌性小鼠中,如图15所示,还观察到了化合物4的抗增殖特性。更具体地,在治疗两周后肿瘤停止发展。类似地,异位植入尿路上皮膀胱癌肿瘤并用化合物4治疗的小鼠的肿瘤大小显著减小,如图18所示。

[0199] 例如,相对于未接受治疗的肿瘤,采用本文公开的化合物治疗的肿瘤具有至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%的体积下降和/或肿瘤生长下降。

[0200] 另一方面为减少和/或预防肿瘤转移的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的本文公开的至少一种化合物。

[0201] 例如,相对于未治疗的个体,肿瘤转移的数量至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%。

[0202] 参见图19,进行了化合物4的抗炎特性的进一步的鼠体内研究,并发现在腹膜巨噬细胞中NO产生和尿素合成显著降低。

[0203] 还发现,化合物4的衍生物显示出抗炎、抗癌、抗增殖和抗转移特性。化合物4衍生物、化合物8、10和11的额外的体外和体内研究在巨噬细胞和UBC细胞中进行。

[0204] 图21表明这些化合物可有效抑制NO的产生。所述化合物还有效抑制了巨噬细胞中IFN γ 活化的STAT1信号传导途径和LPS活化的NF κ B信号传导途径(图22和图23)。

[0205] 例如,相对于未处理的细胞,用本文公开的化合物处理的细胞的LPS活化的NF κ B信号传导途径至少下降约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。

[0206] 现参见图25,发现化合物4和化合物8在雄性小鼠的异位植入的UBC肿瘤中具有抗增殖活性。

[0207] 例如,所述化合物为化合物4。

[0208] 例如,所述化合物为化合物8。

[0209] 例如,所述化合物为化合物10。

[0210] 例如,所述化合物为化合物11。

[0211] 例如,所述个体为哺乳动物。例如,所述个体为人。

[0212] 例如,所述细胞位于体外。

[0213] 例如,所述细胞位于体内。

[0214] 例如,所述细胞为癌症细胞。

[0215] 例如,所述癌症为黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌或膀胱癌。

[0216] 例如,所述膀胱癌为浅表性UBC或肌层浸润性UBC。

[0217] 例如,所述肿瘤为黑色素肿瘤、子宫肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤或膀胱肿瘤。

[0218] 例如,所述膀胱肿瘤为浅表性UBC肿瘤或肌层浸润性UBC肿瘤。

[0219] 例如,本文公开的方法对于预防浅表性UBC发展成肌层浸润性UBC肿瘤是有效的。

[0220] 在本公开中,使用了以下缩写:

[0221] 缩写 含义

[0222] Ac₂O 乙酸酐

[0223] AcONa 乙酸钠

[0224] CH₂Cl₂ 二氯甲烷

[0225]	Boc	叔丁氧基羰基
[0226]	Et ₂ O	二乙醚
[0227]	EtOAc	乙酸乙酯
[0228]	Et ₃ N	三乙胺
[0229]	h	小时
[0230]	HCl	盐酸
[0231]	i.p.	腹腔内
[0232]	m	间
[0233]	MA	马来酸酐
[0234]	MeOH	甲醇
[0235]	min	分钟
[0236]	mmol	毫摩尔
[0237]	MTT	3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑
[0238]	NMR	核磁共振
[0239]	o	邻
[0240]	p	对
[0241]	Phe	苯基
[0242]	s.c.	皮下
[0243]	TLC	薄层色谱
[0244]	TFA	三氟乙酸
[0245]	UBC	尿路上皮膀胱癌

实施例

[0246] 本部分还描述了本文中呈现的几种化合物的合成。这些实施例不应理解为以任何方式限制本公开的范围。

[0247] 材料与方法-化学

[0248] 无水反应在惰性气氛下进行,装置在干燥氮气下组装和冷却。除非另有说明,起始材料、反应物和溶剂为商业途径获得的,并且原样使用并通过标准方法纯化和干燥。¹³有机溶液用硫酸镁干燥,减压下在旋转蒸发器上蒸发。通过UV荧光或用碘染色监测所有反应。商业TLC板采用Sigma T 6145 (聚酯硅胶 60Å, 0.25mm)。根据Still及其同事在Merck 60级230-400目的硅胶上的方法进行快速柱色谱。¹⁴色谱中使用的所有溶剂在使用前已经蒸馏。

[0249] 红外光谱在Nicolet Impact 420FT-IR上获取。质谱分析使用安捷伦科技的MS型6210仪器获得。高分辨质谱(HRMS)使用ESI(电喷雾离子化)正离子化模式(ESI+)的TOF(飞行时间)获得。(蒙特利尔魁北克大学有机分子分析平台)。

[0250] 在Varian 200MHz NMR仪器上记录核磁共振(NMR)光谱。将样品溶解在氘代氯仿(CDCl₃)、氘代丙酮(丙酮-d₆)或氘代二甲基亚砷(DMSO-d₆)中,使用四甲基硅烷或氯仿作为内标物(TMS, ¹H-NMR中为0.0ppm, ¹³C-NMR中CDCl₃ 77.0ppm)进行数据采集。化学位移(δ)以百万分率(ppm)表示,偶合常数(J)以赫兹(Hz)表示。多重性由以下缩写描述:s表示单峰,d表示双重峰,dd表示双重双重峰,t表示三重峰,dt表示双重三重峰,q表示四重峰,dq表示双

重四重峰,m表示多重峰,#m表示多重多重峰,br表示宽峰。

[0251] 采用图式1、2、3或4中概括的方法,由相关的氨基苯甲酸衍生物制备以下化合物。

[0252] 实施例1.N'-[4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-苯甲酰基]-胍甲酸叔丁酯(4)、其盐酸盐(5)及其三氟乙酸盐(6)的制备

[0253] 步骤A.4-(3-羧基-丙烯酰基氨基)-苯甲酸(2)的合成

[0254] 将4-氨基苯甲酸(1.5.34g,38.93mmol)溶于无水丙酮(12mL)中,向其加入甲醇(1mL)。将溶解在无水丙酮中的马来酸酐(1.05eq.)加入到第一个溶液中。将反应混合物搅拌2小时,允许足够的时间以使二酸2完全沉淀。过滤沉淀物,用丙酮(2×2mL)洗涤两次,并在干燥器中干燥过夜。粗二酸2(9.16g,90%)已足够纯,无需进一步纯化即可用于下一步骤。IR(ν , cm^{-1}):3500-2500(CO_2H),1686 cm^{-1} (C=O); ^1H NMR(DMSO- d_6 , δ ppm):12.79(br s, 2H,2× CO_2H),10.58(s,1H,NH),7.89和7.71(2×d,J=8.6Hz,4H,芳香族),6.48和6.30(2×d,J=12.2Hz,2H,马来酰亚胺); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , δ ppm):167.4,167.3,164.1,143.2,132.1,130.9(2),130.6,126.0,119.2(2);ESI+HRMS:(M+H) $^+$ 计算值 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_5=236.0553$;实测值=236.0558。

[0255] 步骤B.4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-苯甲酸(3)的合成

[0256] 用乙酸酐(4.0mL,36.28mmol)和无水乙酸钠(350mg,4.27mmol)处理二酸2(2.01g,8.54mmol),并将混合物在50℃下加热2小时。然后,将溶液蒸干,并在70℃下与水一起搅拌2小时。所得沉淀物经过滤并在干燥器中干燥过夜,得到1.65g(89%)的马来酰亚胺4。该衍生物的光谱数据与文献中报道的相符。^{9,11}IR(ν , cm^{-1}):3475-2600(CO_2H),1715(C=O),1704(C=O); ^1H NMR(丙酮- d_6 , δ ppm):8.14和7.57(2×d,J=8.6Hz,4H,芳香族),7.08(s,2H,马来酰亚胺); ^{13}C NMR(丙酮- d_6 , δ ppm):169.3(2),166.2,136.2,134.7(2),130.1(2),129.3,125.8(2);ESI+HRMS:(M+H) $^+$ 计算值 $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{NO}_4=218.0448$;实测值=218.0447。

[0257] 步骤C.N'-[4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-苯甲酰基]-胍甲酸叔丁酯的合成(4)

[0258] 采用由Willner等人¹⁵报道的修饰过程合成衍生物4,Lau等人和Hamelin-Morrisette等人也曾描述过该过程。⁹⁻¹¹用三乙胺(190 μL ,1.36mmol)和氯甲酸异丁酯(175 μL ,1.34mmol)处理在二氯甲烷(4.5mL)中的分子3(211mg,0.97mmol)的冷却悬浮液(0℃)。将混合物在0℃下搅拌1小时,并在室温(22℃)下搅拌约1小时。然后,将溶解在二氯甲烷(0.8mL)中的胍基甲酸叔丁酯(128mg,0.97mmol)逐滴滴加到混合物中并在22℃下再搅拌12小时。将反应混合物用乙酸乙酯(55mL)和二氯甲烷(20mL)稀释,用饱和 NaHCO_3 (2×50mL)洗涤两次,用0.1N的HCl(2×50mL)洗涤两次,用饱和NaCl(2×50mL)洗涤两次,最后用 H_2O (50mL)洗涤。将有机相干燥(MgSO_4)并蒸发,得到粗衍生物4。用己烷/丙酮(3/2)混合物,经快速色谱法纯化产物,得到173mg(54%)的4。该衍生物的光谱数据与文献中报道的相符。¹⁰IR(ν , cm^{-1}):3360-3240(NH),3087(C=C),2988(CH,脂肪族),1733(C=O),1706(C=O); ^1H NMR(丙酮- d_6 , δ ppm):9.05(s,1H,NH),8.02和7.53(2×d,J=8.6Hz,4H,芳香族),7.07(s,2H,马来酰亚胺),2.84(br s,1H,NH),1.45(s,9H,3× CH_3); ^{13}C NMR(丙酮- d_6 , δ ppm):169.3(2),166.0,155.7,135.1,134.6(2),131.6,127.9(2),125.9(2),79.6(2),27.5(3);ESI+HRMS:(M+Na) $^+$ 计算值 $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{NaO}_5=354.1060$;实测值=354.1072;(M-2-甲基丙烯+H) $^+$ 计算值 $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_5=276.0620$;实测值=276.0627。

[0259] 步骤D.4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-苯甲酸酰肼盐酸盐(或4-马来酰亚胺基苯甲酸酰肼盐酸盐) (5)的合成

[0260] 采用Heindel等报道的类似方法进行化合物4的水解,用盐酸裂解马来酰亚胺基乙酸(叔丁氧基羰基)酰肼,形成马来酰亚胺基乙酸酰肼盐酸盐。¹⁶向溶解在无水二氧六环(30mL)中的4(2.41g,7.27mmol)的溶液中加入盐酸溶液(60mL,1.0M的乙醚溶液,60mmol)。将混合物在室温下搅拌5小时。然后,加入150mL己烷以完成盐酸盐5的沉淀。沉淀的粗产物过滤,用己烷洗涤并用甲醇/异丙醇/己烷(8/3/10)的混合物重结晶两次,得到1.7g(46%)预期产物。IR(ν , cm^{-1}): 3200-2500 (CO_2H), 3269 (NH), 1702 ($\text{C}=\text{O}$), 1693 ($\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 8.06和7.52 (2 $\times$ d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H, 芳香族), 7.21 (s, 2H, 马来酰亚胺); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 170.0 (2), 165.6, 135.9, 135.4 (2), 129.6, 129.0 (2), 126.8 (2); ESI+HRMS: ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 计算值 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3=232.0717$; 实测值=232.0717; ESI+HRMS: ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 计算值 $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClN}_3\text{O}_3=268.0483$; 实测值=268.0483。

[0261] 步骤E.4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-苯甲酸酰肼三氟乙酸盐(6)的合成

[0262] 将溶解在三氟乙酸(0.5mL)中的4(106mg,0.32mmol)的溶液在0℃下搅拌30分钟。然后,在22℃下真空下除去过量的三氟乙酸,定量得到化合物6。IR(ν , cm^{-1}): 3500-2500 (CO_2H), 3277 (NH), 1710 ($\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 11.62 (br s, 1H, $\text{NHNH}_3^+\text{CF}_3\text{CO}_2^-$), 8.63 (br s, NH_3^+), 8.01和7.56 (2 $\times$ d, $J=8.5\text{Hz}$, 4H, 芳香族), 7.24 (s, 2H, 马来酰亚胺); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 169.6 (2), 165.4, 135.5, 135.0 (2), 129.4, 128.4 (2), 126.5 (2)。

[0263] 实施例2.N'-[3-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-4-氯-苯甲酰基]-胍甲酸叔丁酯(4a)的制备

[0264] 按照实施例1方法中的上述步骤A-C,使用3-氨基-4-氯苯甲酸作为起始材料代替4-氨基苯甲酸,高效地制备衍生物4a。

[0265] 步骤A.3-(顺式-3-羧基-丙烯酰基氨基)-4-氯苯甲酸(2a)的合成

[0266] 2a的光谱数据:IR(ν , cm^{-1}): 3500-2500 (CO_2H), 3310 (NH), 1696 ($\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 13.08 (s, 2H, 2 $\times$ CO_2H), 10.13 (s, 1H, NH), 8.37 (s, 1H, 芳香族), 7.72和7.61 (2 $\times$ d, 2H, $J=10.0\text{Hz}$, 芳香族), 6.59和6.34 (2 $\times$ d, 2H, $J=12.0\text{Hz}$, 马来酰亚胺); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 167.5, 166.7, 164.1, 135.0, 131.6, 131.2 (2), 130.4 (2), 127.2 (2)。

[0267] 步骤B.3-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-4-氯-苯甲酸(3)的合成

[0268] 3a的光谱数据:IR(ν , cm^{-1}): 3300-2500 (CO_2H), 3490 (胺), 1674 ($\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR (丙酮- d_6 , δ ppm): 8.1 (m, 2H, aromatic), 7.76 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$, 芳香族), 7.14 (s, 2H, 马来酰亚胺); ^{13}C NMR (丙酮- d_6 , δ ppm): 168.7 (2), 165.0, 143.0, 137.84, 134.9 (2), 132.3, 131.6, 130.6, 130.2。

[0269] 步骤C.N'-[3-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-4-氯-苯甲酰基]-胍甲酸叔丁酯(4a)的制备

[0270] 4a的光谱数据:IR(ν , cm^{-1}): 3494 (胺), 3090 ($\text{C}=\text{C}$), 2974 (脂肪族), 1717 ($\text{C}=\text{O}$)。 ^1H NMR (丙酮- d_6 , δ ppm): 9.71 (s, 1H, NH), 8.05 (dd, 1H, $J=8.2\text{Hz}$ 和 $J=1.8\text{Hz}$, 芳香族), 7.95 (d, 1H, $J=1.8\text{Hz}$, 芳香族), 7.75 (d, 1H, $J=8.6\text{Hz}$, 芳香族), 7.11 (s, 2H, 马来酰亚胺), 2.91 (s, 1H, NH), 1.43 (s, 9H, 3 $\times$ CH_3); ^{13}C NMR (丙酮- d_6 , δ ppm): 169.5 (2), 166.0, 156.5, 135.0 (2), 134.0 (2), 130.0, 130.7, 129.0 (2), 80.0, 28.1 (3)。

[0271] 实施例3.N'-[4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-2-氯-苯甲酰基]-胍甲酸叔丁酯(4b)的制备

[0272] 按照实施例1方法中的上述步骤A-C,使用4-氨基-2-氯苯甲酸作为起始材料代替4-氨基苯甲酸,高效地制备了衍生物4b。

[0273] 步骤A.4-(顺式-3-羧基-丙烯酰基氨基)-2-氯苯甲酸(2b)的合成

[0274] 2b的光谱数据:IR(ν , cm^{-1}): 3500-2500(CO_2H), 3262(NH), 1689($\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 13.8(s, 2H, $2\times\text{CO}_2\text{H}$), 10.7(s, 1H, NH), 7.85(m, 2H, 芳香族), 7.55(dd, 1H, $J=10.0\text{Hz}$ 和 $J=2.0\text{Hz}$, 芳香族), 6.45和6.31($2\times\text{d}$, 2H, $J=12.0\text{Hz}$, 马来酰亚胺); ^{13}C MNR($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 168.0, 166.0, 164.0, 143.0, 136.5, 135.0, 132.0, 131.5, 126.0, 121.5, 119.2。

[0275] 步骤B.3-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-4-氯苯甲酸(3b)的合成

[0276] 3b的光谱数据:IR(ν , cm^{-1}): 3300-2500(CO_2H), 3470(胺), 1723($\text{C}=\text{O}$)。 ^1H NMR(丙酮- d_6 , δ ppm): 7.90(d, 1H, $J=8.6\text{Hz}$, 芳香族), 7.67(d, 1H, $J=2.2\text{Hz}$, 芳香族), 7.50(dd, 1H, $J=8.3\text{Hz}$ 和 $J=2.0\text{Hz}$, 芳香族), 7.11(s, 2H, 马来酰亚胺); ^{13}C NMR(丙酮- d_6 , δ ppm): 168.0(2), 165.0, 138.0, 136.0(2), 135.0, 132.0, 128.0, 124.0, 118.0。

[0277] 步骤C.N'-[3-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-4-氯-苯甲酰基]-胍甲酸叔丁酯(4b)的制备

[0278] 4b的光谱数据:IR(ν , cm^{-1}): 3473(胺), 3090($\text{C}=\text{C}$), 2984(脂肪族), 1708($\text{C}=\text{O}$)。 ^1H NMR(丙酮- d_6 , δ ppm): 9.03(s, 1H, NH), 7.65(d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$, 芳香族), 7.59(d, 1H, $J=1.6\text{Hz}$, 芳香族), 7.45(dd, 1H, $J=8.2$ 和 $J=1.8\text{Hz}$, 芳香族), 7.08(s, 2H, 马来酰亚胺), 2.96(s, 1H, NH), 1.47(s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); ^{13}C NMR(丙酮- d_6 , δ ppm): 169.0(2), 166.0, 156.0, 135.0(2), 134.6, 133.0, 131.0, 127.9(2), 125.9, 80.0, 27.5(3)。

[0279] 实施例4.N'-[4-(2,5-二氧化-吡咯烷-1-基)-苯甲酰基]-胍甲酸叔丁酯(12)的制备

[0280] 将马来酰亚胺4(103mg, 0.31mmol)溶解在甲醇(1mL)中,向其加入5%Pd/C(14mg)。将一些氢气在30秒内鼓入上述混合物中。将该悬浮液在氢气气氛下剧烈搅拌3小时。值得注意的是,对于更大规模,需要更长的时间。然后,以己烷/丙酮(3/2)混合物作为洗脱液,将上述悬浮液在硅胶上过滤,得到87mg(84%)化合物12。IR(ν , cm^{-1}): 3400-3100(NH), 2981(CH), 1703($\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR(丙酮- d_6 , δ ppm): 9.54(br s, 1H, NH), 8.00和7.45($2\times\text{d}$, $J=8.6\text{Hz}$, 4H, 芳香族), 1.45(s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); ^{13}C MNR(丙酮- d_6 , δ ppm): 176.2(2), 165.9, 155.7, 136.1, 132.4, 127.8(2), 126.7(2), 79.6, 28.2, 27.5; ESI+HRMS: ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 计算值 $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5=334.1397$;实测值=334.1391; ESI+HRMS: ($\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_9$) $^+$ 计算值 $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_5=278.0771$;实测值=278.0769。

[0281] 实施例5.4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-苯甲酸N'-二乙酰胍(8, R=CH₃)的制备

[0282] 向溶解在二氯甲烷(10mL)中的粗品6(444mg, 1.28mmol)的溶液加入三乙胺(1.07mL, 780mg, 7.7mmol)和乙酸酐(0.61mL, 659mg, 6.4mmol)。将混合物在22℃下搅拌约30分钟。然后,将有机相用乙酸乙酯(75mL)直接稀释到萃取漏斗中。依次用5%的碳酸氢钠水溶液(50mL)、用10%的氯化钠水溶液(50mL)及最后用水(50mL)洗涤有机相。有机相用无水

硫酸镁干燥、过滤并蒸发得到粗材料(111mg)。用己烷/丙酮(7/3)混合物,经快速柱色谱法纯化产物,得到75mg(18%)的预期材料8(R=CH₃)。值得注意的是,不同的酸酐或烷酰氯可用于产生上述特定衍生物类似物。IR(ν , cm⁻¹): 3200(NH), 1702(C=O), 1662(C=O); ¹H NMR(丙酮-d₆, δ ppm): 10.15(br s, 1H, NH), 8.09和7.61(2×d, J=8.6Hz, 4H, 芳香族), 7.10(s, 2H, 马来酰亚胺), 2.41(s, 6H, 2×CH₃); ¹³C NMR(丙酮-d₆, δ ppm): 171.1(2), 169.3(2), 166.0, 135.8, 134.7(2), 130.8, 128.2(2), 126.1(2), 24.2(2)。ESI+HRMS: (M+H)⁺计算值C₁₅H₁₄N₃O₅=316.0928; 实测值=316.0945; ESI+HRMS: (M+H-Ac)⁺计算值C₁₃H₁₂N₃O₄=275.08252, 实测值=275.0856。

[0283] 实施例6.N-乙酰基-N'-[4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-苯甲酰基]-胍甲酸叔丁酯(10, R=CH₃)的制备

[0284] 向溶解在二氯甲烷(3mL)中的4(100mg, 0.30mmol)的溶液加入三乙胺(252 μ L, 183mg, 1.81mmol)和乙酸酐(71 μ L, 76.7mg, 0.75mmol)。将混合物在22℃下搅拌约30分钟。然后, 将有机相用乙酸乙酯(25mL)直接稀释到萃取漏斗中。依次用5%的碳酸氢钠水溶液(10mL)、用10%的氯化钠水溶液(10mL)及最后用水(20mL)洗涤有机相。有机相用无水硫酸镁干燥、过滤并蒸发得到粗材料(123mg)。用己烷/丙酮(4/1)混合物, 经快速柱色谱法纯化产物, 得到22mg(20%)的预期材料10(R=CH₃)。值得注意的是, 较长的反应时间(2小时)可使预期材料的产率更高。然而, 也存在一些二乙酰化产物(11)作为副产物。IR(ν , cm⁻¹): 3286(NH), 1753(C=O), 1711(C=O), 1652(C=O); ¹H NMR(CDCl₃, δ ppm): 8.28(br s, 1H, NH), 7.90和7.50(2×d, J=8.6Hz, 4H, 芳香族), 6.89(s, 2H, 马来酰亚胺), 2.61(s, 3H, CH₃), 1.51(s, 9H, 3×CH₃); ¹³C NMR(CDCl₃, δ ppm): 170.5, 168.9(2), 165.2, 151.0, 135.0, 134.4(2), 130.9, 128.3(2), 125.7(2), 84.8, 27.8(3), 25.5; ESI+HRMS: (M+Na)⁺计算值C₁₈H₁₉N₃NaO₆=396.1166; 实测值=396.1165; ESI+HRMS: (M+H-叔-Boc)⁺计算值C₁₃H₁₂N₃O₄=274.0822; 实测值=274.0824。

[0285] 实施例7.N,N'-二乙酰基-N'-[4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-苯甲酰基]-胍甲酸叔丁酯(11, R=CH₃)的制备

[0286] 向溶解在二氯甲烷(3mL)中的4(100mg, 0.30mmol)的溶液加入三乙胺(252 μ L, 183mg, 1.81mmol)和乙酰氯(54 μ L, 60mg, 0.75mmol)。将混合物在22℃下搅拌约2小时。然后, 将有机相用乙酸乙酯(25mL)直接稀释到萃取漏斗中。依次用5%的碳酸氢钠水溶液(10mL)、用10%的氯化钠水溶液(10mL)及最后用水(20mL)洗涤有机相。有机相用无水硫酸镁干燥、过滤并蒸发得到粗材料(118mg)。用己烷/丙酮(4/1)混合物, 经快速柱色谱法纯化产物, 得到100mg(80%)的预期材料11(R=CH₃)。IR(ν , cm⁻¹): 3193(NH), 1701(C=O), 1660(C=O); ¹H NMR(CDCl₃, δ ppm): 7.68和7.50(2×d, J=8.6Hz, 4H, 芳香族), 6.89(s, 2H, 马来酰亚胺), 2.49和2.48(2×s, 6H, 2×CH₃), 1.50(s, 9H, 3×CH₃); ¹³C NMR(CDCl₃, δ ppm): 170.2, 169.9(2), 168.8(2), 150.2, 134.6, 134.4(2), 132.9, 128.2(2), 125.0(2), 85.9, 27.8(3), 25.4, 24.6; ESI+HRMS: (M+Na)⁺计算值C₂₀H₂₁N₃NaO₇=438.1272; 实测值=438.1281; ESI+HRMS: (M+H-Ac-叔-Boc)⁺计算值C₁₃H₁₂N₃O₄=274.0822; 实测值=274.0833。

[0287] 实施例8.N'-{4-[3-(2-叔丁氧基羰基氨基乙基硫烷基)-2,5-二氧化-吡咯烷-1-基]-苯甲酰基}-胍甲酸叔丁酯(13)的制备

[0288] 向溶解在甲醇(3mL)中的4(115mg, 0.34mmol)的溶液加入2-(Boc-氨基)乙硫醇(70

μL , 73mg, 0.41mmol)。将混合物在22℃下搅拌2小时,并在50℃下搅拌1小时。将有机相用乙酸乙酯(30mL)直接稀释到萃取漏斗中,并依次用5%的碳酸氢钠水溶液($2 \times 10\text{mL}$)和用水($2 \times 20\text{mL}$)洗涤。有机相用无水硫酸镁干燥、过滤并蒸发得到粗材料(191mg)。用己烷/丙酮(3/2)混合物,经快速柱色谱法纯化产物,得到107mg (61%)的预期材料15。IR (ν , cm^{-1}): 3300 (NH), 1707 (C=O), 1680 (C=O); ^1H NMR (CDCl_3 , δ ppm): 8.80 (br s, 1H, NH), 7.86和7.34 ($2 \times \text{d}$, $J=8.2\text{Hz}$, 4H, 芳香族), 6.90 (br s, 1H, NH), 5.07 (br s, 1H, NH), 3.98 (1H, m, -CHS-), 2.6-3.6 (m , 6H, $3 \times -\text{CH}_2-$), 1.50和1.45 ($2 \times \text{s}$, 18H, $2 \times 3 \times \text{CH}_3$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , δ ppm): 175.4, 173.2, 165.8, 155.9 (2), 134.8, 131.7, 128.2 (2), 126.4 (2), 82.1, 79.7, 39.4, 38.9, 36.1, 32.7, 28.4 (3), 28.2 (3); ESI+HRMS: ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 计算值 $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{NaO}_7\text{S}=531.1884$;实测值=531.1881。

[0289] 实施例9. 通用结构13的衍生物的总体制备方法(见图式3)

[0290] 按照Taha等人¹²描述的方法,在酸性条件下在丁醇(或其它溶剂)中回流,可以将化合物5用相关的醛(烷基醛(直链或支链)、苯甲醛或取代的苯甲醛)处理,得到预期烷基脎或苯甲酰脎衍生物。

[0291] 实施例10. 衍生物14、15或16的总体制备方法(见图式4)

[0292] 衍生物4(或本公开所述的任何其他马来酰亚胺)可以与适当的二烯(丁二烯(未取代的或取代的)、环戊二烯、环己二烯、环庚二烯、呋喃、噻吩、吡咯、N-烷基吡咯)反应,得到预期环加成物(Diels-Alder产物),如14、15和16。该反应可以在加压或不加压下,通过加热纯的试剂(二烯和亲二烯体)或试剂溶液进行。

[0293] 实施例11. 用R=4-羟基-3-甲氧基苯制备脎13的具体方法(见图式3)

[0294] 如实施例1步骤E中所述,使用以下量制备中间体4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-吡咯-1-基)-苯甲酸酰肼三氟乙酸盐(6): 衍生物4(100mg, 0.303mmol)、三氟乙酸250 μL 、二氯甲烷(1mL)。将中间体6溶解在二氯甲烷(2mL)中,并用4-羟基-3-甲氧基苯甲醛(香草醛, 46.1mg, 0.303mmol)和碳酸氢钠(25.4mg, 0.303mmol)处理。使用二氯甲烷(2-3mL)溶解粘附在反应容器壁上的醛。将反应在室温下搅拌12小时。然后,将上述反应混合物转移到含有乙酸乙酯(50mL)的分液漏斗中。将有机相用3%的碳酸氢钠水溶液($2 \times 20\text{mL}$)和水($3 \times 15\text{mL}$)洗涤两次。有机相用无水硫酸镁干燥、过滤并蒸发得到粗脎13, R=4-羟基-3-甲氧基苯(79mg, 71%)。通过薄层色谱法纯化产物。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 11.71 (br s, 1H, NH), 9.54 (br s, 1H, OH), 8.32 (br s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}-$), 7.97和7.49 ($2 \times \text{d}$, $J=8.2\text{Hz}$, 4H, 芳香族), 7.32 (br s, 1H, 芳香族), 7.21 (s, 2H, 马来酰亚胺), 7.09 (br d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H, 芳香族), 6.83 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H, 芳香族), 3.82 (s, 3H, OCH_3)。

[0295] 使用异香草醛代替香草醛,得到R=4-甲氧基-3-羟基苯的脎13: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 11.71 (br s, 1H, NH), 9.30 (br s, 1H, OH), 8.29 (br s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}-$), 7.98 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H, 芳香族), 7.49 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H, 芳香族), 7.27 (d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H, 芳香族), 7.22 (s, 2H, 马来酰亚胺), 7.04 (dd, $J=1.6$ 和 8.2Hz , 1H, 芳香族), 6.96 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H, 芳香族), 3.80 (s, 3H, OCH_3)。

[0296] 材料与方法-生物学

[0297] 体外研究(衍生物4、5、8、10、11和12等)

[0298] 细胞培养-通用: 生物试验采用人单核细胞系THP1, 鼠巨噬细胞样细胞系J774A.1

和RAW 264.7以及鼠UBC细胞系MB49和MB49-I进行。将细胞维持在补充有10%的热灭活的胎牛血清(FBS)并含有1mM的丙酮酸钠、10mM的4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)和50 μ g/mL的庆大霉素的RPMI培养基(称为10%FBSRPMI-1640)中。将上述细胞维持在37℃和含有5%CO₂的水分饱和的气氛中。

[0299] THP1细胞、RAW 264.7细胞和J774A.1细胞是用于研究单核细胞和巨噬细胞响应于各种炎症介质的功能和分化的最广泛使用的细胞系。^{17,18}未分化的THP1细胞类似于从健康供体或具有炎症疾病(例如糖尿病和动脉粥样硬化)的供体分离的原代单核细胞/巨噬细胞。¹⁹用佛波醇处理后,THP1细胞分化成巨噬细胞样细胞,其在几个方面模拟天然单核源巨噬细胞。²⁰如前所述,将表达绿色荧光蛋白(GFP)-THP1细胞在50nM佛波醇12-豆蔻酸酯13-乙酯中培养18小时,以诱导单核细胞向巨噬细胞的分化。²¹⁻²³细胞系RAW 264.7和J774A.1由Tatiana Scorza博士(加拿大蒙特利尔魁北克大学)友情提供。这些细胞系是巨噬细胞样细胞模型,其在响应于IFN γ 、TNF α 、细菌感染和细菌产物如脂多糖(LPS)时产生大量NO。¹⁷细胞系MB49-I是一种高浸润性和致瘤性UBC细胞模型,其由MB49原发性肿瘤的连接体内传代发展而来。²⁴

[0300] 细胞信号传导研究:用载剂(DMSO)、化合物4和化合物5以10 μ M、25 μ M或50 μ M的浓度对THP1源人巨噬细胞(750 $\times$ 10³细胞/mL)和MB49-I细胞(500 $\times$ 10³细胞/mL)预处理30分钟;然后立即(t=0分钟)或用50U/mL的IFN γ 、25ng/mL的IL6或10ng/mL的TNF α 活化30分钟后洗涤和回收。制备细胞溶解物,并通过如上所述的免疫印迹法进行分析。^{21-23,25}简言之,蛋白质样品在还原条件下通过SDS-PAGE分解并转移到PVDF膜上。首先用兔多克隆抗体针对磷酸-STAT1(pSTAT1)、pSTAT3或p-I κ B(均为1:2000)在4℃下过夜探测印迹。然后将印迹与HRP-缀合的山羊抗兔IgG Ab(1:3000)一起在室温下孵育1小时。将相同的印迹剥离,然后用抗STAT1或抗STAT3抗体(均为1:1000)探测。在两种情况下,均使用增强化学发光检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific)使探测的分子可视化。

[0301] 荧光素酶试验。为了评估响应于TNF α 的NF κ B的转录活性,用表达载体(其在CMV启动子和NF κ B转录响应元件的串联重复序列的控制下,允许萤火虫荧光素酶报告基因的转录)瞬时转染采用单层(在24孔板中,7.5 $\times$ 10⁴个细胞/孔)培养的MB49-I细胞。荧光素酶基因编码61-kDa酶,其在ATP、氧和Mg²⁺存在下氧化D-荧光素,产生可通过测量释放的光而量化的荧光产物。使用Opti-MEM减血清培养基和Lipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)进行转染。然后,用载剂(DMSO)和化合物4(10 μ M或30 μ M)对MB49-I细胞预处理30分钟;然后在用10ng/mL或50ng/mL的TNF α 活化的24小时后洗涤并回收。将细胞溶解物与荧光素酶检测试剂(荧光素、辅酶A、ATP和Mg²⁺的混合物)混合,并使用发光计测量产生的光。

[0302] 表面抗原表达分析。为了研究膜受体表达,将THP1源人巨噬细胞(750 $\times$ 10⁴个细胞/mL)用DMSO或化合物4和化合物5预处理3小时,然后不处理(对照)或用50U/mL的IFN γ 处理48小时。MHC-II和CD40的表达水平通过如文献所述²¹⁻²³的流式细胞术评估。

[0303] 运动性分析。如文献所述²⁶,进行体外划痕伤口愈合试验以研究化合物4和化合物5在IL6诱导的巨噬细胞迁移中的作用。简言之,将THP1源人巨噬细胞(750 $\times$ 10³个细胞/mL)接种到24-孔组织培养板中,以单层形式达到~70-80%的汇合。用p200移液管尖端,将细胞单层在一个方向上沿直线刮擦以产生“划痕”。为了在图像采集期间获得相同的场,垂直于第一划痕划出另一条直线,在每个孔中产生十字。除去细胞碎片,用1mL的Hank's缓冲液洗

涤细胞一次,使划痕边缘平滑。用载剂(DMSO)或化合物4(10 μ M)和化合物5(25 μ M)预处理细胞单层3小时,然后不处理(对照)或用25ng/mL的IL6处理48小时。以十字作为参考点,将上述板置于倒置荧光显微镜下,并在t=0h和t=48h获取划痕图像。使用基于Java的图像处理程序ImageJ(National Institutes of Health)确定运动细胞的数量,且相对细胞运动性表示为,在t=48h时运动细胞相对于初始伤口(在t=0h)内的运动细胞的对照百分比(%)。

[0304] 微浸润试验。在改良的Boyden室(HTS Transwell System)中通过人工基底膜评估人UBC T24细胞迁移率,从而测量浸润。简而言之,上述膜由具有0.4 μ m孔径的聚碳酸酯过滤器组成,并在冰上用在无血清培养基中1:2(v/v)稀释的基质胶(BD Biosciences)涂覆。将T24细胞(50×10^3 个细胞)接种到室上方的孔中的基质胶涂层中,同时将极化的M1巨噬细胞(50×10^3 个细胞)接种在下方的孔中。0.4 μ m孔径的聚碳酸酯过滤器太小而不能使细胞移动到下方的孔的底部。因此,去除进入基质胶涂层的非浸润细胞,并且在48小时孵育期后用Hoescht 33258染料染色向下迁移到聚碳酸酯滤器的细胞,通过荧光显微镜观察并计数。

[0305] 基于3D球体的肿瘤浸润试验的细胞分析。按照制造商的说明书(Corning)进行细胞制备和球状体形成。简言之,收集MDA-MB-231细胞并在补充有10%血清的(完全)培养基中稀释至 5×10^4 个细胞/mL的浓度。然后,将100 μ L细胞悬浮液移液到合适的96孔球状体形成板中,并置于37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下。每24小时监测球状体的形成。典型的细胞聚集期为48小时。在球状体形成完成后,从每个孔中取出70 μ L完全培养基,并用70 μ L无血清培养基替换。每天重复这一过程以产生48小时的血清饥饿期。然后将基质胶基质(100 μ L)加入每个孔中。将板在摇摆斗式离心机中以300 $\times$ g离心5分钟。然后,将板转移至37 $^{\circ}$ C/5%CO₂的孵育器中1小时,以引发凝胶形成。在1小时凝胶形成孵育期后,在60分钟内将DMSO或化合物4加入适当的孔中。预处理后,除去培养基并用完全培养基替换,然后每天更换培养基,持续4天。用第0天和第4天的明场图像测量远离肿瘤延伸并进入细胞外基质的浸润性突起(invadopodia)。这些突起的作用是分解基质胶基质,从而有助于浸润过程。识别这些突起,并使用ImageJ软件(National Institutes of Health)适当地量化它们的面积和周长。

[0306] 用化学方法评价NO和尿素的产生。使MB49-I细胞和J774A.1细胞(25×10^3 个细胞/孔)生长,并如文中所述的用各种抗炎衍生物、前体和单功能衍生物预处理3小时。然后,用10%FBS RPMI-1640洗涤上述细胞两次,然后用细胞因子INF γ 和TNF α 活化产生NO 24小时。使用如前所述的Griess试剂法测量NO产生。²⁷该方法涉及检测在生理条件下由NO的自发氧化形成的亚硝酸根离子(NO₂⁻)。根据制造步骤(Life Technologies;#G-7921),将等体积的磺胺酸和N-(1-萘基)乙二胺混合在一起,形成Griess试剂。在NO₂⁻存在的情况下,将磺胺酸转化为重氮盐,其再与N-(1-萘基)乙二胺偶联以产生粉红色,其用分光光度计(Biotek, synergy Ht)在548nm下检测。以相同的方式,使用市售试剂盒测量通过精氨酸酶-1活性的尿素合成。

[0307] 通过MTT试验评估细胞增殖。为了评估抗增殖活性,如前所述地^{21-23,25,28},进行细胞活性/增殖MTT试验。简言之,将MB49-I细胞(5×10^3 个细胞/孔)接种在96-孔板中的100 μ L的10%FBS RPMI-1640中,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂培养24小时。用载剂(DMSO)或0 μ M、10 μ M、25 μ M、37.5 μ M和50 μ M的衍生物1和衍生物1A预处理细胞3小时,然后在不存在或存在INF γ 和TNF α 的情况下孵育24小时。在培养期结束时,向每个孔中加入10 μ L的5mg/mL甲基噻唑基二苯基-溴化四唑(MTT)溶液。在用MTT试剂孵育3小时后,加入100 μ L的MTT溶解缓冲液(10%SDS的

10mM HCl), 并将板在细胞孵育器中放置过夜, 然后进行吸光度测量。使用Microplate Reader Manager (来自Bio-Rad Laboratories) 在580nm下读取光密度。

[0308] 统计分析。对于所有生物实验, 数据以来自三个独立试验的平均值 $\pm$ SD来表示。通过单因素ANOVA分析数据, 然后使用Prism软件3.03版 (GraphPad, San Diego, CA) 进行Bonferonni后检验。 p 值 ≤ 0.05 被认为表示统计学显著性。

[0309] 体内试验 (衍生物4和8)

[0310] 异位UBC模型。将每只重15-18g的雄性C57BL/6J小鼠 (6-8周龄) 用于实验 (由Charles River提供)。在12:12小时的光照: 黑暗循环中, 饲养小鼠并可自由获取食物和水, 室温保持在21 $^{\circ}$ C。将MB49细胞、MB49-I细胞和iNOS缺失型MB49-I细胞 (5×10^4 , 在100 μ L的PBS中) 皮下 (s.c.) 注射到小鼠的右侧腹中。监测皮下肿瘤的增长速率。每3天使用数字卡尺测定肿瘤大小, 持续24-28天, 并使用IVIS成像系统在第15天和第25天测量荧光素发光。肿瘤长度和宽度由盲法观察者测量。肿瘤的体积由下式计算: 长度 $\times$ 宽度 2×0.52 , 其中长度和宽度是用卡尺在相互垂直的方向上测量的肿瘤直径。在约10mm³的肿瘤大小下, 将小鼠分成不同的组。对照组接受PBS治疗。如文中所指出的, 以不同剂量 (90 μ M、150 μ M或300 μ M) 治疗其他组, 每3-4天腹腔内 (i.p.) 注射化合物4或化合物8, 持续18-20天。^{24, 27}

[0311] 原位UBC模型。将每只体重15-18g的雌性C57BL/6J小鼠 (6-8周龄) 麻醉, 并通过尿道将24-规格的Teflon导管引入膀胱腔。为了准备用于肿瘤植入的膀胱, 通过电烙术在膀胱壁中诱导点病变。然后, 将100 μ L的PBS中的 1×10^5 个MB49-I细胞滴注到膀胱中。当需要时, 给对照小鼠进行电烙术并将PBS滴入膀胱中。将含有细胞悬浮液的注射器保持在导管中20分钟, 以使细胞附着到膀胱壁上。^{24, 27}

[0312] 统计分析。使用Prism软件3.03版 (GraphPad, San Diego, CA), 进行Mann-Whitney测试, 用以比较肿瘤生长。 p 值 ≤ 0.05 被认为表示统计学显著性。

[0313] 体外和体内实验的结果在图1至25中呈现。

[0314] 参考文献

[0315] 1. LaFond, R. In Cancer: The outlaw cell, 3rd Ed., ACS publication, Washington, DC, 384 pages (2012)

[0316] 2. Alderton GK. The tumor microenvironment drives metastasis, Nat. Rev. Cancer 16, 199 (2016)

[0317] 3. Steeg PS. Targeting metastasis, Nat. Rev. Cancer 16, 201-218 (2016)

[0318] 4. Baumann M, Krause M, Overgaard J, Debus J, Bentzen SM, Daartz J, Richter C, Zips D, Bortfeld T. Radiation oncology in the era of precision medicine, Nat. Rev. Cancer 16, 234-249 (2016)

[0319] 5. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment, Nat. Rev. Cancer 12, 237-251 (2012)

[0320] 6. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. Nat. Rev. Cancer 12, 278-287 (2012)

[0321] 7. Phillips AP, Mentha JW. US Patent 3,046,301 (October 29, 1959); Deglin JH, Vallerand AH. In Guide des médicaments, ERPI, pp. 424-427 (1995)

[0322] 8. Remers, WA. Antineoplastic agents, In Wilson and Gisvold's Textbook of

organic Medicinal and pharmaceutical chemistry, 9th Ed., Delgado JN, Remers, WA. J. B. Eds, Lippincott, New York, Chapter 8, 321-322 (1989)

[0323] 9. Lau A, Berube G, Ford CHJ. Conjugation of doxorubicin to monoclonal anti-carcinoembryonic antigen antibody via novel thiol-directed cross-linking reagents, *Bioorg. Med. Chem.*, 3, 1299-1304 (1995)

[0324] 10. Lau A, Berube G, Ford CHJ, Gallant M. Novel doxorubicin-monoclonal anti-carcinoembryonic antigen antibody immunoconjugate activity in vitro, *Bioorg. Med. Chem.*, 3, 1305-1312 (1995)

[0325] 11. Hamelin-Morrisette J, Cloutier S, Girouard J, Belgorosky D, Eiján A-M, Legault J, Reyes-Moreno C, and Bérubé G. Identification of an anti-inflammatory derivative with anti-cancer potential: The impact of each of its structural components on inflammatory responses in macrophages and bladder cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.*, 96, 259-269 (2015)

[0326] 12. Taha M, Ismail NH, Lalani S, Fatmi MQ, Atia-tul-Wahab, Siddiqui S, Khan KM, Imran S, Choudhary MI. Synthesis of novel inhibitors of α -glucosidase based on the benzothiazole skeleton containing benzohydrazide moiety and their molecular docking studies, *Eur. J. Med. Chem.*, 92, 387-400 (2015)

[0327] 13. Perrin DD, Armarego CF. In Purification of Laboratory Chemicals, 3rd Ed., Pergamon Press, Oxford, New York (1988)

[0328] 14. Still WC, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.*, 43, 2923-2925 (1978)

[0329] 15. Willner D, Trail PA, Hofstead SJ, King HD, Lasch SJ, Braslawsky GR, Greenfield RS, Kaneko T, Firestone RA. (6-Maleimidocaproyl) hydrazone of doxorubicin. A new derivative for the preparation of immunoconjugates of doxorubicin, *Bioconjug. Chem.*, 4, 521-527 (1993)

[0330] 16. Heindel ND, Zhao HR, Egolf RA, Chang CH, Schray KJ, Emrich JG, McLaughlin JP, Woo DV, A novel heterobifunctional linker for formyl to thiol coupling, *Bioconjug. Chem.*, 2, 427-430 (1991)

[0331] 17. Lemaire S, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. Study of macrophage functions in murine J774 cells and human activated THP-1 cells exposed to oritavancin, a lipoglycopeptide with high cellular accumulation, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58, 2059-2066 (2014)

[0332] 18. Auwerx J, The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation, *Experientia*, 47, 22-31 (1991)

[0333] 19. Qin Z, The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature, *Atherosclerosis*, 221, 2-11 (2012)

- [0334] 20.Daigneault M,Preston JA,Marriott HM,Whyte MK,Dockrell DH.The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages,PloS one,5,0008668 (2010)
- [0335] 21.Dufresne M,Dumas G,Asselin E,Carrier C,Pouliot M,Reyes-Moreno C, Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells,Mol.Immunol.,48,1556-1567 (2011)
- [0336] 22.Dumas G,Dufresne M,Asselin E,Girouard J,Carrier C,Reyes-Moreno C.CD40 pathway activation reveals dual function for macrophages in human endometrial cancer cell survival and invasion,Cancer Immunol.Immunother.,62, 273-283, (2013)
- [0337] 23.Dallagi A,Girouard J,Hamelin-Morrisette J,Dadzie R,Laurent L, Vaillancourt C,Lafond J,Carrier C,Reyes-Moreno C.The activating effect of IFN-gamma on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10axis via Statlinhibition and Stat3activation,Cell.Mol.Immunol.,12,326-341 (2015)
- [0338] 24.Fabris VT,Lodillinsky C,Pampena MB,Belgorosky D,Lanari C,Eijan AM.Cytogenetic characterization of the murine bladder cancer model MB49and the derived invasive line MB49-I,Cancer Genet.,205,168-176 (2012)
- [0339] 25.Leduc,Bourassa V,Asselin E,Leclerc P,Lafond,Reyes-Moreno C.Leukemia Inhibitory Factor Regulates Differentiation of Trophoblast-Like BeWo Cells Through the Activation of JAK/STAT and MAPK3/1MAP Kinase-Signaling Pathways,Biol.Reprod.,86,54,1-10 (2012)
- [0340] 26.Menon MB,Ronkina N,Schwermann J,Kotlyarov A,Gaestel M.Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3in fibroblast migration,Cell.Motil.Cytoskeleton,66, 1041-1047 (2009)
- [0341] 27.Belgorosky D,Langle Y,Prack Mc Cormick B,Colombo L,Sandes E,Eijan A.M.Inhibition of nitric oxide is a good therapeutic target for bladder tumors that express iNOS,Nitric Oxide,36,11-18 (2014)
- [0342] 28.Carmichael J,Degraff WG,Gazdar AF,Minna JD,Mitchell JD.Evaluation of a tetrazolium-based semiautmated colorimetric assay:Assessment of radiosensitivity.Cancer Res.,47,943-946 (1987)
- [0343] 已经针对具体的实例描述了本公开。本说明书旨在帮助理解本公开,而非限制其范围。对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离如本文所揭示的本公开范围的情况下,可对本公开做出各种修改,并且这些修改旨在由本文涵盖。

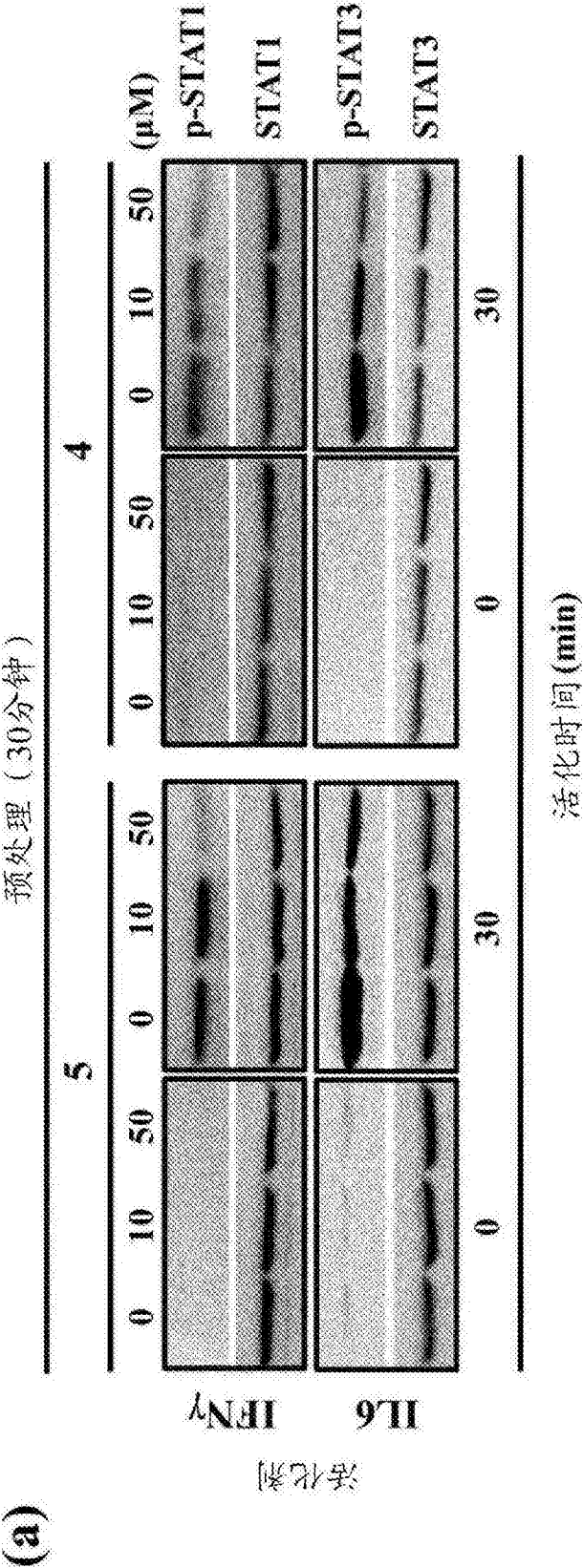


图1

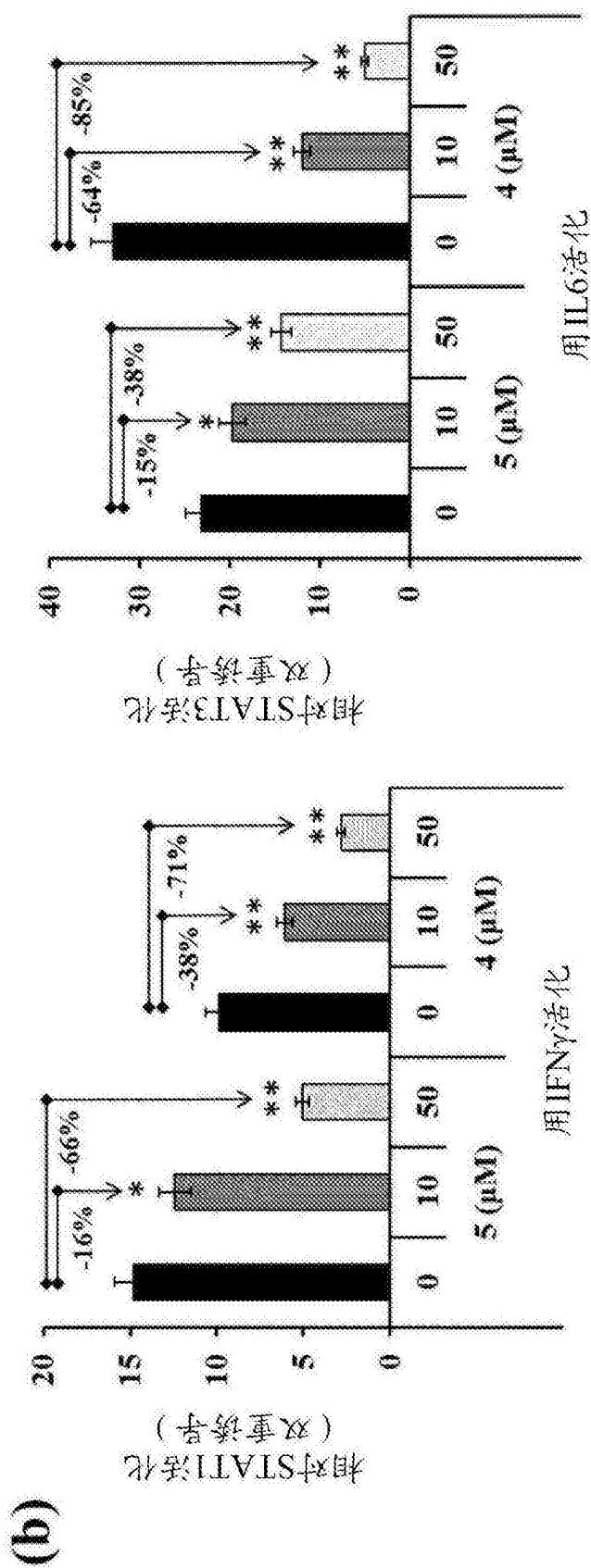


图1(续)

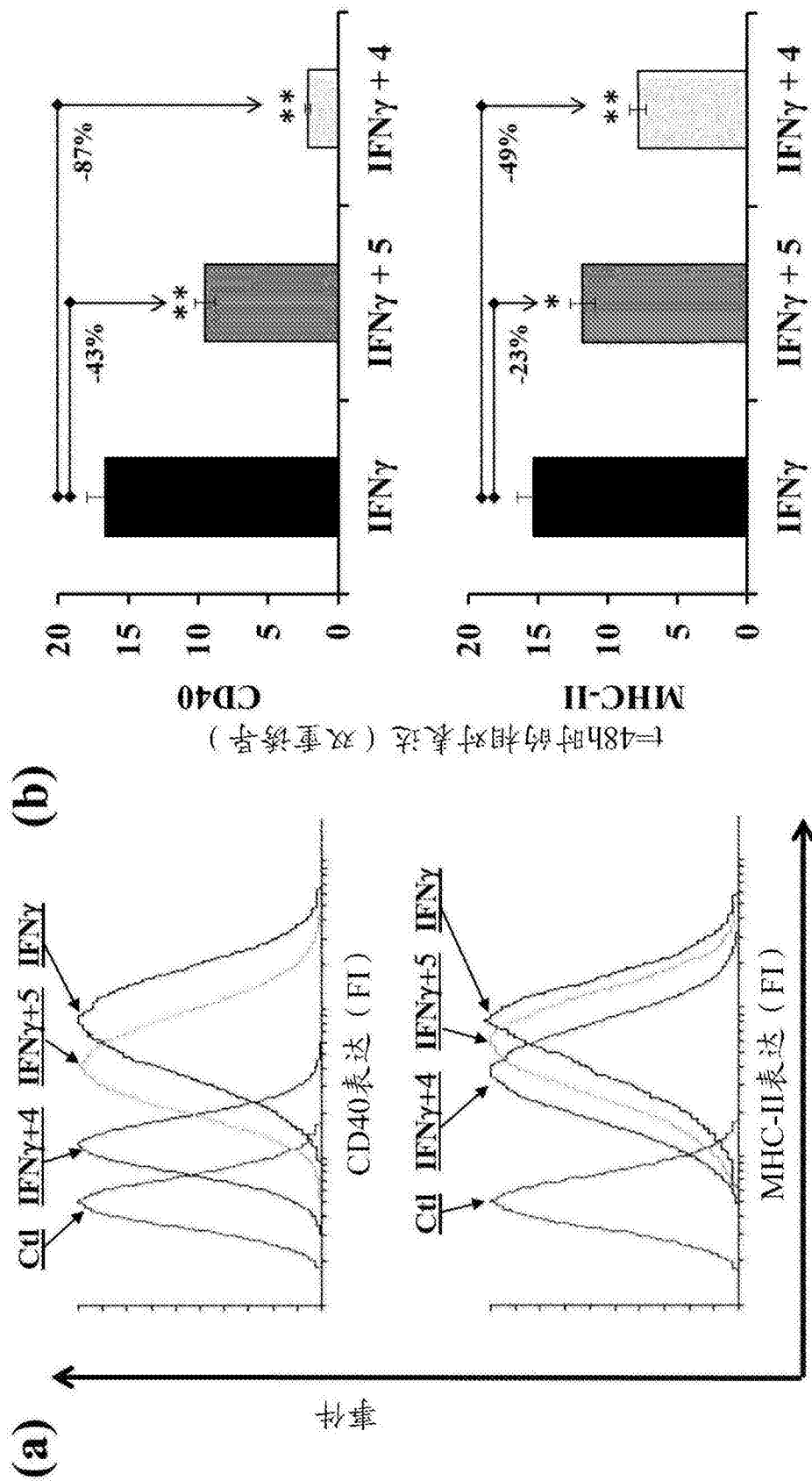


图2

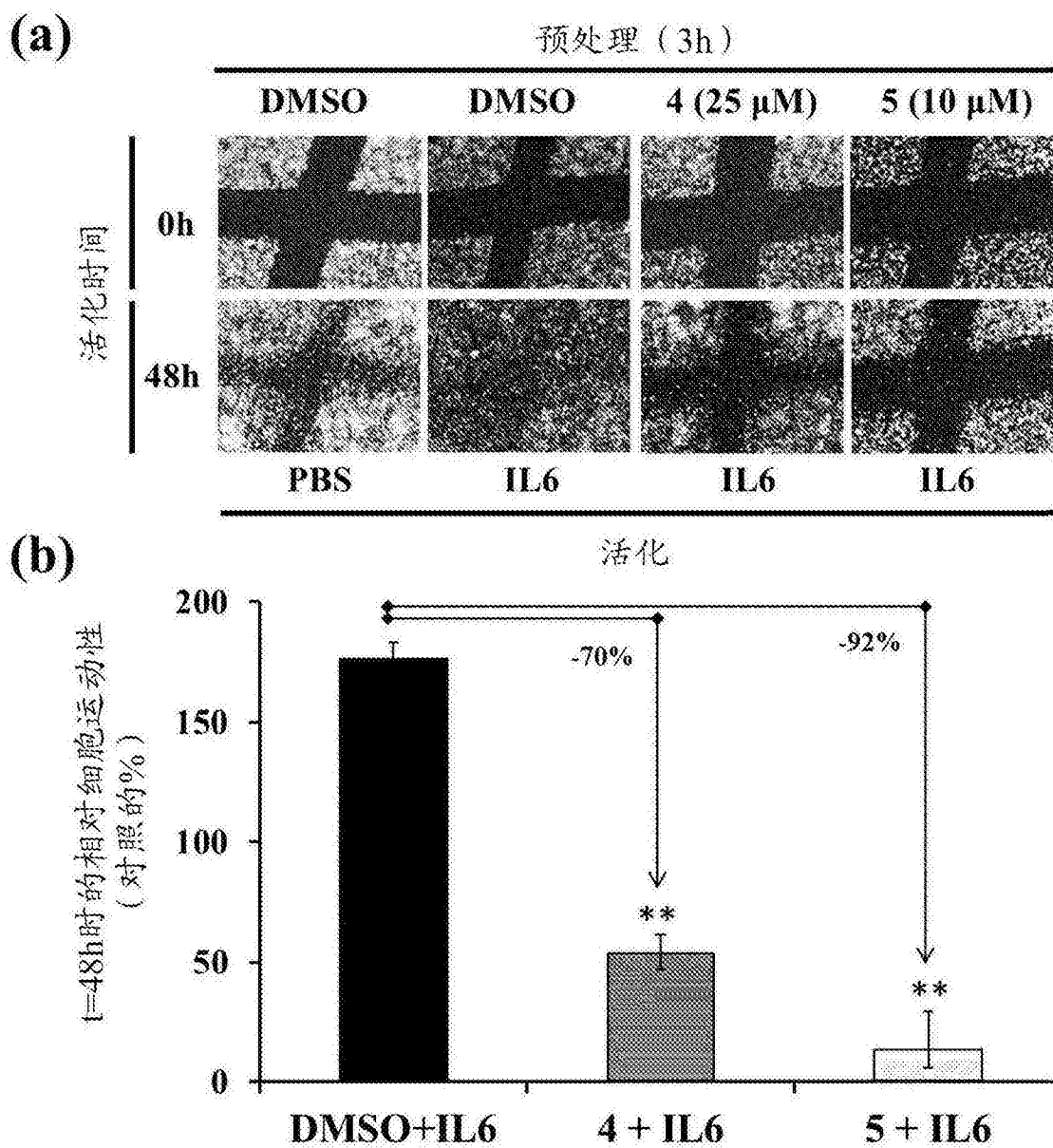


图3

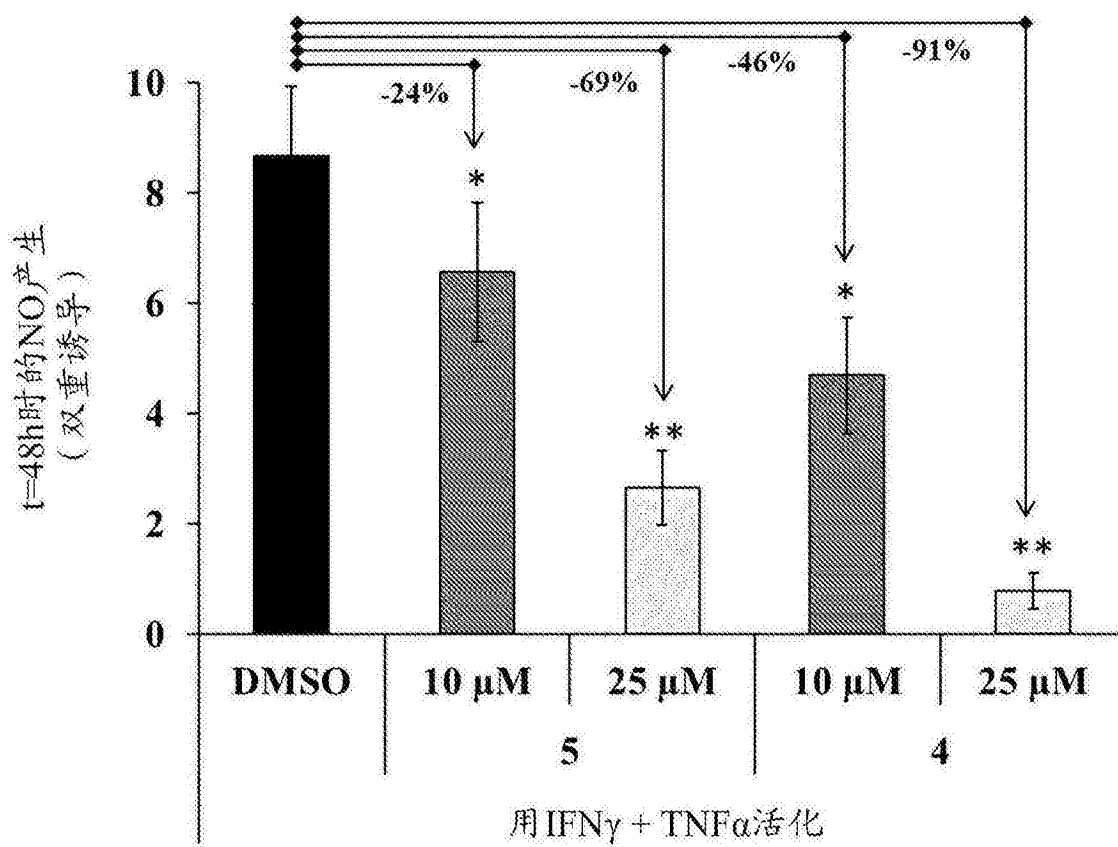


图4

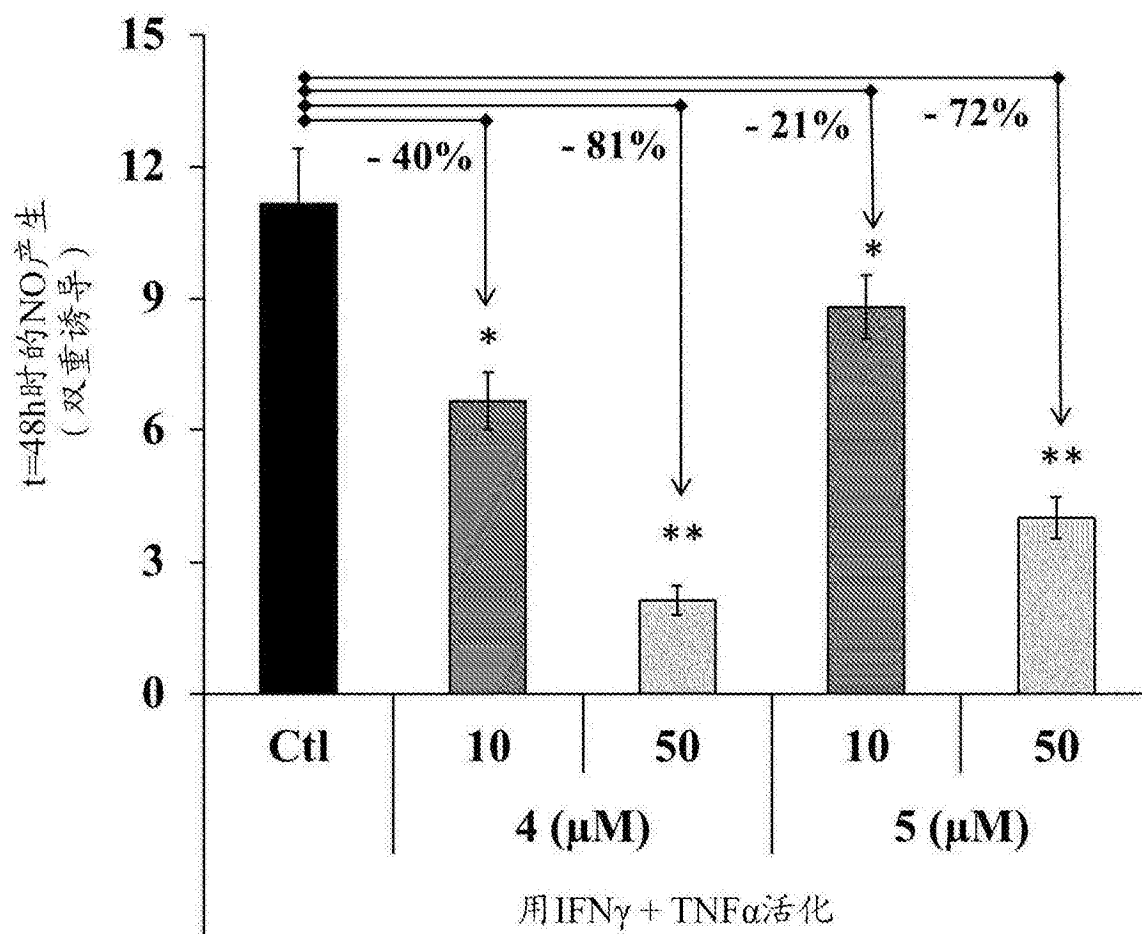


图5

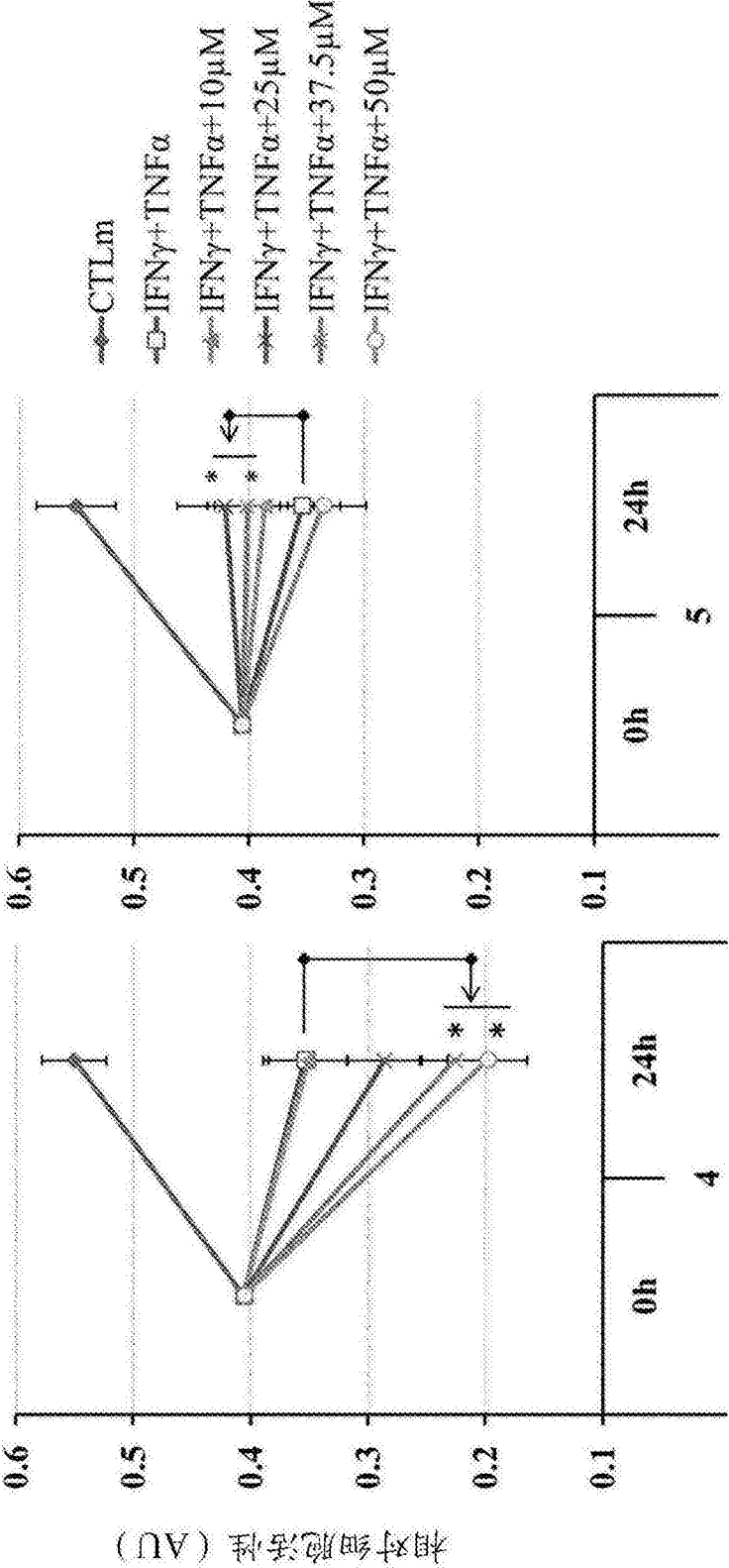


图6

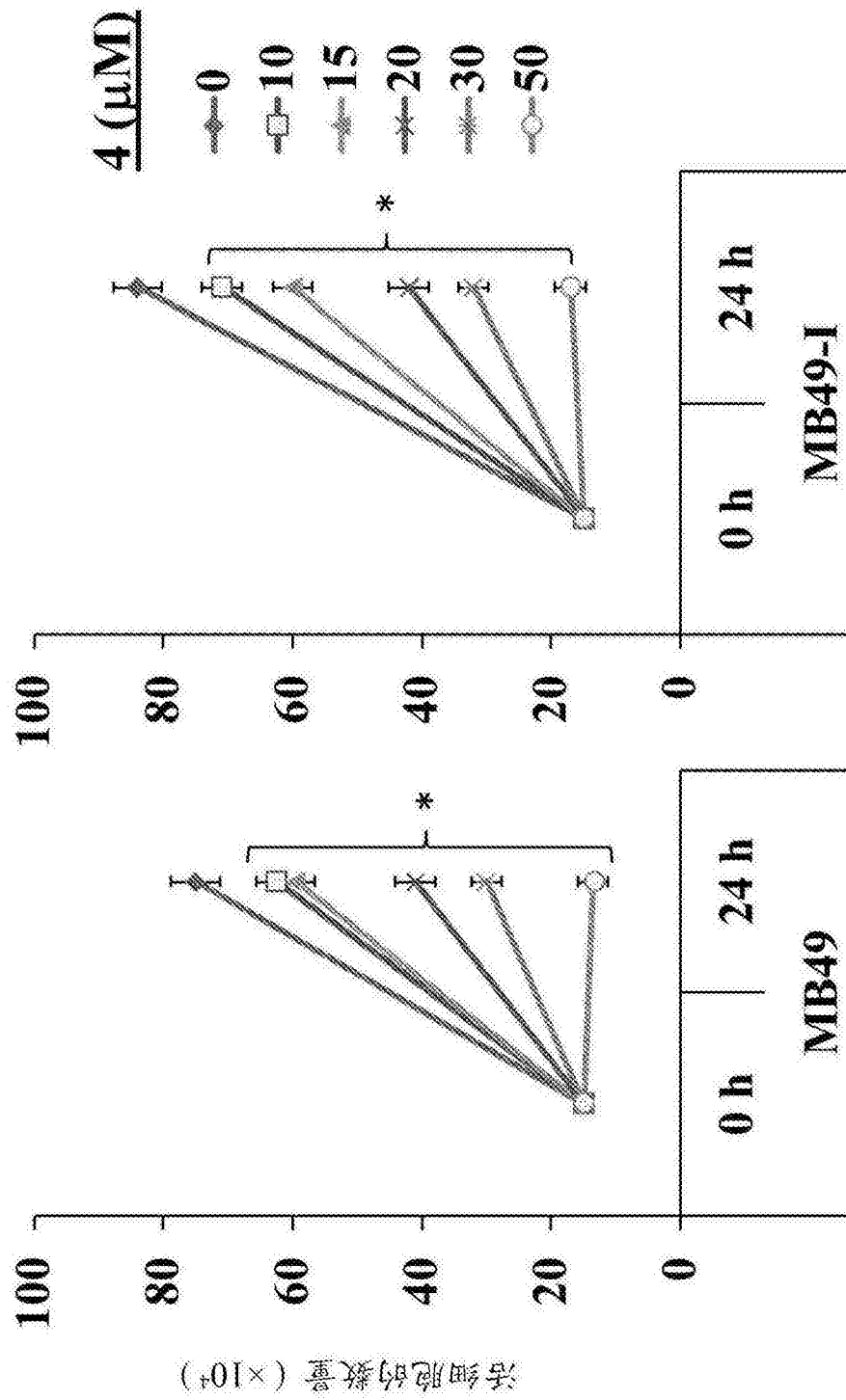


图7

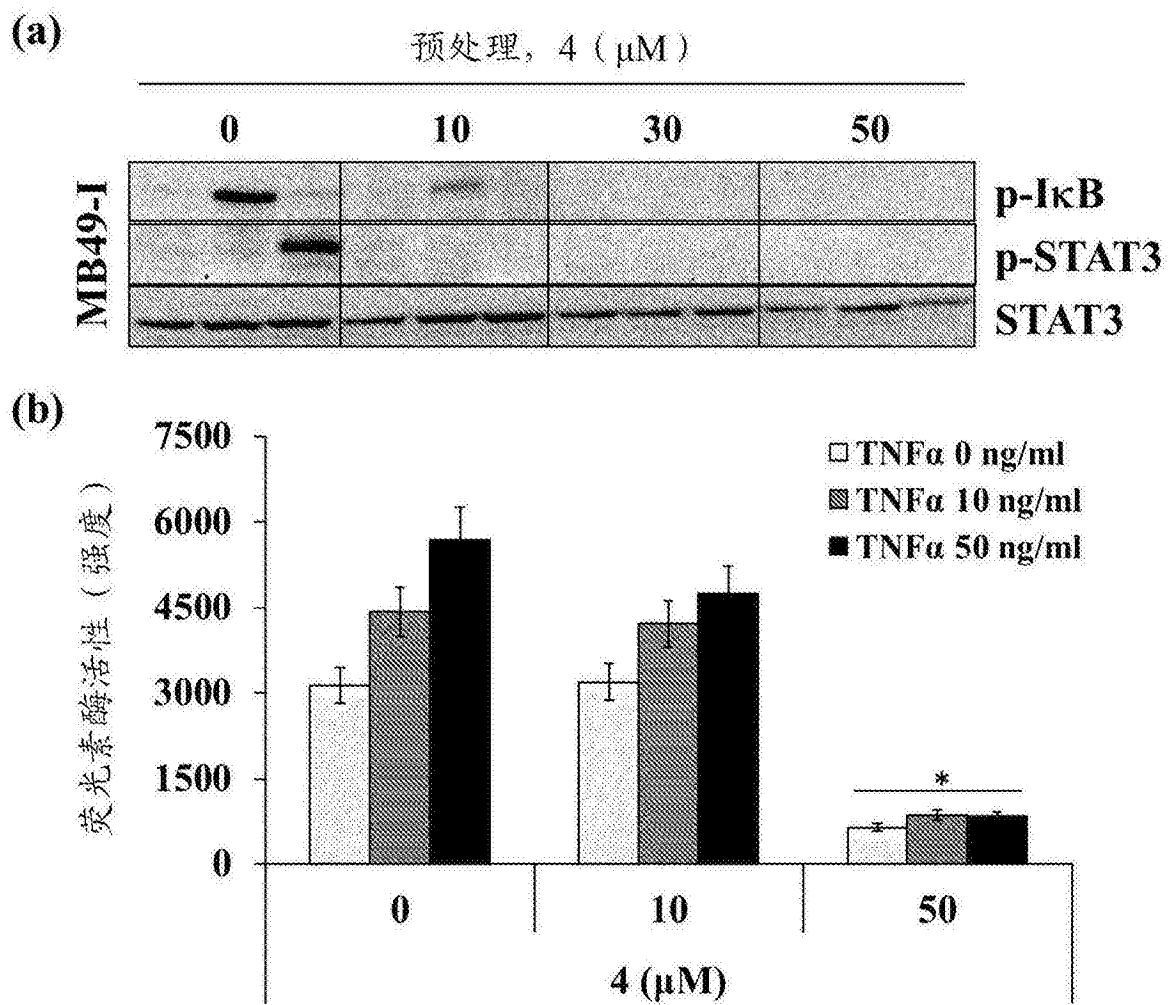


图8

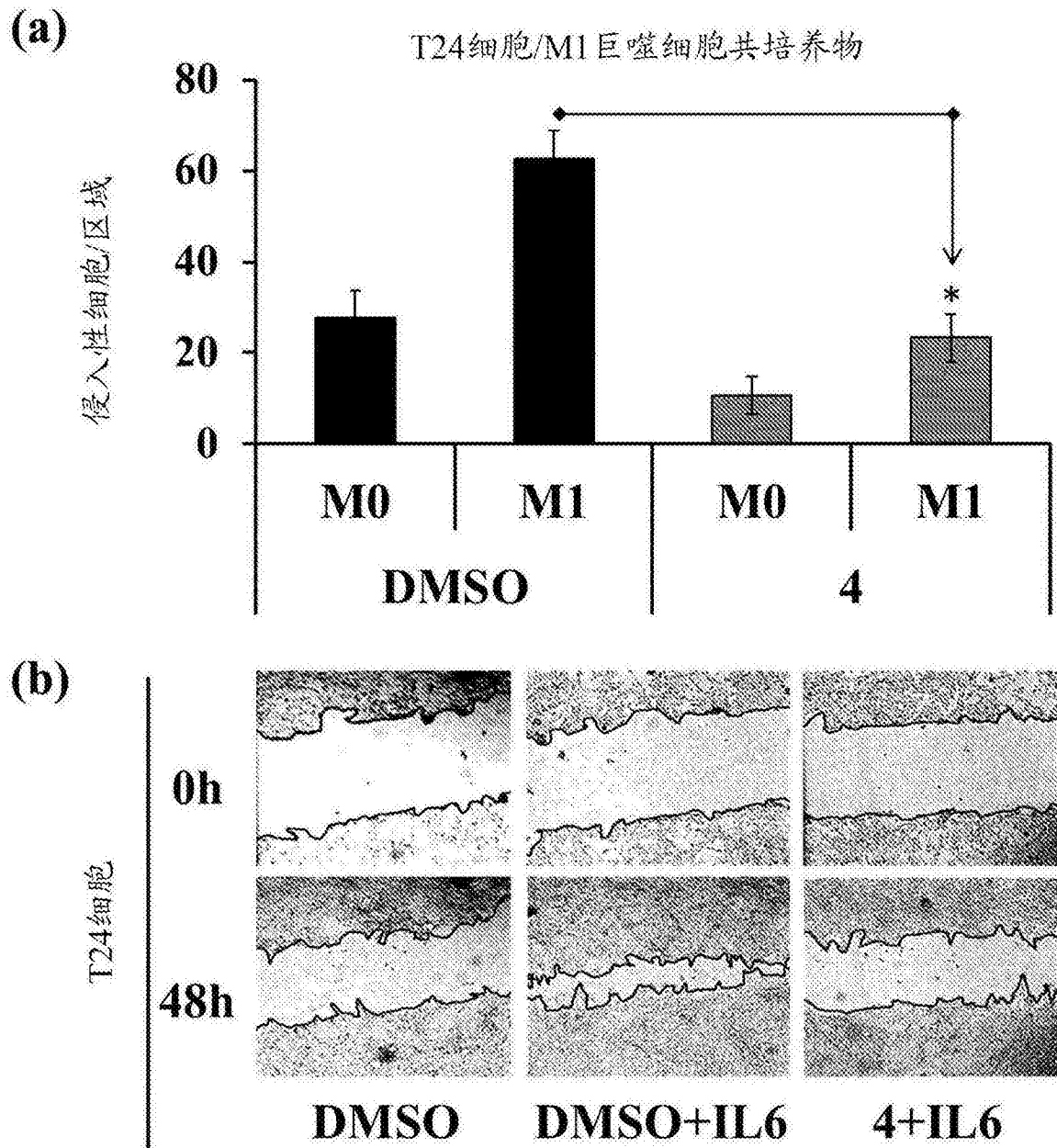


图9

MDA-MB-241 (乳腺癌细胞)

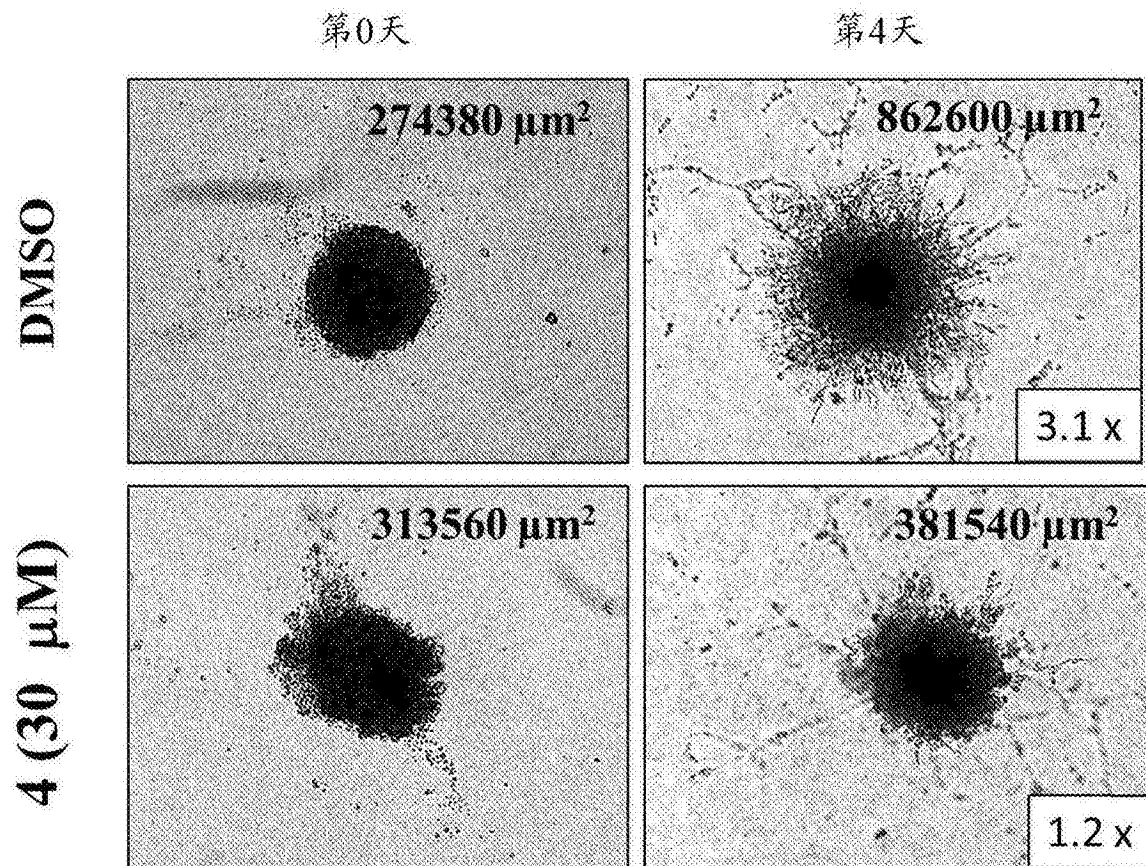


图10

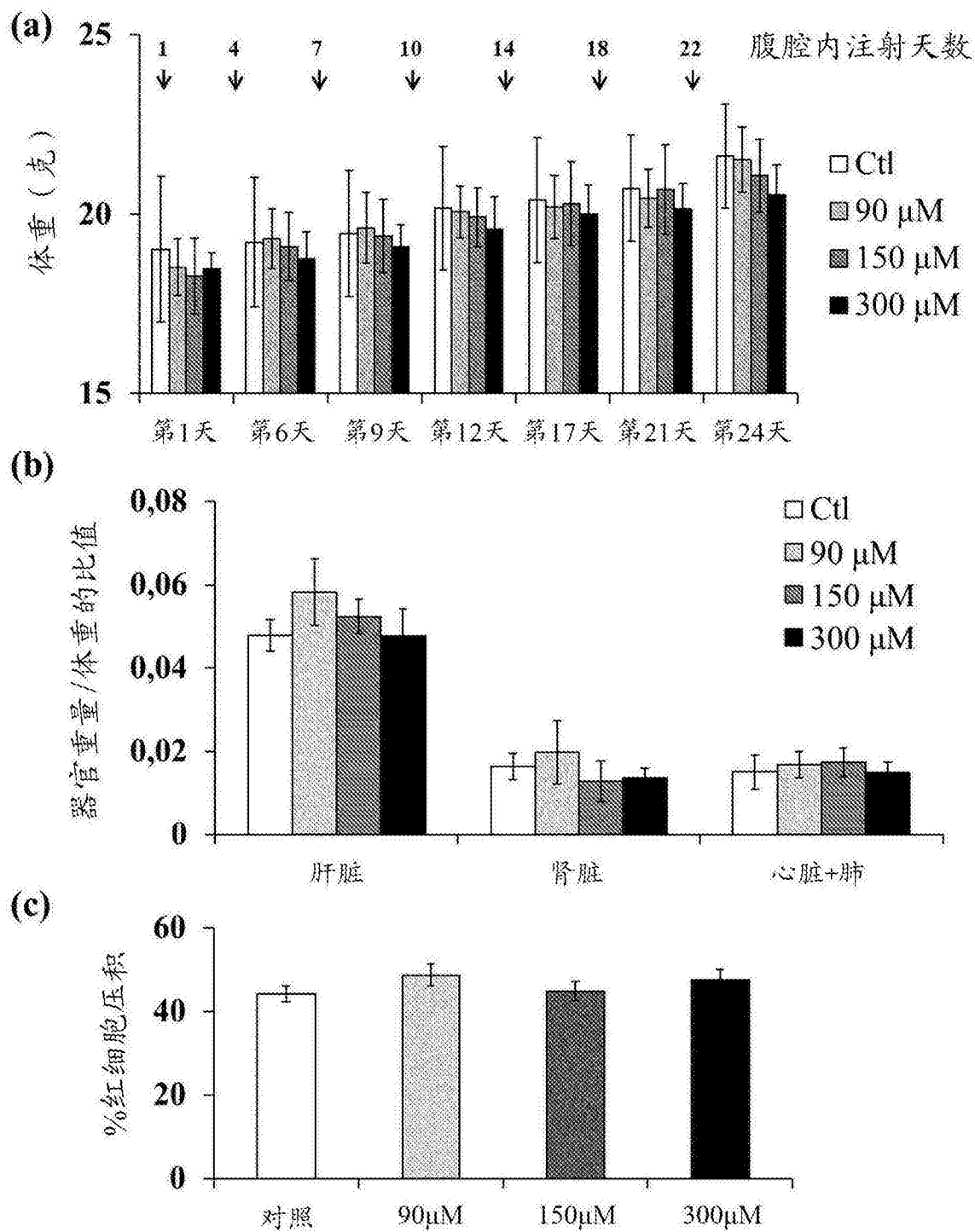


图11

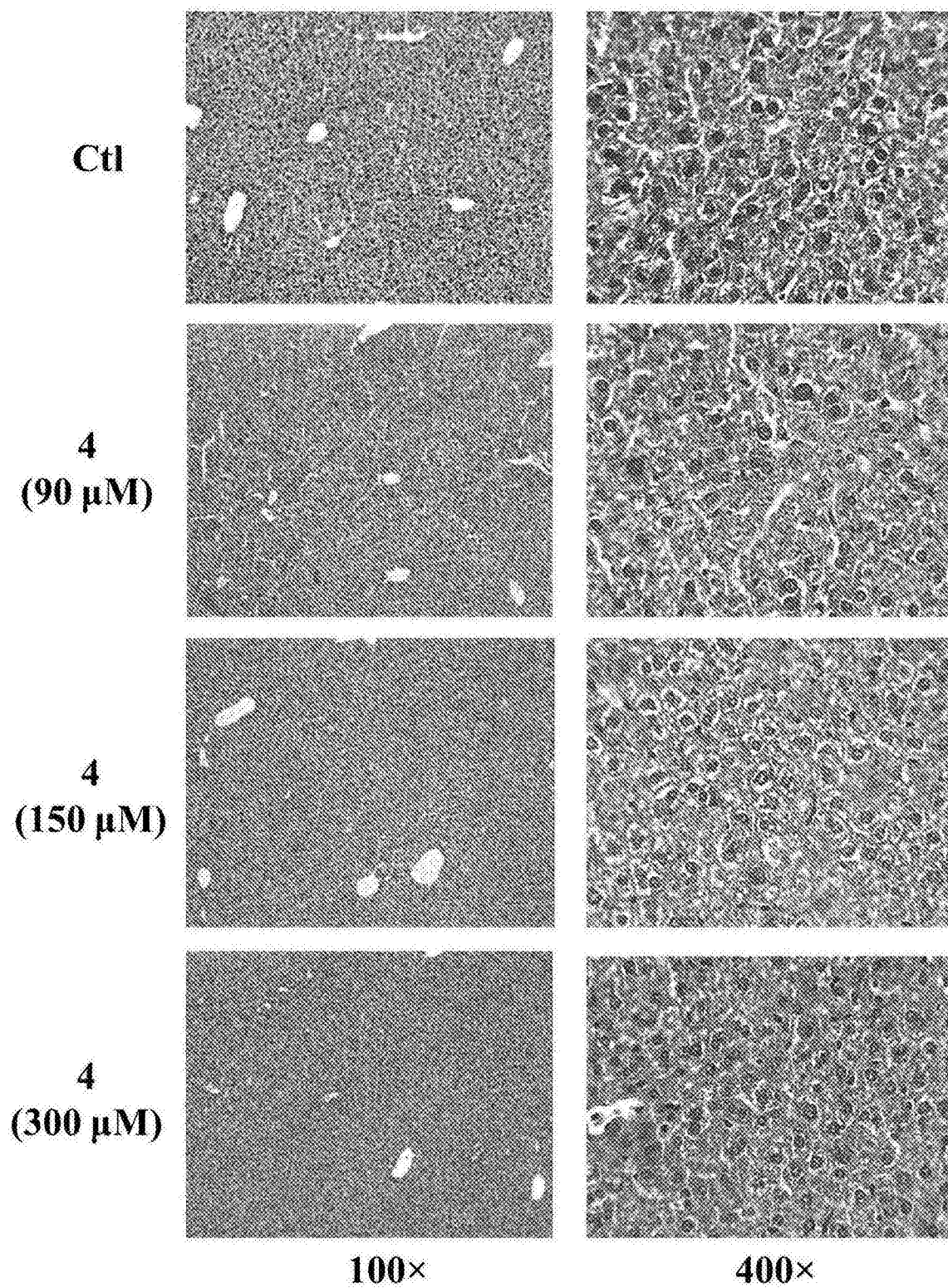


图12

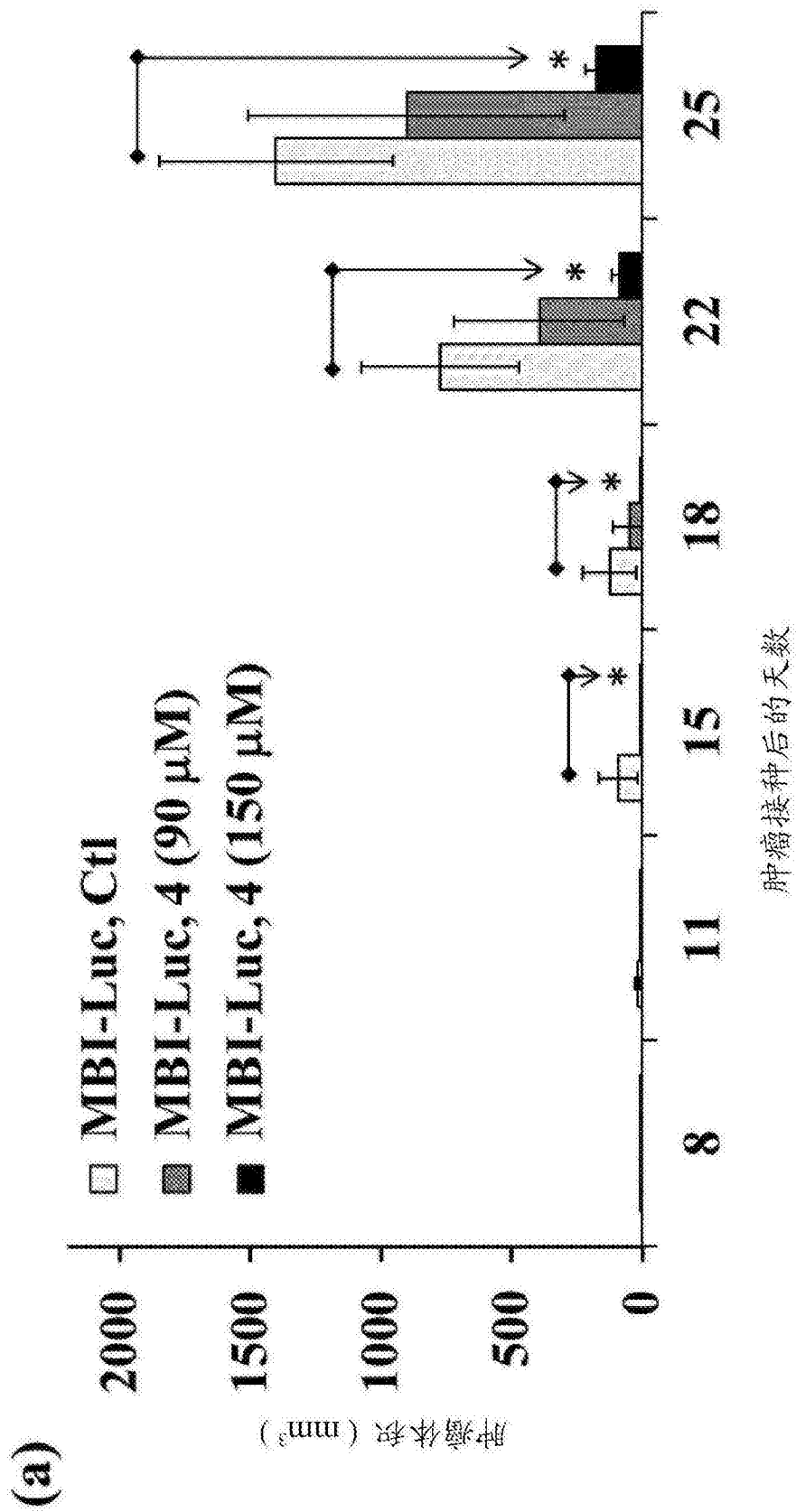


图13

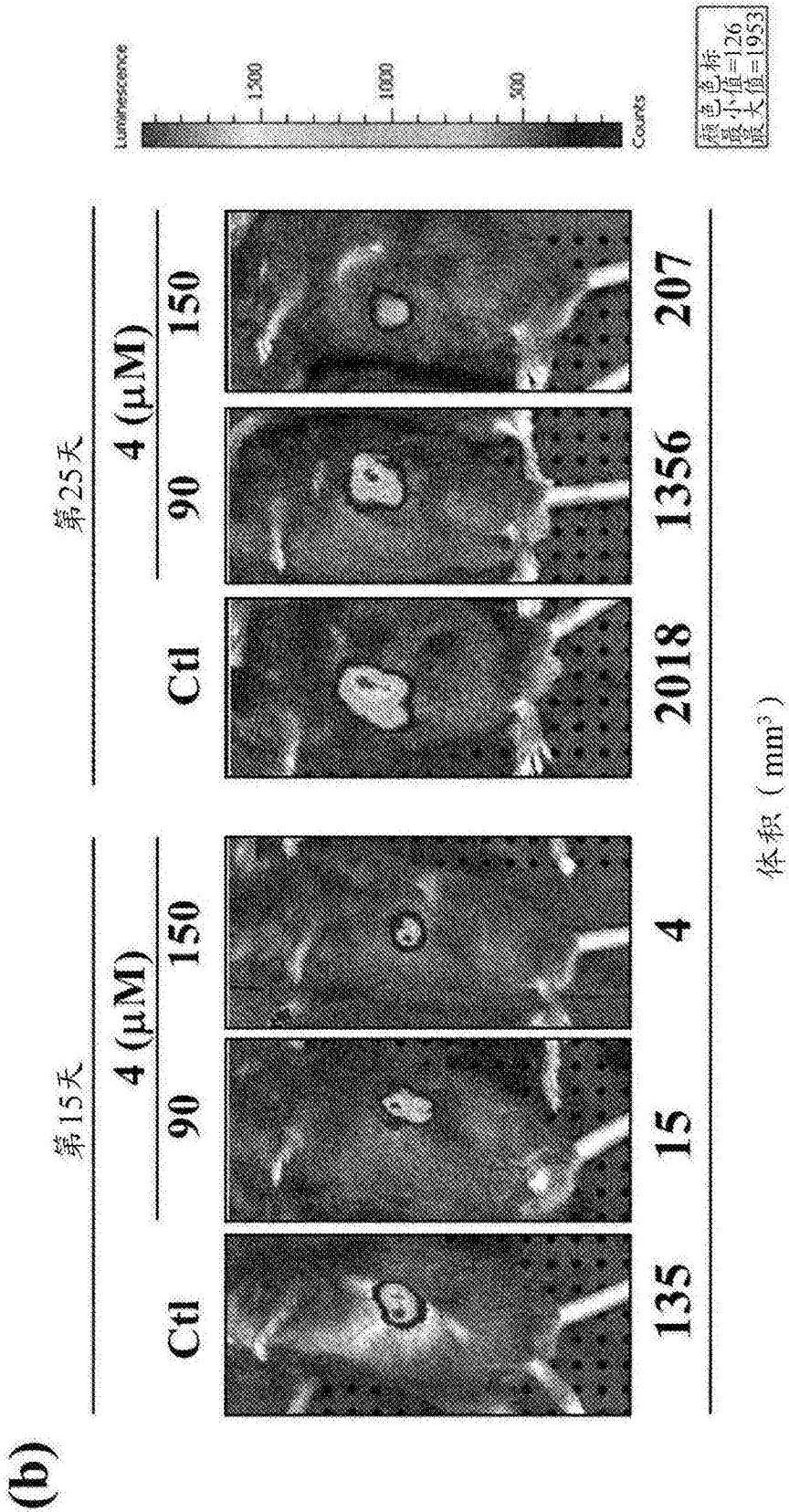


图13 (续)

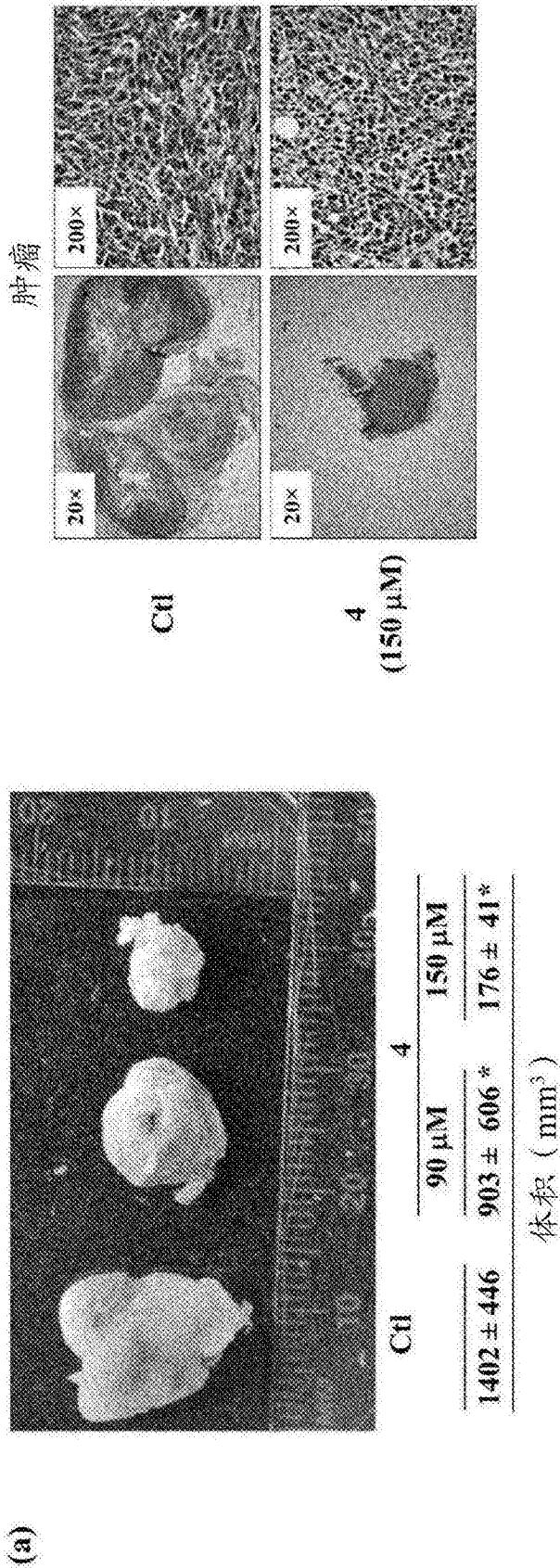


图14

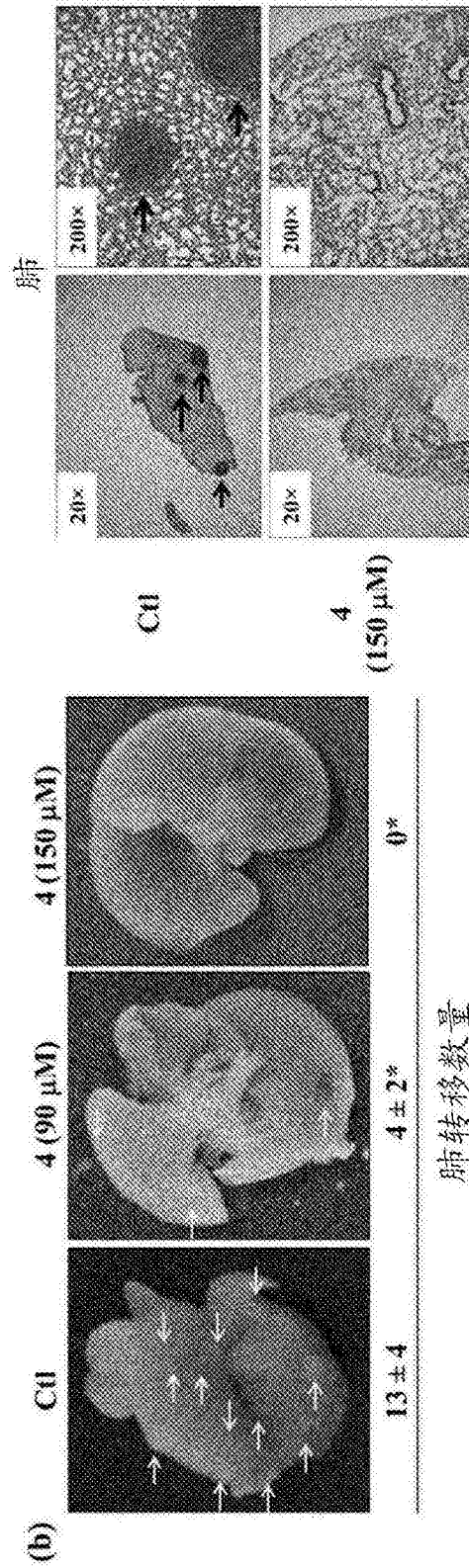


图14(续)

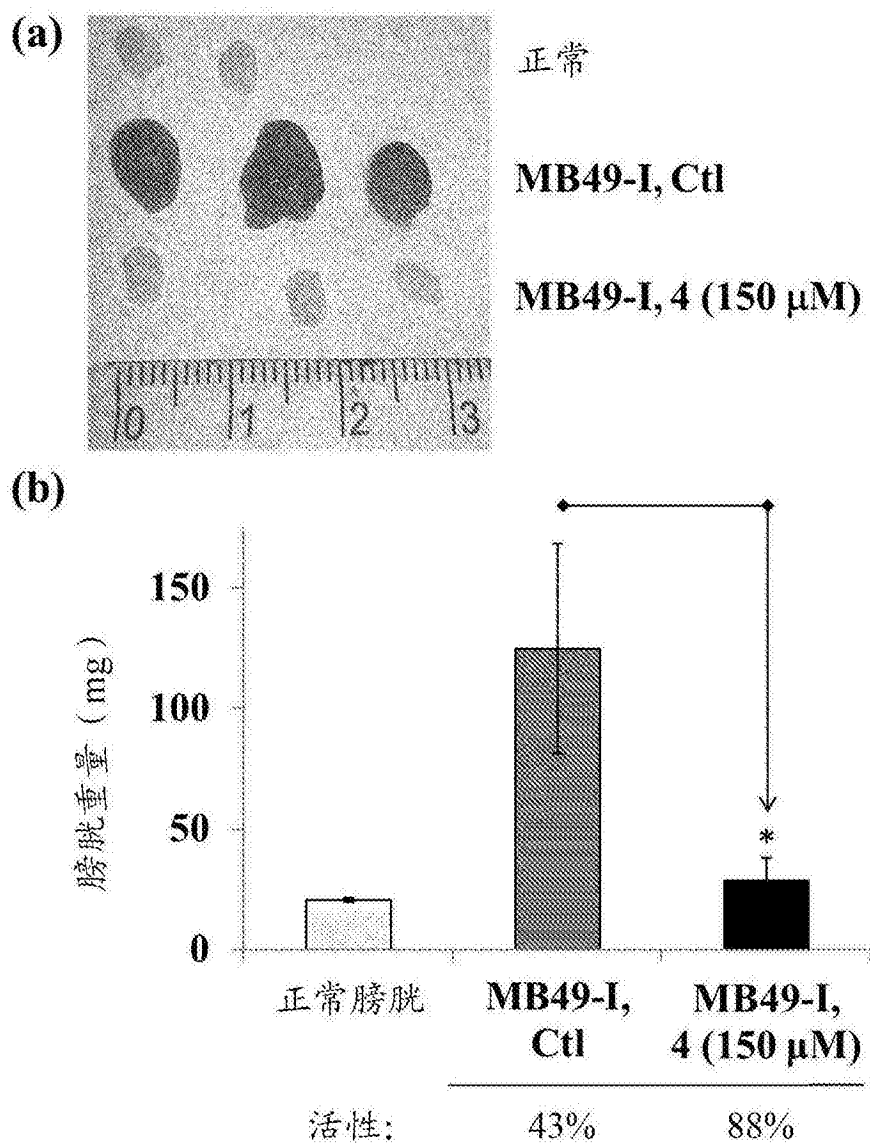


图15

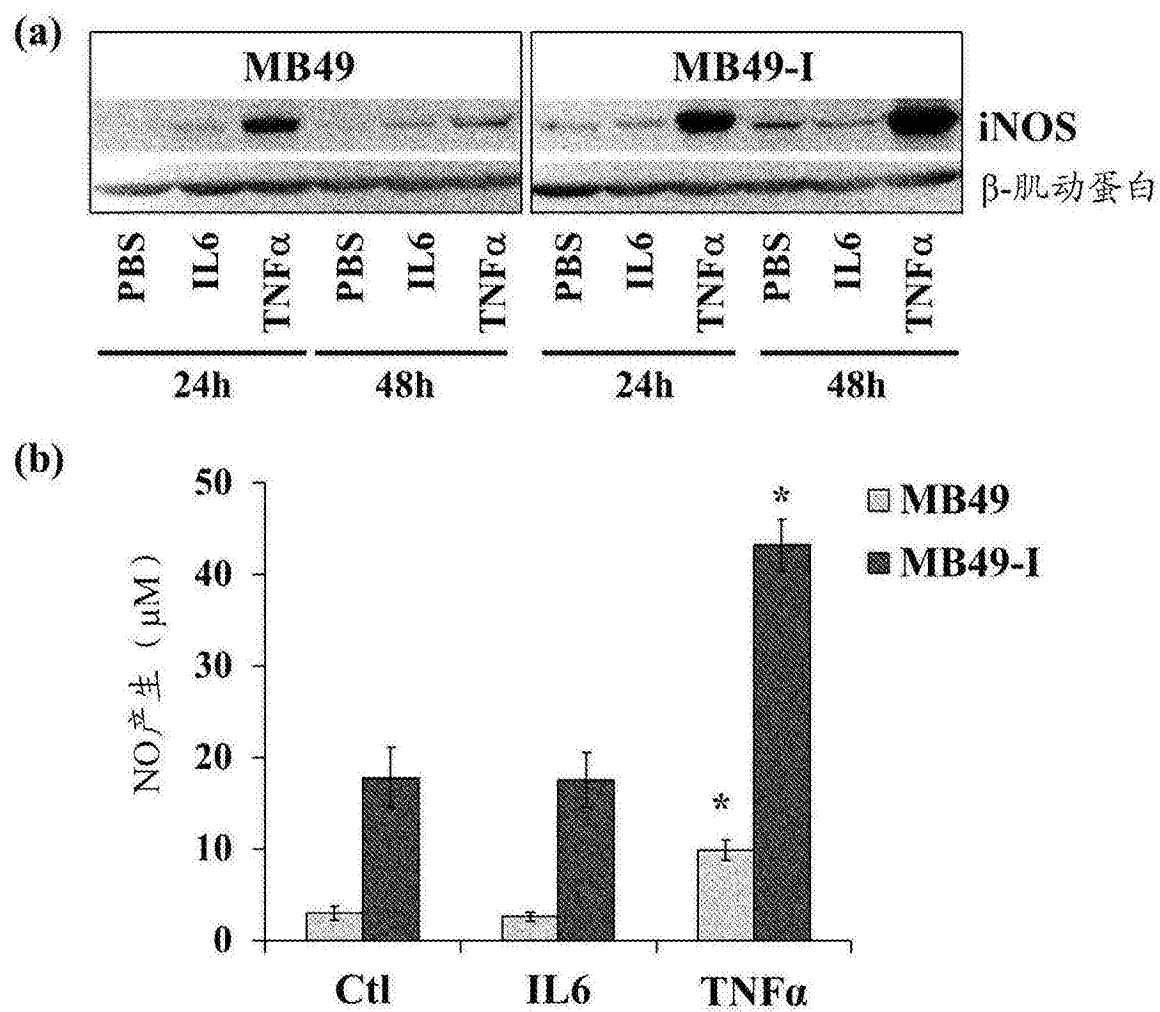


图16

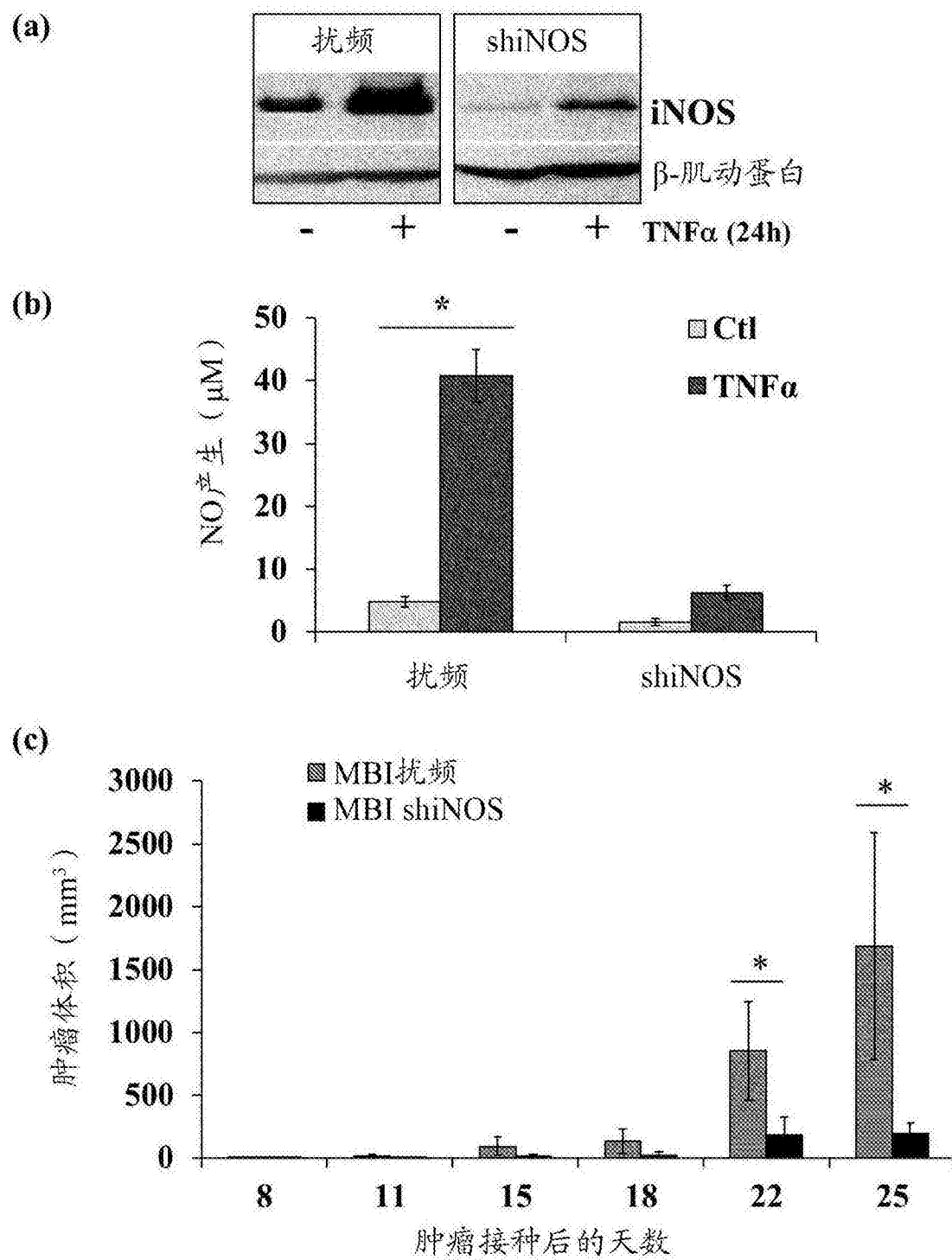


图17

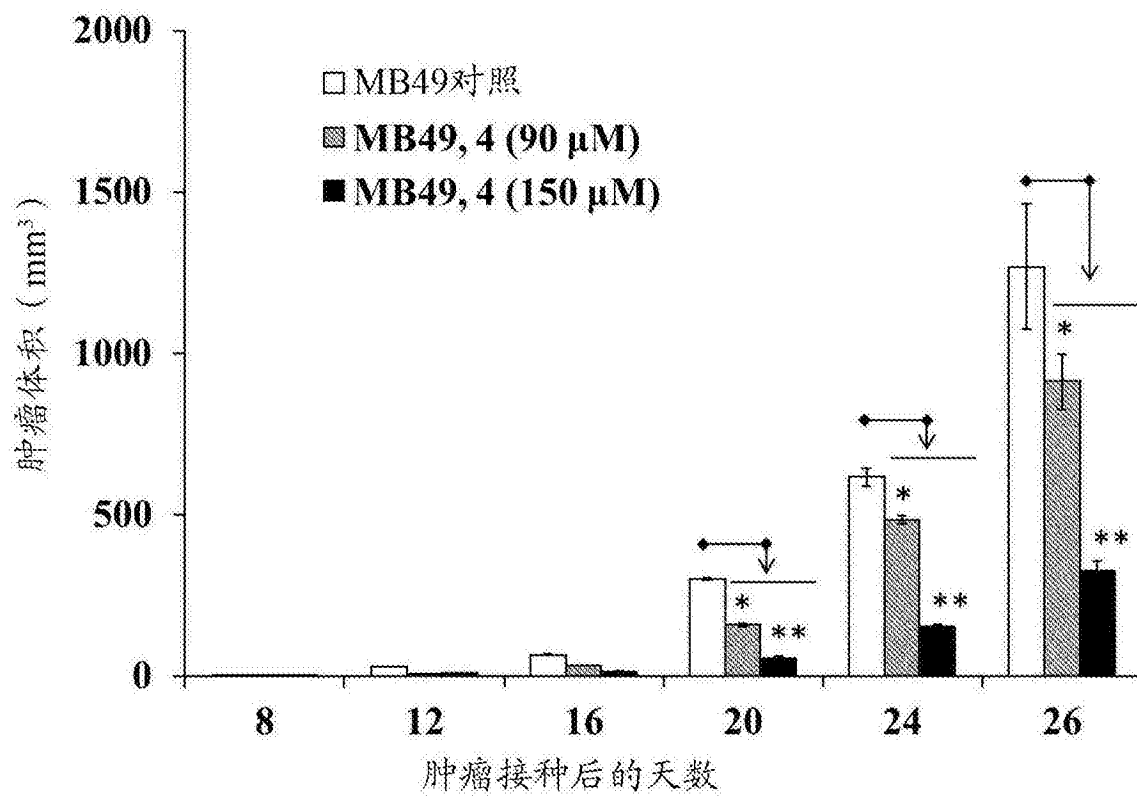


图18

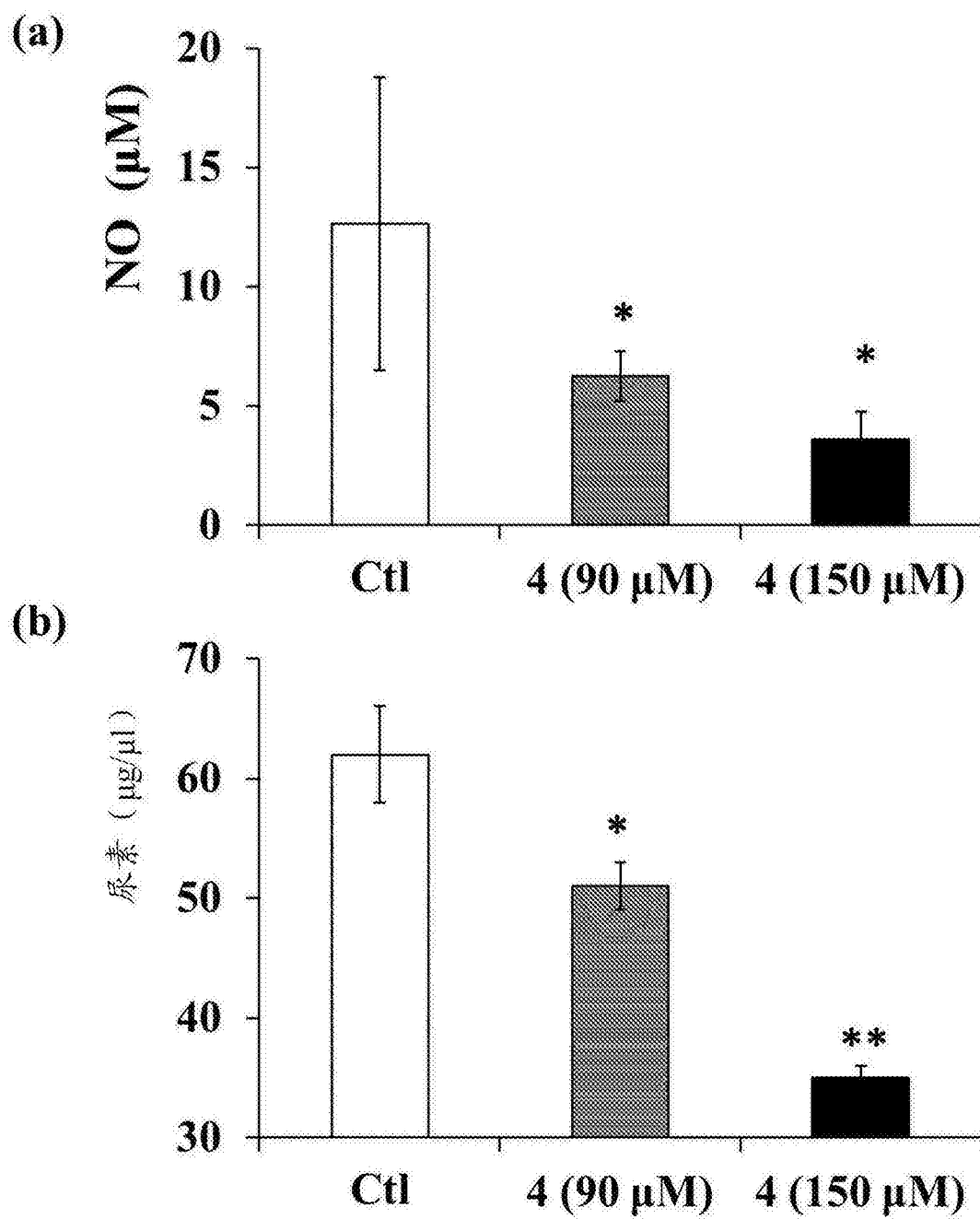


图19

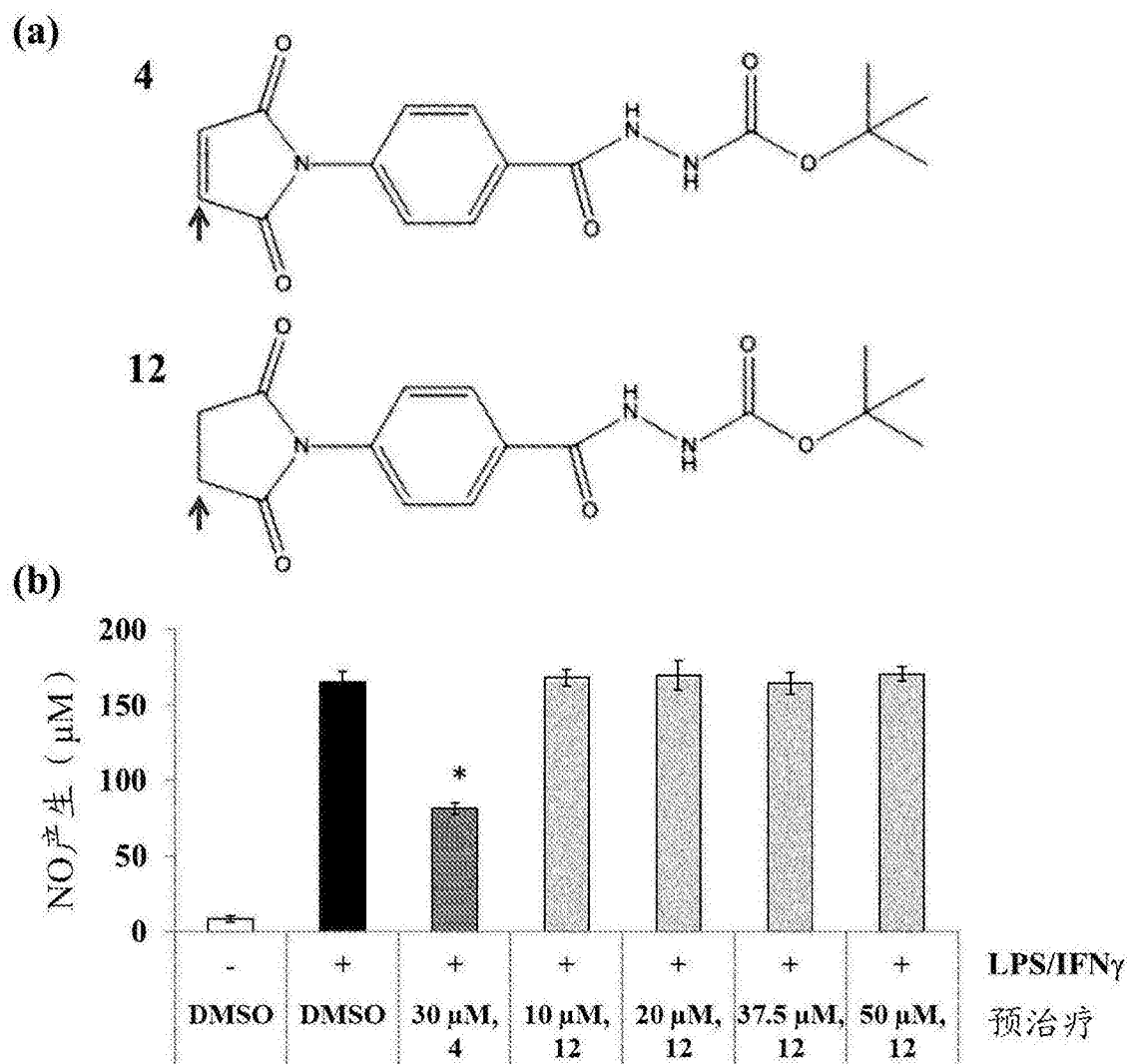


图20

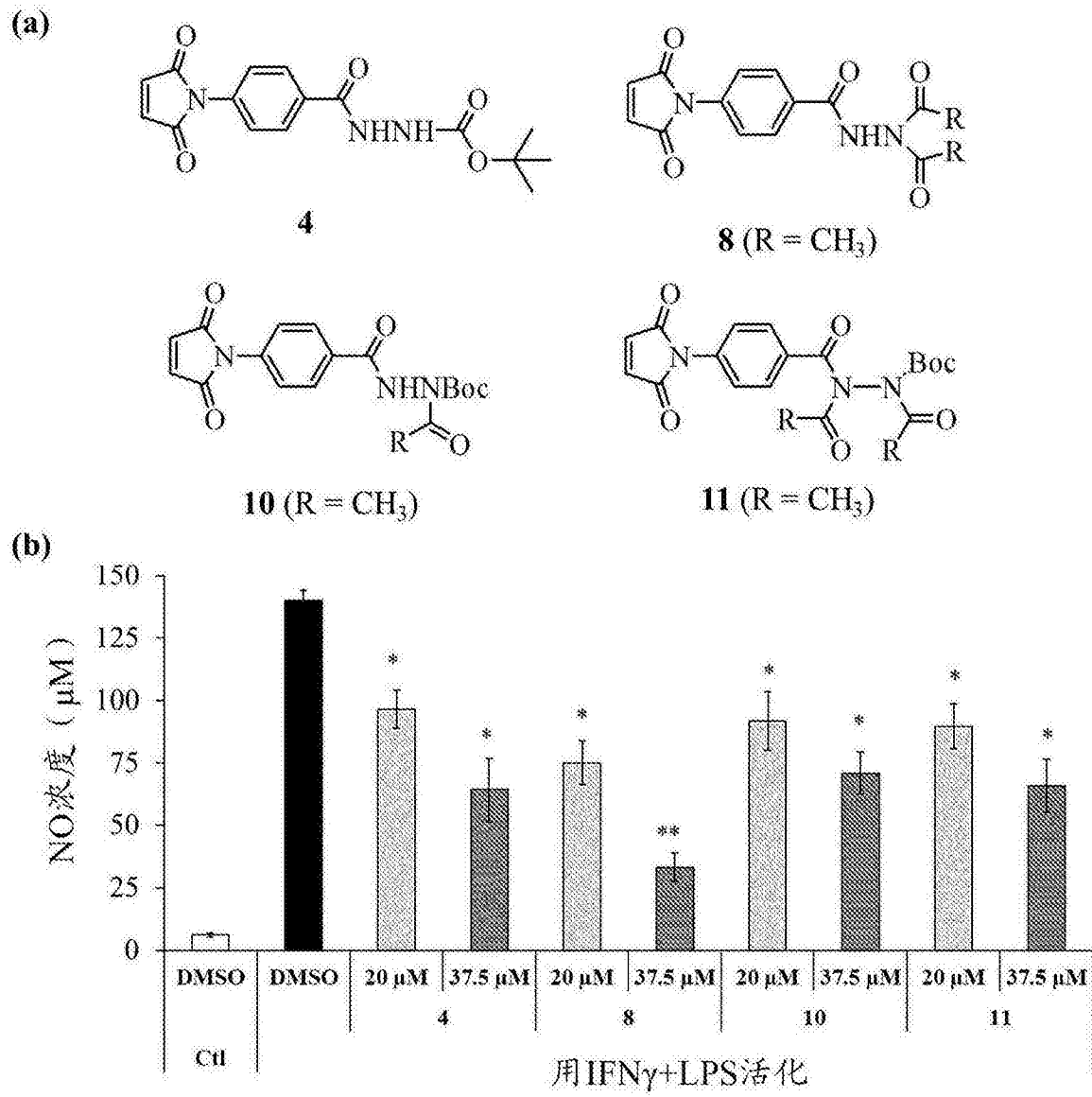


图21

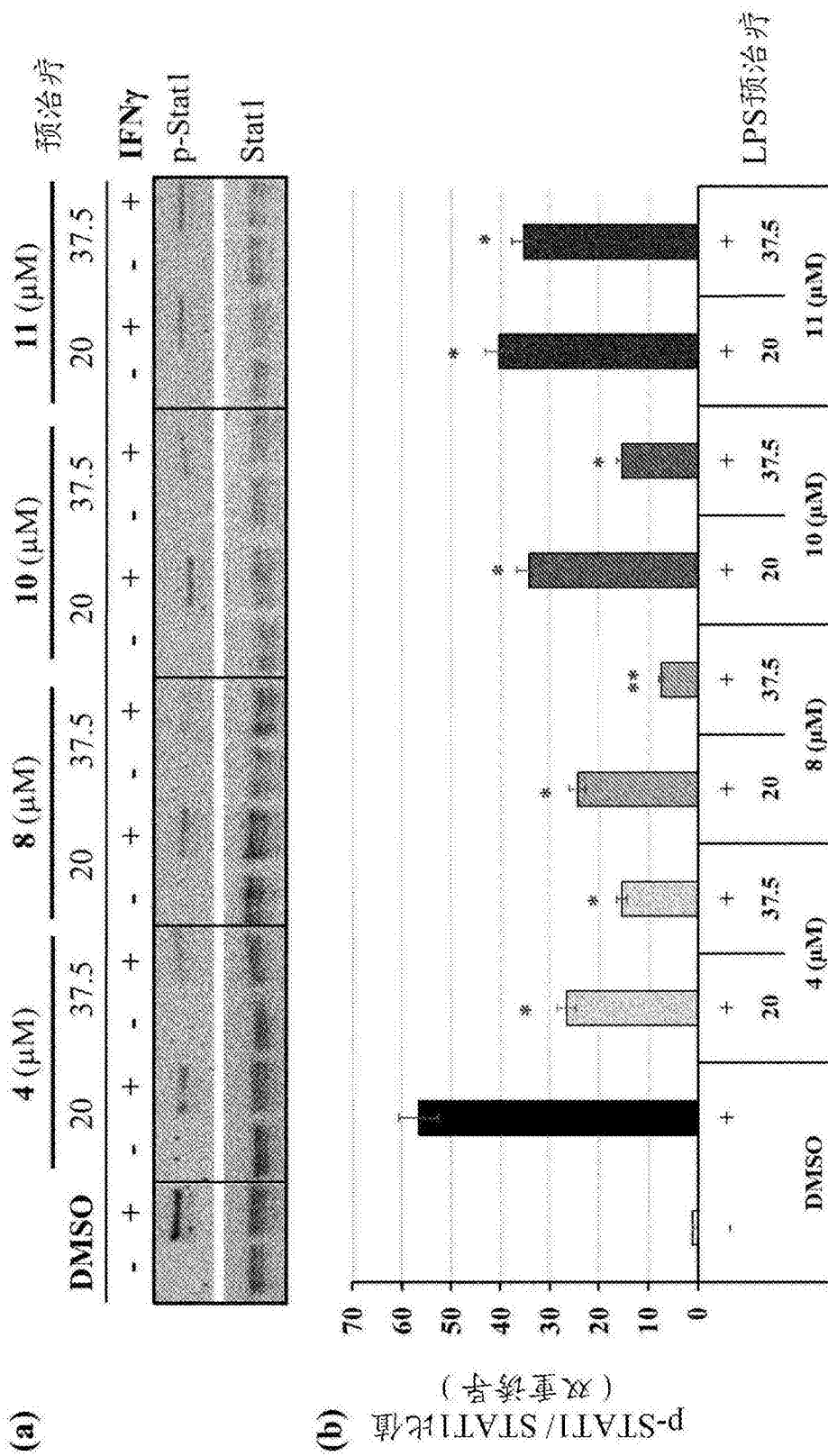


图22

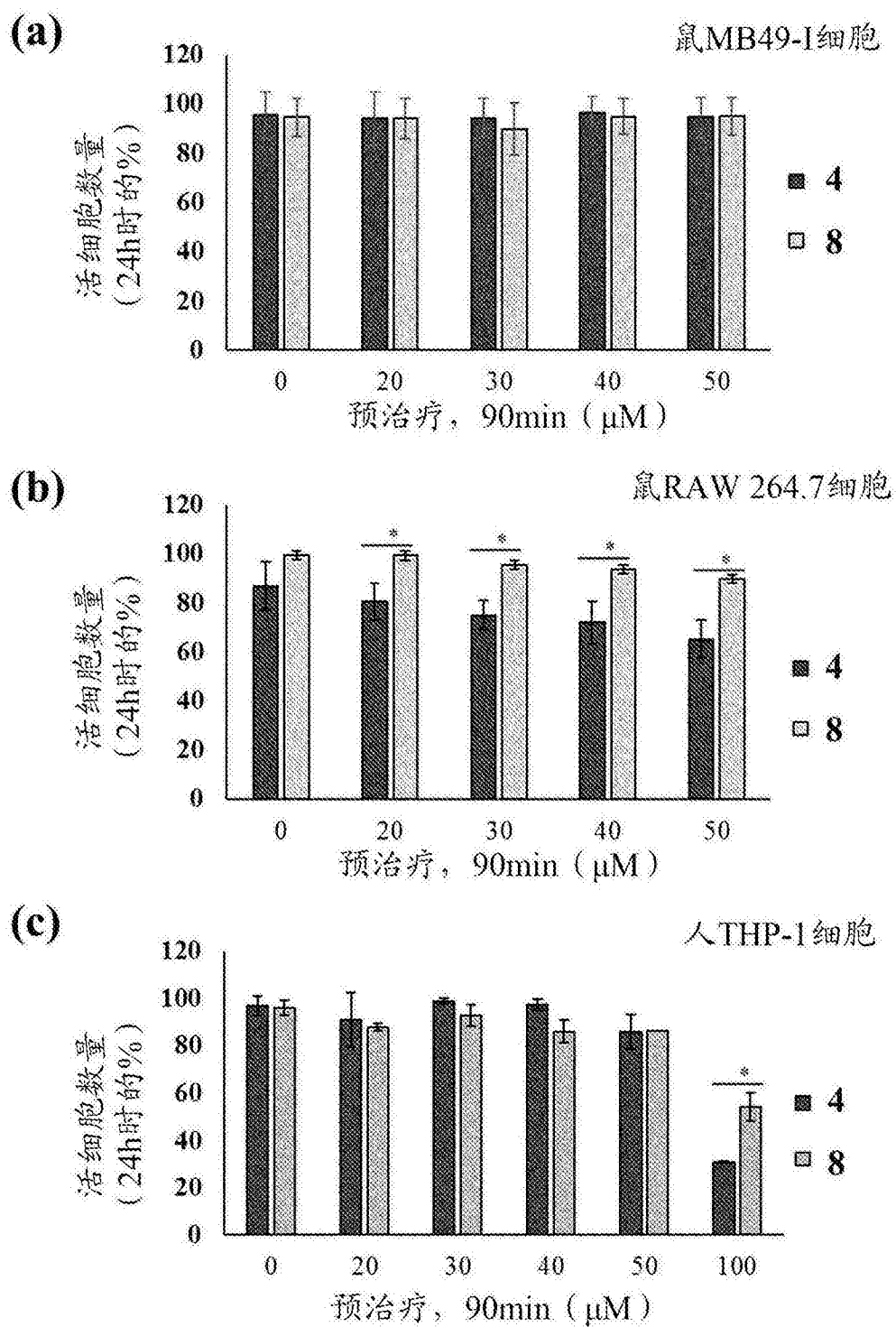


图24

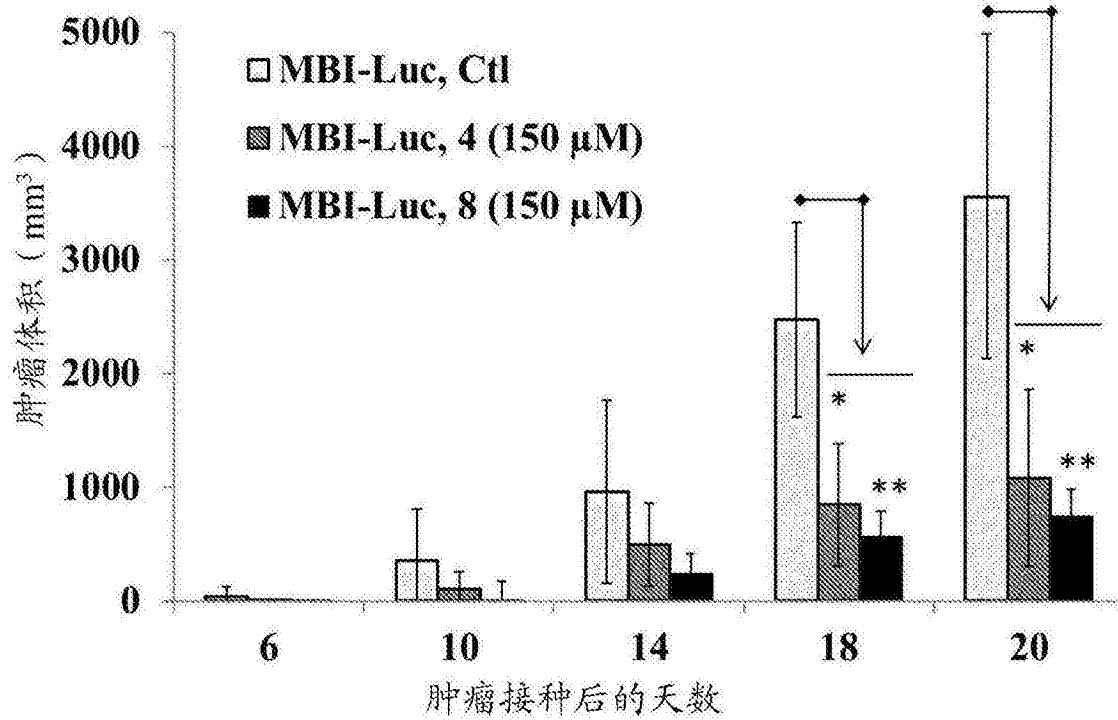


图25