



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103764604 B

(45)授权公告日 2017.02.08

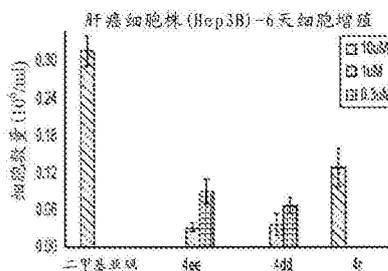
(21)申请号 201280013655.1  
 (22)申请日 2012.01.27  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 103764604 A  
 (43)申请公布日 2014.04.30  
 (30)优先权数据  
 61/437,341 2011.01.28 US  
 61/439,118 2011.02.03 US  
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日  
 2013.09.16  
 (86)PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2012/022938 2012.01.27  
 (87)PCT国际申请的公布数据  
 W02012/103457 EN 2012.08.02  
 (73)专利权人 肯塔基大学研究基金会  
 地址 美国肯塔基州列克星顿市  
 (72)发明人 大卫·S·瓦特 刘春明  
 维塔利·M·斯维里帕 文·张  
 (74)专利代理机构 北京中博世达专利商标代理  
 有限公司 11274  
 代理人 申健

(51)Int.Cl.  
 C07C 15/52(2006.01)  
 C07C 211/45(2006.01)  
 A61K 31/136(2006.01)  
 A61P 35/00(2006.01)  
 (56)对比文件  
 US 2008096973 A1,2008.04.24,  
 JP H05249517 A,1993.09.28,  
 CN 100482638 C,2009.04.29,  
 US 2003203908 A1,2003.10.30,  
 JP H0285828 A,1990.03.27,  
 CN 1143629 A,1997.02.26,  
 US 2008108840 A1,2008.05.08,  
 Reid,E..Carcinogenic action of 2'-  
 chloro-4-dimethylaminostilbene, in  
 relation to (A) possible effect of growth  
 hormone ,and (B) composition of liver  
 cytoplasm.《British Journal of cancer》  
 .1956,第10卷第123-128页.  
 审查员 张保集

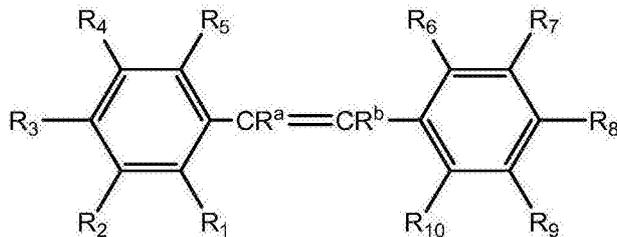
权利要求书2页 说明书38页 附图15页

(54)发明名称  
 芪类似物和治疗癌症的方法

(57)摘要  
 芪类似物及药学组合物对治疗各种癌症是有效的,包括但不限于,公开的大肠癌(CRC)和乳腺癌。卤代芪类似物包括芪环上的氮杂芳基基团和/或氨基基团。



1. 一种根据式(II)的化合物在制备用于治疗与蛋氨酸腺苷转移酶2A(MAT2A)生物活性或水平增加有关紊乱的药物中的用途:



( II )

或它的药学上可接受的盐,其中 $R^a$ 和 $R^b$ 是独立的H、烷基; $R_1$ 至 $R_5$ 中的至少一个是卤素, $R_6$ 至 $R_{10}$ 中的至少一个是含氮取代基,其余的 $R_1$ 至 $R_{10}$ 是独立的H,卤基,氨基,烷基氨基,二烷基氨基,三烷基氨基,巯基,烷硫基,烷酰基,硝基,亚硝基,氰基,芳基,杂芳基,磺酰基,磺酰胺, $CONR_{11}R_{12}$ , $NR_{11}CO(R_{13})$ , $NR_{11}COO(R_{13})$ , $NR_{11}CONR_{12}R_{13}$ ;其中 $R_{11}$ , $R_{12}$ , $R_{13}$ 是独立的H,烷基,芳基,杂芳基或氟。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中 $R_1$ 至 $R_5$ 中的至少一个是氯和/或氟取代基,并且 $R_6$ 至 $R_{10}$ 中的至少一个是 $NR^cR^dZ$ 取代基,其中 $R^c$ 是H,烷基,烷氧基,芳基,杂芳基, $R^d$ 为烷基基团, $Z$ 是非共用电子对,H,烷基,氧。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中 $R_1$ 至 $R_5$ 中的至少一个是氯和/或氟取代基, $R^c$ 是氢或 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基,并且 $R^d$ 是 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基基团。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中 $R_1$ 至 $R_5$ 中的两个或三个是氯和/或氟。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中所述化合物选自由以下组成的组:(E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(3-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(4-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二乙基苯胺;(E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二苯基苯胺;(E)-4-(2,3-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,4-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,5-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-2-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-3-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二乙基苯胺;(E)-4-(3,4-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(3,5-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-N,N-二甲基-4-(2,3,6-三氟苯乙烯基)苯胺;(E)-N,N-二甲基-4-(2,4,6-三氟苯乙烯基)苯胺;(E)-4-(2-氯-6-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,6-二氯苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,6-二氟苯乙基)-N,N-二甲基苯胺;和(E)-2-苯甲酰胺-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N-甲基苯胺;(E)-4-(2-氯-6-氟苯乙烯基)-N-甲基苯胺;(E,Z)-4-(2,6-二氯苯乙烯基)-N-甲基苯胺;和它们的药学上可接受的盐。

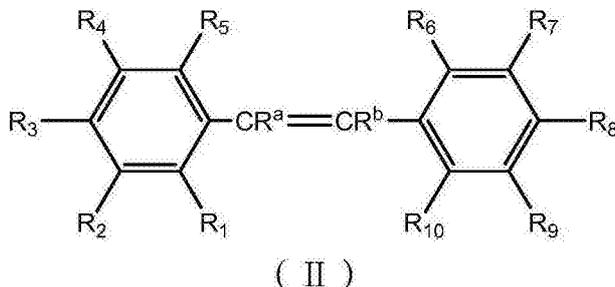
6. 根据权利要求1-5任一项所述的用途,其中所述药物包括药学上可接受的载体。

7. 根据权利要求1-5任一项所述的用途,用于治疗癌症。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述治疗的癌症选自由结肠癌,乳腺癌,肺癌,前列腺癌和肝癌组成的组。

9. 一种可检测地标记的式(II)的化合物在制备用于检测复杂蛋白质样品中MAT2A水平

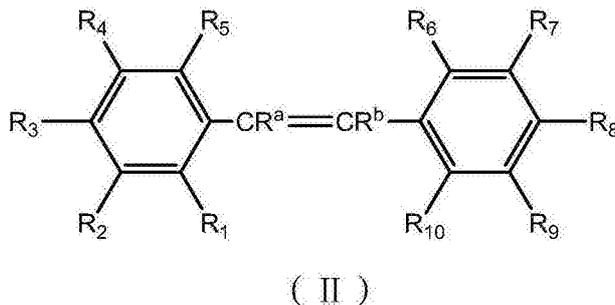
的药物中的用途,所述用途包括:在一定条件下,将可检测地标记的式(II)的化合物接触到所述复杂的蛋白质混合物中,在此条件下所述标记的化合物结合到所述样品中存在的MAT2A上;分离结合的MAT2A;除去所有未结合的蛋白,并检测样品中结合到可检测地标记的化合物的MAT2A的水平,其中,式(II)的化合物为:



或它的药学上可接受的盐,其中 $R^a$ 和 $R^b$ 是独立的H、烷基、卤基、烷氧基、氰基; $R_1$ 至 $R_5$ 中的至少一个是卤素, $R_6$ 至 $R_{10}$ 中的至少一个是含氮取代基,其余的 $R_1$ 至 $R_{10}$ 是独立的H,卤基,氨基,烷基氨基,二烷基氨基,二烷基氨基的N-氧化物,芳基烷基氨基,二烷基氧氨基,三烷基氨基,巯基,烷硫基,烷酰基,硝基,亚硝基,氰基,芳基,杂芳基,磺酰基,磺酰胺, $CONR_{11}R_{12}$ , $NR_{11}CO(R_{13})$ , $NR_{11}COO(R_{13})$ , $NR_{11}CONR_{12}R_{13}$ ;其中 $R_{11}$ , $R_{12}$ , $R_{13}$ 是独立的H,烷基,芳基,杂芳基或氟。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述可检测地标记的化合物是生物素化的化合物,并且其中所述检测是通过选自由免疫印迹法、亲和色谱法、高效液相色谱法、快速蛋白液相色谱法、离子交换法、分子筛法和质谱法组成的组的方法进行的。

11. 一种可检测地标记的式(II)的化合物在制备用于诊断受试者癌症的药物中的用途,所述用途包括:(1)从所述受试者获得包括蛋白质的样品,(2)将可检测地标记的式(II)的化合物与所述样品中的蛋白质接触,以结合MAT2A并检测所述样品中MAT2A的水平;及(3)将所述样品中MAT2A水平与正常参考水平进行比较,由此,如果所述样品中MAT2A的水平在统计学上高于正常参考水平,表明诊断为癌症,其中,式(II)的化合物为:



或它的药学上可接受的盐,其中 $R^a$ 和 $R^b$ 是独立的H、烷基、卤基、烷氧基、氰基; $R_1$ 至 $R_5$ 中的至少一个是卤素, $R_6$ 至 $R_{10}$ 中的至少一个是含氮取代基,其余的 $R_1$ 至 $R_{10}$ 是独立的H,卤基,氨基,烷基氨基,二烷基氨基,二烷基氨基的N-氧化物,芳基烷基氨基,二烷基氧氨基,三烷基氨基,巯基,烷硫基,烷酰基,硝基,亚硝基,氰基,芳基,杂芳基,磺酰基,磺酰胺, $CONR_{11}R_{12}$ , $NR_{11}CO(R_{13})$ , $NR_{11}COO(R_{13})$ , $NR_{11}CONR_{12}R_{13}$ ;其中 $R_{11}$ , $R_{12}$ , $R_{13}$ 是独立的H,烷基,芳基,杂芳基或氟。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中从受试者中获得的所述样品是活检样品,所述活检样品包括选自乳房,前列腺,大肠,肺,结肠,膀胱,头和颈,卵巢的癌细胞,或皮肤癌细胞。

## 芪类似物和治疗癌症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2011年1月28日提交的编号为61/437,341的美国临时申请以及2011年2月3日提交的编号为61/439,118的美国临时申请的优先权。

[0003] 上述申请的全部内容均通过引用合并于此。

[0004] 关于联邦政府赞助的研究的声明

[0005] 本发明的完成在美国国立卫生研究院授予的2P20 RR020171下得到了政府的支持。政府对本发明有着一定的权利。

### 技术领域

[0006] 本发明涉及一种具有抗肿瘤活性的化合物。具体地,本发明涉及一种卤代芪(stilbene)类似物和确定该芪类似物特定的分子靶点及通过给药该芪类似物抑制患者体内癌细胞生长的方法。此外,本发明还涉及芪类似物的直接靶点-蛋氨酸腺苷转移酶2A(MAT2A)和复杂的蛋白质混合物中MAT2A水平的检测方法。

### 背景技术

[0007] 白藜芦醇(反式或(E)-3,5,4'-三羟基芪(1))(图1)是在植物中产生的一种植物抗毒素,作为红葡萄酒的有益成分被推广。白藜芦醇的顺式或(Z)-异构体(2)和另一芪衍生物紫檀芪(3)表现出一定的抗肿瘤活性。(图1)最近,我们发现白藜芦醇和紫檀芪(在蓝莓中发现的一种芪),通过抑制Wnt/ $\beta$ -链蛋白(catenin)的信号传导(signaling)至少部分地抑制结肠癌细胞。张·W(Zhang,W.),药物化学杂志(J Med Chem)2011,54,1288-97。

[0008] Wnt/ $\beta$ -链蛋白信号传导在肿瘤发生和发展中起着重要的作用,Wnt信号传导异常导致肿瘤的形成。超过90%的大肠癌包括APC或 $\beta$ -链蛋白的突变,这些突变稳定 $\beta$ -链蛋白和激活Wnt信号传导。含有这些突变的细胞组成性激活Wnt信号传导,并进行强烈的增殖,该增值最终导致癌症。在信号级联中多个点处拦截和阻断Wnt/ $\beta$ -链蛋白通路,对于结肠癌的化学预防和治疗是一个有吸引力的目的。

[0009] 靶向 $\beta$ -链蛋白上游信号传导和促进 $\beta$ -链蛋白降解的几种Wnt抑制剂已经确定。虽然这些药剂抑制正常细胞中的Wnt信号传导和一些APC突变的结肠癌细胞,但它们可能对含有 $\beta$ -链蛋白突变的结肠癌细胞并不是有效的。其他几种Wnt抑制剂也已报告。然而,副作用限制了它们在人类中的潜在使用。如果拥有足够的效力和极小的毒性,食品中发现的天然产物可能是理想的用于癌症的化学预防和治疗药物。

[0010] 因此,不断需要比白藜芦醇和紫檀芪更有效力的化合物,用于癌症和其他疾病的治疗。对于不表现出有害副作用的化合物特别需要。

### 发明内容

[0011] 本发明的优点包括卤代芪类似物和具有抗肿瘤活性的组合物,以及通过给药一种或多种卤代芪类似物或组合物来抑制患者体内肿瘤细胞的生长和/或治疗患者体内癌症的

方法。

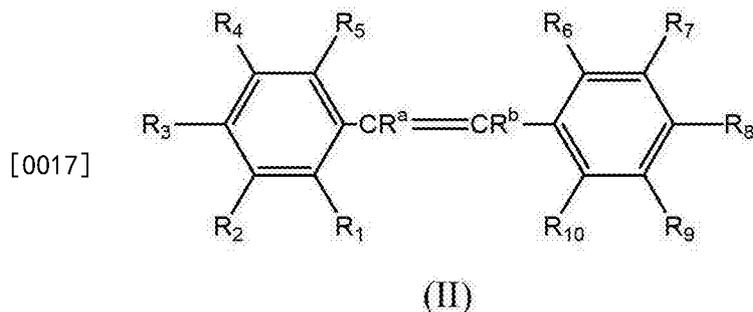
[0012] 本发明的一个方面涉及对杀死诸如癌细胞的过度增殖细胞有用的卤代芪类似物，用于治疗人类恶性和良性的肿瘤，包括但不限于，大肠癌(CRC)，肝癌和乳腺癌。在本发明的该方面中，提供了对癌细胞具有抗肿瘤活性的某些卤代芪类似物。本发明的卤代芪类似物包括根据式(I)的化合物：



[0014] (I)

[0015] 其中 $R^a$ 和 $R^b$ 是独立的H、烷基、卤基、烷氧基、氰基；X代表 $Ar_1$ 上的至少一个卤素，例如：氟、氯、溴或碘取代基； $Ar_1$ 和 $Ar_2$ 中的每个是芳基或杂芳基，芳基例如苯基、萘基，杂芳基例如吡啶基、吡咯烷基、哌啶基、嘧啶基、咪唑基、噻吩基，这些基团可以进一步由卤基，氨基，烷基氨基，二烷基氨基，芳基烷基氨基，二烷基氨基的N-氧化物，三烷基氨基，巯基，烷硫基，烷酰基，硝基，亚硝基，氰基，烷氧基，链烯氧基，芳基，杂芳基，磺酰基，磺酰胺， $CONR_{11}R_{12}$ ， $NR_{11}CO(R_{13})$ ， $NR_{11}COO(R_{13})$ ， $NR_{11}CONR_{12}R_{13}$ 取代，其中 $R_{11}$ ， $R_{12}$ ， $R_{13}$ 是独立的H，烷基，芳基，杂芳基或氟；提供： $Ar_2$ 在芳环内包含至少一个氮原子或在芳环上包含至少一个氮取代基；例如： $NR^cR^dZ$ 取代基，其中 $R^c$ 是H，烷基，烷氧基，芳基，杂芳基， $R^d$ 为烷基基团，Z是非共用电子对，H，烷基，氧，或他们的药学上可接受的盐。

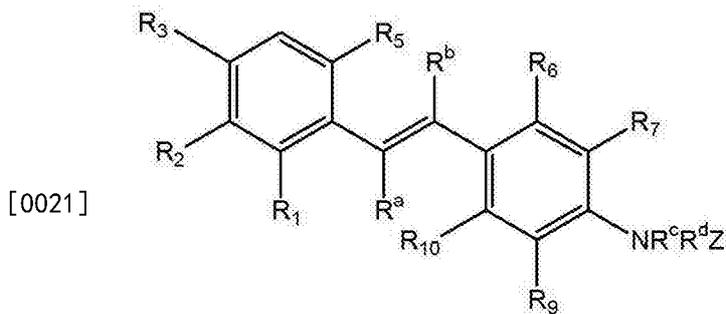
[0016] 在本发明另一个实施例中，卤代芪类似物包括式(II)的化合物：



[0018] 或其药学上可接受的盐，其中 $R^a$ 和 $R^b$ 如上述所定义；

[0019]  $R_1$ 至 $R_{10}$ 是独立的H，卤基，氨基，烷基氨基，二烷基氨基，二烷基氨基的N-氧化物，芳基烷基氨基，二烷基氧氨基(dialkyloxyamino)，三烷基氨基，巯基，烷硫基，烷酰基，硝基，亚硝基，氰基，烷氧基，链烯氧基，芳基，杂芳基，磺酰基，磺酰胺， $CONR_{11}R_{12}$ ， $NR_{11}CO(R_{13})$ ， $NR_{11}COO(R_{13})$ ， $NR_{11}CONR_{12}R_{13}$ ，其中 $R_{11}$ ， $R_{12}$ ， $R_{13}$ 是独立的H，烷基，芳基，杂芳基或氟；提供： $R_1$ 至 $R_5$ 中的至少一个是卤素，例如氟和/或氯； $R_6$ 至 $R_{10}$ 中的至少一个是含氮取代基，例如， $NR^cR^dZ$ 取代基，其中 $R^c$ 是H，烷基，烷氧基，芳基，杂芳基， $R^d$ 为烷基基团，Z是非共用电子对，H，烷基，氧。

[0020] 在本发明的另一个实施例中，卤代芪类似物包括根据式(III)的化合物：



(III)

[0022] 或其药学上可接受的盐,其中, $R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_9, R_{10}, R^a, R^b$ 和 $NR^cR^dZ$ 与上述所定义

的相同。

[0023] 本发明还包括卤代芪类似物生物素化的衍生物和卤代芪类似物的代谢物。

[0024] 本发明进一步包括该卤代芪类似物的药物组合物,例如,一种或多种式(I),式(II)和/或式(III)化合物和/或与药物载体组合的一种或多种根据式(I),式(II)和/或式(III)的化合物的药学上可接收的盐。在本发明另一方面中,该药物组合物包括至少一种卤代芪类似物的有效量。

[0025] 本发明还涉及治疗癌症的方法,例如,抑制诸如人的哺乳动物中癌细胞的生长和/或肿瘤的生长,或治疗与过度增殖细胞有关的疾病。在本发明的这方面的一个实施例中,将治疗有效量的一种或多种卤代芪类似物,药用盐和/或它们的组合物,给药于需要治疗癌症的患者,足以治疗/抑制癌细胞生长。

[0026] 在本发明的该方面的另一个实施例中,将足以抑制患者体内癌细胞的生长的治疗有效量的一种或多种卤代芪类似物、药用盐和/或它们的组合物,给药于罹患大肠癌的患者。在另一个实施例中,治疗有效量的一种或多种卤代芪类似物、药用盐和/或它们的组合物足以抑制或治疗乳腺癌。

[0027] 还在另一个实施例中,将足以抑制患者体内癌细胞的生长的治疗有效量的一种或多种卤代芪类似物、药用盐和/或它们的组合物,给药于罹患与年龄有关的癌症的患者。与年龄有关的癌症的非限定性的例子包括:前列腺癌,乳腺癌,肺癌和结肠癌,它们倾向于较多地出现在年长个体中,如65岁或更老。

[0028] 在本发明的另一方面中,还提供了一种通过用治疗有效量的卤代芪类似物处理细胞,在细胞中使用酶抑制剂S-腺苷转移酶来阻断Wnt信号传导和/或其他通路的方法。这些类似物可以抑制蛋氨酸腺苷转移酶2A(MAT2A)和降低细胞S-腺苷-蛋氨酸(SAM),SAM是调控基因表达和肿瘤生长的DNA甲基化和蛋白甲基化的主要供体。SAM还是代谢途径中的一个关键因素。因此,本发明中所描述的卤代芪类似物还是用于治疗诸如糖尿病的代谢性疾病的候选药物。

[0029] 本发明还包括一种药物组合物,包括:一种或多种式(I)、式(II)和/或式(III)的化合物和/或一种或多种其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物,用于治疗与MAT2A生物活性或水平增加有关的紊乱。在一个相关的实施例中,与MAT2A生物活性或水平增加相关的紊乱是癌症。在另一个实施例中,癌症是结肠癌,乳腺癌,肺癌,前列腺癌或肝癌。

[0030] 本发明还涉及一种治疗与受试者的MAT2A生物活性或水平的增加有关的紊乱的方法,包括:向该受试者给药有效量的卤代芪类似物组合物,例如,一种或多种式(I)、式(II)和/或式(III)的化合物和/或一种或多种其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物。在一个相关的实施例中,与MAT2A生物活性或水平的增加有关的紊乱是癌症。在另一个实施例中,癌症是结肠癌,乳腺癌,肺癌,前列腺癌或肝癌。

[0031] 本发明还涉及一种调节受试者MAT2A活性的方法,该方法包括:向该受试者给药有效量的一种或多种式(I)、式(II)和/或式(III)的化合物和/或一种或多种其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物。在一个相关的实施例中,MAT2A活性调节包括降低受试者MAT2A生物活性或水平。在另一个相关的实施例中,MAT2A活性调节包括减少SAM和/或S-腺苷高半胱氨酸(SAH)合成。

[0032] 本发明还涉及一种检测复杂(complex)蛋白质样品中MAT2A水平的方法,所述方法包括:将可检测地标记的式(I)-式(III)的化合物与所述的蛋白质混合物接触,由此所述标记的化合物结合到样品中存在的MAT2A上;分离结合的MAT2A;除去所有未结合的蛋白,并检测样品中结合到可检测地标记的化合物的MAT2A水平。在一个相关的实施例中,结合的MAT2A的分离通过以亲和性为基础的分选方法进行。在另一个相关实施例中,(I)-(III)的化合物是生物素化的。在另一个相关实施例中,使用免疫印迹、高效液相色谱、快速蛋白液相色谱、离子交换、分子筛、荧光光谱、紫外-可见光谱或质谱进行检测。

[0033] 本发明还涉及一种诊断受试者癌症的方法,包括:(1)从受试者获得包含蛋白的样品,(2)将可检测地标记的式(I)-式(III)的化合物与样品中的蛋白质接触,以结合到MAT2A上并检测所述样品中MAT2A的水平;及(3)将样品中MAT2A水平与正常参考水平进行比较,由此,如果样品中MAT2A水平在统计学上(statistically)高于正常参考水平,表明诊断为癌症。在一个相关实施例中,根据第[0021]段中所述的方法进行步骤(2)中的检测。在另一个相关实施例中,从受试者中获得的样品为活检样品,包括选自乳房、前列腺、大肠、肺、结肠、膀胱、头和颈、肠、卵巢的癌细胞或皮肤癌细胞。

[0034] 本发明还涉及一种识别接受治疗的作为候选者的受试者的方法,该治疗使用一种或多种式(I)、式(II)或式(III)的化合物或一种或多种其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物,所述方法包括:(1)从受试者中获得蛋白样品,(2)将可检测地标记的式(I)-(III)的化合物与所述的蛋白质接触,以结合MAT2A并检测所述样品中MAT2A的水平;及(3)将样品中MAT2A水平与正常参考水平进行比较,由此,如果样品中MAT2A水平在统计学上高于正常参考水平,则表明受试者具有接受式(I)、式(II)或式(III)的化合物或一种或多种其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物的治疗的候选资格。在一个相关实施例中,根据第[0021]段中所述的方法执行步骤(2)中的检测。

[0035] 本发明还涉及一种包含本发明化合物的试剂盒。在一个相关实施例中,所述试剂盒包含一种或多种式(I)-式(III)的化合物。在另一个相关实施例中,所述试剂盒包含一种或多种在组合疗法中使用的其它治疗化合物或组合物。

[0036] 在另一个实施例中,所述试剂盒可以是包括作为诊断试剂来使用的可检测地标记的式(I)-(III)的化合物的诊断试剂盒。在另一个相关实施例中,标记的化合物是一种或多种式(I)、式(II)和/或(III)的化合物的生物素化衍生物。在另一个实施例中,所述试剂盒包括标记的式(I)-式(III)的化合物的标记的结合伴侣。

[0037] 从下面的详细描述中,本发明另外的优点对于本领域技术人员将变得显而易见,其中,仅通过说明执行本发明的预期最佳方式,来示出和描述仅本发明的最佳实施例。将能意识到的是,本发明可以有其他的、不同的实施例,并且可以在多个明显的方面修改本发明的若干细节,所有这些都脱离本发明。因此,附图和描述本质上将被视为说明性的,而不是限制性的。

[0038] 附图简要说明

[0039] 参考附图,其中,在全文中,具有相同的附图标记标识的元素代表相同的元素,其中:

[0040] 图1显示了具有抗肿瘤活性的天然存在的芪类结构。结构式1是反式白藜芦醇,2是顺式白藜芦醇,3是紫檀芪。

[0041] 图2是某些芪类似物和1,2-二芳基乙烷的一般合成示意图。图例:a,(1)n-BuLi(正丁基锂),THF(四氢呋喃);(2)ArCHO;b,(1)NaH,DMF(二甲基甲酰胺);(2)ArCHO;c,H<sub>2</sub>,Pd-C,THF。

[0042] 图3显示本发明氟代和/或氯代芪类似物的几个可能代谢物的化学结构。

[0043] 图4是卤代芪类似物的生物素化衍生物的合成示意图。图例:a,SnCl<sub>2</sub>,HCl,HOAc;b,CNBr;c,生物素基氯化物(biothynyl-chloride),Et<sub>3</sub>N(三乙胺),THF;d,生物素,HOBt(1-羟基苯并三唑),EDC(二氯乙烷),Et<sub>3</sub>N,DMF;e,(+)-生物素基-碘代乙酰胺基-3,6-二氧杂辛二胺,K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,EtOH(乙醇)。

[0044] 图5(A)提供本发明一氟代芪的多种化学结构。图5(B)是显示了30μM时4-氨基芪(4c)抑制Wnt靶基因的免疫印迹。图5(C)是显示了30μM时4-苯乙烯基-N,N-二甲基苯胺(4d)比4-甲氧基芪(4b)要活跃的免疫印迹。图5(D)是显示了10μM时4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4e)和4-(3-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4f)抑制Wnt靶基因的免疫印迹。图5(E)是显示了4e中二甲氨基苯基基团的免疫印迹。图5(F)是显示了4e与白藜芦醇和紫檀芪抑制CRC细胞的增殖效果的比较曲线图。

[0045] 图6(A)提供本发明二卤代N,N-二烷基氨基芪类似物4和饱和类似物5r的多种化学结构。图6(B)是显示了10μM时N,N-二烷基氨基芪类似物4o、4m和4r抑制Wnt靶基因的免疫印迹。图6(C)是显示了N,N-二甲基氨基类似物的邻位和间位的异构体(4p和4q)不及对位-异构体(4r)活跃的免疫印迹。图6(D)是显示了三卤代N,N-二甲基氨基芪类似物(4v和4w)是活跃Wnt抑制剂的免疫印迹。图6(E)是显示了0.5μM处化合物4r抑制Wnt靶基因的免疫印迹。

[0046] 图7显示本发明的卤代类似物对体外和体内CRC细胞增殖的影响。图7(A)显示了本发明的各种化合物在0.1,0.3和1μM时对CRC细胞增殖的抑制曲线图。图7(B)显示了在两翼皮下注射LS174CRC癌细胞(2×10<sup>6</sup>)后经化合物4r或玉米油治疗的典型裸鼠。图7(C)是用化合物4r和玉米油进行治疗的裸鼠的体重曲线图。图7(D)是化合物4r或玉米油治疗的小鼠的肿瘤体积曲线图。统计学显著性由学生t检验(\*P<0.05)计算得出。

[0047] 图8(A)是显示了由普洛麦格(Promega)公司GloMax<sup>®</sup>光度计在365nm检测的荧光的条形图。图8(B)是显示了化合物4s是活跃的Wnt抑制剂的免疫印迹。8(C)是显示了化合物4r(10μM)和白藜芦醇(100μM)降低LS174细胞内的Wnt/β-链蛋白靶点的蛋白水平的免疫印迹。图8(D)是显示了化合物4r抑制Wnt靶基因的转录的免疫印迹。

[0048] 图9涉及到芪类似物靶点的亲和纯化。图9(A)显示了本发明的卤代芪类似物的生

物素化衍生物13。图9(B)显示了银染的蛋白标记物(1),从生物素-芪类似物-磁珠的洗脱(2),仅链霉亲和素磁珠(3)和不相关的生物素标记的磁珠(4)。

[0049] 图10显示了与MAT2A的直接相互作用的本发明的卤代芪类似物。谷胱甘肽转移酶-MAT2A(GST-MAT2A)和谷胱甘肽转移酶-MAT2B(GST-MAT2B)的融合蛋白从大肠杆菌(*E. coli*)中表达和纯化。这些蛋白质在有或没有生物素化的衍生物13的参与下,与链霉亲和素磁珠一起培养。结合蛋白由2.5mM的D-生物素洗脱,并通过抗GST抗体(anti-GST-Ab)进行免疫印迹分析。

[0050] 图11显示了卤代芪比白藜芦醇更有效地抑制产生SAM和SAH的MAT2A活性。图11A显示了10 $\mu$ M化合物4r对比30 $\mu$ M白藜芦醇对LS174结肠癌细胞中SAM水平的影响。图11B显示了3 $\mu$ M化合物4dd和10 $\mu$ M化合物4r对比30 $\mu$ M白藜芦醇对结肠癌细胞中SAM水平的影响。图11C显示了3 $\mu$ M化合物4dd和10 $\mu$ M化合物4r对比30 $\mu$ M白藜芦醇对结肠癌细胞中SAH水平的影响。

[0051] 图12显示了MAT2A和MAT2B对癌细胞的增殖是至关重要的,并且它们在转录水平上的抑制减少癌细胞增殖。显示了采用shRNA(短发夹RNA)敲掉MAT2A基因(12A)和MAT2B基因(12B)能够抑制肝癌细胞株Hep3B(12C)的增殖。

[0052] 图13显示了MAT2A和MAT2B基因抑制结肠癌细胞增殖的时间-过程研究。图13A显示了MAT2A和MAT2B的shRNA对HT29细胞增殖的抑制。图13B显示了MAT2A和MAT2B的shRNA对LS174T细胞增殖的抑制。

[0053] 图14是显示了本发明的卤代芪类似物抑制结肠癌细胞增殖的图表。

[0054] 图15是显示了本发明的卤代芪类似物抑制肝癌细胞增殖图表。

[0055] 图16是显示了本发明的卤代芪4dd对裸鼠体内的异种移植肿瘤的抑制作用图表。

[0056] 图17显示了选定的卤代芪类似物对乳腺癌(图17A)、肺癌(图17B和17C)、类癌瘤(17D)和前列腺癌(17E)细胞株的增殖的抑制作用。

[0057] 图18A显示了突变的MAT2A(K265L)用于进行卤代芪类似物的结合研究。图18B显示了MAT2A的终端缺失(MAT2A-缺乏)不影响卤代芪类似物结合到MAT2A。图18C显示了突变的MAT2A(MAT2A-K265L)部分地失去其结合到卤代芪类似物的能力。

[0058] 本发明的详细描述

[0059] 本发明涉及到新颖的酶蛋氨酸腺苷转移酶2A(MAT2A)抑制剂,(基因ID:4144;核苷酸NM\_005911;氨基酸ID:NP\_005902)。这些化合物对治疗或预防任何这样的疾病和/或病症有用:其中对MAT2A水平和/或它的酶的产物(即,S-腺苷-蛋氨酸(SAM或甲硫氨酸(AdoMet)))的调节有效地改善症状或疾病。MAT2A的抑制可导致SAM水平的降低和甲基化反应的减少或SAM下游的甲基化产物的减少。因此,本发明提供用于治疗或预防与MAT2A有关的紊乱的化合物、组合物和方法。这样的疾病或紊乱包括但不限于诸如癌症的增殖性疾病、诸如糖尿病的代谢紊乱、心脏疾病、老化、肥胖和诸如阿尔茨海默病和帕金森病的神经退行性疾病。

[0060] 定义

[0061] 术语“烷基”是本领域公认的,包括饱和的脂族基团,所述饱和的脂族基团包括直链烷基基团、支链烷基基团、环烷基(脂环族)基团、烷基取代的环烷基基团和环烷基取代的烷基基团。在某些实施例中,直链或支链烷基在其主链具有约30或更少的碳原子(如C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>直链,C<sub>3</sub>-C<sub>30</sub>支链),可选地,约20个或更少。同样地,环烷基在其环结构中具有约3至约10个

碳原子,可选地,在环结构中具有约5、6或7个碳原子。本文所用的术语“烷基”还包括卤素取代的烷基。

[0062] 术语“芳烷基”是本领域公认的,指由芳基基团取代的烷基基团(例如,芳族或杂芳族基团)。

[0063] 术语“烯基”和“炔基”是本领域公认的,指上述烷基长度的不饱和脂族基团类似物和上述烷基的可能的取代物,但分别含有至少一个双键或三键。

[0064] 除非碳原子数另有规定,“低级烷基”是指上如上定义的烷基,但具有一至大约十个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>),例如,在其主链结构有一个到约六个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)。同样,“低级烯基”,“低级烷基”,“低级氨基”,“低级炔基”等有相似的链长度。

[0065] 术语“单位剂量”或“剂量”指适合于在受试者中使用的物理上独立的单位,每个单位含有规定量的治疗组合物,由与治疗组合物的给药相关的、能够产生上述讨论的期望反应计算得出,即,适当的途径和治疗方案。根据治疗的次数和单位剂量这两者的给药量取决于期望的保护或期望的效果。

[0066] 术语“治疗”和“治疗”既指治疗性治疗又指预防或预防措施,其中目标是为了防止或减缓(减轻)不期望的病理变化或紊乱,如癌症的发展或扩散。出于本发明的目的有益的或者期望的临床效果包括但不限于,减轻症状、降低疾病程度、稳定疾病状态(即不恶化)、延迟或减缓病情恶化、改善或减轻该疾病状态及缓解(不论是部分或全部),无论是可检测到的还是不可检测到的。例如,“治疗”包括定性或定量的减少(例如,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)肿瘤或转移瘤的大小,或减少或防止转移瘤的增长。“治疗”也意味着与不接受治疗的预期生存期相比,延长生存期。

[0067] 那些需要治疗的包括那些已经具有病症或紊乱的,以及那些容易发生病症或紊乱的,或那些病症或紊乱可以被预防的。

[0068] 短语“治疗有效量”指本发明化合物的(i)治疗或预防特定疾病病症、或紊乱的量,(ii)减轻、改善或消除具体疾病、病症或紊乱的一种或多种症状的量,或(iii)防止或延迟本发明所描述的具体疾病、病症或紊乱的一种或多种症状开始的量。对于癌症,药物的治疗有效量可以减少癌细胞的数目;降低肿瘤的大小;抑制(即,在一定程度上减慢,最好是阻止)肿瘤细胞渗透到周围脏器;抑制(即,在一定程度上减慢,最好是阻止)肿瘤的转移;在一定程度上,抑制肿瘤的生长;和/或在一定程度上缓解与癌症相关的症状中的一种或多种。在此程度上药物可以阻止生长和/或杀死现有癌细胞,它可能是抑制细胞生长的和/或细胞毒性的。对于癌症治疗,疗效可以被测定,例如,通过评估疾病进展时间(TTP)和/或确定其反应率(RR)。

[0069] 术语“癌症(cancer)”和“癌的(cancerous)”指哺乳动物的一种生理状况,典型特征是细胞生长的失控。“肿瘤”包括一种或多种癌细胞。癌症的实例包括但不限于,癌(carcinoma)、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤及白血病或淋巴系统恶性肿瘤。这些癌症的更具体的例子包括鳞状细胞癌(例如,鳞状上皮细胞癌),包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌(“NSCLC”)、肺腺癌、肺鳞状细胞癌的肺癌,腹膜癌,肝细胞癌,包括胃肠道癌的胃癌,胰腺癌,恶性胶质瘤,宫颈癌,卵巢癌,肝癌,膀胱癌,肝癌,乳腺癌,结肠癌,直肠癌,大肠癌,子宫内膜癌或子宫癌,涎腺癌,肾癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肝癌,肛门癌,阴茎癌,以及头颈癌。

[0070] 在本申请所用的术语“前药”指本发明化合物的前体或衍生物形式,它们与母体化

合物或药物相比具有更低的细胞毒性,能够被水解或酶解地活化成或转换成活性更好的母体形式。本发明的前药包括但不限于,含磷酸酯(phosphate)的前药,含有硫代磷酸酯的前药,含硫酸盐的前药,含肽的前药,D-氨基酸修饰的前药,糖基化的前药,含 $\beta$ -内酰胺的前药,含任选取代的苯氧基乙酰胺的前药,含任选取代的苯基乙酰胺的前药,5-氟胞嘧啶和其他5-氟尿苷的前药,它们可以被转换为活性更好而无细胞毒性的药物。

[0071] “代谢物”指具体的化合物或其盐在体内通过代谢形成的产物。化合物的代谢物可以使用本领域中已知的常规技术来识别,并且其活性可以使用诸如本文所描述的测试方法来测定。此类产品例如可以从给药化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺化、酯化、脱酯化、酶裂解等得到。

[0072] 术语“复杂蛋白质样品”用来将样品与纯化的蛋白质样品区分开来。复杂蛋白质样品含有多种蛋白质,还可能额外含有其他污染物。复杂蛋白质样品的非限制性实例包括:肿瘤组织、活检样品、血清或细胞提取物。

[0073] “参考样品”是指用于比较目的的任何样品、标准或水平。“正常参考样品”可以是取样自同一受试者的先前样品,没有患上癌症的受试者的样品,被诊断出患有癌症但不是转移性疾病的受试者,因癌症或转移性疾病或两者兼有而已被治疗的受试者,具有良性的肿瘤的受试者,或来自一个或多个健康受试者的特殊组织的样品,或来自一个或多个健康受试者的复合(pooled)的组织样品。

[0074] 本文使用的短语“MAT2A的生物活性”或“MAT2A生物活性”,指蛋氨酸腺苷转移酶2A(MAT2A)的所有固有生物学特性。MAT2A的生物学特性包括但不限于:催化ATP的腺苷基团转移到蛋氨酸的硫原子上然后产生S-腺苷蛋氨酸(SAM或甲硫氨酸);涉及在肿瘤细胞中异常细胞的生长和增殖;通过SAM作为甲基供体的功能,促进细胞内的甲基化反应。

[0075] 如本文所使用的术语“标记的”或“可检测地标记的”指将引发物理或化学反应的物质共价地或非共价地连接到本发明的化合物,该物理或化学反应可以通过诸如生物素/链霉亲和素、抗原/抗体的结合配位体,或例如但不限于紫外/可见分光光度计、流式细胞仪、荧光检测仪器等的仪器方式被观察或检测。各种各样的标记物和标记技术在本领域中是众所周知的。合适的标记物包括生物素,放射性核素,如 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ ,酶,底物,辅助因子,抑制剂,荧光基团,化学发光基团,磁性粒子等。

[0076] 短语“结合到”在涉及出于检测目的将本发明的标记的化合物结合到MAT2A时,是指在异质群体的蛋白质和其他生物制剂的存在下,MAT2A的存在所决定的结合反应。因此,结合实验条件下,例如,本发明标记的化合物结合到MAT2A,不以显著数量结合到样品中的其它蛋白质。可以使用各种常规的检测手段,用于检测该标记的化合物与MAT2A的结合,如免疫印迹,流式细胞仪和FACS(荧光活化细胞分选法)分选,免疫组化等。例如参见哈洛(Harlow)、莱恩(Lane),抗体,实验室手册,冷泉港(Cold Spring Harbor)出版物,NY(1988)中例如对免疫印迹或免疫荧光实验的说明。通常情况下,具体的或选择性的结合反应将至少两倍于背景信号或噪声,更典型地大于10至100倍背景。

[0077] 因此,本发明包括本发明的化合物的代谢物,代谢物包括通过这种过程产生的化合物:该过程包括将本发明的化合物与哺乳动物接触一段足以产生它的代谢物的时间。

[0078] 治疗剂

[0079] 本文公开的是卤代芪类似物和它们在减轻过度增殖细胞或治疗与MAT2A活性相关

的疾病或紊乱中的用途。本发明的卤代芪类似物显示出抗肿瘤活性,即,接触该化合物的癌细胞被杀死、损坏和/或肿瘤的生长被抑制。该类似物对于治疗包括大肠癌、肝癌、乳腺癌等的人类癌症是有用的。

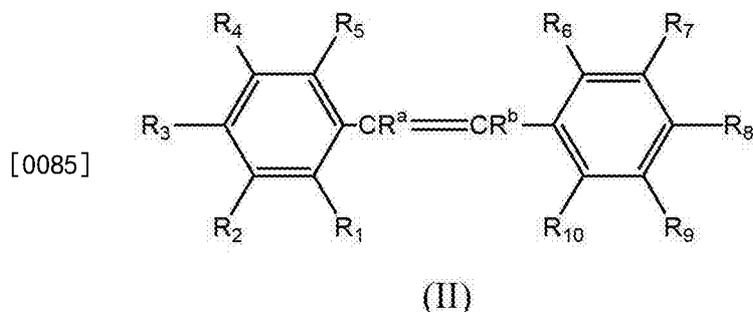
[0080] 本发明的卤代芪类似物包括根据式(I)的化合物:

[0081]  $X-Ar_1-CR^a=CR^b-Ar_2$

[0082] (I)

[0083] 其中 $R^a$ 和 $R^b$ 是独立H、烷基、卤基、烷氧基、氰基;X代表 $Ar_1$ 上的至少一个卤素,例如:氟、氯、溴或碘取代基; $Ar_1$ 和 $Ar_2$ 中的每个是芳基或杂芳基,芳基例如苯基、萘基,杂芳基例如吡啶基、吡咯烷基、哌啶基、嘧啶基、咪唑基、噻吩基,这些基团可以进一步由卤基,氨基,烷基氨基,二烷基氨基,芳基烷基氨基,二烷基氨基的N-氧化物,三烷基氨基,巯基,烷硫基,烷酰基,硝基,亚硝基,氰基,烷氧基,链烯氧基,芳基,杂芳基,磺酰基,磺酰胺,CONR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>,NR<sub>11</sub>CO(R<sub>13</sub>),NR<sub>11</sub>COO(R<sub>13</sub>),NR<sub>11</sub>CONR<sub>12</sub>R<sub>13</sub>取代,其中R<sub>11</sub>,R<sub>12</sub>,R<sub>13</sub>是独立的H,烷基,芳基,杂芳基或氟;提供: $Ar_2$ 在芳环内包含至少一个氮原子或在芳环上包含至少一个氮取代基;例如: $Ar_2$ 上的NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>Z取代基,其中R<sup>c</sup>是H,烷基,烷氧基,芳基,杂芳基,R<sup>d</sup>为烷基基团,Z是非共用电子对,H,烷基,氧。优选地,所述杂芳基基团是单环,其中,该环包括2-5个碳原子和1至3个杂原子,在本文中称为“(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)杂芳基”。本实施例还包括药学上可接受的式(I)的盐和式(I)的生物素化的衍生物。碳-碳双键上的取代基可以是顺式或反式构型。在本发明的一个方面中, $Ar_1$ 上,X为一个、两个或三个氟取代基和/或X是一个、两个或三个氯取代基和/或X代表至少一个氟和至少一个氯。在本发明的另一个方面中,X是一个或多个氟和/或氯并且R<sup>c</sup>为氢或低级烷基,R<sup>d</sup>是低级烷基或其药学上可接受的盐、或其生物素化的衍生物。

[0084] 在另一个实施例中,本发明包括式(II)的化合物:

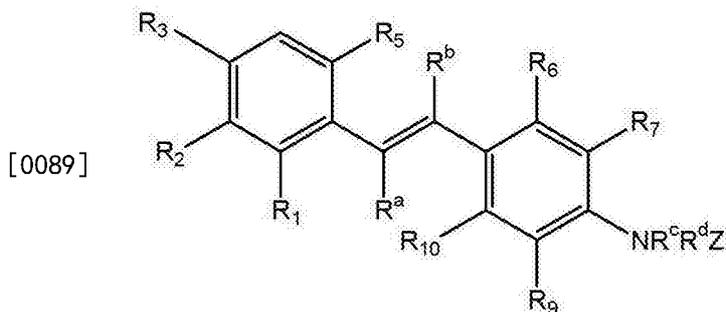


[0086] 其中 $R^a$ 和 $R^b$ 如上述所定义,R<sub>1</sub>至R<sub>10</sub>是独立的H,卤基,氨基,烷基氨基,二烷基氨基,二烷基氨基的N-氧化物,芳基烷基氨基,二烷基氧氨基,三烷基氨基,巯基,烷硫基,烷酰基,硝基,亚硝基,氰基,烷氧基,链烯氧基,芳基,杂芳基,磺酰基,磺酰胺,CONR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>,NR<sub>11</sub>CO(R<sub>13</sub>),NR<sub>11</sub>COO(R<sub>13</sub>),NR<sub>11</sub>CONR<sub>12</sub>R<sub>13</sub>,其中R<sub>11</sub>,R<sub>12</sub>,R<sub>13</sub>是独立的H,烷基,芳基,杂芳基或氟;提供:R<sub>1</sub>至R<sub>5</sub>中的至少一个是卤素,例如氟和/或氯,R<sub>6</sub>至R<sub>10</sub>中的至少一个是含氮取代基,例如,NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>Z取代基,其中R<sup>c</sup>是H,烷基,例如低级烷基、烷氧基、芳基、杂芳基,R<sup>d</sup>为烷基取代基,Z是非共用电子对,H,烷基,氧,或其药学上可接受的盐,或生物素化的衍生物。

[0087] 在本发明的其他实施例中,R<sub>1</sub>至R<sub>5</sub>中的至少一个是氯和/或氟取代基;R<sub>6</sub>至R<sub>10</sub>中的至少一个是NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>Z,其中R<sup>c</sup>是H或低级烷基并且R<sup>d</sup>是低级烷基。在某些实施例中,R<sub>1</sub>至R<sub>5</sub>中的一个、两个或三个为氟或氯基团;而在某些实施例中,R<sub>1</sub>和R<sub>5</sub>中的每个为氟和/或氯基团,例如,R<sub>1</sub>和R<sub>5</sub>是两个氟、两个氯或一个是氟基团一个是氯基团。在另一个实施例中R<sub>1</sub>和R<sub>4</sub>的每

个氟和/或氯基,例如R<sub>1</sub>和R<sub>4</sub>是两个氟、两个氯或一个是氟基团和一个氯基团。

[0088] 本另一个实施例,本发明包括根据式(III)的化合物:



[0090] (III)

[0091] 其中,R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub>,R<sub>5</sub>,R<sub>6</sub>,R<sub>7</sub>,R<sub>9</sub>,R<sub>10</sub>,R<sup>a</sup>,R<sup>b</sup>和NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>Z与上述所定义的相同,或为其药学上可接受的盐,或生物素化的衍生物。在本发明一方面中,R<sup>a</sup>,R<sup>b</sup>都是H,R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>,R<sup>3</sup>,或R<sup>5</sup>中的一个或多个是氟或氯,且R<sup>c</sup>为H或低级烷基,如甲基、乙基、丙基基团,并且R<sup>d</sup>是低级烷基,如甲基、乙基、丙基基团。在本发明的另一个方面中,R<sup>a</sup>,R<sup>b</sup>都是H,R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>,R<sup>3</sup>,或R<sup>5</sup>中的至少两个是氟和/或氯,或其药学上可接受的盐,或其生物素化的衍生物。

[0092] 在本发明的另一个实施例中,卤代的芪类似物是二卤代N,N-二甲氨基苯乙烯,其芳环在2'或3'的位置处具有至少一个氟或氯。在另一个实施例中,芪类似物在2'位置处具有一个氟并在6'位置处具有另一个氟。在另一个实施例中,芪类似物在2'位置处具有一个氟并在6'位置处具有一个氯。在另一个实施例中,芪类似物在2'位置处具有一个氯并在6'位置处具有一个氯。

[0093] 在另一个实施方案中,芪类似物是二卤代N-甲氨基苯乙烯,其中,在2'或3'位置处具有至少一个氟或氯。

[0094] 本发明的特殊的卤代芪类似物的包括:(E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二甲苯胺;(E)-4-(3-氟苯乙烯基)-N,N-二甲苯胺;(E)-4-(4-氟苯乙烯基)-N,N-二甲苯胺;(E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二乙基苯胺;(E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二苯基苯胺;(E)-1-(4-(2-氟苯乙烯基)苯基)-4-甲基哌嗪;(E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基萘基-1-胺;(E)-2-(4-(2-氟苯乙烯基)苯基)-1-甲基-1H-咪唑;(E)-4-(2,3-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,4-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,5-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-2-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-3-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二乙基苯胺;(E)-4-(3,4-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(3,5-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-N,N-二甲基-4-(2,3,6-三氟苯乙烯基)苯胺;(E)-N,N-二甲基-4-(2,4,6-三氟苯乙烯基)苯胺;(E)-4-(2-氯-6-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,6-二氯苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺;(E)-4-(2,6-二氟苯乙基)-N,N-二甲基苯胺和(E)-2-苯甲酰胺-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺。

[0095] 合成

[0096] 本发明的化合物,包括式(I)到式(III)的化合物,可以由本文公开的方法或本领域中已知的任何其他方法制备。本领域的普通技术人员将知道如何修改过程,以获得本发明的类似物。此外,化合物可以使用下面描述的方法及实施例1至3中的方法或者其修改版

本制备。

[0097] 图2是本发明的某些卤代芪类似物的一般合成示意图。本发明的其他卤代芪类似物可以通过类似的方法或鉴于本发明通过本领域中已知的合成方法来制备。例如,如图2所示,维悌希(Wittig)或沃兹沃思-埃蒙斯(Wadsworth-Emmons)反应,分别使用磷盐或二乙基膦酸盐,与醛基一起提供了良好产率的(E)-芪(4)。磷盐由相应的苄基溴和三苯基膦制备,二乙基膦酸盐由相应的苄基溴和亚磷酸三乙酯利用阿尔布佐夫(Arbuzov)反应按文献的标准方法制备。通过燃烧分析对化合物进行了充分表征并确定了纯度(>95%)。

[0098] 术语邻位,间位和对位,是领域公认的术语,指苯的1,2-,1,3-和1,4-二取代。例如,名称1,2-二甲苯和邻二甲苯是同义的。

[0099] 本发明还包括卤代芪类似物的潜在代谢物。这些包括芪类似物,例如,通式(I),(II)或(III),具有发生了氧化而成为N-氧化物的二烷基氨基取代基。在一个实施例中,该化合物是在2'或3'位置处具有至少一个氟或氯的二卤代N,N-二甲氨基苯乙烯。这些潜在的代谢物也包括具有发生了甲基化或去甲基化的N,N-二烷基氨基基团的卤代芪类似物。在一个实施例中,芪类似物是在2'或6'的位置处具有至少一个氟或氯的二卤代N,N,N-三甲氨基苯乙烯卤代物。在一个实施例中,类似物是在2'或3'位置处具有至少一个氟或氯的二卤代N-甲基氨基苯乙烯。在一个实施例中,类似物是在2'或3'位置处具有至少一个氟或氯的二卤代N,N-甲基羟基氨基苯乙烯。

[0100] 本发明还包括卤代芪类似物的生物素化衍生物。这种生物素化的衍生物对于确定这些药物的分子靶点是有用的。式(I),(II)和(III)的芪类似物包含由合成和转化为生物素化的衍生物。保留生物活性的生物素化衍生物被用来确定这些化合物(S-腺苷转移酶)的分子靶点。

[0101] 在本发明的某些实施例中,本发明的卤代芪类似物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药,抑制过度增殖细胞的生长。在本发明的某些实施例中,本发明的卤代芪类似物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药,抑制蛋氨酸腺苷转移酶2A(MAT2A)的活性,并且对治疗与MAT2A相关的疾病或病症有用,例如,维持和/或传播需要MAT2A的疾病和病症。

[0102] 本发明的化合物的代谢物

[0103] 本文所描述的式(I)至式(III)的化合物的体内代谢物也落入本发明的范畴。此类产品例如可从给药的化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺化、酯化、脱酯化、酶裂解等产生。

[0104] 因此,本发明包括式(I)至式(III)的化合物的代谢物,代谢物包括通过这种过程产生的化合物:该过程包括将本发明的化合物与哺乳动物接触一段足以产生它的代谢物的时间。。

[0105] 代谢物一般可通过制备本发明的可检测地标记的化合物来识别,例如本发明的放射性标记(例如,C或H同位素)的化合物,以可检测的剂量(例如,大于约0.5mg/kg)不经肠道将其给药于诸如大鼠、小鼠、豚鼠、猴的动物或给药于人,允许有足够的时间发生代谢(通常为约30秒~30小时),并从尿液,血液或其他生物样品中分离其转换产物。因为产物是可检测地标记的,所以这些产物容易被分离(其他产物通过使用能够结合代谢物尚存的表位的抗体来分离)。使用常规方式确定代谢物的结构,例如,通过MS,LC/MS或NMR分析。在一般情

况下,以与常规的药物代谢研究的分析相同的方式完成对代谢物的分析,对本领域技术人员而言是众所周知的。本发明化合物的代谢物,只要它们不是在体内发现,则治疗剂量对诊断化验是有用的。图3所示的式(I)至(III)的化合物的可能代谢物的实施例根据实施例2合成。

[0106] 本发明化合物的前药

[0107] 除了本发明的化合物,本发明还包括这类化合物药学上可接受的前药。前药包括的化合物,其中氨基酸残基、或两个或更多个(例如,两个,三个或四个)氨基酸残基的多肽链,通过酰胺键或酯键共价结合到本发明化合物的游离氨基、羟基或羧酸基团上。氨基酸残基包括但不局限于20个天然存在的、通常由三个字母符号指定的氨基酸,还包括磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸,磷酸酪氨酸,4-羟基脯氨酸,羟嗪,锁链赖氨酸,异锁链赖氨酸, $\gamma$ -羧基谷氨酸,马尿酸,八氢吡啶-2-羧酸,抑胃酶氨酸,1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸,青霉素,鸟氨酸,3-甲基组氨酸,戊氨酸, $\beta$ -丙氨酸, $\gamma$ -氨基丁酸,瓜氨酸,高半胱氨酸,高丝氨酸,甲基-丙氨酸,对-苯甲酰苯丙氨酸,苯基甘氨酸,炔丙基甘氨酸,肌氨酸,蛋氨酸和叔丁基甘氨酸。

[0108] 还包括其他类型的前药。例如,本发明化合物的游离羧基可以衍生为酰胺或烷基酯。作为另一个例子,含有游离羟基的本发明化合物可以通过将羟基基团转换成如下基团衍生成前药,该基团例如但不限于,磷酸酯,琥珀酸单酯,二甲基氨基乙酸盐,或磷酰氧甲基羰基基团,见先进药物输送评论(Advanced Drug Delivery Reviews),(1996)19:1-15。还包括羟基和氨基基团的氨基甲酸酯前物,它们是碳酸酯前药、羟基基团的磺酸酯和硫酸酯。羟基基团衍生物例如(酰氧基)甲基醚和(酰氧基)乙基醚,其中酰基基团可以用基团任选取代的烷基酯,基团包括但不限于,醚,胺和羧酸官能团,或还包括如上所述的是氨基酸酯的酰基基团。这种类型的前药在药物化学期刊(J. Med. Chem.), (1996), 39:10中有描述。更具体的例子包括用基团替换氢原子,基团如(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)链烷酰氧甲基,1-((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)链烷酰氧基)乙基,1-甲基-1-((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)链烷酰氧基)乙基,(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷氧基羰基氧甲基,N-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷氧基羰基氨基甲基,琥珀酰基,(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)链烷酰基, $\alpha$ -氨基(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)链烷酰基,芳酰基和 $\alpha$ -氨基酰基或 $\alpha$ -氨基酰基- $\alpha$ -氨基酰基,其中每一个 $\alpha$ -氨基基团独立地选自天然存在的L-氨基酸,P(O)(OH)<sub>2</sub>, -P(O)(O(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基)<sub>2</sub>或糖基(基团通过除去碳水化合物中半缩醛形式的羟基基团形成)。

[0109] 更多有关前药衍生物的例子,请参见,例如,a)前药的设计,H·邦加尔德(H. Bundgaard)编著,(爱思唯尔(Elsevier),1985)和酶学方法,42卷,309-396页,K·韦德(K. Widder)等编著(学术出版社(Academic Press),1985);b)药物设计与发展教材,克饶斯尔德-拉森(Krogsgaard-Larsen)和H·邦加尔德编著,第5章“前药的设计与应用”H·邦加尔德编著,113-191页(1991);c)H·邦加尔德,先进药物输送评论,8:1-38(1992);d)H·邦加尔德等,药物科学期刊,77:285(1988);和e)N·拉谷(N. Kakeya)等,化学和药学报,32:692(1984),它们中的每个通过具体引用并入本文。

[0110] 药物组合物

[0111] 本发明还包括药物组合物,该药物组合物包括至少一种卤代芪类似物,例如,一种或多种式(I),式(II)和/或式(III)的化合物,和/或一种或多种与药用载体组合的、根据式(I)、(II)和/或(III)的化合物的药学上可接受的盐。在本发明的一方面中,该药物组合物包

括至少一种卤代芪类似物的有效量。在本发明的另一实施例中,所述药物组合物包括:二卤代N,N-二烷基氨基芪类似物和药学上可接受的载体。

[0112] 尽管本发明的化合物作为原料化学品给药是可能的,但优选地是,将它们作为药物组合物呈现。根据另一方面,本发明提供了一种药物组合物,该组合物含有式(I)到式(III)的一种化合物或多种化合物的混合物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物,以及一个或多个药物载体、赋形剂或添加剂和任选的一种或多种其它治疗成分。该载体必须是在与配方中的其它成分是相容的意义上是“可接受的”,而且对其接受者是无害的。术语“药学上可接受的载体”包括赋形剂和稀释剂。

[0113] 为了制备药物组合物,根据常规的药学化合物技术,可将治疗有效量的一种或多种根据本发明的卤代芪类似物与药学上可接受的载体紧密混合,以产生一个剂量。载体可以采取各种各样的形式,这取决于给药所需的制剂(preparation)形式,如口服、局部或肠胃外,包括凝胶剂、乳剂、软膏、洗剂和时间释放植入制剂、或很多其他的。在制备口服剂型的药物组合物时,可以使用任何常用的药物介质。因此,对于诸如悬浮液、酞剂和溶液的液体口服制剂,可使用合适的载体和添加剂,包括水,乙二醇,油,醇,矫味剂,防腐剂,着色剂等。对于诸如粉剂、片剂、胶囊的固体口服制剂及对于诸如栓剂的固体制剂,可使用合适的载体和添加剂,包括淀粉,糖载体,如葡萄糖、甘露糖醇、乳糖和相关载体,稀释剂,成粒剂,润滑剂,粘合剂,崩解剂等。如果需要,片剂或胶囊可通过标准技术包有肠衣或缓释。

[0114] 在一个实施例中,组合物利用载体制备,载体可保护活性化合物不从体内迅速消除,例如控释剂,包括植入物和微胶囊化的传递系统。可以使用可生物可降解的、生物相容的聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这些配方的方法对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0115] 药学上可接受的载体可以采取多种形式,这取决于所需给药途径,例如,口服或肠胃外(包括静脉内)。在固体口服制剂优于液体制剂时,在诸如粉剂、胶囊和囊片的口服固体制剂的情况下,可使用诸如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂和崩解剂的载体。优选的固体口服制剂是片剂或胶囊剂,因为它们易于给药。如果需要,可以通过标准的水溶性或非水溶性的技术对片剂覆膜。也可使用口服和不经肠道缓释的剂型。

[0116] 脂质体悬浮液也可以是药学上可接受的载体。它们可根据本领域技术人员公知的方法制备。例如,脂质体配方可以这样制备:将适当的脂质溶解在无机溶剂中,该无机溶剂随后蒸发,在容器表面上留下干燥的脂质薄膜。然后将活性化合物的水溶液引入到容器中。然后用手旋转容器,以释放容器的侧面的脂质物质并分散脂质聚集体,由此形成脂质体悬浮液。在本发明的这方面中,还可以使用本领域普通技术人员公知的其它制备方法。

[0117] 在一个实施例中,本发明的组合物能够将式(I)到式(III)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物持续地、连续地输送到与给药部位临近或远离的组织。生物活性剂能够提供一个局部或全身性的生物、生理或治疗的效果。例如,式(I)到式(III)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物,可以起到杀死癌细胞或癌干细胞、或控制或抑制肿瘤的生长或转移的作用,及其他功能等。

[0118] 剂型和给药剂量

[0119] 基于本发明的卤代芪类化合物的药物剂型包括至少一种式(I)到式(III)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物水合物前药或代谢物,以治疗的有效量任选地与药学

上可接受的添加剂、载体和/或赋形剂组合,用于治疗肿瘤、癌症和其他与MAT2A活性有关的疾病和病症,如糖尿病、心脏疾病、老化、肥胖病、阿尔茨海默氏病或帕金森病。本领域的普通技术人员将认识到,根据本发明的一种或多种化合物的治疗有效量将随要治疗病症、它的严重程度、使用的治疗方案、使用的药物的药代动力学以及治疗的患者(动物或人)的不同而不同。

[0120] 本发明的剂型包括那些适合于口服的、不经肠道的(包括皮下、皮内、肌内、静脉内、瘤内和关节内)、直肠和局部的(包括真皮、颊、舌下和眼内)给药,以及通过吸入给药的那些。最合适的途径可能取决于接受者的病症和紊乱。典型的剂型为本领域技术人员所众所周知,并且用于制备它们的一般方法可在任一标准的药学教科书中找到,例如雷明顿(Remington):药剂学的科学与实践,21版,利平科特(Lippincott)。本发明的剂型可以方便地以单位剂量形式呈现,并且可以通过药学领域中公知的任一方法进行制备。所有的方法都包括将化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物(“活性成分”)与一种或多种辅助成分相关联的步骤。一般情况下,通过均匀且紧密地将活性成分与液体载体、或细碎的固体载体、或此两者相关联,然后,如果需要,将产物成形为所需要的剂型。口服剂型对本领域技术人员来说是众所周知的,并且用于制备它们的一般方法可在任一标准的药学教科书中找到,例如,雷明顿:药剂学的科学与实践,21版,其全部内容通过引用合并于此。

[0121] 本发明的活性化合物(即,式(I)至式(III)中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物)在药物组合物中的浓度,将取决于药物的吸收,分布,失活,和药物的排泄率,以及本技术领域技术人员公知的其他因素。应当指出的是剂量值也将随着要减轻的病症的严重程度的不同而不同。组合物可一次给药,或可被分成若干小剂量在不同的时间间隔给药。

[0122] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用的载体。它们可以封装在明胶胶囊中或压成片剂。出于口服治疗给药的目的,活性化合物或其前药衍生物可以与赋形剂混合,并用于片剂、锭剂或胶囊的形式中。药学上相容的粘合剂和/或佐药材料,可作为组合物的一部分包括在内。

[0123] 片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以包含任一下列非限定性的成分或类似性质的化合物:粘合剂,如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,如淀粉或乳糖;分散剂,如藻酸或玉米淀粉;润滑剂,如硬脂酸镁;助流剂如胶态二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;或调味剂,如胡椒薄荷、水杨酸甲酯、或水果香料。当剂量单位形式是胶囊时,除了上述的任何一种之外,它可以包含液体载体,如脂肪油。此外,剂量单位形式可含有各种修饰剂量单位的物理形式的其它材料,例如,糖衣、虫胶或肠溶性药物。

[0124] 片剂例如可任意地被涂覆或刻痕,以及可被调配以提供持续的延迟的或控制释放的活性成分。口服和不经肠道缓释的药物输送系统是本领域技术人员所公知的,例如,在雷明顿:药剂学的科学与实践,21版中,找到了实现口服或肠胃外给药的缓释的一般方法。

[0125] 活性化合物也可以作为酞剂、悬浮液、糖浆、薄片(wafer)等成分被给药。除了活性化合物以外,糖浆可以包含蔗糖或果糖作为甜味剂以及某些防腐剂、染料、着色剂和风味调料。

[0126] 在本发明的某些实施例中,卤代芪类似物与药学上可接受的载体、赋形剂或添加剂作为混合物进行调配。一般情况下,该药物组合物通过口服给药形式给药,但用于很多病

症的治疗时,很多其他的剂型可通过局部的、肠胃外的、静脉内的、肌内的、经皮的、口腔的、皮下的、栓剂的或其它途径,包括眼睛或眼部路线。静脉内和肌肉内制剂一般在无菌生理盐水中给药。当然,本领域的普通技术人员在不致使药物组合物不稳定或损害其治疗活性时,可以在说明书的教导范围内修改剂型以提供众多的用于特定给药途径的剂型。为了控制本发明的化合物的药代动力学对患者达到最大有益效果,还可以在常规技术人员的技能范围内修改特定化合物的给药途径和给药方案。

[0127] 在某些药学剂型中,优选可以是化合物的前药形式。本领域的普通技术人员将认识到如何容易地将本化合物修改为前药形式,以在宿主有机体或患者体内方便输送有效化合物至达靶点部位。在宿主有机体或患者体内将本发明化合物输送到达靶点的过程中,常规技术人员在适当情况下也将充分利用前药形式的良好药代动力学参数,以最大化化合物的预期效果。

[0128] 药物组合物包含任一式(I)至式(III)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物,该药物组合物可通过药学领域公知的任何方法方便地以单位剂量形式方便地呈现和制备。优选的单位剂量制剂是那些包含活性成分的有效剂量或其适宜部分、或其药学上可接受的盐。预防或治疗剂量的大小通常随病症的性质和严重程度及给药的途径的不同而不同。剂量和可能的剂量频率也将根据年龄、体重和每个患者的反应的不同而不同。一般情况下,每日总剂量(以单次或分剂量形式)为每日约0.1mg至约7000mg,或每日约0.1mg至每日约100mg,或每日约10mg至每日约100mg,或从约20mg至约100mg、至约80mg、或至约60mg。在一些实施例中,每日总剂量范围可从每日约10mg至约500mg,或每日约100mg至约500mg。进一步指出的是儿童、65岁以上的患者以及那些肾功能或肝功能受损的,最初接受低剂量,并且基于个体的反应和/或血药浓度确定剂量。在某些情况下,使用超出这些范围的剂量可能是必要的,这对本领域技术人员而言将是显而易见的。此外,应当指出,临床医师或治疗医师知道如何以及何时结合每个患者的反应中断、调整或终止治疗。

[0129] 另外,可以通过例如遵循用于估计最大安全剂量的FDA准则,确定本发明化合物用于成人最初临床试验的最大安全起始剂量。这些准则为使用在动物研究中所用剂量推断在人体试验中使用的安全剂量提供指导。见工业指导(Guidance for industry),在治疗成人健康志愿者的最初临床试验中估计最大安全起始剂量,食品药品监督管理局,药品评价和研究中心(CDER),2005年7月。

[0130] 在一个实施例中,包含在本发明的治疗有效剂型范围内的化合物的量对治疗与MAT2A活性相关的疾病是有效量。通常,以剂型呈现的本发明优选的化合物的有效治疗量通常从稍小于约0.025mg/kg至约2.5g/kg,并在某些实施例中为患者的约2.5至约5mg/kg或约2.5至约100mg/kg或更多,这取决于所使用的化合物、所治疗的病症和给药途径,尽管本发明可以考虑此剂量范围的例外情况。在一些实施例中,本发明的卤代芪类似物的给药量从约0.1mg/kg到约100mg/kg。

[0131] 本发明的活性化合物,即,式(I)至式(III)中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物,以足够的量被包括在药学上可接受的载体或稀释剂中,以向患者提供输送所需指示的有效治疗量,而不会在接受治疗的患者中造成严重的毒性作用。

[0132] 在某些实施例中,活性化合物方便地以任一合适的单位剂量形式给药,包括但不

限于含有1至3000mg的单位剂量、优选为每单位剂量形式中5-500mg的活性成分。10-250mg的口服剂量通常是方便的。

[0133] 给药于患者或者受试者的本发明组合物的实际剂量可通过物理和生理因素决定，例如体重、病症的严重程度、所治疗疾病的类型、先前或并发的治疗干预、患者的自发病和给药途径。在任何情况下，给药的负责人将为每个受试者确定组合中活性成分的浓度以及适宜剂量。

[0134] 在某些实施例中，药物组合物可以包括，例如，至少约0.1%的活性化合物，即，式(I)至(III)中的至少一种化合物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物。在其它实施例中，活性化合物可包括单位重量的约1%至约75%之间、或约5%至约50%之间，例如，可从中推导的任何范围。在其他非限制性实施例中，每次给药，剂量也可包含约1微克/kg/体重、约5微克/kg/体重、约10微克/kg/体重、约50微克/kg/身体重量、约100个毫克/kg/体重、约150毫克/kg/体重、约200毫克/kg/体重、约300毫克/kg/体重、约400毫克/kg/体重、或更多，以及可从中推导的任何范围。在可从此处列出的数值中得到的范围的非限制性实施例中，可在约50毫克/kg/体重到约50微克/kg/体重、或约50微克/kg/体重到约50毫克/kg/体重等的范围内给药。

[0135] 给药途径

[0136] 根据本发明的方法，本发明描述的卤代芪类似物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药，可以经各种形式给药于受试者，如本领域技术人员所理解的，这取决于所选择的给药途径。本发明的活性化合物可通过如下方式给药，例如，口服、不经肠道、颊、舌下、鼻、直肠、贴片、泵、或经皮给药以及相应调配的药物组合物。肠胃外的给药包括静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、肿瘤内、经上皮、鼻腔、肺内、鞘内、直肠和局部给药方式。肠胃外给药可能是在一个选定的时间周期内连续给药。

[0137] 另外，本发明的化合物可能会被并入配方中用于任一给药途径，包括例如，口服、局部和肠胃外，肠胃外包括静脉内、肌内、眼或眼内、腹膜内、口含、经皮给药和以栓剂形式。

[0138] 治疗方法

[0139] 在一个实施例中，本发明涉及一种用于治疗受试者中与MAT2A生物活性有关的疾病的方法，包括向受试者给药以有效量的式(I)、式(II)和/或式(III)的一种或多种化合物的化合物或组合物，和/或一种或多种其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物。

[0140] 在一个实施例中，与MAT2A相关的紊乱是肿瘤和/或癌症。因此，在一个实施例中，本发明还涉及一种用于肿瘤和/或癌症的方法，包括向需要这种治疗的患者给药有效量的一种或多种本发明的卤代芪类似物和/或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物。例如，本发明仔细考虑了治疗各种癌症和其并发症的方法。更具体地，本发明涉及抑制良性和恶性肿瘤(包括恶性肿瘤或癌症)生长的方法，包括将肿瘤暴露在至少一种卤代芪类似物或其药学上可接受的盐或其药学上可接受的组合物的抑制或治疗的有效量或浓度下。本发明仔细考虑对内部的恶性肿瘤的治疗，如眼或眼内癌、直肠癌、结肠癌、宫颈癌、前列腺癌、乳腺癌、肝癌和膀胱癌、与年龄有关的癌症及许多其他的。

[0141] 因此，本发明的化合物和/或组合物用于治疗动物、特别是哺乳动物(包括作为患者人类)是有效的。因此，患有过度增殖性紊乱，特别是癌症、或本文所公开的其他疾病的人

类和其它动物、特别是哺乳动物,可通过对患者给药以有效量的一种或多种根据本发明的卤代芪类似物、或其衍生物或其药学上可接受的盐治疗,以任选的药学上可接受的载体或稀释剂的形式,可单独使用或与其它已知药物(取决于待治疗的疾病)联合使用。根据本发明的治疗也可以将本发明的化合物和/或组合物与其它常规的癌症疗法协同实施,如放射治疗或手术或其他抗癌药剂的给药。

[0142] 在某些实施例中,对于卤代芪类似物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物到细胞或受体组织输送被认为有治疗效果的任何疾病,本发明可在其治疗中找到应用。这类疾病的例子包括过度增殖性疾病和静态恶性疾病。在具体的实施例中,该疾病是过度增殖性疾病,如固体组织或血液细胞的癌症。静态恶性疾病可以由本发明的卤代芪类类似物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物治疗,包括,例如慢性淋巴细胞性白血病。

[0143] 例如,可给药本发明的卤代芪类似物的化合物或组合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物治疗过度增殖性疾病。过度增殖性疾病可能是癌症、平滑肌瘤、腺瘤、脂肪瘤、血管瘤、纤维瘤、癌前病变(如腺瘤样增生和前列腺上皮内瘤样病变)、原位癌、口腔毛状白斑、或牛皮癣。

[0144] 癌症可以是实体瘤、转移癌、或者非转移性癌症。在某些实施例中,癌症可能起源于膀胱,血液,骨,骨髓,脑,乳房,结肠,食道,十二指肠,小肠,大肠,结肠,直肠,肛门,牙龈(gum),头,肾,肝,肺,鼻咽,颈,卵巢,前列腺,皮肤,睾丸,舌头,或子宫。在某些实施例中,癌症是卵巢癌。在特定的方面中,癌症可能是化疗耐药的癌症,即,癌症的折射形式。

[0145] 本发明还包括了涉及改变生理状态的癌症以外的疾病。例如,已表明糖尿病涉及潜在的信号变化,即对胰岛素的抵抗和通过IRS激活下游信号的故障(巴克·D·J(Burks D J),怀特·M·F(White M F),糖尿病2001年2月;50增刊1:S140-5)。同样地,已表明心血管疾病涉及心肌细胞的肥大,其涉及多种途径,如PKC家族(玛赫特·A(Malhotra A),分子细胞生物学报(Mol Cell Biochem)2001年9月;225(1-):97-107)。认为诸如类风湿关节炎的炎症性疾病涉及趋化因子受体和打乱的下游信号(丹布罗西奥·D(D'Ambrosio D),免疫方法期刊(J Immunol Methods)2003年2月;273(1-2):3-13)。

[0146] 在本发明的另一个方面中,提供了一种通过让细胞接触有效量的本发明的卤代芪类似物以扰乱细胞中Wnt信号传导的方法。Wnt信号传导通路描述了复杂的蛋白质网络,以它们在胚胎发育和癌症中的作用而著名,但也涉及成年动物的正常生理过程。权威的Wnt通路涉及一系列当Wnt蛋白结合到Frizzled家族细胞表面受体时发生的活动,导致受体激活Dishevelled家族蛋白,最终导致到达细胞核的 $\beta$ -链蛋白的量的变化。Dishevelled(DSH)是与膜相关的Wnt受体复合物的关键成分,当复合物通过Wnt结合而被激活时,该复合物可抑制包括轴蛋白、GSK-3和APC蛋白的第二蛋白质复合物。轴蛋白/GSK-3/APC复合物通常促进 $\beta$ -链蛋白细胞内信号传导分子的蛋白降解。在该 $\beta$ -链蛋白破坏复合物被抑制之后,细胞质内的一些 $\beta$ -链蛋白得到了稳固,并且一些 $\beta$ -链蛋白能够进入细胞核,与TCF/LEF家族转录因子接触,以促进特异性基因的表达。本发明的这个方面,将细胞与足够量的一种或多种本发明的化合物相接触,以扰乱细胞中的Wnt信号传导。

[0147] 联合治疗

[0148] 本发明的活性化合物,即,一种或多种式(I)、式(II)和/或式(III)的化合物,和/

或一种或多种其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物也能与其他不损害所需功能的活性材料混合,或者与补充所需功能的材料混合,例如其他的抗癌剂,在某些情况下,取决于所需的治疗或目标为,抗生素、抗真菌剂、抗炎、抗病毒化合物或者其它具有明显药理作用的药物。

[0149] 本发明的方法和组合物进一步提供组合疗法,该疗法可加强本发明化合物的治疗或保护作用,和/或增加另一种抗癌疗法或抗过度增生疗法的治疗效果。提供有效结合量的治疗和预防的方法和组合物以达到预期效果,如杀死肿瘤细胞和/或抑制细胞过度增殖。此过程可能涉及将细胞与例如治疗性核酸相接触,如作为第二疗法的化疗药物或作为基因表达的抑制剂。组织、肿瘤或细胞可以与本发明的化合物或组合物以及一个或多个附加的抗癌治疗接触。例如,附加的抗癌治疗可包括化学治疗剂、抗荷尔蒙剂、放射疗法、手术疗法、或免疫治疗。

[0150] 化疗药物的例子包括:烷化剂,如噻替哌和环磷酰胺;烷基磺酸盐,如二甲磺酸丁酯,英丙舒凡和丙酰哌嗪二甲烷磺酸酯的;氮杂环丙烷,如苯并多巴,卡波昆,甲硫氨酸尿多巴(meturedopa)和尿多巴(uredopa);乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(methylamelamines),包括六甲三聚氰胺,三乙烯亚胺三嗪(triethylenemelamine),三乙烯磷酰胺,三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺;内酯(acetogenins)(特别是布拉他辛和布拉它辛酮);喜树碱(包括合成类似物托泊替康);苔藓抑素;卡莉司汀(callystatin),CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);隐藻缩酚酸肽(cryptophycin)(特别是隐藻缩酚酸肽1和隐藻缩酚酸肽8);多拉司他汀;倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);软珊瑚醇(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑制素(spongistatin);氮芥,如苯丁酸氮芥,萘氮芥,氯萘氮芥(chlornaphazine),氯磷酰胺(cholophosphamide),雌氮芥,异环磷酰胺,氮芥(mechlorethamine),盐酸甲氮芥,马法兰,新恩比兴(novembichin),苯芥胆甾醇,泼尼莫司汀,曲洛磷胺,尿嘧啶芥(uracil mustard);亚硝基脲,如卡莫司汀,氯脲霉素,福莫司汀,洛莫司汀,尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,如烯二炔类抗生素(如卡里奇霉素,尤其是卡里奇霉素 $\gamma$ (calicheamicin gammall)和卡里奇霉素 $\Omega$ (calicheamicin omegall));达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;双磷酸盐类,如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素,以及新制癌菌素发色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团,阿克拉霉素(aclacinomysins),放线菌素,氨苄霉素(authrarnycin),重氮丝氨酸,博来霉素,放线菌素,卡柔比星(carabycin),洋红霉素,嗜癌素(carzinophilin),色霉素(chromomycinis),更生霉素(dactinomycin),柔红霉素,地托比星,6-重氮基-5-氧-L-正亮氨酸,阿霉素(包括吗啉代阿霉素,氰基吗啉代-阿霉素,2-吡咯啉并-阿霉素和脱氧阿霉素),表阿霉素,伊索比星,伊达比星,麻西罗霉素,诸如丝裂霉素C的丝裂霉素,霉酚酸,诺加霉素(nogalamycin),橄榄霉素(olivomycins),培落霉素,泡特菲尔霉素(**potfiromycin**),嘌呤霉素,三铁阿霉素(quelamycin),罗多比星,链黑菌素,链脲佐菌素,杀结核菌素,乌苯美司,净司他丁,佐柔比星;抗代谢产物,如氨甲喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸,氨甲喋呤,蝶罗呤,三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨,6-巯基嘌呤,硫咪嘌呤,硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如环胞苷,阿扎胞苷,6-氮杂尿苷,卡莫氟,阿糖胞苷,二脱氧尿苷,脱氧氟尿苷,依诺他滨,氟尿苷;雄激素如卡普睾酮,屈他雄酮丙酸酯,环硫雄醇,美雄烷,睾内酯;抗肾上腺,如氨鲁米特,米托坦,曲洛司坦;叶酸补充

剂,如弗罗林酸(frolinic acid);醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸;二氢嘧啶脱氢酶灭活剂;安吡啶;拜司特巴司(bestrabucil);葱双咪脒;依达曲沙(edatraxate);去氧糖胺(defofamine);秋水仙碱;亚斯醌;依福密辛(elformithine);依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;马缨丹碱(lonidainine);美登素类生物碱,如美登素和美登木素;丙脒脒;米托蒽醌;美化达醇(mopidanmol);硝胺(nitraerine);喷司他丁;蛋氨酸芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸乙肼(podophyllinic acid);2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK多糖复合物);丙亚胺;根霉素;西佐喃;锗螺旋胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素(尤其是T-2毒素,疣孢菌素A(verracurin A),漆斑菌素A和蛇形霉素(anguidine));乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;派泊溴烷;盖西他信(gacytosine);阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类,例如,紫杉醇和多西紫杉醇(doxetaxel);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤,甲氨蝶呤;铂配位复合物,如顺铂,奥沙利铂和卡铂;长春新碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺肖林(novantrone);替尼泊苷;依达曲沙;柔红霉素;氨基蝶呤;卡培他滨;伊班膦酸钠;伊立替康(例如,CPT-1);拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类维生素A,如维甲酸,卡培他滨,顺铂(CDDP),卡铂,甲基苄肼,氮芥,环磷酰胺,喜树碱,异环磷酰胺,美法仑,苯丁酸氮芥,马利兰,亚硝基脲(nitrosurea),更生霉素,柔红霉素,阿霉素,博莱霉素,光辉霉素(plicomycin),丝裂霉素,依托泊苷(VP16),他莫昔芬,雷洛昔芬,雌激素受体结合剂,紫杉酚,紫杉醇,多西紫杉醇,吉西他滨(gemcitabine),长春瑞滨,法尼基蛋白转移酶抑制剂,反铂(transplatinum),5-氟尿嘧啶,长春新碱,长春花碱和氨甲蝶呤和上述提到任意种的药学上可接受的盐、酸衍生物。

[0151] 配方中还包括了调节或者抑制对肿瘤的激素作用的抗激素药物,如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),例如包括,他莫昔芬,雷洛昔芬,

[0152] 屈洛昔芬,A-羟基他莫昔芬,曲沃昔芬,keoxifene,LY1 17018,奥那司酮和托瑞米芬;芳香化酶抑制剂抑制芳香化酶,芳香化酶调节肾上腺中雌激素的生成,例如,4(5)-咪唑,氨鲁米特,醋酸甲地孕酮,依西美坦,福美西坦,法偈唑,伏氯唑,来曲唑和阿那曲唑;抗雄激素,如氟他胺,尼鲁米特,比卡鲁胺,亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是在牵涉到抑制异常型(abherent)细胞增殖的信号传导路径中抑制基因表达的那些反义寡核苷酸,例如,PKC- $\alpha$ ,RaIF和H-Ras;核酶,如血管内皮生长因子表达抑制剂和HER2表达抑制剂;疫苗,如基因治疗疫苗和上述任意种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0153] 在一实施例中,本文列出了治疗制剂或组合物,包括一种或多种式(I)、式(II)和/或式(III)的化合物,和/或一种或多种其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物,该治疗制剂或组合物可以在第二种抗癌治疗前、治疗过程中、治疗之后给药,或者在和第二种抗癌治疗相关的各种组合中给药。给药可能会有从同时到几分钟、几天、几周的时间间隔。在包含组合物的卤代苾与额外的抗癌药物分别的提供给患者的实施例中,通常应该确保每次送药之间不超过重要的时间段,这样这两种药物对患者仍将发挥出联合的有益效果。在这种情况下,可以设想,可以在大约每12至24或72小时内,更优选的,在约每6-12小时内向患者提供基因表达治疗和抗肿瘤治疗的抑制剂。在每次给药之间流逝数天(2,3,4,

5,6或7)到数周(1,2,3,4,5,6,7或8)的一些情况下,显著延长治疗时间周期也是可取的。

[0154] 在一天之内(24小时周期),患者被给予一次或多次的药物给药。而且,一个疗程后,预期在一段时期内不进行抗癌治疗。这段时间内,可能会持续1,2,3,4,5,6,7天,和/或1,2,3,4,5周,和/或1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12个月或以上,这取决于患者的病情,例如预后,强度,健康等

[0155] 本发明给予患者的任何化合物或治疗,将毒性(如果药物有的话)考虑在内,将遵循这些化合物给药的一般原则。因此,在一些实施例中,存在监测毒性的步骤,这归因于联合治疗。预计将根据需要重复治疗周期。还预计各种标准疗法、以及辐射和外科手术可与所描述的治疗联合应用。

[0156] 在特定的方面中,预计标准治疗将包括化疗、放疗、免疫疗法、手术疗法或基因疗法,并能与本文所描述的联合疗法联合采用。

[0157] “制品”

[0158] 在本发明的另一实施例中,提供了制品,或“试剂盒”,包含可用于治疗上述提到的疾病和紊乱的材料。在一个实施例中,所述试剂盒包括容器,所述容器包含至少一种式(I)-(III)的化合物,和/或一种或多种其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药或代谢物。

[0159] 所述试剂盒可进一步包括在容器上或与容器相关联的标签或药品说明书。术语“药品说明书”是用来指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明,包含关于使用这种治疗产品的有关适应症、用法、用量、给药、禁忌症和/或警告。合适的容器例如包括,瓶子、药水瓶、注射器、罩板包装等。容器可由诸如玻璃或塑料的各种材料形成。可以保存式(I)-(III)的化合物或其制剂的容器对于治疗病症是有利的,并且可以有一个无菌进入孔(例如,容器可以是静脉注射溶液袋或是可通过皮下注射针头刺破的具塞小瓶)。组合物中至少一种活性药物是式(I)-(III)的化合物。标签或药品说明书指明所述组合物用于治疗所选择的病症,例如癌症。

[0160] 在一个实施例中,试剂盒包括两种单独的药物组合物:一种包含本发明的化合物,第二种为药物化合物。在另一个实施例中,试验或诊断试剂盒包括本发明的标记化合物和一种或多种必要的试剂,该试剂用于在标记化合物在体内或体外结合到靶点时检测该标记化合物。在一个相关的实施例中,该试剂盒包括描述开展检测试验必要步骤的药品说明书。

[0161] 在另一个实施例中,本发明的试剂盒还包括针或注射器,优选以无菌形式包装,用于注射组合物,和/或包装酒精垫。可选的包括说明,用于临床医生或患者给药卤代芪化合物。

[0162] 诊断方法和诊断探针

[0163] 本发明的另一个方面提供了具有通式(I)-(III)的化合物,该化合物具有连接部分(疏水性连接子、亲水性连接子、光可裂解(photo-cleavable)连接子,反应可裂解(reaction-cleavable)连接子),其中,所述连接部分与标记分子共价键结合(标记可以是荧光物质、生物素、不同的聚合物磁珠和不同的反应性基团)。在图4中已经描述了典型的生物素化的类似物,根据如下的实施例3合成。

[0164] 本发明的化合物在生物素化后,为复杂样品中非放射性检测和MAT2A定量提供合适的方法,它提供一种相对于常规使用的辐射试验更有效的替代方法。因此,本发明的另一个方面涉及使用生物素化的芪类似物作为诊断试剂,用于检测或监测复杂蛋白样品中

MAT2A的存在或水平。复杂蛋白质样品含有多种蛋白质,可能还含有其他污染物。复杂蛋白质样品的非限制性实施例包括肿瘤组织、活检、血清和细胞提取物。

[0165] 在一个实施例中,本发明涉及一种检测、监测或分析复杂蛋白质样品中MAT2A水平的方法,所述方法包括在一定条件下,添加标记的式(I)-(III)的化合物到所述复杂蛋白质混合物中,由此所述标记的化合物共价共轭到MAT2A;通过合适的基于亲和的分离方法分离共轭的MAT2A,除去未结合的蛋白,在分离后检测MAT2A的水平。在一相关实施例中,可以通过测量从式(I)-(III)的化合物发出的荧光信号来完成该检测。在另一相关实施例中,可以通过测量经由连接子结合到式(I)-(III)的化合物的标记发出的荧光信号完成检测。也可以使用本领域技术人员公知的多种分离和分析复杂的蛋白质混合物分析步骤来完成检测步骤。这些分析方法包括色谱法,例如HPLC(高效液相色谱法)、FPLC(快速蛋白液相色谱法),离子交换法,分子筛法,质谱法,诸如此类。

[0166] 本发明的可用于将可检测的标记附加到化合物中的连接子部分可以是图4中任一的连接子。可替代地,连接子部分可以是包括重复的亚烷结构(聚乙二醇,或“PEG”)的连接子部分。因此,本领域技术人员可以选择本发明的化合物的连接子部分,以提供他们对于MAT2A的附加的专属性。

[0167] 除别的之外,连接子部分包括:醚、聚醚、二胺、醚二胺、聚醚二胺、酰胺、聚酰胺、聚硫醚、二硫化物、硅醚、烷基或烯基链(直链或支链,并且它们的一些部分可以是环状的)芳基、二芳基或烷基-芳基基团,具有0到3个不饱和脂肪位。虽然氨基酸和寡肽通常不是优选的,但在使用时,它们通常会采用2-3个碳原子的氨基酸,也就是甘氨酸和丙氨酸。在连接子部分中的芳基基团可以含有一个或多个杂原子(如N,O或S原子)。上面提到的原子的数量,在提到一个基团中的原子的数量时不包括氢,除非另有注明。所述连接子部分在不只有一个键时,将具有约1-60个原子,通常是1-30个原子,其中,原子包括C、N、O、S、P等,特别是C、N、O,并且一般将具有约1-12个碳原子和约0-8个、通常为0-6个的杂原子。

[0168] 在一个实施例中,可取的是具有连接到本发明化合物的可检测的标记,以允许化合物-MAT2A复合物被反应混合物中其他组份捕获或洗掉。标记将通常在约1kDa以下。生物素是常规的标记或配位体,尤其是如脱硫生物素和脱亚氨基生物素的类似物,其可以很容易地被生物素从链霉亲和素中偏离。然而,在便利的条件下任何小分子将足以被捕获和释放。

[0169] 生物分子(例如蛋白质)的亲和纯化在本领域中是公知的,允许通过利用目标分子的对分子结合配位体的结合亲和力来纯化分子。亲和纯化方法的例子有融合标签蛋白质的纯化、抗生物素蛋白-生物素系统、下拉试验,诸如此类。

[0170] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种受试者癌症诊断的方法,包括:(1)从结合化合物并检测样品中MAT2A蛋白的患者中获得与复杂蛋白质样品中的蛋白质接触的标记的式(I)-(III)的化合物;(2)将样品中MAT2A水平与正常参考值进行比较,由此,如果样品中MAT2A水平显著高于正常参考值,表明诊断为癌症。在一个相关实施例中,活检样品包括,例如,选自乳腺癌,前列腺癌,结肠癌,肺癌,结肠癌,膀胱癌,头和颈,肠,卵巢癌,或皮肤癌细胞的癌细胞。

[0171] 在另一个实施例中,本发明涉及一种识别接受用本发明的化合物治疗的受试者的候选者;所述方法包括(1)从受试者中获得蛋白样品,(2)将可检测地标记的式(I)-(III)的

化合物与样品中结合MAT2A的蛋白质接触,并检测所述样品中MAT2A的水平;及(3)将样品中MAT2A水平与正常参考值进行比较,由此,如果样品中MAT2A水平显著高于正常参考样值,则表明本发明的一种或多种化合物具有用于治疗的首选资格。在一个相关的实施例中,蛋白质样品是活检样品,组织样品,血清样品,尿样品和诸如此类的。如果有必要,传统的工具如蛋白分离试剂盒可用于从原料活检,组织,血液或尿液样品中获得蛋白质样品。在另一个相关的实施例中,标记物是生物素化的式(I)-(III)的化合物。

## 实施例

[0172] 下面的实施例意图进一步说明本发明的某些优选实施例,在本质上并不是限制性的。采用不超过常规的实验方法,本领域技术人员将确认、或能够确定本文中描述的具体物质和步骤的众多等同物。

[0173] 实施例1

[0174] 芪类似物的合成

[0175] 材料与方法:化学药品均购自西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)、MP生物医学(MP Biomedical)公司(4c)或梯希爱公司(TCI)(4d)或根据文献步骤合成。使用的从商业供应商得到的溶剂,除非另有说明,无需进一步纯化。核磁共振光谱确定为使用瓦里安(Varian)仪器( $^1\text{H}$ ,400兆赫; $^{13}\text{C}$ ,100兆赫,除非另有说明)测定。LRMS电子轰击(EI,electron impact)电离质谱在ThermoFinnigan PolarisQ(离子阱质谱仪)上记录为70eV。样品经由可加热的直探入口进入。高分辨率电子轰击(EI)电离质谱在JEOL JMS-700T MStation(扇形磁场仪器)上记录为25eV,分辨率大于10,000。样品经由可加热的直探入口进入。使用全氟煤油(pfk)产生参考质谱。使用DHB(2,5-二羟基苯甲酸)基质,在Bruker Utraflexstreme-飞行时间质谱仪(Billerica,MA)上获得MALDI质谱。通过燃烧分析建立的化合物的纯度>95%。元素分析通过大西洋微观实验室(Atlantic Microlabs)有限公司,佐治亚州诺克斯市(Norcross,GA)测定。除非另有说明,化合物通过制备板Merck硅胶F254进行色谱分离。

[0176] 一般步骤A。 $-78^\circ\text{C}$ 下,在悬浮有1.5mmol的三苯基溴化磷的4ml无水THF中加入2.25mmol(1.5当量)的正丁基锂(溶于1.6M己烷中)。参见图2的用于该反应的一般原理图。允许将该混合溶液加热至 $25^\circ\text{C}$ ,30分钟,并加入溶有2.25mmol乙醛的1ml无水THF。搅拌该混合溶液24小时,用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 稀释,用饱和的 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 溶液洗涤,然后用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥。如下列每个芪中所指出的,产物通过色谱法和/或重结晶纯化。

[0177] 一般步骤B。 $0^\circ\text{C}$ 下,在含有1.5mmol二乙基膦酸盐的4ml无水DMF中加入2.25mmol(1.5当量)的NaH(用己烷洗涤以除去油)。参见图2的用于该反应的一般原理图。搅拌该混合溶液20分钟,并逐滴加入含有1.5mmol乙醛的1ml无水DMF。 $25^\circ\text{C}$ 下,搅拌该混合溶液24小时,用冰水骤冷,用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 萃取,并用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥。如下列每个芪中所指出的,产物通过色谱法和/或重结晶纯化。

[0178] (E)-4-羟基芪(4a)的合成。 $-10^\circ\text{C}$ 下,在含有210mg(1mmol)(E)-4-甲氧基芪(4b)的7ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中加入1.28ml含有1M  $\text{BBr}_3$ 的二氯甲烷。 $-5^\circ\text{C}$ 下,搅拌混合溶液4小时,倒入冷水中骤冷。产物用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 萃取,经无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥,并用1:10 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 进行色谱分离,得到85mg(43%)的4a。熔点 $184-185^\circ\text{C}$ 。

[0179] (E)-4-甲氧基芪(4b)的合成。步骤B,产率87%。无色晶体:熔点 $136-137^\circ\text{C}$ 。

[0180] (E)-4-(2-氟苯烯基)-N,N-二甲基苯胺(4e)的合成。步骤B,产率84%。从乙腈中析出淡黄色晶体。熔点124-126℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 7.73-7.68(m,1H),7.46(d,2H,J=8.8Hz),7.26-7.09(m,4H),7.08(d,1H,J=16.8Hz),6.75(d,2H,J=9.2Hz),2.98(s,6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 160.18(d,J=245.9Hz),150.85,131.67(d,J=4.6Hz),128.08(d,J=8.4Hz),127.93(两个碳),126.8(d,J=4.5Hz),126.14(d,J=12.1Hz),125.46,124.59(d,J=3.1Hz),115.64(d,J=22.0Hz),115.49(d,J=4.6Hz),112.44(两个碳),39.69(两个碳)。MS:m/z(%)241(100),240(74),225(32),197(20),196(20),177(18),176(13)。C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FN的分析计算值:C,79.64;H,6.68。测定值:C,79.77;H,6.80。

[0181] (E)-4-(3-氟苯烯基)-N,N-二甲基苯胺(4f)的合成。步骤B,产率65%。从乙腈中析出淡黄色晶体。熔点147-148℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 7.42(d,2H,J=8.4Hz),7.35-7.25(m,3H),7.17(d,1H,J=16.4Hz),6.96(d,1H,J=16.8Hz),6.93-6.88(m,1H),6.72(d,2H,J=8.8Hz),2.95(s,6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 163.47(d,J=241.4Hz),150.82,141.36(d,J=7.6Hz),130.66,130.42(d,J=8.4Hz),127.97(两个碳),125.22,122.63(d,J=2.2Hz),122.24(d,J=2.2Hz),113.12(d,J=21.3Hz),112.43(两个碳),111.96(d,J=22.0Hz),39.69(两个碳)。MS:m/z(%)241(100),240(69),225(25),197(20),196(18),177(16),176(10)。C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FN的分析计算值:C,79.64;H,6.68。测定值:C,79.86;H,6.67。

[0182] (E)-4-(4-氟苯烯基)-N,N-二甲基苯胺(4g)的合成。步骤B,产率64%。从乙腈中析出淡黄色晶体。熔点197-198℃。C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FN的分析计算值:C,79.64;H,6.68。测定值:C,79.85;H,6.64。

[0183] (E)-4-(2-氟苯烯基)-N,N-二乙基苯胺(4g)的合成。步骤B,产率51%。从己烷中析出淡黄色晶体。熔点78-79℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 7.69-7.65(m,1H),7.40(d,2H,J=8.8Hz),7.24-7.08(m,4H),7.04(d,1H,J=16.4Hz),6.71(d,2H,J=8.8Hz),3.42(q,4H,J=7.2Hz),1.16(t,6H,J=7.2Hz)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 160.13(d,J=242.2Hz),148.04,131.73(d,J=4.5Hz),128.24(两个碳),127.91(d,J=7.6Hz),126.70(d,J=4.5Hz),126.27(d,J=11.4Hz),124.57(d,J=3.8Hz),124.49,115.62(d,J=22.0Hz),114.82(d,J=3.8Hz),111.76(两个碳),44.19(两个碳),12.21(两个碳)。MS:m/z(%)269(34),255(19),254(100),226(22),225(20),197(16),196(17)。C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>FN的分析计算值:C,80.26;H,7.48。测定值:C,80.07;H,7.61。

[0184] (E)-4-(2-氟苯烯基)-N,N-二苯基苯胺(4i)的合成。步骤B,产率60%。从己烷中析出淡黄色晶体。熔点114-115℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 7.77-7.73(m,1H),7.54(d,2H,J=8.4Hz),7.34-7.06(m,15H),7.02(d,2H,J=8.8Hz)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 160.39(d,J=245.9Hz),148.00,147.73,131.58,130.87(d,J=4.5Hz),129.63,128.90(d,J=8.3Hz),127.88,127.23(d,J=3.8Hz),125.58(d,J=12.0Hz),124.75,124.71,123.53,123.25,118.78(d,J=3.8Hz),115.76(d,J=22.0Hz)。MS:m/z(%)365(100),364(12),254(13)。C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>FN的分析计算值:C,85.45;H,5.52。测定值:C,85.59;H,5.69。

[0185] (E)-1-(4-(2-氟苯烯基)苯基)-4-甲基哌嗪(4j)的合成。步骤B,产率65%。从乙腈中析出淡黄色晶体。熔点142-144℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 7.72-7.69(m,1H),7.48(d,2H,J=8.8Hz),7.28-7.09(m,5H),6.96(d,2H,J=8.8Hz),3.22(t,4H,J=5.2Hz),2.48(t,4H,J=5.2Hz),2.54(s,3H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 160.27(d,J=245.2Hz),151.59,131.34(d,J=

5.3Hz), 128.42(d, J=8.4Hz), 127.97, 127.81(两个碳), 126.98(d, J=3.8Hz), 125.90(d, J=12.1Hz), 126.62(d, J=3.8Hz), 116.85(d, J=3.8Hz), 115.69(d, J=22.0Hz), 115.46(两个碳), 55.09(两个碳), 48.34(两个碳), 45.70。MS:m/z(%) 296(100), 281(42), 226(24), 211(46), 197(28), 196(42), 177(28)。C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>2</sub>的分析计算值:C, 77.00; H, 7.14。测定值:C, 77.22; H, 7.49。

[0186] (E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基-1萘胺(4k)的合成。步骤B, 产率18%。从己烷:乙醚中析出黄色晶体。熔点56-58℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): δ8.33-8.27(m, 2H), 8.09(d, 1H, J=16.4Hz), 7.95-7.91(m, 1H), 7.80(d, 1H, J=8.0Hz), 7.58-7.52(m, 2H), 7.36-7.15(m, 4H), 7.28(d, 1H, J=16.4Hz), 2.90(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMRm(丙酮-d<sub>6</sub>): δ160.49(d, J=246.7Hz), 151.66, 132.85, 129.41, 129.10(d, J=8.4Hz), 128.92, 128.38(d, J=4.6Hz), 127.67(d, J=3.8Hz), 126.27, 125.78(d, J=12.2Hz), 125.17, 124.92, 124.74(d, J=3.0Hz), 124.25, 124.03, 121.75(d, J=3.8Hz), 115.78(d, J=22.0Hz), 114.19, 44.62。MS:m/z(%) 291(100), 290(28), 276(70), 261(40), 247(22), 246(15)。C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>FN的分析计算值:C, 82.45; H, 6.23。测定值:C, 82.42; H, 6.22。

[0187] (E)-2-(4-(2-氟苯乙烯基)苯基)-1甲基-1H-咪唑(4l)的合成。步骤B, 产率47%。从己烷中析出无色晶体。熔点60-61℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): δ7.82-7.78(m, 1H), 7.65(d, 1H, J=16.0Hz), 7.35-7.29(m, 1H), 7.26(d, 1H, J=16.0Hz), 7.22-7.13(m, 2H), 7.08(d, 1H, J=1.2Hz), 6.96(d, 1H, J=0.8Hz), 3.81(s, 3H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): δ160.65(d, J=246.7Hz), 145.39, 129.53(d, J=8.3Hz), 128.89, 127.66(d, J=3.0Hz), 124.98(d, J=11.4Hz), 124.71(d, J=3.8Hz), 122.73(d, J=3.8Hz), 122.18, 116.99(d, J=5.3Hz), 115.83(d, J=22.0Hz), 32.04。MS:m/z(%) 202(17), 201(59), 186(20), 183(100), 168(25), 146(16), 128(17)。C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>的分析计算值:C, 71.27; H, 5.48。测定值:C, 71.24; H, 5.61。

[0188] (E)-4-(2,3-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4m)的合成。步骤A, 产率88%。黄色晶体。熔点132-133℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): δ7.50-7.43(m, 3H), 7.24(d, 1H, J=16.4Hz), 7.16-7.07(m, 2H), 7.03(d, 1H, J=16.4Hz), 6.73(d, 2H, J=8.8Hz), 2.96(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): δ151.09, 151.02(dd, J<sub>1</sub>=243.6Hz, J<sub>2</sub>=12.9Hz), 147.87(dd, J<sub>1</sub>=246.3Hz, J<sub>2</sub>=12.9Hz), 133.18(d, J=5.3Hz), 128.19(两个碳), 124.95, 124.56(dd, J<sub>1</sub>=7.6Hz, J<sub>2</sub>=4.5Hz, 两个碳), 121.78(t, J=3.0Hz), 114.65(d, J=17.4Hz), 114.24(t, J=3.8Hz), 112.38(两个碳), 39.64(两个碳)。MS:m/z(%) 259(100), 258(78), 243(25), 214(16), 195(16)。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 74.11; H, 5.83。测定值:C, 74.01; H, 5.71。

[0189] (E)-4-(2,4-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4n)的合成。步骤B, 产率58%。从乙腈中析出黄色晶体。熔点139-140℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): δ7.78-7.72(m, 1H), 7.44(d, 2H, J=8.4Hz), 7.17(d, 1H, J=16.4Hz), 7.04-6.97(m, 3H), 6.75(d, 2H, J=9.2Hz), 2.98(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): δ161.65(dd, J<sub>1</sub>=245.2Hz, J<sub>2</sub>=12.1Hz), 160.00(dd, J<sub>1</sub>=248.6Hz, J<sub>2</sub>=12.1Hz), 150.87, 131.54(dd, J<sub>1</sub>=4.5Hz, J<sub>2</sub>=2.3Hz), 127.89(两个碳), 125.34, 122.84(dd, J<sub>1</sub>=12.1Hz, J<sub>2</sub>=3.8Hz), 114.56(t, J=1.6Hz), 112.43(两个碳), 111.73(dd, J<sub>1</sub>=21.3Hz, J<sub>2</sub>=3.8Hz, 两个碳), 103.85(t, J=26.2Hz), 39.68(两个碳)。MS:m/z(%) 259(100), 258(71), 243(30), 215(15), 195(14)。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 74.11; H, 5.83。测定值:C, 74.25; H, 5.77。

[0190] (E)-4-(2,5-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4o)的合成。步骤A, 产率77%。黄色

晶体。熔点146-147℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.51-7.46(m, 3H), 7.28(d, 1H, J=16.4Hz), 7.18-7.12(m, 1H), 7.03(d, 1H, J=16.4Hz), 7.00-6.95(m, 1H), 6.76(d, 2H, J=8.8Hz), 2.99(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ159.28(dd, J=236.0Hz), 156.22(dd, J=241.4Hz), 151.09, 133.04(d, J=3.8Hz), 128.21(两个碳), 124.94, 116.97(dd, J<sub>1</sub>=25.5Hz, J<sub>2</sub>=9.6Hz, 两个碳), 114.08(dd, J<sub>1</sub>=24.7Hz, J<sub>2</sub>=8.7Hz, 两个碳), 112.38(两个碳), 112.12(d, J=4.5Hz), 39.64(两个碳)。MS:m/z(%)259(100), 258(84), 243(29), 215(18), 195(17)。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 74.11; H, 5.83。测定值:C, 74.63; H, 5.90。

[0191] (E)-2-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4p)的合成。步骤B, 产率92%。黄色油状。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.78(d, 1H, J=16.8Hz), 7.65(dd, 1H, J<sub>1</sub>=7.6Hz, J<sub>2</sub>=1.6Hz), 7.36-7.26(m, 2H), 7.12-7.03(m, 5H), 2.74(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ161.06(dd, J<sub>1</sub>=242.2Hz, J<sub>2</sub>=7.6Hz, 两个碳), 152.77, 133.81(t, J=8.0Hz), 131.25, 129.19, 128.59(t, J=11.0Hz), 126.72, 122.65, 118.46, 115.31(t, J=15.6Hz), 113.84, 111.92(dd, J<sub>1</sub>=19.4Hz, J<sub>2</sub>=6.8Hz, 两个碳), 44.31(两个碳)。MS:m/z(%)259(100), 258(14), 132(8)。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 74.11; H, 5.83。测定值:C, 74.38; H, 5.79。

[0192] (E)-3-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4q)的合成。步骤B, 产率53%。从己烷中析出无色晶体。熔点69-71℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.38(d, 1H, J=16.8Hz), 7.33-7.26(m, 1H), 7.21-7.18(m, 1H), 7.11(d, 1H, J=17.2Hz), 7.07-7.00(m, 2H), 6.93-6.91(m, 2H), 6.72-6.69(m, 1H), 2.96(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ161.03(dd, J<sub>1</sub>=248.2Hz, J<sub>2</sub>=7.6Hz, 两个碳), 151.38, 138.03, 136.83(t, J=8.0Hz), 129.46, 128.70(t, J=11.0Hz), 114.87(t, J=16.0Hz), 114.81, 114.09, 112.98, 111.91(dd, J<sub>1</sub>=19.4Hz, J<sub>2</sub>=6.5Hz, 两个碳), 111.21, 39.93(两个碳)。MS:m/z(%)259(100), 258(52), 239(31), 238(33), 223(16), 222(37)。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 74.11; H, 5.83。测定值:C, 74.30; H, 5.78。

[0193] (E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4r)的合成。步骤B, 产率94%。从己烷中析出淡黄色晶体。熔点112-113℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.45(d, 2H, J=8.4Hz), 7.35(d, 1H, J=16.8Hz), 7.27-7.20(m, 1H), 7.01-6.98(m, 2H), 6.91(1H, d, J=16.8Hz), 6.75(d, 2H, J=9.2Hz), 2.98(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ160.82(dd, J<sub>1</sub>=247.9Hz, J<sub>2</sub>=8.0Hz, 两个碳), 151.10, 135.99(t, J=8.3Hz), 127.97(两个碳), 127.57(t, J=11.3Hz), 125.41, 115.50(t, J=16.0Hz), 112.40(两个碳), 111.79(dd, J<sub>1</sub>=19.0Hz, J<sub>2</sub>=6.8Hz, 两个碳), 109.73, 39.65(两个碳)。MS:m/z(%)259(100), 258(71), 243(25), 195(11)。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 74.11; H, 5.83。测定值:C, 74.08; H, 5.79。

[0194] (E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二乙基苯胺(4s)的合成。步骤B, 产率57%。从己烷中析出黄色晶体。熔点70-71℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.43(d, 2H, J=8.4Hz), 7.34(d, 1H, J=16.8Hz), 7.27-7.20(m, 1H), 7.01-6.98(m, 2H), 6.89(d, 1H, J=16.8Hz), 6.72(d, 2H, J=8.8Hz), 3.43(q, 4H, J=7.2Hz), 1.16(t, 6H, J=7.2Hz)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ160.80(dd, J<sub>1</sub>=247.1Hz, J<sub>2</sub>=8.0Hz, 两个碳), 148.30, 136.07(t, J=8.3Hz), 128.29(两个碳), 127.37(t, J=10.6Hz), 124.45, 115.62(t, J=16.0Hz), 111.78(dd, J<sub>1</sub>=19.0Hz, J<sub>2</sub>=6.8Hz, 两个碳), 111.73(两个碳), 109.07, 44.20(两个碳), 12.20(两个碳)。MS:m/z(%)287(44), 272(100), 244(21), 243(15)。C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 75.24; H, 6.66。测定值:C, 75.12; H, 6.79。

[0195] (E)-4-(3,4-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4t)的合成。步骤A, 产率59%。从己

烷中析出黄色晶体。熔点159-160℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.50-7.44(m, 1H), 7.41(d, 2H, J=8.8Hz), 7.32-7.28(m, 1H), 7.27-7.20(m, 1H), 7.11(d, 1H, J=16.0Hz), 6.92(d, 1H, J=16.4Hz), 6.71(d, 2H, J=8.8Hz), 2.95(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ150.82, 150.56(dd, J<sub>1</sub>=243.9Hz, J<sub>2</sub>=12.9Hz), 148.99(dd, J<sub>1</sub>=244.3Hz, J<sub>2</sub>=12.9Hz), 130.55(d, J=3.0Hz), 127.91(两个碳), 125.16, 122.71(d, J=6.1Hz), 122.68(d, J=6.1Hz), 121.68(d, J=2.3Hz), 117.49(d, J=17.4Hz), 113.96(d, J=17.5Hz), 112.43(两个碳), 39.68(两个碳)。MS:m/z(%)259(100), 258(82), 243(36), 215(22), 195(16)。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 74.11; H, 5.83。测定值:C, 74.24; H, 5.79。

[0196] (E)-4-(3,5-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4u)的合成。步骤A, 产率51%。黄色晶体。熔点136-137℃。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 74.11; H, 5.83。测定值:C, 74.38; H, 5.70。

[0197] (E)-N,N-二甲基-4-(2,3,6-三氟苯乙烯基)苯胺(4v)的合成。步骤B, 产率45%。从己烷中析出浅黄色晶体。熔点91-92℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.48(d, 2H, J=9.2Hz), 7.39(d, 1H, J=16.8Hz), 7.22-7.14(m, 1H), 7.06-7.00(m, 1H), 6.89(d, 1H, J=16.8Hz), 6.76(d, 2H, J=8.0Hz), 3.00(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ156.09(ddd, J<sub>1</sub>=243.9Hz, J<sub>2</sub>=5.3Hz, J<sub>3</sub>=2.4Hz), 151.31, 147.94(m, 两个碳), 137.17(t, J=8.4Hz), 128.23(两个碳), 124.89, 117.43(dd, J<sub>1</sub>=17.1Hz, J<sub>2</sub>=12.1Hz), 114.02(dd, J<sub>1</sub>=19.4Hz, J<sub>2</sub>=10.2Hz), 112.33(两个碳), 111.21(ddd, J<sub>1</sub>=25.5Hz, J<sub>2</sub>=7.6Hz, J<sub>3</sub>=3.8Hz), 108.99, 39.59(两个碳)。MS:m/z(%)277(100), 276(83), 261(24), 214(16), 213(12)。C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N的分析计算值:C, 69.30; H, 5.09。测定值:C, 69.50; H, 4.97。

[0198] (E)-N,N-二甲基-4-(2,4,6-三氟苯乙烯基)苯胺(4w)的合成。步骤B, 产率63%。从己烷中析出浅黄色晶体。熔点127-128℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.45(d, 2H, J=8.8Hz), 7.29(d, 1H, J=16.8Hz), 6.91(t, 2H, J=8.8Hz), 6.83(d, 1H, J=16.8Hz), 6.75(d, 2H, J=8.8Hz), 2.99(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ160.87(m, 三个碳), 151.09, 135.59(m, 两个碳), 127.95(两个碳), 125.25, 112.39(两个碳), 108.80, 100.65(dd, J<sub>1</sub>=30.7Hz, J<sub>2</sub>=25.8Hz, 两个碳), 39.64(两个碳)。MS:m/z(%)277(100), 276(75), 261(29)。C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N的分析计算值:C, 69.30; H, 5.09。测定值:C, 69.49; H, 4.99。

[0199] (E)-4-(2-氯-6-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4x)的合成。步骤B, 产率90%。黄色晶体, 晶体从己烷中析出。熔点42-44℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.43(d, 2H, J=8.8Hz), 7.36-7.33(m, 1H), 7.27-7.13(m, 3H), 6.94(d, 1H, J=16.8Hz), 6.73(d, 2H, J=8.8Hz), 2.95(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ160.74(d, J=249.1Hz), 151.02, 136.87(d, J=12.1Hz), 133.35(d, J=6.1Hz), 128.51(d, J=10.1Hz), 128.31(两个碳), 126.28(d, J=3.4Hz), 124.72, 124.59(d, J=14.8Hz), 115.55(d, J=23.5Hz), 113.91(d, J=2.1Hz), 112.58(两个碳), 40.30(两个碳)。MS:m/z(%)277(37), 276(36), 275(100), 274(31), 225(19)。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>Cl FN的分析计算值:C, 69.69; H, 5.48。测定值:C, 69.68; H, 5.61。

[0200] (E)-4-(2,6-二氯苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(4y)的合成。步骤B, 产率78%。从己烷中析出黄色晶体。熔点96-97℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.48-7.44(m, 4H), 7.25-7.21(m, 1H), δ7.11(d, 1H, J=16.8Hz), 6.94(d, 1H, J=16.4Hz), 6.77(d, 2H, J=8.8Hz), 2.99(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ151.19, 137.63, 135.36, 134.18, 128.97(两个碳), 128.18(两个碳), 128.02(两个碳), 124.79, 117.40, 112.41(两个碳), 39.68(两个碳)。MS:m/z(%)293(65), 292(32),

291(100), 221(40), 220(30)。C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 65.77; H, 5.17。测定值:C, 65.52; H, 5.17。

[0201] (E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺(5r)的合成。向含有150mg(0.58mmol)4r的10ml四氢呋喃中加入50mg10%的Pd-C。该混合物在帕尔振摇器(Parr shaker)上在40磅每平方英寸(psi)下被氢化5小时。混合物使用1:10乙酸乙酯:己烷通过硅藻土和色谱法过滤,得到110mg(76%)的5r:从己烷中析出无色晶体。熔点42-43°C。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 7.31-7.23(m, 1H), 7.02(d, 2H, J=8.4Hz), 6.98-6.92(m, 2H), 6.66(d, 2H, J=8.4Hz), 2.90-2.89(m, 2H), 2.85(s, 6H), 2.77-2.73(m, 2H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 161.68(dd, J<sub>1</sub>=244.1Hz, J<sub>2</sub>=8.7Hz, 两个碳), 149.62, 128.98, 128.94(两个碳), 128.15(t, J=10.3Hz), 117.36(t, J=20.5Hz), 112.88(两个碳), 111.22(dd, J<sub>1</sub>=19.4Hz, J<sub>2</sub>=7.2Hz, 两个碳), 40.10(两个碳), 34.73, 24.75。MS:m/z(%)261(40), 134(100), 118(27), 91(22)。C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 73.54; H, 6.56。测定值:C, 73.53; H, 6.49。

[0202] 实施例2

[0203] 卤代芪类似物的代谢物的合成

[0204] 一般步骤:在含有4(0.7mmol)的搅拌溶液的CHCl<sub>3</sub>(3ml)中在0°C下分多次加入70%间氯过氧苯甲酸(m-CPBA)(0.7mmol, 1当量)。得到的混合物在室温下搅拌5小时。混合液经CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(15mL)稀释,饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液和水洗涤,无水MgSO<sub>4</sub>干燥并浓缩。产物通过色谱法纯化,并被下面列出的单个的胺氮氧化物所记录。

[0205] (E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺氧化物(4z)的合成。产率72%。R<sub>f</sub>=0.31(1:5CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。熔点100-103°C。<sup>1</sup>H NMR(二甲基亚砜(DMSO)-d<sub>6</sub>): $\delta$ 8.11(d, 2H, J=8.4Hz), 7.72(d, 2H, J=8.8Hz), 7.43-7.35(m, 2H), 7.21-7.15(m, 3H), 3.40(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): $\delta$ 160.85(dd, J<sub>1</sub>=249.0Hz, J<sub>2</sub>=7.6Hz, 两个碳), 156.35, 137.30, 134.60(t, J=7.6Hz), 130.13(t, J=10.7Hz), 127.42(两个碳), 121.67(两个碳), 116.40, 114.44(t, J=15.2Hz), 112.76(dd, J<sub>1</sub>=19.0Hz, J<sub>2</sub>=6.1Hz, 两个碳), 63.92(两个碳)。高分辨率仪(HRMS)(EI)C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>NO的计算值:275.1121。测定值:275.1120。

[0206] (E)-4-(2-氯-6-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺氧化物(4aa)的合成。产率54%。黄色固体。R<sub>f</sub>=0.34(1:5CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。熔点82-84°C。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 8.21(d, 2H, J=8.8Hz), 7.73(d, 2H, J=8.8Hz), 7.43(d, 1H, J=16.4Hz), 7.38-7.32(m, 3H), 7.26-7.21(m, 1H), 3.50(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): $\delta$ 161.29(d, J=249.8Hz), 156.41, 137.41, 135.20(d, J=12.1Hz), 134.40(d, J=5.3Hz), 129.41(d, J=10.6Hz), 126.98(两个碳), 126.06(d, J=3.0Hz), 123.93(d, J=14.4Hz), 121.41(两个碳), 120.31(d, J=1.5Hz), 115.19(d, J=23.6Hz), 63.27(两个碳)。HRMS(EI)C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>ClFNO的计算值:291.0826。测定值:291.0828。

[0207] (E)-4-(2,6-二氯苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺氧化物(4bb)的合成。产率80%。R<sub>f</sub>=0.19(1:10甲醇-二氯甲烷)。熔点80-82°C。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): $\delta$ 8.13(d, 2H, J=9.2Hz), 7.71(d, 2H, J=9.2Hz), 7.55(d, 2H, J=8.4Hz), 7.34(t, 1H, J=8.0Hz), 7.22(d, 1H, J=16.8Hz), 7.11(d, 1H, J=16.8Hz), 3.41(s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): $\delta$ 156.31, 136.52, 136.12, 134.51, 134.11, 129.97, 129.34(两个碳), 127.24(两个碳), 123.85(两个碳), 121.49(两个碳), 63.78(两个碳)。高分辨率MS仪(EI)C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>NO的计算值:307.0531。测定值:307.0530。

[0208] (E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N-甲基苯胺(4cc)的合成。将1g(3.86mmol)的4r和

820mg(7.72mmol, 2当量)的溴化氰加入到15ml丙酮溶液中,回流16小时。在氩气流下,混合物被冷却并浓缩。残留物经乙醚萃取,合并的乙醚萃取液被合并及浓缩。产物经25ml浓盐酸回流3小时。混合物经2M NaOH溶液中和,乙醚提取,无水MgSO<sub>4</sub>干燥并浓缩。产物通过色谱法使用1:5乙酸乙酯-己烷纯化,得到320mg(34%)的4cc,黄色固体:熔点51-53℃。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ7.32(d, 2H, J=8.8Hz), 7.29-7.21(m, 2H), 7.14-7.06(m, 2H), 6.79(d, 1H, J=16.4Hz), 6.55(d, 2H, J=8.8Hz), 6.02(q, 1H, J=5.2Hz), 2.70(d, 3H, J=5.2Hz)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ160.36(dd, J<sub>1</sub>=246.8Hz, J<sub>2</sub>=8.0Hz, 两个碳), 150.88, 136.35(t, J=7.5Hz), 128.42(两个碳), 127.96(d, J=10.7Hz), 124.53, 115.32(t, J=15.5Hz), 112.33(dd, J<sub>1</sub>=19.1Hz, J<sub>2</sub>=6.8Hz, 两个碳), 112.09(两个碳), 108.86, 29.93。MS:m/z(%)246(30), 245(100), 244(15)。C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 73.45; H, 5.34。测定值:C, 73.31; H, 5.26。

[0209] (E)-4-(2-氯-6-氟苯乙烯基)-N-甲基苯胺(4dd)的合成。使用1g(3.63mmol)的4x和764mg(7.26mmol, 2当量)的溴化氰重复用于制备4cc的步骤,得到的产物通过色谱法使用1:5乙酸乙酯-己烷纯化,得到400mg(42%)的4dd,黄色固体:熔点43-45℃。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ7.37-7.31(m, 3H), 7.27-7.21(m, 2H), 7.18(d, 1H, J=16.4Hz), 6.88(d, 1H, J=16.4Hz), 6.56(d, 2H, J=8.8Hz), 6.04(q, 1H, J=5.2Hz), 2.71(d, 3H, J=5.2Hz)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ160.75(d, J=248.0Hz), 150.98, 137.24(d, J=12.2Hz), 133.30(d, J=6.1Hz), 128.49(两个碳), 128.33(d, J=9.9Hz), 126.28(d, J=3.1Hz), 124.73(d, J=14.5Hz), 124.40, 115.54(d, J=22.9Hz), 113.12(d, J=2.2Hz), 112.11(两个碳), 29.94。MS:m/z(%)261(100), 227(15), 213(25)。C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>Cl FN的分析计算值:C, 68.84; H, 5.01。测定值:C, 68.67; H, 5.05。

[0210] (E和Z)-4-(2,6-二氯苯乙烯基)-N-甲基苯胺(4ee)的合成。使用1g(3.42mmol)的4y和720mg(6.84mmol, 2当量)的溴化氰重复用于制备4cc的步骤,得到的产物通过色谱法(多次并且每次使用两种展开剂(development))使用1:5乙酸乙酯-己烷纯化,得到390mg(41%)的4ee,是9:1E:Z-同分异构体的混合物,黄色油状。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ7.49(d, 2H, J=8.4Hz), 7.35(d, 2H, J=8.4Hz), 7.24(t, 1H, J=8.0Hz), 6.99(d, 1H, J=16.4Hz), 6.82(d, 1H, J=16.4Hz), 6.55(d, 2H, J=8.4Hz), 6.01(q, 1H, J=5.2Hz), 2.70(d, 3H, J=5.2Hz)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ150.45, 137.40, 134.69, 133.36, 128.86(两个碳), 128.28, 127.97(两个碳), 123.47, 116.09(两个碳), 111.57(两个碳), 29.50。C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N的HRMS(EI)的计算值:277.0425。测定值:277.0425。

[0211] (E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N,N-三甲基苯胺碘化物(4ff)的合成。在含有200mg(0.77mmol)4r的丙酮(2ml)溶液中加入CH<sub>3</sub>I 328mg(2.31mmol, 3当量)。得到的混合溶液回流8小时。形成的沉淀通过过滤被收集,经乙酯洗涤,残留溶剂经真空除去,得到200mg(64%)的4ff,白色固体:熔点198-199℃。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ7.98(d, 2H, J=8.8Hz), 7.91(d, 2H, J=9.2Hz), 7.47-7.38(m, 2H), 7.29(d, 1H, J=16.8Hz), 7.23-7.17(m, 2H), 3.62(s, 9H)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ160.30(dd, J<sub>1</sub>=249.1Hz, J<sub>2</sub>=7.4Hz, 两个碳), 146.72, 138.44, 133.04(t, J=7.8Hz), 130.00(t, J=10.8Hz), 128.05(两个碳), 121.03(两个碳), 117.44, 113.58(t, J=15.5Hz), 112.23(dd, J<sub>1</sub>=19.2Hz, J<sub>2</sub>=5.7Hz, 两个碳), 56.45(三个碳)。C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>F<sub>2</sub>IN的分析计算值:C, 50.89; H, 4.52。测定值:C, 51.10; H, 4.49。

[0212] 实施例3

[0213] 卤代茈萘类化合物的生物素化类似物的合成

[0214] 在此实施例中,制备了一些生物活性的生物素标记的卤代芪类似物,尤其是氟化的N,N-二烷氨基芪类(FIDAS或FIDAS剂)。如图4所示,制备了一些在FIDAS药物和生物素之间具有可变间隔区的生物素-FIDAS化合物。通过缺乏生物素杂环或者仅具有生物素的其它酰胺的合成,确定了活性位置位于芪中,而不在这些分子的生物素部分中。确定了两个末端之间最优的间隔区长度,并确定了生物素-FIDAS和链霉亲和素磁珠的结合和洗脱条件。

[0215] (E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二甲基-3-硝基苯胺(6)的合成。在0℃,在含有1.63g(6.18mmol,1.2当量)二乙基2,6-二氟苄基膦酸酯的15ml无水DMF(二甲基甲酰胺)中加入310mg(7.72mmol,1.5当量)的60%氢化钠。搅拌混合溶液30分钟,并在10分钟内加入含有1.0g(5.15mmol)4-(二甲氨基)-3-硝基苯甲醛的8ml无水DMF中。在0℃下搅拌混合溶液2小时,然后倒入冷水中。沉淀物通过过滤被收集,用乙腈重结晶,得到1.1g(70%)的6,红色晶体:熔点152-153℃。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ7.81(d,1H,J=8.8Hz),7.68(d,1H,J=16.4Hz),7.38-7.30(m,1H),7.17(d,1H,J=3.2Hz),7.10-7.03(m,3H),7.01(d,1H,J=16.8Hz),3.1(s,6H)。<sup>13</sup>C NMR(丙酮-d<sub>6</sub>):δ160.76(dd,J<sub>1</sub>=248.3Hz,J<sub>2</sub>=7.5Hz,两个碳),150.56,150.03,129.66(t,J=8.7Hz),128.73(t,J=10.7Hz),128.08,118.20,116.16,114.92(t,J=1.6Hz),114.52(t,J=15.1Hz),111.74(dd,J<sub>1</sub>=19.7Hz,J<sub>2</sub>=6.5Hz,两个碳),106.01,39.31(两个碳)。C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的HRMS(EI)计算值:304.1023。测定值:304.1016。

[0216] (E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-二甲苯-1,3-联胺(7)的合成。在含有5g(26.4mmol,8.5当量)SnCl<sub>2</sub>的7ml浓HCl中逐滴加入含有0.95g(3.1mmol)6的100ml冰醋酸。混合溶液在25℃下搅拌约(ca.)12小时。沉淀物通过过滤被收集,用5ml冰醋酸冲洗,并悬浮于200ml水中。水性悬浮液用NaOH调整pH到9-10,然后用乙醚萃取。将合并的乙醚萃取液用水洗涤,用无水MgSO<sub>4</sub>干燥,然后浓缩。残留物用乙醇重结晶,得到590mg(69%)的7,黄色晶体:熔点97-98℃。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ7.41(d,1H,J=16.4Hz),7.27(d,1H,J=8.8Hz),7.24-7.18(m,1H),7.12-7.05(m,2H),6.61(d,1H,J=16.4Hz),6.10(dd,1H,J<sub>1</sub>=8.8Hz,J<sub>2</sub>=2.4Hz),6.03(d,1H,J=2.8Hz),5.05(br.s(宽单峰),2H),2.87(s,6H)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ160.25(dd,J<sub>1</sub>=246.0Hz,J<sub>2</sub>=7.9Hz,两个碳),151.95,147.98,132.39(t,J=7.1Hz),127.45(t,J=11.1Hz),127.06,116.11(t,J=15.1Hz),112.20(dd,J<sub>1</sub>=18.7Hz,J<sub>2</sub>=6.8Hz,两个碳),111.39,108.21,103.52,99.07,40.28(两个碳)。MS:m/z(%)275(21),274(100),273(33),257(15),211(16)。C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>的计算值:C,70.06;H,5.88。测定值:C,70.18;H,5.94。

[0217] (E)-1,3-二氟-2-(4-硝基苯乙烯基)苯(8)的合成。在含有956mg(2mmol)(4-硝基苄基)三苯基溴化膦和284mg(2mmol)2,6-二氟苯甲醛的20mlCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中,在10分钟内逐滴加入5ml的0.48M NaOH溶液(2.4mmol,1.2当量)。红色溶液在50℃下加热1小时。有机层被分离,用饱和NaHSO<sub>3</sub>水溶液和水冲洗,然后用无水MgSO<sub>4</sub>干燥。残留物用乙醇重结晶,得到360mg(69%)的8,淡黄色晶体:熔点136-137℃。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ8.23(d,2H,J=8.8Hz),7.93(d,2H,J=8.8Hz),7.50(d,1H,J=16.8Hz),7.46-7.40(m,1H),7.37(d,1H,J=16.8Hz),7.23-7.17(m,2H)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>):δ160.79(dd,J<sub>1</sub>=249.4Hz,J<sub>2</sub>=7.3Hz,两个碳),147.27,143.81,133.35(t,J=7.9Hz),130.82(t,J=10.7Hz),128.21(两个碳),124.46(两个碳),119.70(t,J=1.6Hz),113.79(t,J=15.1Hz),112.65(dd,J<sub>1</sub>=19.5Hz,J<sub>2</sub>=5.9Hz,两个碳)。MS:m/z(%)261(61),231(67),214(45),194(34),183(100)。C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O的分析计算值:C,64.37;H,3.47。测定值:C,64.56;H,3.42。

[0218] (E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)苯胺(9)的合成。使用含有300mg(1.15mmol)8的20ml冰醋酸和含有1.85g(9.76mmol, 8.5当量)SnCl<sub>2</sub>的3ml浓HCl重复用于制备7的步骤,在25℃下搅拌约12小时后,用水淬灭,得到沉淀物。通过过滤收集沉淀物,用5ml冰醋酸冲洗,并悬浮于80ml水中。将水性悬浮液用NaOH调节pH到9-10,并用乙醚萃取。将合并的乙醚萃取液用水冲洗,用无水MgSO<sub>4</sub>干燥,并浓缩。产物用己烷重结晶,得到220mg(83%)的9,无色晶体:熔点74-75℃。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): δ7.28(d, 2H, J=8.8Hz), 7.27-7.22(m, 1H), 7.21(d, 1H, J=16.8Hz), 7.13-7.06(m, 2H), 6.77(d, 1H, J=16.8Hz), 6.57(d, 2H, J=8.8Hz), 5.43(s, 2H)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): δ160.35(dd, J<sub>1</sub>=246.8Hz, J<sub>2</sub>=8.0Hz, 两个碳), 150.06, 136.41(t, J=7.9Hz), 128.42(两个碳), 127.99(t, J=10.3Hz), 124.68, 115.31(t, J=15.1Hz), 114.29(两个碳), 112.33(dd, J<sub>1</sub>=19.1Hz, J<sub>2</sub>=6.3Hz, 两个碳), 108.84MS:m/z(%) 232(18), 231(100), 183(13)。C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>N的分析计算值:C, 72.72; H, 4.79。测定值:C, 72.77; H, 4.83。

[0219] (E)-N-(2-(2,6-二氟苯乙烯基)-5-(二甲氨基)苯基)-5-(2-氧代六氢(oxohexahydro)-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺(10)的合成。在200mg(0.82mmol)的生物素中加入8ml(0.11mol)的SOCl<sub>2</sub>。混合液在25℃搅拌1小时。浓缩混合液,并用苯(两个15ml部分)脱水以得到酰氯。在含有186mg(0.68mmol)的7和83mg(0.82mmol, 1.2当量)的三乙胺(Et<sub>3</sub>N)的5ml无水四氢呋喃(THF)中逐滴加入含有酰氯的8ml无水THF。混合液在25℃搅拌2小时,倒入水中,并用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>萃取。合并的有机相用无水MgSO<sub>4</sub>干燥,蒸发,得到产物,通过色谱法使用1:10CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>进行纯化,得到200mg(59%)的10,黄色固体:熔点183-184℃。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): δ9.51(s, 1H), 7.61(d, 1H, J=8.8Hz), 7.40(d, 1H, J=16.4Hz), 7.32-7.24(m, 1H), 7.15-7.09(m, 2H), 6.80(d, 1H, J=16.8Hz), 6.67-6.61(m, 2H), 6.45(s, 1H), 6.36(s, 1H), 4.31-4.28(m, 1H), 4.15-4.11(m, 1H), 3.12-3.07(m, 1H), 2.93(s, 6H), 2.80(dd, 1H, J<sub>1</sub>=12.4Hz, J<sub>2</sub>=5.2Hz), 2.57(d, 1H, J=12.4Hz), 2.31(t, 2H, J=7, 2Hz), 1.69-1.35(m, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): δ171.90, 163.14, 160.40(dd, J<sub>1</sub>=247.6Hz, J<sub>2</sub>=7.9Hz, 两个碳), 151.03, 137.35, 132.05(t, J=8.0Hz), 128.27(t, J=11.0Hz), 126.36, 120.44, 115.40(t, J=15.0Hz), 112.36(dd, J<sub>1</sub>=19.1Hz, J<sub>2</sub>=6.4Hz, 两个碳), 110.93, 110.65, 110.20, 61.47, 59.64, 55.86, 40.40(两个碳), 40.31, 36.11, 28.70, 28.55, 25.84。C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S的HRMS(EI)计算值: 500.2057。测定值: 500.2047。

[0220] (E)-N-(4-(2,6-二氟苯乙烯基)苯基)-5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺(11)的合成。在有100mg(0.41mmol, 1当量)生物素的3ml无水DMF的悬浮液中加入66mg(0.49mmol, 1.2当量)的1-羟基苯并三唑水合物、94mg(0.49mmol, 1.2当量)的N-(3-二甲氨基丙基)-N'-碳酰二亚胺盐酸盐,和79mg(0.78mmol, 1.9当量)的Et<sub>3</sub>N。混合液在25℃搅拌24小时,然后倒入水中。通过过滤收集沉淀物并使用1:1乙酸乙酯-甲醇进行色谱分离,得到120mg(66%)的11,白色晶体:熔点278-280℃。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): δ9.99(s, 1H), 7.64(d, 2H, J=8.8Hz), 7.56(d, 2H, J=8.8Hz), 7.37-7.29(m, 2H), 7.19-7.12(m, 2H), 7.02(d, 1H, J=16.4Hz), 6.44(s, 1H), 6.36(s, 1H), 4.33-4.29(m, 1H), 4.16-4.13(m, 1H), 3.15-3.10(m, 1H), 2.83(dd, 1H, J<sub>1</sub>=12.8Hz, J<sub>2</sub>=4.8Hz), 2.58(d, 1H, J=12.0Hz), 2.33(t, 2H, J=7, 2Hz), 1.70-1.33(m, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): δ171.70, 163.13, 160.53(dd, J<sub>1</sub>=247.8Hz, J<sub>2</sub>=7.7Hz, 两个碳), 140.09, 135.28(t, J=7.9Hz), 131.77, 129.18(t, J=10.7Hz), 127.69(两个碳), 119.54(两个碳), 114.61(t, J=15.5Hz), 113.25, 112.45(dd, J<sub>1</sub>=19.1Hz, J<sub>2</sub>=6.3Hz, 两个碳),

61.48, 59.63, 55.82, 40.28, 36.70, 28.67, 28.53, 25.50。C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S的HRMS(EI)计算值: 457.1636。测定值: 457.1650。C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S的分析计算值: C, 63.00; H, 5.51。测定值: C, 62.82; H, 5.47。

[0221] (E)-N-(4-(2,6-二氟苯乙烯基)苯基)-N-甲基-5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺(12)的合成。使用167mg(0.68mmol)的4cc和200mg(0.82mmol, 1.2当量)的生物素重复用于制备10的步骤, 以得到产物, 通过色谱法使用1:10CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>纯化该产物, 得到130mg(41%)的12, 无色固体: 熔点: 91-93°C。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): δ7.71(d, 2H, J=8.0Hz), 7.41-7.36(m, 2H), 7.33(d, 2H, J=8.4Hz), 7.21-7.14(m, 3H), 6.38(s, 1H), 6.33(s, 1H), 4.30-4.26(m, 1H), 4.09-4.06(m, 1H), 3.17(s, 3H), 3.05-3.00(m, 1H), 2.80(dd, 1H, J<sub>1</sub>=12.2Hz, J<sub>2</sub>=5.2Hz), 2.56(d, 1H, J=12.4Hz), 2.09(br. s, 2H), 1.58-1.18(m, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): δ171.96, 163.13, 160.61(dd, J<sub>1</sub>=248.0Hz, J<sub>2</sub>=7.6Hz, 两个碳), 144.40, 134.71(t, J=7.9Hz), 129.80(t, J=11.1Hz), 128.27(两个碳), 128.07, 128.01, 115.70(两个碳), 114.35(t, J=15.1Hz), 112.54(dd, J<sub>1</sub>=19.1Hz, J<sub>2</sub>=6.4Hz, 两个碳), 61.42, 59.62, 55.75, 40.27, 37.20, 33.64, 28.54, 28.43, 25.32。C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S[MH<sup>+</sup>]的MALDI-TOFMS计算值: 472.1870。测定值472.1872。

[0222] N-(2-(4-(2,6-二氟苯乙烯基)苯基)-4-氧-8,11-二噁(dioxa)-2,5-二硫唑嘌呤十三烷(diazatridecan)-13-基)-5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺(13)的合成。在含有34mg(0.14mmol, 1.5当量)4cc的1ml的无水乙醇中加入50mg(0.092mmol)的(+)生物素酰-碘代乙酸基-3,6-二氧代辛二胺和20mg(0.14mmol, 1.5当量)的无水K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>。混合液回流12小时, 然后过滤, 浓缩。通过色谱法使用1:10CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>纯化产物, 得到16mg(26%)的13, 不成晶型的透明玻璃状。初始分离得到的产物是纯的(E)-同分异构体, 但在浓缩过程中, 即使在低温下, 会迅速地平衡为(E/Z)-同分异构体的混合物。同分异构体的比率随溶剂而改变, 改变范围为从丙酮-d<sub>6</sub>中的约10:90到DMSO-d<sub>6</sub>中60:40。这种异构化必然使NMR波谱复杂, 以下报道的主要是(E)-同分异构体的数据。<sup>1</sup>H NMR(丙酮-d<sub>6</sub>): δ7.48(d, 2H, J=8.8Hz), 7.42-7.35(m, 2H), 7.30-7.22(m, 1H), 7.13(br. s, 1H), 7.05-7.00(m, 2H), 6.95(d, 1H, J=16.8Hz), 6.75(d, 2H, J=9.2Hz), 5.87(s, 1H), 5.64(s, 1H), 4.51-4.46(m, 1H), 4.34-4.29(m, 1H), 3.97(s, 2H), 3.59-3.45(m, 8H), 4.42-3.29(m, 4H), 3.23-3.17(m, 1H), 3.13(s, 3H), 2.92(dd, 1H, J<sub>1</sub>=12.4Hz, J<sub>2</sub>=4.8Hz), 2.69(d, 1H, J=12.4Hz), 2.18(t, 2H, J=7.2Hz) 1.81-1.39(m, 6H)。这里指出的是C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S[MH<sup>+</sup>]的MALDI-TOFMS计算值: 660.3030。测定值660.3040。

[0223] 实施例4

[0224] 天然芪类似物白藜芦醇和紫檀芪对Wnt信号传导的抑制

[0225] 材料和方法: 已使用了以下的材料和方法来产生在本申请的本实施例和其他实施例中的结果。

[0226] 细胞培养和转染。HEK293T、HCT116和SW480细胞生长在添加有10%的胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基(Mediatech公司)中。LS174T细胞生长在添加有5%的胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI培养基(Mediatech公司)中。如Zhang.W等. 分子细胞生物学报2006, 26, 2055-2064(通过引用合并于此)中描述的方法, 使用磷酸钙瞬时转染HEK293T细胞。

[0227] 免疫印迹法。使用下列抗体进行免疫印迹法： $\beta$ -链蛋白(西格玛,C2206),原癌基因(c-Myc)(艾必通公司(Epitomics),1472-1),轴蛋白2(Axin2)(细胞信号传导(Cell Signaling),2151), $\beta$ -肌动蛋白(西格玛,A1978),TCF4(艾必通公司,2114-1)以及and派格帕斯2(pygopus2)(圣克鲁兹公司(Santa Cruz),sc-74878),细胞周期蛋白D1(细胞信号传导,2926)。

[0228] RT-PCR。用DMSO或Wnt抑制剂对LS174T细胞进行处理。36小时后,使用RNeasy试剂盒(凯杰公司(Qiagen))分离RNA。按照张等,分子细胞生物学(Mol Cell Biol)2006,26,2055-2064中描述的执行PC-PCR。使用下列引物: $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin):5'-CAACCGCGAGAAGATGAC-3'(SEQ ID NO:01),5'-AGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'(SEQ ID NO:02);生存素(survivin):5'-CATTCGTCCGGTTGCGCTTTCC-3'(SEQ ID NO:03),5'-GCGCACTTTCTCCGAGTTTCC-3'(SEQ ID NO:04);c-Myc:5'-TGGGCTGTGAGGAGGTTTG-3'(SEQ ID NO:05),5'-TATGTGGAGCGGCTTCTCG-3'(SEQ ID NO:06);Axin2:5'-CACCACCACCACCATTTC-3'(SEQ ID NO:07),5'-GCATCCACTGCCAGACATCC-3'(SEQ ID NO:08);TCF4:5'-CACCACATCATACGCTACAC-3'(SEQ ID NO:09),5'-CGACCTTGCTCTCATTTC-3'(SEQ ID NO:10);派格帕斯2:5'-GGCCGGTCTGCAAATGAAG-3'(SEQ ID NO:11),5'-TCCACCTCCAGTGCTGTAG-3'(SEQ ID NO:12);Lgr5:5'-CCTGCTTGACTTTGAGGAAGAC-3'(SEQ ID NO:13),5'-ATGTTCACTGCTGCGATGAC-3'(SEQ ID NO:14);CD44:5'-CAGAATGGCTGATCATCTTG-3'(SEQ ID NO:15),5'-CAAATGCACCATTTCCCTGAG-3'(SEQ ID NO:16);Ki67:5'-ACAGAGTGCTCAACAACCTTC-3'(SEQ ID NO:17),5'-GCTTGCAGAGCATTTATCAG-3'(SEQ ID NO:18)。

[0229] 荧光素酶和细胞增殖分析。用0.2 $\mu$ g的Super8xTOPFlash报道基因(reporter)和0.05 $\mu$ g的海肾荧光素酶报道基因在12孔板中对HEK293T细胞进行瞬时转染。12小时后更换培养介质。6小时后,用DMSO或Wnt抑制剂处理细胞12小时,随后用25mM的LiCl或Wnt条件培养基处理。12小时后,收获细胞,通过双荧光素酶报道基因分析系统(Promega公司,Madison WI)对荧光素酶活性进行测量。所有条件下做三次,并且每次试验至少做两次。对于细胞增殖分析,用DMSO或抑制剂处理CRC细胞2天和4天。通过Vi-Cell细胞活力分析仪分析细胞数量和活力。

[0230] 裸鼠中的肿瘤移植。按照Zhang等,分子细胞生物学2006,26,2055-2064中描述的,在6-8周的C57BL/6J无胸腺裸鼠的两翼皮下注射LS174或HT29结肠癌细胞( $2 \times 10^6$ )。将化合物4r或4dd溶于玉米油或PEG(聚乙二醇)400中。用4r以20mg/kg/天,通过腹腔注射或填喂法(50 $\mu$ L/鼠)处理小鼠。对照组的小鼠用相同体积的玉米油或PEG400处理。一个月内,每周两次对体重和肿瘤的生长进行分析。使用数显卡尺测量肿瘤的大小。通过公式: $V=1/2LW^2$ ( $\text{mm}^3$ )计算肿瘤的体积。

[0231] 免疫荧光法。盖玻片上生长的细胞通过4%的多聚甲醛在室温下固定20分钟。用含有0.3%(w/v)聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)的PBS对细胞进行渗透,并用含有5%正常山羊血清的PBS阻塞细胞30分钟。将抗 $\beta$ -链蛋白抗体(1:300,sigma,St.Louis,MO)稀释在阻塞液中,并与细胞一起培养过夜。用PBS冲洗细胞3次,并进一步用稀释在PBS中的Alexa-488标记的抗兔IgG(1:500)培养40分钟。冲洗盖玻片,并安放在载玻片上,使用Olympus FW1000共聚焦显微镜观察并拍照盖玻片。盖玻片上生长的细胞分别用荧光化合物处理2小

时、6小时、12小时和24小时。处理的细胞通过4%多聚甲醛在室温下固定20分钟。之后用PBS对细胞冲洗3次,将细胞安放在载玻片上,在波长为405nm的荧光下观察细胞,并用Olympus FW1000聚焦显微镜拍照。

[0232] 为了识别用于CRC预防和治疗的Wnt通路抑制剂,使用TopFlash报道基因分析,从植物中筛选出一些抗癌剂。将TopFlash报道基因转染到HEK293T细胞中,为了激活荧光素酶报道基因,用Wnt3A条件培养基处理上述细胞。白藜芦醇(100 $\mu$ M)显著地抑制了Wnt诱导的荧光素酶活性。为了确定白藜芦醇是否调节 $\beta$ -链蛋白的降解,用25mM抑制GSK-3以及稳固 $\beta$ -链蛋白的LiCl处理细胞。在该试验中,LiCl比Wnt3A条件培养基更强地激活了报道基因。白藜芦醇强烈地抑制LiCl诱导的Wnt信号传导,这表明白藜芦醇通过调节 $\beta$ -链蛋白的活性抑制Wnt信号传导,而不是它的降解。大黄素是植物中的抗癌剂;它存在于许多未纯化的白藜芦醇产品中。大黄素对Wnt信号传导没有影响。见Zhang等.,医药化学杂志(J. of Med. Chem.)54,1288-1297(2011)。

[0233] 为了证实这些结果,通过免疫印迹法和RT-PCR在LS174CRC细胞中分析了 $\beta$ -链蛋白的靶基因。c-Myc和细胞周期蛋白D1是 $\beta$ -链蛋白的靶点,它们的蛋白水平是由白藜芦醇降低的,而不是由白藜芦醇的同分异构体降低的,即顺式或(Z)-白藜芦醇。细胞周期蛋白B1水平下降,而P21<sup>WAF1/CIP1</sup>水平升高,这与以下事实相符:P21<sup>WAF1/CIP1</sup>的表达是由c-Myc抑制的。 $\beta$ -链蛋白水平并没有受到白藜芦醇的影响。接下来,采用RT-PCR分析了 $\beta$ -链蛋白的靶基因的mRNA的水平。在白藜芦醇处理的细胞中,Lgr5、CD44和c-Myc的生存素表达降低。细胞增殖标记Ki67也有所下降。这些结果证实白藜芦醇抑制CRC细胞中内源性的Wnt靶基因。

[0234] 许多芪类衍生物还表现出抗肿瘤活性。为了确定这些化合物的结构/活性关系,对一些白藜芦醇类似物进行了测试。结果发现,紫檀芪抑制了Wnt信号传导。为了确定白藜芦醇和紫檀芪对细胞生长的影响,用白藜芦醇和紫檀芪对LS174 CRC细胞处理2天和4天。二者都抑制了细胞增殖。其他CRC细胞株也观察到了类似的结果。在这些试验中,紫檀芪要比白藜芦醇更具活性,这表明涉及免疫印迹法检测Wnt靶蛋白的水平水平的本试验对于识别其他用于Wnt抑制和CRC抑制的白藜芦醇类似物是有效的。

[0235] 实施例5

[0236] 卤代芪类似物是有效的Wnt抑制剂

[0237] 设计和合成了一系列芪类似物(图2,图3,图5A和6A)。用免疫印迹试验分析了各种单取代的羟基、烷氧基、氨基和N,N-二烷基氨基芪类(图5B,5C),并且在这些取代基中,具有N,N-二甲基氨基取代基的(E)-4-苯乙烯基-N,N-二甲基苯胺(4d)在30 $\mu$ M时有效地抑制了CRC细胞中的Wnt靶基因、Axin2和c-Myc(图5C)。然而,4d的溶解度较差,在10 $\mu$ M浓度以下是没有效果的(数据未示出)。为了提高其溶解度和活性,用2'-氟代4e,3'-氟代4f和4'-氟代4g取代基修饰了化合物4d(图5D)。4e和4f这两种化合物在10 $\mu$ M时有着良好的活性,(E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二甲基苯胺。在所有的单氟取代的化合物中化合物(4e)是最好的。还分析了化合物4e中N,N-二甲氨基基团的修饰,发现在(E)-4-(2-氟苯乙烯基)-N,N-二乙基苯胺(4h)中N,N-二乙氨基基团在10 $\mu$ M时是活跃的,但不如化合物4e强,在化合物4i中N,N-二苯氨基基团是不活跃的(图5E)。这些类似物对 $\beta$ -链蛋白水平并无影响,进一步表明它们影响的是 $\beta$ -链蛋白的活性,而不是它的稳定性。比较了化合物4e、白藜芦醇和紫檀芪对CRC细胞生长的影响,结果发现,在细胞增殖试验中,4e是显著有效的抑制剂(图5F)。

[0238] 在化合物4e相对于化合物4d而言可见的改进的活性的基础上,在二卤代的N,N-二甲氨基苊中至少有一个氟取代基是合成在2'-或3'-位上的(图6A)。具有2'-位氟和其他邻位或者间位到双键的氟的化合物(化合物4m,4o和4r)比化合物4e更有活性(图6B)。(E)-4-(2,6-二氟苯乙烯)-N,N-二甲基苯胺(化合物4r)的活性最好。化合物4r的邻位和间位N,N-二甲氨基类似物(即化合物4p和4q)的活性不如化合物4r,表明在化合物4r中,对位取代的二甲氨基对于其活性是非常重要的(图6C)。基于化合物4r的结构,合成了两种三卤代的二甲氨基苊(化合物4v和4w),在这两个化合物中,氟取代基中的两个在2'-和6'-位(图6D)。虽然化合物4v和4w在10 $\mu$ M是活跃的,但他们和化合物4r相比没有表现出显著的改善。当化合物4r中的苊碳-碳双键还原为1,2-二芳基乙烷化合物5r中的饱和单键时,活性丧失,这表明双键对生物活性而言是必需的(图6D)。用不同剂量的化合物4r处理LS174CRC细胞,发现化合物4r在2.5 $\mu$ M明显抑制了Wnt靶基因,甚至在0.5 $\mu$ M也很活跃(图6E)。例如,基于免疫印迹法和细胞增殖试验,可以确定苊4r比白藜芦醇和紫檀芪有效10-100倍。

#### [0239] 实施例6

##### [0240] 卤代苊类似物在体外和体内抑制CRC

[0241] 在本实施例中,分析了本发明的苊类似物对CRC细胞生长的影响。与免疫印迹法结果一致,在细胞增殖试验中,苊化合物4r比化合物4e更有效;在纳摩尔浓度下抑制了LS174细胞增殖(图7A)。为了测试化合物4r在体内对肿瘤生长的影响,在随机分成两组的无胸腺裸鼠的侧翼下皮下注射LS174细胞。通过腹腔注射(ip)用溶解在玉米油中的化合物4r(20mg/kg/day)处理其中一组小鼠。通过腹腔注射相同体积的玉米油(50 $\mu$ l)处理对照组小鼠。每周两次称重小鼠并测量肿瘤。化合物4r处理的小鼠与对照组小鼠一个月内在体重上没有显著性差异(图7B和7C),这表明化合物4r在此剂量下没有显著的毒性作用。然而,通过4r的治疗,显著抑制了移植瘤的增长(图7D)。

[0242] 因此,如本实施例所示,本发明的卤代苊类似物能够在体外和体内抑制CRC。另一项研究显示小鼠可以忍受至少200mg/kg的卤代苊类似物,FIDAS4dd。一周后,这些小鼠的体重减少了,但在停止4dd治疗后,恢复到正常体重(数据未显示)。

#### [0243] 实施例7

##### [0244] 卤代苊类似物在细胞核中抑制Wnt信号传导

[0245] 本发明的苊类似物,特别是,(E)-4-(2,6-二氟苯乙烯基)-N,N-二乙基苯胺(化合物4s)(图8)在365纳米表现出强的荧光(图8A),尽管化合物4s的活性稍差于化合物4r(图8B)。然而,化合物4s非常适于这些化合物在作用部位上的研究。用10 $\mu$ M的化合物4s处理LS174细胞2小时、6小时、12小时和24小时。通过共聚焦荧光显微镜固定并分析上述细胞。结果发现,化合物4s在2小时时定位在细胞核和细胞质中。12小时后,化合物4s的核水平明显降低(数据未示出,见Zhang等,医药化学杂志54,1288-1297(2011))。为了研究这些化合物对 $\beta$ -链蛋白定位的影响,用10 $\mu$ M的化合物4r处理LS174细胞24小时。固定细胞,然后通过免疫荧光法分析 $\beta$ -链蛋白的定位。与DMSO处理的细胞相比,用化合物4r处理的细胞中,核 $\beta$ -链蛋白的水平下降了。然而,仍然可以在化合物4r处理的细胞的细胞核中检测到核 $\beta$ -链蛋白的显著水平,表明该化合物4r可以通过除调节 $\beta$ -链蛋白的水平和定位以外的机制来抑制Wnt信号。分析了 $\beta$ -链蛋白的下游因素,发现TCF4和派格帕斯2的蛋白水平被CRC细胞中的化合物4r和白藜芦醇降低了(图8C)。RT-PCR试验表明化合物4r强烈地抑制了Wnt靶基因的转

录。它还抑制TCF4基因,但并没有显著影响派格帕斯2基因,这表明这些卤代芪类似物抑制在多能级间的Wnt/介导的转录(图8D)。

[0246] 实施例8

[0247] 卤代芪类似物目标识别

[0248] 材料和方法:使用以下的材料和方法来产生在本申请的本实施例和其他实施例中的结果。

[0249] 免疫印迹法和细胞增殖试验。通过免疫印迹法使用诸如c-Myc、Axin2的抗Wnt靶基因的抗体,分析了氟代N,N-二烷基氨基芪(FIDAS或FIDAS药物)在癌症细胞中的Wnt信号活性。采用细胞活力分析仪(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter),Vi-Cell XR)分析FIDAS药物对癌症细胞生长的影响。这些试验先前已描述过(见张等,医药化学杂志54,1288-1297(2011))。

[0250] 慢病毒介导的shRNA测定。MAT2A和MAT2B的ShRNA结构购买于Sigma公司。用慢病毒包装的质粒psPAX2和pMD2.G,以及对照组或MAT2A/2B shRNA质粒转染293T细胞。转染后48小时收集慢病毒库存(stock)。用慢病毒库存感染HT29,LS174T和Hep3B细胞株12小时,随后在新鲜培养基中持续生长36-48小时。受感染的细胞株接种于12孔板中用于增殖试验。通过免疫印迹法使用与pcDNA3.1-MAT2A/2B和pLKO.1-shRNA质粒共转染的293T细胞的裂解物测试shRNA的效率。

[0251] 蛋白纯化。为了纯化FIDAS目标,将LS174T细胞裂解物与链霉亲和素磁珠和生物素化的FIDAS试剂13(参见图4和图10A)在4°C下过夜培养。用细胞裂解缓冲液洗磁珠3次。用2.5mM的D-生物素洗脱结合蛋白。通过4-12%梯度的SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)分离出纯化的样品并通过银染或SYPRO Ruby荧光染色进行分析。按照之前的描述(见张等人,Kruppel样因子4和β-链蛋白的新型串扰调节正常肠道内动态和肿瘤抑制,分子细胞生物杂志2006,26,2055-64),通过LC-MS/MS对生物素化类似物样品中特别出现的蛋白条带进行切离和分析。

[0252] MAT2A和MAT2B克隆到pGEX6p3载体。将结构转染到大肠杆菌BL21中。按照先前所描述的(见刘,β-TRCP耦合β-链蛋白磷酸化-降解并调节非洲爪蟾(Xenopus)轴的形成,美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)1999,96,6273-8),GST融合蛋白被IPTG诱导,并经谷胱甘肽磁珠纯化。对于结合试验,纯化的蛋白质将与上面描述的链霉亲和素磁珠和生物素化的FIDAS13一起培养。通过免疫印迹法使用抗GST、MAT2A或MAT2B的抗体分析洗脱的蛋白。

[0253] SAM和SAH的LC-MS/MS分析。LC-MS/MS系统包括两个Varian ProStar的210 LC(液相色谱)泵和一个Varian 1200L三重四极质谱仪。使用Hypercarb柱(50mmx2.1mm,3mm,赛默飞世尔公司(Thermo Scientific)#35003-052130)进行分离。从98%的溶液A(0.1%溶于水的甲酸)开始梯度洗脱,然后在8分钟后增至38%的溶液B(0.1%溶于乙腈的甲酸)。该柱用90%B冲洗5分钟,再用98%A再生另外8分钟。流速为0.25mL/min。在第3到第11分钟之间,洗脱剂被切换到质谱仪的离子源。监测到前体产品转换为SAM(m/z 399→250)、SAH(m/z 385→250)和[d-4]-SAH(m/z 389→136)。离子源优化参数为:毛细管电压:对于SAM和SAH均为32V,碰撞能量:对于SAM和SAH分别为9V和7V,针电压:5000V,保护电压:600V。氮气作为干燥气体,温度为300°C,接口加热器设置为50°C。干燥气体和雾化气体分别设置为20psi和

50psi。

[0254] 基于细胞的SAM分析。LS174T细胞培养在含5%胎牛血清(FBS)的RPMI1640培养基中。用FIDAS试剂处理细胞24小时或48小时。收获细胞,并称重。将高氯酸(0.4M)加入到细胞团块(100 $\mu$ l/10mg)中用于脱蛋白。将样品充分混合,并在10,000g离心。将60 $\mu$ l上清液与20 $\mu$ l的内标物(5 $\mu$ g/ml的SAH-d<sub>4</sub>)混合。用2.5M的K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>将样品pH值调节至5-7,并在冰上放置15分钟以沉淀高氯酸钾。样品两次在10000g离心15分钟。通过LC-MS/MS使用基于以前出版物(参见Krijt等,色谱B杂志分析技术生物生命科学877,2061-6,(2009))的改进方法对5 $\mu$ l的上清液进行了分析。用0.4M高氯酸(PCA)的系列稀释液制备SAM和SAH标准,单个校准点为0.05、0.5、5、50 $\mu$ g/ml。

[0255] SAM合成。在25 $^{\circ}$ C,将5mg纯化的MAT2A在含有1mM L-甲硫氨酸和1mM ATP的500ml反应溶液中(50mM的Tris.Cl,50mM的KCl,10mM的MgCl<sub>2</sub>)培养5分钟。用500ml 0.4M的高氯酸停止反应,并用2.5M的K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>中和反应。将样品在冰上放置15分钟以沉淀出上述的高氯酸钾。用LC-MS/MS分析SAM。

[0256] 在这个例子中,通过使用本发明的生物素化的化合物,可以纯化并鉴定蛋氨酸腺苷转移酶2A(MAT2A),作为本文描述的卤代芪类似物的直接目标。

[0257] 将CRC细胞裂解物与链霉亲和素磁珠±生物素-FIDAS一起培养(图9A),并用2.5mM的D-生物素洗脱结合蛋白。纯化的样品通过4-12%梯度的SDS-PAGE进行分离并用银染法分析(图9B)。确定了两个特定的蛋白条带。通过MALDI-TOF/TOF和LC-MS/MS质谱法对这些条带进行了分析。通过这两种方法,这两个条带经确定,上面的条带是蛋氨酸腺苷转移酶2A(MAT2A),下面的条带是蛋氨酸腺苷转移酶2B(MAT2B)(图9B)。

[0258] 由MAT2A和MAT2B彼此结合形成复合物,以确定哪个亚基直接与FIDAS试剂相互作用,纯化重组的MAT2A和MAT2B并测试与FIDAS的相互作用。简单地说,GST-MAT2A和GST-MAT2B的融合蛋白在大肠杆菌中被表达和纯化。将这些蛋白与带或不带生物素化衍生物13的链霉亲和素磁珠一起培养(图9A)。用2.5mM的D-生物素洗脱结合蛋白,并用抗GST抗体通过免疫印迹法分析该结合蛋白。结果发现MAT2A直接与生物素化的FIDAS试剂相结合;MAT2B通过MAT2A间接与FIDAS试剂相结合(图10)。

[0259] 实施例9

[0260] 卤代芪类似物对MAT2A酶活性的影响

[0261] 蛋氨酸腺苷转移酶催化ATP和L-蛋氨酸的S-腺苷蛋氨酸(SAM或AdoMet)合成反应。在哺乳动物中,有三种类型的蛋氨酸腺苷转移酶,MATI/III和MATII。MATI和III是 $\alpha$ 1亚基的四聚体或二聚体(由MAT1A编码)并在成人肝脏中表达。MAT2A编码蛋氨酸腺苷转移酶II型的催化亚基( $\alpha$ 2)。MAT2B编码了 $\alpha$ 2的调节亚基。MAT2A和MAT2B广泛地表达在增殖细胞和肿瘤中。MAT2A控制SAM的细胞水平,对于包括DNA甲基化和蛋白质甲基化的许多细胞甲基化反应,SAM是主要的甲基供体。

[0262] 为了测试FIDAS试剂是否抑制MAT2A的酶活性,开发LC-MS/MS方法对AdoMet(SAM)和SAH(S-腺苷高半胱氨酸)进行检测和分析(数据未示出)。此外,开发了体外方法,由L-蛋氨酸和ATP合成SAM。结果表明,白藜芦醇和化合物4r均抑制SAM合成中的MAT2A的活性,并且在LS174细胞中10 $\mu$ M的化合物4r比30 $\mu$ M的白藜芦醇更加明显地降低了MAT2A的活性。这些数据表明,在MAT2A抑制中,4r显著强于白藜芦醇(图11A)。在抑制SAM和SAH的试验中的另一个

卤代芪类似物的测试表明,化合物4dd比4r在抑制MAT2A和降低SAM和SAH中更有效(图11B和11C)。在图11B和11C中,将3 $\mu$ M的4dd对引起SAM和SAH浓度降低的效果与10 $\mu$ M的4r和30 $\mu$ M的白藜芦醇对引起SAM和SAH浓度降低的效果分别进行了比较。这些结果表明,化合物4dd比显著强于白藜芦醇的化合物4r更加有效。

#### [0263] 实施例10

##### [0264] MAT2A和MAT2B基因抑制细胞增殖的影响

[0265] 在这个实施例中,研究了MAT2A和MAT2B基因抑制细胞增殖的效果。为了研究细胞增殖中MAT2A和MAT2B的生物学功能,MAT2A或MAT2B基因的表达被shRNA敲掉(图12A和12B)。MAT2A和MAT2B shRNA均可抑制肝癌细胞Hep3B的增殖(图12C)。为了检测MAT2A和MAT2B是否是结肠癌细胞增殖所需的,在结肠癌细胞LS174T和HT29中敲掉MAT2A和MAT2B基因。在对MAT2A和MAT2B抑制LS174T和HT29细胞增殖的效果研究一段时间后,确定了MAT2A和MAT2B shRNA均抑制结肠癌细胞的增殖,并且在抑制癌细胞的增殖时MAT2A的抑制比MAT2B的抑制更有效(图13A和13B)。

#### [0266] 实施例11

##### [0267] 卤代芪类似物的代谢物对体外细胞增殖的影响

[0268] 如前所示,合成了本发明的卤代芪类化合物的一些代谢物(实施例2和图3)。在这项研究中,研究了这些代谢物对细胞增殖的影响。化合物4aa,4dd和4ee明显比白藜芦醇以及化合物4r更加有效(图14和15)。

#### [0269] 实施例12

##### [0270] 卤代芪类似物的代谢物对小鼠体内细胞增殖的影响

[0271] 在这项研究中,对小鼠口服卤代芪类似物的代谢物的功效进行了测试。

[0272] 根据上述方法和Zhang等,药物化学期刊54,1288-1297(2011))中所描述的方法培养移植瘤裸鼠。简单地说,将HT29细胞皮下注射到裸鼠的侧翼中。通过灌胃法用溶有20mg/kg化合物4dd的PEG400处理小鼠。如实施例7中所描述的,腹腔注射溶有化合物4r的玉米油抑制了移植瘤的生长。在这里,还表明本发明的卤代芪也可以溶解于其它溶剂中,例如PEG400和环状糊精。

[0273] 结果表明,4dd显著的抑制了移植瘤的生长,并且对体重无任何不良影响(图16)。

#### [0274] 实施例13

##### [0275] 卤代芪类似物对其它类型癌症的抑制

[0276] 正如上述所讨论的,本发明卤代芪类似物与MAT2A相结合并且抑制酶功能,这导致对结肠癌细胞增殖的抑制。因为,例如,在肝癌中,表明在MAT2A表达增加的同时MAT1A的表达减少了(参见Cai等,肝脏学(Hepatology)24,1090-7(1996)),申请人假设本发明的化合物应该能够抑制其它类型癌症的增殖,尤其在那些MAT2A的活性或表达增加的癌症的增殖。

[0277] 为了验证这一假设,用本发明的卤代芪类似物治疗大量癌细胞株。结果表明,卤代芪类似物也能够抑制其它类型的癌症。如图17所示,本发明的化合物抑制乳腺癌(图17A)、肺癌(图17B和C)、类癌(图17D)和前列腺癌(图17E)细胞株的细胞增殖。

#### [0278] 实施例14

##### [0279] MAT2A和卤代芪类似物的结合研究

[0280] 为了验证本发明的卤代芪类似物是否也与MAT1A相结合,从大肠杆菌中克隆并纯

化出了多聚组氨酸标记(His-tagged)的MAT1A。执行体外结合试验,结果表明,测试的化合物只结合MAT2A,而不结合MAT1A(图18B)。根据公布的MAT结构,底物结合和催化涉及几个关键残基。在这些关键残基中,赖氨酸265保存在MAT1A和MAT2A之间以及不同物种之间。当赖氨酸265突变为亮氨酸(K265L,图18A)时,MAT2A和化合物13之间的结合明显减少,这表明K265涉及与本发明的化合物相结合(图18C)。一并考虑,FIDAS试剂是MAT2A的特异性抑制剂,对于多种癌症以及代谢性疾病是有前景的候选药物。

[0281] 实施例15

[0282] 卤代芪类似物在抑制其他MAT2A相关的疾病或紊乱中的功效

[0283] 还表明的是,MAT2A是由肝内乙型肝炎感染诱导的(Liu等,生物化学杂志.286,17168-80(2011))。既然本发明的化合物有效地抑制MAT2A并减少SAM,那么这些化合物在治疗可能涉及MAT2A的任何疾病或病症时是有效的,这些疾病或癌症包括,但不限于诸如糖尿病的代谢性疾病、心脏疾病、老化、肥胖、诸如如阿尔茨海默氏症和帕金森病的神经退行性疾病。

[0284] 在本发明中,仅仅示出并描述了本发明的优选实施例和其多功能的实施例。可以理解的是,本发明能够使用在各种其他组合中和环境中,且能够在本文表达的发明构思的范围内进行变化或修饰。因此,举例来说,采用不超过常规的实验方法,本领域技术人员将识别、或能够确定本文描述的特定物质、步骤及安排。这些等同物被认为是在本发明的范围之内,并由权利要求覆盖。包括本发明所引用期刊文章的任何或所有的专利和/或出版物通过引用明确地并入本文。

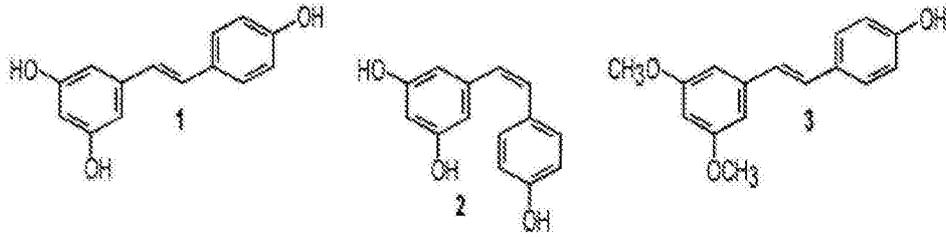


图1

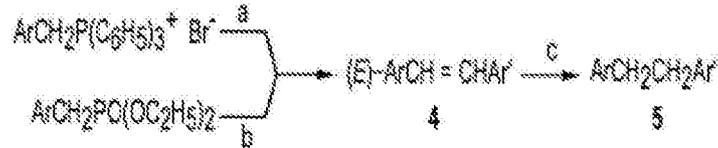


图2

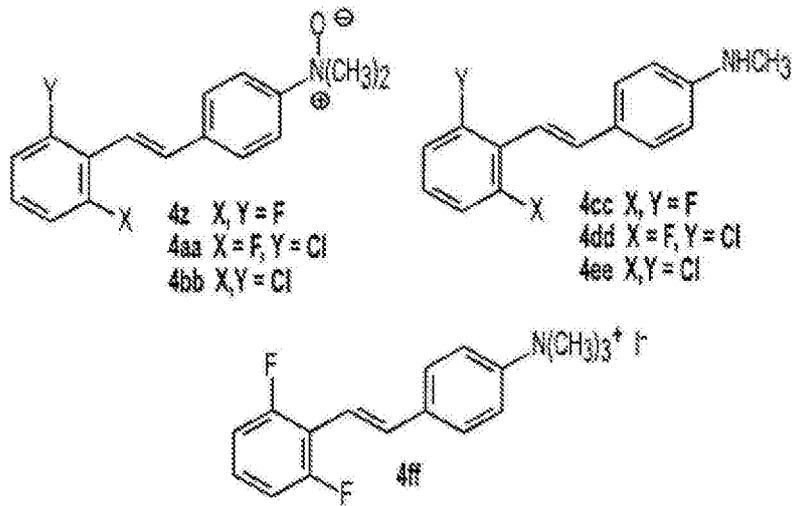


图3

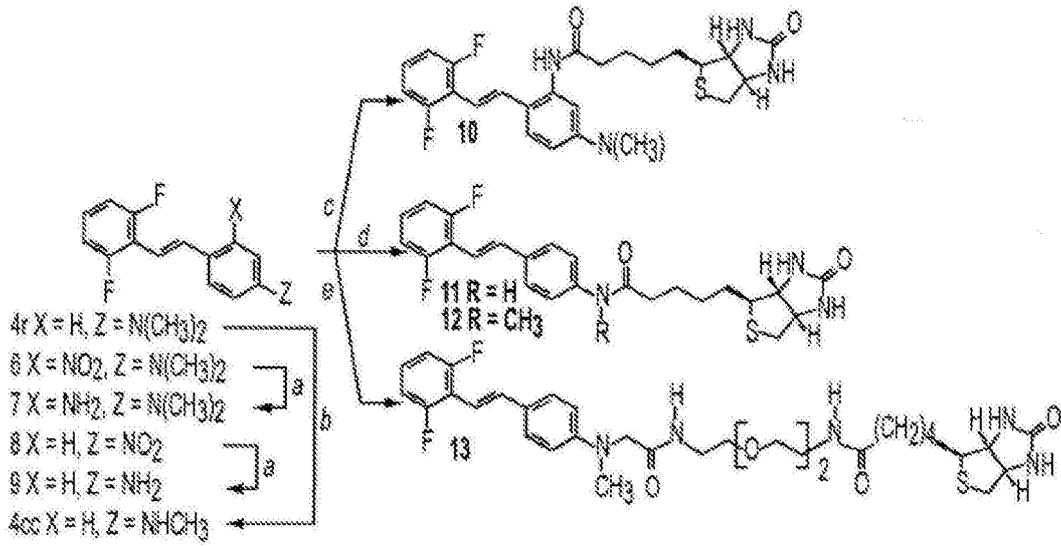


图4

A

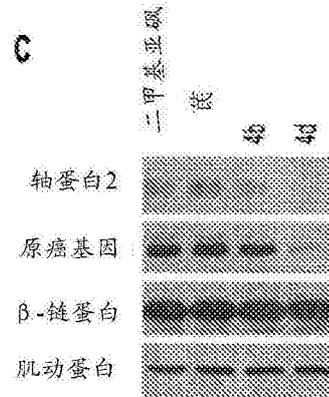
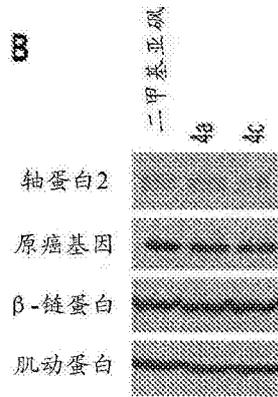
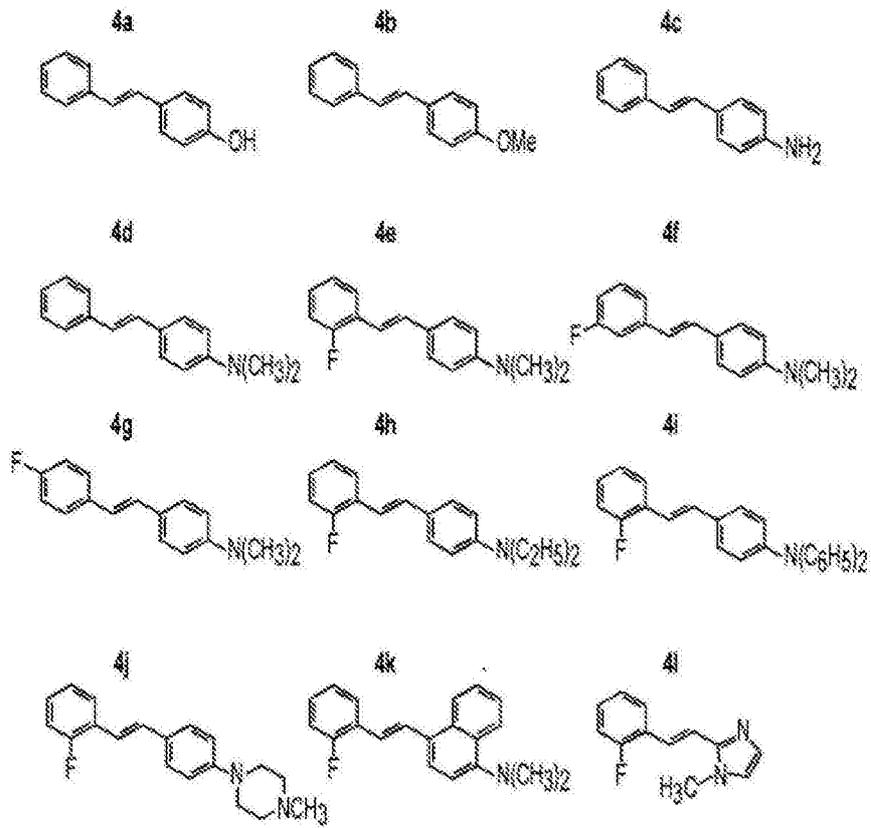


图5

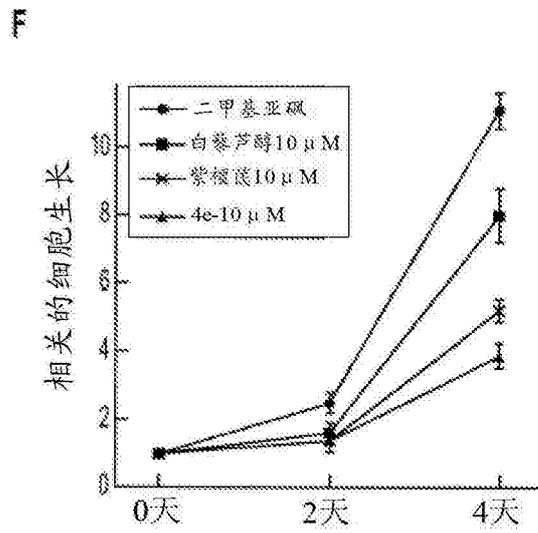
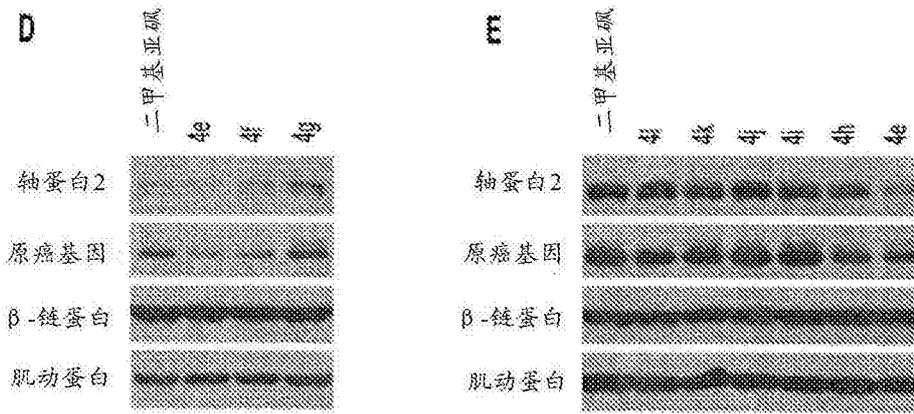
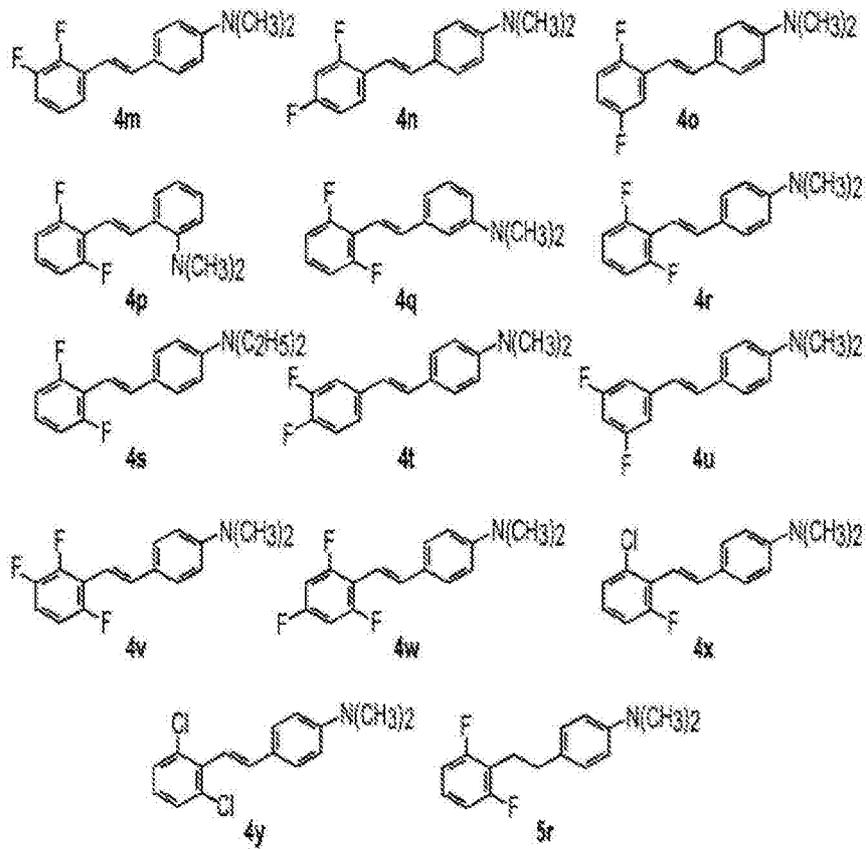


图5(续)

A



B

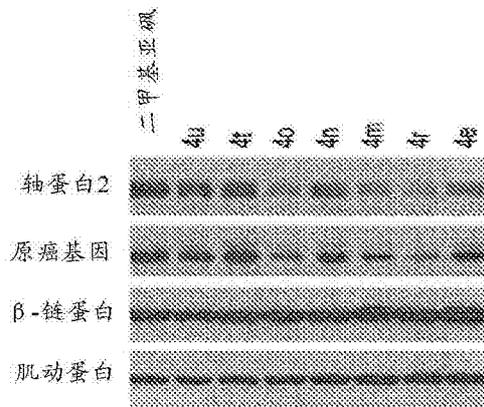


图6

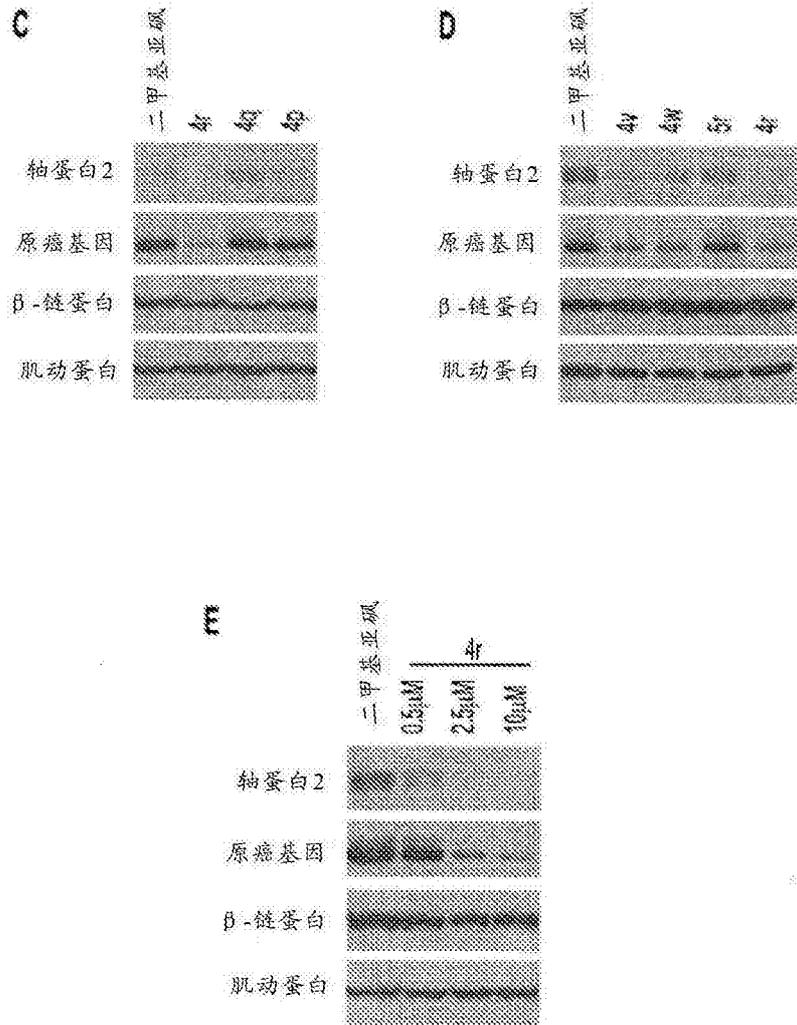


图6(续)

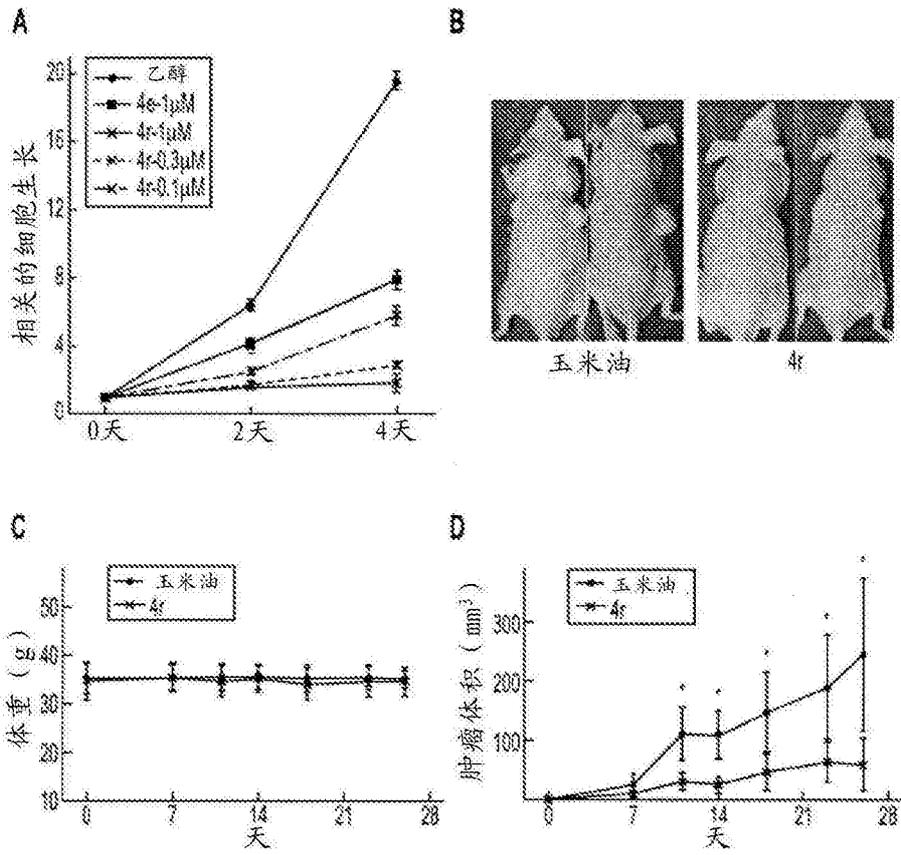


图7

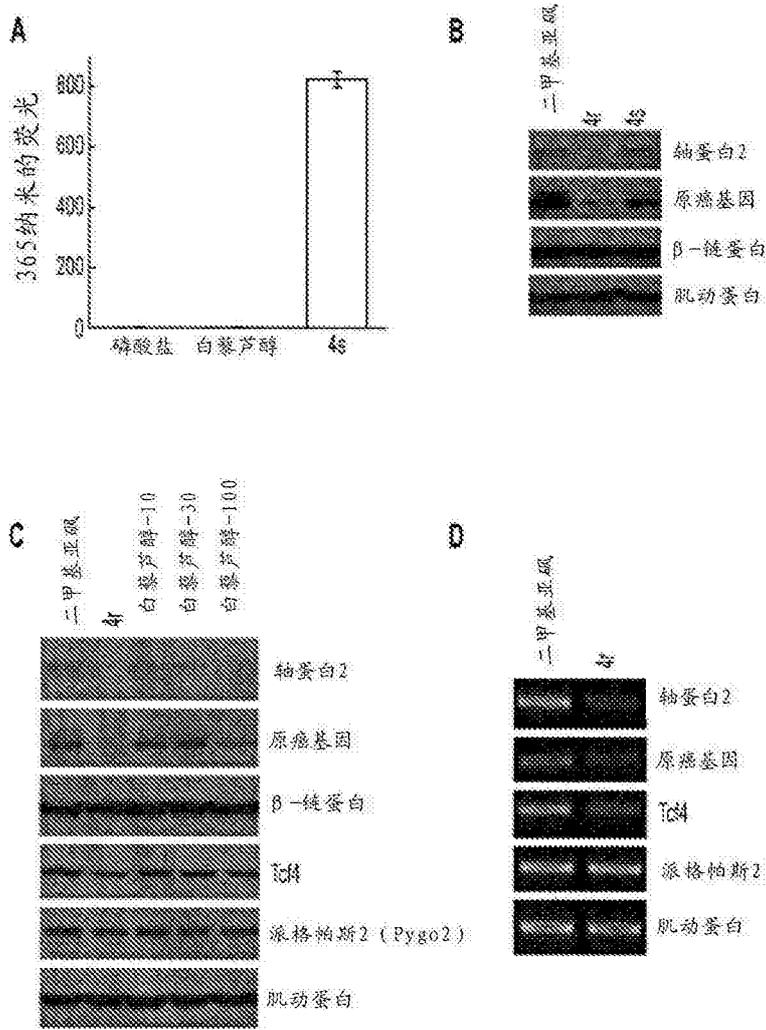


图8

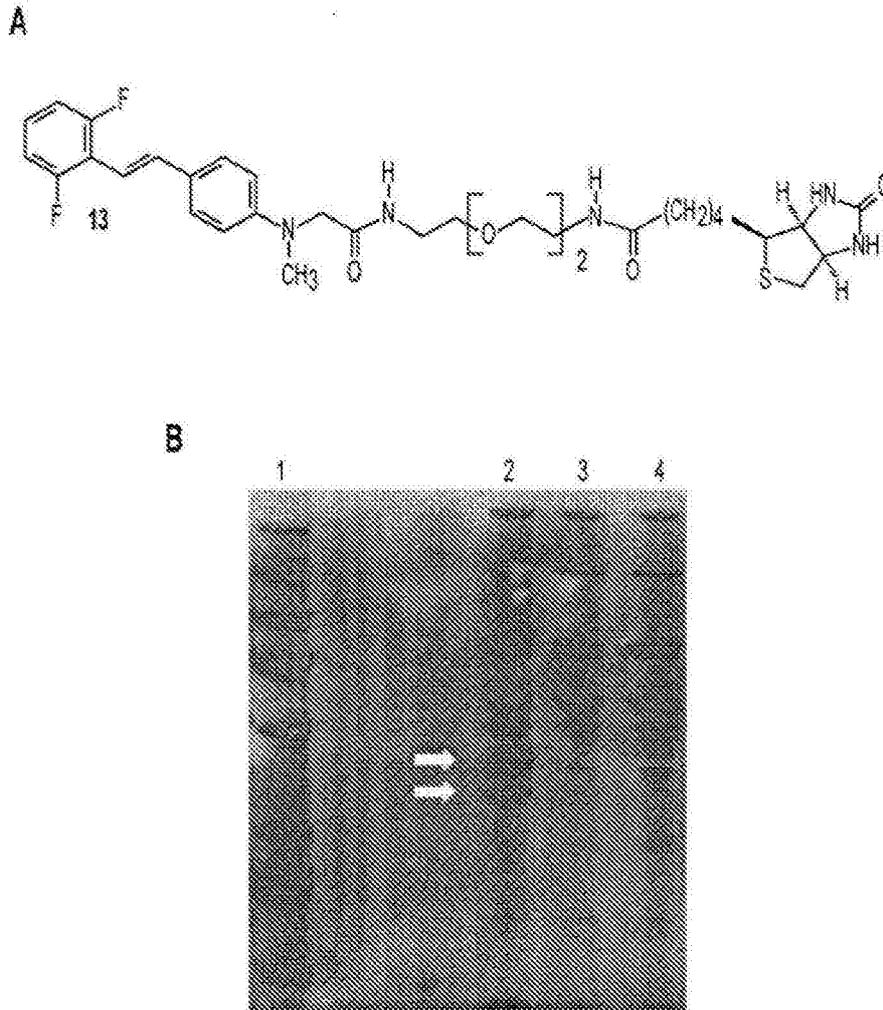


图9

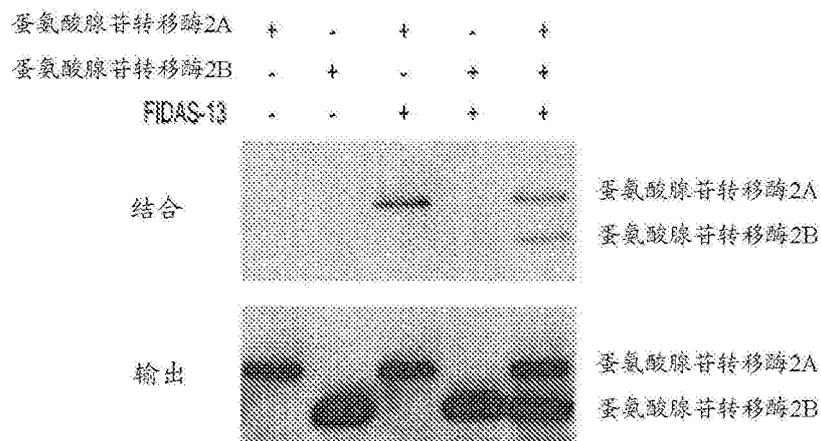


图10

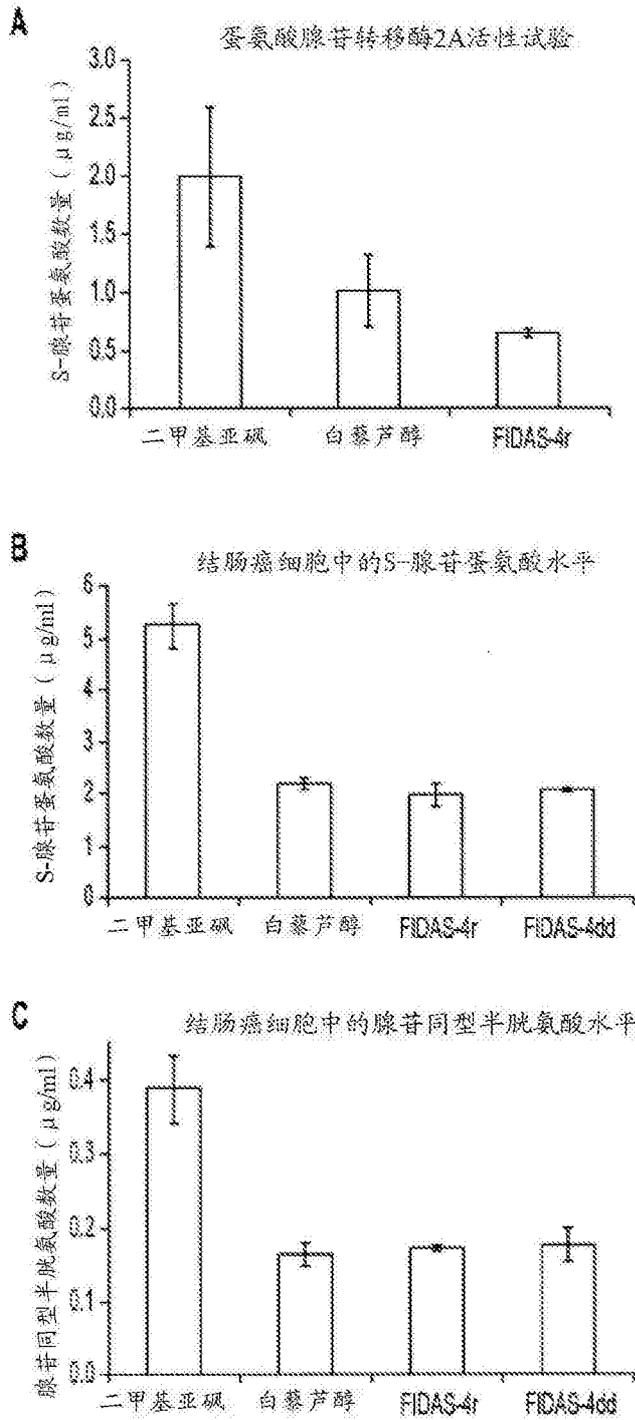


图11

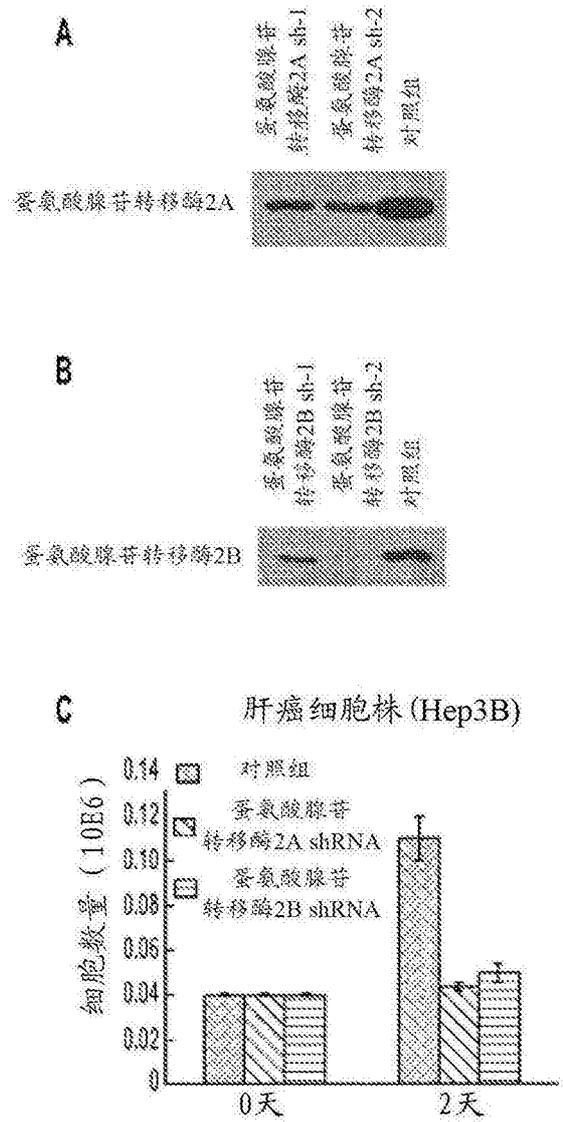


图12

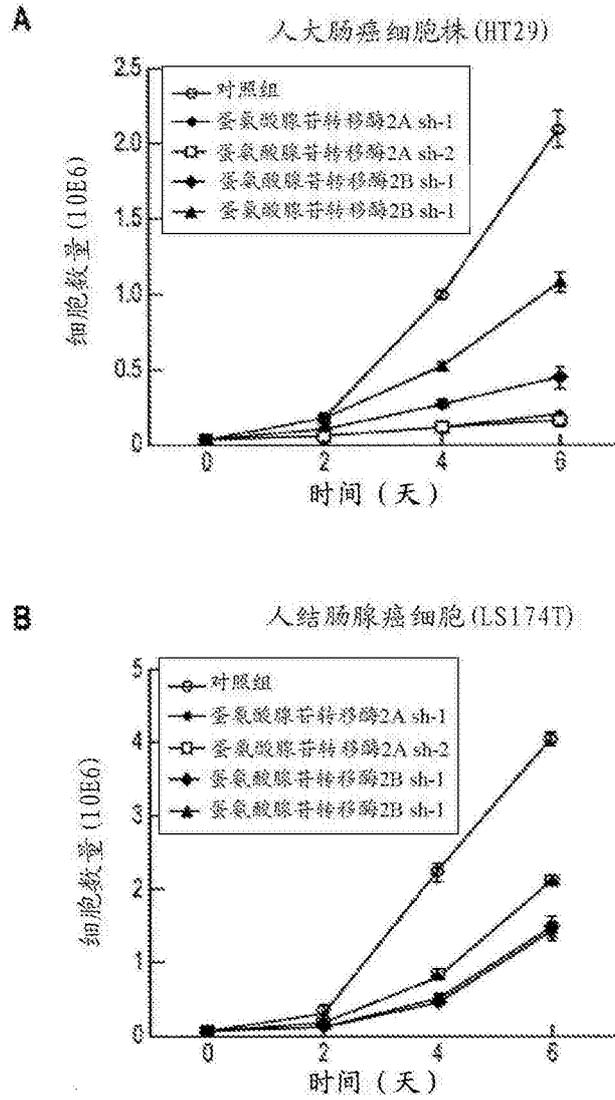


图13

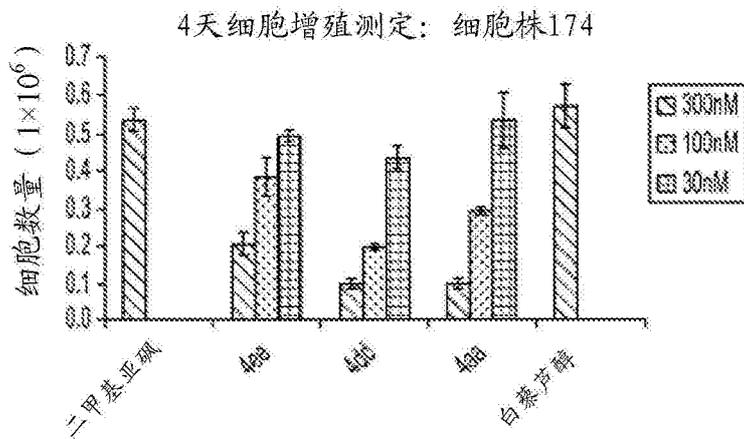


图14

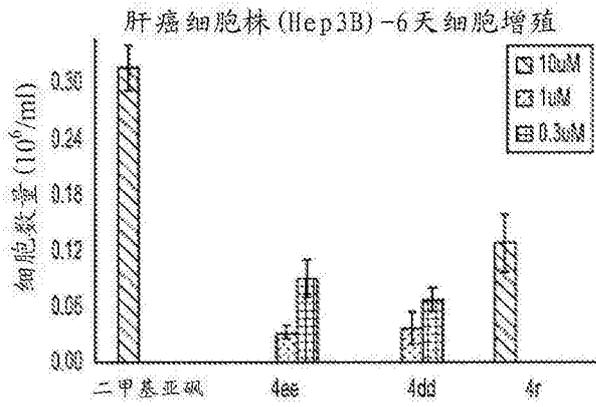


图15

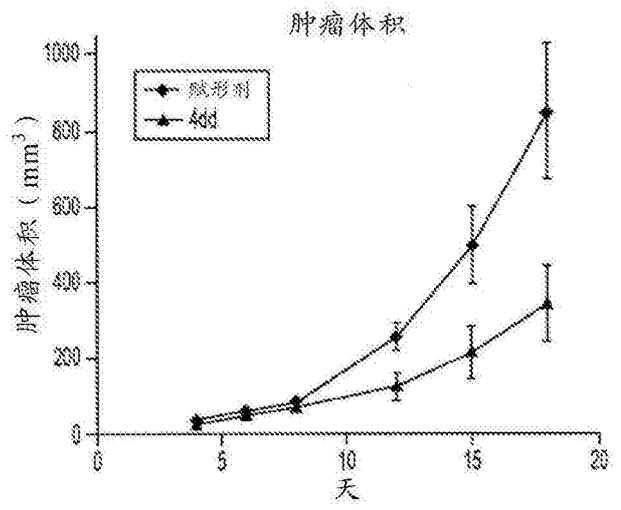


图16

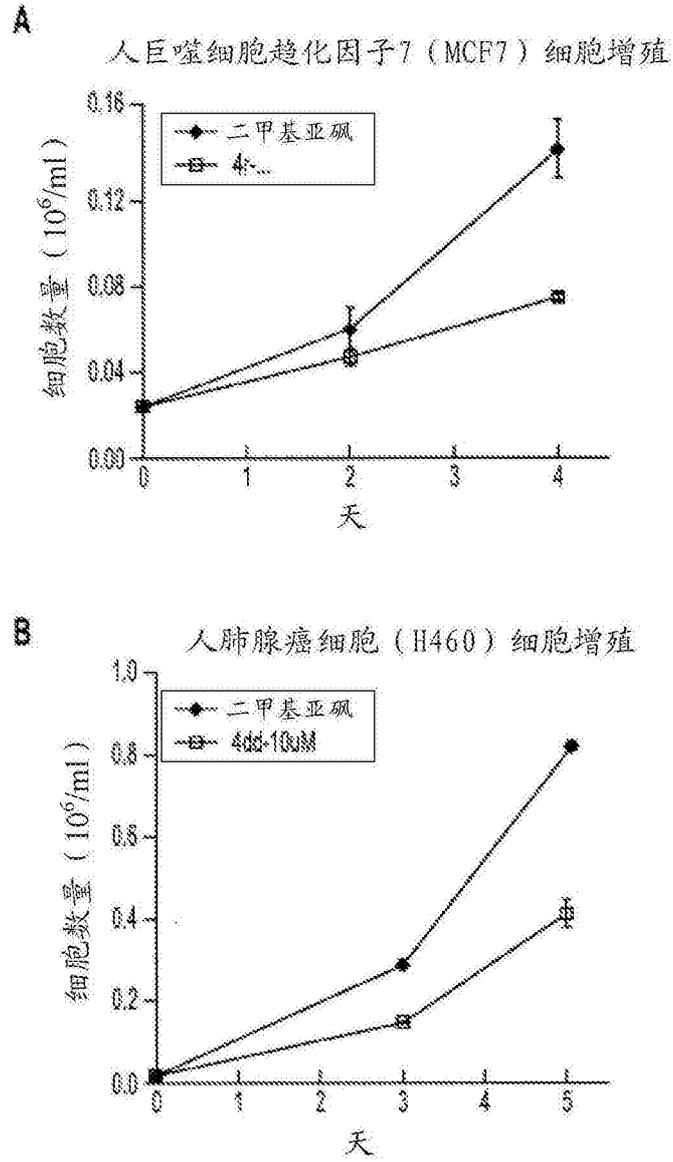
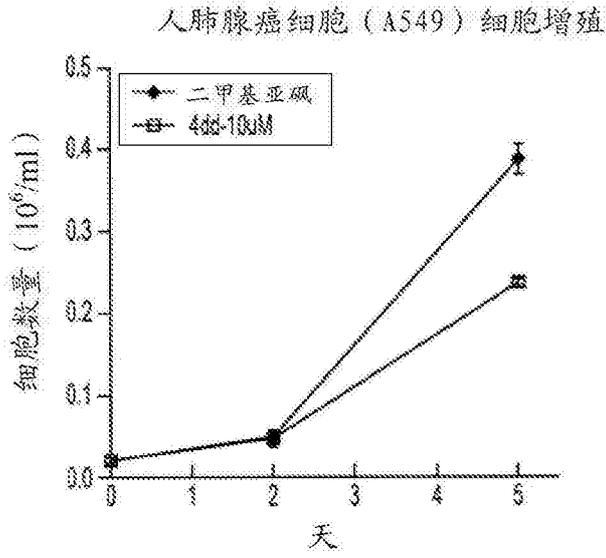
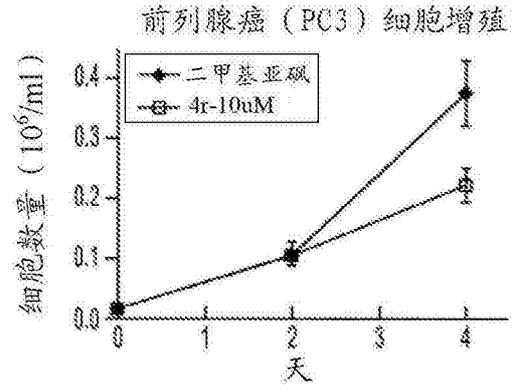


图17

C



E



D

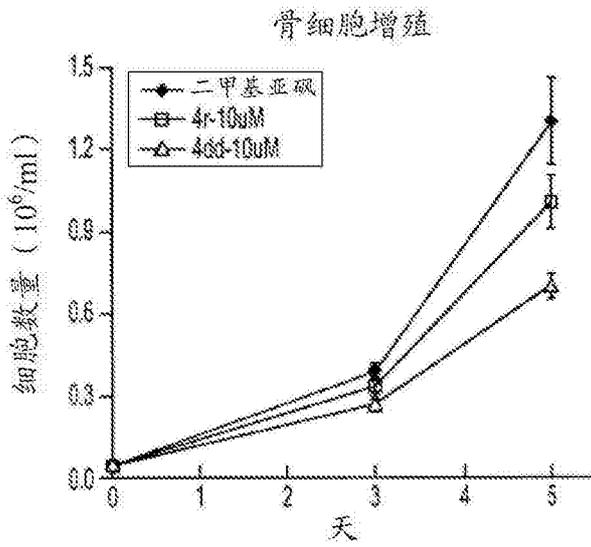


图17(续)

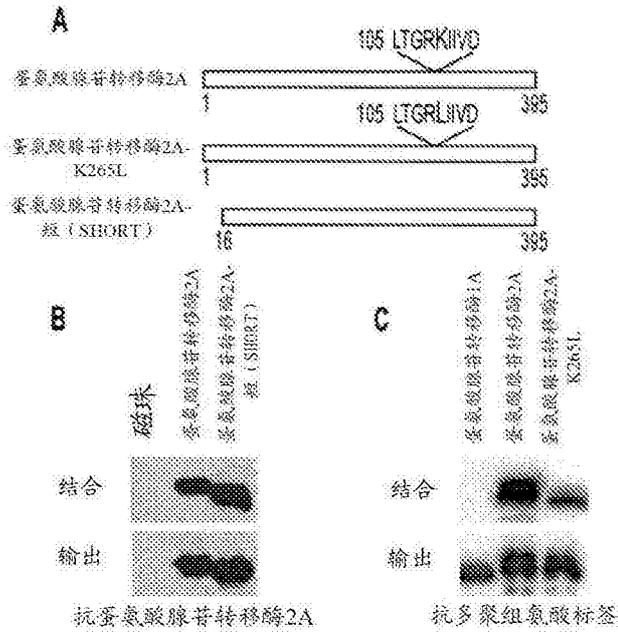


图18