

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 1 月 18 日 (18.01.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/011663 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/5377 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/108196

(22) 国际申请日: 2022 年 7 月 27 日 (27.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210809550.2 2022年7月11日 (11.07.2022) CN

(71) 申请人: 中国科学技术大学 (**UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA**) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市黄山路 443 号中国科学技术大学西校区生命科学学院 545 室, Anhui 230027 (CN)。

(72) 发明人: 姚雪彪(**YAO, Xuebiao**); 中国安徽省合肥市黄山路 443 号中国科学技术大学西校区生命科学学院 545 室, Anhui 230027 (CN)。 刘行(**LIU, Xing**); 中国安徽省合肥市黄山路 443 号中国科学技术大学西校区生命科学学院 545 室, Anhui 230027 (CN)。 杨丰瑞(**YANG, Fengrui**); 中国安徽省合肥市黄山路 443 号中国科学技术大学西校区生命科学学院 545 室, Anhui 230027 (CN)。 马明明(**MA, Mingming**); 中国安徽省合肥市黄山路 443 号中国科学技术大学西校区生命科学学院 545 室, Anhui 230027 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (**JIEKAI&PARTNERS**); 中国北京市丰台区广安路 9 号 5 号楼 15A 层, Beijing 100055 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) **Title:** CENTROMERE PROTEIN CENP-M SMALL MOLECULE INHIBITOR CENPEMLIN, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 着丝粒蛋白 CENP-M 小分子抑制剂 cenpemlin 及其制备方法与应用

(57) **Abstract:** Disclosed are a centromere protein CENP-M small molecule inhibitor cenpemlin, and a preparation method therefor and the use thereof. A small molecule compound cenpemlin is obtained by means of analyzing the protein plane information of the fine structures of CENP-M and CENP-L and performing targeted screening. The results of biochemical and cytological experiments all indicate that cenpemlin inhibits the proliferation of cancer cells by means of interfering with the interaction between CENP-M and CENP-L, thereby providing a new compound for analyzing and interfering with the rapid proliferation of cancer cells.

(57) 摘要: 公开了着丝粒蛋白 CENP-M 小分子抑制剂 cenpemlin 及其制备方法与应用。通过解析 CENP-M 与 CENP-L 精细结构的蛋白位点信息, 靶向筛选到小分子化合物 cenpemlin。生物化学与细胞学实验结果均表明, cenpemlin 通过干预 CENP-M 与 CENP-L 的相互作用, 抑制了癌细胞的增殖, 为解析和干预癌细胞的快速增殖提供了新型化合物。



WO 2024/011663 A1

着丝粒蛋白 CENP-M 小分子抑制剂 cenpemlin 及其制备方法与应用

技术领域

本发明属于医药领域，具体涉及有丝分裂关键着丝粒蛋白 CENP-M 小分子抑制剂 cenpemlin 及其制备方法与应用。

5

背景技术

细胞精准的有丝分裂保证了基因组的稳定及细胞稳态的维持。有丝分裂通过姐妹染色单体的平等分离产生两个基因相同的子细胞。驱动染色体分离的分子机制在真核生物进化过程中相对保守。动粒是此分子机制的基本要素，可视为层状结构，其内层和外层分别直接接触着丝粒染色质和纺锤体微管。动粒内层由至少 16 个着丝粒蛋白质组成，这些蛋白质组装成多元复合物并直接与着丝粒染色质相互作用，这些复合物包括：CENP-H、I、K、M 复合物、CENP-O、P、Q、U、R 复合物，CENP-T、W、S、X 复合物、CENP-L、N 复合物和 CENP-C 蛋白，这些复合物组装完成后进一步招募其余动粒蛋白。虽然着丝粒蛋白之间的相互作用研究广泛，但其中一些蛋白的具体生物学功能仍待进一步探索。

15

近来，我们研究组利用冷冻电镜解析了 CCAN 复合物的结构，CCAN 复合物呈现为“人”字形，CENP-L/N 二聚体构成了拱门，DNA 从拱底处穿过。CENP-M 蛋白与其他三种着丝粒蛋白 CENP-H、I、K 相互作用形成复合物，成为动粒内层的一部分。CENP-M 在拱顶顶端的 CENP-L/N 二聚体附近结合，与 CENP-L 和 CENP-N 在空间上都存在相互作用界面。同时，CENP-M 在整个细胞周期中都存在动点定位，其功能可能是组成性的，但具体的分子机制仍未完全解析。

20

CENP-M 最初被命名为 PANE1 (proliferation associated nuclear element 1)，仅在后生动物中保守。随后的研究证明，CENP-M 与 CENP-A、CENP-L、CENP-N 和 CENP-T 密切相关。CENP-M 的缺失导致其他 CCAN 蛋白的错误定位，从而表明 CENP-M 对于内层动粒的组装和稳定至关重要。然而，尽管 CENP-M 在结构和进化上与 GTP 水解酶相关，但它不是一种真正意义上的酶。通过与进化保守的 CENP-H、I、K 蛋白形成四元复合物，在招募染色质重塑 FACT 蛋白复合物、促进 CENP-A 核小体重构和招募纺锤体检验点相关蛋白等一系列重要生物学进程中发挥至关重要的作用。

25

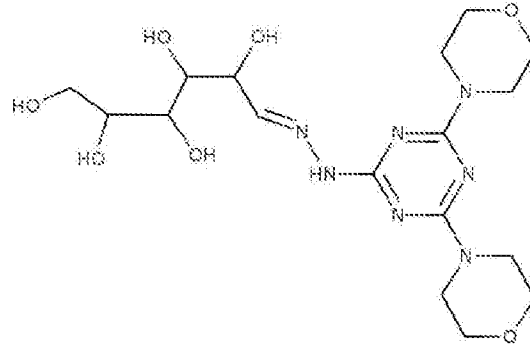
目前没有有关 CENP-M 抑制剂的相关报道。

30

发明公开

本发明的目的是提供一种化合物、其异构体及其药学上可接受的盐及其制备方法与应用。

本发明所提供的化合物，其结构式如式 I 所示：



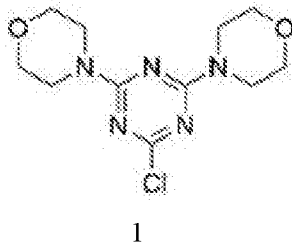
式 I,

上述式 I 所示化合物特异性地靶向有丝分裂关键着丝粒蛋白 CENP-M，作为 CENP-M 抑制剂，名为 **cenpemlin**。

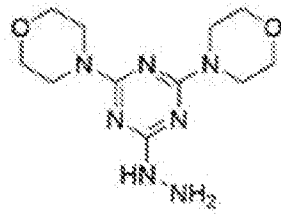
CENP-M 是内层动粒 CCAN 复合物中的重要一员，因在快速增殖的细胞中被鉴定而命名为 PANE1，随后的研究发现 CENP-M 是一种假 GTP 水解酶。近年来，关于内层动粒 CCAN 复合物的研究层出不穷，但是其精细结构仍然没有完全解析。我们采用基于冷冻电镜的结构生物学方法来回答科学问题。利用昆虫体系表达纯化 CCAN 复合物蛋白，随后在体外重组，进而得到了完整的 CCAN 复合物。通过冷冻电镜收集复合物的三维图像，随后进行三维重构，最终，我们得到了包含 CENP-M 蛋白的 CCAN 复合物的结构信息。基于 CENP-M 和 CENP-L 蛋白相互作用界面的精细结构，我们通过分子对接分析、虚拟筛选、细胞表型分析及蛋白质相互作用实验相结合，鉴定出具有特异性的 CENP-M 靶向小分子化合物，式 I 所示化合物，**cenpemlin**。

式 I 所示化合物根据图 1 所示合成路线图通过包括如下步骤的方法制备得到：

1) 使得三聚氯氰和吗啉在碱性条件下反应，生成含双 1,4-氧氮杂环的氯氰中间产物 1；



2) 将含双 1,4-氧氮杂环的氯氰中间产物 1 与水合肼发生取代反应，生成 1,3(1,4-氧氮杂环)-5-肼聚氰（化合物 2）；



5

3) 在冰醋酸中使得 1,3(1,4-氧氮杂环)-5-肼聚氰与六碳单糖发生缩合反应, 得到式 I 所示化合物。

上述方法步骤 1) 中, 三聚氯氰与吗啉的摩尔比可为 1:2-2.5, 具体可为 1:2;

所述反应在冰水浴作用下进行, 所述反应的时间可为 1-1.5h, 具体可为 1h;

10 所述碱性条件由碳酸氢钠提供; 碳酸氢钠与吗啉的摩尔比可为 1:1.0-1.2, 具体可为 1:1;

上述方法步骤 2) 中, 含双 1,4-氧氮杂环的氯氰中间产物 1 与水合肼的摩尔比为 1:1-2;

所述反应的温度为 40℃-60℃, 时间为 3-4h, 具体可为 3h;

15 上述方法步骤 3) 中, 1,3(1,4-氧氮杂环)-5-肼聚氰与六碳单糖的配比可为 10mmol:1.8-2.0g, 具体可为 10mmol:1.8g;

可作为原料的六碳单糖包括但不限于 D-葡萄糖, D-半乳糖, D-甘露糖;

所述反应的温度为 40℃-60℃, 时间为 4-5h, 具体可为 4h。

20 式 I 所示化合物、其异构体及其药学上可接受的盐在制备具有如下功能的产品中的应用也属于本发明的保护范围:

1) 着丝粒蛋白 CENP-M 抑制剂;

2) 抑制细胞有丝分裂的试剂;

3) 抑制肿瘤细胞增殖的产品;

4) 预防和/或治疗癌症的产品;

25 所述 2) 中, 抑制细胞有丝分裂是通过干扰 CENP-M 介导的动粒组装实现的, 具体为抑制 CENP-M 与 CENP-L 相互作用;

3) 中, 所述肿瘤细胞可为上皮癌细胞; 具体可为宫颈癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞等;

4) 所述癌症具体可为上皮癌, 具体可为宫颈癌、肝癌、乳腺癌等。

30 本发明还提供一种抑制细胞有丝分裂的试剂, 所述试剂含有式 I 所示化合物、其异构体或其药学上可接受的盐。

本发明还提供一种抑制肿瘤细胞增殖的产品，所述抑制肿瘤细胞增殖的产品含有式 I 所示化合物、其异构体或其药学上可接受的盐。

本发明还提供一种预防和/或治疗癌症的产品，所述预防和/或治疗癌症的产品含有式 I 所示化合物、其异构体或其药学上可接受的盐。

5 本发明还提供一种抑制 CENP-M 与 CENP-L 相互作用的方法，为：向含有 CENP-M 和 CENP-L 的体系中加入式 I 所示化合物、其异构体或其药学上可接受的盐，培养，即可。

10 本发明提供的 CENP-M 抑制型的有机小分子化合物，在加入培养基中与 CENP-M 蛋白结合后，使得染色体不能正确排列并进一步导致细胞出现有丝分裂的延迟及滞后染色体的表型。

实时活细胞拍摄发现 cenpemlin 处理的细胞，会产生染色体错误排列和纺锤体不稳定，还会导致有丝分裂延迟的表型。这些诱导细胞有丝分裂异常的表型与 CENP-M 敲低的表型是一致的。

15 Cenpemlin 在 1 μ M 浓度的处理下可以抑制 CENP-M 与 CENP-L 的相互作用。利用 cenpemlin 对 CENP-M/CENP-L 的有效抑制作用，可以进一步研究 CENP-M 在有丝分裂动粒组装及染色体排列中的功能。

本发明的 CENP-M 小分子抑制剂 cenpemlin 将在细胞生物学研究中发挥重要作用，同时其调控肿瘤细胞增殖的功效可为新型化疗药物的研制奠定基础。

20 本发明通过解析 CENP-M 与 CENP-L 精细结构的蛋白位点信息，靶向筛选到小分子化合物 cenpemlin。生物化学与细胞学实验结果均表明，cenpemlin 通过干预 CENP-M 与 CENP-L 的相互作用，抑制了癌细胞的增殖，为解析和干预癌细胞的快速增殖提供了新型化合物。

附图说明

25 图 1 为本发明式 1 所示 CENP-M 抑制剂的合成路线图。

图 2 为小分子化合物 cenpemlin 的核磁鉴定结果。

图 3 为小分子化合物 cenpemlin 对细胞有丝分裂的表型分析。

图 4 为小分子化合物 cenpemlin 阻滞细胞有丝分裂的实时成像分析。

图 5 为小分子化合物 cenpemlin 的洗脱效果分析。

30 图 6 表明小分子化合物 cenpemlin 抑制 CENP-M 与 CENP-L 相互作用。

图 7 为小分子化合物 cenpemlin 抑制癌细胞增殖的统计分析。

图 8 为小分子化合物 cenpemlin 抑制小鼠体内肝癌细胞增殖的实验。

实施发明的最佳方式

5 下述实施例中的实验方法，如无特别说明，均为常规方法

下面结合实施例对本发明作进一步的说明，但不以任何方式对本发明加以限制，基于本发明教导所做的任何变更或改进，均属于本发明的保护范围。

下述实施例中采用的 CENP-M 在 NCBI 数据库中的登录号
Accession:NP_076958.1 (Update: 27-JUN-2022)

10 下述实施例中采用的 CENP-L 在 NCBI 数据库中的登录号 Accession:
NP_001164653.1 (update: 30-JAN-2022)

实施例 1、小分子化合物 cenpemlin 的合成

15 将三聚氯氰 (10.0 g, 0.054 mol) 溶于 150 mL 二氯甲烷，将溶液在冰水浴中冷却到低于 5° C，将吗啉 (9.50 mL, 0.108 mol) 和碳酸氢钠 (9.1 g, 0.108 mol) 溶于 100 mL 水，将溶液在冰水浴中冷却到低于 5° C。冰水浴中，在快速搅拌下，将水溶液滴加到二氯甲烷溶液中，并继续搅拌反应 1 h。将两相分开，用 50 mL 水洗涤有机相，洗涤两次。通过旋蒸浓缩有机相至 20 mL，向有机相中加入 50 mL 石油醚，将产生的白色
20 沉淀过滤并用冷水和冷石油醚洗涤，干燥后得 14.7 g 白色固体，即中间产物 1，产率 95%。核磁氢谱：¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.80-3.68 (m, 16H)。

将中间产物 1 (5.7 g, 20 mmol) 加入 25 mL 乙醇，加入 5 mL 水合肼，将溶液加热至 40°C-60°C 回流 3 小时，然后冷却到室温，白色固体逐渐析出。过滤，并用 20 mL 乙醇洗涤，洗涤两次，干燥后得 5.2 g 白色固体产物，即化合物 2，产率 93%。核磁氢
25 谱：¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.80-3.68 (m, 16H), 4.77 (d, 2H), 9.39 (t, 1H)。

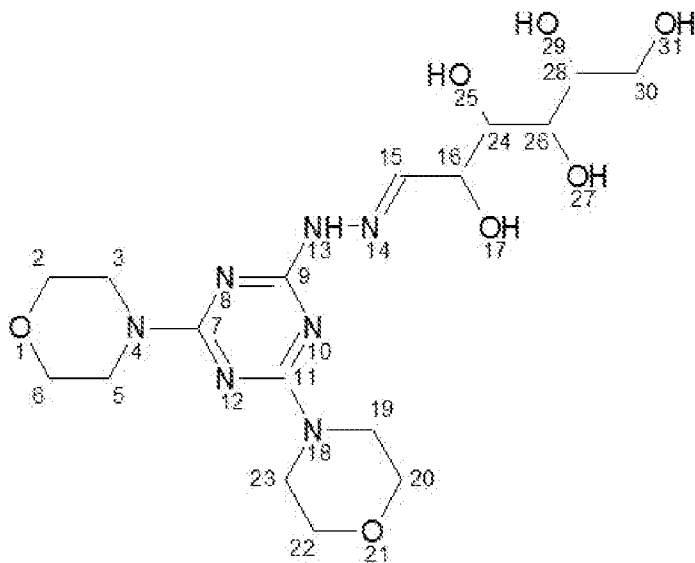
将化合物 2 (2.8 g, 10 mmol) 加入 25 mL 乙醇，加入 10 mmol 六碳糖 (1.8 g)，并加入 0.2 mL 冰醋酸，将溶液加热至 40°C-60°C 回流 4 小时，然后冷却到室温，白色固体逐渐析出。过滤，并用 20 mL 乙醇洗涤，洗涤两次，得白色固体产物，用乙醇/乙酸乙酯重结晶可纯化产物。根据所用六碳糖的种类不同，所得产物的产率在 70-85%
30 间。可作为原料的六碳单糖包括但不限于 D-葡萄糖，D-半乳糖，D-甘露糖。

利用 Bruker AV-500 核磁共振波谱仪进行小分子结构式的鉴定，根据氢谱的化学

位移和峰的积分面积得知该小分子的结构式符合式 I 结构。

图 2 示小分子化合物 cenpemlin 的核磁鉴定结果。

化合物的结构式和其 600 MHz ^1H NMR 谱图的归属情况如下：



5

其 600 MHz ^1H 谱图的归属情况如下：

- 10 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 3.01 (26, m, 1CH), δ 3.59 (3, 5, 19, 23, m, 4CH₂), δ 3.67 (3, 5, 19, 23, m, 4CH₂), δ 4.34 (30, t, 1CH₂), δ 4.43 (28, m, 1CH), δ 4.62 (26, m, 1CH), δ 4.87 (16, d, 1CH), δ 6.25 (15, d, 1CH), δ 8.05 (13, s, 1NH)

15 实施例 2、小分子化合物 cenpemlin 造成染色体排列错误

1、实验步骤

- 1) 将稳定表达 GFP-CENP-N 的 HeLa 细胞接种到直径为 12 mm 的圆盖玻片上；
- 2) 24 h 后加入终浓度为 2mM 的 Thymidine 处理细胞 14-16h；
- 3) 用 37° C 预热的 PBS 清洗细胞 3 次将 Thymidine 洗脱，换上新鲜培养基继续
- 20 培养 8h；
- 4) 实验组加入终浓度为 1 μ M 的 cenpemlin，对照组加入同等体积的 DMSO，处理 1 h；
- 5) 用含 3.7% 甲醛的 PBS 缓冲液固定细胞 10 min；

- 6) 经过 0.2% TritonX-100 打孔和 1% BSA 封闭后, 室温孵育 ACA 抗体 1 h;
- 7) DAPI 染色 3 min 后封片;
- 8) 将玻片置于 DV 显微镜载物台上, 在 60 $\times$, NA=1.42 镜头下拍摄。

2、结果如图 3 所示。

- 5 cenpemlin 处理 HeLa 细胞后可见大量未排列到赤道板的染色体, 以 GFP-CENP-N 作为 CENP-L/N 复合物的表征, 可见未排列至赤道板区域的动粒, 即表明, cenpemlin 处理细胞将导致细胞有丝分裂染色体队列异常。

实施例 3、小分子化合物 cenpemlin 造成有丝分裂阻滞

10 1、实验步骤

- 1) 将 HeLa 细胞接种到 35mm 活细胞培养皿中;
- 2) 24 h 后转染质粒 DNA: GFP-tubulin 和 mCherry-H2B (转染质粒细胞密度为 70%-80%);
- 3) 转染 6 h 后换上新鲜培养基并加入 2 mM 的 Thymidine 处理细胞 14-16h;
- 15 4) 用 37 $^{\circ}$ C 预热的 PBS 清洗细胞 3 次将细胞释放, 随后换上新鲜培养基继续培养;
- 5) 打开 Applied Precision Personal DV 显微镜及恒温装置使温度稳定在 37 $^{\circ}$ C;
- 6) 释放后 8-9 h 将细胞培养基换成 CO₂-independent Medium, 加入终浓度为 1 μ M 的 cenpemlin 或相同体积的 DMSO;
- 20 7) 将细胞置于 DV 显微镜 37 $^{\circ}$ C 恒温载物台上, 在 60 $\times$, NA=1.42 镜头下实时拍摄, 每隔 3 min 拍摄一帧。

2、结果如图 4 所示。

- 从染色体运动的情况来看, cenpemlin 处理后会致使细胞的部分染色体始终无法正确队列, 还造成了明显的有丝分裂延迟, 细胞在核膜破裂 120 min 后仍未进入后期。
- 25 该结论同样证实了之前一些研究所认为的 CENP-M 对纺锤体组装检验点的具有一定功能。

实施例 4、小分子化合物 cenpemlin 洗脱效果检测

30 1、实验步骤

- 1) 将 HeLa 细胞接种到 35mm 活细胞培养皿中;
- 2) 24 h 后转染质粒 DNA: GFP-tubulin 和 mCherry-H2B (转染质粒细胞密度为

70%-80%);

3) 转染 6 h 后换上新鲜培养基并加入终浓度为 20 μ M 的 MG132 和 cenpemlin 或 DMSO 处理细胞 1 h;

4) 打开 Applied Precision Personal DV 显微镜及恒温装置使温度稳定在 37 $^{\circ}$ C;

5) 用 37 $^{\circ}$ C 预热的 PBS 清洗细胞 3 次将细胞释放, 随后换上新鲜培养基继续培养;

6) 释放后立即将细胞培养基换成 CO₂-independent Medium;

7) 将细胞置于 DV 显微镜 37 $^{\circ}$ C 恒温载物台上, 在 60 $\times$, NA=1.42 镜头下实时拍摄, 每隔 3 min 拍摄一帧。

2、结果如图 5 所示。

Cenpemlin 处理后的细胞在 45 min 后退出有丝分裂, 但是细胞表现为多细胞表型, 即基因组出现不均等分配, 原因是 cenpemlin 处理后的细胞出现多极纺锤体现象。

实施例 5、小分子化合物 cenpemlin 影响 CENP-M 与 CENP-L 的相互作用

1、实验步骤

1) 将 HEK293T 细胞接种到 6cm 培养皿中;

2) 24 h 后转染质粒 DNA: GFP-CENP-M 和 FLAG-CENP-L (转染质粒细胞密度为 70%-80%);

3) 转染 4 h 后换上新鲜培养基并继续培养 24h;

4) 加入终浓度为 1 μ M 的 cenpemlin 或相同体积的 DMSO 处理细胞 1 h;

5) 用细胞刮将细胞刮下, 收集在离心管中, 1,000 rpm 离心去除培养基;

6) 加入细胞裂解 buffer 进行超声破碎, 12,000 rpm 离心 10 min;

7) 取上清与 FLAG beads 孵育 4h;

8) 细胞裂解 buffer 清洗 beads 3 次, sample buffer 煮样, 随后进行电泳和免疫印迹分析。

2、结果如图 6 所示。

Cenpemlin 处理后 (第三泳道) CENP-M 和 CENP-L 的相互作用相对于对照组 (第二泳道) 减弱, 表明 1 μ M 的 cenpemlin 足以破坏 CENP-M 与 CENP-L 的相互作用, 这一结果呼应了前文中的细胞表型实验, 说明 cenpemlin 抑制肿瘤细胞增殖是通过干扰 CENP-M 与 CENP-L 的相互作用而实现的。

实施例 6、小分子化合物 cenpemlin 的广谱抑癌作用

1、实验步骤

1) 将 HeLa 细胞（宫颈癌细胞）、MDA-MB-231 细胞（三阴性乳腺癌细胞）和 HepG2 细胞（肝癌细胞）接种到 6cm 培养皿中；

5 2) 分别加入终浓度为 1 μ M 的小分子化合物 cenpemlin 或 DMSO 处理细胞 24 h；

3) 分别用胰酶消化细胞，取细胞悬液进行台盼蓝染色；

4) 在普通光学显微镜下观察蓝色着色的细胞并进行计数。

2、结果如图 7 所示。

10 Cenpemlin 处理后 HeLa 细胞、MDA-MB-231 细胞和 HepG2 细胞都出现台盼蓝着色不同比例的升高，这一结果呼应了前文中的细胞表型实验，说明 cenpemlin 具有广谱的抑制癌细胞增殖的作用。

实施例 8、小分子化合物 cenpemlin 抑制肝癌细胞增殖。

1、实验步骤

15 1) 根据已发表的实验方案(Chen et al., 2011. Cancer Res)，我们把稳定表达荧光素酶(luciferase)的肝癌细胞 MHCC97-H cells (5×10^6 in 0.1 mL 生理盐水)种植在 6 周龄的雌性 NOD/SCID 小鼠肝内。实验共分三组，即 DMSO 对照组、紫杉醇组与 cenpemlin 组 (2 mg/kg)，每组 10 只小鼠。

20 2) 造模 14 天后(荧光素测试造模成功)，DMSO 对照组、紫杉醇组及 cenpemlin 实验组(2 mg/kg)分别进行腹腔注射(每只 0.2 mL；两侧分别注射 0.1 mL)，每天一次共三天。

3) 每隔一天注射，四次后(给药第 11 天)，进行荧光素测试。

2、结果如图 8 所示。

25 A 为给药后第 11 天荧光素成像图。B 为统计分析图。结果表明，紫杉醇和小分子化合物 cenpemlin 组的小鼠，肝内的癌细胞数显著降低。以上结果表明，小分子化合物 cenpemlin 可以有效地抑制小鼠体内肝癌细胞的增殖，为抗癌药物的筛选和研发提供了新的视野和靶标。

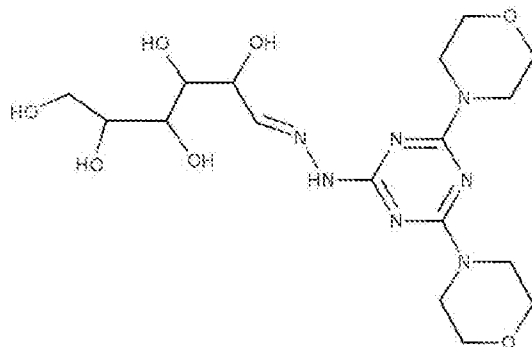
30 工业应用

本发明通过解析 CENP-M 与 CENP-L 精细结构的蛋白位点信息，靶向筛选到小分

子化合物 cenpemlin。生物化学与细胞学实验结果均表明, cenpemlin 通过干预 CENP-M 与 CENP-L 的相互作用, 抑制癌细胞的增殖, 为解析和干预癌细胞的快速增殖提供了新型化合物。

权利要求

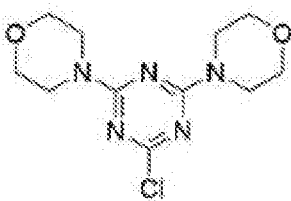
1. 式 I 所示化合物、其异构体及其药学上可接受的盐：



式 I。

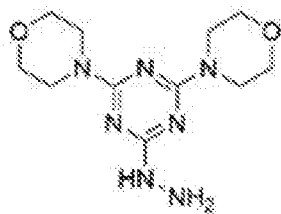
2. 制备权利要求 1 中式 I 所示化合物的方法，包括如下步骤：

1) 使得三聚氯氰和吗啉在碱性条件下反应，生成含双 1,4-氧氮杂环的氯氰中间产物 1；



1

2) 将含双 1,4-氧氮杂环的氯氰中间产物 1 与水合肼发生取代反应，生成化合物 2；



2

3) 在冰醋酸中使得 1,3(1,4-氧氮杂环)-5-肼聚氰与六碳单糖发生缩合反应，得到式 I 所示化合物。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：步骤 1) 中，三聚氯氰与吗啉的摩尔比为 1:2-2.5；

所述反应在冰水浴作用下进行，所述反应的时间为 1-1.5h；

所述碱性条件由碳酸氢钠提供。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法，其特征在于：

步骤 2) 中, 含双 1,4-氧氮杂环的氯氰中间产物 1 与水合肼的摩尔比为 1:1-2;
所述反应的温度为 40°C-60°C, 时间为 3-4h。

5. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法, 其特征在于: 步骤 3) 中, 1,3(1,4-氧氮杂环)-5-肼聚氰与六碳单糖的的配比为 10mmol:1.8-2.0g;

5 所述反应的温度为 40°C-60°C, 时间为 4-5h。

6. 权利要求 1 中式 I 所示化合物、其异构体及其药学上可接受的盐在制备具有如下功能的产品中的应用:

1) 着丝粒蛋白 CENP-M 抑制剂;

2) 抑制细胞有丝分裂的试剂;

10 3) 抑制肿瘤细胞增殖的产品;

4) 预防和/或治疗癌症的产品。

7. 根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于: 所述 2) 中, 抑制细胞有丝分裂是通过干扰 CENP-M 介导的动粒组装实现的。

8. 根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于: 所述 3) 中, 所述肿瘤细胞为上皮
15 癌细胞; 具体可为宫颈癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞。

9. 根据权利要求 9 所述的应用, 其特征在于: 所述 4) 中, 所述癌症为上皮癌, 具体为宫颈癌、肝癌、乳腺癌。

10. 一种抑制细胞有丝分裂的试剂, 所述试剂含有权利要求 1 中式 I 所示化合物、其异构体及其药学上可接受的盐。

20 11. 一种抑制肿瘤细胞增殖的产品, 含有权利要求 1 中式 I 所示化合物、其异构体及其药学上可接受的盐。

12. 一种预防和/或治疗癌症的产品, 含有权利要求 1 中式 I 所示化合物、其异构体及其药学上可接受的盐。

13. 一种抑制 CENP-M 与 CENP-L 相互作用的方法, 为: 向含有 CENP-M 和
25 CENP-L 的体系中加入权利要求 1 中式 I 所示化合物、其异构体及其药学上可接受的盐, 培养, 即可。

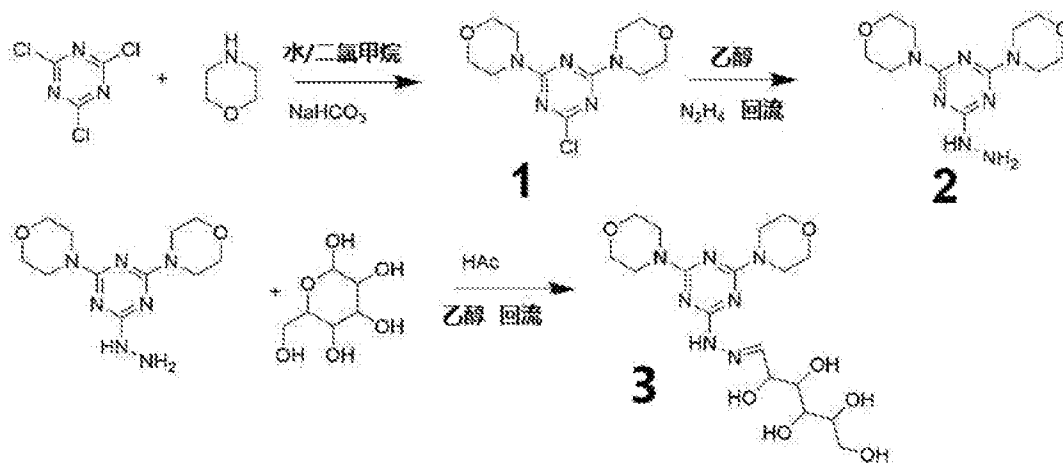


图 1

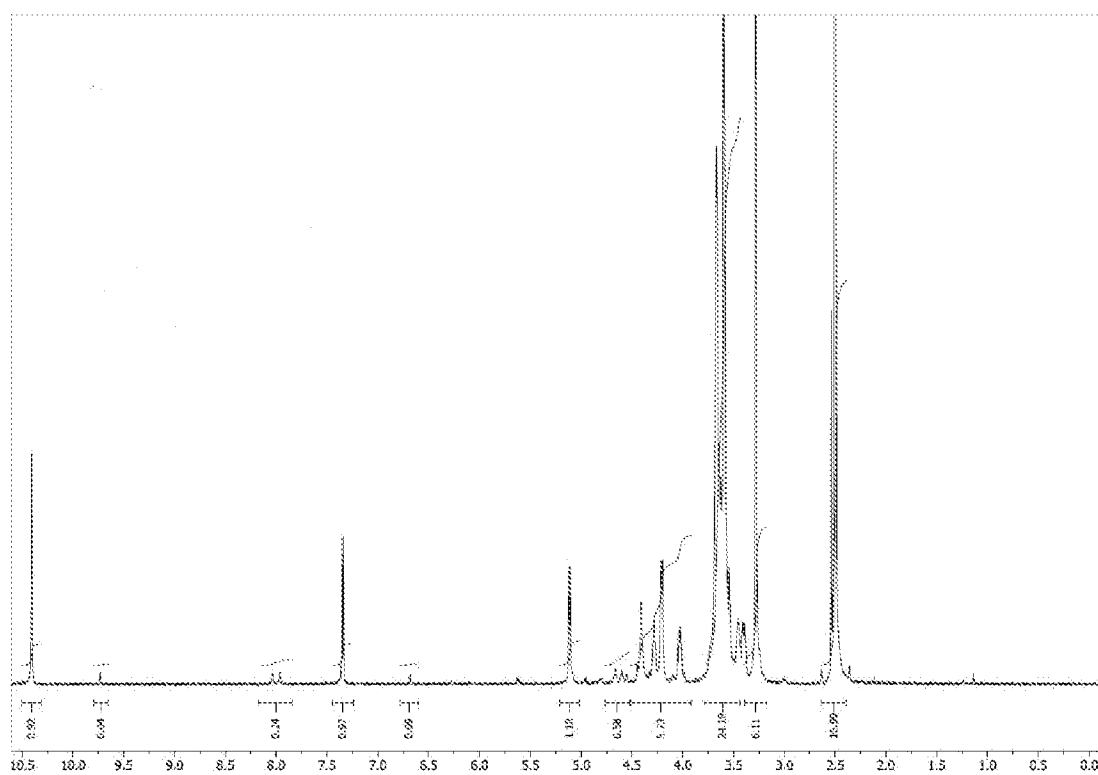


图 2

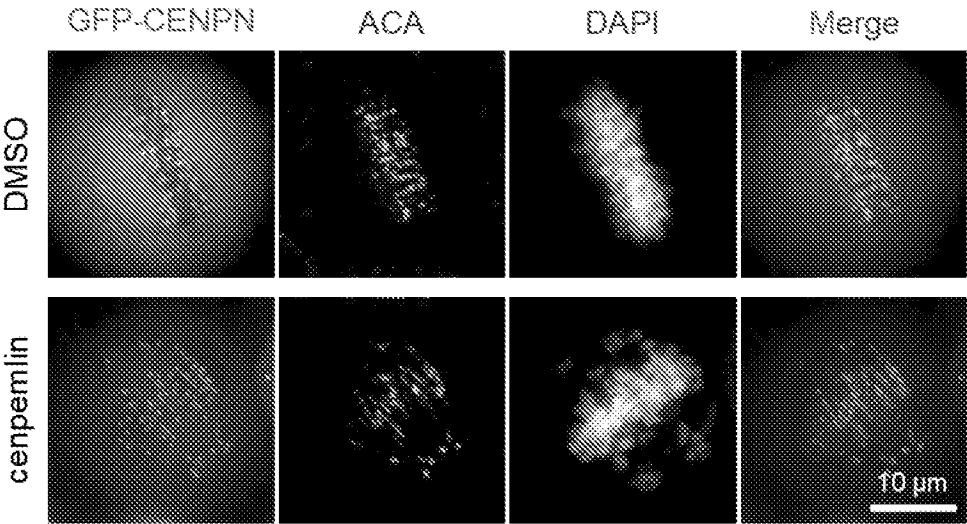


图 3

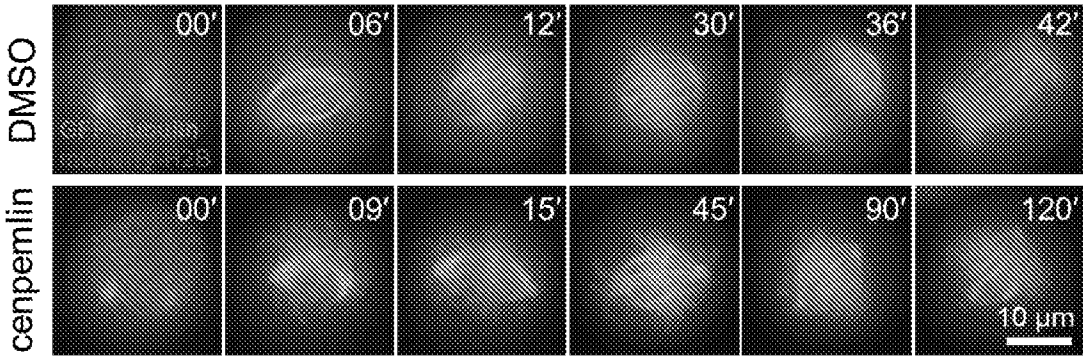


图 4

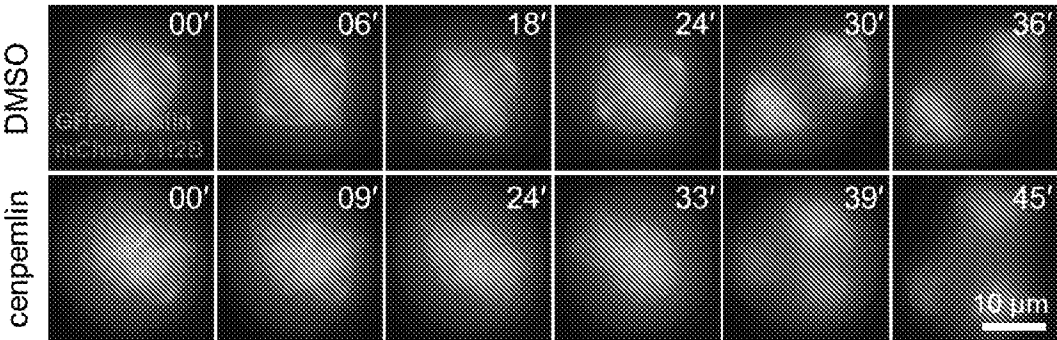


图 5

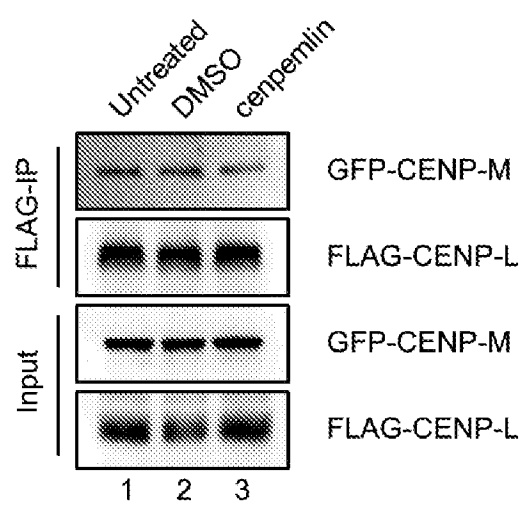


图 6

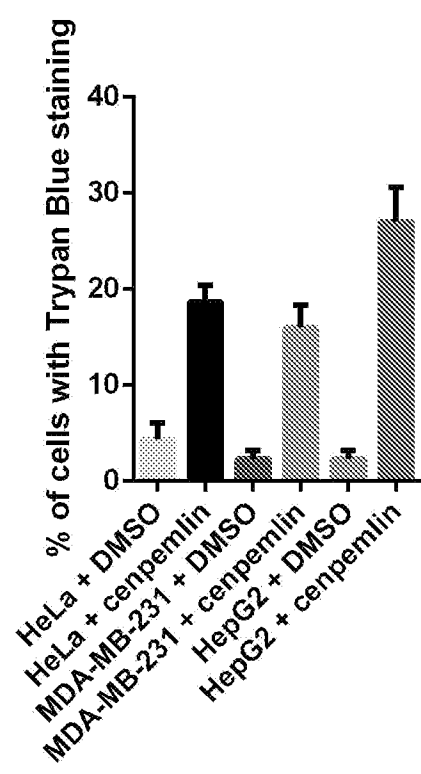


图 7

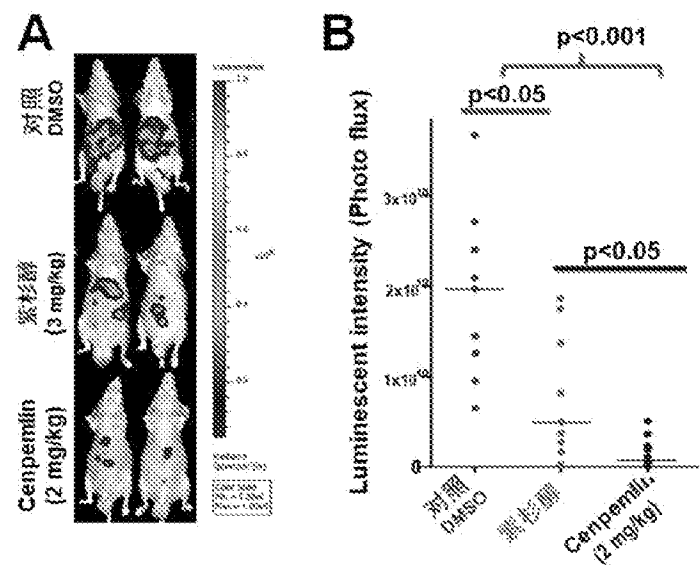


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/108196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/5377(2006.01)i; A61K 31/53(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNXTX; WPABSC; ENTXTX; ENTXT; DWPI; STNext; CNKI; 百度学术; BAIDU SCHOLAR; 292031-97-1, cenpmlin, 着色粒, CENP-M, 有丝分裂, 肿瘤, 癌症, 宫颈癌, 肝癌, 乳腺癌, chromophore, target, mitosis, tumor, cancer, cervical cancer, liver cancer, breast cancer, 中国科学技术大学, 姚雪彪, 刘行, 杨丰瑞, 马明明

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Cas No:292031-97-1." <i>Registry</i> , 01 October 2000 (2000-10-01),	1, 10-12
Y	"Cas No:292031-97-1." <i>Registry</i> , 01 October 2000 (2000-10-01),	2-5
Y	RASHEED, H. et al. "Synthesis and Bioactivity Evaluation of Novel 1, 3, 5-Triazine-1 H - pyrazole-triazol-ethiadiazole Derivatives." <i>Molecules</i> , Vol. 25, 11 June 2020 (2020-06-11), 2708 (pages 1-11)	2-5
A	US 2020369649 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 26 November 2020 (2020-11-26) claims 1-9	1-13
A	RASHEED, H. et al. "Barbiturate- and Thiobarbiturate-Based s Triazine Hydrazone Derivatives with Promising Antiproliferative Activities." <i>ACS Omega</i> , Vol. 5, 23 June 2020 (2020-06-23), pages 15805-15811	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 December 2022

Date of mailing of the international search report

05 January 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/108196

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EL-FAHAM, A. et al. "Ultrasonic promoted synthesis of novel s-triazine-Schiff base derivatives; molecular structure, spectroscopic studies and their preliminary anti-proliferative activities." <i>Journal of Molecular Structure.</i> , Vol. 1125, 27 June 2016 (2016-06-27), pages 121-135	1-13
A	张成路等 (ZHANG, Chenglu et al.). "新型1, 3, 5-三嗪-1H-吡唑-三唑并噻二唑衍生物的合成及活性评价 (Synthesis and Bioactivity Evaluation of Novel 1,3,5-Triazine-1H-pyrazole-triazol-ethiadiazole Derivatives)" <i>有机化学 (Chinese Journal of Organic Chemistry)</i> , Vol. 38, 03 January 2018 (2018-01-03), pages 1223-1232	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/108196

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2020369649	A1	26 November 2020	WO	2019108665	A1	06 June 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/108196

A. 主题的分类 A61K 31/5377(2006.01)i; A61K 31/53(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类				
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNTXT;WPABSC;ENTXTC;ENTXT;DWPI;STNext;CNKI;百度学术: 292031-97-1, cenpemlin, 着色粒, CENP-M, 有丝分裂, 肿瘤, 癌症, 宫颈癌, 肝癌, 乳腺癌, chromophore, target, mitosis, tumor, cancer, cervical cancer, liver cancer, breast cancer, 中国科学技术大学, 姚雪彪, 刘行, 杨丰瑞, 马明明				
C. 相关文件				
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求		
X	"Cas No:292031-97-1." Registry., 2000年10月1日 (2000 - 10 - 01),	1, 10-12		
Y	"Cas No:292031-97-1." Registry., 2000年10月1日 (2000 - 10 - 01),	2-5		
Y	RASHEED, H.等. "Synthesis and Bioactivity Evaluation of Novel 1, 3, 5-Triazine-1 H -pyrazole-triazol-ethiadiazole Derivatives." Molecules., 第25卷, 2020年6月11日 (2020 - 06 - 11), 2708(第1-11页)	2-5		
A	US 2020369649 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2020年11月26日 (2020 - 11 - 26) 权利要求1-9	1-13		
A	RASHEED, H.等. "Barbiturate- and Thiobarbiturate-Based s Triazine Hydrazone Derivatives with Promising Antiproliferative Activities." ACS Omega., 第5卷, 2020年6月23日 (2020 - 06 - 23), 第15805-15811页	1-13		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。				
<table><tr><td>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td><td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</td></tr></table>			* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件			
国际检索实际完成的日期 2022年12月22日		国际检索报告邮寄日期 2023年1月5日		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 齐丹丹 电话号码 (86-10)53961871		

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	EL-FAHAM, A. 等. "Ultrasonic promoted synthesis of novel s-triazine-Schiff base derivatives; molecular structure, spectroscopic studies and their preliminary anti-proliferative activities." Journal of Molecular Structure., 第1125卷, 2016年6月27日 (2016 - 06 - 27), 第121-135页	1-13
A	张成路等. "新型1, 3, 5-三嗪-1H-吡唑-三唑并噻二唑衍生物的合成及活性评价" 《有机化学》, 第38卷, 2018年1月3日 (2018 - 01 - 03), 第1223-1232页	1-13

国际申请号
PCT/CN2022/108196

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
US 2020369649 A1	2020年11月26日	W0 2019108665 A1	2019年6月6日