(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113527289 A
(43)申请公布日 2021.10.22

(21)申请号 202110344230.X

(22)申请日 2016.09.23

(30)优先权数据
62/222,713 2015.09.23 US

(62)分案原申请数据
201680064972.4 2016.09.23

(71)申请人 米纳瓦生物技术公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 C·巴姆达德 S·莫

(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所(普通合伙) 44240
代理人 金辉

(51)Int.Cl.
C07D 471/04(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 19/08(2006.01)
A61P 11/06(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 17/06(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 7/06(2006.01)
A61P 5/00(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

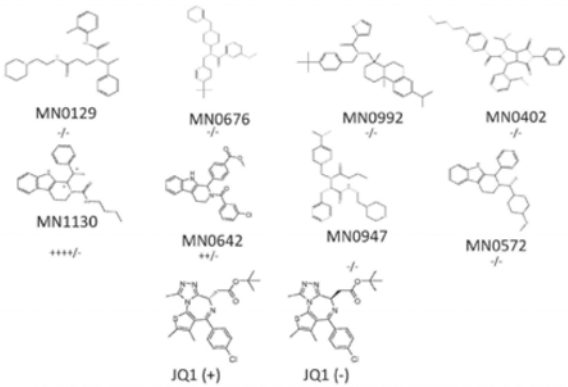
权利要求书11页 说明书84页 附图178页

(54)发明名称

筛选分化干细胞的试剂的方法

(57)摘要

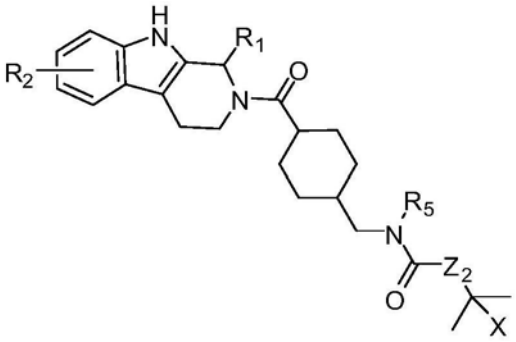
本申请公开了识别用于治疗或预防癌症或转移性癌症的试剂的方法,其包括将干细胞与潜在药剂接触,以及识别诱导分化或者抑制干细胞多能性或干细胞的生长的试剂的步骤,其中将这样的试剂确定为抗癌试剂。



CN 113527289 A

1.具有式9、式5、式6、或式7的化合物：

式9



其中，

R1为任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基；任选取代的C2-C15杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；任选取代的C4-C8环烷基烷基；或H；

R2为氢、C1-C6烷氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H；

R5为H、甲基、C1-C6烷基、或2-苯基乙基；

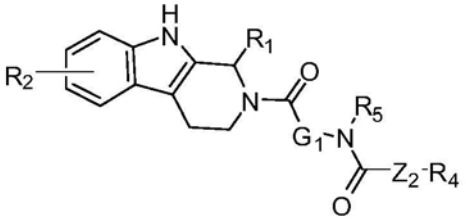
X为H、或C1-C3烷基；

Z2为-O-、键、-NH-、-S-、-CH(CH_3)-、-(CH_2)$_n$-；-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO_2-或-C(=NH)-、-CH_2NH(CO)-、-CH_2NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-；-(CH_2)$_n$NH(CO)-、-(CH_2)$_n$NH(CO)O-、-(CH_2)$_m$NH(CO)NH-；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-、或-N($CH_2CH_2C_6H_5$)-；

m=1-5；n=1-8；

其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2、或-SO_3H的一个或多个取代；

式5



其中，

R1为任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基；任选取代的C2-C15杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的未取代的C3-C8环烷基；任选取代的C4-C8环烷基烷基；或H；

R2为氢、C1-C6烷氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$或$-SO_3H$；

G1为-C3-C7环烷基-CH_2-、$-(CH_2)_n-$、或-CH=CH-；

Z2为-O-、键、-NH-、-S-、$-CH(CH_3)-$、$-(CH_2)_n-$、-CH=CH-、-CO-、-SO-、$-SO_2-$或$-C(=NH)-$、$-CH_2NH(CO)-$、$-CH_2NH(CO)O-$、$-CH_2NH(CO)NH-$；$-(CH_2)_pNH(CO)-$、$-(CH_2)_pNH(CO)O-$、$-(CH_2)_pNH(CO)NH-$；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-、$-N(CH_2CH_2C_6H_5)-$；或任选取代的C6-C12芳基；

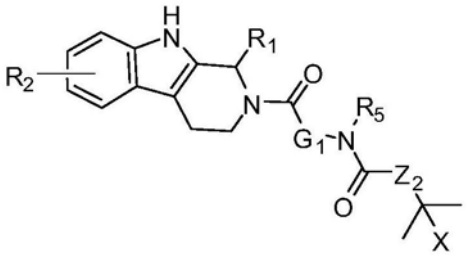
R5为H、甲基、C1-C6烷基、或2-苯基乙基；

R4为任选取代的C1-C9烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基；或任选取代的C3-C7环烷基；$-(CH_2)_p$-NH(CO)O-(C1-C6烷基)；$-CH_2O(CH_2)_p$-NH(CO)O-(C1-C6)烷基；$-(CH_2)_p$-NHCO-$(CH_2)_n$-NH(CO)O-C1-C6烷基)；-NH(CO)O-叔丁基；-O-叔丁基；-叔丁基；或H；

n＝1-8；p＝1-9；

其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$、或$-SO_3H$的一个或多个取代；

式6



其中，

R1为任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基；任选取代的C2-C15杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；或H；

R2为氢、C1-C6烷氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$或$-SO_3H$；

G1为-C3-C7环烷基-CH_2-、$-(CH_2)_n-$、或-CH=CH-；

Z2为-O-、键、-NH-、-S-、$-CH(CH_3)-$、$-(CH_2)_n-$；-CH=CH-、-CO-、-SO-、$-SO_2-$或$-C(=NH)-$、$-CH_2NH(CO)-$、$-CH_2NH(CO)O-$、$-CH_2NH(CO)NH-$；$-(CH_2)_pNH(CO)-$、$-(CH_2)_pNH(CO)O-$、$-(CH_2)_pNH(CO)NH-$；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-、或$-N(CH_2CH_2C_6H_5)-$；

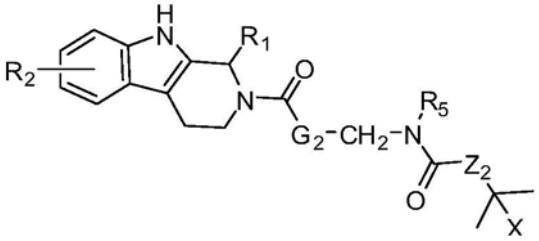
R5为H、甲基、C1-C6烷基、或2-苯基乙基；

X为H、或C1-C3烷基；

n＝1-8；p＝1-9；

其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$、或$-SO_3H$的一个或多个取代；

式7



其中，

R1为任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基；任选取代的C2-C15杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；任选取代的C4-C8环烷基烷基；或H；

R2为氢、C1-C6烷氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$或$-SO_3H$；

G2为-C3-C7环烷基-、键、$-(CH_2)_n-$、-CH=CH-、$-CH_2NH(CO)-$、$-CH_2NH(CO)O-$、$-CH_2NH(CO)NH-$；$-(CH_2)_nNH(CO)-$、$-(CH_2)_nNH(CO)O-$、或$-(CH_2)_mNH(CO)NH-$；

Z2为-O-、键、-NH-、-S-、$-CH(CH_3)-$、$-(CH_2)_n-$、-CH=CH-、-CO-、-SO-、$-SO_2-$或$-C(=NH)-$、$-CH_2NH(CO)-$、$-CH_2NH(CO)O-$、$-CH_2NH(CO)NH-$；$-(CH_2)_pNH(CO)-$、$-(CH_2)_pNH(CO)O-$、$-(CH_2)_pNH(CO)NH-$；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基$-CH_2NH(CO)O-$、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-、或$-N(CH_2CH_2C_6H_5)-$；

R5为H、甲基、C1-C6烷基、或2-苯基乙基；

X为H、或C1-C3烷基；

m＝1-5；n＝1-8；p＝1-9；

其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$、或$-SO_3H$的一个或多个取代。

2.根据权利要求1所述的化合物，化合物为式5，其中，

式5中的R1为H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的苯基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基；任选取代的C2-C15杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基。

3.根据权利要求2所述的化合物，其中，式5中的R1为H、任选取代的C1-C6烷基、或任选取代的C3-C8环烷基。

4.根据权利要求2所述的化合物，其中，在式5中，

R1为氢，甲基，乙基，异丙基，异丁基，苄基，吡啶基，苯基，或由卤素、三氟甲基、甲氧基、氰基或二烷基氨基取代的苯基，

R2为氢、卤素、甲基或甲氧基；

Z2为O、NH、-CH_2-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、-$(CH_2)_4$-、-$(CH_2)_5$-、-CH(CH_3)-、-CH_2NH(CO)CH_2-、-$CH_2O(CH_2)_2$-、-环己基-CH_2-或键；

G1为-环己基-CH_2-、-(CH_2)-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、-$(CH_2)_4$-、或-$(CH_2)_5$-；

R5为氢、甲基或2-苯基乙基；以及

R4为任选取代的苯基、萘基、苄基、取代的异丙基或叔丁基。

5.根据权利要求1所述的化合物，化合物为式6，其中，

式6中的R1为H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的苯基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基；任选取代的C2-C15杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基。

6.根据权利要求5所述的化合物，其中，式6中的R1为H、任选取代的C1-C6烷基、或任选取代的C3-C8环烷基。

7.根据权利要求5所述的化合物，其中，在式6中，

R1为氢，甲基，乙基，异丙基，异丁基，苄基，吡啶基，苯基，或由卤素、三氟甲基、甲氧基、氰基或二烷基氨基取代的苯基；

R2为氢、卤素、甲基或甲氧基；

Z2为O、NH、-CH_2-或键；

G1为-环己基-CH_2-、-(CH_2)-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、-$(CH_2)_4$-、或-$(CH_2)_5$-；

R5为氢或甲基；以及

X为氢或甲基。

8.根据权利要求1所述的化合物，化合物为式7，其中，

式7中的R1为H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的苯基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基；任选取代的C2-C15杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基。

9.根据权利要求8所述的化合物，其中，式7中的R1为H、任选取代的C1-C6烷基、或任选取代的C3-C8环烷基。

10.根据权利要求8所述的化合物，其中，在式7中，

R1为氢，甲基，乙基，异丙基，异丁基，苄基，吡啶基，苯基，或由卤素、三氟甲基、甲氧基、氰基或二烷基氨基取代的苯基；

R2为氢、卤素、甲基或甲氧基；

Z2为O、NH、或-CH_2-；

G2为-环己基-CH_2-、-(CH_2)-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、或-CH_2NH(CO)-；

R5为氢或甲基；以及

X为氢或甲基。

11.根据权利要求1所述的化合物，化合物为式9，其中，

式9中的R1为H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的苯基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基；任选取代的C2-C15杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基

烯基;任选取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基。

12.根据权利要求11所述的化合物,其中,式9中的R1为H、任选取代的C1-C6烷基、或任选取代的C3-C8环烷基。

13.根据权利要求11所述的化合物,其中,在式9中,

R1为异丙基或异丁基;

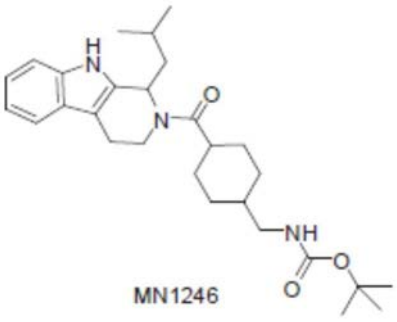
R2为氢、卤素、或甲基;

Z2为O或NH;

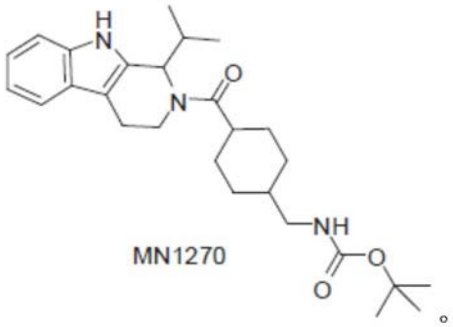
R5为氢;以及

X为甲基。

14.根据权利要求1所述的化合物,其具有选自以下的结构:



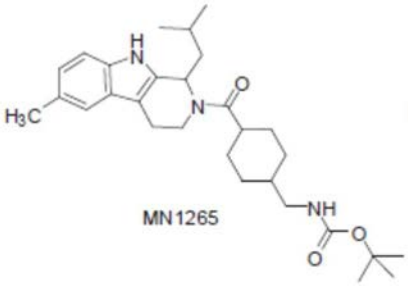
MN1246

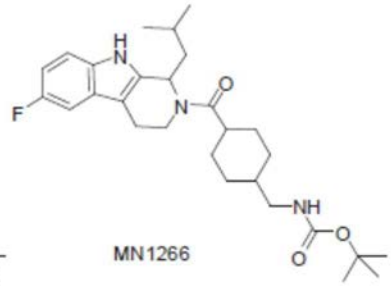


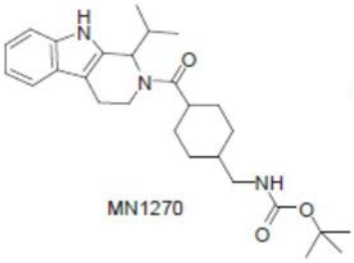
MN1270

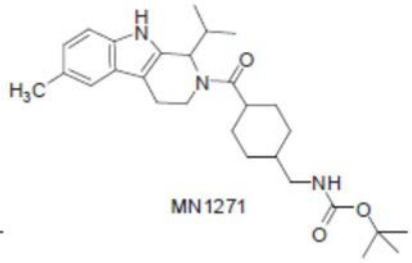
。

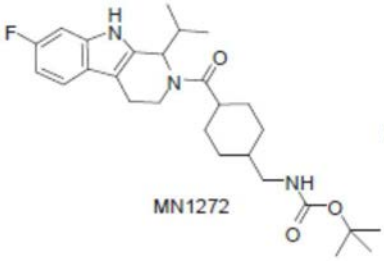
15.根据权利要求1所述的化合物,其具有选自以下的结构:

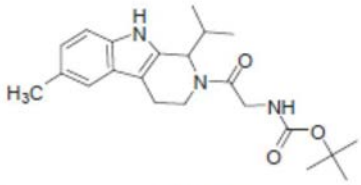

MN1265

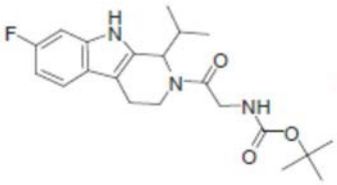

MN1266

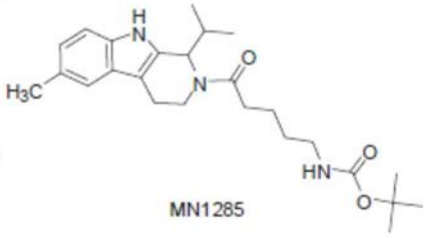

MN1270


MN1271


MN1272

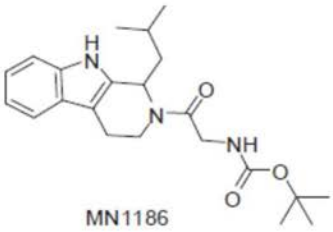

MN1279

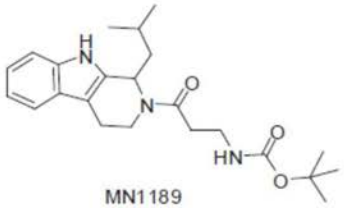

MN1280

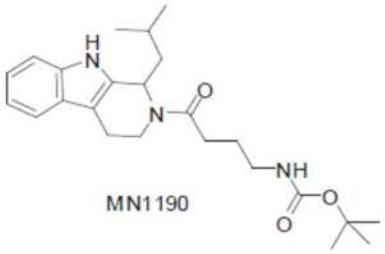

MN1285

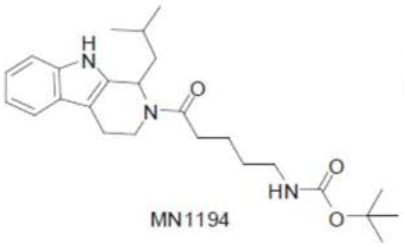
。

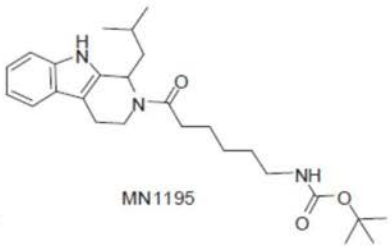
16.根据权利要求1所述的化合物,其具有选自以下的结构:

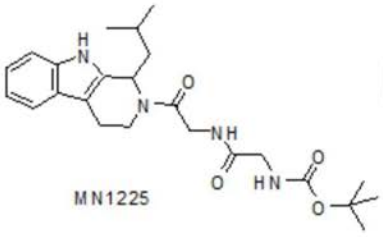

MN1186

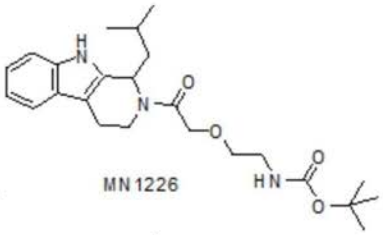

MN1189

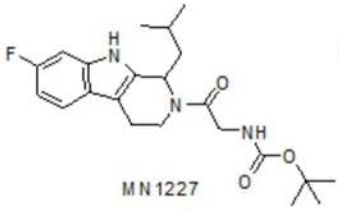

MN1190

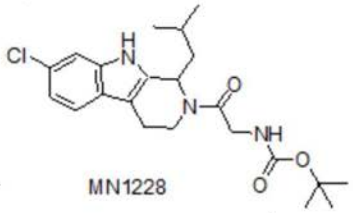

MN1194

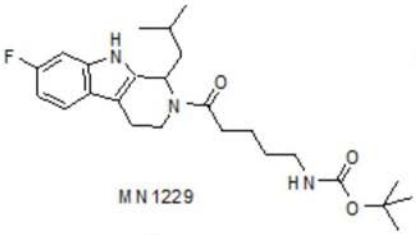

MN1195

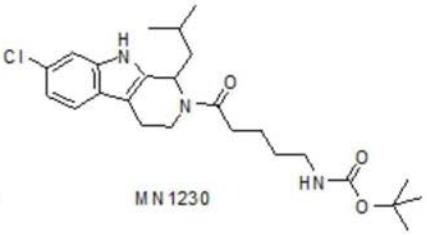

MN1225

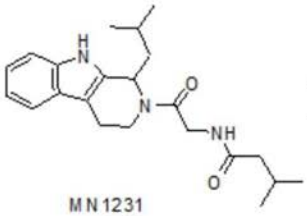

MN1226

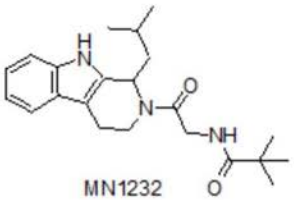

MN1227

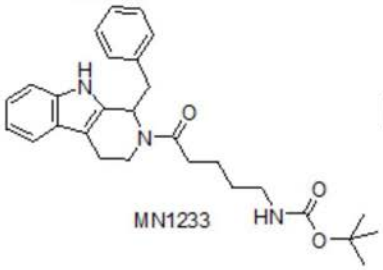

MN1228

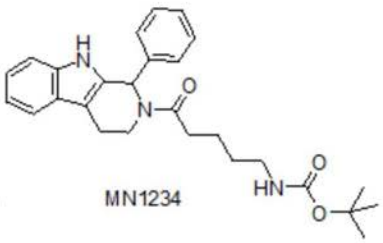

MN1229

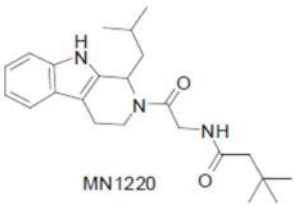

MN1230

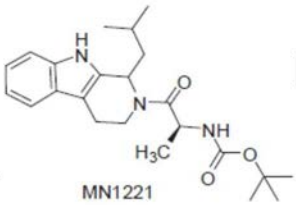

MN1231

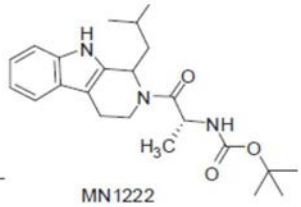

MN1232

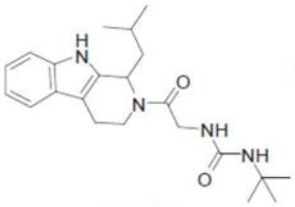

MN1233

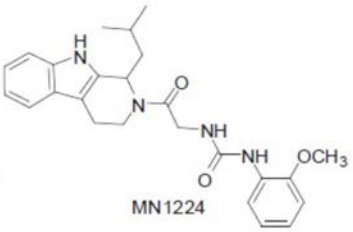

MN1234


MN1220


MN1221

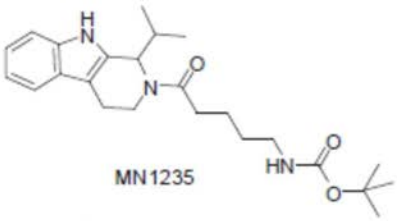

MN1222

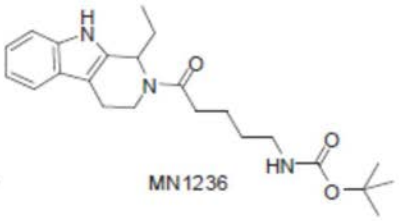

MN1223

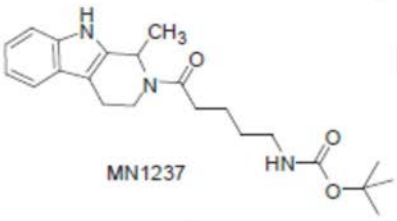

MN1224

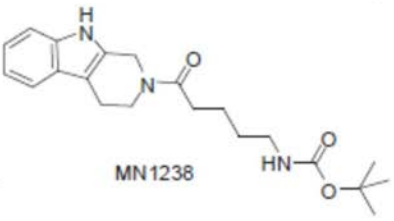
。

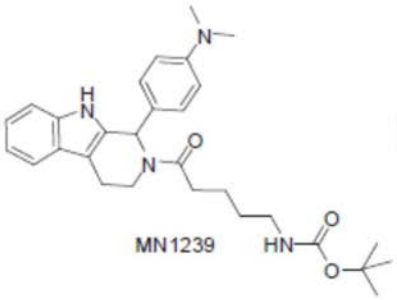
17.根据权利要求1所述的化合物,其具有选自以下的结构:

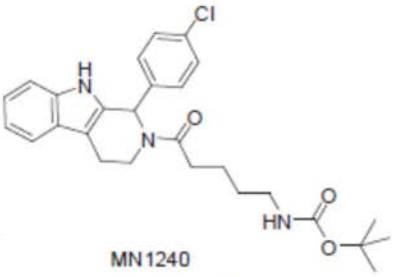

MN1235

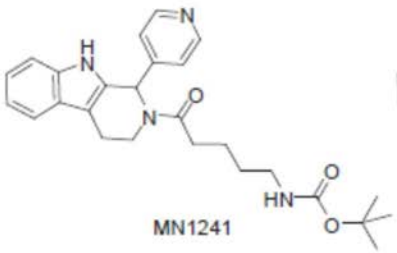

MN1236

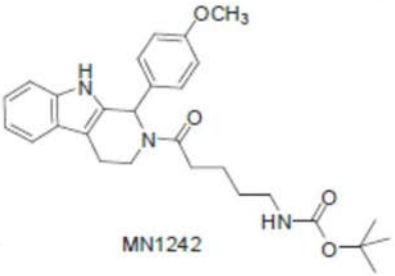

MN1237

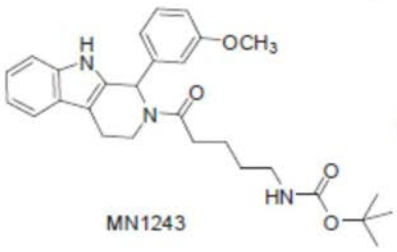

MN1238

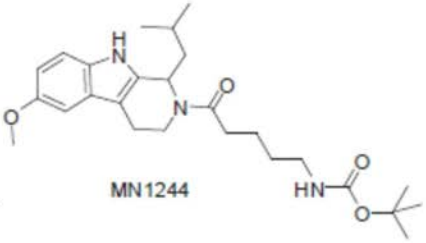

MN1239

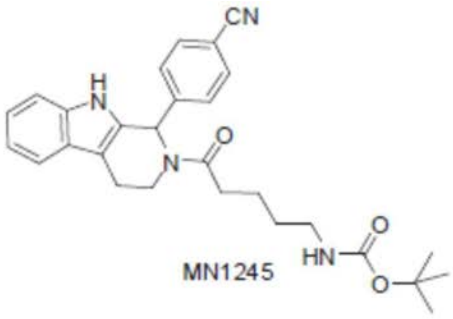

MN1240


MN1241

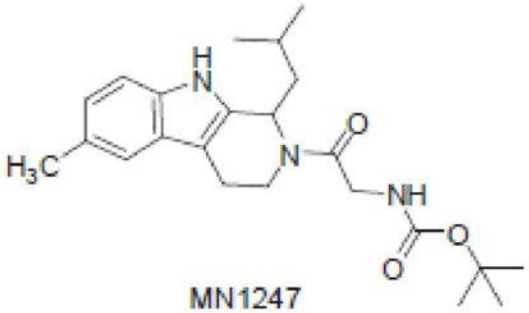

MN1242


MN1243

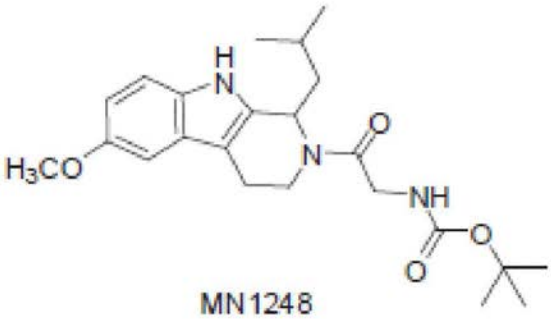

MN1244



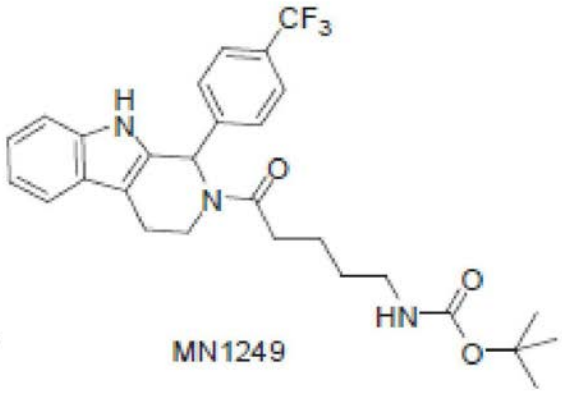
MN1245



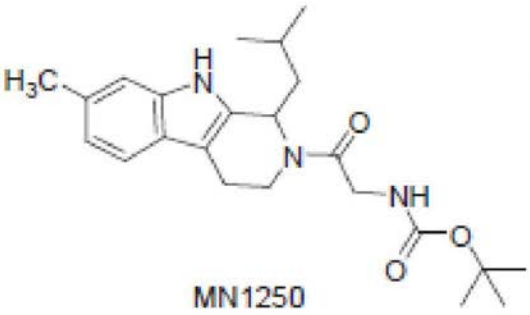
MN1247



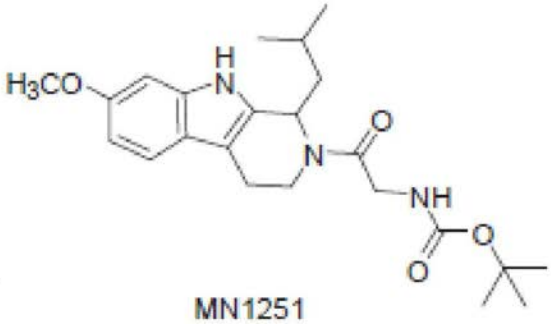
MN1248



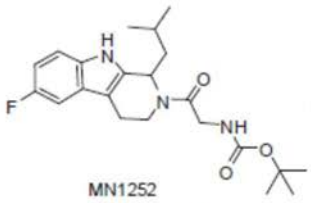
MN1249

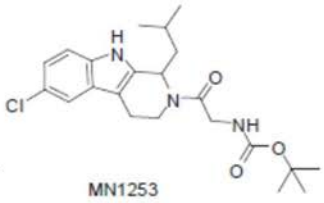


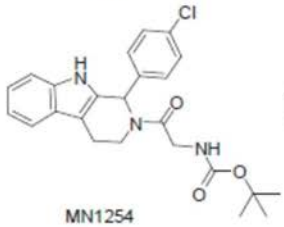
MN1250

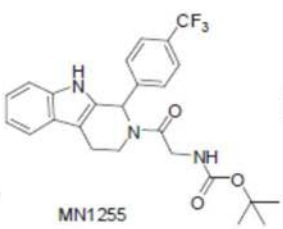


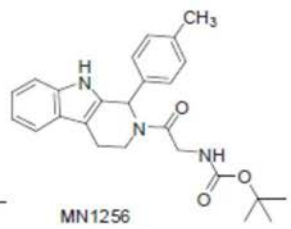
MN1251

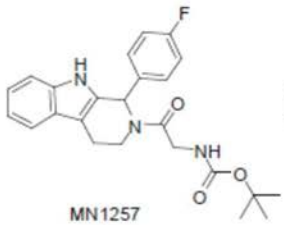

MN1252

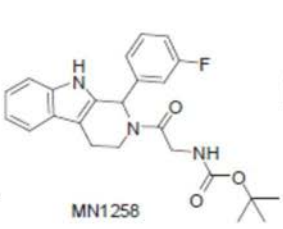

MN1253

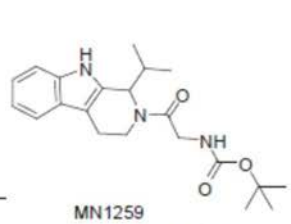

MN1254

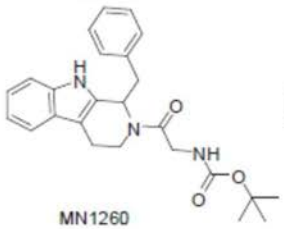

MN1255

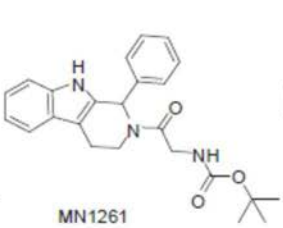

MN1256

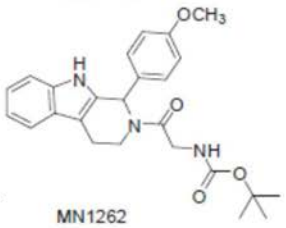

MN1257

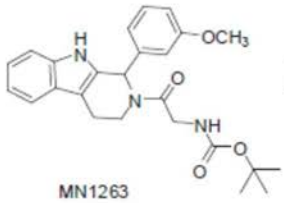

MN1258

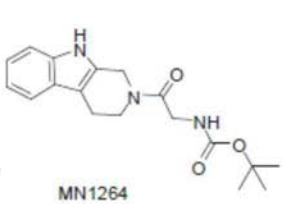

MN1259

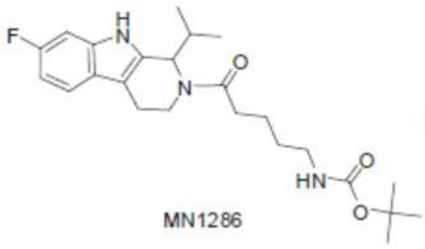

MN1260

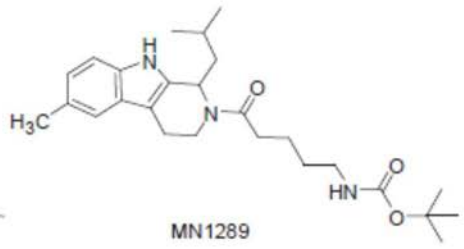

MN1261

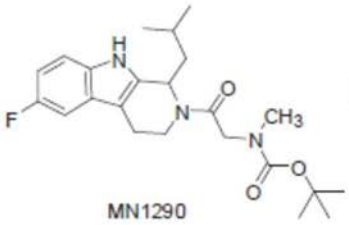

MN1262

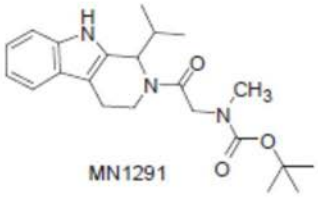

MN1263

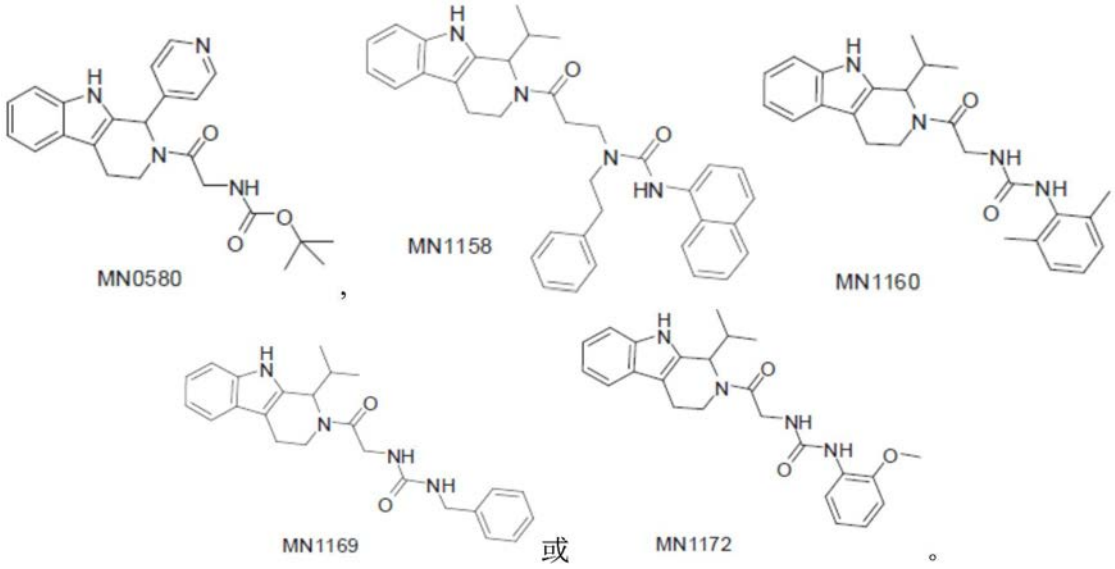

MN1264


MN1286


MN1289


MN1290


MN1291



18.根据权利要求1-17中任一项所述的化合物在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途，其中，其中癌症为MUC1阳性或MUC1*阳性癌症。

19.根据权利要求18所述的用途，其中癌症为$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性癌症。

20.根据权利要求18或19所述的用途，其中分析来自受试者的癌性样本并确定其为MUC1*阳性、$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性。

21.根据权利要求20所述的用途，其中通过PCR分析癌性样本。

22.根据权利要求20或21所述的用途，其中当癌性样本表达EEF1A1基因的至少0.5％的mRNA表达水平的MUC1基因、NME7基因或NME7-X1基因的mRNA水平时，确定其为MUC1*阳性、$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性。

23.根据权利要求20所述的用途，其中通过免疫组化分析癌性样本。

24.根据权利要求23所述的用途，其中当癌性样本与结合于PSMGFR肽或N-10肽的抗体接触并将组织染色、用病理学家的标准1-4(“+-++++”)评分时，确定其为MUC1*阳性。

25.根据权利要求23所述的用途，其中当癌性样本与结合于NME7的B3肽的抗体接触并将组织染色、用病理学家的标准1-4(“+-++++”)评分时，确定其为$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性。

26.根据权利要求1-17所述的化合物在制备用于治疗有需要的受试者的炎症疾病或病症的药物中的用途，其中当化合物与干细胞接触时，抑制干细胞多能性或生长、或者诱导干细胞分化。

27.根据权利要求26所述的用途，其中炎症疾病或病症为类风湿性关节炎、炎性肠综合症、克罗恩氏病、骨关节炎、哮喘、皮炎、牛皮癣、囊性纤维化、移植后晚期和慢性实体器官排斥、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、舍格伦综合征、桥本甲状腺炎、多肌炎、硬皮病、艾迪生病、白癜风、恶性贫血、肾小球肾炎、肺纤维化、自身免疫性糖尿病、糖尿病性视网膜病、鼻炎、缺血再灌注损伤、血管成形术后再狭窄、慢性阻塞性肺病(COPD)、格雷夫斯病、胃肠过敏、结膜炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、心绞痛、癌症转移、小动脉疾病或线粒体疾病。

筛选分化干细胞的试剂的方法

[0001] 本申请是申请号为201680064972.4,申请日为2016年9月23日,发明名称为“筛选分化 干细胞的试剂的方法”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明一般地涉及用于治疗癌症的方法和组合物,以分化干细胞的化合物的功能为特征。

背景技术

[0003] 最近发现在标准条件下培养的人类干细胞并不是处于真正的多能状态。它们而是经历了 一些分化并做出了某些细胞命运的决定,其被多种甲基化标志物的累积所证实。当比较人类 培养的干细胞与小鼠胚胎的细胞时,可以确定,人类培养的干细胞看起来并在行为上更像来 自胚胎的外胚层的小鼠干细胞,其开始分化,而不是内细胞团的真正的多能干细胞。研究者 将内细胞团的真正的多能干细胞称为“幼稚的”并且将更加分化的细胞称为“启动的”。进一 步的研究显示,通过在bFGF中培养,小鼠和人类启动的干细胞进行自我复制,而小鼠幼稚 干细胞通过在LIF中培养进行自我复制。使人类干细胞在幼稚状态下生长的生长因子是未知 的。启动状态的干细胞倾向于自发分化且必须人工剖开以除去分化中的部分,而幼稚干细胞 天然地抵抗自发分化。另外,启动干细胞不能作为单个细胞而传代且具有很低的克隆效率, 而幼稚干细胞能够作为单个细胞而传代且具有高克隆效率。雌性幼稚干细胞具有两个活跃的 X染色体而启动状态的干细胞已经通过甲基化具有一个不活跃的X染色体。此外,已知幼稚 状态干细胞具有少得多的甲基化标志物,所述甲基化标志物基本上是早期分化决定,也已知 为细胞命运决定,其限制该干细胞将成为的成熟细胞的类型。

发明内容

[0004] 在本发明的一个方面,公开了药物筛选,其中针对试剂筛选它们相比较启动干细胞优选 抑制幼稚干细胞的多能性的能力。筛选的试剂可以是抗体或抗体样分子、多克隆、单克隆、抗体片段融合蛋白、抗体模拟物、肽或肽模拟物、小分子或天然产物。

[0005] 在本发明的另一方面,公开了抑制癌生长、抑制转移癌细胞生长、或抑制转移潜能癌细 胞的试剂,其中所述试剂由它们诱导分化或抑制幼稚干细胞多能性以及它们相对不能诱导启 动干细胞的分化或抑制多能性的能力来识别。

[0006] 在本发明的又一方面,公开的试剂公开了用作抗癌或抗转移治疗剂,用于治疗或预防癌 症。

[0007] 在本发明的另一方面,通过在幼稚干细胞而不是启动干细胞中识别上调的基因而识别新 型抗癌或抗转移药物靶标。

[0008] 在本发明的又一方面,通过在幼稚干细胞而不是启动干细胞中识别上调的微小RNA而识 别新型抗癌或抗转移药物靶标。

[0009] 在一个方面，本发明涉及识别用于治疗或预防癌或转移癌的试剂的方法，包括以下步骤：

[0010] (i)将干细胞与潜在试剂接触，以及(ii)识别诱导分化、或抑制干细胞多能性或干细 胞的生长的试剂，其中确定这种试剂是抗癌试剂。干细胞可以是幼稚状态干细胞。或者在步 骤(i)中，干细胞可以是幼稚状态干细胞或启动状态干细胞，其中将试剂对幼稚状态干细胞 的效果与对启动状态干细胞的效果相比较，其中如果相比较启动状态干细胞，试剂对幼稚状 态干细胞由更大的效果，那么确定该试剂为抗癌试剂。该试剂可以是多克隆抗体、单克隆抗 体、抗体样分子、抗体片段融合蛋白、抗体模拟物、肽或肽模拟物、小分子或天然产物。干 细胞可以是人类的。干细胞可以通过在含有$NME7_{AB}$或者NME7-X1的培养基中培养而维持 在幼稚状态。癌可以是乳癌、卵巢癌、黑素瘤、前列腺癌、肺癌或胰腺癌。癌可以是MUC1 阳性或MUC1*阳性癌。癌可以是$NME7_{AB}$或NME7-X1阳性癌。试剂通常可以不具有细胞毒性的。试剂可以不是对成纤维细胞或成纤维母细胞具有细胞毒性的。

[0011] 在另一方面，本发明涉及预防或治疗癌症的方法，包括对受试者给予由根据以上的方法 获得的试剂。癌症可以是乳癌、卵巢癌、黑素瘤、前列腺癌、肺癌或胰腺癌。癌可以是MUC1 阳性或MUC1*阳性癌。癌可以是$NME7_{A}$或NME7-X1阳性癌。

[0012] 在另一方面，本发明涉及预防癌的转移的方法，包括对受试者给予由根据以上的方法获 得的试剂。

[0013] 在另一方面，本发明涉及抑制癌生长的方法，包括对受试者给予由根据以上的方法获得 的试剂。

[0014] 在另一方面，本发明涉及抑制转移癌细胞生长的方法，包括对受试者给予由根据以上的 方法获得的试剂。

[0015] 在另一方面，本发明涉及识别针对药物发现的抗癌或抗转移靶标的方法，包括识别相比 较启动状态干细胞在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物。

[0016] 在另一方面，本发明涉及针对药物发现的抗癌或抗转移靶标的方法，包括识别相比较启 动状态干细胞在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物。

[0017] 在另一方面，本发明涉及识别抗癌或抗转移试剂的方法，包括(i)识别相比较启动状态 干细胞在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物；(ii)将幼稚状态干细胞与试剂接触；以 及(iii)识别增加在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物的表达或活性的试剂。下调的 基因可以是当干细胞启动分化时上调的基因。所述下调的基因可以是纤连蛋白、波形蛋白或 NF1。

[0018] 在另一方面，本发明涉及识别抗癌或抗转移试剂的方法，包括(i)识别相比较启动状态 干细胞在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物；(ii)将幼稚状态干细胞与试剂接触；以 及(iii)识别抑制在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物的表达或活性的试剂。所述上 调的基因可以是E-钙调蛋白或CXCR4。

[0019] 在另一方面，本发明涉及识别抗癌或抗转移试剂的方法，包括(i)识别相比较成纤维细 胞在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物；(ii)将幼稚状态干细胞与试剂接触；以及(iii) 识别抑制在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物的表达或活性的试剂。所述上调的基因 可以是E-钙调蛋白或CXCR4。

[0020] 在另一方面，本发明涉及识别抗癌或抗转移试剂的方法，包括(i)识别相比较成纤

维细 胞在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物;(ii)将幼稚状态干细胞与试剂接触;以及(iii) 识别增加在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物的表达或活性的试剂。下调的基因可以 是当干细胞启动分化时上调的基因。所述下调的基因可以是纤连蛋白、波形蛋白或NF1。

[0021] 在另一方面,本发明涉及识别抗癌或抗转移试剂的方法,包括(i)识别比较启动干细胞 或成纤维细胞在幼稚状态干细胞中上调的微小RNA;(ii)将幼稚状态干细胞与试剂接触;以 及(iii)识别抑制在幼稚状态干细胞中上调的微小RNA的表达或活性的试剂。

[0022] 在另一方面,本发明涉及式1-10的化合物。

[0023] 在另一方面,本发明涉及治疗受试者中的癌症的方法,包括对受试者给予式1-10或如图 18-27中所示的化合物。癌可以是MUC1阳性或MUC1*阳性癌。癌可以是$NME7_{AB}$或NME7-X1 阳性癌。

[0024] 在另一方面,本发明涉及预防或治疗癌症的方法,包括以下步骤:(i)分析来自患者的 癌性样品以及确定其为MUC1*阳性、$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性;以及

[0025] (ii)对受试者给予有效量的式1-10的化合物。分析步骤可以通过PCR实施。在一个方 面,当癌性样品可以表达其为至少0.5%的mRNA表达水平的EEF1A1基因的mRNA水平的MUC1基因、NME7基因或NME7-X1基因,其确定为MUC1*阳性、$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1 阳性。分析步骤可以通过免疫组织化学实施。在一个方面,当癌性样品与结合于PSMGFR肽 或N-10肽的抗体接触并组织染色,用病理学家的标准分1-4(“+-++++”)评分时,确定为 MUC1*阳性。当癌性样品与结合于NME7的B3肽的抗体接触并将组织染色,用病理学家的 标准分1-4(“+-++++”)评分时,确定为$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性。

[0026] 在另一方面,本发明涉及识别用于预防或治疗炎症疾病或病症的试剂的方法,包括以下 步骤:(i)将干细胞暴露于试剂;(ii)识别抑制干细胞多能性或生长,或者诱导干细胞分化 的试剂,其中所述试剂或其类似物为用于治疗炎症疾病或病症的试剂。炎症疾病或病症可以 是类风湿性关节炎、炎性肠综合症、克罗恩氏病、骨关节炎、哮喘、皮炎、牛皮癣、囊性纤 维化、移植后晚期和慢性实体器官排斥、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、舍格伦综合征、 桥本甲状腺炎、多发性肌炎、硬皮病、艾迪生病、白癜风、恶性贫血、肾小球肾炎、肺纤维 化、自身免疫性糖尿病、糖尿病性视网膜病、鼻炎、缺血-再灌注损伤、血管成形术后再狭窄、 慢性阻塞性肺病(COPD)、格雷夫斯病、胃肠过敏、结膜炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、 心绞痛、癌症转移、小动脉疾病或线粒体疾病。

[0027] 在另一方面,本发明涉及治疗炎症疾病或病症的方法,包括对有需要的人给予试剂,所 述试剂当与干细胞接触时,抑制干样多能性或生长或诱导干细胞分化,炎症疾病或病症可以 是类风湿性关节炎、炎性肠综合症、克罗恩氏病、骨关节炎、哮喘、皮炎、牛皮癣、囊性纤 维化、移植后晚期和慢性实体器官排斥、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、舍格伦综合征、 桥本甲状腺炎、多发性肌炎、硬皮病、艾迪生病、白癜风、恶性贫血、肾小球肾炎、肺纤维 化、自身免疫性糖尿病、糖尿病性视网膜病、鼻炎、缺血-再灌注损伤、血管成形术后再狭窄、 慢性阻塞性肺病(COPD)、格雷夫斯病、胃肠过敏、结膜炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、 心绞痛、癌症转移、小动脉疾病或线粒体疾病。所述试剂可以是如图18-27所示出的式1-10 的化合物。

[0028] 本发明的这些和其他目的将从本发明的以下描述,所附的参考附图和所附权利要

求中更 充分地理解。

附图说明

[0029] 本发明将从下面给出的详细描述和附图中得到更充分的理解,并且附图仅仅是作为说明 给出的,因此不是对本发明的限制,并且其中;

[0030] 图1显示了一组小分子的化学结构,测试其抑制多能性、生长或诱导幼稚状态或启动状 态的干细胞分化的能力。

[0031] 图2为总结了小分子、抗MUC1*Fab“E6”、MUC1*胞外结构域肽“FLR”和抗NME7 抗体#56和#61的测试结果的表。

[0032] 图3A-3L显示了人启动状态干细胞在10倍放大率下的照片,其在具有生长因子FGF的 干细胞介质中在MEF层上生长,并在测试试剂的存在下处理3天。图3A显示了在抗 MUC1*Fab,即E6的存在下培养的启动干细胞的照片,图3B显示了在MUC1*胞外结构域肽 FLR的存在下培养的启动干细胞的照片,图3C显示了对照启动干细胞的照片;图3D显示了 启动干细胞在0.2%DMSO中培养作为小分子在0.2%DMSO中的对照的照片,图3E显示了在 MN0642的存在下培养的启动干细胞的照片,图3F显示了在MN1130的存在下培养的启动干 细胞的照片,图3G显示了在MN0572的存在下培养的启动干细胞的照片,图3H显示了在 MN0947的存在下培养的启动干细胞的照片,图3I显示了在MN0129的存在下培养的启动干 细胞的照片,图3J显示了在MN0676的存在下培养的启动干细胞的照片,图3K显示了在 MN0992的存在下培养的启动干细胞的照片,以及图3L显示了在MN0402的存在下培养的启 动干细胞的照片。

[0033] 图4A-4L显示了人启动状态干细胞在20倍放大率下的照片,其在具有生长因子FGF的 干细胞介质中在MEF层上生长,并在测试试剂的存在下处理3天。虚线表示干细胞多能性或 生长被抑制或分化被诱导的区域。图4A显示了在抗MUC1*Fab,即E6的存在下培养的启动干细胞的照片,图4B显示了在MUC1*$_{ecd肽}$胞外结构域肽,也已知为FLR的存在下培养的启 动干细胞的照片,图4C显示了对照启动干细胞的照片;图4D显示了启动干细胞在0.2%DMSO中培养作为小分子在0.2%DMSO中的对照的照片,图4E显示了在MN0642的存在下培养的 启动干细胞的照片,图4F显示了在MN1130的存在下培养的启动干细胞的照片,图4G显示 了在MN0572的存在下培养的启动干细胞的照片,图4H显示了在MN0947的存在下培养的 启动干细胞的照片,图4I显示了在MN0129的存在下培养的启动干细胞的照片,图4J显示 了在MN0676的存在下培养的启动干细胞的照片,图4K显示了在MN0992的存在下培养的 启动干细胞的照片,以及图3L显示了在MN0402的存在下培养的启动干细胞的照片。

[0034] 图5A-5L显示了人启动状态干细胞在10倍放大率下的照片,其在不具有生长因子FGF 的干细胞介质中在MEF层上生长,并在测试试剂的存在下处理3天。图5A显示了在抗MUC1*Fab,即E6的存在下培养的启动干细胞的照片,图5B显示了在MUC1*胞外结构域肽 FLR的存在下培养的启动干细胞的照片,图5C显示了在抗NME7多克隆抗体#56的存在下 培养的启动干细胞的照片,图5D显示了在抗NME7多克隆抗体#61的存在下培养的启动干 细胞的照片,图5E显示了在MN0642的存在下培养的启动干细胞的照片,图5F显示了在 MN1130的存在下培养的启动干细胞的照片,图5G显示了在MN0572的存在下培养的启动 干细胞的照片,图5H显示了在MN0947的存在下培养的启动干细胞的照片,图5I显示了在 MN0129的存在下培养的启动干细胞的照片,图5J显示了在MN0676的存在下培养的启动干 细胞的照片,图5K显

示了在MN0992的存在下培养的启动干细胞的照片，以及图5L显示了 在MN0402的存在下培养的启动干细胞的照片。

[0035] 图6A-6L显示了人启动状态干细胞在20倍放大率下的照片，其在不具有生长因子FGF 的干细胞介质中在MEF层上生长，并在测试试剂的存在下处理3天。虚线表示干细胞多能性 或生长被抑制或分化被诱导的区域。图6A显示了在抗MUC1*Fab，即E6的存在下培养的启 动干细胞的照片，图6B显示了在MUC1*胞外结构域肽FLR的存在下培养的启动干细胞的照 片，图6C显示了在抗NME7多克隆抗体#56的存在下培养的启动干细胞的照片，图6D显示了在抗NME7多克隆抗体#61的存在下培养的启动干细胞的照片，图6E显示了在MN0642 的存在下培养的启动干细胞的照片，图6F显示了在MN1130的存在下培养的启动干细胞的照 片，图6G显示了在MN0572的存在下培养的启动干细胞的照片，图6H显示了在MN0947 的存在下培养的启动干细胞的照片，图6I显示了在MN0129的存在下培养的启动干细胞的照 片，图6J显示了在MN0676的存在下培养的启动干细胞的照片，图6K显示了在MN0992的 存在下培养的启动干细胞的照片，以及图6L显示了在MN0402的存在下培养的启动干细胞 的照片。

[0036] 图7A-7L显示了人幼稚状态干细胞在10倍放大率下的照片，其在具有生长因子$NME7_{AB}$的干细胞介质中在MUC1*抗体、C3表面上生长，并在测试试剂的存在下处理3天。虚线表 示干细胞多能性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图7A显示了在抗MUC1*Fab，即E6的存在下培养的幼稚干细胞的照片，图7B显示了在MUC1*胞外结构域肽FLR的存在下培养的幼稚干细胞的照片，图7C显示了对照幼稚干细胞的照片；图7D显示了幼稚干细胞在 0.2％DMSO中培养作为小分子在0.2％DMSO中的对照的照片，图7E显示了在MN0642的存 在下培养的幼稚干细胞的照片，图7F显示了在MN1130的存在下培养的幼稚干细胞的照片， 图7G显示了在MN0572的存在下培养的幼稚干细胞的照片，图7H显示了在MN0947的存 在下培养的幼稚干细胞的照片，图7I显示了在MN0129的存在下培养的幼稚干细胞的照片， 图7J显示了在MN0676的存在下培养的幼稚干细胞的照片，图7K显示了在MN0992的存在 下培养的幼稚干细胞的照片，以及图7L显示了在MN0402的存在下培养的幼稚干细胞的照 片。

[0037] 图8A-8L显示了人幼稚状态干细胞在20倍放大率下的照片，其在具有生长因子$NME7_{AB}$的干细胞介质中在MUC1*抗体、C3表面上生长，并在测试试剂的存在下处理3天。虚线表 示干细胞多能性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图8A显示了在MUC1*Fab，即E6的存在下培养的幼稚干细胞的照片，图8B显示了在抗MUC1*胞外结构域肽FLR的存在下培养的幼稚干细胞的照片，图8C显示了对照幼稚干细胞的照片，图8D显示了幼稚干细胞在 0.2％DMSO中培养作为小分子在0.2％DMSO中的对照的照片，图8E显示了在MN0642的存 在下培养的幼稚干细胞的照片，图8F显示了在MN1130的存在下培养的幼稚干细胞的照片， 图8G显示了在MN0572的存在下培养的幼稚干细胞的照片，图8H显示了在MN0947的存 在下培养的幼稚干细胞的照片，图8I显示了在MN0129的存在下培养的幼稚干细胞的照片， 图8J显示了在MN0676的存在下培养的幼稚干细胞的照片，图8K显示了在MN0992的存在 下培养的幼稚干细胞的照片，以及图8L显示了在MN0402的存在下培养的幼稚干细胞的照 片。

[0038] 图9A-9L显示了人幼稚状态干细胞在10倍放大率下的照片，其在不具有生长因子$NME7_{AB}$的干细胞介质中在MUC1*抗体、C3表面上生长，并在测试试剂的存在下处理3天。 虚线表示干细胞多能性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图9A显示了在抗MUC1*Fab， 即E6的存在下培养的幼稚干细胞的照片，图9B显示了在MUC1*胞外结构域肽FLR的存在 下培养的

幼稚干细胞的照片,图9C显示了在抗NME7多克隆抗体#56的存在下培养的幼稚干 细胞的照片,图9D显示了在抗NME7多克隆抗体#61的存在下培养的幼稚干细胞的照片, 图9E显示了在MN0642的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图9F显示了在MN1130的存在 下培养的幼稚干细胞的照片,图9G显示了在MN0572的存在下培养的幼稚干细胞的照片, 图9H显示了在MN0947的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图9I显示了在MN0129的存在 下培养的幼稚干细胞的照片,图9J显示了在MN0676的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图 9K显示了在MN0992的存在下培养的幼稚干细胞的照片,以及图9L显示了在MN0402的存 在下培养的幼稚干细胞的照片。

[0039] 图10A-10L显示了人幼稚状态干细胞在20倍放大率下的照片,其在不具有$NME7_{AB}$的干细胞介质中在MUC1*抗体、C3表面上生长,并在测试试剂的存在下处理3天。虚线表示 干细胞多能性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图10A显示了在抗MUC1*Fab,即E6的 存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10B显示了在MUC1*胞外结构域肽FLR的存在下培养 的幼稚干细胞的照片,图10C显示了在抗NME7多克隆抗体#56的存在下培养的幼稚干细胞 的照片,图10D显示了在抗NME7多克隆抗体#61的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10E 显示了在MN0642的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10F显示了在MN1130的存在下培 养的幼稚干细胞的照片,图10G显示了在MN0572的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10H 显示了在MN0947的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10I显示了在MN0129的存在下培 养的幼稚干细胞的照片,图10J显示了在MN0676的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10K 显示了在MN0992的存在下培养的幼稚干细胞的照片,以及图10L显示了在MN0402的存在 下培养的幼稚干细胞的照片。

[0040] 图11A-11F显示了人启动状态干细胞在4倍放大率下的照片,之前在bFGF中在MEF之 上生长,但在实验中在缺乏bFGF下培养,并用测试试剂处理3天。虚线表示干细胞多能性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图11A显示了在对照乱序siRNA存在下培养的启动干细胞的照片,图11B显示了在BRD4特异性siRNA存在下培养的启动干细胞的照片,图11C显 示了在JMJD6特异性siRNA存在下培养的启动干细胞的照片,图11D显示了在所谓的BRD4 抑制剂JQ1又称为JQ1-的非活性立体异构体的存在下培养的启动干细胞的照片,图11E显示 了在500nM所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1+的活性立体异构体的存在下培养的启动干 细胞的照片,以及图11F显示了在1uM所谓的BRD4抑制剂JQ1+的活性立体异构体的存在 下培养的启动干细胞的照片。

[0041] 图12A-12F显示了人启动状态干细胞在20倍放大率下的照片,之前在bFGF中在MEF之上生长,但在实验中在缺乏bFGF下培养,并用测试试剂处理3天。虚线表示干细胞多能 性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图12A显示了在对照乱序siRNA存在下培养的启动干细胞的照片,图12B显示了在BRD4特异性siRNA存在下培养的启动干细胞的照片,图12C 显示了在JMJD6特异性siRNA存在下培养的启动干细胞的照片,图12D显示了在所谓的 BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1-的非活性立体异构体的存在下培养的启动干细胞的照片,图12E 显示了在500nM所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1+的活性立体异构体的存在下培养的启 动干细胞的照片,以及图12F显示了在1uM所谓的BRD4抑制剂JQ1+的活性立体异构体的 存在下培养的启动干细胞的照片。

[0042] 图13A-13F显示了人幼稚状态干细胞在4倍放大率下的照片,之前在$NME7_{AB}$中在

MUCI*抗体表面,C3上生长,但在实验中在缺乏$NME7_{AB}$下培养,并用测试试剂处理3天。虚线表示干细胞多能性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图13A显示了在对照乱序siRNA 存在下培养的幼稚干细胞的照片,图13B显示了在BRD4特异性siRNA存在下培养的幼稚干 细胞的照片,图13C显示了在JMJD6特异性siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图13D 显示了在所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1-的非活性立体异构体的存在下培养的幼稚干细 胞的照片,图13E显示了在500nM所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1+的活性立体异构体 的存在下培养的幼稚干细胞的照片,以及图13F显示了在1uM所谓的BRD4抑制剂JQ1+的 活性立体异构体的存在下培养的幼稚干细胞的照片。

[0043] 图14A-14F显示了人幼稚状态干细胞在20倍放大率下的照片,之前在$NME7_{AB}$中在MUCI*抗体表面,C3上生长,但在实验中在缺乏$NME7_{AB}$下培养,并用测试试剂处理3天。虚线表示干细胞多能性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图14A显示了在对照乱序siRNA 存在下培养的幼稚干细胞的照片,图14B显示了在BRD4特异性siRNA存在下培养的幼稚干 细胞的照片,图14C显示了在JMJD6特异性siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图14D 显示了在所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1-的非活性立体异构体的存在下培养的幼稚干细 胞的照片,图14E显示了在500nM所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1+的活性立体异构体 的存在下培养的幼稚干细胞的照片,以及图14F显示了在1uM所谓的BRD4抑制剂JQ1+的 活性立体异构体的存在下培养的幼稚干细胞的照片。

[0044] 图15A-15F显示了人幼稚状态干细胞在4倍放大率下的照片,之前在NME1二聚体中在 MUC1*抗体表面,C3上生长,但在实验中在缺乏$NME7_{AB}$下培养,并用测试试剂处理3天。虚线表示干细胞多能性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图15A显示了在对照乱序siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图15B显示了在BRD4特异性siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图15C显示了在JMJD6特异性siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图15D 显示了在所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1-的非活性立体异构体的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图15E显示了在500nM所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1+的活性立体异构体 的存在下培养的幼稚干细胞的照片,以及图14F显示了在1uM所谓的BRD4抑制剂JQ1+的 活性立体异构体的存在下培养的幼稚干细胞的照片。

[0045] 图16A-16F显示了人幼稚状态干细胞在20放大率下的照片,之前在NME1二聚体中在 MUC1*抗体表面,C3上生长,但在实验中在缺乏NME1二聚体下培养,并用测试试剂处理 3天。虚线表示干细胞多能性或生长被抑制或分化被诱导的区域。图16A显示了在对照乱序siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图16B显示了在BRD4特异性siRNA存在下培养的 幼稚干细胞的照片,图16C显示了在JMJD6特异性siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片, 图16D显示了在所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1-的非活性立体异构体的存在下培养的幼 稚干细胞的照片,图16E显示了在500nM所谓的BRD4抑制剂JQ1又称为JQ1+的活性立体 异构体的存在下培养的幼稚干细胞的照片,以及图16F显示了在1uM所谓的BRD4抑制剂 JQ1+的活性立体异构体的存在下培养的幼稚干细胞的照片。

[0046] 图17显示了之前已知抑制炎症或抑制癌细胞生长、迁移和侵润的化合物的化学结构。

[0047] 图18-27显示了使用抑制癌细胞生长、迁移和侵润的本发明方法而识别的化合物的化学 结构。它们对幼稚干细胞具有抑制作用,但是对启动状态干细胞没有作用或对启动

状态干细 胞的作用非常小。

[0048] 图28显示了本发明的化合物和多种其他之前已知的化学化合物的生物数据的综述。

[0049] 图29A-29P显示了用对照培养基或之前报道抑制癌细胞迁移的小分子培养3天的人类干 细胞的照片，所述癌细胞迁移是癌症转移的特征。在图29A-29H中，细胞为幼稚状态干细胞， 之前在生长因子$NME7_{AB}$中在MUC1*抗体表面、C3上生长，但在实验中在缺乏$NME7_{AB}$下 培养。在图29I-29P中，细胞为启动状态干细胞，之前在生长因子FGF中在非活性的MEF层上生长，但在实验中在缺乏FGF下培养。

[0050] 图30-62A-F和图64-66A-F显示了人幼稚状态干细胞的照片，之前在$NME7_{AB}$中 在MUC1*抗体表面、C3上生长，但在实验中在缺乏$NME7_{AB}$下培养，并用候选小分子药 物以6uM的最终浓度处理3天。在每个板中，给出-或+、++、+++或++++的分数，其 中“-”指示在6uM下候选药物对干细胞的全能性或增殖不具有明显效果。“+”指示 轻微的效果，以及“++++”指示对全能性或增殖的突出的效果。增殖的抑制可以看做 是干细胞层中的洞，或空白区域。多能性的抑制，其也诱导分化，看做是细胞尺寸的 增加伴随细胞核尺寸的减小，细胞伸长和变平或细胞变圆并从平板上漂浮。

[0051] 图30-62G-L和图63A-63F显示了人启动状态干细胞的照片，之前在FGF中在 MEF层上生长，但在实验中在缺乏FGF下培养，并用候选小分子药物以6uM的最终浓 度处理3天。在每个板中，给出-或+、++、+++或++++的分数，其中“-”指示在6uM 下候选药物对干细胞的全能性或增殖不具有明显效果。“+”指示轻微的效果，以及 “++++”指示对全能性或增殖的突出的效果。启动状态的干细胞在限定的聚落中生长， 而不是像幼稚干细胞在统一的层中。增殖的抑制可以看做是聚落尺寸的减小。多能性 的抑制，其也诱导分化，看做是细胞尺寸的增加伴随细胞核尺寸的减小，细胞伸长和 变平或细胞变圆并从平板上漂浮。

[0052] 图67-72显示了人幼稚状态干细胞的照片，之前在$NME7_{AB}$中在MUC1*抗体表面、C3上生长，但在实验中在缺乏$NME7_{AB}$下培养，并用候选小分子药物以3个不同的最终浓度处 理3天。在图67-72中，A、D化合物浓度是12uM。在图67-72中，B、E化合物浓度是6uM。 在图67-72中，C、F化合物浓度是0.75uM。

[0053] 图73是显示了测得的癌细胞迁移的百分比抑制的柱形图。所使用的癌细胞是T47D乳腺 癌细胞系。用胶原蛋白涂覆多孔板，并且用Platypus系统接种细胞，其限制了细胞进入孔的 中部直到细胞已经附着。在126小时使用图像J测量仍然无细胞的百分比区域，并将变为图 表。测试的试剂如下：抗MUC1*Fab“E6”，其在体外和体内显示抑制几乎所有的所测试的 MUC1*阳性细胞的增殖；JQ1，据报道在体外和体内抑制癌细胞迁移和增殖的BRD4抑制剂； 他人报道的抑制一些癌细胞迁移的小分子；以及本发明的新型小分子。

[0054] 图74A-74P显示了在126小时的癌细胞迁移测试的代表性照片，其中癌细胞用试剂组处 理。以6uM的最终浓度给予小分子，除非另有指示。“+”或“-”指示在幼稚/启动干细胞测试中收到的每种试剂的分数。例如，+++/-指示显著抑制幼稚干细胞的多能性和增殖但是对 启动干细胞无效果的化合物。用对照PBS处理图74A细胞。用抗MUC1*Fab E6处理图 74B-74D细胞。图74E-74I显示用对照量的DMSO在0时刻处理的细胞。用JQ1处理图74F-74G 细胞。图74H-74M显示用对照量的DMSO在126小时处理的细胞。图74J显示用新型分子 MN1194处理的细胞。图74K显示用新型分子MN1186处理的细胞。图74L显示用新型分子 MN1137处理的细

胞。图74N显示用新型分子MN1193处理的细胞。图74O显示用新型分子 MN1203处理的细胞。图74P显示用新型分子MN1184处理的细胞。

[0055] 图75A-75X显示了癌细胞迁移测试的结果，其中测试抑制幼稚干细胞多能性或增殖的本 发明的新型化合物抑制癌细胞侵润和迁移的能力。图75A-75U显示了在本发明的新型化合物 或对照，仅DMSO存在下，在T47D乳腺癌细胞上在120小时时实施的迁移、侵润照片。图 75V为显示多个测试化合物在0、24小时或48小时抑制癌细胞迁移的图。图75W为显示小 分子的抑制效果作为浓度的函数的图。图75X为显示了本发明的小分子的IC50是如何测量 和计算的图。

[0056] 图76A-76H显示了在一系列浓度的本发明的化合物或对照，仅DMSO存在下，在T47D乳腺癌细胞上在120小时时实施的癌细胞迁移、侵润的照片。

[0057] 图77A-77O显示了在一系列浓度的本发明的化合物或对照，仅DMSO存在下，在T47D乳腺癌细胞上在120小时时实施的癌细胞迁移、侵润的照片。

[0058] 图78A-78Q显示了在一系列浓度的本发明的化合物或对照，仅DMSO存在下，在T47D乳腺癌细胞上在120小时时实施的癌细胞迁移、侵润的照片。

[0059] 图79A-79P显示了在一系列浓度的本发明的化合物或对照，仅DMSO存在下，在T47D乳腺癌细胞上在120小时时实施的癌细胞迁移、侵润的照片。

[0060] 图80A1-H12显示了在6uM的最终浓度的本发明化合物或对照，仅DMSO存在下，在T47D乳腺癌细胞上在120小时时实施的癌细胞迁移、侵润的照片。

[0061] 图81A-81P显示了癌细胞迁移、侵润测试的照片，对成为干细胞药物筛选中的亮点的 MN1194的类似物测试其抑制乳腺癌细胞迁移的能力，作为最终化合物浓度的函数。这些实 验在T47D乳腺癌细胞上实施并在120小时时拍摄。

[0062] 图82A-82P显示了癌细胞迁移、侵润测试的照片，对成为干细胞药物筛选中的亮点的 MN1194的类似物测试其抑制乳腺癌细胞迁移的能力，作为最终化合物浓度的函数。这些实 验在T47D乳腺癌细胞上实施并在120小时时拍摄。

[0063] 图83A-83T显示了MN1186和MN1194及其类似物对MUC1*阳性T47D乳腺癌细胞的 迁移的作用及计算的IC50的图。使用图J测量相对于对照的百分比抑制。

[0064] 图84显示了本发明的化合物对DU145 MUC1*阳性前列腺癌细胞的迁移、侵润的 作用的图。照片在0时刻拍摄。

[0065] 图85显示了本发明的化合物对SK-OV-3MUC1*阳性卵巢癌细胞的迁移、侵润的 作用的图。照片在0时刻拍摄。

[0066] 图86显示了本发明的化合物对DU145 MUC1*阳性前列腺癌细胞的迁移、侵润的 作用的图。照片在24小时时拍摄。

[0067] 图87显示了本发明的化合物对SK-OV-3MUC1*阳性卵巢癌细胞的迁移、侵润的 作用的图。照片在24小时时拍摄。

[0068] 图88显示了本发明的化合物对A549 MUC1*阳性肺癌细胞的迁移、侵润的作用的图。照片在0时刻拍摄。

[0069] 图89显示了本发明的化合物对PC-3MUC1*阴性但NME7和NME7-X1高度阳性的 前列腺癌细胞的迁移、侵润的作用的图。照片在0时刻拍摄。

[0070] 图90显示了本发明的化合物对A549 MUC1*阳性肺癌细胞的迁移、侵润的作用的

图。照片在20小时时拍摄。

[0071] 图91显示了本发明的化合物对PC-3MUC1*阴性但NME7和NME7-X1高度阳性的 前列腺癌细胞的迁移、侵润的作用的图。照片在20小时时拍摄。

[0072] 图92显示了本发明的化合物对A549 MUC1*阳性肺癌细胞的迁移、侵润的作用的图。照片在26小时时拍摄。

[0073] 图93显示了本发明的化合物对PC-3MUC1*阴性但NME7和NME7-X1高度阳性的 前列腺癌细胞的迁移、侵润的作用的图。照片在26小时时拍摄。

[0074] 图94显示了本发明的化合物对A549 MUC1*阳性肺癌细胞的迁移、侵润的作用的图。照片在40小时时拍摄。

[0075] 图95显示了本发明的化合物对PC-3MUC1*阴性但NME7和NME7-X1高度阳性的 前列腺癌细胞的迁移、侵润的作用的图。照片在40小时时拍摄。

[0076] 图96显示了本发明的化合物对CHL-1MUC1*阳性黑色素瘤细胞的迁移、侵润的 作用的图。照片在0时刻拍摄。

[0077] 图97显示了本发明的化合物对OV-90MUC1*阴性卵巢癌细胞的迁移、侵润的作 用的图。照片在0时刻拍摄。

[0078] 图98显示了本发明的化合物对CHL-1MUC1*阳性黑色素瘤细胞的迁移、侵润的 作用的图。照片在40小时时拍摄。

[0079] 图99显示了本发明的化合物对OV-90MUC1*阴性卵巢癌细胞的迁移、侵润的作 用的图。照片在40小时时拍摄。

[0080] 图100显示了本发明的化合物对CHL-1MUC1*阳性黑色素瘤细胞的迁移、侵润的 作用的图。照片在72小时时拍摄。

[0081] 图101显示了本发明的化合物对OV-90MUC1*阴性卵巢癌细胞的迁移、侵润的作 用的图。照片在72小时时拍摄。

[0082] 图102显示了本发明的化合物对CAPAN-2MUC1*阳性胰腺癌细胞的迁移、侵润的 作用的图。照片在0时刻拍摄。

[0083] 图103显示了本发明的化合物对1500，又称为ZR-75-1，MUC1*阳性乳腺癌细胞 的迁移、侵润的作用的图。照片在0时刻拍摄。

[0084] 图104显示了本发明的化合物对CAPAN-2MUC1*阳性胰腺癌细胞的迁移、侵润的 作用的图。照片在72小时时拍摄。

[0085] 图105显示了本发明的化合物对1500，又称为ZR-75-1，MUC1*阳性乳腺癌细胞 的迁移、侵润的作用的图。照片在72小时时拍摄。

[0086] 图106A1-106H6显示了本发明的化合物对癌细胞的迁移、侵润的作用的图。图106A1-106H6显示了化合物对CAPAN-2 MUC1*阳性胰腺癌细胞的迁移的作用。照片在 120小时时拍摄。图106A7-106H12显示了本发明的化合物对1500，又称为ZR-75-1， MUC1*阳性乳腺癌细胞的迁移、侵润的作用的图。照片在120小时时拍摄。

[0087] 图107A1-107H6显示了MN1194及其类似物抑制MUC1*阳性T47D乳腺癌细胞增殖的能力作为化合物浓度的函数的图。照片在120小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0088] 图108A1-108H6显示了MN1186及其类似物抑制MUC1*阳性T47D乳腺癌细胞增殖的能力作为化合物浓度的函数的图。照片在120小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0089] 图109A1-109H4显示了本发明的化合物抑制MUC1*阳性DU145前列腺癌细胞增殖的能 力的图。照片在96小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0090] 图110A1-110H4显示了本发明的化合物抑制MDA-MB-453,MUC1*阳性非常低的乳腺癌细胞增殖的能力的图。照片在96小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0091] 图111A1-111H4显示了本发明的化合物抑制PC-3MUC1*阴性但$NME7_{AB}$和NME7-X1 高度阳性的前列腺癌细胞增殖的能力的图。照片在96小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0092] 图112A1-112H4显示了本发明的化合物抑制MUC1*阳性SK-OV-3卵巢癌细胞增殖的能 力的图。照片在96小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0093] 图113A1-113H4显示了本发明的化合物抑制MUC1*阳性T47D乳腺癌细胞增殖的能力的 图。照片在96小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0094] 图114A1-114H4显示了本发明的化合物抑制MUC1*阴性OV-90卵巢癌细胞增殖的能力 的图。照片在96小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0095] 图115A1-115H12显示了本发明的化合物在6uM的最终浓度下抑制MUC1*阳性T47D乳 腺癌细胞增殖的能力的图。照片在120小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0096] 图116A1-116H6显示了本发明的化合物相比较已知抗癌试剂对MUC1*阳性DU145前列 腺癌细胞增殖的作用的图。显示的已知抗癌化合物为BRD4抑制剂JQ1+及其非活性对映异构 体JQ1-,和抗迁移化合物SU11274。照片在50小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0097] 图117A1-117H6显示了本发明的化合物相比较已知抗癌试剂对MUC1*阳性SK-OV-3卵 巢癌细胞增殖的作用的图。显示的已知抗癌化合物为BRD4抑制剂JQ1+及其非活性对映异构 体JQ1-,和抗迁移化合物SU11274。照片在50小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0098] 图118A-118B显示了本发明的化合物或已知抗癌药物对癌细胞增殖的抑制作用的自动钙 黄素测量的图。图118A显示了化合物对DU145 MUC1*阳性前列腺癌细胞的作用。图118B 显示了化合物对SK-OV-3MUC1*阳性卵巢癌细胞的作用。

[0099] 图119A1-119H6显示了本发明的化合物相比较已知抗癌试剂对MUC1*阳性A549肺癌细 胞增殖的作用的图。显示的已知抗癌化合物为BRD4抑制剂JQ1+及其非活性对映异构体JQ1-， 和抗迁移化合物SU11274。照片在40小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0100] 图120A1-120H6显示了本发明的化合物相比较已知抗癌试剂对PC-3MUC1*阴性但NME7和NME7-X1高度阳性的前列腺癌细胞增殖的作用的图。显示的已知抗癌化合物为 BRD4抑制剂JQ1+及其非活性对映异构体JQ1-,和抗迁移化合物SU11274。照片在40小时 时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0101] 图121A-121B显示了本发明的化合物或已知抗癌药物对癌细胞增殖的抑制作用的自动钙 黄素测量的图。图121A显示了化合物对A549 MUC1*阳性肺癌细胞的作用。图121B显示了 化合物对PC-3MUC1*阴性但$NME7_{AB}$和NME7-X1高度阳性的前列腺癌细胞的作用。

[0102] 图122A1-122H6显示了本发明的化合物相比较已知抗癌试剂对CHL-1MUC1*阳性黑色 素瘤细胞增殖的作用的图。显示的已知抗癌化合物为BRD4抑制剂JQ1+及其非活性对映异构 体JQ1-,和抗迁移化合物SU11274。照片在120小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0103] 图123A1-123H6显示了本发明的化合物相比较已知抗癌试剂对OV-90MUC1*阴性但$NME7_{AB}$和NME7-X1阳性的卵巢癌细胞增殖的作用的图。显示的已知抗癌化合物为BRD4 抑制剂JQ1+及其非活性对映异构体JQ1-,和抗迁移化合物SU11274。照片在120小时时拍摄。 通

过钙黄素染色测量增殖。

[0104] 图124A-124B显示了本发明的化合物或已知抗癌药物对癌细胞增殖的抑制作用的自动钙 黄素测量的图。图124A显示了化合物对CHL-1MUC1*阳性黑色素瘤细胞的作用。图124B 显示了化合物对OV-90MUC1*阴性但$NME7_{AB}$和NME7-X1阳性的卵巢癌细胞的作用。

[0105] 图125A1-125H6显示了本发明的化合物相比较已知抗癌试剂对CAPAN-2MUC1*阳性胰 腺癌细胞增殖的作用的图。显示的已知抗癌化合物为BRD4抑制剂JQ1+及其非活性对映异构 体JQ1-,和抗迁移化合物SU11274。照片在120小时时拍摄。通过钙黄素染色测量增殖。

[0106] 图126A1-126H6显示了本发明的化合物相比较已知抗癌试剂对MUC1*阳性乳腺癌细胞 1500s又称为ZR-75-1增殖的作用的图。显示的已知抗癌化合物为BRD4抑制剂JQ1+及其非 活性对映异构体JQ1-,和抗迁移化合物SU11274。照片在120小时时拍摄。通过钙黄素染色 测量增殖。

[0107] 图127A-127B显示了本发明的化合物或已知抗癌药物对癌细胞增殖的抑制作用的自动钙 黄素测量的图。图127A显示了化合物对CAPAN-2MUC1*阳性胰腺癌细胞的作用。图127B 显示了化合物对1500又称为ZR-75-1MUC1*阳性乳腺癌细胞的作用。

[0108] 图128A1-128H12显示了本发明的化合物对癌细胞的迁移、侵润的作用作为化合物浓度 的函数的图。将化合物在MUC1*阳性乳腺癌细胞系T47D上测试,并在处理后的72小时拍 摄照片。在图128A1-128A12中,以24uM的最终浓度给予化合物。在图128B1-128B12中,以12uM的最终浓度给予化合物。在图128C1-128C12中,以6uM的最终浓度给予化合物。 在图128D1-128D12中,以3uM的最终浓度给予化合物。在图128E1-128AE12中,以1.5uM 的最终浓度给予化合物。在图128F1-128F12中,以0.75uM的最终浓度给予化合物。在图 128G1-128G12中,以0.375uM的最终浓度给予化合物。在图128H1-128H12中,以6uM的 最终浓度给予化合物。对照孔含有0.2%DMSO,其为与化合物孔中相同浓度的DMSO。

[0109] 图129A-129K显示了化合物MN1265、MN1266、MN1270、MN1271、MN1272、MN1279、MN1280、MN1285、MN1286、MN1289和MN1246在处理后的72小时对癌细胞迁移的抑制 作用的图。从这些图中得到每个化合物的IC50。使用图J测量迁移相对于对照的百分比抑制。

[0110] 图130A1-130H12显示了本发明的化合物对癌细胞的迁移、侵润的作用作为化合物浓度 的函数的图。将化合物在MUC1*阳性乳腺癌细胞系T47D上测试,并在处理后的93小时拍 摄照片。在图130A1-130A12中,以24uM的最终浓度给予化合物。在图130B1-130B12中,以12uM的最终浓度给予化合物。在图130C1-130C12中,以6uM的最终浓度给予化合物。 在图130D1-130D12中,以3uM的最终浓度给予化合物。在图130E1-130AE12中,以1.5uM 的最终浓度给予化合物。在图130F1-130F12中,以0.75uM的最终浓度给予化合物。在图 130G1-130G12中,以0.375uM的最终浓度给予化合物。在图130H1-130H12中,以6uM的 最终浓度给予化合物。对照孔含有0.2%DMSO,其为与化合物孔中相同浓度的DMSO。

[0111] 图131A-131K显示了化合物MN1265、MN1266、MN1270、MN1271、MN1272、MN1279、MN1280、MN1285、MN1286、MN1289和MN1246在处理后的93小时对癌细胞迁移的抑制 作用的图。从这些图中得到每个化合物的IC50。使用图J测量迁移相对于对照的百分比抑制。

[0112] 图132A1-132H12显示了本发明的化合物对癌细胞增殖的作用作为化合物浓度的函数的 图。将化合物在MUC1*阳性乳腺癌细胞系T47D上测试,并在处理后的96小时拍摄照片。 在图132A1-132A12中,以24uM的最终浓度给予化合物。在图132B1-132B12中,以12uM

的最终浓度给予化合物。在图132C1-132C12中，以6uM的最终浓度给予化合物。在图 132D1-132D12中，以3uM的最终浓度给予化合物。在图132E1-132AE12中，以1.5uM的最 终浓度给予化合物。在图132F1-132F12中，以0.75uM的最终浓度给予化合物。在图 132G1-132G12中，以0.375uM的最终浓度给予化合物。在图132H1-132H12中，以6uM的 最终浓度给予化合物。对照孔含有0.2％DMSO，其为与化合物孔中相同浓度的DMSO。

[0113] 图133为在图132A1-132H12中画出的化合物对癌细胞增殖的抑制效果的图。在钙黄素 活细胞分析中测量相对细胞数。

[0114] 图134A-134K显示了化合物MN1265、MN1266、MN1270、MN1271、MN1272、MN1279、MN1280、MN1285、MN1286、MN1289和MN1246在处理后的96小时对癌细胞增殖的抑制 作用的图。从这些图中得到每个化合物的IC50。使用钙黄素活细胞分析测量相对于对照的增 殖的抑制。

[0115] 图135为显示多种细胞相对于DMSO对照的数量作为化合物浓度的函数的图。使用钙黄 素分析处理后120小时测量细胞计数。

[0116] 图136A1-136H6显示了化合物MN1197、MN1238、MN1247、MN1265、MN1285、MN1203、MN1239、MN1248、MN1266、MN1286、MN1231、MN1240、MN1249、MN1269、MN1269、 MN1289、MN1232、MN1241、MN1250、MN1270、MN1290、MN1237、MN1233、MN1242、 MN1251、MN1271、MN1291、MN1284、MN1234、MN1243、MN1262、MN1272、MN1288、 MN1236、MN1244、MN1263和MN1279以6uM在处理后的96小时对癌细胞增殖的抑制作 用的图。通过钙黄素活细胞分析染色细胞。

[0117] 图137A1-137H6显示了在钙黄素分析前在图136A1-136H6中描述的细胞的明场(bright field)照片。

[0118] 图138A-138I显示了化合物MN1197、MN1238、MN1240、MN1246、MN1265、MN1270、MN1272和MN1280对癌细胞增殖的抑制作用的大明场照片。

[0119] 图139显示了活细胞的自动钙黄素测量的图，显示了化合物在6uM下对MUC1*阳性乳 腺癌细胞处理后96小时的抑制作用。

[0120] 图140A1-140E12显示了癌细胞迁移测试的照片，其中对抗MUC1*抗体Fab和截短的MUC1*胞外结构域肽N-10测试其抑制癌细胞迁移或侵润的能力。测试的癌症亚型为CHL-1黑色素瘤(MUC1*$^{+}$/NME7^{+}/NME7-X1^{+})、A2058黑色素瘤(MUC1*$^{+/}$NME7$_{AB}^{+}$/NME7-X1^{++})、SK-OV-3卵巢癌(MUC1*$^{+}$/NME7^{+}/NME7-X1^{+})、A549肺癌(MUC1*$^{LO)}$、T47D乳腺癌 (MUC1*$^{+++}$/NME7$_{AB}^{+++}$/NME7-X1^{+++})、DU145(MUC1*$^{++}$/NME7$_{AB}^{+++}$/NME7-X1^{+++})前列腺 癌和PC-3(MUC1*$^{-}$/NME7$_{AB}^{+++}$/NME7-X1^{+++})前列腺癌细胞。测试抑制迁移能力的抗体为单 克隆抗MUC1*胞外结构域抗体E6的Fab，其结合于N-10肽，另一单克隆抗体的Fab也结合 于N-10肽，以及N-10肽。E6 Fab和C2 Fab两者竞争性抑制NME1二聚体、NME7$_{AB}$和NME7-X1与MUC1*生长因子受体的胞外结构域的结合。NME1二聚体、NME7$_{AB}$和NME7-X1 结合于MUC1*胞外结构域的N-10序列，所以N-10肽也竞争性抑制NME1二聚体、NME7$_{AB}$和NME7-X1与其同源受体的结合。

[0121] 图141A1-141E12显示了癌细胞增殖测试的照片，显示了以上在图140中描述的 生物制剂对癌症亚型的作用。

[0122] 图142A-142D显示了培养中的人类成纤维细胞的照片，其仅用0.2％DMSO处理作为对 照。

[0123] 图143A-143F显示了JQ1+(图143A-143C)对于非活性异构体JQ1-(图143D-143F)对人幼稚状态干细胞(图143A、143D)、人启动状态干细胞(图143B、143E)或人类成纤维 细胞(图143C、143F)的作用的图。

[0124] 图144A-153F-显示了本发明的化合物对幼稚干细胞(图144A、D-153A、D)、启动状态 干细胞(图144B、E-153B、E)或成纤维祖细胞(图144C、F-153C、F)的作用的图。

[0125] 图154A-154E显示了本发明的化合物对幼稚干细胞(图154A、D)、启动状态干细胞(图 154B)或成纤维祖细胞(图154C、E)的作用的图。

[0126] 图155A-159D-显示了本发明的化合物对幼稚干细胞(图155A、C-159A、C)或成纤维祖细胞(图155B、D-159B、D)的作用的图。

[0127] 图160A-160F-显示了之前已知癌细胞迁移抑制剂相对本发明的化合物对人类成纤维祖细 胞生长的作用的图。

[0128] 图161为用本发明的化合物处理的幼稚干细胞的RT-PCR测试的图。测量其表达的基因 为E-钙调蛋白,其随着细胞经历上皮向间质过渡而升高,纤连蛋白和波形蛋白,其两者随着 干细胞启动分化而增加,以及NF1,其为第一基因中的一个,当干细胞开始分化下降至神经 系时增加。

[0129] 图162为用本发明的化合物处理的T47D癌细胞的RT-PCR测试的图。转移标志物E-钙 调蛋白响应于化合物而减少,而分化标志物增加。

[0130] 图163是图162中显示的RT-PCR测量图,但Y轴展开以显示基因表达中的差异。

[0131] 图164A-164B显示了用抗$NME7_{AB}$抗体#61染色的第3天(图164A)或第5天(图164B)的人类胚胎的照片,所述抗$NME7_{AB}$抗体#61结合$NME7_{AB}$或NME7-X1的B3肽。可以看 出,第3天的所有细胞对于$NME7_{AB}$都是阳性的,但是在第5天,当桑椹胚开始分化时,$NME7_{AB}$阳性细胞限于内细胞团的幼稚细胞。

[0132] 图165A-165C显示了共免疫沉淀实验的蛋白质印迹的照片。将人类诱导的多能干(iPS 克隆7)细胞或人类胚胎干细胞(HES克隆3)裂解,用对照IgG抗体或Ab5进行免疫沉淀实验,所述对照IgG抗体或Ab5结合于MUC1的胞质尾部的抗体。然后将凝胶用结合NME7 的抗体印迹(图165A)。箭头指向两个NME7反应性物种,30kDa和33kDa,它们被Ab5(MUC1 抗体)下拉,但不被对照抗体IgG拉下。将裂解物单独装载到两条最右侧的泳道中,并显示 了全长NME7,42kDa处于裂解物中但不结合于MUC1。图165B显示了重组$NME7_{AB}$和 NME7-X1的蛋白质印迹。为了显示$NME7_{AB}$和NME7-X1结合于MUC1*而不是全长MUC1, 剥离图165A的凝胶并用结合于PSMGFR序列的抗MUC1*抗体再校正。

[0133] 图166A-166D显示了共免疫沉淀实验的蛋白质印迹的照片。它与上面在图165中描述的 实验相同,但是它是在T47D癌细胞上进行的。实验显示$NME7_{AB}$和NME7-X1在癌细胞中与MUC1*结合。

[0134] 图167为在许多启动状态和幼稚人干细胞系以及癌细胞系DU145、T47D和PC3中的$NME7_{AB}$和NME7-X1的RT-PCR测量图。将测量标准化为在MEF上在FGF中生长的启动状 态人类干细胞。

[0135] 图168为在许多癌细胞系中$NME7_{AB}$和NME7-X1的RT-PCR测量图。将测量标准化为 在MEF上在FGF中生长的启动状态人类干细胞。

[0136] 图169为在许多癌细胞系中$NME7_{AB}$和NME7-X1的RT-PCR测量图。因为干细胞系表 达

高水平的$NME7_{AB}$，所以在该图中，我们显示每个基因相对于EEF1A1的表达，EEF1A1 是经常用于跨多个细胞系比较表达的管家基因。

[0137] 图170A-170C显示了多种癌细胞系的蛋白质印迹。图170A显示了探测全长MUC1表达 的癌细胞系的蛋白质印迹，其中探测抗体是抗串联重复抗体$VU4H_5$。图170B显示探测切割 的MUC1，MUC1*表达的癌细胞系的蛋白质印迹，其中探测抗体是结合MUC1*细胞外结构域的PSMGFR序列的抗体。图170C显示探测NME7表达的癌细胞系的蛋白质印迹，其中探 测抗体是结合于$NME7_{AB}$或NME7-X1序列的多克隆抗体。

[0138] 图171A-171C显示了多种癌细胞系的蛋白质印迹，其用我们的抗体61或市售抗体探测。图171A显示了用我们的抗NME7抗体探测的癌细胞系的蛋白质印迹，其中所述抗NME7抗 体结合B3肽。图171B-171C显示了分别用市售的抗NME7抗体B9和H278探测的癌细胞系的蛋白质印迹。可以看出，抗体61结合于NME7AB和NME7-X1(33kDa和30kDa)，而不 结合于17kDa和21kDa的相关蛋白NME1和NME2。NME1和NME2在所有细胞中表达。 相反，B9仅识别全长NME7 42kDa以及H278识别低分子量NME1和NME2。

[0139] 图172A-172C显示了用MNC2抗MUC1*单克隆抗体染色的人类癌组织样本的照片，所述MNC2抗MUC1*单克隆抗体结合于MUC1*胞外结构域的N-10肽。图172A显示了乳腺癌， 图172B显示了肺癌，图172C显示了胰腺癌。

[0140] 图173A-173L显示了用抗体#61抗$NME7_{AB}$多克隆抗体染色的人肺癌组织样本的照片， 所述#61抗$NME7_{AB}$多克隆抗体结合于NME7的B域的B3肽。图173A-173D显示了正常肺， 图173E-173H显示了二期肺癌，以及图173I-173L显示了三期转移性肺癌。可以看出，抗体 61不结合于正常组织，而是只结合于癌组织以及染色随着转移状态的增加而增加。

具体实施方式

[0141] 定义在本申请中，“一”和“一个”用于指代单数和复数对象两者。

[0142] 如本文所使用的，“约”或“基本上”一般对限制于确切数值提供了余地。例如，如在多 肽序列的长度的上下文中使用的，“约”或“基本上”是指该多肽不限制于所列举的氨基酸的 数量。可以包括从N-末端或C-末端增加或减去的一些氨基酸，只要诸如其结合活性的功能活 性存在。

[0143] 如本文所使用的，给予“结合”一个或多个进一步治疗的试剂包括同时(并行)或以任 何顺序连续给药。

[0144] 如本文所使用的，“载体”包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂，其对以所采用的 剂量和浓度暴露于其的细胞或哺乳动物没有毒性。通常，药学上可接受的载体是水性pH缓 冲溶液。药学上可接受的载体的实例包括但不限于诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸的缓 冲物；抗氧化剂包括抗坏血酸；低分子量(少于约10个残基)多肽；诸如血清白蛋白、明胶 或免疫球蛋白的蛋白质；亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯 合剂诸如EDTA；糖醇如甘露糖醇或山梨糖醇；成盐抗衡离子诸如钠；和/或非离子表面活性 剂如TWEEN®、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS®。

[0145] 如本文所使用的，“药学上可接受的载体和/或稀释剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣抗菌剂和抗真菌剂，等张剂和吸收延迟剂等。此类介质和试剂用于药学活性物

质的用途 在本领域中是公知的。除了任何常规介质或试剂与活性成分不相容之外，考虑将其用于治疗 组合物中。补充活性成分也可以合并入组合物中。

[0146] 以剂量单位形式配制肠胃外组合物以便于给药和剂量均匀性是特别有利的。如本文所使 用的剂量单位形式是指适合作为待治疗的哺乳动物受试者的单位剂量的物理上离散的单位；每个单位含有经计算的预定量的活性物质，与所需的药物载体结合产生所需的治疗效果。本 发明的剂量单位形式的规格受制于并且直接取决于(a)活性材料的独特特征和待实现的特定 治疗效果，以及(b)在用于治疗患有身体健康受损的疾病的活体受试者中的疾病的这种活性 材料的合成领域中固有的限制。

[0147] 将主要活性成分配制成与单位剂量形式的合适的药学上可接受的载体以有效量方便有效 地给药。例如，单位剂型可以含有0.5μg至约2000mg范围内的主要活性化合物。以比例表示， 活性化合物通常存在于约0.5μg/ml的载体。在含有补充活性成分的组合物的情况下，通过参 考所述成分的常规剂量和给药方式来确定剂量。

[0148] 术语“MUC1生长因子受体”(MGFR)是功能性定义，意味着与活化配体相互作用以促进细胞增殖的MUC1受体的部分，所述活化配体诸如生长因子或修饰酶如裂解酶。MUC1 的MGFR区域是最接近细胞表面的细胞外部分，并且大部分或全部由MGFR(PSMGFR)的 基本序列所限定。MGFR包括未经修饰的肽和经过酶修饰例如磷酸化、糖基化等的肽。本发 明的结果与MUC1在一位点切割后配体与此部分的可接近的机制一致，所述位点与导致部分 或全部IBR从细胞释放的肿瘤发生相关。MGFR也已知为MUC1*。

[0149] 术语“MUC1生长因子受体的基本序列”(PSMGFR)或“FLR”是在一些情况下限定 了大多数或所有MGFR的肽序列，及其功能性变体和肽序列的片段，如下文所限定的。PSMGFR为如下文表1中所列出的SEQ ID NO:3所限定的，以及所有的功能性变体及其片段， 所述片段具有多达20的任意整数值的氨基酸置换(即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、 12、13、14、15、16、17、18、19或20)和/或在其N末端和/或C末端多达20的任意整数 值的氨基酸添加或删除。上文中的“功能性变体或片段”是指具有特异性结合于配体或以其 他方式特异性与配体接触的能力的这样的变体或片段，所述配体特异性结合于SEQ ID NO:3 的肽或以其他方式特异性与其接触。其为SEQ NO:3(指代nat-PSMGFR-用于“天然的”)的 PSMGFR肽的功能性变体的PSMGFR的一个实例是SEQ ID NO:11(指代var-PSMGFR)，其 通过包括SPY-序列而不是天然的-SPY(参见序列表中的粗体)而与nat-PSMGFR不同。当与 天然形式相比较时，Var-PSMGFR可以增强构想稳定性，其对于诸如抗体生产的某些应用是 重要的。PSMGFR包括未经修饰的肽和经过酶修饰例如磷酸化、糖基化等的肽。

[0150] 如本文所使用的，术语“PSMGFR”是如GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO:3)所述的 MUC1生长因子受体的基本序列的首字母缩略词。关于该点，例如在“N-10PSMGFR”、“N-15PSMGFR”或“N-20PSMGFR”中的“N-数字”是指已从PSMGFR的N末端删除的 氨基酸残基数。类似地，例如在“C-10PSMGFR”、“C-15PSMGFR”或“C-20PSMGFR”中的“C-数字”是指已从PSMGFR的C末端删除的氨基酸残基数。

[0151] 如本文所使用的，“MUC1*的胞外结构域”指示缺乏串联反复结构域的MUC1蛋白的胞 外部分。在多数情况下，MUC1*是分解产生，其中MUC1*部分由缺乏串联反复的短胞外结构域、跨膜结构域和胞质尾区组成。MUC1的分解的精确位点尚为未知，因此它似乎能够被多于一个酶分解。MUC1*的胞外结构域将包括PSMGFR序列的大部分，但是可以具有额外 的

10-20个N末端氨基酸。

[0152] 如本文所使用的,编号为1-10的“NME家族蛋白”或“NME家族成员蛋白”为集合在一起的蛋白质,因为它们都具有至少一个NDPK(核苷酸二磷酸激酶)结构域。在一些情况下,按照能够催化从ATP到ADP的转化,NDPK结构域是无功能的。NME蛋白之前已知为 NM23蛋白,标号为H1和H2。最近已经识别出多达十(10)个NME家族成员。本文中, 术语NM23和NME可以互换。本文中,术语NME1、NME2、NME5、NME6、NME7、NME8 和NME9用于指代天然蛋白以及NME变体。在一些情况下,这些变体是更加可溶的,在E.coli 中表达更好或比天然序列蛋白更加可溶。例如,说明书中所使用的NME7可以意味着天然蛋 白或变体,诸如具有高级商业应用性的NME7-AB,因为变体允许E.coli中的可溶性的适当 折叠的蛋白高收率表达。NME7-AB基本上由NME7 A和B结构域组成,但是缺乏大多数的 DM10结构域(SEQ ID NO:12),其位于天然蛋白的N末端。在本文中所指的“NME1”可与 “NM23-H1”互换。本发明也旨在不受NME蛋白的精确序列限制。也称为NM23-S120G的 突变体NME1-S120G在整篇申请中可互换使用。优选S120G突变体和P96S突变体,因为它 们优先形成二聚体,但是本文中也指代NM23二聚体、NME1二聚体、或二聚的NME1、或 二聚的NM23。

[0153] 如本文所指的NME7旨在意味着具有约42kDa分子量的天然NME7。

[0154] “NME7家族”指代全长NME7以及具有约30kDa、33kDa分子量的自然发生或人工创建的裂解形式,或者具有约25kDa分子量的裂解形式,变体缺失或部分缺失的DM10前导序列(SEQ ID NO:12),其为SEQ ID NO:5所代表的约1-95个氨基酸的的NME7的NME7,诸 如NME7b、NME7-X1、NME7-AB或重组NME7蛋白,或其变体,其序列可改变以允许有 效的表达或提高收率、溶解度,或者使得NME7更高效或商业上更加可行的其他特性。“NME7家族”也可以包括“NME7-AB类似”蛋白,其为在癌细胞中表达的在30至33kDa 范围内的蛋白。

[0155] 如本文所使用的,“诱导分化、或抑制干细胞多能性或干细胞的生长”的试剂指代单独 或结合引起干细胞处于启动状态或幼稚状态,以分化或抑制干细胞多能性或干细胞的生长的 蛋白、小分子或核酸。这样的试剂的实例包括SMAD抑制剂或dorsomorphin。

[0156] 如本文所使用的,关于启动的干细胞的“抑制幼稚状态中上调基因的表达或活性”的试 剂是指单独或组合引起幼稚干细胞中正常上调的基因的抑制的蛋白质,小分子或核酸。这样 的试剂的实例包括siRNA、翻译核酸和小分子。

[0157] 如本文所使用的,关于启动的干细胞的“增加幼稚状态中下调基因的表达或活性”的试 剂是指单独或组合引起幼稚干细胞中正常下调的基因的上调的蛋白质,小分子或核酸。这样 的试剂的实例包括编码指示分化的蛋白诸如波形蛋白、纤连蛋白和NF1的基因,以及微小 RNA,诸如miR-145。

[0158] 如本文所使用的,关于成纤维细胞的“抑制幼稚状态中上调基因的表达或活性”的试剂 是指单独或组合引起幼稚干细胞中正常上调的基因的抑制的蛋白质,小分子或核酸。这样的 试剂的实例包括特异于多能基因OCT4、SOX2、KLF4或c-Myc,编码波形蛋白、纤连蛋白 和NF1的基因或基因产品本身的反义核酸或siRNA。

[0159] 如本文所使用的,关于成纤维细胞的“增加幼稚状态中下调基因的表达或活性”的试剂 是指单独或组合引起幼稚干细胞中正常下调的基因的上调的蛋白质,小分子或核酸。这样的 试剂的实例包括编码下调基因或蛋白本身的核酸,以及诱导诸如SMAD抑制剂、dorsomorphin 等的分化的试剂。

[0160] 如本文所使用的，“促进多能性的试剂”或“将体细胞恢复至干样或癌样状态”是指单 独或结合诱导或抑制某些基因的表达，以使得基因签名移至更类似干细胞或癌细胞的一个的 蛋白、小分子或核酸。实例包括但不限于NME1二聚体、NME7、NME7-X1、NME7-AB、2i、5i，诸如抑制MBD3、CHD4、BRD4或JMJD6表达的siRNA的核酸，与人类NME1、NME2、NME5、NME6、NME7、NME8或NME9具有高度序列同源性的微生物NME蛋白，优选具有包括NDPK结合域的区域。

[0161] 如本文所使用的，关于被称为“小分子”的试剂，它可以是合成的化学品或者具有在50Da 和2000Da之间，优选在150Da和1000Da之间，更优选在200Da和750Da之间的分子量的 基于化学的分子。

[0162] 如本文所使用的，关于被称为“天然产物”的试剂，它可以是化学分子或者生物分子，只要该分子存在于自然界中。

[0163] 如本文所使用的，术语“癌症”可以包括但不限于：胆道癌；膀胱癌；脑癌包括成胶质 细胞瘤和成神经管细胞瘤；乳腺癌；宫颈癌；绒毛膜癌；结肠癌；子宫内膜癌；食道癌；胃癌；血液肿瘤包括急性淋巴性和髓性白血病；多发性骨髓瘤；AIDS相关白血病和成人T细 胞白血病淋巴瘤；包括Bowen氏病和Paget氏病的上皮内肿瘤；肝癌；肺癌；淋巴瘤，包括 霍奇金病和淋巴细胞性淋巴瘤；神经母细胞瘤；口腔癌包括鳞状细胞癌；包括由上皮细胞，基质细胞，生殖细胞和间质细胞产生的那些的卵巢癌；胰腺癌；前列腺癌；直肠癌；肉瘤包 括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤；皮肤癌包括黑素瘤、卡波西肉 瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌；睾丸癌包括胚细胞瘤如精原细胞瘤、非精原细胞瘤(畸胎瘤，绒毛膜癌)、间质肿瘤和生殖细胞肿瘤；甲状腺癌包括甲状腺腺癌和髓质癌；以及肾癌包括腺 癌和肾母细胞瘤。优选的癌症为乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌和脑癌。良 性或恶性形式的肿瘤也被认为在癌症状态内。

[0164] 如本文所描述的术语“癌症治疗”可以包括但不限于：化学疗法、放射疗法、辅助疗法 或前述方法的任何组合。可能变化的治疗方面包括但不限于：剂量，给药时间或持续时间或 疗法；并且可以或不可以与其他治疗组合，这些治疗也可以在剂量，时间或持续时间上变化。对癌症的另一种治疗是手术，其可以单独使用或与任何上述治疗方法组合使用。医学领域的 普通技术人员可以确定适当的治疗。

[0165] 如本文所使用的，“炎性疾病”或病症是指特征为涉及特定区域中的非特异性免疫应答 的免疫应答的疾病或病症。这样的疾病或病症包括但不限于：类风湿性关节炎、炎性肠综合 症、克罗恩氏病、骨关节炎、哮喘、皮炎、牛皮癣、囊性纤维化、移植后晚期和慢性实体器 官排斥、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、舍格伦综合征、桥本甲状腺炎、多肌炎、硬皮病、 艾迪生病、白癜风、恶性贫血、肾小球肾炎、肺纤维化、自身免疫性糖尿病、糖尿病性视网 膜病、鼻炎、缺血再灌注损伤、血管成形术后再狭窄、慢性阻塞性肺病(COPD)、格雷夫斯病、胃肠过敏、结膜炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、心绞痛、癌症转移、小动脉疾病或 线粒体疾病。

[0166] 如本文所使用的，“身体样本”是指从受试者获得的任何身体组织或体液样本。优选体 液，例如淋巴液、唾液、血液、尿液、乳汁和乳腺分泌物等。在某些实施例中血液是优选的。用于本文所描述的各种方法的组织和/或细胞的样品可通过标准方法获得，所述标准方法包括 但不限于：组织活检，包括穿孔活检和细胞刮取，穿刺活检以及通过抽吸术或其

他方法收集 血液或其他体液。

[0167] 如本文所使用的，“受试者”是指任何哺乳动物(优选为人)，并且优选为具有可通过将 本发明组合物施用于受试者内的部位来治疗的疾病的哺乳动物。实例包括人类、非人灵长类 动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗或猫。通常，本发明涉及与人类一起使用。

[0168] 如本文所使用的，“MUC1阳性癌症”或“MUC1*阳性癌症”是指以MUC1的异常表达 为特征的癌症，其中异常可指MUC1基因或基因产物的过表达，或MUC1或MUC1*的正常 表达模式的丧失，其在健康状态下仅限于细胞的顶端边界或导管的管腔边缘，或者从细胞表 面切割和脱落的MUC1的量的增加。

[0169] 序列表自由文本

[0170] 关于除了a、g、c、t以外的核苷酸符号的使用，它们遵循WIPO标准ST.25，附录2，表1中示出的惯例，其中k代表t或g；n代表a、c、t或g；m代表a或c；r代表a或g；s代 表c或g；w代表a或t以及y代表c或t。

[0171] MTPGTQSPFF LLLLLTVLTV VTGSGHASST PGGEKETSAT QRSSVPSSTE KNAVSMTSSV LSSHSPGSGS STTQGQDVTL APATEPASGS AATWGQDVTS VPVTRPALGS TTPPAHDVTS APDNKPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTR

YLIALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYE KVSAGNGGSSLSYTNPAVAAASANL(SEQ ID NO:2)描述了在其N末端具有nat-PSMGFR 的截短的MUC1受体同种型,并且包括全长MUC1受体的跨膜和胞质序列。

[0175] GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO:3)描述 了MUC1生长因子受体的天然基本序列的胞外结构域(nat-PSMGFR-“PSMGFR”的一实 例)。

[0176] QFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO:4)描述了PSMGFR的 N-10肽,其中删除了N末端的10个氨基酸。

[0177] DPETMNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYD NLHLEDLFIG NKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKA GFTITKLKMMMLSRKEALDFHV DHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLLGPA NSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFAS AAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTC CIVKPHAVSEGMLNTLYSVHFVNRRAMFIFLMYFMYRK(SEQ ID NO:5)描述了NME7氨 基酸序列(NME7:GENBANK登录号AB209049)。

[0178] MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELI QFITTGP IIAMEILRDDAICEWKRLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASA AREMELFFPSSGGCGPAN TAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFN MDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPC VAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARH LRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN(SEQ ID NO:6)描述了人类 NME7-AB。

[0179] MMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLLGPANSGV ARTDASES IRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKP HAVSEGLLGKILMAIRDAGF EISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSG PCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTL RAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEV QYFFKILDN*(SEQ ID NO:7)描述了人类NME7-X1。

[0180] MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELI QFITTGP IIAMEILRDDAICEWKRLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASA AREMELFF-(SEQ ID NO:8)描述了人类NME7-A1。

[0181] MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRV NVEEFYEVY KGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPG TLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDG LLEVQYFFKILDN(SEQ ID NO:9)描述了人类NME7-B3.

[0182] AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF(SEQ ID NO:10)描述了B3,其为NME7B 肽3(B结构域)。

[0183] GTINVHDVETQFNQYKTEAASPYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO:11)描 述了MUC1生长因子受体的天然基本序列的“SPY”功能变体的胞外结构域,具有增强的稳 定性(var-PSMGFR-“PSMGFR”的一实例)。

[0184] MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHL EDLFIGNKVN VFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRK(SEQ ID NO:12)描述了NME7的DM10 结构域。

[0185] 癌细胞与干细胞

[0186] 干细胞和癌细胞具有很多共同之处。目前研究人员发现,未分化的干细胞的许多标志物 实际上也是癌细胞的标志物。相反,曾经认为是癌标志物的许多分子标志物现在重新定义为 干细胞标志物。例如,我们已经发现,曾识别为转移癌标志物的CXCR4是幼稚干细胞的标 志物。癌细胞以经历上皮至间质转换(EMT)为特征,其中上皮细胞是终末分化的,而

间质 细胞较少分化且呈干样细胞(Mani et al.,2008)。肿瘤学家长期观察到,随着癌症阶段的进展，受影响组织的细胞看上去越来越不成熟或分化,且看上去更像干细胞。病理学家使用分化阶 段的外观来分类癌症阶段,早期癌症归类为中度分化,且侵润或转移的癌症被归类为低分化。

[0187] 进一步地,我们曾报道过,我们发现调节超过所有癌症75％的生长的生长因子受体 MUC1*存在于100％的多能人类干细胞中(Hikita et al.,2008;Smagghe et al.,2013)。最近，我们发现结合于MUC1*并激活MUC1*的生长、生存和自我更新功能的生长因子$NME7_{AB}$ (Carter et al.,2016)。人类干细胞可以通过在含有$NME7_{AB}$作为仅有的生长因子的基本培养 基中培养而维持于多能状态。在$NME7_{AB}$中培养的干细胞维持于称为幼稚的最早状态。$NME7_{AB}$存在于人类桑椹胚3天的的每个细胞中,其中所有的细胞都处于最早的幼稚状态。 到了人类囊胚的第五天,$NME7_{AB}$限制在内细胞团中,其中细胞根据定义是幼稚的。$NME7_{AB}$应该在人类囊胚的第五天后关掉,除了可以在睾丸中找到。但是,我们发现,对应于$NME7_{AB}$和NME7-X1的以截短形式的NME7在侵润和转移的癌中表达(WO2015/023694)。我们证明 了,向规整癌细胞中加入$NME7_{AB}$使得它们转变为更具转移性的癌细胞,使得从少如50个植 入的癌细胞可在动物中形成肿瘤,而非转移性癌细胞需要4-6M植入的细胞以形成肿瘤。另 外,将$NME7_{AB}$注射给动物引起移植的癌细胞转移。这些数据进一步确立了在分子水平上、在干细胞与癌细胞之间,更具体地在侵润或转移癌与幼稚干细胞之间的功能链。

[0188] 这些结果暗示了在干细胞中促进多能性的途径与促进癌症的途径是一样的。抑制干细胞 多能性或生长,或者诱导干细胞分化的试剂是当给予患者时,对于预防和治疗癌症有效抗癌 的试剂。

[0189] 发明人们显示了,转变或维持干细胞处于幼稚状态的试剂能够将癌细胞转换至更具转移 性的状态。因此,幼稚干细胞在许多方面与侵润或转移癌细胞相似。这些结果暗示了在幼稚 干细胞中促进多能性的途径与在癌细胞中促进转移的途径是一样的。预测了抑制幼稚干细胞 多能性或生长,或者诱导干细胞分化的试剂是当给予患者时,对于预防和治疗转移性癌症有 效抗癌的试剂。

[0190] 幼稚干细胞与启动干细胞之间的巨大差异提示了这两种不同类型的干细胞通过不同的途 径生长多能性和抵抗分化。因此,抑制幼稚干细胞多能性或增殖但不抑制启动状态干细胞，或对启动状态干细胞具有轻微作用的候选药物是在治疗或预防侵润或转移性癌症最有效的候 选药物。

[0191] 在本发明的一个方面,干细胞在可能是候选药物的试剂的存在下进行培养,观察到所述 试剂抑制干细胞多能性、或生长、或诱导干细胞分化且将所述试剂给予患者用于预防或治疗 癌症。在本发明的一个方面,干细胞是人类的。在另一方面,干细胞处于幼稚状态。在一些 情况下,通过在NME1二聚物、NME7、$NME7_{AB}$、NME7-X1中培养维持干细胞处于幼稚状 态,或通过报道的其他方法维持干细胞处于更加幼稚状态(Silva et al.,2008;Hanna et al.,2010; Gafni et al.,2013;Theunissen et al.,2014;Ware et al.,2014)。在又一方面,试剂为观察到抑制 多能性或生长,或诱导幼稚干细胞分化,但不针对启动状态干细胞,或者试剂对启动状态干 细胞具有较小作用,以及将所述试剂给予具有进展或已经诊断为转移性癌症的风险的患者。 因为我们发现所有的多能干细胞是MUC1*阳性的,以及幼稚干细胞表达$NME7_{AB}$,那么如上 描述所识别的试剂将对于治疗MUC1*阳性、或$NME7_{AB}$阳性、

或NME7-X1阳性癌症最为有 效。

[0192] 药物筛选

[0193] 这里我们描述了用于识别预防或治疗癌症、转移性癌症或预防癌症复发的疗法的疗法和 方法。在一个实施例中，这些疗法用于预防或治疗MUC1阳性、MUC1*阳性、NME7阳性、$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性的癌症。我们已经证实了，控制幼稚干细胞生长和多能性的信 号转导途径与控制启动干细胞生长和多能性的那些不同。进一步地，我们发现，调节幼稚干细胞生长和多能性的相同途径也调节癌细胞的生长和转移潜能。我们发现，抑制干细胞多能 性或生长，或者诱导干细胞分化的试剂是抑制癌细胞增殖的试剂，并且当给予患者时，是有 效的预防和治疗癌症的试剂。抑制幼稚干细胞多能性或生长，或者诱导幼稚干细胞分化的试 剂是抑制癌细胞迁移的试剂，其以转移性癌症为特征，并且当给予患者时，是有效的预防和 治疗侵润或转移性癌症的抗癌试剂。抑制多能性或生长，或者诱导幼稚干细胞而不是启动干 细胞分化，或者对启动干细胞具有小得多的作用的试剂是有效的预防和治疗侵润或转移性癌 症的抗癌试剂。

[0194] 因此，为了识别治疗试剂以治疗有发展或诊断为癌症的风险的患者：1)生长处于多能状 态的干细胞；2)将多能干细胞群与候选药物接触；3)识别抑制多能性或生长，或诱导多能 干细胞的分化的候选药物；4)推断出抑制多能性或生长，或诱导多能干细胞的分化的候选药 物为抗癌试剂。

[0195] 为了识别治疗试剂以治疗有发展或诊断为癌症的风险的患者：1)生长处于幼稚状态的干 细胞；2)将干细胞与候选药物接触；3)识别抑制多能性或生长，或诱导幼稚干细胞的分化 的候选药物；4)推断出抑制多能性或生长，或诱导幼稚干细胞的分化的候选药物为用于治疗 或预防侵润性癌症或癌症转移的抗癌试剂。

[0196] 或者，为了识别治疗试剂以治疗有发展或诊断为转移性癌症的风险的患者：1)生长处于 幼稚状态的干细胞，以及可选地，平行生长处于启动状态的干细胞；2)将两种干细胞群与候 选药物接触；3)识别抑制多能性或生长，或者诱导幼稚干细胞但可选地不诱导启动干细胞分 化，或者对启动干细胞具有小得多的作用的候选药物；以及4)推断出抑制多能性或生长， 或者诱导幼稚干细胞但可选地不诱导启动干细胞分化，或者对启动干细胞具有小得多的作用 的候选药物为用于治疗或预防癌症转移的抗癌试剂。

[0197] 以这些方式筛选以评价其作为抗癌或抗转移试剂的试剂可以是任意形式的，包括但不限 于小分子、天然产物、抗体、抗体片段、文库或抗体或抗体片段、肽、肽模拟物、核酸、反 义核酸、DNA、RNA、编码或非编码、抑制性RNA、细菌和微生物。在本发明的一个方面， 干细胞是人类来源的。在本发明的又一方面，干细胞是灵长动物来源的。在本发明的又一方面，干细胞是哺乳动物来源的。在本发明的又一方面，干细胞啮齿动物来源的。

[0198] 在本发明的另一方面，通过识别在幼稚干细胞中上调但在启动干细胞中不上调的基因来 识别新的抗癌或抗转移药物靶标。在本发明的又一方面，通过识别在幼稚干细胞中上调但在 启动干细胞中不上调的微小RNA来识别新的抗癌或抗转移药物靶标。

[0199] 药物筛选结果

[0200] WO2009/042815公开了在直接结合测定中，一系列咔啉分子抑制MUC1*的胞外结构域 和NME蛋白，特别是NME1二聚体和$NME7_{AB}$之间的相互作用。我们以前也显示了，抑制MUC1*-NME相互作用的同一系列咔啉也抑制癌细胞生长。我们测试了一组的10种小分子，

包括三种咔啉(图1),以及对生物制剂测试其与启动状态干细胞相比抑制幼稚干细胞多能性 或生长的能力。我们以前证明抗MUC1*单克隆抗体E6的Fab或对应于MUC1*的胞外结构域的合成肽,FLR(也称为PSMGFR)通过抑制$NME7_{AB}$或MUC1*-NME1相互作用而抑制 癌症和干细胞两者的多能性和生长。我们还测试了新的抗NME7抗体#56和#61;我们以前 已经显示了它们抑制$NME7_{AB}$的能力以将常规癌细胞转化为转移性癌细胞,尽管#61比#56 更有效。我们以前还显示,一些咔啉小分子通过抑制MUC1*-$NME7_{AB}$或MUC1*-NME1相互 作用来抑制癌症的生长。

[0201] JQ1是一种据报道抑制BRD4的小分子,已显示抑制癌细胞迁移和癌细胞增殖,但尚未 有报道对干细胞有任何影响。在存在和不存在干细胞生长因子的情况下进行干细胞筛选测定:$NME7_{AB}$用于生长幼稚干细胞或FGF用于生长启动干细胞。如果存在同源生长因子,那么生 物制品或小分子将不得不竞争生长因子以获得效果。因此,我们预计,当生长因子FGF用于 启动干细胞或者$NME7_{AB}$或NME1二聚体用于幼稚干细胞时,不会出现更多的影响。结果总 结在图2的表格中。目视确定化合物对干细胞的作用,并将化合物分级为0-4,其中4为最大 效果,0为无法观察到的效果。观察到的主要影响是来自多能干细胞形态的变化,其为从具 有大的核质比例的小圆细胞的鹅卵石样式变为分化干细胞的样式,所述干细胞是细长的,大 而扁平的细胞,具有较小的核质比。一些化合物也严重抑制干细胞的生长。将化合物添加到 最终浓度6uM的幼稚状态干细胞或启动状态干细胞中。在这种特殊情况下,通过在含有 $NME7_{AB}$或NME1二聚体的培养基中培养,将幼稚状态的干细胞维持在幼稚状态。但是,其 他方法诸如2i和5i(Silva et al.,2008,Nichols and Smith,2009,Theunissen et al.,2014)]用来将 干细胞维持在更加幼稚的状态。在这种情况下,启动状态干细胞在在bFGF中一层MEF上培 养,但已知任何含有bFGF的培养基都将维持干细胞处于启动状态。

[0202] 我们已经显示,JQI对幼稚干细胞生长但不对启动干细胞生长具有抑制作用。另外,以 前的研究显示JQ1具有抗炎作用(Belkina et al,2013;Meng et al,2014)。因此,本研究中 识别的化合物还应具有抗炎作用并可用于治疗肥胖、哮喘、慢性消化性溃疡、结核、类风湿 性关节炎、慢性牙周炎、溃疡性结肠炎和克罗恩氏病、慢性鼻窦炎、慢性活动肝炎等中的炎 症的治疗。

[0203] 在测试的10种小分子和4种生物制品中,除了对启动干细胞集落有适度影响的MN1130 外,没有一种对启动干细胞有作用。然而,当相同的试剂在幼稚干细胞上进行测试时,四种 生物制剂中的三种和三种咔啉中的两种极大地抑制干细胞多能性和生长并诱导分化。请注意, 这些试剂诱导幼稚干细胞形态的变化,这与当干细胞开始分化时发生的形态变化(虚线所示) 一致。细胞变平,呈现更多的纺锤形,细胞核与细胞质的比例降低。

[0204] 除了图1所示的小分子外,还测试了抗MUC1*Fab、FLR肽、又称为PSMGFR肽和抗NME7抗体#56和#61。图2是这些候选药物如何在幼稚与启动的干细胞药物中进行的总结,其中确认的药物亮点是诱导幼稚干细胞的分化,但对FGF生长的启动干细胞没有影响或较小 的影响的化合物中的一个。图3-10显示了用小分子、Fab、MUC1*胞外结构域肽“FLR”或小分子处理的干细胞的照片。图3-6显示所有的试剂或化合物均未显着诱导启动状态的干细 胞的分化。然而,图7-10显示了几种试剂诱导幼稚状态的干细胞的分化。分化部分用虚线表 示。具体而言,在这些浓度下,抗MUC1*E6Fab、FLR肽、抗-NME7#61、MN572、MN0642 和MN1130均诱导幼稚状态干细胞的分化,并预测其为癌症的有效抑制剂和转移性癌症的抑

制剂。可以将它们给予患者用于预防或治疗癌症或转移性癌症。已显示E6 Fab抑制所有MUC1*阳性癌细胞的生长。另外，抗MUC1*E6 Fab显示强有力抑制动物中MUC1*阳性肿 瘤的生长。类似地，化合物MN0642显示体外抑制癌细胞的生长。FLR(PSMGFR)肽和抗 NME7#61显示抑制常规癌细胞向转移性癌细胞的转变。

[0205] 检测并发现其他几种与咔啉不相似但据报道抑制癌症生长或迁移的小分子可抑制多能性 或生长或者诱导干细胞特别是幼稚干细胞的分化。例如，据报道与咔啉JQ1(+)(图1)不 相似的小分子抑制炎症(Belkina et al.,2013)、癌症多能性(Fillippakopoulos et al.,2010)和 癌细胞迁移(Tang et al.,2013)。据报道，JQ1(+)抑制BRD4且其无活性对映异构体JQ1(-) 不起作用(Fillippakopoulos et al.,2010)。已报道BRD4是NME7的调节剂，NME7是癌基因 c-Myc的调节剂，并且是在癌细胞和干细胞中过表达选定的少数基因的超级增强剂的组分。目前尚不完全清楚BRD4的这些声称的功能中的哪些是正确的。将启动状态干细胞用JQ1(+)、无活性立体异构体JQ1(-)、BRD4特异性siRNA或JMJD6特异性siRNA处理3天。这些药 物似乎都不能诱导启动状态的干细胞的分化，但JQ1(+)可能对启动干细胞的集落的大小有 适度影响(图11)，并且也似乎导致一些异常形态(图12)。然而，JQ1(+)显著诱导幼稚状 态干细胞的分化并抑制其生长(图14E-F、15E-F和16E-F)。无论是幼稚干细胞在$NME7_{AB}$ (图13-14)还是NME1二聚体(图15-16)中培养，JQ1(+)均抑制幼稚干细胞多能性和生 长并诱导分化。由于JQ1(+)是炎症、癌细胞迁移和癌细胞增殖的已知抑制剂，所以这些结 果表明，有效治疗炎症或者预防或治疗癌症的试剂也抑制幼稚干细胞多能性或生长或者诱导 干细胞分化。因此，抑制幼稚干细胞多能性或生长或者诱导干细胞分化的试剂也是治疗炎症 或者预防或治疗癌症的有效治疗。

[0206] 然后，我们测试了一系列扩充的试剂，包括已知抑制癌症生长或迁移的试剂(图17)(Horm et al.,2012;Meng&Yue,2014;Zhen et al.,2014)其以侵润或转移性癌症为特征。我们还合 成了一系列新型小分子，在干细胞药物筛选试验中测试它们，然后合成最佳亮点的类似物。这些小分子如图18-27所示。在干细胞药物筛选试验中测试了已知化合物和新型化合物。在 图29-72的照片中显示了小分子对幼稚和启动状态干细胞的作用。图17-27中所示的小分子 和生物制剂也在癌细胞迁移测定中测试。构效关系表见图28。有效的癌细胞迁移是癌细胞侵 润其他组织和转移的特征。典型的迁移测定包括用纤连蛋白、胶原蛋白等涂覆细胞培养板，接种癌细胞并在横跨所有细胞制造疤痕并测量癌细胞侵入空隙空间所花费的时间。提供更可 靠数据的另一种方法是鸭嘴兽系统，它是一种特殊的多孔细胞培养板，具有并列的一组塞子，可在每个孔的中心封堵一个圆圈。当塞子就位时，将癌细胞接种，然后在细胞附着到平板表 面后将它们除去。将候选药物添加到每个孔中，然后作为时间函数拍摄照片以追踪候选药物 对癌细胞迁移或侵润的抑制作用。图73-106显示了癌细胞迁移测定的结果。柱状图总结了已 知的抗迁移化合物相比较抗MUC1*Fab E6和在图73中所示的合成的第一少数小分子的结果。癌细胞迁移测试和总结其活性的柱状图显示在图74中。两个新型小分子MN1186和MN1194 相比较已知抗迁移分子SU11274的效果显示在图75A-75U中。图75V为显示了测量一些化 合物在0、24或48小时时刻抑制癌细胞迁移的图。图75W为显示了小分子的抑制效果作为 浓度函数的图。图75X为显示了本发明的小分子的IC50是如何测量并计算的图。

[0207] 从图73-75中可以看出，癌细胞迁移的两个最有效的抑制剂是MN1186和MN1194，其

也抑制干细胞多能性和生长。MN1186对幼稚干细胞的效果为++++(4)，意味着其在最高程度上抑制干细胞多能性和增殖(图39C、39F)，但是对启动状态干细胞只有++(2)的中等效果(图39I、39L)。MN1194对幼稚干细胞的效果为++++(4)，意味着其在最高程度上抑制 干细胞多能性和增殖(图41B、41E)，但是几乎不影响启动状态干细胞(图41H、41K)。我 们随后对MN1186和MN1194制造了类似物。MN1186类似物包括MN1220、MN1221、MN1222、 MN1223、MN1224、MN1227和MN1228;MN1194类似物包括MN1190、MN1193、MN1195、 MN1225、MN1226、MN1229和MN1230。我们对母体化合物MN1186及其类似物(图76A-76H) 以及MN1194及其类似物(图77A-77H)测试了其抑制癌细胞迁移的能力。这些研究显示化 合物MN1227(图50B、50E、50H、50K和图76G)、MN1228(图50C、50F、50I、50L和 图76H)、MN1229(图51A、51D、51G、51J和图77B)、MN1190(图40C、40F、40I、40L 和图77E)和MN1195(图41C、41F、41I、41L和图77D)对于MN1186(图39C、39F、39I、 39L和图76A)和MN1194(图41B、41E、41H、41K和图77A)有所改进，并且全部均大 大好于先前已知的迁移抑制剂SU11274和MN1204(Zhen et al., 2014)。

[0208] 也在细胞生长试验中测试了MN1194和1186的这些类似物(分别为图107A1-107H6和 图108A1-108H6)。在该实验中，将母体化合物及其类似物均加到正常的细胞培养基中，至最 终浓度为40uM、20uM、10uM、5uM或2.5uM。为了进行对比，先前已知的癌细胞迁移抑制剂SU11274和MN1204也包括在相同实验中。在测试化合物存在下培养120h后，T47D癌细 胞进行染色活细胞的钙黄素测试。在读取被活细胞吸收的钙黄素的荧光的标准平板读数器上定量相对细胞增殖。正如在细胞迁移测试中，类似物MN1190、MN1195、MN1227、MN1228、MN1229比母体化合物MN1186和1194更好地抑制癌细胞增殖，在5uM-2uM表现出抑制， 并且都比已知化合物SU11274和MN1204更好地抑制癌细胞生长。

[0209] 在癌细胞迁移试验中也测试了MN1186和1194的化学结构的其他变体(分别为图78A-78Q和图79A-79P)。

[0210] 药物化学技术和我们观察到的构效关系对其他小分子的设计和合成产生影响。在干细胞 试验以及同样在癌细胞迁移试验中对它们进行了测试(图80A1-80H12)，其中以6uM的最终 浓度的剂量给予所述分子并且所使用的细胞系为MUC1*高度阳性的乳腺癌细胞系T47D。另 一癌细胞迁移的照片、侵润测试，其中MN1194的类似物是干细胞药物筛选中的亮点，测试 其抑制乳腺癌细胞迁移的能力作为最终化合物浓度的函数(图81A-81P)。这些实验在T47D 乳腺癌细胞上进行并在120小时拍摄。图82A-82P显示了另一癌细胞迁移、侵润测试的照片， 其中对干细胞药物筛选中的亮点的MN1184的类似物测试其抑制乳腺癌细胞迁移的能力作为 最终化合物浓度的函数。这些实验在T47D乳腺癌细胞上进行并在120小时拍摄。测试所述 小分子的效果作为化合物浓度的函数允许我们计算每个化合物的IC50(图83A-83T和图28)。

[0211] 所有的人多能干细胞是MUC1*阳性的。幼稚状态干细胞也表达原始生长因子$NME7_{AB}$， 其为MUC1*的激活配体。乳腺癌细胞系T47D源自转移性乳腺癌患者。T47D细胞表达任意 可商业获得的细胞系的高水平的MUC1*。我们发现，T47D细胞也表达$NME7_{AB}$以及可选的剪接同种型NME7-X1，其均为激活MUC1*生长因子受体的生长因子。

[0212] 本发明的多数新型化合物为咔啉类或类似咔啉的分子。我们之前显示了，在纳米颗粒直接结合测定中，这些咔啉类中的一些抑制NME1二聚体或$NME7_{AB}$与MUC1*胞外结 构域

的结合。但是，在我们的纳米颗粒测定中，我们仅能够确定化合物破坏MUC1*胞 外结构域肽与NME1二聚体或$NME7_{AB}$之间的相互作用。我们不能得出该化合物是否通 过结合于MUC1*或其配体而这样起作用。回想起我们的化合物亮点首先在干细胞药物 筛选实验中识别，出于其抑制干细胞多能性或增殖的能力。我们随后测试了所述亮点 抑制癌细胞迁移、侵润的能力，其为转移癌的特征，并且我们随后最终测试了所述亮 点抑制癌细胞增殖的能力。因此，我们首先在MUC1*阳性、$NME7_{AB}$阳性和NME7-X1阳 性T47D细胞上测试了本发明的化合物。通常结果为，抑制干细胞多能性或增殖的化 合物和生物制剂也抑制T47D癌细胞迁移和增殖。我们随后将这些研究扩展至其他癌 症的亚种，为MUC1*阳性、$NME7_{AB}$阳性、MUC1*和$NME7_{AB}$两者阳性或MUC1*阴性细胞系。癌细胞迁移研究的小分子抑制在DU145(MUC1*$^{+}$/$NME7_{AB}^{+++}$/$NME7\text{-}X1^{+++}$)前列腺癌细胞和 SK-OV-3(MUC1*$^{+}$)卵巢癌细胞(图84-87)；A549(MUC1*^{LO})肺癌细胞和PC-3 (MUC1*-/$NME7_{AB}^{+++}$/$NME7\text{-}X1^{+++}$)前列腺癌细胞(图88-95)；CHL-1(MUC1*$^{+}$/NME7^{+})黑

[0213] 也在一些癌症亚型上进行癌细胞增殖研究的小分子抑制。对本发明的小分子、以及BRD4 抑制剂JQ1+及其非活性对应异构体JQ1-和c-Met抑制剂SU11274测试其抑制以下癌细胞生 长的能力：DU145(MUC1*$^{+}$/$NME7_{AB}^{+++}$/$NME7\text{-}X1^{+++}$)前列腺癌细胞(图109A1-109H4)；MDA-MB-453(MUC1*^{LO})乳腺癌细胞(图110A1-110H4)；PC-3 (MUC1*$^{-}$/$NME7_{AB}^{+++}$/$NME7\text{-}X1^{+++}$)前列腺癌细胞(图111A1-111H4)；SK-OV-3(MUC1*$^{+}$) 卵巢癌细胞(图112A1-112H4)；T47D(MUC1*$^{++++}$/$NME7_{A}^{B+++}$/$NME7\text{-}X1^{+++}$)乳腺癌细胞(图 113A1-113H4)；以及OV-90(MUC1*$^{-}$)卵巢癌细胞(图114A1-114H4)。本发明的小分子对 T47D乳腺癌细胞具有最强有力的效果，所述T47D乳腺癌细胞对于MUC1*生长因子受体和 其激活的配体$NME7_{AB}$和NME7-X1呈高度阳性。可以从图113的活细胞钙黄素染色实验中 看出，MN1130、MN1133、MN1246和MN1227明显抑制这些细胞的生长。先前报道抑制癌 细胞增殖的JQ1+和SU11274也抑制这些细胞的生长。但是，本发明的化合物和JQ1或SU11274 对MUC1*阴性乳腺癌细胞OV-90均不具有任何显现出的作用(图114)。本发明的化合物抑 制MUC1*阳性乳腺癌细胞SK-OV-3的生长，而c-Met抑制剂SU11274没有效果并且JQ1+具 有轻微的效果(图112)。本发明的化合物，MN1130、MN1133、MN1246和MN1227也抑制 MUC1*阳性DU145前列腺癌细胞(图109)以及MUC1*阴性但$NME7_{AB}$阳性PC-3前列腺癌 细胞(图111)和MUC1*^{LO} MDA-MB-453乳腺癌细胞(图110)的生长。

[0214] 在T47D癌细胞上进行了更广泛的癌细胞增殖测试，以对比每种化合物的相对抑制强度。以6uM的最终浓度的剂量对46个化合物进行给药。120小时后，用钙黄素染色活细胞。测试 的照片显示在图115中。同样对化合物测试其抑制DU145前列腺癌细胞(图116A1-116H6) 和SK-OV-3卵巢癌细胞(图117A1-117H6)的增殖的能力。在图118A和118B中分别用曲线 图表示并示出了活细胞相对于对照的自动测量。同样对这些相同的化合物测试其抑制A549 肺癌细胞(图119A1-119H6)和PC-3前列腺癌细胞(图120A1-120H6)的增殖的能力。在图 121A和121B中分别针对这些细胞用曲线图表示并示出了活细胞相对于对照的自动测量。同 样对这些相同的化合物测试其抑制CHL-1黑色素瘤细胞(图122A1-122H6)和OV-90卵巢癌 细胞(图123A1-123H6)的增殖的能力。在图124A和124B中分别针对这些细胞用曲线图表 示并示出了活细胞相对于对照的自动测量。同样对这些相同的化合物测试其抑制CAPAN-2 前列腺癌细胞(图125A1-125H6)和ZR-75-1乳腺癌细胞(图126A1-126H6)的增殖的能力。 在图127A和127B中分别针对这些细胞用曲线图表示并示出了活细胞相对于对照的

自动测量。

[0215] 得出进一步的药物化学和构效关系的观察结论，其导致另一轮的其他化合物的合成。针 测试化合物MN1265、MN1265、MN1266、MN1270、MN1271、MN1272、MN1279、MN1280、MN1285、MN1286、MN1289、MN1290和MN1291对癌细胞迁移的抑制效果。在72小时(图 128A1-128H12)和93小时(图130A1-130H12)拍摄细胞的照片。因为将化合物在一系列浓 度上给药，可以生成IC50曲线并在图129A-129K中示出，随后在图131A-131K中以对数尺 度显示。在癌细胞迁移测试中，使用Image J软件定量已迁移至空白处的细胞数。数据显示了 药物化学技术以及从构效关系获得的知识，导致该组化合物的IC50浓度的大幅降低，对于从 给药时间点后72小时开始计算的曲线，其中MN1265的IC50为0.77uM并且MN1266的为 1.29uM。对这些化合物测试其抑制癌细胞增殖的能力。钙黄素染色的活细胞的照片显示在图132A1-132H12中。随后在平板读数器(TECAN SAFIRE，Tecan集团有限公司，瑞士)上定 量钙黄素荧光，并且作为化合物浓度的函数以曲线图表示对癌细胞增殖的抑制效果。癌细胞 增殖的抑制作为浓度的函数的曲线图和计算的IC50显示在图134A-134K中。也进行了细胞 活性试验并以图表示了结果(图135)。

[0216] 当以6uM的最终浓度给药时，对本发明的不同组的小分子一起测试其抑制T47D细胞的 增殖的能力。测试MN1197、MN1238、MN1247、MN1265、MN1285、MN1203、MN1239、 MN1248、MN1266、MN1286、MN1231、MN1240、MN1249、MN1269、MN1269、MN1289、 MN1232、MN1241、MN1250、MN1270、MN1290、MN1237、MN1233、MN1242、MN1251、 MN1271、MN1291、MN1284、MN1234、MN1243、MN1262、MN1272、MN1288、MN1236、 MN1244、MN1263和MN1279。在治疗后96小时通过钙黄素活细胞测试染色细胞(图 136A1-136H6)。在钙黄素染色前拍摄明场照片(图137A1-137H6)。在图138A-138I中示出 了化合物MN1197、MN1238、MN1240、MN1246、MN1265、MN1270、MN1272和MN1280 对癌细胞增殖的抑制作用的扩大的明场照片。图示了活细胞的自动钙黄素测量，显示了化合 物在以6uM治疗后96小时对MUC1*阳性乳腺癌细胞的抑制作用。

[0217] 回想一下，我们以前已经表明，一些咔啉抑制配体NME1或$NME7_{AB}$与MUC1*生长因 子受体的胞外结构域的结合。我们使用的测定是金纳米粒子测定法，当靶向相互作用被破坏时仅给出读数，所以不能确定咔啉是否通过与配体、$NME7_{AB}$或MUC1*结合破坏MUC1*与 其配体的结合。在下一组实验中，我们在各种癌症亚型上测试了抗体和肽，试图预测哪些癌 症最受本发明化合物的影响。E6和C2是已显示竞争性抑制NME1和$NME7_{AB}$与MUC1*的 细胞外结构域结合的抗MUC1*单克隆抗体。已显示E6和C2两者的Fab在体外抑制所有 MUC1*阳性癌细胞的生长，并在体内抑制MUC1*乳腺癌和前列腺癌。此外，E6和C2单克 隆抗体已显示仅与癌变组织，而不是正常组织结合，例如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、 胰腺癌、结肠直肠癌、胃癌和肝癌(数千的人体组织标本检测)。重要的是，抗体E6和C2 以及NME1二聚体和$NME7_{AB}$都与N-10肽结合，N-10肽由MUC1*胞外结构域的近35个氨 基酸的膜序列组成。N-10肽，也结合于$NME7_{AB}$和NME7-X1，并抑制它们与其同源受体(包 括MUC1*胞外结构域)结合。

[0218] 图140A1-140E12显示了癌细胞迁移的照片，其中对抗MUC1*抗体Fab E6和C2以及截 短的MUC1*胞外结构域，N-10，测试其抑制癌细胞迁移或侵润的能力。测试的癌症亚型为CHL-1黑色素瘤($MUC1*^{+/}NME7^{+}/NME7\text{-}X1^{+}$)、A2058黑色素瘤 ($MUC1*^{+}/NME7_{AB}{}^{+}/NME7\text{-}X1^{++}$)、SK-OV-3卵巢癌($MUC1*^{+}/NME7^{+}/NME7\text{-}X1^{+}$)、A549 肺癌($MUC1*^{LO}$)、T47D乳腺癌($MUC1*^{+++}/NME7_{AB}{}^{+++}/NME7\text{-}X1^{+++}$)、DU145 ($MUC1*^{++}/NME7_{AB}{}^{+++}/NME7\text{-}X1^{+++}$)前列腺癌和PC-3($MUC1*^{-}/$

$NME7_{AB}^{+++}$/NME7-$X1^{+++}$) 前列腺癌细胞。可以看出，只有N-10肽抑制PC-3前列腺癌细胞的迁移，因为它们是MUC1* 阴性但对于$NME7_{AB}$和NME7-X1高度阳性，所以该肽将抑制它们的相互作用。E6和C2的 Fab以及N-10肽均抑制T47D乳腺癌细胞和DU146前列腺癌细胞的迁移，这两种细胞对于 MUC1*，$NME7_{AB}$和NME7-X1都是高度阳性的。Fabs和N-10肽抑制MUC1*阳性或NME7阳性的其他癌细胞系的迁移和增殖(图141A1-141E12)，并且抑制程度与癌细胞系表达的MUC1*或$NME7_{AB}$或NME7-X1的量成比例。

[0219] 随着癌症治疗变得更有针对性，目标是开发优先抑制癌细胞的多能性或增殖，同时对正 常健康的细胞具有最小的作用的治疗剂。没有“正常”细胞系，因为正常的终末分化细胞不 会像干细胞或癌细胞那样继续分裂。然而，成纤维细胞比干细胞更分化，但能够在限定的时 间段内自我复制。我们测试了选择的本发明化合物以确定这些化合物是否仅仅是细胞毒性的， 或者它们是否选择性地影响干细胞以及严重影响癌细胞。由于成纤维细胞不会改变形态，所 以该测定的读数仅仅是化合物对增殖的影响。在测试化合物以6uM分别加到生长中的人成纤 维细胞后48小时拍摄照片。对每个化合物针对其对成纤维细胞增殖的作用评分，其中“+” 表示25％抑制成纤维细胞生长，“++”为50％抑制生长以及“+++”为75％抑制生长。图 142A-142D显示了培养中的人成纤维细胞的照片，仅用0.2％DMSO处理作为对照。图 143A-143F显示了JQ1+(图143A-143C)的效果与非活性对映异构体JQ1-的效果的对比的照 片，两者均以500nM的最终浓度(图143D-143F)作用于人类幼稚状态干细胞(图143A、143D)、人类启动状态干细胞(图143B、143E)或人类成纤维细胞(图143C、143F)。可以看出，JQ1+对成纤维细胞具有与它们在启动状态干细胞上相同的效果，这表明它比不影响稍 后的成纤维祖细胞的化合物具有更多的副作用。图144A-153F-显示了本发明的化合物对幼稚 干细胞(图144A、D-153A、D)、启动状态干细胞(图144B、E-153B、E)或成纤维祖细胞(图144C、F-153C、F)的作用。图154A-154E显示了本发明的化合物对幼稚干细胞(图154A、D)、启动状态干细胞(图154B)或成纤维祖细胞(图154C、E)的作用。图155A-159D显 示了本发明的化合物对幼稚干细胞(图155A、C-159A、C)或成纤维祖细胞(图155B、D-159B、 D)的作用。图160A-160F显示了先前已知的癌细胞迁移抑制剂对本发明化合物对于人成纤 维细胞祖细胞生长的作用的照片。从图中可以看出，本发明的大多数新化合物对成纤维细胞 的生长几乎没有或没有作用。本发明化合物强有力地抑制干细胞和癌细胞多能性和增殖，但 对成纤维祖细胞具有很小或通常没有作用的事实显示这些化合物不是细胞毒试剂。相比之下， 其他先前报道的癌细胞迁移抑制剂对成纤维细胞祖细胞具有与它们在干细胞和癌细胞上相同 的效果，这表明它们可能对患者具有毒性副作用。

[0220] 实验表明，本发明的新化合物通过诱导成熟(也称为分化)来抑制干细胞和癌细胞的多 能性和/或增殖。图161是用本发明化合物处理的幼稚干细胞的RT-PCR测量图。测量其表达 的基因是E-钙调蛋白，随着细胞经历上皮向间质转变而升高，随着干细胞开始分化而增加的 纤连蛋白和波形蛋白以及NF1，其是当干细胞开始分化向神经系时增加的第一基因中的一个。 纤连蛋白、波形蛋白或NF1表达响应于用化合物处理而增加的事实表明该化合物诱导分化并 且终末分化细胞不自我复制。E-钙调蛋白则相反；它随着细胞癌变而增加。应注意的是，先 前已知的癌细胞迁移和增殖抑制剂JQ1+和SU11274不引起分化标志物的上调，即诱导干细 胞的分化。与其他化合物中的一些相比，活性降低的化合物MN1235也未能诱导分化。类似 地，本发明的新型化合物诱导癌细胞的分化。转移标记物E-钙调蛋白的表

达降低并且分化标 志物纤连蛋白,波形蛋白和NF1的表达增加(图162-图163)。

[0221] 本发明的新型化合物是高度特异性的。它们特异性地抑制干细胞和癌细胞的多能性和/或 增殖。本发明的新型化合物对抗MUC1*阳性和/或$NME7_{AB}$或NME7-X1阳性的癌症最有效。尽管我们发现NME1二聚体、$NME7_{AB}$和NME7-X1都是MUC1*生长因子受体的激活配体,并且它们与其胞外结构域结合,但我们已经开发了充足的证据,表明$NME7_{AB}$和NME7-X1 两者都具有其他结合伴侣并且能够发挥致癌作用,而无需MUC1*。

[0222] $NME7_{AB}$是使最早的幼稚干细胞生长的自然生长因子。单独使用$NME7_{AB}$对幼稚人类干 细胞的生长和多能性已足够。图164A-164B显示了用抗$NME7_{AB}$抗体#61染色的第3天(图164A)或第5天(图164B)的人胚胎照片,所述抗$NME7_{AB}$抗体#61与$NME7_{AB}$或NME7-X1 的B结构域的B3肽结合。可以看出,第3天的所有细胞对于$NME7_{AB}$都是阳性的,但是到 了第5天,当桑椹胚开始分化时,$NME7_{AB}$阳性细胞限于内细胞团的幼稚细胞。虽然$NME7_{AB}$在所有幼稚干细胞中均有表达,但据报道除睾丸外,在其他成年人组织均不表达。然而,我 们已经在我们检查的每一个转移癌中发现了它。我们已经显示,幼稚干细胞和癌细胞两者分 泌$NME7_{AB}$和NME7-X1。我们显示在干细胞和癌细胞两者中,$NME7_{AB}$和NME7-X1都与 MUC1*的胞外结构域结合,并通过MUC1*胞外结构域的配体诱导的二聚化激活多能性和生 长。图165A-165C显示了共免疫沉淀实验的蛋白质印迹的照片。将人诱导的多能干(iPS克 隆7)细胞或人胚胎干细胞(HES克隆3)裂解,用对照IgG抗体或Ab5进行免疫沉淀实验, 所述对照IgG抗体或Ab5结合MUC1的胞质尾区。然后用结合于NME7的抗体印记凝胶(图 165A)。箭头指向两个NME7反应种类,30kDa和33kDa,其通过Ab5,MUC1抗体而不是 对照抗体IgG下拉。仅将裂解产物装载到最右边的两个泳道,显示了全长NME7,42kDa在 裂解产物中但不结合于MUC1。图165B显示了重组体$NME7_{AB}$和NME7-X1的蛋白质印迹。 为了显示$NME7_{AB}$和NME7-X1结合于MUC1*而不是全长MUC1,剥落图165A的凝胶并用 结合于PSMGFR序列的抗MUC1*抗体再探测。图166A-166D显示了共免疫沉淀实验的蛋白 质印迹的照片。其是以上在图165中描述的相同的实验,但是在T47D癌细胞上进行。该实 验显示在癌细胞中$NME7_{AB}$和NME7-X1结合于MUC1*。

[0223] 我们在多种幼稚和启动人类干细胞系中并且也在两者MUC1*阳性癌细胞系和一种MUC1*阴性癌细胞系中测量$NME7_{AB}$和NME7-X1的表达。图167是在多种启动状态和幼稚 状态人类干细胞系中以及癌细胞系DU145、T47D和PC3中的$NME7_{AB}$和NME7-X1的RT-PCR 测量图。将该测量标准化至在FGF中在MEF上生长的启动状态的人类干细胞。该图显示了 相比较干细胞,癌细胞表达2-4倍多的$NME7_{AB}$和5-10倍多的NME7-X1。我们也在一组癌 细胞系上进行了RT-PCR,以测量标准化至启动状态干细胞的$NME7_{AB}$和NME7-X1(图168)。 但是,干细胞已经表达了大量的$NME7_{AB}$,因为它为仅需的生长因子。因此,我们还分析了 PCR数据,以便在图168中,$NME7_{AB}$和NME7-X1的表达以EEF1A1的百分比给出,EEF1A1 是常用于跨多个细胞系的基因表达比较的管家基因。

[0224] 评估MUC1*、$NME7_{AB}$和NME7-X1表达的另一种方法是通过蛋白质印迹。图170A-170C显示各种癌细胞系的蛋白质印迹。图170A显示探测全长MUC1的表达的癌细胞系的蛋白质印迹,其中探测抗体是抗串联重复抗体VU4H5。图170B显示探测切割的MUC1、MUC1*表 达的癌细胞系的蛋白质印迹,其中探测抗体是结合于MUC1*胞外结构域的PSMGFR序列的 抗体。MUC1*阳性细胞系包括乳腺癌细胞系T47D、前列腺癌细胞系DU145、乳腺癌细胞系 BT-474、黑素瘤细胞系CHL-1、黑素瘤细胞系A2058和胰腺细胞系CAPAN-2。然而,BT-474、 CHL-1、

A2058中的MUC1*的表达通过PCR和根据文献为MUC1阳性,但是表达非常低并 且在该印迹中不可见。通过PCR和根据文献,前列腺癌细胞系PC-3和胰腺癌细胞系PANC-1 都是MUC1阴性的。图170C显示探测NME7表达的癌细胞系的蛋白质印迹,其中探测抗体 是结合于$NME7_{AB}$或NME7-X1的序列的多克隆抗体。图171A-171C显示了各种癌细胞系的 蛋白质印迹,所述各种癌细胞系用我们的抗体#61或可商业获得的抗体探测。图171A显示了 用我们的抗NME7抗体探测的癌细胞系的蛋白质印迹,其中抗NME7抗体结合于B3肽。图 171B-171C显示了分别用商业获得的抗NME7抗体B9和H278探测的癌细胞系的蛋白质印迹。 可以看出,抗体#61结合于NME7AB和NME7-X1(33kDa和30kDa)但是不结合于17kDa 和21kDa的相关蛋白NME1和NME2。在所有细胞中表达NME1和NME2。相反,B9仅识 别全长NME7 42kDa以及H278识别低分子量的NME1和NME2。

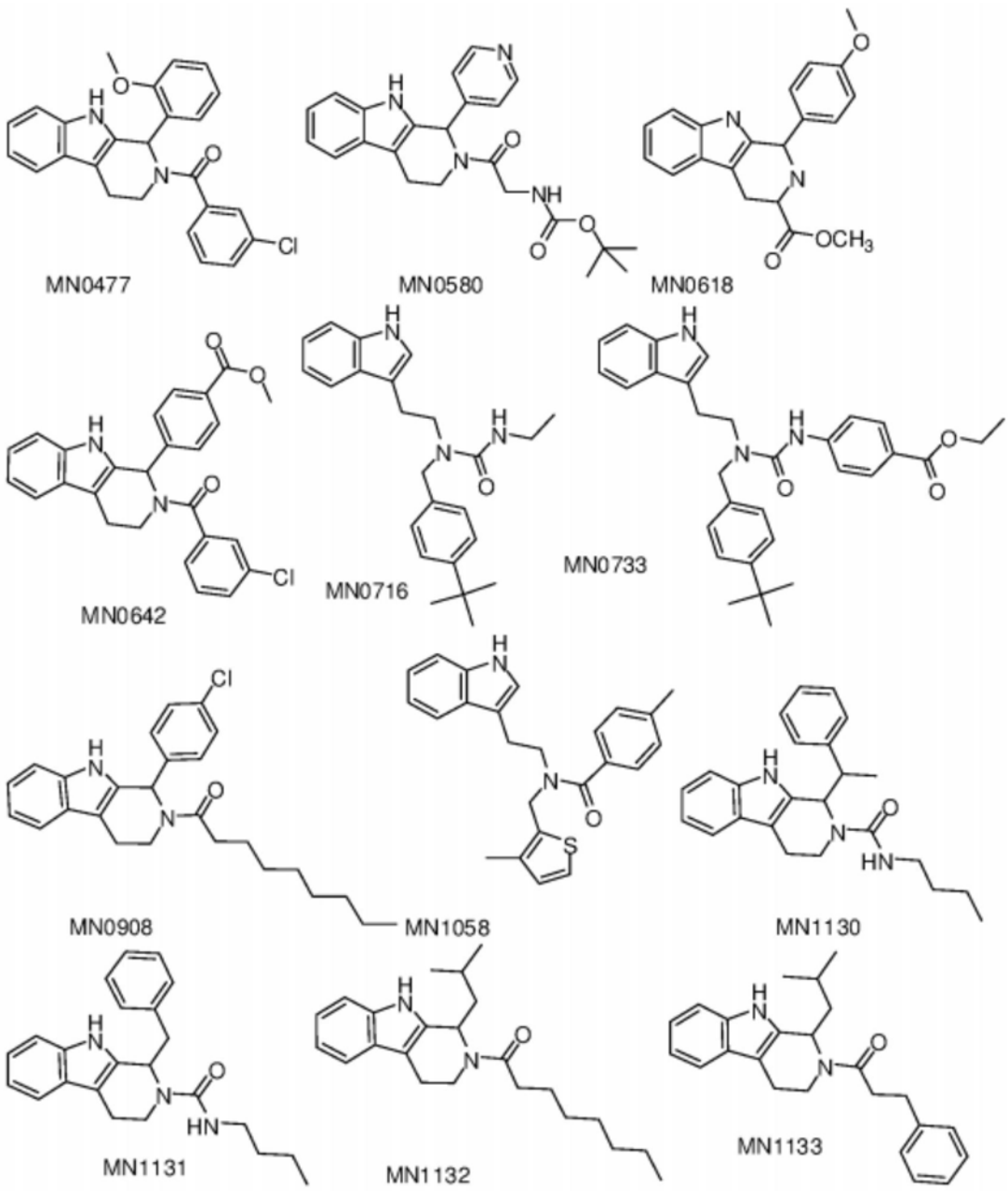
[0225] 也探测人体组织种类以确定MUC1*和$NME7_{AB}$或NME7-X1表达在来自多个患者的肿瘤中的程度。包含来自一个阵列中不同患者的大约300-400个肿瘤的癌阵列用结合于PSMGFR肽的多克隆抗MUC1*抗体或结合于N-10肽的单克隆抗体C2染色。大约90%的乳腺癌被多 克隆抗体染色,C2单克隆抗体染色85%的三阴性乳腺癌,83%的卵巢癌,78%的胰腺癌和71%的肺癌。图172A-172C显示了人体癌组织标本的照片,所述人体癌组织标本用结合于MUC1*胞外结构域的N-10肽的MNC2抗MUC1*单克隆抗体染色。显示的是乳腺癌(图172A)、肺 癌(图172B)和胰腺癌(图172C)。C2抗体不与正常组织结合。与$NME7_{AB}$和NME7-X1 的B结构域的B3肽结合的抗$NME7_{AB}$抗体选择性地结合至癌组织,其中其表达随转移状态 显著增加。图173A-173L显示了人体肺组织标本的照片,所述人体肺组织标本用结合于NME7 的B结构域的B3肽的抗体#61抗$NME7_{AB}$多克隆抗体染色。显示的是正常肺(图173A-173D)、2期肺癌(图173E-173H)和3期转移性肺癌(图173I-173L)。可以看出,抗体61不结合于 正常组织,但仅结合于癌组织并随转移状态增加而染色增加。

[0226] 本发明的新型化合物为治疗或预防癌症和转移性癌症的有力试剂。本发明的新型化合物 对MUC1*阳性和/或$NME7_{AB}$或NME7-X1阳性的癌症的治疗最为有效。在本发明的一个方面, 检测来自患者的生物样品中MUC1*、$NME7_{AB}$或NME7-X1的存在,并且在发现患者的癌症对MUC1*、$NME7_{AB}$或NME7-X1呈阳性时,以适于预防或治疗癌症的量对患者给予本发明 的化合物。在一种情况下,对患者样品进行测试,如PCR,以确定编码MUC1、NME7或 NME7-X1的核酸的量。在本发明的一个方面,如果那些基因的表达与在人多能干细胞中的表 达相当或更高,则认为患者的癌症为MUC1*阳性、$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性。在本发 明的另一方面,如果那些基因的表达等于或大于那些细胞中EEF1A1表达的0.5%,则认为患 者的癌症是MUC1*阳性、$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性。在本发明的又一方面,如果患者 的组织标本与结合于PSMGFR肽或N-10肽的抗体接触并且对组织染色用病理学家的标准评 分1-4(“+-++++”),则认为患者的癌症是MUC1*阳性。在本发明的另一方面,如果患者 的组织标本与结合于NME7的B3肽的抗体接触并且对组织染色用病理学家的标准评分1-4 (“+-++++”),则认为患者的癌症是$NME7_{AB}$阳性或NME7-X1阳性。

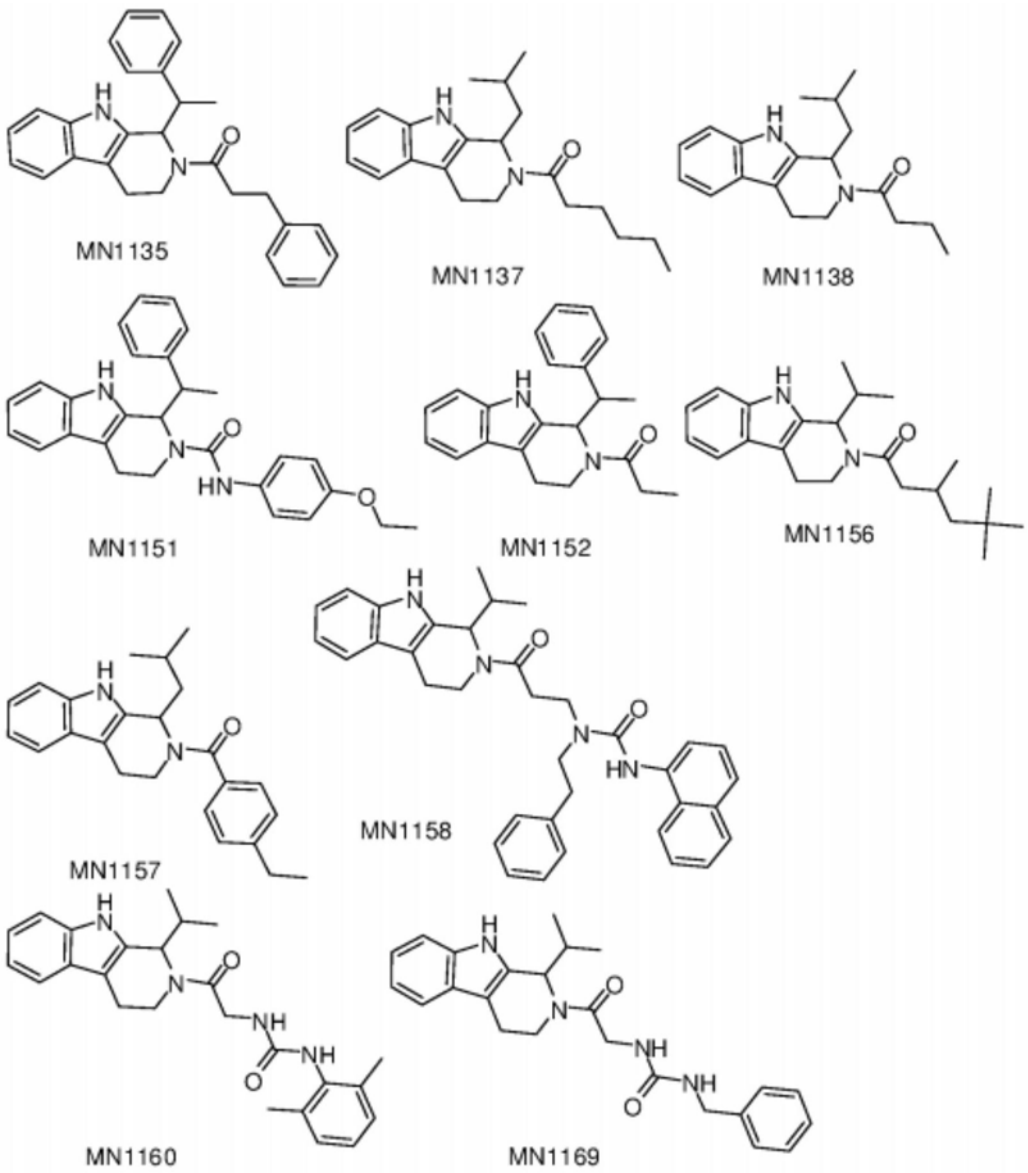
[0227] 化合物

[0228] 下面示出的是用于治疗或预防癌症的示例性化合物。以下的示例性化合物也在图18至 27中示出。

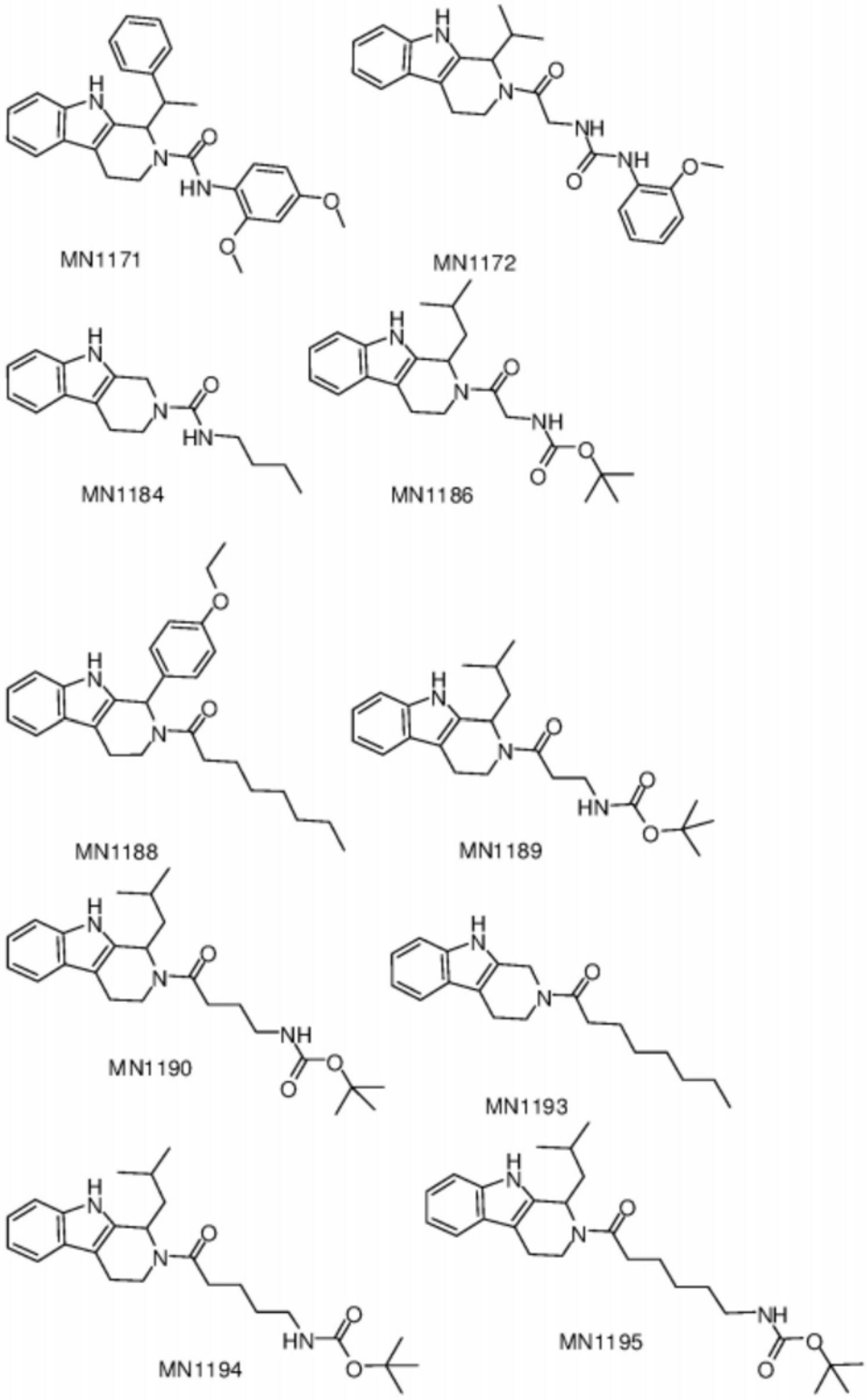
[0229]


MN0477
MN0580
MN0618
MN0642
MN0716
MN0733
MN0908
MN1058
MN1130
MN1131
MN1132
MN1133

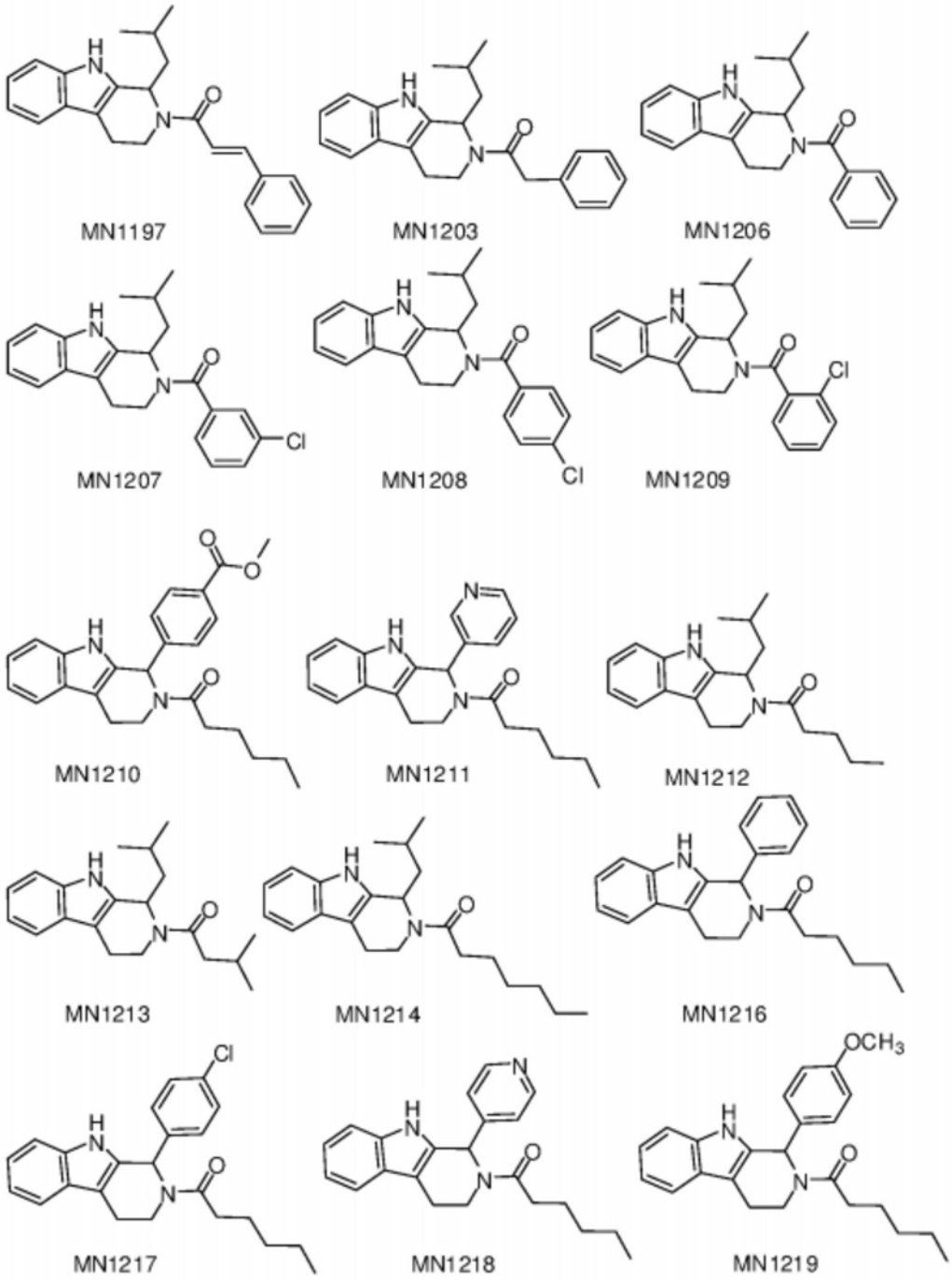
[0230]


MN1135
MN1137
MN1138
MN1151
MN1152
MN1156
MN1157
MN1158
MN1160
MN1169

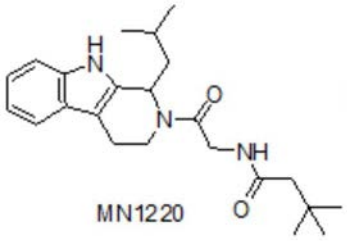
[0231]


MN1171
MN1172
MN1184
MN1186
MN1188
MN1189
MN1190
MN1193
MN1194
MN1195

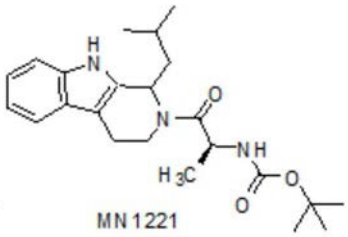
[0232]


MN1197
MN1203
MN1206
MN1207
MN1208
MN1209
MN1210
MN1211
MN1212
MN1213
MN1214
MN1216
MN1217
MN1218
MN1219

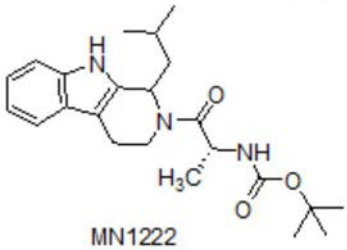
[0233]



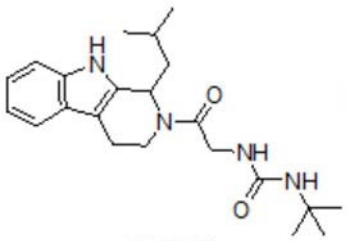
MN1220



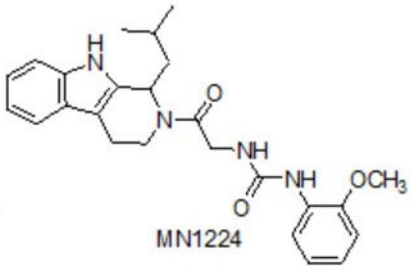
MN1221



MN1222

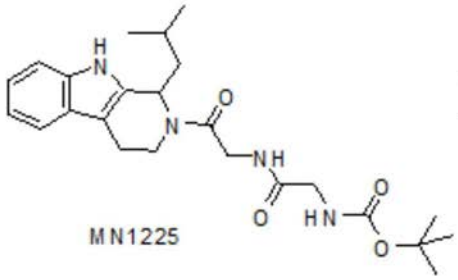


MN1223

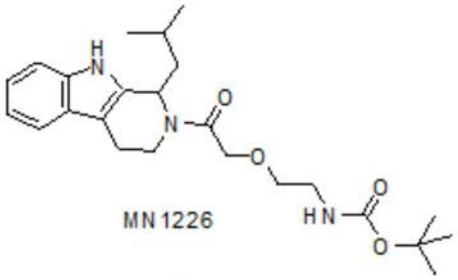


MN1224

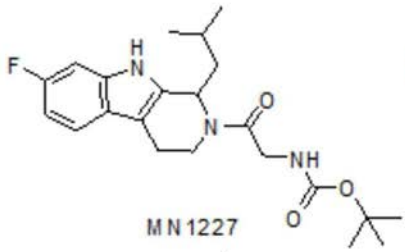
[0234]



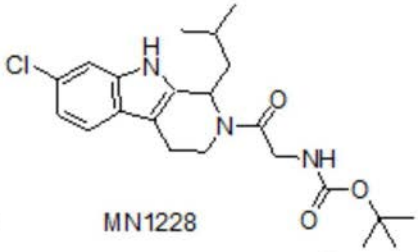
MN1225



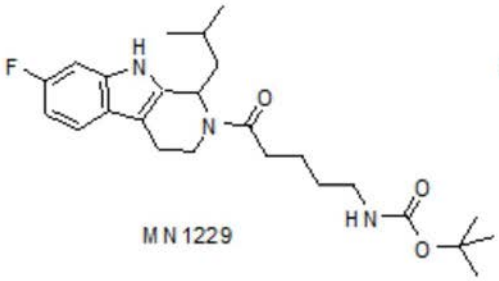
MN1226



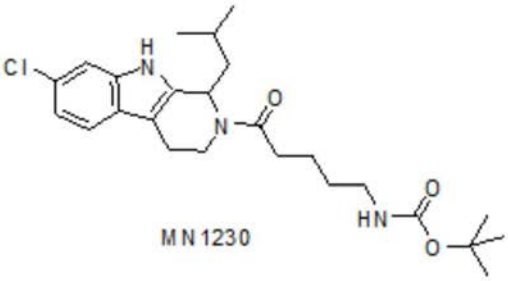
MN1227



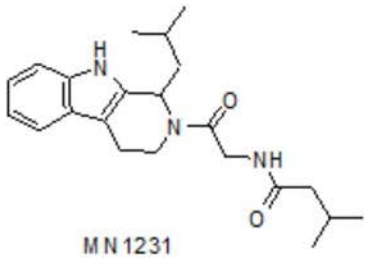
MN1228



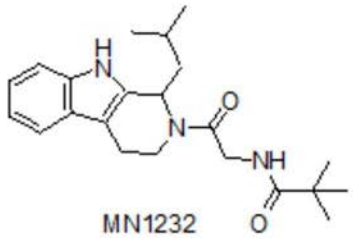
MN1229



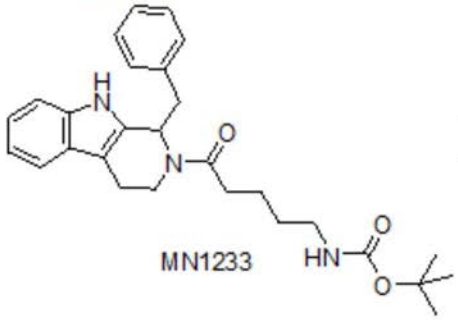
MN1230



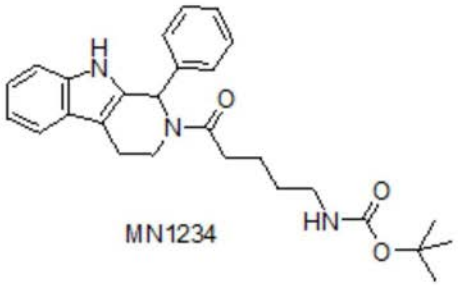
MN1231



MN1232

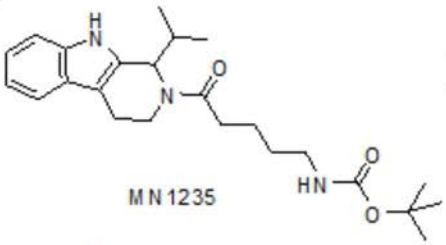


MN1233

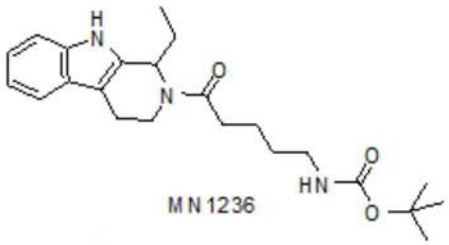


MN1234

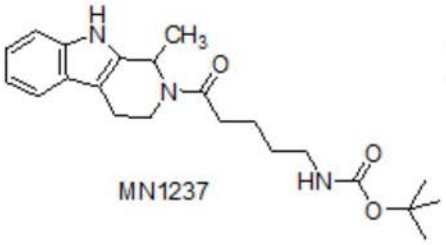
[0235]



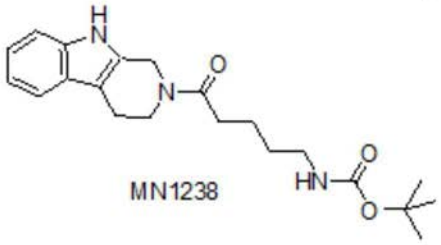
MN1235



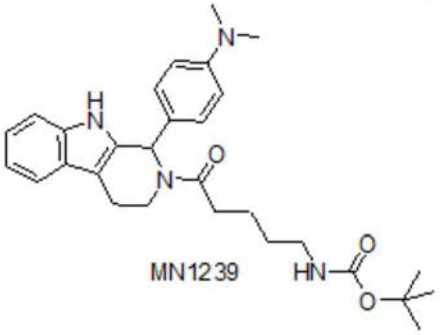
MN1236



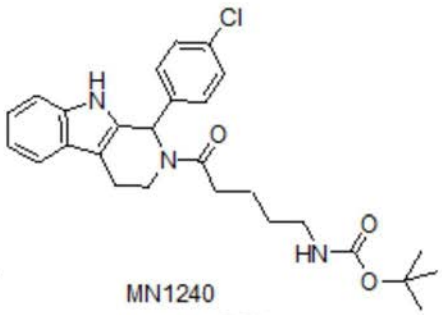
MN1237



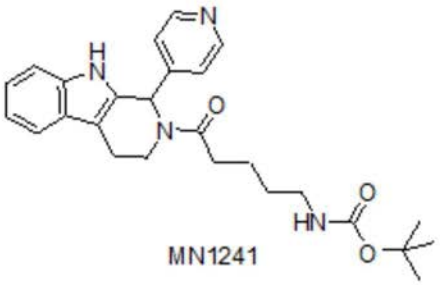
MN1238



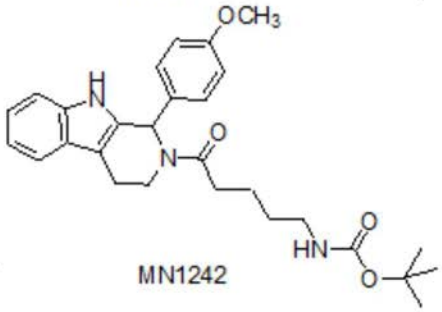
MN1239



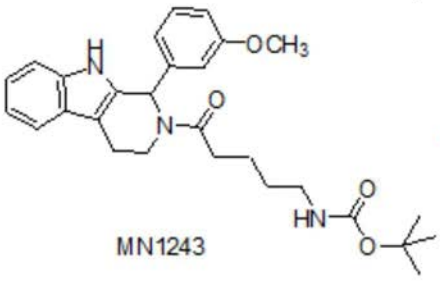
MN1240



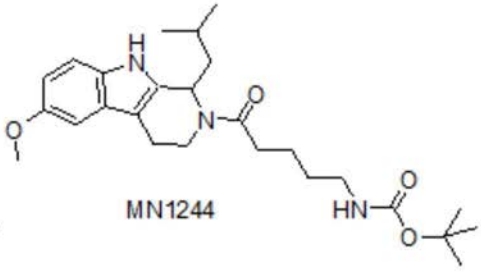
MN1241



MN1242

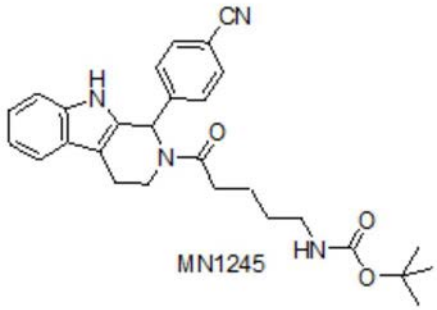


MN1243

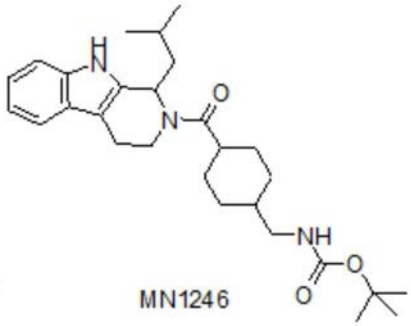


MN1244

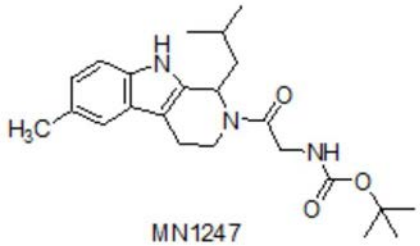
[0236]



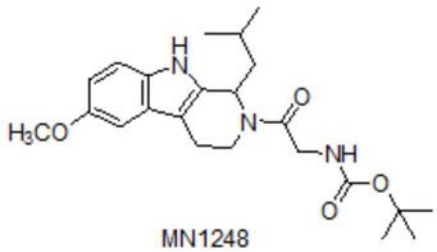
MN1245



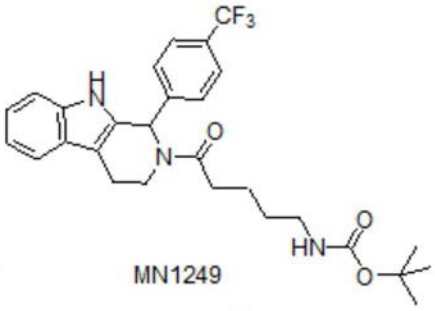
MN1246



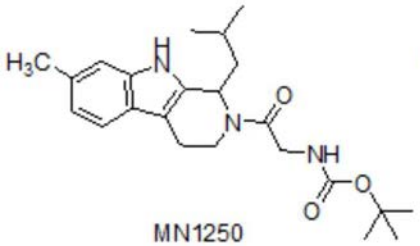
MN1247



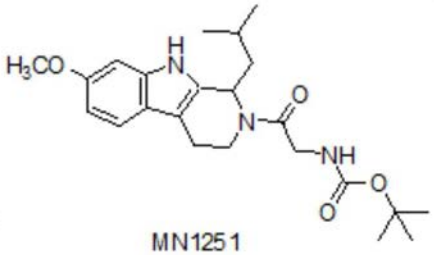
MN1248



MN1249

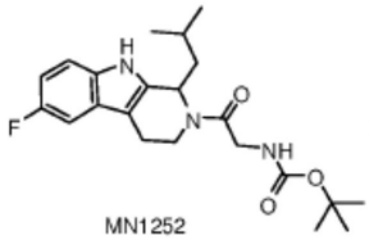


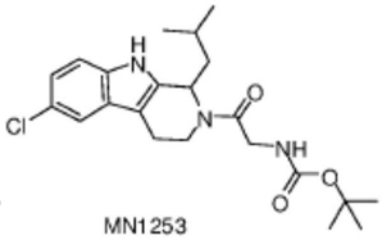
MN1250

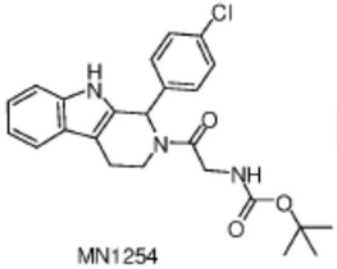


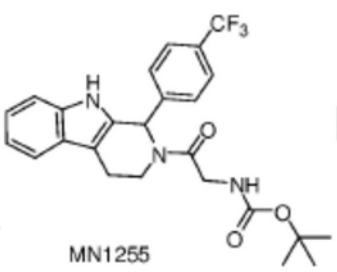
MN1251

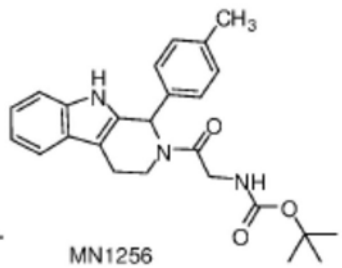
[0237]

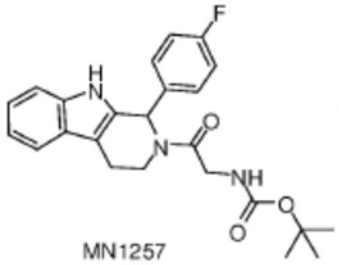

MN1252

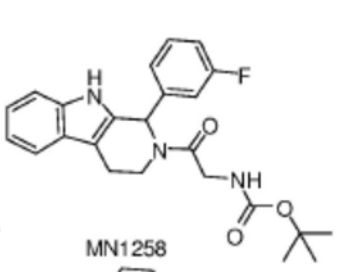

MN1253

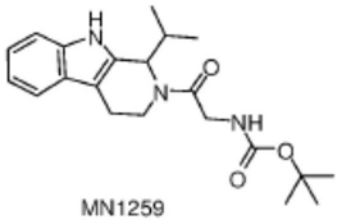

MN1254

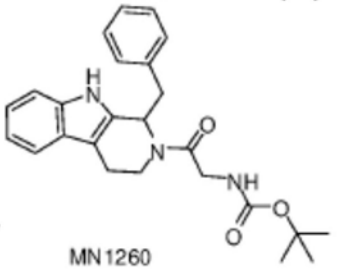

MN1255

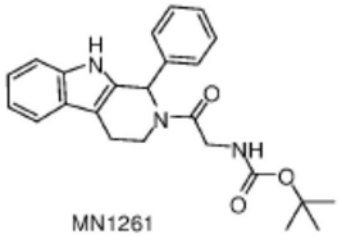

MN1256

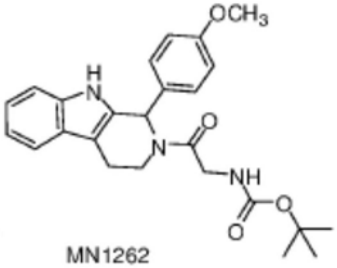

MN1257


MN1258

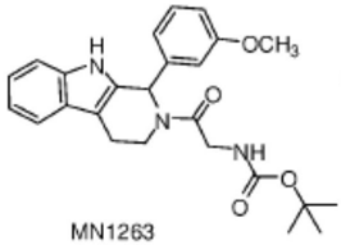

MN1259


MN1260

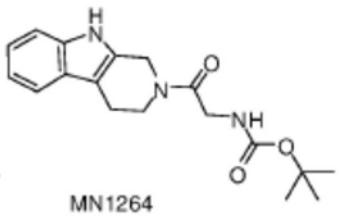

MN1261


MN1262

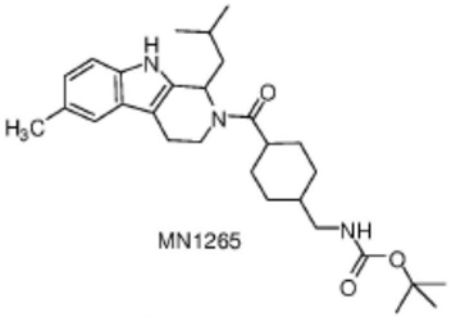
[0238]



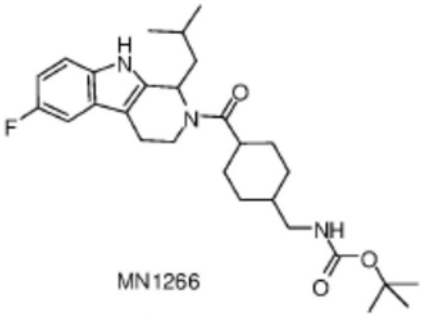
MN1263



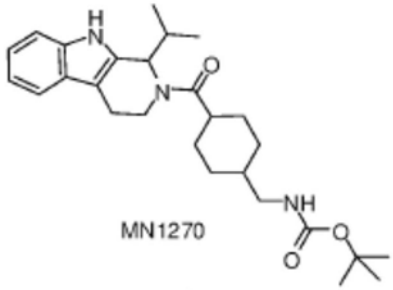
MN1264



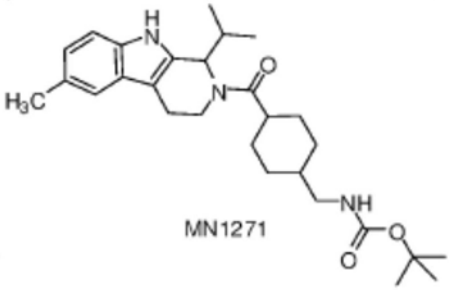
MN1265



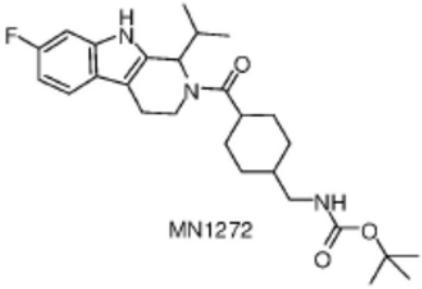
MN1266



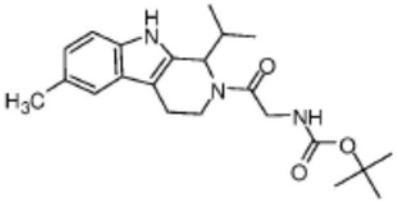
MN1270



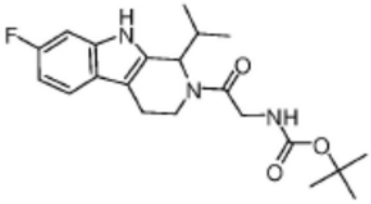
MN1271



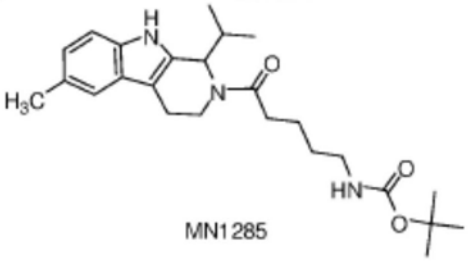
MN1272



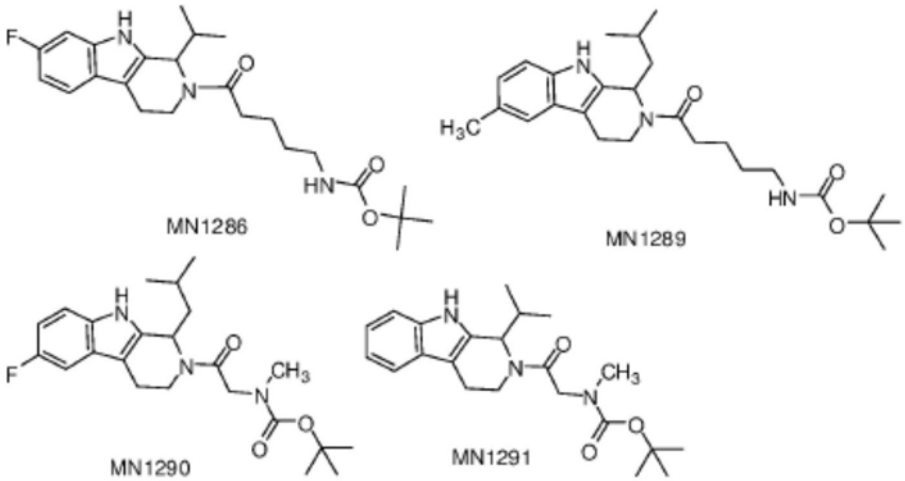
MN1279



MN1280



MN1285

[0239] 

[0240] 本文描述的是用于治疗或预防癌症的化合物。在本文描述的化合物的内容中，应用了如 下定义：

[0241] 在本说明书的内容中，除非另有说明，“烷基”取代基团或在取代基团中的烷基取代部 分可以是直链或支链的，或者可以是或包括一个或多个环烷基基团。适合的烷基基团包括但 不限于C1-C9烷基基团、C1-C6烷基基团、C1-C4烷基基团以及C1-C3烷基基团。烷基基团 /部分的实例包括如以下示例的甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正 戊基、2,4,4-三甲基戊基、2-甲基环戊基、环戊基甲基和环烷基/部分。除非另有说明，所有的 烷基可以是取代或未取代的。

[0242] “烷基”指不包含杂原子的烷基基团。因此该短语包括直链烷基基团诸如甲基、乙基、 丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基等。该短语也包 括直链烷基基团的支链同分异构体，包括但不限于，以举例方式提供的以下：-CH(CH$_3$)$_2$、 -H(CH$_3$)(CH$_2$CH$_3$)、-CH(CH$_2$CH$_3$)$_2$、-C(CH$_3$)$_3$、-C(CH$_2$CH$_3$)$_3$、-CH$_2$CH(CH$_3$)$_2$，、 CH$_2$CH(CH$_3$)(CH$_2$CH$_3$)、-CH$_2$CH(CH$_2$CH$_3$)$_2$、-CH$_2$C(CH$_3$)$_3$、-CH$_2$C(CH$_2$CH$_3$)$_3$、-CH(CH$_3$)、 -CH(CH$_3$)(CH$_2$CH$_3$)、-CH$_2$CH$_2$CH(CH$_3$)$_2$、-CH$_2$CH$_2$CH(CH$_3$)(CH$_2$CH$_3$)、-CH$_2$CH$_2$CH(CH$_2$CH$_3$)$_2$、 -CH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)$_3$、-CH$_2$CH$_2$C(CH$_2$CH$_3$)$_3$、-CH(CH$_3$)CH$_2$-CH(CH$_3$)$_2$、-CH(CH$_3$)CH(CH$_3$)CH(CH$_3$)$_2$、 -CH(CH$_2$CH$_3$)CH(CH$_3$)CH(CH$_3$)(CH$_2$CH$_3$)以及其他。

[0243] “卤素”或“卤代”指氯、溴、氟及碘基团。术语“卤代烷基”指一个或多个卤素原子取代的烷基自由基。术语“卤代烷氧基”指一个或多个卤素原子取代的烷氧基自由基。

[0244] “卤代烷基”取代基或取代基中的卤代烷基部分指烷基基团或部分其中一个或多个，例 如一个、两个、三个、四个或五个氢原子分别被卤素原子，即，被氟、氯、溴或碘原子代替。 适合的卤代烷基基团包括但不限于卤素(C1-C3)烷基和卤素(C1-C)烷基。卤代烷基基团/部分的 实例包括氟甲基、二氟甲基、三氟甲基以及2,2,2-三氟乙基。

[0245] “环烷基”取代基或取代基中的环烷基部分指饱和的碳氢环，包括，例如，3-8个碳原子， 其实例包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。除非另有说明，环烷基取代基或部分可以包 括单环、双环(例如稠合或螺环)以及多环的碳氢环。“环烷基”取代基或取代基中的环烷 基部分包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

[0246] “杂烷基”取代基或取代基中的杂烷基部分指烷基基团或部分，其中有1-4个仲碳或叔 碳原子，包括通过其该基团或部分连接于该分子的其余部分的任何仲碳或叔碳原子，在仲碳 原子的情况下独立地由选自氮、氧和硫的杂原子取代，在叔碳原子的情况下由氮取

代。杂烷 基/部分的实例包括如以下示例的甲氧基、甲氨基、甲硫基、乙氧基、乙氨基、二甲氨基、乙 硫基、丙氧基、甲氧基乙基、丙氨基、甲基乙氨基、丙硫基、甲硫基乙基、四氢吡喃基氧基、N-甲基吡咯烷基和杂环烷基/部分。

[0247] “杂环烷基”取代基或取代基中的杂环烷基部分是指环烷基或部分，其中1-4个仲碳原 子或叔碳原子，包括通过其连接到分子的其余部分的任何仲或叔碳原子，在仲碳原子的情况 下，由选自氮、氧和硫的杂原子独立地取代，或者在叔碳原子的情况下由氮取代。杂环烷基/ 部分的实例包括四氢呋喃基、吡咯烷基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、哌啶基、哌嗪基、吗啉 基和硫代吗啉基。

[0248] “烯基”取代基或取代基中的烯基部分是指具有一个或多个碳-碳双键的不饱和烃基或部 分。合适的“烯基”包括但不限于C1-C9烯基、C1-C6烯基、C1-C4烯基和C1-C3烯基。烯基/部分的实例包括如以下示例的乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、1-戊烯基、1-己烯基、 1,3-丁二烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1,4-己二烯基和环烯基/部分。

[0249] “环烯基”取代基或取代基中的环烯基部分是指具有一个或多个碳-碳双键且含有例如3 至8个碳原子的不饱和烃基环，其实例包括环戊-1-烯-1-基、环己-1-烯-1-基和环己-1,3-二烯-1- 基。除非另有说明，环烯基取代基或部分可以包括单环、双环(例如稠合或螺环)和多环烃 基环。

[0250] “杂烯基”取代基或取代基中的杂烯基部分是指烯基或部分，其中1-4个仲碳或叔碳原 子，包括通过其任何连接到分子的其余部分的仲碳或叔碳原子，在仲碳原子的情况下，由选 自氮、氧和硫的杂原子独立地取代，或者在叔碳原子的情况下被氮取代。杂烯基/部分的实例 包括如以下示例的乙烯氧基、乙烯氨基、乙烯硫基、乙烯氧基乙基和杂环烯基/部分。

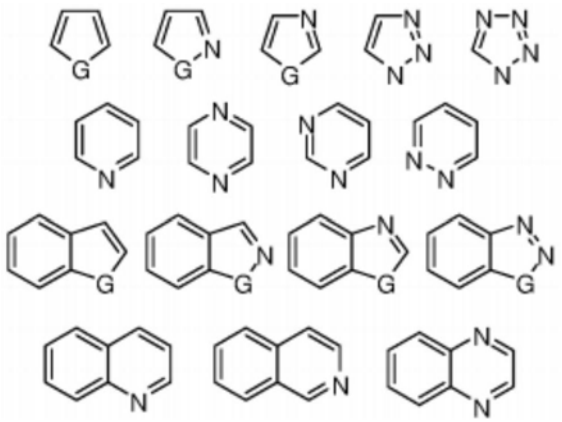
[0251] 取代基中的“杂环烯基”取代基或杂环烯基部分是指环烯基或部分，其中1-4个仲或叔 碳原子，包括任何仲或叔碳原子，所述基团或部分通过所述仲碳或叔碳原子连接到分子的其 余部分，在仲碳原子的情况下，由选自氮、氧和硫的杂原子独立地取代，或者在叔碳原子的 情况下被氮取代。杂环烯基/部分的实例包括二氢吡喃基和二氢呋喃基。

[0252] “炔基”取代基或取代基中的炔基部分是指具有一个或多个碳-碳三键的不饱和烷基或部 分。炔基/部分的实例包括乙炔基、炔丙基、丁-1-炔基和丁-2-炔基。

[0253] “杂炔基”取代基或取代基中的杂炔基部分是指炔基或部分，其中1-4个仲碳或叔碳原 子，包括通过其连接到分子的其余部分的任何仲或叔碳原子，在仲碳原子的情况下，由选自 氮、氧和硫的杂原子独立地取代，或者在叔碳原子的情况下被氮取代。杂炔基/部分的实例包 括乙炔氧基和炔丙氨基。

[0254] “芳基”取代基或取代基中的芳基部分包括单环芳烃和多环稠环芳烃。芳基/部分的实例 包括苯基、萘基、蒽基和菲基。

[0255] “杂芳基”取代基或取代基中的杂芳基部分包括单环芳基和多环稠环芳基，其中1至4 个环原子独立地选自氮、氧和硫，环的其余部分原子是碳。杂芳基/部分的实例包括以下：

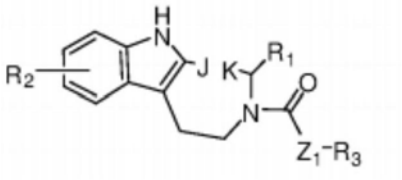
[0256] 

[0257] 为了本发明的目的，当部分的组合被称为一个基团，例如芳基烷基、芳基烯基、芳基炔 基、烷基芳基、烯基芳基或炔基芳基时，最后提到的部分含有该基团连接到分子的其余部分 的原子。芳基烷基的一个例子是苄基。环烷基烷基的一个例子是环丙基甲基。

[0258] 当关于被称为一个基团例如“杂(芳基烷基)”的部分的组合使用前缀“杂”时，组合中的任何或所有部分可以是杂部分。因此，术语“杂(芳基烷基)”涵盖杂芳基-烷基、芳基 -杂烷基和杂芳基-杂烷基。杂(芳基烷基)基团/部分的实例包括吡啶基甲基、苯氧基、N-苯胺基和吡啶基氧基乙基。

[0259] 当提到基团可以被取代时，该基团可以由例如一个或多个独立地选自卤素、三氟甲基、 甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H所取代。

[0260] 在一个方面，本发明公开了式1的化合物：

[0261] 

(1)

[0262] 在式1中，J和K均为氢，或者J和K一起形成产生六元环的键，或者J和K一起代表 产生七元环的-CH_2-。

[0263] R1为H，任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环 原子；任选取代的C7-C15芳基烷基，诸如但不限于苄基或α-甲基苄基；任选取代的C2-C15 杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选 取代的C3-C8环烷基；或者任选取代的C4-C8环烷基烷基。

[0264] R2为H、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基，任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、 -C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0265] Z1是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH_3)-、-$(CH_2)_n$-、-C3-C7环烷基-CH_2-、-CH=CH-、-CO-、 -SO-、-SO_2-、-C(=NH)-、-CH_2NH(CO)-、-CH_2NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-；-$(CH_2)_n$NH(CO)-、 -$(CH_2)_n$NH(CO)O-、-$(CH_2)_m$NH(CO)NH-；-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)-、-C3-C7环烷基 -CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)NH-、-$(CH_2)_n$N($CH_2CH_2C_6H_5$)或任选取代的芳基。

[0266] R3为H、任选取代的C1-C9烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C6-C12芳基；

任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15 芳基烷基，诸如但不限于苄基或α-甲基苄基；任选取代的C3-C7环烷基；-$(CH_2)_P$-NH(CO)O-(C1-C6烷基)；-$CH_2O(CH_2)_P$-NH(CO)O-(C1-C6)烷基；-$(CH_2)_P$-NHCO-$(CH_2)_P$-NH(CO)O-C1-C6烷基)；-NH(CO)O-叔丁基；-O-叔丁基或-叔丁基；CONH-芳基。

[0267] m＝1-5；n＝1-8；p＝1-9；

[0268] 其中“取代的”意味着用独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(＝NH)NH_2或-SO_3H的一个或多个来取代。

[0269] 在一个实施例中，J和K可以均为氢；或者J和K一起可以形成产生六元环的键。

[0270] 在一个实施例中，R1可以是H、甲基、乙基、异丙基、异丁基、苯基、卤素取代的苯基、甲基羧基、甲氧基、甲基、叔丁基；杂芳基、吡啶基、取代的杂环(诸如噻吩基)；苄基或α- 甲基苄基。

[0271] 在一个实施例中，R2可以是H、卤素、甲基或甲氧基。

[0272] 在一个实施例中，Z1可以是键、-NH-、-CH_2-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、-CH＝CH-、取代的苯 基、-CH_2NH(CO)O-、-$(CH_2)_2$NH(CO)O-、-$(CH_2)_3$NH(CO)O-、-$(CH_2)_4$NH(CO)O-、 -$(CH_2)_5$NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)-、-CH(CH_3)NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-、 -CH_2NH(CO)CH_2NH(CO)O-、-$CH_2O(CH_2)_2$NH(CO)O-或-环己基-CH_2NH(CO)O-。

[0273] 在一个实施例中，R3可以是乙基、丁基、异丁基、戊基、2,4,4-三甲基戊基、庚基、辛基、苯基或甲基、乙基、卤素、乙氧基或甲氧基取代的苯基。

[0274] 在一个实施例中，J和K一起可以形成产生六元环的键、R1为异丁基、以及R3为 -NH(CO)O-叔丁基、R2可以是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、 C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、 -C(＝NH)NH_2或-SO_3H。

[0275] 在另一个实施例中，J和K一起可以形成产生六元环的键，R1为异丁基、Z1为环己基甲 基、R3为-NH(CO)O-叔丁基、R2可以是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧 基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(＝NH)NH_2或-SO_3H。

[0276] 在一个实施例中，J和K一起可以形成产生六元环的键，R1为异丁基，Z1为由1-5个亚 甲基单位组成的烷基链、R3为-NH(CO)O-叔丁基或-NH(CO)CH_2-异丙基、R2可以是氢、卤素、 三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、 -NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(＝NH)NH_2或-SO_3H。

[0277] 在一个实施例中，J和K一起可以形成产生六元环的键，R1为异丁基，Z1为由-CH_2-、-NHCO-或-O-的组合组成的4-9个键长的链，R3为-NH(CO)O-叔丁基，以及R2可以是氢、 卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、 -SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(＝NH)NH_2或-SO_3H。

[0278] 在一个实施例中，J和K一起可以形成产生六元环的键，R1为乙基、异丁基、异丙基、苄基，Z1为由-CH_2-组成的4-9个键长的链，R3为-NH(CO)O-叔丁基、R2可以是氢、卤素、 三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、 -NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(＝NH)NH_2或-SO_3H。

[0279] 在一个实施例中，J和K一起可以形成产生六元环的键，Z1为-$(CH_2)_{4-9}$，R3为-NH(CO)O- 叔丁基，R2可以是氢，R1可以是由氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H取代的苯环。

[0280] 在一个实施例中，J和K一起可以形成产生六元环的键，Z1为环己基甲基或C3-C7环烷 基-CH2-，R3为-NH(CO)O-叔丁基，R1为异丁基，R2为卤素、甲基或甲氧基。

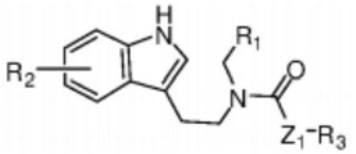
[0281] 在一个实施例中，J和K均为氢，R1为叔丁基苯基，R2为氢，Z1为-CONH-或-CO-以及R3为乙基、乙基羧基苯基或甲基苯基。

[0282] 在一个实施例中，J和K均为氢，R1为甲基噻吩基，R2为氢，Z1为-NH-或键以及R3 为乙基、乙基羧基苯基或甲基苯基。

[0283] 在一个实施例中，J和K均为氢，R1为甲基噻吩基或叔丁基苯基，Z1为-NH-或键以及R3为乙基、乙基羧基苯基或甲基苯基，以及R2可以为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙 基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、 -CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0284] 在另一个实施例中，J和K均为氢，R1为甲基噻吩基或叔丁基苯基，Z1为-NH-或键，R2可以为氢或卤素以及R3为取代的苯基，其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、 -N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2、或-SO_3H的一个或多个取代。

[0285] 在一个方面，本发明公开了式2的化合物：

[0286] 

[0287] R1可以为H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O 的环原子；任选取代的C7-C15芳基烷基，诸如但不限于苄基或α-甲基苄基；任选取代的 C2-C15杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯 基；任选取代的未取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

[0288] R2可以为H、C1-C6烷氧基，诸如但不限于甲氧基或乙氧基；三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H；

[0289] Z1可以为键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH_3)-、-$(CH_2)_n$-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO_2-、

[0290] -C(=NH)-、-CH_2NH(CO)-、-CH_2NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-；-$(CH_2)_n$NH(CO)-、 -$(CH_2)_n$NH(CO)O-、-$(CH_2)_m$NH(CO)NH-；-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)-、-C3-C7环烷基 -CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)NH-、-$(CH_2)_n$N($CH_2CH_2C_6H_5$)-、任选取代的C6-C12 芳基；

[0291] R3可以为H、任选取代的C1-C9烷基；C2-C6烯基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的萘基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代 的C7-C15芳基烷基，诸如但不限于苄基或α-甲基苄基；任选取代的C3-C7环烷基；-$(CH_2)_P$-NH(CO)O-(C1-C6烷基)；-$CH_2O(CH_2)_P$-NH(CO)O-(C1-C6)烷基；-$(CH_2)_P$-NHCO-$(CH_2)_P$-NH(CO)O-C1-

C6烷基);-NH(CO)O-叔丁基;-O-叔丁基;-叔丁基; -CONH-芳基;

[0292] m＝1-5;n＝1-8;p＝1-9;

[0293] 其中“取代的”意味着由选独立自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(＝NH)NH_2或-SO_3H的一个或多个取代。

[0294] 在一个实施例中,R1可以是取代的苯基或取代的杂环(诸如噻吩基)。

[0295] 在一个实施例中,R2可以是H。

[0296] 在一个实施例中,Z1为键、-NH-或取代的苯基。

[0297] 在一个实施例中,R3可以为乙基、苯基、取代的苯基或取代的杂芳基。

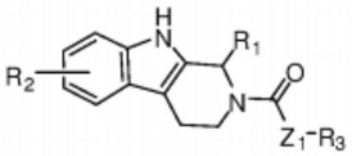
[0298] 在一个实施例中,R1为叔丁基苯基,R2为氢、Z1为-NH-或键,以及R3为乙基、乙基羧基苯基或甲基苯基。

[0299] 在另一个实施例中,R1为甲基噻吩基,R2为氢,Z1为-NH-或键,以及R3为乙基、乙基羧基苯基或甲基苯基。

[0300] 在另一个实施例中,R1为甲基噻吩基或叔丁基苯基,Z1为-NH-键,以及R3为乙基、乙 基羧基苯基或甲基苯基,以及R2可以为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(＝NH)NH_2或-SO_3H。

[0301] 在另一个实施例中,R1为甲基噻吩基或叔丁基苯基,Z1为-NH-或键,R2可以为氢或卤 素,以及R3为取代的苯基,其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、 -CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(＝NH)NH_2或-SO_3H的一个或多个取代。

[0302] 在一个方面,本发明公开了式3的化合物:

[0303] 

[0304] R1为H、任选取代的C1-C6烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;任选取代的C1-C9杂芳基,具有1-4个独立选自N、S和O的环 原子;任选取代的C7-C15芳基烷基,诸如但不限于苄基或α-甲基苄基;任选取代的C2-C15 杂芳基烷基,具有1-4个独立选自N、S和O的环原子;任选取代的C7-C15芳基烯基;任选 取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

[0305] R2为H,C1-C6烷氧基,诸如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(＝NH)NH_2或-SO_3H;

[0306] Z1为键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH_3)-、-$(CH_2)_n$-、-C3-C7环烷基-CH_2-、-CH＝CH-、-CO-、 -SO-、-SO_2-或-C(＝NH)-、-CH_2NH(CO)-、-CH_2NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-;-$(CH_2)_n$NH(CO)-、 -$(CH_2)_n$NH(CO)O-、-$(CH_2)_m$NH(CO)NH-;-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)-、-C3-C7环烷基 -CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)NH-、-$(CH_2)_n$N($CH_2CH_2C_6H_5$)-或任选取代的 C6-C12芳基;

[0307] R3为H、任选取代的C1-C9烷基、C2-C6烯基;任选取代的C6-C12芳基、任选取代的C1-C9杂芳基,具有1-4个独立选自N、S和O的环原子;任选取代的C7-C15芳基烷基,诸 如但不限于苄基或α-甲基苄基;或任选取代的C3-C7环烷基;-$(CH_2)_n$-NH(CO)O-(C1-C6烷基); -$CH_2O(CH_2)_P$-NH(CO)O-(C1-C6)烷基;-(CH_2)p-NHCO-$(CH_2)_m$-NH(CO)O-C1-C6烷基); -NH(CO)O-叔丁基;-O-叔丁基;或-叔丁基;CONH-芳基;

[0308] m=1-5;n=1-8;p=1-9;

[0309] 其中"取代的"意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H的一个或多个取代。

[0310] 在一个实施例中,R1可以为H、甲基、乙基、异丙基、异丁基、苯基、卤素、甲基羧基、甲氧基、乙氧基、甲基取代的苯基;杂芳基、吡啶基、苄基或α-甲基苄基。

[0311] 在一个实施例中,R2可以为H、卤素、甲基或甲氧基。

[0312] 在一个实施例中,Z1可以为键、-NH-、-CH_2-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、-CH=CH-、取代的苯 基、-CH_2NH(CO)O-、-$(CH_2)_2$NH(CO)O-、-$(CH_2)_3$NH(CO)O-、-$(CH_2)_4$NH(CO)O-、 -$(CH_2)_5$NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)-、-CH(CH_3)NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-、 -CH_2NH(CO)CH_2NH(CO)O-、-$CH_2O(CH_2)_2$NH(CO)O-或-环己基-CH_2NH(CO)O-。

[0313] 在一个实施例中,R3可以为乙基、丁基、异丁基、戊基、2,4,4-三甲基戊基、庚基、辛基、苯基、甲基、乙基、卤素、乙氧基或甲氧基取代的苯基。

[0314] 在一个实施例中,R1为异丁基,以及R3为-NH(CO)O-叔丁基,R2可以为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、 -NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2、或-SO_3H。

[0315] 在另一个实施例中,R1为异丁基,Z1为环己基甲基,R3为-NH(CO)O-叔丁基,R2可以为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0316] 在一个实施例中,R1为异丁基,Z1为C1-C5烷基,R3为-NH(CO)O-叔丁基或-NH(CO)CH_2- 异丙基,R2可以为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于 甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、 -C(=NH)NH_2或-SO_3H。

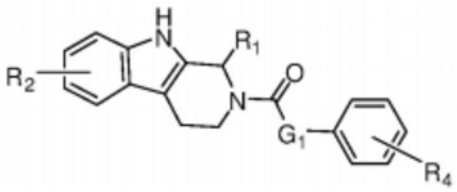
[0317] 在一个实施例中,R1为异丁基,R3为-NH(CO)O-叔丁基,以及R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、 -SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0318] 在一个实施例中,R1为乙基、异丁基、异丙基、苄基,Z1为$(CH_2)_{4-9}$-,R3为-NH(CO)O-叔丁基,R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0319] 在一个实施例中,Z1为$(CH_2)_{4-9}$-,R3为-NH(CO)O-叔丁基,R2可以为氢,R1为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基和乙氧基取代的苯环、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0320] 在一个实施例中,Z1环己基甲基或C3-C7环烷基-CH_2-基团,R3为-NH(CO)O-叔丁基, R1为异丁基,R2为卤素、甲基或甲氧基。

[0321] 在一个方面，本发明公开了式4的化合物：

[0322] 

[0323] R1为任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原 子；任选取代的C7-C15芳基烷基，诸如但不限于苄基或α-甲基苄基；任选取代的C2-C15杂 芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取 代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

[0324] R2可以为H、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、 乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、 $-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$或$-SO_3H$；

[0325] G1为键、-NH-、-O-、-S-、$-CH(CH_3)-$、$-(CH_2)_n-$，-CH＝CH-、-CO-、-SO-、$-SO_2-$或$-C(=NH)-$、

[0326] $-CH_2NH(CO)-$、$-CH_2NH(CO)O-$、$-CH_2NH(CO)NH-$；$-(CH_2)_nNH(CO)-$、$-(CH_2)_nNH(CO)O-$、$-(CH_2)_mNH(CO)NH-$；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基$-CH_2NH(CO)O-$、-C3-C7环烷 基-$NH(CO)NH-$、$-N(CH_2CH_2C_6H_5)-$；

[0327] R4为H、任选由卤素、乙基羧基、甲基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6 烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$或$-SO_3H$ 取代；

[0328] m＝1-5；n＝1-8；

[0329] 其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、 $-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$或$-SO_3H$的一个或多个取代。

[0330] 在一个实施例中，R1可以为异丙基、异丁基、甲基羧基、甲氧基取代的苯基或α-甲基苄 基。

[0331] 在一个实施例中，R2可以为H。

[0332] 在一个实施例中，G1可以为键、-NH-、$-CH_2-$、$-(CH_2)_2-$、$-(CH_2)_3$、-CH＝CH-或 $-CH_2NH(CO)NH-$。

[0333] 在一个实施例中，R4可以为氢、卤素、甲基、乙基、甲氧基或乙氧基。

[0334] 在一个实施例中，R1为异丁基，R2为氢或卤素，G1为键、$-CH_2-$或$-CH_2CH_2-$，R4为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$或$-SO_3H$。

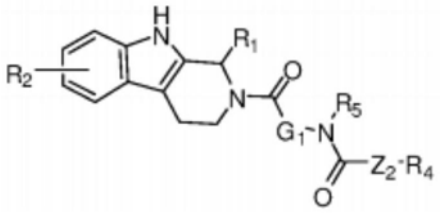
[0335] 在另一个实施例中，R1为α-甲基苄基，R2为氢或卤素，G1为NH、键、$-CH_2-$或$-CH_2CH_2-$， R4为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙 氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、$-C(=NH)NH_2$、或$-SO_3H$。

[0336] 在另一个实施例中，R1为异丁基或异丙基，R2为氢或卤素，G1为$-CH_2NH(CO)NH-$或为 $-CH_2NH(CO)NHCH_2-$，R4为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如 但

不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0337] 在另一个实施例中,R1为异丁基、异丙基或α-甲基苄基,R2为氢或卤素,G1为键、-CH_2-、-CH_2CH_2-或C2-烯烃,R4为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0338] 在一个方面,本发明公开了式5的化合物:

[0339] 

[0340] R1为H、任选取代的C1-C6烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;任选取代的C1-C9杂芳基,具有1-4个独立选自N、S和O的环 原子;任选取代的C7-C15芳基烷基,诸如但不限于苄基或α-甲基苄基;任选取代的C2-C15 杂芳基烷基,具有1-4个独立选自N、S和O的环原子;任选取代的C7-C15芳基烯基;任选 取代的未取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

[0341] R2为氢、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙 基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H;

[0342] G1为键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH_3)-、-$(CH_2)_n$-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO_2-或-C(=NH)-、-CH_2NH(CO)-、-CH_2NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-;-$(CH_2)_n$NH(CO)-、-$(CH_2)_n$NH(CO)O-、-$(CH_2)_m$NH(CO)NH-;-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷 基-NH(CO)NH-、-N($CH_2CH_2C_6H_5$)-、-C3-C7环烷基-CH_2-,诸如但不限于-环己基-CH_2-;

[0343] Z2为键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH_3)-、-$(CH_2)_n$-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO_2-或-C(=NH)-、-CH_2NH(CO)-、-CH_2NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-;-$(CH_2)_P$NH(CO)-、-$(CH_2)_P$NH(CO)O-、-$(CH_2)_P$NH(CO)NH-;-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷 基-NH(CO)NH-、-N($CH_2CH_2C_6H_5$)-;或任选取代的C6-C12芳基;

[0344] R5为H、甲基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯基乙基;

[0345] R4为H,任选取代的C1-C9烷基,诸如但不限于叔丁基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C6-C12芳基,诸如但不限于任选取代的萘基;任选取代的C1-C9杂芳基,具有1-4个独立选自N、S和O的环原子;任选取代的C7-C15芳基烷基,诸如但不限于苄基或α-甲 基苄基;任选取代的C3-C7环烷基;-$(CH_2)_P$-NH(CO)O-(C1-C6烷基); -$CH_2O(CH_2)_P$-NH(CO)O-(C1-C6)烷基;-$(CH_2)_P$-NHCO-$(CH_2)_n$-NH(CO)O-C1-C6烷基); -NH(CO)O-叔丁基;或-O-叔丁基;

[0346] m=1-5;n=1-8;p=1-9;

[0347] 其中“取代的”意味着由独立选自卤素,三氟甲基,甲基羧基,乙基羧基,C1-C6烷氧基,诸如但不限于甲氧基以及乙氧基,C1-C6烷基,-OH,-SH,-NH_2,-N_3,-CN,-NO_2,-CHO,-COOH,-$CONH_2$,-C(=NH)NH_2或-SO_3H的一个或多个取代。

[0348] 在一个实施例中,R1可以为氢、甲基、乙基、异丙基、异丁基、苄基、杂芳基诸如吡啶

基、苯基以及由卤素、三氟甲基、甲氧基、氰基或二烷基氨基取代的苯基。

[0349] 在一个实施例中，其中R2可以为氢、卤素、甲基或甲氧基。

[0350] 在一个实施例中，Z2可以为O、NH、-CH_2-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、-$(CH_2)_4$-、-$(CH_2)_5$-、-CH(CH_3)-、-CH_2NH(CO)CH_2-、-$CH_2O(CH_2)_2$-、-环己基-CH_2-或键。

[0351] 在一个实施例中，G1为-(CH_2)-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、-$(CH_2)_4$-，-$(CH_2)_5$-，-$CH_2OCH_2CH_2$-、-CH(CH_3)-、-$CH_2NHCOCH_2$-或-环己基-CH_2-。

[0352] 在一个实施例中，R5可以为氢、甲基或2-苯基乙基。

[0353] 在一个实施例中，R4可以为任选取代的苯基、萘基、苄基、取代的异丙基或叔丁基。

[0354] 在一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，Z2为氧以及R4为叔丁基，G1没有氧，R2 为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧 基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0355] 在另一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，Z2为氧，R4为叔丁基，G1为环己基甲基，R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙 氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0356] 在另一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，Z2为氧或CH_2，R4为叔丁基或异丙基， G1为C1-C5亚烷基，R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如 但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

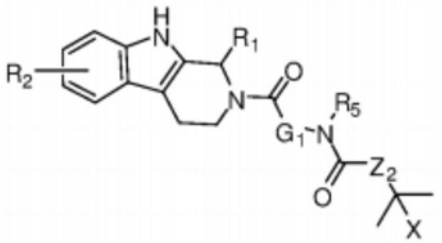
[0357] 在一个实施例中R1为异丁基，R5为氢，Z2为氧，R4为叔丁基以及R2可以为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0358] 在一个实施例中，R1为乙基，异丁基，异丙基或苄基，R5为氢，Z2为氧，R4为叔丁基，G1为$(CH_2)_{4-9}$-，R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限 于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0359] 在一个实施例中，R5为氢，Z2为氧，R4为叔丁基，G1为$(CH_2)_{4-9}$-，R2为氢，R1为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H 取代的苯环。

[0360] 在另一个实施例中，R5为氢，Z2为氧，R4为叔丁基，R1为异丁基，R2为卤素、甲基 或甲氧基，G1为环己基甲基或C3-C7环烷基-CH_2-基团。

[0361] 在一个方面，本发明公开了式6的化合物：

[0362] 

[0363] R1为H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环 原子；任选取代的C7-C15芳基烷基，诸如但不限于苄基或α-甲基苄基；任选取代的C2-C15 杂芳基

烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选 取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

[0364] R2为氢，C1-C6烷氧基，诸如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、 $-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$；

[0365] G1为键、-NH-、-O-、-S-、$-CH(CH_3)-$、$-(CH_2)_n-$、-CH=CH-、-CO-、-SO-、$-SO_2-$或-C(=NH)-、 $-CH_2NH(CO)-$、$-CH_2NH(CO)O-$、$-CH_2NH(CO)NH-$；$-(CH_2)_nNH(CO)-$、$-(CH_2)_nNH(CO)O-$、 $-(CH_2)_mNH(CO)NH-$；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基$-CH_2NH(CO)O-$、-C3-C7环烷 基-NH(CO)NH-、$-N(CH_2CH_2C_6H_5)-$、-C3-C7环烷基$-CH_2-$，诸如但不限于-环己基$-CH_2-$；

[0366] Z2为键、-NH-、-O-、-S-、$-CH(CH_3)-$、$-(CH_2)_n-$；-CH=CH-、-CO-、-SO-、$-SO_2-$或-C(=NH)-、 $-CH_2NH(CO)-$、$-CH_2NH(CO)O-$、$-CH_2NH(CO)NH-$；$-(CH_2)_PNH(CO)-$、$-(CH_2)_PNH(CO)O-$、 $-(CH_2)_PNH(CO)NH-$；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基$-CH_2NH(CO)O-$、-C3-C7环烷 基-NH(CO)NH-或$-N(CH_2CH_2C_6H_5)-$；

[0367] R5为H、甲基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯基乙基；

[0368] X为H、C1-C3烷基或C1-C3芳基烷基；

[0369] m=1-5；n=1-8；p=1-9；

[0370] 其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、 $-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$的一个或多个取代。

[0371] 在一个实施例中，R1可以为氢、甲基、乙基、异丙基、异丁基、苄基、杂芳基诸如吡啶基、苯基和卤素、甲基、三氟甲基、甲氧基、氰基或二烷基氨基取代的苯基。

[0372] 在一个实施例中，R2可以为氢、卤素、甲基或甲氧基。

[0373] 在一个实施例中，G1可以为$-(CH_2)-$、$-(CH_2)_2-$、$-(CH_2)_3-$、$-(CH_2)_4-$、$-(CH_2)_5-$、$-CH_2OCH_2CH_2-$、 $-CH(CH_3)-$、$-CH_2NHCOCH_2-$、$-CH_2O(CH_2)_2-$、-环己基$-CH_2-$或键。

[0374] 在一个实施例中，Z2可以为O、NH、$-CH_2-$或键。

[0375] 在一个实施例中，R5可以为氢或甲基。

[0376] 在一个实施例中，X可以为氢或甲基。

[0377] 在一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，X为甲基，Z2为氧，G1为跨4-9个键长的链且没有氧原子，R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限 于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、 $-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$。

[0378] 在另一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，X为甲基，Z2为氧，G1为环己基甲基， R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙 氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$。

[0379] 在另一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，X为甲基或氢，Z2为氧或CH_2，G1为C1-5亚甲基基团、R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于 甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、 -C(=NH)NH_2或$-SO_3H$。

[0380] 在另一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，X为甲基，Z2为氧，G1为4-9个键长的链，

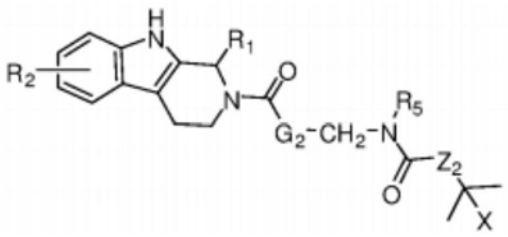
以及R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以 及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0381] 在另一个实施例中,R1为乙基,异丁基,异丙基,苄基,R5为氢,X为甲基,Z2为氧,G1为$(CH_2)_{4-9}$-,R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限 于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0382] 在另一个实施例中,R5为氢,X为甲基,Z2为氧,G1为$(CH_2)_{4-9}$-,R2为氢,R1为氢、 卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、 -SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H取代的苯环。

[0383] 在另一个实施例中,R5为氢,X为甲基,Z2为氧,R1为异丁基,R2为卤素、甲基或甲氧基,G1为环己基甲基或C3-C7环烷基-CH_2-基团。

[0384] 在一个方面,本发明公开了式7的化合物:

[0385] 

[0386] R1为H、任选取代的C1-C6烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;任选取代的C1-C9杂芳基,具有1-4个独立选自N、S和O的环 原子;任选取代的C7-C15芳基烷基,诸如但不限于苄基或α-甲基苄基;任选取代的C2-C15 杂芳基烷基,具有1-4个独立选自N、S和O的环原子;任选取代的芳基烯基;任选取代的 C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

[0387] R2为氢、C1-C6烷氧基,诸如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H;

[0388] G2为键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH_3)-、-$(CH_2)_n$-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO_2-或-C(=NH)-、 -CH_2NH(CO)-、-CH_2NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-;-$(CH_2)_n$NH(CO)-、-$(CH_2)_n$NH(CO)O-、 -$(CH_2)_m$NH(CO)NH-;-C3-C7环烷基-,诸如但不限于-环己基-或-N($CH_2CH_2C_6H_5$)-;

[0389] Z2为键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH_3)-、-$(CH_2)_n$-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO_2-或-C(=NH)-、 -CH_2NH(CO)-、-CH_2NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-;-$(CH_2)_P$NH(CO)-、-$(CH_2)_P$NH(CO)O-、 -$(CH_2)_P$NH(CO)NH-;-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷 基-NH(CO)NH-或-N($CH_2CH_2C_6H_5$)-;

[0390] R5为H、甲基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯基乙基;

[0391] X为H、C1-C3烷基或C1-C3芳基烷基;

[0392] m=1-5;n=1-8;p=1-9;

[0393] 其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H的一个或多个取代。

[0394] 在一个实施例中,R1可以为氢、甲基、乙基、异丙基、异丁基、苄基、杂芳基诸如吡啶基、苯基、卤素、三氟甲基、甲基、甲氧基、氰基或二烷基氨基取代的苯基。

[0395] 在一个实施例中,R2可以为氢、卤素、甲基或甲氧基。

[0396] 在一个实施例中,G2可以为键、-CH_2-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、-$(CH_2)_4$-、-CH_2OCH_2-、-CH(CH_3)-、-CH_2NHCO-或-环己基-。

[0397] 在一个实施例中,Z2为O、CH_2或NH。

[0398] 在一个实施例中,R5可以为氢或甲基。

[0399] 在一个实施例中,X可以为氢或甲基。

[0400] 在一个实施例中,R1为异丁基,R5为氢,Z2为氧,R5为氢,X为甲基,G2没有氧, R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6 烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0401] 在另一个实施例中,R1为异丁基、R5为氢、X为甲基、Z2为氧、G2为环己基、R2为 氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、 -OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0402] 在另一个实施例中,R1为异丁基,Z2为氧或CH_2,R5为氢或甲基,X为甲基,G2为键或-(CH_2)1-4-,R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如甲氧基 或乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

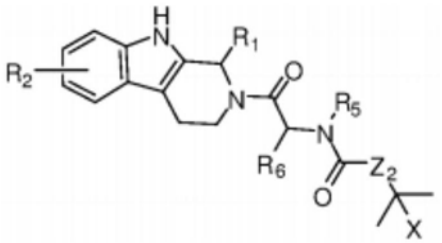
[0403] 在一个实施例中,R1为异丁基,Z2为氧,R5为氢,X为甲基,及R2为氢、卤素、三 氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、 -NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0404] 在另一个实施例中,R1为乙基、异丁基、异丙基、苄基,Z2为氧,R5为氢,X为甲基,G2为-$(CH_2)_{2-5}$,R2可以为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但 不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0405] 在另一个实施例中,R5为氢,X为甲基,Z2为氧,G2为-$(CH_2)_{2-5}$,R2为氢,R1为氢、 卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、 -SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H取代的苯环。

[0406] 在另一个实施例中,R5为氢,X为甲基,Z2为氧,R1为异丁基,R2为卤素、甲基或甲氧基,G2为环己基或C3-C7环烷基-CH_2-基团。

[0407] 在一个方面,本发明公开了式8的化合物:

[0408] 

[0409] R1为H、任选取代的C1-C6烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;任选取代的C1-C9杂芳基,具有1-4个独立选自N、S和O的环 原子;任选取代的C7-C15芳基烷基,诸如但不限于苄基或α-甲基苄基;任选取代的C2-C15 杂芳基

烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的芳基烯基；任选取代的 C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

[0410] R2为氢、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙 基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、 -C(=NH)NH_2或$-SO_3H$；

[0411] Z2为键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH_3)-、$-(CH_2)_n-$；-CH=CH-、-CO-、-SO-、$-SO_2-$、-C(=NH)-、 $-CH_2NH(CO)-$、$-CH_2NH(CO)O-$、$-CH_2NH(CO)NH-$；$-(CH_2)_nNH(CO)-$、$-(CH_2)_nNH(CO)O-$、 $-(CH_2)_mNH(CO)NH-$；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基$-CH_2NH(CO)O-$、-C3-C7环烷 基-NH(CO)NH-或$-N(CH_2CH_2C_6H_5)-$；

[0412] R5为H、甲基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯基乙基；

[0413] X为H、C1-C3烷基或C1-C3芳基烷基；

[0414] R6为H或C1-C3烷基；

[0415] m=1-5；n=1-8；

[0416] 其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基的一个或多个取代。

[0417] 在一个实施例中，R1可以为氢、甲基、乙基异丙基、异丁基、苄基、杂芳基诸如吡啶基、 苯基或卤素、三氟甲基、甲基、甲氧基、氰基、或二烷基氨基取代的苯基。

[0418] 在一个实施例中，R2可以为氢、卤素、甲基或甲氧基。

[0419] 在一个实施例中，Z2可以为O、CH_2、NH或键。

[0420] 在一个实施例中，R5可以为氢或甲基。

[0421] 在一个实施例中，X可以为氢或甲基。

[0422] 在一个实施例中，R6可以为H或甲基。

[0423] 在一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，Z2为氧，以及R5为氢、X为甲基、R6为氢 或甲基、R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基，诸如但不限于乙 氧基以及甲氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、 -C(=NH)NH_2或$-SO_3H$。

[0424] 在另一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，Z2为氧或CH_2，R5为氢或甲基，X为甲基，R6为氢或甲基，R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6 烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$。

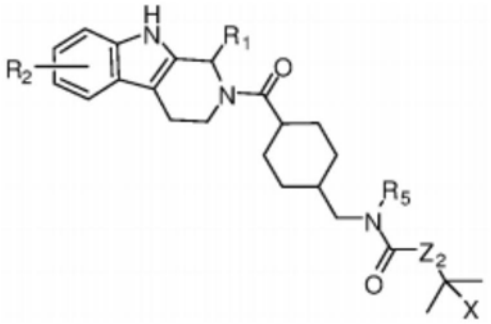
[0425] 在另一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，Z2为氧，X为甲基，R6为氢或甲基，R2 为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基，诸如但不限于甲氧基以及乙 氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$。

[0426] 在另一个实施例中，R1为乙基、异丁基、异丙基、苄基，R5为氢，Z2为氧，X为甲基，R6可以为氢或甲基，R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如 但不限于乙氧基以及甲氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、 $-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$。

[0427] 在另一个实施例中，R5为氢，X为甲基，Z2为氧，R6为氢或甲基，R2为氢，R1为氢、 卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、 -SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$取代的苯环。

[0428] 在另一个实施例中，R5为氢，X为甲基，Z2为氧，R1为异丁基，R6为氢或甲基，R2 为卤素、甲基或甲氧基。

[0429] 在一个方面，本发明公开了式9的化合物：

[0430] 

[0431] R1为H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；任选取代的C1-C9杂芳基，具有1-4个独立选自N、S和O的环 原子；任选取代的C7-C15芳基烷基，诸如但不限于苄基或α-甲基苄基；任选取代的C2-C15 杂芳基烷基，具有1-4个独立选自N、S和O的环原子；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选 取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

[0432] R2为氢、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙 基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、 -C(=NH)NH_2或$-SO_3H$；

[0433] R5为H、甲基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯基乙基；

[0434] X为H、C1-C3烷基或C1-C3芳基烷基；

[0435] Z2为键、-NH-、-O-、-S-、$-CH(CH_3)-$、$-(CH_2)_n-$；-CH=CH-、-CO-、-SO-、$-SO_2-$、-C(=NH)-、 $-CH_2NH(CO)-$、$-CH_2NH(CO)O-$、$-CH_2NH(CO)NH-$；$-(CH_2)_nNH(CO)-$、$-(CH_2)_nNH(CO)O-$、 $-(CH_2)_mNH(CO)NH-$；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基$-CH_2NH(CO)O-$、-C3-C7环烷 基-NH(CO)NH-或$-N(CH_2CH_2C_6H_5)-$；

[0436] m=1-5；n=1-8；

[0437] 其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、 $-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$中的一个或多个取代。

[0438] 在一个实施例中，R1可以为异丙基或异丁基。

[0439] 在一个实施例中，R2可以为H、卤素或甲基。

[0440] 在一个实施例中，R5可以为H。

[0441] 在一个实施例中，X可以为甲基。

[0442] 在一个实施例中，Z2可以为O。

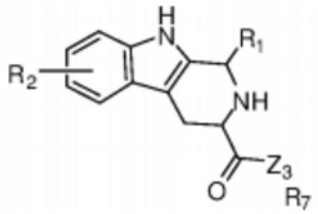
[0443] 在一个实施例中，R1为异丁基，R5为氢，Z2为氧，X为氢以及R2为氢、卤素、三氟 甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、 -OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$。

[0444] 在另一个实施例中，R1为异丙基，R5为氢，Z2为氧，X为氢以及R2为氢、卤素、三 氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、 -OH、-SH、$-NH_2$、$-N_3$、-CN、$-NO_2$、-CHO、-COOH、$-CONH_2$、-C(=NH)NH_2或$-SO_3H$。

[0445] 在另一个实施例中,R1为异丁基或异丙基,R5为氢或甲基,Z2为氧,X为氢,以及R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0446] 在另一个实施例中,R1为异丁基或异丙基,R5为氢,Z2为-CH_2-或氧,X为氢或CH_3以及R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以 及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0447] 在一个方面,本发明公开了式10的化合物:

[0448] 

[0449] R1为H、任选取代的C1-C6烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;任选取代的C1-C9杂芳基,具有1-4个独立选自N、S和O的环 原子;任选取代的C7-C15芳基烷基,诸如但不限于苄基或α-甲基苄基;任选取代的C2-C15 杂芳基烷基,具有1-4个独立选自N、S和O的环原子;任选取代的C7-C15芳基烯基;任选 取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

[0450] R2为氢、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙 基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、 -C(=NH)NH_2或-SO_3H;

[0451] Z3为键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH_3)-、-(CH_2)$_n$-;-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO_2-或-C(=NH)-、 -CH_2NH(CO)-、-CH_2NH(CO)O-、-CH_2NH(CO)NH-;-(CH_2)$_n$NH(CO)-、-(CH_2)$_n$NH(CO)O-、 -(CH_2)$_m$NH(CO)NH-;-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH_2NH(CO)O-、-C3-C7环烷 基-NH(CO)NH-、-N($CH_2CH_2C_6H_5$)-;

[0452] R7为H、甲基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯基乙基;

[0453] m=1-5;n=1-8;

[0454] 其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、 -$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0455] 在一个实施例中,R1可以为甲氧基苯基。

[0456] 在一个实施例中,R2可以为H。

[0457] 在一个实施例中,Z3可以为O、CH_2或NH。

[0458] 在一个实施例中,R7可以为甲基。

[0459] 在一个实施例中,R2为氢,Z3为氧,R7为甲基以及R1为乙基、异丙基、异丁基、苄基、苯基或取代的苯基,其中“取代的”意味着由独立选自卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙 基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、 -CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H的一个或多个取代。

[0460] 在另一个实施例中,R2为氢,Z3为氧,R7为甲基或乙基以及R1为乙基、异丙基、异丁基、苄基、苯基、甲氧基苯基。

[0461] 在另一个实施例中，Z3为氧，R7为甲基或乙基以及R1为乙基、异丙基、异丁基、苄基、苯基或甲氧基苯基，R2为氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基诸如但不限于甲氧基以及乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、-NO_2、-CHO、-COOH、-$CONH_2$、-C(=NH)NH_2或-SO_3H。

[0462] 在一个实施例中，R1为异丁基。

[0463] 在一个实施例中，在式1-3的范围内，-Z1-R3部分具有开始于结合Z1与式1-3的羰基基 团的原子并终止于R3的末端原子的通路(pathway)；所述通路为由最多原子组成的通路，并 且所述通路具有4-9个原子。以上描述的通路由碳原子和/或杂原子组成。氢原子不算做通路 的一部分。

[0464] 在一个实施例中，-Z1-R3部分含有至少一个氧原子。

[0465] 在一个实施例中，-Z1-R3部分含有疏水性末端基团，诸如选自3-甲基丁酰(异丁基羰基)、2,2-二甲基丙酰(叔丁基羰基)、2-甲基丙酰(异丙基羰基)、苯基以及苄基的末端基团。

[0466] 在一个实施例中，-Z1-R3部分含有末端叔丁基氧羰基(BOC)基团。

[0467] 在一个实施例中，-Z1-R3部分含有至少一个氧原子。

[0468] 在一个实施例中，-Z1-R3部分含有疏水性末端基团，诸如选自3-甲基丁酰(异丁基羰基)、2,2-二甲基丙酰(叔丁基羰基)、2-甲基丙酰(异丙基羰基)、苯基以及苄基的末端基团。

[0469] 在一个实施例中，-Z1-R3部分含有末端叔丁基氧羰基(BOC)基团。

[0470] 在一个实施例中，在式4的范围内，-G_1-苯基-R_4部分具有开始于结合G1与式4的羰基 基团的原子并终止于R4的末端原子的通路；所述通路为由最多原子组成的通路，并且所述 通路具有4-9个原子。以上描述的通路由碳原子和/或杂原子组成。氢原子不算做通路的一部 分。

[0471] 在一个实施例中，-G_1-苯基-R_4部分含有至少一个氧原子。

[0472] 在一个实施例中，-G_1-苯基-R_4部分含有疏水性末端基团，诸如选自卤素或三氟甲基的末 端基团。

[0473] 在一个实施例中，-G_1-苯基-R_4部分含有末端叔丁基氧羰基(BOC)基团。

[0474] 在一个实施例中，在式5的范围内，-G1-N(R5)-C(O)-Z2-R4部分具有开始于结合G1与 式5的羰基基团的原子并终止于R4的末端原子的通路；所述通路为由最多原子组成的通路， 并且所述通路具有4-9个原子。以上描述的通路由碳原子和/或杂原子组成。氢原子不算做通 路的一部分。

[0475] 在一个实施例中，-G1-N(R5)-C(O)-Z2-R4部分含有至少一个氧原子。

[0476] 在一个实施例中，-G1-N(R5)-C(O)-Z2-R4部分含有疏水性末端基团，诸如选自2-甲基丙 氧基、叔丁氧基、1-甲基乙氧基、3-甲基丁酰(异丁基羰基)、2,2-二甲基丙酰(叔丁基羰基)、2-甲基丙酰(异丙基羰基)的末端基团。

[0477] 在一个实施例中，-G1-N(R5)-C(O)-Z2-R4部分含有末端叔丁基氧羰基(BOC)基团。

[0478] 在一个实施例中在式6的范围内，-G1-N(R5)-C(O)-Z2-$CH_2(CH_3)_2$-X部分具有开始于结合 G1与式6的羰基基团的原子并终止于X的末端原子的通路；所述通路为由最多原子组成的 通路，并且所述通路具有4-9个原子。以上描述的通路由碳原子和/或杂原子组成。

氢原子不 算做通路的一部分。

[0479] 在一个实施例中,G1不含有氧原子。

[0480] 在一个实施例中,-G1-N(R5)-C(O)-Z2-$CH_2(CH_3)_2$-X部分含有疏水性末端基团,诸如选自 氢、甲基和乙基末端基团。

[0481] 在一个实施例中,-G1-N(R5)-C(O)-Z2-$CH_2(CH_3)_2$-X部分含有末端叔丁基氧羰基(BOC) 基团。

[0482] 在一个实施例中,G1为环己基甲基。

[0483] 在一个实施例中在式7的范围内,-G2-CH_2-N(R5)-C(O)-Z2-$CH_2(CH_3)_2$-X部分具有开始于 结合G2与式7的羰基基团的原子并终止于X的末端原子的通路;所述通路为由最多原子组 成的通路,并且所述通路具有4-9个原子。以上描述的通路由碳原子和/或杂原子组成。氢原 子不算做通路的一部分。

[0484] 在一个实施例中,G2不含有氧原子。在一个实施例中,Z2不含有氧原子。

[0485] 在一个实施例中,-G2-CH_2-N(R5)-C(O)-Z2-$CH_2(CH_3)_2$-X部分含有疏水性末端基团,诸如 选自氢、甲基和乙基末端基团。

[0486] 在一个实施例中,-G2-CH_2-N(R5)-C(O)-Z2-$CH_2(CH_3)_2$-X部分含有末端叔丁基氧羰基 (BOC)基团。

[0487] 在一个实施例中在式8的范围内,-CH(R6)-N(R5)-C(O)-Z2-$CH_2(CH_3)_2$-X部分具有开始于 结合于式8的羰基基团的原子并终止于X的末端原子的通路;所述通路为由最多原子组成的 通路,并且所述通路具有4-9个原子。以上描述的通路由碳原子和/或杂原子组成。氢原子不 算做通路的一部分。

[0488] 在一个实施例中,G2不含有氧原子。在一个实施例中,Z2不含有氧原子。

[0489] 在一个实施例中,-CH(R6)-N(R5)-C(O)-Z2-$CH_2(CH_3)_2$-X部分含有疏水性末端基团,诸如 选自氢、甲基和乙基末端基团。

[0490] 在一个实施例中,-CH(R6)-N(R5)-C(O)-Z2-$CH_2(CH_3)_2$-X部分含有末端叔丁基氧羰基 (BOC)基团。

[0491] 在一个实施例中在式10的范围内,-Z3-R7部分具有开始于结合Z3与式10的羰基基团 的原子并终止于R7的末端原子的通路;所述通路为由最多原子组成的通路,并且所述通路 具有4-9个原子。以上描述的通路由碳原子和/或杂原子组成。氢原子不算做通路的一部分。

[0492] 在一个实施例中,-Z3-R7部分含有至少一个氧原子。

[0493] 在一个实施例中,-Z3-R7部分含有疏水性末端基团,诸如选自3-甲基丁酰(异丁基羰基)、2,2-二甲基丙酰(叔丁基羰基)、2-甲基丙酰(异丙基羰基)、苯基和苄基的末端基团。

[0494] 在一个实施例中,-Z3-R7部分含有末端叔丁基氧羰基(BOC)基团。

[0495] 对于所有的式1-10,公开了以下的可选实施例:

[0496] R1为H的选项可以从式1-10的定义中排除。

[0497] Z1或G1为“任选取代的苯基”的选项可以式1-10的定义中排除。

[0498] R1可以为苄基或C_{2-4}烷基,诸如但不限于异丁基、异丙基和乙基。

[0499] R1可以为芳基、取代或未取代的苯基、任选由卤素、甲氧基、二甲氨基或氰基取代

的，未取代的苄基,或杂芳基,诸如但不限于吡啶基。

[0500] R1可以为取代或未取代的苯基,例如卤素或甲氧基取代的,或未取代的苄基。

[0501] R2可以为甲氧基。

[0502] R2可以为卤素,诸如F或Cl。

[0503] R2可以为甲基。

[0504] 一般地,作为适用于式1-10：

[0505] 一般地：

[0506] 在一个实施例中,R1为异丁基、异丙基、乙基、氢、苯基、氯苯基、三氟甲基-苯基、氟苯基或苄基。

[0507] 在一个实施例中,R2为氟、氯、或甲基。

[0508] 在一个实施例中,Z1-R3部分具有选自BOC-氨甲环酸,BOC-缬氨酸,BOC-5-氨基戊酸，BOC-6-氨基己酸,BOC-甘氨酸和BOC-γ-氨基丁酸的末端基团。在式1中,这些对应于Z1为键,且R3为-$(CH_2)_n$-NH(CO)O-(C1-C6烷基),其中n＝1至5个亚甲基单元,即-$(CH_2)_{1-5}$-。

[0509] 化学类似物的合成路线

[0510] 使用之前在文献中描述的已知的有机化学技术合成本申请中的化合物(参见反应路线)。

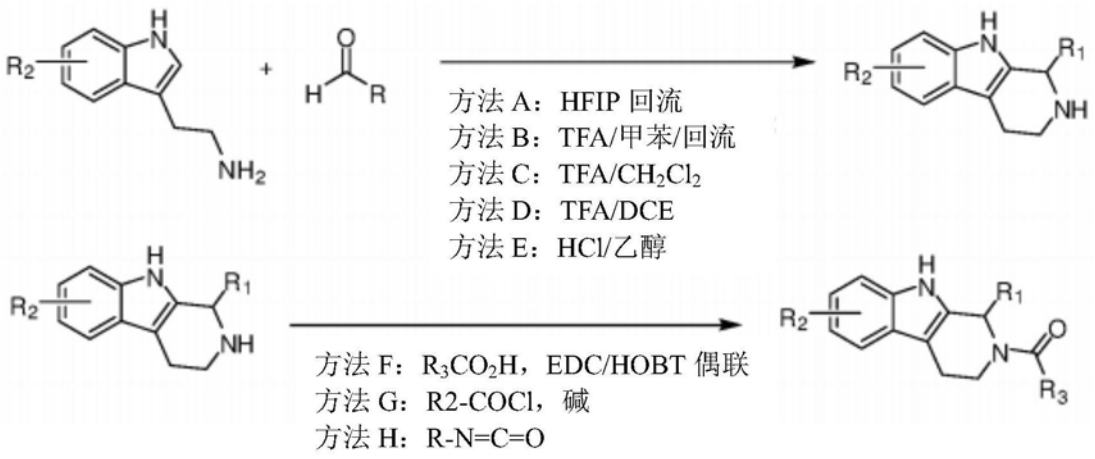
[0511] 环化方法A-E:在多种溶剂和温度下使用1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(路易斯酸)或三氟乙 酸(质子酸),将未取代的色胺和取代的色胺与脂肪族和芳香族醛在Pictet-Spangler型杂环化 反应中起反应,以提供在R1和R2具有取代的四氢-β-咔啉。

[0512] 偶联方法F-H:然后用羧酸(在偶联试剂存在下)、酰氯在碱的存在下将四氢-β-咔啉的碱 性的二级氮酰化,或者用异氰酸酯以产生脲。

[0513] 针对本文所描述的每个类似物所使用的具体合成方法参见物理数据和合成方法表。

[0514] 反应路线

[0515]

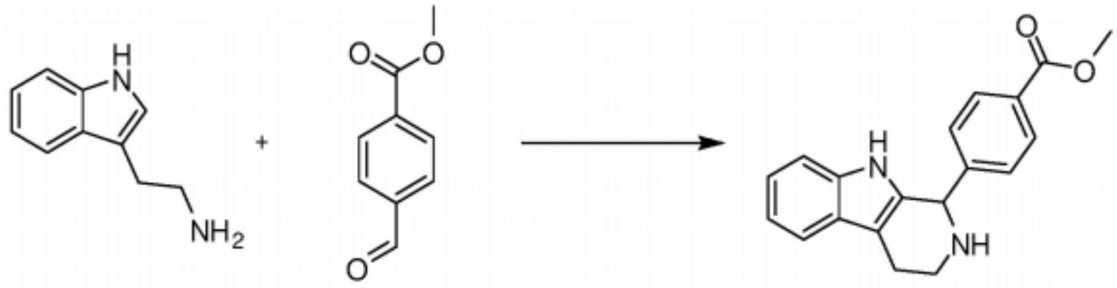


[0516] 实验方法

[0517] 所有的溶剂和反应试剂购自Sigma-Aldrich、Fisher Scientific或其他商业供应商,并且使 用无需进一步纯化。NMR实验中用到的所有氘化溶剂购自Sigma-Aldrich,并且使用无需进 一步纯化。所有的^{1}H NMR实验使用Varian 400MHz Unity Inova NMR波谱仪进行。用1秒 的延迟时间(d1)通过16次扫描获得^{1}H NMR谱。谱宽为20ppm(从-3ppm至20ppm)。

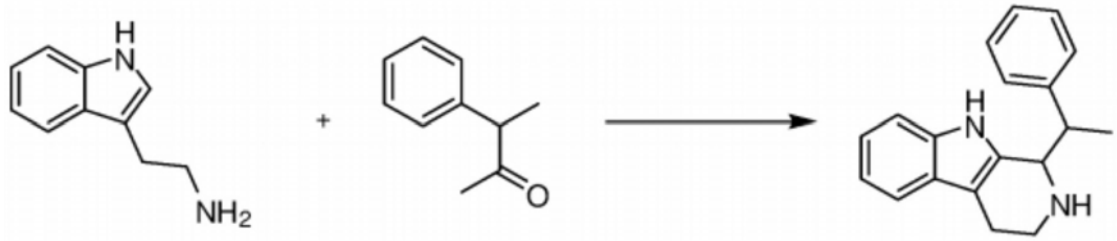
通 过定制的NMR服务(Ayer,MA)进行NMR实验。使用LC/MS进行质谱实验。通常在二氯 甲烷中以1mg/mL的浓度制备样品,针对每次获取注射1uL。通过Brown大学(Providence,RI) 的Dr.Tun-Li Shen进行质谱实验。通过使用氢酸纸(Hydracid Papers)1-6(Micro Essential Laboratory-Brookly,NY)或用Fisher科学pH计,型号AB15测定pH测量值。使用附接于 KD Scientific,model 100注射器泵的Hamilton 10mL气密注射器进行反应试剂的控制加入。使 用压缩氩气(超高纯-Igo's Welding供应-Watertown,MA),或者作为气球,使用附接于针或 在Sigma-Aldrich Atmos手套袋中的perfectum针管连接器,实现所有的惰性气氛。实验室玻 璃器皿由Sigma-Aldrich、Ace glass、Chemglass或VWR scientific制造。使用Sigma-Aldrich 硅胶(230-400目、60级、cat.#717185)进行硅胶纯化。使用EMD TLC硅胶60F254板 (2.5×7.5cm,cat.#1153410001)进行TLC。通过I2硅胶或紫外光对TLC进行可视化。在Agilent HP1090 HPLC上使用Luna 5u C18(2)100A柱(50×2.00mm,Phenomenex),用紫外检测器 在254nm和220nm处使用标准溶剂梯度程序获得高效液相色谱(HPLC)分析。溶剂A为水 中0.4%TFA;溶剂B为乙腈中0.4%TFA;HPLC梯度为5%B(0-0.5min),100%B(上升到0.5-5min),100%B(5-7min),5%B(7-7.01min),5%B(7.01-9min)。

[0518] 合成实例1(通过方法D的环化)

[0519] 

[0520] 将色胺(1.00g,6.26mmol)、4-甲酰基苯甲酸甲酯(1.03g,6.24mmol)和4A分子筛(0.76 g)悬浮于1,2-二氯乙烯(DCE)(30mL)中。向混合物加入三氟乙酸(TFA)(285mg,2.50mmol), 并且将反应加热至回流,得到亮棕色沉淀物。将混合物冷却至30℃并通过玻璃纤维塞移除 4A分子筛。将溶液用饱和$NaHCO_3$溶液(15mL)猝灭并用EtOAc(50mL)稀释。用饱和 NaCl溶液洗涤有机层并干燥(无水$MgSO_4$)。通过真空除去溶剂,得到浅棕色固体。通过快速柱色谱法进一步纯化该物质:使用MeOH、EtOAc和己烷(1:3:6)进行洗脱。合并含有产 物的级分,得到亮棕色固体(0.80g,42%收率;TLC R_f=0.129(10%MeOH/30%EtOAc/己烷);HPLC R_t=3.254min)。该中间体用于以下化合物MN0642和MN1210的合成。

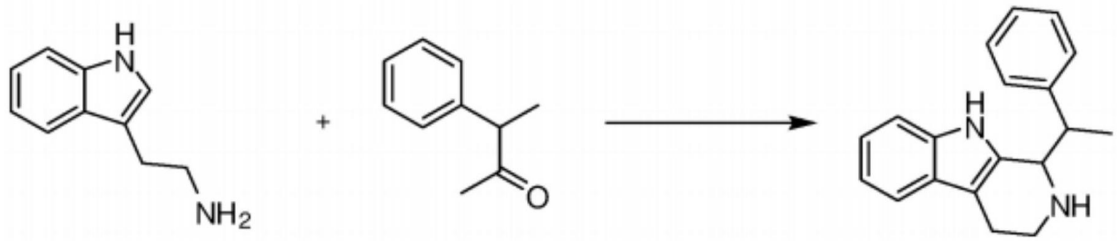
[0521] 合成实例2(通过方法D的环化)

[0522] 

[0523] 将色胺(4.25g,26.6mmol)加至1,2-二氯乙烷(85mL)中。将2-苯基丙醛(3.6mL,27mmol)、三氟乙酸(TFA)(0.80mL,10.6mmol)和4A分子筛(2.5g)加至混合物中。反应 在搅拌并回流下过夜。将反应冷却至室温,加入EtOAc(100mL),并用饱和$NaHCO_3$溶液 (3×25mL)以

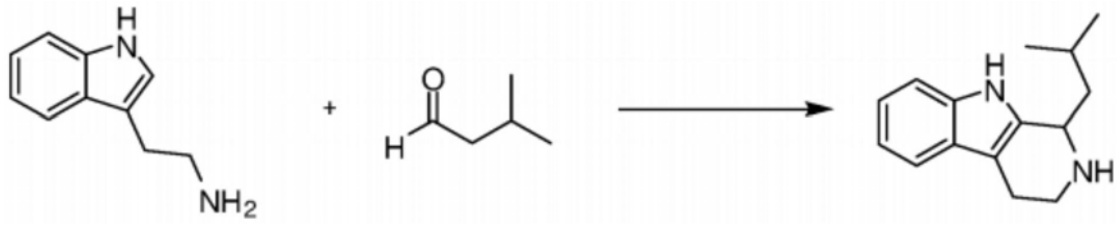
及然后用饱和NaCl溶液(25mL)洗涤有机层。将溶剂蒸发,得到棕色固体。将粗固体溶解在CH_2Cl_2中并用快速柱色谱法纯化:由0%、1%、2%、3%和3%MeOH的CH_2Cl_2溶液组成的5个级分。将含有产物的级分合并,真空下除去溶剂得到固体(3.58g,48.7%收率; TLC R_f=0.34(3%MeOH/CH_2Cl_2);HPLC R_t=3.187min)。该中间体用于以下化合物MN1130、MN1135、MN1151、MN1152和MN1171的合成。

[0524] 合成实例3:MN1179(通过方法B的环化)

[0525] 

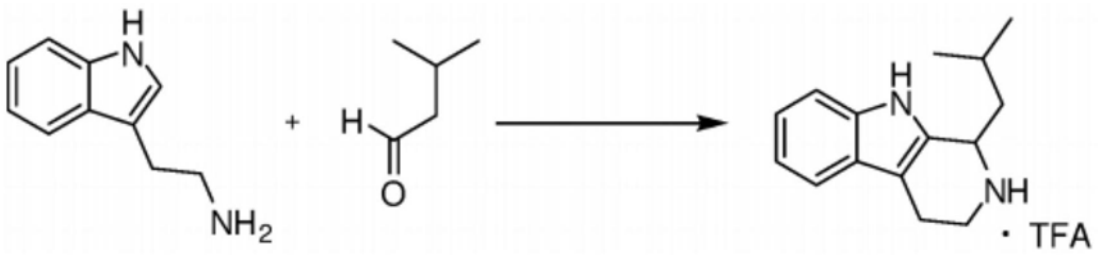
[0526] 将色胺(5.00g,31.2mmol)加至甲苯(100mL)中。向混合物加入2-苯基丙醛(4.2mL,31.2mmol)和TFA(0.60mL,7.8mmol)。反应在搅拌并回流下过夜,使用Dean-Stark分水 器除去水。将反应冷却至室温,加入EtOAc(100mL),并用饱和$NaHCO_3$溶液(3×25mL) 以及然后用饱和NaCl溶液(25mL)洗涤有机层。将溶剂蒸发,得到棕色固体。将固体溶解 在EtOAc(50mL)中,加入庚烷(50mL),并将反应置于冰上。将溶液过滤并干燥剩余物。 将固体溶解在CH_2Cl_2中并用快速柱色谱法进一步纯化:由0%、1%、3%、5%和5%MeOH的 CH_2Cl_2溶液组成的5个级分。将含有产物的级分合并,真空下除去溶剂得到固体(5.10g,59.1% yield;TLC R_f=0.34(3%MeOH/CH_2Cl_2);HPLC R_t=3.187min)。该中间体用于以下化合物 MN1130、MN1135、MN1151、MN1152和MN1171的合成。

[0527] 合成实例4:MN1180(通过方法A的环化)

[0528] 

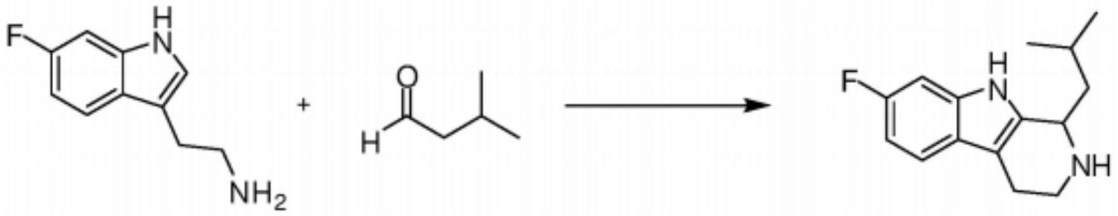
[0529] 将色胺(1.6g,10mmol)溶解于1,1,1,3,3,3-六氟-2-异丙醇(16mL)并通过注射器加入 到异戊醛(1.3mL;12mmol)中。将反应在氮气的惰性氛围中回流18.5hr并搅拌。将溶剂蒸 发并在真空下与$CHCl_3$(3×50mL)共沸。加入己烷(16mL)并在水浴中超声10min并随后过夜。将混合物过滤,得到固体(1.9g)。通过与5N NH_4OH(10mL)搅拌20min而研碎来 进一步纯化该物质。将所得物过滤随后用H_2O(2×20mL)洗涤。将得到过的固体过滤并在 真空离解器(vacuum dissicator)中干燥,得到固体(1.60g,71.0%收率;TLC R_f=0.30 (10%MeOH/1%NH_4OH/CH_2Cl_2);HPLC R_t=3.081min)。该中间体用于以下化合物的合成: MN1132、MN1133、MN1137、MN1138、MN1157、MN1186、MN1189、MN1190、MN1194、 MN1195、MN1197、MN1203、MN1206、MN1207、MN1208、MN1209、MN1212、MN1213、 MN1214、MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、MN1231、 MN1232、MN1246。

[0530] 合成实例5:MN1180(通过方法C的环化)

[0531] 

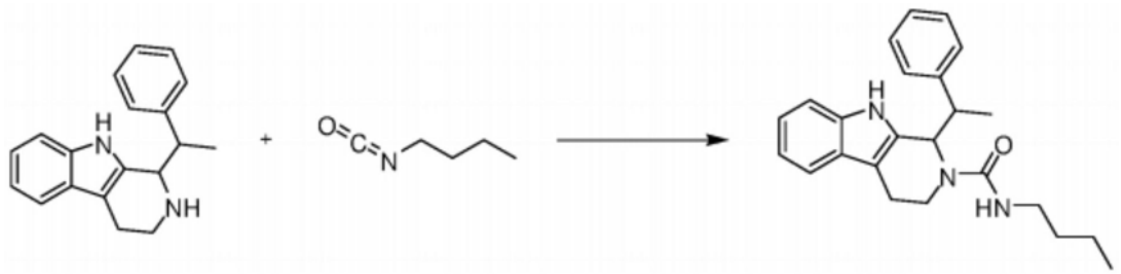
[0532] 将色胺(8.0g,50mmol)溶解于CH_2Cl_2(400mL)并在氩气的惰性氛围下放置20min。向溶液中加入异戊醛(5.36mL,50.0mmol)并将反应放置在-80℃冰浴中20min。15min内 滴加TFA(38.3mL)。将反应从水浴中移除,允许升温至室温,并搅拌20hr。将溶剂蒸发, 得到黑色油状物。将该油状物溶于CH_2Cl_2(250mL)并加入1N NaOH且振摇。收集沉淀物 并在真空离解器下干燥,以给出17.9g的橄榄色粉末(TFA盐)。将TFA盐在回流的乙腈中重 结晶。收集到的固体用冷ACN(～20mL)洗涤并干燥,得到结晶固体(9.3g,54%收率;TLC R_f＝0.30(10% MeOH/1%NH4OH/CH_2Cl_2);HPLC R_t＝3.099min)。该中间体用于以下化合物 的合成:MN1132、MN1133、MN1137、MN1138、MN1157、MN1186、MN1189、MN1190、 MN1194、MN1195、MN1197、MN1203、MN1206、MN1207、MN1208、MN1209、MN1212、 MN1213、MN1214、MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、 MN1231、MN1232、MN1246。

[0533] 合成实例6(通过方法A的环化)

[0534] 

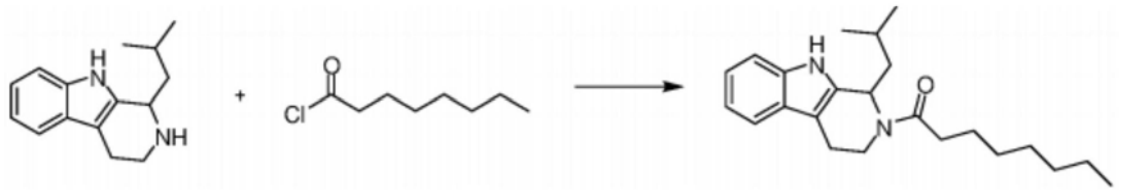
[0535] 将6-氟色胺(950mg,5.30mmol)溶解于1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(8.5mL)。通过注射器 加入异戊醛(690uL,6.40mmol)。将反应在氮气下放置在60℃的油浴中,通过HPLC确定在 21hr反应完全。在真空下除去溶剂,与$CHCl_3$(3×10mL)共沸,用己烷(2×5mL)磨碎, 过滤,并在真空下干燥。分离产物为黄色固体(1.36g,104%收率);TLC R_f＝0.354 (5%MeOH/1%NH4OH/CH_2Cl_2);HPLC R_t＝3.240min)。该中间体用于以下化合物的合成: MN1132、MN1133、MN1137、MN1138、MN1157、MN1186、MN1189、MN1190、MN1194、 MN1195、MN1197、MN1203、MN1206、MN1207、MN1208、MN1209、MN1212、MN1213、 MN1214、MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、MN1227、MN1228、MN1229、MN1230、MN1231、MN1232、MN1246、MN1247、MN1248、MN1250、 MN1251、MN1252、MN1253、MN1254、MN1255、MN1256、MN1257、MN1258、MN1260、 MN1261、MN1265、MN1266、MN1271、MN1272、MN1279、MN1280、MN1285、MN1286、 MN1289。

[0536] 合成实例7:MN1130(通过方法H的耦联)

[0537] 

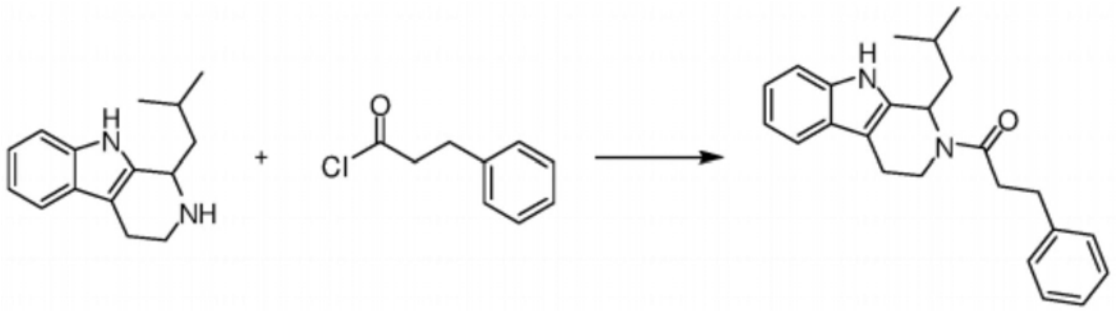
[0538] 将1-(1-苯基乙基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(276mg,1.00mmol)溶解于$CHCl_3$ (50mL)并在氮气的惰性氛围下在冰浴中冷却10min。通过注入器加入丁基异氰酸酯(170 μL,1.50mmol)。将反应从冰浴中移除并允许经过10min升温至室温。HPLC表明反应在1hr 时完成。将反应并在真空下蒸发并干燥。将残留物溶解于EtOAc(100mL),用1M柠檬酸 (3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×25mL)和饱和NaCl溶液(25mL)洗涤。将有机层干 燥(无水Na_2SO_4),过滤并在真空下蒸发以给出灰白色固体(339mg)。通过用40%EtOAc/60% 己烷(3mL)搅拌1hr而研磨而进一步纯化该物质,然后通过研磨收集产物。通过用 40%EtOAc/60%己烷(3mL)搅拌1hr来重复研磨。将得到固体过滤并在真空离解器中干燥, 得到白色固体(138mg,36.7%收率;TLC R_f=0.46(40%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.598 min);MS m/z 375.2412(100%rel.int.)。该方法用于合成以下化合物:MN733、MN1130、 MN1131、MN1158、MN1160、MN1169、MN1171、MN1172、MN1184。

[0539] 合成实例8:MN1132(通过方法G的耦联)

[0540] 

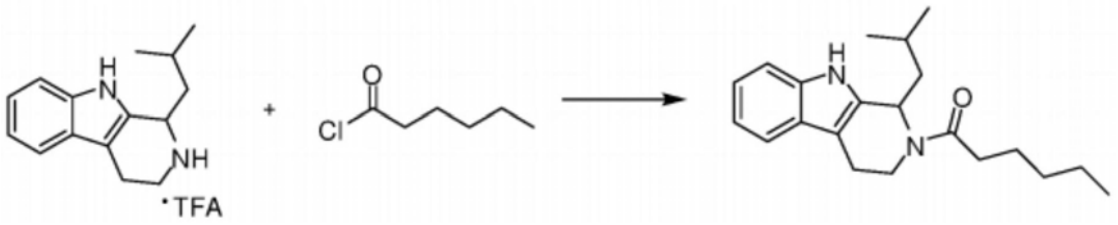
[0541] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(228mg,1.00mmol)溶解于CH_2Cl_2(10 mL)并在氮气的惰性氛围下在冰浴中冷却6min。在通过注射器加入辛酰氯(170μL,1.00mmol) 后直接加入三乙胺(TEA)(140μL,1.00mmol)。将反应从冰浴中移除并允许经过10min升 温至室温。HPLC表明反应在10min内完成。用EtOAc(100mL)稀释溶液,用1N HCl(3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×50mL)和饱和NaCl溶液(25mL)洗涤溶液。将有机 层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。将得到的油状物溶解于CH_2Cl_2(5mL),并 在真空下除去溶剂。用己烷(3mL)洗涤油性残留物以除去任意可溶于己烷的杂质。通过硅 胶色谱进一步纯化该物质:由己烷中的0%、5%、10%、15%和20%EtOAc组成的5个级分。 合并含有产物的级分,在真空下除去溶剂,得到油状物。将该油状物溶于CH_2Cl_2(~1mL) 并在冰浴中缓慢蒸发,得到白色固体。将该固体在高度真空下干燥,得到黄色油状物(236mg, 67.0%收率;TLC R_f=0.28(10%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=5.299min);^1H NMR($CDCl_3$, 0.003% v/v TMS,400MHz):δ0.85-1.10(9H,m)、1.20-1.40(8H,m)、1.55-1.80(5H,m)、2.30-2.55(2H,dq)、2.65-2.90(2H,m)、3.45-3.55(1H,m)、4.00-4.10(1H,dd)、5.87(1H,t)、7.10 (1H,t)、7.15(1H,t)、7.30(1H,d)、7.47(1H,d)、7.80(1H,br s)。该方法用于合成以下 化合物:MN0477、MN0642、MN0908、MN1132、MN1133、MN1135、MN1137、MN1138、 MN1152、MN1156、MN1157、MN1188、MN1193、MN1197、MN1203、MN1206、MN1207、 MN1208、MN1209、MN1210、MN1211、MN1212、MN1213、MN1214、MN1216、MN1217、 MN1218、MN1219。

[0542] 合成实例9:MN1133(通过方法G的耦联)

[0543] 

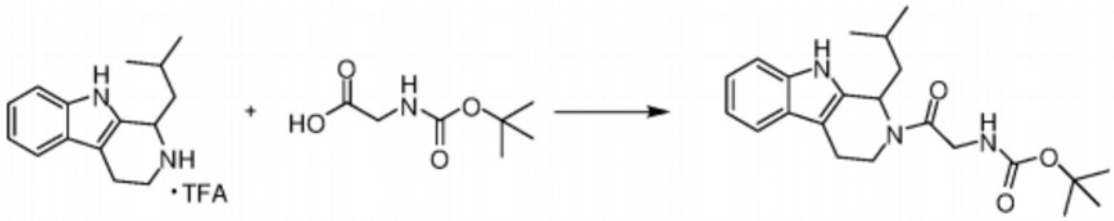
[0544] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(220mg,0.963mmol)溶解于CH_2Cl_2(10 mL)并在氮气的惰性氛围下在冰浴中冷却。通过注射器加入苯丙酰氯(148μL,1.00mmol)。45min后,加入H_2O(10mL)。另搅拌5min后,加入1M naOH至pH为13-14。75min后,加入1M NaOH(0.5mL)。然后加入CH_2Cl_2(80mL),蒸发溶液并用1N NaOH(2×75mL)、H_2O(100mL)、1N HCl(2×100mL)和饱和NaCl溶液(100mL)洗涤。将有机层干燥(无 水$MgSO_4$)并过滤。将该物质通过硅胶色谱进一步纯化:由0%、0%、1%、2%、3%和3%EtOAc 的CH_2Cl_2溶液组成的6个级分(每个200mL)。将含有产物的级分合并,真空下除去溶剂, 得到白色固体(244mg,70.3%收率;TLC R_f=0.41(3%MeOH的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t=4.803 min);^1H NMR($CDCl_3$,0.003%v/v TMS,400MHz):δ_H 0.97(3H,d)、1.18(3H,d)、1.55-1.65 (1H,m)、1.66-1.71(2H,m)、2.65-2.85(4H,m)、2.95-3.1(2H,m)、3.40-3.47(1H,m)、3.92-4.05 (1H,m)、5.87-5.92(1H,m)、7.05-7.30(8H,m)、7.43(1H,d)、7.77(1H,br s)。该方法用 于合成以下化合物:MN0477、MN0642、MN0908、MN1132、MN1133、MN1135、MN1137、 MN1138、MN1152、MN1156、MN1157、MN1188、MN1193、MN1197、MN1203、MN1206、 MN1207、MN1208、MN1209、MN1210、MN1211、MN1212、MN1213、MN1214、MN1216、 MN1217、MN1218、MN1219。

[0545] 合成实例10:MN1137(通过方法G的耦联)

[0546] 

[0547] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚·TFA盐(410mg,1.20mmol)溶解于 CH_2Cl_2(30mL)中并在氮的惰性氛围下在冰浴中冷却5min。通过注射器加入己酰氯(168μL, 1.20mmol),然后直接加入三乙胺(670μL,4.80mmol)。4小时后,通过HPLC确定反应完全。将溶液蒸发,得到溶解于EtOAc(200mL)的灰白色固体,用1N NaOH(3×50mL)、1N HCl(3×50mL)和饱和NaCl溶液(3×50mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过 滤,并在真空下蒸发。通过硅胶色谱进一步纯化该物质:由0%、2%,、3%、4%、4%和7%EtOAc 的CH_2Cl_2溶液组成的6个级分(每个200mL)。将含有产物的级分合并,真空下除去溶剂得 到固体(167mg,42.6%收率;TLC R_f=0.50(4%EtOAc的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t=4.968min)。 该方法用于合成以下化合物:MN0477、MN0642、MN0908、MN1132、MN1133、MN1135、 MN1137、MN1138、MN1152、MN1156、MN1157、MN1188、MN1193、MN1197、MN1203、 MN1206、MN1207、MN1208、MN1209、MN1210、MN1211、MN1212、MN1213、MN1214、 MN1216、MN1217、MN1218、MN1219。

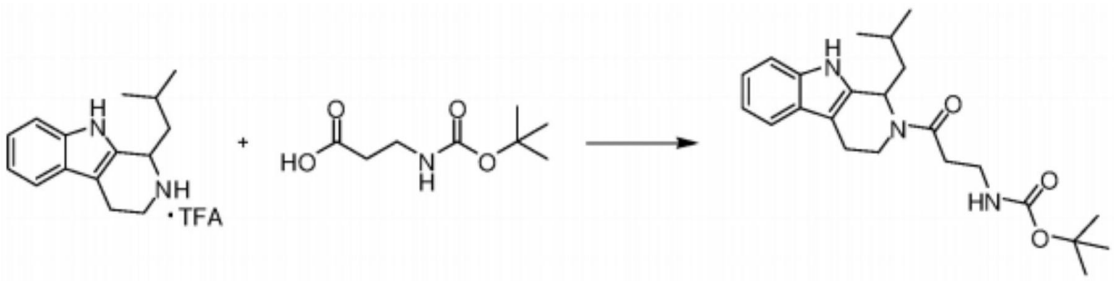
[0548] 合成实例11:MN1186(通过方法F的耦联)

[0549] 

[0550] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚·TFA盐(410mg,1.20mmol)、1-乙基-3- (3-二甲胺丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(230mg,1.20mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (13mg,0.12mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(61mg,0.40mmol)和Boc-甘氨酸(210mg,1.20 mmol)均溶解于乙腈(ACN)(1.5mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(6mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(240μL,1.44mmol)。将溶解搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释溶液,用1N HCl(3×25 mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×25mL)和饱和NaCl溶液(25mL)洗涤。将有机层干燥(无 水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发,得到油状物。通过硅胶色谱进一步纯化该物质,使用:由0%、1%、2%、4%、4%、5%、5%、5%和5%EtOAc的CH_2Cl_2溶液组成的9个级分(200 mL)。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂蒸发,得到白色固体(331mg,71.6%收率; TLC R_f=0.59(10% EtOAc的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t=4.577min);^1H NMR($CDCl_3$,0.003% v/v TMS,400MHz):δ_H 0.95(3H,d)1.10(3H,d)、1.45(9H,s)、1.55-1.85(3H,m)、2.70-2.93 (2H,m)、3.40-3.55(1H,m)、3.87-4.20(3H,m)、5.60(1H,br s)、5.80(1H,dt)、7.05-7.20 (2H,m)、7.30(1H,d)、7.45(1H,d)、7.80(1H,br s)。

[0551] 该方法用于合成以下化合物:MN0580、MN1169、MN1172、MN1186、MN1189、MN1190、MN1194、MN1195、MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、 MN1227、MN1228、MN1229、MN1230、MN1231、MN1232、MN1233、MN1234、MN1235、 MN1236、MN1237、MN1238、MN1239、MN1240、MN1241、MN1242、MN1243、MN1244、 MN1245、MN1246、MN1247、MN1248、MN1249、MN50、MN1251、MN1252、MN1253、 MN1254、MN1255、MN1256、MN1257、MN1258、MN1259、MN1260、MN1261、MN1262、 MN1263。

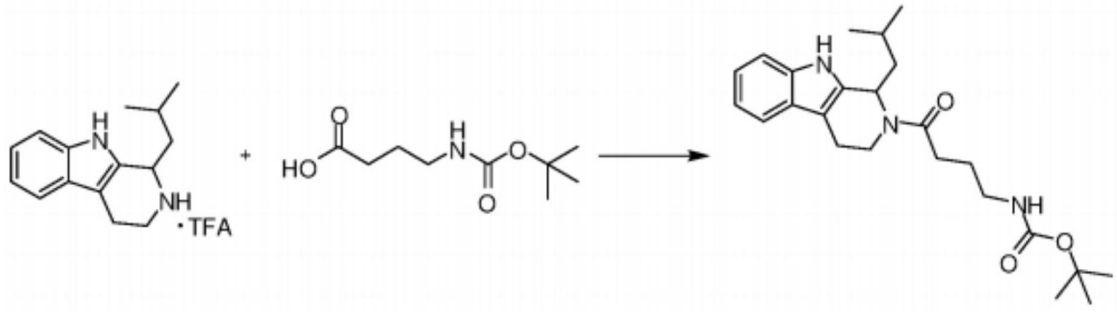
[0552] 合成实例12:MN1189(通过方法F的耦联)

[0553] 

[0554] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚·TFA盐(410mg,1.20mmol)、1-乙基-3- (3-二甲胺丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(230mg,1.20mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (13mg,0.12mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(61mg,0.40mmol)和Boc-β-丙氨酸(227mg,1.20mmol)均溶解于乙腈(1.5mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(6mL)和二异丙基乙胺(DIEA) (240μL,1.44mmol)。将溶液搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释溶液,用1M柠檬酸 (3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×25mL)和饱和NaCl溶液(25mL)洗涤。将有机层干 燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。通过硅胶色谱进一步纯化该物质:由0%、2%、 4%、5%、5%、6%、6%、8%、

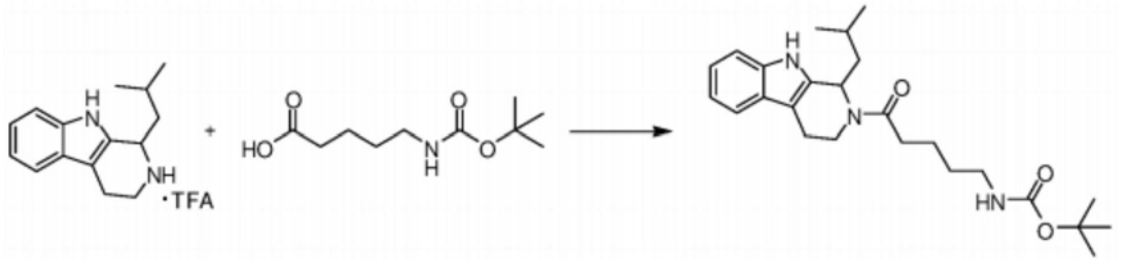
10％和12％EtOAc的CH_2Cl_2溶液组成的10个级分(每个200 mL)。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂蒸发,得到固体(314mg,64.5％收率;TLC R_f＝0.26(10％EtOAc的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t＝4.573min)。^1H NMR($CDCl_3$,0.003％v/v TMS, 400MHz):δ_H 1.00(3H,d)、1.07(3H,d)、1.40(9H,s)、1.55-1.85(4H,m)、2.55-2.90(4H, m)、3.40-3.55(3H,m)、4.00(1H,dd)、5.25(1H,br s)、5.80-5.90(1H,m)、7.10(1H,dd)、 7.15(1H,dd)、7.30(1H,d)、7.45(1H,d)、7.77(1H,br s)。该方法用于合成以下化合物: MN0580、MN1169、MN1172、MN1186、MN1189、MN1190、MN1194、MN1195、MN1220、 MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、MN1227、MN1228、MN1229、 MN1230、MN1231、MN1232、MN1233、MN1234、MN1235、MN1236、MN1237、MN1238、 MN1239、MN1240、MN1241、MN1242、MN1243、MN1244、MN1245、MN1246、MN1247、 MN1248、MN1249、MN50、MN1251、MN1252、MN1253、MN1254、MN1255、MN1256、MN1257、MN1258、MN1259、MN1260、MN1261、MN1262、MN1263。

[0555] 合成实例13:MN1190(通过方法F的耦联)

[0556] 

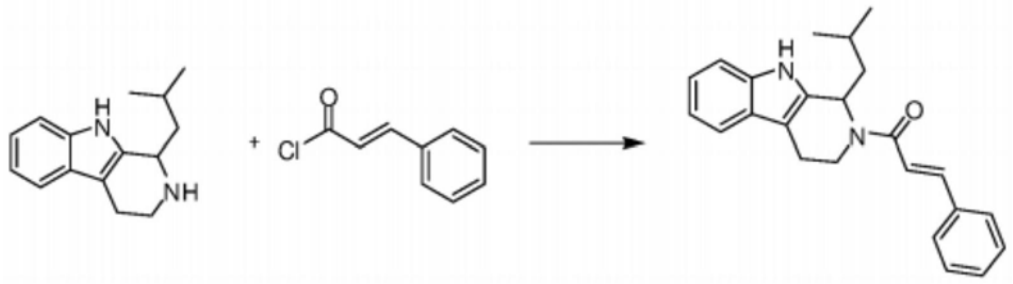
[0557] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚·TFA盐(410mg,1.20mmol)、1-乙基-3- (3-二甲胺丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(230mg,1.2mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (13mg,0.12mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(61mg,0.40mmol)和Boc-γ-氨基丁酸(244mg, 1.20mmol)均溶于乙腈(1.5mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(6mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(240μL,1.44mmol)。将溶液搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释溶液,用1M柠檬酸 (3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×25mL)和饱和NaCl溶液(25mL)洗涤。将有机层干 燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。通过硅胶色谱进一步纯化该物质:由0％、4％、6％、8％、10％、10％、12％、14％和14％EtOAc的CH_2Cl_2溶液组成的9个组分(每个200mL)。 将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂蒸发,得到白色粉末(395mg,79.6％;TLC R_f＝0.16 (10％EtOAc的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t＝4.580min)。^1H NMR($CDCl_3$,0.003％v/v TMS, 400MHz):δ_H 1.00(3H,d)、1.07(3H,d)、1.45(9H,s)、1.65-1.95(5H,m)、2.40-2.60(2H, m)、2.67-2.90(2H,m)、3.10-3.25(2H,m)、3.45-3.55(1H,m)、4.05(1H,dd)、4.83(1H,br s)、5.85(1H,m)、7.10(1H,dd)、7.15(1H,dd)、7.30(1H,d)、7.45(1H,d)、7.80(1H,br s)。该方法用于合成以下化合物:MN0580、MN1169、MN1172、MN1186、MN1189、MN1190、 MN1194、MN1195、MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、 MN1227、MN1228、MN1229、MN1230、MN1231、MN1232、MN1233、MN1234、MN1235、 MN1236、MN1237、MN1238、MN1239、MN1240、MN1241、MN1242、MN1243、MN1244、 MN1245、MN1246、MN1247、MN1248、MN1249、MN50、MN1251、MN1252、MN1253、 MN1254、MN1255、MN1256、MN1257、MN1258、MN1259、MN1260、MN1261、MN1262、 MN1263。

[0558] 合成实例14:MN1194(通过方法F的耦联)

[0559] 

[0560] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚·TFA盐(410mg,1.20mmol)、1-乙基-3- (3-二甲胺丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(230mg,1.20mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (13mg,0.12mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(61mg,0.40mmol)和Boc-5-氨基戊酸(261mg, 1.20mmol)均溶于乙腈(1.5mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(6mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(240μL,1.44mmol)。将溶液搅拌过夜。用EtOAc(100mL)稀释溶液,用1M柠檬酸(3×25 mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×25mL)和饱和NaCl溶液(25mL)洗涤。将有机层干燥(无 水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。通过硅胶色谱进一步纯化该物质:由0%、1%MeOH、 1%MeOH/0.1%NH4OH、2%MeOH/0.1%NH4OH和3%MeOH/0.1%NH4OH的CH_2Cl_2溶液 组成的5个级分(每个200mL)。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂蒸发,得到固体(412 mg,80.3%收率;TLC R_f=0.14(10%EtOAc的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t=4.652min)。1H NMR ($CDCl_3$,0.003%v/v TMS,400MHz):δH 0.97(3H,d)、1.05(3H,d)、1.45(9H,s)、1.5-1.85 (7H,m)、2.30-2.60(2H,m)、2.65-2.90(2H,m)、3.05-3.20(2H,m)、3.40-3.55(1H,m)、 4.05(1H,dd)、4.65(1H,brs)、5.85-5.90(1H,m)、7.07(1H,dd)、7.15(1H,dd)、7.30(1H, d)、7.45(1H,d)、7.80(1H,brs)。该方法用于合成以下化合物:MN0580、MN1169、MN1172、 MN1186、MN1189、MN1190、MN1194、MN1195、MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、 MN1224、MN1225、MN1226、MN1227、MN1228、MN1229、MN1230、MN1231、MN1232、 MN1233、MN1234、MN1235、MN1236、MN1237、MN1238、MN1239、MN1240、MN1241、 MN1242、MN1243、MN1244、MN1245、MN1246、MN1247、MN1248、MN1249、MN50、 MN1251、MN1252、MN1253、MN1254、MN1255、MN1256、MN1257、MN1258、MN1259、 MN1260、MN1261、MN1262、MN1263。

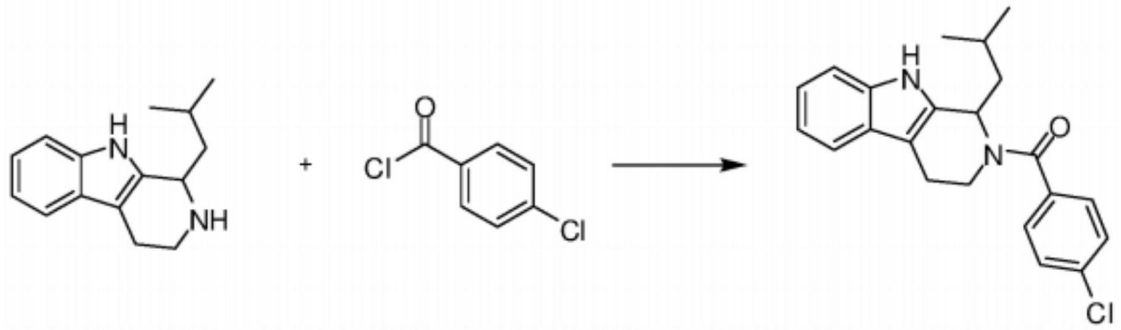
[0561] 合成实例15:MN1197(通过方法G的偶联)

[0562] 

[0563] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(228mg,1.00mmol)溶解于CH_2Cl_2(20 mL)并在氮气的惰性氛围下在冰浴中冷却6min。通过注射器加入肉桂酰氯(168mg,1.00 mmol)然后直接加入三乙胺(210μL,1.50mmol)。将反应从冰浴中移除并允许经过1hr升温 至室温。HPLC表明反应在1hr时完成。用EtOAc(100mL)稀释溶液,用1N HCl(3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×50mL)和饱和NaCl溶液(25mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发,得到灰白色固体。通过硅胶色谱进一步纯化该物质:含有0%-20%EtOAc 的己烷的级分。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂除去,得到固体

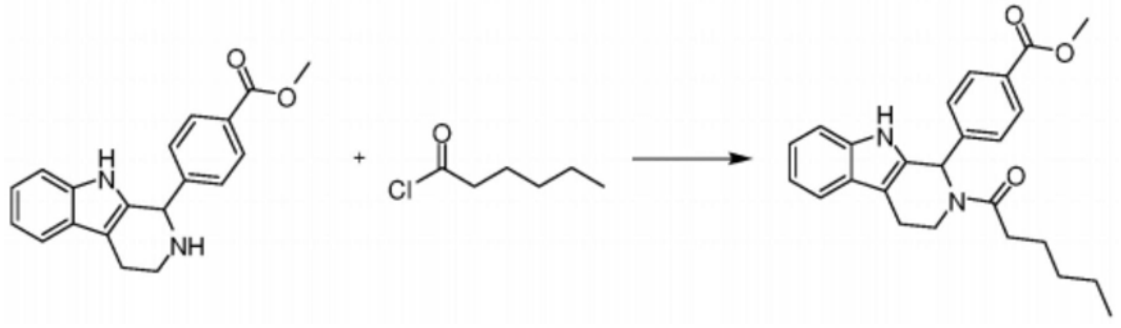
(308mg,85.9%收 率;TLC R_f=0.41(3%MeOH的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t=4.801min)。^{1}H NMR ($CDCl_3$,0.003% v/v TMS,400MHz):δ_H 1.00(3H,d)、1.10(3H,d)、1.60-1.70(1H,m)、1.75-1.95(2H,m)、2.75-3.00(2H,m)、3.55-3.65(1H,m)、4.30(1H,dd)、5.97-6.05(1H,m)、7.03(1H,d)、7.07(1H,dd)、7.15(1H,dd)、7.30-7.60(7H,m)、7.70(1H,d)、7.80(1H,br s)。该方法 用于合成以下化合物:MN0477、MN0642、MN0908、MN1132、MN1133、MN1135、MN1137、MN1138、MN1152、MN1156、MN1157、MN1188、MN1193、MN1197、MN1203、MN1206、 MN1207、MN1208、MN1209、MN1210、MN1211、MN1212、MN1213、MN1214、MN1216、 MN1217、MN1218、MN1219。

[0564] 合成实例16:MN1208(通过方法G的耦联)

[0565] 

[0566] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(228mg,1.00mmol)溶解于CH_2Cl_2(20 mL)并在氮气的惰性氛围下在冰浴中冷却6min。通过注射器加入4-氯苯甲酰氯(130μL,1.00 mmol)然后直接加入三乙胺(210μL,1.50mmol)。将反应从冰浴中移除并允许经过10min 升温至室温。将反应在室温下搅拌100hr。用EtOAc(100mL)稀释溶液,用1N HCl(3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×50mL)和饱和NaCl溶液(50mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。通过硅胶色谱进一步纯化该物质:含有0%-20%EtOAc的己烷的级分。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂除去,得到固体(268mg,75.9%收率;TLC R_f=0.36 (20%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.876min)。^{1}H NMR($CDCl_3$,0.003%v/v TMS, 400MHz):δ_H 1.05(3H,d)、1.13(3H,d)、1.60-1.95(3H,m)、2.60-2.90(2H,m)、3.45-3.57 (1H,m)、3.85(1H,dd)、5.90-6.05(1H,m)、7.10(1H,dd)、7.17(1H,dd)、7.27-7.50(6H,m)、7.85(1H,br s)。该方法用于合成以下化合物:MN0477、MN0642、MN0908、MN1132、MN1133、MN1135、MN1137、MN1138、MN1152、MN1156、MN1157、MN1188、MN1193、 MN1197、MN1203、MN1206、MN1207、MN1208、MN1209、MN1210、MN1211、MN1212、 MN1213、MN1214、MN1216、MN1217、MN1218、MN1219。

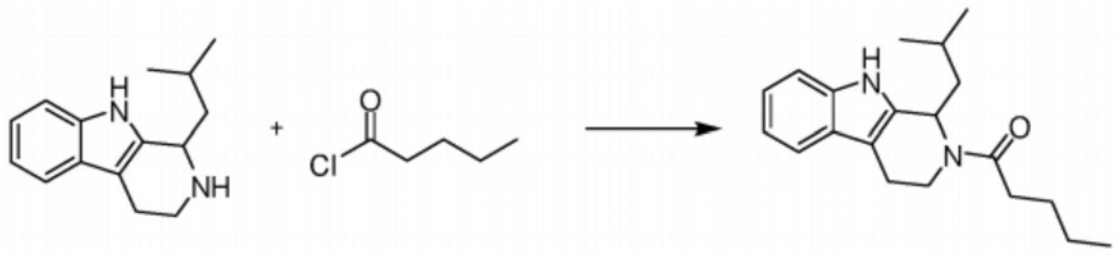
[0567] 合成实例17:MN1210(通过方法G的耦联)

[0568] 

[0569] 将甲基4-(2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚-1-基)苯甲酸酯(130mg,

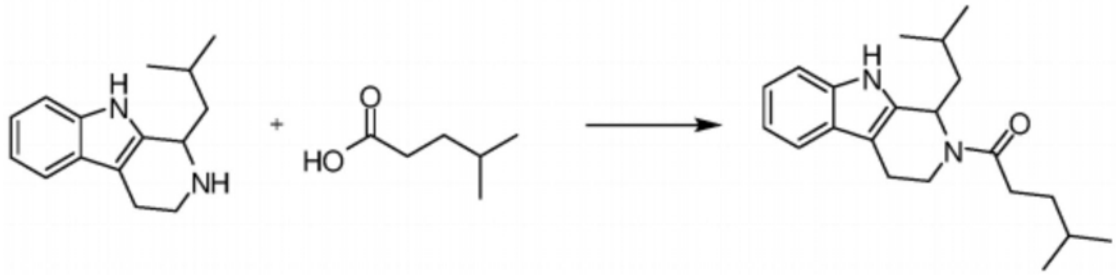
0.424mmol)溶 解于CH_2Cl_2(20mL)并在氮气的惰性氛围下在冰浴中冷却6min。通过注射器加入己酰氯(60 μL,0.42mmol)然后直接加入三乙胺(TEA)(88μL,0.63mmol)。将反应从冰浴中移除并允 许过夜升温至室温。在真空下除去溶剂并将残留物溶解于EtOAc(100mL),用1N HCl (3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×50mL)和饱和NaCl溶液(50mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。将溶剂在真空下除去,得到固体(178mg)。通过硅 胶色谱进一步纯化粗产物:由0%、1%、1%、2%、2%、2.5%和3%MeOH的CH_2Cl_2溶液组 成的7个级分(每个200mL)。将含有产物的级分合并,真空下将溶剂除去,得到固体(131 mg,76.4%收率;TLC R_f=0.27(2%MeOH的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t=4.834min)。^1H NMR ($CDCl_3$,0.003% v/v TMS,400MHz):δ_H 0.90(3H,t)、1.30-1.40(4H,m)、1.63-1.73(2H,m)、 2.40-2.50(2H,m)、2.85-3.00(2H,m)、3.30-3.40(1H,m)、3.90(3H,s)、3.97(1H,dd)、 7.05(1H,s)、7.15(1H,dd)、7.20(1H,dd)、7.33(1H,d)、7.37(2H,d)、7.55(1H,d)、 7.93(2H,d)、8.05(1H,br s)。该方法用于合成以下化合物:MN0477、MN0642、MN0908、 MN1132、MN1133、MN1135、MN1137、MN1138、MN1152、MN1156、MN1157、MN1188、 MN1193、MN1197、MN1203、MN1206、MN1207、MN1208、MN1209、MN1210、MN1211、 MN1212、MN1213、MN1214、MN1216、MN1217、MN1218、MN1219。

[0570] 合成实例18:MN1212(通过方法G的耦联)

[0571] 

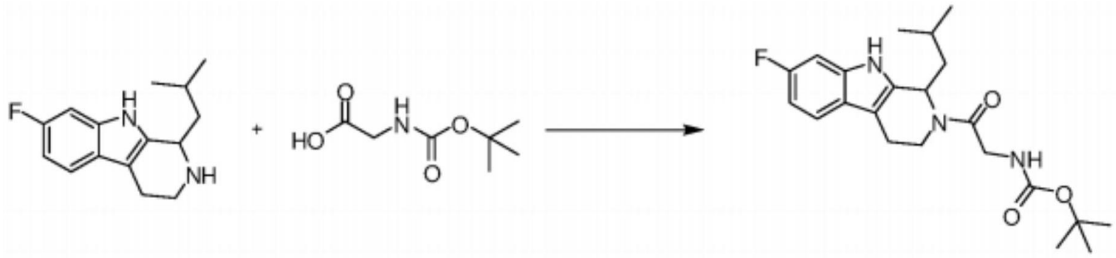
[0572] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(228mg,1.00mmol)溶解于CH_2Cl_2(20mL) 并在氮气的惰性氛围下在冰浴中冷却6min。通过注射器加入戊酰氯(120μL,1.00mmol)然 后直接加入三甲胺(TEA)(210μL,1.5mmol)。将反应从冰浴中移除并允许升温至室温。HPLC 表明反应在3.5hr时完成。将反应在真空下蒸发并干燥。将残留物溶解于EtOAc(100mL), 用1M柠檬酸(3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×50mL)和饱和NaCl溶液(50mL)洗涤。 将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发得到固体。通过硅胶色谱进一步纯化粗 产物:由0%、0.5%、0.75%、1%和2%MeOH的CH_2Cl_2溶液组成的5个级分(每个200mL)。将含有产物的级分合并,真空下将溶剂除去,得到固体(219mg,70.0%收率;TLC R_f=0.29(2% MeOH的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t=4.747min)。^1H NMR($CDCl_3$,0.003%v/v TMS,400MHz):δ_H 0.85-1.15(9H,m)、1.30-1.45(2H,m)、1.53-1.87(5H,m)、2.35-2.55(2H,m)、2.65-2.90(2H,m)、3.43-3.55(1H,m)、4.05(1H,dd)、5.85-5.95(1H,m)、7.07(1H,dd)、7.15(1H, dd)、7.30(1H,d)、7.45(1H,d)、7.80(1H,br s)。该方法用于合成以下化合物:MN0477、MN0642、MN0908、MN1132、MN1133、MN1135、MN1137、MN1138、MN1152、MN1156、 MN1157、MN1188、MN1193、MN1197、MN1203、MN1206、MN1207、MN1208、MN1209、 MN1210、MN1211、MN1212、MN1213、MN1214、MN1216、MN1217、MN1218、MN1219。

[0573] 合成实例19:MN1213(通过方法F的耦联)

[0574] 

[0575] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(228mg,1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲 胺丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(191mg,1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(12mg, 0.10mmol)和羟基苯并三唑(HOBT)(51mg,0.33mmol)均溶于乙腈(1.25mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(200μL,1.20mmol)。通过注射器加入4- 甲基戊酸(126μL,1.00mmol)。将反应搅拌18hr。将所得物用EtOAc(100mL)稀释溶液，用饱和NaCl溶液(2×50mL)、1M柠檬酸(3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×25mL)和饱 和NaCl溶液(2×50mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。通过 硅胶色谱进一步纯化粗产物:由0%、0.5%、0.75%、1%和2%MeOH的CH_2Cl_2溶液组成的5 个级分(每个200mL)。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂除去,得到固体(245mg, 75.0%收率;TLC R_f=0.29(2%MeOH的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t=4.869min)。^1H NMR ($CDCl_3$,0.003%v/v TMS,400MHz):δ_H 0.87-1.15(12H,m)、1.5-1.83(4H,m)、2.35-2.55(2H, m)、2.65-2.90(2H,m)、3.45-3.55(1H,m)、4.05(1H,dd)、5.85-5.90(1H,m)、7.10(1H,dd)、 7.15(1H,dd)、7.33(1H,d)、7.45(1H,d)、7.83(1H,br s)。该方法用于合成以下化合物：MN0580、MN1169、MN1172、MN1186、MN1189、MN1190、MN1194、MN1195、MN1220、 MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、MN1227、MN1228、MN1229、 MN1230、MN1231、MN1232、MN1233、MN1234、MN1235、MN1236、MN1237、MN1238、 MN1239、MN1240、MN1241、MN1242、MN1243、MN1244、MN1245、MN1246、MN1247、MN1248、MN1249、MN50、MN1251、MN1252、MN1253、MN1254、MN1255、MN1256、MN1257、MN1258、MN1259、MN1260、MN1261、MN1262、MN1263。

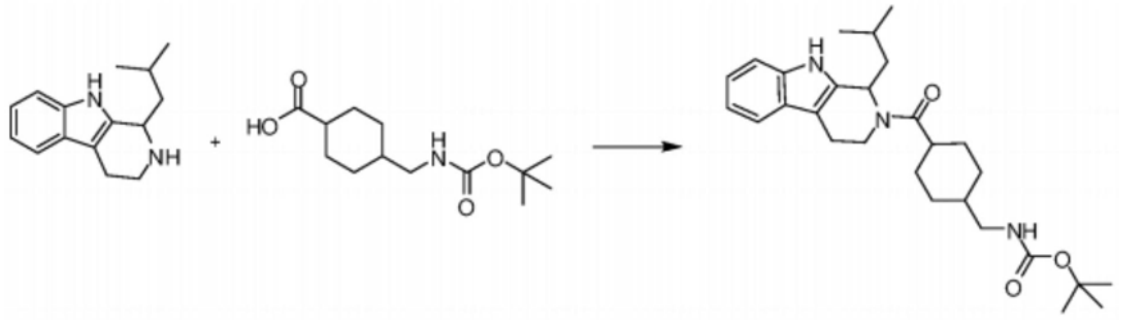
[0576] 合成实例20:MN1227(通过方法F的耦联)

[0577] 

[0578] 将7-氟-1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(247mg,1.00mmol)、1-乙基-3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(191mg,1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(12 mg,0.10mmol)和羟基苯并三唑(HOBT)(51mg,0.33mmol)均溶于乙腈(1.25mL)、二甲 基甲酰胺(DMF)(5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(200uL,1.20mmol)。向混合物中加入 N-Boc-甘氨酸(175mg,1.00mmol)。将反应在室温下搅拌16.5hr。将所得物用EtOAc(100mL) 稀释,用饱和NaCl溶液(2×50mL)、1M柠檬酸(3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×25mL) 和饱和NaCl溶液(50mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。通 过硅胶色谱进一步纯化粗产物:由己烷中的0%、5%、10%、10%、15%、15%、20%和20% EtOAc组成的8

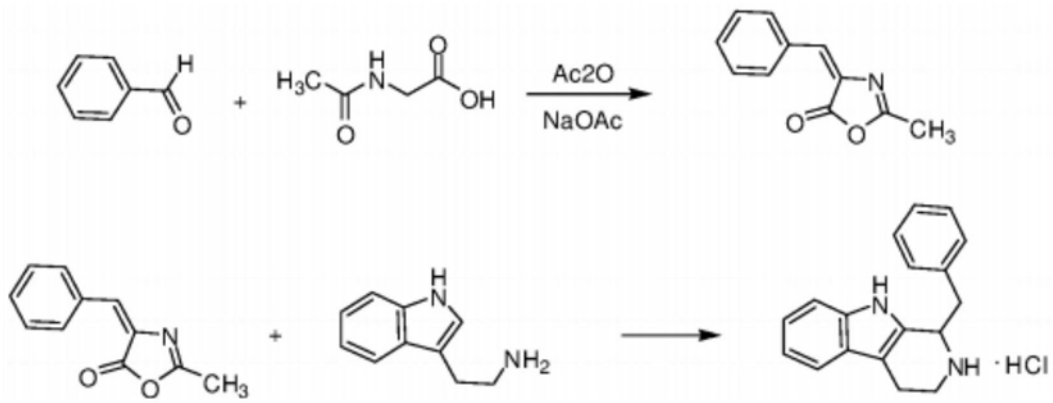
个级分(每个200mL)。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂除去,得 到固体(219.4mg,54.37%收率;TLC R_f=0.250(20%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.594 min)。^{1}H NMR($CDCl_3$,0.003%v/v TMS,400MHz):δ_H 0.95(3H,d)、1.08(3H,d)、1.45(9H, s)、1.60-1.85(3H,m)、2.65-2.90(2H,m)、3.40-3.53(1H,m)、3.85(1H,dd)、3.95-4.20(2H, m)、5.58(1H,br s)、5.75-5.83(1H,m)、6.80-6.90(1H,m)、6.97-7.05(1H,m)、7.30-7.37 (1H,m)、7.87(1H,br s)。该方法用于合成以下化合物:MN0580、MN1169、MN1172、MN1186、 MN1189、MN1190、MN1194、MN1195、MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、 MN1225、MN1226、MN1227、MN1228、MN1229、MN1230、MN1231、MN1232、MN1233、 MN1234、MN1235、MN1236、MN1237、MN1238、MN1239、MN1240、MN1241、MN1242、 MN1243、MN1244、MN1245、MN1246、MN1247、MN1248、MN1249、MN50、MN1251、 MN1252、MN1253、MN1254、MN1255、MN1256、MN1257、MN1258、MN1259、MN1260、 MN1261、MN1262、MN1263。

[0579] 合成实例21:MN1246(通过方法F的耦联)

[0580] 

[0581] 将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(228mg,1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲 胺丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(192mg,1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(12mg, 0.10mmol)和羟基苯并三唑(HOBT)(51mg,0.33mmol)均溶于乙腈(1.25mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(200uL,1.20mmol)。向混合物中加入Boc- 反式-4-(氨基甲基)环己烷-1-羧酸(257mg,1.00mmol)。将反应在室温下搅拌16hr。将所 得物用EtOAc(100mL)稀释,用饱和NaCl溶液(2×50mL)、1M柠檬酸(3×25mL)、饱和 $NaHCO_3$溶液(3×25mL)和饱和NaCl溶液(50mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。通过硅胶色谱进一步纯化粗产物:由己烷中的0%、1%、1.5%、2%和 2.5%MeOH组成的5个级分(每个200mL)。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂除去, 得到固体(401mg,86%收率;TLC R_f=0.16(10%EtOAc的CH_2Cl_2溶液);HPLC R_t=4.847 min)。该方法用于合成以下化合物:MN0580、MN1169、MN1172、MN1186、MN1189、MN1190、 MN1194、MN1195、MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、 MN1227、MN1228、MN1229、MN1230、MN1231、MN1232、MN1233、MN1234、MN1235、 MN1236、MN1237、MN1238、MN1239、MN1240、MN1241、MN1242、MN1243、MN1244、 MN1245、MN1246、MN1247、MN1248、MN1249、MN50、MN1251、MN1252、MN1253、 MN1254、MN1255、MN1256、MN1257、MN1258、MN1259、MN1260、MN1261、MN1262、 MN1263。

[0582] 合成实例22:MN1233中间体合成(通过吖内酯的环化)

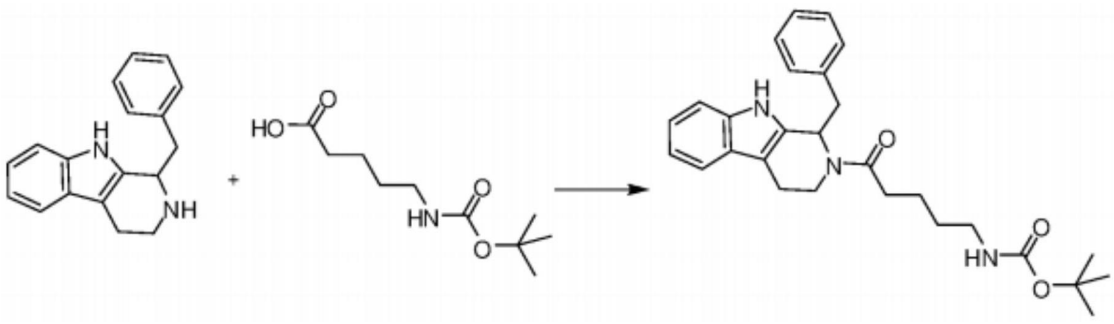
[0583] 

[0584] 参考:Herbst,R.M.,and Shemin,D.α-Acetaminocinnamic acid.Organic Syntheses,Coll.Vol. 2,p.1(1943);Vol.19,p.1(1939).Audia,J.E.,Droste,J.J.,Nissen,J.S.,Murdoch,G.L.,Evrard, D.A.,"Pictet-Spengler-like"Synthesis of Tetrahydro-β-carbolines under Hydrolytic Conditions. Direct Use of Azalactones as Phenylacetaldehyde Equivalents,J.Org.Chem.61,22 7937-7939(1996)

[0585] 4-苯亚甲基-2-甲基唑-5(4H)-酮合成:向乙酰甘氨酸(5.86g,50mmol)、乙酸钠(4.10g,50 mmol)的乙酸酐(47.3mL,500mmol)悬浊液加入苯甲醛(5.11mL,50mmol)。将反应混合 物在100℃油浴中加热10min至溶解。然后增加回流冷凝器并油浴加热至140℃,加热精确 1h。随后在搅拌下将反应瓶投入冰水浴中并允许搅拌1h。1h后,向暗红色溶液中的黄色固体 的悬浊液加入冰冷水(47mL)。将产物收集于烧结玻璃漏斗,在漏斗中搅拌下用冰冷水(3×50 mL)洗涤,将粗产物在干燥器中在固体KOH上方过夜干燥,得到4.6g的黄色粉末的产物。将该物质从85mL的热的2-丙醇重结晶,缓慢冷却至室温,在冰浴中变冷,随后通过过滤收 集得到2.98g、32%收率的纯化的4-苯亚甲基-2-甲基唑-5(4H)-酮:mp 148-151℃。

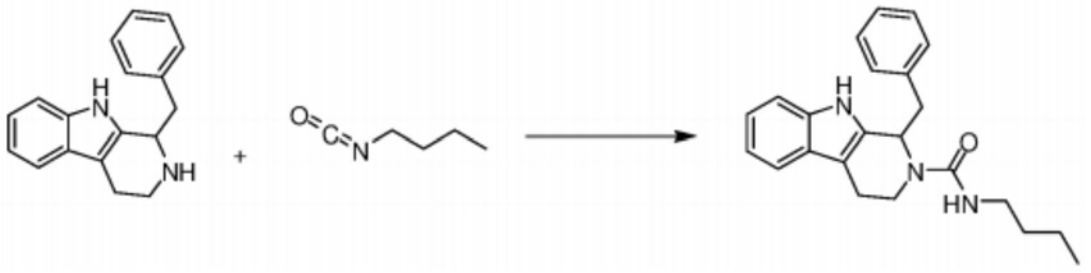
[0586] 1-苄基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚盐酸盐合成:将色胺盐酸盐(2.4g,10.2mmol 悬浮于1N HCl。加入氮杂内酯(4-苯亚甲基-2-甲基唑-5(4H)-酮)(2.3g,12.2mmol)并且将 该混合物在油浴中在氮气下用回流冷凝器在105℃加热至回流。15分钟后溶液澄清,1h后伴 随轻微冒泡开始形成沉淀物。将反应混合物回流过夜,然后在冰浴中冷却。将产物收集于烧 结玻璃,用水(100mL)洗涤。在真空干燥器中在固体KOH上方干燥泥浆状微细固体3天, 得到3.2g的灰白色固体产物。用冰冷的2-丙醇(2×10mL)并随后用冰冷的乙醚(10mL) 洗涤该物质,然后在真空下干燥过夜,得到3.0g、98%收率的灰白色粉末1-苄基-2,3,4,9-四氢 -1H-吡啶并[3,4-b]吲哚盐酸盐。该中间体用于合成以下化合物:MN1131和MN1233。

[0587] 合成实例23:MN1233(通过方法F的耦联)

[0588] 

[0589] 将1-苄基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚盐酸盐(297mg,1.00mmol)、1-乙基-3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(191mg,1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(12 mg,0.10mmol)和羟基苯并三唑(HOBT)(51mg,0.33mmol)均溶于乙腈(1.25mL)、二甲 基甲酰胺(DMF)(5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(400uL,2.40mmol)。向混合物中加入Boc-5-氨基戊酸(217mg,1.00mmol)。将反应在室温下搅拌16hr。将所得物用EtOAc(100mL)稀释,用饱和NaCl溶液(2×50mL)、1M柠檬酸(3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液(3×25mL) 和饱和NaCl溶液(50mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空下蒸发。通 过硅胶色谱纯化粗产物:由己烷中的0%、30%、35%、40%和45%EtOAc组成的5个级分(每 个200mL)。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂除去,得到固体(293mg,63%收率): TLC R_f=0.25(40%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.503min)。^1H NMR($CDCl_3$,0.003%v/v TMS,400MHz):δ_H 1.45(9H,s)、1.50-1.80(6H,m)、2.40-2.55(2H,m)、2.75-2.85(2H,m)、 3.10-3.25(2H,m)、3.35-3.43(1H,m)、4.05-4.10(1H,m)、4.63(1H,br s)、5.90-5.95(1H, m)、6.97-7.25(4H,m)、7.27-7.53(6H,m)。该方法用于合成以下化合物:MN0580、MN1169、 MN1131、MN1172、MN1186、MN1189、MN1190、MN1194、MN1195、MN1220、MN1221、 MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、MN1227、MN1228、MN1229、MN1230、 MN1231、MN1232、MN1233、MN1234、MN1235、MN1236、MN1237、MN1238、MN1239、 MN1240、MN1241、MN1242、MN1243、MN1244、MN1245、MN1246、MN1247、MN1248、 MN1249、MN50、MN1251、MN1252、MN1253、MN1254、MN1255、MN1256、MN1257、 MN1258、MN1259、MN1260、MN1261、MN1262和MN1263。

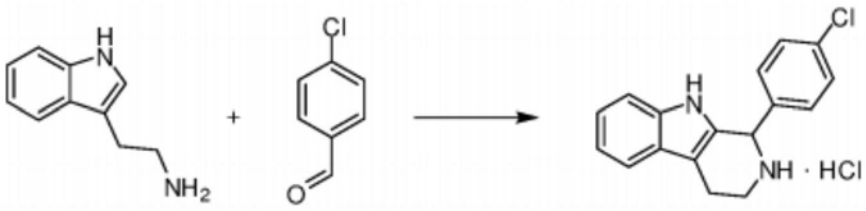
[0590] 合成实例24:MN1131(通过方法H的耦联)

[0591] 

[0592] 将1-(1-1-苄基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(781mg,2.98mmol)溶于$CHCl_3$(40 mL)并在氮气的惰性氛围下在冰浴中冷却10min。用注射器加入丁基异氰酸酯(504μL,4.47 mmol)。从反应从冰浴中移除并允许经过10min升温至室温。HPLC表明反应在1hr完全。将 反应蒸发并在真空下干燥。将残留物溶解于EtOAc(100mL),用饱和$NaHCO_3$溶液(3×30mL)、 1M柠檬酸(3×30mL)和饱和NaCl溶液(25mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过 滤并在真空下蒸发,得到灰白色固体(1.5g)。通过硅胶(70g)用色谱进一步纯化该物质:用8-200mL的级分:0%、2%、3%、4%、5%和6%MeOH的CH_2Cl_2溶液洗脱。将含有最纯 净的产

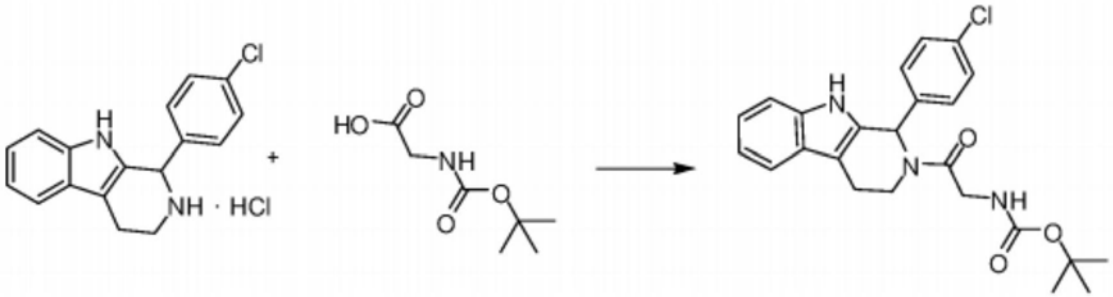
物的级分合并并蒸发得到1.02g的灰白色产物:TLC R_f=0.1(30%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.191min)。该方法用于合成以下化合物:MN733、MN1130、MN1131、MN1158、MN1160、MN1169、MN1171、MN1172、MN1184。

[0593] 合成实例25:MN1254(通过方法E的环化)

[0594] 

[0595] 将色胺(1.60g,10mmol)溶于EtOAc(5mL),通过旋流和用加热枪加热直至溶解。随后加入4-氯苯甲醛(1.48g,10.5mmol)。将反应器旋流并用加热枪加热至溶解。席夫碱中间体在2min内沉淀。将反应混合物冷却至室温并在烧结玻璃上收集中间体席夫碱,并随后在真空下干燥得到2.36g黄褐色粉末的中间体。将席夫碱溶解于乙腈/无水乙醇(12.5mL/12.5mL)。加入4N HCl的二氧六环溶液(4mL,16mmol)。将溶液加热至回流,在该点上结晶产 物的盐酸盐开始沉淀。将反应混合物冷却至-20℃,并在烧结玻璃上收集固体。该产物,1-(4- 氯苯基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚盐酸盐,在真空下干燥,得到2.16g,85%收率(总 体68%)的灰白色粉末:Mp:163-165℃(自由碱)。

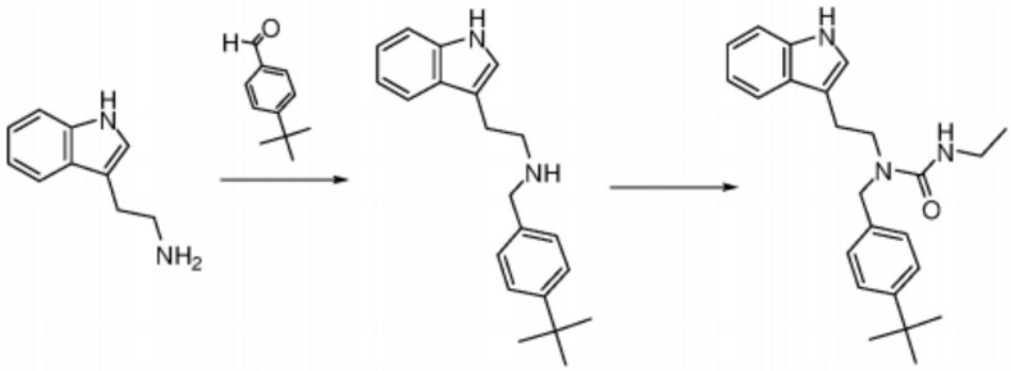
[0596] 合成实例26:MN1254(通过方法F的耦联)

[0597] 

[0598] 将1-1-(4-氯苯基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚盐酸盐(319mg,1.00mmol)、1- 乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(192mg,1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP)(12mg,0.10mmol)和羟基苯并三唑(HOBT)(51mg,0.33mmol)均溶于乙腈(1.25 mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(200uL,1.20mmol)。向混 合物中加入Boc-甘氨酸(175mg,1.00mmol)。将反应在室温下搅拌16hr。将所得物用EtOAc(100mL)稀释,用饱和NaCl溶液(2×50mL)、1M柠檬酸(3×25mL)、饱和$NaHCO_3$溶液 (3×25mL)和饱和NaCl溶液(50mL)洗涤。将有机层干燥(无水Na_2SO_4)、过滤并在真空 下蒸发。通过硅胶色谱纯化粗产物:由15%、20%和25%EtOAc的己烷溶液组成的3个级分 (每个200mL)。将含有产物的级分合并,并真空下将溶剂除去,得到固体(269mg,61%收 率;TLC R_f=0.30(25%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.574min)。该方法用于合成以下化 合物:MN0580、MN1169、MN1172、MN1186、MN1189、MN1190、MN1194、MN1195、 MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、MN1227、MN1228、 MN1229、MN1230、MN1231、MN1232、MN1233、MN1234、MN1235、MN1236、MN1237、 MN1238、MN1239、MN1240、MN1241、MN1242、MN1243、MN1244、MN1245、MN1246、 MN1247、MN1248、MN1249、MN50、MN1251、MN1252、MN1253、MN1254、MN1255、 MN1256、MN1257、MN1258、MN1259、MN1260、MN1261、MN1262、

MN1263。

[0599] 合成实例27:MN0716(吲哚类似物合成)

[0600] 

[0601] N-(4-叔丁基苄基)-2-(1H-吲哚-3-基)乙胺:向色胺(1.5g,9.4mmol)的无水乙醇(15 mL)的溶液中加入4-叔丁基苯甲醛(2.0mL,12mmol)。在冷却0℃前至将反应搅拌1h,并随后加入$NaBH_4$(750mg,19mmol)。将溶液在0℃下搅拌1h。在真空内将溶液浓缩并随后 在高度真空下干燥。将反应用1N HCl(～20mL)猝灭,随后加入EtOAc(100mL)以形成沉 淀。用固体K_2CO_3是混合物成碱性(pH 10)。分层,通过Na_2O4干燥并蒸发,得到300mg 的油状物。通过先加入1N HCl(10mL)、再加入EtOAc(50mL)纯化该物质,以沉淀固体 N-(4-叔丁基苄基)-2-(1H-吲哚-3-基)乙胺:260mg(9%收率);HPLC R_t(2.757min)。

[0602] 向N-(4-叔丁基苄基)-2-(1H-吲哚-3-基)乙胺(100mg,0.327mmol)的CH_2Cl_2冰冷溶液加入乙基异氰酸酯(26uL,0.327mmol)(在1.5mL CH_2Cl_2中冷至0℃)。将反应在0℃ 搅拌5min。1h后加入0.2当量的乙基异氰酸酯,并另外搅拌30min。用CH_2Cl_2稀释溶液并 用饱和$NaHCO_3$溶液洗涤。将溶液在硅胶上用己烷/乙酸乙酯[2:1-1:1]洗脱进行色谱分析,得 到129mg、100%收率的产物,HPLC R_t 4.664min;TLC R_f 0.16,10%EtOAc的CH_2Cl_2溶液。该方法用于合成以下化合物:MN0716、MN0733和MN1058。

[0603] 表1.物理数据和合成方法表

[0604]

化合物	HPLC R_t（min）	TLC R_f	TLC 洗脱	环化方法	形成胺的方法
MN0477	4.766	0.22	25% EtOAc 的己烷溶液	B	G
MN0580	3.473	0.14	4% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	E	F
MN0618	3.364	0.14	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	C	F
MN0642	4.797	0.24	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	D	G
MN0716	4.664	0.16	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	吲哚	H
MN0733	5.162	0.07	25% EtOAc 的己烷溶液	吲哚	G
MN0908	5.106	0.47	25% EtOAc 的己烷溶液	吲哚	G
MN1058	5.109	0.48	25% EtOAc 的己烷溶液	吲哚	G
MN1130	4.598	0.46	40% EtOAc 的己烷溶液	C	H
MN1131	4.462	0.22	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	氮杂内酯	H
MN1132	5.299	0.28	10% EtOAc 的己烷溶液	A	G
MN1133	4.803	0.41	3% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	G
MN1135	4.804	0.39	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	B	G
MN1137	4.968	0.5	4% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	G
MN1138	4.548	0.22	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	G
MN1151	4.696	0.81	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	B	H
MN1152	4.433	0.66	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	B	G
MN1156	4.284	0.22	25% EtOAc 的己烷溶液	B	G
MN1157	4.735	0.36	20% EtOAc 的己烷溶液	B	G
MN1158	5.162	0.52	25% EtOAc 的己烷溶液	B	H
MN1160	2.984	0.24	25% EtOAc 的己烷溶液	B	H
MN1169	4.404	0.21	25% EtOAc 的己烷溶液	B	H

	MN1171	4.680	0.81	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	B	H
	MN1172	4.405	0.19	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	B	H
	MN1184	3.957	0.1	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	市售	H
	MN1186	4.577	0.59	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1188	5.299	0.41	25% EtOAc 的己烷溶液	B	G
	MN1189	4.533	0.26	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1190	4.58	0.16	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1193	4.703	0.18	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	市售	G
	MN1194	4.652	0.14	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1195	4.777	0.1	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1197	4.801	0.41	3% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	G
	MN1203	4.559	0.32	25% EtOAc 的己烷溶液	A	G
	MN1206	4.553	0.32	25% EtOAc 的己烷溶液	A	G
	MN1207	4.735	0.44	25% EtOAc 的己烷溶液	A	G
	MN1208	4.876	0.36	20% EtOAc 的己烷溶液	A	G
	MN1209	4.79	0.38	25% EtOAc 的己烷溶液	A	G
	MN1210	4.834	0.27	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	D	G
	MN1211	3.734	0.14	4% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	B	G
	MN1212	4.747	0.29	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	G
	MN1213	4.869	0.29	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	G
	MN1214	5.137	0.48	25% EtOAc 的己烷溶液	A	G
	MN1216	4.823	0.4	25% EtOAc 的己烷溶液	B	G
[0605]	MN1217	5.057	0.47	25% EtOAc 的己烷溶液	E	G
	MN1218	3.733	0.11	4% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	E	G
	MN1219	4.808	0.27	25% EtOAc 的己烷溶液	B	G
	MN1220	4.412	0.1	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1221	4.639	0.32	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1222	4.637	0.34	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1223	4.256	0.08	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1224	4.404	0.19	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1225	4.229	0.08	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1226	4.517	0.1	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1227	4.594	0.25	20% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1228	4.771	0.29	20% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1229	4.867	0.13	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1230	4.698	0.12	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1231	4.191	0.1	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1232	4.241	0.19	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1233	4.503	0.25	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1234	4.5	0.28	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1235	4.451	0.41	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	市售	F
	MN1236	4.309	0.11	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	市售	F
	MN1237	4.18	0.14	3% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	市售	F
	MN1238	4.034	0.07	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	市售	F
	MN1239	3.817	0.1	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	E	F

	MN1240	4.771	0.14	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	D	F
	MN1241	3.674	0.17	4% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	E	F
	MN1242	4.511	0.09	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	B	F
	MN1243	4.507	0.1	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	B	F
	MN1244	4.465	0.08	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1245	4.435	0.1	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1246	4.847	0.16	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1247	4.599	0.13	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1248	4.418	0.21	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1249	4.719	0.29	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1250	4.599	0.31	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1251	4.395	0.18	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1252	4.56	0.24	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1253	4.742	0.26	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1254	4.574	0.3	25% EtOAc 的己烷溶液	E	F
	MN1255	4.641	0.29	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1256	4.518	0.27	25% EtOAc 的己烷溶液	E	F
	MN1257	4.496	0.24	25% EtOAc 的己烷溶液	B	F
[0606]	MN1258	4.497	0.49	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	B	F
	MN1259	4.314	0.32	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	市售	F
	MN1260	4.467	0.44	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	氮杂内酯	F
	MN1261	4.39	0.48	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	B	F
	MN1262	4.401	0.4	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	B	F
	MN1263	4.418	0.24	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	B	F
	MN1264	3.893	0.14	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	市售	F
	MN1265	4.714	0.11	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1266	4.755	0.14	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1270	4.596	0.11	2% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1271	4.732	0.11	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1272	4.634	0.09	10% EtOAc 的 CH_2Cl_2 溶液	A	F
	MN1279	4.487	0.19	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1280	4.321	0.17	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1285	4.57	0.04	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1286	4.448	0.03	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1289	4.714	0.08	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1290	4.580	0.17	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
	MN1291	4.359	0.09	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F

[0607] 化合物生物活性的总结

[0608] 图28显示了构效关系图表。在伤口愈合分析中完成癌细胞迁移的抑制百分比。与对照相 比,在存在候选药物的情况下,侵润的癌细胞占据的百分比面积通过Image J细胞软件定量, 该软件能够从照片进行细胞计数。通过在几种化合物浓度下进行迁移实验并然后应用希尔方 程(Hill's equation)来计算IC50。在存在或不存在候选药物的情况下,通过自动化细胞计数 来定量癌细胞增殖的抑制。定量的数据如图28所示。在这里,对候选药物的效力简单地评分, 4为最高抑制程度,0为最低。基于细胞形态和细胞密度,通过目视对候选药物的对干细胞多 能性或增殖的作用进行评分,其中0为在形态学或细胞数量方面没有变化,4为最深刻的作 用,干细胞呈现分化细胞的形态,以及少得多的细胞指示增殖的抑制。图29-72显示了每个 候选药物的效果的照片。成纤维细胞是稍晚阶段的祖细胞,因此它们不会改变形态。每个候 选药物的作用的评分为0-4,其中4为最高程度抑制细胞增殖(图

28)。

[0609] 药学组合物

[0610] 本发明的某些化合物包括不对称取代的碳原子。这些不对称取代的碳原子可以导致本发 明的化合物包括在特定的不对称取代的碳原子上的立体异构体的混合物,或单一的立体异构 体。结果,本发明的化合物的外消旋体混合物、非对映异构体混合物以及单一的非对映异构 体包括在本发明内。术语“S”和“R”构型,如本文所使用的,由IUPAC 1974“RECOMMENDATIONS FOR SECTIONE,FUNDAMENTAL STEREOCHEMISTRY,”Pure Appl.Chem.45:13-30,1976限定。术语α和β用于环状化合物的环位置。参考平面的α侧是 优选取代位于较低数值位置的一侧。那些位于参考平面相反侧的取代指定为β描述符。值得 注意的是,这种用法不同于环立体化学中的用法,其中,“α”表示“位于平面之下”,表示 绝对构型。术语α和β构型,如本文所使用的,由“Chemical Abstracts Index Guide,”Appendix IV,paragraph 203,1987限定。

[0611] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的盐”是指本发明的化合物的无毒的酸盐或碱土 金属盐。这些盐可在化合物最终的分离和纯化步骤中原位制备,或使碱或酸官能团分别与合 适的有机或无机酸或碱单独反应。代表性的盐包括但不限于:乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、 柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、 二葡糖酸盐、环戊烷丙酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫 酸盐、庚酸盐、己酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶盐(pectinate)、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、 硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。同时,碱性含氮基团可被以下试剂季铵化,如烷基 卤化物,诸如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物;二烷基硫酸盐,如二甲基、 二乙基、二丁基和二戊基硫酸盐;长链卤化物,诸如癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基氯化 物、溴化物和碘化物;芳烷基卤化物,如苄基和苯乙基溴化物,等等。因此包含水溶或油溶 或可分散的产物。

[0612] 可用于形成药学上可接受的酸加成盐的酸的实例包括这样的无机酸如盐酸、硫酸和磷酸 以及这样的有机酸如草酸、马来酸、甲磺酸、琥珀酸和柠檬酸。碱性加成盐可以在本发明化 合物的最终分离和纯化过程中原位制备,或者通过使羧酸部分与合适的碱例诸如药学上可接 受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐或与氨或者有机伯胺、仲胺或叔胺反应而分 离。药学上可接受的盐包括但不限于基于碱金属和碱土金属的阳离子,诸如钠、锂、钾、钙、 镁、铝盐等,以及无毒的铵,季铵和胺阳离子包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、 二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。可用于形成碱加成盐的其它代表性有机胺包括二乙胺、 乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等。

[0613] 本文使用的术语“药学上可接受的前药”是指在合理的医学判断范围内,适用于与人类 和低等动物的组织接触而没有不适当的毒性、刺激性、过敏反应等,与合理的利益/风险比相 称,并且对于其预期用途有效的本发明化合物的那些前药,以及可能的情况下本发明化合物 的两性离子形式。术语“前药”是指在体内快速转化以产生上式的母体化合物的化合物,例 如通过在血液中水解。在Higuchi,T.和V.Stella,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems,”A.C.S. Symposium Series 14中,以及在“Bioreversible Carriers

in Drug Design,"Edward B.Roche (ed.),American Pharmaceutical Association, Pergamon Press,1987中提供了全面的讨论,这 两篇均通过引用并入本文。

[0614] 本发明的化合物可用于在体外或体内抑制癌细胞的生长。这些化合物可以单独使用或与 药学上可接受的载体或赋形剂一起用于组合物中。合适的药学上可接受的载体或赋形剂包括, 例如,加工试剂和药物递送修饰剂以及增强剂,例如,磷酸钙、硬脂酸镁、滑石、单糖、二 糖、淀粉、明胶、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、葡萄糖、羟丙基-β-环糊精、聚乙 烯吡咯烷酮、低熔点蜡、离子交换树脂等,以及它们中任何两个或更多个的组合。在 "Remington's Pharmaceutical Sciences,"Mack Pub.Co.,New Jersey,1991中描述了其他适合 的药学上可接受的赋形剂,通过引用并入本文。

[0615] 本发明化合物的有效量通常包括通过本文所述的任何测定法、通过本领域普通技术人员 已知的其他MUC1*阳性活性测定法或通过检测癌症症状的抑制剂或缓解剂而足以可检测地 抑制MUC1*阳性活性的任何量。

[0616] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的宿主和特定的给药 模式而变化。然而,应该理解,对于任何特定患者的具体剂量水平将取决于各种因素,包括 所采用的特定化合物的活性、年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、给药时间、给药途 径、排泄率、药物组合以及正在进行治疗的特定疾病的严重程度。给定情况的治疗有效量可 以通过常规实验容易地确定,并且在普通临床医师的技能和判断范围内。

[0617] 为了本发明的目的,治疗有效剂量通常是以单剂量或分剂量施用给宿主的总日剂量,可 以为例如每日0.001至1000mg/kg体重的量,和更优选每日1.0至30mg/kg体重。剂量单位组 合物可以含有这样的约数的量以组成日剂量。

[0618] 本发明的化合物可以以含有所需要的常规无毒药学上可接受的载体,佐剂和载剂的剂量 单位制剂口服、肠胃外、舌下、通过气雾剂或吸入喷雾剂、直肠或局部给药。局部给药也可 能涉及使用透皮给药的使用,诸如透皮贴剂或离子电泳设备。本文使用的术语"胃肠外"包 括皮下注射,静脉内、肌内、胸骨内注射或输注技术。

[0619] 可根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制可注射制剂,例如无菌可注 射水性或油性混悬剂。无菌注射制剂还可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌 可注射溶液或悬浮液,例如作为1,3-丙二醇中的溶液。在可接受的载体和溶剂中可以采用水, 林格(Ringer's)溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的单或双甘油酯。另外,发现脂肪酸如 油酸可用于制备注射剂。

[0620] 用于药物的直肠给药的栓剂可通过将药物与合适的无刺激性赋形剂(诸如可可脂和聚乙 二醇)混合来制备,所述赋形剂在常温下为固体,但在直肠温度下为液体并因此在直肠中融 化并且释放药物。

[0621] 用于口服给药的固体剂型可以包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这样的固体剂 型中,活性化合物可以与至少一种惰性稀释剂诸如蔗糖乳糖或淀粉混合。正常情况下,这样 的剂型还可以包含除惰性稀释剂以外的其他物质,例如润滑剂如硬脂酸镁。在胶囊、片剂和 丸剂的情况下,剂型还可以包含缓冲剂。片剂和丸剂可以另外用肠溶衣制备。

[0622] 用于口服给药的液体剂型可以包括药学上可接受的乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏 剂,其含有本领域常用的诸如水的惰性稀释剂。这样的组合物也可以包括佐剂,诸如

湿润剂、乳化和混悬剂、环糊精、和甜味剂、调味剂以及芳香剂。

[0623] 本发明的化合物也能够以脂质体的形式给药。如本领域所已知的，脂质体一般来源于磷 脂或其他脂类物质。脂质体由分散在水性介质中的单层或多层水合液晶形成。可以使用能够 形成脂质体的任何无毒的，生理上可接受的和可代谢的脂质。除了本发明的化合物之外，本 发明以脂质体形式的组合物还可含有稳定剂、防腐剂、赋形剂等。优选的脂质是天然和合成 的磷脂和磷脂酰胆碱(卵磷脂)。形成脂质体的方法是本领域已知的。参见例如Prescott(ed.), "Methods in Cell Biology,"Volume XIV,Academic Press,New York, 1976,p.33et seq。

[0624] 虽然本发明的化合物可以作为唯一的活性药学试剂来给予，但它们也可以与用于治疗癌 症的一种或多种其他试剂组合使用。可用于与本发明化合物组合用于治疗癌症的代表性试剂 包括例如依立替康、拓扑替康、吉西他滨、格列卫、赫赛汀、5-氟尿嘧啶、亚叶酸、卡铂、 顺铂、紫杉烷、特扎西他滨、环磷酰胺、长春花生物碱、伊马替尼、蒽环类抗生素、利妥昔 单抗、曲妥珠单抗、拓扑异构酶I抑制剂以及其他癌症化疗剂。

[0625] 与本发明化合物组合使用的上述化合物将按照Physicians'Desk Reference (PDR)第47 版(1993)中所示的治疗量使用，其通过引用并入本文，或者这样的治疗有用量如对于本领 域的普通技术人员来说是已知的。

[0626] 本发明的化合物和其他抗癌剂可以以推荐的最大临床剂量或以较低剂量给药。取决于给 药途径，疾病的严重程度和患者的反应，本发明组合物中活性化合物的剂量水平可以变化以 获得期望的治疗反应。该组合可作为分开的组合物或作为含有两种试剂的单一剂型给药。当 作为组合物给药时，治疗剂可以配制为分开的组合物，其可以在相同时间或不同时间给予，或者配制为治疗剂可以作为单一组合物给予。

[0627] 在血液癌症诸如慢性粒细胞白血病(CML)中，染色体易位是组成型活化的BCR-ABL酪氨酸激酶的原因。作为抑制Abl激酶活性的结果，患病患者对小分子酪氨酸激酶抑制剂GLEEVEC®有反应。然而，许多晚期疾病的患者最初对GLEEVEC®有反应，但后来由于Abl激酶结构域中赋予抗性的突变而复发。体外研究已经证实，BCR-Av1采用Raf激酶途径来引起其作用。另外，在相同途径中抑制多于一种激酶提供了抵抗赋予抗性的突变的额外保护。因此，在本发明的另一方面，本发明化合物与至少一种另外的试剂诸如GLEEVEC®组合用于 治疗血液癌症，诸如慢性粒细胞性白血病(CML)，以逆转或防止对该至少一种另外的药剂 的抗性。

[0628] 在本发明的另一方面，提供了包含一种或多种本发明化合物的试剂盒。代表性的试剂盒 包括本发明的化合物和包装说明书或其他标签，包括通过给予MUC1*抑制量的化合物来治疗 细胞增殖性疾病的说明。

[0629] 本发明在范围上不受本文描述的特定实施例的限制。事实上，除了本文所描述的那些之 外，本发明的各种修改对于本领域技术人员而言从前面的描述和附图将变得显而易见。这些 修改意图落入所附权利要求的范围内。下面的实例是通过对本发明的说明的方式来提供的，而不是作为限制。

[0630] 实例

[0631] 实例1幼稚状态干细胞的生长。

[0632] 在含有浓度为2-32nM的人重组$NME7_{AB}$的最低限度无血清培养基中培养干细胞，不

论 是胚胎干细胞还是诱导多能干(iPS)细胞,其中优选4-8nM,更优选4nM。为了促进表面附着,将细胞培养板用浓度为2-100ug/mL的涂覆溶液的称为MN-C3或C3或MN-C8的抗 MUC1*单克隆抗体涂覆,其中优选3-50ug/mL以及更优选6-12.5ug/mL。在这些实验中,使 用12.5ug/mL的MN-C3。将抗体涂覆的板在接种干细胞前在4℃下温育过夜。加入Rho激酶 I抑制剂以增强表面附着。在某些情况下,$NME7_{AB}$被人重组NME1二聚体取代,这种二聚体 也诱导干细胞恢复到幼稚样状态。

[0633] 实例2启动状态干细胞的生长。

[0634] 在含有浓度为8ng/mL的人重组bFGF的最低限度无血清培养基中培养干细胞,不论是胚 胎干细胞还是诱导多能干(iPS)细胞。将干细胞接种到非活性的小鼠胚胎成纤维细胞,又称 为MEF的表面,其分泌额外的不典型的生长因子和细胞因子。

[0635] 实例3针对转移性癌症的抑制剂的药物筛选

[0636] 平行培养人类幼稚状态和启动的干细胞至少5代以保证正常无分化的生长。将干细胞以 每孔50,000个细胞接种于12孔细胞培养板中。将细胞在其各自的培养基(bFGF培养基或 $NME7_{AB}$培养基)中培养24小时。当指示时,移除培养基并替换为不含bFGF或$NME7_{AB}$的培养基。将测试诱导幼稚干细胞分化的能力的试剂以所示浓度添加到培养基中。72小时后,拍摄照片见图1-10。

[0637] 实例4针对癌症或转移性癌症的抑制剂的药物筛选

[0638] 平行培养人类幼稚状态和启动的干细胞至少5代以保证正常无分化的生长。将干细胞以 每孔50,000个细胞接种于12孔细胞培养板中。将细胞在其各自的培养基(bFGF培养基或 $NME7_{AB}$培养基)中培养24小时。随后移除培养基并替换为不含bFGF或$NME7_{AB}$的培养基。以500nM或1uM添加BRD4抑制剂JQ1或非活性立体异构体并测试其诱导幼稚干细胞分化 的能力。48小时后更换培养基并用含有BRD4抑制剂的新鲜培养基替代。4天后实验停止。 拍摄照片并收集细胞沉淀用于进一步分析,参见图11-16。

[0639] 实例5迁移测试

[0640] 对于癌细胞迁移实验,将癌细胞以不同的密度接种到Oris细胞迁移测定Collagen-1涂覆 的96孔板(Platypus Technologies LLC,Madison,WI)中。Collagen-1涂覆的96孔板包含一 个特定的真空塞,它附接到每个孔的底部,形成一个细胞无法生长进去的区域。一旦细胞以 高密度接种到每个孔中,对它们给予18-24小时的时间段以附着到孔的底部。将24小时后的 塞子从板上移除,随后将小分子类似物加入孔中。拍摄每个孔的图像并表示每个孔的0时间 (T=0)。在24、48、72、96和120小时的时间点拍摄孔的图像。使用在这些特定时间点拍 摄的图像进行数据分析。图片导入到ImageJ(Rasband,W.S.,ImageJ,U.S.National Institutes of Health,Bethesda,Maryland,USA,http://imagej.nih.gov/ij/,1997-2016.)并计算没有细胞的剩余 面积。为了确定小分子类似物与DMSO对照的有效性,将在每个时间点收集的面积与T=0 图像的面积进行比较,从而得出每个孔剩余的面积百分比。然后将收集的数据标准化至每个 实验中的DMSO对照。

[0641] 实例6.增殖实验

[0642] 对于癌细胞增殖实验,将癌细胞以恒定密度(6000个细胞/孔)接种到96孔白壁/透明底 部组织培养物处理板(Corning Incorporated,Big Flats,NY)上。在含有2%FBS的培养基中 于T=24小时添加小分子类似物。在加入小分子后,细胞保持未接触120小时,在接

种后24、48、72和96小时进行视觉确认/检查。在120小时时，在板上进行钙黄素荧光测定(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)。钙黄素荧光(终浓度为0.5μM)用于评估细胞活力。在TECAN SAFIRE^{2}分光光度计读板器中测量癌细胞荧光。然后使用Olympus IX71荧光成像显微镜对板 进行成像，并使用ImageJ组装所得图像的拼集。

[0643] 参考文献

[0644] Nichols J,Smith A.Naive and primed pluripotent states.Cell Stem Cell.2009;4:487-492.

[0645] Silva J,Barrandon O,Nichols J,Kawaguchi J,Theunissen TW,ASmith.Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition.PLoS Biol.2008;6:e253.

[0646] Gafni O,Weinberger L,Mansour AA,Manor YS,Chomsky E,Ben-Yosef D,Kalma Y,Viukov S,Maza I,Zviran A,Rais Y,Shipony Z,Mukamel Z,Krupalnik V,Zerbib M,Geula S,Caspi I, Schneir D,Shwartz T,Gilad S,Amann-Zalcenstein D,Benjamin S,Amit I,Tanay A,Massarwa R, Novershtern N,Hanna JH.Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells.Nature.2013;504:282-286.

[0647] Theunissen TW,Powell BE,Wang H,Mitalipova M,Faddah DA,Reddy J,Fan ZP,Maetzel D, Ganz K,Shi L,Lungjangwa T,Imsoonthornruksa S,Stelzer Y,Rangarajan S,D'Alessio A,Zhang J, Gao Q,Dawlaty MM,Young RA,Gray NS,Jaenisch R.Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency.Cell Stem Cell. 2014;15:471-487.

[0648] Smagghe BJ,Stewart AK,Carter MG et al.MUC1*ligand,NM23-H1,is a novel growth factor that maintains human stem cells in a more naive state.PLoS One.2013;8:e58601.

[0649] Hikita ST,Kosik KS,Clegg DO et al.MUC1*mediates the growth of human pluripotent stem cells.PLoS One.2008;3:e3312.

[0650] Hanna J,Cheng AW,Saha K,Kim J,Lengner CJ,Soldner F,Cassady JP,Muffat J,Carey BW, Jaenisch R..Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs.Proc Natl Acad Sci U S A.2010;107:9222-9227.

[0651] Ware CB,Nelson AM,Mecham B,Hesson J,Zhou W,Jonlin EC,Jimenez-Caliani AJ,Deng X, Cavanaugh C,Cook S,Tesar PJ,Okada J,Margaretha L,Sperber H,Choi M,Blau CA,Treuting PM,Hawkins RD,Cirulli V,Ruohola-Baker H..Derivation of naive human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A.2014;111:4484-4489.

[0652] Belkina AC,Nikolajczyk BS,Denis GV.BET protein function is required for inflammation: Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses. J Immunol.2013;190(7):3670-8.

[0653] Tang X,Peng R,Phillips JE,Deguzman J,Ren Y,Apparsundaram S,Luo Q,Bauer CM, Fuentes ME,DeMartino JA,Tyagi G,Garrido R,Hogaboam CM,Denton CP,Holmes AM,Kitson C,Stevenson CS,Budd DC.Assessment of Brd4 inhibition in

idiopathic pulmonary fibrosis lung fibroblasts and in vivo models of lung fibrosis.Am J Pathol.2013 183(2):470-9

[0654] Filippakopoulos P,Qi J,Picaud S,Shen Y,Smith WB,Fedorov O,Morse EM, Keates T, Hickman TT,Felletar I,Philpott M,Munro S,McKeown MR,Wang Y,Christie AL,West N, Cameron MJ,Schwartz B,Heightman TD,La Thangue N,French CA,Wiest O, Kung AL,Knapp S, Bradner JE.Selective inhibition of BET bromodomains.Nature.2010;468(7327):1067-73

[0655] Tang X,Peng R,Phillips JE,Deguzman J,Ren Y,Apparsundaram S,Luo Q, Bauer CM, Fuentes ME,DeMartino JA,Tyagi G,Garrido R,Hogaboam CM,Denton CP, Holmes AM,Kitson C,Stevenson CS,Budd DC..Assessment of Brd4 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis lung fibroblasts and in vivo models of lung fibrosis.Am J Pathol.2013;183(2):470-9

[0656] Horm TM,Bitler BG,Broka DM,Louderbough JM,Schroeder JA.MUC1 drives c-Met-dependent migration and scattering.Mol Cancer Res.2012 10(12):1544-54

[0657] Meng XG,Yue SW.Dexamethasone disrupts cytoskeleton organization and migration of T47D Human breast cancer cells by modulating the AKT/mTOR/RhoA pathway.Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(23):10245-50.

[0658] Zheng C1,Fang Y,Tong W,Li G,Wu H,Zhou W,Lin Q,Yang F,Yang Z,Wang P, Peng Y, Pang X,Yi Z,Luo J,Liu M,Chen Y.Synthesis and biological evaluation of novel tetrahydro-β-carboline derivatives as antitumor growth and metastasis agents through inhibiting the transforming growth factor-βsignaling pathway.J Med Chem.2014;57(3)

[0659] Carter MG,Smagghe BJ,Stewart AK,Rapley JA,Lynch E,Bernier KJ,Keating KW, Hatziioannou VM,Hartman EJ,Bamdad CC.APrimitive Growth Factor,NME7AB,Is Sufficient to Induce StableNaïveState Human Pluripotency;Reprogramming in This Novel Growth Factor Confers Superior Differentiation.Stem Cells.2016;34 (4):847-59.

[0660] Mani SA,Guo W,Liao MJ,Eaton EN,Ayyanan A,Zhou AY,Brooks M,Reinhard F, Zhang CC,Shipitsin M,Campbell LL,Polyak K,Brisken C,Yang J,Weinberg RA.The epithelial-mesenchymal transitiongeneratescells with properties of stem cells.Cell.2008;133(4)

[0661] S.Meng,L.Zhang,Y.Tang,Q.Tu,L.Zheng,L.Yu,D.Murray,J.Cheng,S.H.Kim, X.Zhou and J.Chen,BET Inhibitor JQ1 Blocks Inflammation and Bone Destruction.J Dent Res.2014; 93(7):657-662.

[0662] 本文所列举的所有的参考文献通过引用并入本文。

[0663] 本领域的技术人员将认识到或仅仅使用常规实验就能够确定本文具体描述的本发明的具 体实施方式的许多等同物。

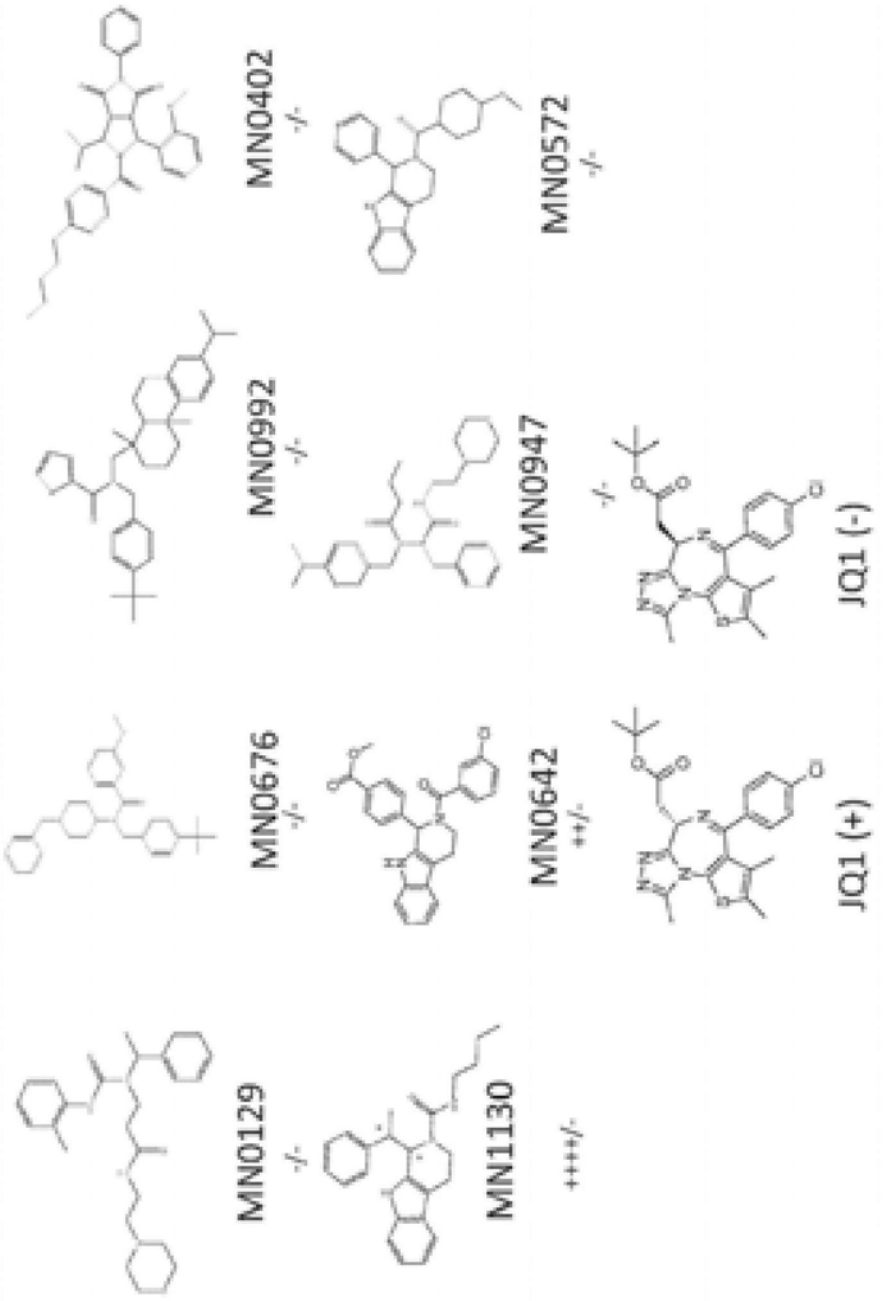

MN0402
-/-
MN0572
-/-
MN0992
-/-
MN0947
-/-
JQ1 (-)
MN0676
-/-
MN0642
++/-
JQ1 (+)
MN0129
-/-
MN1130
++++/-

图1

干细胞的筛选中的结果的总结。将候选药物加至在96h后的幼稚干细胞与启动干细胞，以一次6 μM的分子小分子。"-"表明在6 μM没有对多能性成熟的抑制，"+"表明抑制多能性成熟，ND=无数据

化合物	在MEP上的启动干细胞FOP	在实验中启动干细胞无生长因子	在MUC1抗体表面的幼稚干细胞NME7[a]	在实验中幼稚干细胞无生长因子
E6 Fab 40 ug/mL	-	-	+	++
$MUC1^{*}_{ecd}$ μ 10uM	-	-	+	++
PBS 对照	-	ND	-	ND
DMSO 0.2% 对照	-	ND	-	ND
抗NME7 Ab #56	ND	-	ND	-
抗NME7 Ab #61	ND	-	ND	++
MN0842	-	-	++	++
MN1130	+	+	++++	++++
MN0572	-	+	-	+
MN0947	-	-	-	-
MN0129	-	-	-	-
MN0676	-	-	-	-
MN0402	-	-	-	-
MN0992	-	-	-	-

图2

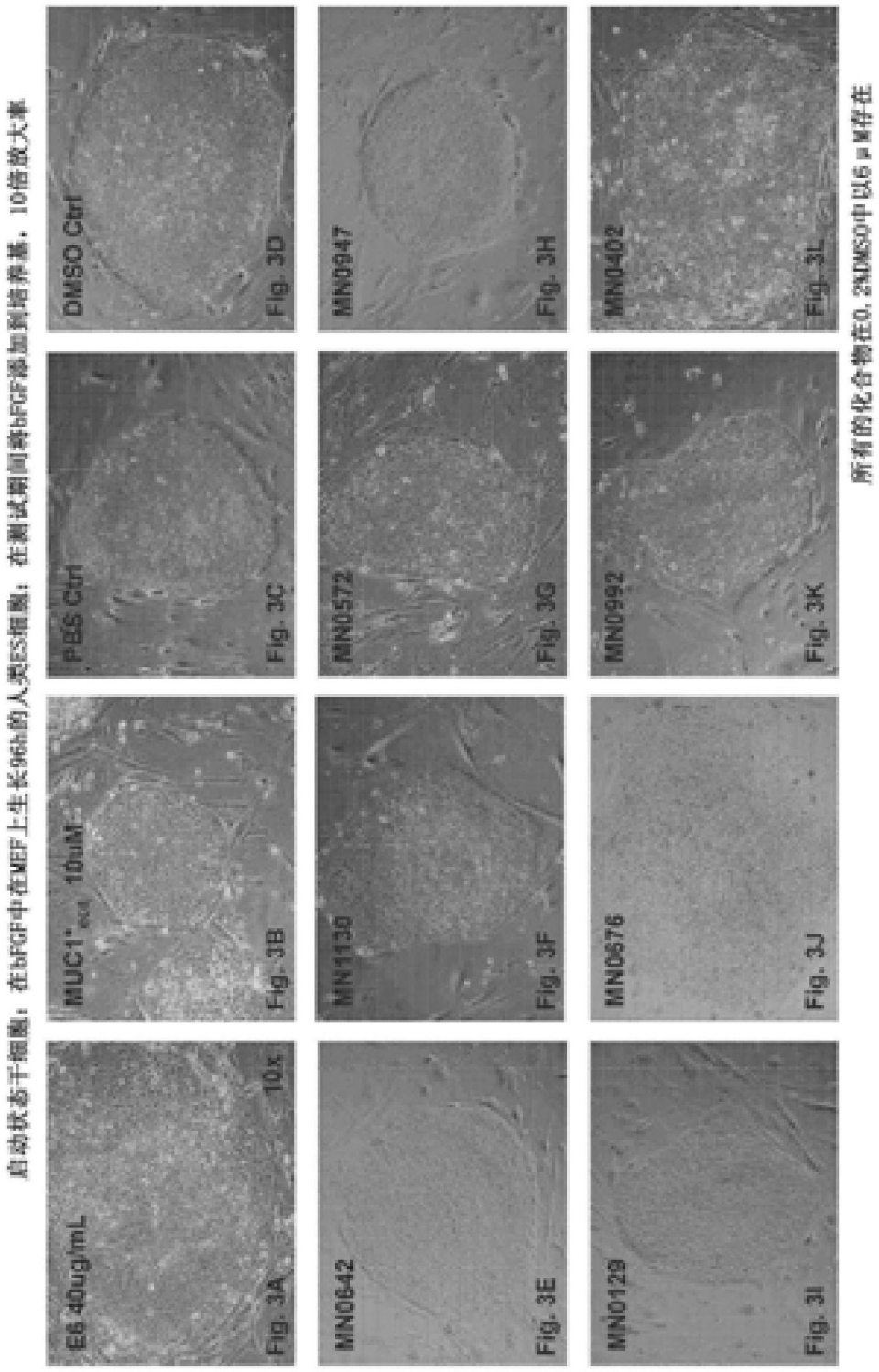

启动软骨干细胞：在bFGF中在MEF上生长96h的人类ES细胞；在测试期间将bFGF添加到培养基，10倍放大率
EB 40ug/mL
10x
Fig. 3A
MUC1* ECD 10uM
Fig. 3B
PBS Ctrl
Fig. 3C
DMSO Ctrl
Fig. 3D
MN0842
Fig. 3E
MN1130
Fig. 3F
MN0572
Fig. 3G
MN0947
Fig. 3H
MN0129
Fig. 3I
MN0676
Fig. 3J
MN0992
Fig. 3K
MN0402
Fig. 3L
所有的化合物在0.2%DMSO中以6 mM存在

图3

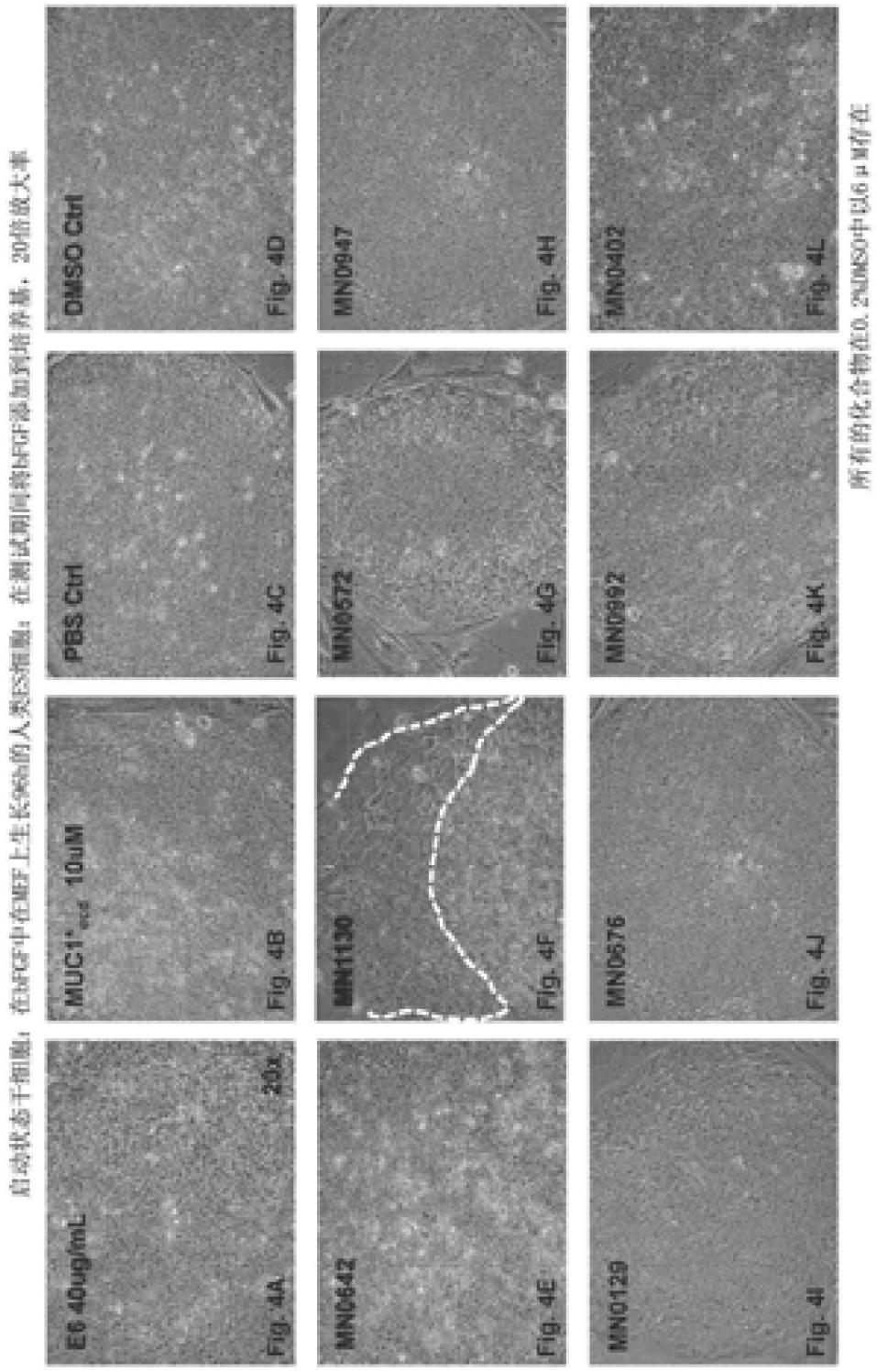

启动状态干细胞；在bFGF中在MEF上生长6wk的人类ESC细胞；在测试期间将bFGF添加到培养基，20倍放大率
所有的化合物在0.25%DMSO中以6μM存在
E6 40ug/mL
20x
Fig. 4A
MUC1*ecd 10μM
Fig. 4B
PBS Ctrl
Fig. 4C
DMSO Ctrl
Fig. 4D
MN0642
Fig. 4E
MN1130
Fig. 4F
MN0572
Fig. 4G
MN0947
Fig. 4H
MN0129
Fig. 4I
MN0576
Fig. 4J
MN0992
Fig. 4K
MN0402
Fig. 4L

图4

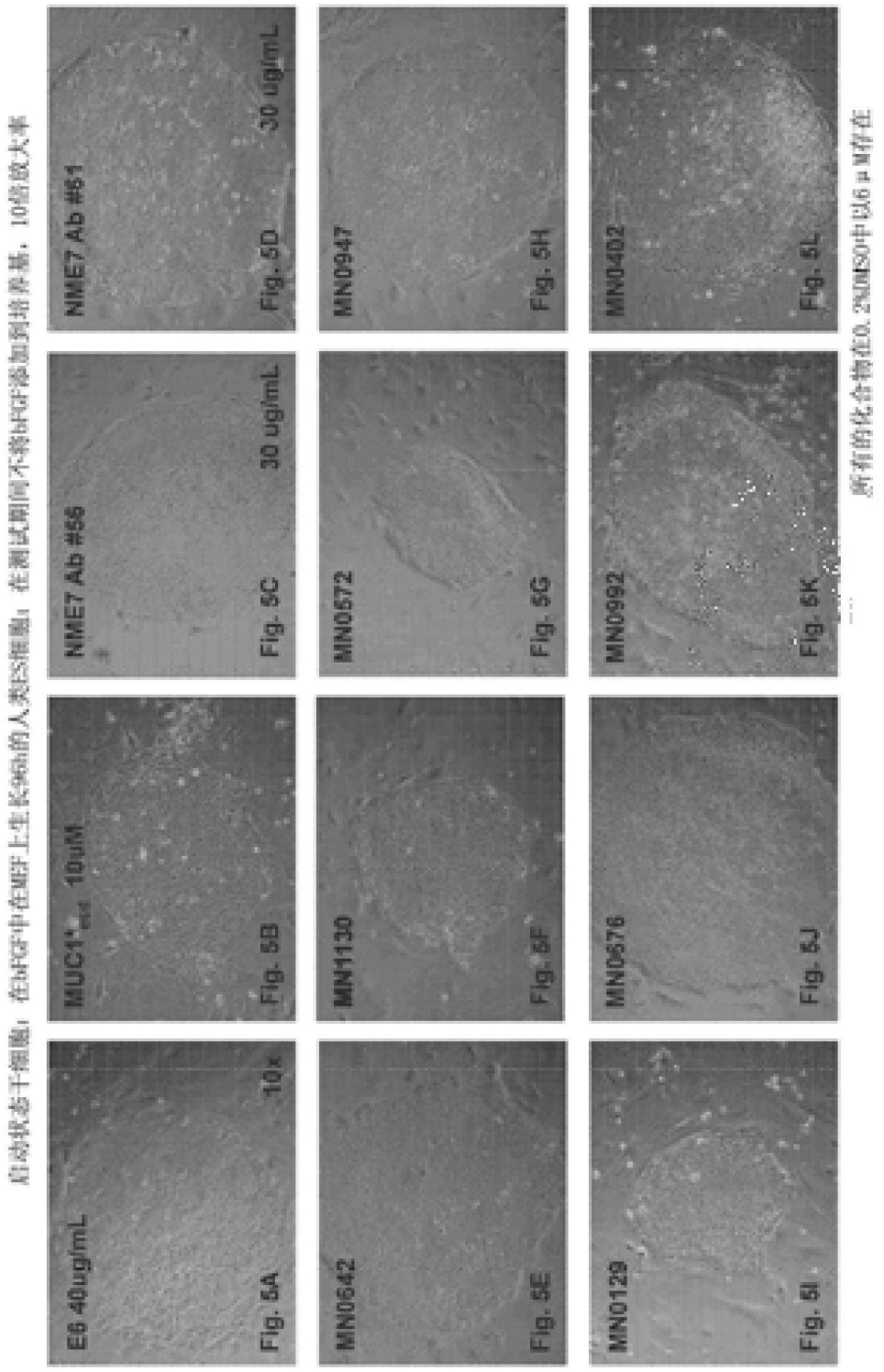

E6 40ug/mL
10x
Fig. 5A
MUC1*ecd 10uM
Fig. 5B
NME7 Ab #56
30 ug/mL
Fig. 5C
NME7 Ab #61
30 ug/mL
Fig. 5D
MN0642
Fig. 5E
MN1130
Fig. 5F
MN0572
Fig. 5G
MN0947
Fig. 5H
MN0129
Fig. 5I
MN0576
Fig. 5J
MN0992
Fig. 5K
MN0402
Fig. 5L
启动状态干细胞；在bFGF中在MEF上生长6wk的人类ES细胞；在测试期间不将bFGF添加到培养基，10倍放大率
所有的化合物在0.2%DMSO中以6 μM存在

图5

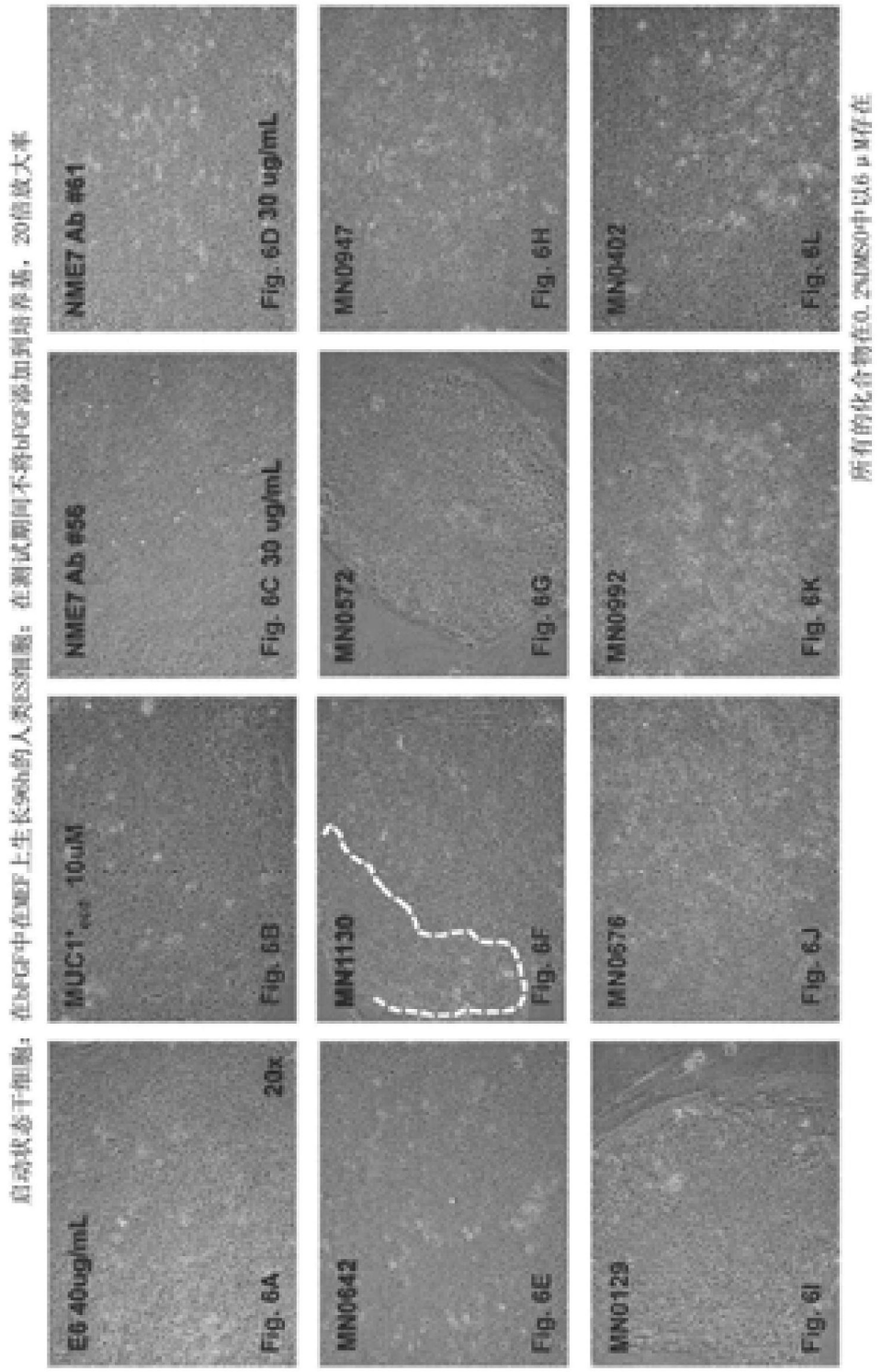

启动状态干细胞：在bFGF中在MEF上生长96h的人类ES细胞；在测试期间不将bFGF添加到培养基，20倍放大率
E6 4ug/mL
20x
Fig. 6A
MUC1'ext 10uM
Fig. 6B
NME7 Ab #56
Fig. 6C 30 ug/mL
NME7 Ab #61
Fig. 6D 30 ug/mL
MN0642
Fig. 6E
MN1130
Fig. 6F
MN0572
Fig. 6G
MN0947
Fig. 6H
MN0129
Fig. 6I
MN0576
Fig. 6J
MN0992
Fig. 6K
MN0402
Fig. 6L
所有的化合物在0.2%DMSO中以6 μM存在

图6

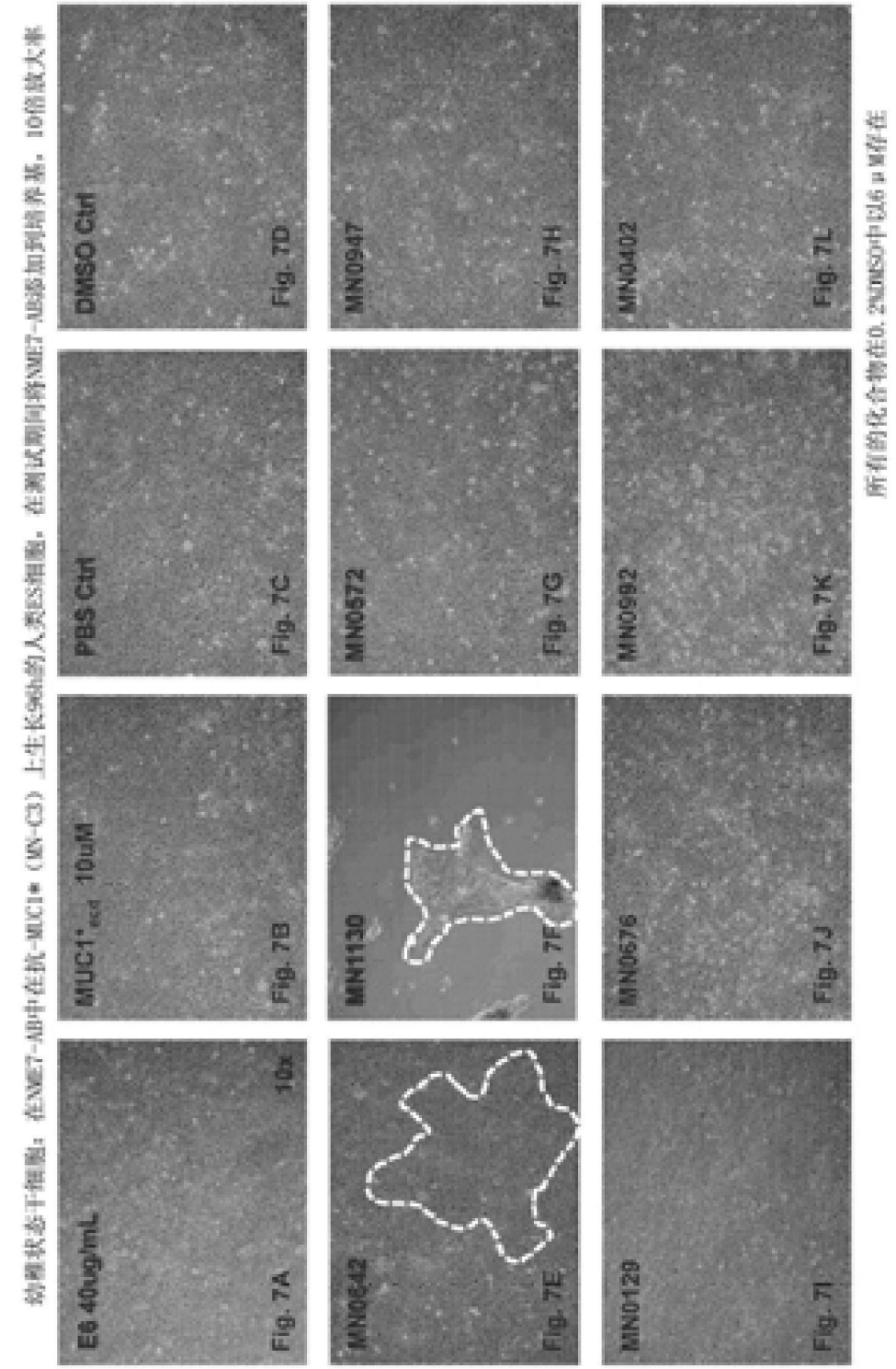

E6 40ug/mL
10x
Fig. 7A
MUC1*ecd 10uM
Fig. 7B
PBS Ctrl
Fig. 7C
DMSO Ctrl
Fig. 7D
MN0642
Fig. 7E
MN1130
Fig. 7F
MN0572
Fig. 7G
MN0947
Fig. 7H
MN0120
Fig. 7I
MN0676
Fig. 7J
MN0982
Fig. 7K
MN0402
Fig. 7L

图7

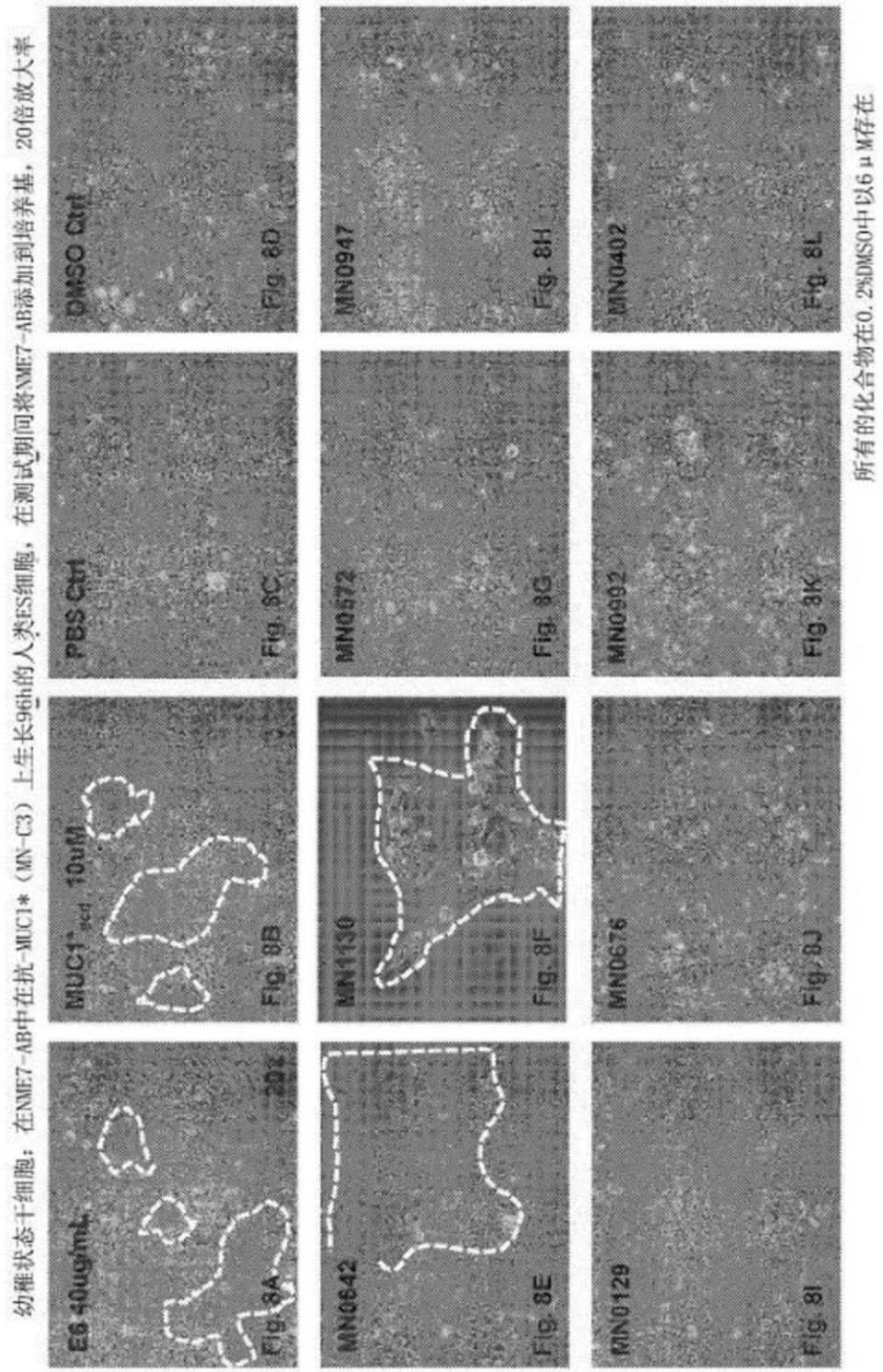

幼稚状态干细胞：在NME7-AB中在抗-MUC1*（MN-C3）上生长96h的人类ES细胞，在测试期间将NME7-AB添加到培养基，20倍放大率
E6 40ug/mL
MUC1* ecd 10uM
PBS Ctrl
DMSO Ctrl
Fig. 8A
Fig. 8B
Fig. 8C
Fig. 8D
MN0642
MN1130
MN0672
MN0947
Fig. 8E
Fig. 8F
Fig. 8G
Fig. 8H
MN0129
MN0676
MN0992
MN0402
Fig. 8I
Fig. 8J
Fig. 8K
Fig. 8L
所有的化合物在0.2%DMSO中以6 μ M存在

图8

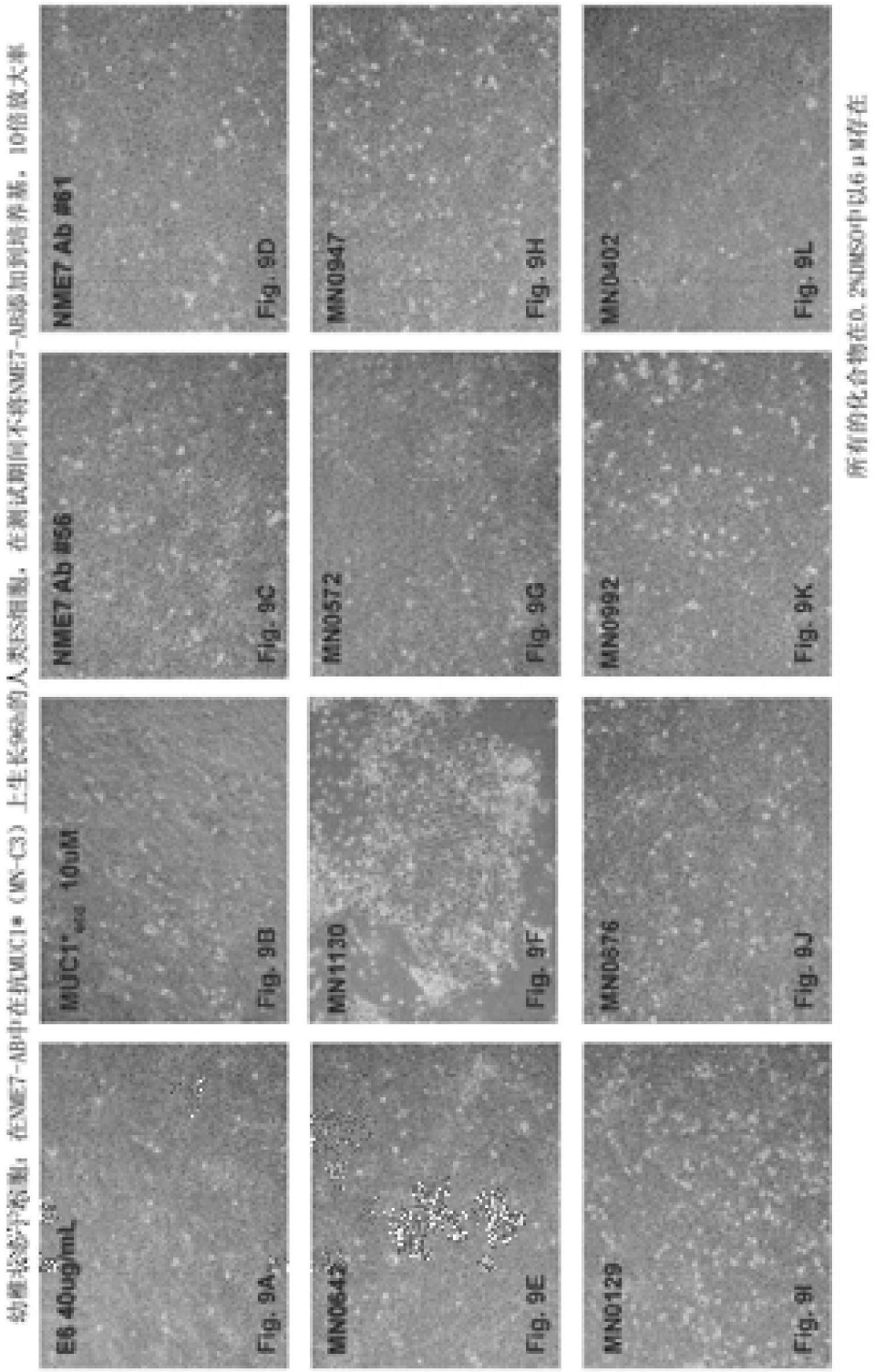

E6 40ug/mL
Fig. 9A
MUC1*ecd 10uM
Fig. 9B
NME7 Ab #56
Fig. 9C
NME7 Ab #61
Fig. 9D
MN0642
Fig. 9E
MN1130
Fig. 9F
MN0572
Fig. 9G
MN0947
Fig. 9H
MN0576
Fig. 9J
MN0992
Fig. 9K
MN0402
Fig. 9L
MN0129
Fig. 9I

图9

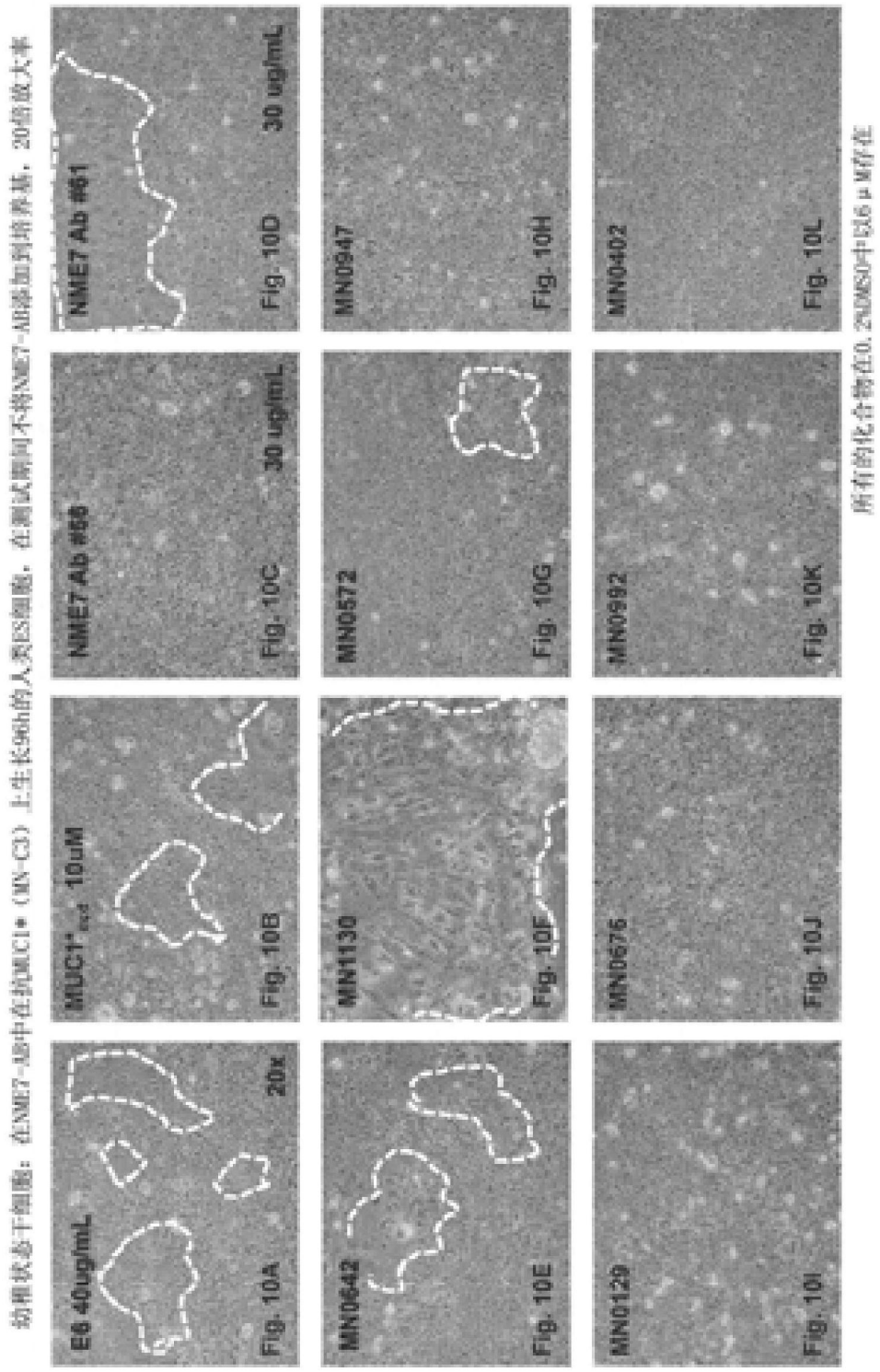

幼稚状态干细胞：在NME7-AB中在抗MUC1• (MY-C3) 上生长9dh的人类ES细胞，在测试期间不将NME7-AB添加到培养基，20倍放大率
E6 40ug/mL
20x
Fig. 10A
MUC1*ext 10uM
Fig. 10B
NME7 Ab #88
30 ug/mL
Fig. 10C
NME7 Ab #61
30 ug/mL
Fig. 10D
MN0642
Fig. 10E
MN1130
Fig. 10F
MN0572
Fig. 10G
MN0947
Fig. 10H
MN0129
Fig. 10I
MN0676
Fig. 10J
MN0992
Fig. 10K
MN0402
Fig. 10L
所有的化合物在0.2%DMSO中以6 μ M存在

图10

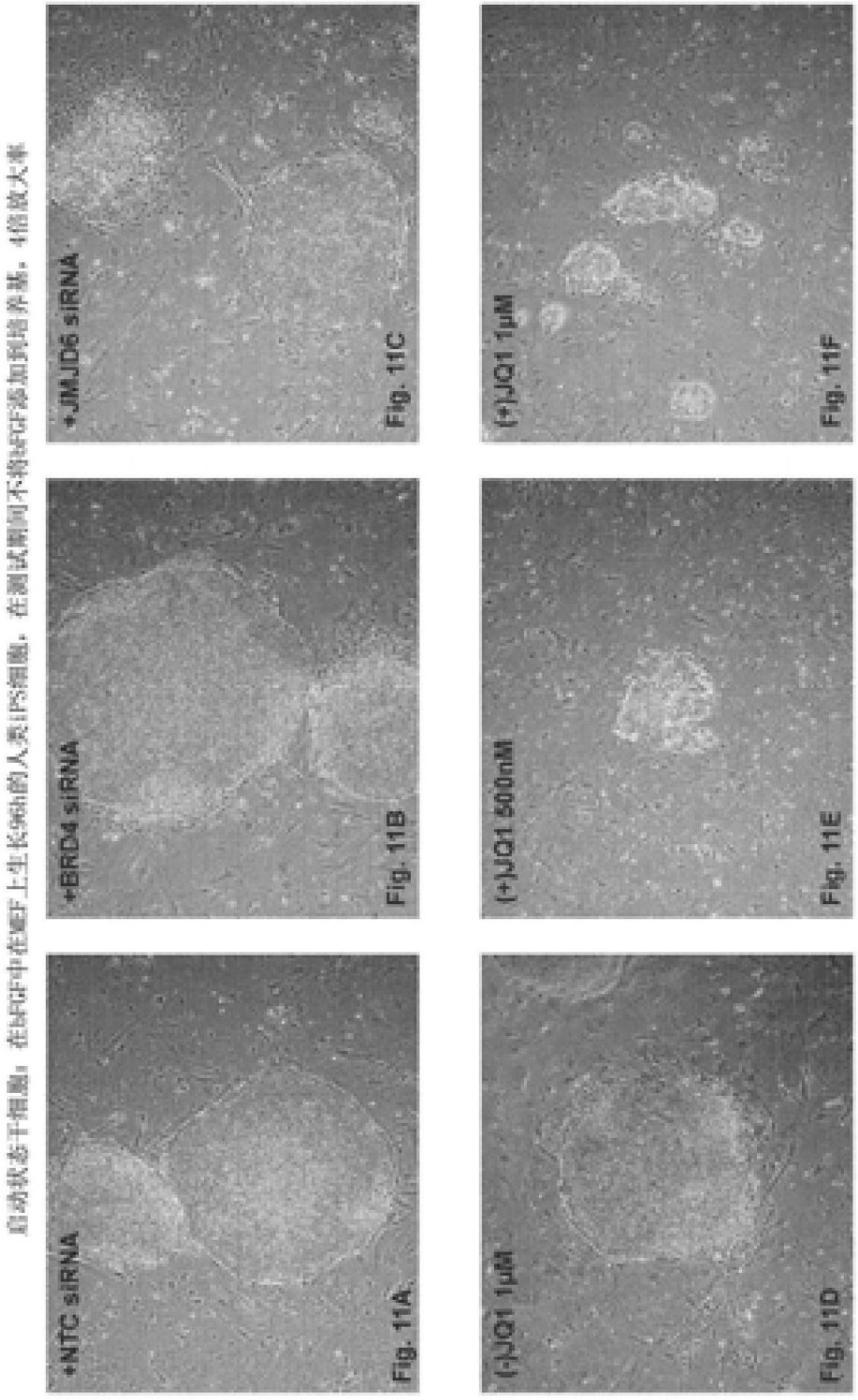

+NTC siRNA
Fig. 11A
+BRD4 siRNA
Fig. 11B
+JMJD6 siRNA
Fig. 11C
(-)JQ1 1μM
Fig. 11D
(+)JQ1 500nM
Fig. 11E
(+)JQ1 1μM
Fig. 11F

图11

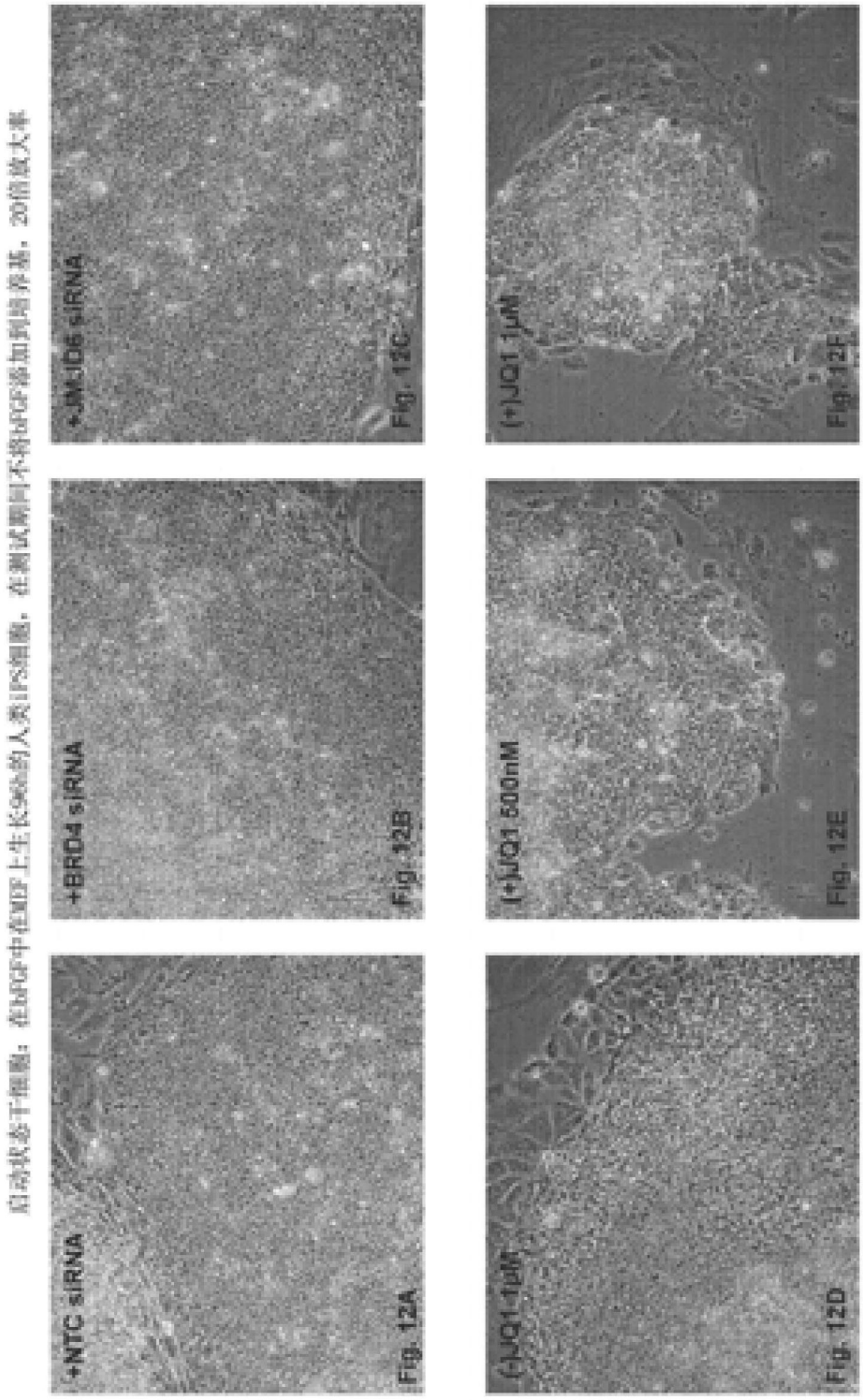

启动状态干细胞；在bFGF中在MEF上生长cells的人类iPS细胞，在测试期间不将bFGF添加到培养基，20倍放大率
+NTC siRNA
Fig. 12A
+BRD4 siRNA
Fig. 12B
+JMJD6 siRNA
Fig. 12C
(+)JQ1 1μM
Fig. 12D
(+)JQ1 500nM
Fig. 12E
(+)JQ1 1μM
Fig. 12F

图12

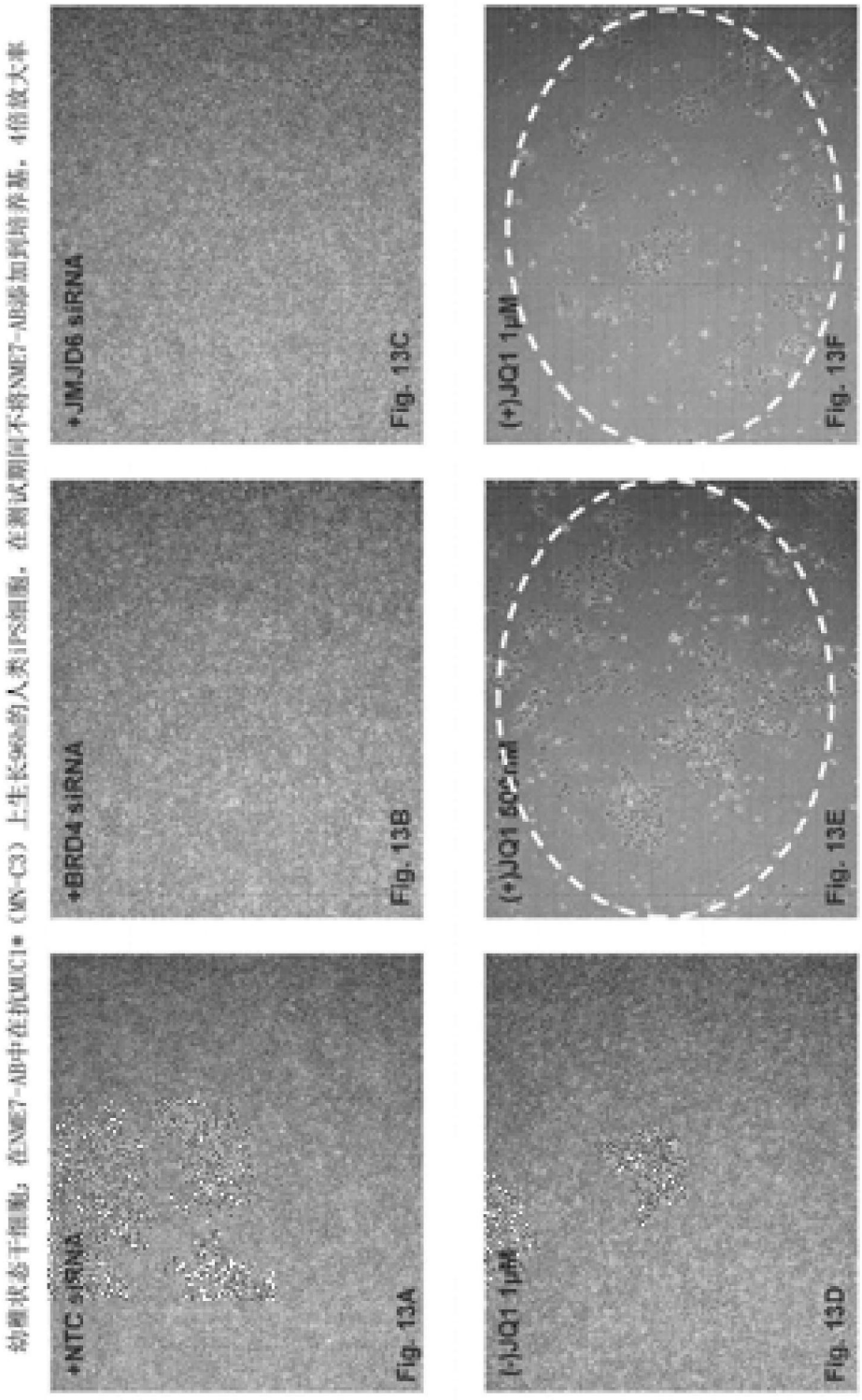

幼稚状态干细胞；在NSE7-AB中在抗MYC1*（MS-C3）上生长96h的人类iPS细胞，在测试期间不将NSE7-AB添加到培养基，4倍放大率
+NTC siRNA
Fig. 13A
+BRD4 siRNA
Fig. 13B
+JMJD6 siRNA
Fig. 13C
(-)JQ1 1μM
Fig. 13D
(+)JQ1 500nM
Fig. 13E
(+)JQ1 1μM
Fig. 13F

图13

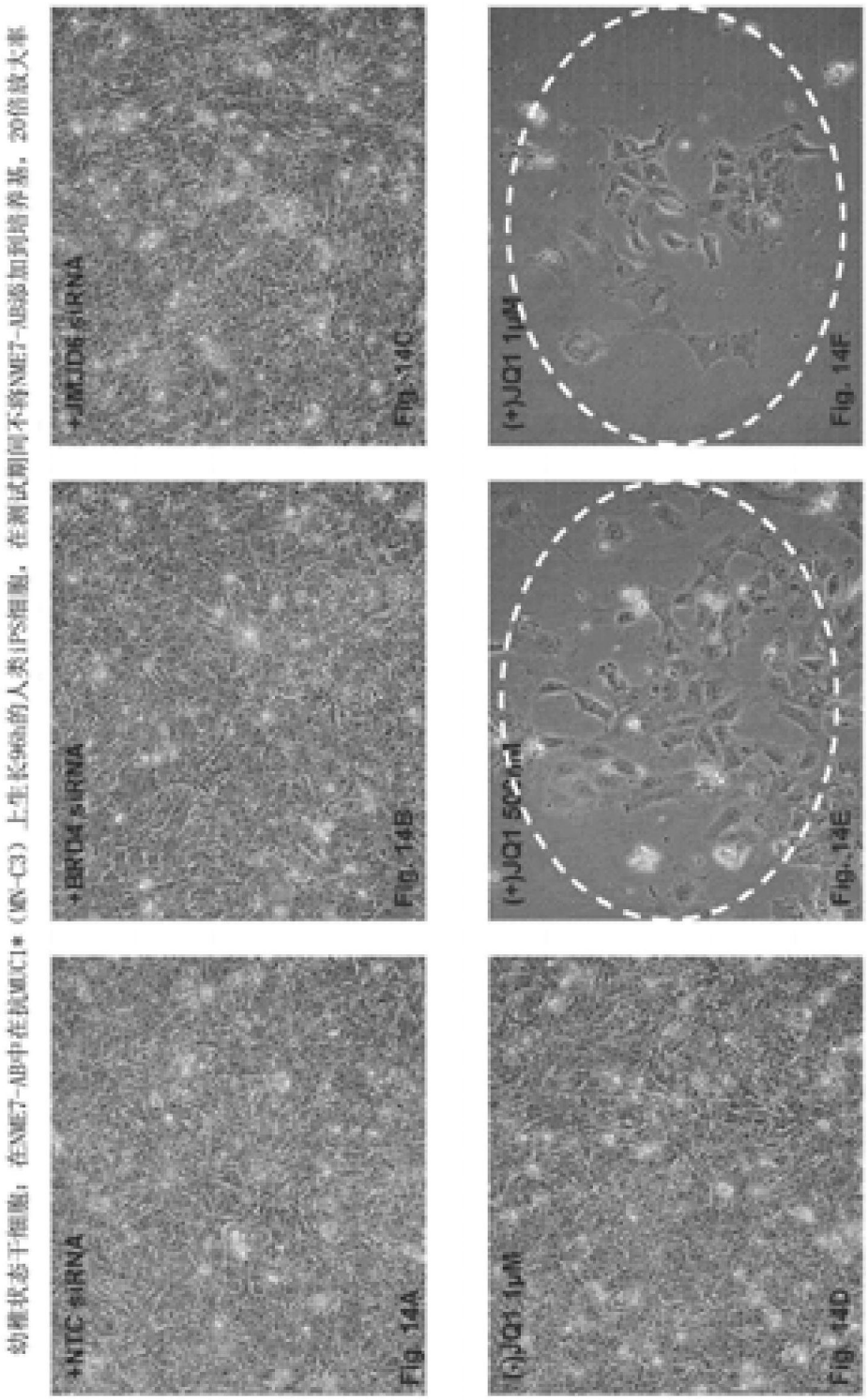

幼稚状态干细胞；在NME7-AB中在抗MUC1*（MY-C3）上生长96h的人类iPS细胞，在测试期间不含NME7-AB添加到培养基，20倍放大率
+NTC siRNA
Fig. 14A
+BRD4 siRNA
Fig. 14B
+JMJD6 siRNA
Fig. 14C
(-)JQ1 1μM
Fig. 14D
(+)JQ1 500nM
Fig. 14E
(+)JQ1 1μM
Fig. 14F

图14

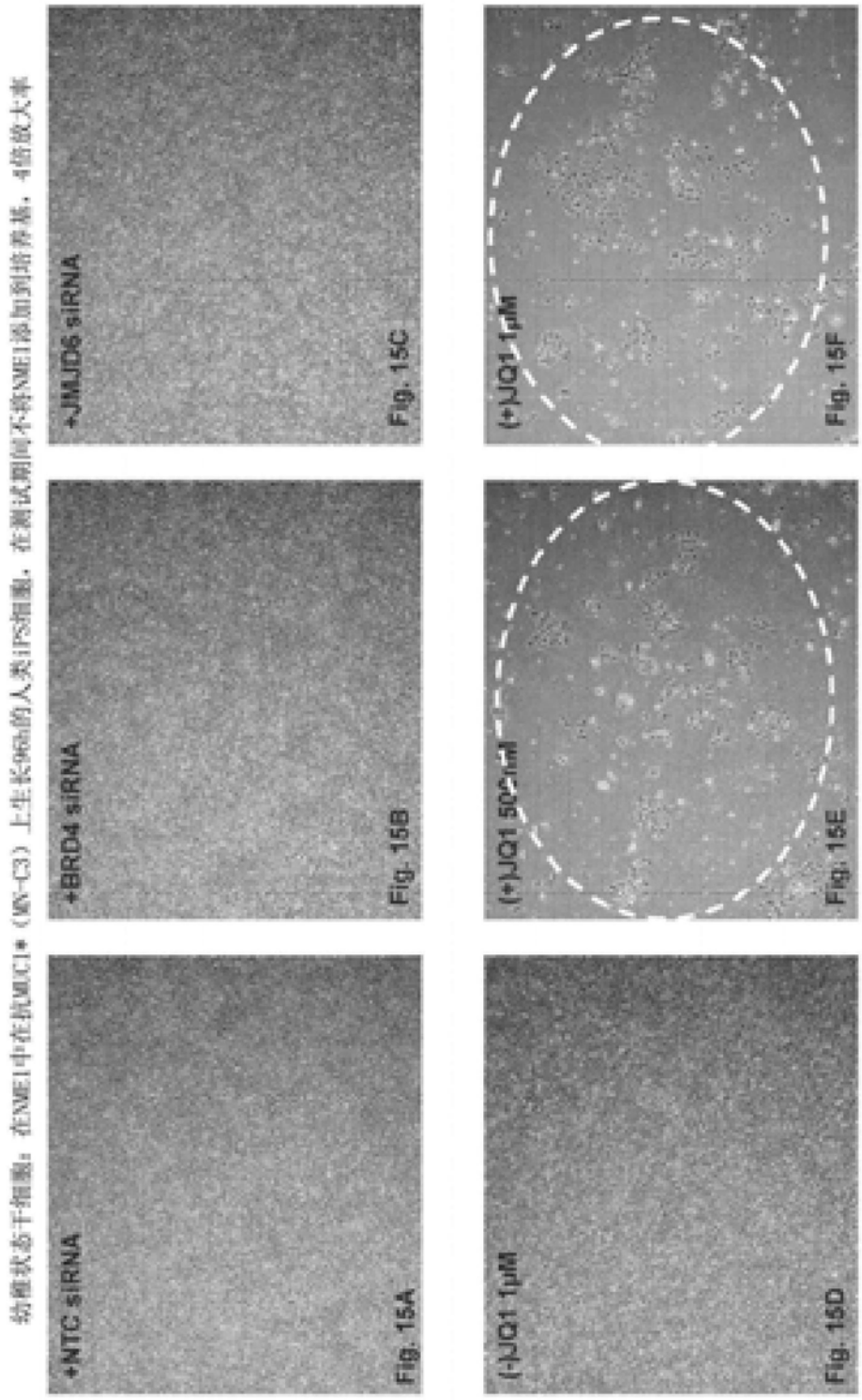

+NTC siRNA
Fig. 15A
+BRD4 siRNA
Fig. 15B
+JMJD6 siRNA
Fig. 15C
(-)JQ1 1μM
Fig. 15D
(+)JQ1 500nM
Fig. 15E
(+)JQ1 1μM
Fig. 15F

图15

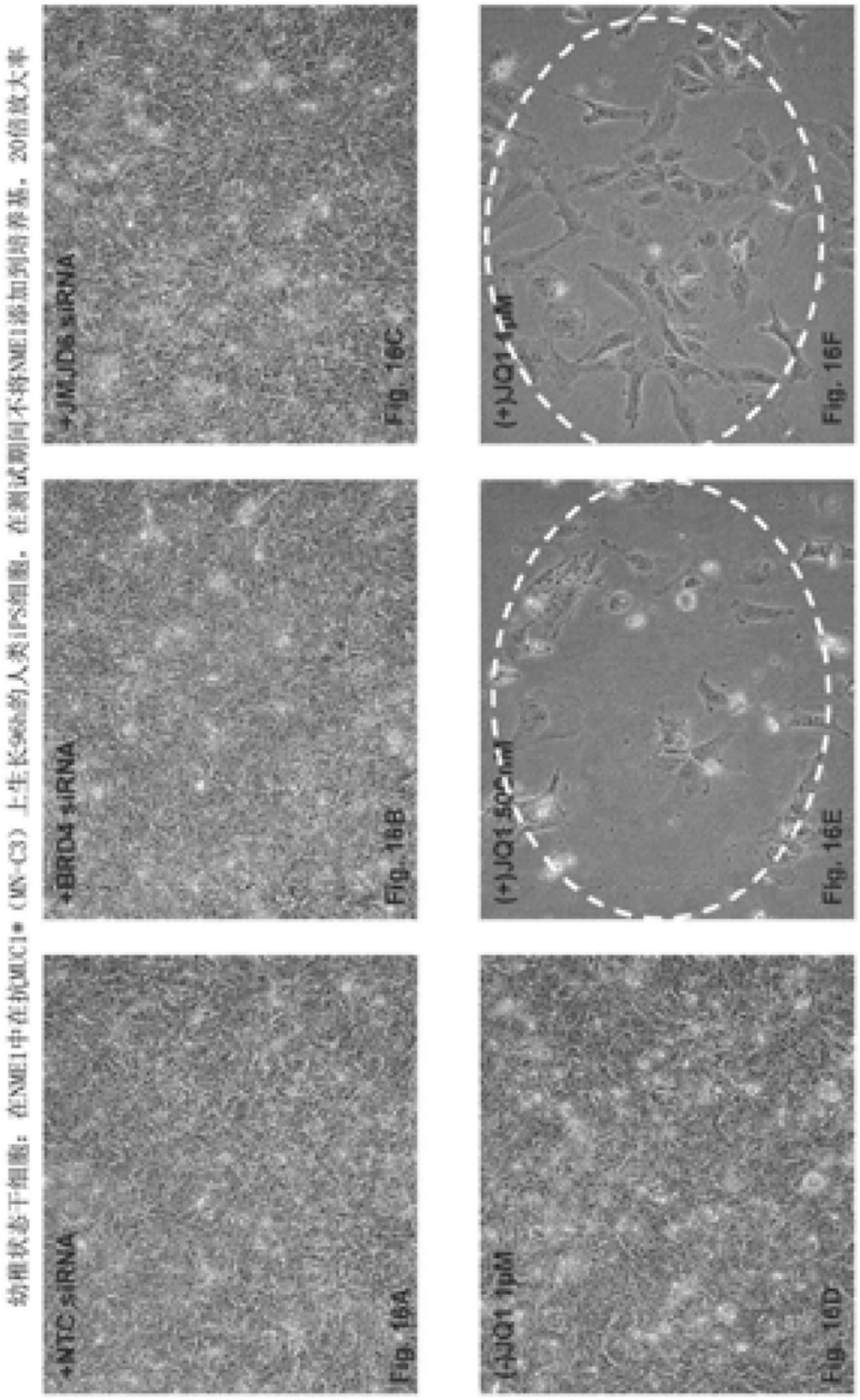

幼稚状态干细胞：在NME1中在抗MUC1*（MY-C3）上生长96h的人类iPS细胞。在测试期间不将NME1添加到培养基，20倍放大率
+NTC siRNA
Fig. 16A
+BRD4 siRNA
Fig. 16B
+JMJD6 siRNA
Fig. 16C
(-)JQ1 1pM
Fig. 16D
(+)JQ1 502nM
Fig. 16E
(+)JQ1 1μM
Fig. 16F

图16

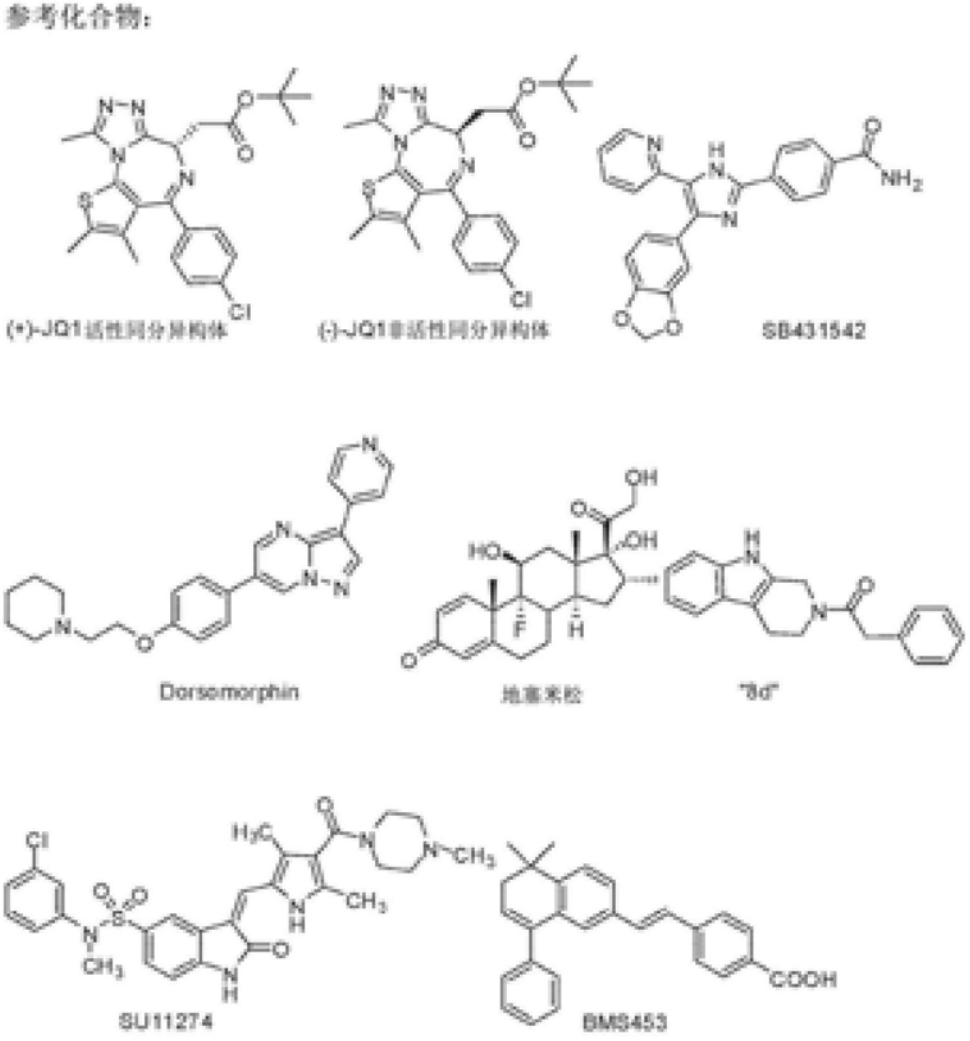

参考化合物：
(+)-JQ1活性同分异构体
(-)-JQ1非活性同分异构体
SB431542
Dorsomorphin
地塞米松
"8d"
SU11274
BMS453

图17

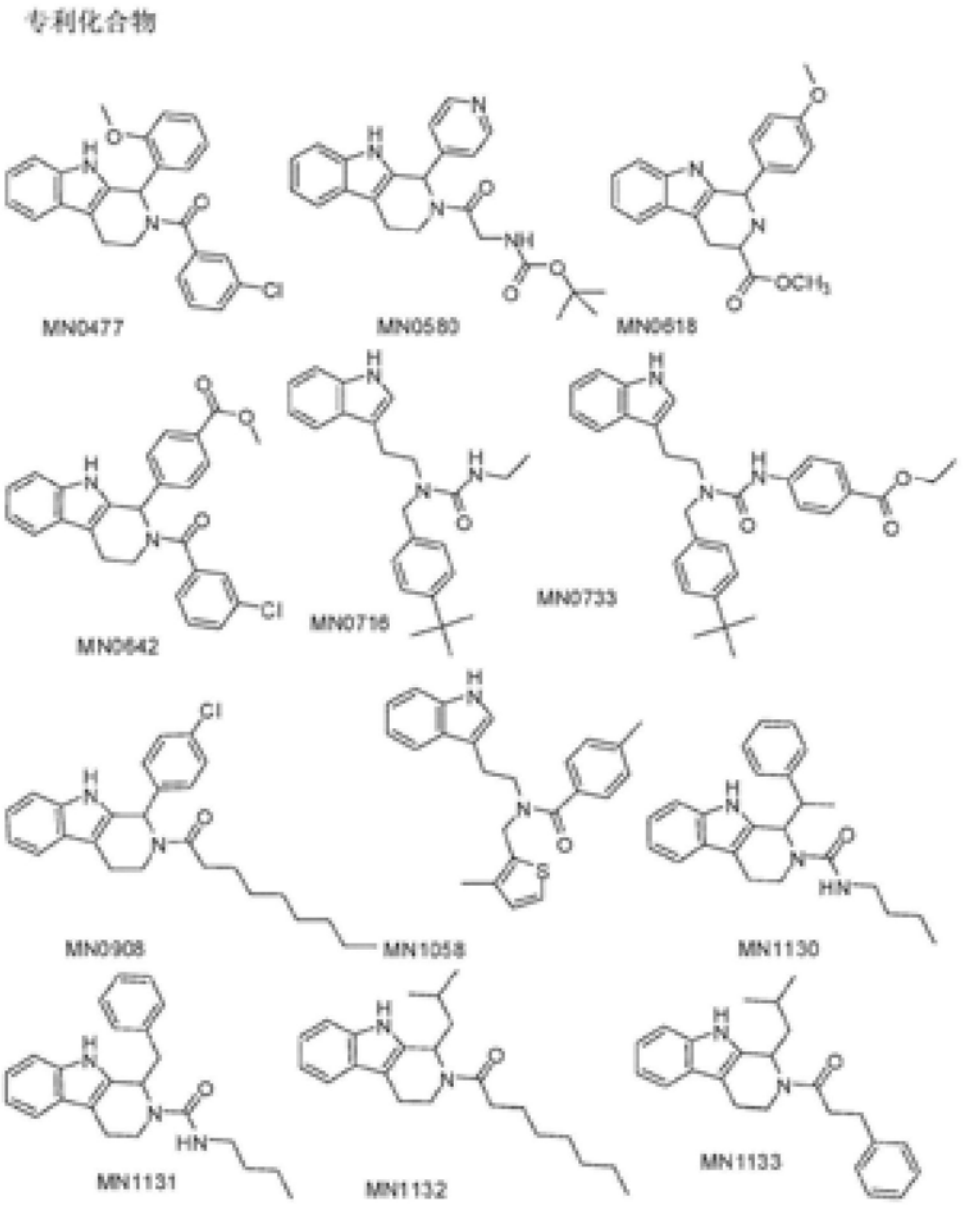

专利化合物
MN0477
MN0580
MN0618
MN0642
MN0716
MN0733
MN0908
MN1058
MN1130
MN1131
MN1132
MN1133

图18

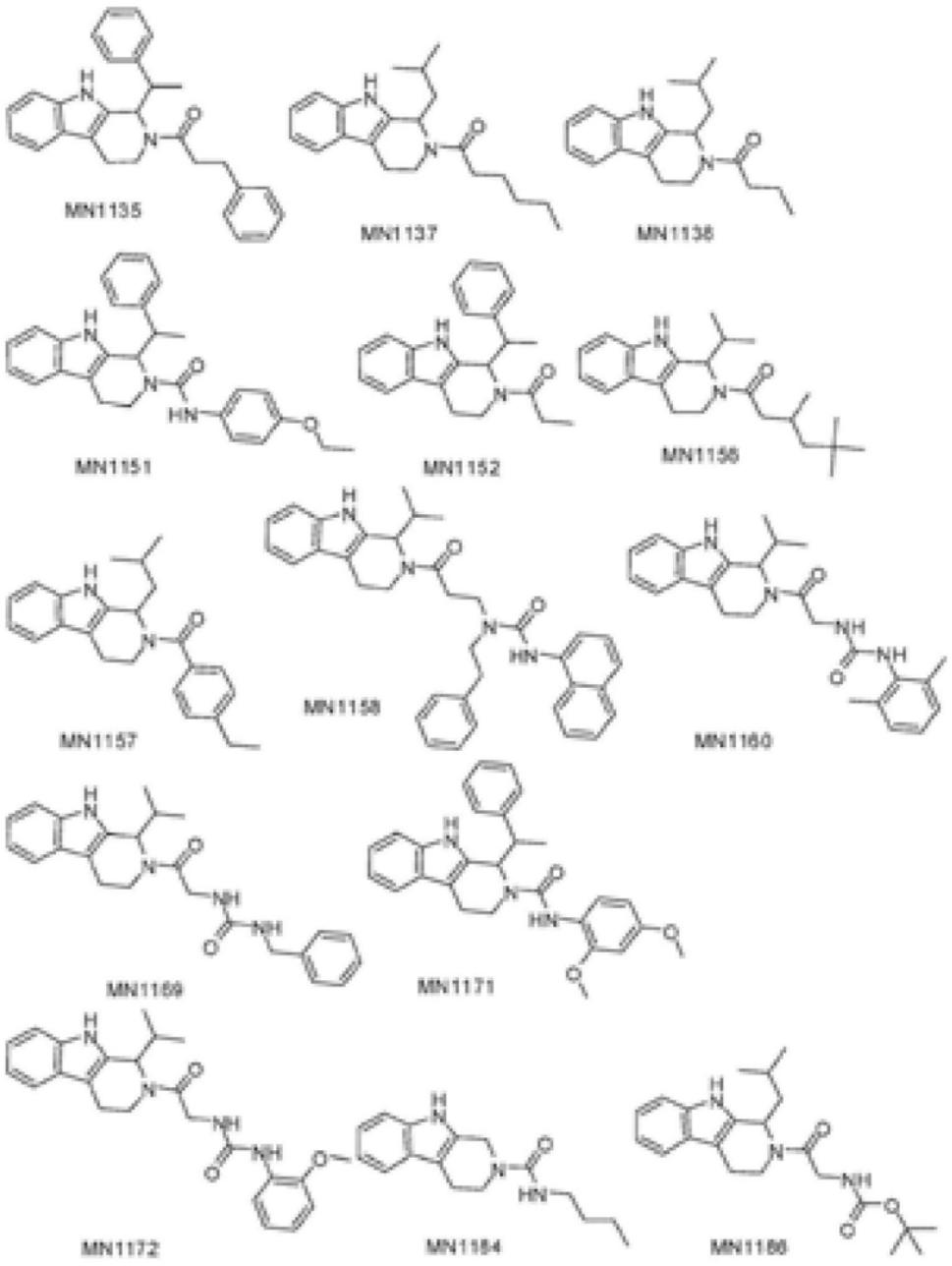

MN1135
MN1137
MN1138
MN1151
MN1152
MN1156
MN1157
MN1158
MN1160
MN1169
MN1171
MN1172
MN1184
MN1186

图19

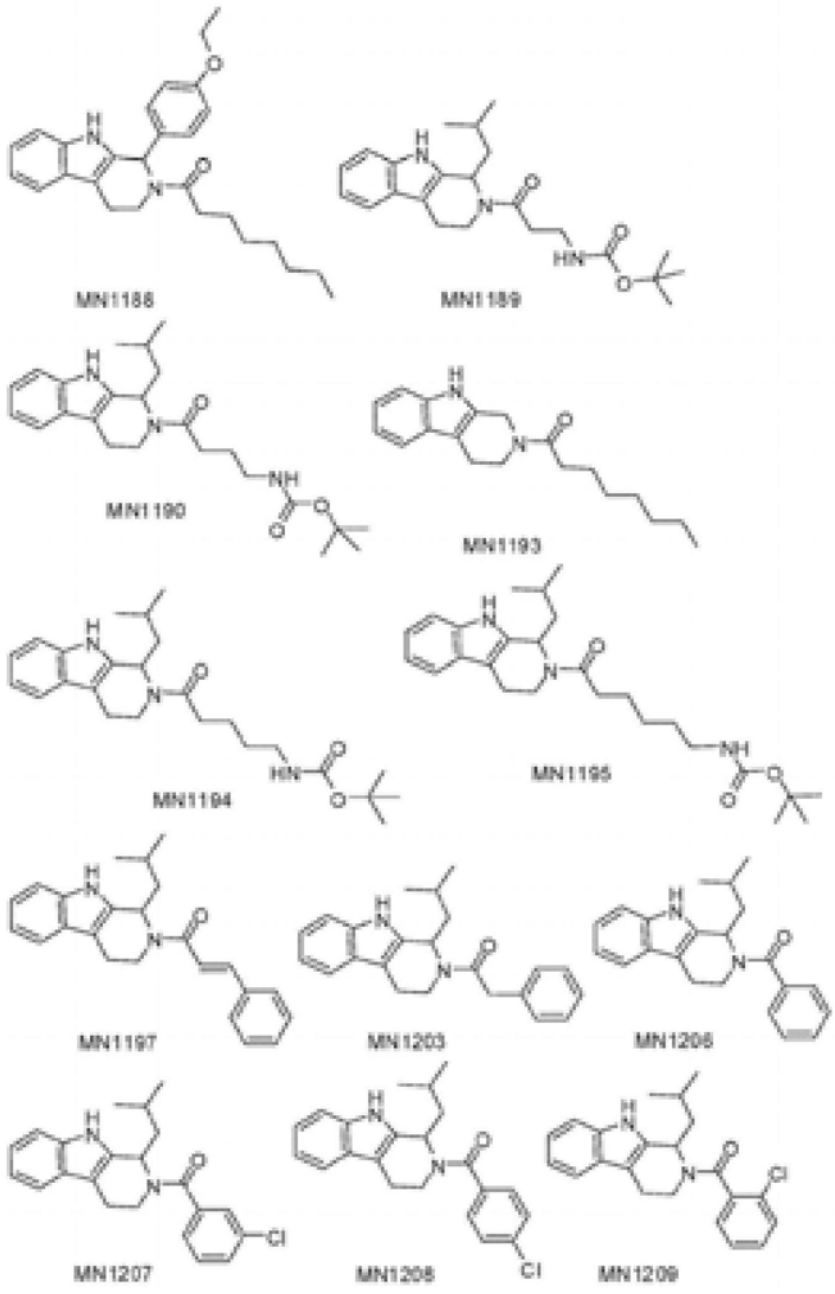

MN1188
MN1189
MN1190
MN1193
MN1194
MN1195
MN1197
MN1203
MN1206
MN1207
MN1208
MN1209

图20

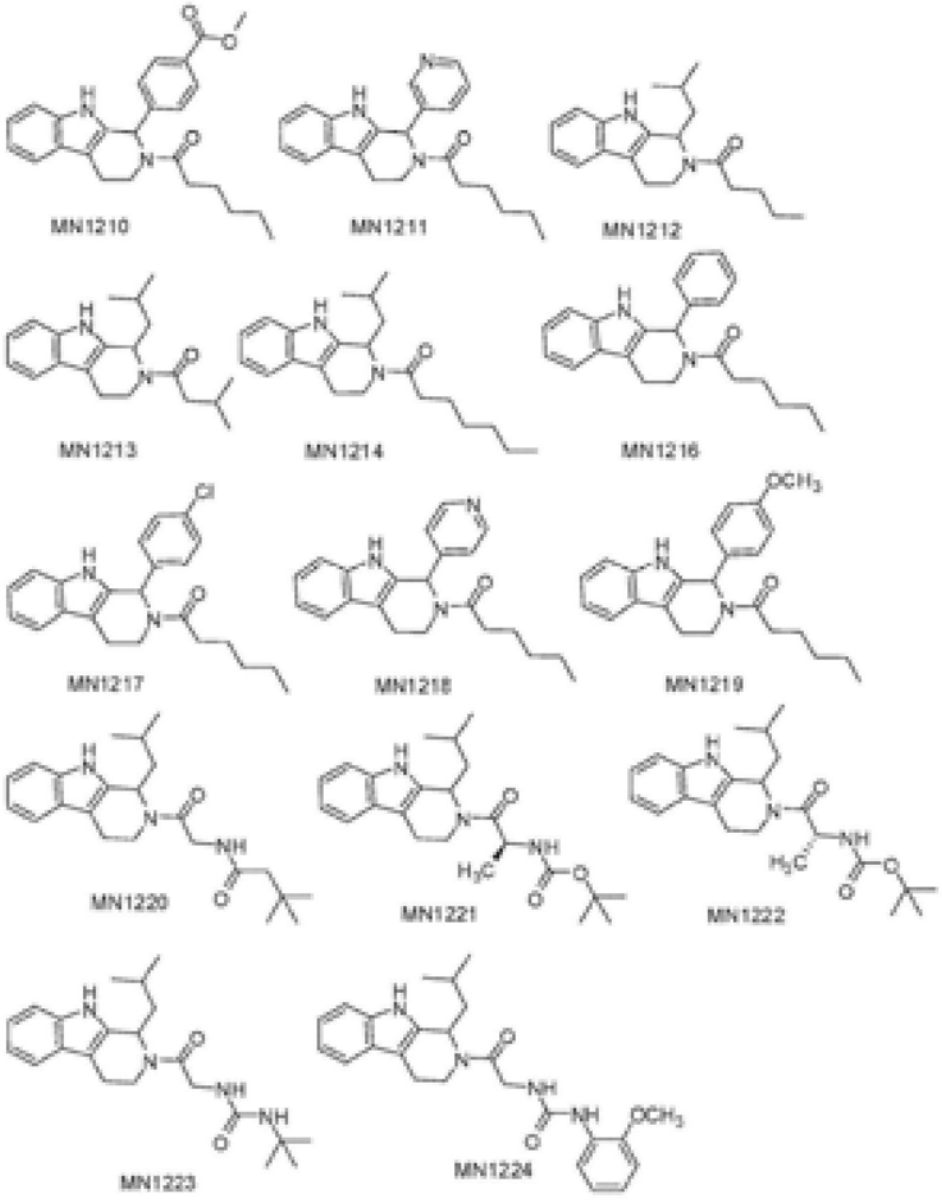

MN1210
MN1211
MN1212
MN1213
MN1214
MN1216
MN1217
MN1218
MN1219
MN1220
MN1221
MN1222
MN1223
MN1224

图21

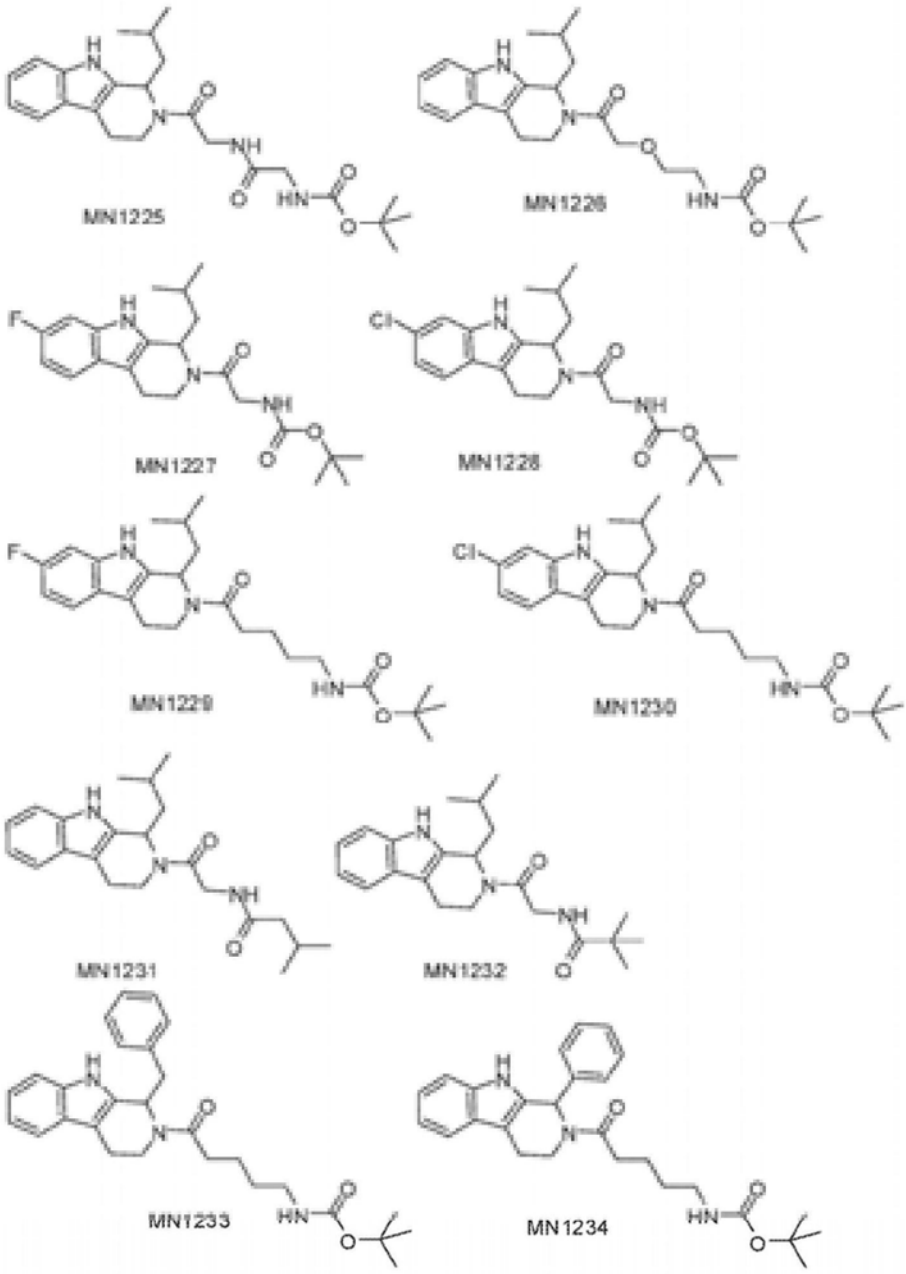

MN1225
MN1226
MN1227
MN1228
MN1229
MN1230
MN1231
MN1232
MN1233
MN1234

图22

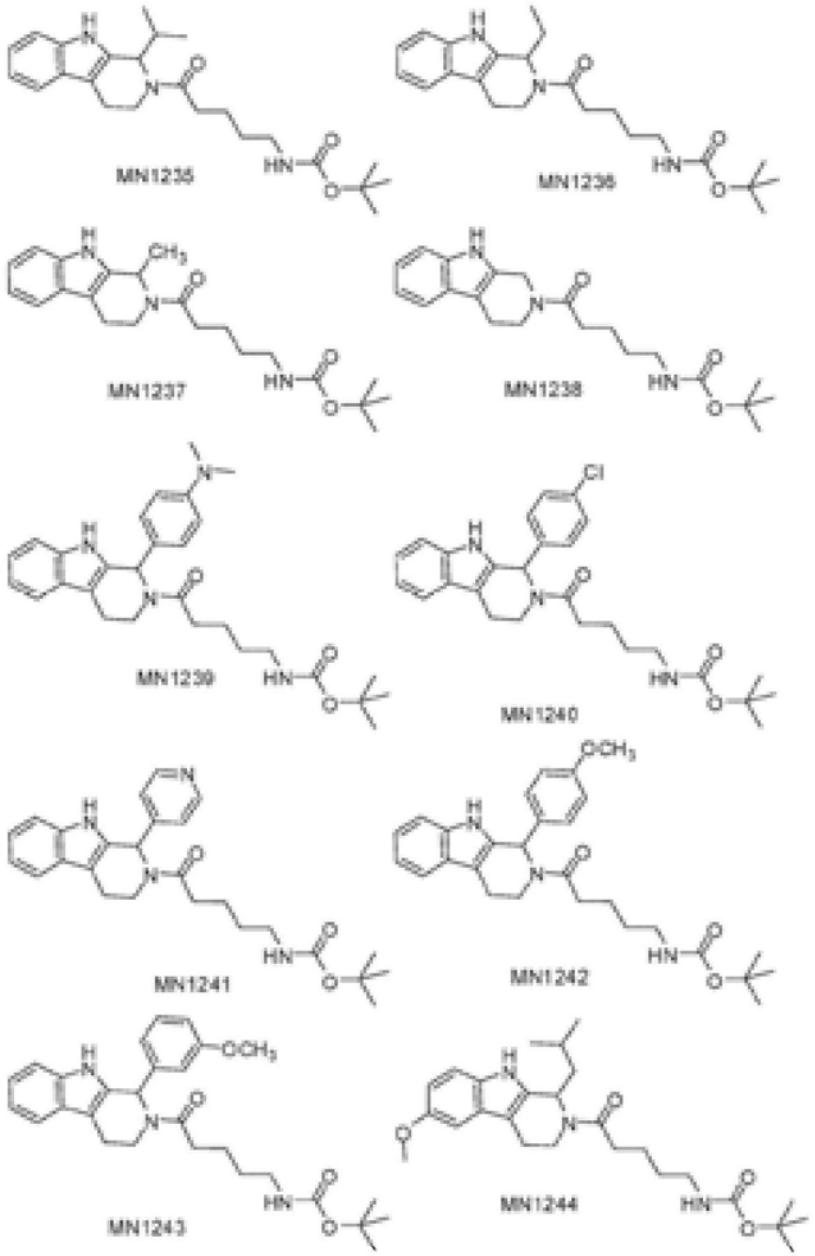

MN1235
MN1236
MN1237
MN1238
MN1239
MN1240
MN1241
MN1242
MN1243
MN1244

图23

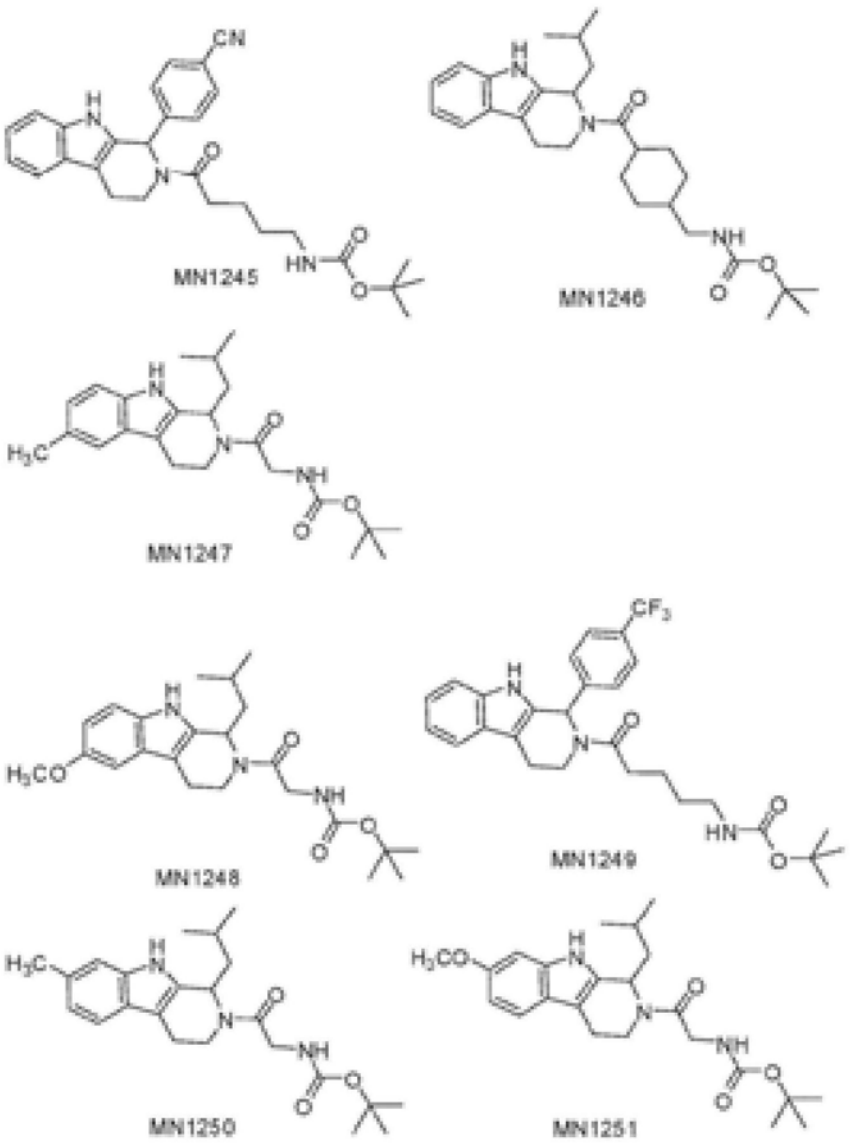


图24

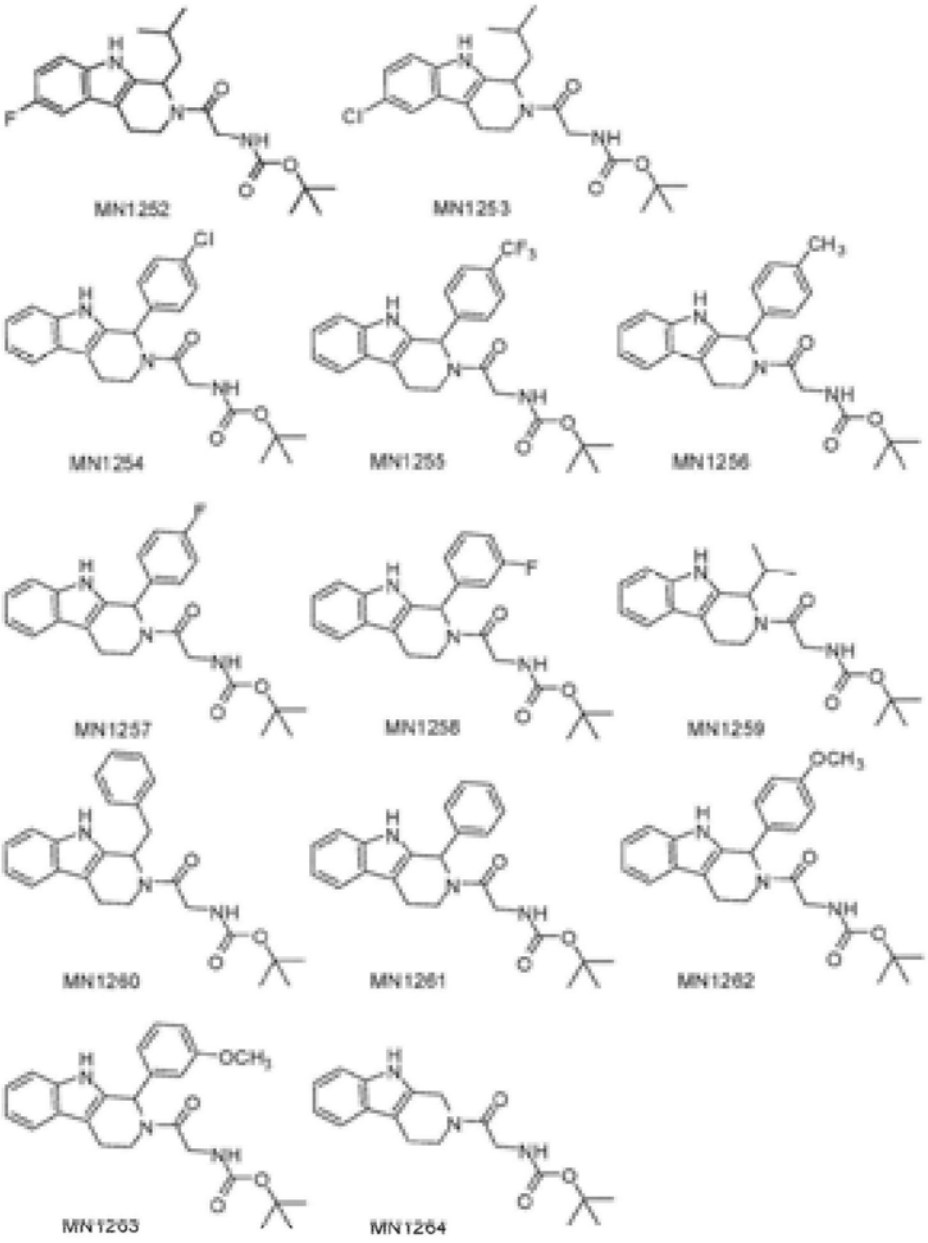

MN1252
MN1253
MN1254
MN1255
MN1256
MN1257
MN1258
MN1259
MN1260
MN1261
MN1262
MN1263
MN1264

图25

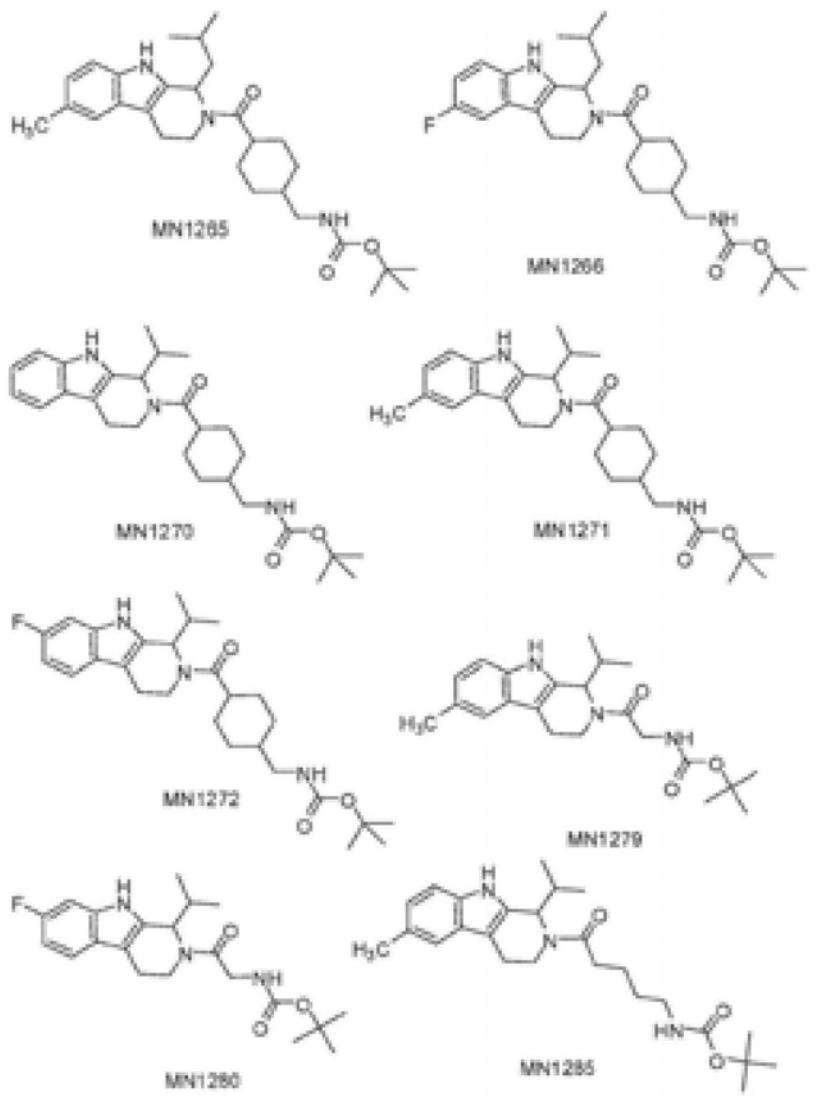

MN1265
MN1266
MN1270
MN1271
MN1272
MN1279
MN1280
MN1285

图26

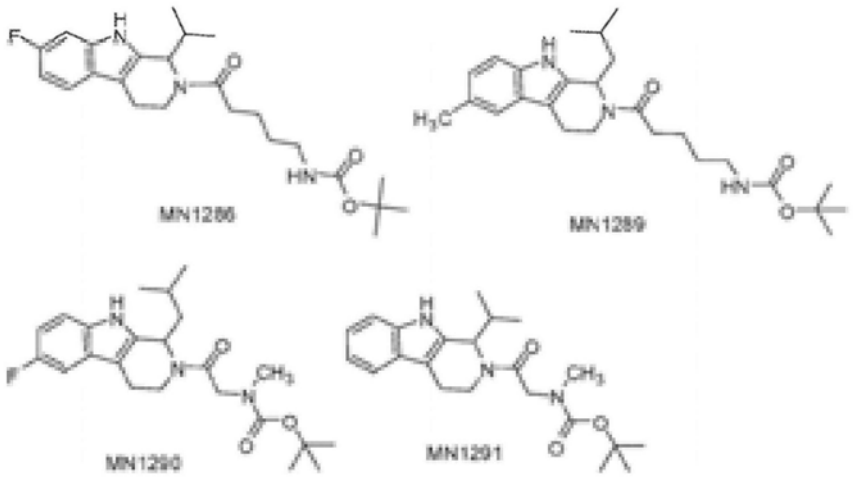

MN1286
MN1289
MN1290
MN1291

图27

化合物编号	其他名	在6uM时的癌细胞迁移的抑制百分比	癌细胞迁移IC50（uM）	在6uM时的自动状态干细胞化合物	在6uM时的动脉平滑干细胞化合物	在6uM时抑制癌细胞增殖
MN0477		16%		0	1	3
MN0580		3%		0	3	1
MN0618		0%		0	2	2
MN0642		11%		0	3	3
MN0716		33%		0	1	2
MN0784		8%		0	1	1
MN0908		26%		1	3	
MN1058		16%		0	1	1
MN1150		90%	13.42	1	4	3**
MN1151		36%		0	1	2
MN1152		14%		1	4	1
MN1153		12%		1	4	4
MN1157		32%	13.42	2	4	3
MN1158		7%		1	4	1
MN1251		60%		0	2	2
MN1252		70%		0	1	3
MN1256		82%		0	3	4
MN1257		86%		1	3	2
MN1258		20%		0	2	1
MN1260		24%		0	2	1
MN1269		0%		4	4	4
MN1271		21%		1	1	1
MN1272		18%		0	3	2
-	(+)-IQ1	0%		2	4	3***
-	(-)-IQ1	10%		1	1	0***
-	SB431542	3%		1	2	0
-	SU5402	0%		2	4	1
-	dorsomorphin	31%		0	1	1
MN1284		12%		0	0	0
MN1286		94%	6.31	2	4	3*
MN1288		8%		2	3	1
MN1289		28%		1	4	1
MN1290		48%	4.32	1	3	1*
MN1293		10%		0	0	0*
MN1294		64%	5.20-5.46	1	4	3*
MN1295		53%	2.86	0	2	3*
MN1297		12%		0	4	4
MN1305		27%	12.33	1	1	1
-	"Bif"	50%	14.86	0	0	ND
-	地塞米松	34%		1	1	ND
MN1206		40%		0	2	1
MN1207		21%		0	2	0
MN1208		8%		2	3	ND
MN1209		8%		1	1	0
MN1210		8%		3	3	ND
MN1211		11%		0	1	1
MN1212		29%		0	4	1
MN1213		29%		0	4	2
MN1214		26%		2	3	2
-	BMS453	7%		0	0	ND
MN1216		27%		0	0	3
MN1217		26%		1	1	3
MN1218		12%		2	0	0
MN1219		0%		1	1	2
MN1220		80%	6.37	2	2	2*
MN1221		7%		1	1	2*

图28

MN1222		24%	10.46-15.65	0	0	1*
MN1223		18% @ 10uM	10.04	0	0	0*
MN1224		16% @ 10uM	10.48	0	0	1*
MN1225		13%	10.36	0	0	1*
MN1226		53%	4.08-12.5	1	1	1*
MN1227		58%	2.93-6.24	2	4	3*
MN1228		55%	5.71	2	4	3*
MN1229		44%	3.31	2	4	3*
MN1230		26%	6.53	2	4	3*
MN1231		32% @ 10uM	18.28	2	2	1
MN1232		37% @ 10uM		2	3	1
MN1233		51%	5.19-5.87	1	1	4
MN1234		27%	6.12-10.25	0	0	4
MN1235		70%	3.62-4.41	0	2 @ 12uM	4**
MN1236		66%	3.78-5.62	0	0	0
MN1237		54%	5.22-5.73	0	0	0
MN1238		42%	4.62-5.19	1	0	0
MN1239		16%	10.54-11.99	1	0	4
MN1240		35%	6.37-8.15	1	0	4
MN1241		20%	10.54-11.72	0	0	0
MN1242		31%	10.25-10.61	0	0	4
MN1243		43%	6.83 12.84	0	1	4
MN1244		41%	7.21-13.2	4	4	3
MN1245		18%	9.18-11.65	0	2	1
MN1246		61%	2.5-2.9	0	3	3
MN1247		47%	5.34	3	4	3
MN1248		29%	8.82	3	2	1
MN1249		28%	7.84	2	1	4
MN1250		17%	9.86	3	4	3
MN1251		15%	14.81	2	3	2
MN1252		42%		2	4	2
MN1253		21%		3	4	1
MN1254		35%		2	2	4
MN1255		31%		1	2	4
MN1256		16%		2	2	3
MN1257		27%		1	2	2
MN1258		10%		0	1	1
MN1259		71%		0	2 @ 12uM	1
MN1260		38%		0	1	1
MN1261		35%		0	1	2
MN1262		18%		2	3	2
MN1263		13%		1	1	2
MN1264		58%		0	0	0
-	SU11274	69% @ 6uM	2.62	0	1	2**
MN1265		41%	2.4	ND	4	4
MN1266		52%	1.9	ND	3	3
MN1270		81%	2.5	ND	0	4
MN1271		74%	2.6	ND	0	4
MN1272		70%	2.5	ND	0	4
MN1279		21%	19.2	ND	0	1
MN1280		39%	11.6	ND	2	0
MN1285		30%	6.9	ND	2	2
MN1288		61%	3.5	ND	1	3
MN1289		28%	7.4	ND	4	4
MN1290		22%		ND	2	3
MN1291		25%		ND	1	1

* =10 uM
** =20 uM
*** =1 uM

图28(续)

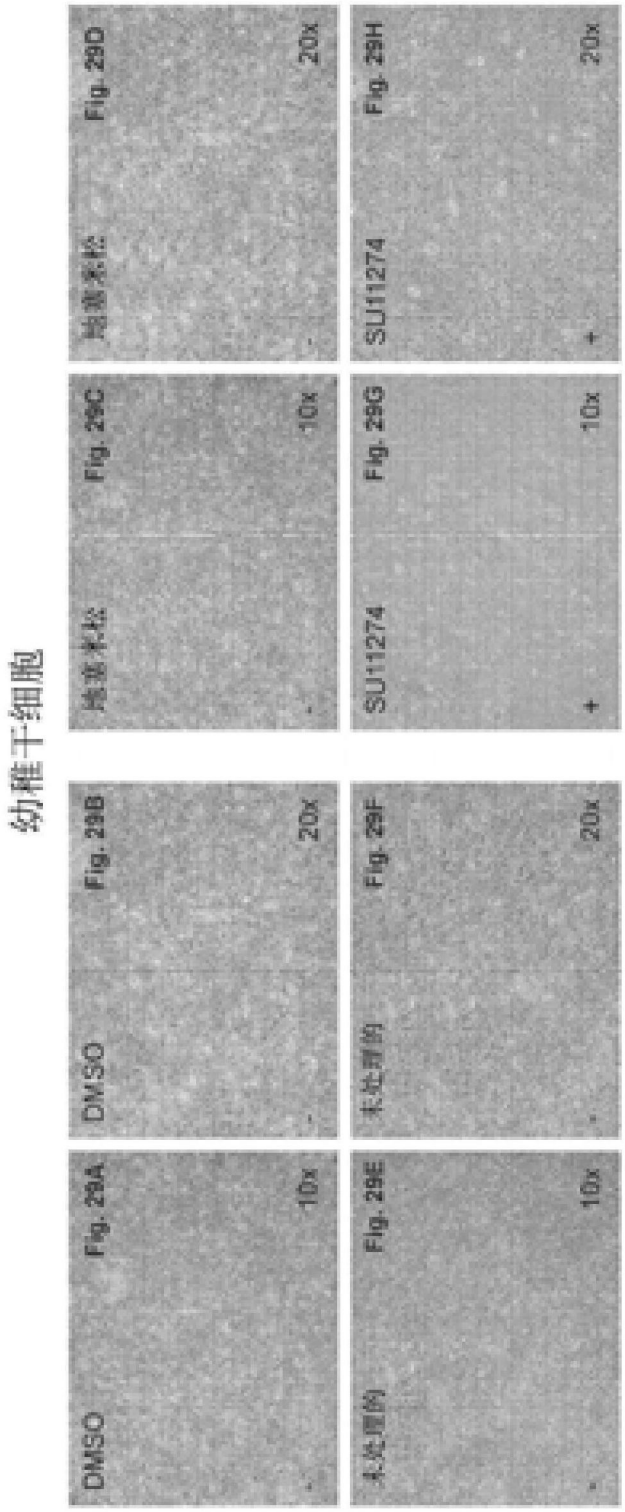

幼稚干细胞
DMSO
Fig. 29A
10x
DMSO
Fig. 29B
20x
培美考林
Fig. 29C
10x
培美考林
Fig. 29D
20x
未处理的
Fig. 29E
10x
未处理的
Fig. 29F
20x
SU11274
Fig. 29G
10x
SU11274
Fig. 29H
20x

图29A至图29H

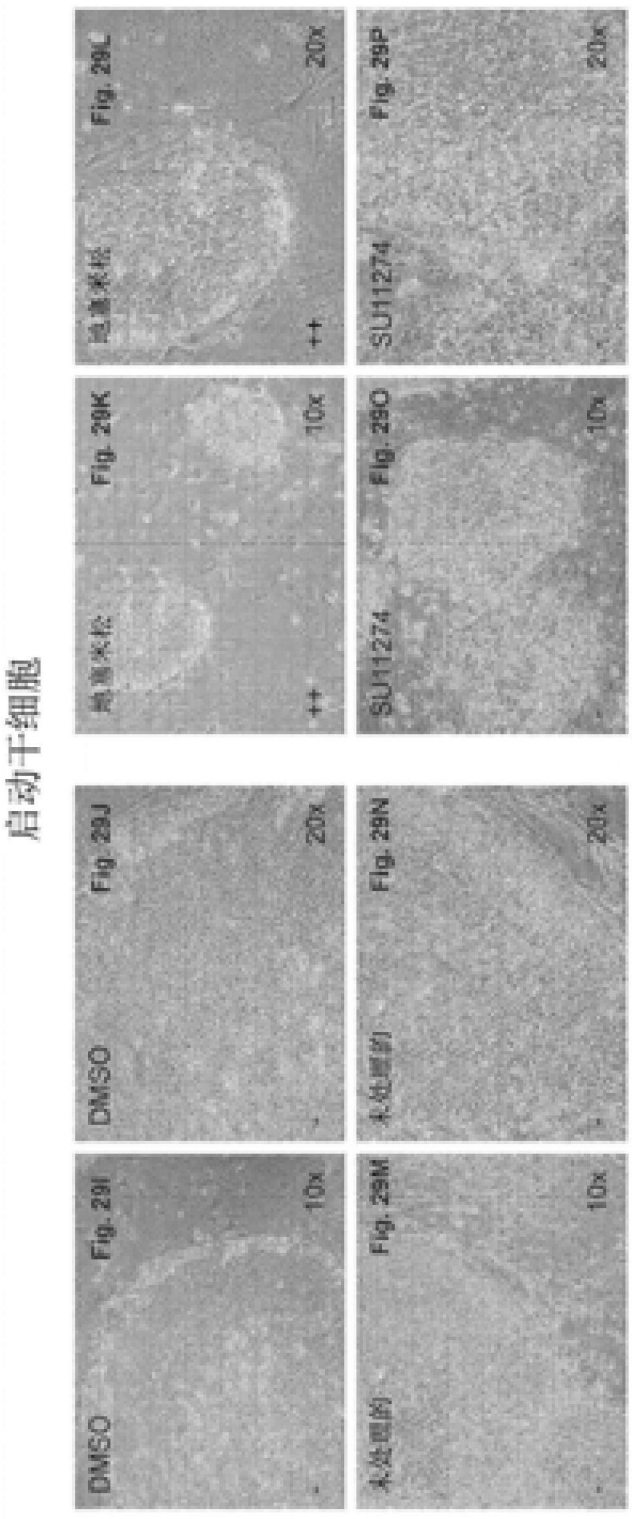

启动干细胞
DMSO
Fig. 29I
10x
DMSO
Fig. 29J
20x
Fig. 29K
10x
++
Fig. 29L
20x
++
未处理的
Fig. 29M
10x
未处理的
Fig. 29N
20x
SU11274
Fig. 29O
10x
SU11274
Fig. 29P
20x

图29I至图29P

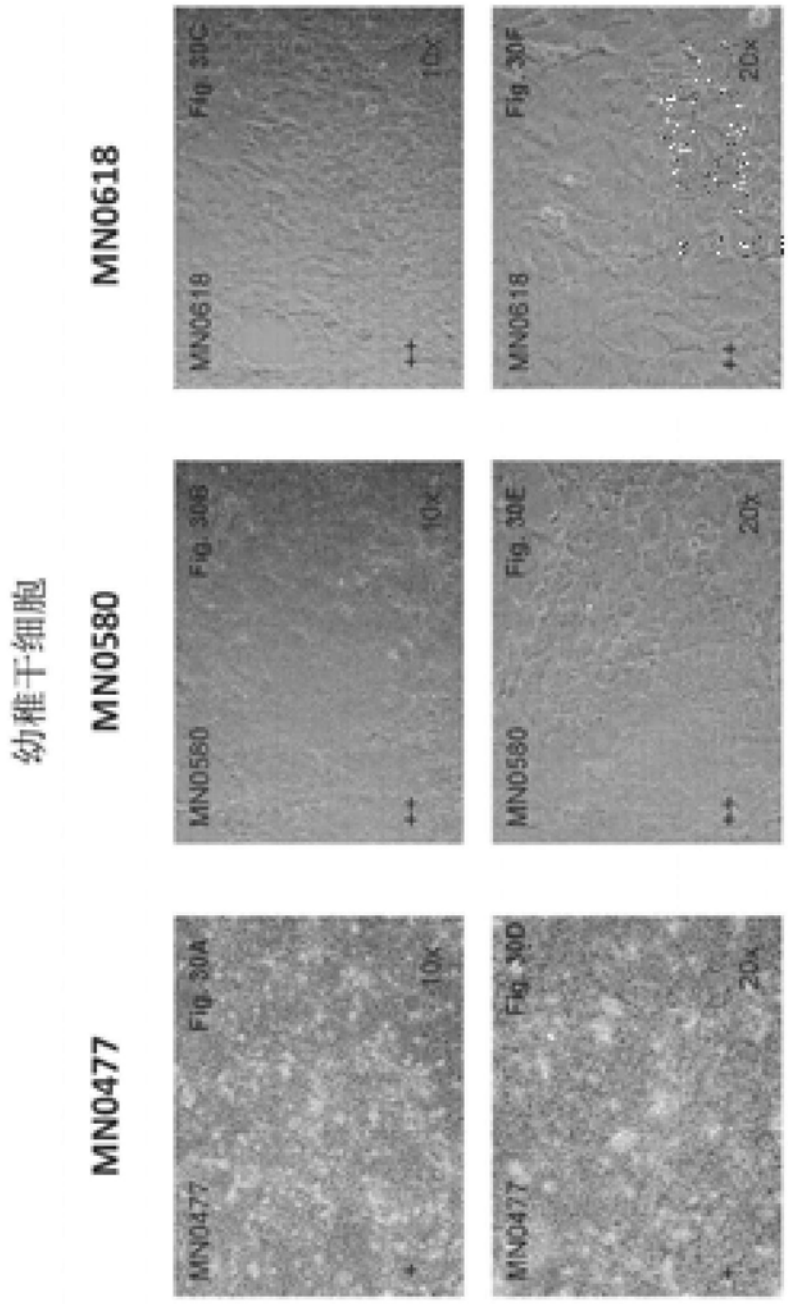

幼稚干细胞
MN0477
MN0580
MN0618
Fig. 30A
Fig. 30B
Fig. 30C
Fig. 30D
Fig. 30E
Fig. 30F
10x
20x
+
++
++
+
++
++

图30A至图30F

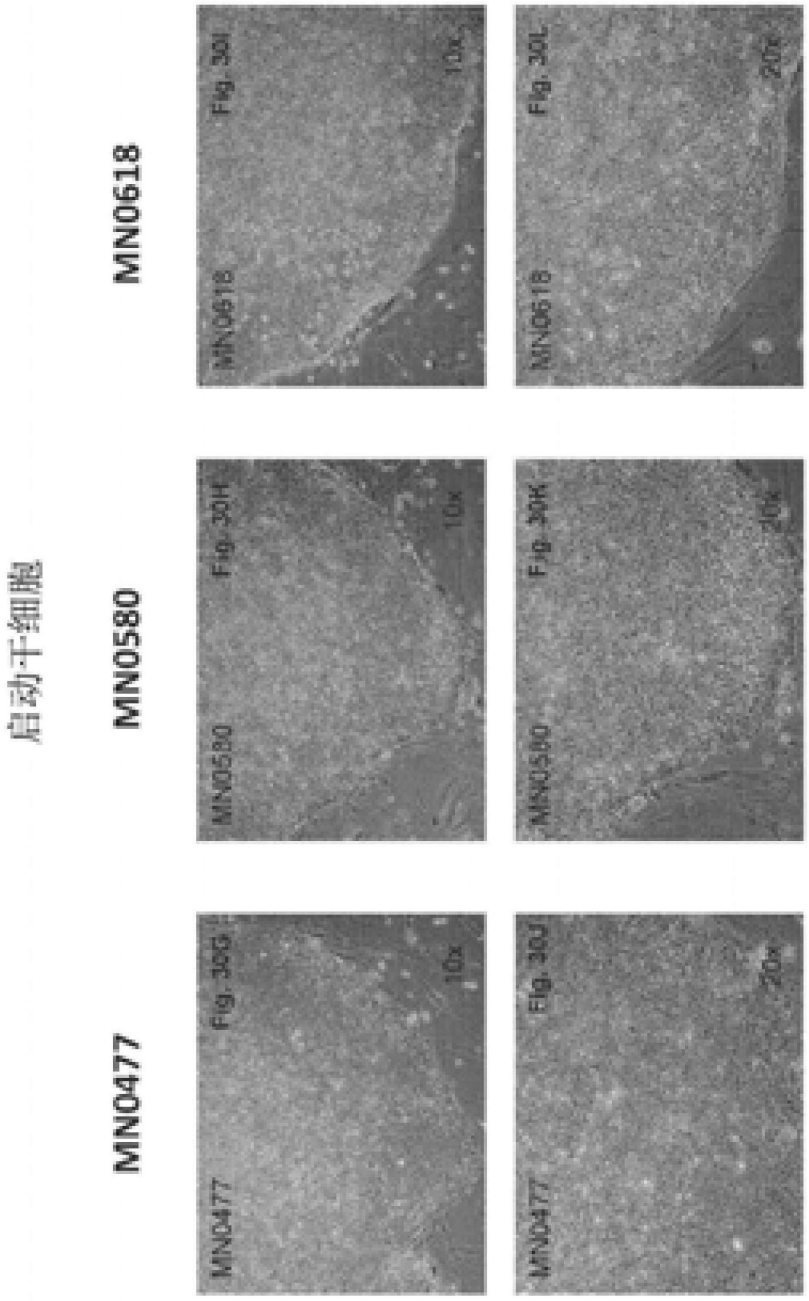

启动干细胞
MN0618
MN0580
MN0477
Fig. 30I
Fig. 30L
Fig. 30H
Fig. 30K
Fig. 30G
Fig. 30J
10x
20x

图30G至图30L

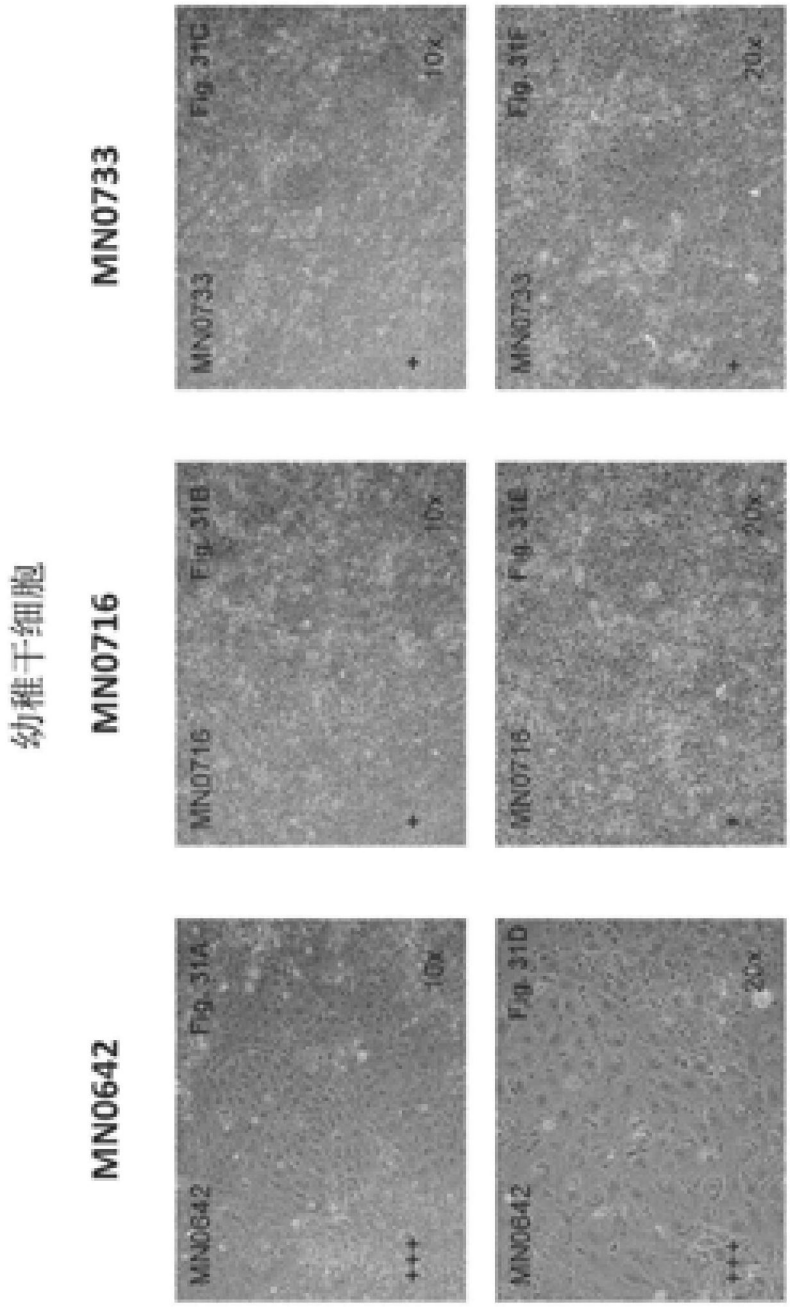

幼稚干细胞
MN0642
MN0716
MN0733
Fig. 31A
Fig. 31B
Fig. 31C
Fig. 31D
Fig. 31E
Fig. 31F
MN0642
MN0716
MN0733
10x
20x
+++
+

图31A至图31F

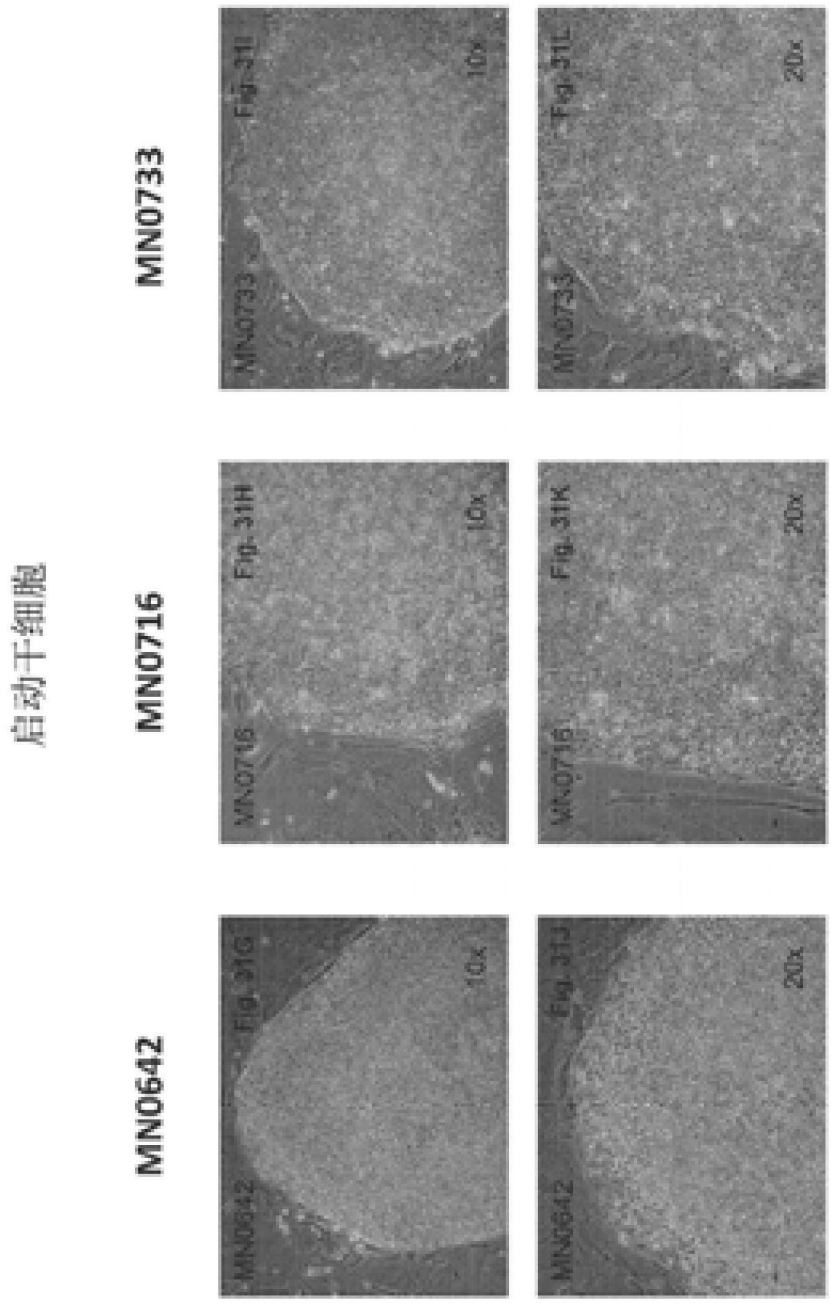

MN0733
MN0716
MN0642
启动干细胞
Fig. 31I
Fig. 31L
Fig. 31H
Fig. 31K
Fig. 31G
Fig. 31J
10x
20x

图31G至图31L

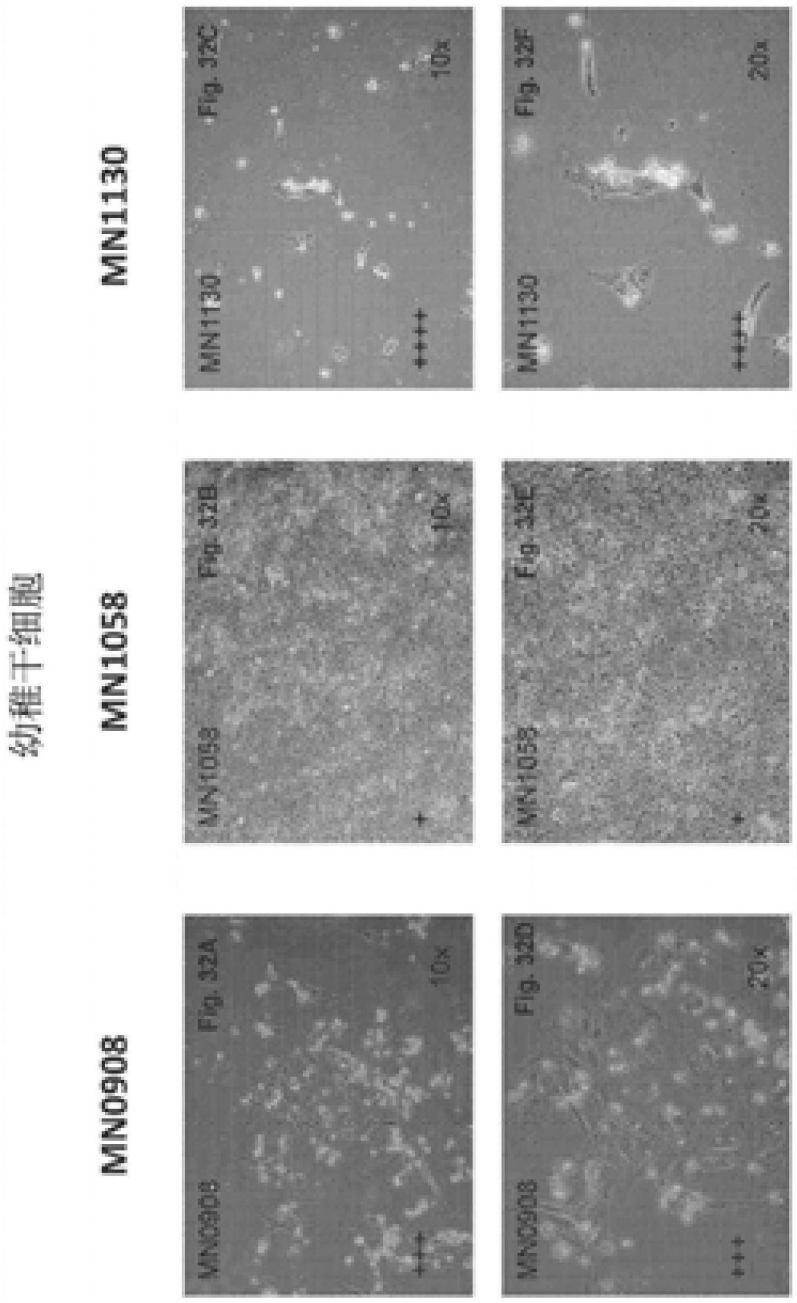

幼稚干细胞
MN0908
MN1058
MN1130
Fig. 32A
Fig. 32B
Fig. 32C
Fig. 32D
Fig. 32E
Fig. 32F
10x
20x
+++
+
++++

图32A至图32F

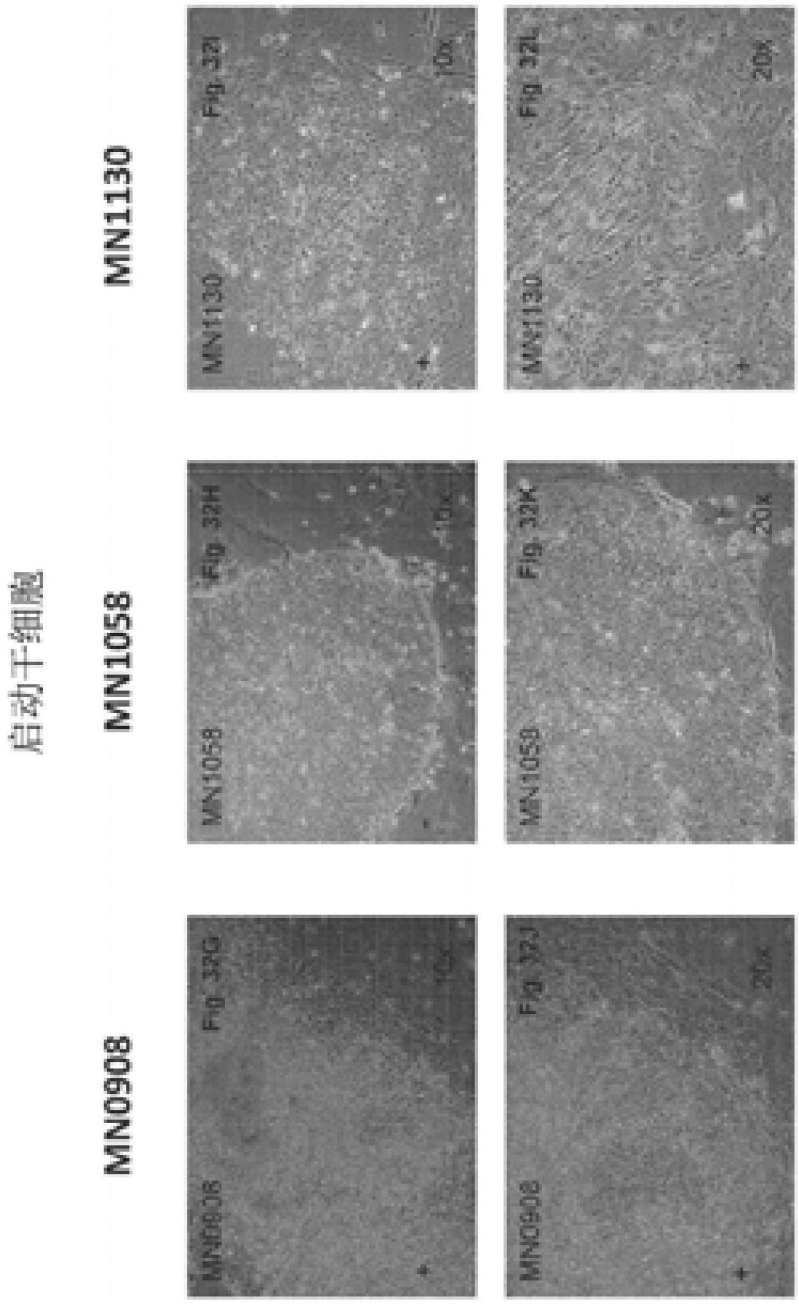

启动干细胞
MN0908
MN1058
MN1130
Fig. 32G
Fig. 32H
Fig. 32I
Fig. 32J
Fig. 32K
Fig. 32L
10x
20x

图32G至图32L

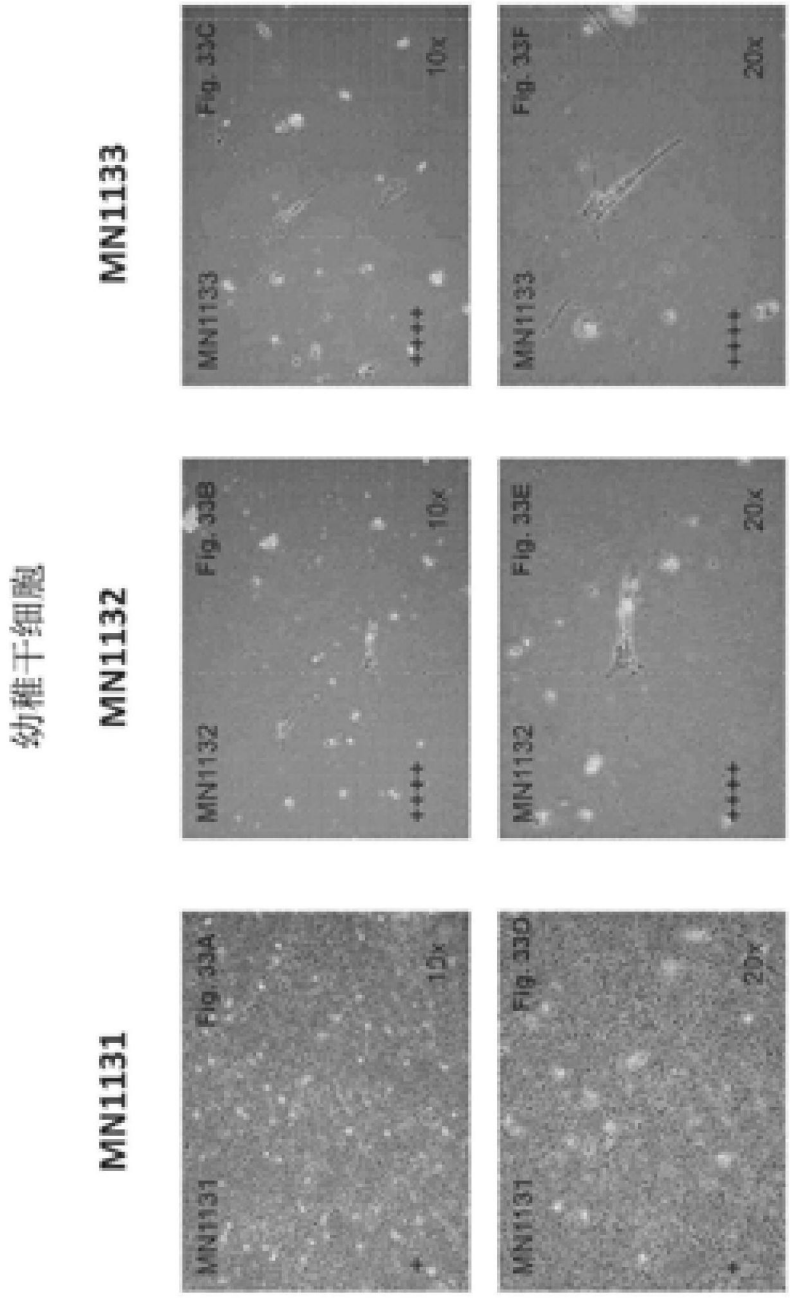

幼稚干细胞
MN1131
MN1132
MN1133
Fig. 33A
Fig. 33B
Fig. 33C
Fig. 33D
Fig. 33E
Fig. 33F
10x
20x
++++
+

图33A至图33F

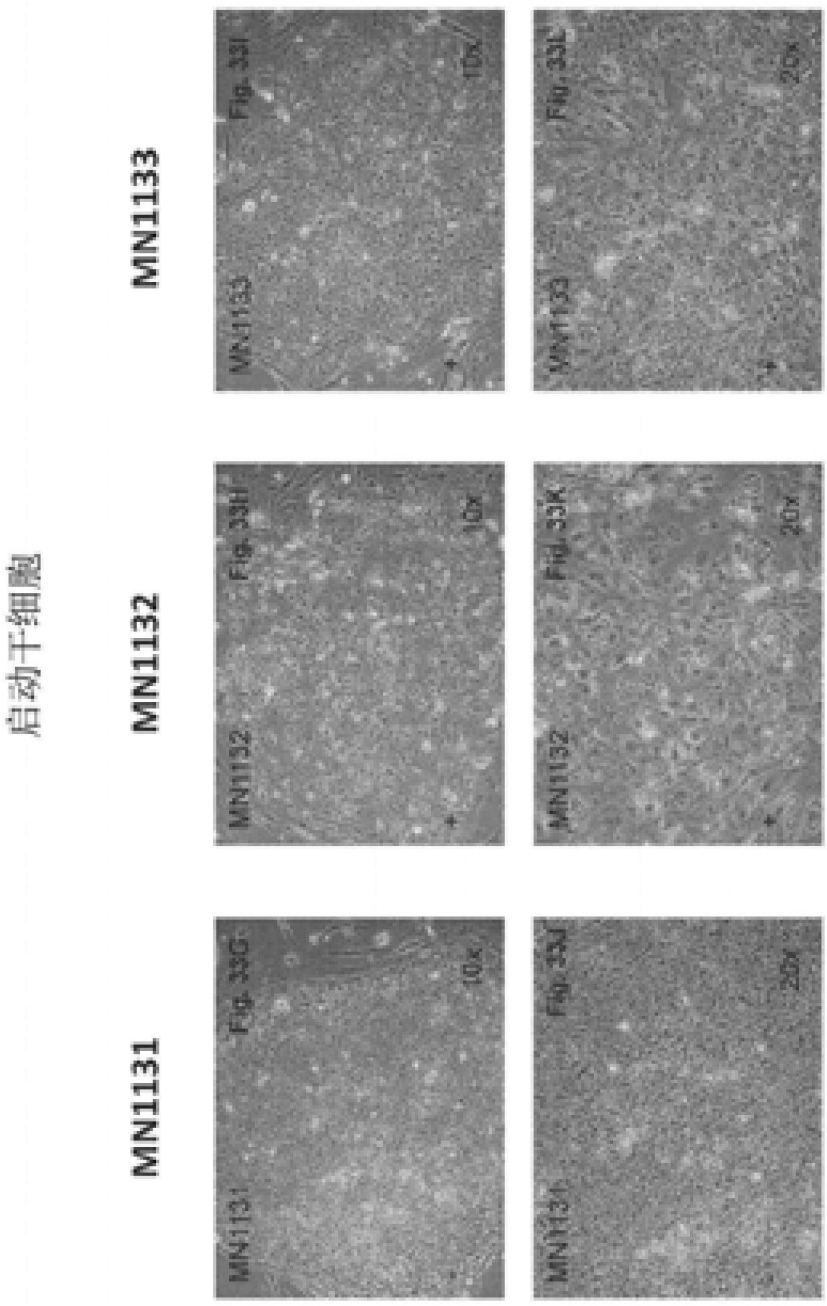

启动干细胞
MN1131
MN1132
MN1133
Fig. 33G
Fig. 33H
Fig. 33I
Fig. 33J
Fig. 33K
Fig. 33L
10x
20x

图33G至图33L

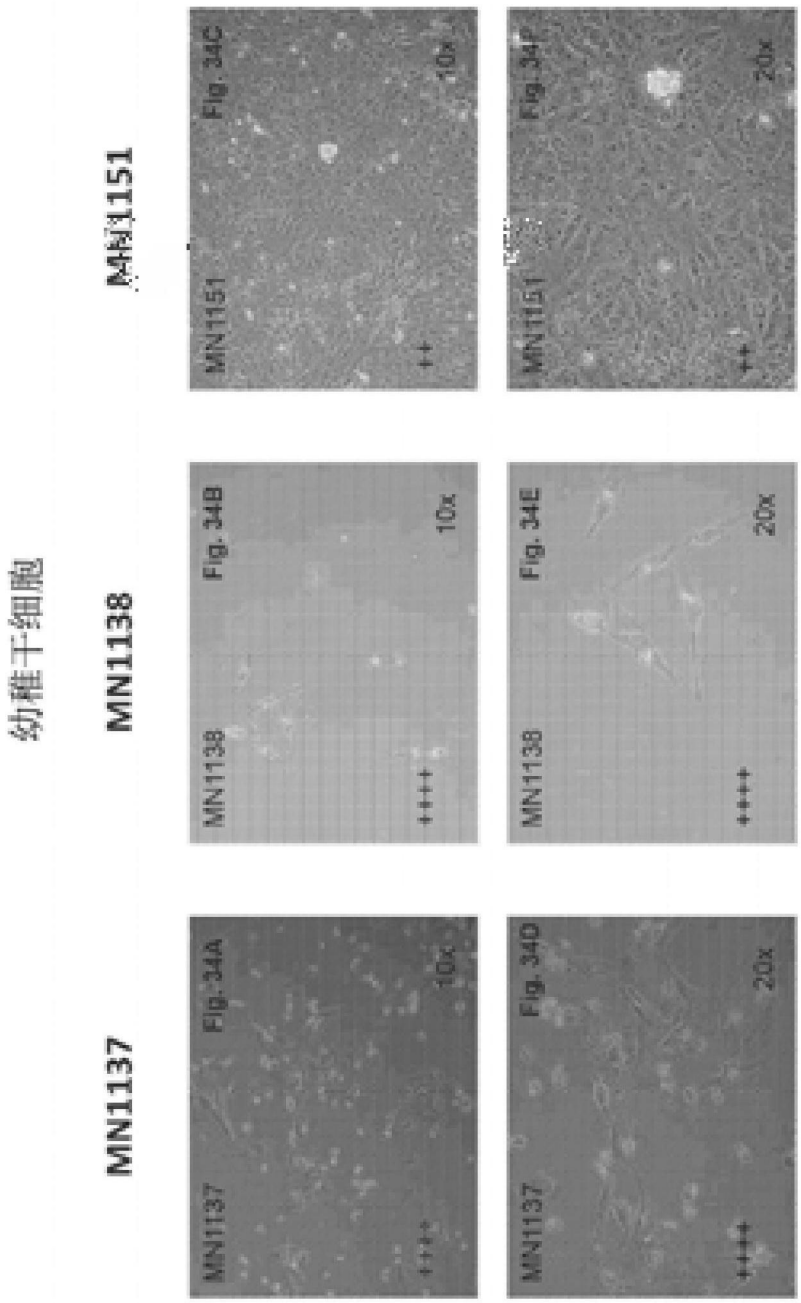

幼稚干细胞
MN1137
MN1138
MN1151
Fig. 34A
Fig. 34B
Fig. 34C
Fig. 34D
Fig. 34E
Fig. 34F
10x
20x
++++
++

图34A至图34F

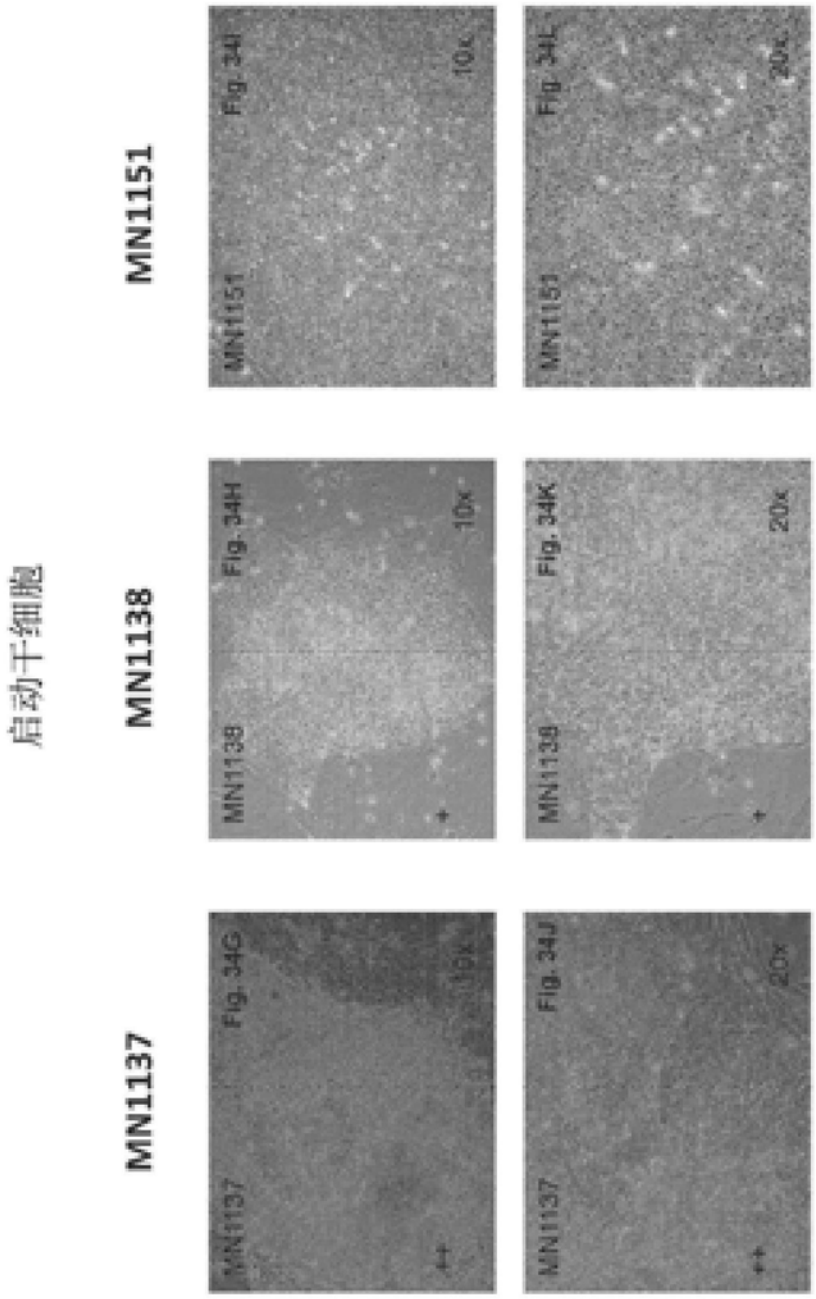

MN1151
MN1138
MN1137
启动干细胞
Fig. 34I
10x
MN1151
Fig. 34L
20x
MN1151
Fig. 34H
10x
MN1138
Fig. 34K
20x
MN1138
Fig. 34G
10x
MN1137
Fig. 34J
20x
MN1137

图34G至图34L

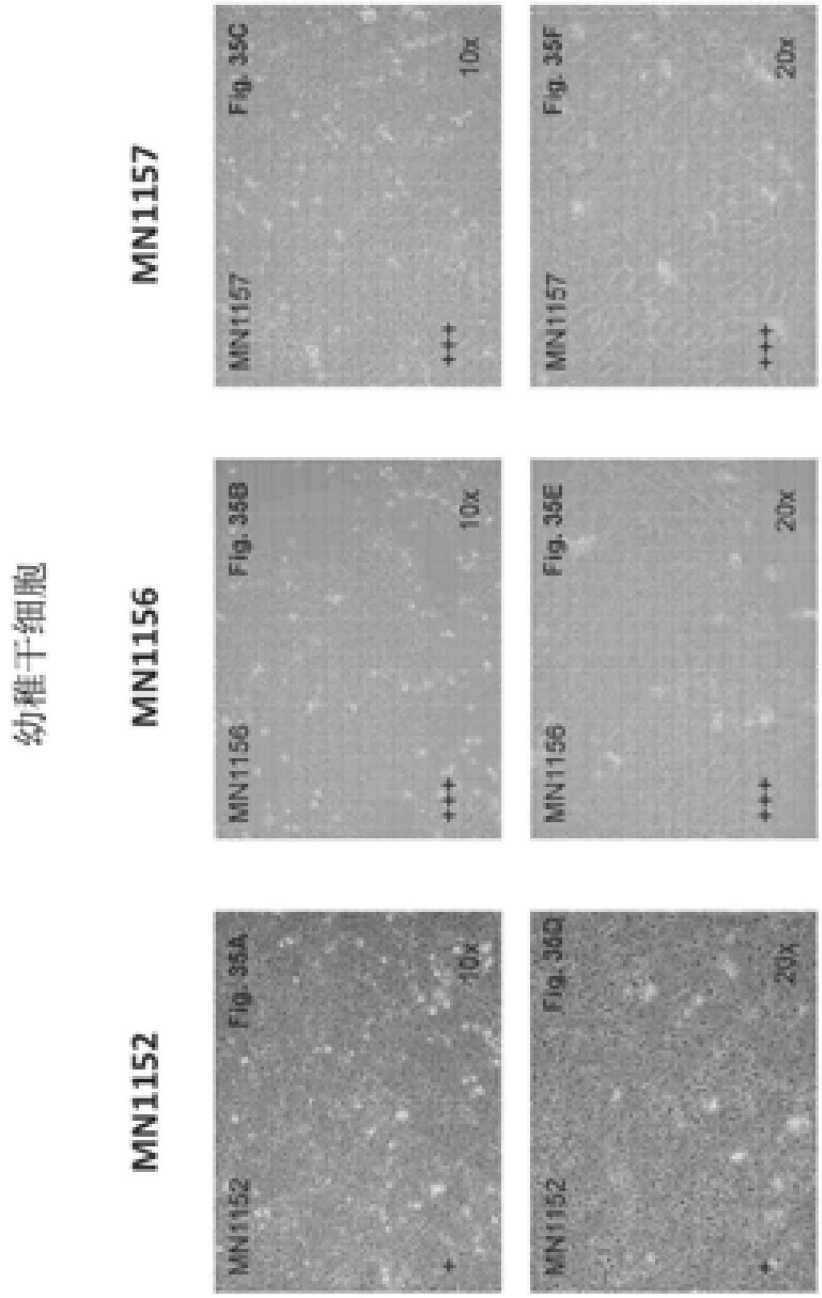

幼稚干细胞
MN1152
MN1156
MN1157
Fig. 35A
Fig. 35B
Fig. 35C
Fig. 35D
Fig. 35E
Fig. 35F
10x
20x
+
+++

图35A至图35F

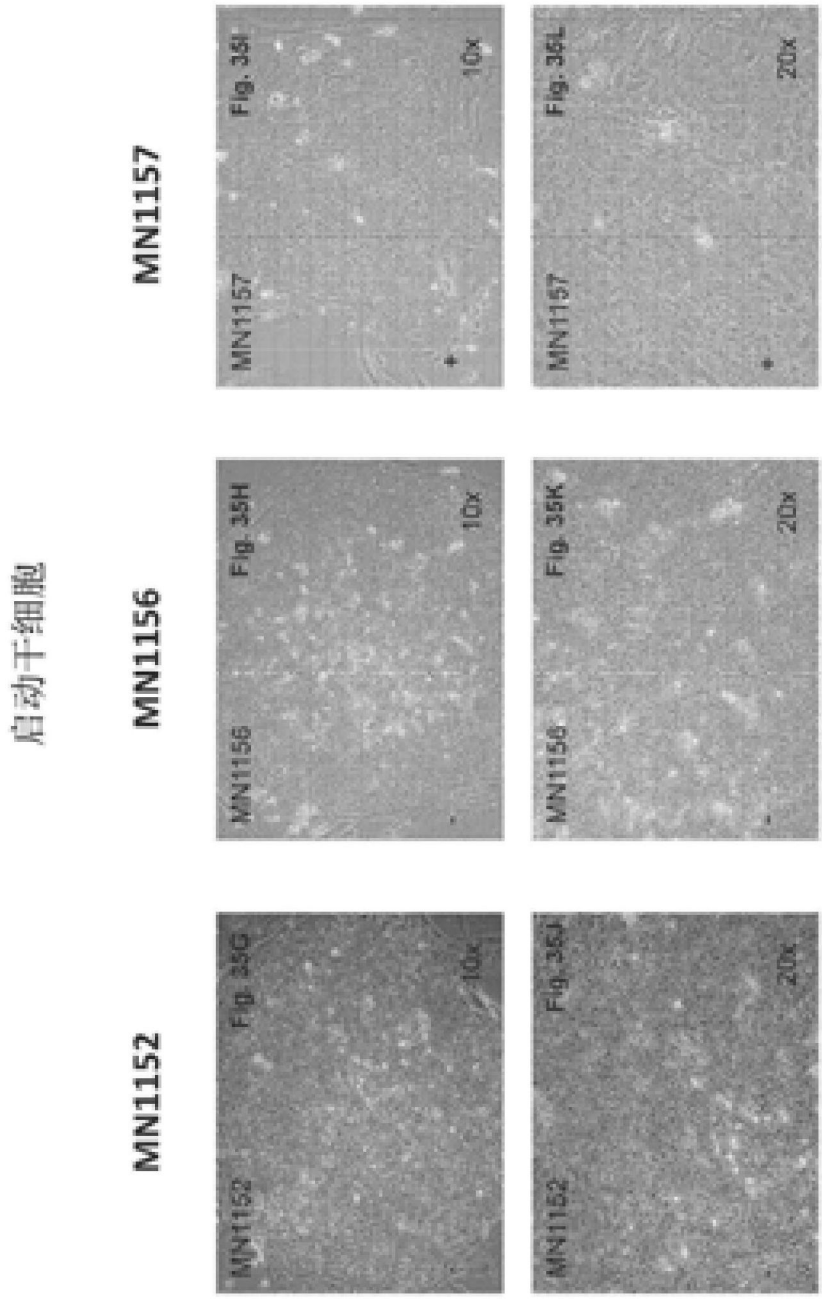

启动干细胞
MN1152
MN1156
MN1157
Fig. 35G
Fig. 35H
Fig. 35I
Fig. 35J
Fig. 35K
Fig. 35L
10x
20x

图35G至图35L

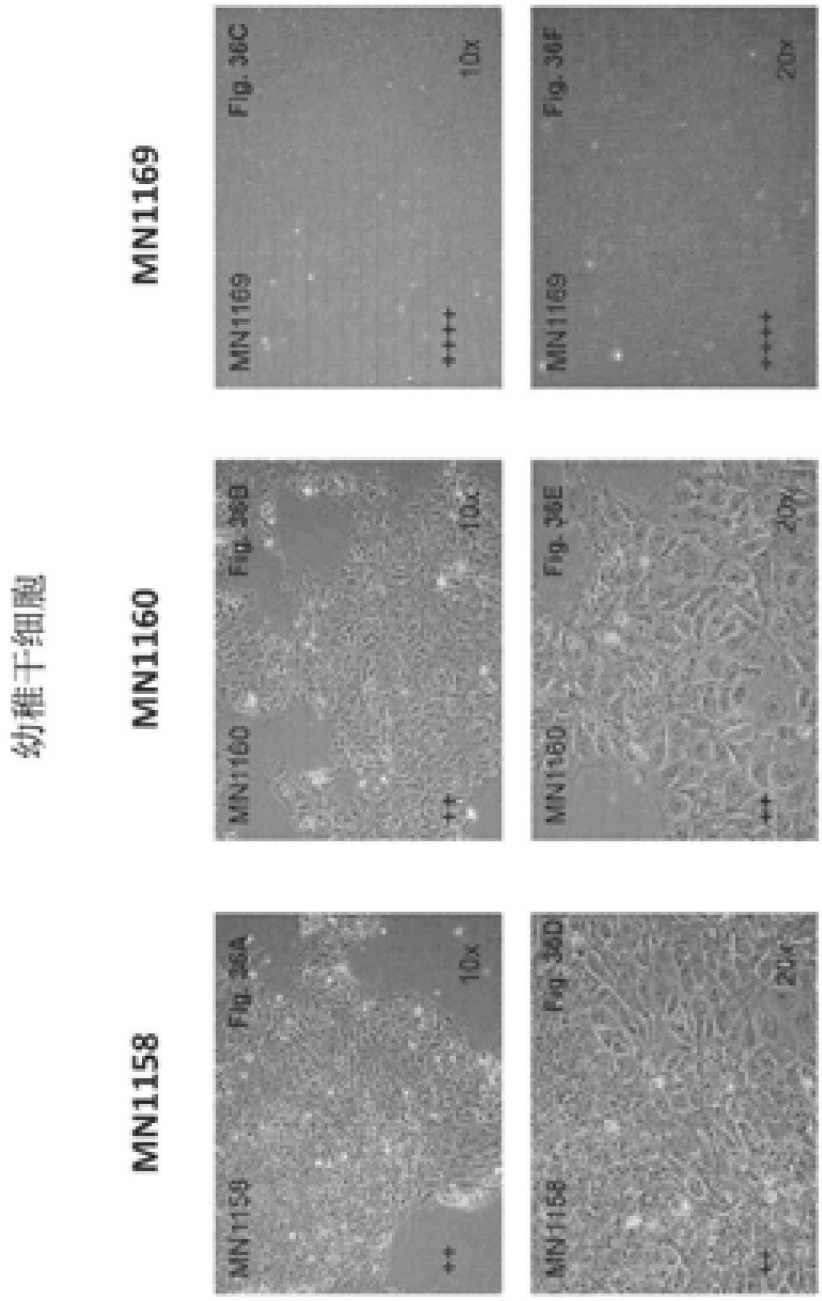

幼稚干细胞
MN1158
MN1160
MN1169
Fig. 36A
10x
MN1158
++
Fig. 36B
10x
MN1160
++
Fig. 36C
10x
MN1169
++++
Fig. 36D
20x
MN1158
++
Fig. 36E
20x
MN1160
++
Fig. 36F
20x
MN1169
++++

图36A至图36F

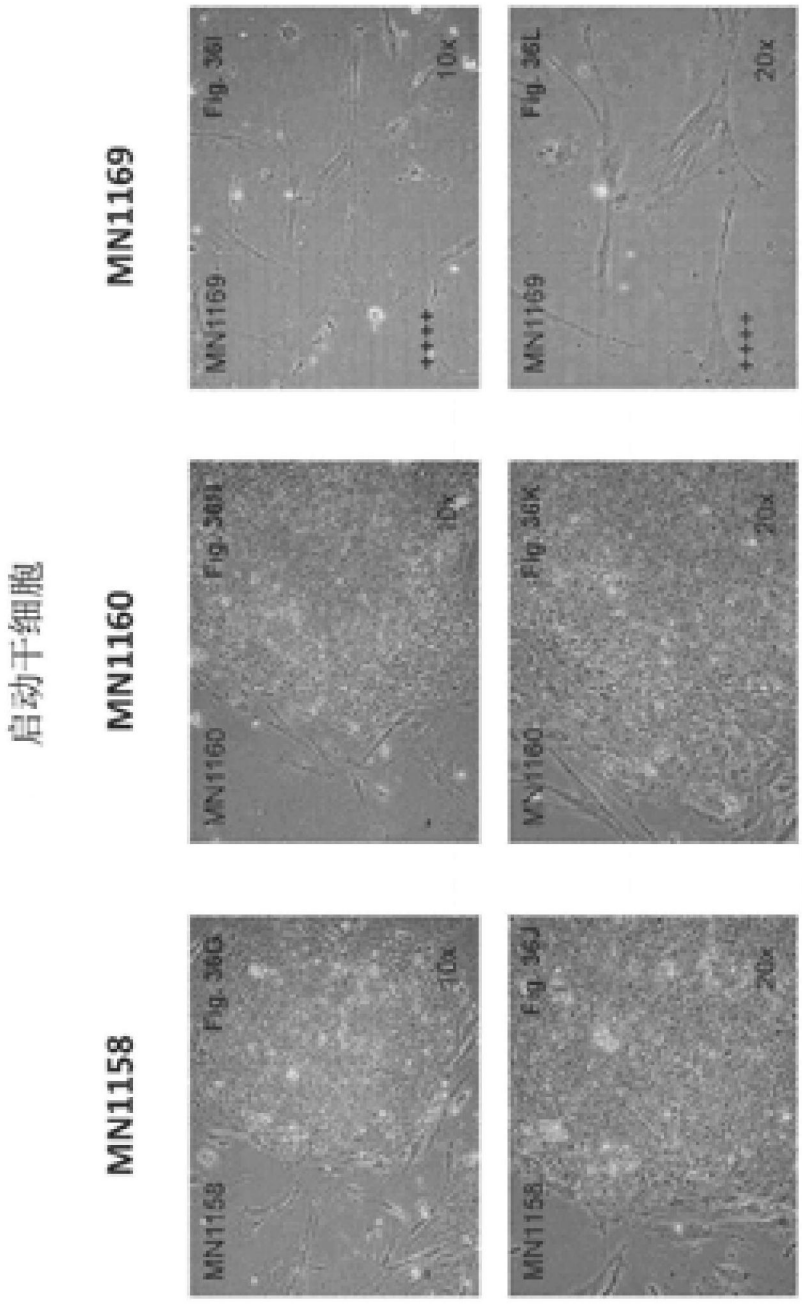

启动干细胞
MN1158
MN1160
MN1169
Fig. 36G
Fig. 36H
Fig. 36I
Fig. 36J
Fig. 36K
Fig. 36L
10x
20x
++++

图36G至图36L

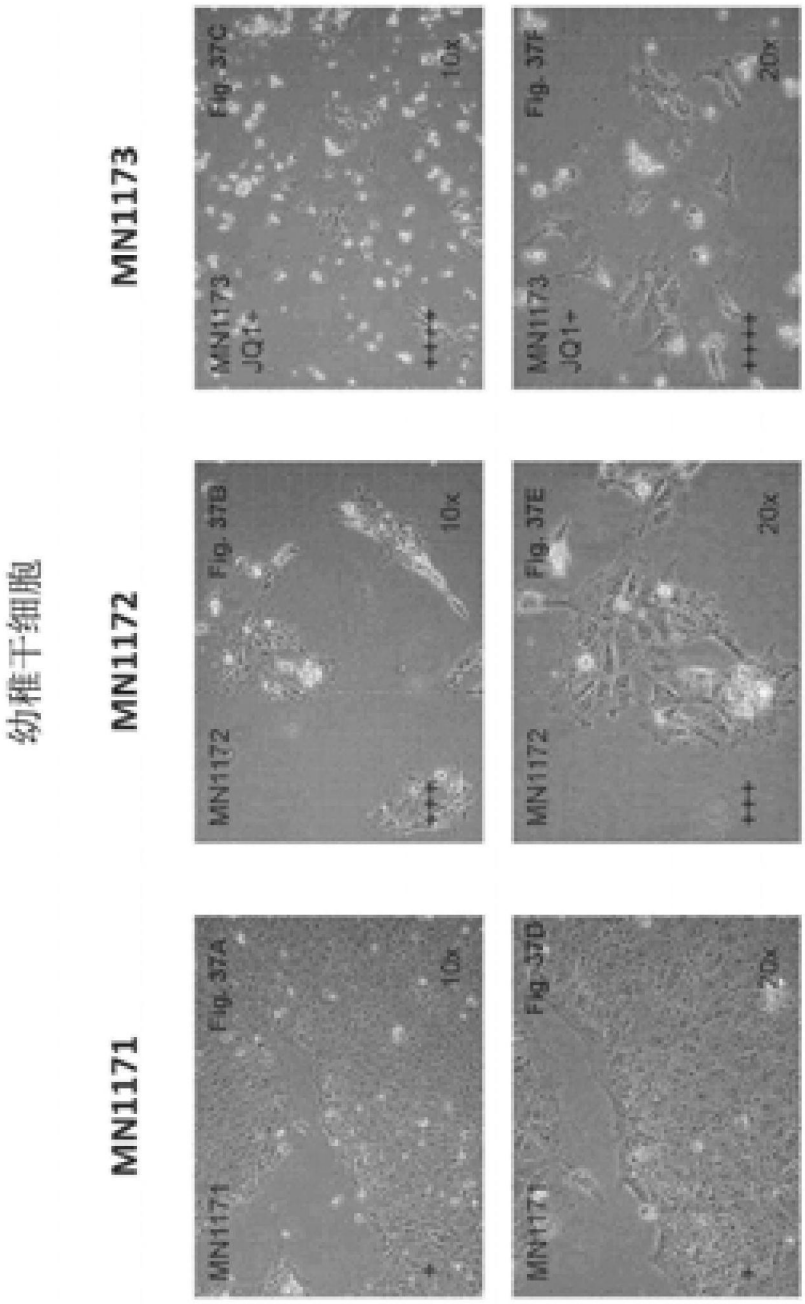

幼稚干细胞
MN1171
MN1172
MN1173
Fig. 37A
Fig. 37B
Fig. 37C
Fig. 37D
Fig. 37E
Fig. 37F
MN1171
MN1172
MN1173
JQ1+
10x
20x
+
+++
++++

图37A至图37F

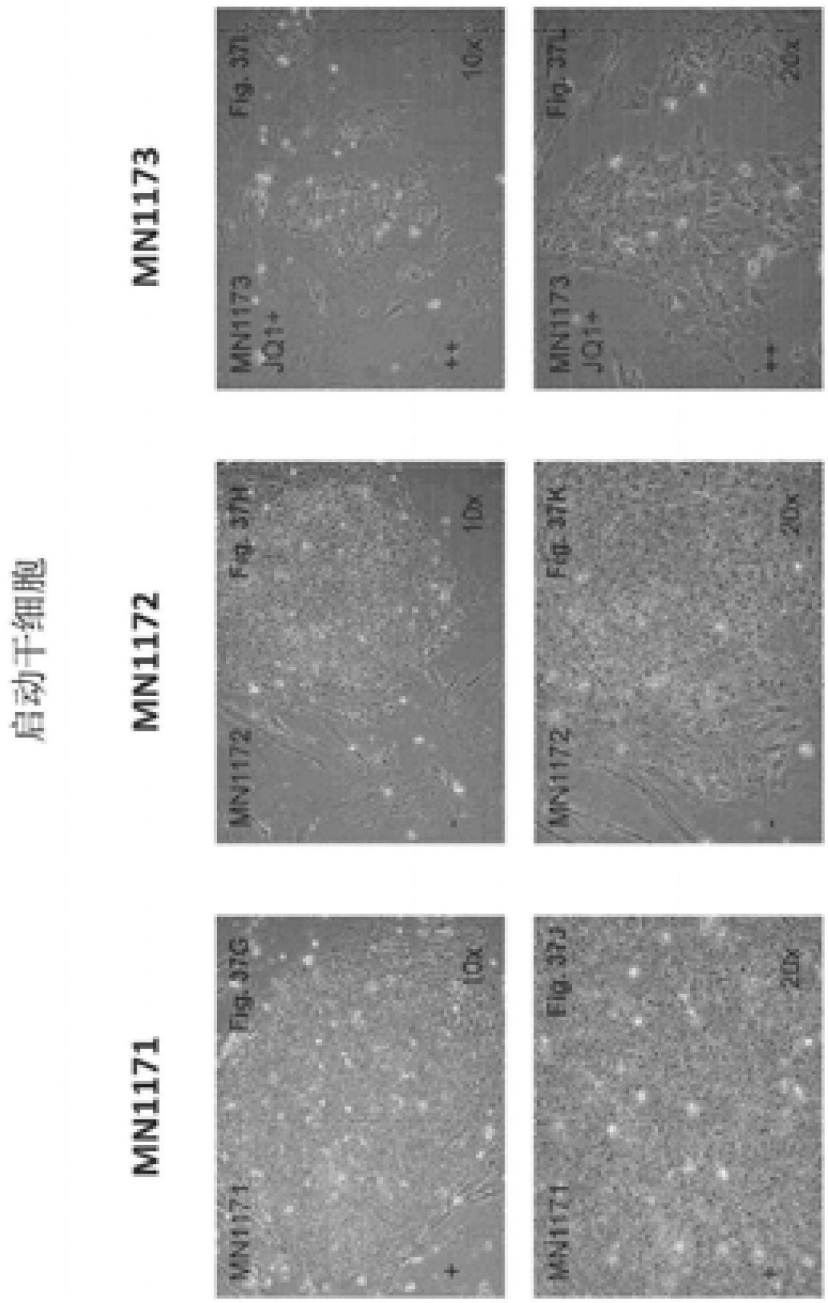

MN1171
MN1172
MN1173
启动干细胞
Fig. 37G
Fig. 37H
Fig. 37I
Fig. 37J
Fig. 37K
Fig. 37L
10x
20x
MN1171
MN1172
MN1173
JQ1+
+
-
++

图37G至图37L

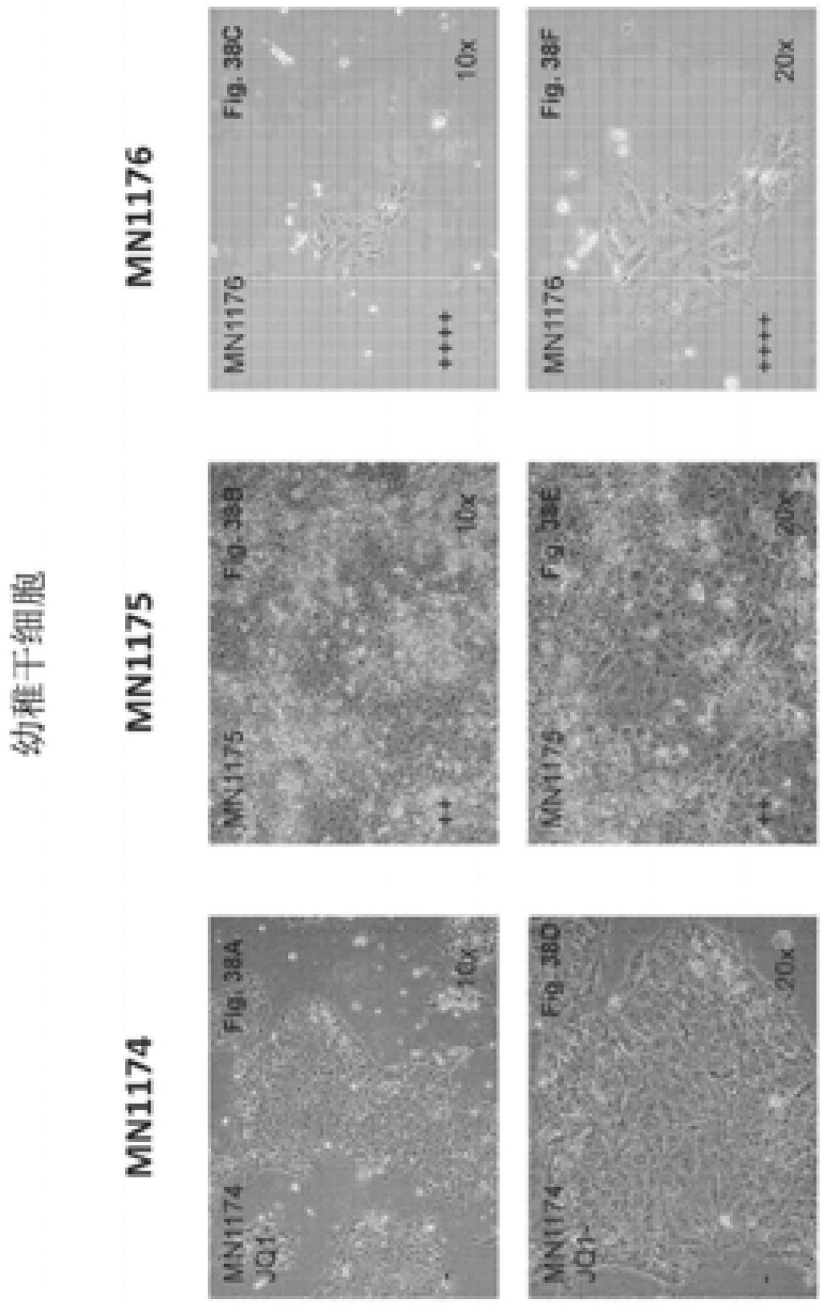

幼稚干细胞
MN1174
MN1175
MN1176
Fig. 38A
Fig. 38B
Fig. 38C
Fig. 38D
Fig. 38E
Fig. 38F
MN1174
JQ1-
MN1175
MN1176
10x
20x
++
++++

图38A至图38F

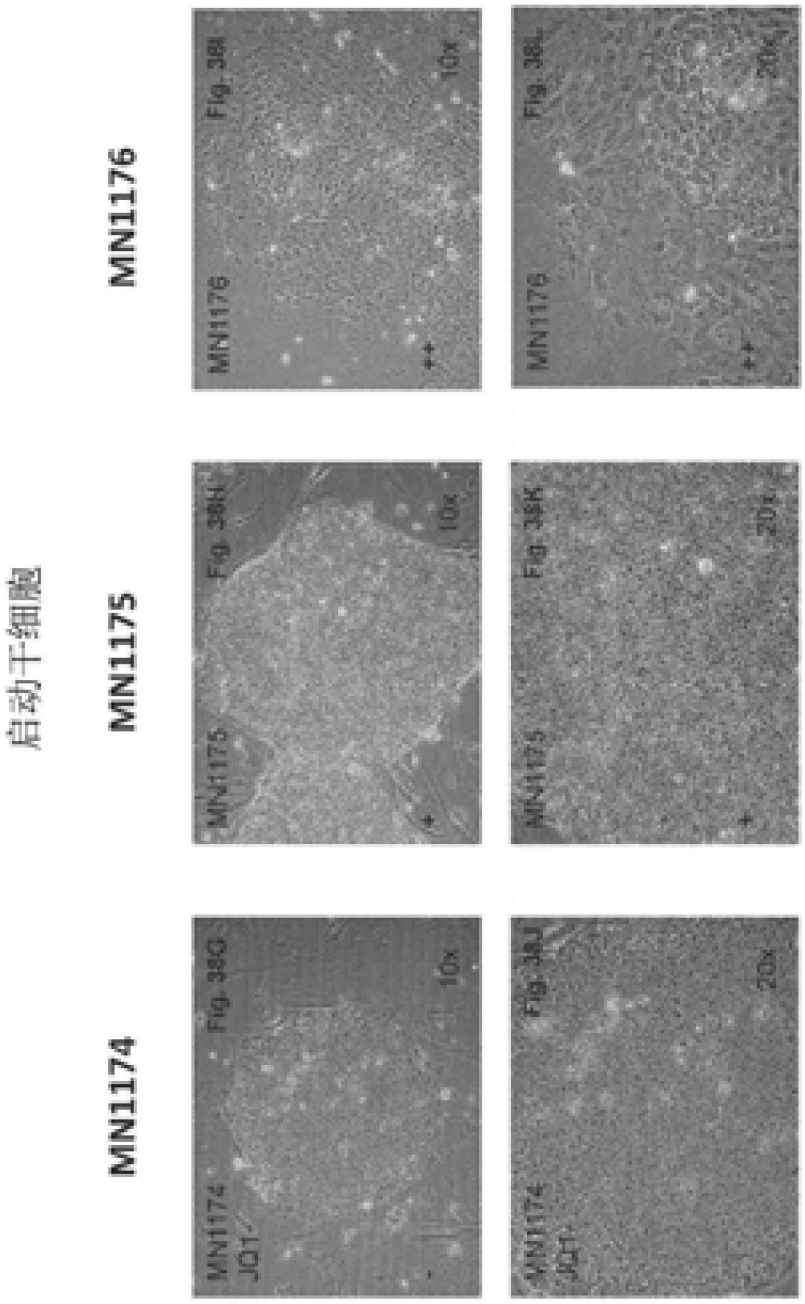

启动干细胞
MN1174
MN1175
MN1176
Fig. 38G
Fig. 38H
Fig. 38I
Fig. 38J
Fig. 38K
Fig. 38L
10x
20x
++
+

图38G至图38L

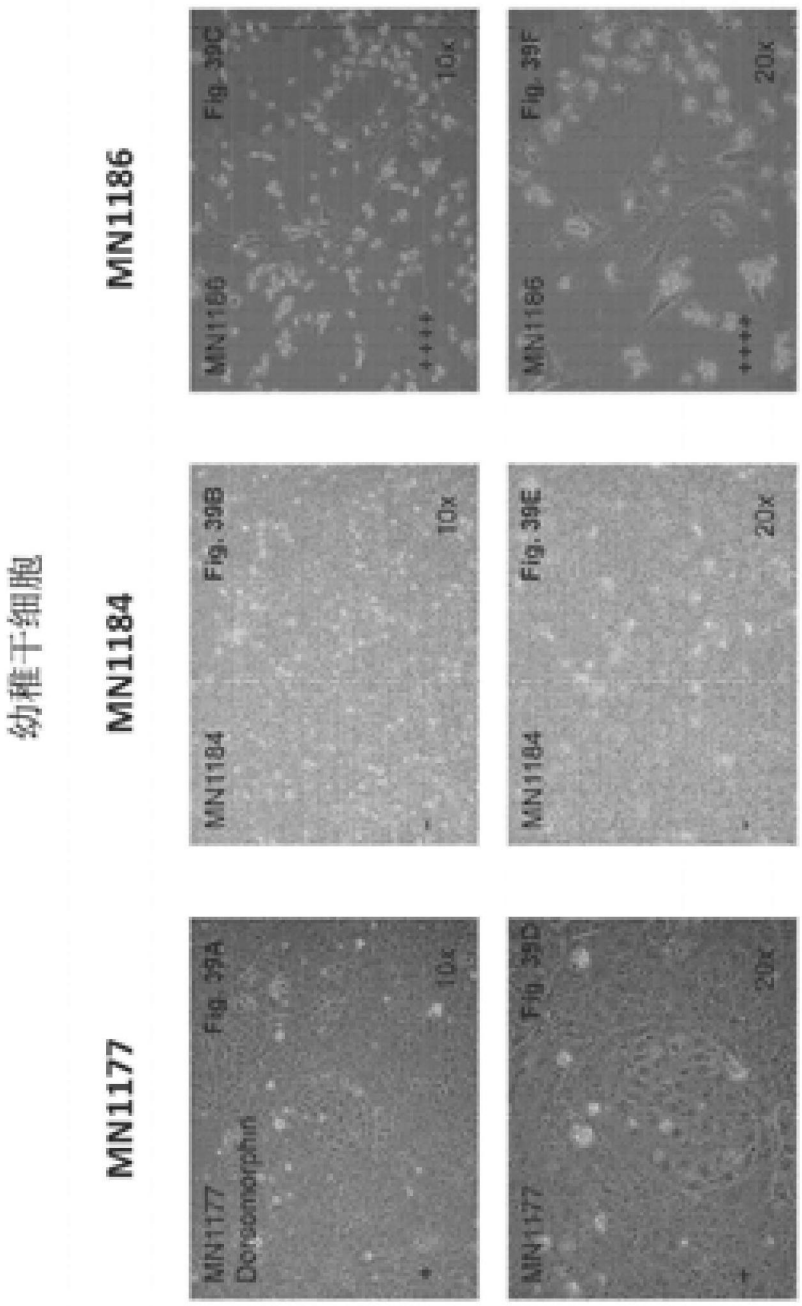

幼稚干细胞
MN1177
MN1184
MN1186
Fig. 39A
MN1177
Dexamorphin
10x
+
Fig. 39B
MN1184
10x
-
Fig. 39C
MN1186
10x
++++
Fig. 39D
MN1177
20x
+
Fig. 39E
MN1184
20x
-
Fig. 39F
MN1186
20x
++++

图39A至图39F

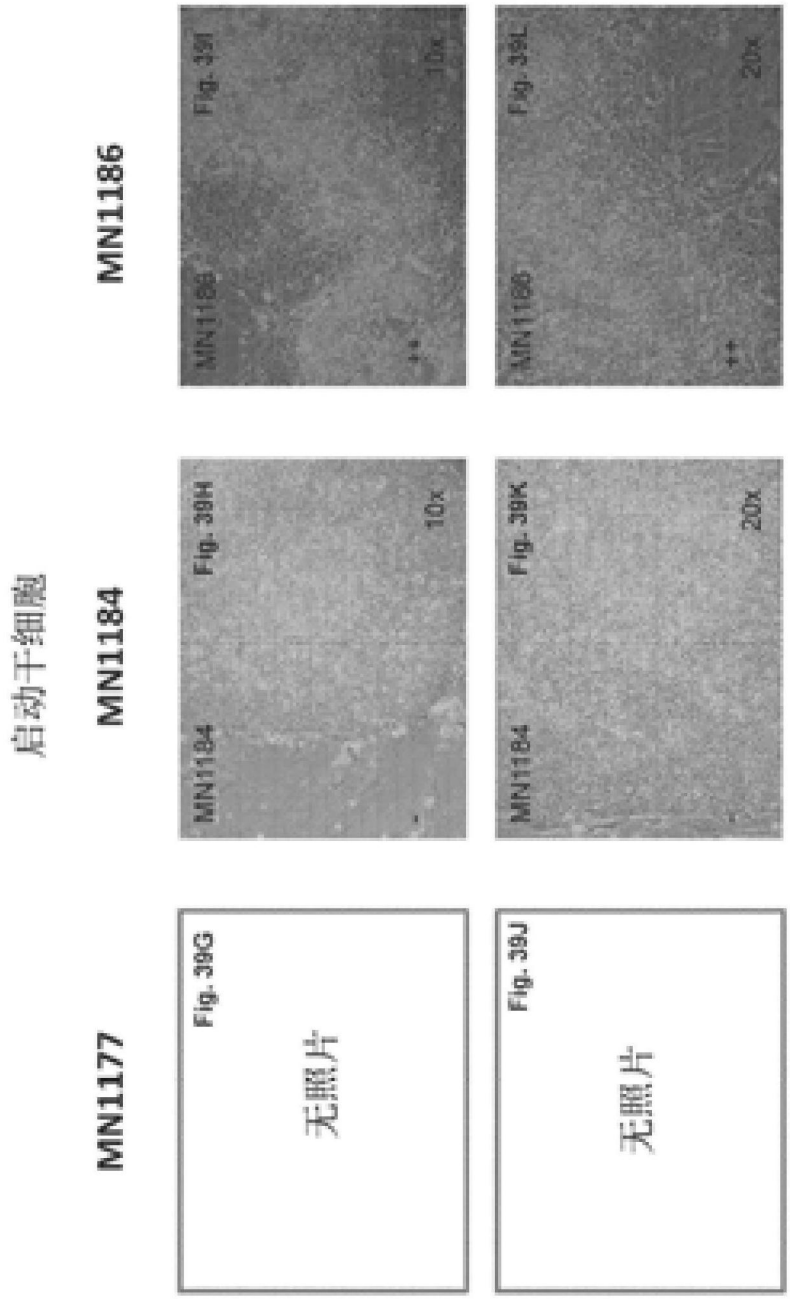

启动干细胞
MN1177
MN1184
MN1186
Fig. 39G
无照片
Fig. 39H
MN1184
10x
-
Fig. 39I
MN1186
10x
++
Fig. 39J
无照片
Fig. 39K
MN1184
20x
-
Fig. 39L
MN1186
20x
++

图39G至图39L

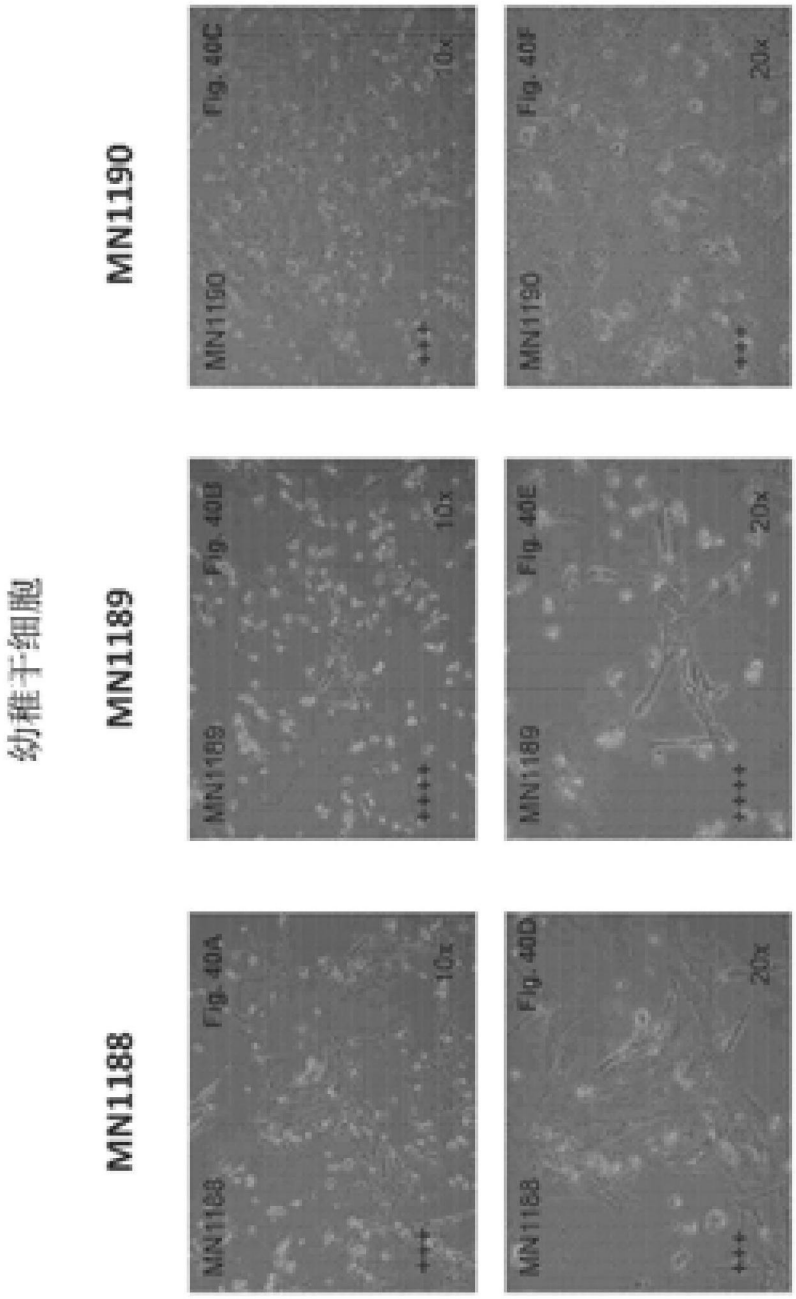

幼稚干细胞
MN1188
MN1189
MN1190
Fig. 40A
Fig. 40B
Fig. 40C
Fig. 40D
Fig. 40E
Fig. 40F
10x
20x
+++
++++

图40A至图40F

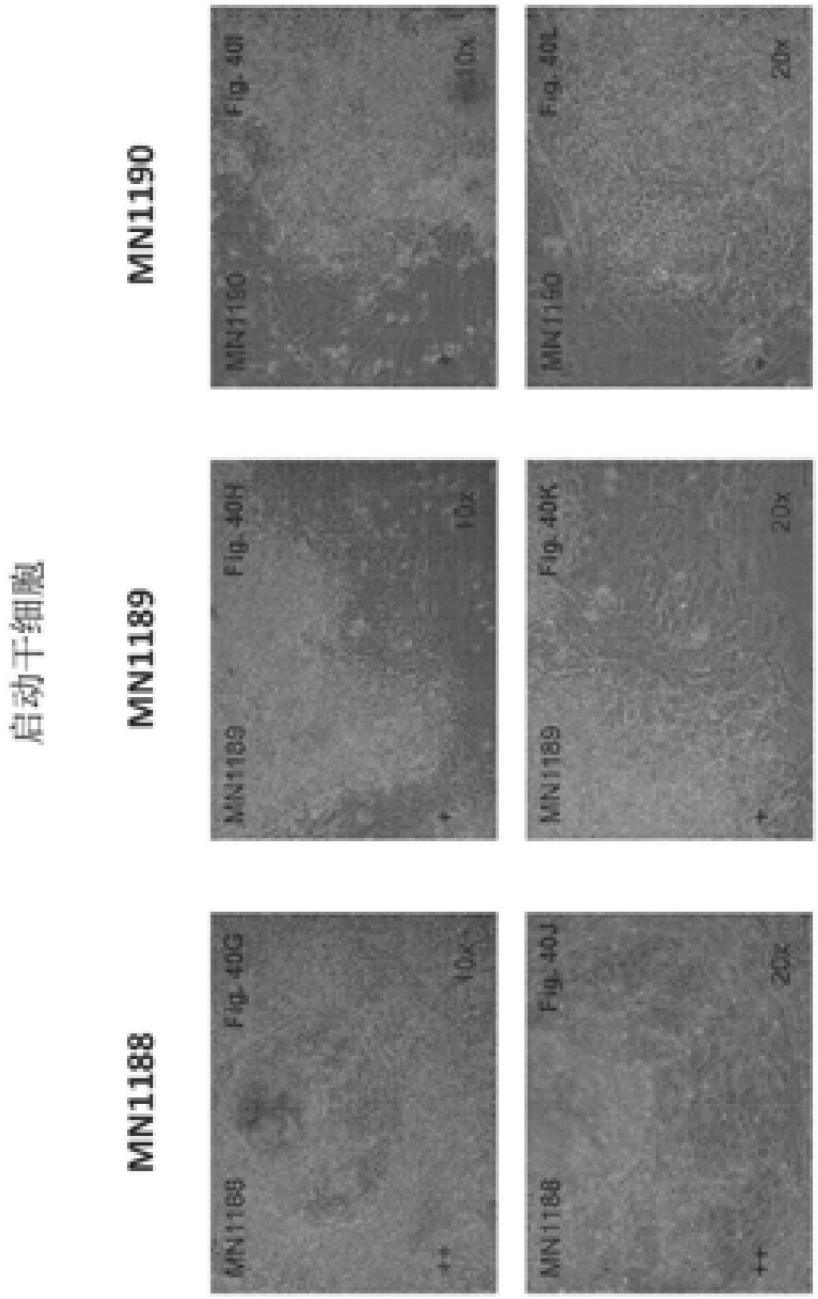

启动干细胞
MN1188
MN1189
MN1190
Fig. 40G
Fig. 40H
Fig. 40I
Fig. 40J
Fig. 40K
Fig. 40L
10x
20x

图40G至图40L

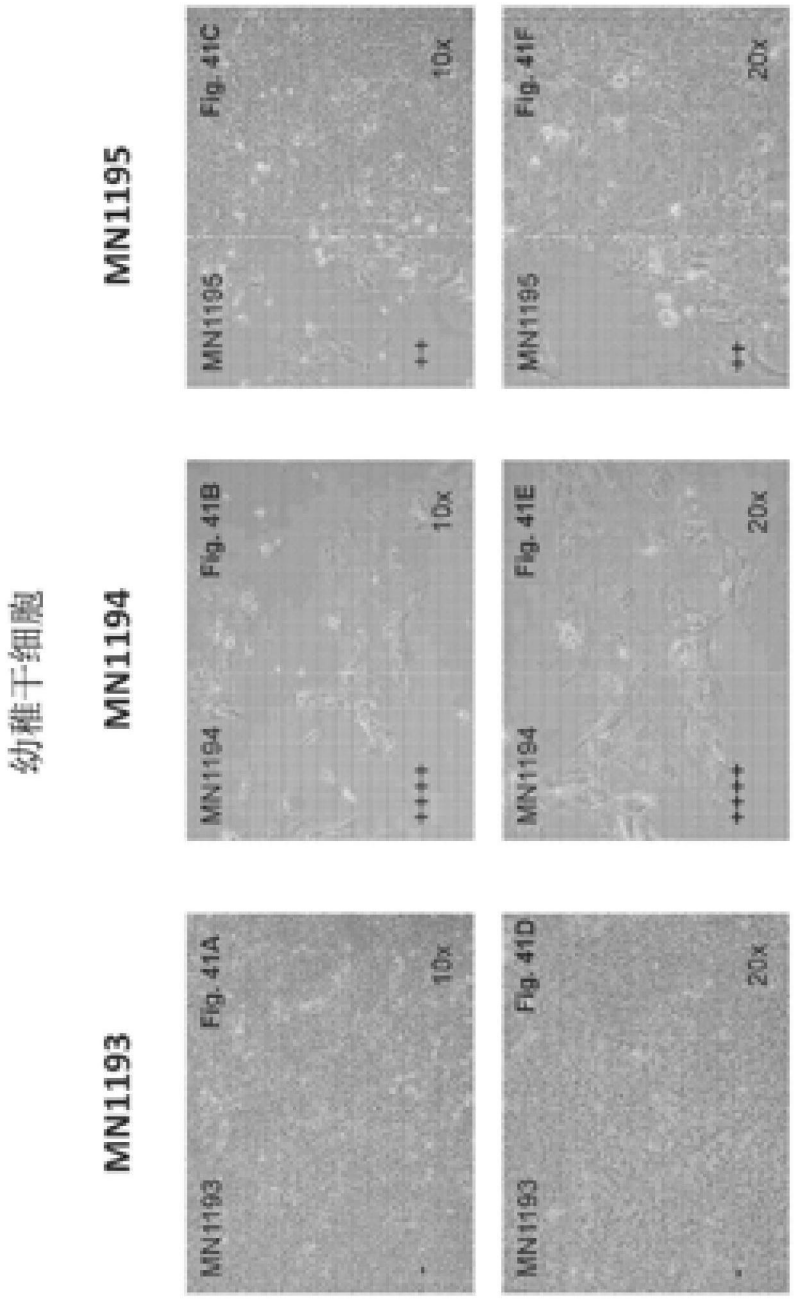

幼稚干细胞
MN1193
MN1194
MN1195
Fig. 41A
Fig. 41B
Fig. 41C
Fig. 41D
Fig. 41E
Fig. 41F
MN1193
MN1194
MN1195
10x
20x
-
++++
++

图41A至图41F

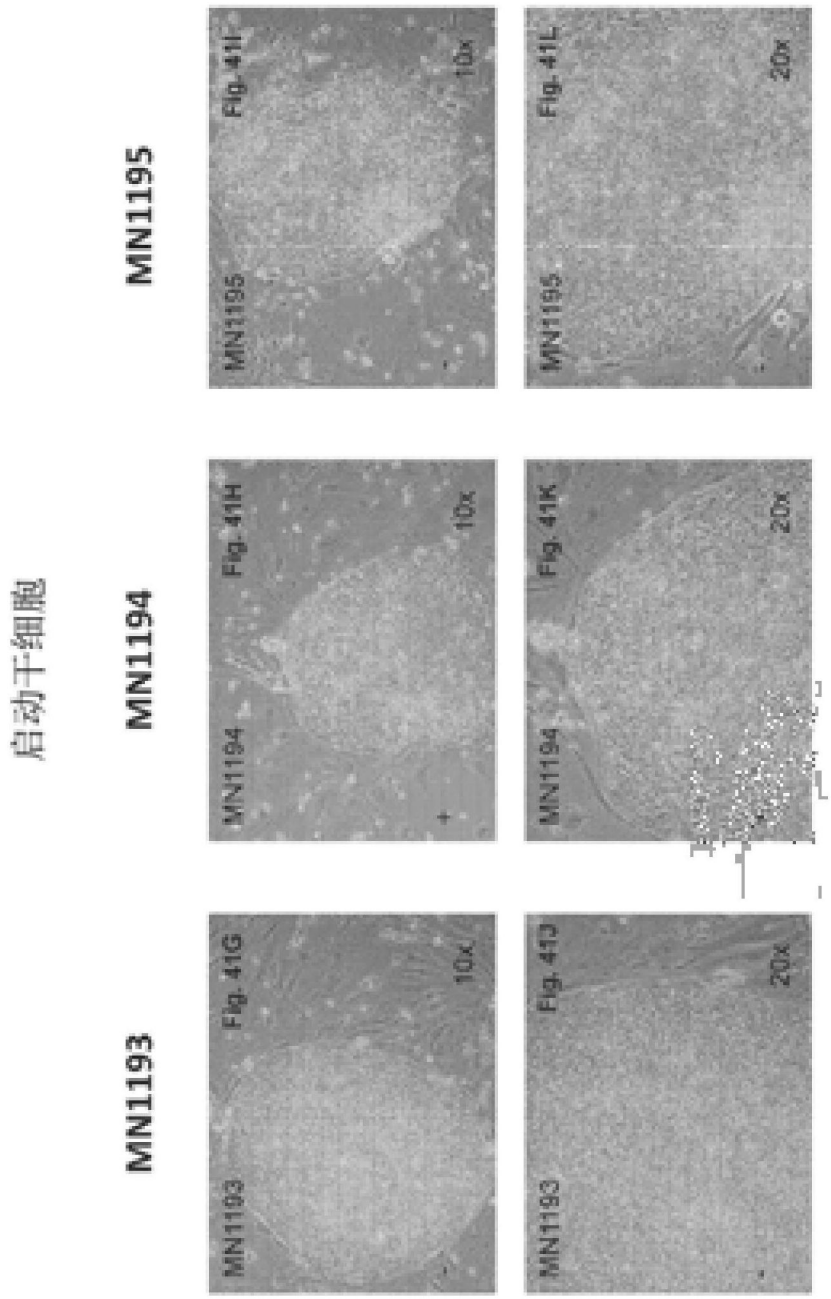

MN1193
MN1194
MN1195
启动干细胞
Fig. 41G
Fig. 41H
Fig. 41I
Fig. 41J
Fig. 41K
Fig. 41L
10x
20x
MN1193
MN1194
MN1195

图41G至图41L

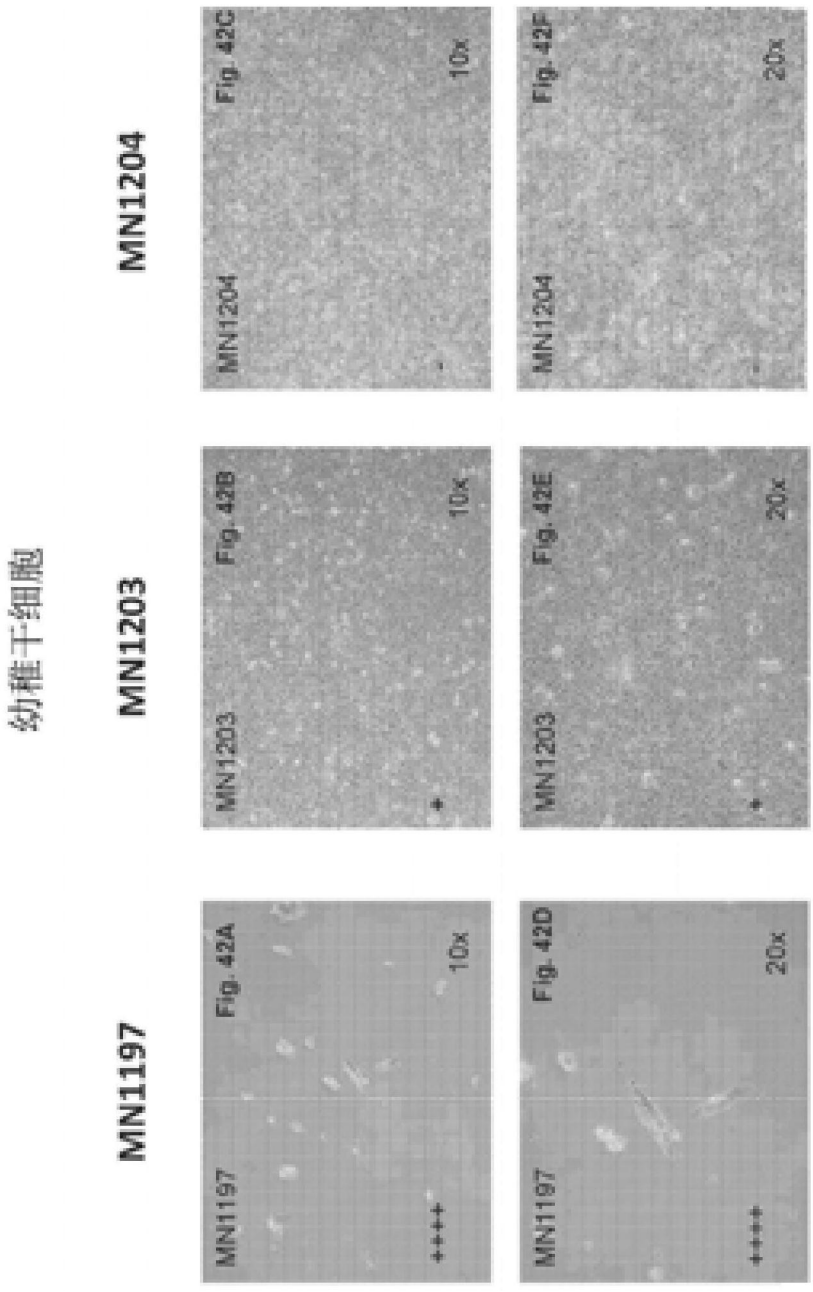

幼稚干细胞
MN1197
MN1203
MN1204
Fig. 42A
Fig. 42B
Fig. 42C
Fig. 42D
Fig. 42E
Fig. 42F
MN1197
MN1203
MN1204
++++
+
-
10x
20x

图42A至图42F

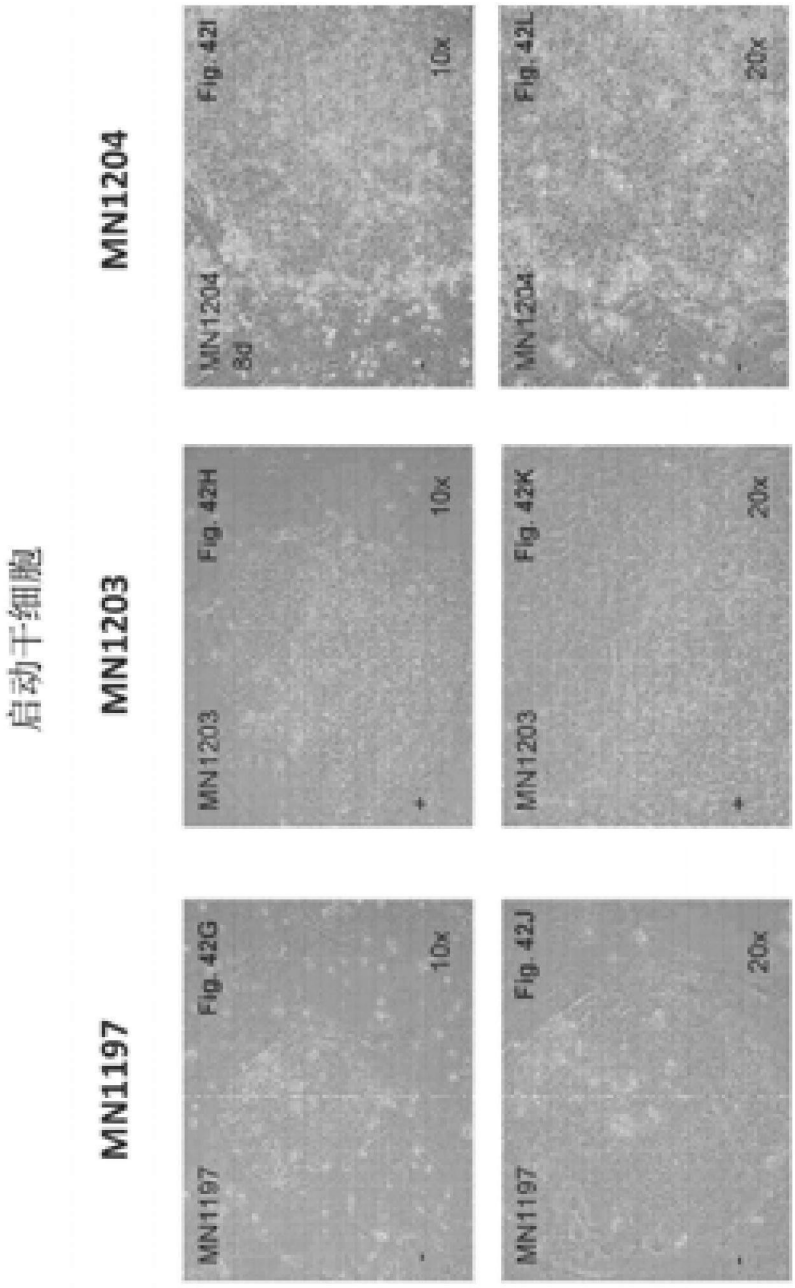

MN1197
MN1203
MN1204
启动干细胞
Fig. 42G
Fig. 42H
Fig. 42I
Fig. 42J
Fig. 42K
Fig. 42L
MN1197
MN1203
MN1204
8d
10x
20x
-
+

图42G至图42L

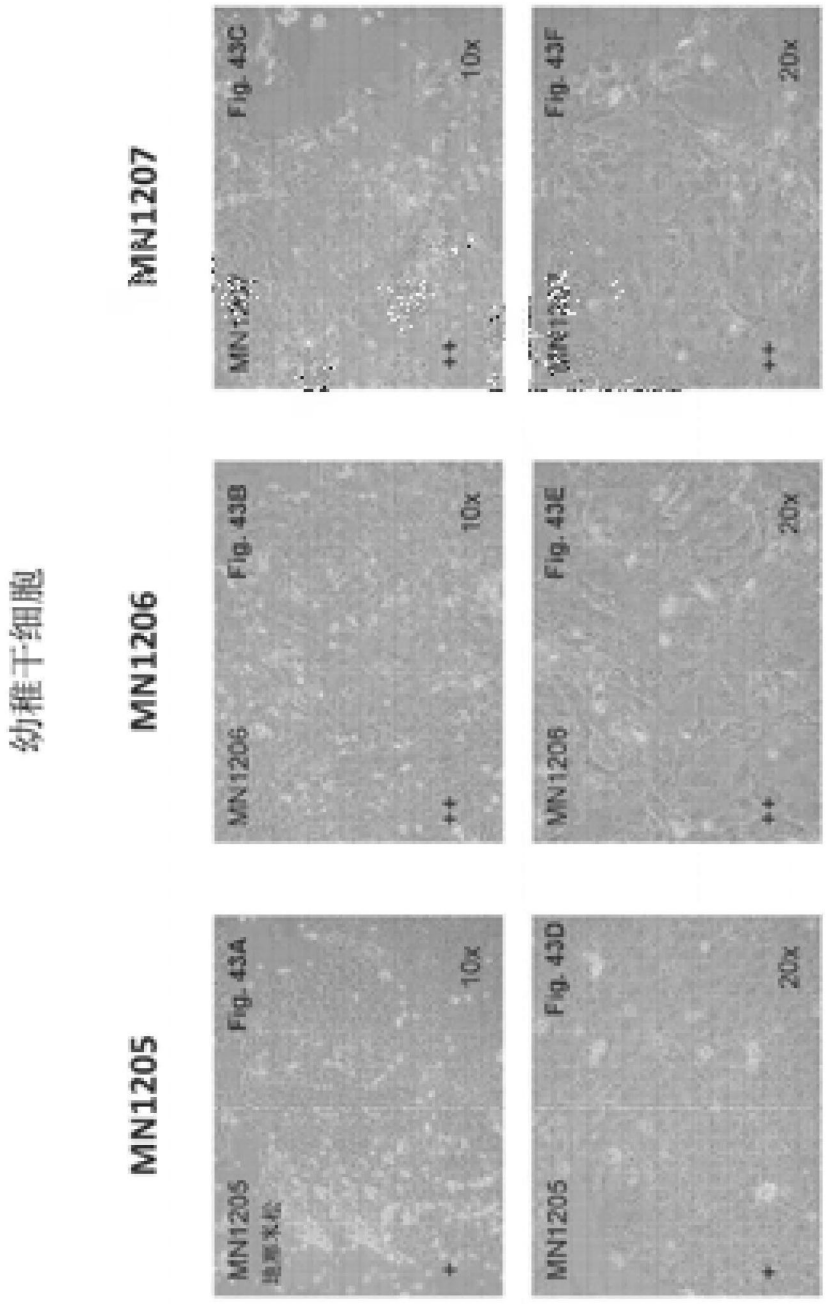

幼稚干细胞
MN1205
MN1206
MN1207
Fig. 43A
Fig. 43B
Fig. 43C
Fig. 43D
Fig. 43E
Fig. 43F
10x
20x
+
++

图43A至图43F

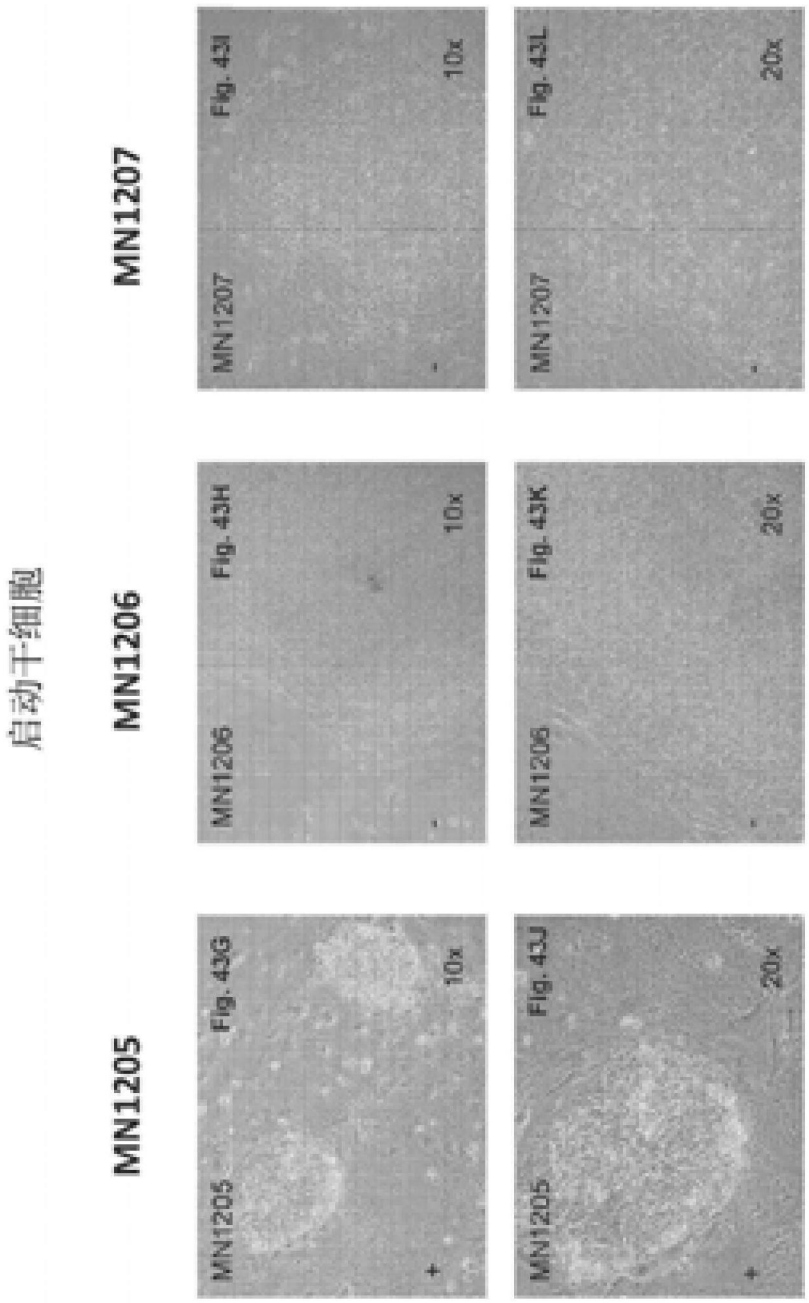

MN1205
MN1206
MN1207
启动干细胞
Fig. 43G
Fig. 43H
Fig. 43I
Fig. 43J
Fig. 43K
Fig. 43L
10x
20x
+
-

图43G至图43L

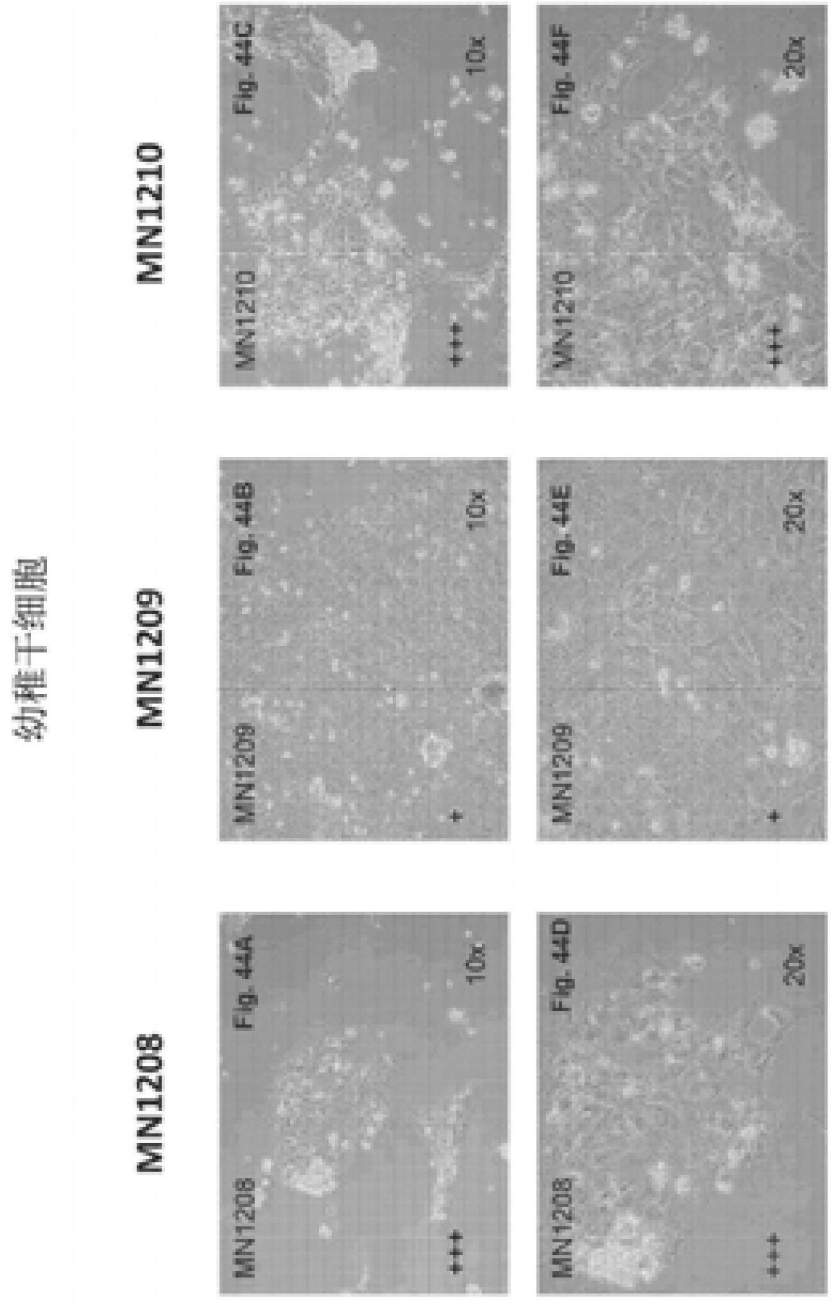

幼稚干细胞
MN1208
MN1209
MN1210
MN1208
Fig. 44A
10x
+++
MN1209
Fig. 44B
10x
+
MN1210
Fig. 44C
10x
+++
MN1208
Fig. 44D
20x
+++
MN1209
Fig. 44E
20x
+
MN1210
Fig. 44F
20x
+++

图44A至图44F

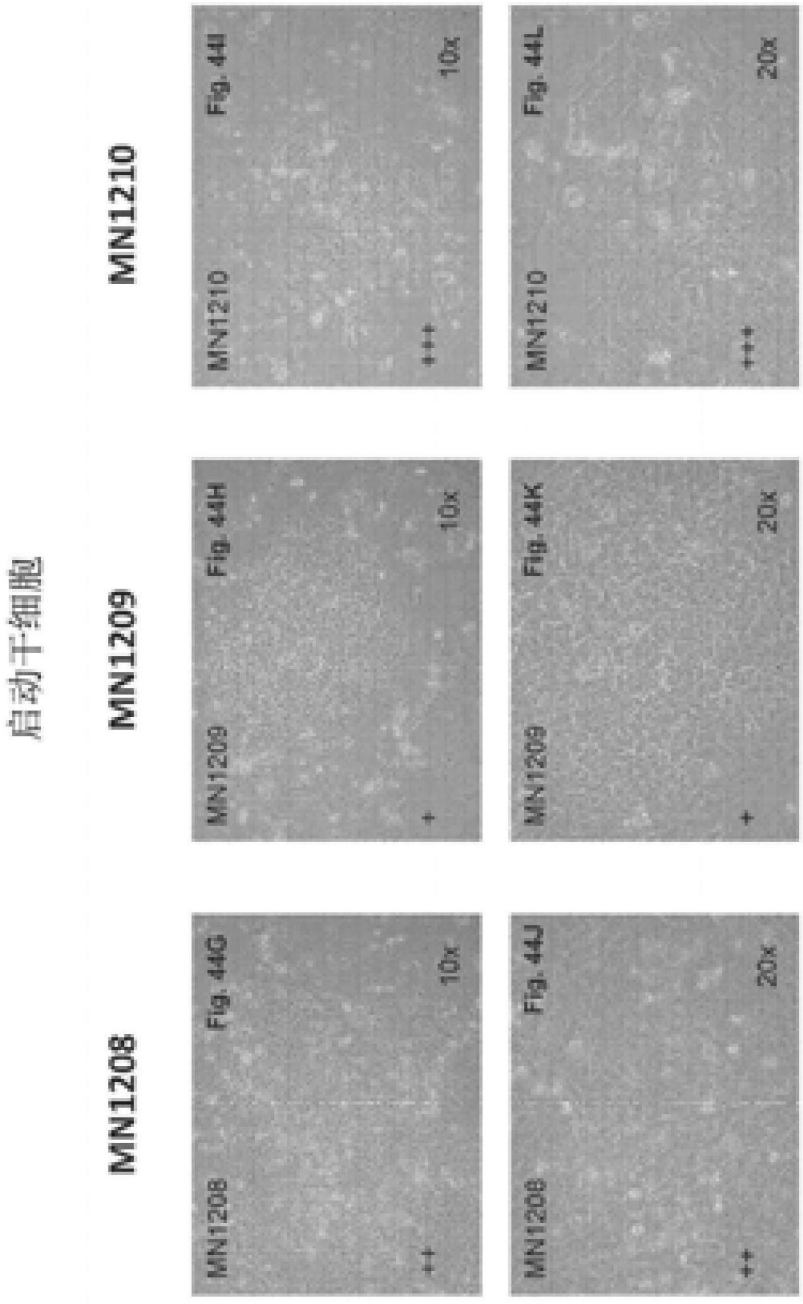

MN1208
MN1209
MN1210
启动干细胞
Fig. 44G
Fig. 44H
Fig. 44I
Fig. 44J
Fig. 44K
Fig. 44L
MN1208
MN1209
MN1210
++
+
+++
10x
20x

图44G至图44L

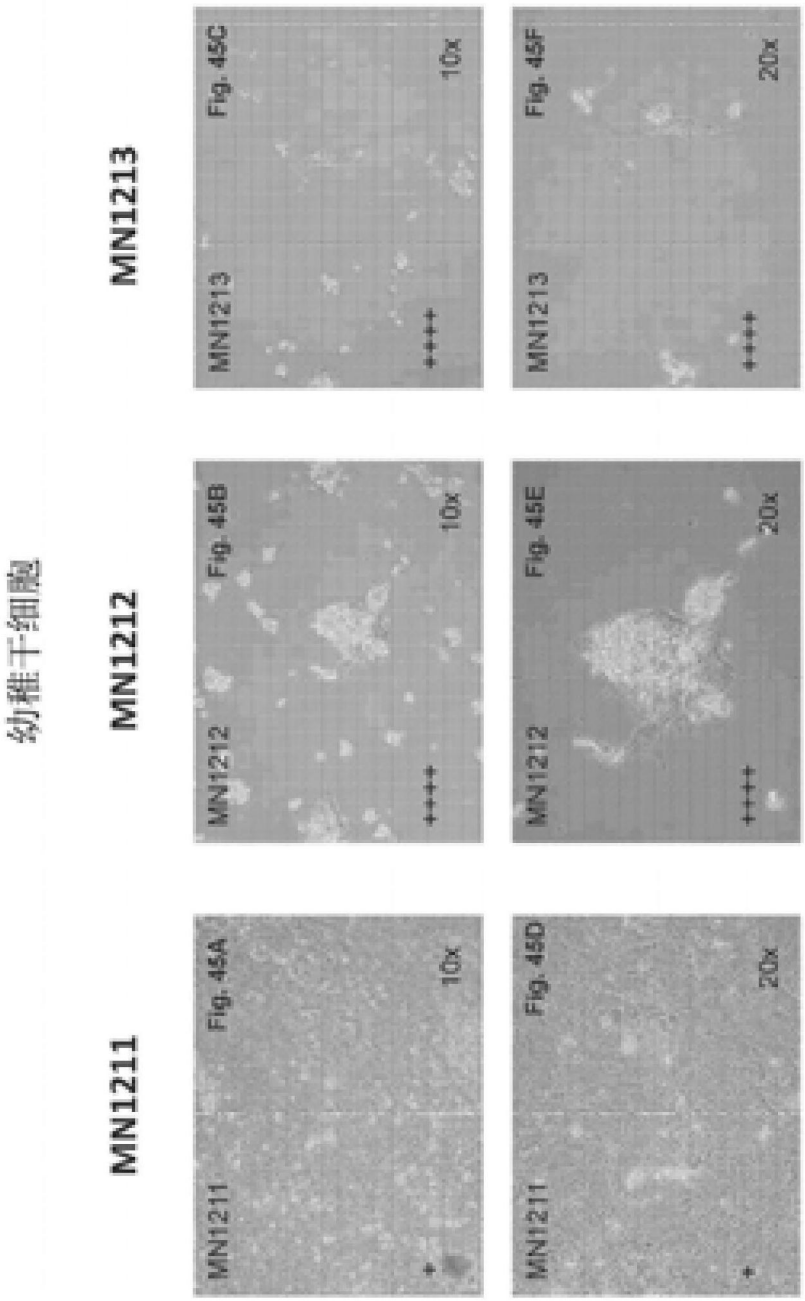

幼稚干细胞
MN1211
MN1212
MN1213
Fig. 45A
Fig. 45B
Fig. 45C
Fig. 45D
Fig. 45E
Fig. 45F
MN1211
MN1212
MN1213
10x
20x
+
++++

图45A至图45F

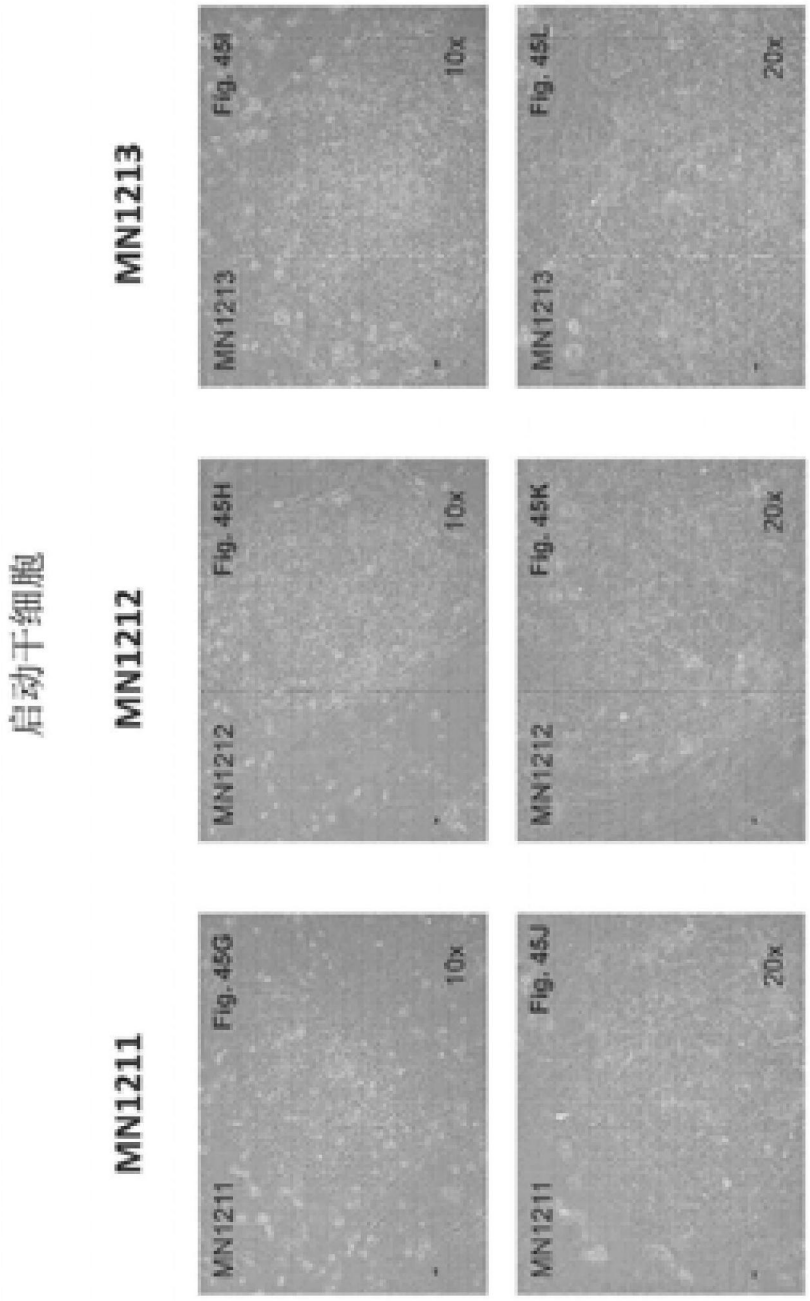

MN1211
MN1212
MN1213
启动干细胞
Fig. 45G
10x
MN1211
Fig. 45J
20x
MN1211
Fig. 45H
10x
MN1212
Fig. 45K
20x
MN1212
Fig. 45I
10x
MN1213
Fig. 45L
20x
MN1213

图45G至图45L

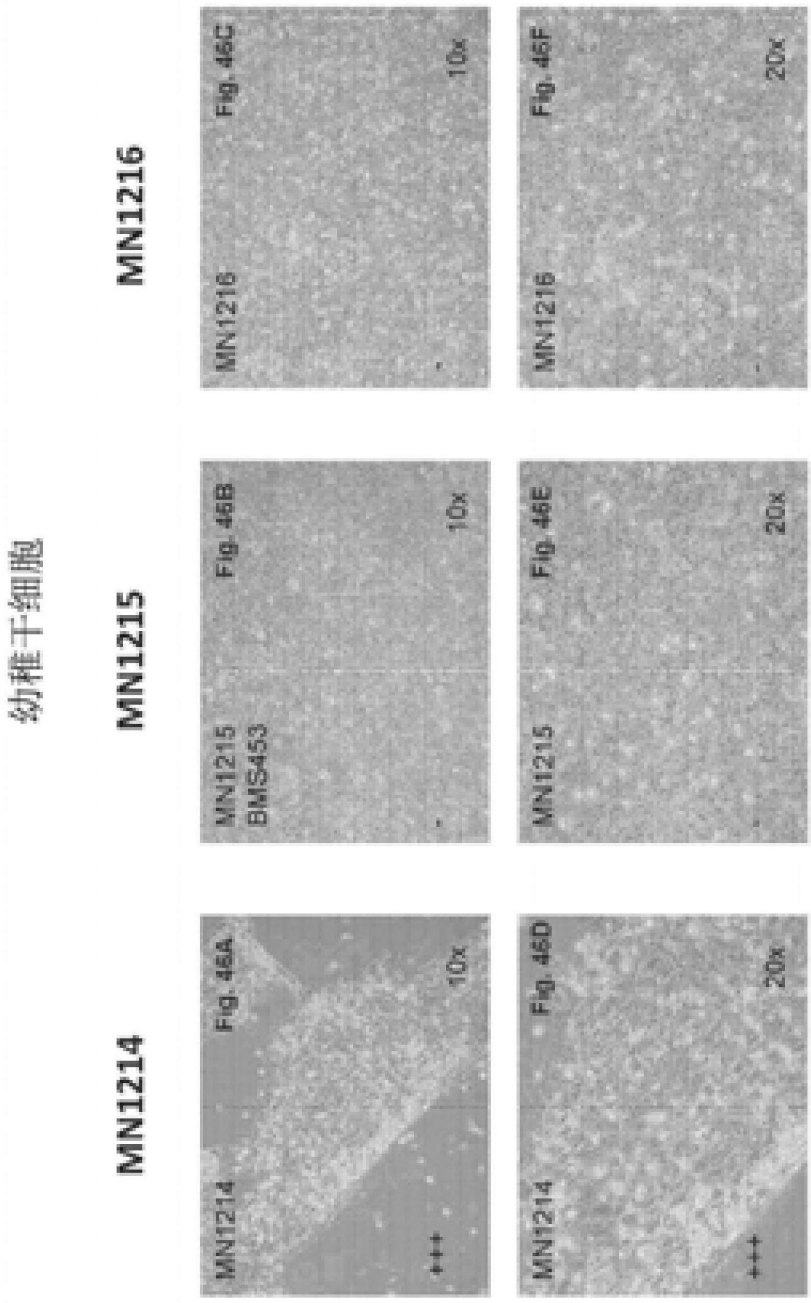

幼稚干细胞
MN1214
MN1215
MN1216
Fig. 46A
Fig. 46B
Fig. 46C
Fig. 46D
Fig. 46E
Fig. 46F
MN1214
MN1215
MN1216
BMS453
10x
20x
+++
-

图46A至图46F

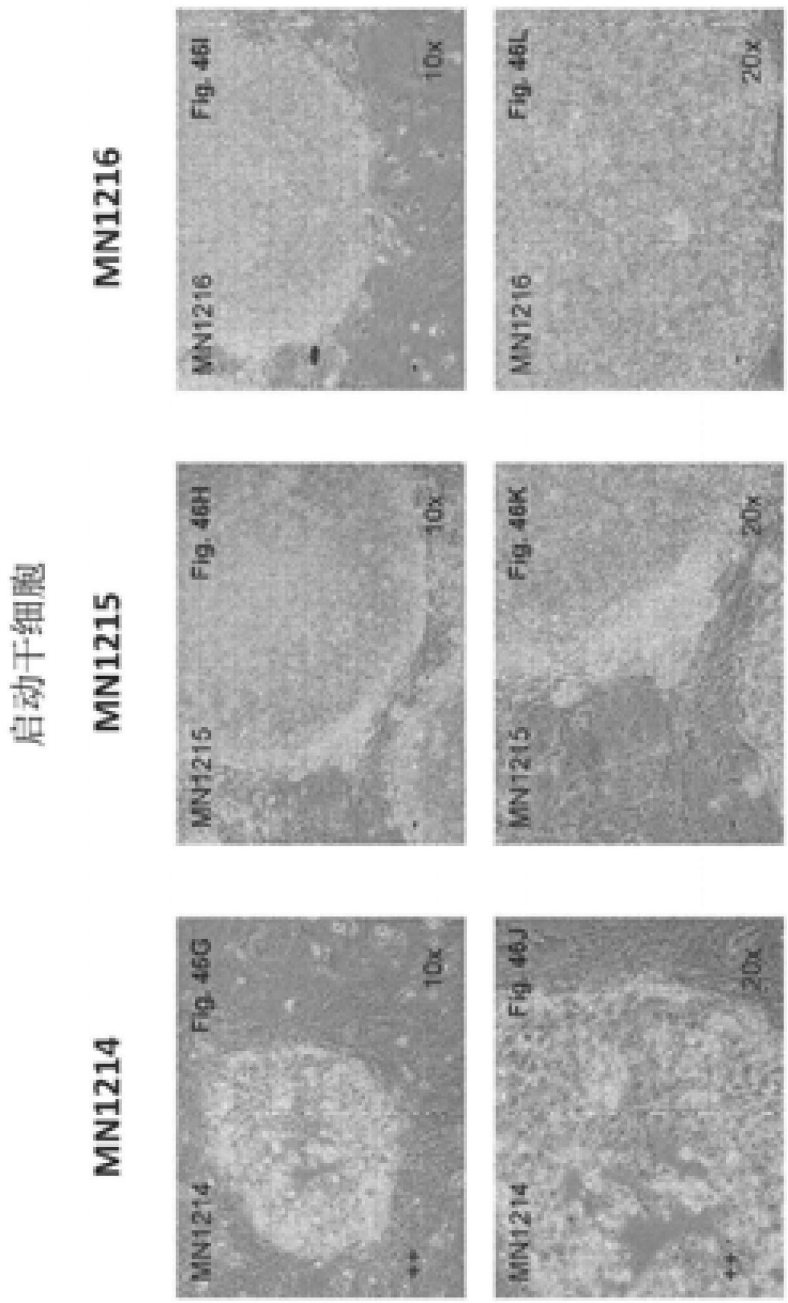

启动干细胞
MN1214
MN1215
MN1216
Fig. 46G
Fig. 46H
Fig. 46I
Fig. 46J
Fig. 46K
Fig. 46L
10x
20x
MN1214
MN1215
MN1216
++
-

图46G至图46L

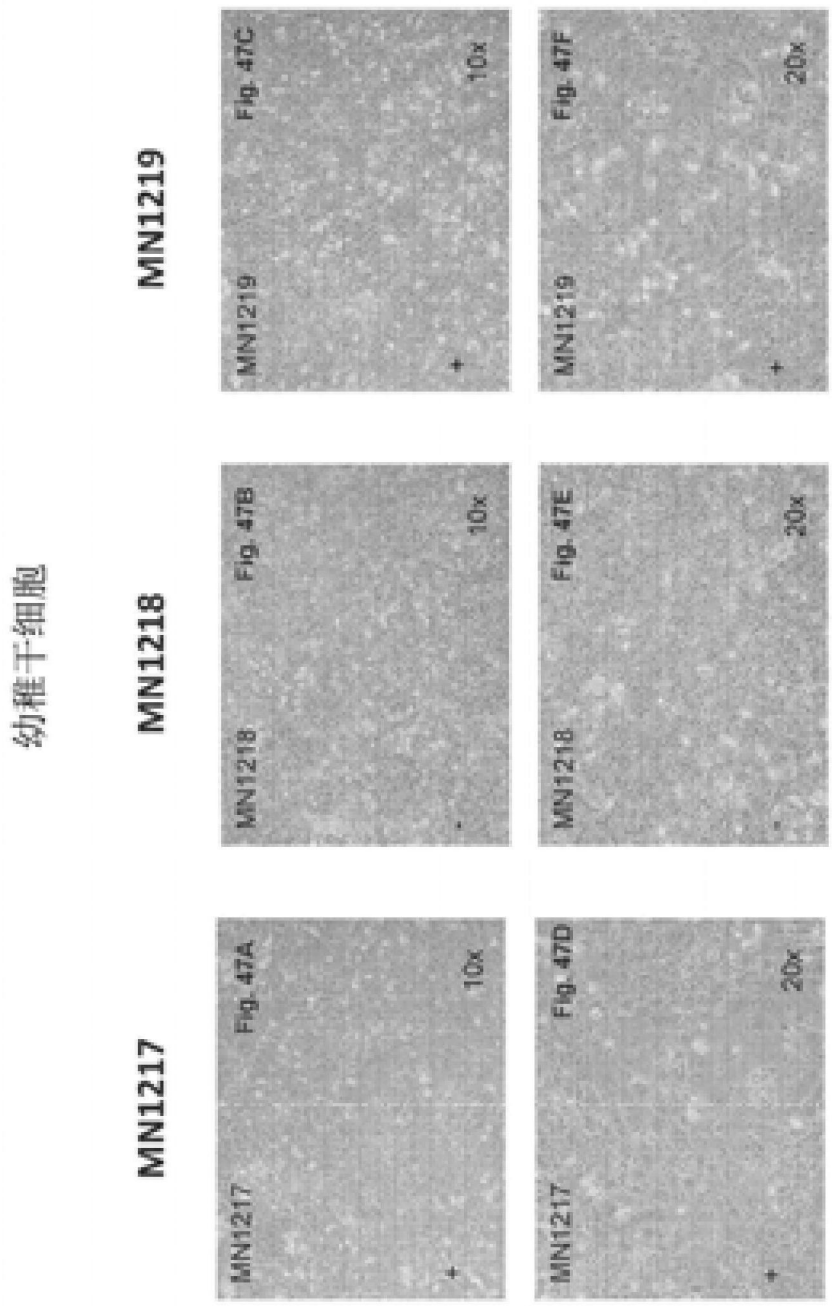

幼稚干细胞
MN1217
MN1218
MN1219
Fig. 47A
Fig. 47B
Fig. 47C
Fig. 47D
Fig. 47E
Fig. 47F
10x
20x
+
-

图47A至图47F

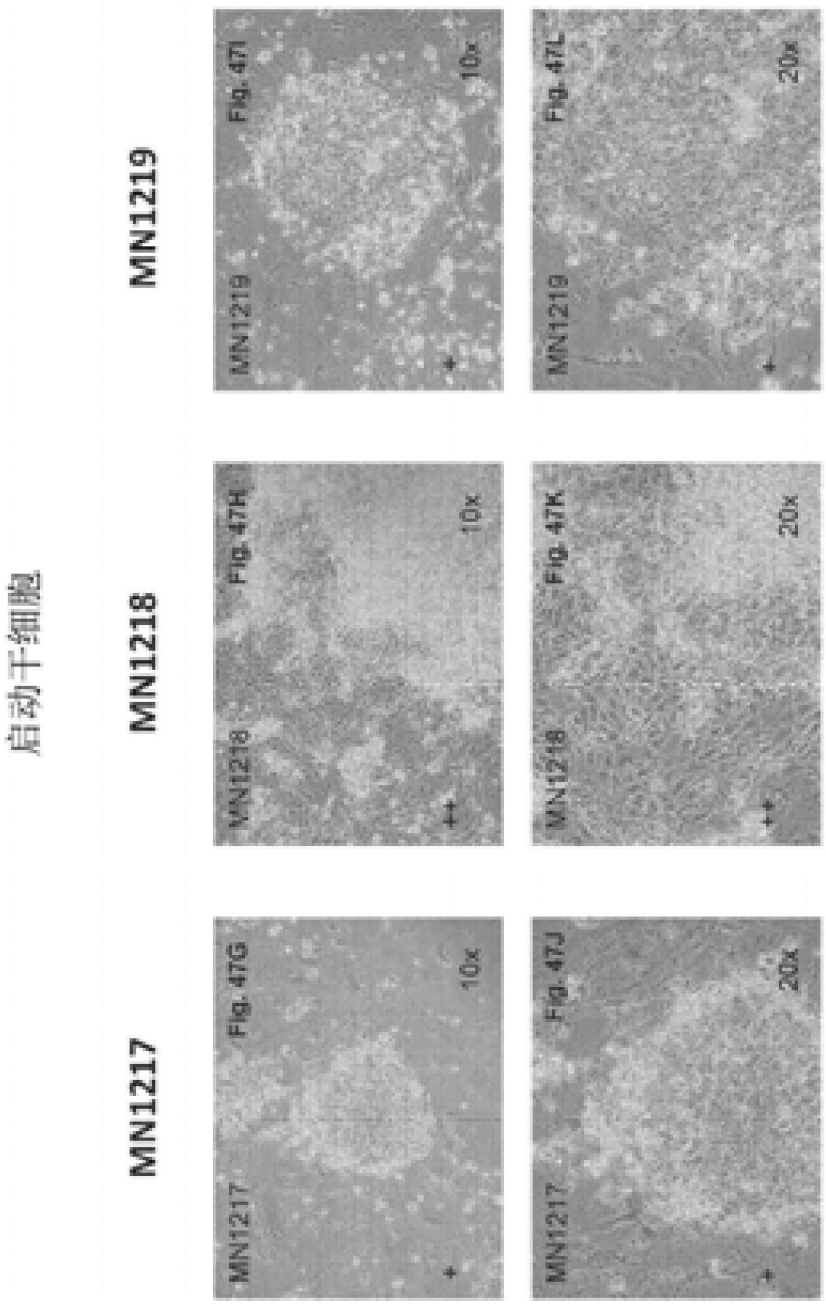

启动干细胞
MN1217
MN1218
MN1219
Fig. 47G
Fig. 47H
Fig. 47I
Fig. 47J
Fig. 47K
Fig. 47L
MN1217
MN1218
MN1219
10x
20x
+
++

图47G至图47L

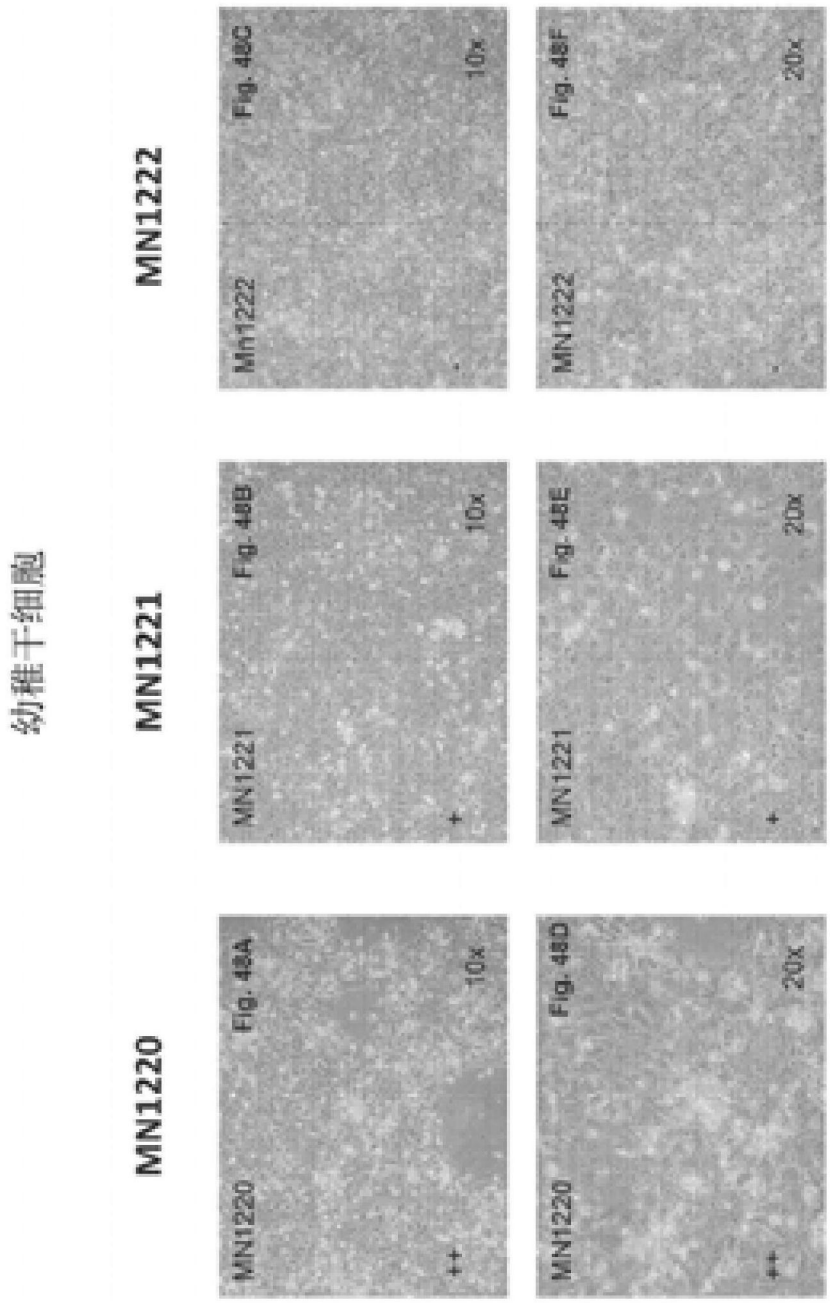

幼稚干细胞
MN1220
MN1221
MN1222
Fig. 48A
Fig. 48B
Fig. 48C
Fig. 48D
Fig. 48E
Fig. 48F
MN1220
MN1221
MN1222
10x
20x
++
+
-

图48A至图48F

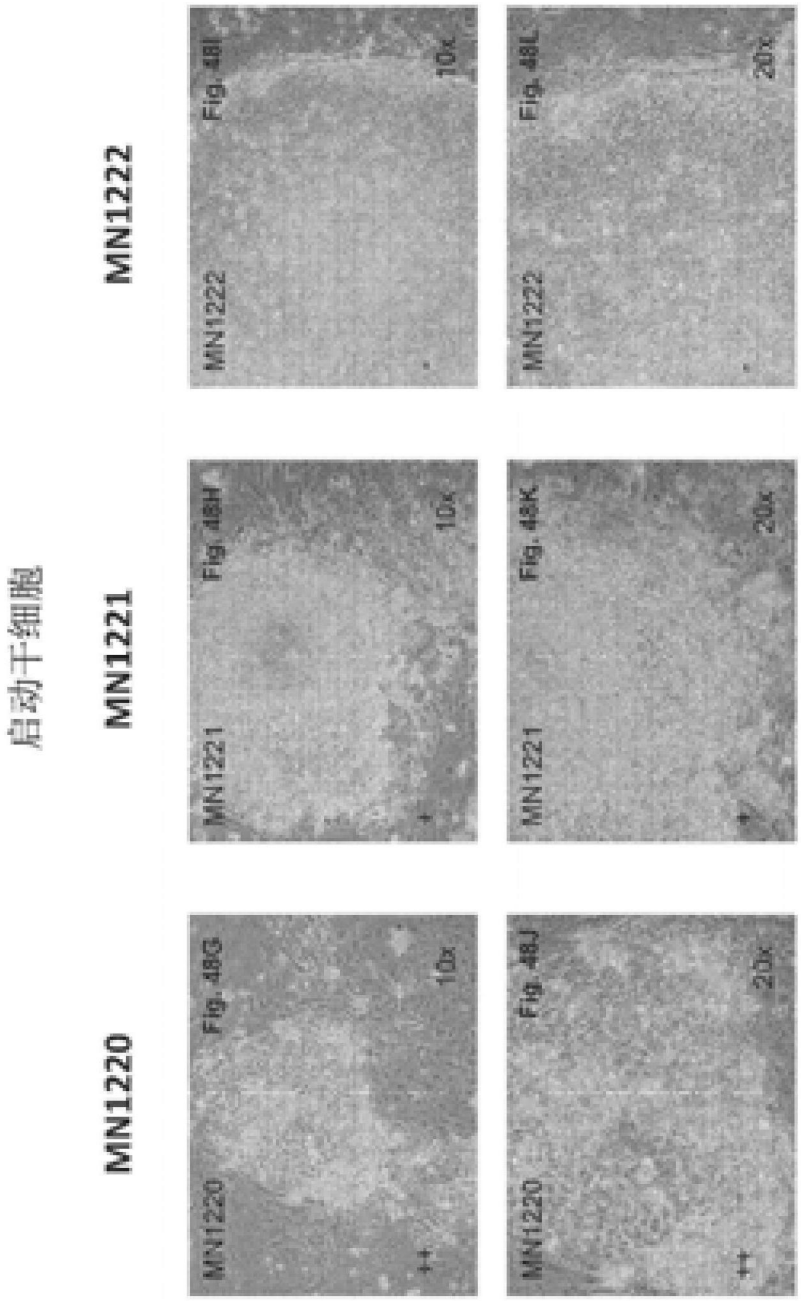

启动干细胞
MN1220
MN1221
MN1222
Fig. 48G
Fig. 48H
Fig. 48I
Fig. 48J
Fig. 48K
Fig. 48L
MN1220
MN1221
MN1222
10x
20x
++
+
-

图48G至图48L

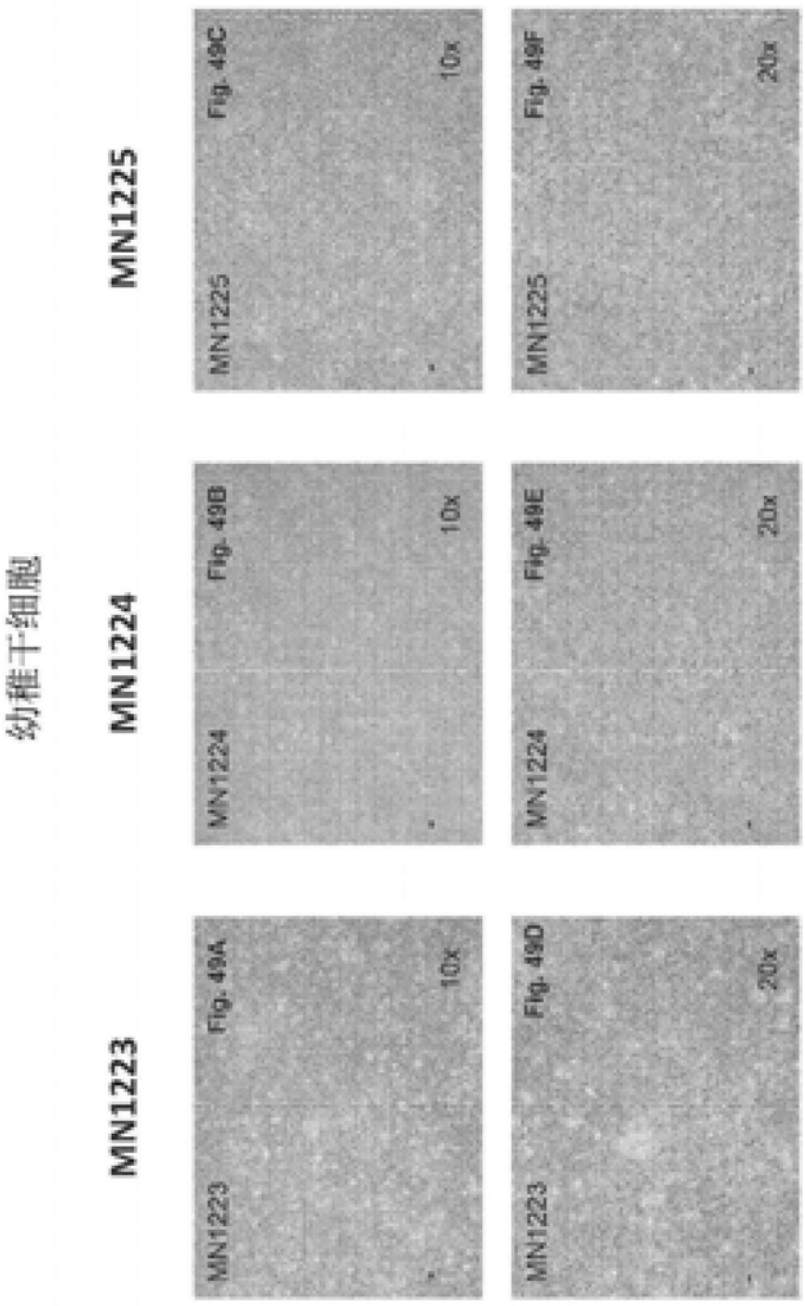

幼稚干细胞
MN1223
MN1224
MN1225
MN1223
Fig. 49A
10x
MN1223
Fig. 49D
20x
MN1224
Fig. 49B
10x
MN1224
Fig. 49E
20x
MN1225
Fig. 49C
10x
MN1225
Fig. 49F
20x

图49A至图49F

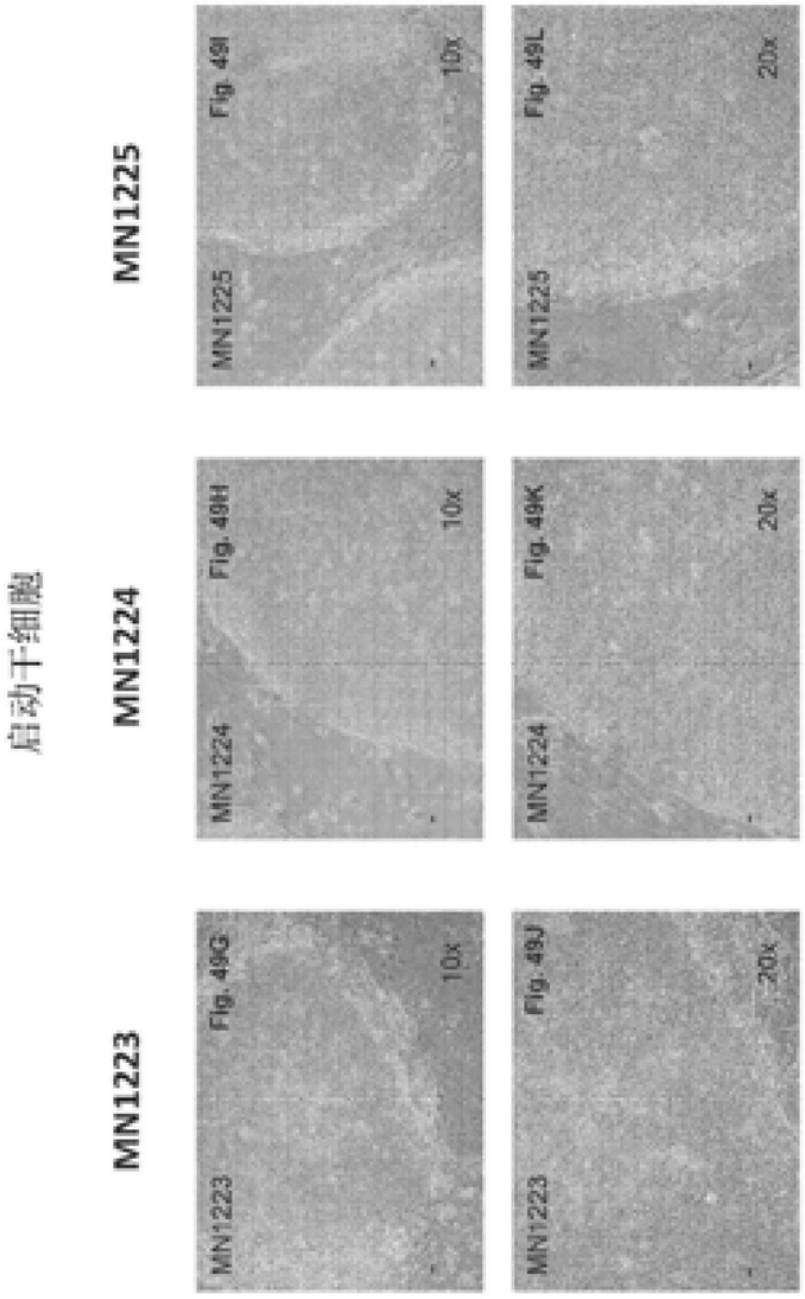

启动干细胞
MN1223
MN1224
MN1225
MN1223
Fig. 49G
10x
MN1224
Fig. 49H
10x
MN1225
Fig. 49I
10x
MN1223
Fig. 49J
20x
MN1224
Fig. 49K
20x
MN1225
Fig. 49L
20x

图49G至图49L

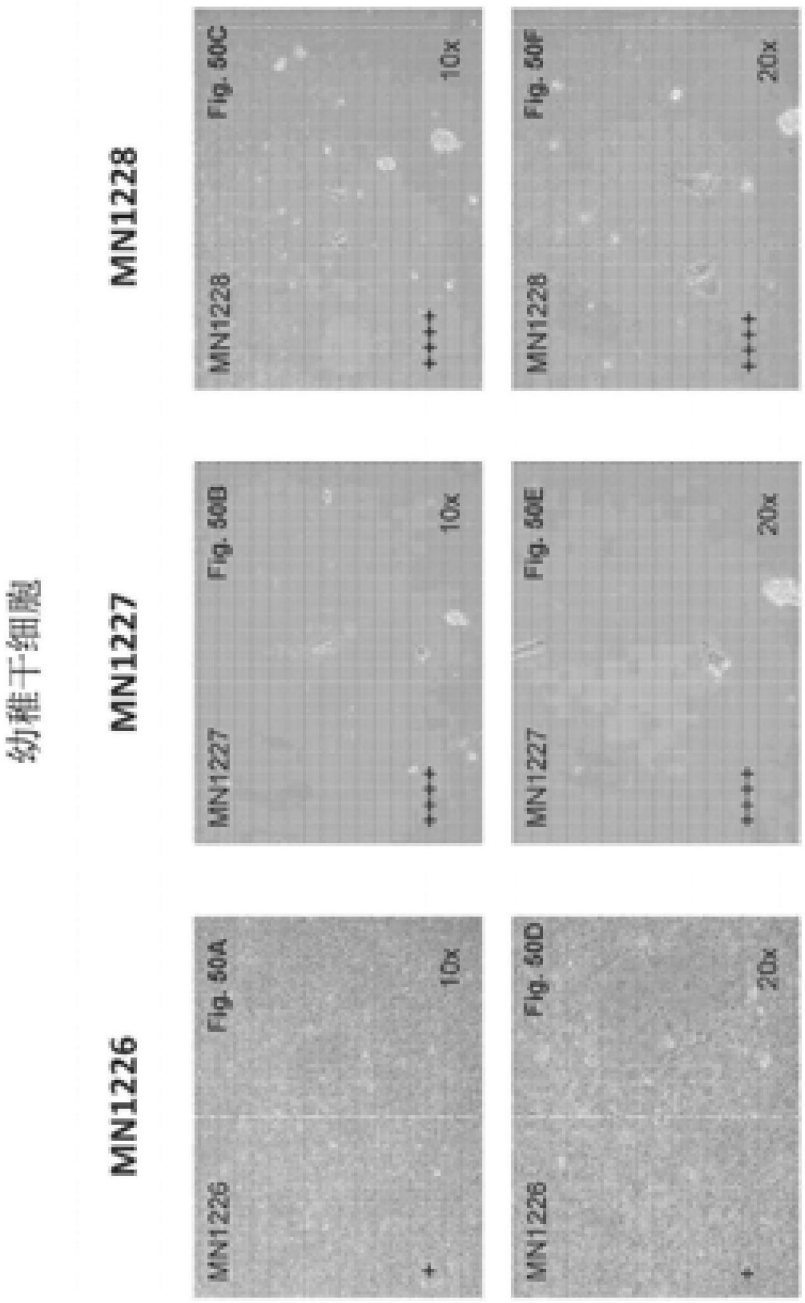

幼稚干细胞
MN1226
MN1227
MN1228
MN1226
Fig. 50A
10x
+
MN1226
Fig. 50D
20x
+
MN1227
Fig. 50B
10x
++++
MN1227
Fig. 50E
20x
++++
MN1228
Fig. 50C
10x
++++
MN1228
Fig. 50F
20x
++++

图50A至图50F

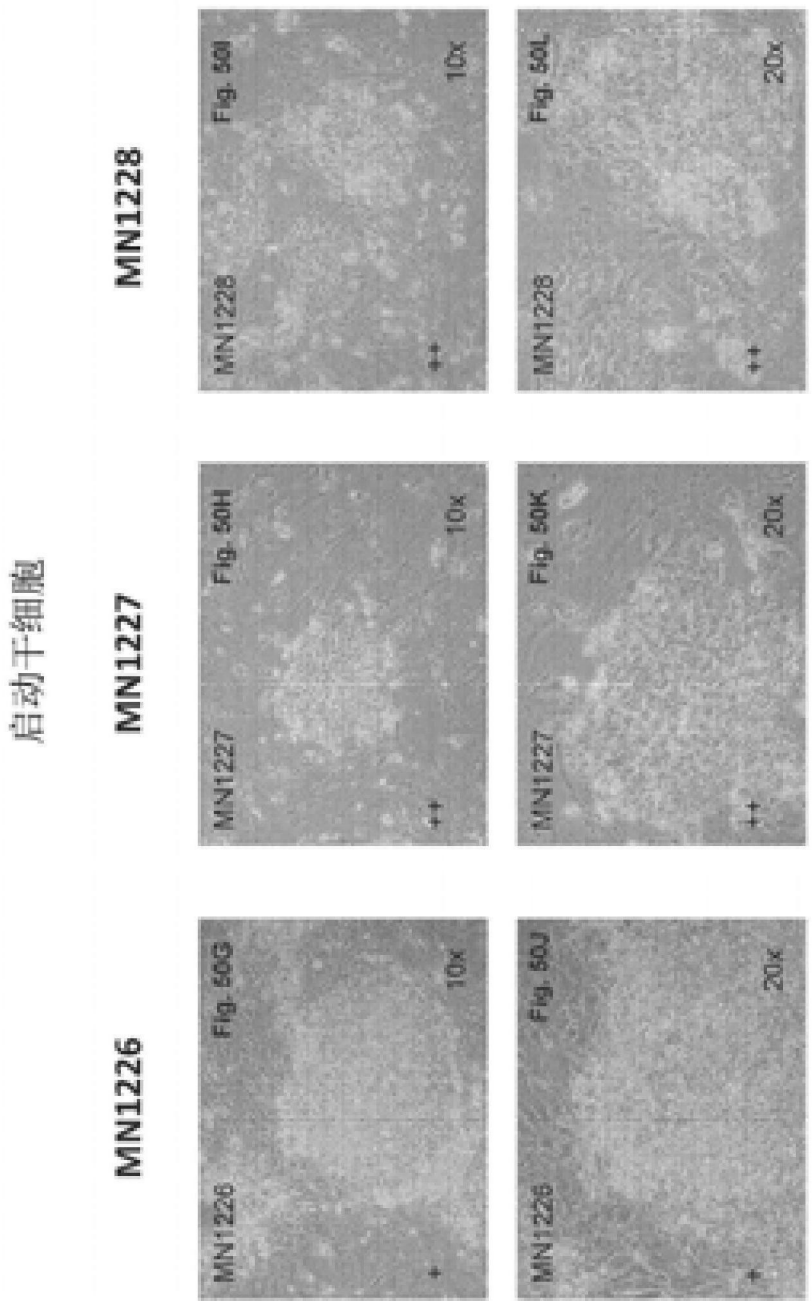

启动干细胞
MN1226
MN1227
MN1228
Fig. 50G
Fig. 50H
Fig. 50I
Fig. 50J
Fig. 50K
Fig. 50L
MN1226
MN1227
MN1228
10x
20x
+
++

图50G至图50L

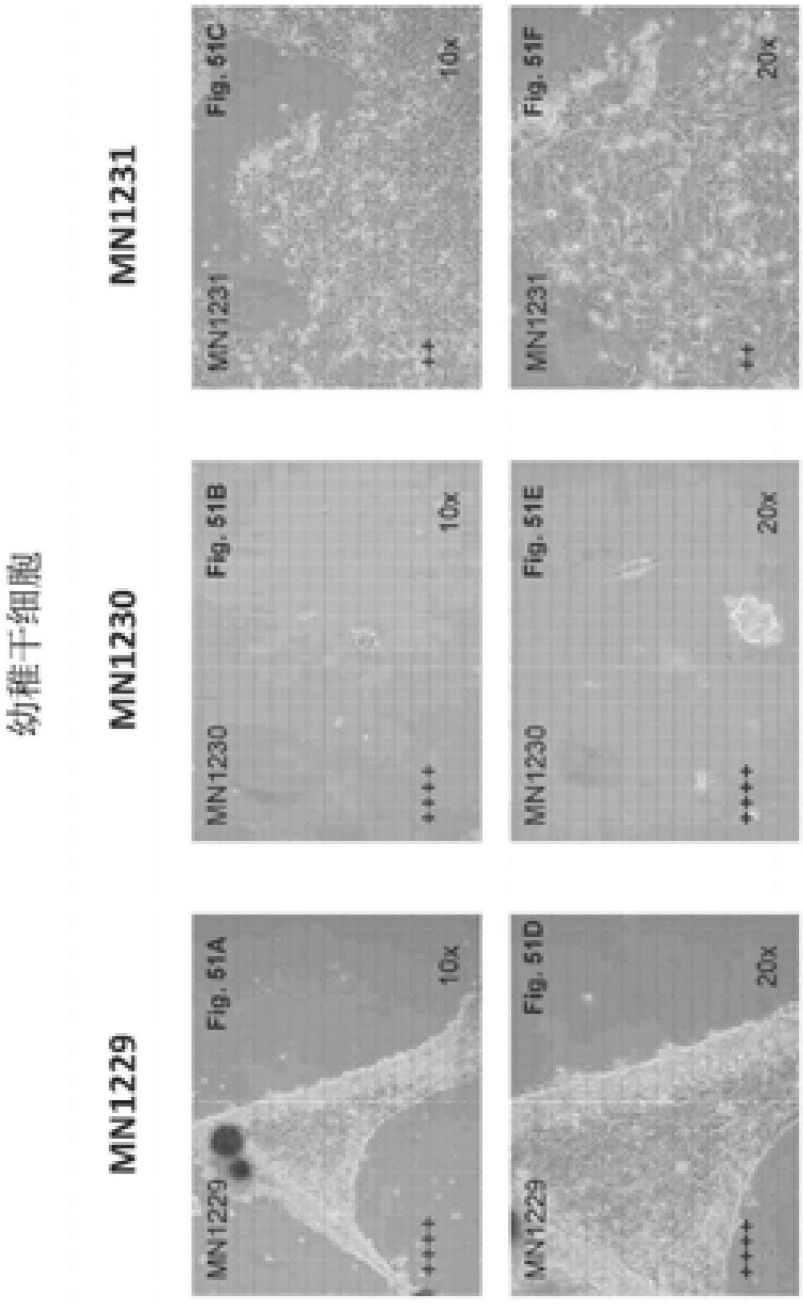

幼稚干细胞
MN1229
MN1230
MN1231
Fig. 51A
Fig. 51B
Fig. 51C
Fig. 51D
Fig. 51E
Fig. 51F
MN1229
MN1230
MN1231
10x
20x
++++
++

图51A至图51F

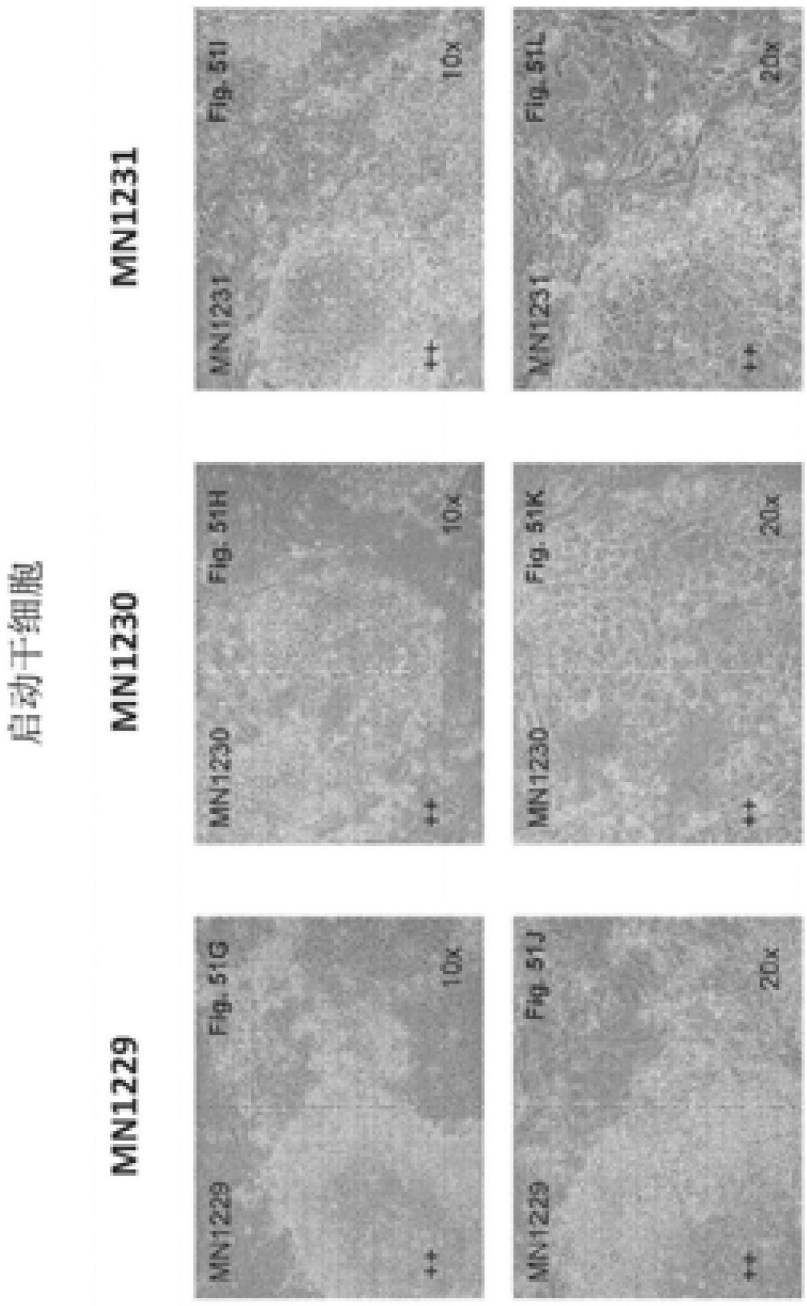

启动干细胞
MN1229
MN1230
MN1231
Fig. 51G
Fig. 51H
Fig. 51I
Fig. 51J
Fig. 51K
Fig. 51L
MN1229
MN1230
MN1231
10x
20x
++

图51G至图51L

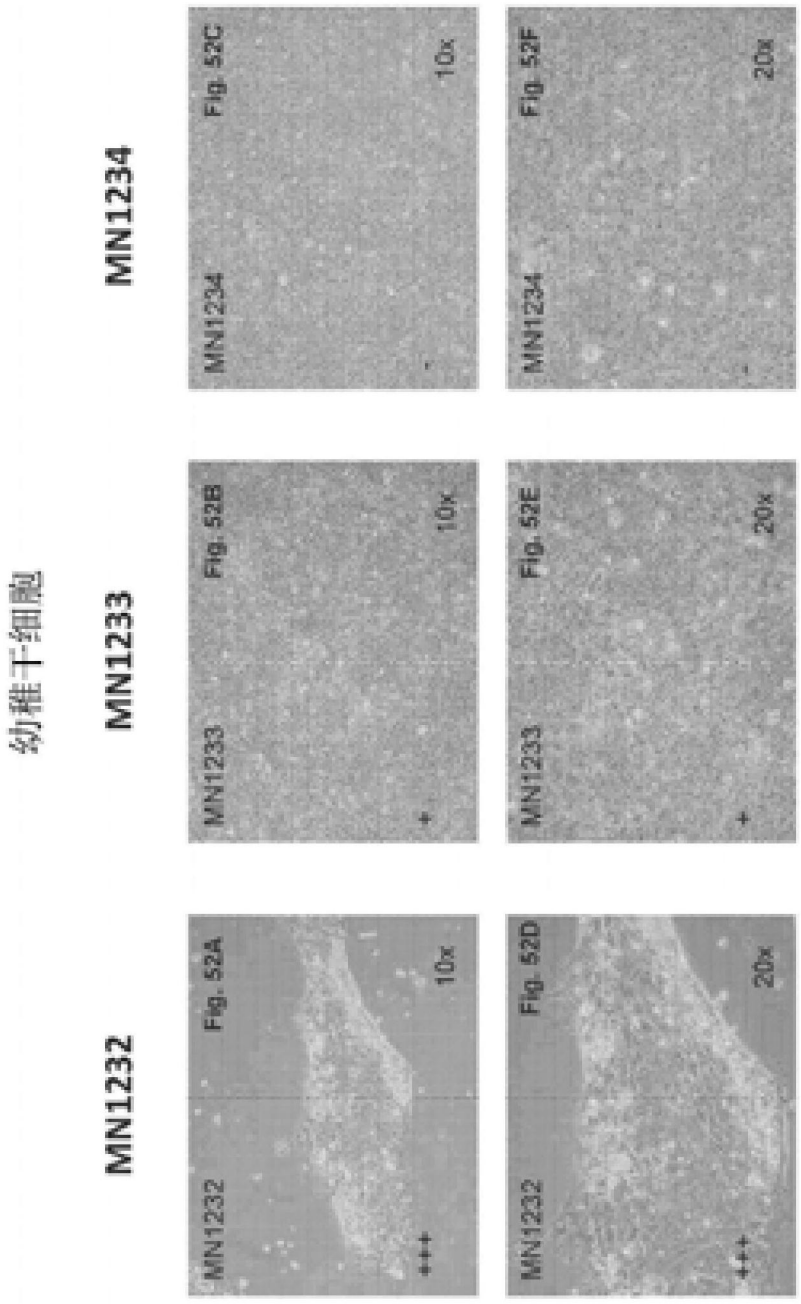

幼稚干细胞
MN1232
MN1233
MN1234
Fig. 52A
Fig. 52B
Fig. 52C
Fig. 52D
Fig. 52E
Fig. 52F
MN1232
MN1233
MN1234
+++
+
-
10x
20x

图52A至图52F

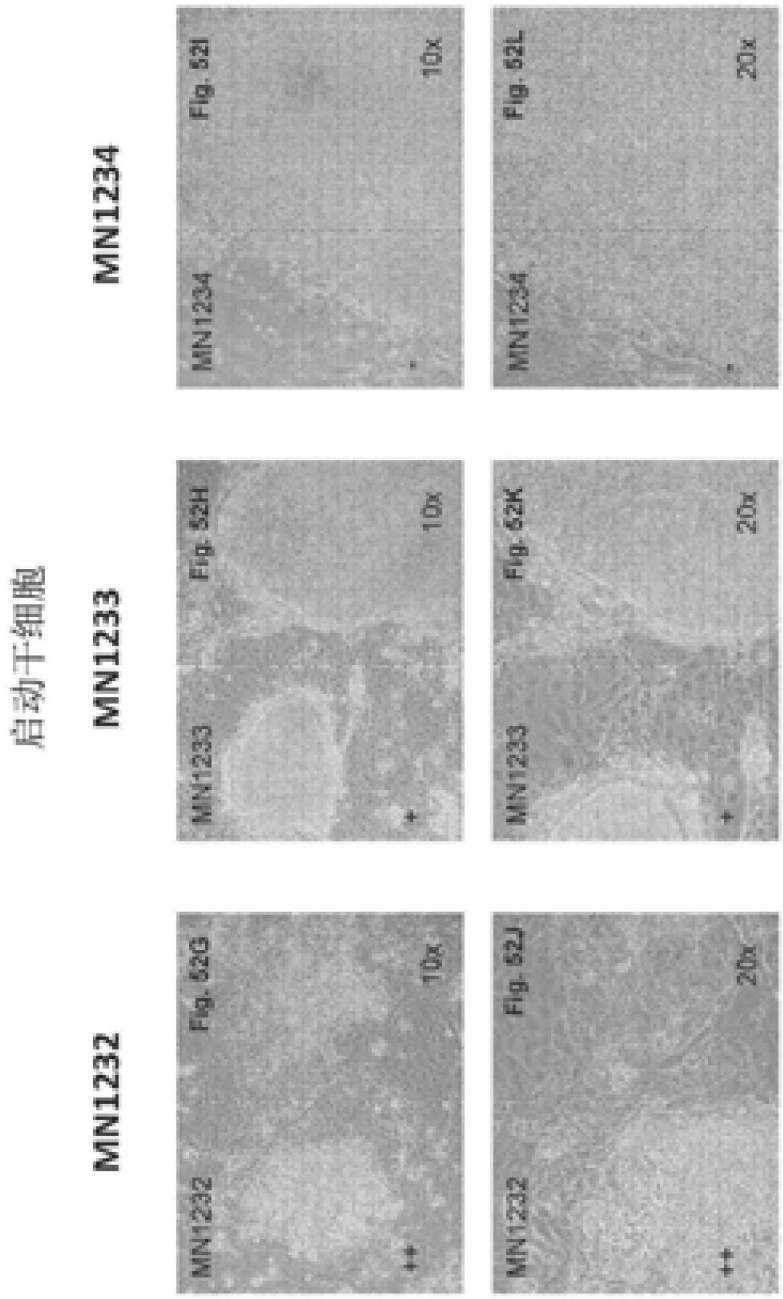

启动干细胞
MN1232
MN1233
MN1234
Fig. 52G
Fig. 52H
Fig. 52I
Fig. 52J
Fig. 52K
Fig. 52L
MN1232
MN1233
MN1234
++
+
-
10x
20x

图52G至图52L

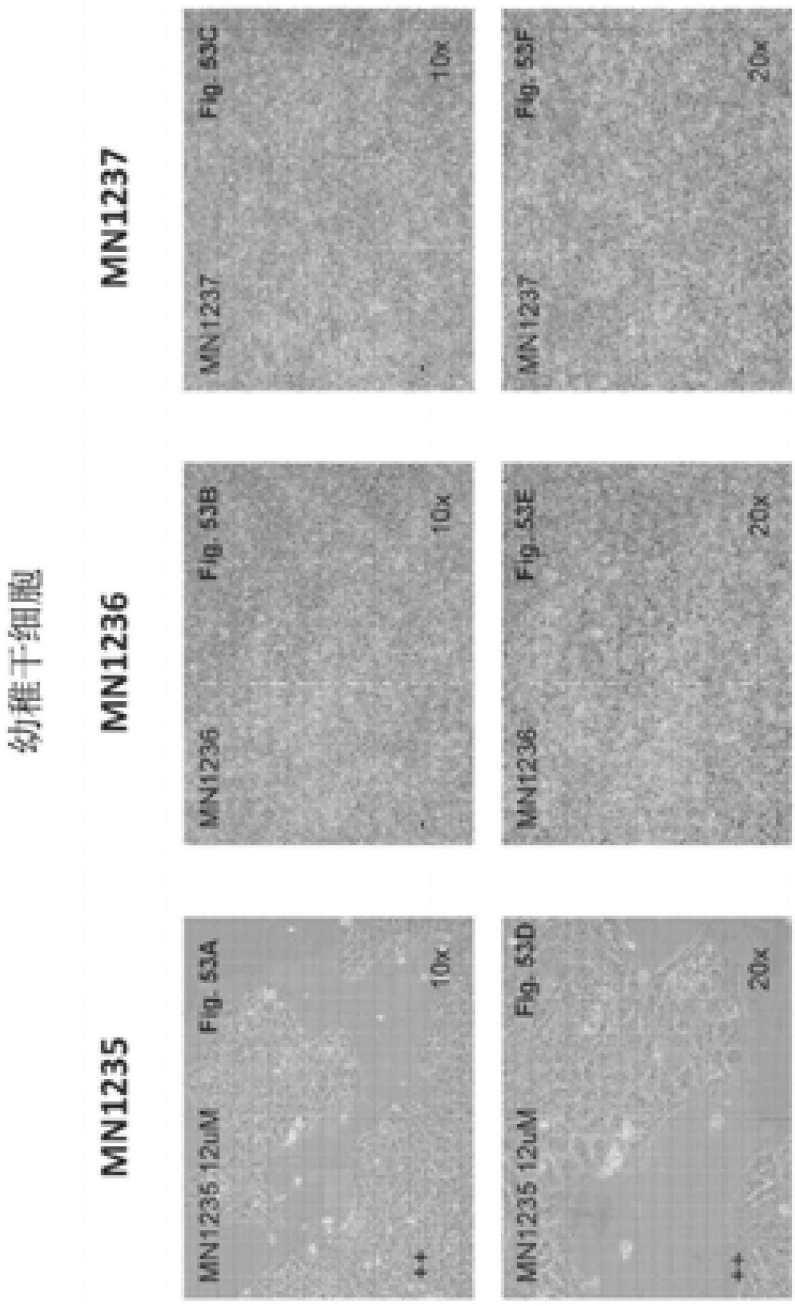

幼稚干细胞
MN1235
MN1236
MN1237
MN1235 12uM
Fig. 53A
10x
++
MN1236
Fig. 53B
10x
-
MN1237
Fig. 53C
10x
-
MN1235 12uM
Fig. 53D
20x
++
MN1236
Fig. 53E
20x
MN1237
Fig. 53F
20x

图53A至图53F

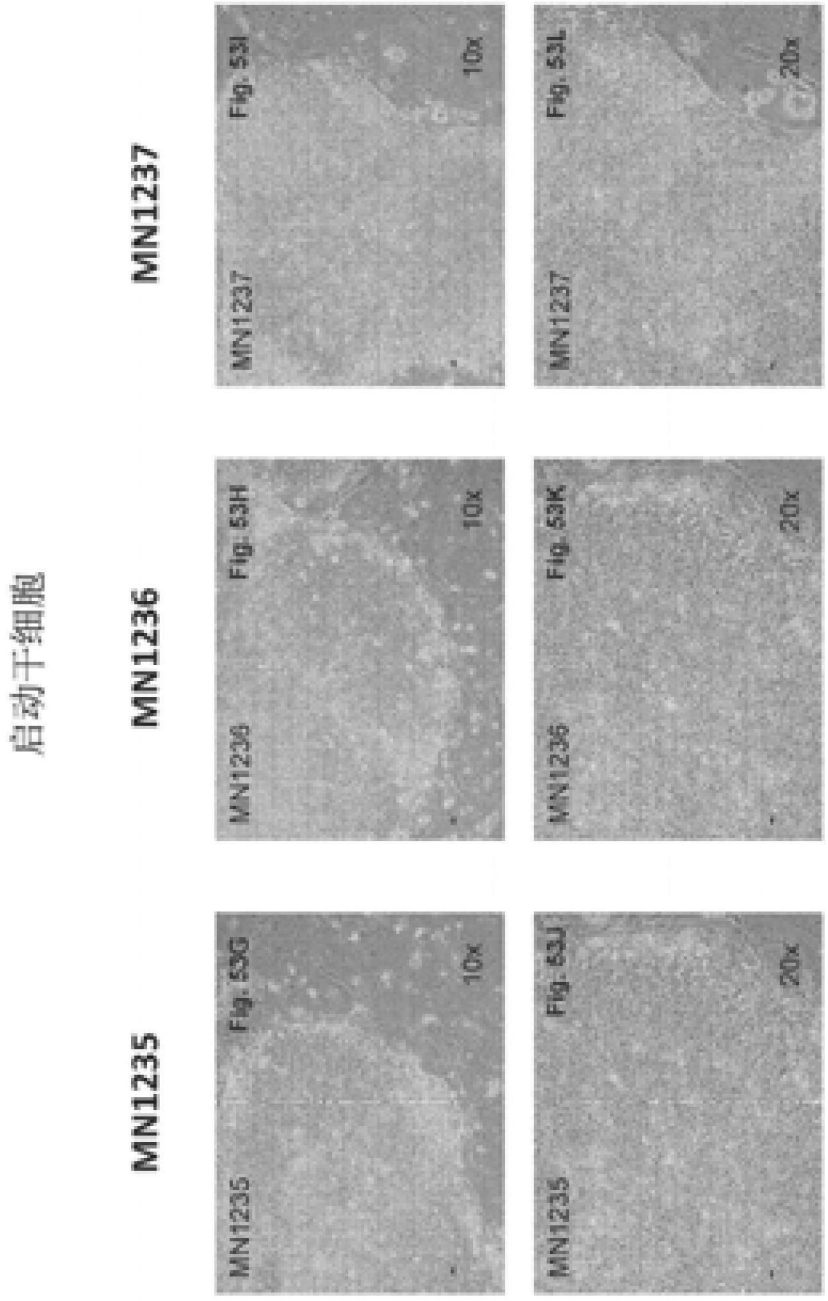

启动干细胞
MN1235
MN1236
MN1237
Fig. 53G
Fig. 53H
Fig. 53I
Fig. 53J
Fig. 53K
Fig. 53L
10x
20x

图53G至图53L

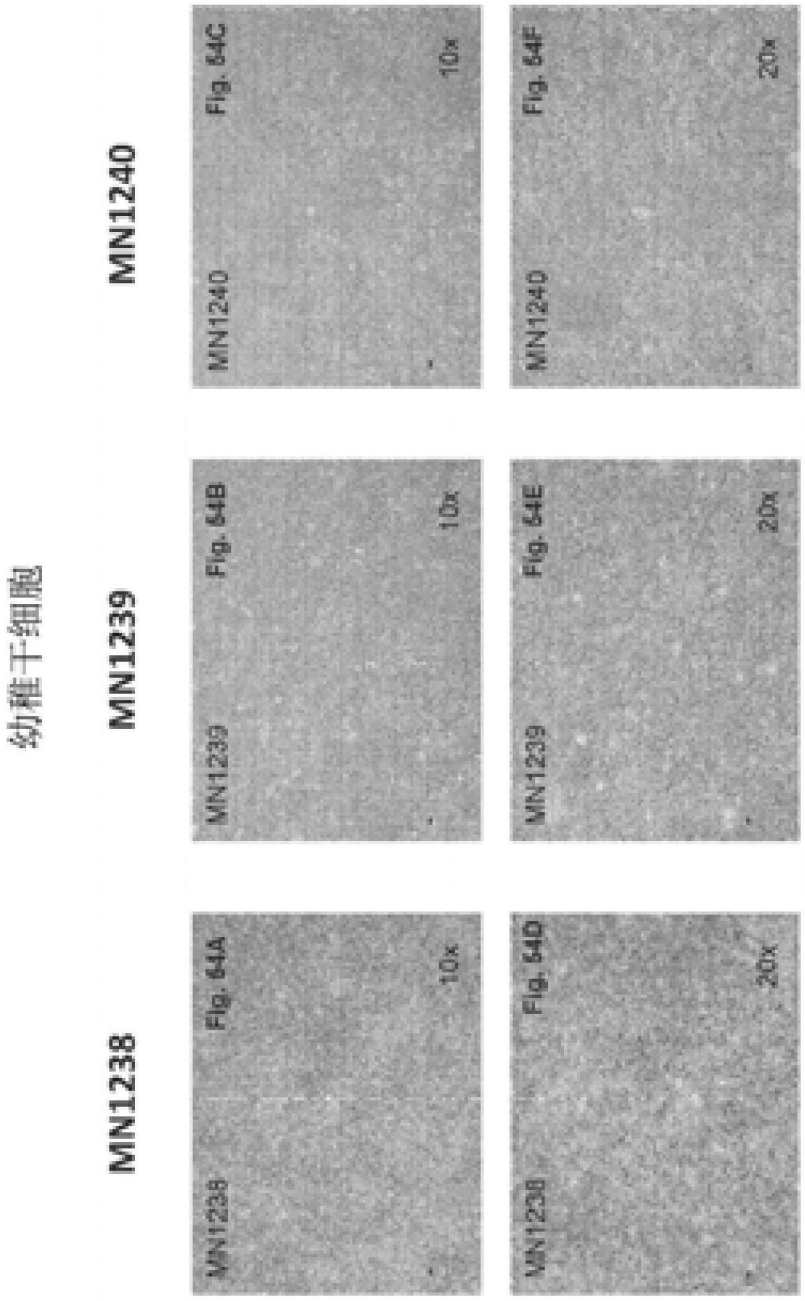

幼稚干细胞
MN1238
MN1239
MN1240
Fig. 54A
Fig. 54B
Fig. 54C
Fig. 54D
Fig. 54E
Fig. 54F
10x
20x

图54A至图54F

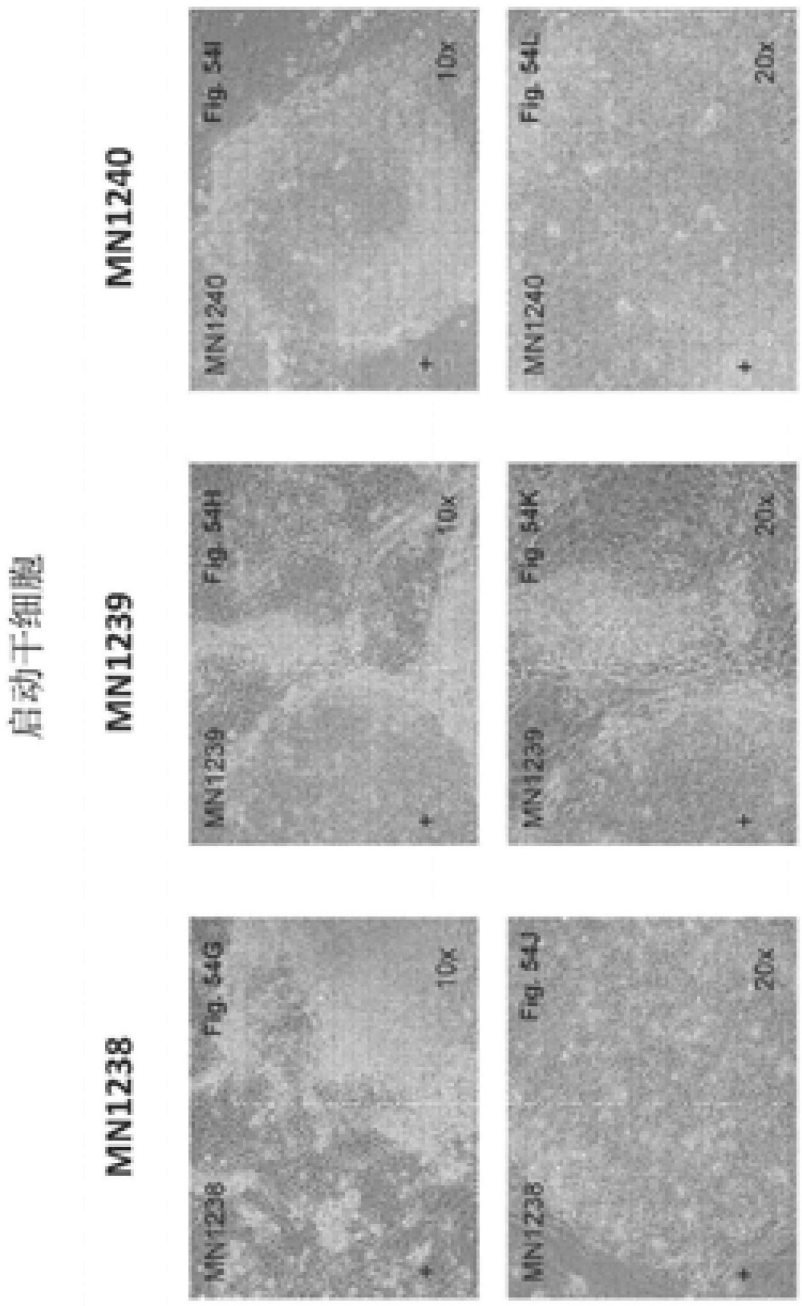

启动干细胞
MN1238
MN1239
MN1240
Fig. 54G
Fig. 54H
Fig. 54I
Fig. 54J
Fig. 54K
Fig. 54L
10x
20x
MN1238
MN1239
MN1240
+

图54G至图54L

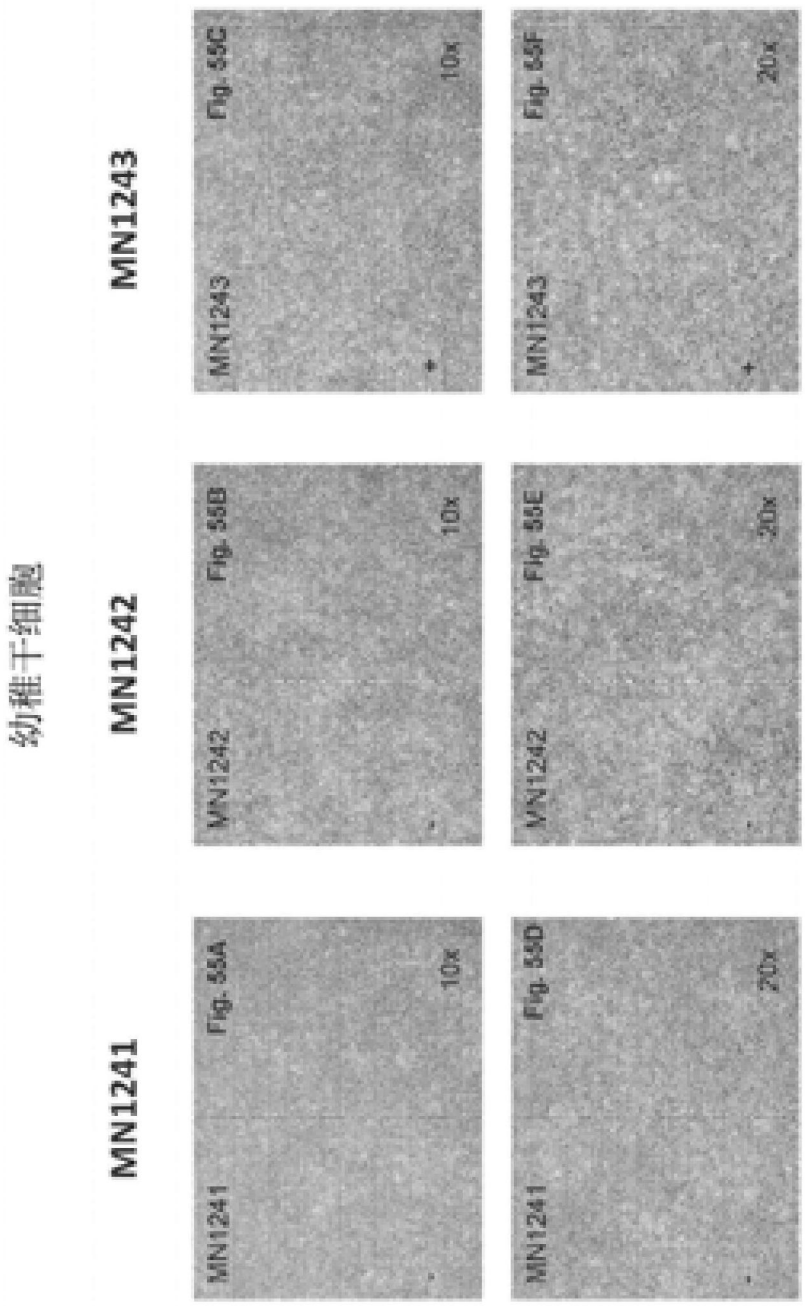

幼稚干细胞
MN1241
MN1242
MN1243
Fig. 55A
Fig. 55B
Fig. 55C
Fig. 55D
Fig. 55E
Fig. 55F
MN1241
MN1242
MN1243
10x
20x
-
+

图55A至图55F

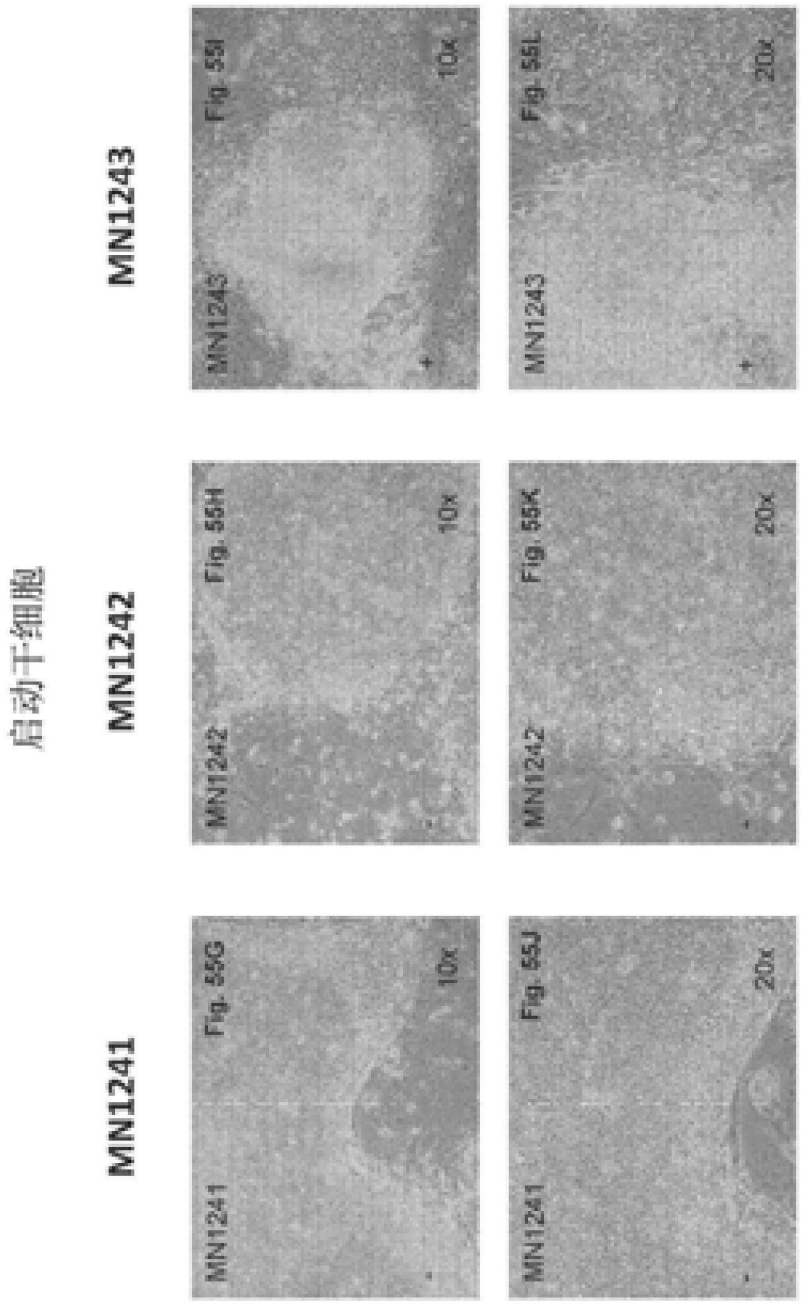

MN1241
MN1242
MN1243
启动干细胞
Fig. 55G
Fig. 55H
Fig. 55I
Fig. 55J
Fig. 55K
Fig. 55L
MN1241
MN1242
MN1243
10x
20x
-
+

图55G至图55L

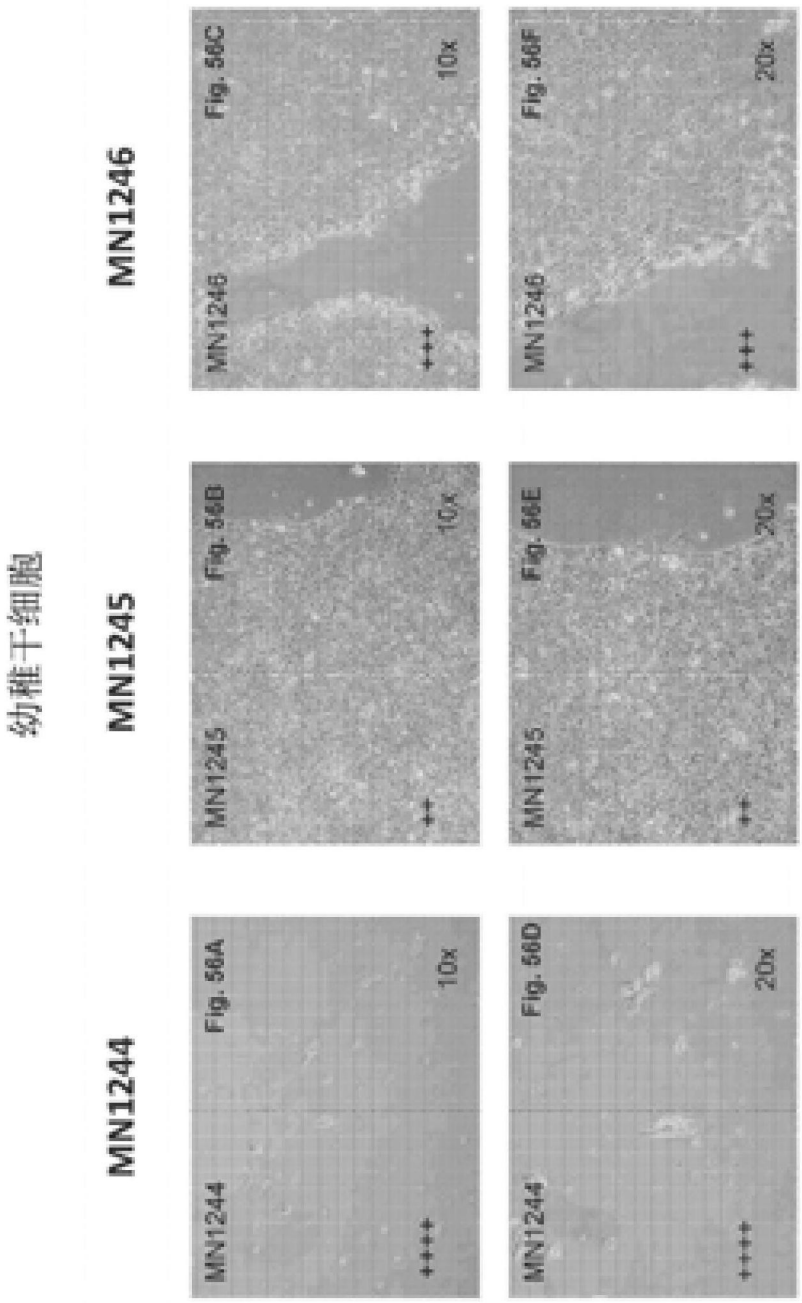

幼稚干细胞
MN1244
MN1245
MN1246
Fig. 56A
Fig. 56B
Fig. 56C
Fig. 56D
Fig. 56E
Fig. 56F
MN1244
MN1245
MN1246
++++
++
+++
10x
20x

图56A至图56F

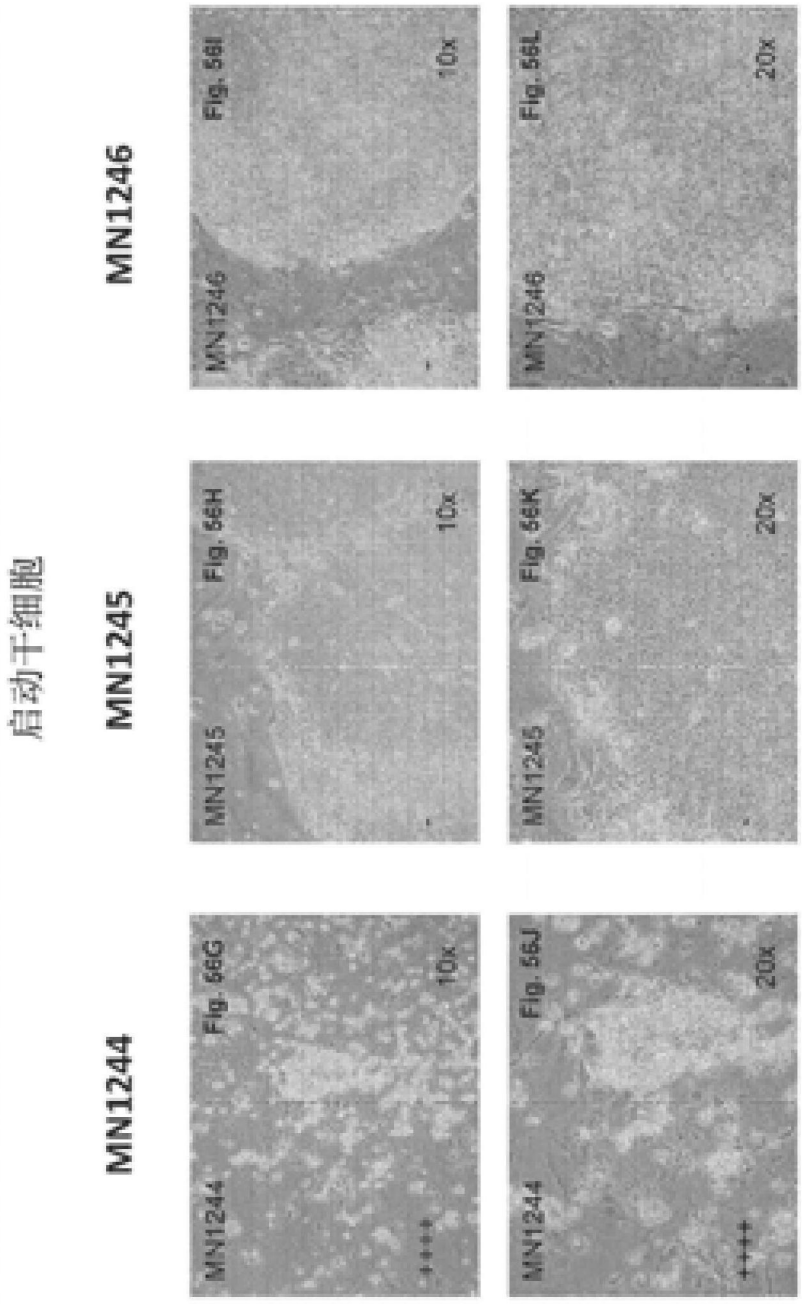

启动干细胞
MN1244
MN1245
MN1246
Fig. 56G
Fig. 56H
Fig. 56I
Fig. 56J
Fig. 56K
Fig. 56L
MN1244
MN1245
MN1246
10x
20x
++++

图56G至图56L

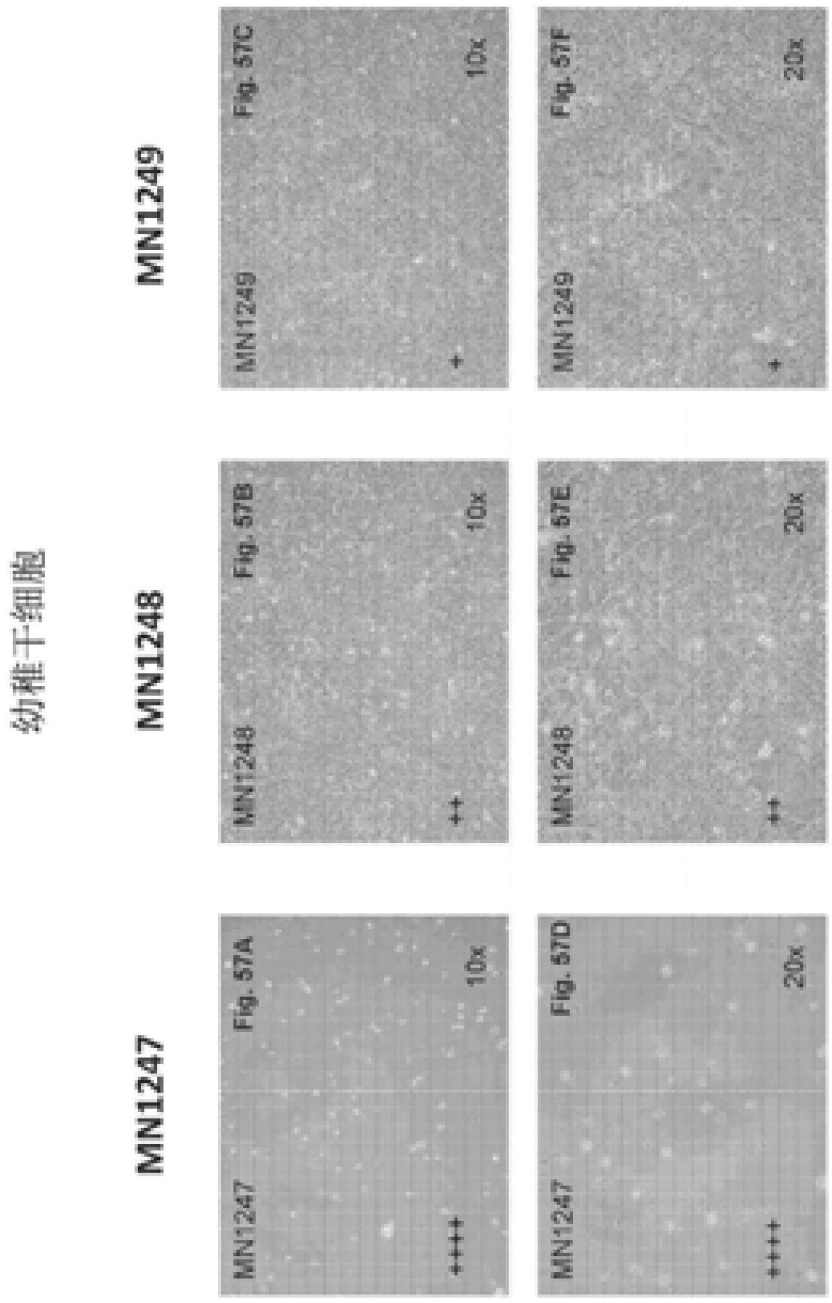

幼稚干细胞
MN1247
MN1248
MN1249
Fig. 57A
Fig. 57B
Fig. 57C
Fig. 57D
Fig. 57E
Fig. 57F
MN1247
MN1248
MN1249
++++
++
+
10x
20x

图57A至图57F

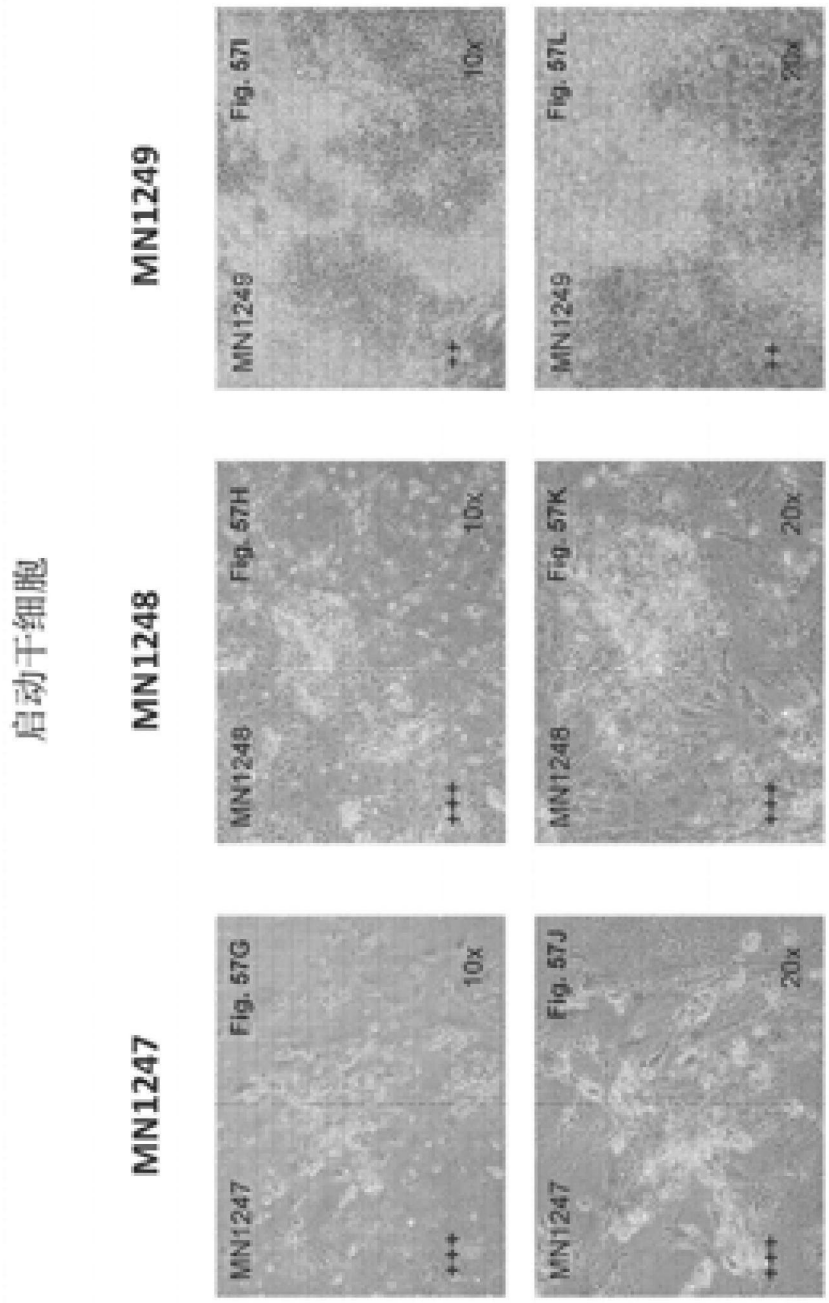

启动干细胞
MN1247
MN1248
MN1249
MN1247
Fig. 57G
10x
+++
MN1248
Fig. 57H
10x
+++
MN1249
Fig. 57I
10x
++
MN1247
Fig. 57J
20x
+++
MN1248
Fig. 57K
20x
+++
MN1249
Fig. 57L
20x
++

图57G至图57L

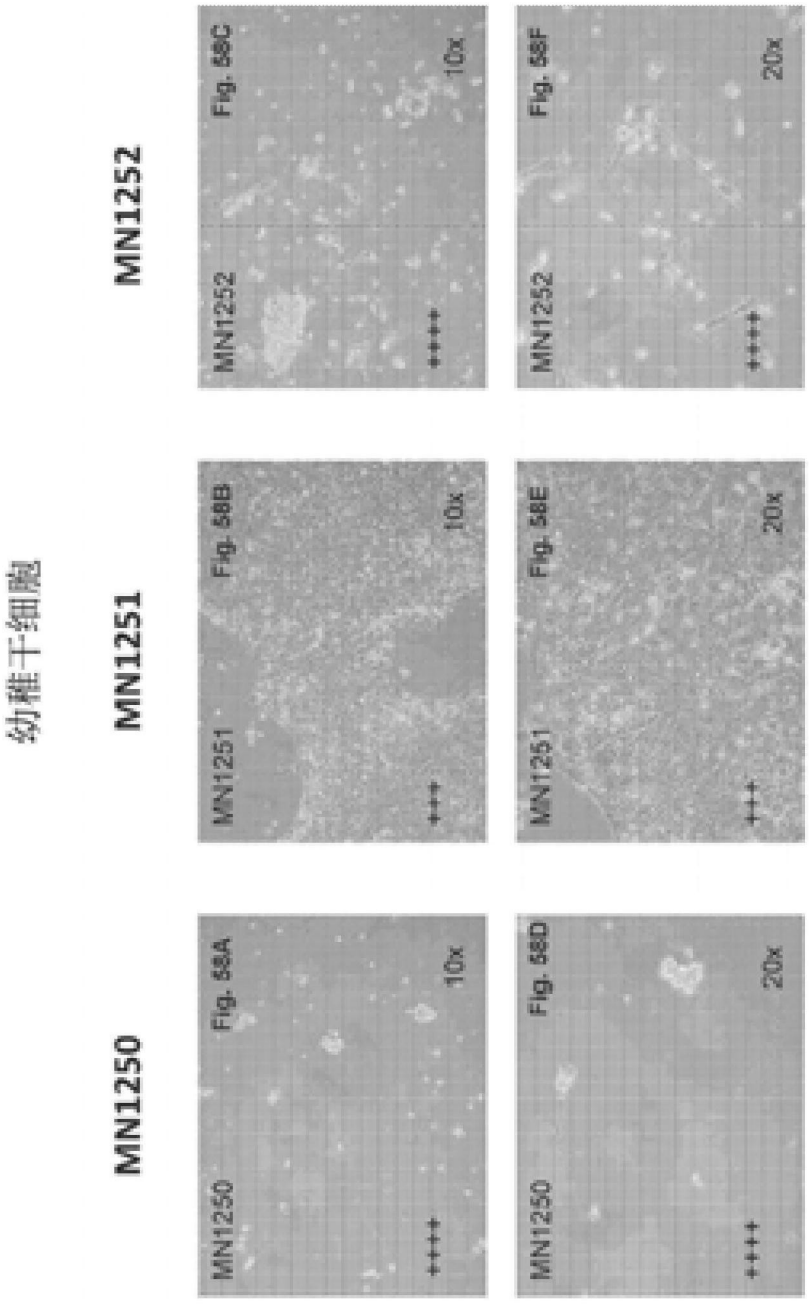

幼稚干细胞
MN1250
MN1251
MN1252
Fig. 58A
Fig. 58B
Fig. 58C
Fig. 58D
Fig. 58E
Fig. 58F
MN1250
MN1251
MN1252
++++
+++
++++
+++
++++
10x
10x
20x
20x
20x

图58A至图58F

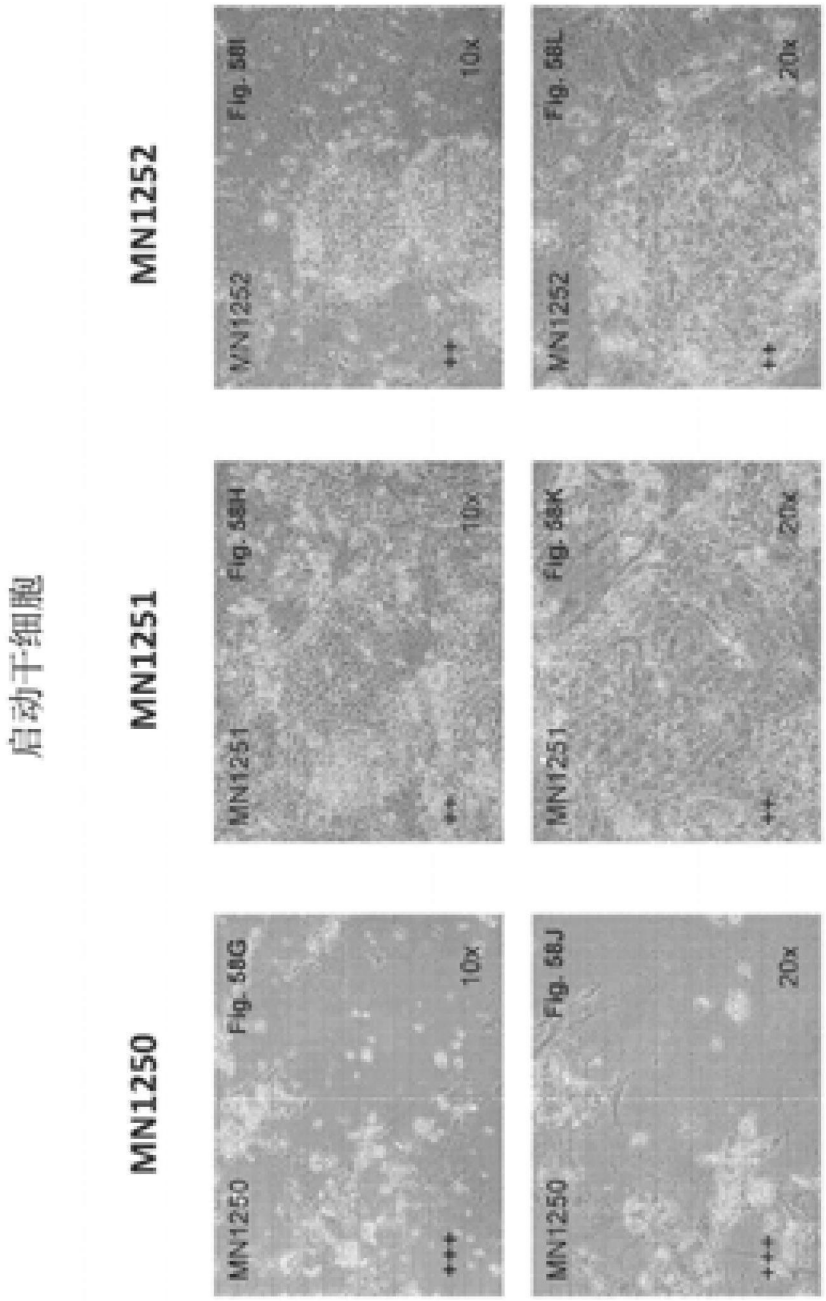

启动干细胞
MN1250
MN1251
MN1252
Fig. 58G
Fig. 58H
Fig. 58I
Fig. 58J
Fig. 58K
Fig. 58L
MN1250
MN1251
MN1252
10x
20x
+++
++

图58G至图58L

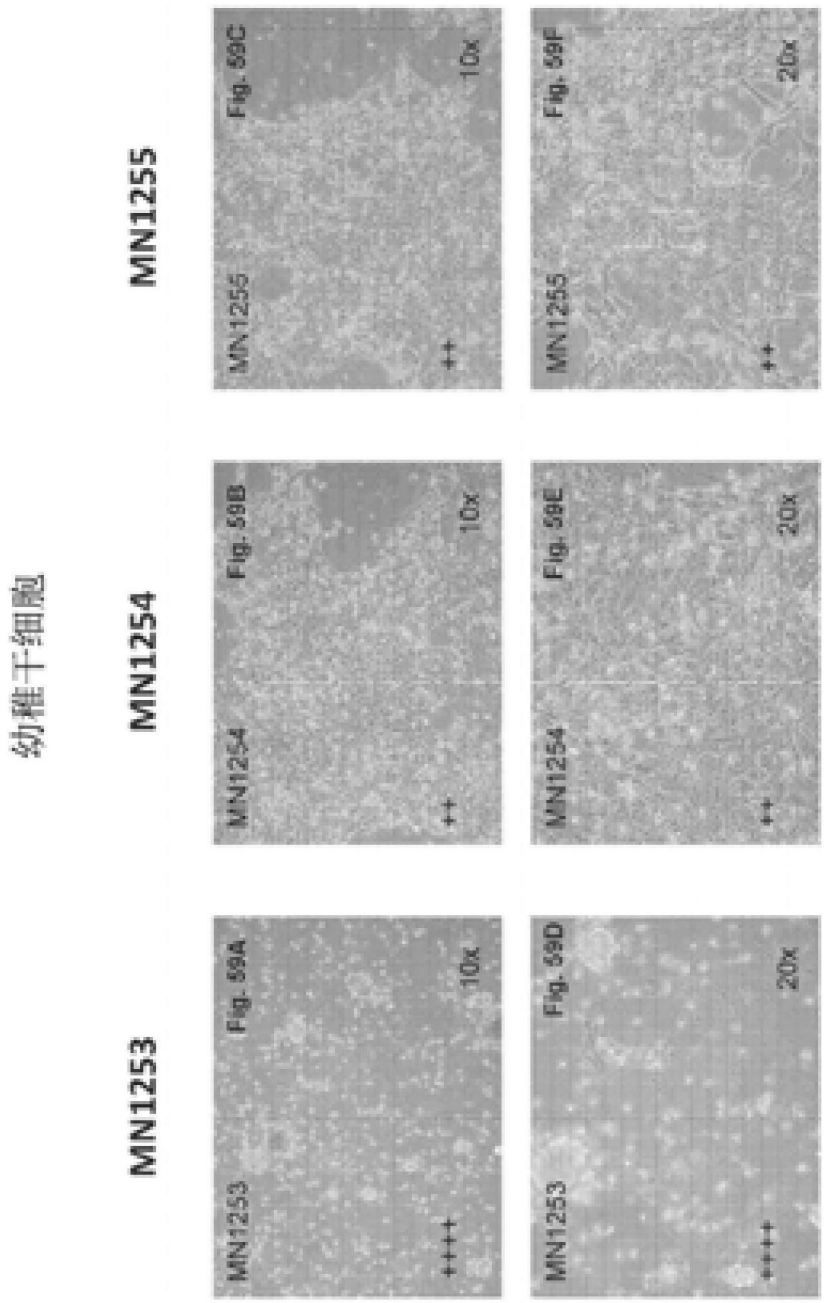

幼稚干细胞
MN1253
MN1254
MN1255
Fig. 59A
Fig. 59B
Fig. 59C
Fig. 59D
Fig. 59E
Fig. 59F
MN1253
MN1254
MN1255
++++
++
++
10x
20x

图59A至图59F

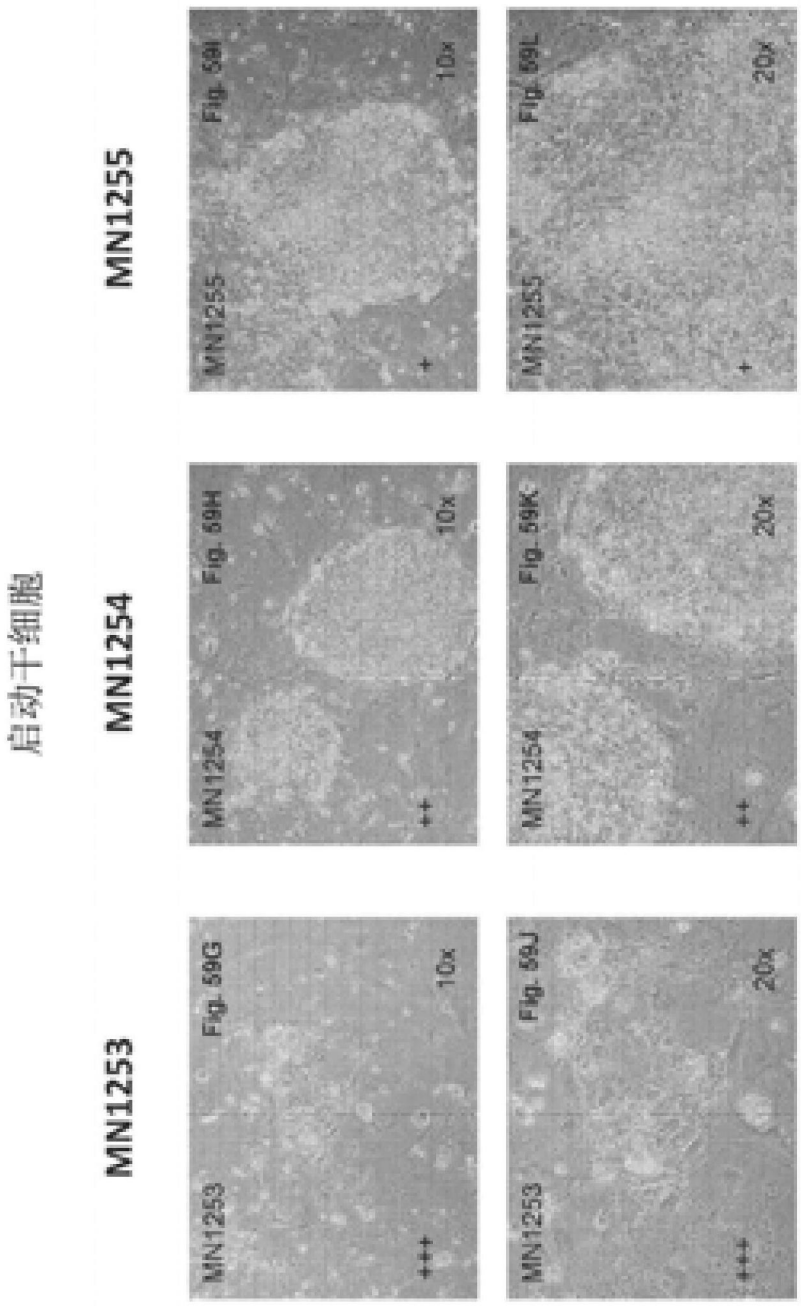

启动干细胞
MN1253
MN1254
MN1255
Fig. 59G
Fig. 59H
Fig. 59I
Fig. 59J
Fig. 59K
Fig. 59L
MN1253
MN1254
MN1255
10x
20x
+++
++
+

图59G至图59L

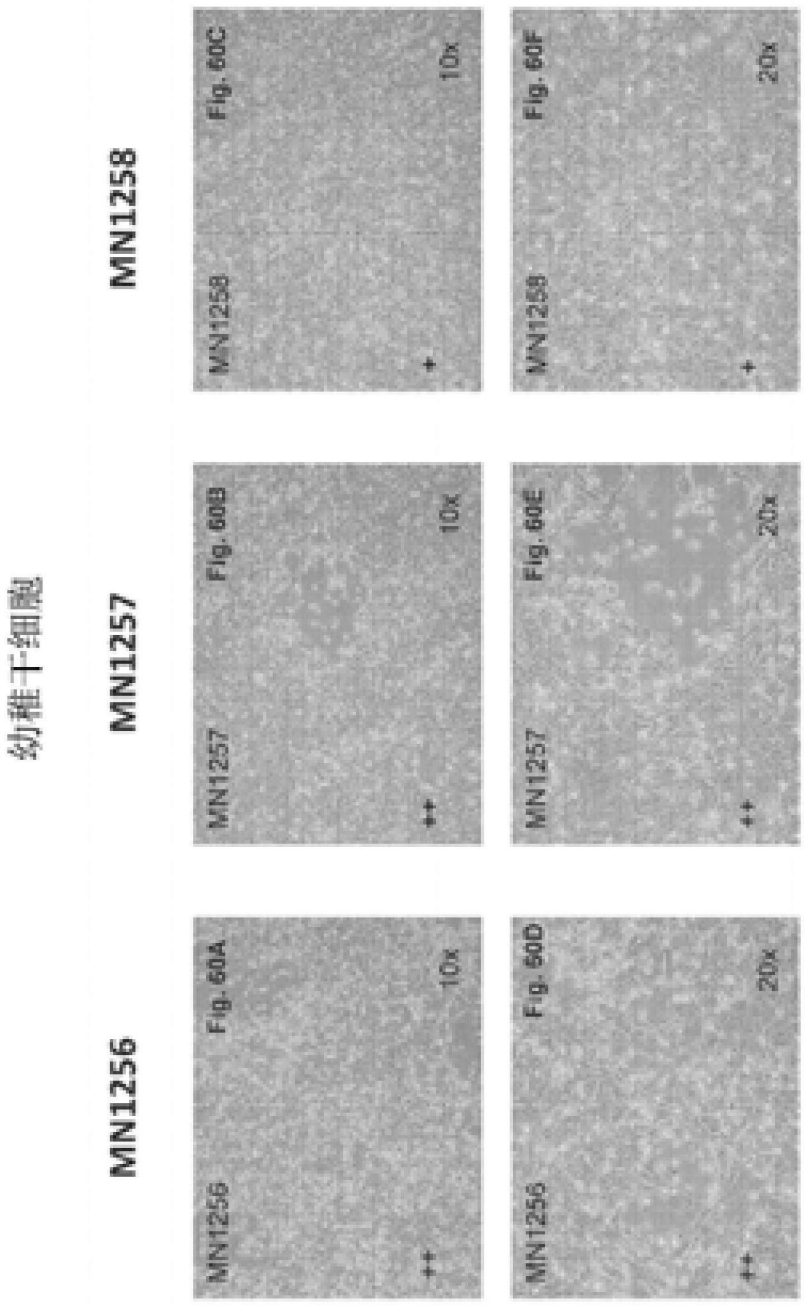

幼稚干细胞
MN1256
MN1257
MN1258
Fig. 60A
Fig. 60B
Fig. 60C
Fig. 60D
Fig. 60E
Fig. 60F
MN1256
MN1257
MN1258
++
+
10x
20x

图60A至图60F

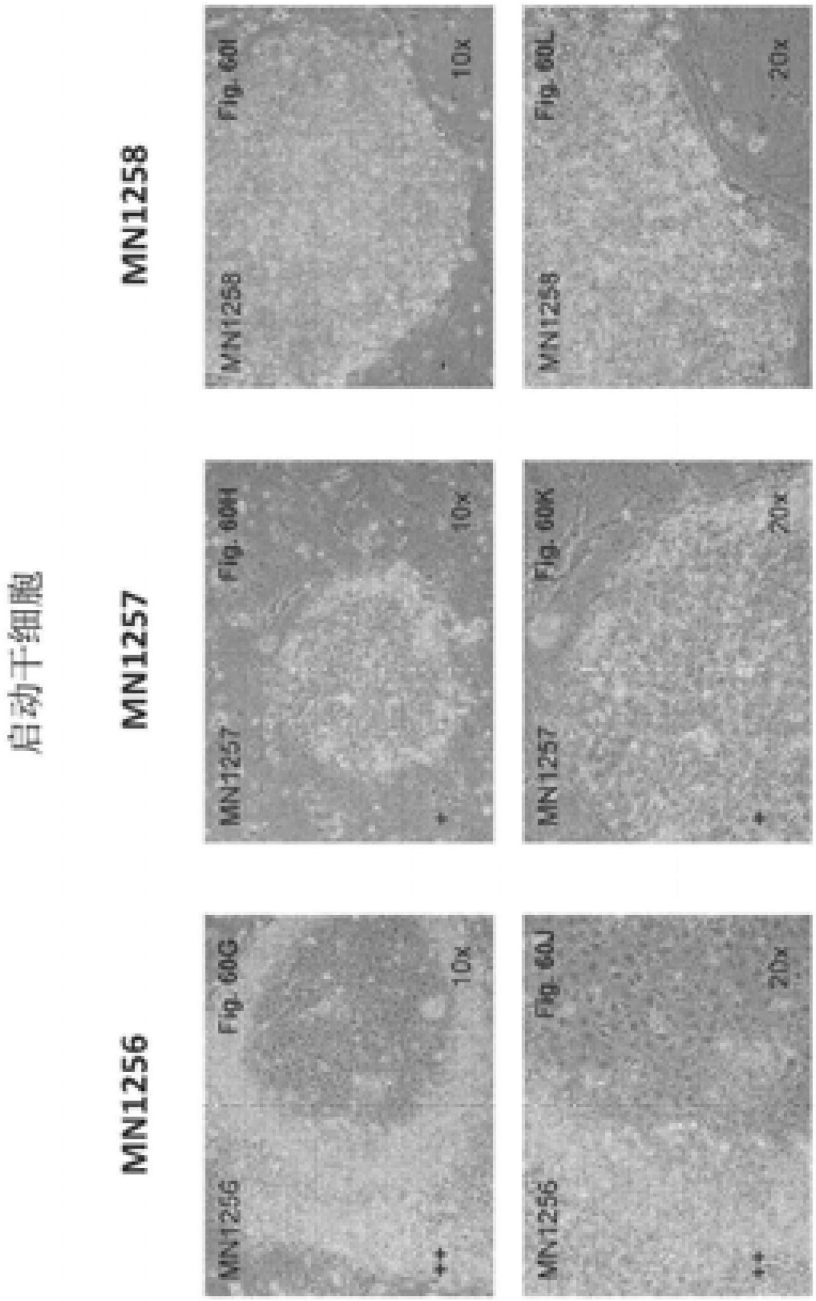

启动干细胞
MN1256
MN1257
MN1258
Fig. 60G
Fig. 60H
Fig. 60I
Fig. 60J
Fig. 60K
Fig. 60L
MN1256
MN1257
MN1258
10x
20x
++
+

图60G至图60L

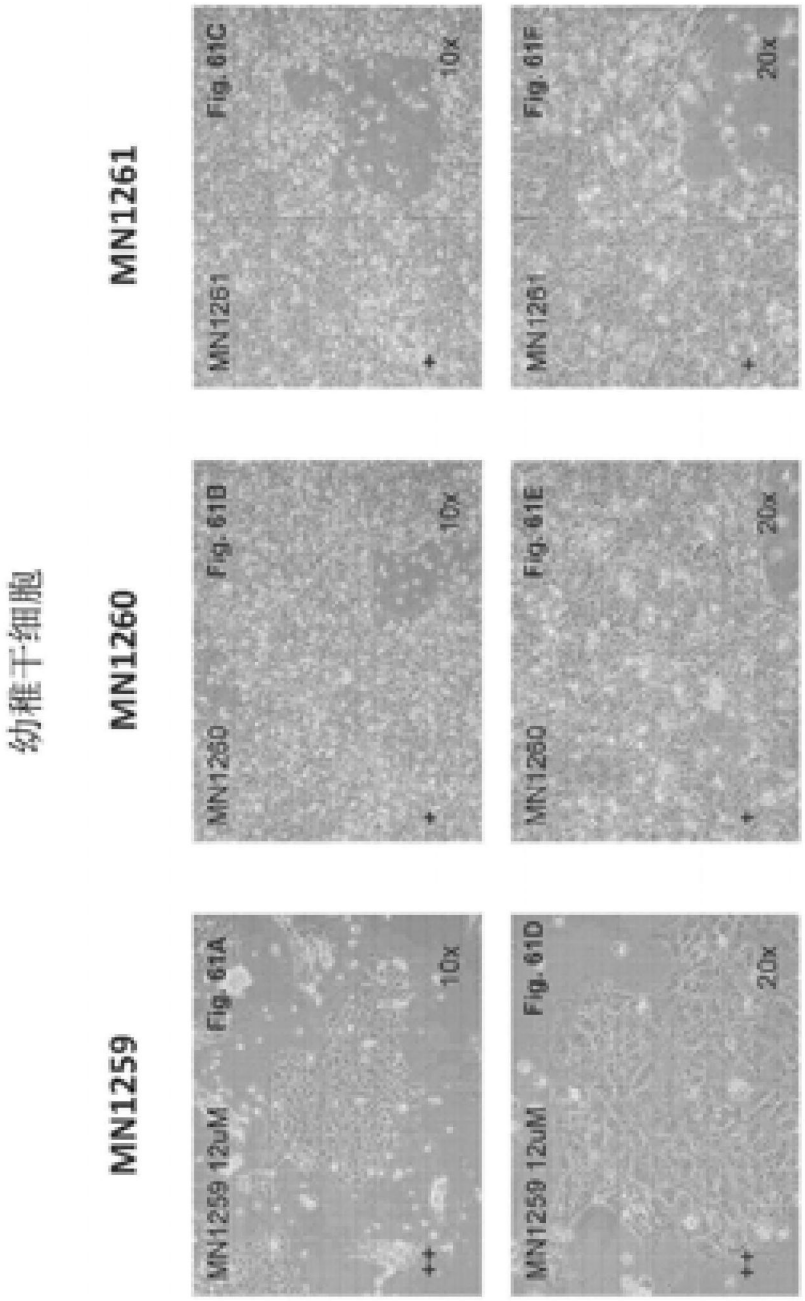

幼稚干细胞
MN1259
MN1260
MN1261
Fig. 61A
Fig. 61B
Fig. 61C
Fig. 61D
Fig. 61E
Fig. 61F
MN1259 12uM
MN1260
MN1261
10x
20x
++
+

图61A至图61F

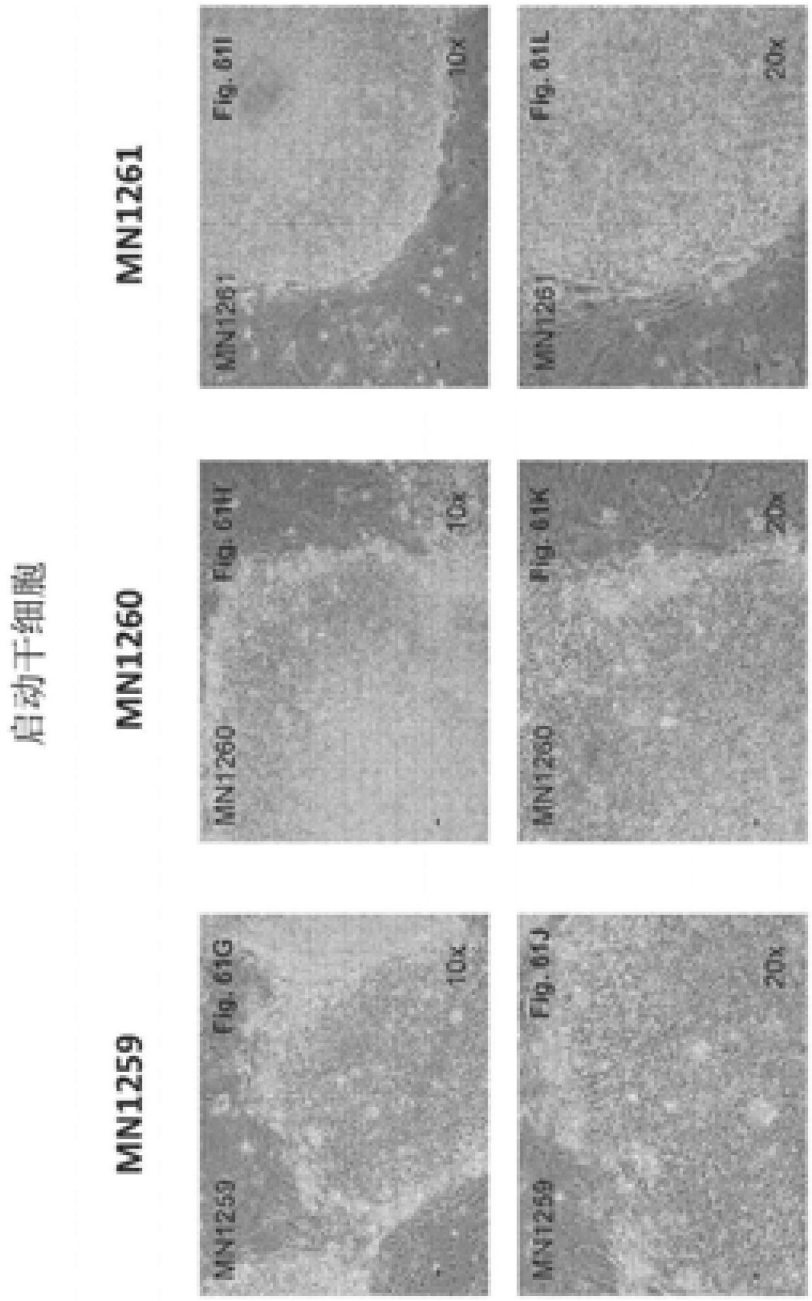

启动干细胞
MN1259
MN1260
MN1261
Fig. 61G
Fig. 61H
Fig. 61I
Fig. 61J
Fig. 61K
Fig. 61L
10x
20x

图61G至图61L

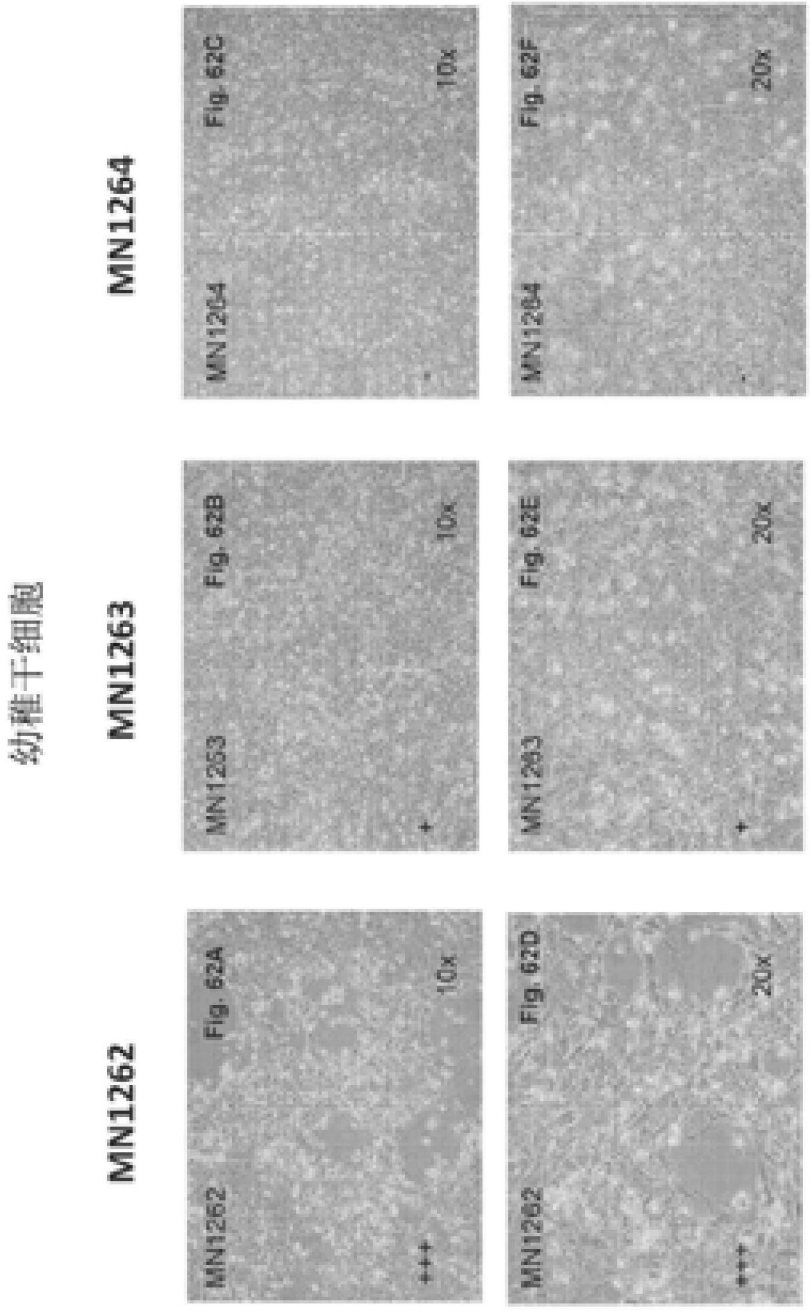

幼稚干细胞
MN1262
MN1263
MN1264
MN1262
Fig. 62A
10x
+++
MN1263
Fig. 62B
10x
+
MN1264
Fig. 62C
10x
-
MN1262
Fig. 62D
20x
+++
MN1263
Fig. 62E
20x
+
MN1264
Fig. 62F
20x
-

图62A至图62F

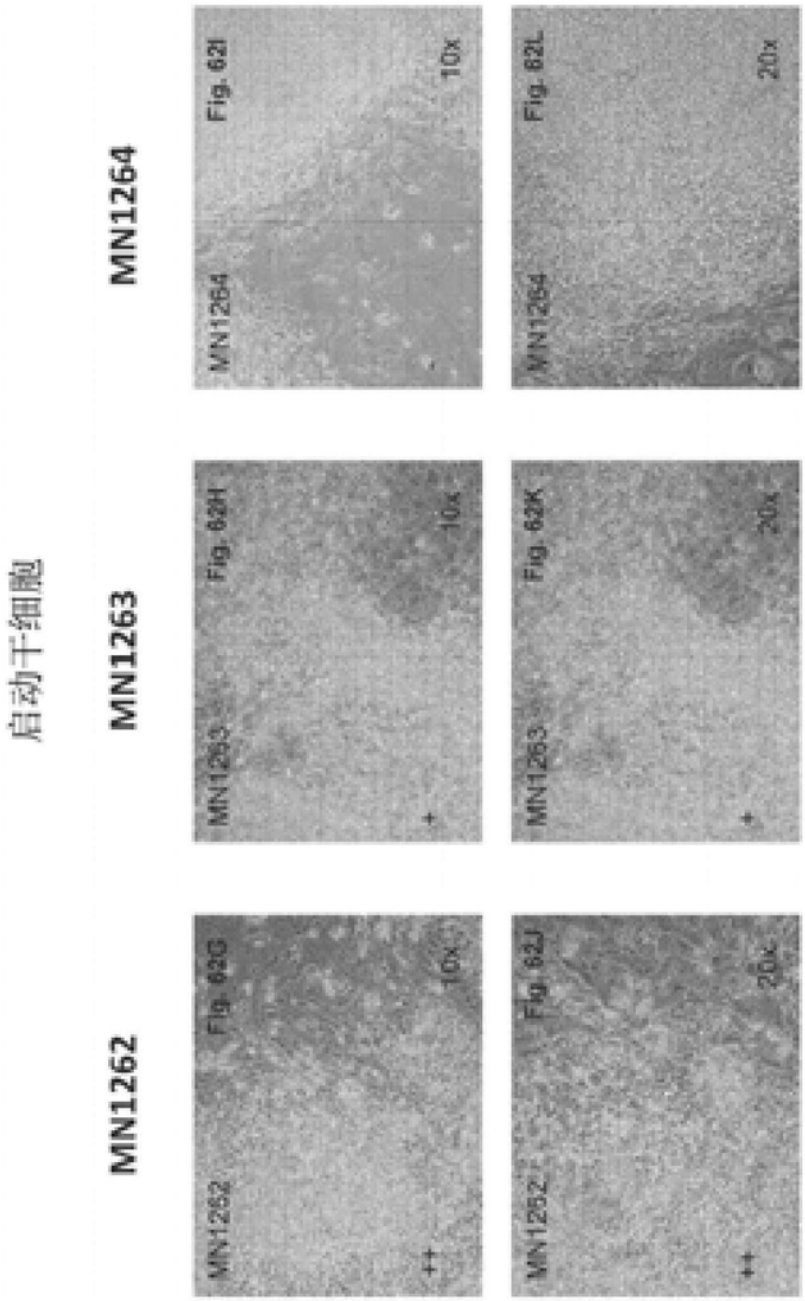

启动干细胞
MN1262
MN1263
MN1264
Fig. 62G
Fig. 62H
Fig. 62I
Fig. 62J
Fig. 62K
Fig. 62L
MN1262
MN1263
MN1264
10x
20x
++
+

图62G至图62L

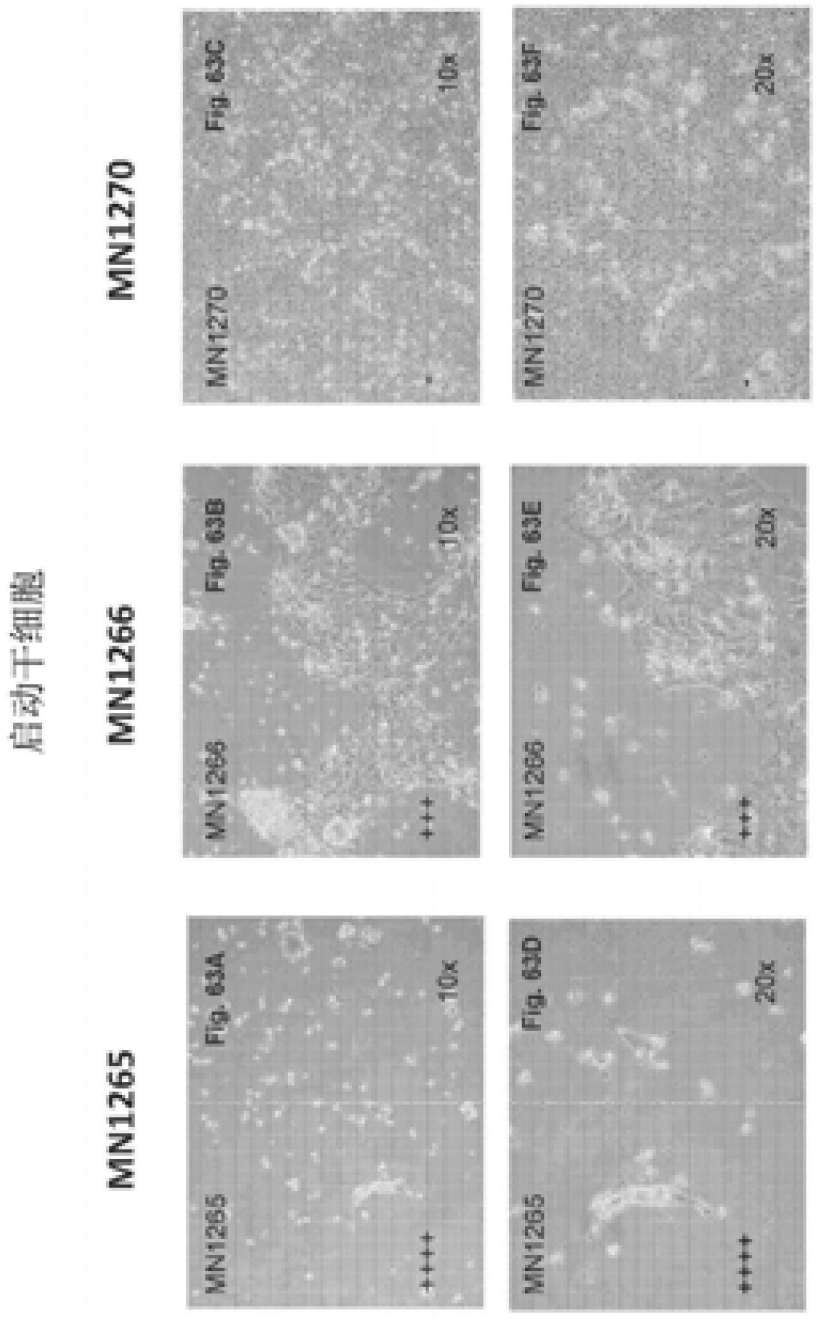

MN1265
MN1266
MN1270
启动干细胞
Fig. 63A
Fig. 63B
Fig. 63C
Fig. 63D
Fig. 63E
Fig. 63F
MN1265
MN1266
MN1270
++++
+++
-
10x
20x

图63A至图63F

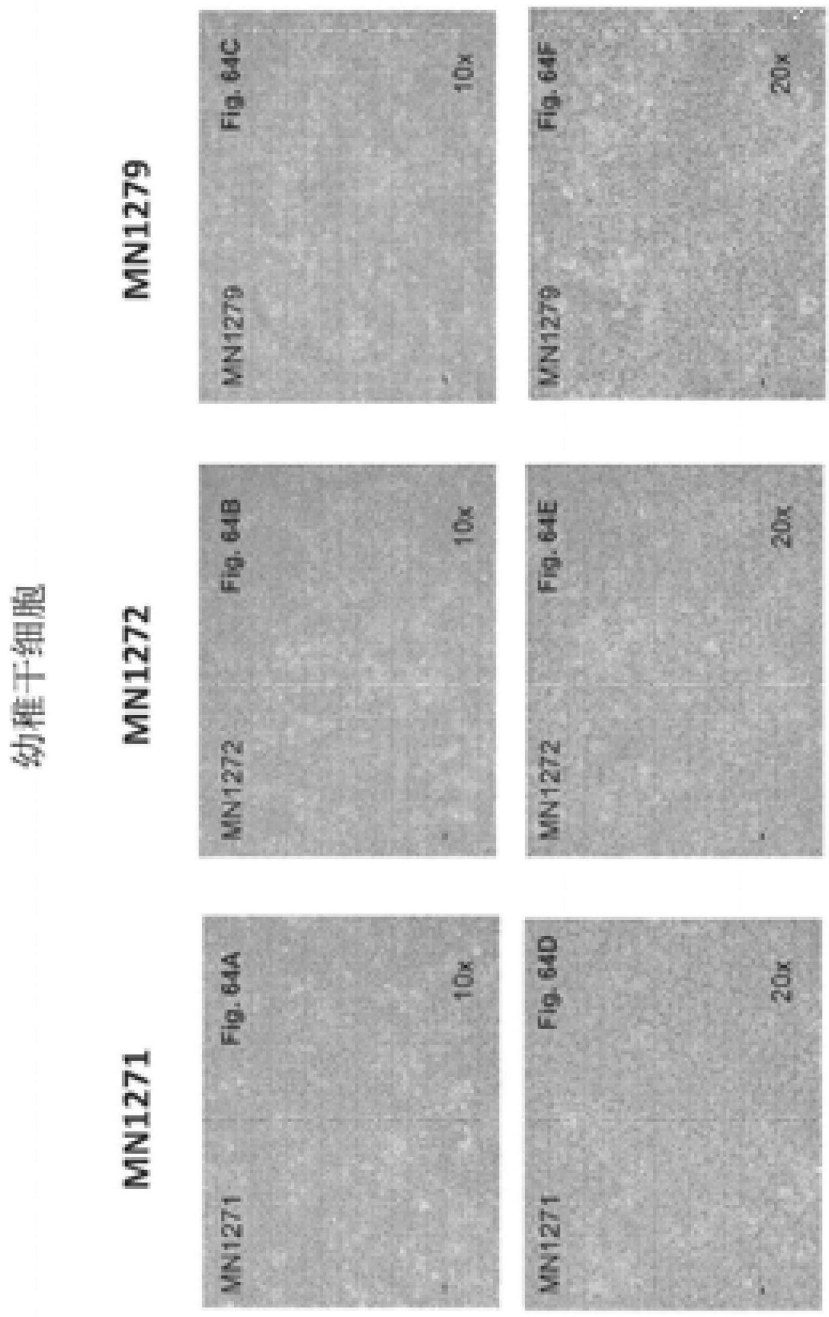

幼稚干细胞
MN1271
MN1272
MN1279
MN1271
Fig. 64A
10x
MN1272
Fig. 64B
10x
MN1279
Fig. 64C
10x
MN1271
Fig. 64D
20x
MN1272
Fig. 64E
20x
MN1279
Fig. 64F
20x

图64A至图64F

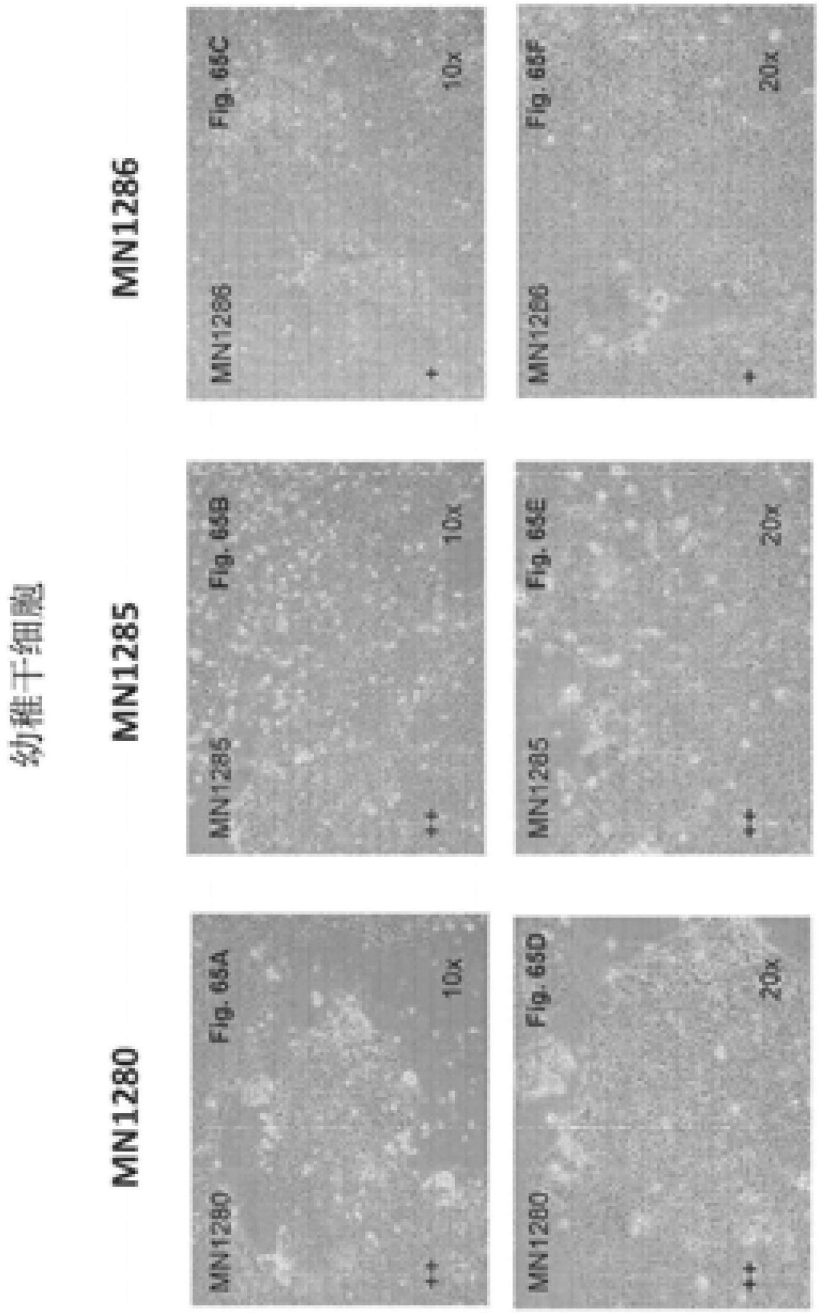

幼稚干细胞
MN1280
MN1285
MN1286
Fig. 65A
Fig. 65B
Fig. 65C
Fig. 65D
Fig. 65E
Fig. 65F
MN1280
MN1285
MN1286
++
++
+
10x
10x
10x
20x
20x
20x

图65A至图65F

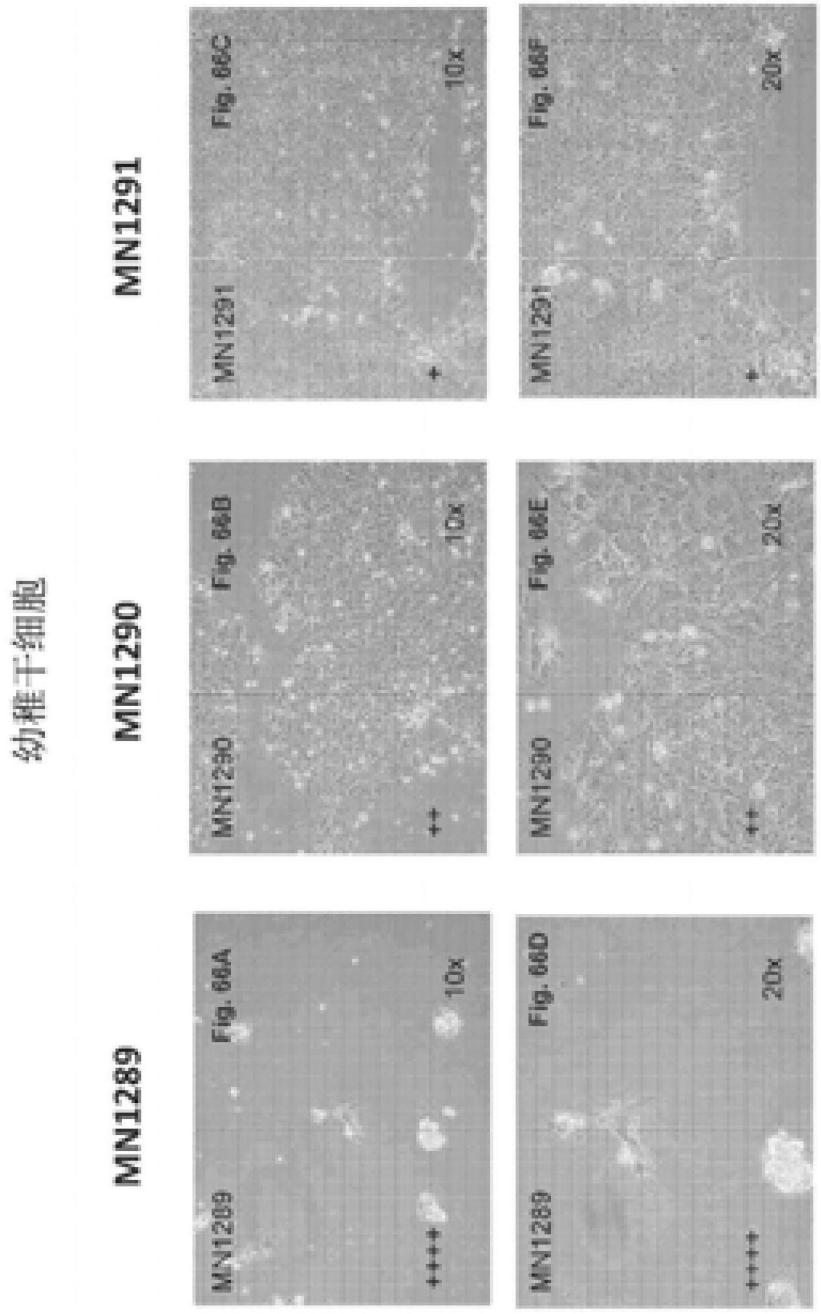

幼稚干细胞
MN1289
MN1290
MN1291
Fig. 66A
Fig. 66B
Fig. 66C
Fig. 66D
Fig. 66E
Fig. 66F
MN1289
MN1290
MN1291
++++
++
+
10x
20x

图66A至图66F

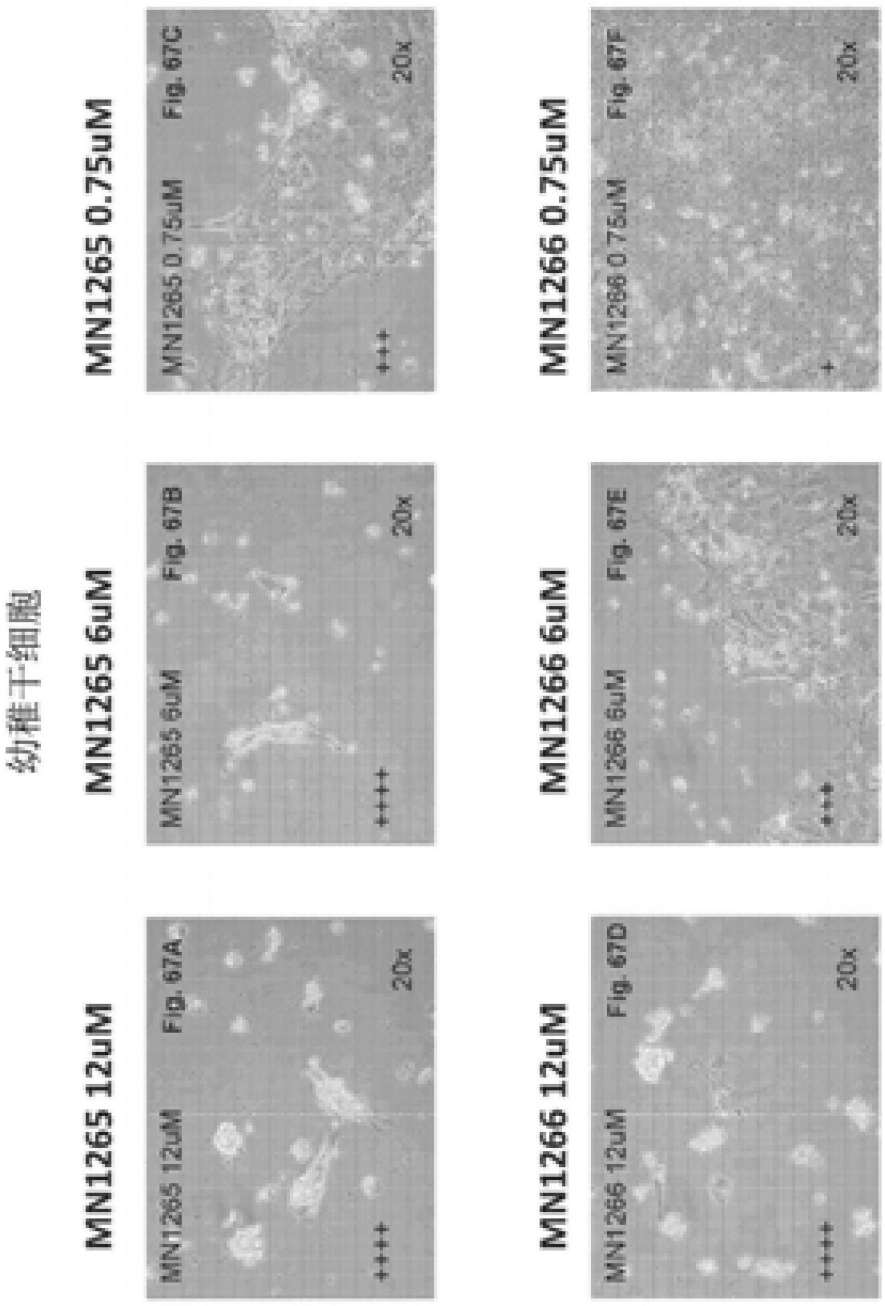

幼稚干细胞
MN1265 12uM
MN1265 6uM
MN1265 0.75uM
MN1266 12uM
MN1266 6uM
MN1266 0.75uM
Fig. 67A
Fig. 67B
Fig. 67C
Fig. 67D
Fig. 67E
Fig. 67F
20x
++++
+++
+

图67A至图67F

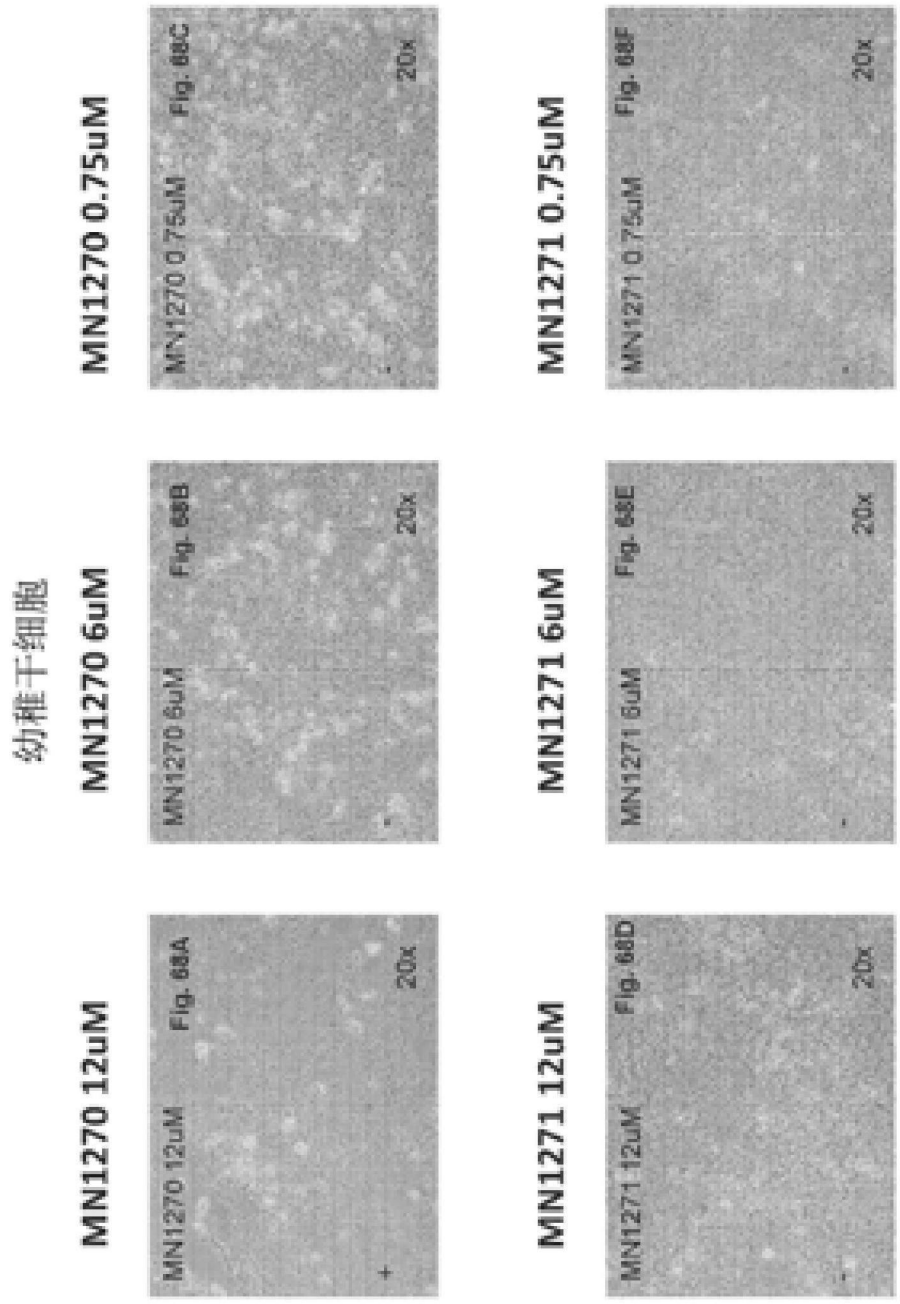

幼稚干细胞
MN1270 12uM
MN1270 6uM
MN1270 0.75uM
MN1271 12uM
MN1271 6uM
MN1271 0.75uM
MN1270 12uM Fig. 68A
MN1270 6uM Fig. 68B
MN1270 0.75uM Fig. 68C
MN1271 12uM Fig. 68D
MN1271 6uM Fig. 68E
MN1271 0.75uM Fig. 68F
20x
+
-

图68A至图68F

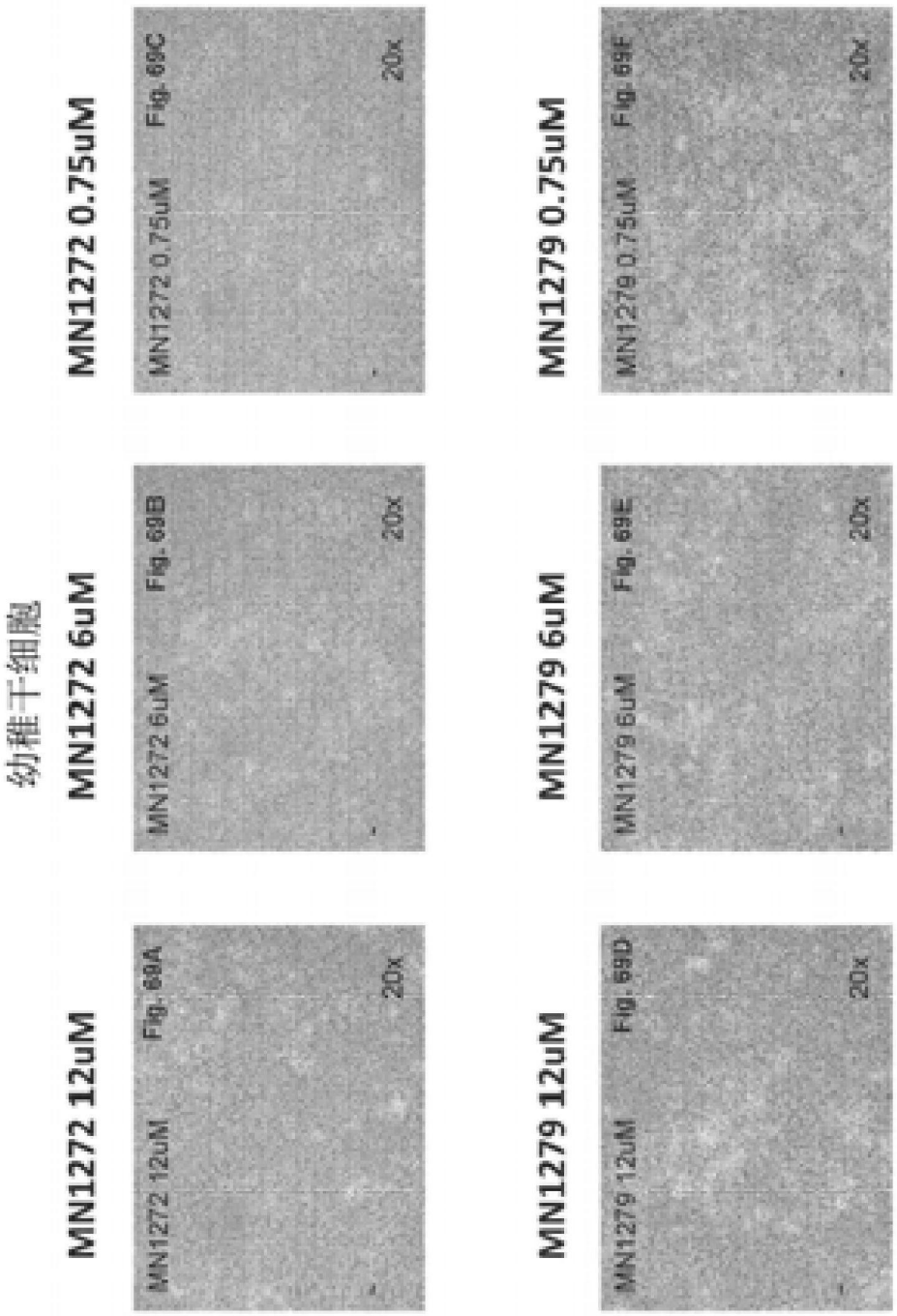

幼稚干细胞
MN1272 12uM
MN1272 6uM
MN1272 0.75uM
MN1279 12uM
MN1279 6uM
MN1279 0.75uM
Fig. 69A
Fig. 69B
Fig. 69C
Fig. 69D
Fig. 69E
Fig. 69F
20x

图69A至图69F

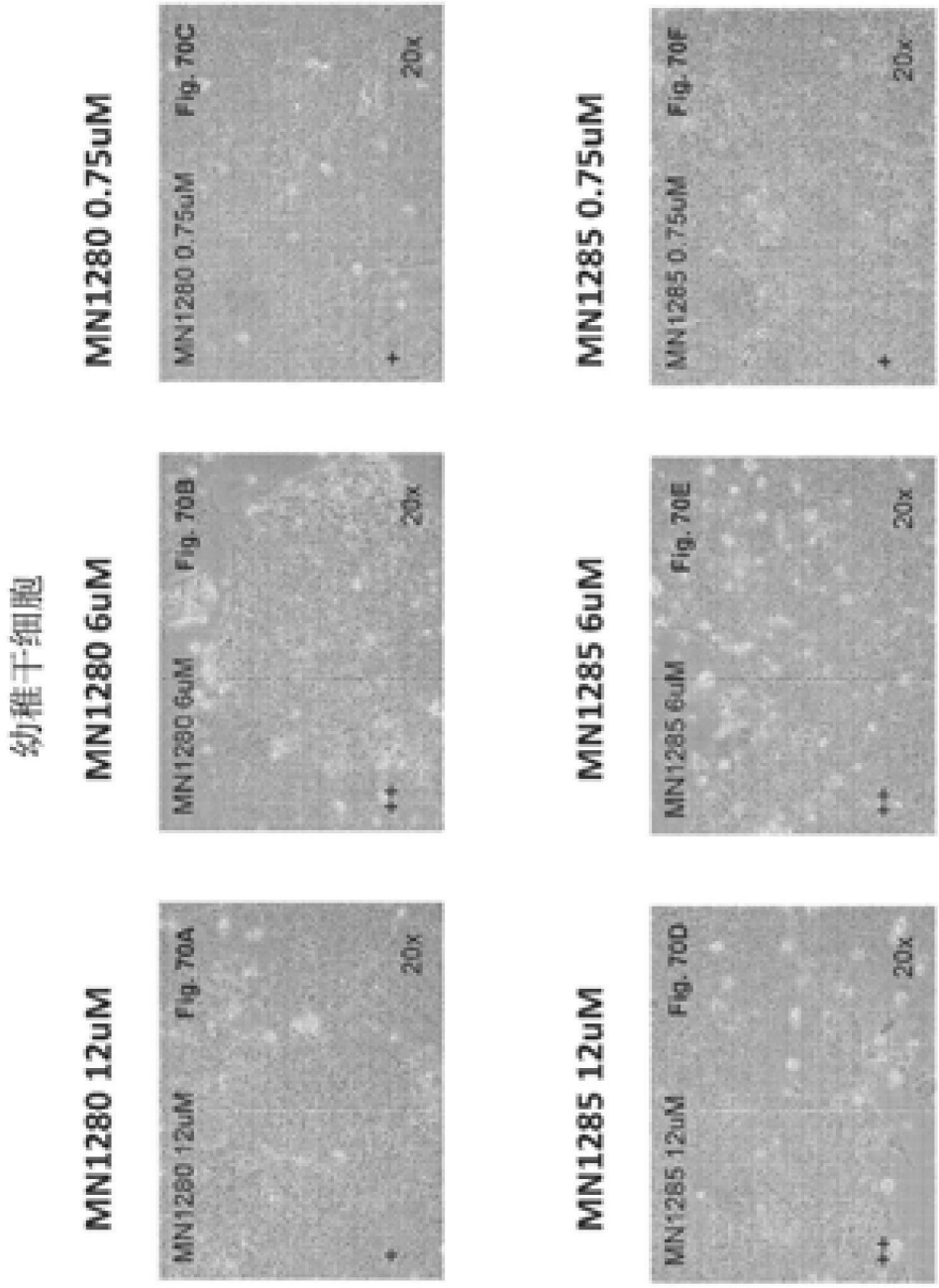

幼稚干细胞
MN1280 12uM
MN1280 6uM
MN1280 0.75uM
MN1285 12uM
MN1285 6uM
MN1285 0.75uM
MN1280 12uM Fig. 70A
MN1280 6uM Fig. 70B
MN1280 0.75uM Fig. 70C
MN1285 12uM Fig. 70D
MN1285 6uM Fig. 70E
MN1285 0.75uM Fig. 70F
20x
+
++

图70A至图70F

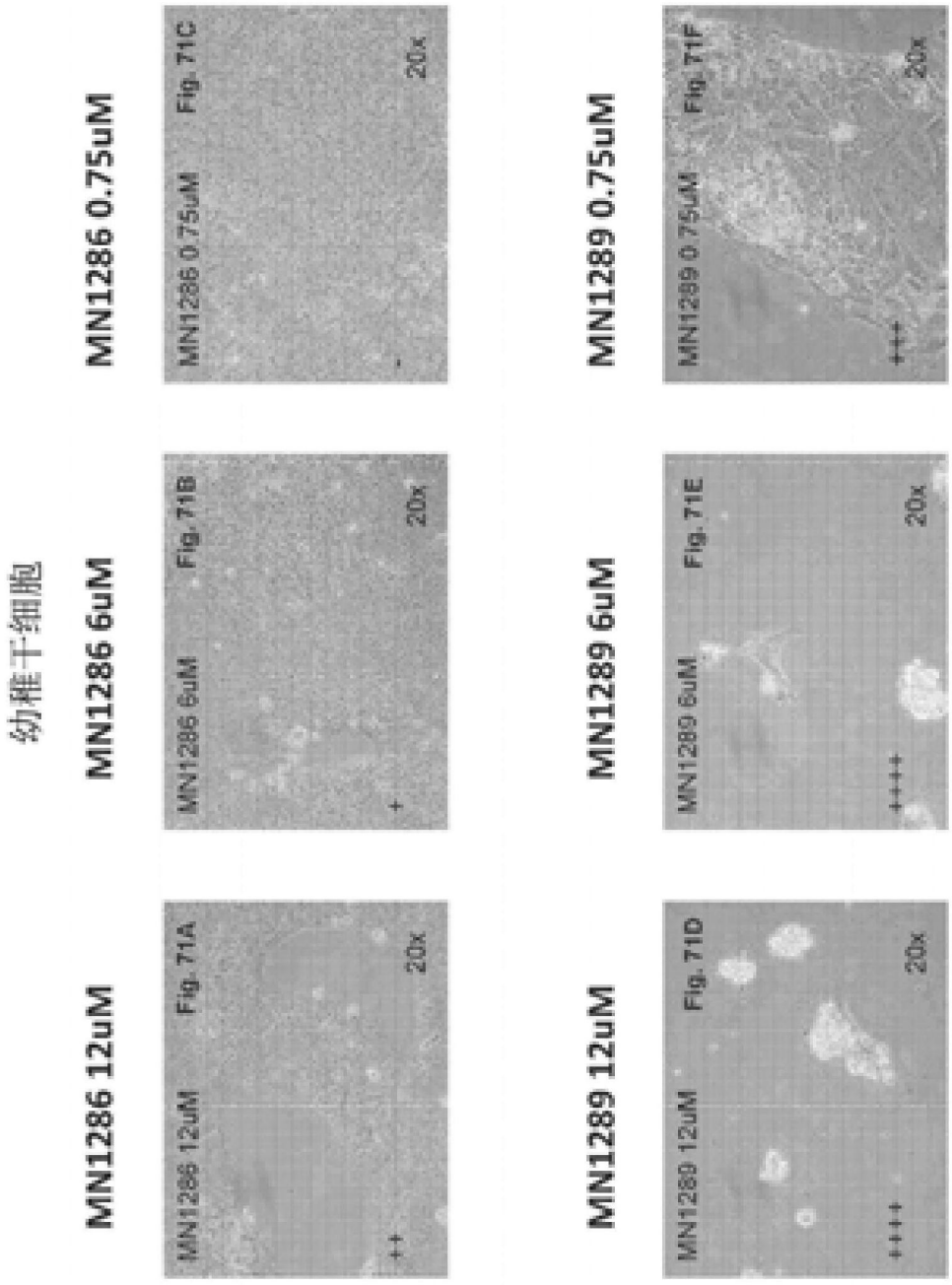

幼稚干细胞
MN1286 12uM
MN1286 6uM
MN1286 0.75uM
MN1289 12uM
MN1289 6uM
MN1289 0.75uM
Fig. 71A
Fig. 71B
Fig. 71C
Fig. 71D
Fig. 71E
Fig. 71F
20x
++
+
-
++++
++++
+++

图71A至图71F

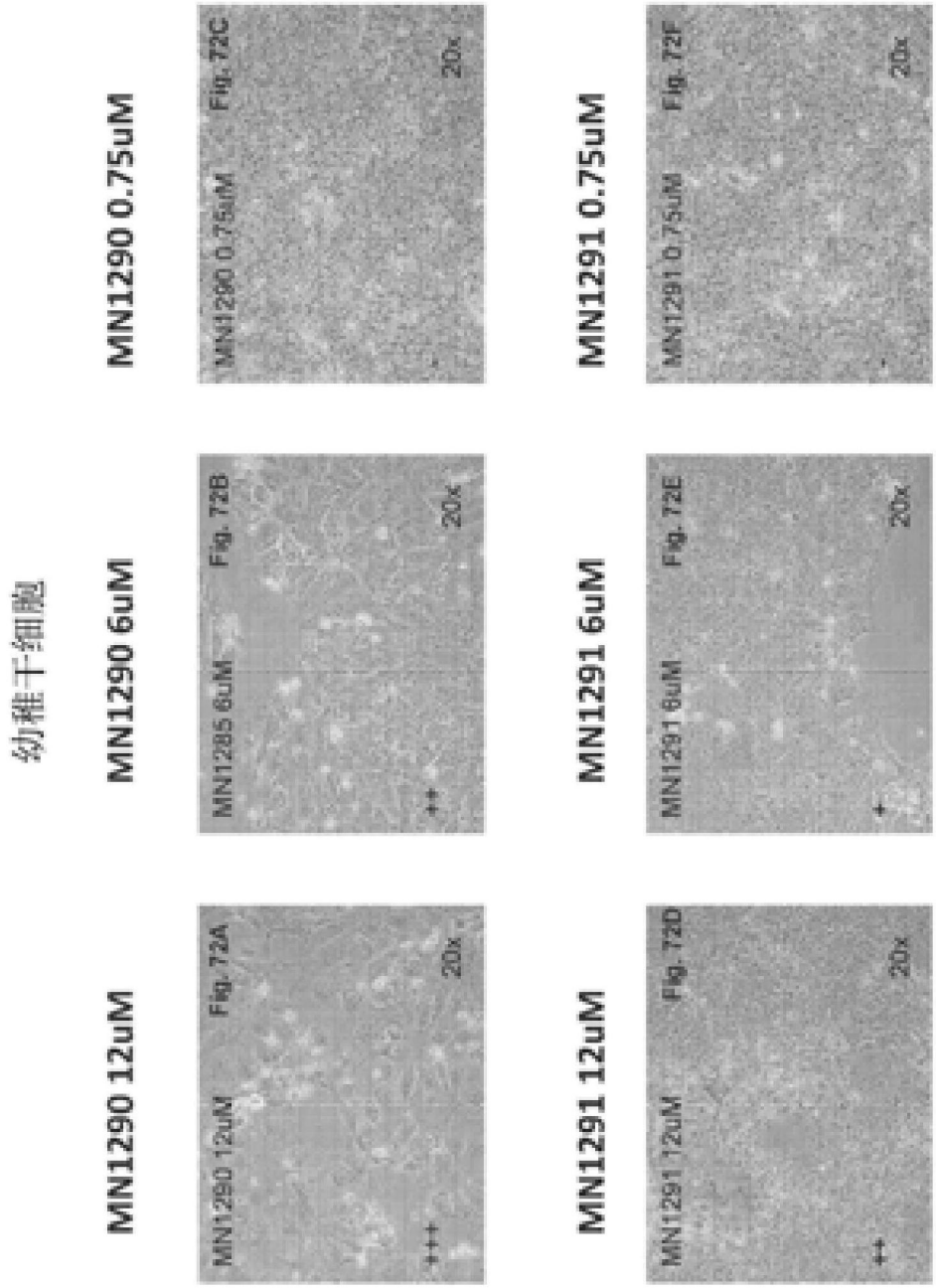

幼稚干细胞
MN1290 12uM
MN1290 6uM
MN1290 0.75uM
MN1291 12uM
MN1291 6uM
MN1291 0.75uM
MN1290 12uM Fig. 72A
MN1285 6uM Fig. 72B
MN1290 0.75uM Fig. 72C
MN1291 12uM Fig. 72D
MN1291 6uM Fig. 72E
MN1291 0.75uM Fig. 72F
20x
+++
++
+
-

图72A至图72F

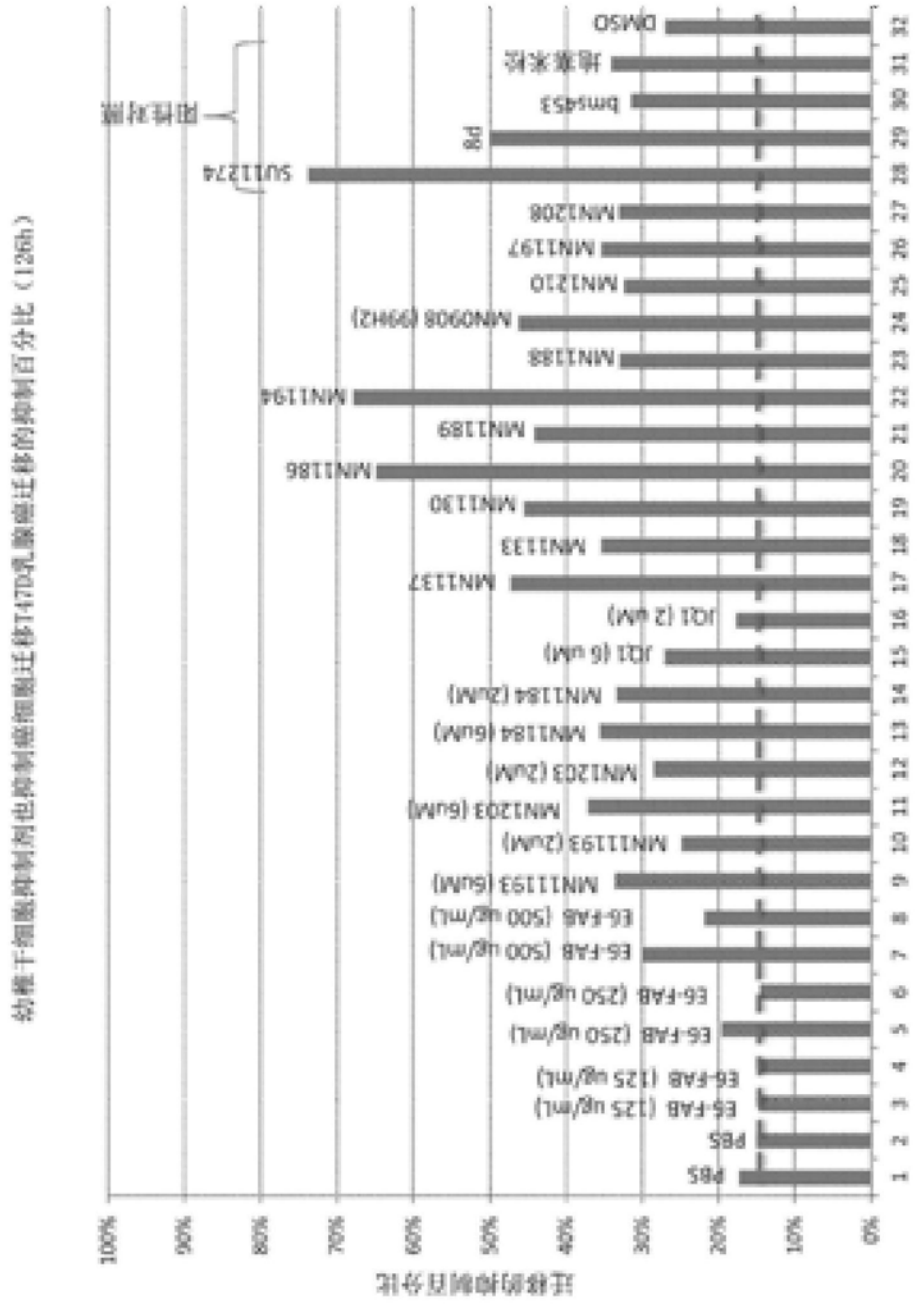

结肠干细胞抑制剂也抑制细胞迁移T47D乳腺癌迁移的抑制百分比（12h）
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
迁移的抑制百分比
阳性对照
SU11274
PF
bms453
抗寒来松
DMSO
MN1208
MN1197
MN1210
MN0908 (99HZ)
MN1188
MN1194
MN1189
MN1186
MN1130
MN1133
MN1137
JQ1 (2 uM)
JQ1 (6 uM)
MN1184 (2uM)
MN1184 (6uM)
MN1203 (2uM)
MN1203 (6uM)
MN1193 (2uM)
MN1193 (6uM)
E6-FAB (500 ug/mL)
E6-FAB (500 ug/mL)
E6-FAB (250 ug/mL)
E6-FAB (250 ug/mL)
E6-FAB (125 ug/mL)
E6-FAB (125 ug/mL)
PBS
PBS
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

图73

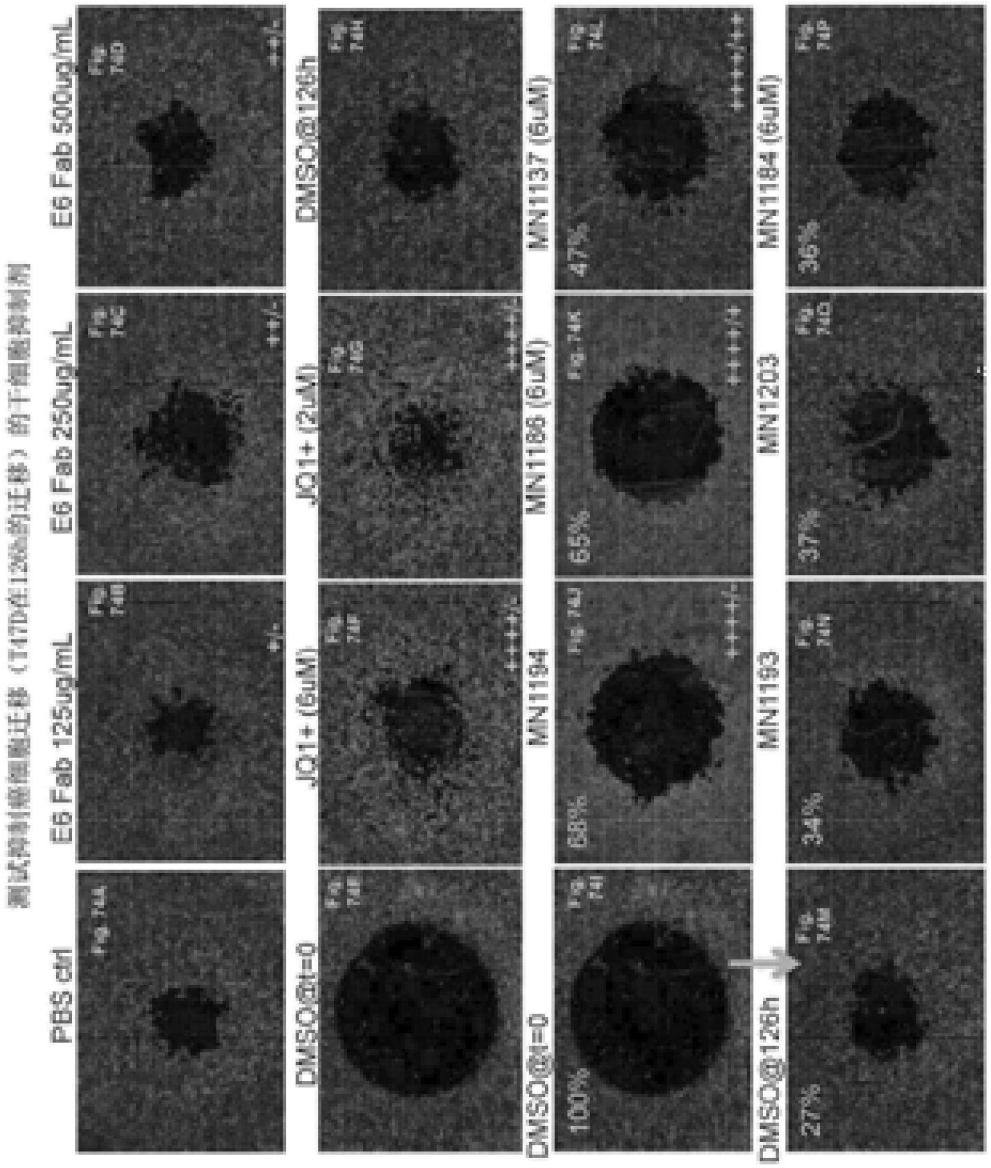

测试抑制癌细胞迁移（T47D在126h的迁移）的干细胞抑制剂
PBS ctrl
E6 Fab 125ug/mL
E6 Fab 250ug/mL
E6 Fab 500ug/mL
DMSO@t=0
JQ1+ (6uM)
JQ1+ (2uM)
DMSO@126h
DMSO@t=0
MN1194
MN1188 (6uM)
MN1137 (6uM)
DMSO@126h
MN1193
MN1203
MN1184 (6uM)
100%
68%
65%
47%
27%
34%
37%
36%

图74

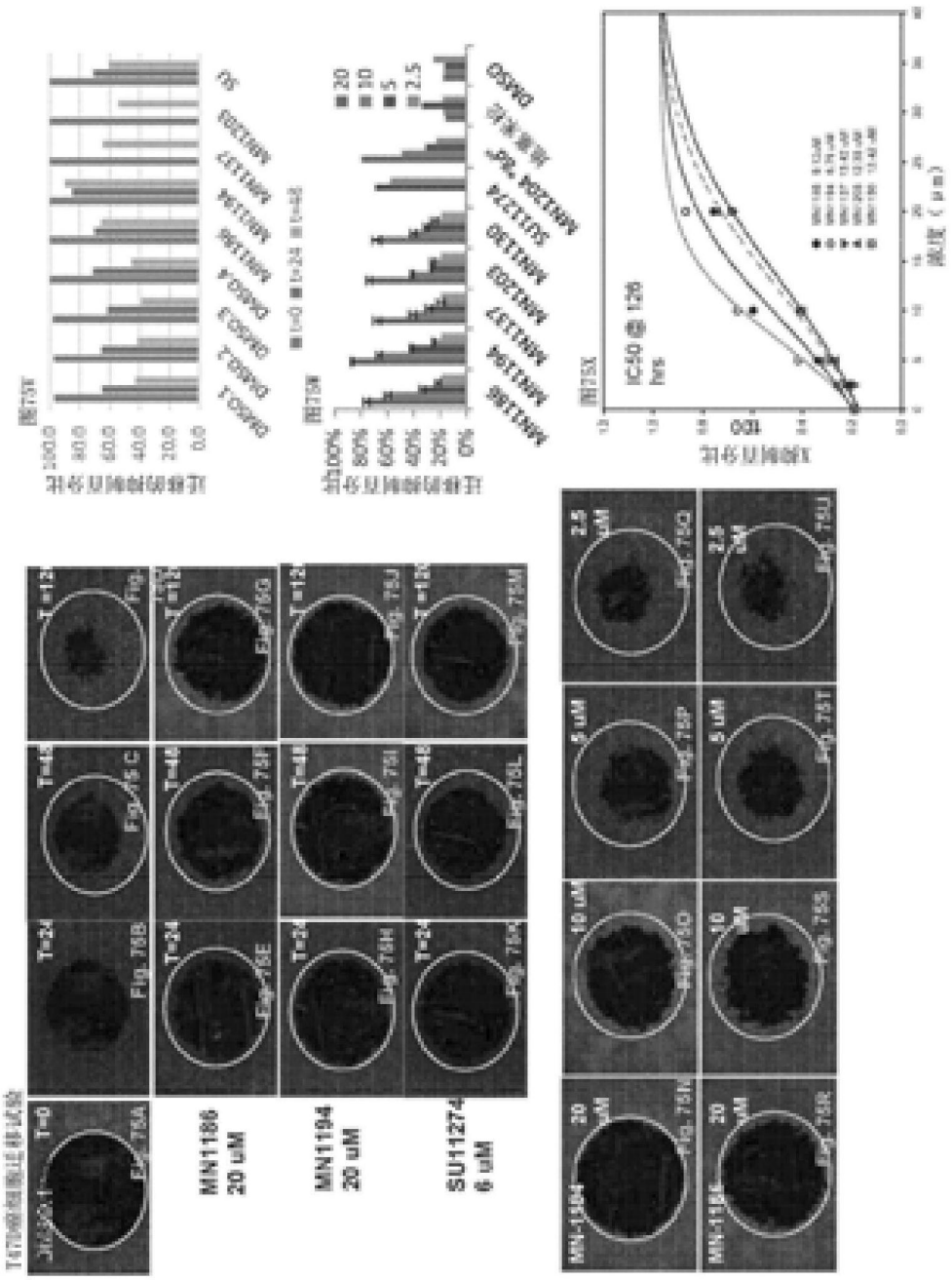
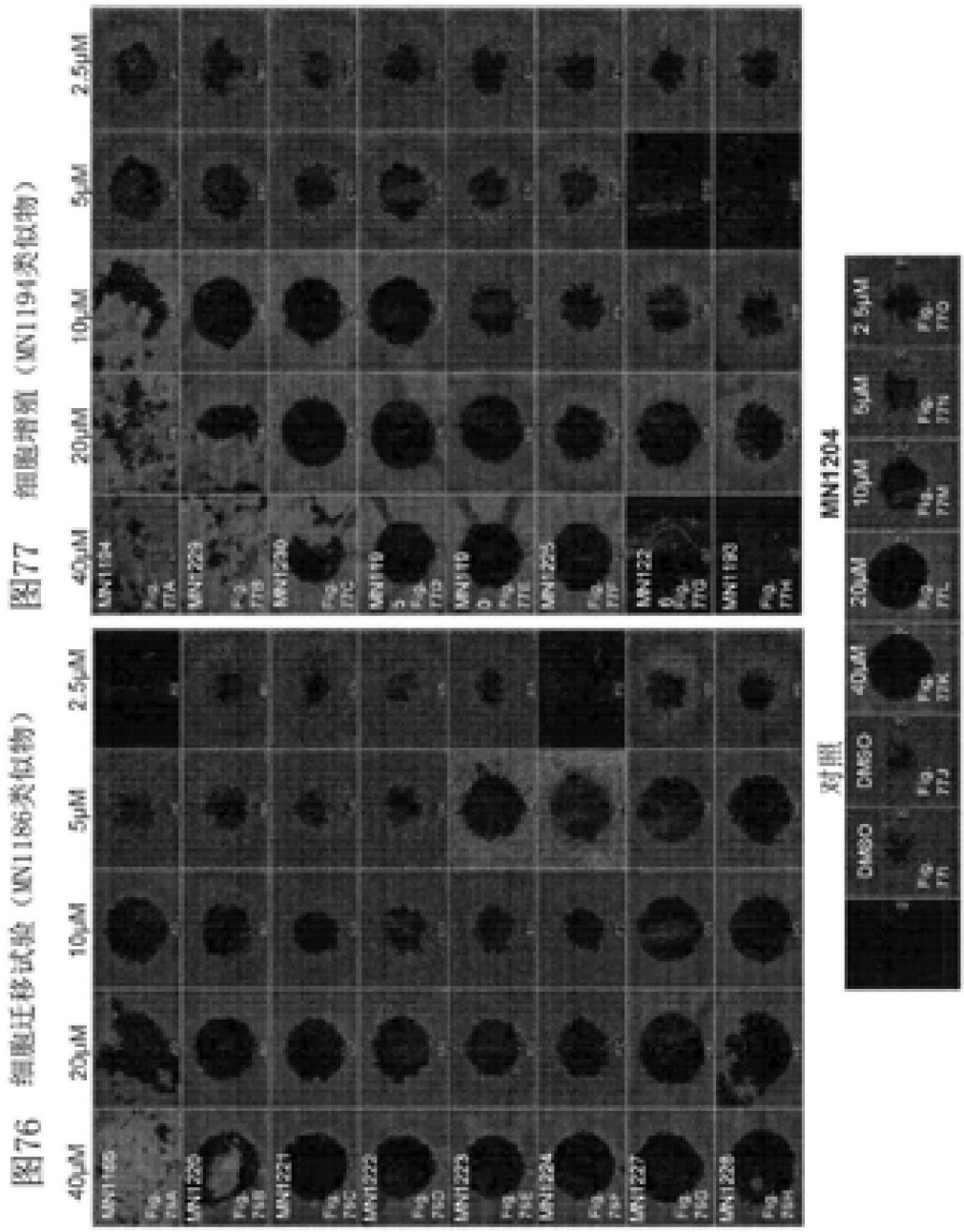
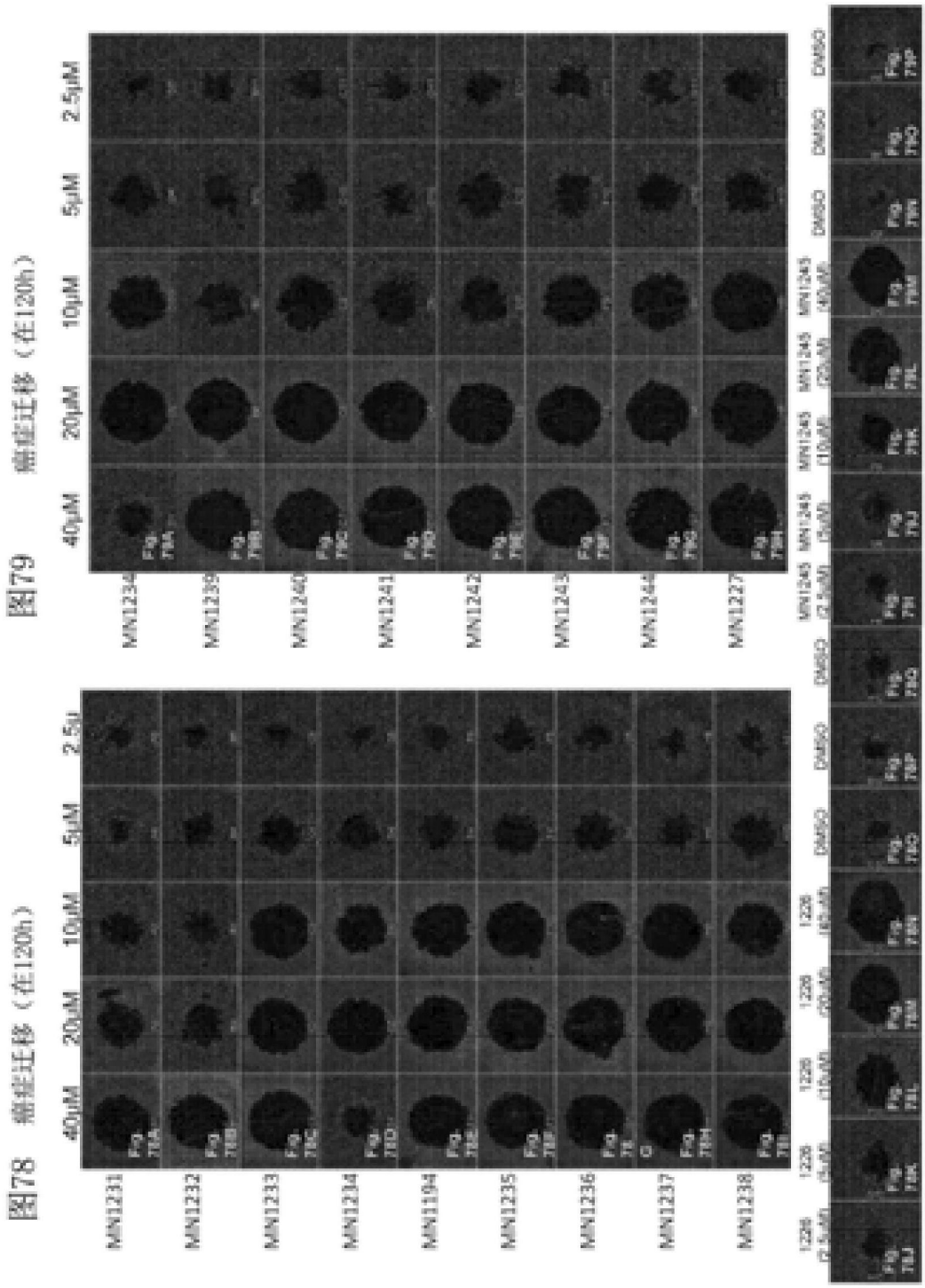

MN1186
20 uM
MN1194
20 uM
SU11274
6 uM
T=0
T=24
T=48
T=120
20 uM
10 uM
5 uM
2.5 uM
IC-50 @ 12h
hrs

图75


图76 细胞迁移试验（MN1186类似物）
40μM
20μM
10μM
5μM
2.5μM
MN1185
MN1220
MN1221
MN1222
MN1223
MN1224
MN1227
MN1228
图77 细胞增殖（MN1194类似物）
MN1194
MN1229
MN1230
MN1219
MN1225
MN122
MN1193
对照
DMSO
DMSO
MN1204


图78 癌症迁移（在120h）
40μM
20μM
10μM
5μM
2.5μM
DMSO
MN1231
MN1232
MN1233
MN1234
MN1194
MN1235
MN1236
MN1237
MN1238
图79 癌症迁移（在120h）
MN1234
MN1239
MN1240
MN1241
MN1242
MN1243
MN1244
MN1227
MN1245

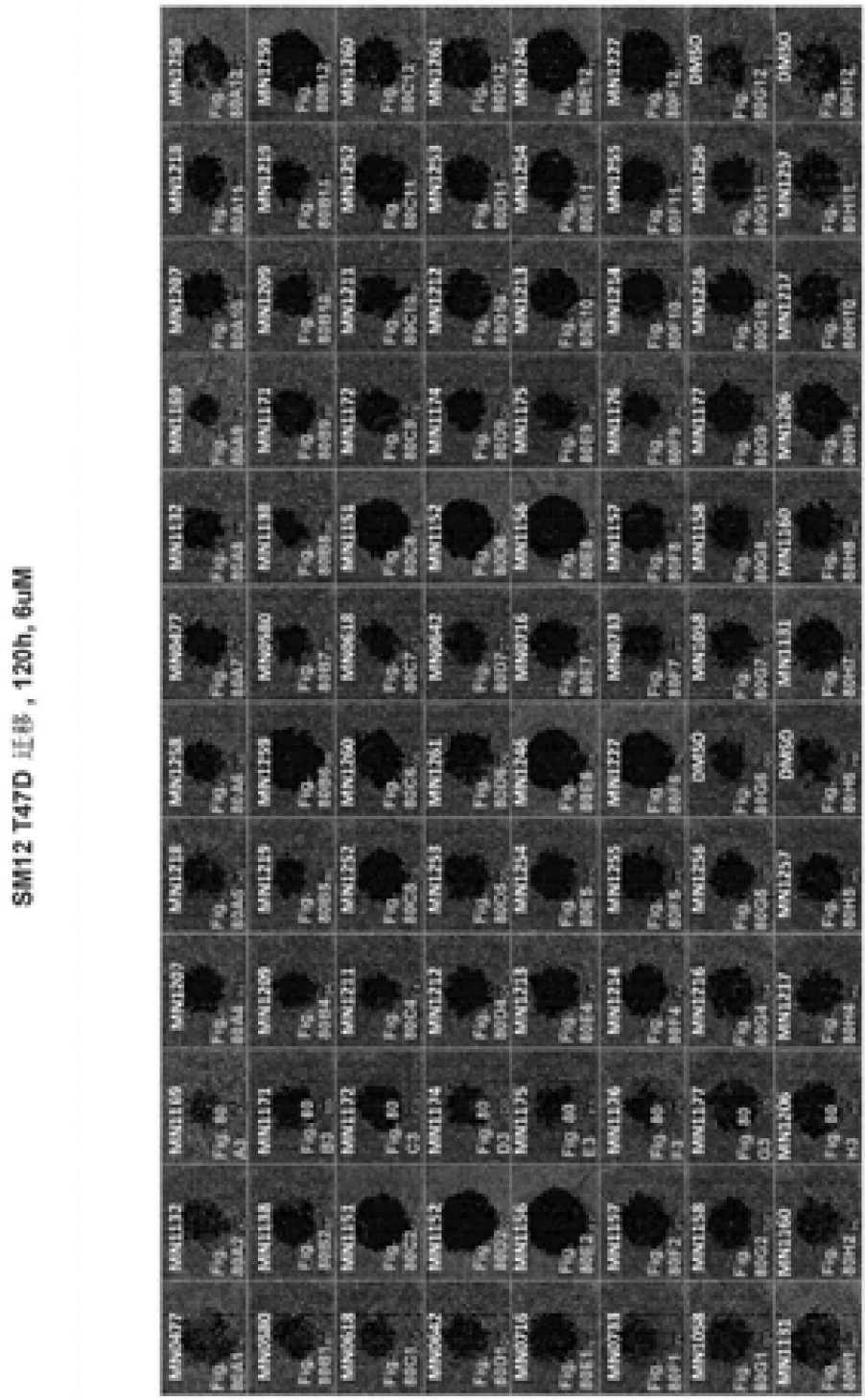


图80

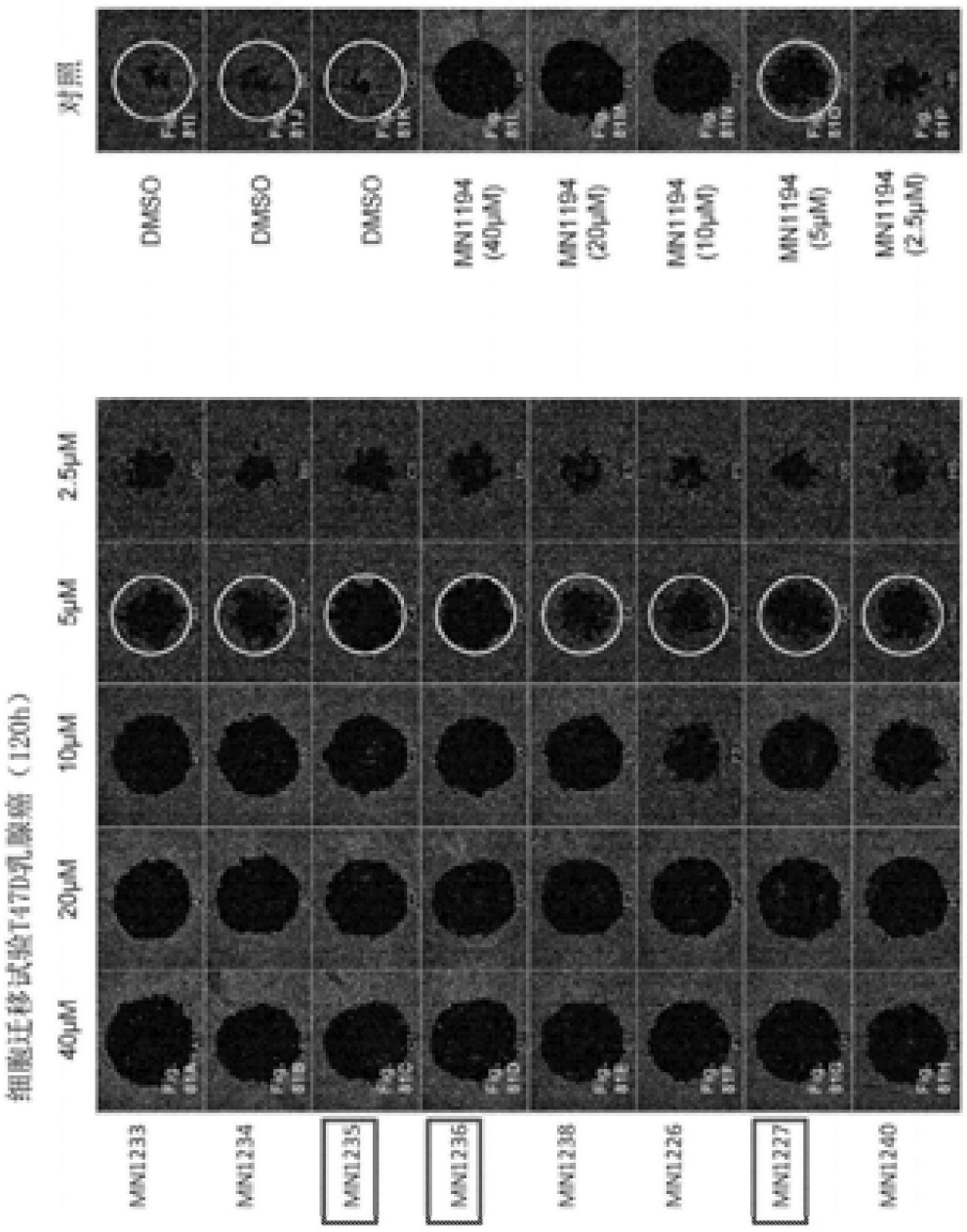

细胞迁移试验T47D乳腺癌（120h）
对照
DMSO
DMSO
DMSO
MN1194 (40μM)
MN1194 (20μM)
MN1194 (10μM)
MN1194 (5μM)
MN1194 (2.5μM)
40μM
20μM
10μM
5μM
2.5μM
MN1233
MN1234
MN1235
MN1236
MN1238
MN1226
MN1227
MN1240

图81

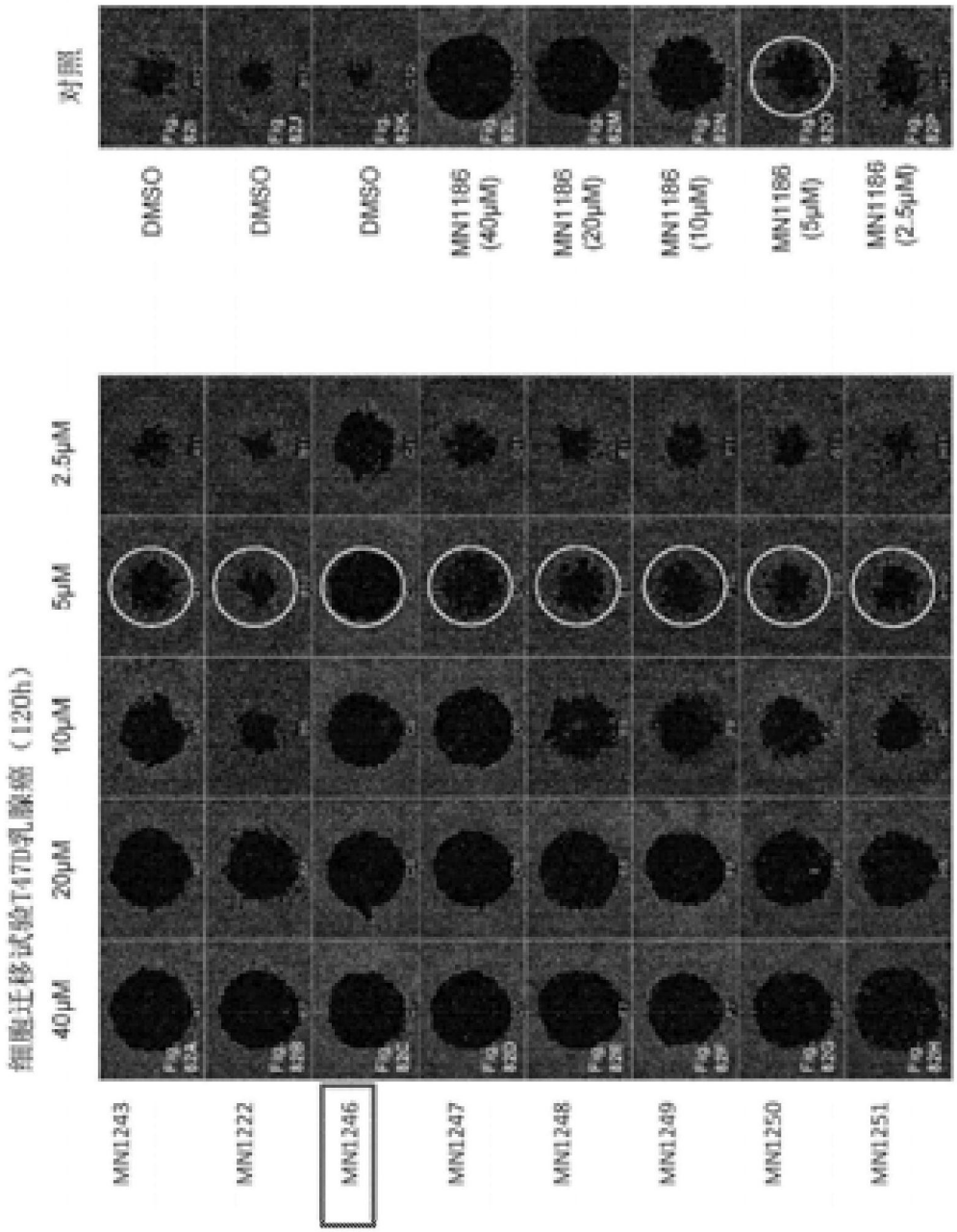

对照
DMSO
DMSO
DMSO
MN1186 (40μM)
MN1186 (20μM)
MN1186 (10μM)
MN1186 (5μM)
MN1186 (2.5μM)
细胞迁移试验T47D乳腺癌（120h）
40μM
20μM
10μM
5μM
2.5μM
MN1243
MN1222
MN1246
MN1247
MN1248
MN1249
MN1250
MN1251

图82

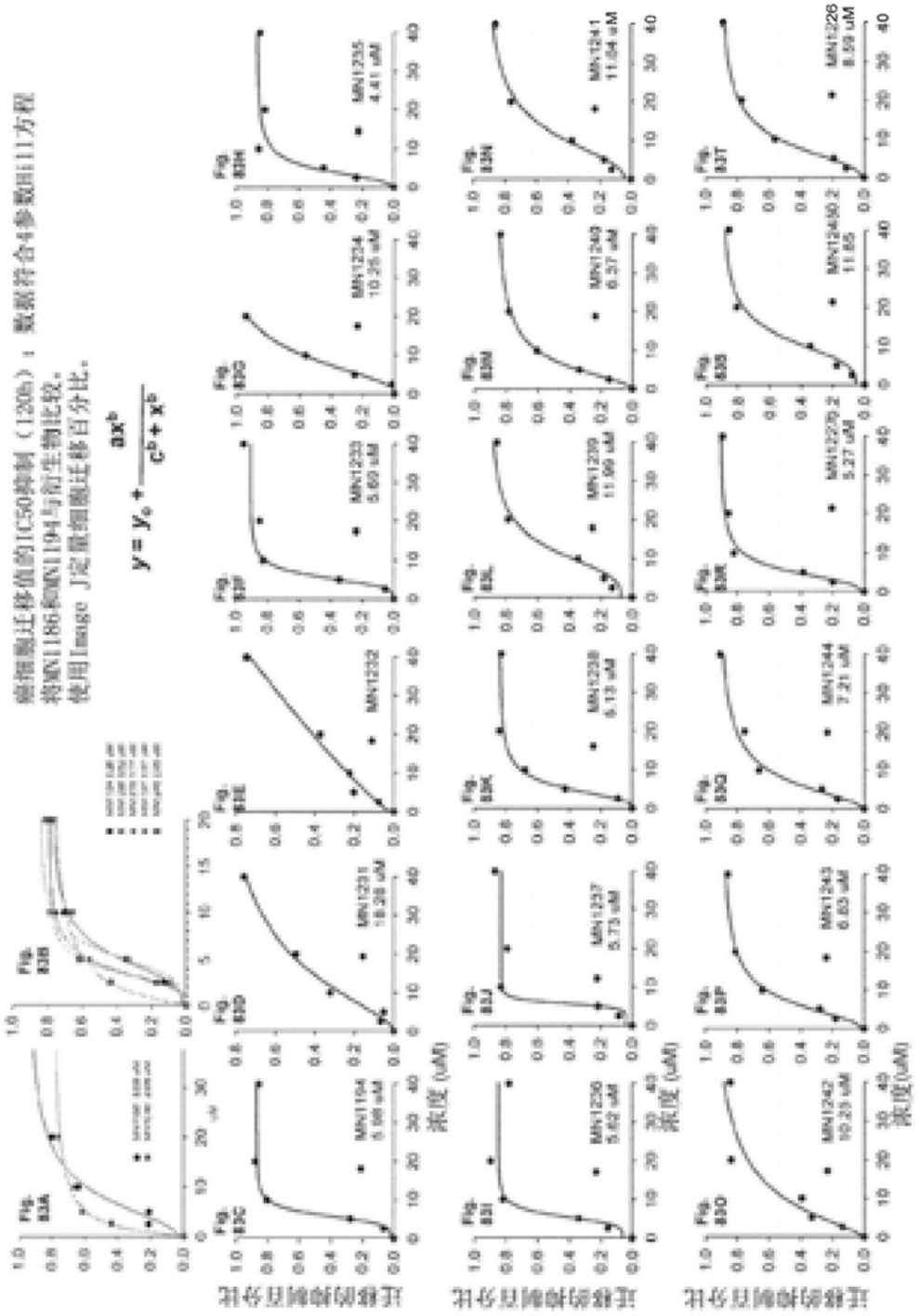

癌细胞迁移值的IC50抑制（120h）；数据符合4参数拟Hill方程
将MN1186和MN1194与衍生物比较。
使用Imago J定量细胞迁移百分比。
$y = y_0 + \frac{ax^b}{c^b + x^b}$
Fig. 83A
Fig. 83B
Fig. 83C
MN1194 5.98 uM
MN1256 5.62 uM
Fig. 83D
MN1251 18.38 uM
MN1257 5.73 uM
Fig. 83E
MN1232
MN1238 6.13 uM
Fig. 83F
MN1239 11.99 uM
Fig. 83G
MN1234 10.35 uM
MN1233 5.69 uM
Fig. 83H
MN1235 4.41 uM
MN1241 11.64 uM
Fig. 83I
MN1242 10.25 uM
MN1243 6.83 uM
Fig. 83J
MN1249 6.27 uM
Fig. 83K
MN1244 7.21 uM
Fig. 83L
MN12460.2 11.65
Fig. 83M
MN12290.2 5.27 uM
Fig. 83N
MN1226 8.59 uM
Fig. 83O
Fig. 83P
Fig. 83Q
Fig. 83R
Fig. 83S
Fig. 83T
迁移的抑制百分比
浓度 (uM)

图83

癌细胞迁移的抑制：t=0

图84 DU145

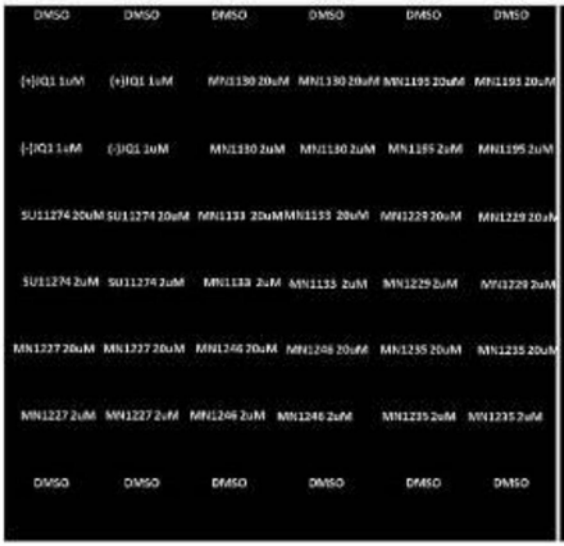
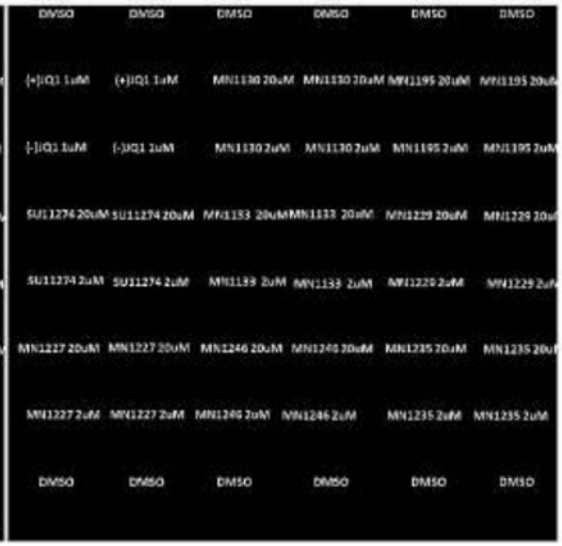


图85 SK-OV-3



癌细胞迁移的抑制：t=24小时

图86 DU145

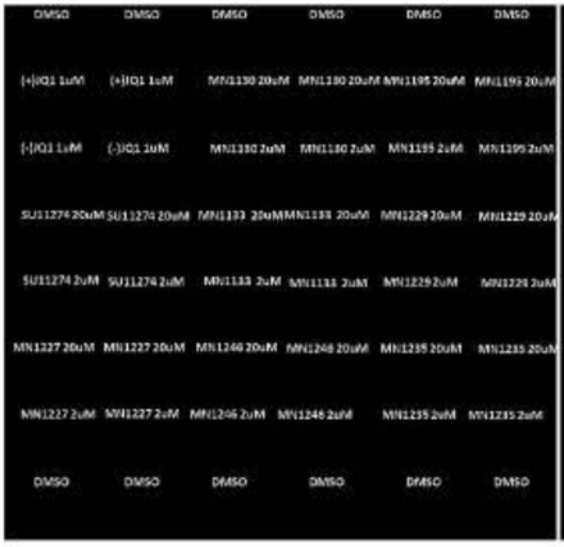


图87 SK-OV-3



癌细胞迁移的抑制：t=0

图88 A549

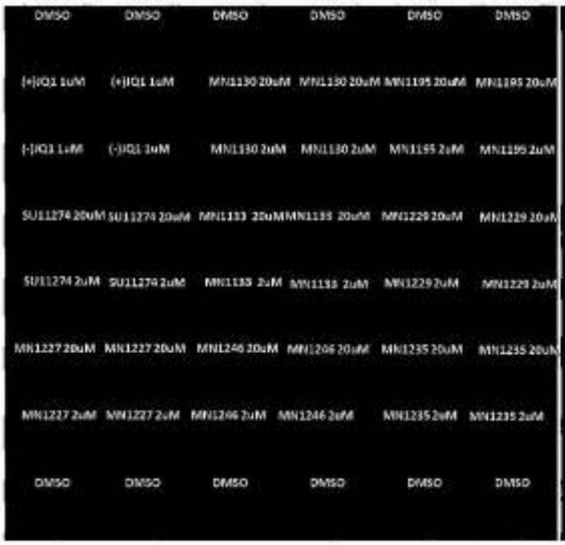
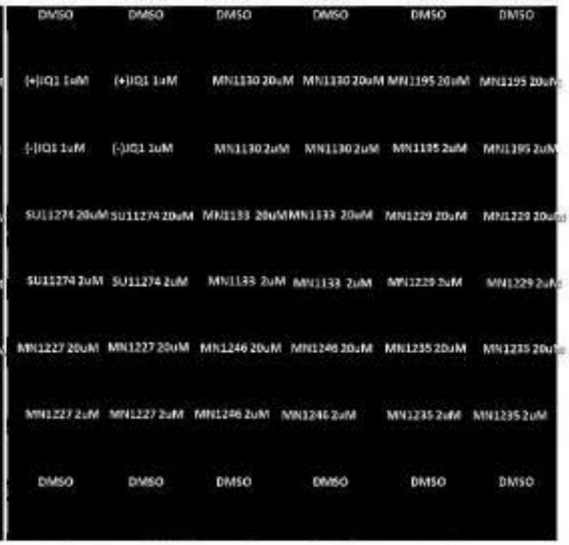


图 89 PC-3



癌细胞迁移的抑制：t=20小时

图90 A549



图91 PC-3



癌细胞迁移的抑制：t=26小时

图92 A549



图93 PC-3



癌细胞迁移的抑制：t=40小时

图94 A549

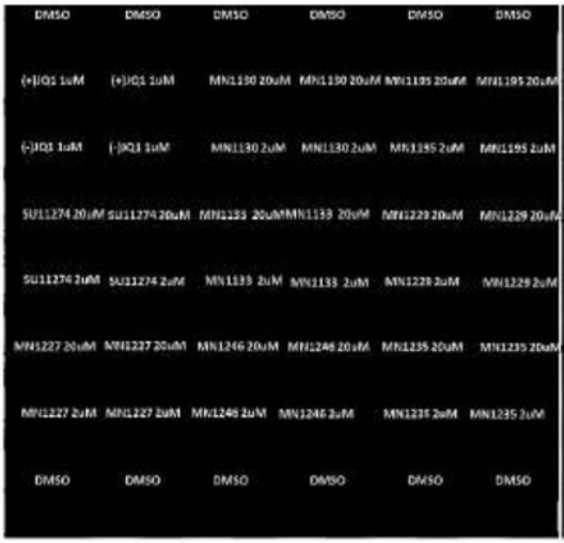


图95 PC-3



癌细胞迁移的抑制：t=0小时

图96 CHL-1



图97 OV-90



癌细胞迁移的抑制：t=40小时

图98 CHL-1



图99 OV-90



癌细胞迁移的抑制：t=72小时

图100 CHL-1



图101 OV-90



癌细胞迁移的抑制：t=0小时

图102 CAPAN-2



图103 CRL-1500 aka ZR-75-1

癌细胞迁移的抑制：t=72小时

图104 CAPAN-2

图105 CRL-1500 aka ZR-75-1



癌细胞迁移的抑制：t=120小时

CAPAN-2

CRL-1500 aka ZR-75-1

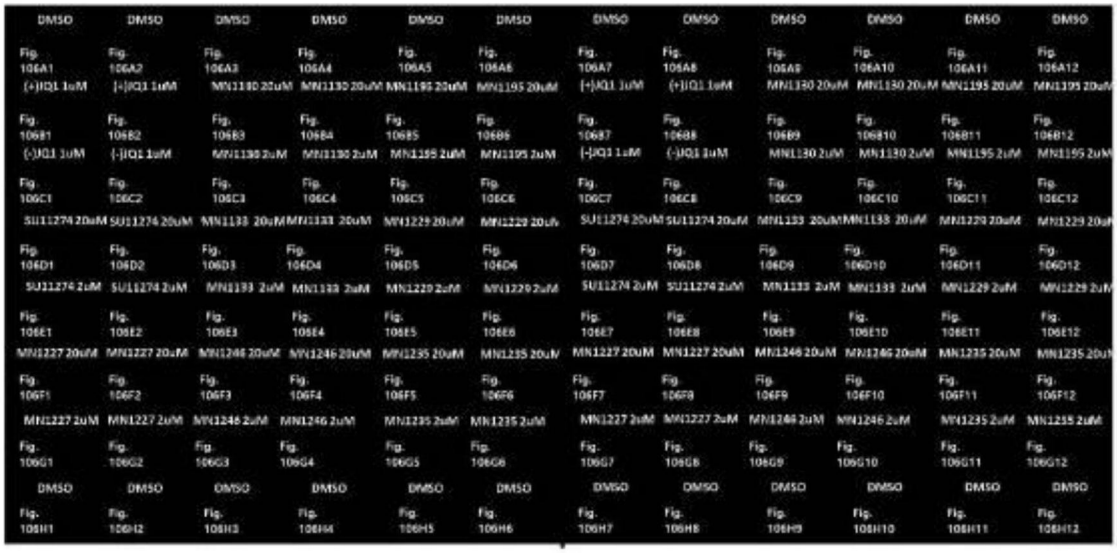
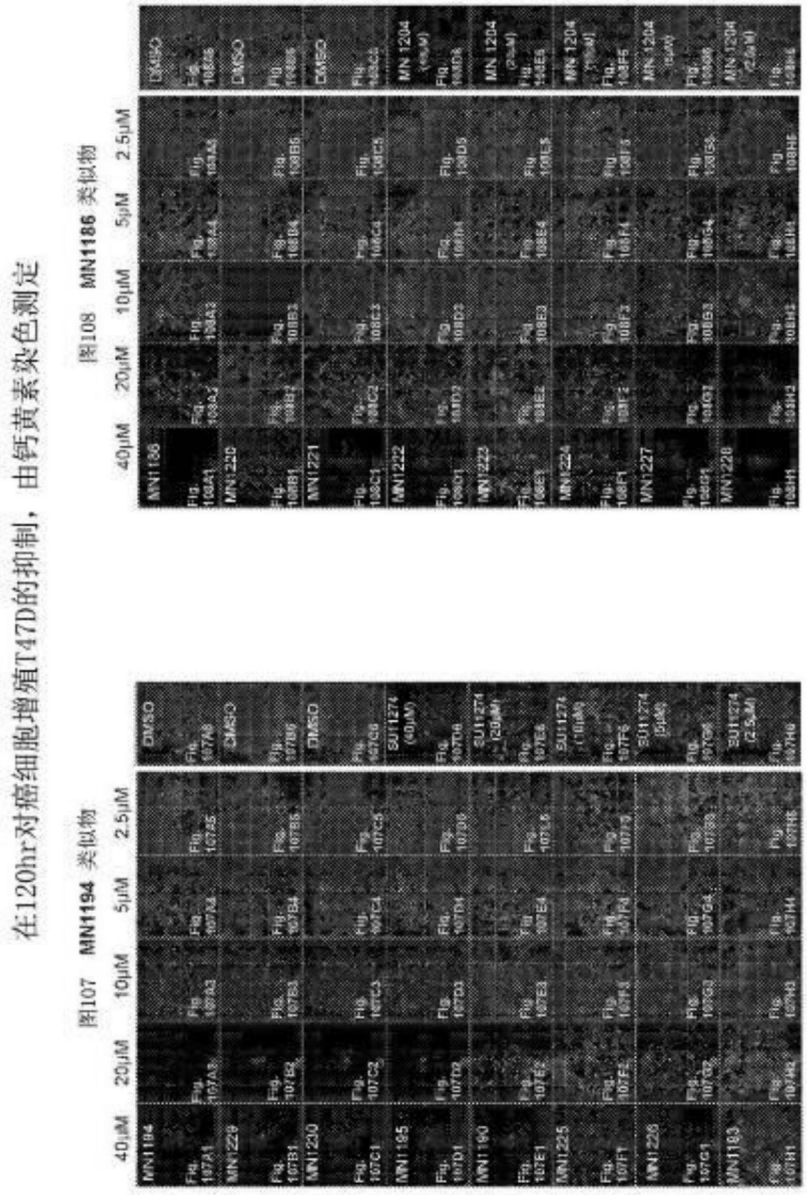
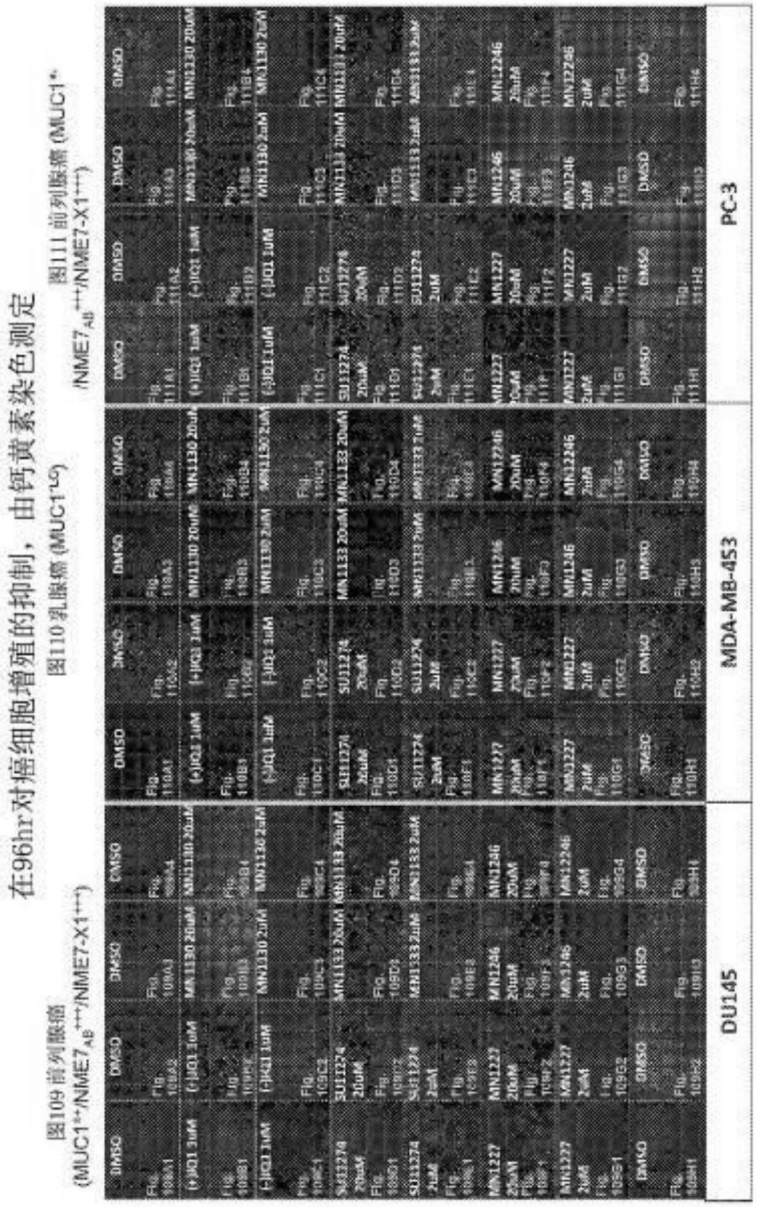
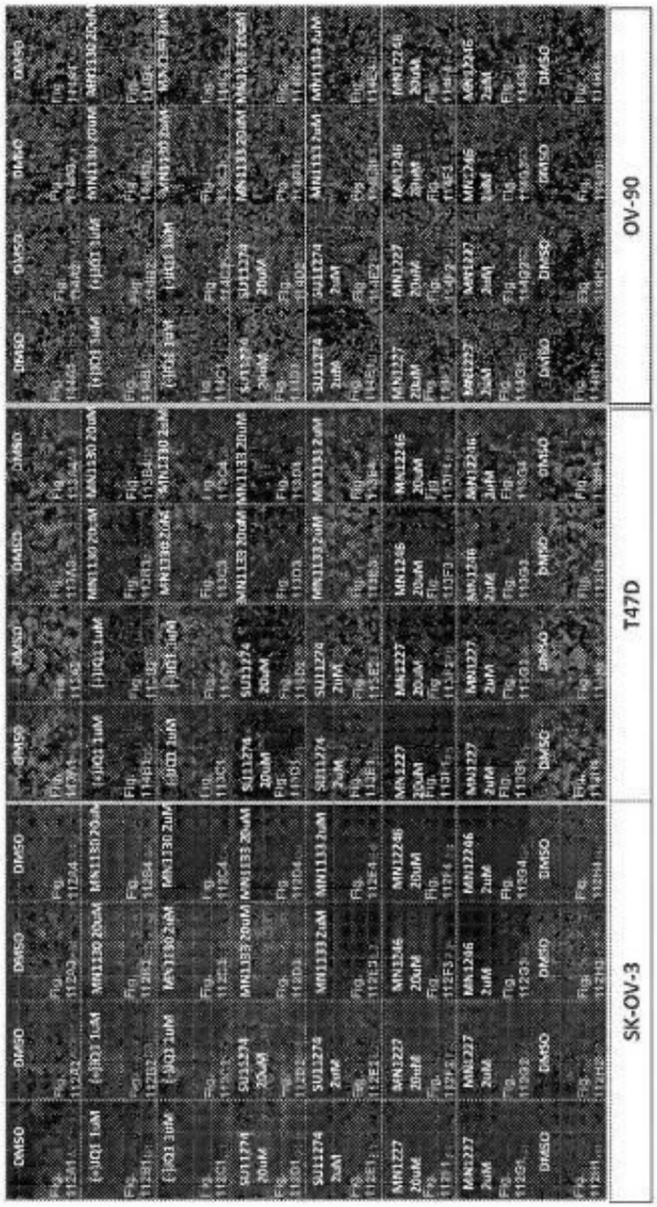


图106


在120hr对癌细胞增殖T47D的抑制，由钙黄素染色测定
图107 MN1194 类似物
图108 MN1186 类似物
40μM
20μM
10μM
5μM
2.5μM
DMSO
MN1194
MN1229
MN1230
MN1195
MN1190
MN1225
MN1226
MN1183
MN1186
MN1220
MN1221
MN1222
MN1223
MN1224
MN1227
MN1228
SU11274 (40μM)
SU11274 (20μM)
SU11274 (10μM)
SU11274 (5μM)
SU11274 (2.5μM)
MN 1204 (40μM)
MN 1204 (20μM)
MN 1204 (10μM)
MN 1204 (5μM)
MN 1204 (2.5μM)


在96hr对癌细胞增殖的抑制，由钙黄素染色测定
图109 前列腺癌
(MUC1++/NME7AB+++/NME7-X1+++)
图110 乳腺癌 (MUC1-ve)
图111 前列腺癌 (MUC1+ve/NME7AB+++/NME7-X1+++)
DU145
MDA-MB-453
PC-3


在96hr对癌细胞增殖的抑制，由钙黄素染色测定
图112 卵巢癌(MUC1*+)
图113 乳腺癌
(MUC1*****/NME7AB*****/NME7-X1*****)
图114 卵巢癌(MUC1*)
SK-OV-3
T47D
OV-90

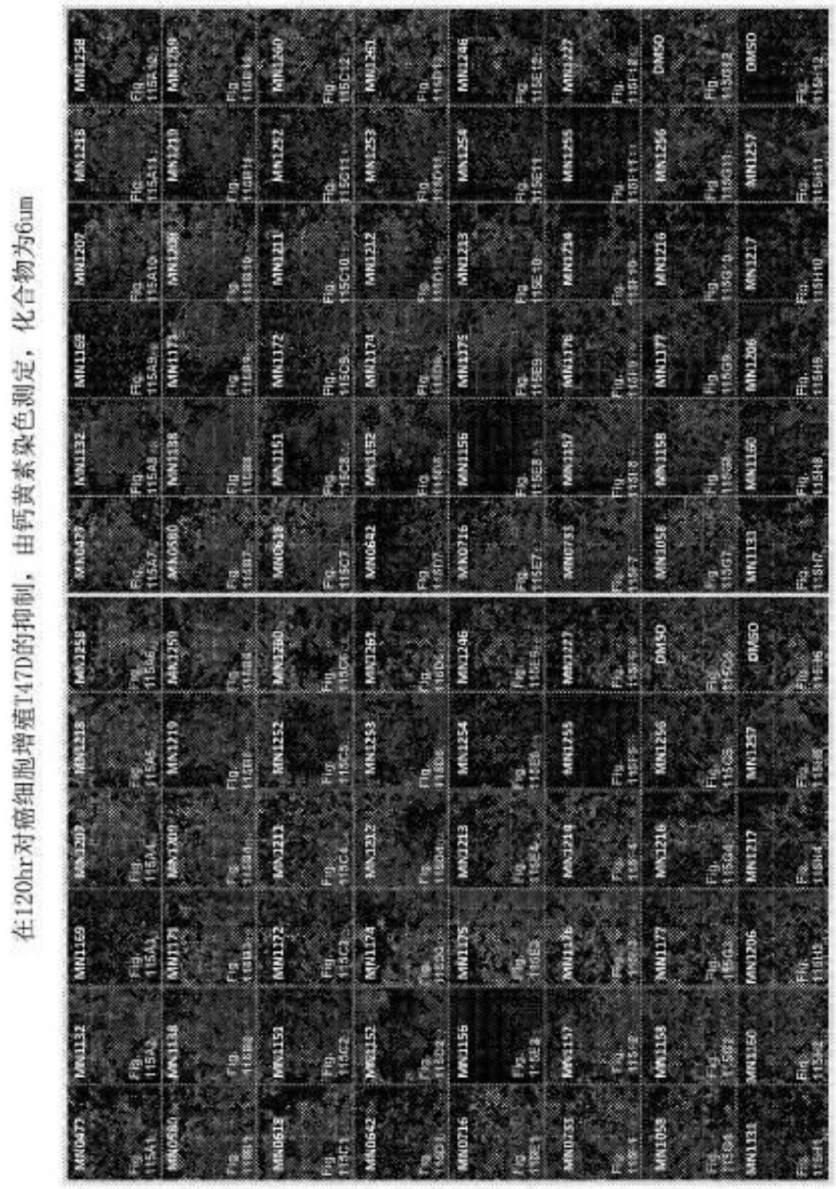

在120hr对癌细胞增殖T47D的抑制，由钙黄素染色测定，化合物为6um
MN0477
MN1132
MN1169
MN1207
MN1218
MN1253
MN0477
MN1332
MN1168
MN1207
MN1218
MN1258
MN0580
MN1138
MN1179
MN1209
MN1219
MN1259
MN0618
MN1151
MN1172
MN1211
MN1252
MN1260
MN0642
MN1152
MN1174
MN1212
MN1253
MN1261
MN0716
MN1156
MN1175
MN1213
MN1254
MN1246
MN0755
MN1157
MN1176
MN1214
MN1255
MN1247
MN1058
MN1158
MN1177
MN1216
MN1256
DMSO
MN1131
MN1160
MN1206
MN1217
MN1257
DMSO

图115

在50hr对癌细胞增殖的抑制，由钙黄素染色测定

图116 DU145 前列腺癌
(MUC1**/NME7$_{AB}$***/NME7-X1***)

图117 SK-OV-3 卵巢癌
(MUC1**)

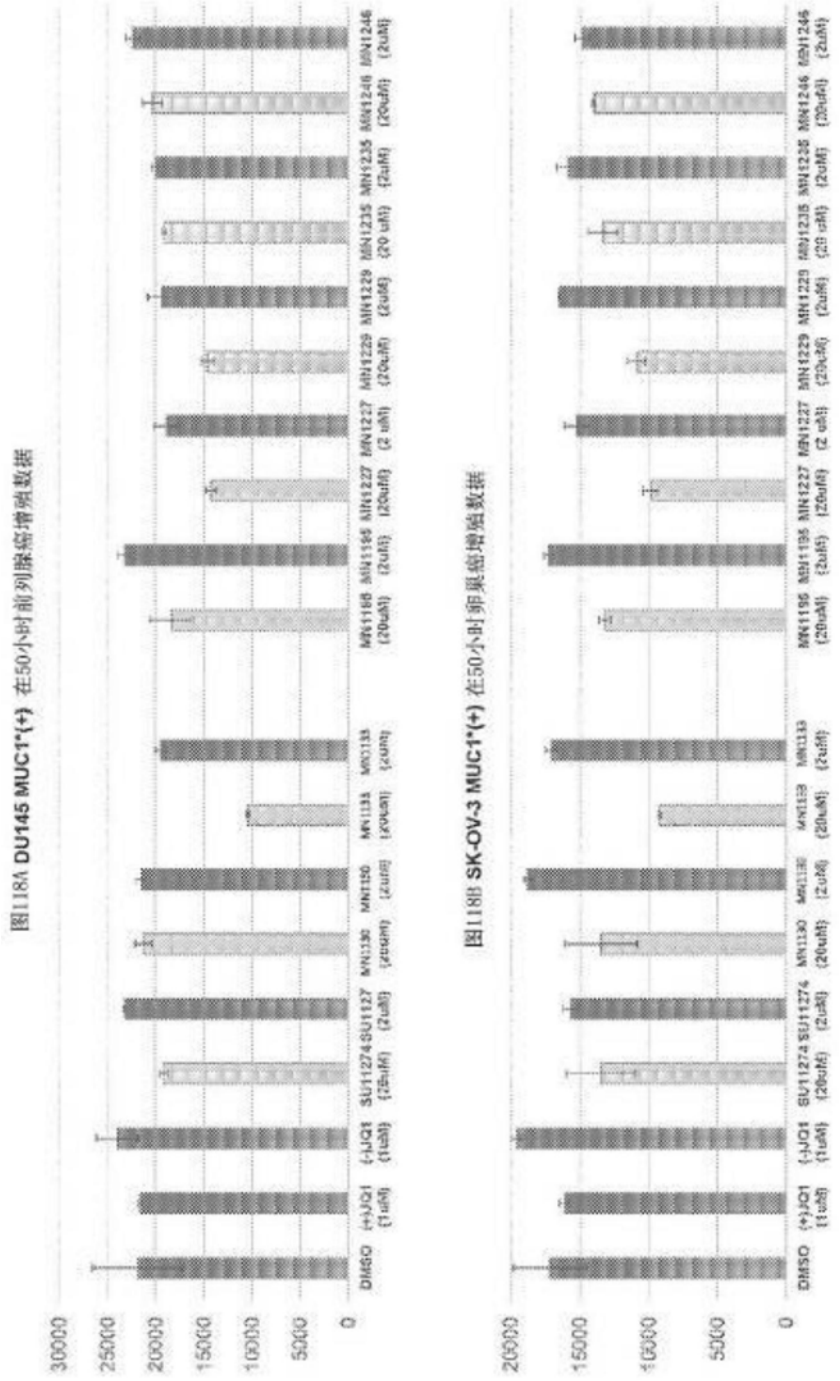
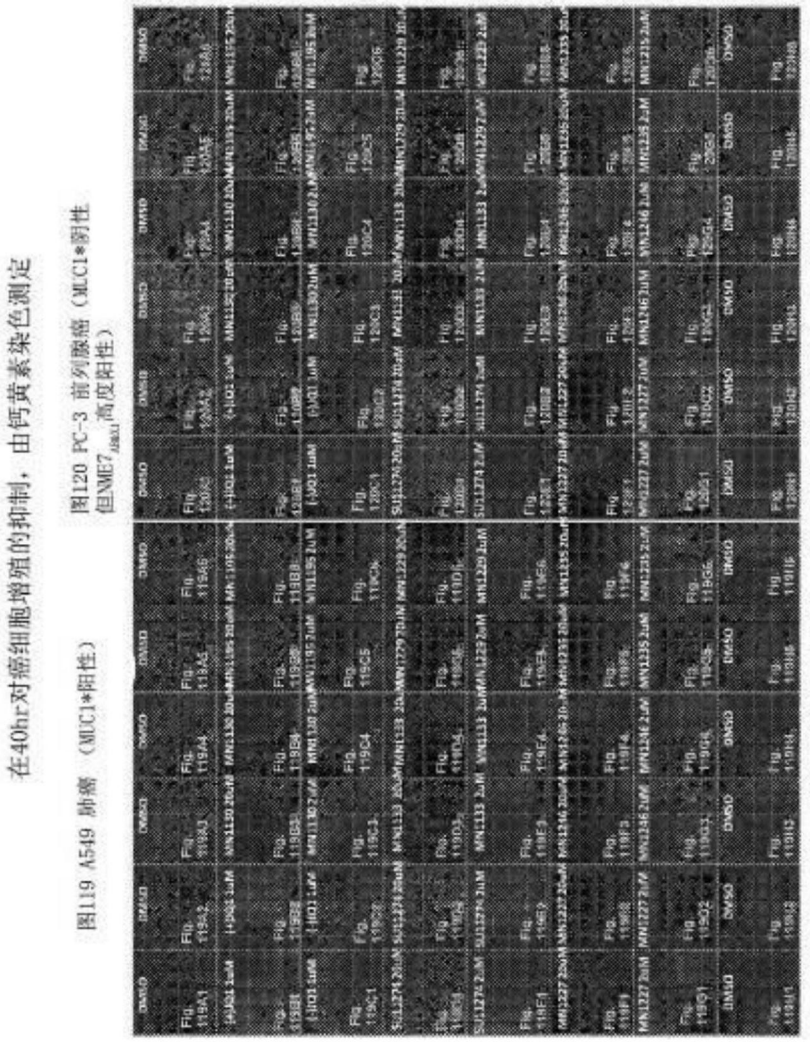

图118A DU145 MUC1*(+) 在50小时前列腺癌增殖数据
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
DMSO
(+)JQ1 (1uM)
(-)JQ1 (1uM)
SU11274 (2uM)
SU11274 (20uM)
SU1127 (2uM)
MN130 (20uM)
MN130 (2uM)
MN133 (20uM)
MN133 (2uM)
MN1195 (20uM)
MN1195 (2uM)
MN1227 (20uM)
MN1227 (2 uM)
MN1229 (20uM)
MN1229 (2uM)
MN1235 (20 uM)
MN1235 (2uM)
MN1246 (20uM)
MN1246 (2uM)
图118B SK-OV-3 MUC1*(+) 在50小时卵巢癌增殖数据
20000
15000
10000
5000
0
DMSO
(+)JQ1 (1uM)
(-)JQ1 (1uM)
SU11274 (20uM)
SU11274 (2uM)
MN130 (20uM)
MN130 (2uM)
MN133 (20uM)
MN133 (2uM)
MN1195 (20uM)
MN1195 (2uM)
MN1227 (20uM)
MN1227 (2 uM)
MN1229 (20uM)
MN1229 (2uM)
MN1235 (20 uM)
MN1235 (2uM)
MN1246 (20uM)
MN1246 (2uM)

图118


在40hr对癌细胞增殖的抑制，由钙黄素染色测定
图119 A549 肺癌 (MUC1*阳性)
图120 PC-3 前列腺癌（MUC1*弱性 但NME7AA1高度阳性）

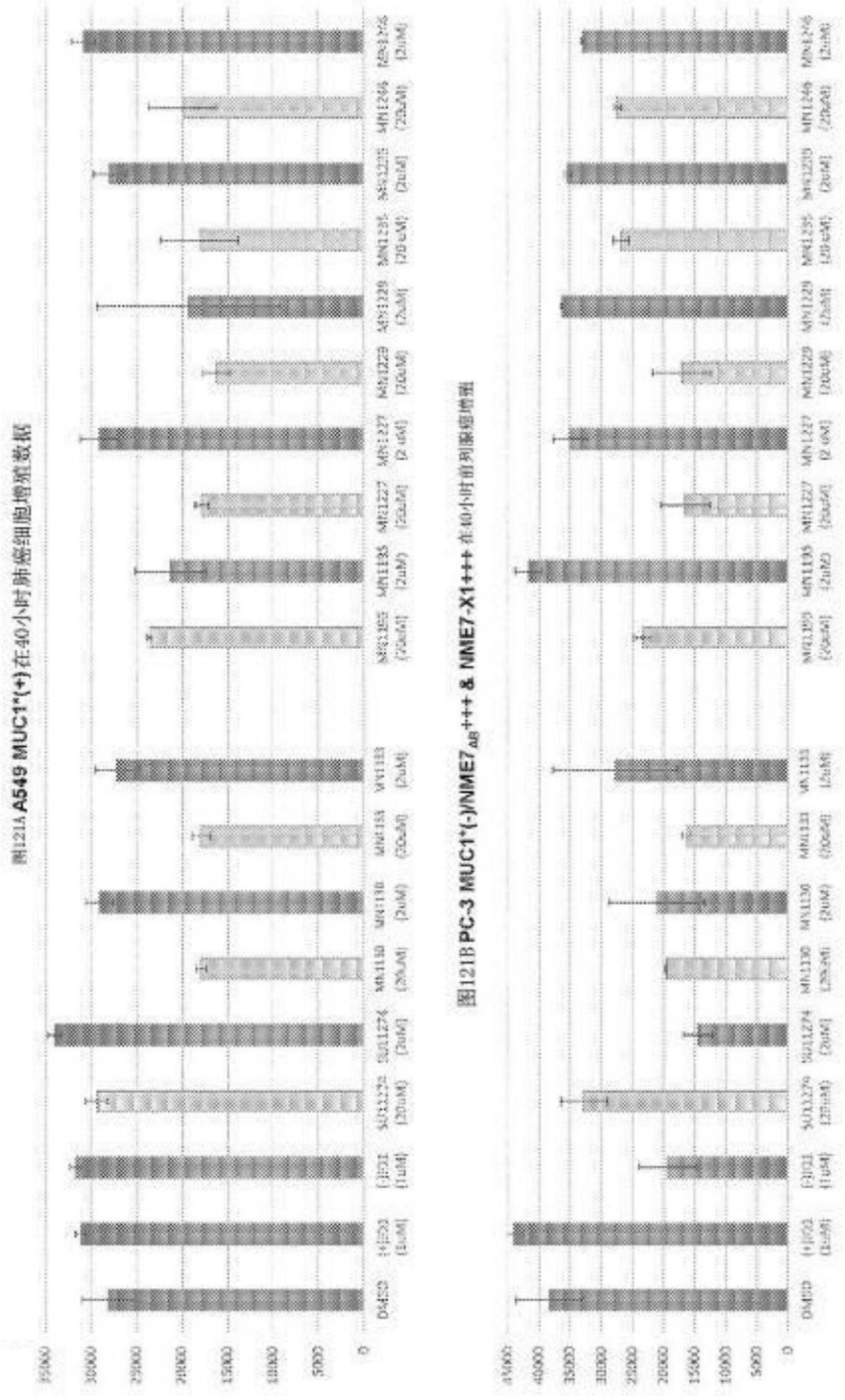

图121A A549 MUC1*(+)在40小时肿瘤细胞增殖数据
图121B PC-3 MUC1*(-)/NME7 AB+++ & NME7-X1+++ 在40小时的细胞增殖

图121

在120hr对癌细胞增殖的抑制，由钙黄素染色测定

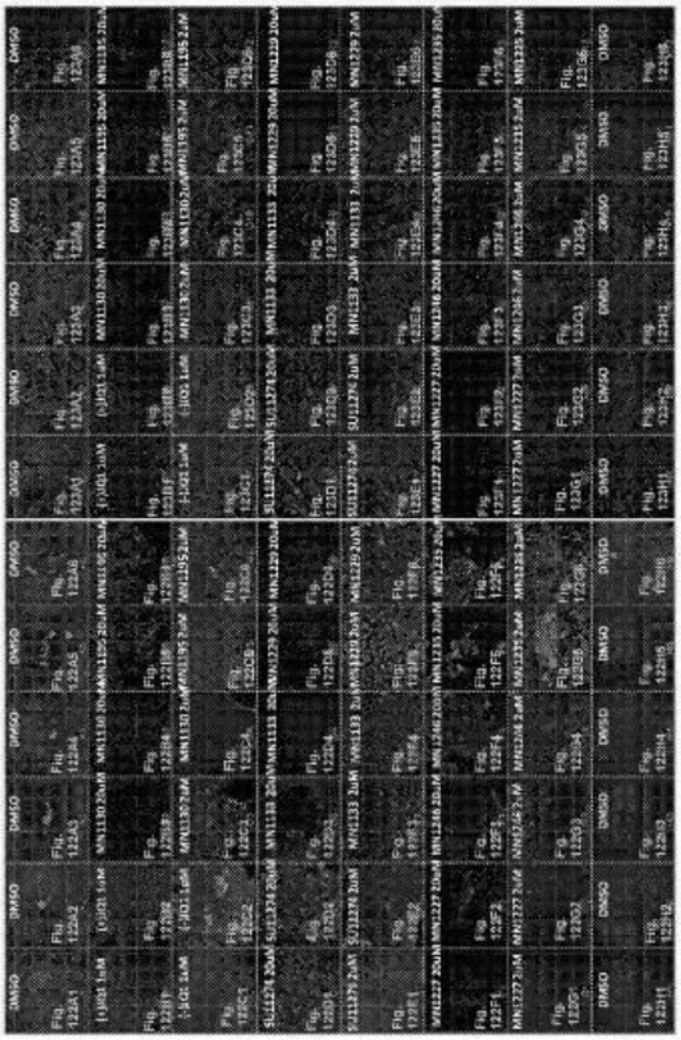


图122 CHL-1 黑色素瘤 (MUC1$^{+/+}$/NME7$_{AD\ 8-X1}$ $^{+/+}$)

图123 CV-90 卵巢癌 (MUC1$^{+/+}$)

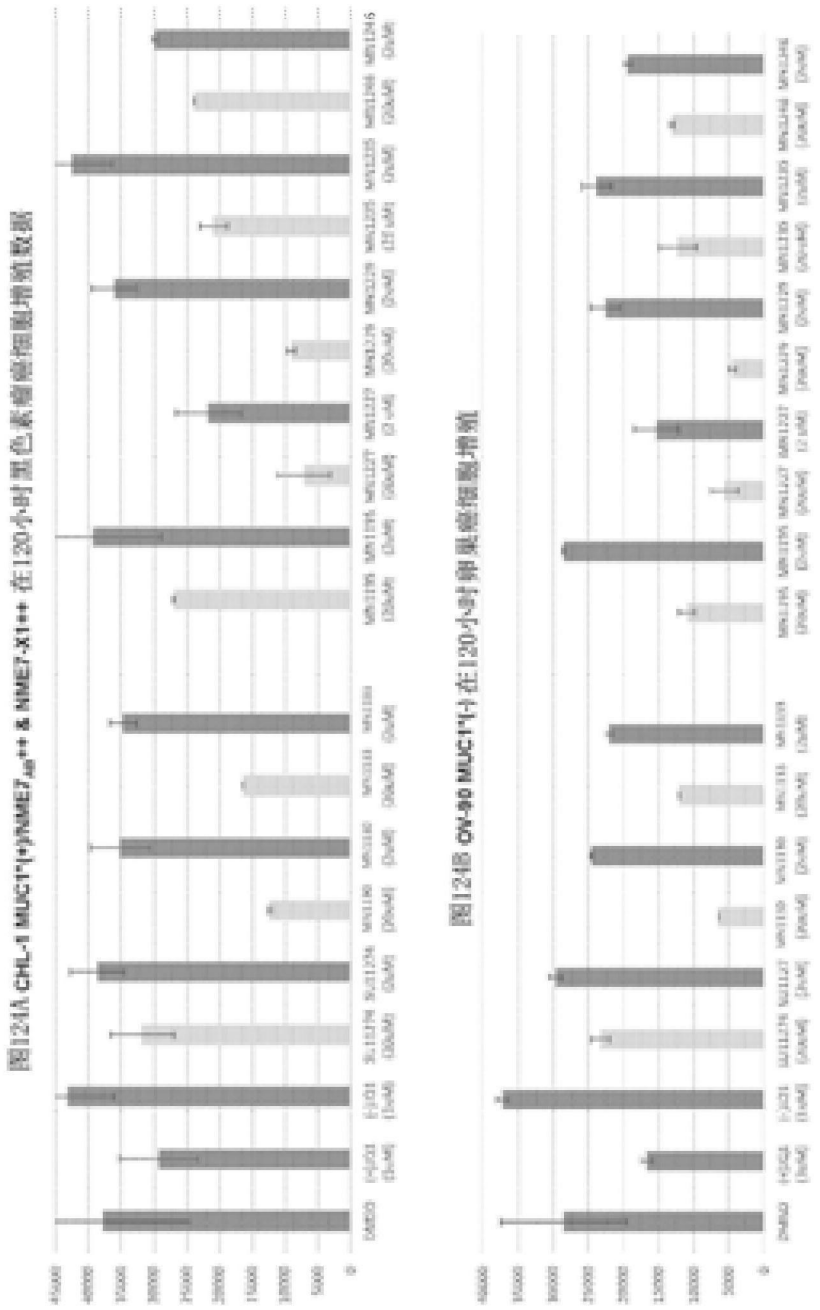

图121A CHL-1 MUC1*(+)/NME7AB++ & NME7-X1++ 在120小时黑色素瘤细胞增殖数据
图124B OV-90 MUC1*(+)在120小时单独细胞增殖

图124

在120hr对癌细胞增殖的抑制，由钙黄素染色测定

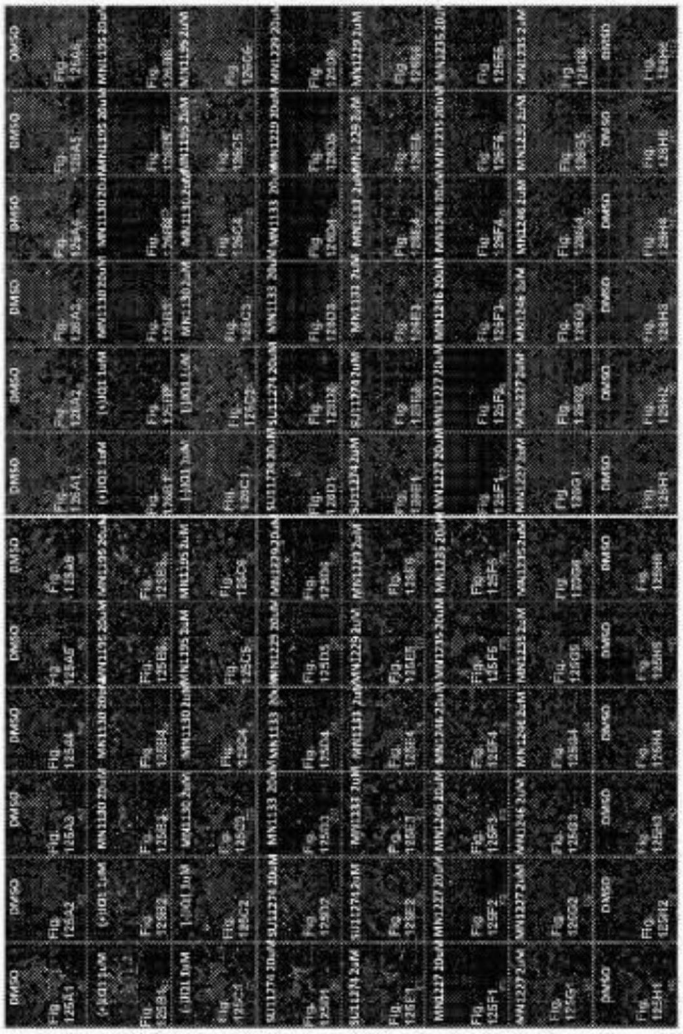


图125 CAPAN-2 胰腺癌 (MUC1⁺⁺)

图126 1500aka ZR-75-1 胰腺癌 (MUC1⁺⁺)

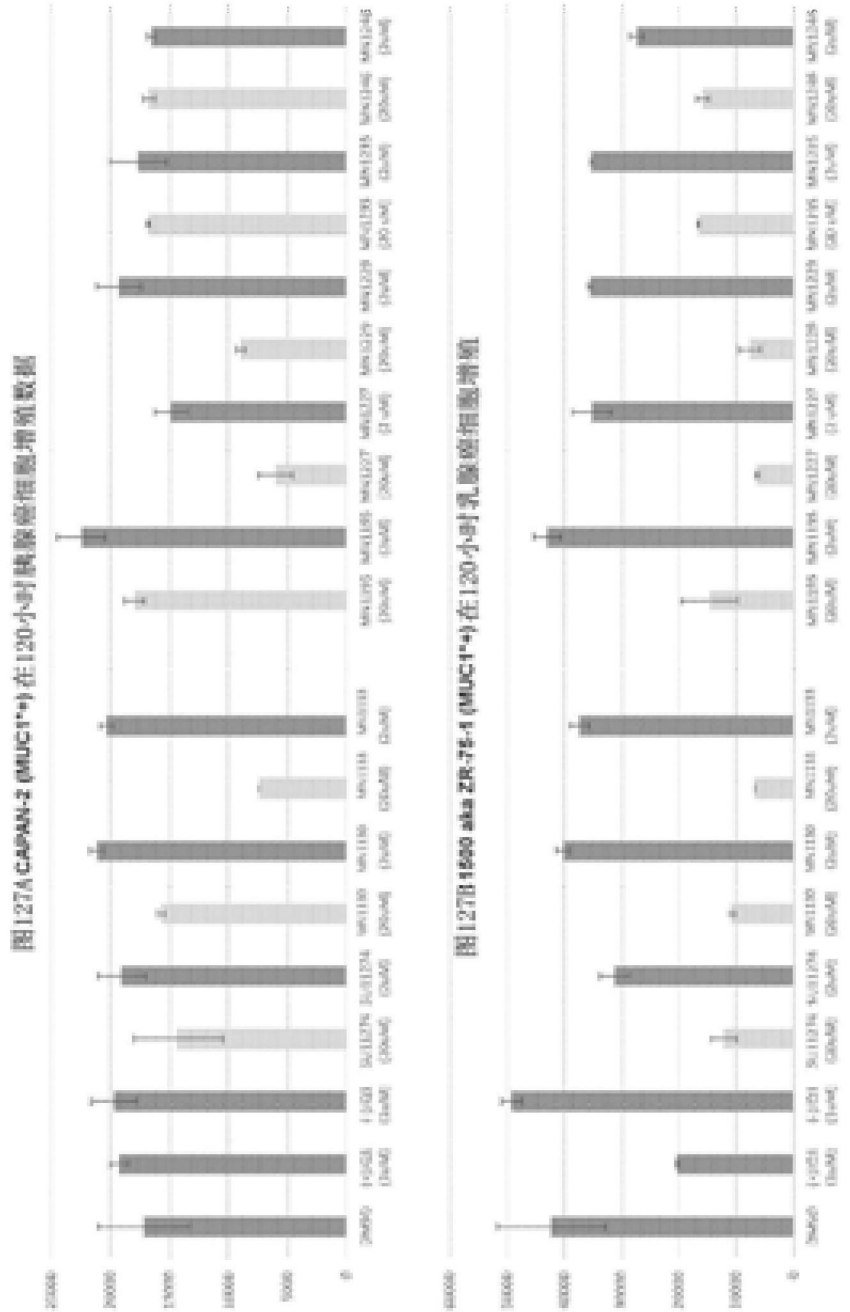

图127A CAPAN-2 (MUC1*+)在120小时乳腺癌细胞增殖数据
图127B 1599 aka ZR-75-1 (MUC1*+)在120小时乳腺癌细胞增殖

图127

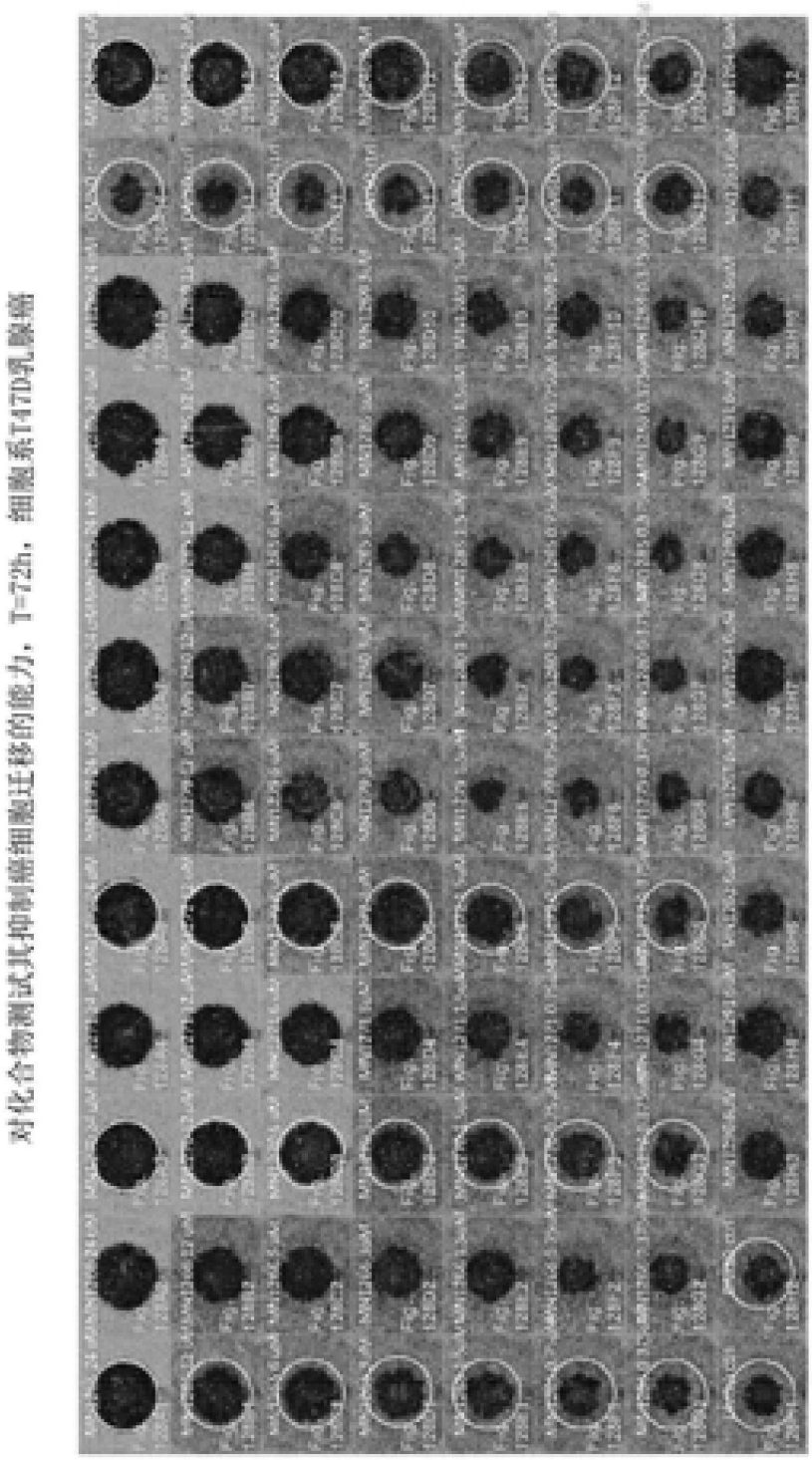


图128

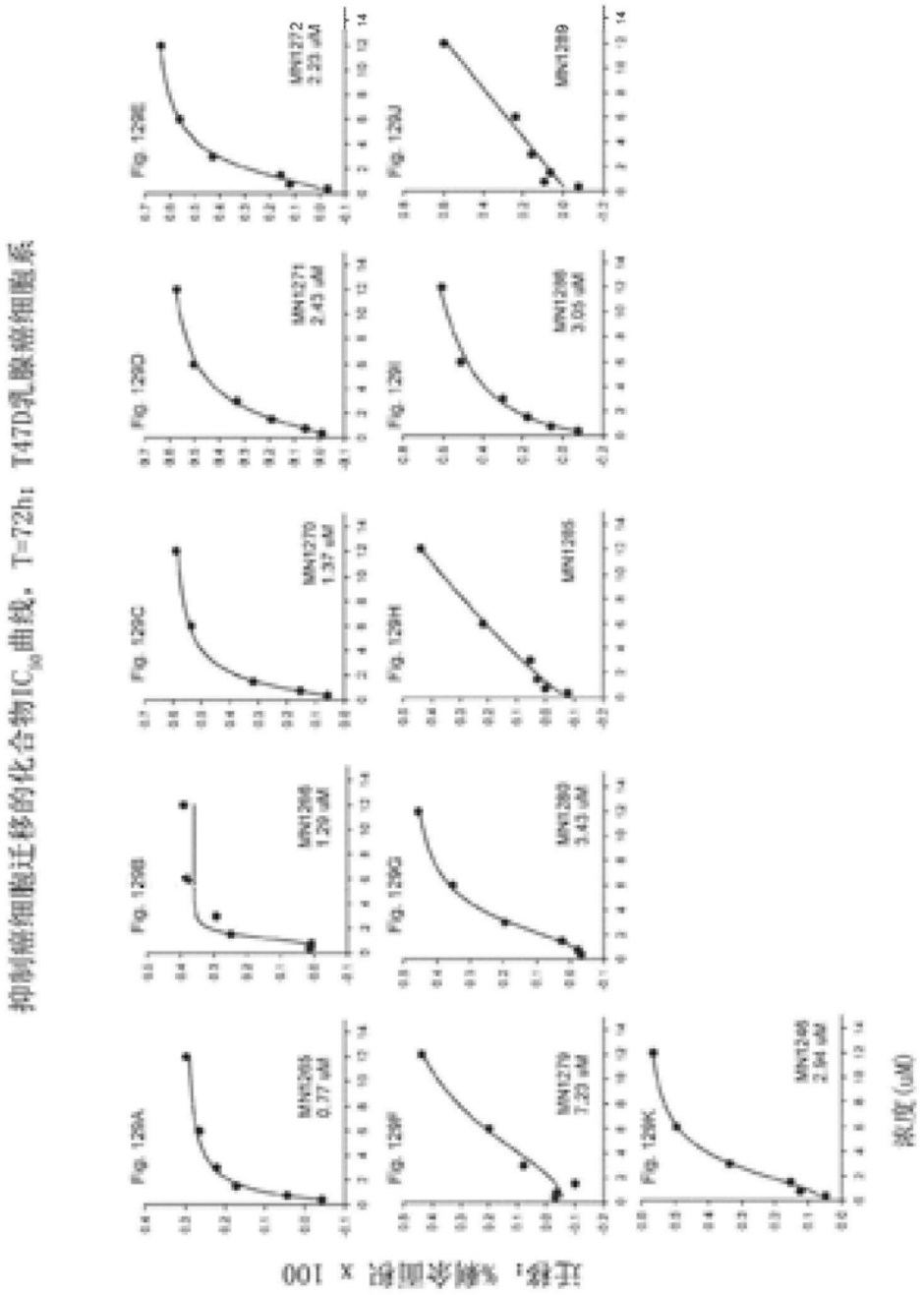

抑制癌细胞迁移的化合物IC50曲线，T=72h；T47D乳腺癌细胞系
迁移，%剩余面积 x 100
浓度(uM)
Fig. 129A
MN1265
0.77 uM
Fig. 129B
MN1268
1.29 uM
Fig. 129C
MN1270
1.37 uM
Fig. 129D
MN1271
2.43 uM
Fig. 129E
MN1272
2.33 uM
Fig. 129F
MN1279
7.23 uM
Fig. 129G
MN1280
3.43 uM
Fig. 129H
MN1285
Fig. 129I
MN1286
3.05 uM
Fig. 129J
MN1289
Fig. 129K
MN1346
2.94 uM

图129

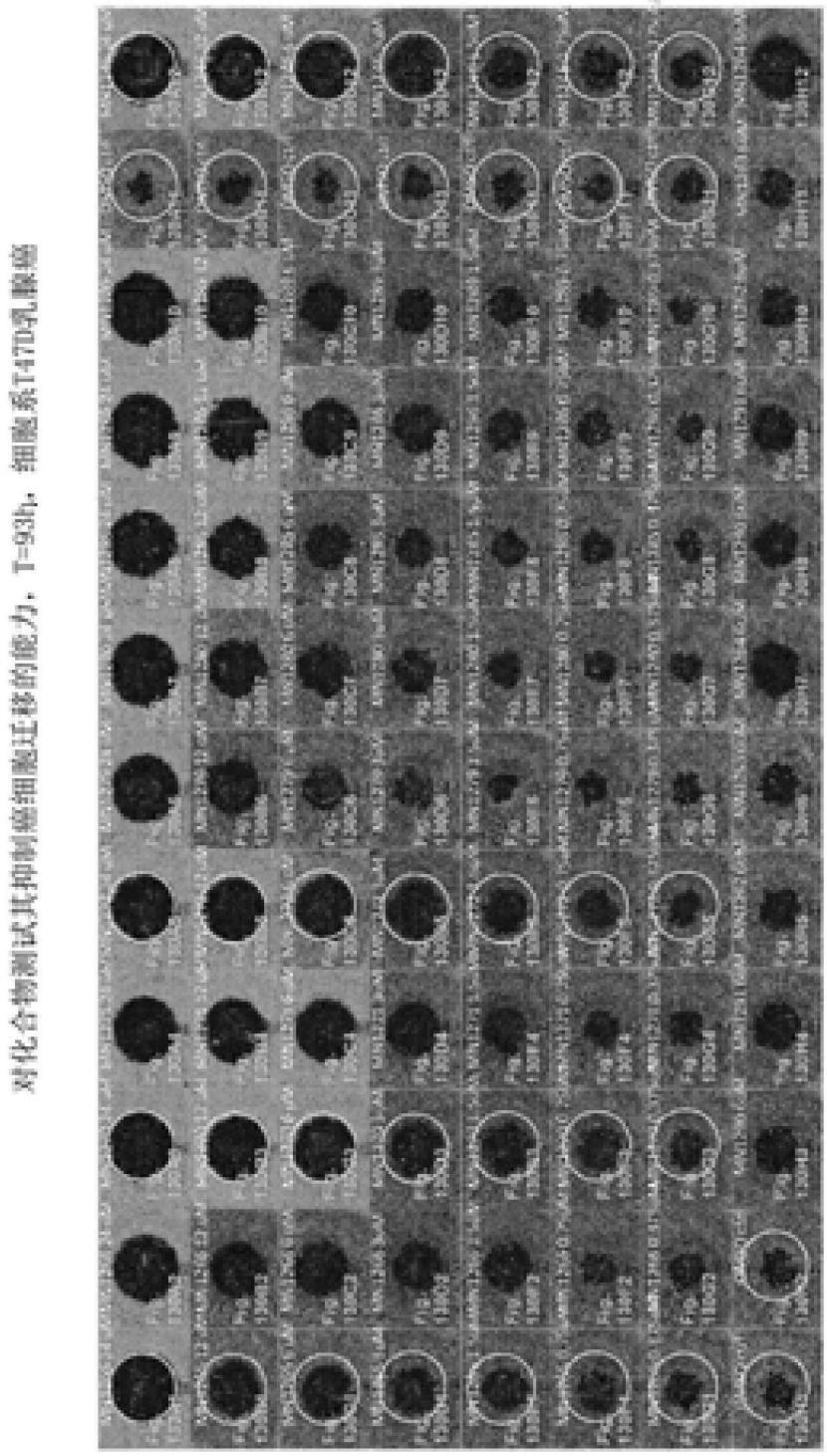


图130

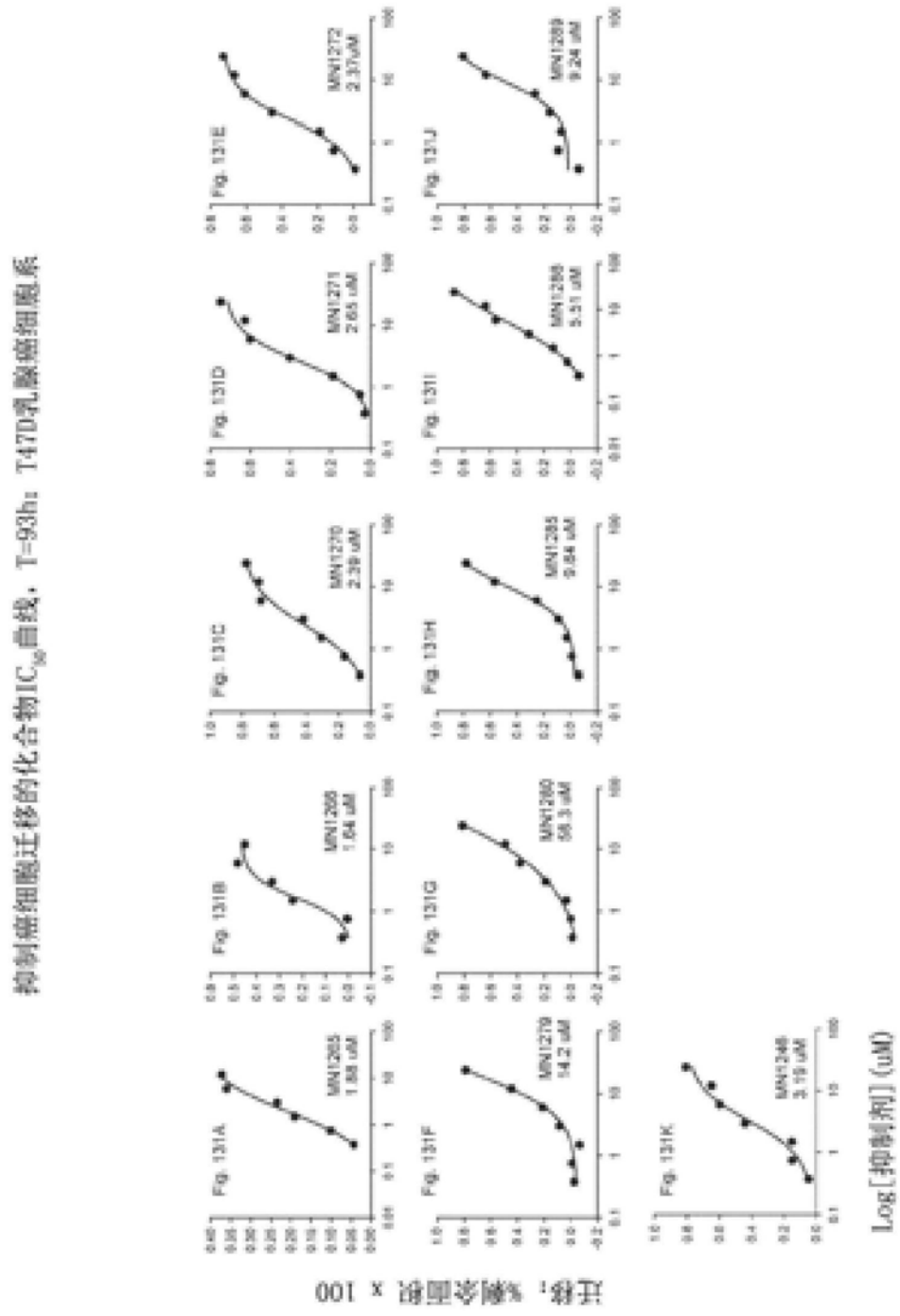

抑制癌细胞迁移的化合物IC50曲线，T=93h：T47D乳腺癌细胞系
迁移：%剩余面积 x 100
Log[抑制剂] (uM)
Fig. 131A
MN1265
1.88 uM
Fig. 131B
MN1269
1.64 uM
Fig. 131C
MN1270
2.39 uM
Fig. 131D
MN1271
2.65 uM
Fig. 131E
MN1272
2.37uM
Fig. 131F
MN1279
14.2 uM
Fig. 131G
MN1280
58.3 uM
Fig. 131H
MN1285
9.84 uM
Fig. 131I
MN1288
5.51 uM
Fig. 131J
MN1289
9.24 uM
Fig. 131K
MN1348
3.19 uM

图131

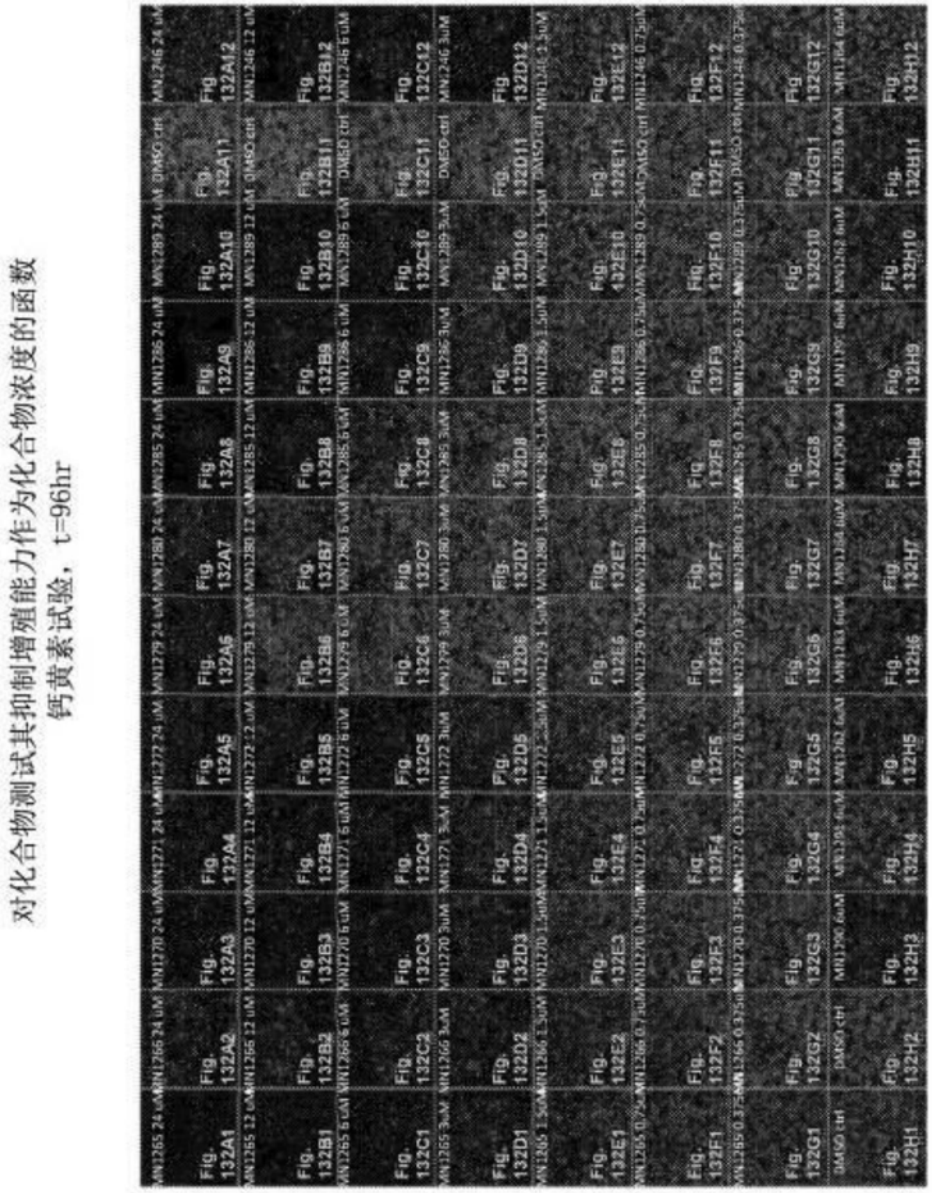


图132

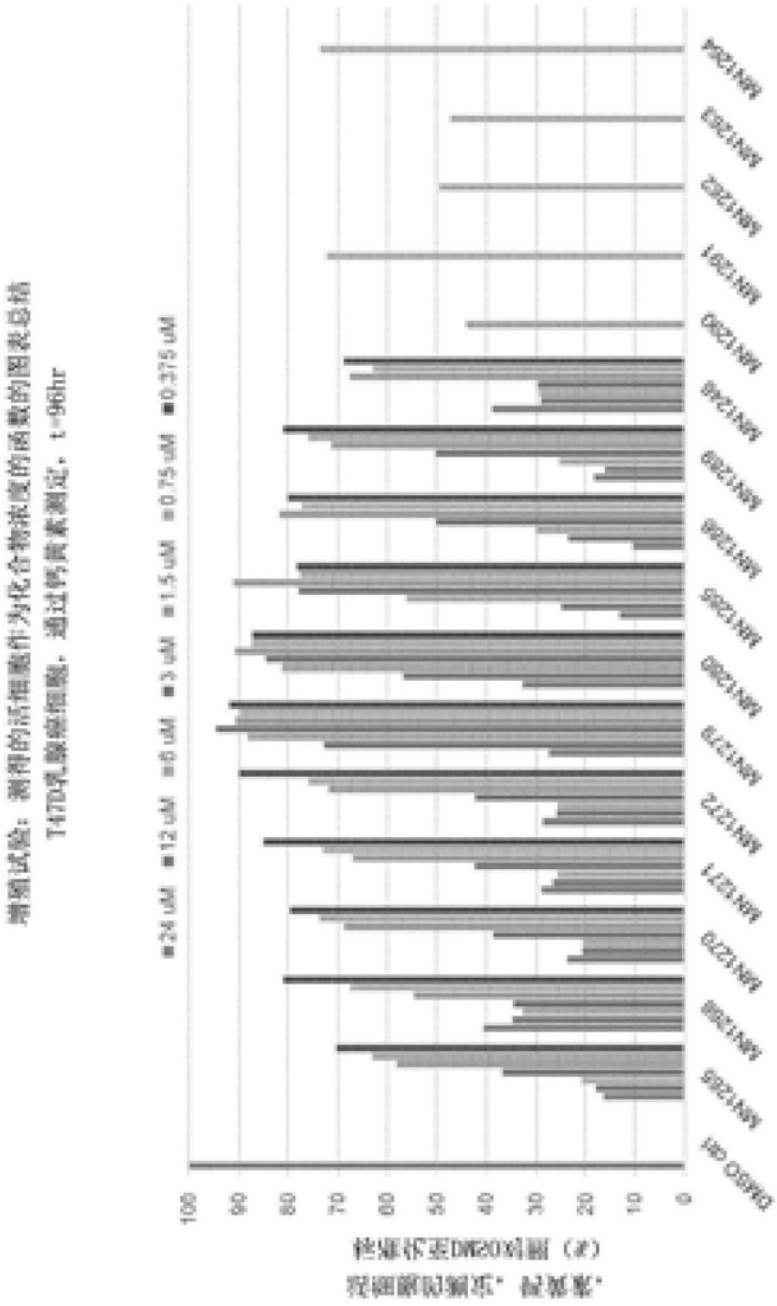

增殖试验：测得的活细胞作为化合物浓度的函数的图表总结
T47D乳腺癌细胞，通过钙黄素测定，t=96hr
■24 uM ■12 uM ■6 uM ■3 uM ■1.5 uM ■0.75 uM ■0.375 uM
落射荧光，活细胞细胞总
(#) 细胞(CZMD至分析法
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
DMSO Ctrl
MN1265
MN1268
MN1271
MN1272
MN1273
MN1280
MN1281
MN1282
MN1283
MN1284
MN1285
MN1286
MN1287
MN1288
MN1289
MN1290
MN1291
MN1292
MN1293
MN1294

图133

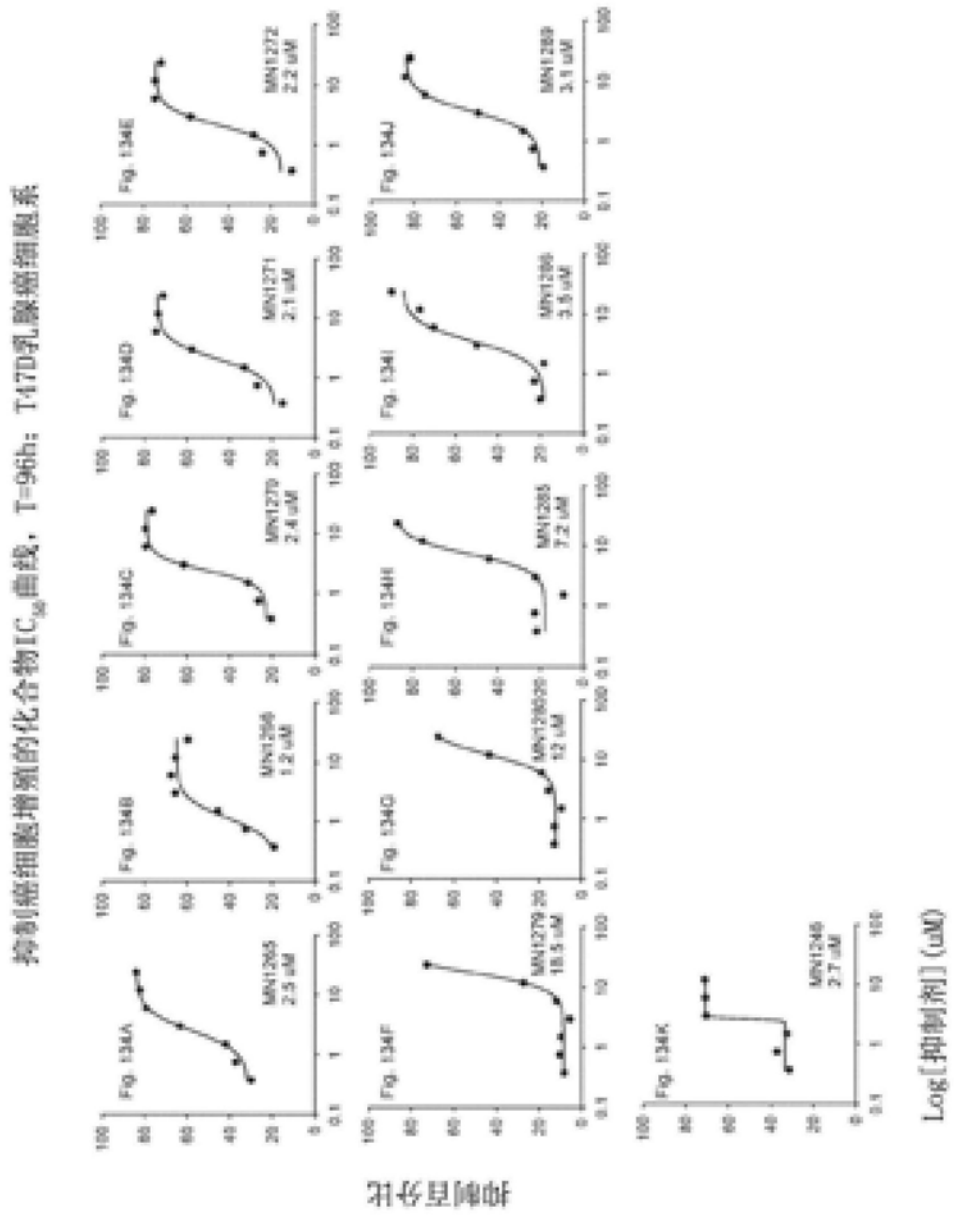

抑制增殖细胞的化合物IC50曲线，T=96h；T47D乳腺癌细胞系
抑制百分比
Log[抑制剂] (uM)
Fig. 134A
MN1265
2.5 uM
Fig. 134B
MN1266
1.2 uM
Fig. 134C
MN1270
2.4 uM
Fig. 134D
MN1271
2.1 uM
Fig. 134E
MN1272
2.2 uM
Fig. 134F
MN1279
18.5 uM
Fig. 134G
MN1280/81
1.2 uM
Fig. 134H
MN1283
7.2 uM
Fig. 134I
MN1288
3.5 uM
Fig. 134J
MN1289
3.1 uM
Fig. 134K
MN1246
2.7 uM

图134

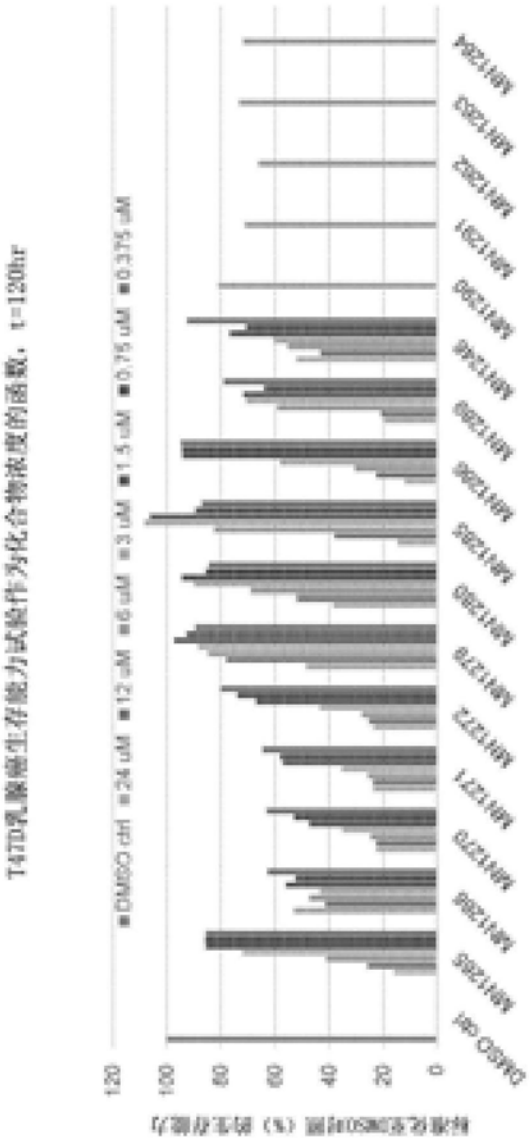
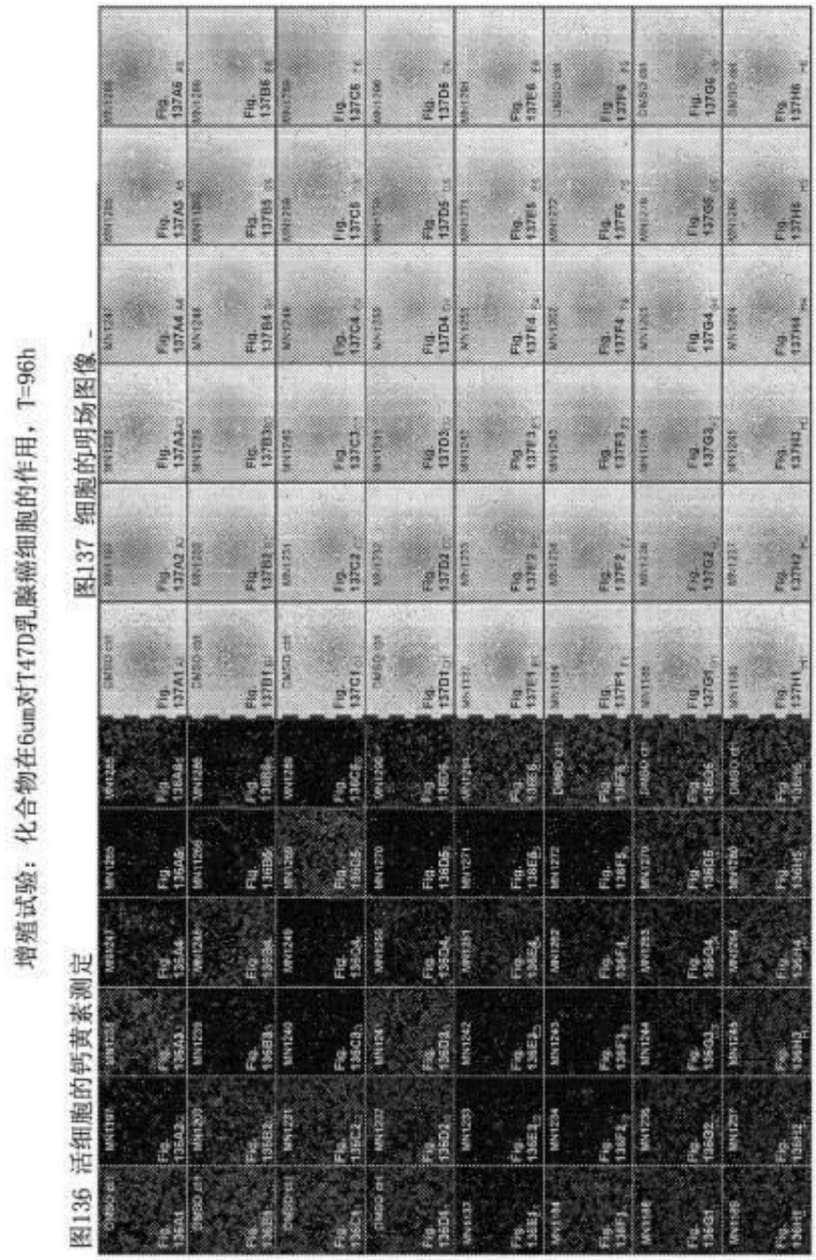

T47D乳腺癌生存能力试验作为化合物浓度的函数，t=120hr
DMSO ctrl 24 uM 12 uM 6 uM 3 uM 1.5 uM 0.75 uM 0.375 uM
相对化至DMSO对照（%）的生存能力
120
100
80
60
40
20
0

图135


增殖试验：化合物在6um对T47D乳腺癌细胞的作用，T=96h
图136 活细胞的钙黄素测定
图137 细胞的明场图像

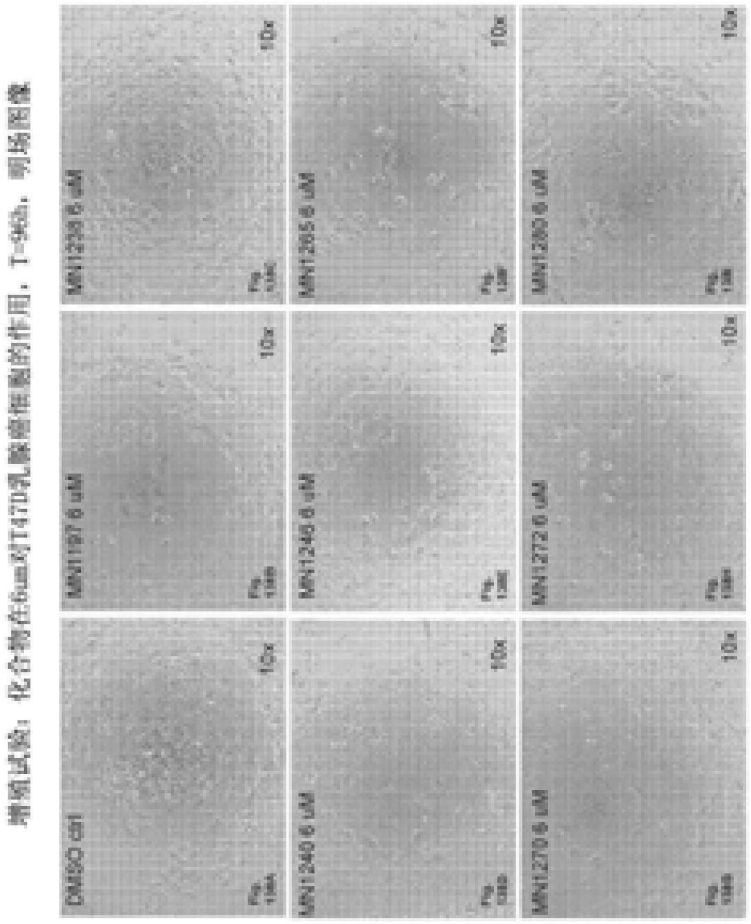

增殖试验：化合物在6um的T47D乳腺癌细胞的作用，T=96h，明场图像
DMSO ctrl
MN1240 6 uM
MN1197 6 uM
MN1246 6 uM
MN1272 6 uM
MN1270 6 uM
MN1238 6 uM
MN1265 6 uM
MN1269 6 uM
10x

图138

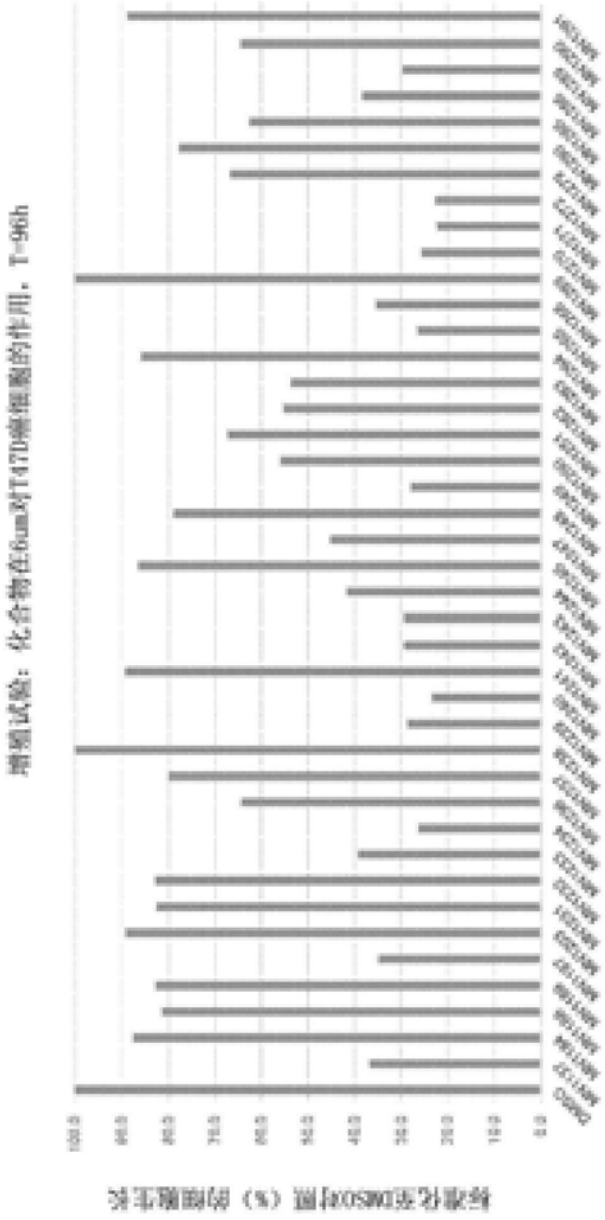


图139

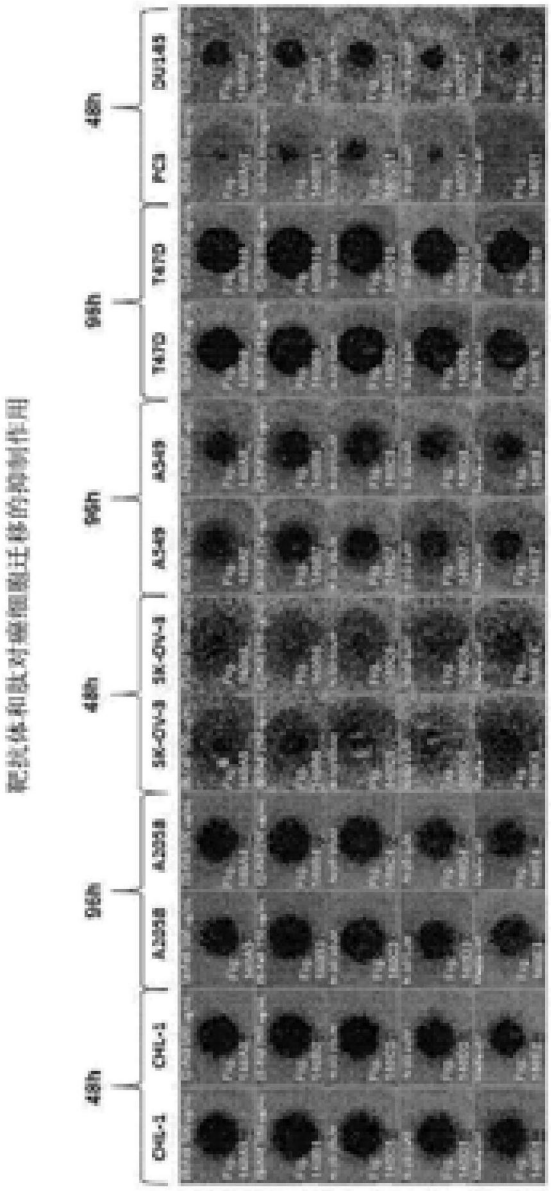

靶抗体和肽对癌细胞迁移的抑制作用
48h
96h
48h
96h
48h
96h
CHL-1
CHL-1
A2058
A2058
SK-OV-3
SK-OV-3
A549
A549
T47D
T47D
PC3
DU145

图140

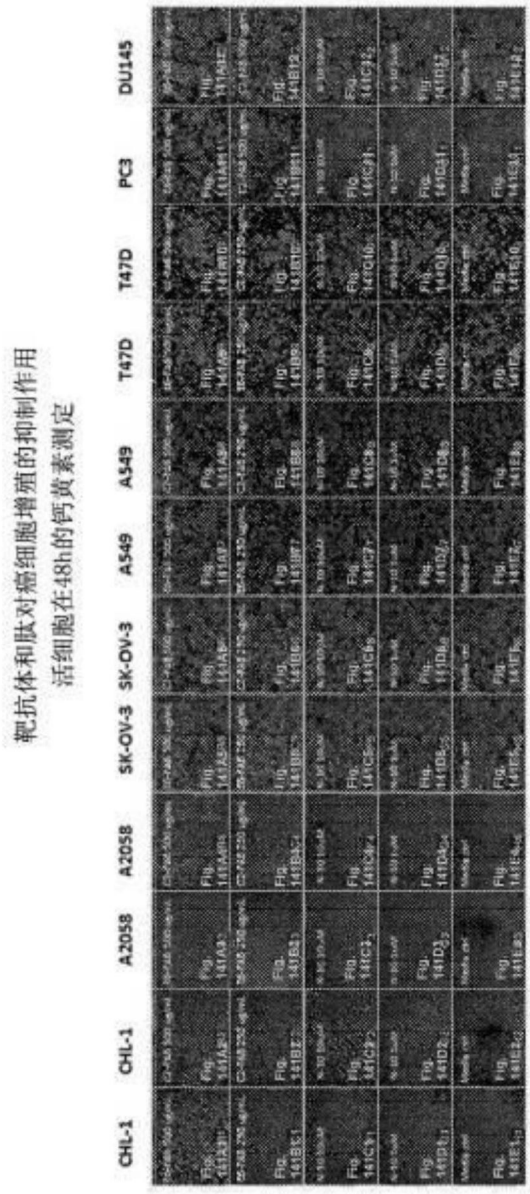

靶抗体和肽对癌细胞增殖的抑制作用
活细胞在48h的钙黄素测定
CHL-1
CHL-1
A2058
A2058
SK-OV-3
SK-OV-3
A549
A549
T47D
T47D
PC3
DU145

图141

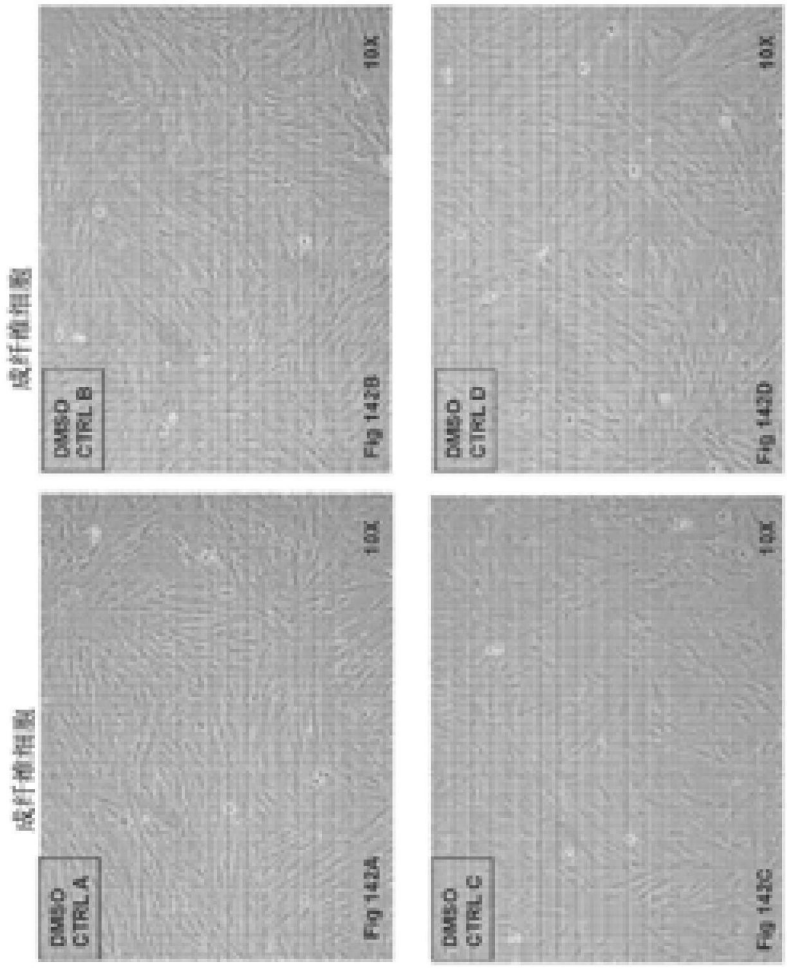

成纤维细胞
DMSO CTRL A
10X
Fig 142A
DMSO CTRL B
10X
Fig 142B
DMSO CTRL C
10X
Fig 142C
DMSO CTRL D
10X
Fig 142D

图142

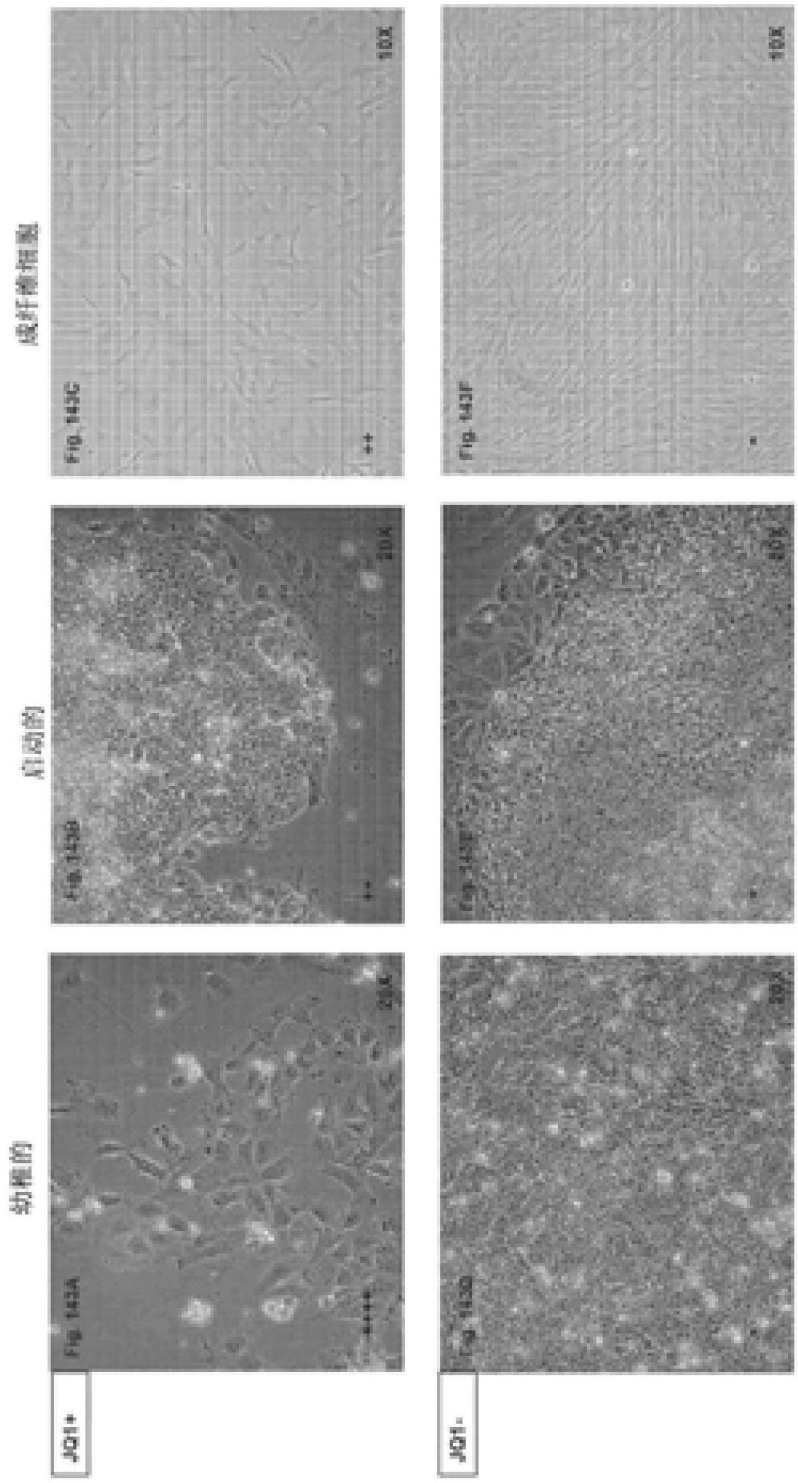

JQ1+
JQ1-
幼稚的
启动的
成纤维细胞
Fig. 143A
Fig. 143B
Fig. 143C
Fig. 143F
++++
++
+
20X
10X

图143

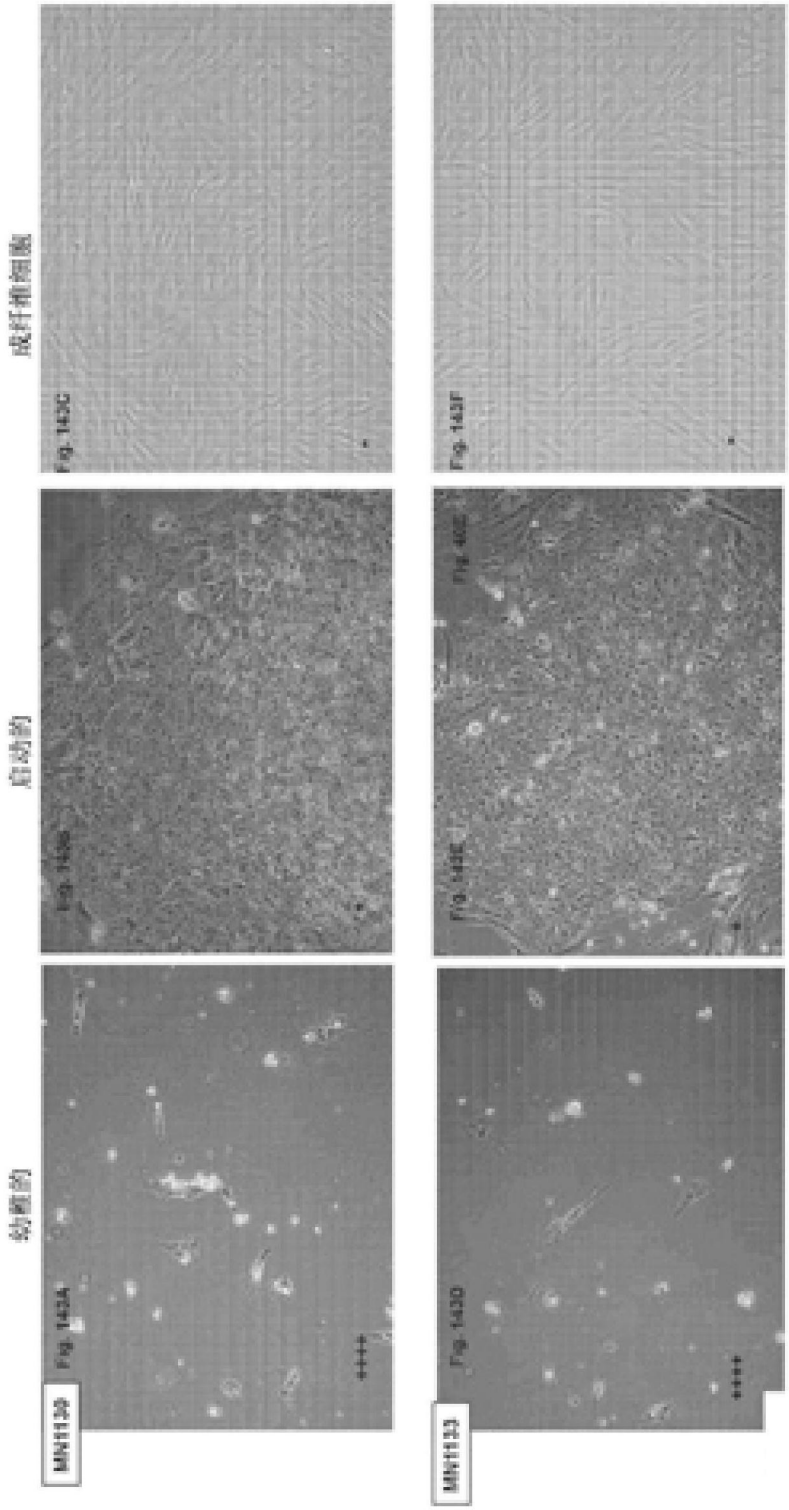

成纤维细胞
启动的
幼稚的
Fig. 143C
Fig. 143F
Fig. 143B
Fig. 143E
Fig. 143A
Fig. 143D
MN1133
MN1133
++++
++++

图144

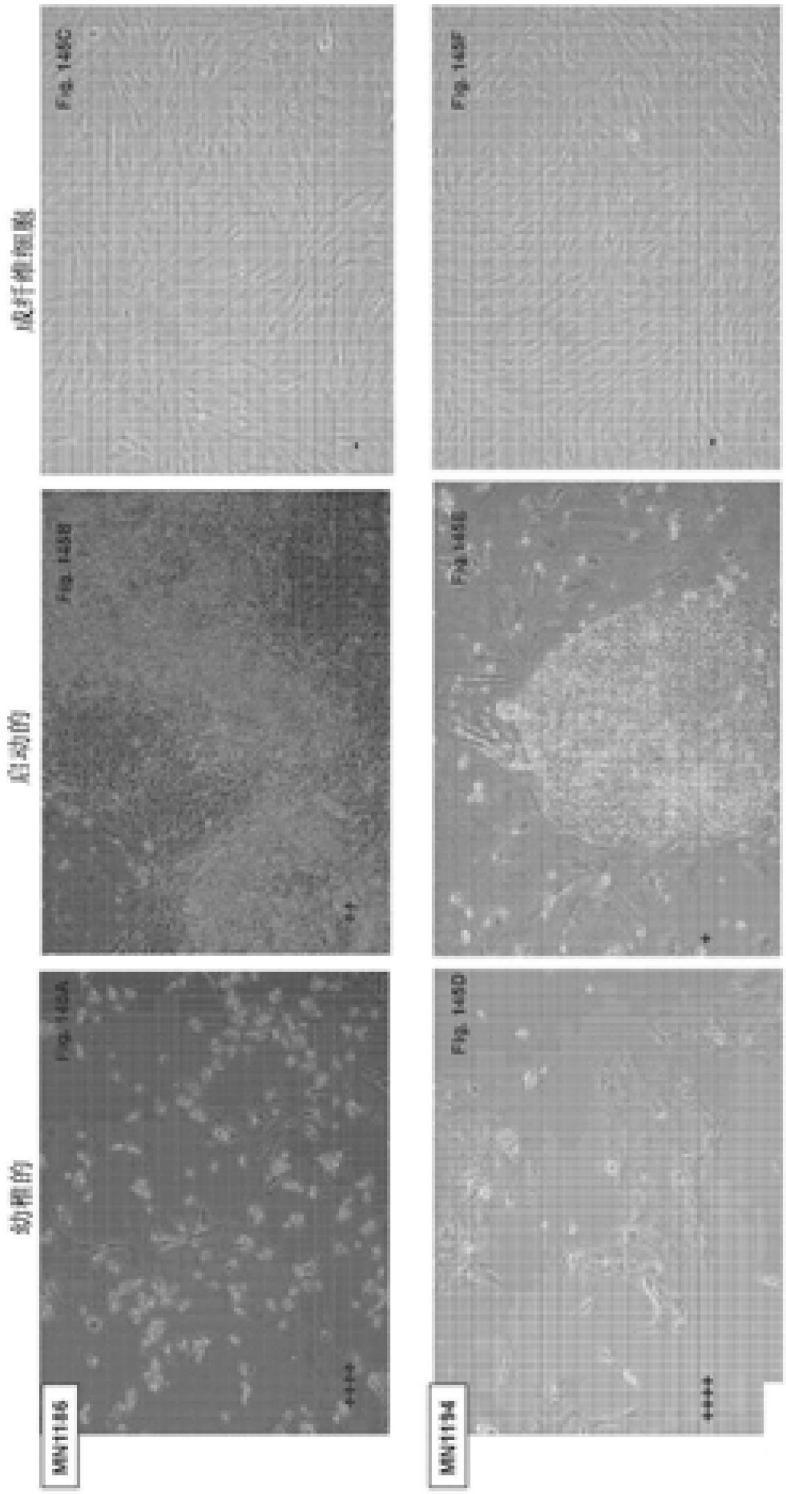

成纤维细胞
启动的
幼稚的
Fig. 145C
Fig. 145F
Fig. 145B
Fig. 145E
Fig. 145A
Fig. 145D
MN11-85
MN11-94
++
+
++++
++++

图145

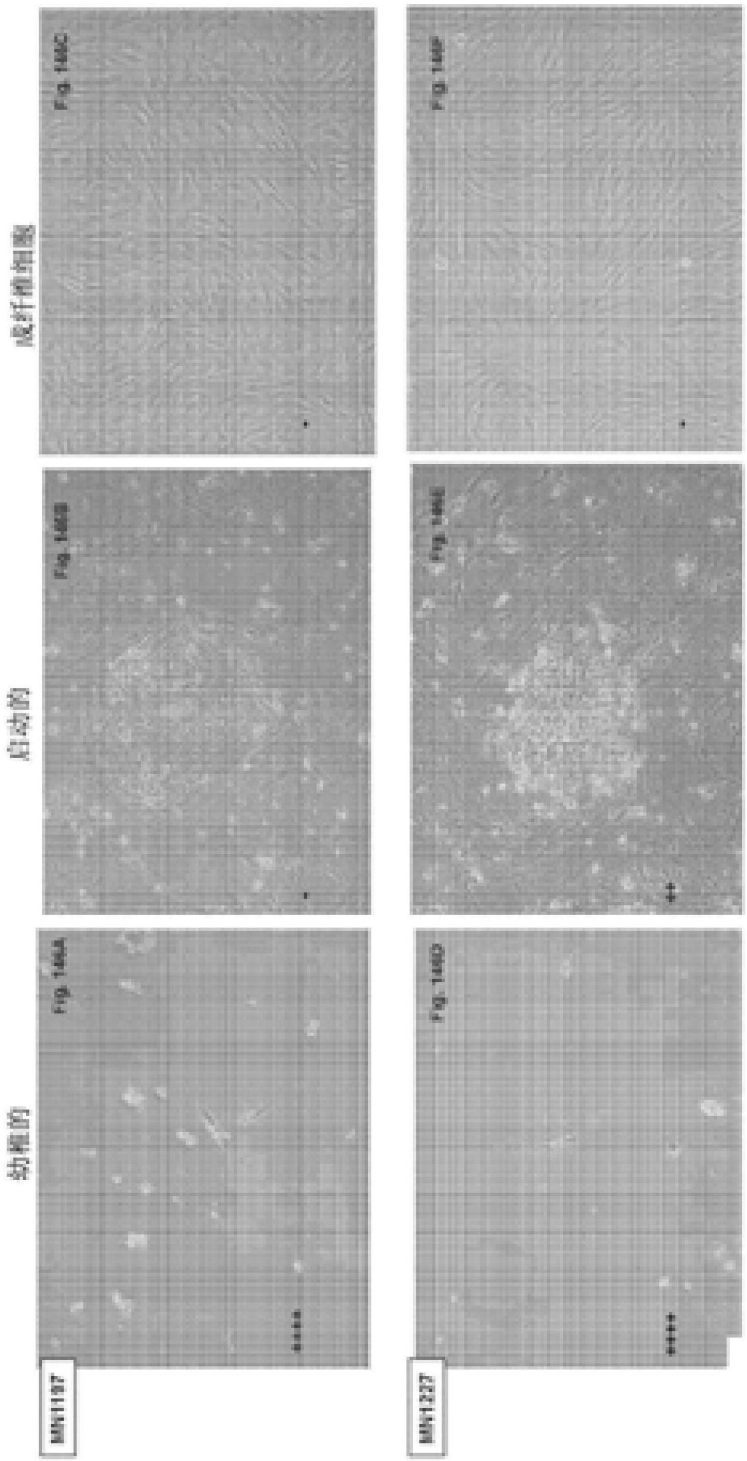

成纤维细胞
启动的
幼稚的
Fig. 146C
Fig. 146D
Fig. 146B
Fig. 146E
Fig. 146A
Fig. 146D
MN1197
MN1227

图146

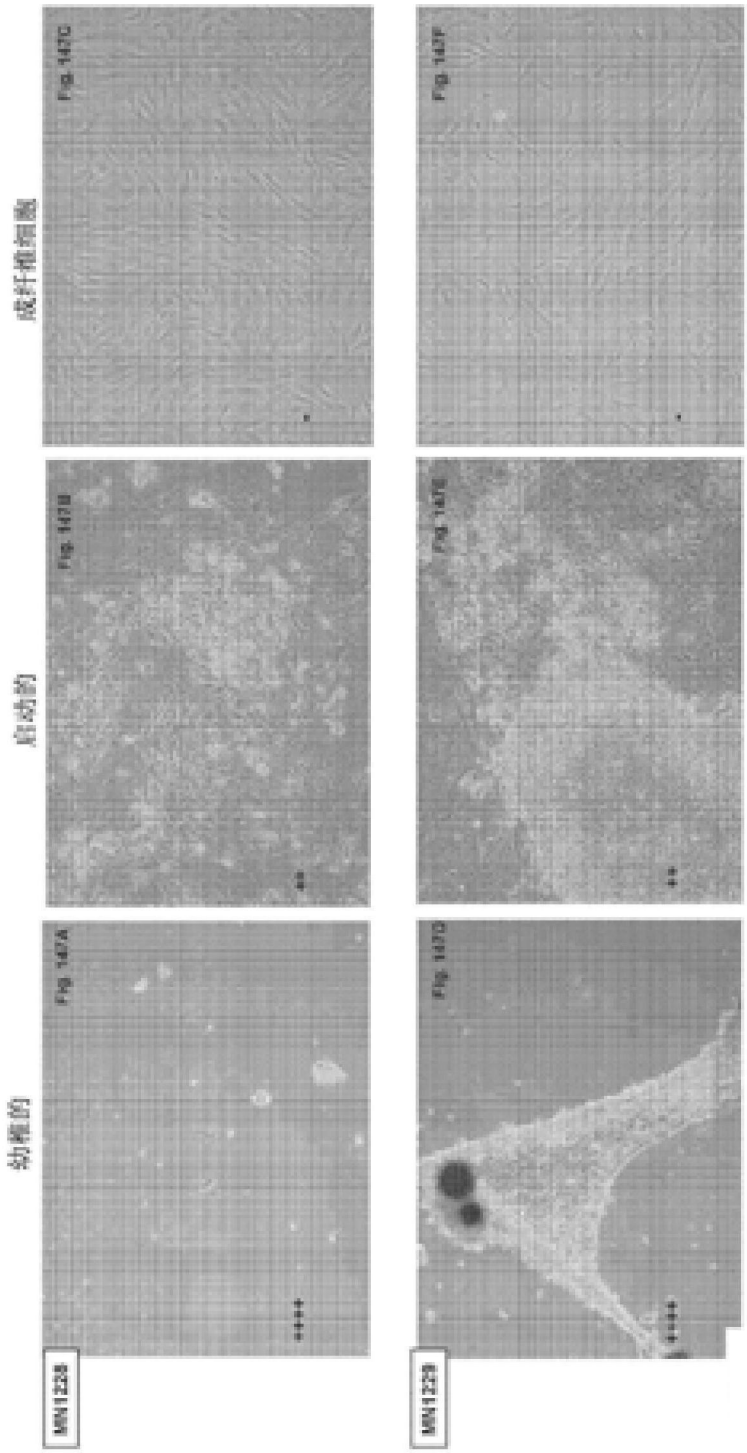

成纤维细胞
启动的
幼稚的
Fig 147C
Fig 147F
Fig 147B
Fig 147E
Fig 147A
Fig 147D
MN1238
MN1239

图147

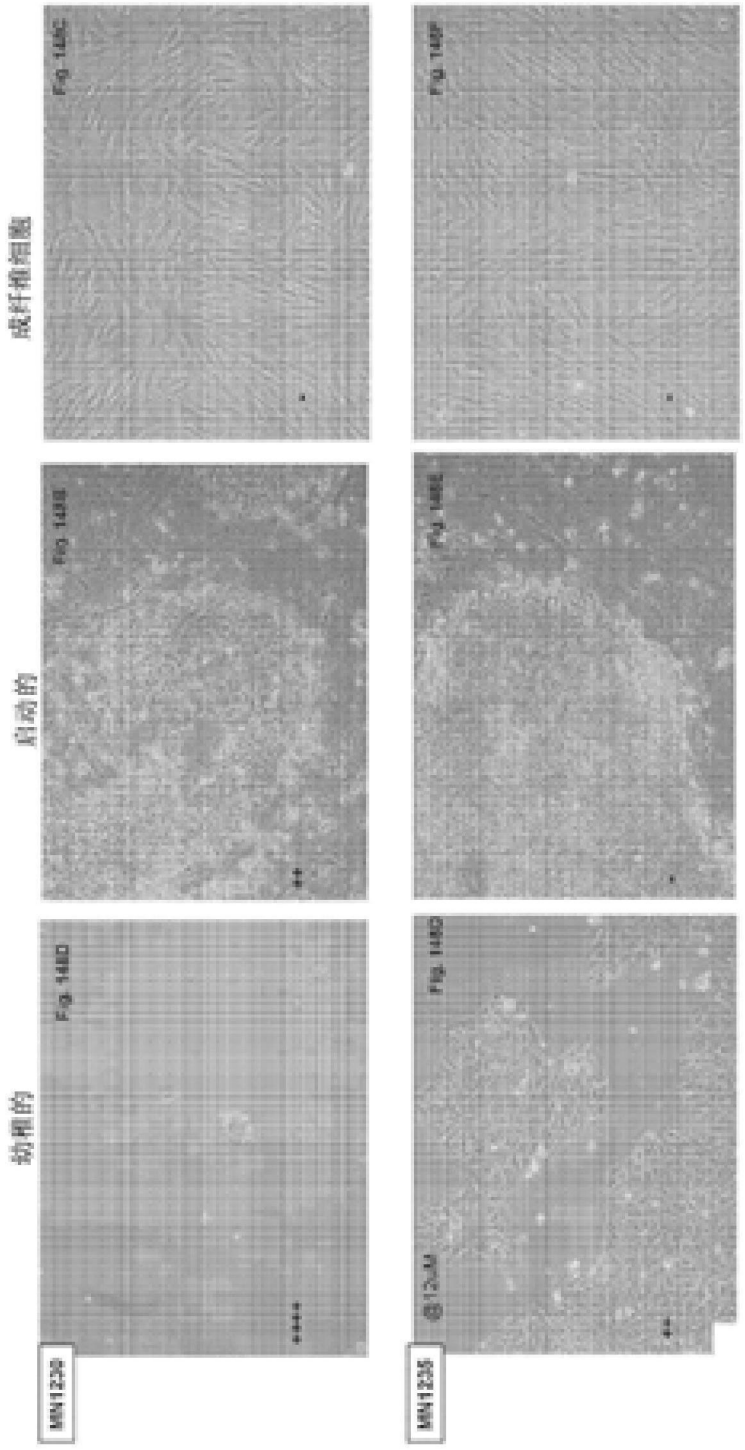


图148

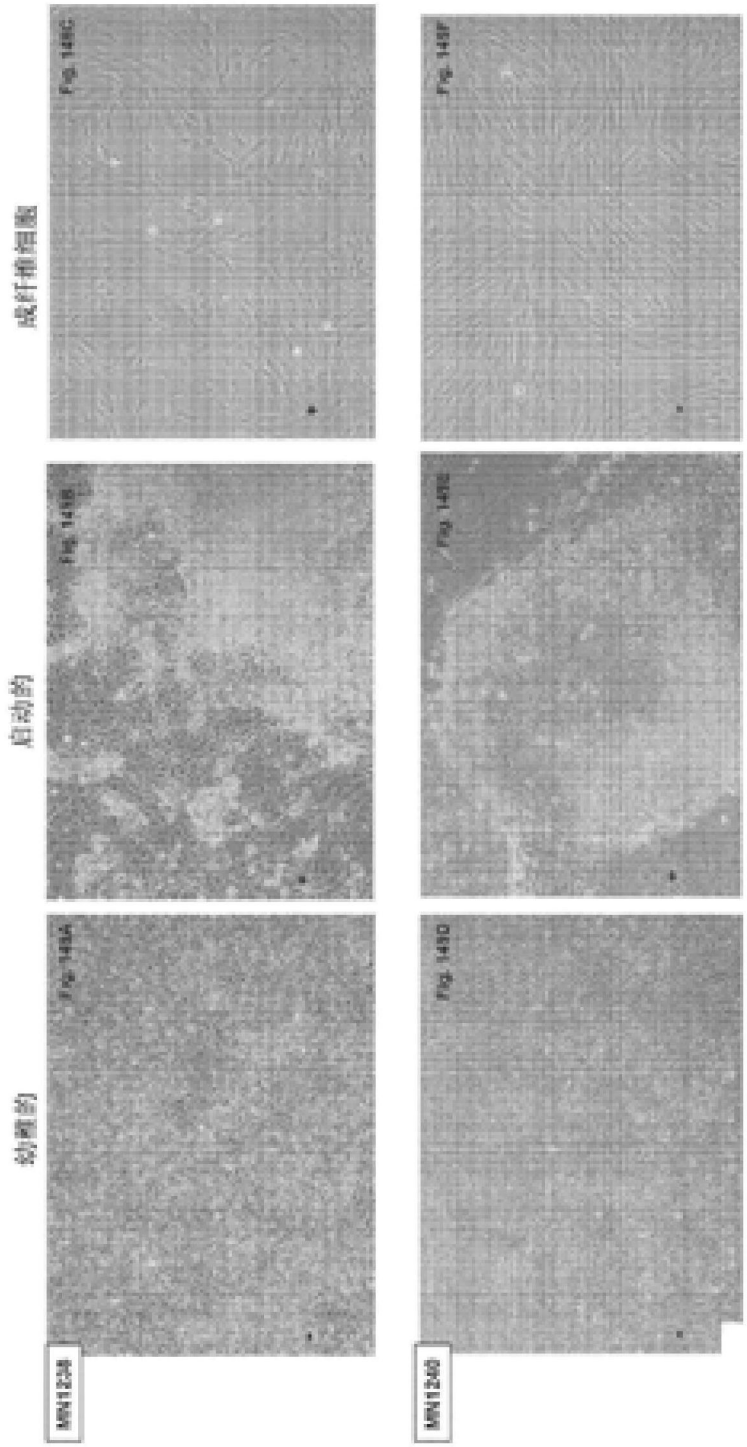

成纤维细胞
启动的
幼稚的
Fig. 149C
Fig. 149F
Fig. 149B
Fig. 149E
Fig. 149A
Fig. 149D
MN1238
MN1240

图149

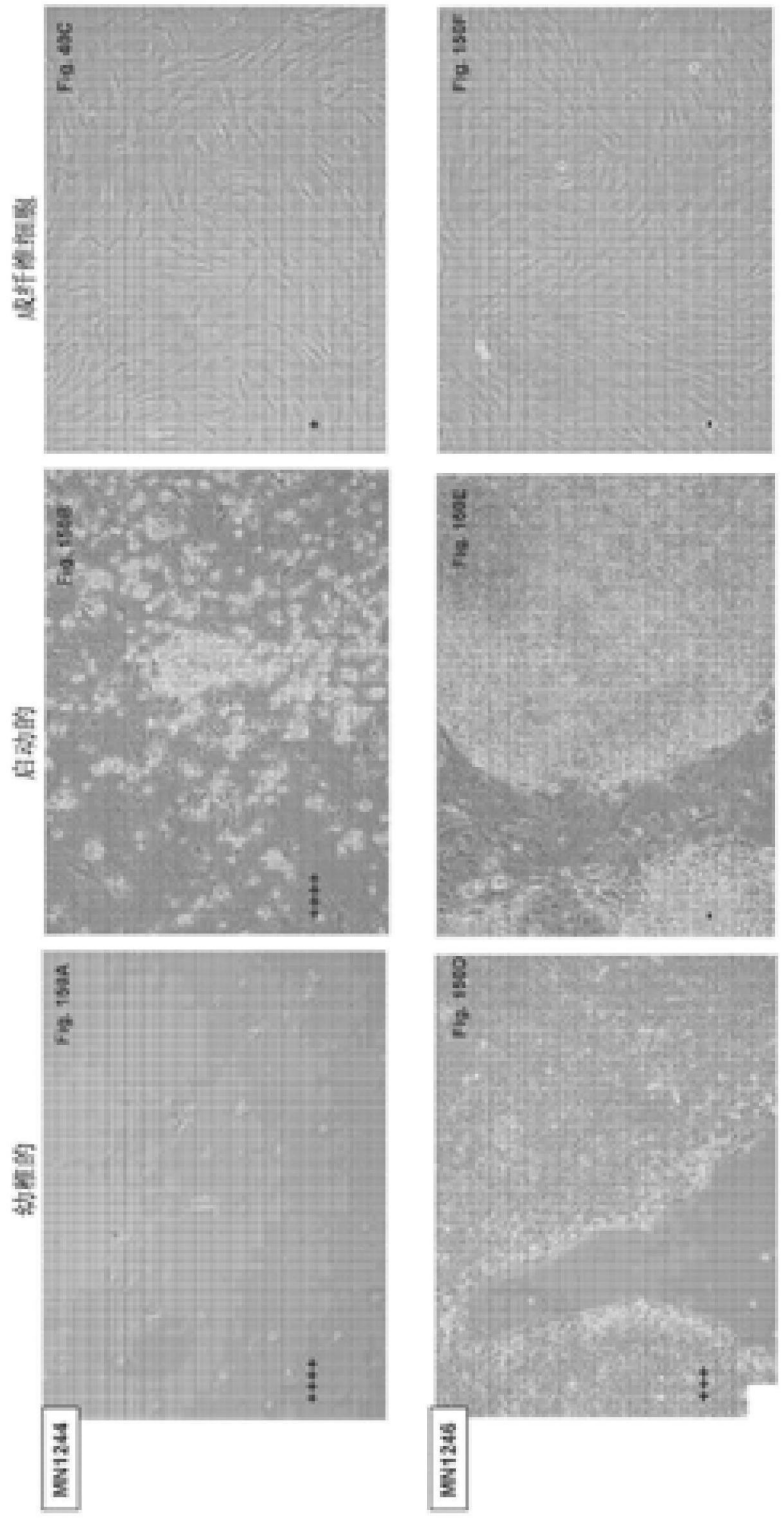

成纤维细胞
Fig 49C
Fig 155F
启动的
Fig 155B
Fig 155E
幼稚的
Fig 155A
Fig 155D
MN1244
MN1246

图150

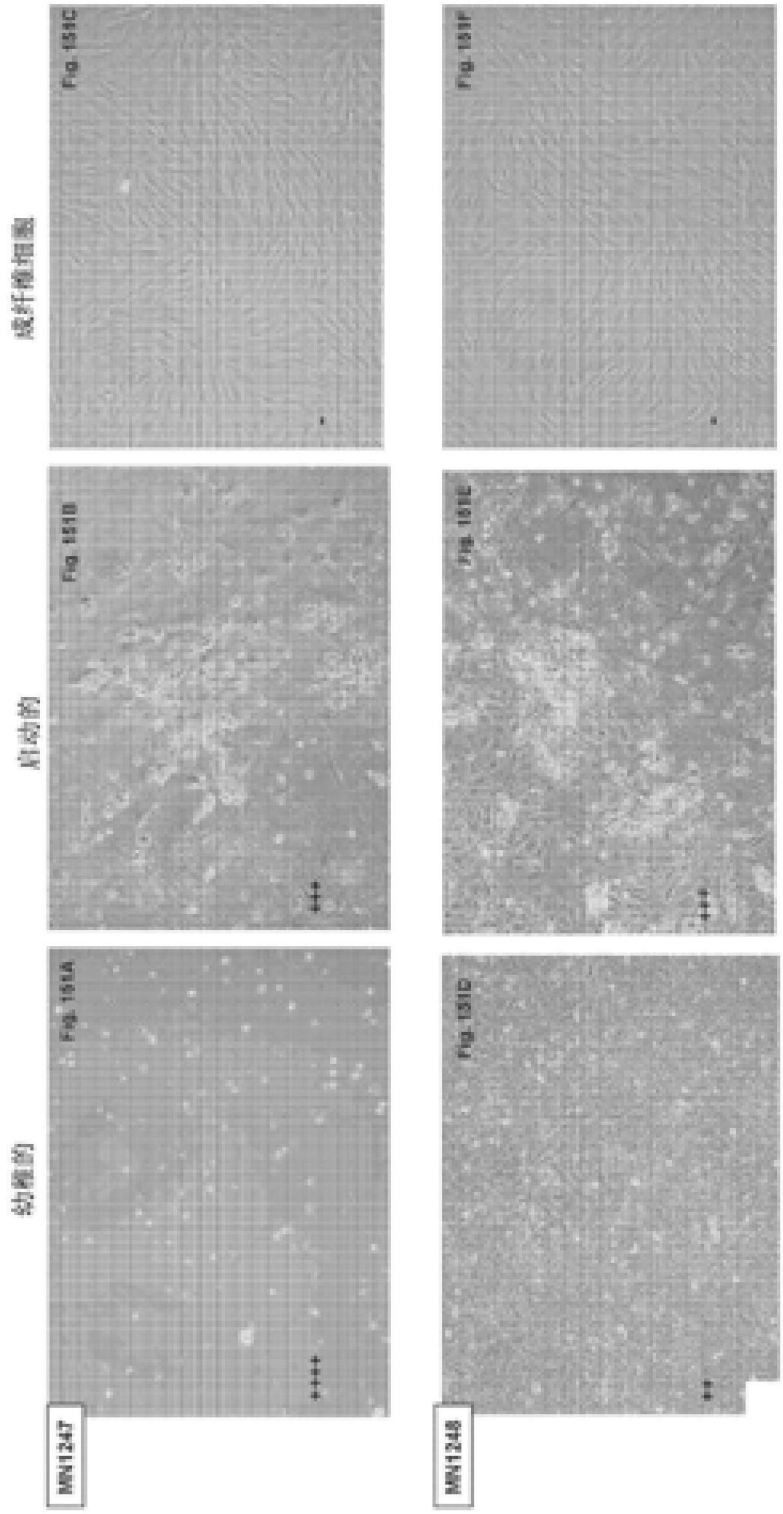

成纤维细胞
活动的
幼稚的
Fig. 151C
Fig. 151F
Fig. 151B
Fig. 151E
Fig. 151A
Fig. 151D
MN1247
MN1248

图151

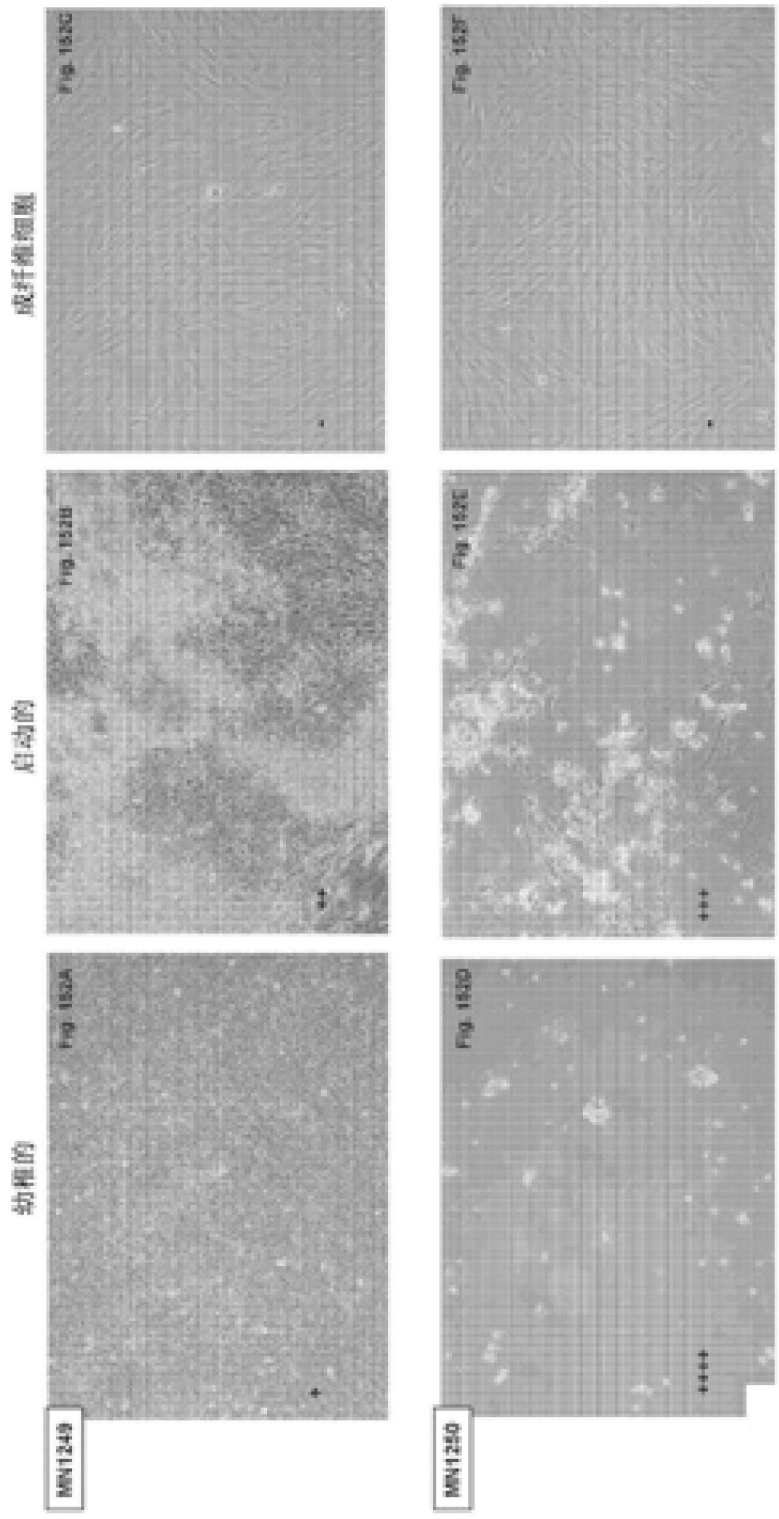

成纤维细胞
启动的
幼稚的
Fig 152C
Fig 152F
Fig 152B
Fig 152E
Fig 152A
Fig 152D
+
++
+++
++++
MN1249
MN1250

图152

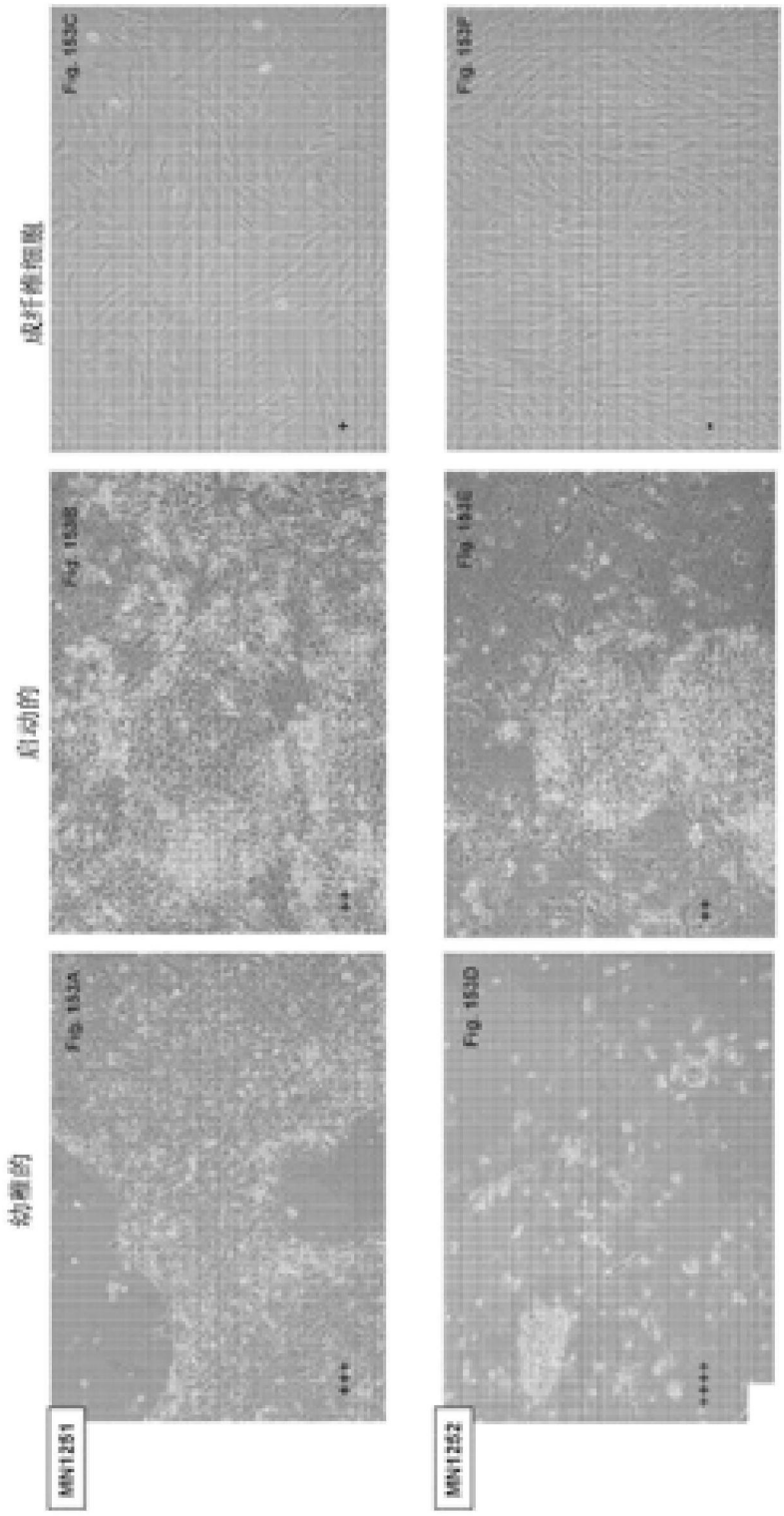

成纤维细胞
启动的
幼稚的
Fig 153C
Fig 153F
Fig 153B
Fig 153E
Fig 153A
Fig 153D
MN1251
MN1252

图153

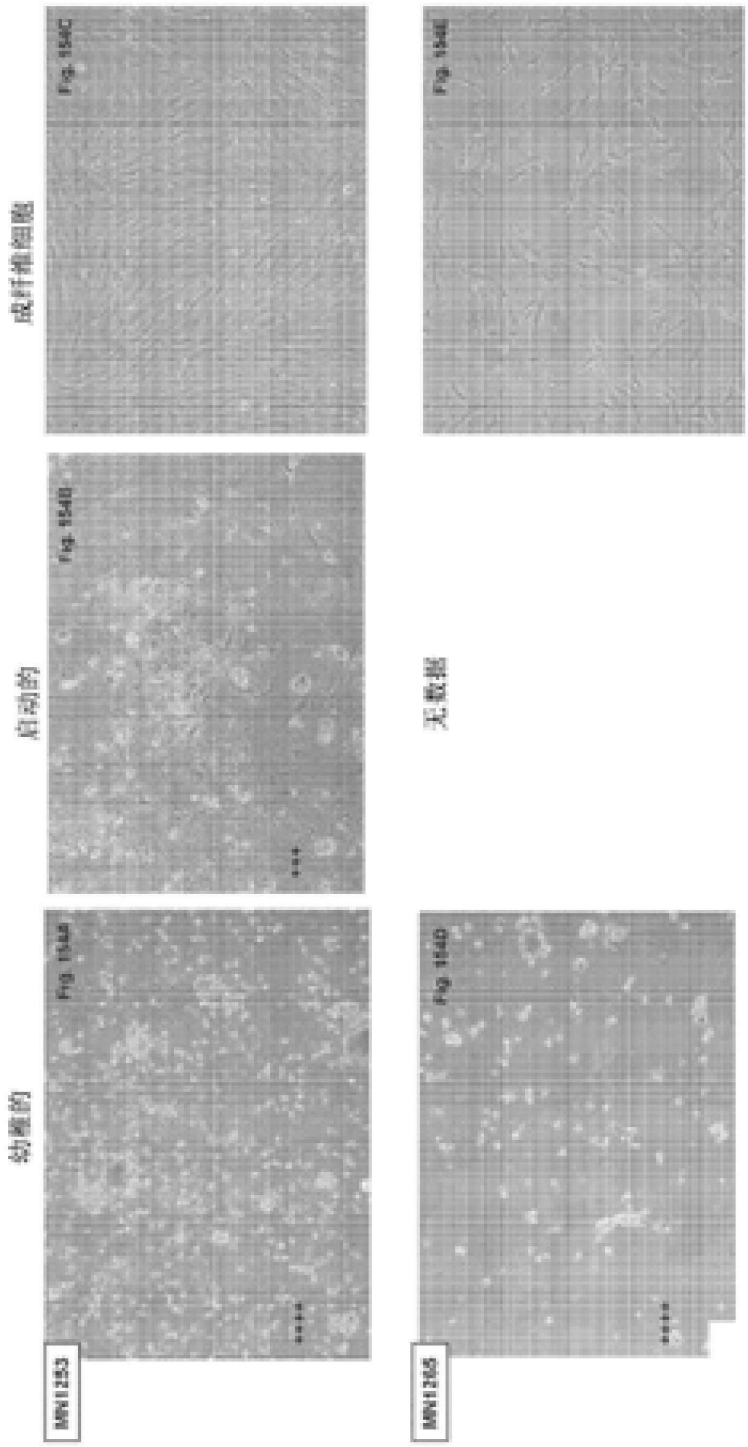


图154

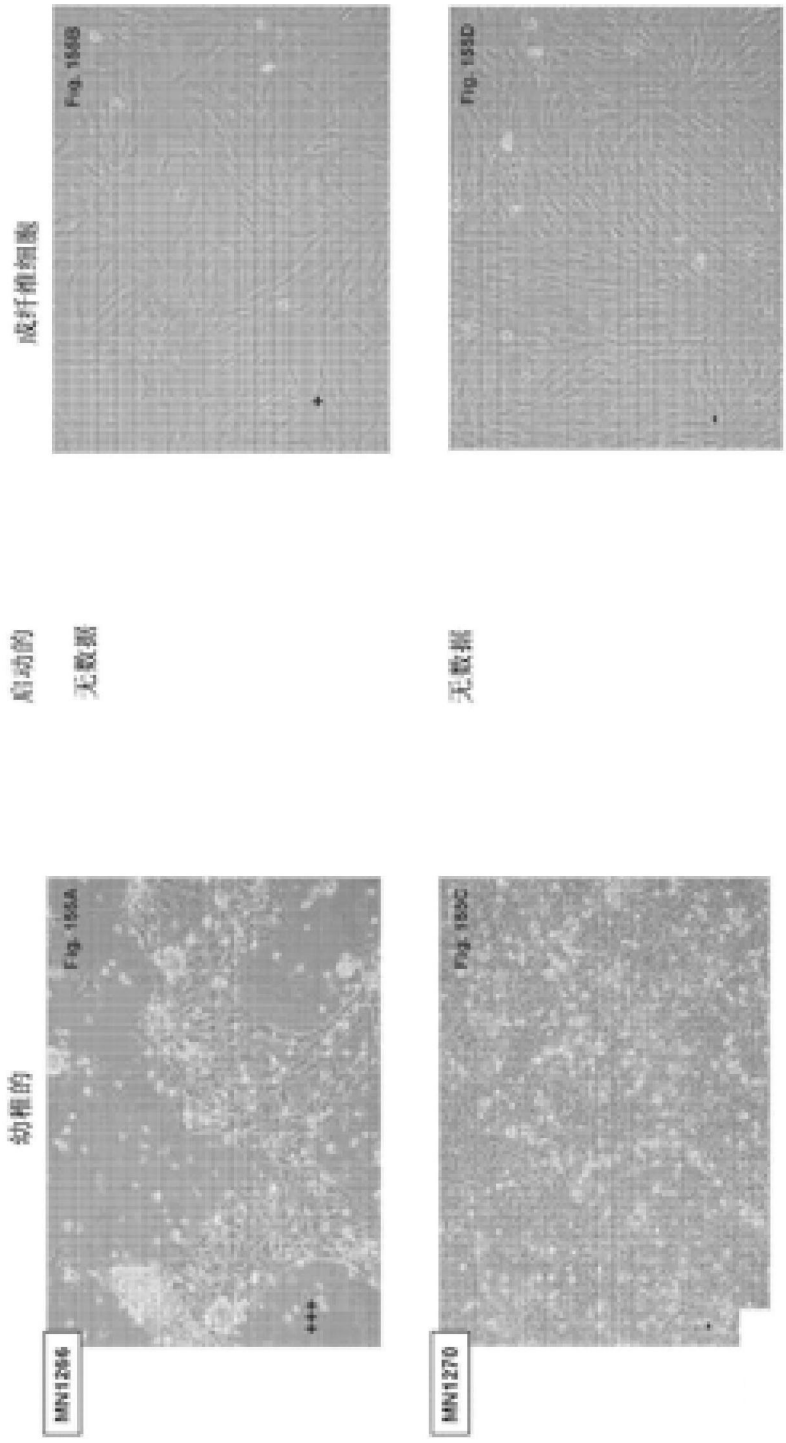

成纤维细胞
Fig. 155B
Fig. 155D
启动的
无数据
无数据
幼稚的
Fig. 155A
Fig. 155C
+++
MN1266
MN1270

图155

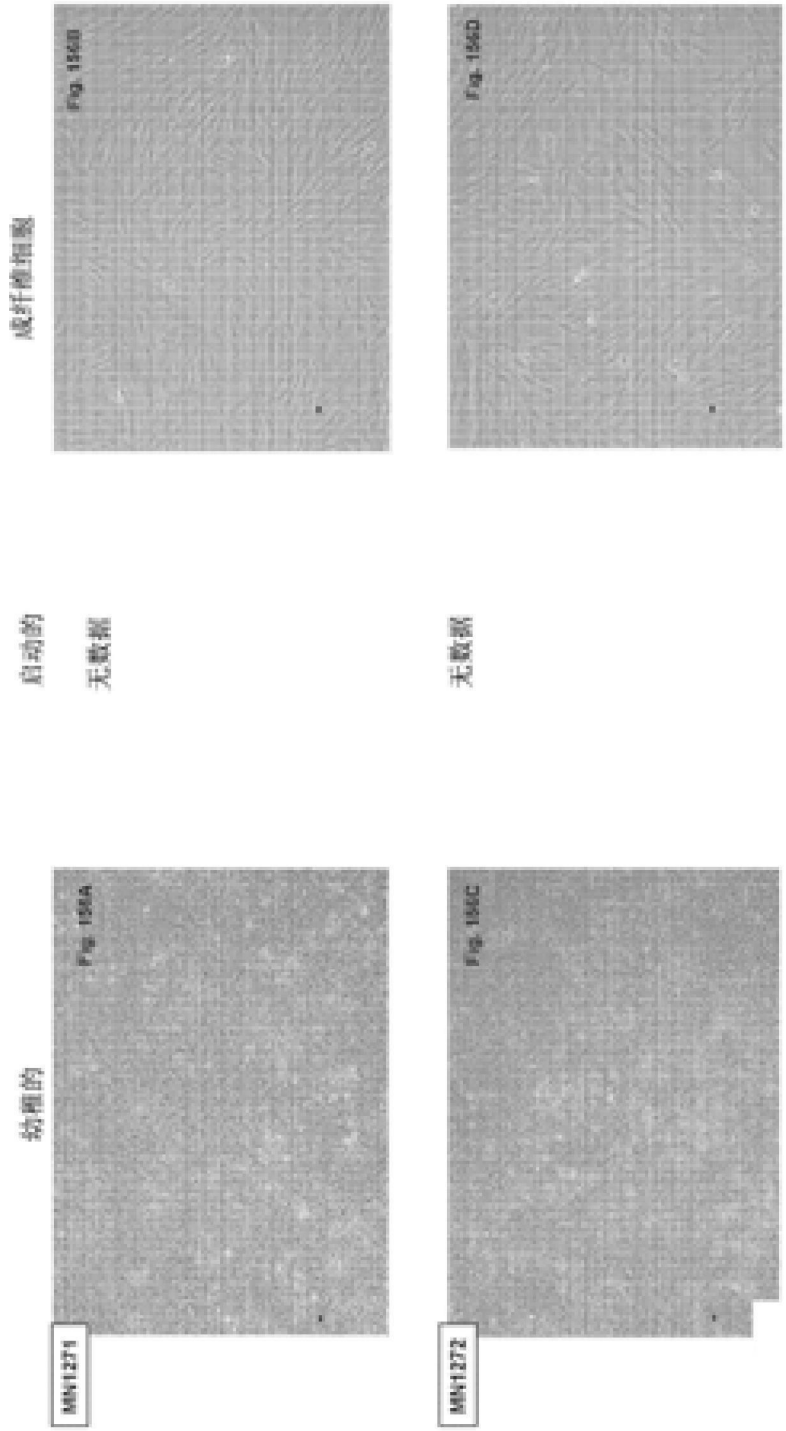

成纤维细胞
Fig. 156B
Fig. 156D
启动的
无载剂
无载剂
纳维的
Fig. 156A
Fig. 156C
MN1271
MN1272

图156

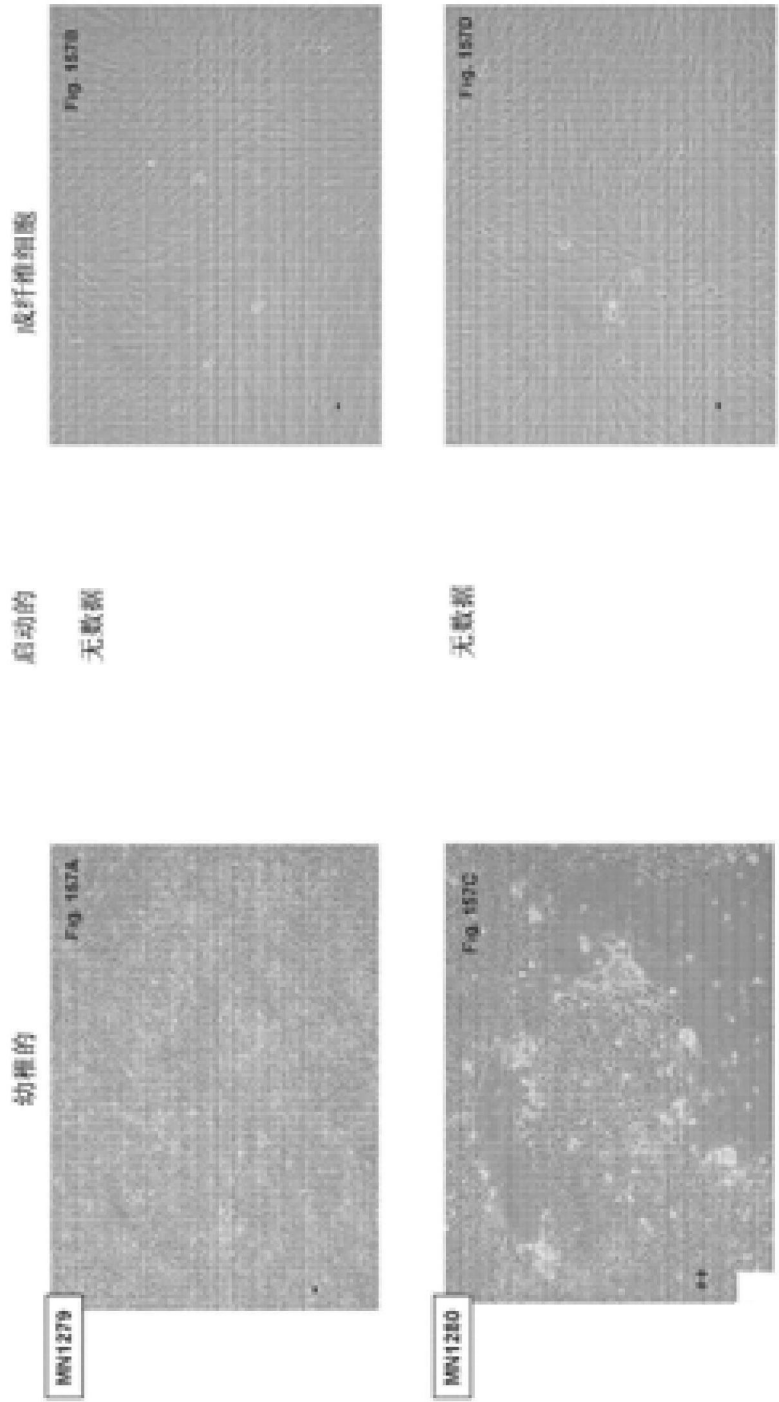

成纤维细胞
Fig. 157B
Fig. 157D
启动的
无数据
无数据
幼稚的
Fig. 157A
Fig. 157C
MN1279
MN1280

图157

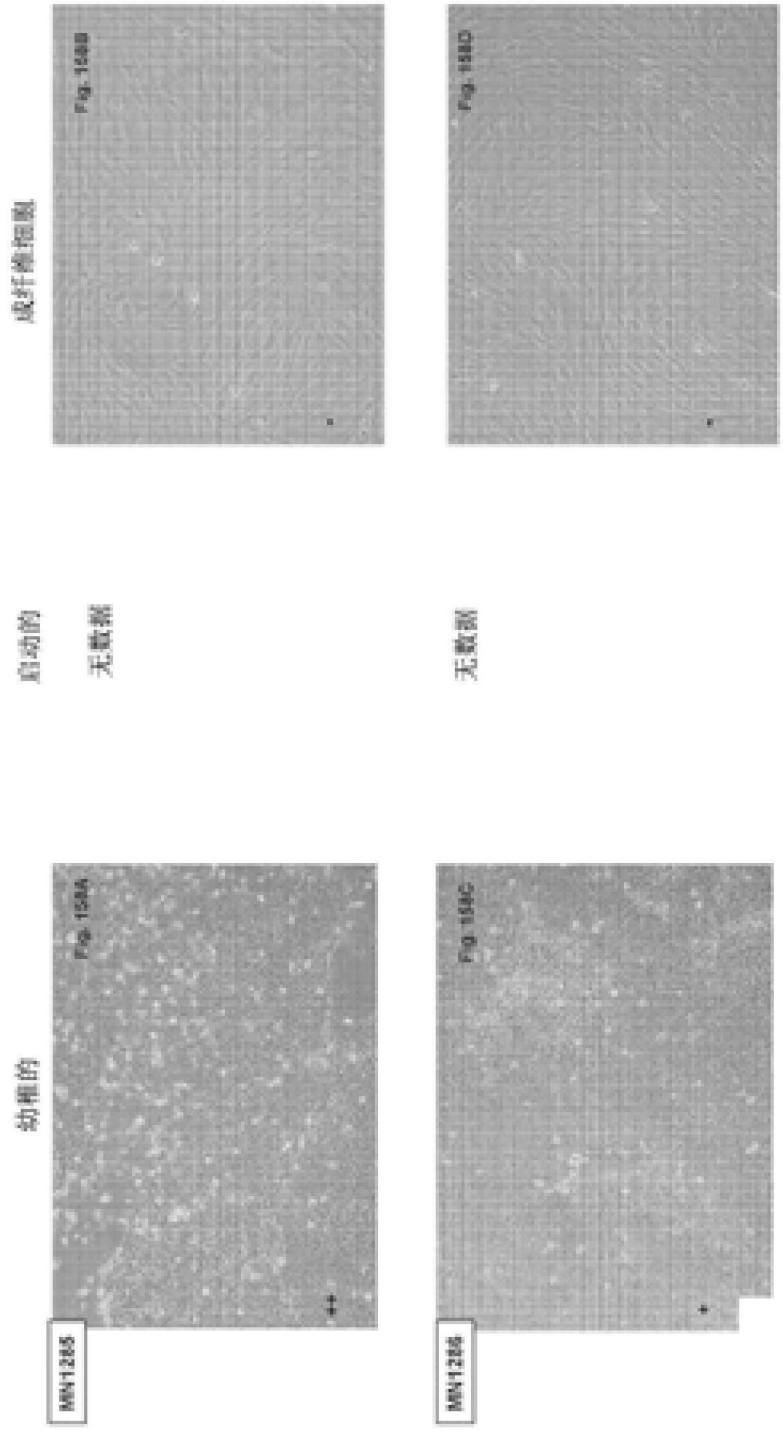

成纤维细胞
Fig. 158B
Fig. 158D
启动的
无数据
无数据
幼稚的
Fig. 158A
Fig. 158C
MN1285
MN1286

图158

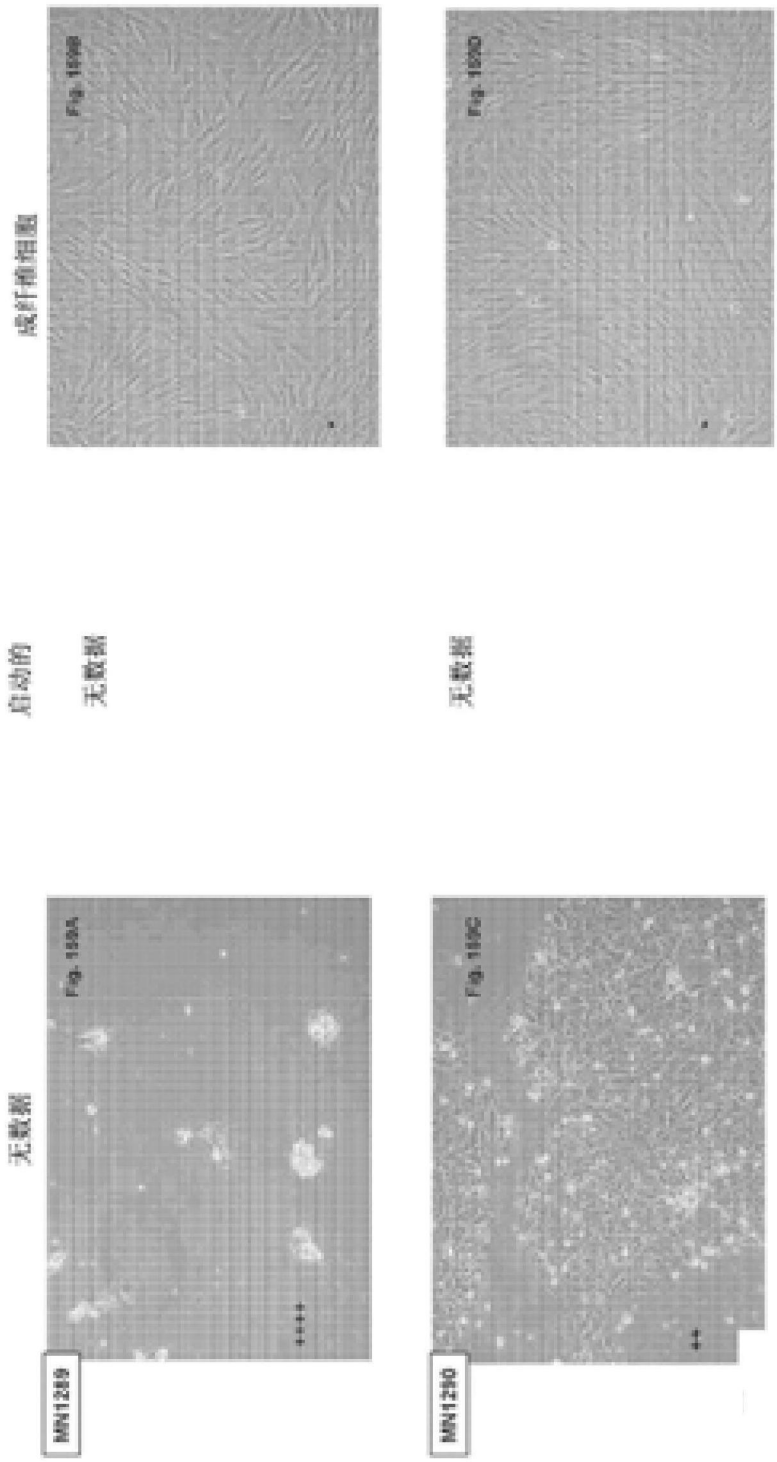

成纤维细胞
Fig. 159B
Fig. 159D
启动的
无数据
无数据
无数据
Fig. 159A
Fig. 159C
++++
++
MN1289
MN1290

图159

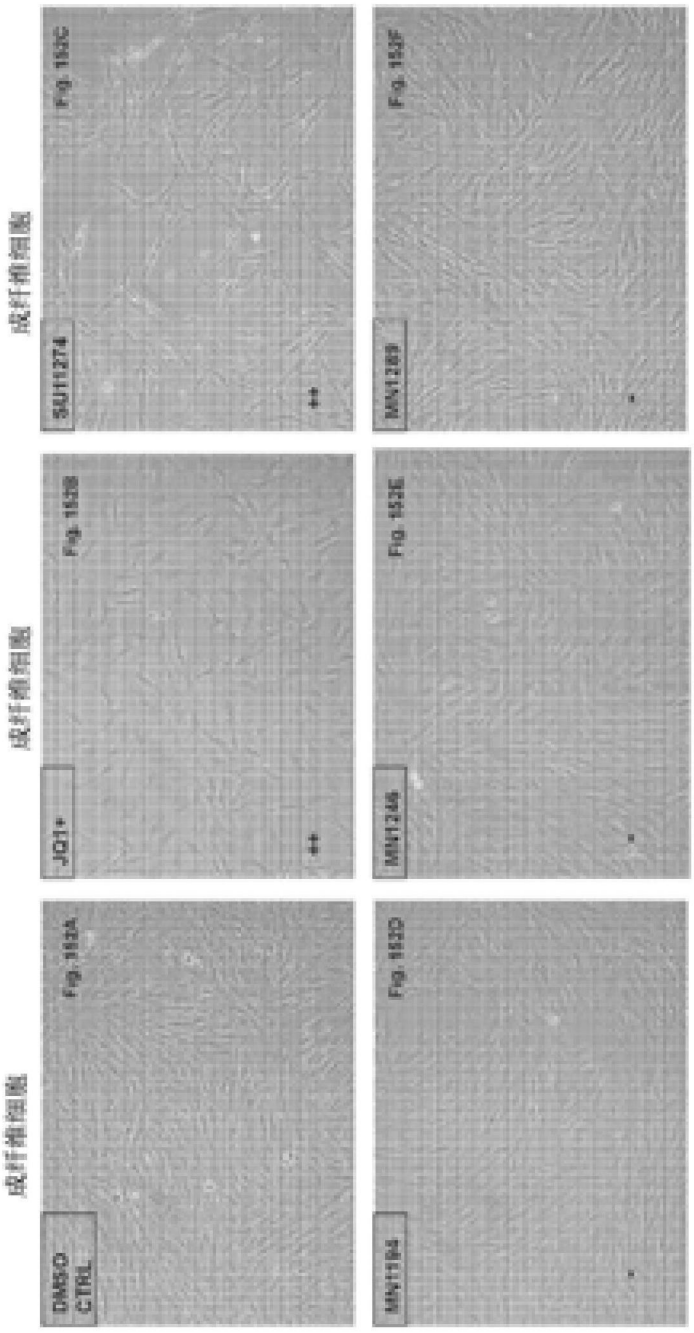

成纤维细胞
DMSO CTRL
Fig. 153A
成纤维细胞
JQ1+
Fig. 153B
成纤维细胞
SU11274
Fig. 153C
成纤维细胞
MN1184
Fig. 153D
成纤维细胞
MN1246
Fig. 153E
成纤维细胞
MN1289
Fig. 153F

图160

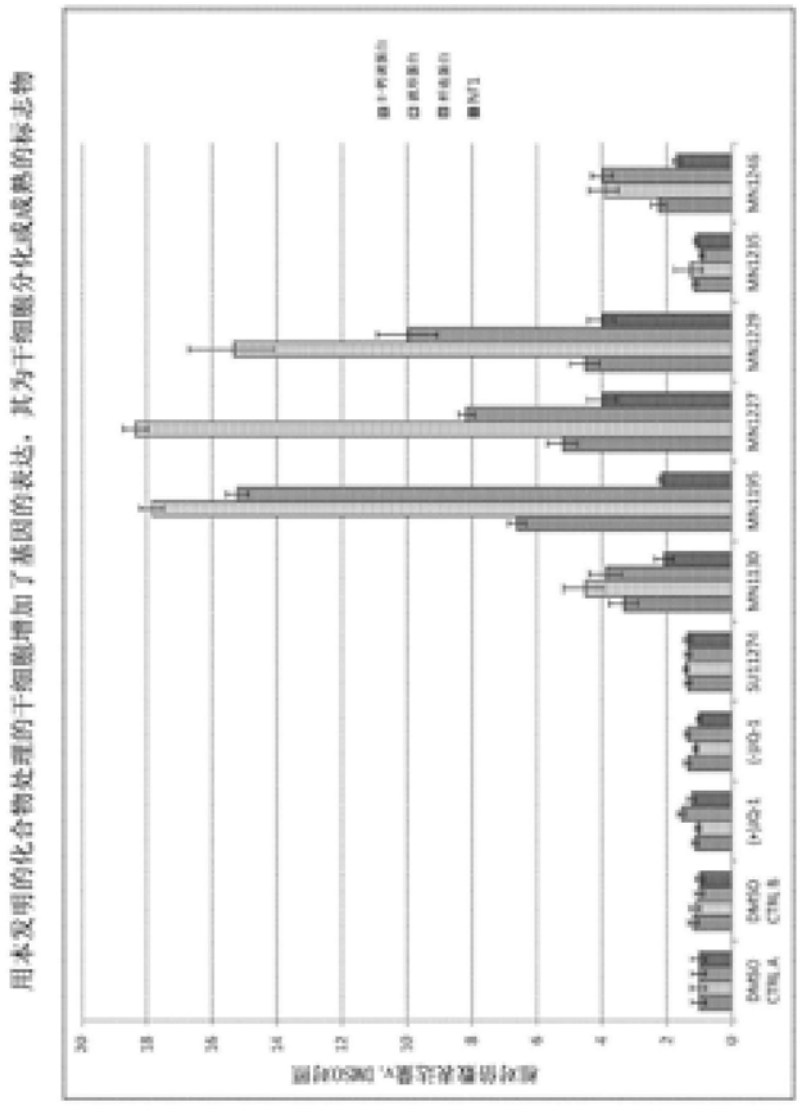

用本发明的化合物处理的干细胞增加了基因的表达，其为干细胞分化成成熟的标志物
相对倍数表达量v. DMSO对照
30
25
20
15
10
5
0
DMSO
CTRL A
DMSO
CTRL B
(+)JQ-1
(-)JQ-1
SU1127N
MN1130
MN1195
MN1227
MN1229
MN1235
MN1246

图161

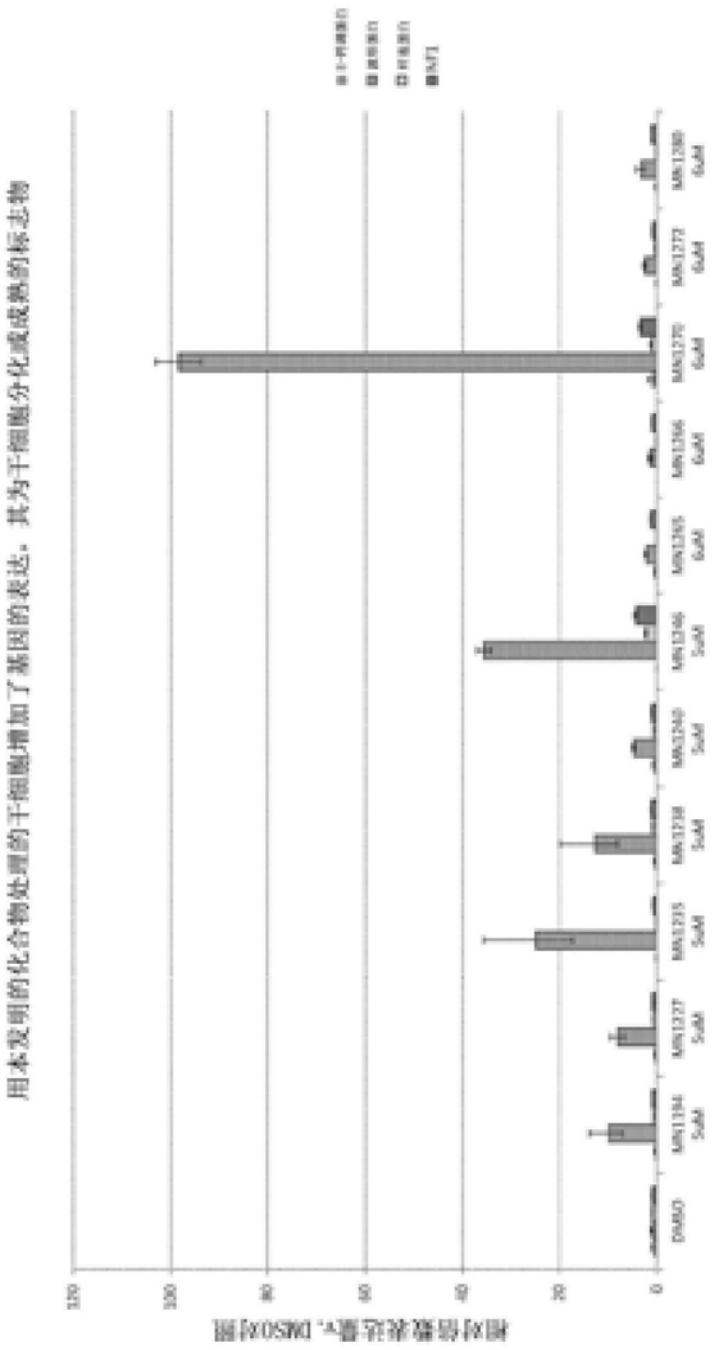

用本发明的化合物处理的干细胞增加了基因的表达，其为干细胞分化成成熟的标志物
相对信号表达量vs. DMSO对照
0
20
40
60
80
100
120
DMSO
MN1364 5uM
MN1727 5uM
MN1735 5uM
MN1738 5uM
MN1740 5uM
MN1746 5uM
MN1765 6uM
MN1766 6uM
MN1770 6uM
MN1772 6uM
MN1780 6uM

图162

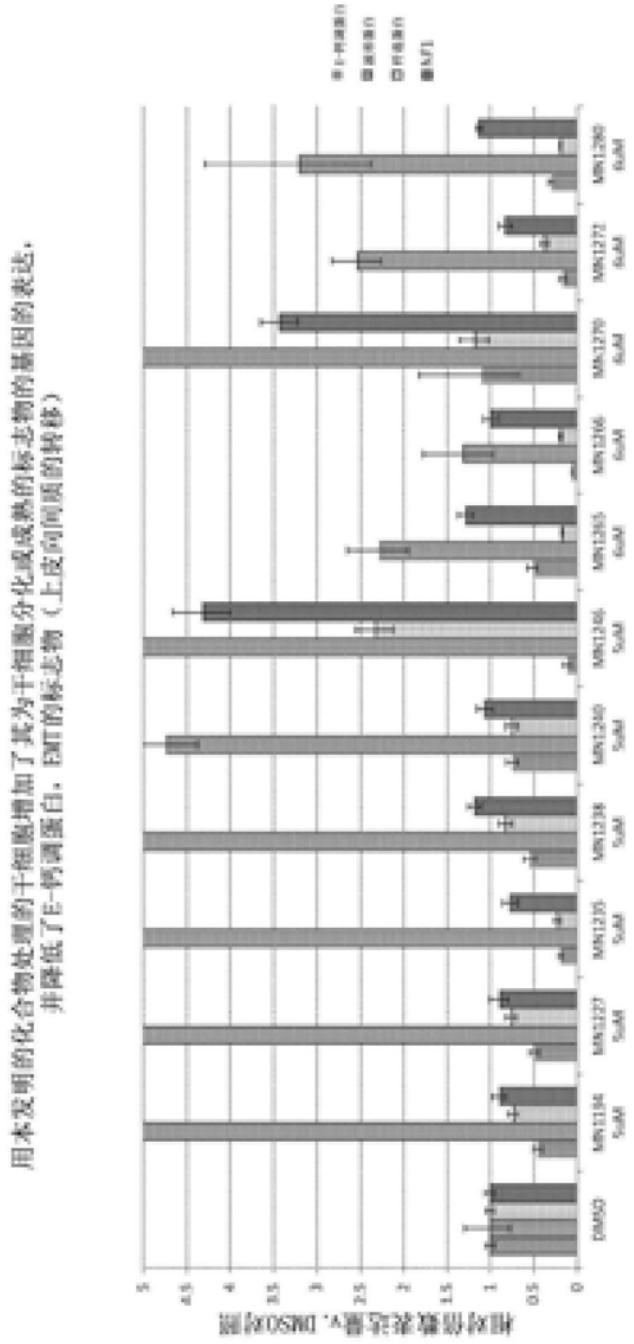

用本发明的化合物处理的干细胞增加了其为干细胞分化成成熟的标志物的基因的表达，
并降低了E-钙调蛋白，EMT的标志物（上皮向间质的转移）
相对容载表达量v. DMSO对照
DMSO
MN1194 5uM
MN1227 5uM
MN1235 5uM
MN1238 5uM
MN1240 5uM
MN1245 5uM
MN1265 6uM
MN1266 6uM
MN1270 6uM
MN1272 6uM
MN1280 6uM

图163

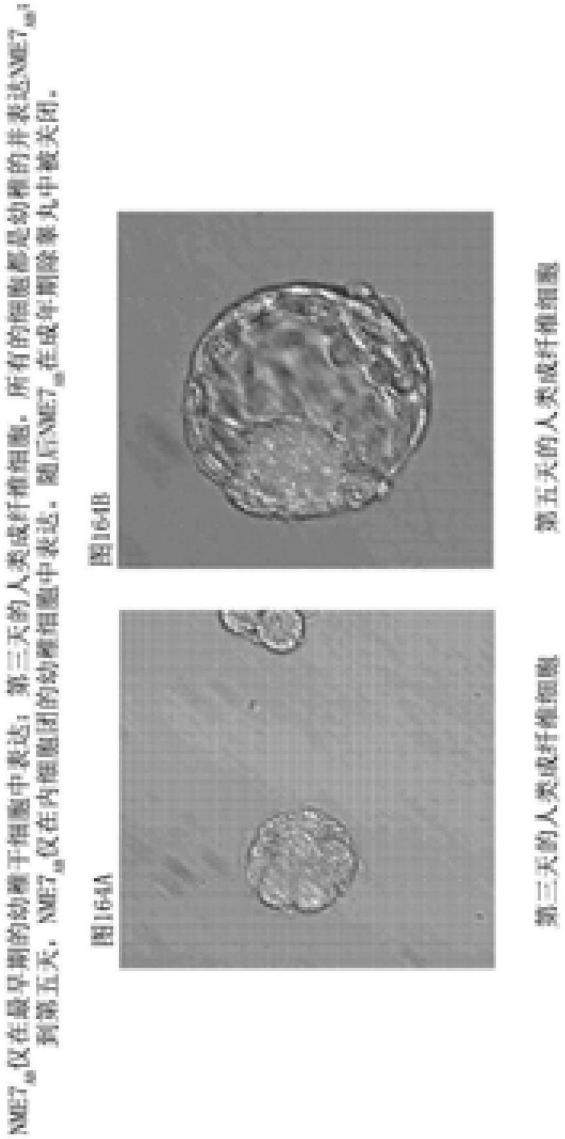

NME7$_{AB}$仅在最早期的幼胚干细胞中表达；第三天的人类成纤维细胞。所有的细胞都是幼稚的并表达NME7$_{AB}$
到第五天，NME7$_{AB}$仅在内细胞团的幼稚细胞中表达。随后NME7$_{AB}$在成年期除睾丸中被关闭。
图164B
图164A
第三天的人类成纤维细胞
第五天的人类成纤维细胞

图164

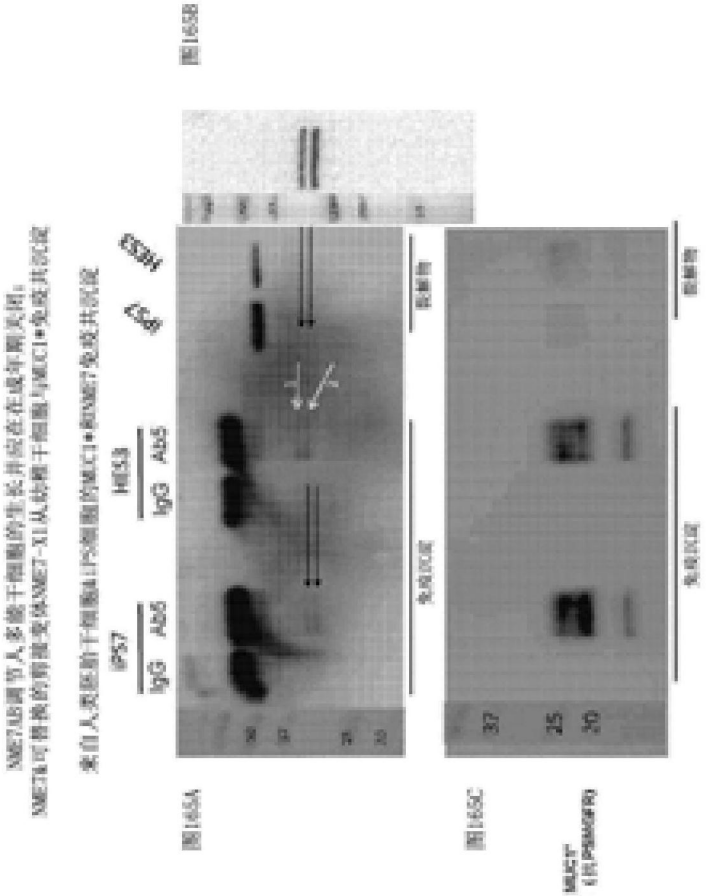

图165B
NME7AB同节人多能干细胞的生长并应在成年期关闭；
NME7AB可替换的胃癌受体NME7-X1从幼茸干细胞与MUC1•免疫共沉淀
来自人类胚胎干细胞LIS细胞的MUC1•和NME7免疫共沉淀
IP57
IgG
Ab5
HIS3
IgG
Ab5
IP57
HIS3
免疫印迹
图165A
图165C
MUC1
(胞质域的C)

图165

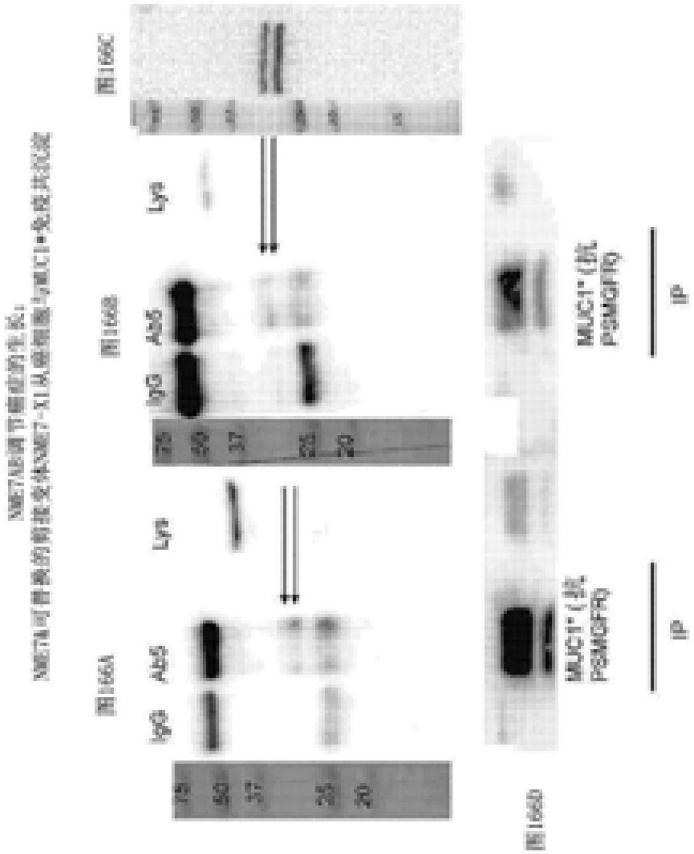

图166C
Lys
图166B
Ab5
IgG
Lys
图166A
Ab5
IgG
MUC1*(抗PSMGFR)
IP
MUC1*(抗PSMGFR)
IP
图166D

图166

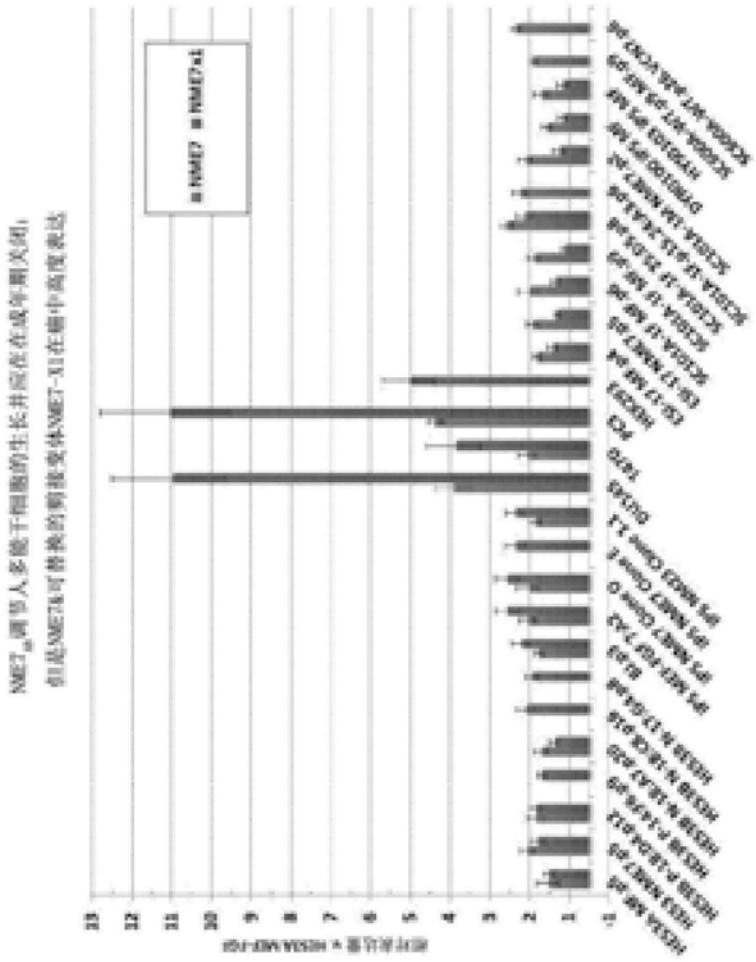


图167

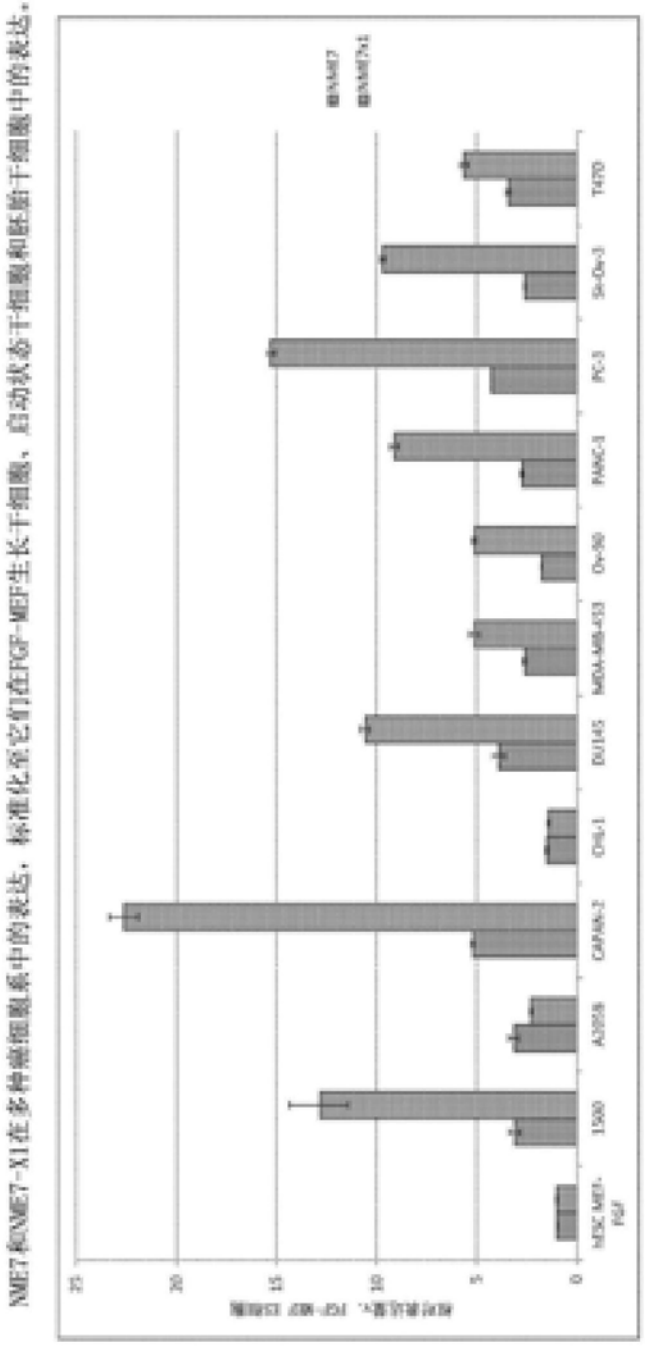
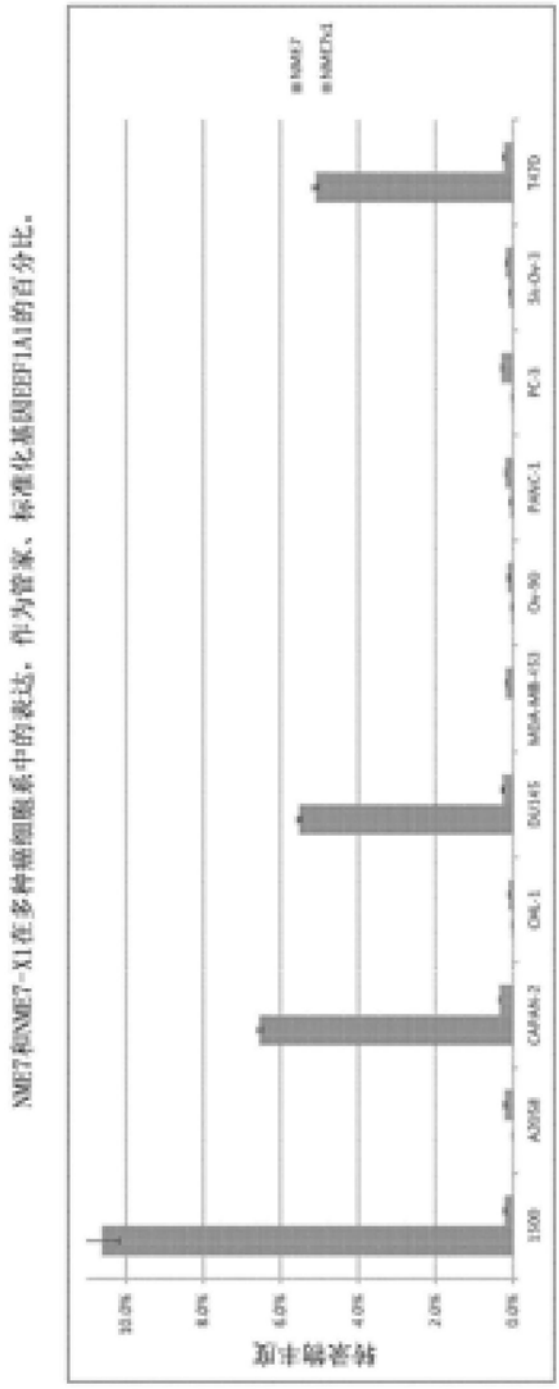

NME7和NME7-X1在多种癌细胞系中的表达，标准化在它们在FGF-MEF生长细胞，启动状态干细胞和胚胎干细胞中的表达。
NME7
NME7x1
MSC MEF-FGF
1500
A2058
CAPAN-2
CHL-1
DU145
MDA-MB-453
Ov-90
RANG-1
PC-3
Sk-Ov-3
T470
0
5
10
15
20
25

图168



NME7和NME7-X1在多种癌细胞系中的表达，作为管家、标准化基因EEF1A1的百分比。

图169

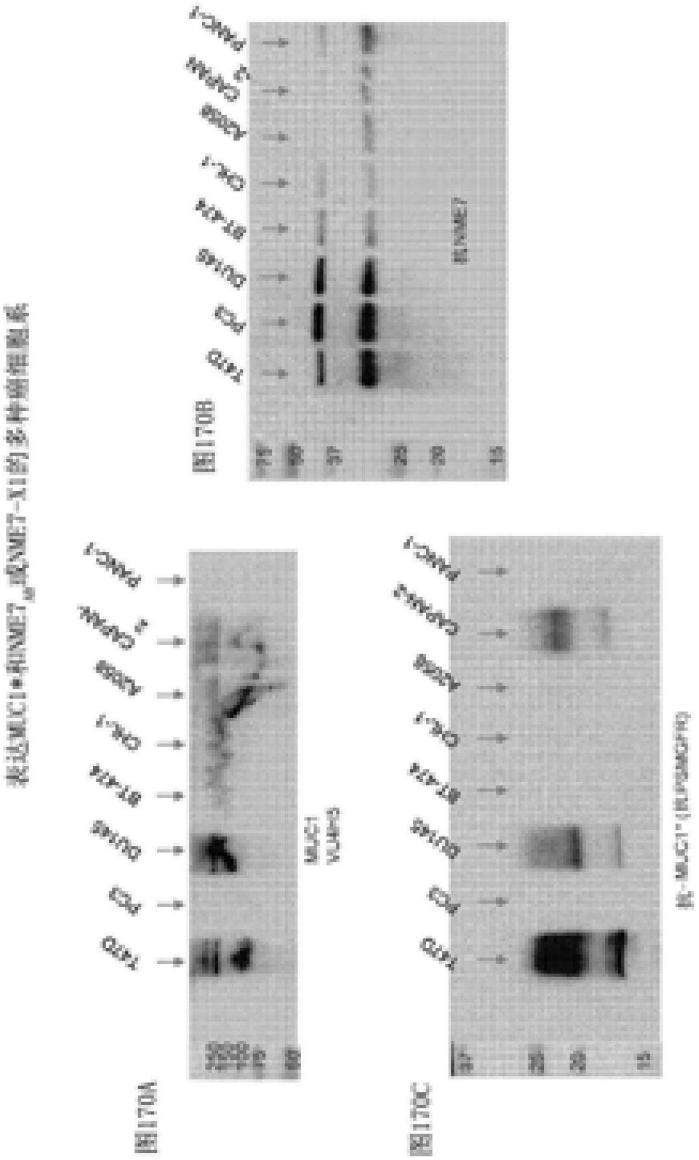

表达MUC1*和NME7ab或NME7-X1的多种细胞系
PARC-1
CAPAN-2
A2058
CAPAN-1
CAL-1
BT-474
DU145
PC3
T47D
MUC1 VU4H3
抗-MUC1*(HUMGH5)
图170A
图170B
图170C

图170

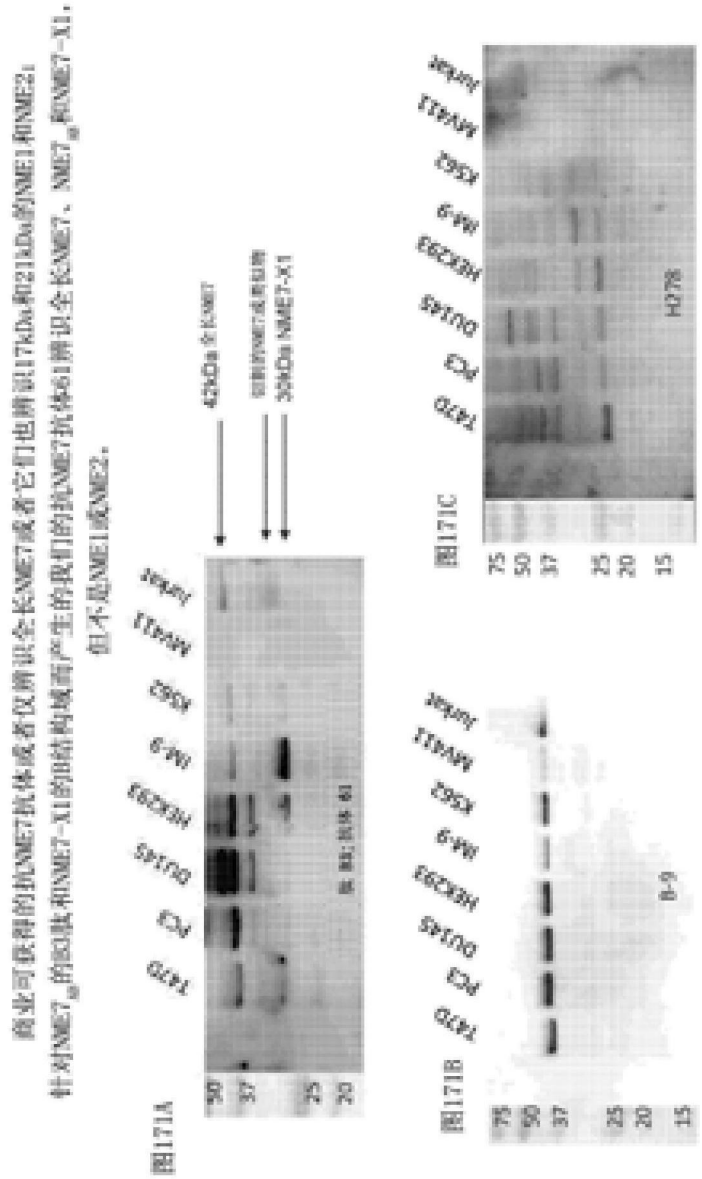

商业可获得的抗NME7抗体或者仅辨识全长NME7或者它们也辨识17kDa和21kDa的NME1和NME2；
针对NME7ab的IgG1抗和NME7-X1的结构域而产生的我们的抗NME7抗体61辨识全长NME7、NME7ab和NME7-X1，
但不是NME1或NME2。
42kDa 全长NME7
35kDa NME7-X1
Jurkat
MV411
K562
IM-9
HEK293
DU145
PC3
T47D
H278
8-9
图171A
图171B
图171C

图171

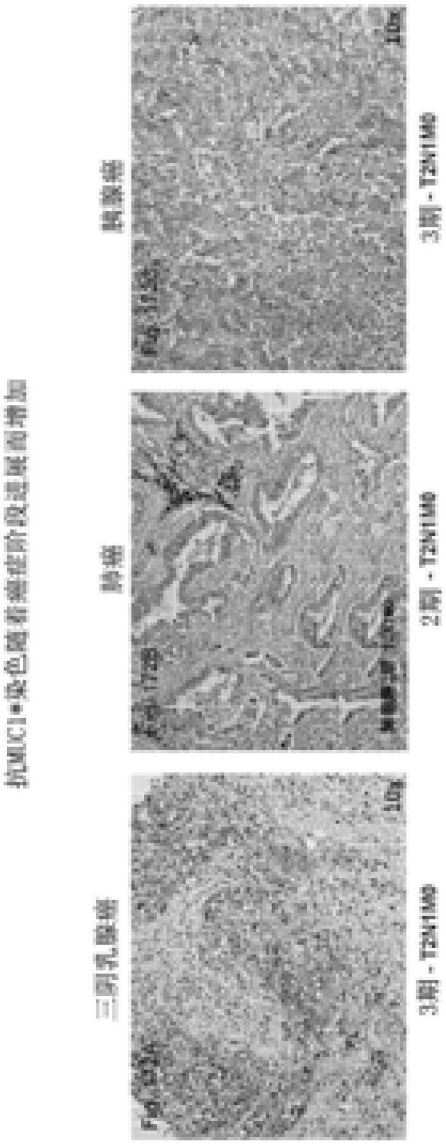

抗MUC1•染色随着癌症阶段进展而增加
三阴乳腺癌
肺癌
转移癌
3阴 - T2N1M0
2阴 - T2N1M0
3阴 - T2N1M0

图172

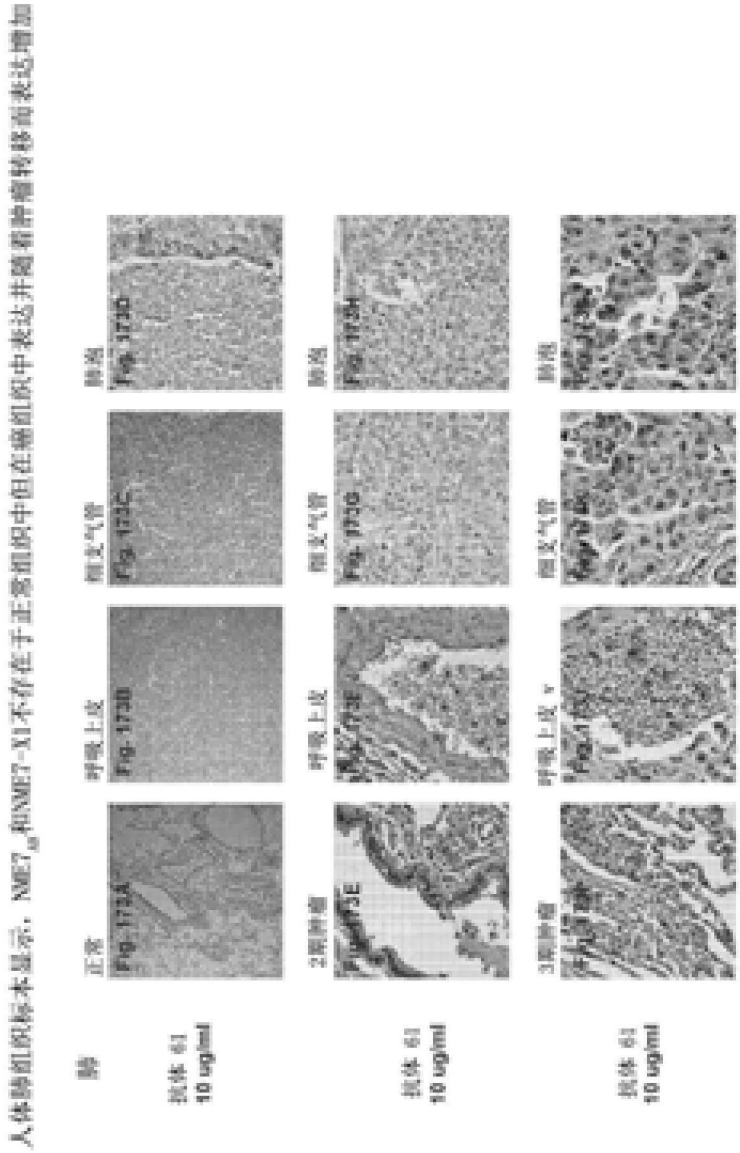

人体肺组织标本显示，NME7$_{AB}$和NME7-X1不存在于正常组织中但在癌组织中表达并随着肿瘤转移而表达增加
肺
正常
呼吸上皮
细支气管
肺泡
Fig. 1734
Fig. 1735
Fig. 1736
抗体 61
10 ug/ml
2期肿瘤
3期肿瘤

图173