

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



PCT



(10) 国际公布号

WO 2012/012941 A1

(43) 国际公布日
2012 年 2 月 2 日 (02.02.2012)

(51) 国际专利分类号:

C07D 209/58 (2006.01) C07C 13/547 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01) A61K 31/015 (2006.01)
C07D 409/12 (2006.01) A61K 31/403 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01) A61K 31/54 (2006.01)
C07D 411/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2010/075521

(22) 国际申请日: 2010 年 7 月 28 日 (28.07.2010)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 大连理工大学 (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国辽宁省大连甘井子凌工路 2 号化工学院, Liaoning 116024 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 张志超 (ZHANG, Zhichao) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号化工学院, Liaoning 116024 (CN)。 吴桂叶 (WU, Guiye) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号化工学院, Liaoning 116024 (CN)。 宋婷 (SONG, Ting) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号化工学院, Liaoning 116024 (CN)。

(74) 代理人: 大连理工大学专利中心 (PATENT CENTER OF DUT); 中国辽宁省大连甘井子区凌工路 2 号 103 室梅洪玉, Liaoning 116024 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: BCL-2 FAMILY PROTEIN INHIBITORS, THEIR CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPOUNDS, COMPLEXES, AND USES IN MANUFACTURE OF BCL-2 FAMILY PROTEIN INHIBITORS THEREOF

(54) 发明名称: BCL-2 家族蛋白抑制剂, 其环糊精包合物、配结物及其在制备 BCL-2 家族蛋白抑制剂中的应用

(57) Abstract: New Bcl-2 family protein inhibitors, their cyclodextrin inclusion compounds, cyclodextrin complexes, and the uses in the manufacture of BH3 analogs, Bcl-2 family protein inhibitors thereof are disclosed. The acenaphthoheterocycle compounds are obtained by introducing oxy-compounds, thio-compounds, carbonyl compounds, ester compounds or acyl compounds on the 3, 4, 6 positions of 8-oxo-8H-acenaphtho[1,2-b]pyrrole-9-carbonitrile respectively, or the 9-carbonitrile furthermore being substituted to obtain acid, ester, amine or amide compounds, and obtained by reacting the acenaphthylenequinone with the methylene derivatives. They can simulate BH3-only protein, competitively bind and antagonize Bcl-2 and Mcl-1 proteins in vitro or intracellular, thereby inducing cell apoptosis. Furthermore, the cyclodextrin inclusion compounds and complexes can improve the effects. They all can be used in the manufacture of anticancer compounds.

[见续页]

WO 2012/012941 A1



(57) 摘要:

本发明涉及一类新的 Bcl-2 家族蛋白抑制剂、其环糊精包合物和环糊精配结物以及它们在制备 BH3 类似物 Bcl-2 家族蛋白抑制剂中的应用。该茈并杂环类化合物是在 8-氧-8H-茈并 [1,2-b] 吡咯-9-腈的 3, 4, 6 位引入各种氧代物、硫代物、羰基、酯基、酰基化合物, 或进一步将 9-腈取代为酸、酯、胺、酰胺基化合物, 以及茈醌与亚甲基衍生物反应所得到的化合物。它模拟 BH3-only 蛋白, 在体外和细胞内竞争性结合和拮抗 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白, 从而诱导细胞凋亡作用, 其环糊精包合物和配结物能提高其作用, 它们均可被用于制备抗癌化合物。

说明书

Bcl-2家族蛋白抑制剂，其环糊精包合物、配结物及其在制备 **Bcl-2** 家族蛋白抑制剂中的应用

[1] 技术领域

[2] 本发明涉及一类新的 **Bcl-2** 家族蛋白抑制剂以及利用纳米技术制备的这类化合物的环糊精包合物或者配结物；并涉及这些化合物在体内、体外的模拟 **BH3-only** 蛋白，竞争性结合和拮抗 **Bcl-2** 和 **Mcl-1** 蛋白，从而诱导细胞凋亡作用和作为抗癌化合物的应用。

[3] 背景技术

[4] 分子靶向抗肿瘤药物正在成为继细胞毒剂类抗肿瘤药物之后，新药研发的热点和市场化的新生代产品。 **Bcl-2** 蛋白，是拮抗和逆转恶性肿瘤永生性的最重要的分子靶点。所以，特异性拮抗 **Bcl-2** 蛋白的药物，将通过专一诱导肿瘤细胞凋亡，最终实现高选择性、安全、高效、无毒副作用抗癌的目标。在 **Bcl-2** 抑制剂中，以高特异的 **BH3** 类似物（**BH3 mimetics**）的抗肿瘤效果最为显著，药效学活性最好，毒副作用最低。此外，还必须具备广谱拮抗 **Bcl-2** 家族蛋白的抗凋亡成员（包括 **Bcl-2** 和 **Mcl-1** 蛋白）的能力，才能实现单剂有效和低耐药。

[5] 但到目前为止，以 **Bcl-2** 为靶点的抗肿瘤药物尚无上市产品，仅有的 19 个临床前 **Bcl-2** 抑制剂中，有三个效果最优的分别处于临床 I, II, III 期。分别是：由美国伊利诺州阿伯特实验室研发的 **ABT-737**， **Gemin X** 公司研发的 **Obatoclax**（**GX15-070**），和美国 **Ascenta** 公司的 **AT-101**。它们都是 **BH3** 类似物，与 **Bcl-2** 蛋白的竞争结合常数达到 **nM** 级，远远高于其它 15 个同类分子。但是它们都存在不足：**Gossypol**， **Obatoclax** 的 **BH3** 类似程度不足，不是绝对的 **BH3** 类似物，也就是具有不依赖 **BAX/BAK** 的细胞毒性，说明存在其他的作用靶点，因此具有毒副作用。**ABT-737** 虽然是特异性最高的 **BH3** 类似物，但是不能拮抗和结合 **Mcl-1** 蛋白，不是广谱的 **Bcl-2** 家族蛋白抑制剂，因而严重限制了其适用的病种。

[6] 本发明人既往研究的成果中公开了一系列 8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯-9-腈的茚并杂环类化合物,并且这类化合物具有通过诱导细胞凋亡抑制肿瘤生长的活性(中国专利,授权公告号 CN1304370C)。然而,作为潜在的以凋亡为基础的抗肿瘤药物,其开发同样面对此类药物开发的难点:凋亡信号通路复杂及潜在的强烈的细胞毒性及其所必然导致的用药的盲目性,而这是导致该类药物的开发失败的重要原因。因此,研究中需要突出强调药物作用的靶向性。

[7] 另一方面,药物的理化性状是影响药效发挥的重要原因,也可能影响药物开发过程中对药效的准确评估。本发明的前期研究中就注意到此类问题。既往研究中的这些化合物的水溶性较差,严重的限制其研究和应用。

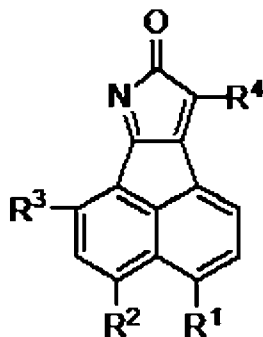
[8] 发明内容

[9] 本发明旨在获得靶向性更强的可作为 BH3 类似物的 Bcl-2 家族蛋白(包括 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白)抑制剂的化合物;在此基础上,结合现代纳米技术通过环糊精包合或者配结的手段,改善化合物的水溶性,提高生物利用度,以充分地开发此类化合物在作为靶向性抗肿瘤制剂方面的用途。

[10] 本发明所述的 Bcl-2 家族蛋白抑制剂具有如下的分子结构通式:

[11] 1、I 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂,其分子结构通式为:

[12]



[13] 其中:

[14] (I) $R^1 = \text{吡啶甲氨基或 } XR^5$, $R^2 = H$, $R^3 = H$, $R^4 = \text{CN、COOH、COOR}^6$ 或 CONHR^6 ;

[15] (II) $R^1 = H$, $R^2 = XR^5$, $R^3 = H$, $R^4 = \text{CN、COOH、COOR}^6$ 或 CONHR^6 ;

[16] (III) $R^1 = H$, $R^2 = H$, $R^3 = XR^5$, $R^4 = \text{CN}$;

[17] (IV) $R^1 = XR^5$, $R^2 = H$, $R^3 = XR^5$, $R^4 = \text{CN}$;

[18] (V) $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=H$, $R^4=CONHR^6$;

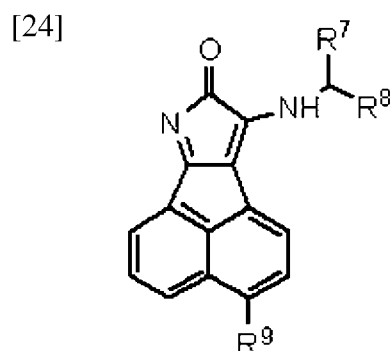
[19] 其中: 当 $X=O$ 、羰基、酯基、酰胺或磺酰胺时, $R^5=(CH_2)_nY$ 或 $(CH_2)_nAr-(o,m,p)Y$, $Y=C_2-C_8$ 直链烷基、 C_2-C_8 支链烷基、 C_1-C_8 直链卤代烷、 C_1-C_8 支链卤代烷、 C_1-C_8 直链胺、 C_1-C_8 支链胺、 C_1-C_8 直链醇、 C_1-C_8 支链醇、 C_1-C_8 直链酯、 C_1-C_8 支链酯、 C_1-C_8 直链羧酸或 C_1-C_8 支链羧酸, $n=0-4$;

[20] 当 $X=O$ 、羰基、酯基、酰胺或磺酰胺时, $R^6=C_1-C_6$ 直链烷基、 C_1-C_6 支链烷基、 C_1-C_6 直链卤代烷、 C_1-C_6 支链卤代烷、 C_1-C_6 直链胺、 C_1-C_6 支链胺、 C_1-C_6 直链醇、 C_1-C_6 支链醇、 C_1-C_6 直链酯、 C_1-C_6 支链酯、 C_1-C_6 直链羧酸、 C_1-C_6 支链羧酸或 $(CH_2)_nAr-(o,m,p)Z$; $Z=CH_3$ 、 C_2H_5 、 NO_2 、 Ph 、 F 、 Cl 、 Br 、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 或 $N(CH_3)_2$, $n=0\sim 4$ 。

[21] 当 $X=S$ 时, $R^5=(CH_2)_nY$ 或 $(CH_2)_nAr-(o,m,p)Y$, $Y=C_7-C_8$ 直链烷基、 C_7-C_8 支链烷基、 C_7-C_8 直链卤代烷、 C_7-C_8 支链卤代烷、 C_7-C_8 直链胺、 C_7-C_8 支链胺、 C_7-C_8 直链醇、 C_7-C_8 支链醇、 C_7-C_8 直链酯、 C_7-C_8 支链酯、 C_1-C_8 直链羧酸或 C_1-C_8 支链羧酸, $n=0-4$;

[22] 当 $X=S$ 时, $R^6=C_1-C_6$ 直链烷基、 C_1-C_6 支链烷基、 C_1-C_6 直链卤代烷、 C_1-C_6 支链卤代烷、 C_1-C_6 直链胺、 C_1-C_6 支链胺、 C_1-C_6 直链醇、 C_1-C_6 支链醇、 C_1-C_6 直链酯、 C_1-C_6 支链酯、 C_1-C_6 直链羧酸、 C_1-C_6 支链羧酸或 $(CH_2)_nAr-(o,m,p)Z$; $Z=CH_3$ 、 C_2H_5 、 NO_2 、 Ph 、 F 、 Cl 、 Br 、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 或 $N(CH_3)_2$, $n=0\sim 4$ 。

[23] 2、II 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂, 其分子结构通式为:

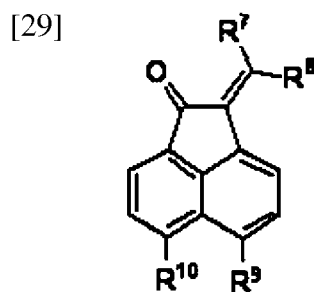


[25] 其中: $R^7=(CH_2)_nX$; $X=H$ 、 CN 、 NO_2 、 NH_2 、 $COOH$ 、 CHO 、 OH 或 SO_3H , $n=0-4$;

[26] $R^8 = (CH_2)_n Y$ 或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p) Y$; $Y = NO_2$ 、Ph、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 C_1-C_8 直链烷基、 C_1-C_8 支链烷基、 C_1-C_8 直链卤代烷、 C_1-C_8 支链卤代烷、 C_1-C_8 直链胺、 C_1-C_8 支链胺、 C_1-C_8 直链醇、 C_1-C_8 支链醇、 C_1-C_8 直链酯、 C_1-C_8 支链酯、 C_1-C_8 直链羧酸或 C_1-C_8 支链羧酸, $n = 0-4$;

[27] $R^9 = ZR^8$ 、H、四氢吡喃-4-氧基、四氢噻喃-4-氧基、噻吩甲氧基、噻吩甲氨基、吡啶甲氨基或硫吗啉基, $Z = O$ 、S、N、羰基、酯基、酰胺或磺酰胺;

[28] 3、III 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂, 其分子结构通式为:



[30] (I) $R^7 = (CH_2)_n X$, $R^8 = (CH_2)_n Y$ 或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p) Y$, $R^9 = ZR^8$ 、四氢噻喃-4-氧基、噻吩甲氧基、噻吩甲氨基、吡啶甲氨基或硫吗啉基, $R^{10} = H$;
 $n=0-4$

[31] (II) $R^7 = (CH_2)_n X$, $R^8 = (CH_2)_n Y$ 或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p) Y$, $R^9 = H$, $R^{10} = ZR^8$ 、四氢噻喃-4-氧基、噻吩甲氧基、噻吩甲氨基、吡啶甲氨基或硫吗啉基;
 $n=0-4$;

[32] (III) $R^9 = H$, $R^{10} = H$, R^7 与 R^8 不同时为 CN。

[33] 其中: $X = H$ 、CN、 NO_2 、 NH_2 、 $COOH$ 、CHO、OH 或 SO_3H ;

[34] $Y = CN$ 、 NO_2 、Ph、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 C_2-C_8 直链烷基、 C_2-C_8 支链烷基、 C_1-C_8 直链卤代烷、 C_1-C_8 支链卤代烷、 C_1-C_8 直链胺、 C_1-C_8 支链胺、 C_1-C_8 直链醇、 C_1-C_8 支链醇、 C_1-C_8 直链酯、 C_1-C_8 支链酯、 C_1-C_8 直链羧酸或 C_1-C_8 支链羧酸;

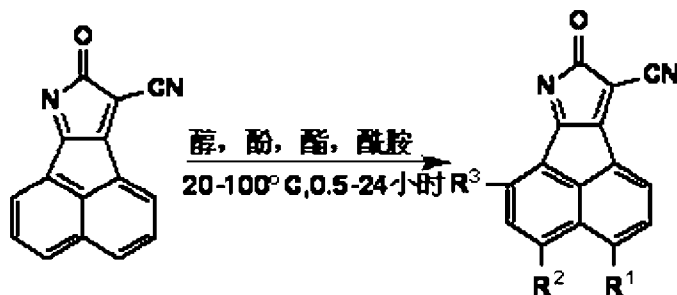
[35] $Z = O$ 、S、N、羰基、酯基、酰胺或磺酰胺;

[36] 本发明的化合物合成主要分为四种途径。

[37] 第一种合成途径是以 8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯-9-腈为原料, 与亲核试剂醇

，酚，酯，酰胺发生反应，温度为 $20 \sim 100^{\circ}\text{C}$ ，反应时间 $0.5 \sim 24$ 小时，反应完成后蒸出溶剂，柱层析得到 3- 取代，4- 取代、6- 取代或者 3,6- 位双取代的 8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈，腈基再经过水解，酯化，酰胺化得到 I 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂，反应式如下：

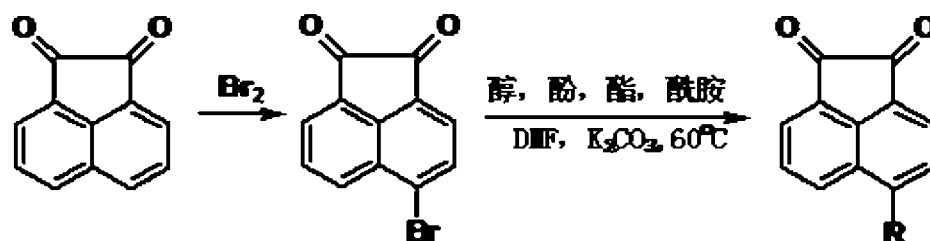
[38]



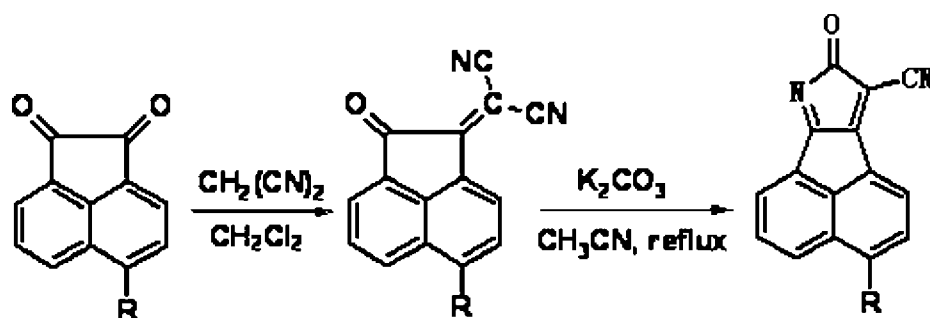
[39]

第二种合成途径是以茚醌为原料，加入液溴回流 2 小时，得到溴代茚醌。先用溴代茚醌与醇，酚，酯，酰胺反应得到相应的取代茚醌。取代茚醌与乙腈在硅胶弱酸性催化的条件下反应得到 3-（2- 氧代 -2 氢 - 茚）- 丙二腈之后，在 K_2CO_3 催化，乙腈回流 $0.5 \sim 6\text{h}$ 冷却后减压蒸除部分溶剂后，过滤或直接柱层析即可制得相应的产品；之后采用第一条合成路径的水解，酯化，酰胺化条件得到 I 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂，反应式如下：

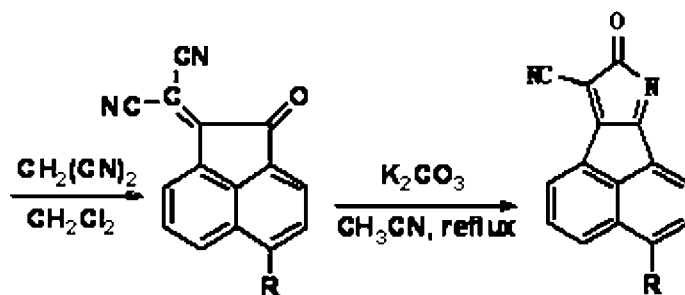
[40]



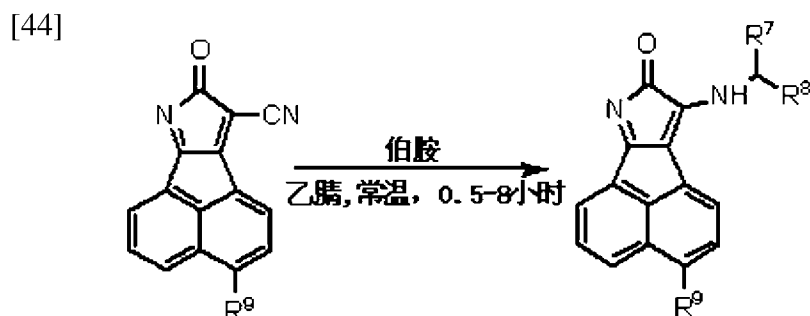
[41]



[42]

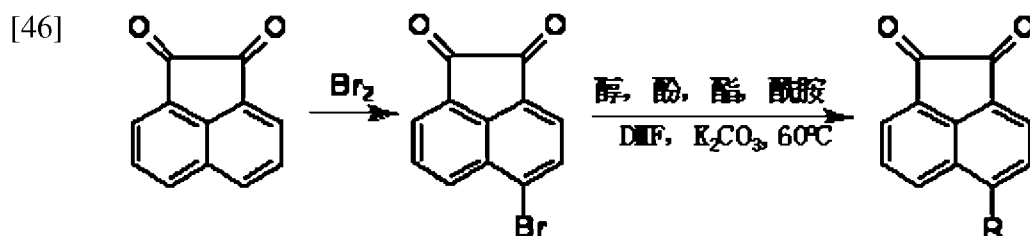


- [43] 第三种合成途径是以 I 类化合物为原料，以乙腈为溶剂，加入 5 倍摩尔量相应的伯胺，常温搅拌 0.5-8 小时。反应完成后，蒸出溶剂，柱层析即可得 II 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂。



反应式如下：

- [45] 第四种合成途径是以茚醌为原料，加入液溴回流 2 小时，得到溴代茚醌。先用溴代茚醌与醇，酚，酯，酰胺反应得到相应的取代茚醌。取代茚醌再与 $R^7CH_2R^8$ 反应，加入哌啶催化，乙醇作溶剂， 60°C 反应 1-20 小时。反应完成后，蒸出溶剂，柱层析分离得到 III 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂。反应式如下：



- [48] 对通过上述方法获得的化合物，我们通过多种手段检测了它们的 BH3 类似程度，以及它们对 Mcl-1 和 Bcl-2 的抑制作用。结果表明，本发明的上述茈并杂环类化合物具有极高的 BH3 类似程度，可以有效抑制 Mcl-1 和 Bcl-2 蛋白。基于此，该类化合物可用于制备 BH3 类似物 Bcl-2 家族蛋白抑制剂，并进一步用于制备靶向性高的抗肿瘤药物。
- [49] 研究中还发现，水溶性较差是本发明的上述茈并杂环类化合物的突出问题，严重限制其研究及应用。参考现代药物制剂技术（环糊精化学 -- 制备与应用，化学工业出版社，2009； β -环糊精包合技术及应用，医学创新研究，2006，3（3）：31-33；*Chem. Pharm. Bull.*，2006，54（1）26-32），本发明的另一项内容在于利用环糊精包合或配结此类化合物，形成包合物或配结物，从而改善其水溶性，提高生物利用度。
- [50] 本发明所述的上述茈并杂环类化合物的环糊精包合物是由下述方法制备：
- [51] ① 称取环糊精，加入水中，加热搅拌使其成为饱和溶液，所述的环糊精为 β -环糊精、 γ -环糊精、2-羟丙基- β -环糊精或甲基- β -环糊精；
- [52] ② 称取待包合的茈并杂环类化合物，该化合物与环糊精的摩尔比为 1 : 3 ~ 10；
- [53] ③ 将待包合的茈并杂环类化合物以 5 ~ 10 mg/mL 的浓度溶于丙酮，将所得溶液以线状逐滴加入到环糊精的水溶液中，40 ~ 65 °C，加热搅拌，有沉淀析出；
- [54] ④ 将上述溶液过滤，用蒸馏水洗涤滤饼，再用丙酮洗去游离状态的化合物，真空干燥，得到权利要求 1 的茈并杂环类化合物的环糊精包合物。
- [55] 本发明所述的上述茈并杂环类化合物的环糊精配结物是由下述方法制备：
- [56] ① 称取干燥的环糊精及待配结的茈并杂环类化合物，环糊精与该化合物的摩尔比为 1 : 1.5 ~ 3；所述的环糊精为 β -环糊精、 γ -环糊精、2-羟丙基- β -环糊精或甲基- β -环糊精；
- [57] ② 将待配结的茈并杂环类化合物与 N,N'-羰基二咪唑以 1 : 1 ~ 2 的摩尔比混合后溶解到 DMSO 中，使待配结的茈并杂环类化合物在 DMSO 溶液中的浓度为 0.2 ~ 0.5 mmol /mL，常温搅拌 30 ~ 60 分钟；

- [58] ③往上述 DMSO 溶液中加入步骤 ①所称取的环糊精及 0.1 ~ 0.3 mmol/mL 的三乙醇胺，常温反应 18 ~ 24 小时；
- [59] ④往步骤 ③的反应体系中加入 0.50 ~ 1.0mg/mL 的丙酮，减压析出沉淀；
- [60] ⑤过滤，沉淀经纯化得权利要求 1 的茈萘杂环类化合物的环糊精配结物。
- [61] 该纯化可以采用离子交换柱进行，条件为采用 Diaion™ HP-20 离子交换树脂做吸附剂，解析采用甲醇与水的混合溶剂。逐渐增大混合溶剂中甲醇的比例，淋洗过程用薄层色谱检测。当洗脱剂中甲醇所占比例达到 40 ~ 55% 时配结物部分被淋洗得到。将所得淋洗液中的甲醇减压旋干之后，剩余溶液冷冻干燥得到配结物。
- [62] 本发明采用相溶解度法、荧光光谱法、圆二色谱法、红外光谱法、热重分析、扫描电镜和 ¹H 核磁、质谱以及 X 单晶衍射等表征手段对所得到的茈萘杂环类化合物的环糊精包合物或配结物进行表征，并对比检测了包合或配结前后茈萘杂环类化合物的溶解度以及对 Mcl-1 和 Bcl-2 的抑制作用的对比，结果表明：环糊精包合或配结的处理方法大大提高了茈萘杂环类化合物在水中的溶解度，并且在一定程度上提高了抑制 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白的能力。该制剂也可用于制备 BH3 类似物类 Bcl-2 家族蛋白抑制剂，并进一步用于制备靶向性高的抗肿瘤药物。
- [63] 因此，本发明的另一目的是公开上文所述的 Bcl-2 家族蛋白抑制剂、该类化合物的环糊精包合物以及配结物在制备 BH3 类似物 Bcl-2 家族蛋白抑制剂中的应用。
- [64] 上述的 Bcl-2 家族蛋白抑制剂或相应的抗肿瘤药物可以是化合物的单质制剂、化合物的环糊精包合物或配结物制剂，或者是有效量的所述 Bcl-2 家族蛋白抑制剂化合物或其环糊精包合物、配结物与适量的药用辅剂混合形成的组合物。并可以根据药用需要，根据现有技术中的制剂方法将其制成需要的剂型。
- [65] 附图说明
- [66] 附图 1 是化合物在细胞水平上干扰 Bcl-2/Bax 之间相互作用结果示图（不同浓度）；
- [67] 附图 2 是化合物在细胞水平上干扰 Bcl-2/Bax 之间相互作用结果示图（不同作

用时间)；

[68] 附图 3 是化合物依赖 BAX/BAK 的细胞毒性实验结果 (Gossypol 为非特异性对照)；

[69] 附图 4 是化合物对 Mcl-1 抑制作用 Western 印记检测电泳图；

[70] 附图 5 是化合物对 Bcl-2 抑制作用 Western 印记检测电泳图；

[71] 附图 6 是比较茚并杂环类化合物及其环糊精包合物和配结物对 Mcl-1 和 Bcl-2 的抑制作用的 Western 印记检测电泳图；

[72] 附图 7 是对比化合物和包合物在肿瘤模型动物体内对 Mcl-1 和 Bcl-2 的抑制作用的 Western 印记检测电泳图，其中：1 空白对照组；2 对照组 = 1 * GB3 ①；3 对照组 = 2 * GB3 ②，4 实验组 = 1 * GB3 ①；5 实验组 = 2 * GB3 ②；6 实验组 = 3 * GB3 ③；7 实验组 = 4 * GB3 ④。

[73] 具体实施方式

[74] 下面以具体实施例的方式对本发明的内容做进一步的说明。

[75] 第一部分：**Bcl-2** 家族蛋白抑制剂 化合物制备及其表征实施例；

[76] 实施例 1: 3- (4- 异丙基苯氧基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈的合成及表征

[77] 50 毫升乙腈中加入 1 克 8- 氧 -8*H* 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈，0.54 克对异丙基苯酚，回流 3 小时，蒸出溶剂，层析柱分离得产品 3- (4- 异丙基苯氧基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈，收率 30%。

[78] 结构表征：M.p. 272-274°C；¹H NMR (400M, CDCl₃)：δ 8.92 (d, J=8.0 Hz, 1H), 8.25 (d, J=8.8 Hz, 2H), 8.44 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.86 (t, J=8.0 Hz, 1H), 7.38 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.14 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.04 (d, J=8.8 Hz, 1H), 3.01 (m, 1H), 1.32 (d, J=8.0 Hz, 6H)；TOF MS EI⁺(m/z): C₂₄H₁₆N₂O₂，计算值：364.1212，实测值：364.1215。

[79] 实施例 2：3- (4- 特戊基苯氧基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈 (A) 和 4- (4- 特戊基苯氧基) 苯氧基 -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈 (B) 的合成及表征

[80] 称取 1.04g 对特戊基苯氧基茚酮，0.3g 丙二腈用二氯甲烷溶解之后，加入硅胶

柱中，快速淋洗，过柱完毕之后旋干得红色固体。称重 1.10g，产率 93%。取 0.69g 3- 苯氧基 - (2- 氧代 -2 氢 - 苄) - 丙二腈，加入 0.08g K_2CO_3 ，20ml 乙腈加热回流 3 小时，反应完毕之后旋干反应液。层析柱分离 (CH_2Cl_2 : 石油醚 =1 : 1) 得到橙红色固体，核磁检验同分异构体比例 1 : 0.4。利用制备液相分离的到两种同分异构体。

- [81] 第一组分 A: M.p. 268-270°C; 1H NMR (400M, $CDCl_3$): δ 8.93 (d, J=7.6 Hz, 1H), 8.61 (d, J=8.0 Hz, 1H), 8.42 (d, J=7.6 Hz, 1H), 7.87 (t, J=8.0 Hz, 1H), 7.48 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.16 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.04 (d, J=8.0 Hz, 1H), 1.71 (d, J=8.0 Hz, 2H), 1.35 (s, 6H), 0.75 (t, J=8.0 Hz, 3H); TOF MS $EI^+(m/z)$: $C_{26}H_{20}N_2O_2$, 计算值: 392.1525, 实测值: 392.1529。
- [82] 第二组分 B: M.p. 285-287°C; 1H NMR (400M, $CDCl_3$): δ 8.86 (d, J=7.6 Hz, 1H), 8.62 (d, J=8.0 Hz, 1H), 8.45 (d, J=7.6 Hz, 1H), 7.92 (t, J=8.0 Hz, 1H), 7.45 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.13 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.02 (d, J=8.0 Hz, 1H), 1.70 (d, J=8.0 Hz, 2H), 1.34 (s, 6H), 0.75 (t, J=8.0 Hz, 3H); TOF MS $EI^+(m/z)$: $C_{26}H_{20}N_2O_2$, 计算值: 392.1525, 实测值: 392.1531。
- [83] 实施例 3: 6- (4- 丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈的合成及表征
- [84] 50mL 乙腈中加入 1g 8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈, 2.64g 对丙基苯硫酚, 常温反应 3 小时, 蒸出溶剂, 层析柱分离得化合物 6- (4- 丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈, 收率 32%。
- [85] 结构表征: M.p. 257-259°C; 1H NMR (400M, $CDCl_3$): δ 8.32 (d, J=8.8Hz, 1H), 8.11 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.95 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.85 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.57 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.50 (t, J=8.4Hz, 1H), 7.06 (d, J=8.4Hz, 2H), 2.62 (t, J=8.0Hz, 2H), 1.65 (m, 2H), 0.91 (t, J=8.0Hz, 3H); TOF MS $EI^+(m/z)$: $C_{24}H_{16}N_2OS$, 计算值: 380.0983, 实测值: 380.0987。
- [86] 实施例 4: 3-(吡啶 -2- 甲氨基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈的合成及表征
- [87] 50 毫升乙腈中加入 1 克 8- 氧 -8H 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈, 0.48 克 2- 氨基甲基吡

啖，回流搅拌 8 小时，蒸出部分溶剂，层析柱分离得产品 3- (吡啶 - 2- 基氨基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈，收率 50%。

[88] 结构表征： M.p. 290-292°C； ^1H NMR (400M, CDCl_3) : δ 8.64 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.82 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.55 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.19 (d, 1H), 6.50 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.65 (d, 2H), 4.0 (t, 1H) ; TOF MS $\text{EI}^+(\text{m/z})$: $\text{C}_{21}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$, 计算值 : 336.1011 , 实测值 : 336.3462 。

[89] 实施例 5 : 3,6- 二 (4- 仲丁基苯硫基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈的合成及表征

[90] 50mL 乙腈中加入 1.0 克 8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈， 2.9 克对仲丁基苯硫酚，常温反应 30 小时，蒸出部分溶剂，层析柱分离得化合物 3,6- 二 (4- 仲丁基苯硫基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈，收率 20%。

[91] 结构表征： M.p. 268-269°C ; ^1H NMR (400M, CDCl_3): δ 8.12 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.60 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.51 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 4H), 7.48 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.23 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.08 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 4H), 2.55 (m, 2H), 1.52 (m, 4H), 1.25 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 6H), 0.78 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 6H) ; TOF MS $\text{EI}^+(\text{m/z})$: $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{OS}_2$, 计算值 : 558.1800 , 实测值 : 558.1803 。

[92] 实施例 6 : 3- 己氧基 -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 甲酸的合成及表征

[93] 在 50ml 单口烧瓶中，加入 60ml 浓硫酸，在 0 ~ 5 °C 下，分批加入 1.15 克的 3- 己氧基 -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈， 1 小时内加完，加完后在室温继续反应 18 小时，反应混合物为粘稠的深棕红色。然后小心缓慢的将其滴入碎冰中，同时剧烈搅拌，滴完后静置，滤饼用大量水洗涤，直至滤饼呈中性，滤饼干燥后得深黄色产品。产率 90%。

[94] 结构表征： M.p. 235-237°C ; ^1H NMR (400M, CDCl_3): δ 11.0 (s, 1H), 8.55 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 8.45 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 8.01 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.71 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.561 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 4.10 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.75 (m, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.31 (m, 2H), 1.29 (m, 2H), 0.89 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H) ; TOF MS $\text{EI}^+(\text{m/z})$: $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_4$, 计算值 : 349.1314 , 实测值 : 349.1316 。

[95] 实施例 7: 3- (4- 异丁基 苯氧基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 甲酸乙酯的合成及表征

[96] 在 100ml 单口烧瓶中, 依次加入 3.78 克 3- (4- 异丁基 苯氧基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈, 50ml 乙腈做溶剂, 2.76克的碳酸钾做缚酸剂, 过量 10 倍的碘甲烷, 氮气保护下, 加热至 42 °C 反应 18 小时。减压蒸去乙腈, 加入二氯甲烷使反应物充分溶解, 过滤之后旋干滤液, 得黄棕色粗产品。硅胶柱层析分离, 展开剂: 二氯甲烷 - 甲醇 (40: 1), 得深黄色产品。产率 85%。

[97] 结构表征: M.p. 215-216°C; ¹H NMR (400M, CDCl₃): δ 8.45 (d, J=8.0Hz, 1H), 8.35 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.85 (t, J=8.0Hz, 1H), 7.68 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.36 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.23 (d, J=8.8Hz, 2H), 6.50 (d, J=8.4Hz, 1H), 2.45 (d, J=8.4Hz, 2H), 0.93 (m, 1H), 1.85 (d, J=8.4Hz, 6H); TOF MS EI⁺(m/z): C₂₇H₂₃NO₄, 计算值: 425.1627, 实测值: 425.1635。

[98] 实施例 8: 9- (正丁胺基) -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -8- 酮的合成及表征

[99] 50 毫升乙腈中加入 1 克 8- 氧 -8*H* 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈, 2.2 毫升正丁胺, 常温反应 1 小时。反应完成后, 减压蒸出部分溶剂, 层析柱分离得产品 9- (正丁胺基) -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -8- 酮, 收率 25%。

[100] 结构表征: M.p. 265-266°C; ¹H NMR (400M, CDCl₃): δ 8.42 (d, J=8.0 Hz, 1H), 8.35 (d, J=8.0 Hz, 1H), 8.04 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.82 (t, J=8.0 Hz, 1H), 7.78 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.54 (t, J=8.4 Hz, 1H), 2.87 (t, J=8.4 Hz, 2H), 2.01 (br, 1H), 1.52 (m, J=8.4 Hz, 2H), 1.31 (m, J=8.4 Hz, 2H), 0.90 (t, 3H); TOF MS EI⁺(m/z): C₁₈H₁₆N₂O, 计算值: 276.1263, 实测值: 276.1266。

[101] 实施例 9: 3- 乙氧基 -9- (3- 苯基丙胺基) -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -8- 酮的合成及表征

[102] 50 毫升乙腈中加入 0.82 克 3- 乙氧基 -8- 氧 -8*H* 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈, 2.3 毫升 3- 苯基丙胺, 常温反应 2 小时。反应完成后, 减压蒸出部分溶剂, 层析柱分离得到产品 3- 乙氧基 -9- (3- 丙基丙胺基) -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -8- 酮, 收率 30%。

[103] 结构表征: M.p. 272-273°C; ¹H NMR (400M, CDCl₃): δ 8.55 (d, J=8.0 Hz, 1H),

8.42 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.82 (t, J=8.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.41 (t, J=8.4 Hz, 2H), 7.30 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.28 (t, J=8.4 Hz, 1H), 6.60 (d, J=8.4 Hz, 1H), 4.62 (q, J=7.6Hz, 2H), 2.87 (t, J=8.4 Hz, 2H), 2.62 (t, J=8.4 Hz, 2H), 2.09 (m, J=8.4 Hz, 2H), 2.01 (br, 1H), 1.31 (t, J=7.6 Hz, 3H); TOF MS EI⁺(m/z): C₂₄H₂₀N₂O₂, 计算值: 368.1525, 实测值: 368.1529。

[104] 实施例 10: 乙基 -2- 氰基 -2- (6- (4- 异丙基苯氧基) -2- 萘酮 -1-2H- 亚甲基) - 酯

[105] 在 25 毫升单口烧瓶中加入 0.63 克 4- 异丙基苯氧基萘醌, 0.4 毫升氰基乙酸乙酯, 80 微升哌啶催化, 10 毫升乙醇作溶剂。60 °C 反应 24 小时。反应完成后, 旋干反应液。层析柱分离 (CH₂Cl₂: 石油醚 = 1: 1) 得到产品 乙基 -2- 氰基 -2- (6- (4- 异丙基苯氧基) -2- 萘酮 -1-2H- 亚甲基) - 酯, 称重 0.58g, 产率 70% 产率。

[106] 结构表征: M.p. 222-223°C; ¹H NMR (400M, CDCl₃): δ 8.45 (d, J=8.0 Hz, 1H), 8.22 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.86 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.46 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.31 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.71 (t, J=8.4 Hz, 1H), 6.74 (d, J=8.4 Hz, 1H), 4.22 (q, J=7.6Hz, 2H), 2.87 (m, J=8.4 Hz, 1H), 1.29 (t, J=8.4 Hz, 3H), 1.20 (d, J=8.4 Hz, 6H); TOF MS EI⁺ (m/z): C₂₆H₂₁NO₄, 计算值: 411.1417, 实测值: 411.1422。

[107] 实施例 11: 2- (6- (4- 氨基苯氧基) -2- 萘酮 -1-2H- 亚甲基) -N- 苯基 -3- 氧代丙酰胺

[108] 在 25 毫升单口烧瓶中加入 0.58 克 4- 氨基苯氧基萘醌, 0.53 克 N- 苯基 -3- 氧代丙酰胺基乙酸乙酯, 80 微升哌啶催化, 10 毫升乙醇作溶剂。60 °C 反应 20 小时。反应完成后, 旋干反应液。层析柱分离 (CH₂Cl₂: 石油醚 = 2: 1) 得到产品 2- (6- (4- 氨基苯氧基) -2- 萘酮 -1-2H- 亚甲基) -N- 苯基 -3- 氧代丙酰胺, 称重 0.49g, 产率 55%。

[109] 结构表征: M.p. 251-253°C; ¹H NMR (400M, CDCl₃): δ 10.32 (s, 1H), 8.43 (d, J=8.0 Hz, 1H), 8.21 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.23 (br, 1H), 7.86 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.71 (t, J=8.4 Hz, 1H), 7.35 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.30 (q, J=8.0Hz, 1H), 7.20 (d, J=8.0 Hz, 2H), 6.78 (d, J=8.4 Hz, 2H), 6.75 (d, J=8.4 Hz, 1H), 6.70 (d, J=8.4 Hz, 2H),

6.23 (br, 2H) 4.32 (s, 2H) ; TOF MS EI⁺(m/z): C₂₈H₂₀N₂O₂ , 计算值 : 448.1423 , 实测值 : 448.1429 。

- [110] 第二部分: **Bcl-2** 家族蛋白抑制剂 化合物环糊精包合物、配结物的制备及其表征实施例;
- [111] 本部分内容包括茚并杂环类化合物环糊精包合物、配结物的制备及对产物的表征, 所采用的表征手段包括紫外光谱、荧光光谱、圆二色光谱、红外光谱、核磁、热失重分析及 SEM。如无特殊说明, 本部分涉及的仪器及其检测方法参考来源如下:
- [112] 相溶解度图: 按照文献 J. Agric. Food Chem., 2007, 55 (9), 3535-3539 的方法绘制相溶解度图。
- [113] 紫外光谱: HP8453 (美国); 检测方法参考文献 Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 173 (2005) 319-327 。
- [114] 荧光光谱: PTI-700 (美国); 检测方法参考文献 J Fluoresc (2008) 18:1103-1114 。
- [115] 圆二色光谱: J-810 (日本); 检测方法参考文献 J. Phys. Chem. B, 2006, 110 (13), 7044-7048 。
- [116] 红外光谱: FT/IR-430 (日本); 检测方法参考文献 Mol. Pharmaceutics, 2008, 5 (2), 358-363 。
- [117] 热失重分析: TGA/SDT851e (瑞士); 检测方法参考文献 Mol. Pharmaceutics, 2008, 5 (2), 358-363 。
- [118] SEM: JSM-5600LV (日本); 检测方法参考文献 J. Med. Chem. 2003, 46, 4634-4637 。
- [119] ¹H 核磁: Bruker AvanceII400M (瑞士); 检测条件为: (溶剂 CDCl₃ , D₂O , 400MHz) 。
- [120] 质谱: GC-Tof MS (英国); 检测方法参考文献 J. Org. Chem. 2000, 65, 9013-9021 。
- [121] X 单晶衍射: XD-3A (日本); 检测方法参考文献 J. Org. Chem. 2008, 73, 8305-8316 8305 。

- [122] 实施例 12：3-(4-异丙基苯氧基)-8-氧-8*H*-苕并[1,2-*b*]吡咯-9-腓 β -环糊精包合物的制备及表征
- [123] 首先称取将经过二次重结晶并充分干燥的 β -环糊精 1.85g (1.63 mMol)，加入 100mL 水，加热并搅拌使其溶解。称取待测化合物 0.196g (0.54 mMol)，用 30mL 丙酮溶解之后，以线状逐滴加入到 β -环糊精的水溶液中，60 °C 加热搅拌 3 天后，有沉淀析出，过滤，用少量蒸馏水洗涤滤饼之后，再用少量的丙酮洗去游离状态的化合物，真空下 50 °C 干燥 24 小时，得到淡红色固体。
- [124] 紫外吸收检测结果表明，随着 β -环糊精浓度的逐渐增大化合物的紫外吸收值逐渐增大，其溶解度逐渐增大，表示包合物的形成。
- [125] 由相溶解度图结果可知：化合物的溶解度由原来的 0.35 μ M 增加到 0.65 μ M，提高 1.8 倍。
- [126] 荧光光谱检测结果显示：固定待测化合物的浓度不变，荧光值随着 β -环糊精浓度的逐渐增大而增大。荧光发射波长不变，但是强度增大，原因化合物进入环糊精空腔之后，空腔环境的变化，保护了处于激发态的化合物分子，使之不与大体积分子和淬灭剂接触，这种荧光光谱的变化表明了化合物与 β -环糊精生成了包合物。
- [127] 圆二色光谱检测结果显示：在 β -环糊精存在的情况下，待测化合物的诱导圆二色在 265 nm 到 385 nm 有一个强的正 cotton 效应的峰，以及在 420 nm 到 510 nm 处有一个弱的 cotton 效应的正峰，这说明化合物进入环糊精的手性空腔之后，产生了诱导圆二色效应，表明了包合物的形成。
- [128] 红外光谱检测结果显示： β -环糊精在 3410.18 和 1029.22 cm^{-1} 有强的吸收带，同时在 579 ~ 911 cm^{-1} 处有一系列的指纹区特征峰。化合物在 2217.55 cm^{-1} 和 1624.08 cm^{-1} 有两个尖锐的特征吸收峰。红外谱图中 2218.13 cm^{-1} 和 1624.48 cm^{-1} 特征吸收峰强度变小，及轻微的位移，同时在 1706 cm^{-1} 出现的一个新的尖峰，表明了包合物的形成。
- [129] ^1H 核磁检测结果显示： β -环糊精的特征峰在 3.32-5.85 ppm，化合物芳香氢的特征峰在 8.92-7.04 ppm。而包合物中出现了 β -环糊精和化合物的特征峰，同时化合物芳香氢特征峰向高场位移了 0.11 ppm，说明了包合物的形成。另外，化

合物芳香氢与 β -环糊精的 C1-H 的比例为 1 : 7.2。由于每个 β -环糊精中含有 6 个 C1-H，所以其包含模式为 1:1。

[130] 热失重分析检测结果显示： β -环糊精在 298 °C 出现拐点，开始降解。而包合物在 271 °C 即出现拐点，开始降解，不同于 β -环糊精，表明了包合物的形成。环糊精的含量为 75.9%，所以其包含模式为 1:1。

[131] SEM 结果显示：3-(4-异丙基苯氧基)-8-氧-8*H*-茕并[1,2-*b*]吡咯-9-腈化合物为针状外形， β -环糊精为较大的方砖状，化合物与 β -环糊精物理混合 SEM 图是针状与方砖状的混合外形，而化合物- β -环糊精包合物的表面形貌明显不同于以上三者，其外形为规整的菱形。从外形结构的明显不同可以看出包合物的形成。

[132] 其他包合物的制备及表征：

[133] 采用与实施例 12 相同的方法，利用不同类型环糊精包合同系列的其他化合物；同样采用紫外、荧光光谱、圆二色光谱、红外光谱、核磁、热失重分析及 SEM 对产物进行了表征，证明了包合物的形成，并通过相溶解度实验检测对比包合前后化合物与其包合物溶解度的变化。具体结果如表 1 所示。从下表 1 的检测结果可以看出，不同类型的环糊精包合的茕并杂环类化合物在水中的溶解度较化合物本身均大大提高。

[134]

被包含 Bcl-2 家族 蛋白抑制剂化合物 名称	环糊精	化合物 溶解度 (μM)	包合物 溶解度 (μM)
3- (4- 异丙基苯氧 基) -8- 氧 -8 <i>H</i> - 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	β - 环糊精	0.35	0.75
3- (4- 特戊基苯 氧基) -8- 氧 -8 <i>H</i> - 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	β - 环糊精	0.49	0.80
3- (对异丙基苯硫 基) -8- 氧 -8 <i>H</i> - 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	β - 环糊精	0.39	0.69
9- (正丁胺基) -8 <i>H</i> - 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -8- 酮	β - 环糊精	0.68	0.81
9- (1- 羟基丁胺 基) -8 <i>H</i> - 茚并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮	β - 环糊精	0.41	0.87
3- (4- 异丙基苯氧 基) -8- 氧 -8 <i>H</i> - 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	γ - 环糊精	0.33	0.72
3- (4- 特戊基苯 氧基) -8- 氧 -8 <i>H</i> -	γ - 环糊精	0.50	0.70

茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈			
3- (对异丙基苯硫 基) -8- 氧 -8H- 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	γ - 环糊精	0.39	0.61
9- (正丁胺基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -8- 酮	γ - 环糊精	0.44	0.85
9- (1- 羟基丁胺 基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮	γ - 环糊精	0.41	0.89
9- (1- 羟基丁胺 基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮	γ - 环糊精	0.45	0.90
3- (4- 异丙基苯氧 基) -8- 氧 -8H- 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	2- 羟丙基 - β - 环糊 精	0.39	0.86
3- (4- 特戊基苯 氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	2- 羟丙基 - β - 环糊 精	0.29	0.75
3- (对异丙基苯硫 基) -8- 氧 -8H- 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	2- 羟丙基 - β - 环糊 精	0.33	0.78

9- (正丁氨基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -8- 酮	2- 羟丙基 - β - 环糊 精	0.39	0.90
9- (1- 羟基丁胺 基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮	2- 羟丙基 - β - 环糊 精	0.41	0.90
9- (1- 羟基丁胺 基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮	甲基 - β - 环糊精	0.31	0.53
3- (4- 异丙基苯氧 基) -8- 氧 -8H- 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -9- 脲	甲基 - β - 环糊精	0.38	0.90
3- (4- 特戊基苯 氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 脲	甲基 - β - 环糊精	0.29	0.56
3- (对异丙基苯硫 基) -8- 氧 -8H- 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -9- 脲	甲基 - β - 环糊精	0.33	0.60
9- (正丁氨基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -8- 酮	甲基 - β - 环糊精	0.39	0.62
9- (1- 羟基丁胺 基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮	甲基 - β - 环糊精	0.41	0.65

[135] 实施例 13: γ -环糊精与 3-己氧基-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸配结物的制备及表征:

[136] 将 3-己氧基-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸 (0.261 g, 0.75 mmol) 和 N,N'-羰基二咪唑 (0.179 g) 溶解到 3 mL 的 DMSO 中, 然后常温搅拌 30 分钟之后, 加入 γ -环糊精 (0.6485 g, 0.5 mmol) 及 4 mL 的三乙醇胺。常温反应 20 小时。反应完毕之后, 加入约 180 mL 的丙酮于反应液, 减压使析出沉淀。所得沉淀用离子交换柱提纯, 所得产品再用甲醇与水的混合溶剂洗涤, 溶液冻干得到 0.281 g 的 3-己氧基-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸/ γ -环糊精配结物。产率 35%。

[137] ^1H 核磁及质谱检测结果显示: ^1H NMR (400M, $\text{D}_2\text{O}-d_6$): δ (ppm) 8.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.85 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.11 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.03 (m, 8H), 3.83 (m, 8H), 3.80 (m, 8H), 3.74 (m, 8H), 1.76 (m, 2H), 3.59 (m, 8H), 3.52 (m, 8H), 1.32-1.42 (m, $(\text{CH}_2)_3$, 6H), 0.86 (t, $J = 8.4$ Hz, 3H); (ESI) m/z ($M+H$)- (1627+1 m/z)。

[138] X 单晶衍射表征结果显示: γ -环糊精在 12° 和 $15 \sim 23^\circ$ 之间有一系列的尖峰出现, 化合物 3-己氧基-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸只在 11° 和 7° 处有尖峰。而配结物在 11° 处的尖峰消失, 在 6° 有一个新的尖峰, 在 $14 \sim 18^\circ$ 以及 $20 \sim 25^\circ$ 出现一系列的尖峰。相对于化合物与环糊精而言, 配结物中有新的尖峰出现, 表明了配结物的形成。

[139] 化合物 3-己氧基-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸与 γ -环糊精配结之后, 在水中的溶解度明显增大。相溶解度曲线拟合曲线方程为 $Y = 0.69 + 0.15 \times X$ 。3-己氧基-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸在水中的溶解度由原来的 $0.69 \mu\text{M}$ 增加到 $12.5 \mu\text{M}$, 提高了 18.1 倍。

[140] 其他配结物的制备及表征:

[141] 采用与实施例 13 相同的方法, 利用不同类型环糊精配结同系列的其他化合物; 同样采用 ^1H 核磁、质谱和 X 单晶衍射对产物进行了表征, 证明了配结物的形成, 并通过相溶解度实验检测对比配结前后化合物与其配结物溶解度的变化。

具体结果如表 2 所示。

[142] 从下表 2 的检测结果可以看出，不同类型的环糊精配结的茚并杂环类化合物在水中的溶解度较化合物本身均大大提高。表 2

[143]

待配结的 Bcl-2 家族蛋白抑制剂化合物名称	环糊精	化合物溶解度 (μM)	包合物溶解度 (μM)
3- 己氧基 -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 甲酰胺	γ - 环糊精	0.53	4.42
3- (4- 异丙基苯 硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 甲酸	γ - 环糊精	0.43	4.65
3- (4- 异丙基苯 氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 甲酰胺	γ - 环糊精	0.50	4.82
3- 己氧基 -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 甲酰胺	2- 羟丙基 - β - 环糊精	0.51	4.95
3- (4- 异丙基苯 硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 甲酸	甲基 - β - 环糊精	0.54	2.41

[144] 第三部分：**Bcl-2** 家族蛋白抑制剂化合物、其环糊精包合物、配结物的理化活性检测

[145] 实施例 14：通过荧光偏振分析法检测化合物的 **BH3** 类似程度

- [146] 合成一个 21 个氨基酸的 Bid BH3 肽段（氨基酸： 79-99 : QEDIIRNIARHLAQVGDSMDR），并在 N 端标记上 6- 羧基荧光素琥珀酰亚胺酯（FAM）作为荧光标签（FAM-Bid）。竞争结合实验中所用的反应体系为 GST-Bcl-2 蛋白（40nM）或 Mcl-1 蛋白，和 FAM-Bid 多肽（5nM）溶于反应缓冲液中（100mM K₃PO₄, pH 7.5; 100μg/ml 牛 γ 白蛋白； 0.02% 叠氮化钠）。在 96 孔板中，每孔加入 100μL 反应体系，然后加入 1μL 不同浓度的溶于 DMSO 的待检测化合物 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈母液至实验设计所需终浓度。同时设立对照组，反应体系中只含有 Bcl-2 或 Mcl-1 和 FAM-Bid(相当于 0% 抑制率)。96 孔板经过 4 个小时的避光孵育后，进行酶标仪上检测。荧光极化值（mP）在由 530nm 波长激发产生的 485nm 发射波长下测量。竞争结合常数（K_i）值根据计算公式推导得出。该化合物与 Bcl-2 蛋白的竞争结合常数为 20nM。
- [147] 按照上述相同的试验方法检测其他 9 个化合物的 BH3 类似程度，它们与 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白的结合常数（表 3 中简称结合常数）也在 nM 级，具体结果如下表 3 所示。
- [148]

化合物名称	结合常数 (nM)
3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	20
3- (4- 特戊基苯氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	11.0
3- (对异丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	23.0
6- (4- 丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	9.0
3-(吡啶 -2- 甲氨基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	14.0
3,6- 二 (4- 仲丁基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	540.0
9- (正丁胺基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮的合成及表征	89.0
3- (4- 异丁基 苯氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 甲酸乙酯	57.0
3- 乙氧基 -9- (3- 苯基丙胺基) -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮	460.0

[149] 实施例 15：活细胞内荧光偏振能量转移（FRET）检测化合物的 BH3 类似性

[150] 利用磷酸钙共沉淀的方法将 2 μ g Bcl-2-CFP 和 Bax-YFP 质粒分别或同时转染至 Hela 细胞中，转染 24 小时后，将细胞接种于 6 孔培养板（2 $\times$ 10⁵ 个 / 孔），加入溶于 DMSO 的待检测化合物 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈 至终浓度（2，5，10 和 15 μ M），药物作用 24 小时后（如附图 1），PBS 清洗细胞 3 次，用 GENIOS 荧光酶标仪（TECAN, Swiss）检测荧光值。在

时间依赖的实验中，转染后的细胞接种于 6 孔板后，加入 40 μ M 化合物，药物作用 3、6 和 24 小时（附图 2），读板检测荧光。在只转染 Bcl-2-CFP 质粒的细胞组中记录 475nm 发射波长值，激发波长为 433nm。在只转染 Bax-YFP 质粒的细胞组中记录 527nm 发射波长值，激发波长为 505nm。对共转染 Bcl-2-CFP 和 Bax-YFP 质粒的细胞实验组记录 527nm 和 475nm 发射波长值，激发波长为 433nm。527nm 发射荧光与 475nm 发射荧光相比值即为 FRET，将单独转染对照组的 FRET 值设为 1.0。在共转染的细胞中，由于 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的相互作用使得 FRET 值增加至 2.0，而随着加药浓度和时间的增加，对两蛋白相互作用的干扰增强，FRET 随之减弱。细胞活力由 MTT 法进行测定。试验结果如附图 2 和附图 3 所示，该化合物在 2 μ M，作用 3 小时即可干扰 Bcl-2/Bax 之间的相互作用，呈浓度时间依赖趋势。

[151] 按照上述相同的试验方法检测其他 9 个化合物，试验证明 这些化合物在不同作用浓度和作用时间的条件下，均具有细胞内模拟 BH3-only 蛋白的作用，能明显干扰 Bcl-2/Bax 之间的相互作用。具体结果如下表 4 所示。

[152] 其中 浓度和时间表示测试化合物在该浓度下干扰 Bcl-2/Bax 之间的相互作用 发生时间。

[153]

化合物名称	浓度 (μM)	时间 (小时)
3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	0.1	2
3- (4- 特戊基苯氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -9- 腈	0.5	2
3- (对异丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -9- 腈	0.2	2
6- (4- 丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	0.5	2
3-(吡啶 -2- 甲氨基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	1.0	2
3,6- 二 (4- 仲丁基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	1.0	2
9- (正丁胺基) -8H- 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮	1.0	2
3- (4- 异丁基 苯氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -9- 甲酸乙酯	5.0	6
乙基 -2- 氰基 -2- (6- (	10.0	6

4- 异丙基苯氧基) -2- 苊 酮 -1-2 <i>H</i> - 亚甲基) - 酯		
--	--	--

- [154] **实施例 16：** 通过 **Bax** 蛋白与线粒体共定位检测化合物的 **BH3** 类似度
- [155] 利用磷酸钙共沉淀方法将 5μg Bax-YFP 质粒转染至 MCF-7 细胞中，转染 24 小时后，将细胞接种于 6 孔培养板（0.2×10⁶ 个 / 孔），加入 10μM 待检测化合物 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8*H*- 苊并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈，作用 6 小时后，PBS 清洗并同 50nM Mito Tracker Red CMXRos（线粒体特异探针；红色）避光孵育 10min，PBS 清洗三次后，Radiance2000 激光共聚焦显微镜（Bio-Rad，USA）扫描荧光图像。同时进行双通道扫描，一个通道扫描 Bax-YFP 的绿色荧光，另一通道扫描指示线粒体的 CMXRos 探针红色荧光，两通道图像相互叠加显示共定位情况。该化合物作用下，叠加图片呈现橘色荧光，表示 Bax 向线粒体位移。
- [156] 按照上述相同的试验方法检测其他 8 个化合物，结果显示他们在不同作用浓度和作用时间的条件下，均具有驱动 **BAX** 向线粒体移位的作用，说明具有细胞内模拟 BH3-only 蛋白的作用。具体结果如下表 5 所示，其中 浓度和时间表示测试化合物在该浓度下 模拟 BH3-only 蛋白驱动 BAX 向线粒体移位的作用发生的时间。
- [157]

化合物名称	浓度 (μM)	时间 (小时)
3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	1.0	1
3- (4- 特戊基苯氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -9- 腈	1.0	3
3- (对异丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -9- 腈	5.0	3
6- (4- 丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	5.0	3
2- (6- (4- 氨基苯氧基) -2- 茚酮 -1-2H- 亚甲基)-N- 苯基 -3- 氧代丙酰胺	1.0	3
3,6- 二 (4- 仲丁基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈	1.0	3
9- (正丁胺基) -8H- 茚 并 [1,2-b] 吡咯 -8- 酮	1.0	3
3- (4- 异丁基 苯氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡 咯 -9- 甲酸乙酯	5.0	3

[158] 实施例 17：化合物依赖 BAX/BAK 的细胞毒性实验验证其 BH3 类似物的特性

[159] 磷酸钙共沉淀转染 3 μ g BAX/BAK 干扰质粒至 MCF-7 细胞中, 转染 24 小时后, 收集细胞, Western 检测 RNA 干扰后 BAX 和 BAK 蛋白表达情况, 相同处理无质粒转染的细胞组设为对照组。转染后的细胞接种于 96 孔板中 (1 $\times$ 10⁵ 个 / 孔), 平行进行未转染质粒细胞组的对照实验, 按实验设计浓度梯度加入待检测化合物 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈, 作用 48 小时后, MTT 检测细胞活力, 结果如附图 3 所示, Gossypol 作为非特异性 BH3 类似物与本发明的化合物对比平行处理, 可见 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈具有绝对依赖 BAX/BAK 的细胞毒性。

[160] 按上述相同试验方法检测其他 8 个化合物 (如所述化合物 ① ~ ⑧), 结果显示所检测化合物也均具有绝对依赖 BAX/BAK 的作用特点。这些化合物包括:

[161] ① 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[162] ② 3- (4- 特戊基苯氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[163] ③ 3- (对异丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[164] ④ 6- (4- 丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[165] ⑤ 2- (6- (4- 氨基苯氧基) -2- 茚酮 -1-2H- 亚甲基)-N- 苯基 -3- 氧代丙酰胺

[166] ⑥ 3,6- 二 (4- 仲丁基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[167] ⑦ 4- (4- 特戊基苯氧基) - 苯氧基 -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[168] ⑧ 4- (对异丙基苯硫基) - 苯氧基 -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[169] 实施例 18: Western 印记检测化合物对 Mcl-1 和 Bcl-2 的抑制作用

[170] 收集细胞样品后, 以 1 $\times$ 10⁶/50 μ l 细胞裂解液 (62.5mM Tris-HCL pH 6.8 ;

2%SDS ; 10% 甘氨酸; 50mM DTT ; 0.01% 溴酚蓝) 低温裂解, 离心, 取蛋白上清, 100 °C 煮沸样品 5 分钟, 12% SDS-PAGE 电泳并转膜, 相应抗体检测目的蛋白, 辣根过氧化物酶标记二抗并结合 ECL 显色法检测目的蛋白在细胞中的表达量。附图 4 和附图 5 分别显示待检测化合物 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈对 Mcl-1 和 Bcl-2 的抑制作用。从图中可以看出, 随着待测化合物作用于肿瘤细胞时间的延长, Bcl-2 和 Mcl-1 的蛋白条带逐渐变浅, 说明化合物具有抑制这两个蛋白的作用。利用 KODAK Gel Logic 1500 成像系统软件对 Western 图片中蛋白条带浓度进行半定量分析, 归一化处理后, 蛋白条带的

浓度如附图 9 和 10 所示。

[171] 经同样方法对检测下述 8 个化合物，它们均具有抑制 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白的作用，这些化合物包括：

[172] ① 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[173] ② 3- (4- 特戊基苯氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[174] ③ 3- (对异丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[175] ④ 6- (4- 丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[176] ⑤ 2- (6- (4- 氨基苯氧基) -2- 茚酮 -1-2H- 亚甲基)-N- 苯基 -3- 氧代丙酰胺

[177] ⑥ 3,6- 二 (4- 仲丁基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[178] ⑦ 4- (4- 特戊基苯氧基) - 苯氧基 -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[179] ⑧ 4- (对异丙基苯硫基) - 苯氧基 -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈；

[180] 这些化合物下调 Mcl-1 蛋白和 Bcl-2 蛋白的半定量分析结果如表 6 和表 7 所示：

[181] 表 6：化合物 = 1 * GB3 ① - = 8 * GB3 ⑧ 下调 Mcl-1 蛋白的半定量分析结果

[182]

化合物	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
对照	1	1	1	1	1	1	1	1
6 小时	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
12 小时	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
18 小时	0.58	0.54	0.55	0.60	0.60	0.70	0.50	0.60
24 小时	0.11	0.21	0.21	0.37	0.30	0.41	0.23	0.20

[183] 表 7 化合物 ① - ⑧ 下调 Bcl-2 蛋白的半定量分析结果

[184]

化合物	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
对照	1	1	1	1	1	1	1	1
2 小时	0.79	0.77	0.74	0.68	0.71	0.60	0.60	0.70
6 小时	0.29	0.45	0.49	0.49	0.45	0.59	0.46	0.28

[185] 实施例 19： Western 印记检测比较 Bcl-2 家族蛋白抑制剂化合物及其环糊精包合物和配结物对 Mcl-1 和 Bcl-2 的抑制作用

[186] 将细胞接种于 6 孔培养板（ 2×10^5 个 / 孔），化合物组加入溶于 DMSO 的化合物 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈 至终浓度 $10 \mu\text{M}$ ，包合物组加入溶于水溶液的相当于 $10 \mu\text{M}$ 化合物的 γ - 环糊精包合物，药物作用 24 小时后， PBS 清洗细胞 3 次，收集细胞样品后，以 $1 \times 10^6 / 50 \mu\text{L}$ 细胞裂解液（62.5mM Tris-HCL pH 6.8；2%SDS；10% 甘氨酸；50mM DTT；0.01% 溴酚蓝）低温裂解，离心，取蛋白上清， 100°C 煮沸样品 5 分钟，12% SDS-PAGE 电泳并转膜，相应抗体检测目的蛋白，辣根过氧化物酶标记二抗并结合 ECL 显色法检测目的蛋白在细胞中的表达量。蛋白条带分析同于实施例 18。附图 6 表明：3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈的 γ - 环糊精包合物对 Mcl-1 和 Bcl-2 蛋白的抑制作用明显高于该化合物本身。即 γ - 环糊精 包合物明显提高了抑制 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白的能力。

[187] 本实施例还采用上述同样方法检测了 β - 环糊精、2- 羟丙基 - β - 环糊精、甲基 - β - 环糊精和羟丙基 - γ - 环糊精包合的 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈，以及下述化合物，均比化合物本身具有更高的细胞内抑制 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白的能力。这些化合物包括：

[188] ①3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[189] ②3-（4- 特戊基苯氧基）-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[190] ③3-（对异丙基苯硫基）-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[191] ④6-（4- 丙基苯硫基）-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[192] ⑤2-（6-（4- 氨基苯氧基）-2- 茚酮 -1-2H- 亚甲基)-N- 苯基 -3- 氧代丙酰胺

[193] ⑥3,6- 二（4- 仲丁基苯硫基）-8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈

[194] 这些化合物及其包合物下调 Mcl-1 蛋白和 Bcl-2 蛋白的半定量分析结果分别如表 8 和表 9 所示：

[195] 表 8：化合物 ① - ⑥ 和它们的包合物下调 Mcl-1 蛋白的半定量分析结果

[196]

	①	②	③	④	⑤	⑥
对照	1	1	1	1	1	1
化合物	0.87	0.79	0.75	0.67	0.65	0.70
包合物	0.60	0.36	0.47	0.47	0.50	0.36

[197] 表 9：化合物 ① - ⑥ 和它们的包合物下调 Bcl-2 蛋白的半定量分析结果

[198]

	①	②	③	④	⑤	⑥
对照	1	1	1	1	1	1
化合物	0.69	0.77	0.74	0.69	0.65	0.79
包合物	0.57	0.45	0.49	0.35	0.47	0.60

[199] 本实施例还采用上述同样方法检测了 γ - 环糊精、2- 羟丙基 - β - 环糊精或甲基 - β - 环糊精配结的其他同类化合物，如：3- 己氧基 -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 甲酰胺、3- (4- 异丙基苯氧基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 甲酰胺、3- (4- 异丙基苯硫基) -8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 甲酸。试验表明：这些化合物的环糊精配结物均比化合物本身具有更高的细胞内抑制 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白的能力。

[200] 实施例 20: Western 印记检测对比化合物和包合物在肿瘤模型动物体内对 Mcl-1 和 Bcl-2 的抑制作用

[201] 选择饲养的中国昆明小鼠，随机分组，每组 10 只。培养的肝癌细胞 H22，按 200 μ L/ 只接种于小鼠腋下皮下。于荷瘤 5 天后，皮下瘤块形成。开始腹腔注射待测化合物 3-(4- 异丙基苯氧基)-8- 氧 -8*H*- 茚并 [1,2-*b*] 吡咯 -9- 腈， γ - 环糊精包合的待测化合物，和口服 γ - 环糊精包合的待测化合物。测试条件包括：

[202] 空白对照组：皮下荷瘤后小鼠不经任何处理；

[203] 对照组①：皮下荷瘤后给小鼠隔日腹腔注射 DMSO 溶液，共计 10 天；

[204] 对照组②：皮下荷瘤后给小鼠隔日腹腔注射环糊精溶液，共计 10 天；

[205] 实验组①：皮下荷瘤后给小鼠隔日腹腔注射 0.03 mg/kg 体重化合物的 DMSO 溶液，共计 10 天；

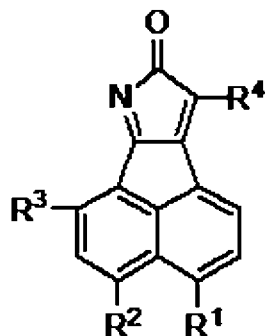
- [206] 实验组②：皮下荷瘤后给小鼠隔日腹腔注射 0.3 mg/kg 体重化合物的 DMSO 溶液，共计 10 天；
- [207] 实验组③：皮下荷瘤后给小鼠隔日腹腔注射相当于 0.3 mg/kg 体重化合物的包合物水溶液，共计 10 天；
- [208] 实验组④：皮下荷瘤后给小鼠隔日灌胃相当于 0.3 mg/kg 体重化合物的包合物水溶液，共计 10 天。
- [209] 实验期间每周两次测定肿瘤长径（a）及与之相垂直的短径（b），按公式 $1/2ab^2$ 计算肿瘤体积。观察动物存活时间。实验第 40 天，按肿瘤体积计算抑瘤率。结果显示：
- [210] 实验组②（化合物 DMSO 溶液注射组）抑瘤率 24.3%；
- [211] 实验组③（包合物注射组）抑瘤率 41.5%；
- [212] 实验组④（包合物口服组）抑瘤率 50.1%。
- [213] 对照组动物平均生存时间为 28 ± 2.1 天，化合物组的平均寿命 30 ± 3.1 天，包合物注射组平均生存时间为 49 ± 3.2 天，包合物口服组平均生存时间为 46 ± 1.4 天。统计学处理结果显示 $P < 0.05$ 。
- [214] 小鼠死亡或处死后，剥取小鼠皮下肿瘤，按 1:3 体积用生理盐水将组织匀浆制备细胞悬液，采用与实施例 19 相同的 western 检测方法，检测肿瘤细胞 Bcl-2、Mcl-1 蛋白的表达情况。附图 7 表明，包合物的体内拮抗 Bcl-2、Mc-1 蛋白的能力强于化合物本身。
- [215] β -环糊精、2-羟丙基- β -环糊精、甲基- β -环糊精和羟丙基- γ -环糊精包合的 3-(4-异丙基苯氧基)-8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯-9-腈、以及下述化合物，均有同样的体内抗肿瘤的作用。包括：
- [216] ① 在相同于实验组②的条件下，3-(4-异丙基苯氧基)-8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯-9-腈的抑瘤率约 65%；在相同于实验组③的条件下，羟丙基 γ -环糊精包合的该化合物的抑瘤率约 70%；
- [217] ② 在相同于实验组②的条件下，3-（4-特戊基苯氧基）-8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯-9-腈的抑瘤率约 40% 左右；在相同于实验组③的条件下，2-羟丙基- β -环糊精包合的该化合物的抑瘤率约 62%；

- [218] ③ 在相同于实验组 ② 的条件下, 3- (对异丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈的抑瘤率约 30% ; 在相同于实验组 ③ 的条件下, γ - 环糊精包合的该化合物抑瘤率约 42% ;
- [219] ④ 在相同于实验组 ② 的条件下, 6- (4- 丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈的抑瘤率达到 75% ; 在相同于实验组 = 3 * GB3 ③ 的条件下, 甲基 - β - 环糊精包合的该化合物的抑瘤率约 85% ;
- [220] ⑤ 在相同于实验组 ② 的条件下, 2- (6- (4- 氨基苯氧基) -2- 茚酮 -1-2H- 亚甲基)-N- 苯基 -3- 氧代丙酰胺的抑瘤率为 50% ; 在相同于实验组 ③ 的条件下, γ - 环糊精包合的该化合物的抑瘤率约为 60% ;
- [221] ⑥ 在相同于实验组 ② 的条件下, 3,6- 二 (4- 仲丁基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 腈的抑瘤率在 40% 左右; 在相同于实验组 ③ 的条件下, β 环糊精包合的该化合物的抑瘤率约 55% 。
- [222] 其它化合物的抑瘤率在 30 ~ 50% 之间。它们的环糊精包合物组的抑瘤率普遍高于化合物本身 ($P < 0.05$) 。
- [223] γ - 环糊精、2- 羟丙基 - β - 环糊精和甲基 - β - 环糊精配结的下述化合物, 相对于这些化合物本身也具有更强的体内抑制 Bcl-2 、 Mcl-1 的能力, 和更高的抑瘤率。其中:
- [224] 3- 己氧基 -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 甲酰胺 的抑瘤率为 30% , 甲基 - β - 环糊精配结后抑瘤率达到 38% 左右;
- [225] 3- (4- 异丙基苯氧基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 甲酰胺 抑瘤率为 45% , γ - 环糊精配结后 的产物抑瘤率为 55% ;
- [226] 3- (4- 异丙基苯硫基) -8- 氧 -8H- 茚并 [1,2-b] 吡咯 -9- 甲酸的抑瘤率为 45% , 2- 羟丙基 - β - 环糊精配结后达到 60% 。

权利要求书

[Claim 1]

1.I 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂，其分子结构通式为：



其中：

(I) R^1 = 吡啶甲氨基或 XR^5 , R^2 = H , R^3 = H , R^4 = CN 、 COOH 、 COOR⁶ 或 CONHR⁶ ；

(II) R^1 = H , R^2 = XR^5 , R^3 = H , R^4 = CN 、 COOH 、 COOR⁶ 或 CONHR⁶ ；

(III) R^1 = H , R^2 = H , R^3 = XR^5 , R^4 = CN ；

(IV) R^1 = XR^5 , R^2 = H , R^3 = XR^5 , R^4 = CN ；

(V) R^1 = H , R^2 = H , R^3 = H , R^4 = CONHR⁶ ；

其中：当 $X = O$ 、羰基、酯基、酰胺或磺酰胺时， $R^5 = (CH_2)_n Y$ 或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p)$ Y, $Y = C_2-C_8$ 直链烷基、 C_2-C_8 支链烷基、 C_1-C_8 直链卤代烷、 C_1-C_8 支链卤代烷、 C_1-C_8 直链胺、 C_1-C_8 支链胺、 C_1-C_8 直链醇、 C_1-C_8 支链醇、 C_1-C_8 直链酯、 C_1-C_8 支链酯、 C_1-C_8 直链羧酸或 C_1-C_8 支链羧酸， $n = 0-4$ ；

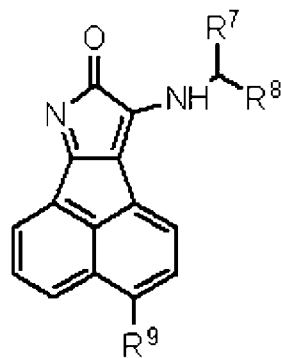
当 $X = O$ 、羰基、酯基、酰胺或磺酰胺时， $R^6 = C_1-C_6$ 直链烷基、 C_1-C_6 支链烷基、 C_1-C_6 直链卤代烷、 C_1-C_6 支链卤代烷、 C_1-C_6 直链胺、 C_1-C_6 支链胺、 C_1-C_6 直链醇、 C_1-C_6 支链醇、 C_1-C_6 直链酯、 C_1-C_6 支链酯、 C_1-C_6 直链羧酸、 C_1-C_6 支链羧酸或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p)$ Z ； $Z = CH_3$ 、 C_2H_5 、 NO_2 、 Ph 、 F 、 Cl 、 Br 、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 或 $N(CH_3)_2$, $n = 0 \sim 4$ 。

当 $X = S$ 时， $R^5 = (CH_2)_n Y$ 或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p)$ Y, $Y = C_7-C_8$ 直

链烷基、 C_7-C_8 支链烷基、 C_7-C_8 直链卤代烷、 C_7-C_8 支链卤代烷、 C_7-C_8 直链胺、 C_7-C_8 支链胺、 C_7-C_8 直链醇、 C_7-C_8 支链醇、 C_7-C_8 直链酯、 C_7-C_8 支链酯、 C_1-C_8 直链羧酸或 C_1-C_8 支链羧酸， $n = 0-4$ ；

当 $X=S$ 时， $R^6 = C_1-C_6$ 直链烷基、 C_1-C_6 支链烷基、 C_1-C_6 直链卤代烷、 C_1-C_6 支链卤代烷、 C_1-C_6 直链胺、 C_1-C_6 支链胺、 C_1-C_6 直链醇、 C_1-C_6 支链醇、 C_1-C_6 直链酯、 C_1-C_6 支链酯、 C_1-C_6 直链羧酸、 C_1-C_6 支链羧酸或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p) Z$ ； $Z = CH_3$ 、 C_2H_5 、 NO_2 、 Ph 、 F 、 Cl 、 Br 、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 或 $N(CH_3)_2$ ， $n = 0 \sim 4$ 。

2.II 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂，其分子结构通式为：

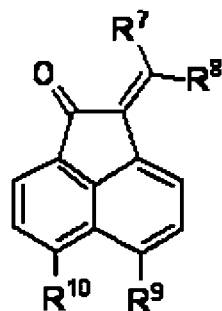


其中： $R^7 = (CH_2)_n X$ ； $X = H$ 、 CN 、 NO_2 、 NH_2 、 $COOH$ 、 CHO 、 OH 或 SO_3H ， $n=0-4$ ；

$R^8 = (CH_2)_n Y$ 或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p) Y$ ； $Y = NO_2$ 、 Ph 、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 C_1-C_8 直链烷基、 C_1-C_8 支链烷基、 C_1-C_8 直链卤代烷、 C_1-C_8 支链卤代烷、 C_1-C_8 直链胺、 C_1-C_8 支链胺、 C_1-C_8 直链醇、 C_1-C_8 支链醇、 C_1-C_8 直链酯、 C_1-C_8 支链酯、 C_1-C_8 直链羧酸或 C_1-C_8 支链羧酸， $n = 0-4$ ；

$R^9 = ZR^8$ 、 H 、四氢吡喃-4-氧基、四氢噻喃-4-氧基、噻吩甲氧基、噻吩甲氨基、吡啶甲氨基或硫吗啉基， $Z = O$ 、 S 、 N 、羰基、酯基、酰胺或磺酰胺；

3.III 系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂, 其分子结构通式为:



(I) $R^7 = (CH_2)_n X$, $R^8 = (CH_2)_n Y$ 或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p) Y$, $R^9 = ZR^8$ 、四氢噻喃-4-氧基、噻吩甲氧基、噻吩甲氨基、吡啶甲氨基或硫吗啉基, $R^{10} = H$; $n = 0-4$

(II) $R^7 = (CH_2)_n X$, $R^8 = (CH_2)_n Y$ 或 $(CH_2)_n Ar - (o,m,p) Y$, $R^9 = H$, $R^{10} = ZR^8$ 、四氢噻喃-4-氧基、噻吩甲氧基、噻吩甲氨基、吡啶甲氨基或硫吗啉基; $n = 0-4$;

(III) $R^9 = H$, $R^{10} = H$, R^7 与 R^8 不同时为 CN。

其中: $X = H$ 、CN、 NO_2 、 NH_2 、 $COOH$ 、 CHO 、 OH 或 $SO_3 H$;

$Y = CN$ 、 NO_2 、Ph、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 C_2-C_8 直链烷基、 C_2-C_8 支链烷基、 C_1-C_8 直链卤代烷、 C_1-C_8 支链卤代烷、 C_1-C_8 直链胺、 C_1-C_8 支链胺、 C_1-C_8 直链醇、 C_1-C_8 支链醇、 C_1-C_8 直链酯、 C_1-C_8 支链酯、 C_1-C_8 直链羧酸 或 C_1-C_8 支链羧酸;

$Z = O$ 、S、N、羰基、酯基、酰胺或磺酰胺;

4. 权利要求 1、2 或 3 所述 Bcl-2 家族蛋白抑制剂的环糊精包合物, 其特征在于由下述方法制备:

① 称取环糊精, 加入水中, 加热搅拌使其成为饱和溶液, 所述的环糊精为 β -环糊精、 γ -环糊精、2-羟丙基- β -环糊精或甲基- β -环糊精;

② 称取待包合的 Bcl-2 家族蛋白抑制剂, 该化合物与环糊精的摩尔比为 1: 3 ~ 1: 10;

③ 将待包合的系列 Bcl-2 抑制剂以 5 ~ 10 mg/mL 的浓度溶于丙酮，将所得溶液以线状逐滴加入到环糊精的水溶液中，40 ~ 65 °C，加热搅拌，有沉淀析出；

④ 将上述溶液过滤，用蒸馏水洗涤滤饼，再用丙酮洗去游离状态的化合物，真空干燥，得到权利要求 1 的系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂的环糊精包合物。

5. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂的环糊精配结物，其特征在于由下述方法制备：

① 称取干燥的环糊精及待配结的 Bcl-2 家族蛋白抑制剂，环糊精与该化合物的摩尔比为 1:1.5 ~ 1:3；所述的环糊精为 β -环糊精、 γ -环糊精、2-羟丙基- β -环糊精、甲基- β -环糊精或羟丙基- γ -环糊精；

② 将待配结的系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂与 N,N'-羰基二咪唑以 1:1 ~ 1:2 的摩尔比混合后溶解到 DMSO 中，使待配结的抑制剂在 DMSO 溶液中的浓度为 0.2 ~ 0.5 mmol/mL，常温搅拌 30 ~ 60 分钟；

③ 往上述 DMSO 溶液中加入步骤 ① 所称取的环糊精及 0.1 ~ 0.3 mmol/mL 的三乙醇胺，常温反应 18 ~ 24 小时；

④ 往步骤 ③ 的反应体系中加入 0.50 ~ 1.0 mg/mL 的丙酮，减压析出沉淀；

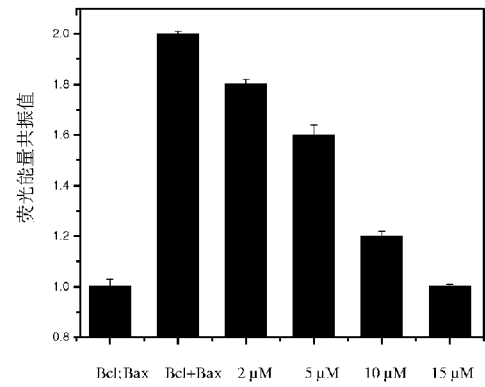
⑤ 过滤，沉淀经纯化得到权利要求 1 的系列 Bcl-2 家族蛋白抑制剂的环糊精配结物。

6. 权利要求 1、2 或 3 所述的系列 Bcl-2 抑制剂，其特征在于，其在制备 BH3 类似物 Bcl-2 家族蛋白抑制剂中的应用。

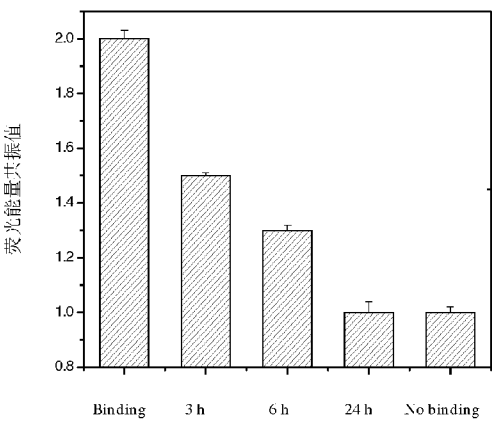
7. 权利要求 4 所述的化合物的环糊精包合物在制备 BH3 类似物 Bcl-2 家族蛋白抑制剂中的应用。

8. 权利要求 5 所述的化合物的环糊精配结物在制备 BH3 类似物 Bcl-2 家族蛋白抑制剂中的应用。

说明书附图

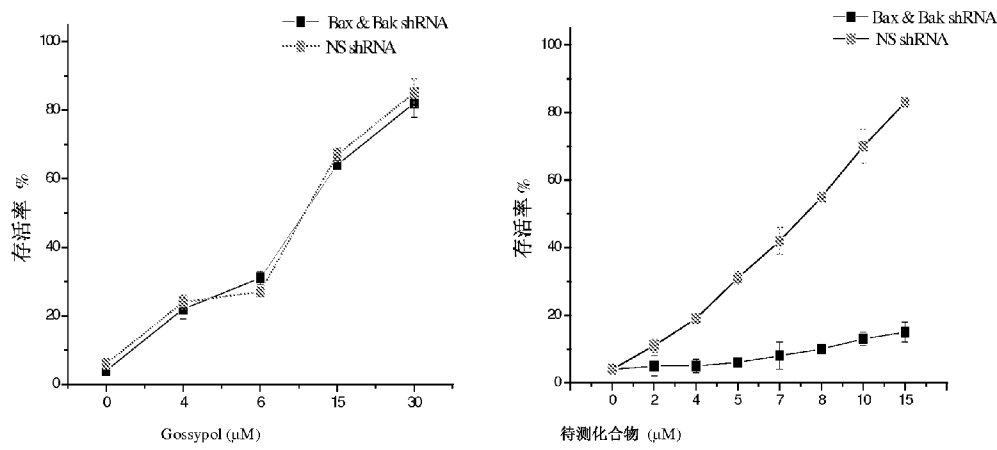


附图 1

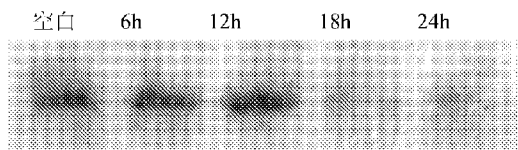


附图 2

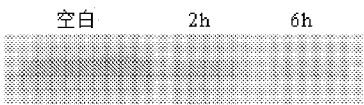
说明书附图



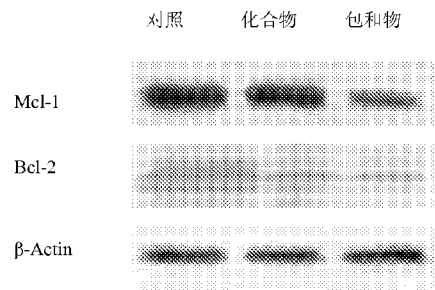
附图 3



附图 4

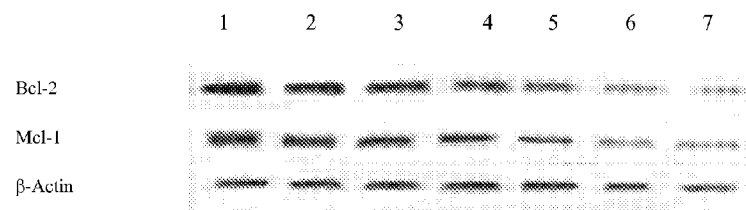


附图 5



附图 6

说明书附图



附图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07D,A61K,A61P

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

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

CPRS; CNKI; WPI; EPODOC; CAPLUS;REGISTRY

Structure search, Bcl, acenaphth+, cancer, tumor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO2010/054575A1(DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY ET AL.), 20 May 2010(20.05.2010), see the whole document, especially the claims 1-6 and examples 1-15	1-8
X	CN101633637A(EAST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 27 January 2010(27.01.2010), see the whole document, especially the claims 1-10 and examples	1-2,6
A	See above	3-5,7-8
X	CN1931840A(EAST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 21 March 2007(21.03.2007), see the whole document, especially the claims 1-9 and examples	1-2,6
A	See above	3-5,7-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 01 April 2011 (01.04.2011)	Date of mailing of the international search report 05 May 2011 (05.05.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer LI Jie Telephone No. (86-10)62084368

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075521

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN1616428A(DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY), 18 May 2005 (18.05.2005), cited in the application, see the whole document, especially the claims 1-3 and examples	1-2,6
A	See above	3-5,7-8
X	ZHANG Zhichao et al.: Inclusion Complex of a Bcl-2 Inhibitor with Cyclodextrin: Characterization, Cellular Accumulation, and in Vivo Antitumor Activity, MOLECULAR PHARMACEUTICS VOL. 7, NO. 4, Pages1348-1354, 15 June 2010 (15.06.2010), see figure 1 on page 1351 and table 1 on page 1353	1-2,4-8
A	See above	3
X	XIE Lijuan et al.:Novel acenaphtho[1,2-b]pyrrole-carboxylic acid family: Synthesis, cytotoxicity, DNA-binding and cell cycle evaluation, Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 17, 2009, Pages 7615-7621, 23 February 2009 (23.02.2009), see the whole document, especially the table 1 on page 7616	1-2,6
A	See above	3-5,7-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075521

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The first invention: claims 1-2,4-8(part), relating to the compounds of series I, II, which are used as the Bcl-2 family protein inhibitor, the cyclodextrin inclusion compounds or complexes of these compounds, and the uses in the manufactures of medicaments thereof.

The second invention: claims 3,4-8(part), relating to the compounds of series III, which are used as the Bcl-2 family protein inhibitor, the cyclodextrin inclusion compounds or complexes of these compounds, and the uses in the manufactures of medicaments thereof.

The reason is that: there is not a common structure between the compounds of above two groups of inventions, that is, a significant structural element is not shared by all of the compounds, and all alternatives do not belong to a recognized class of chemical compounds in the art to which the invention pertains. So the two groups of inventions are not so linked by a special technical feature to form a single general inventive concept, namely they do not comply with the requirements of unity in sense of Rules 13.1,13.2 and 13.3 PCT.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/075521

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2010/054575A1	20.05.2010	CN101423491A	06.05.2009
		CN101928243A	29.12.2010
CN101633637A	27.01.2010	None	
CN1931840A	21.02.2007	None	
CN1616428A	18.05.2005	CN1304370C	14.03.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075521

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D209/58 (2006.01) i
C07D405/12 (2006.01) n
C07D409/12 (2006.01) n
C07D403/12 (2006.01) n
C07D411/12 (2006.01) n
C07C13/547 (2006.01) i
A61K 31/015 (2006.01) i
A61K 31/403 (2006.01) n
A61K 31/54 (2006.01) n
A61P 35/00 (2006.01) i

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07D,A61K,A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRS; CNKI; WPI; EPODOC; CAPLUS;REGISTRY

茈、癌、肿瘤、结构检索; Bcl, acenaphth+, cancer, tumor

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO2010/054575A1 (大连理工大学等), 20.5 月 2010 (20.05.2010), 参见全文, 特别是权利要求 1-6, 实施例 1-25	1-8
X	CN101633637A (华东理工大学), 27.1 月 2010 (27.01.2010), 参见全文, 特别是权利要求 1-10, 实施例	1-2, 6
A	同上	3-5, 7-8
X	CN1931840A (华东理工大学), 21.3 月 2007 (21.03.2007), 参见全文, 特别是权利要求 1-9, 实施例	1-2, 6
A	同上	3-5, 7-8
X	CN1616428A (大连理工大学), 18.5 月 2005 (18.05.2005), 在申请中引用, 参见全文, 特别是权利要求 1-3, 实施例	1-2, 6
A	同上	3-5, 7-8

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

01.4 月 2011 (01.04.2011)

国际检索报告邮寄日期

05.5 月 2011 (05.05.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

李捷

电话号码: (86-10) 62084368

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	张志超等: Inclusion Complex of a Bcl-2 Inhibitor with Cyclodextrin: Characterization, Cellular Accumulation, and in Vivo Antitumor Activity, MOLECULAR PHARMACEUTICS, 第 7 卷, 第 4 期, 第 1348-1354 页, 15.6 月 2010 (15.06.2010), 参见第 1351 页的图 1 以及第 1353 页的表 1	1-2, 4-8
A	同上	3
X	XIE Lijuan 等: NBIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 第 17 卷, 2009, 第 7615-7621 页, 23.2 月 2009 (23.02.2009), 参见全文, 特别是第 7616 页的表 1	1-2, 6
A	同上	3-5, 7-8

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☐ 权利要求:
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
2. ☐ 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:
3. ☐ 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

第1项发明: 权利要求1-2,4-8(部分), 即I系列、II系列的用作Bcl-2家族蛋白抑制剂的化合物, 这些化合物的环糊精包合物、环糊精配结物, 以及它们的制药用途;

第1项发明: 权利要求3,4-8(部分), 即III系列的用作Bcl-2家族蛋白抑制剂的化合物, 这些化合物的环糊精包合物、环糊精配结物, 以及它们的制药用途;

其理由在于: 上述两组发明所涉及的化合物之间没有共同的结构, 即所有可选择化合物没有共有一种具有重要意义的结构单元, 而且所有可选择要素也无法认为属于本领域中公认的化合物类别。所以上述两组发明之间不能在技术上相互关联, 不属于一个总的发明构思, 没有满足发明单一性的要求(细则13.1、13.2和13.3)。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何附加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说, 是权利要求:
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/075521

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO2010/054575A1	20.05.2010	CN101423491A CN101928243A	06.05.2009 29.12.2010
CN101633637A	27.01.2010	无	
CN1931840A	21.02.2007	无	
CN1616428A	18.05.2005	CN1304370C	14.03.2007

主题的分类

C07D209/58 (2006.01) i

C07D405/12 (2006.01) n

C07D409/12 (2006.01) n

C07D403/12 (2006.01) n

C07D411/12 (2006.01) n

C07C13/547 (2006.01) i

A61K 31/015 (2006.01) i

A61K 31/403 (2006.01) n

A61K 31/54 (2006.01) n

A61P 35/00 (2006.01) i