



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113164482 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 09

(21) 申请号 201980077953.9

(22) 申请日 2019.11.28

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113164482 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(30) 优先权数据  
1872016 2018.11.28 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.05.26

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2019/082976 2019.11.28

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/109510 FR 2020.06.04

(73) 专利权人 原子能和替代能源委员会  
地址 法国巴黎

(72) 发明人 让-克里斯托夫·桑特拉  
于廉·巴比尔 丹尼尔·吉莱  
阿兰·普鲁沃斯特  
奥黛丽·库赫特 利维亚·泰普希  
罗宾·温科

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270  
专利代理师 张铮铮 浦彩华

(51) Int.Cl.  
A61K 31/517(2006.01)  
A61P 39/02(2006.01)  
C07D 417/14(2006.01)  
A61K 9/00(2006.01)

(56) 对比文件  
EP 3085374 A1,2016.10.26  
US 2015250788 A1,2015.09.10  
US 2015291568 A1,2015.10.15  
Romain Noel等.N-

Methylidihydroquinazolinone Derivatives of Retro-2 with Enhanced Efficacy against Shiga Toxin.《J. Med. Chem》.2013,第56卷 3404-3413.  
Neetu Gupta等.(S)-N-Methylidihydroquinazolinones are the Active Enantiomers of Retro-2 Derived Compounds against Toxins.《ACS Med. Chem.Lett.》.2014,第5卷94-97.

审查员 邓丽娟

权利要求书4页 说明书20页 附图2页

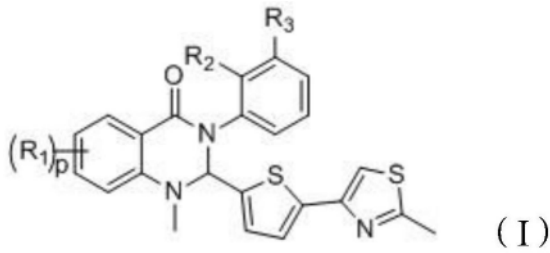
(54) 发明名称

显示抗胞内作用毒素、胞内病毒和细菌的保护活性的新二氢喹唑啉酮

(57) 摘要

本发明涉及一种2,3-二氢喹唑啉-4(1H)-酮类的新家族化合物及其作为胞内作用毒素,或病毒或细菌的毒性作用的抑制剂的用途,其中所述胞内作用毒素诸如为蓖麻毒素、志贺毒素或霍乱毒素,利用逆向转运使细胞中毒,所述病毒或细菌利用逆向转运和/或突触蛋白5依赖性转运感染细胞,尤其为借助内吞作用或胞内寄生虫进入细胞的病毒或细菌。

1. 一种通式 (I) 化合物, 以及它们药学上可接受的盐:



其中:

p 等于 1、2 或 3;

R<sub>1</sub> 在每次出现时独立地表示氢原子; 卤原子; 1 至 3 个碳原子的烷氧基; -NO<sub>2</sub> 或 -NH<sub>2</sub>;

R<sub>2</sub> 和 R<sub>3</sub> 各自独立地表示选自 H、-OH、-OR<sub>4</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sub>5</sub> 和 -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 的基团, 条件是 R<sub>2</sub> 和 R<sub>3</sub> 中至少一个不为 H;

R<sub>4</sub> 和 R<sub>5</sub> 各自独立地表示式 (II) -L-(X)<sub>i</sub>-(PEG)-(Y)<sub>j</sub>-Z 的基团, 其中:

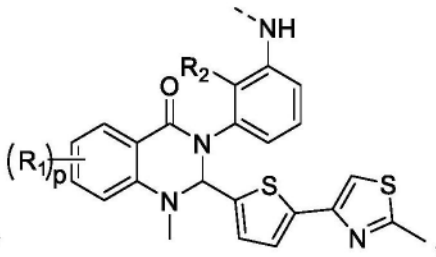
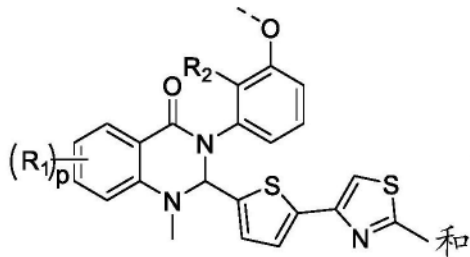
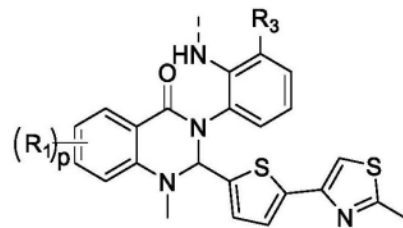
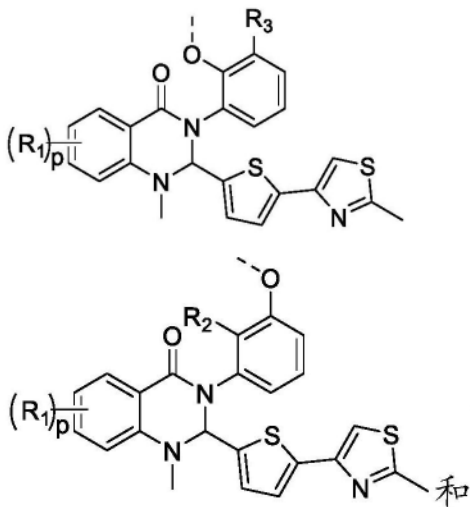
i 和 j 各自独立地表示 0 或 1;

L 表示 -C(=O)- 或 -C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-C(=O)-, 其中 k 为 1、2 或 3;

X 和 Y 各自独立地表示聚(乳酸) 或聚(乳酸-共-羟基乙酸);

PEG 表示聚(乙二醇);

Z 表示选自 H、C<sub>1</sub> 至 C<sub>3</sub> 烷基、-OH、O-C<sub>1</sub> 至 C<sub>3</sub> 烷基或 -L-R<sub>e</sub> 的基团, 其中 L 同以上定义, 并且, R<sub>e</sub> 选自:



并且在 R<sub>e</sub>, R<sub>2</sub> 和 R<sub>3</sub> 独

立地选自 H、-OH、-NH<sub>2</sub> 和 -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>。

2. 根据权利要求 1 所述的通式 (I) 化合物, 其中 R<sub>3</sub> 表示氢原子。

3. 根据权利要求 1 所述的通式 (I) 化合物, 其中 R<sub>2</sub> 表示氢原子。

4. 根据权利要求 1 所述的通式 (I) 化合物, 其中所述 1 至 3 个碳原子的烷氧基为甲氧基; 或者

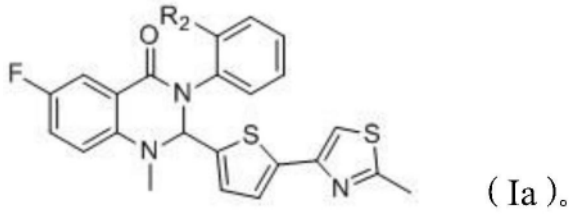
k 为 2。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的通式 (I) 化合物, 其中 p 等于 1。

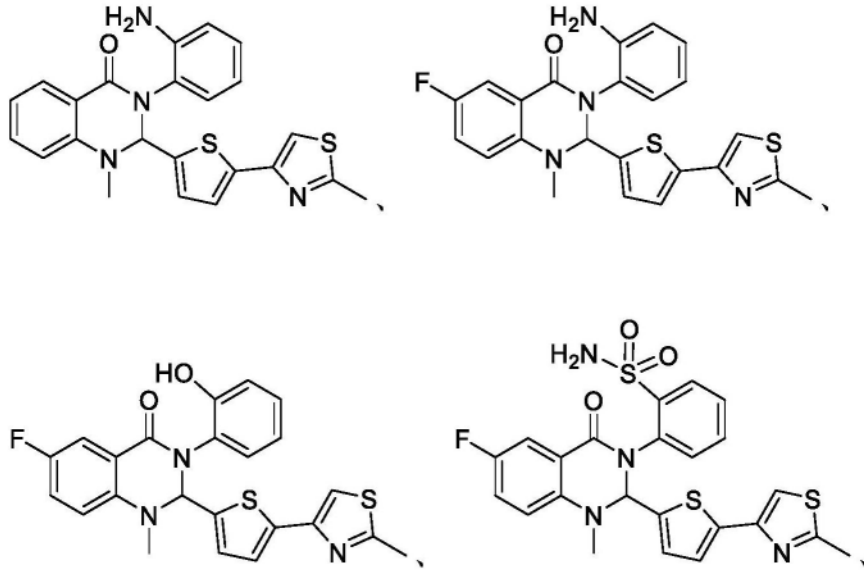
6. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的通式 (I) 化合物, 其中 R<sub>1</sub> 表示卤原子。

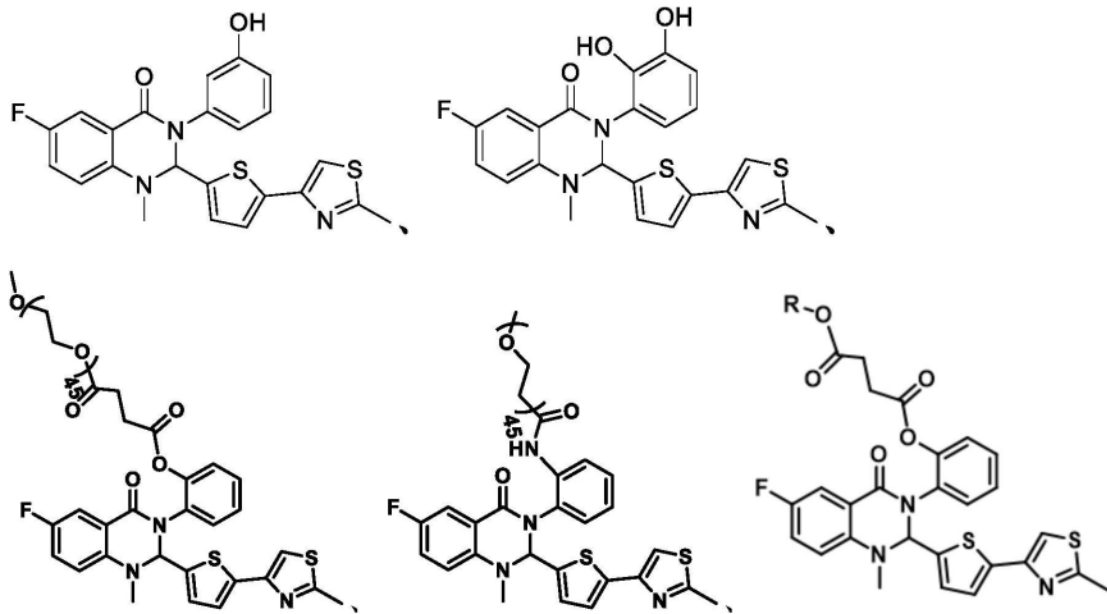
7. 根据权利要求 6 所述的通式 (I) 化合物, 其中 R<sub>1</sub> 表示氟原子。

8. 根据权利要求1所述的通式(I)化合物,所述化合物为以下式(Ia)所示的化合物:

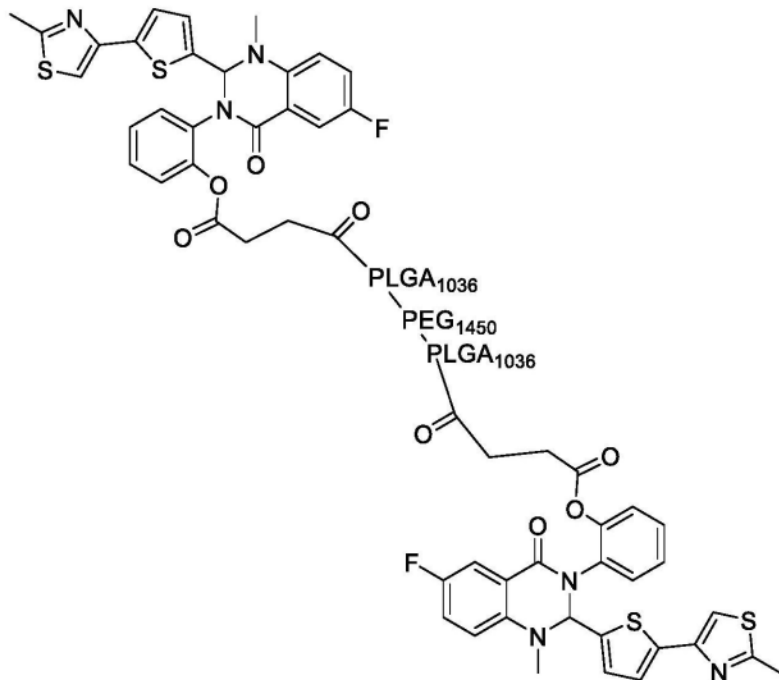


9. 根据权利要求1所述的通式(I)化合物,选自:





和



其中,  $R = \text{PEG}_{450}$ 、 $\text{PEG-PLA}$  或  $\text{PLGA-PEG-PLGA}$ 。

10. 如权利要求9所述的通式(I)化合物, 其中  $R = \text{PLGA}_{1036} - \text{PEG}_{1450} - \text{PLGA}_{1036}$ 。

11. 如权利要求1至4中任一项所定义的通式(I)化合物在制备药物中的用途, 所述药物用于预防和/或治疗由利用逆向转运的胞内作用毒素或由利用逆向转运和/或突触蛋白5依赖性转运而感染细胞的病毒或细菌引起的疾病。

12. 如权利要求1至4中任一项所定义的通式(I)化合物在制备药物中的用途, 所述药物用于预防和/或治疗通过内吞作用或通过胞内寄生虫进入细胞的病毒或细菌引起的疾病。

13. 根据权利要求11所述的用途, 其特征在于, 所述胞内作用毒素选自蓖麻毒素、由志贺痢疾杆菌 *Shigella dysenteriae* 和大肠杆菌 *E. coli* 产生的志贺毒素和志贺样毒素、霍乱

毒素、百日咳毒素、亚麻酶细胞毒素和不耐热肠毒素。

14. 根据权利要求11所述的用途,其特征在于,所述病毒是痘病毒,腺相关病毒,多瘤病毒,乳头瘤病毒,丝状病毒,肠病毒,疱疹病毒,沙粒病毒Arenavirus属的病毒,流感病毒,肺病毒。

15. 根据权利要求11所述的用途,其特征在于,所述病毒是天花病毒,猴天花病毒,牛痘病毒,野兔痘病毒,巨细胞病毒,血清型2腺相关病毒,多瘤病毒JC和多瘤病毒BK,埃博拉病毒和马尔堡病毒,肠病毒71,2型单纯性疱疹病毒,淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒,甲型流感病毒,呼吸道合胞体病毒。

16. 根据权利要求11所述的用途,其特征在于,所述病毒是多发粘液瘤病毒。

17. 一种药物组合物或药剂,包括至少一种如权利要求1至10中任一项所定义的通式(I)化合物作为有效成分和药学上可接受的载体,所述药物组合物或所述药剂适于通过空气、口服、胃肠外或局部途径给药。

## 显示抗胞内作用毒素、胞内病毒和细菌的保护活性的新二氢喹唑啉酮

### 技术领域

[0001] 本发明涉及2,3-二氢喹唑啉-4(1H)-酮的新家族化合物,及其作为利用逆向转运使细胞中毒的胞内作用毒素或者利用逆向转运和/或突触蛋白5-依赖性转运感染细胞的病毒或细菌的毒性作用的抑制剂的用途,其中,所述胞内作用毒素诸如为蓖麻毒素(ricin)、志贺毒素(Shiga toxins)和霍乱毒素(cholera toxin),所述病毒或细菌包括通过内吞作用或胞内寄生虫进入所述细胞的病毒或细菌。

### 背景技术

[0002] 利用逆向转运的胞内作用毒素(intracellular-acting toxins)代表着重大公共健康风险,其中一些与全世界每年超过一百万的死亡相关。这些毒素具体地包括产生于植物蓖麻*Ricinus communis*种子中的蓖麻毒素(ricin)、由志贺痢疾杆菌*Shigella dysenteriae*(Stx)和大肠杆菌*E.coli*(Stx1和Stx2)产生的志贺毒素(Shiga toxin)和志贺样毒素(Stxs, Shiga-like toxins)、霍乱毒素(Ctx, cholera toxin, 来自导致霍乱的霍乱弧菌*Vibrio cholerae*)、百日咳毒素(pertussis toxin, 百日咳的百日咳博代氏菌*Bordetella pertussis*剂)、亚麻酶细胞毒素(subtilase cytotoxin)和不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin, 来自大肠杆菌*E.coli*)。

[0003] 蓖麻毒素是66kDa的糖蛋白,由通过二硫键连接的两个多肽链组成(图1A)。B链(RTB, 262个残基的凝集素)使所述毒素结合到细胞膜的糖脂和糖蛋白并确保其进入所述细胞(图1A)。A链(RTA, 267个氨基酸)确保蓖麻毒素的N-糖苷酶的酶功能,催化从靶细胞的28S RNA除去4324腺嘌呤并导致蛋白合成停止。

[0004] 志贺毒素类包括由志贺痢疾杆菌*Shigella dysenteriae*产生的志贺毒素(Stx)和由大肠杆菌*E.coli*的肠出血菌株(enterohemorrhagic strains)产生的志贺样毒素1(Stx1)和志贺样毒素2(Stx2)。Stx毒素和Stx1毒素具有99%的氨基酸序列同一性,而Stx1和Stx2仅具有56%的氨基酸序列同一性。该毒素的A亚单元(StxA)具有与蓖麻毒素相同的酶活性,并以相同的方式靶向于28S RNA(图1B)。B亚单元(StxB)是五聚体的形式,能通过其与酰基鞘醇三己糖Gb3的相互作用使所述毒素结合到细胞,从而确保其内化作用和其胞内途径。

[0005] 在结合至其膜受体后,蓖麻毒素通过多种内吞途径被内化到这些细胞中,到达反面高尔基体管网状结构(trans-golgiate network),在此通过逆向转运被传递到内质网(ER)(Johannes, L. et al., *Cell* 2008, 135, 1175-87)。志贺毒素通过独特的内吞途径被内化,并且也到达高尔基体,然后到达内质网(出处同上)。

[0006] 所述毒素随后部分地解折叠,链/亚单元A移动至胞液(cytosol)中(Lord, J.M. et al., *Biochemical Society Transactions* 2003, 31, 1260)。因此,这些毒素发挥作用的最后步骤发生在细胞的细胞质中,这些毒素以极高的效率结合到核糖体,并使核糖体的亚单元60S的28S RNA的腺嘌呤4324断裂。这种28S RNA的脱嘌呤作用导致蛋白质合成的停止并

导致细胞死亡。

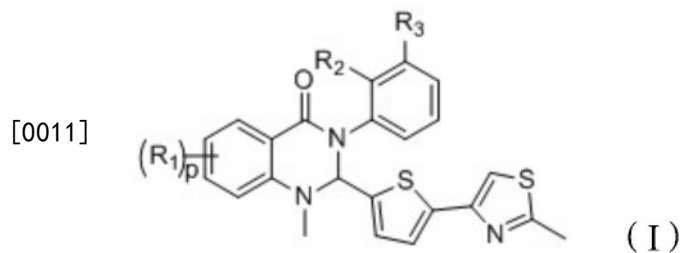
[0007] 为对抗这些毒素带来的威胁,已经开发了若干种类型的抗毒素:中和抗体、酶活性抑制剂(小分子,底物类似物)、可溶受体模拟物和作用于毒素靶向的细胞的化合物。

[0008] 近年来,加速了对阻断胞内作用毒素的胞内途径的新分子的研究。此类分子的主要优势在于这些分子通过对抗利用逆向途径的不同毒素而有效地保护细胞,从而它们具有广谱的活性。

### 发明内容

[0009] 在对阻断逆向转运的化合物的研究中,更具体地是对与上述研究的那些化合物相比更具优势的化合物的研究中,本申请人已证实了衍生自2,3-二氢喹唑啉-4(1H)-酮的在邻位或间位具有特定取代的苯基的新家族化合物,出乎预料地显示出优于Retro-2.1(在已描述的分子中最具活性的分子)的生物活性,因此不仅对于预防和/或治疗能够感染哺乳动物真核细胞的至少一种利用逆向转运的胞内作用毒素的中毒具有显著益处,而且还对于预防和/或治疗利用由于逆向转运和/或突触蛋白5-依赖性转运而感染细胞,特别是通过内吞作用或胞内寄生虫进入细胞的病毒或细菌的感染具有显著益处。

[0010] 因此,本发明涉及一种通式(I)化合物,以及其立体异构形式、立体异构形式的混合物或它们药学上可接受的盐:



[0012] 其中:

[0013] P等于1、2或3;

[0014]  $R_1$ 在每次出现时独立地表示氢原子;卤原子;1至3个碳原子的烷氧基,尤其是甲氧基;  $-NO_2$ 或  $-NH_2$ ;

[0015]  $R_2$ 和  $R_3$ 各自独立地表示选自H、 $-OH$ 、 $-OR_4$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR_5$ 、 $-SO_2-NH_2$ 和  $-SO_2-NH-R_6$ 的基团,条件是  $R_2$ 和  $R_3$ 中至少一个不为H;

[0016]  $R_4$ 、 $R_5$ 和  $R_6$ 各自独立地表示式(II)  $-L-(X)_i-(PEG)-(Y)_j-Z$ 的基团,其中:

[0017] i和j各自独立地表示0或1;

[0018] L表示  $-C(=O)-$ 或  $-C(=O)-(CH_2)_k-C(=O)-$ ,其中k为1、2或3,尤其为2;

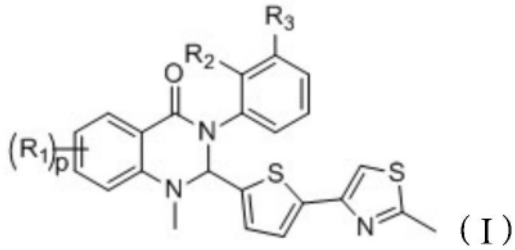
[0019] X和Y各自独立地表示聚(乳酸)或聚(乳酸-共-羟基乙酸);

[0020] PEG表示聚(乙二醇);

[0021] Z表示选自H、 $C_1$ 至  $C_3$ 烷基、 $-OH$ 、 $O-C_1$ 至  $C_3$ 烷基或  $-L-R_6$ 的基团,其中L同以上定义,  $R_6$ 是式(I)经由  $R_2$ 或  $R_3$ 基团与  $-L-(X)_i-(PEG)-(Y)_j-$ 基团连接的残基,所述  $R_2$ 或  $R_3$ 基团是  $-OH$ 、 $-NH_2$ 或  $-SO_2-NH_2$ 。

[0022] 本发明还涉及一种通式(I)化合物,以及其立体异构形式、立体异构形式的混合物或它们药学上可接受的盐:

[0023]

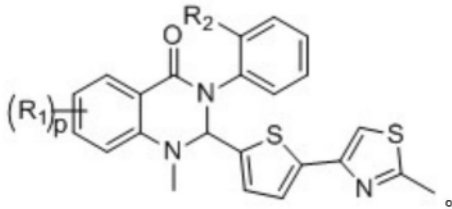


[0024] 其中:

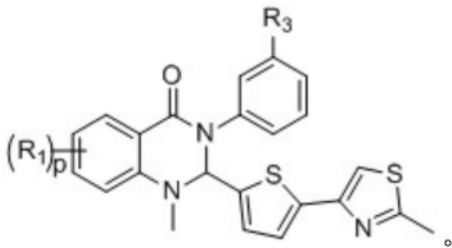
[0025] P等于1、2或3;

[0026]  $R_1$ 在每次出现时独立地表示氢原子;卤原子;1至3个碳原子的烷氧基,尤其是甲氧基;[0027]  $R_2$ 和 $R_3$ 各自独立地表示选自H、-OH、-NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>的基团,条件是 $R_2$ 和 $R_3$ 中至少一个不为H。[0028] 根据一实施方式, $R_2$ 表示选自-OH、-NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>的基团,并且 $R_3$ 表示选自H、-OH、-NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>的基团。[0029] 根据一实施方式, $R_3$ 表示氢原子。因此,根据本发明的通式(I)化合物则具有下式:

[0030]

[0031] 根据一实施方式, $R_2$ 表示氢原子。因此,根据本发明的通式(I)化合物则具有下式:

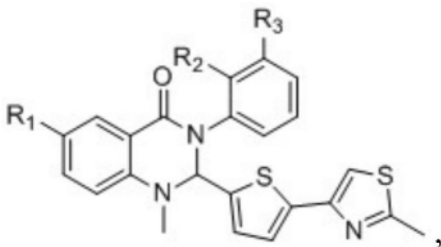
[0032]

[0033] 根据一实施方式, $R_2$ 和 $R_3$ 各自独立地表示选自-OH、-NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>的基团,特别地 $R_2$ 和 $R_3$ 表示-OH。

[0034] 根据一实施方式,p等于1。

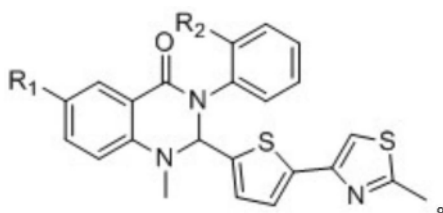
[0035] 根据一实施方式,根据本发明的通式(I)化合物如下式所示:

[0036]

[0037]  $R_1$ 、 $R_2$ 和 $R_3$ 如上所定义,特别地 $R_2$ 和 $R_3$ 代表各自独立地选自-OH、-NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>,例如 $R_2$ 和 $R_3$ 为-OH。

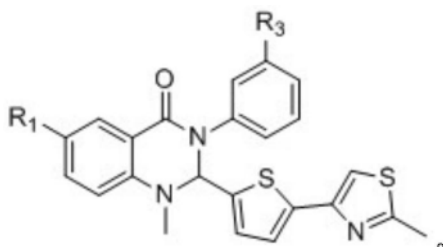
[0038] 根据一具体实施方式,根据本发明的通式(I)化合物如下式所示:

[0039]



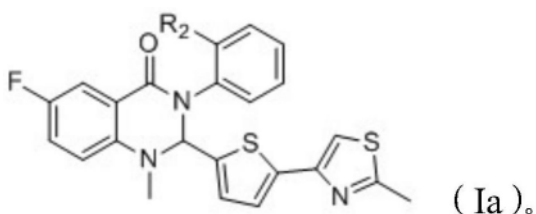
[0040] 根据一具体实施方式,根据本发明的通式(I)化合物如下式所示:

[0041]

[0042] 根据一实施方式,R<sub>1</sub>表示卤原子,特别是氟原子。

[0043] 根据一具体实施方式,根据本发明的通式(I)化合物如下式(Ia)所示:

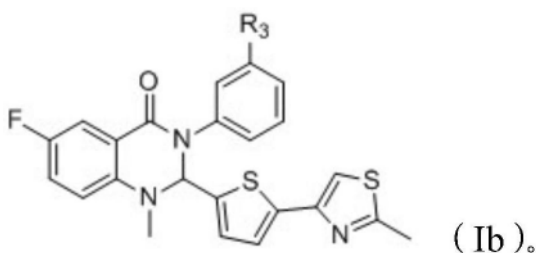
[0044]



(Ia)。

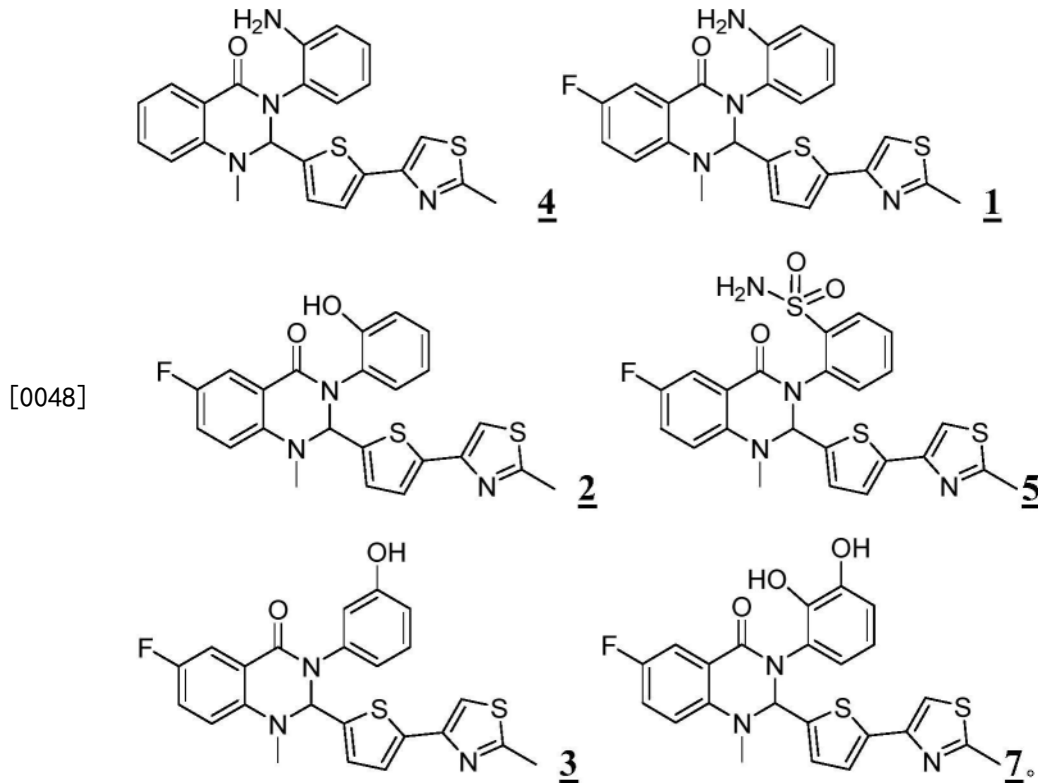
[0045] 根据一实施方式,根据本发明的通式(I)化合物如下式(Ib)所示:

[0046]



(Ib)。

[0047] 根据一实施方式,根据本发明的通式(I)化合物选自:



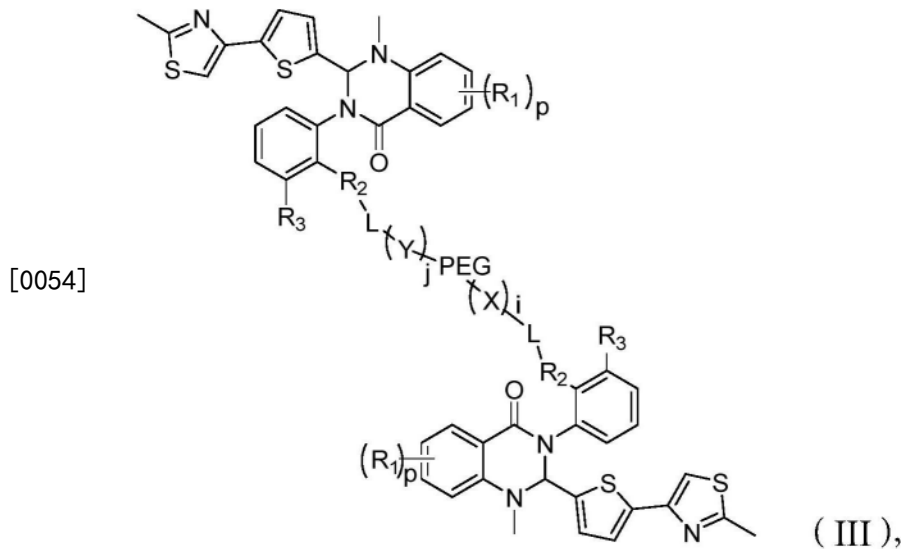
[0049] 根据一实施方式,本发明涉及通式(I)化合物,其中 $R_2$ 和 $R_3$ 各自独立地表示选自H、-OH、-OR<sub>4</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sub>5</sub>、-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>和-SO<sub>2</sub>-NH-R<sub>6</sub>的基团,条件是 $R_2$ 和 $R_3$ 中至少一个,特别地 $R_2$ 表示选自-OR<sub>4</sub>、-NHR<sub>5</sub>和-SO<sub>2</sub>-NH-R<sub>6</sub>的基团, $R_4$ 、 $R_5$ 和 $R_6$ 如上所定义。

[0050] 对于式(II) -L-(X)<sub>i</sub>-(PEG)-(Y)<sub>j</sub>-Z的基团,当 $R_2$ 或 $R_3$ 表示-NHR<sub>5</sub>或-SO<sub>2</sub>-NH-R<sub>6</sub>时,L尤其表示-C(=O)-,和当 $R_2$ 或 $R_3$ 表示-OR<sub>4</sub>时,L尤其表示-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-C(=O)-。

[0051] 根据一实施方式,式(II) -L-(X)<sub>i</sub>-(PEG)-(Y)<sub>j</sub>-Z的基团选自-L-PEG、-L-PEG-PLA和-L-PLGA-PEG-PLGA,其中,当 $R_2$ 或 $R_3$ 表示-NHR<sub>5</sub>或-SO<sub>2</sub>-NH-R<sub>6</sub>时,L尤其表示-C(=O)-,或当 $R_2$ 或 $R_3$ 表示-OR<sub>4</sub>时,L尤其表示-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-C(=O)-。

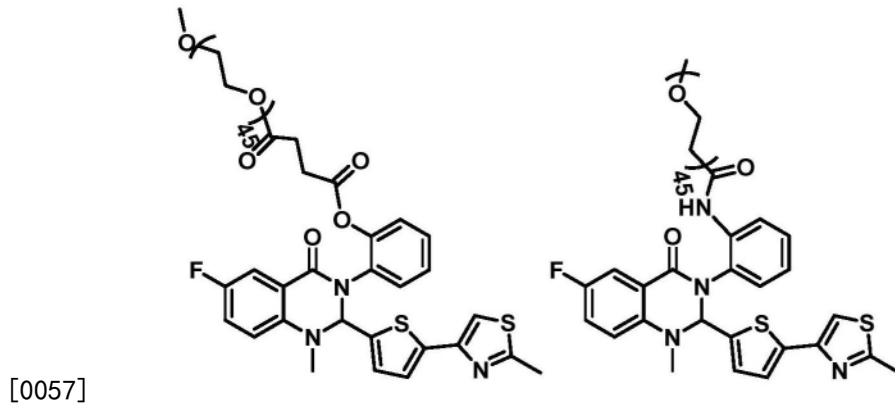
[0052] 根据一实施方式,特别地,当 $R_2$ 或 $R_3$ 表示-NHR<sub>5</sub>或-SO<sub>2</sub>-NH-R<sub>6</sub>时,式(II) -L-(X)<sub>i</sub>-(PEG)-(Y)<sub>j</sub>-Z的基团选自-C(=O)-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>,和特别地,当 $R_2$ 或 $R_3$ 表示-OR<sub>4</sub>时,式(II) -L-(X)<sub>i</sub>-(PEG)-(Y)<sub>j</sub>-Z的基团选自-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-C(=O)-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OCH<sub>3</sub>,其中m是1到500,例如4到500,m特别是30到60,更特别是45。

[0053] 根据一实施方式,根据本发明的通式(I)化合物如下式(III)所示:



[0055] 式(III)中的基团如上所定义。

[0056] 根据一实施方式,根据本发明的通式(I)化合物选自:



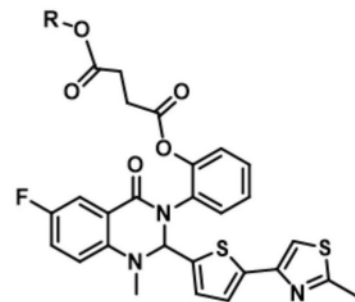
R = PEG<sub>450</sub>

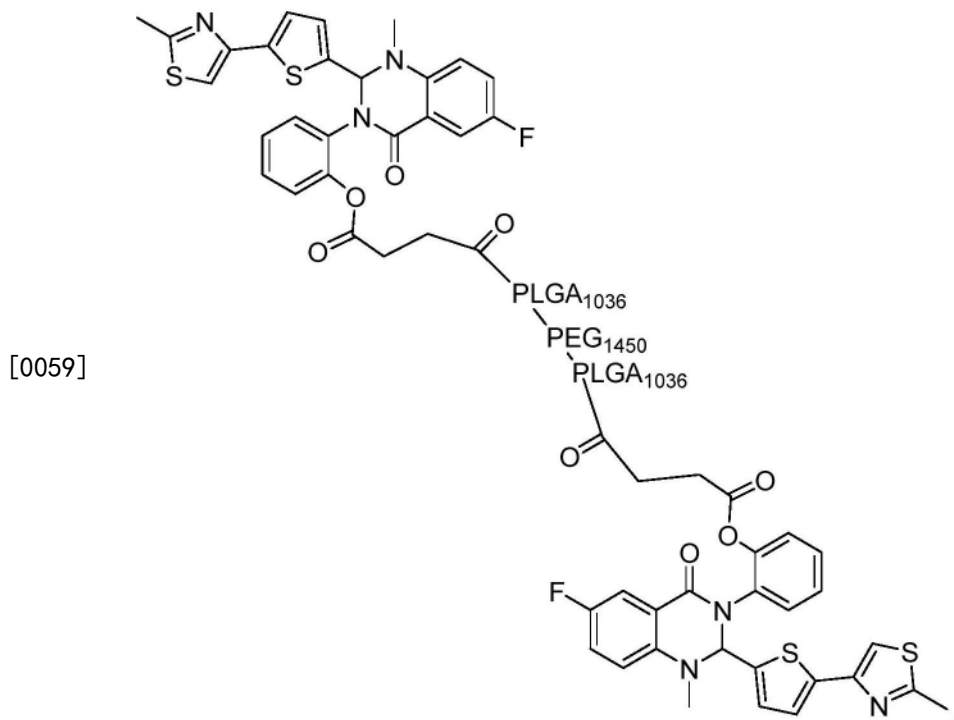
R = PEG-PLA

R = PLGA-PEG-PLGA

特别地 PLGA<sub>1036</sub>-PEG<sub>1450</sub>-PLGA<sub>1036</sub>

[0058] 以及(化合物2)-PLGA<sub>1036</sub>-PEG<sub>1450</sub>-PLGA<sub>1036</sub>-(化合物2)或(化合物2)-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-PLGA<sub>1036</sub>-PEG<sub>1450</sub>-PLGA<sub>1036</sub>-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-(化合物2),特别是下式化合物:





[0060] 根据另一方面,本发明涉及一种药物组合物或药剂,包括至少一种以上定义的通式(I)化合物作为活性成分和药学上可接受的载体,所述药物组合物或所述药剂特别适于通过空气、口服、胃肠外或局部途径施用。

[0061] 应注意的是,所有以上提及的通式(I)化合物的实施方式也单独地或组合地适用于此。

[0062] 根据另一方面,本发明涉及以上定义的通式(I)化合物,用于预防和/或治疗由利用逆向转运的胞内作用毒素引起的或由病毒或细菌引起的疾病,其中所述病毒或细菌为利用逆向转运和/或突触蛋白5依赖性转运而感染细胞的病毒或细菌,特别地,通过内吞作用或通过胞内寄生虫进入所述细胞的病毒或细菌。

[0063] 应注意的是,所有以上提及的通式(I)化合物的实施方式也单独地或组合地适用于此。

[0064] 根据一实施方式,本发明涉及以上定义的通式(I)化合物,用于预防和/或治疗由利用逆向转运的胞内作用毒素而引起的疾病。

[0065] 根据具体实施方式,所述利用逆向转运的胞内作用毒素选自蓖麻毒素,由志贺痢疾杆菌 *Shigella dysenteriae* (Stx) 和大肠杆菌 *E. coli* (Stx1和Stx2, Stx, Stx1a, Stx2a, Stx2c, Stx2d, Stx2e, 例如Melton-Celsa, *Microbiol Spectr.* 2014; 2(2) 中所述) 产生的志贺毒素和志贺样毒素 (Stxs), 霍乱毒素 (Ctx, 来自导致霍乱的霍乱弧菌 *Vibrio cholerae*), 百日咳毒素 (百日咳的百日咳博代氏菌 *Bordetella pertussis*)、亚麻酶细胞毒素和不耐热肠毒素 (大肠杆菌 *E. coli*)。

[0066] 根据一实施方式,本发明涉及以上定义的通式(I)化合物,用于预防和/或治疗由病毒或细菌引起的疾病,其中所述病毒或细菌为利用逆向和/或依赖突触融合蛋白5转运以感染细胞的那些,特别地是通过内吞作用或通过胞内寄生虫进入细胞的病毒或细菌。

[0067] 根据一具体实施方式,所述病毒是痘病毒 (pox viruses), 特别是天花病毒

(smallpox virus)和牛痘病毒(Vaccinia virus);巨细胞病毒(cytomegaloviruses);腺病毒(adenoviruses),特别是腺相关病毒(adeno-associated viruses),尤其是血清2型腺相关病毒;多瘤病毒(polyomaviruses),特别是多瘤病毒JC和多瘤病毒BK;乳头瘤病毒(papillomaviruses);丝状病毒(filoviruses),尤其是埃博拉病毒(Ebola viruses)和马尔堡病毒(Marburg virus);肠病毒(enteroviruses),尤其是肠病毒71;疱疹病毒(herpes viruses),尤其是2型单纯性疱疹病毒(Herpes simplex virus type 2);沙粒病毒Arenavirus属的病毒,尤其是淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(lymphocytic choriomeningitis);流感病毒(influenza viruses),尤其是甲型流感病毒(influenzaviruses A)。

[0068] 根据一具体实施方式,所述病毒是痘病毒,尤其是天花病毒、猴天花病毒(monkeypox virus)、牛痘病毒和野兔痘病毒(leporipoxviruses),所述野兔痘病毒尤其是多发粘液瘤病毒(myxomatosis virus);巨细胞病毒;腺相关病毒,尤其是血清2型腺相关病毒;多瘤病毒,尤其是JC多瘤病毒和BK多瘤病毒;乳头瘤病毒;丝状病毒,尤其是埃博拉病毒和马尔堡病毒;肠病毒,尤其是肠病毒71;疱疹病毒,尤其是2型单纯性疱疹病毒;沙粒病毒Arenavirus属的病毒,尤其是淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒;流感病毒,尤其是甲型流感病毒;肺病毒(pneumoviruses),尤其是呼吸道合胞体病毒(respiratory syncytial virus)。

[0069] 根据一具体实施方式,所述细菌是衣原体目Chlamydiales的细菌,特别是衣原体Chlamydia属的细菌,如:沙眼衣原体Chlamydia trachomatis,肺炎嗜衣原体Chlamydophila pneumoniae,鸚鵡热嗜衣原体Chlamydophila psittaci或西门坎氏菌属Symkania,例如Symkania negevensis。

[0070] 根据一具体实施方式,由胞内寄生虫引起的疾病是利什曼病,特别是由利什曼原虫(Leishmania)属的锥体虫(trypanosomes)引起的疾病,特别是婴儿利什曼原虫Leishmania infantum、杜氏利什曼原虫Leishmania donovani或婴儿/杜氏杂合利什曼原虫Leishmania infantum/donovani hybrid。

[0071] 本发明还涉及预防和/或治疗由利用逆向转运的胞内作用毒素引起的疾病的方法,包括施用有效量的至少一种以上定义的通式(I)化合物。

[0072] 应注意的是,以上提及的关于通式(I)化合物的所有实施方式也单独地或组合地适用于此。

[0073] 合成

[0074] 本发明的化合物可通过本领域技术人员公知的方法制备,包括但不限于以下描述的那些方法,或通过应用有机合成领域的技术人员已知的标准技术对这样的方法修改获得的方法。对于本领域技术人员来说,合适的修改和替换是公知的,容易且明显的,或容易地由科技文献获知。具体地,这样的方法可见于R.C.Larock,Comprehensive Organic Transformations,Wiley-VCH Publishers,1999。

[0075] 可预期的是,在本发明的上下文中公开的所有工艺可以以任何规模实施,包括毫克级、克级、若干克级(multigram)、千克级、若干千克级(multikilogram)或商业化工业级规模。

[0076] 应注意的是,本发明的化合物可包括不对称取代的碳原子,并可以光学活性形式或外消旋形式分离。因此,除非明确指出具体的立体化学或同分异构体形式,否则所有的手

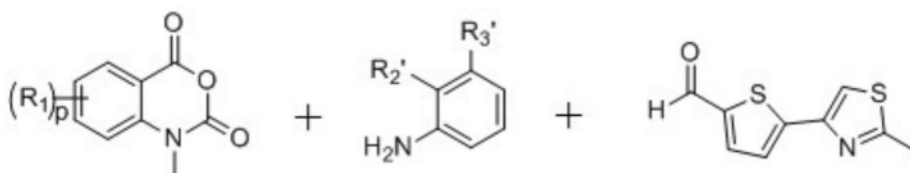
性、非对映体、外消旋体、同分异构体形式的结构都是可预期的。这些光学活性形式的制备和分离是公知的。例如,立体异构体的混合物可通过标准技术分离或通过从手性原材料来手性合成或通过目标手性中心的来有意合成,所述标准技术包括但不限于:在反相和手性色谱中通过常规色谱法拆分外消旋体形式,优选形成盐,重结晶等。

[0077] 本发明的化合物可通过各种合成途径来制备。

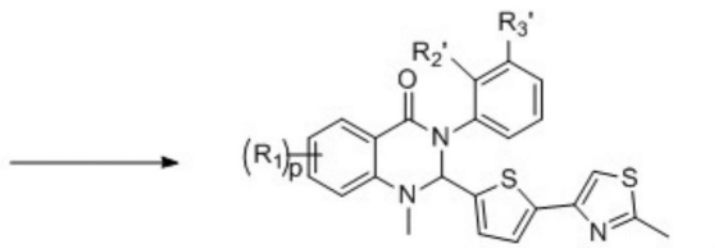
[0078] 在以下描述的反应中,需要对最终产品中存在的那些反应性官能团(例如羟基、氨基或巯基)进行保护,以避免它们参与到次要的、不必要的反应中。常规保护基可根据常规做法来使用,例如,见于T.W.Greene and P.G.M.Wuts in *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3rd ed., John Wiley and Sons, 1999; J.F.W.McOmie in *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973。

[0079] 反应性化合物和起始化合物可商购,或可通过本领域技术人员公知的技术容易地合成。除非另有说明,所有取代基如前所定义。

[0080] 通式(I)化合物可根据以下反应获得:



[0081]



[0082] 特别地,这个反应在有机溶剂中进行。

[0083] 根据一实施方式,将这三种起始化合物在有机溶剂(特别是乙酸)中混合。

[0084] 根据一实施方式,特别地在回流或微波辐射下,对所述有机溶剂进行加热,例如加热至100°C和180°C之间,特别是110°C至140°C,更特别是120°C至130°C的温度。

[0085] 加热时间为10分钟到6小时,例如30分钟到5小时,特别地1小时到4小时,更特别地2小时到3小时。

[0086]  $R_1$ 和 $p$ 如以上定义。

[0087]  $R_2'$ 和 $R_3'$ 分别对应基团 $R_2$ 和 $R_3$ ,或对应增加保护基后的基团。

[0088] 根据一实施方式, $R_2'$ 和 $R_3'$ 表示各自独立地选自以下基团:H、-OH、-NO<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>,条件是 $R_2$ 和 $R_3$ 中至少一个不为H。

[0089] 根据一具体实施方式,当 $R_2'$ 和/或 $R_3'$ 表示-NO<sub>2</sub>时,特别地通过本领域技术人员公知的技术之一,例如通过使锌与乙酸接触来使 $R_2'$ 和/或 $R_3'$ 转化为 $R_2$ 和/或 $R_3$  = -NH<sub>2</sub>。

[0090] 定义

[0091] 如本说明书所使用的,术语“约”指具体值的±10%的值的范围。例如,术语“约120mg”包括120mg±10%的值,即,包括108mg至132mg的值。

[0092] 如本说明书所使用的,除非另有说明,百分比是指以制剂总重量计的重量百分比。

[0093] 如本文所使用的,以“x-y”或以“x至/到y”或以“x和y之间”的形式表示的范围包括限值x和y以及这些限值之间的整数。例如:“1-5”或“1到/至5”或“1和5之间”是指整数1、2、3、4和5。优选的实施方式包括所述范围内的每个单独的整数,以及这些整数的任何子组合。例如,“1-5”优选的值可包括整数1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、2-3、2-4、2-5等。

[0094] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的盐”指在合理的医药判断范围内适于与人或动物组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应,或没有与合理的得益/风险比相称的其他问题性并发症的那些盐。

[0095] 通式(I)化合物的药学上可接受的盐是指盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐或硫酸氢盐、磷酸盐或磷酸氢盐、乙酸盐、草酸盐、苯甲酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、马来酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、葡萄糖酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐。

[0096] 卤原子是指元素周期表第VII族的化学元素,特别是氟、氯、溴和碘。

[0097] 术语具有1至3或1至4个碳原子的烷基是指直链或支链的烃基;实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基或叔丁基(tertiobutyl)。

[0098] “PEG”或“聚(乙二醇)”或“聚乙二醇”尤其是指:任选由选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基的基团封端的-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>-基团,或者任选由选自H、-OH和O-C<sub>1</sub>至C<sub>3</sub>烷基的基团封端的-(-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-基团,其中m选自1到500,特别地4到500,包括30至60。

[0099] PEG的平均摩尔质量可尤其标示在术语“PEG”的名称后,例如PEG-1450(1450g·mol<sup>-1</sup>)。

[0100] “PLA”或“聚(乳酸)”或“聚乳酸”尤其是指:任选由选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基的基团封端的-(C(=O)-CH(CH<sub>3</sub>)-O)<sub>p</sub>-基团,或者任选由选自-OH和O-C<sub>1</sub>至C<sub>3</sub>烷基的基团封端的-(O-CH(CH<sub>3</sub>)-C(=O))<sub>p</sub>-基团,其中p选自1到2000,特别地5到500,特别是10至50。

[0101] PLA的平均摩尔质量可尤其标示在术语“PLA”的名称后,例如PLA-1036(1036g·mol<sup>-1</sup>)。

[0102] “PLGA”或“PLG”表示聚(乳酸-共-乙醇酸),特别指任选由选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基的基团封端的-((C(=O)-CH(CH<sub>3</sub>)-O)<sub>p</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-O)<sub>q</sub>)<sub>r</sub>-基团,或者任选由选自-OH和O-C<sub>1</sub>至C<sub>3</sub>烷基的基团封端的-((O-CH<sub>2</sub>-C(=O))<sub>q</sub>-O-CH(CH<sub>3</sub>)-C(=O))<sub>p</sub>)<sub>r</sub>-基团,其中p、q和r的取值使得PLGA聚合物是统计共聚物或嵌段共聚物,特别是统计共聚物,并且特别地使得PLGA的平均摩尔质量(例如在术语“PLGA”的名称之后指明)在200和4000g·mol<sup>-1</sup>之间,特别地800到1200g·mol<sup>-1</sup>。特别地,p、q和r的取值使得PLGA中乳酸的摩尔百分比为约20%。特别地,p、q和r的取值使得PLGA由12个乳酸单元和3个羟基乙酸单元组成。

## 附图说明

[0103] 图1示出了蓖麻毒素(A,在晶体结构数据库中的名称是pdb 2AAI)和Stx2(B,pdb 1R4P)的晶体结构;

[0104] 图2是在实验部分进行的细胞检测的示意图;

[0105] 图3示出了在实施例的第II部分中所用的IC<sub>50</sub>计算方法,毒性曲线是在缺少抑制剂(对照)以及存在不同浓度的抑制剂的情况下获得的。

## 具体实施方式

## [0106] 实施例

[0107] I. 根据本发明化合物的合成

[0108] 合成中使用的所有化学品和溶剂是反应级的,无需进行额外纯化。使用前,将 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 在氯化钙的存在下蒸馏。在真空下,火焰干燥玻璃器皿,然后在氮气下冷却至室温。所有反应在干燥氮气下进行并通过TLC监测。

[0109] 具体地,用具有UV-可见探测器和RediSep柱的CombiFlash进行纯化。使样品吸附至硅藻土或二氧化硅并装载到固体填充柱中。具体地,使用乙酸乙酯/环己烷或甲醇/二氯甲烷进行梯度洗脱。具体收集在254nm处监测的级分。

[0110] 通过HPLC-MS的分析和纯化使用具有溶剂梯度的二元体系的Waters系统(二元梯度模块2525,在线脱气装置,样品管理器2767,光电二极管阵列探测器2996)进行。具体地,洗脱液具有如下梯度:(99.9%的水/0.1%的 $\text{HCOOH}$ )和(99.9%的 $\text{MeCN}$ /0.1%的 $\text{HCOOH}$ )或者(99.9%的水/0.1%的 $\text{HCOOH}$ )和(99.9%的 $\text{MeOH}$ /0.1%的 $\text{HCOOH}$ )。将每种化合物放置在用 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 或 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  95:5平衡的100-4.6mm(5mm) Zorbax SB-C18柱上。

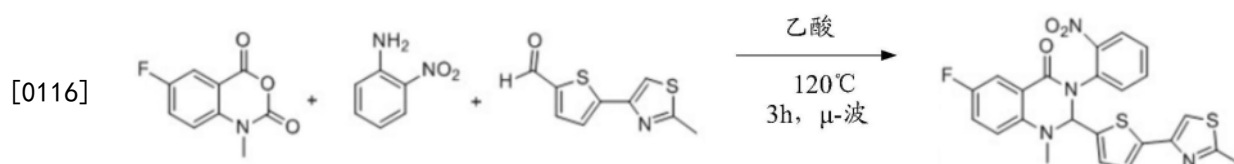
[0111] 该系统例如与具有ZQ2000四极分析仪的Waters Micromass ZQ系统联用。通过电喷雾技术进行电离,其他参数如下:离子源温度 $120^\circ\text{C}$ ,锥孔电压20V,0.3mL/min的流速连续进样。在m/z为100-2000的范围中以正离子和负离子模式记录质谱,并用Mass Lynx 4.0软件进行处理。

[0112] 红外光谱具体地在装备有UATR Two(Perkin Elmer)、Diamond/ZnSe(1反射)的Spectrum Two上进行记录。

[0113] NMR分析具体地在Bruker Avance 400Ultrashield spectrometer光谱仪上进行。 $^1\text{H}$ -NMR和 $^{13}\text{C}$ 谱分别在室温下于400MHz和100MHz下进行记录,样品以大约5mM的浓度用 $\text{DMSO}-d_6$ 或 $\text{CDCl}_3$ 溶解。 $\text{DMSO}$ 单峰信号设定在2.50ppm。化学位移以ppm为单位,耦合常数以Hz的单位。光谱数据与相关结构一致。

[0114] 化合物1的制备

[0115] 硝基前体1'的合成

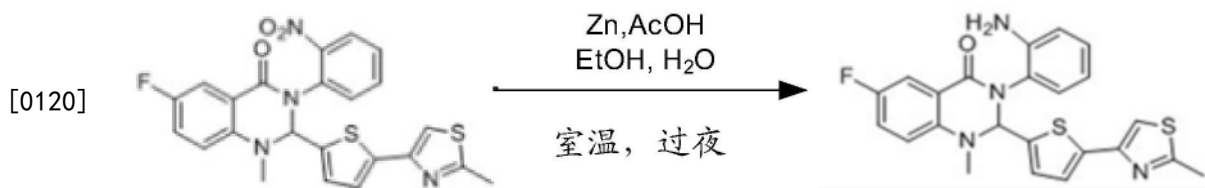


| 试剂                             | 当量 | M<br>(g/mol) | d | n<br>(mmol) | m<br>(mg) | V<br>(mL) |
|--------------------------------|----|--------------|---|-------------|-----------|-----------|
| 5-氟-N-甲基靛红酸酐                   | 1  | 195.15       | / | 1           | 195       | /         |
| 2-硝基苯胺                         | 1  | 138.13       | / | 1           | 138       | /         |
| 5-(2-甲基-1,3-噻唑-4-基)-2-噻吩<br>甲醛 | 1  | 209.00       | / | 1           | 209       | /         |
| 乙酸                             | /  | /            | / | /           | /         | 2         |

[0117]

[0118] 在微波辐射下于 $120^\circ\text{C}$ 下搅拌上述混合物3小时。将残余物溶解在 $\text{EtOAc}$ 中并用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液(3次)、盐水(2次)和水(1次)依次洗涤。有机相用 $\text{MgSO}_4$ 干燥,过滤并浓缩。残余物用色谱法(固体上样)纯化,用环己烷/ $\text{EtOAc}$ :9/1~>1/1混合物洗脱(产率62%)。

[0119] 化合物1的合成



[0121]

| 试剂               | 当量 | M(g/mol) | n(mmol) | m(mg) | V(mL) |
|------------------|----|----------|---------|-------|-------|
| 1'               | 1  | 480.07   | 0.44    | 273   | /     |
| Zn               | 30 | 65.39    | 13.2    | 860   | /     |
| EtOH             | /  | /        | /       | /     | 10    |
| H <sub>2</sub> O | /  | /        | /       | /     | 1.8   |
| AcOH             | /  | /        | /       | /     | 0.9   |

[0122] 将上述混合物在室温和避光保护下搅拌过夜。

[0123] 所得残余物用色谱法(固体上样)纯化,用环己烷/EtOAc:95/5~>0/1混合溶剂洗脱,然后通过将其溶解在最少量的EtOAc中并加入戊烷来使其再沉淀(产率63%)。

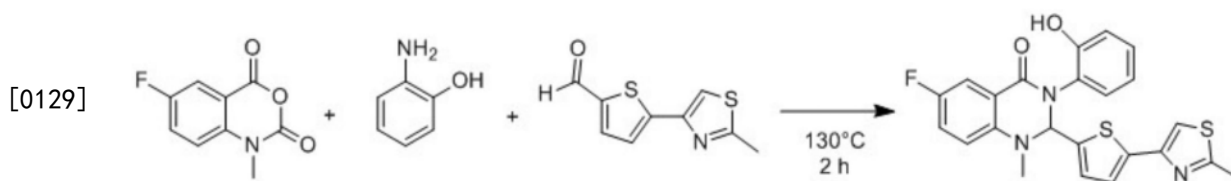
[0124] <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>): 2.69(s, 3H); 2.91(s, 3H); 4(s宽峰, 2H); 5.76(s, 1H); 6.54(dd, 1H, J: 4, J: 8.9); 6.60(td, 1H, J: 1.3, J: 7.8); 6.66(d, 1H, J: 3.7); 6.75(dd, 1H, J: 1.2, J: 8); 6.84(dd, 1H, J: 1.4, J: 7.9); 7-7.1(m, 3H); 7.1(dd, 1H, J: 3.1, J: 8.7); 7.72(dd, 1H, J: 3, J: 8.6)。

[0125] <sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>): 19.1; 36; 76.2; 111.9; 114.4(d, J: 7.1), 115.5(d, J: 24); 116.7; 118.8(d, J: 7.4); 118.9; 121.3(d, J: 23.1); 122.7; 125.2; 128.3; 129.2; 129.5; 137.8; 138.6; 142; 143.1; 148.7; 156.6(d, J: 239); 161; 166.4。

[0126] LC/MS: 保留时间3.23min。

[0127] M+H.: 451.4。

[0128] 化合物2的制备



[0130]

| 试剂                         | 当量 | M(g/mol) | n(mmol) | m(mg) | V(mL) |
|----------------------------|----|----------|---------|-------|-------|
| 5-氟-N-甲基靛红酸酐               | 1  | 195.03   | 1       | 195   | /     |
| 2-氨基苯酚                     | 1  | 109.13   | 1       | 109   | /     |
| 5-(2-甲基-1,3-噻唑-4-基)-2-噻吩甲醛 | 1  | 209.00   | 1       | 209   | /     |
| 乙酸                         | /  | /        | /       | /     | 2     |

[0131] 在130°C下搅拌混合物2小时。将残余物溶解在EtOAc中并用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(3次)、盐水(2次)和水(1次)依次洗涤。有机相用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。残余物用色谱法(固体上样)纯化,用环己烷/EtOAc:95/5~>1/1混合溶剂洗脱,然后通过溶解在最少量的EtOAc中并加入戊烷来使其再沉淀(产率25%)。

[0132] <sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>): 2.62(s, 3H); 2.9(s, 3H); 6.16(s, 1H); 6.75(td, 1H, J: 1.3, J:

7.7) ; 6.79 (dd, 1H, J: 4, J: 9) ; 6.93-7.01 (m, 3H) ; 7.15 (td, 1H, J: 1.7, J: 7.5) ; 7.28 (d, 1H, J: 3.6) ; 7.35 (td, 1H, J: 3.2, J: 8.8) ; 7.58 (dd, 1H, J: 3.1, J: 8.8) ; 7.71 (s, 1H)。

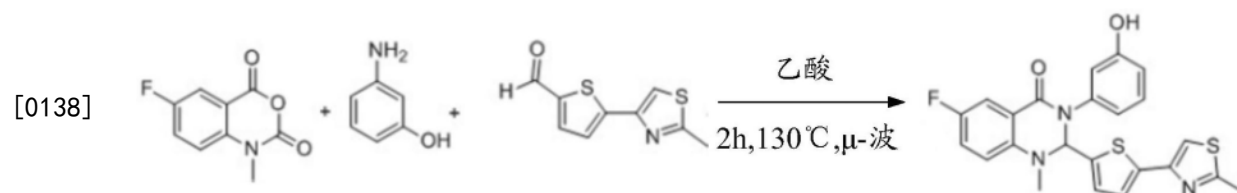
[0133]  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) : 18.5; 35.5; 75.3; 112.7; 113.7 (d, J: 23.6) ; 115 (d, J: 7) ; 116.7; 117.8 (d, J: 7) ; 118.8; 121.1 (d, J: 23.1) ; 122.6; 126.2; 128.3; 128.7; 129.9; 137.6; 139; 143.3; 147.8; 152.6; 155.3 (d, J: 235) ; 159.5; 165.9。

[0134] IR: 1646; 1496; 1450; 1163; 806; 740。

[0135] LC/MS: 保留时间 3.24 min。

[0136] M+H. : 452.4。

[0137] 化合物3的制备



| 试剂                         | 分子式  | 分子量    | 质量(g) | 体积(mL) | n (mmol) |
|----------------------------|--|--------|-------|--------|----------|
| 5-氟-N-甲基酞红酸酐               | C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> FNO <sub>3</sub> | 195.15 | 0.195 | /      | 1.0      |
| 3-氨基苯酚                     | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO               | 109.13 | 0.109 | /      | 1.0      |
| 5-(2-甲基-1,3-噻唑-4-基)-2-噻吩甲醛 | C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NOS <sub>2</sub> | 209.28 | 0.209 | /      | 1.0      |
| 乙酸                         | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | 60.05  | /     | 2.00   | /        |

[0140] 在130 °C下搅拌混合物2小时。将残余物溶解在EtOAc中并用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液和蒸馏水依次洗涤。有机相用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空下浓缩。用少量热EtOAc洗涤所得棕色固体,得到黄色粉末(17%)。

[0141]  $^1\text{H}$  NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) : 2.62 (s, 3H) ; 2.95 (s, 3H) ; 6.43 (s, 1H) ; 6.7-6.78 (m, 3H) ; 6.81 (dd, 1H, J: 4.2, J: 9) ; 6.97 (d, 1H, J: 3.7) ; 7.20 (t, 1H, J: 8) ; 7.33 (d, 1H, J: 3.6) ; 7.36 (dd, 1H, J: 3, J: 8.8) ; 7.61 (dd, 1H, J: 3, J: 8.8) ; 7.71 (s, 1H)。

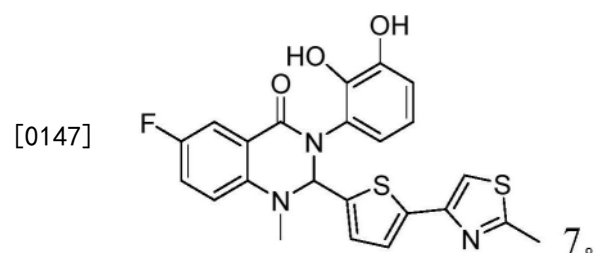
[0142]  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) : 18.5; 35.4; 76; 112.8; 113.7; 113.7 (d, J: 23) ; 114; 115.4 (d, J: 7) ; 116.8; 118 (d, J: 7) ; 121.3 (d, J: 23) ; 122.9; 128.2; 129.5; 137.7; 138.7; 140.8; 143.2; 147.7; 155.5 (d, J: 235) ; 157.6; 159.8; 166。

[0143] IR: 3161 (宽峰) ; 1612; 1499; 1452; 1187; 1156; 795; 766; 730。

[0144] LC/MS: 保留时间 = 3.16 min。

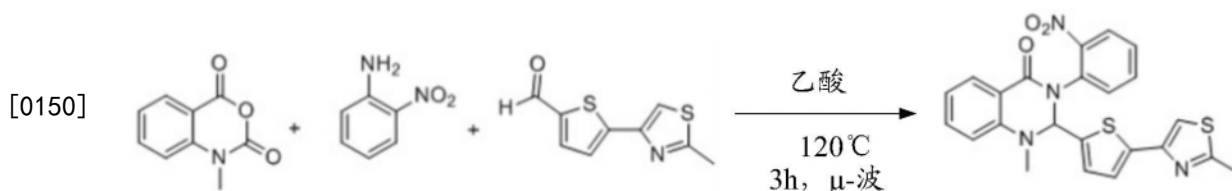
[0145] M+H. : 452.3。

[0146] 下式所示的化合物7用与化合物2或3类似的方法制备。



[0148] 化合物4的制备

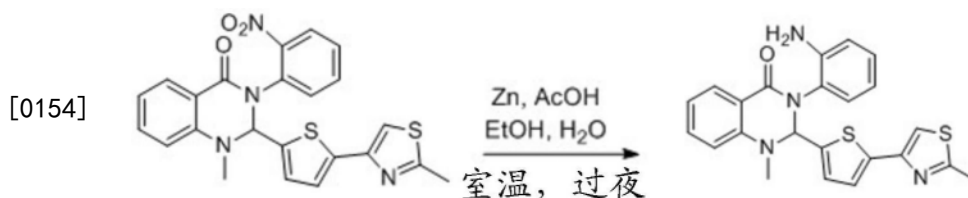
[0149] 硝基前体4'的合成



|        | 试剂                             | 当量 | M (g/mol) | n (mmol) | m (mg) | V (mL) |
|--------|--------------------------------|----|-----------|----------|--------|--------|
| [0151] | N-甲基靛红酸酐                       | 1  | 177.04    | 1        | 177    | /      |
|        | 2-硝基苯胺                         | 1  | 138.13    | 1        | 138    | /      |
|        | 5-(2-甲基-1,3-噻唑-4-基)-2-噻吩<br>甲醛 | 1  | 209.00    | 1        | 209    | /      |
|        | 乙酸                             | /  | /         | /        | /      | 2      |

[0152] 在微波辐射、120℃下搅拌上述混合物3小时。将残余物溶解在EtOAc中并用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液(3次)、盐水(2次)和水(1次)依次洗涤。有机相用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空下浓缩。残余物用色谱法(固体上样)纯化,用环己烷/EtOAc:9/1~>1/1混合溶剂洗脱(产率49%)。

[0153] 化合物4的合成



|        | 试剂               | 当量 | M (g/mol) | n (mmol) | m (mg) | V (mL) |
|--------|------------------|----|-----------|----------|--------|--------|
| [0155] | 4'               | 1  | 462.08    | 0.79     | 365    | /      |
|        | Zn               | 30 | 65.39     | 30       | 1500   | /      |
|        | EtOH             | /  | /         | /        | /      | 10     |
|        | H <sub>2</sub> O | /  | /         | /        | /      | 1.8    |
|        | AcOH             | /  | /         | /        | /      | 0.9    |

[0156] 将上述混合物在室温和避光保护下搅拌过夜。

[0157] 将所得残余物用色谱法(固体上样)纯化,用环己烷/EtOAc:95/5~>0/1混合物洗脱,然后通过溶解在最少量的EtOAc中并加入戊烷来使其再沉淀(产率81%)。

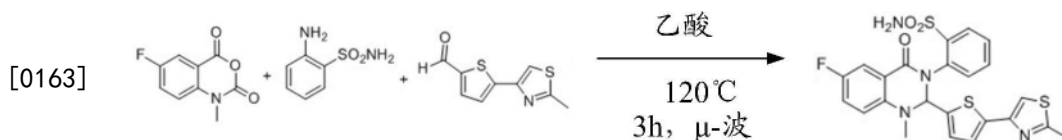
[0158] <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.62 (s, 3H); 2.90 (s, 3H); 5.04 (s, 2H); 5.97 (s, 1H); 6.48 (td, 1H, J:1.2, J:7.3); 6.68 (dd, 1H, J:1.2, J:7.7); 6.77 (d, 1H, J:8.2); 6.87 (dd, 1H, J:1, J:8); 6.9-6.96 (m, 2H); 7.03 (td, 1H, J:1.3, J:8.4); 7.3 (d, 1H, J:3.6); 7.48 (td, 1H, J:1.5, J:8.6); 7.72 (s, 1H); 7.88 (dd, 1H, J:1.5, J:7.7)。

[0159] <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 18.5; 34.9; 74.5; 112.7; 113; 115.9; 116.1; 117; 118.3; 122.6; 124.2; 128.1; 128.4; 128.7; 129.4; 134.2; 137.6; 138.7; 143.8; 143.8; 146.7; 147.8; 160.9; 165.9。

[0160] LC/MS: 保留时间=3.18min。

[0161] M+H<sup>+</sup>: 433.4。

[0162] 化合物5的制备



| 试剂                         | 当量 | M (g/mol) | n (mmol) | m (mg) | V (mL) |
|----------------------------|----|-----------|----------|--------|--------|
| 2-氨基苯磺酰胺                   | 1  | 172.20    | 0.4      | 69     | /      |
| 6-氟-N-甲基靛红酸酐               | 1  | 195.03    | 0.4      | 78     | /      |
| 5-(2-甲基-1,3-噻唑-4-基)-2-噻吩甲醛 | 1  | 209.28    | 0.4      | 84     | /      |
| 乙酸                         | /  | /         | /        | /      | 1      |

[0165] 在微波辐射、120°C下搅拌上述混合物3小时。将残余物溶解在EtOAc中并用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(3次)、盐水(2次)和水(1次)依次洗涤。有机相用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空下浓缩。残余物用色谱法(固体上样)纯化,以环己烷/EtOAc:9/1~>1/1混合溶剂洗脱,然后在二氯甲烷中重结晶(产率13%)。

[0166] <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.63 (s, 3H); 2.85 (s, 3H); 6.18 (s, 1H); 6.85 (dd, 1H, J: 4.2, J: 9.1); 6.89 (dd, 1H, J: 1.3, J: 7.4); 6.91 (d, 1H, J: 3.6); 7.32 (d, 1H, J: 7.6); 7.39 (td, 1H, J: 3.2, J: 8.7); 7.47 (s, 2H); 7.57-7.59 (m, 3H); 7.78 (s, 1H); 8.02 (dd, 1H, J: 1.9, J: 7.5)。

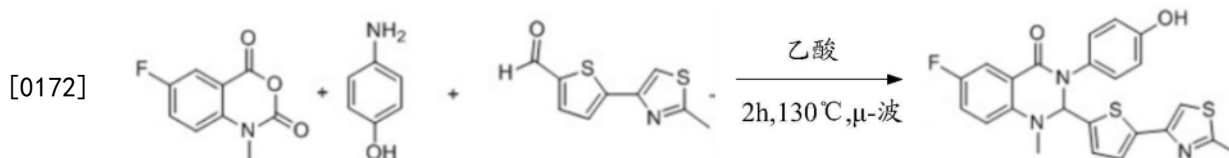
[0167] <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.5; 35.24; 76.7; 113.09; 113.7 (J: 23.6); 114.9 (J: 7); 116.6 (J: 7); 121.6 (J: 22.9); 122.6; 128.3; 128.84; 129.4; 132.1; 132.5; 136.1; 137.6; 138; 141.2; 143.3; 147.7; 155.1 (J: 235); 160.4; 166。

[0168] IR: 3175; 1653; 1496; 1474; 1450; 1357; 1342; 1160; 821; 810; 710。

[0169] LC/MS: 保留时间=3.20min。

[0170] M+H<sup>+</sup>: 515.4。

[0171] 化合物6的制备(本发明范围之外)



| 试剂                         | 分子式  | 分子量    | 质量(g) | 体积 (mL) | n (mmol) |
|----------------------------|--|--------|-------|---------|----------|
| N-甲-5-氟靛红酸酐                | C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 195.15 | 0.180 | /       | 0.92     |
| 4-氨基苯酚                     | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO                             | 109.13 | 0.100 | /       | 0.92     |
| 5-(2-甲基-1,3-噻唑-4-基)-2-噻吩甲醛 | C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NOS <sub>2</sub>               | 209.28 | 0.192 | /       | 0.92     |
| 乙酸                         | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                 | 60.05  | /     | 2.00    | /        |

[0174] 在微波辐射、130°C下搅拌混合物2小时。将残余物溶解在乙酸乙酯中并用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液和蒸馏水依次洗涤。有机相用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空下浓缩。用少量热EtOAc洗涤获得棕色固体,得到黄色粉末(73%)。

[0175] <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.60 (s, 3H); 2.89 (s, 3H); 6.32 (s, 1H); 6.74-6.77 (m, 3H); 6.92 (wide s, 1H); 7.06 (d, 2H, J: 8.1); 7.3-7.35 (m, 2H); 7.57 (d, 1H, J: 6.6); 7.72 (s, 1H); 9.59 (s, 1H)。

[0176] <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 18.5; 35.3; 76.4; 112.8; 113.7 (J: 24); 115.2 (J: 7); 115.4;

117.9(J:7);121.2(J:23);122.8;128;128.4;131;137.7;138.5;143.3;147.7;155.5(J:235);156.3;159.9;166。

[0177] IR:3216(宽峰);1630;1513;1498;1267;1163;888;811;737;711。

[0178] LC/MS:保留时间=3.33min。

[0179] M+H.:452.4。

[0180] II. 评估本发明化合物针对志贺毒素的保护活性的量度

[0181] IC<sub>50</sub>的方案和计算

[0182] 在A549细胞(人肺上皮细胞)或HeLa细胞(人子宫癌细胞)中测试所述化合物针对志贺病毒(Srx-1和/或Stx-2)的效果。使人类细胞在含有100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的DMEM(Dulbecco改良Eagle培养基)的150cm<sup>2</sup>培养瓶中于37℃、含5%的CO<sub>2</sub>的气氛下生长。将所述细胞以每孔50000个细胞的密度接种到Cytostar-T 96固体闪烁底孔的板(图2)。使所述细胞(100μL,在完全DMEM中:DMEM+10%胎牛血清,SVF)在抑制剂(50μL;不同浓度,3h预孵育)存在的条件下进行预孵育,或者不进行预孵育。随后,将补充有毒素(50μL,可变的浓度范围)的完全培养基添加至每孔中。孵育20h后,移除所述培养基(200μL)并替换为不含亮氨酸而含有10%SVF和0.5μCi/mL的<sup>14</sup>C-亮氨酸(GE)的DMEM培养基(Eurobio)。在37℃下孵育7h后,用沃乐(Wallac)1450Microbeta trilux闪烁计数器(PE)读板以测定细胞的掺入放射性。

[0183] 由于这些毒素阻断蛋白质的合成,受影响的细胞不再能吸收放射标记的亮氨酸。相反,用抑制剂处理的细胞仍合成蛋白质,因此吸收放射标记的氨基酸。当细胞在接近孔底部处浓度足够的放射性元素时,引起对该板所含的闪烁剂的激发并使闪烁计数器检测到光子发射(测量每分钟的计数,cpm)。随后,将该数据以细胞的蛋白质合成百分数表示。从而可描绘出无抑制剂(白色圆圈)或有抑制剂(黑色圆圈)的细胞毒性曲线(图2)。对所述数据的非线性回归分析能估算EC<sub>50</sub>,即,观察到摄取50%的放射性亮氨酸的有效浓度,这对应于50%的活细胞。EC<sub>50</sub>值越高,细胞保护越好,因为产生相同的细胞毒性需要更高的毒素浓度。因此,通过计算EC<sub>50</sub>比值R(图2)就能确定抑制剂的有效性。所述值越大(>1),细胞保护越好。

[0184] 在不存在抑制剂和随后存在浓度递增的抑制剂的情况下获得6个细胞毒性曲线。对各浓度(C)的抑制剂,通过Prism软件计算的R值来确定保护率百分比,其中Rmax对应系列中的R最大值:

[0185] %保护率=[(R-1)/(Rmax-1)]\*100

[0186] 随后利用Prism软件通过非线性回归由相对于化合物的各浓度描绘了对应细胞保护百分比的曲线来计算IC<sub>50</sub>(参见图3)。

[0187] IC<sub>50</sub>对应于给出其50%抑制能力的化合物浓度。该浓度越低,抑制剂的抑制能力越强。

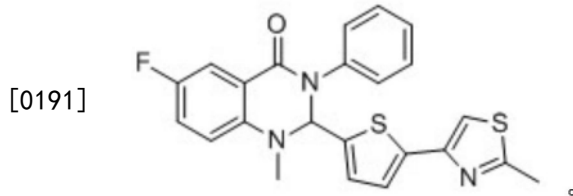
[0188] 结果

[0189]

| 化合物           | IC <sub>50</sub> (nM) |
|---------------|-----------------------|
| Retro-2.1(对照) | 100.0                 |
| <u>4</u>      | 78.6                  |
| <u>1</u>      | 14.2                  |
| <u>2</u>      | 20.0                  |

|                    |       |
|--------------------|-------|
| <u>3</u>           | 55.0  |
| <u>5</u>           | 35.0  |
| <u>7</u>           | 41.0  |
| <u>6</u> (本发明范围之外) | 483.0 |

[0190] 化合物Retro-2.1具有下式结构:



[0192] 结论

[0193] 这些结果表明,与化合物Retro-2.1(本发明范围之外,其中二氢喹唑啉酮带有未取代的苯基)以及化合物6(本发明范围之外,其中二氢喹唑啉酮带有对位被羟基取代的苯基)相比,被测试的化合物是针对志贺毒素的细胞作用的更强的抑制剂。

[0194] III. 评估本发明化合物针对蓖麻毒素的保护活性的量度

[0195] 本发明化合物的 $IC_{50}$ 的方案和计算与以上第II部分中类似,区别是以蓖麻毒素作为毒素。

[0196] IV. 评估本发明化合物针对利用逆向转运和/或突触蛋白5-依赖性转运的病毒,特别是通过内吞作用进入细胞的病毒的保护活性的量度

[0197] 将以下指明的细胞以50%的密度接种到96孔板中补充有10%胎牛血清的MEM培养基中,并在37°C、5%的 $CO_2$ 条件下孵育。所述细胞静置过夜。将各待测化合物以20mM的浓度溶解在DMSO中。第二天,各化合物用含血清的MEM稀释100倍,连续稀释(为5个浓度)并以等体积加入各孔的细胞培养基中。预孵育1小时后,按以下指明的感染复数(MOI)加入病毒。具体地,所用病毒包括编码绿色荧光蛋白的重组病毒(Towner et al.2005.Virology 332:20-7;or ANCHOR viruses supplied by NEOVIRTECH)。这些病毒能在动物体内复制并显示正常的发病机制。然后,用10%的福尔马林按以下指明的时间固定所述细胞。细胞核用标准方法以DAPI染色。随后用落射荧光显微镜对各孔照相来分析感染。用Cell Profiler软件通过分别计数DAPI染色的细胞和绿色荧光细胞来计数总的被感染的细胞。被感染的细胞的分分数通过用绿色荧光细胞数除以细胞总数来计算。用Combenefit软件根据细胞数来评估 $IC_{50}$ (Di Veroli et al.Bioinformatics 2016,32(18),2866-8)。

[0198] 感染和固定条件:

[0199] -用hCMV-ANCHOR,MOI 1感染MRC5细胞;固定6天;

[0200] -用VACV-ANCHOR,MOI 0.1感染HeLa细胞;固定48小时;

[0201] -用Myxomavirus T1-ANCHOR,MOI 0.05感染RK13细胞;固定6天;

[0202] -用RSV,MOI 0.2感染Hep2细胞;固定72小时。

[0203] 毒性

[0204] 测试(2次)浓度为100 $\mu$ M至0.2 $\mu$ M的本发明化合物。在加入本发明化合物后,固定上述细胞72小时。将各孔的计数的细胞数归一化为在相应于仅用DMSO处理的孔中计数的细胞数。使用上述Combenefit软件根据细胞数来评述 $CC_{50}$ 。

[0205] 结果

[0206] 所得结果示于下表：

|                |           | Retro-2.1 | 2     | 1       | 6 (本发明范围之外) |
|----------------|-----------|-----------|-------|---------|-------------|
| HeLa / VacV    | CC50 (nM) | > 50000   | 32300 | >50000  | 20400       |
|                | CI50 (nM) | 37.8      | 3.61  | 1.05    | 628         |
|                | 选择性指数     | 1323      | 8947  | 47619   | 32          |
| RK13 / MyxV T1 | CC50 (nM) | 3350      | ND    | 7460    | 12900       |
|                | CI50 (nM) | 74.5      | 14.2  | 1.44    | 5800        |
|                | 选择性指数     | 45        | ND    | 5,181   | 2           |
| MRC5 / hCMV    | CC50 (nM) | > 50000   | 21000 | 21500   | 16700       |
|                | CI50 (nM) | 11.6      | < 1   | < 1     | 281         |
|                | 选择性指数     | 4310      | 21000 | 21500   | 59          |
| Hep2 / RSV     | CC50 (nM) | > 50000   | 37600 | > 50000 | 25600       |
|                | CI50 (nM) | 162       | 20    | ND      | 2200        |
|                | 选择性指数     | 309       | 1880  | ND      | 12          |

[0208] V. 评估本发明化合物针对利用逆向转运和/或突触蛋白5-依赖性转运的细菌,特别是通过内吞作用进入细胞的细菌的保护活性的量度

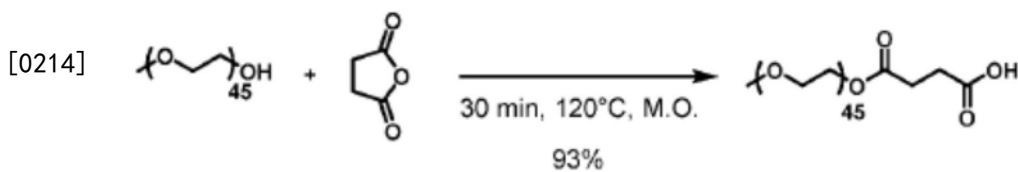
[0209] 用待评估的本发明化合物以25.50 $\mu$ M和75 $\mu$ M的浓度预处理HeLa229细胞30分钟,直到细菌加入所述细胞。

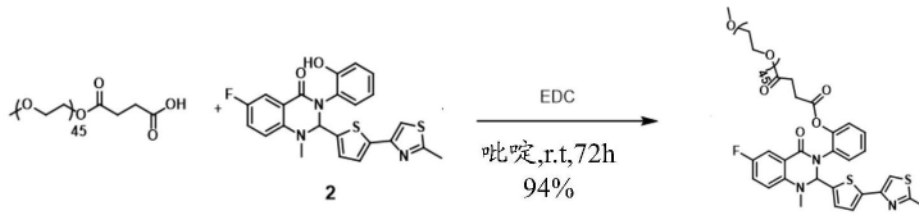
[0210] 显示原发感染的细胞在感染(hpi)24小时后溶解。

[0211] 用所述化合物处理的细胞也在感染48小时后溶解,所得裂解物用于感染新的HeLa229细胞,其在感染24小时后溶解,并用免疫印迹法对其和原发感染样品进行分析。使用特异性抗体(ad hoc antibodies)检测细菌的生长,并且使用肌动蛋白作为对照。

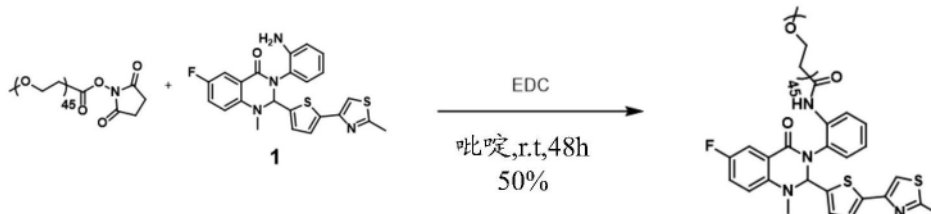
[0212] VI. 根据本发明的前药的合成

[0213] 根据本发明的前药按以下途径合成：



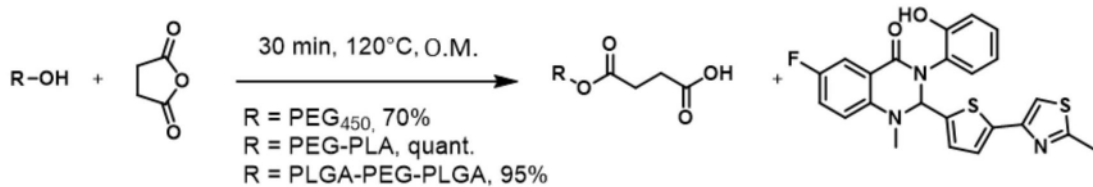


[0215]

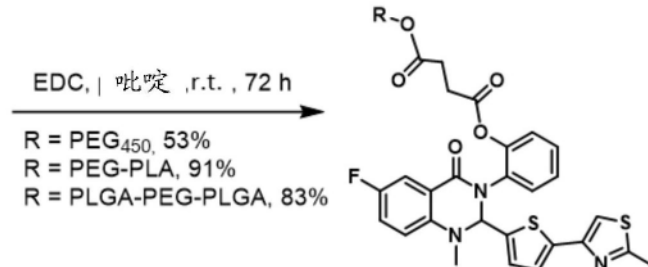


[0216] 由此得到的化合物在水中具有优异的溶解度 (>700mg/mL, 能够以用微型泵给药, 输注, 静脉注射)。它们通过血浆酰胺酶和/或酯酶的裂解是快速的 (例如, 在37°C下小鼠血浆中,  $t_{1/2}$ 为2.6小时)。

[0217] 按以下途径获得溶于水并具有热胶凝特性的热胶凝聚合物形式的其他前药:

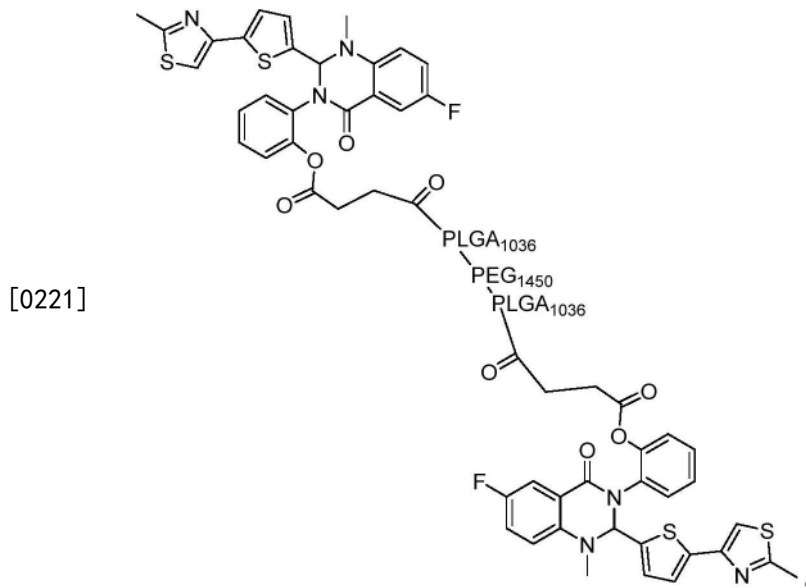


[0218]

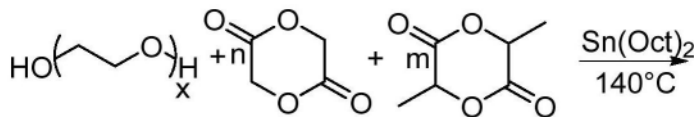


[0219] 或如下所示:

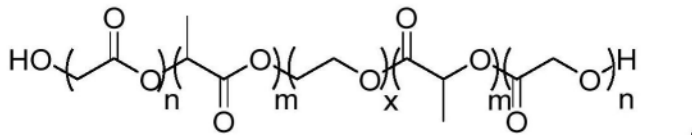
[0220] (化合物2)-PLGA1036-PEG1450-PLGA1036-(化合物2) ( $M_n=4393\text{g/mol}$ ) 或 (化合物2)-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-PLGA1036-PEG1450-PLGA1036-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-(化合物2), 特别是下式化合物:



[0222] 例如PLGA1036-PEG1450-PLGA1036按如下方法获得:



[0223]



[0224] 将聚(乙二醇)1450 (3.00g、2.07mmol) 置于施兰克瓶 (schlenk) 中, 在油浴中加热至100℃。在搅拌下将施兰克瓶置于真空下2小时。将乙交酯 (0.6g、5.13mmol) 和D,L-丙交酯 (2.64g、18.3mmol) 加入到施兰克瓶中, 并将混合物加热至130℃, 直到固体完全熔融。加入 Sn(Oct)<sub>2</sub> (1滴)。将混合物在氮气、搅拌下于130℃加热20小时。使混合物达到室温, 并溶于20mL的丙酮中。在搅拌下将所述溶液逐滴加入到4℃的蒸馏水中。将混合物在4℃下搅拌直至聚合物完全溶解, 然后将混合物加热至80℃。通过倾析回收聚合物。重复该顺序, 然后将固体溶解在二氯甲烷中。有机相用MgSO<sub>4</sub>干燥, 过滤并蒸发, 得到半透明的胶, 将其在真空下于40℃干燥15小时。经纯化的产物: 3.8g (49%)。

[0225] 摩尔质量 (PLA) = 1707g/mol; 摩尔质量 (PGA) = 365g/mol, 对应于化合物 PLGA1036-PEG1450-PLGA1036 (Mn = 3522g/mol; LA/GA = 3.8)。

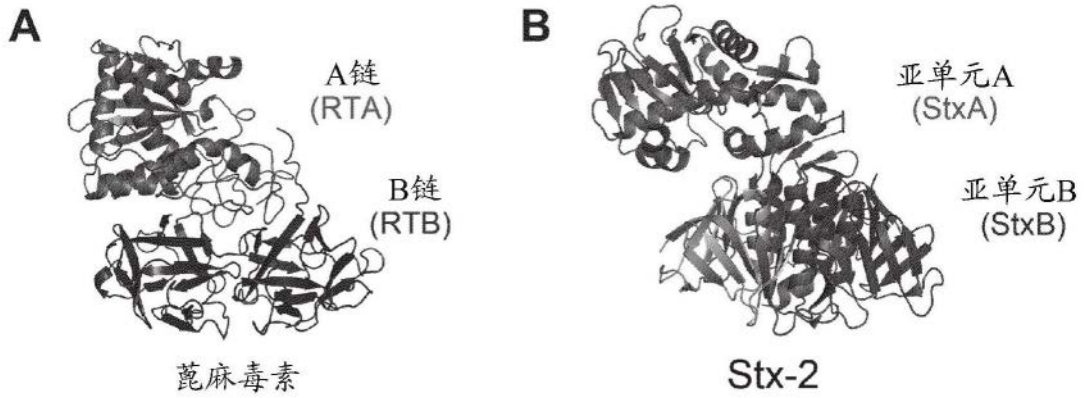
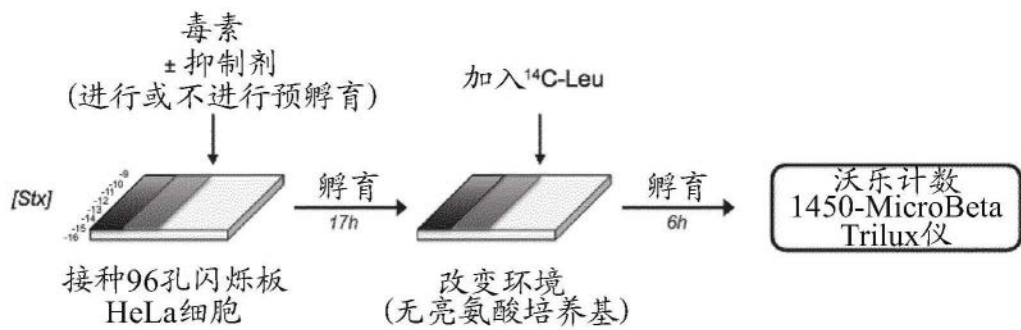


图1

原理:



细胞毒性曲线:

R的确定

$$R = \frac{EC_{50} \text{ 抑制剂}}{EC_{50} \text{ 对照}}$$

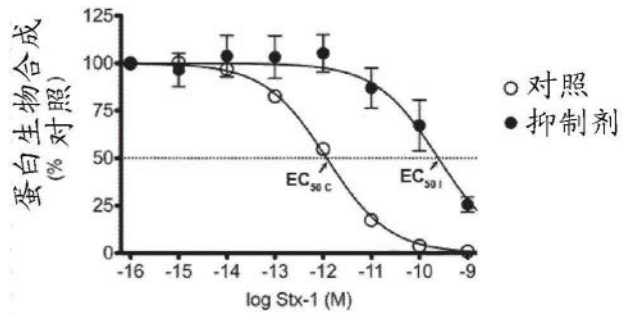


图2

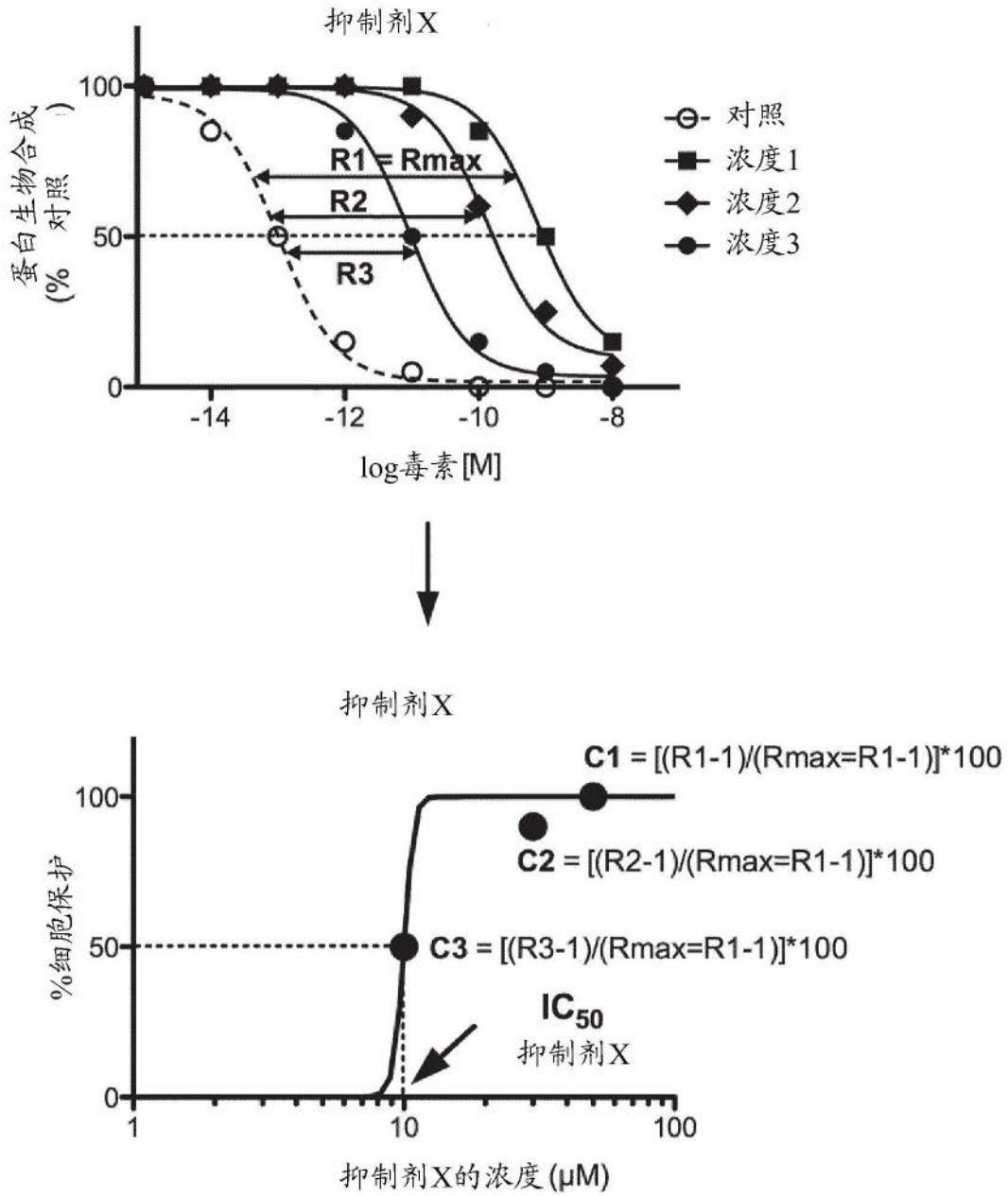


图3