



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107250112 B

(45) 授权公告日 2021.04.23

(21) 申请号 201580067667.6

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2015.10.09

A61P 35/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 25/28 (2006.01)

申请公布号 CN 107250112 A

A61P 17/10 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.10.13

A61P 17/06 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 17/00 (2006.01)

1417957.6 2014.10.10 GB

A61P 17/14 (2006.01)

1419496.3 2014.10.31 GB

A61P 27/10 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 39/06 (2006.01)

2017.06.12

C09K 11/06 (2006.01)

C12N 5/079 (2010.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/GB2015/052956 2015.10.09

CN 101316821 A, 2008.12.03

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 1144091 A, 1997.03.05

W02016/055800 EN 2016.04.14

W0 9807716 A2, 1998.02.26

(73) 专利权人 高力研究有限公司

US 4678793 A, 1987.07.07

地址 英国杜伦

Richard L. Beard. Synthesis and

(72) 发明人 安德鲁·怀廷 托德·莫德

biological activity of 1,2,3,4-tetrahydroquinoline and 3,4-(1H)-

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理

dihydroquinolin-2-one analogs of retinoic

有限公司 11112

acid.《Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry

代理人 王静 丁业平

Letters》.1997, 第7卷(第18期), 第2373-2378

页.

(51) Int.Cl.

审查员 张倩

C07D 215/18 (2006.01)

C07D 215/12 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

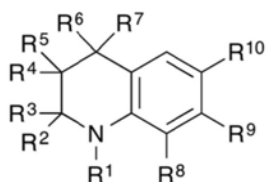
权利要求书4页 说明书28页 附图17页

(54) 发明名称

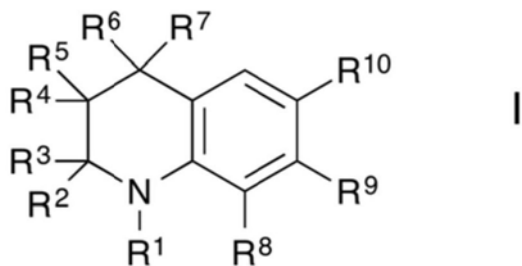
荧光合成类视色素

(57) 摘要

本发明描述了式I的化合物:

I 其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>和R<sup>10</sup>均如本文所限定。

1. 一种游离形式或盐形式的式I的化合物：



其中

R<sup>1</sup>为氢、或C1-4烷基；

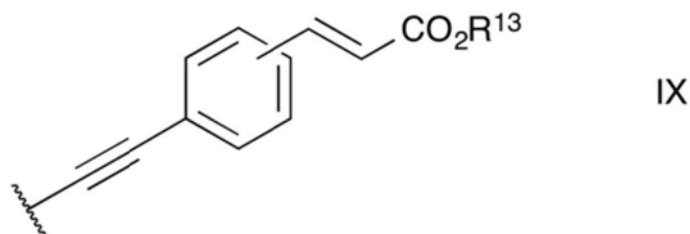
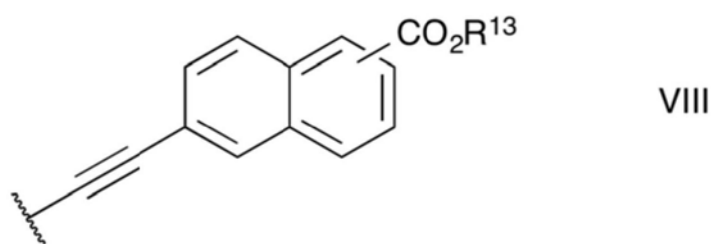
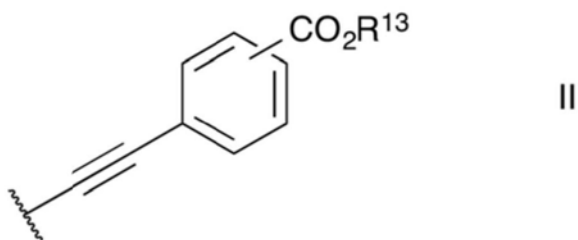
成对的R<sup>2</sup>和R<sup>4</sup>表示键，并且R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>相同或不同，分别为氢或C1-4烷基；或者成对的R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>表示键，并且R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>相同或不同，分别为氢或C1-4烷基；

R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>相同或不同，并且分别为氢或C1-4烷基；

条件是：如果来自R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>的一对基团表示键，则成对的R<sup>4</sup>和R<sup>6</sup>或成对的R<sup>5</sup>和R<sup>7</sup>不表示键；

R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>相同或不同，并且分别为氢或C1-4烷基；

R<sup>10</sup>为基团II、VIII或IX：



其中R<sup>13</sup>为氢或C1-4烷基。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其中R<sup>10</sup>为如权利要求1所限定的基团II。

3. 根据权利要求1所述的化合物，其中R<sup>10</sup>为如权利要求1所限定的基团VIII。

4. 根据权利要求1所述的化合物，其中R<sup>10</sup>为如权利要求1所限定的基团IX。

5. 根据前述权利要求1所述的化合物，其中所述部分-CO<sub>2</sub>R<sup>13</sup>位于4位。

6. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述部分-CO<sub>2</sub>R<sup>13</sup>位于3位。
7. 根据权利要求1所述的化合物,其选自由游离形式或盐形式的以下化合物:  
4-2-[2,4,4-三甲基-1-(丙-2-基)-1,4-二氢喹啉-6-基]乙炔基苯甲酸(17)。
8. 根据权利要求1所述的式I的化合物在制备使干细胞分化为至少一种分化细胞类型的药物中的应用。
9. 根据权利要求8所述的应用,其中所述干细胞是人或动物全能干细胞。
10. 根据权利要求8所述的应用,其中所述干细胞是人或动物的亚全能干细胞。
11. 根据权利要求8所述的应用,其中所述干细胞是人或动物的多能干细胞。
12. 根据权利要求11所述的应用,其中所述多能干细胞选自由以下细胞构成的组:造血干细胞、神经干细胞、骨干细胞、肌肉干细胞、间充质干细胞、上皮干细胞、外胚层干细胞、中胚层干细胞或内胚层干细胞。
13. 根据权利要求1所述的式I的化合物用于使干细胞分化为至少一种分化细胞类型的应用,其中所述应用用于非治疗或非诊断目的。
14. 根据权利要求1所述的式I的化合物在制备控制细胞凋亡的药物中的应用。
15. 根据权利要求1所述的式I的化合物用于控制细胞凋亡的应用,其中所述应用用于非治疗或非诊断目的。
16. 一种诱导干细胞的分化的方法,其包括以下步骤:
  - (i) 在适于维持所述干细胞的细胞培养基中形成干细胞的制备物,其中所述培养基包含根据权利要求1所述的式I的化合物;以及
  - (ii) 在使所述干细胞分化成至少一种分化细胞类型的条件下培养所述干细胞,其中所述方法用于非治疗或非诊断目的。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述干细胞是多能干细胞或亚全能干细胞。
18. 根据权利要求16或17中任一项所述的方法,其中所述分化细胞选自由以下细胞构成的组:角质形成细胞、成纤维细胞、上皮细胞、神经元胶质细胞或神经细胞、肝细胞、间充质细胞、肌细胞、肾细胞、血细胞、胰腺细胞或内皮细胞。
19. 根据权利要求16或17项所述的方法,其中所述方法在离体进行。
20. 根据权利要求1所述的式I的化合物在制备治疗或预防将受益于类视色素治疗的疾病或病症的药物中的应用。
21. 根据权利要求20所述的应用,其中所述疾病或病症受益于对细胞分化或细胞凋亡的控制。
22. 根据权利要求20或21所述的应用,其中所述疾病或病症为癌症或皮肤疾病。
23. 根据权利要求20或21所述的应用,其中所述化合物作为化学治疗剂或化学预防剂。
24. 根据权利要求23所述的应用,其中所述化合物在治疗或预防癌前期病症或癌性病症中作为化学治疗剂或化学预防剂。
25. 根据权利要求24所述的应用,其中所述癌前期病症或癌性病症选自皮肤、口腔、喉、肺、膀胱、外阴、乳腺、消化道中的那些病症。
26. 根据权利要求22所述的应用,其中所述化合物在治疗或预防基底细胞癌、鳞状细胞癌中作为化学治疗剂或化学预防剂。
27. 根据权利要求22所述的应用,其中所述化合物在治疗或预防白血病中作为化学治

疗剂或化学预防剂。

28. 根据权利要求22所述的应用, 其中所述化合物由于其调节体外和体内中的正常细胞、恶化前细胞和恶性细胞的生长、分化和凋亡的能力而作为化学治疗剂或化学预防剂。

29. 根据权利要求1所述的式I的化合物在制备促进细胞增殖的药物中的应用。

30. 根据权利要求29所述的应用, 其中所述细胞增殖为皮肤或神经细胞增殖。

31. 根据权利要求1所述的式I的化合物在制备促进组织健康和发育的药物中的应用。

32. 根据权利要求31所述的应用, 其用于促进人或动物体的皮肤、骨骼、神经、牙齿、毛发和/或粘膜的健康和发育。

33. 一种探针, 其包含根据权利要求1所述的式I的化合物。

34. 根据权利要求1所述的式I的化合物在制备用于监测细胞分化或凋亡的药物中的应用, 所述监测包括施用有效量的式I的化合物并且通过荧光医学成像检测由所述化合物发出的荧光。

35. 一种监测细胞分化或细胞凋亡的方法, 所述方法通过检测由所述化合物发出的荧光从而对根据权利要求1所述的式I的化合物的分布进行成像, 由此监测细胞分化或细胞凋亡, 其中所述方法用于非治疗或非诊断目的。

36. 一种监测细胞分化或细胞凋亡的方法, 所述方法通过检测拉曼散射信号对根据权利要求1所述的式I的化合物的分布进行成像, 由此监测细胞分化或细胞凋亡, 其中所述方法用于非治疗或非诊断目的。

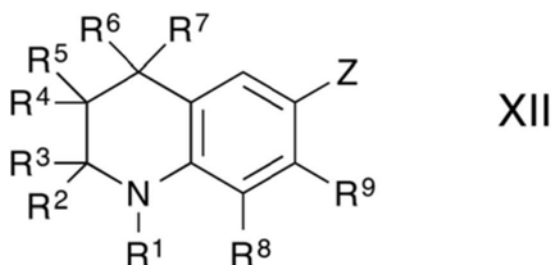
37. 一种监测根据权利要求1所述的式I的化合物的细胞内或细胞外的浓度和分布, 以制作离体、体内或体外中的式I的化合物的浓度的方法, 其中所述方法用于非治疗或非诊断目的。

38. 一种用于将由根据权利要求1所述的式I的化合物发出的荧光与由式I的化合物刺激的拉曼散射信号叠加的方法, 其中所述方法用于非治疗或非诊断目的。

39. 一种用于将由根据权利要求33或34所述的式I的化合物发出的荧光与由根据权利要求37所述的式I的化合物刺激的拉曼散射信号计算的浓度叠加的方法, 其中所述方法用于非治疗或非诊断目的。

40. 一种组合物, 其包含根据权利要求1所述的式I的化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

41. 一种用于制造根据权利要求1所述的式I的化合物的工艺, 其包括使式XII的化合物与式XIII或XIV的化合物反应:



其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 和 $R^9$ 分别如权利要求1所限定; 并且

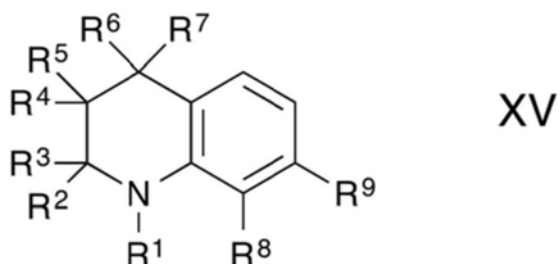
Z为离去基团;

$R^{10}H$  XIII

$R^{10}Z$  XIV

其中 $R^{10}$ 如权利要求1所限定。

42. 一种用于制造根据权利要求1所述的式I的化合物的工艺, 其包括使式XV的化合物与式XIV的化合物反应;



其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 和 $R^9$ 分别如权利要求1所限定;

$R^{10}Z$  XIV

其中 $R^{10}$ 如权利要求1所限定; 并且

Z为离去基团。

43. 一种测定治疗活性化合物的相对亲和性的方法, 包括利用根据权利要求1所述的式I的荧光化合物处理合成或天然蛋白受体或细胞, 并且利用所述治疗活性化合物替代所述式I的荧光化合物, 其中所述方法用于非治疗或非诊断目的。

## 荧光合成类视色素

### 技术领域

[0001] 本发明涉及新型化合物、它们的应用以及与之相关的治疗方法。

[0002] 更具体地,本发明涉及新型荧光合成类视色素(retinoid)化合物及其在控制细胞分化中的应用。本发明还提供了使用本发明的新型化合物的药物治疗方法。

### 背景技术

[0003] 维生素A(视黄醇)及其衍生物属于被称为类视色素的一类化合物。类视色素是一类重要的信号分子,该信号分子参与控制从胚胎发生到成体内稳态的许多重要的生物学途径以及干细胞发育的许多方面,如干细胞增殖、分化和凋亡。

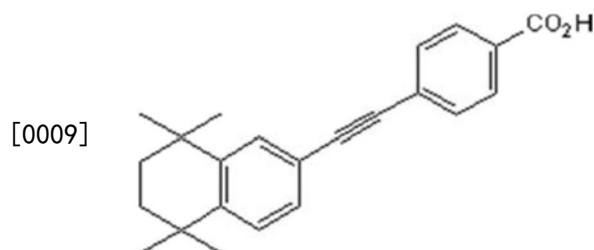
[0004] 类视色素在结构和/或功能上与维生素A有关;并且许多类视色素具有生物活性,包括全反式视黄酸(ATRA)。ATRA是最丰富的内源性类视色素并且已被广泛研究多年;ATRA在生理和实验条件下异构化,具有激活不同受体的不同异构体,因此解释了对这些小分子观察到的各种生物学效应。

[0005] 尽管类视色素的毒性抑制了其广泛使用,但是由于类视色素在正常细胞和肿瘤细胞两者中能够控制分化和凋亡,因此使得它们具有作为化学预防剂和化学治疗剂的潜力。

[0006] 然而,ATRA显示出差的稳定性,特别是在暴露于光下时。ATRA化合物在暴露于光下时会异构化和降解。为了克服这个问题,人们努力在暗处存储和使用ATRA,但是这样的预防措施增加了与使用ATRA有关的成本,并且不能完全减轻该问题。此外,由于ATRA在储存时易于光异构化和降解,因此难以准确地预测以单剂量施用的活性化合物的量。人们试图通过合成稳定的类视色素化合物从而克服与ATRA有关的问题。通常认为ATRA由于其共轭连接基团而易于光解异构化。

[0007] 国际专利申请No.PCT/GB2007/003237(WO 2008/025965)公开了表现出良好稳定性并诱导细胞分化的新的类视色素化合物。

[0008] 一个特别令人关注的化合物是EC23<sup>®</sup>,其由Reinnervate销售:



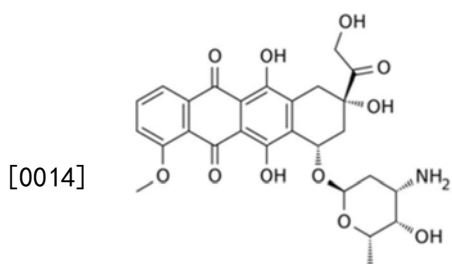
[0010] EC23<sup>®</sup>通常表现出良好的光照稳定性,并且在储存时表现出良好的稳定性。还发现EC23<sup>®</sup>不易于代谢降解,因此在人体或动物体中可能具有相对长的相关半衰期。然而,EC23<sup>®</sup>仅是弱荧光,并且需要可能会损害生物样品的紫外线激发。

[0011] 荧光成像已经迅速成为调查生物学过程的有力工具,特别是在活细胞中,其中在活细胞的生理环境中可能观察到细胞事件。单分子可视化技术的发展极大增强了荧光显微

术对此类应用的有效性,使得能够在其内源环境中跟踪蛋白质和小分子。

[0012] 荧光是一种发光形式,其中吸收了光或其他电磁辐射的物质由电子激发态发射光。在荧光中,发射光的波长通常比吸收光的波长更长(并且能量更低)。这种现象被称为斯托克斯位移,并且归因于在发射吸收的光子之前,通常通过振动弛豫到第一激发态(S1)的最低能级而导致的能量损失。量子效率给出了荧光过程的效率:它定义为发射的光子数与吸收的光子数之比(最大值=1,即,每个吸收光子都会产生发射光子)。荧光衰减通常是指指数衰减,并且荧光寿命是指在经历松弛回到基态之前保持在激发态的分子的半衰期的量度。在磷光中,观察到较长的激发态寿命,随后是来自激发三重线态的辐射衰减(即光子发射)。

[0013] 阿霉素是用于治疗许多癌症的化疗药物,这些癌症包括白血病、霍奇金淋巴瘤、膀胱癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、卵巢癌和甲状腺癌。分子的两亲性质和两性性质是指药物能够同时结合细胞膜和蛋白质。



阿霉素

[0015] 由于阿霉素的固有荧光,该化合物也成为荧光成像领域中的通用研究工具,因此已经在各种细胞和组织中看到了其分布。由于发现阿霉素的荧光强度取决于其浓度和微环境,所以能够通过考虑阿霉素与诸如DNA、组蛋白和磷脂之类的细胞成分的相互作用来表征卵巢癌A2780细胞中的药物的细胞内摄取和运输。

[0016] 目前,阿霉素是唯一已知的具有固有荧光发射性以及显著生物活性的小分子。因此,如果可以将荧光掺入至干细胞发育的小分子调节剂中,这本身就构成了强大的探针,并且不需要使用荧光染料、蛋白质和量子点。特别地,使用活细胞跟踪技术将提供关于细胞摄取和定位的宝贵信息,从而提供对类视色素活性和新陈代谢的新见解。此外,由于不再需要将大荧光实体附着至目标分子上,所以目标分子可以在其天然环境的生理背景下被追踪。此外,产生可能具有有用的荧光性质的惰性荧光探针也可能是有利的。

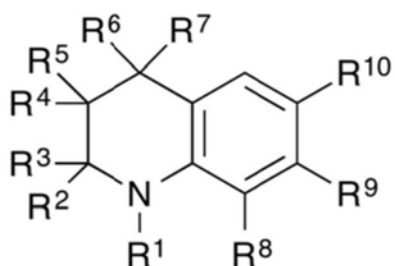
[0017] 因此,为了改进荧光成像,需要这样的新型荧光团,该荧光团表现出良好储存稳定性并且不易于代谢降解,因此在体内具有相对长的相关半衰期。因此,本发明的目的是提供稳定的荧光类视色素。

## 发明内容

[0018] 本发明通过制备具有给电子氮的新型分子体系以提供高度共轭结构,从而提供EC23<sup>®</sup>型分子的荧光型。

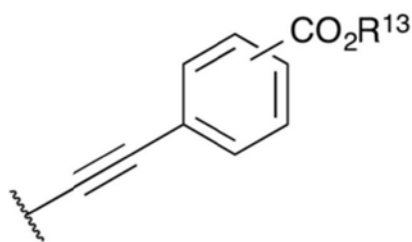
[0019] 因此,根据本发明的第一方面,提供了一种游离形式或盐形式的式I的化合物及其异构体:

[0020]



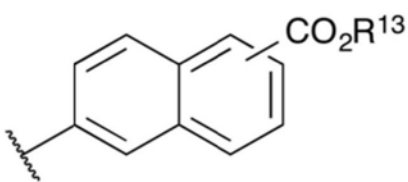
I

[0021] 其中

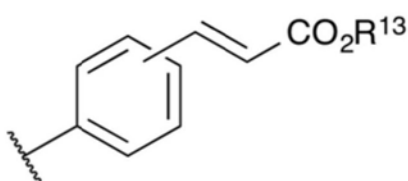
[0022]  $R^1$ 为氢、烷基C1-10或酰基；[0023]  $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 和 $R^5$ 可以相同或不同，并且分别为氢或烷基C1-4，或者成对的 $R^2$ 和 $R^4$ 或成对的 $R^3$ 和 $R^5$ 表示键；[0024]  $R^6$ 和 $R^7$ 可以相同或不同，并且分别为氢、烷基C1-4，或者成对的 $R^4$ 和 $R^6$ 或成对的 $R^5$ 和 $R^7$ 表示键，或 $R^6$ 和 $R^7$ 一起形成基团：[0025]  $=CR^{11}R^{12}$ ；[0026] 条件是：如果来自 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 和 $R^5$ 的一对基团表示键，则成对的 $R^4$ 和 $R^6$ 或成对的 $R^5$ 和 $R^7$ 不表示键；[0027]  $R^8$ 和 $R^9$ 可以相同或不同，并且分别为氢、烷基C1-10、芳基、芳烷基、卤素、三氟烷基、氰基、硝基、 $-NR^aR^b$ 、 $-OR^a$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(O)OR^a$ 、 $-OC(O)R^a$ 、 $-S(O)R^aR^b$ 和 $-C(O)NR^aR^b$ ；[0028]  $R^{11}$ 和 $R^{12}$ 可以相同或不同，并且分别为氢或烷基C1-10；以及[0029]  $R^a$ 和 $R^b$ 可以相同或不同，并且分别为氢或烷基C1-10；[0030]  $R^{10}$ 为基团II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X或XI：

II

[0031]

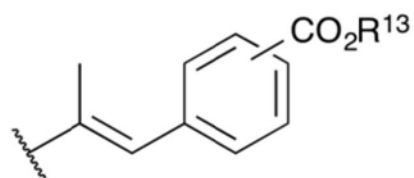


III

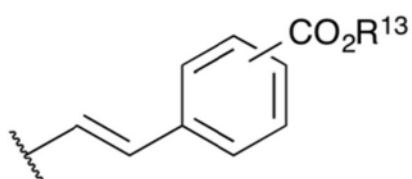


IV

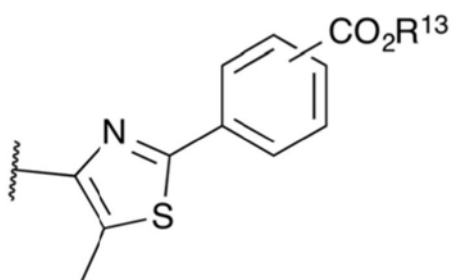




V

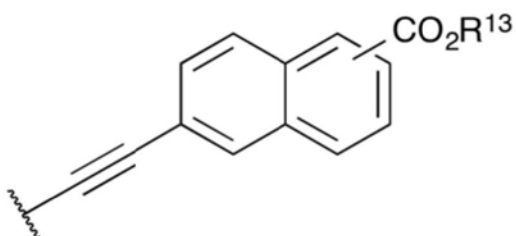


VI

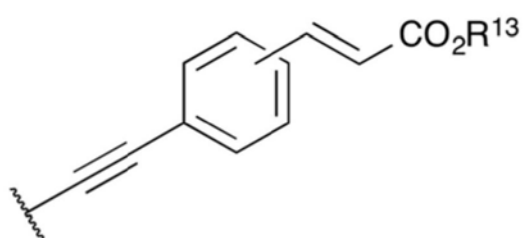


VII

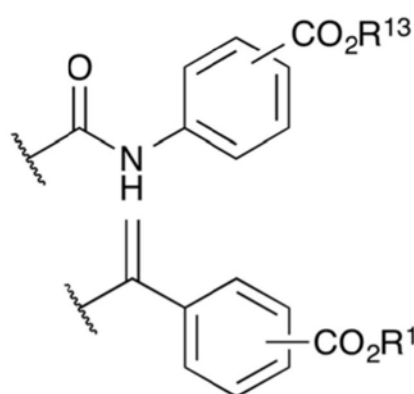
[0032]



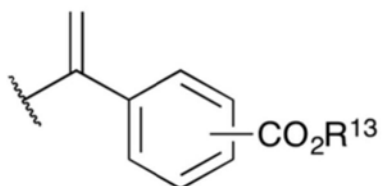
VIII



IX



X



XI

[0033] 其中 $\text{R}^{13}$ 为氢或烷基C1-10。

[0034] 如本文所用,术语“烷基”是指完全饱和的、支链的、无支链的或环状的烃部分,即伯烷基、仲烷基或叔烷基,或者在适当的情况下,其指的是环烷基或被环烷基取代的烷基,它们也可以是饱和或不饱和的烷基。如果没有另外指出,则烷基优选包含1至10个碳原子、更优选1至7个碳原子或1至4个碳原子。烷基的代表性实例包括但不限于甲基、乙基、正丙

基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基等。

[0035] 如本文所用,术语“芳基”是指仅由氢和碳组成且包含6至19个碳原子、优选6至10个碳原子的芳族单环或多环烃环体系,其中该环体系可以是部分饱和的。芳基包括但不限于诸如苄基、苯基、茚基和萘基之类的基团。除非在本说明书中另有具体说明,否则术语“芳基”或前缀“芳(ar)-”(例如“芳烷基”)意在包括任选被一个或多个取代基取代的芳基,所述取代基选自烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、氰基、硝基、氨基、肟基、芳基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基构成的组中。优选的芳基是任选被取代的苯基或萘基。

[0036] 芳基可以为单环、双环、三环或多环,优选为单环、双环或三环,更优选为单环或双环。

[0037] 在本发明的一个方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团II、III或IV。

[0038] 在本发明的一个方面中, $R^1$ 为烷基C1-10,优选为烷基C1-3。

[0039] 在本发明的一个方面中, $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 和 $R^5$ 分别为氢。

[0040] 在本发明的一个方面中,成对的 $R^2$ 和 $R^4$ 或成对的 $R^3$ 和 $R^5$ 表示键。

[0041] 在本发明的一个方面中, $R^6$ 和 $R^7$ 相同或不同; $R^6$ 和 $R^7$ 可以分别表示烷基C1-4,例如甲基。

[0042] 如本文所用,术语“卤素”或“卤代”是指氟、氯、溴和碘。

[0043] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团II。

[0044] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团III。

[0045] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团IV。

[0046] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团V。

[0047] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团VI。

[0048] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团VII。

[0049] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团VIII。

[0050] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团IX。

[0051] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团X。

[0052] 在本发明的另一方面中, $R^{10}$ 为如本文所限定的基团XI。

[0053] 部分- $CO_2R^{13}$ 优选位于4位,即在乙炔基的对位。 $R^{13}$ 优选为氢。

[0054] 可以提及的式I的化合物包括选自以下化合物构成的组中的那些化合物:

[0055] 游离形式或盐形式的4-2-[4,4-二甲基-1-(丙-2-基)-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基]乙炔基苯甲酸(9);和

[0056] 6-(1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基)-萘-2-羧酸甲酯(11);

[0057] 3-[4-(1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基)-苯基]-丙烯酸甲酯(13);和

[0058] 4-2-[2,4,4-三甲基-1-(丙-2-基)-1,4-二氢喹啉-6-基]乙炔基苯甲酸(17);以它们的异构体。

[0059] 诸如ATRA之类的类视色素化合物在储存时是不稳定的。特别地,当这种化合物暴露于300nm至400nm区域的光时易于光异构化和降解。令人惊奇的是,本发明的式I的化合物在暴露于光时是稳定的,并且经历的光异构化和降解远少于ATRA。通常,式1的化合物的稳

定性比诸如ATRA之类的类视色素好得多,特别是式1的化合物受光异构化的影响更小。通常,在本发明的化合物暴露于波长为300nm至400nm的光3天后,其经历的异构化和降解比ATRA少得多。通常,在本发明的化合物暴露于波长为300nm至400nm的光3天后,保留有至少60重量%的本发明化合物(而ATRA为小于40重量%)。

[0060] 通常,本发明的化合物诱导干细胞(例如人神经干细胞)分化为神经亚型。通常,本发明的化合物诱导细胞分化至与已知类视色素(例如ATRA)相当或更大的程度。

[0061] 将包含干细胞(例如,源自人胎儿脑组织的腹侧中脑的细胞)的样品暴露于补充有本发明化合物的基质后,可以显著增加表达神经元标记物的分化细胞数。通常,可以将样品暴露于这种基质约7天。

[0062] 在根据本发明的优选应用中,提供了如本文定义的化合物或组合物在干细胞分化为至少一种分化细胞类型中的应用。

[0063] 干细胞通常可以是人或动物全能干细胞,特别是非人全能干细胞,例如哺乳动物(例如小鼠、大鼠或兔)的全能细胞。

[0064] 可选地,干细胞可以是人或动物亚全能干细胞,优选为人亚全能干细胞。

[0065] 在本发明的可替代的优选实施方案中,所述干细胞是人或动物的多能干细胞。

[0066] 在本发明的优选实施方案中,所述多能干细胞选自由以下细胞构成的组:造血干细胞、神经干细胞、骨干细胞、肌肉干细胞、间充质干细胞、上皮干细胞(源自诸如皮肤、胃肠粘膜、肾脏、膀胱、乳腺、子宫、前列腺和垂体等内分泌腺之类的器官)、外胚层干细胞、中胚层干细胞或内胚层干细胞(例如源自诸如肝脏、胰腺、肺和血管之类的器官)。

[0067] 根据本发明的另一方面,提供了一种诱导干细胞的分化的方法,其包括以下步骤:

[0068] (i) 在适于维持所述干细胞的细胞培养基中形成干细胞的制备物,其中所述培养基包含根据式I的化合物;以及

[0069] (ii) 在使所述干细胞分化成至少一种分化细胞类型的条件下培养所述干细胞。

[0070] 在本发明的优选方法中,所述干细胞是多能干细胞或亚全能干细胞。根据一个实施方案,所述干细胞不是全能干细胞。优选地,所述干细胞是人源的。

[0071] 在本发明的优选方法中,所述分化细胞选自由以下细胞构成的组:角质形成细胞、成纤维细胞(例如皮肤、角膜、肠粘膜、口腔粘膜、膀胱、尿道、前列腺、肝脏)、上皮细胞(例如皮肤、角膜、肠粘膜、口腔粘膜、膀胱、尿道、前列腺、肝脏)、神经元胶质细胞或神经细胞、肝细胞、间充质细胞、肌细胞(心肌细胞或肌管细胞)、肾细胞、血细胞(例如,CD4+淋巴细胞、CD8+淋巴细胞)、胰腺细胞或内皮细胞。

[0072] 通常,培养基中本发明化合物的浓度为0.1 $\mu$ M至20 $\mu$ M;典型地为约10 $\mu$ M。

[0073] 在本发明的优选方法中,该方法在可见光和/或UV光、不超过50 $^{\circ}$ C的温度和/或氧化试剂(例如空气或DMSO)的存在下进行。本发明的方法可以在离体(ex vivo)、体内或体外(in vitro)进行。

[0074] 本发明的化合物表现出良好的稳定性并且可以用于控制细胞分化和细胞凋亡。

[0075] 因此,根据本发明的又一方面,提供了根据式I的化合物在治疗或预防将会受益于类视色素治疗的疾病或病症中的应用。

[0076] 式I的化合物在将细胞分化和细胞凋亡控制在与ATRA相当或更大的程度的同时,表现出良好的稳定性,并且与ATRA相比,更不容易经历光异构化。

[0077] 根据本发明的又一方面,提供了用于控制细胞分化或凋亡的式I化合物。

[0078] 疾病或病症通常受益于对细胞分化或凋亡的控制。

[0079] 可能受益于类视色素治疗的疾病或病症包括癌症(例如神经瘤)、皮肤疾病(诸如痤疮)、皮肤创伤(例如烫伤、紫外线损伤、皮肤老化)。

[0080] 由于本发明化合物具有控制正常细胞和肿瘤细胞中的分化和凋亡的能力,因而可以作为化学治疗剂或化学预防剂。特别地,本发明的化合物可能特别适合于治疗或预防癌症前期病症或癌性病症,该癌症前期病症或癌症病症包括皮肤、口腔、喉、肺、膀胱、外阴、乳腺、消化道的癌症前期病症或癌症病症。本发明的化合物可用于治疗或预防包括头颈部肿瘤和膀胱肿瘤在内的基底细胞癌、鳞状细胞癌。特别适用于通过使用本发明化合物治疗或预防的癌症包括白血病,例如骨髓性白血病,特别是急性早幼粒细胞白血病。

[0081] 据信,本发明的化合物抑制体外细胞的转化并抑制癌发生。据信,本发明的化合物因此表现出对肿瘤扩大和/或肿瘤发生的抑制作用。当将本发明的化合物用作化学治疗剂时,本发明的化合物通常阻止或逆转致癌分级,从而减少或避免明显恶性肿瘤的临床后果。

[0082] 据信,由于本发明的化合物具有调节体外和体内中的正常细胞、恶化前细胞和恶性细胞的生长、分化和凋亡的能力,因而表现出化学治疗和/或化学预防性能。

[0083] 根据本发明的又一方面,提供了本发明化合物在促进细胞增殖,例如皮肤或神经细胞增殖中的应用。

[0084] 根据本发明的又一方面,提供了本发明化合物在促进组织健康和发育,特别是在促进人或动物体的皮肤、骨骼、神经、牙齿、毛发和/或粘膜的健康和发育中的应用。本发明的化合物可用于预防或治疗老化迹象(特别是皱纹和老年斑)、皮肤病症如痤疮(特别是严重痤疮和/或顽固性痤疮)、牛皮癣、妊娠纹、毛发角化病、气肿、秃发。

[0085] 根据本发明的又一方面,本发明的化合物可用于治疗或预防眼睛的疾病或病症,或可用于维持视力或使视力处于最佳状态。

[0086] 根据本发明的又一方面,本发明的化合物可以用作抗氧化剂,特别用于人体或动物体内或用于人体或动物体上。

[0087] 本发明化合物对人或动物体的施用剂量取决于预期应用。例如,适用于局部施用的制剂通常包含0.025重量%至1重量%的本发明的化合物,特别是0.025重量%至0.1重量%。对于化学治疗应用,常规剂量为20mg/m<sup>2</sup>/天至80mg/m<sup>2</sup>/天,适宜为40mg/m<sup>2</sup>/天至50mg/m<sup>2</sup>/天,更适宜为约45mg/m<sup>2</sup>/天。

[0088] 如本文所述,本发明的化合物是固有荧光的。

[0089] 因此,根据本发明的又一方面,提供了包含如本文所述的式I的化合物的探针。

[0090] 本发明还提供监测细胞分化或凋亡的方法,该方法包括施用有效量的式I的化合物并且通过荧光医学成像检测由所述式I的化合物发出的荧光。

[0091] 本发明还提供通过使用包括但不限于荧光寿命成像显微术 (FLIM) 的技术检测由所述化合物发出的荧光,从而对式I的化合物的分布进行成像,由此来监测细胞分化或细胞凋亡的方法。

[0092] 在另一方面,本发明还提供通过包括但不限于相干反斯托克斯拉曼散射 (CARS) 和受激拉曼散射 (SRS) 等的技术检测受刺激的拉曼散射信号,从而对式I的化合物的分布进行成像,由此来监测细胞分化或凋亡的方法。

[0093] 本发明还提供通过包括但不限于多元曲线分辨 (MCR) 和拉曼散射信号的最小二乘分析的技术来制作离体、体内或体外中的式I化合物的浓度,从而监测式I的化合物的细胞内或细胞外的浓度和分布的方法。

[0094] 此外,本发明提供了用于将由式I的化合物发出的荧光与由式I的化合物刺激的拉曼散射信号叠加的方法。用于叠加发射荧光的方法可用于本文描述的监测细胞分化或凋亡的方法中。

[0095] 式I的化合物的有利之处还在于:该化合物可以选择性地用于不同的细胞类型,即,可以将可见成像、荧光成像和/或拉曼成像用于鉴定对本发明的合成分子更有响应的细胞类型。这可以提供细胞识别方法。观察本发明的化合物的荧光寿命可以提供关于局部环境的信息,并且潜在地提供关于化合物正在进行的作用的信息。此外,然后可以用其他分子处理已用本发明的荧光化合物处理的细胞,例如,“置换”荧光化合物,以给出相对亲和力的量度,这尤其可以用于药物筛选等。因此,本发明的荧光化合物可以与其他合适的已知化合物组合使用。

[0096] 根据本发明的又一方面,提供了一种组合物,其包含一种或多种本发明的化合物联合一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0097] 本发明的组合物还包含一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂或稀释剂。本文中采用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适合用于与人的组织接触的那些化合物、材料、组合物和/或剂型,或是指可能与合理的利益/风险比相称的情况(没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症的动物)。

[0098] 当制备本发明的组合物用于口服施用,上述化合物通常与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合以形成药物制剂或单位剂型。

[0099] 对于口服施用而言,组合物可以是粉末、颗粒状、溶液、悬浮液、乳液或用于从口香糖摄取活性成分的天然或合成聚合物或树脂的形式。该组合物也可以为丸剂、药糖剂或糊剂。也可以将本发明口服施用的组合物配制为用于持续释放,例如,可以将上述化合物包被、微囊化或以其他方式置于持续递送装置内。这些制剂中的总活性成分占制剂重量的0.1%至99.9%。

[0100] 因此,包含本发明的化合物的一种或多种合适的单位剂型可以通过多种途径施用,包括口服,肠胃外(包括皮下、静脉内、肌内和腹膜内)、直肠、经皮、透皮、胸内、肺内、粘膜、眼内和鼻内(呼吸)途径。也可以在脂质制剂中配制该组合物或(例如)利用微囊化将该组合物配制为用于持续释放。在适当的情况下,制剂可以方便地为离散的单位剂型,并且可以通过药学领域公知的任何方法来制备。这样的方法可以包括以下步骤:将治疗剂与液体载体、固体基质、半固体载体、细分的固体载体或其组合混合,然后(如果需要)将产品引入到所需的递送系统或在所需的递送系统中使该产品成形。

[0101] 可以通过本领域已知的方法,使用公知且易于获得的成分来制备包含本发明的化合物的药物制剂。例如,可以将该化合物与普通赋形剂、稀释剂或载体一起配制,并形成片剂、胶囊剂、溶液、混悬剂、粉剂、气雾剂等。适用于这种制剂的赋形剂、稀释剂和载体的实例包括缓冲剂、以及诸如淀粉、纤维素、糖、甘露醇和硅衍生物之类的填料和填充剂。

[0102] 还可以包含粘合剂,例如羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素和其他纤维素衍生物,藻酸盐,明胶和聚乙烯吡咯烷酮。可以包含保湿剂(例如,甘油)、崩解剂(例

如,碳酸钙和碳酸氢钠)。还可以包含延迟溶解的试剂,例如石蜡。还可以包含吸收加速剂,如季铵化合物。可以包含诸如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯之类的表面活性剂。可以加入诸如高岭土和膨润土之类的吸附载体。还可以包含诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁和固体聚乙二醇之类的润滑剂。也可添加防腐剂。本发明的组合物还可以包含诸如纤维素和/或纤维素衍生物之类的增稠剂。本发明的组合物还可以包含胶类,例如黄原胶、瓜尔胶或carbo胶或阿拉伯胶,或者作为替代的聚乙二醇、膨润土和蒙脱石等。

[0103] 例如,含有本发明的化合物的片剂或囊片(caplets)可以包含缓冲剂,例如碳酸钙、氧化镁和碳酸镁。合适的缓冲剂还可以包括乙酸的盐形式、柠檬酸的盐形式、硼酸的盐形式和磷酸的盐形式。囊片和片剂还可以包含无活性成分,例如纤维素、预凝胶化淀粉、二氧化硅、羟丙基甲基纤维素、硬脂酸镁、微晶纤维素、淀粉、滑石、二氧化钛、苯甲酸、柠檬酸、玉米淀粉、矿物油、聚丙二醇、磷酸钠、硬脂酸锌等。含有至少一种本发明的化合物的硬质或软质明胶胶囊可以包含无活性成分,例如明胶、微晶纤维素、月桂基硫酸钠、淀粉、滑石和二氧化钛等,以及液体赋形剂,例如聚乙二醇(PEG)和植物油。此外,包含一种或多种本发明的化合物的肠溶包衣囊片或片剂被设计为能够抵抗在胃中的崩解并溶解在十二指肠的更中性至碱性环境中。

[0104] 也可以将本发明的治疗性化合物配制成用于方便口服施用的酏剂或溶液,或配制成适用于肠胃外施用(例如通过肌内、皮下、腹膜内或静脉内途径施用)的溶液。本发明的治疗性化合物的药物制剂还可以呈水溶液或无水溶液或分散体的形式,或者呈乳剂或悬浮液或药膏的形式。

[0105] 因此,治疗性化合物可以被配制用于胃肠外施用(例如通过注射,如团注或连续输注),并且可以以单位剂型存在于安瓿、预填充注射器、小体积输注容器或多剂量容器中。如上所述,可以添加防腐剂以帮助维持剂型的搁置寿命。活性化合物和其他成分可以在油性或水性赋形剂中形成悬浮液、溶液或乳液,并且可以含有配制剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可选地,活性化合物和其他成分可以通过无菌固体的无菌分离或通过从溶液中冻干得到的粉末形式,并在使用前加入适合的赋形剂(例如灭菌无热原水)进行配制。

[0106] 根据需要,可以添加佐剂,该佐剂选自抗氧化剂、表面活性剂、其他防腐剂、成膜剂、角质溶解剂或除粉刺剂(comedolytic agents)、香料、矫味剂和着色剂。可以添加氧化剂,例如叔丁基氢醌、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯和 $\alpha$ -生育酚以及它们的衍生物。

[0107] 这些制剂可以包含本领域公知的药学上可接受的载体、赋形剂和佐剂。例如,可以使用从生理学角度来看可接受的一种或多种有机溶剂来制备溶液,该有机溶剂除了水之外还从以下溶剂中选择,如丙酮、乙酸、乙醇、异丙醇、二甲基亚砜、乙二醇醚(例如,以名称“Dowanol”出售的产品)、聚二醇和聚乙二醇,短链酸的C1-C4烷基酯、乳酸乙酯或乳酸异丙酯、脂肪酸甘油三酸酯(例如,以名称“Miglyol”销售的产品)、肉豆蔻酸异丙酯、动物油、矿物油和植物油以及聚硅氧烷。

[0108] 优选地,组合物是包含如上所述的一种或多种化合物的溶剂或稀释剂的形式。溶剂或稀释剂可以包括酸溶液、二甲基砜、N-(2-巯基丙酰基)甘氨酸、2-正壬基-1,3-二氧戊环和乙醇。优选地,该溶剂/稀释剂是酸性溶剂,例如乙酸、柠檬酸、硼酸、乳酸、丙酸、磷酸、苯甲酸、丁酸、苹果酸、丙二酸、草酸、琥珀酸或酒石酸。

[0109] 本发明的药物制剂可以包含药学上可接受的载体、稀释剂、增溶剂或乳化剂、以及

本领域可用的各种类型的盐作为任选成分。这些物质的实例包括常规生理盐水溶液,例如生理缓冲盐水溶液和水。可用于本发明的药物制剂的载体和/或稀释剂的具体非限制性实例包括水和生理上可接受的缓冲盐水溶液,例如pH 7.0-8.0的磷酸盐缓冲盐水溶液。

[0110] 溶剂可以包含乙酸溶液。溶剂(例如乙酸溶液)可以以小于1%、0.5%、0.25%、0.1%、0.05%或0.01% (w/w) (例如乙酸)的浓度存在于组合物中。

[0111] 本发明的组合物可以包含一种或多种其他治疗剂。例如,在本发明的组合物用于治疗或预防癌症的情况下,可以包含一种或多种其他化学治疗剂和/或化学预防剂。在将该组合物用于护肤品的情况下,可以使用一种或多种其他护肤剂,例如一种或多种保湿剂或抗菌剂。

[0112] 另外,本发明的化合物非常适合于作为持续释放剂型等的制剂。可以这样配置该制剂,使得制剂可能在一段时间内,(例如)在肠道或呼吸道的特定部分中释放活性化合物。可以由以下物质来制备包衣、包膜和保护基质:聚合物(如聚交酯-羟乙酸酯)、脂质体、微乳剂、微粒、纳米颗粒或蜡。这些包衣、包膜和保护基质可以用于涂覆留置装置,例如支架、导管、腹膜透析管、排液装置等。

[0113] 对于局部施用而言,可以如本领域已知的那样来配制活性剂以直接应用于目标区域。主要适用于局部应用的形式为(例如)霜剂、乳剂、凝胶剂、粉剂、分散剂或微乳剂、较大或较小程度上增稠的洗剂、浸渍垫、软膏或棒剂、气溶胶制剂(例如喷雾剂或泡沫剂)、皂剂、清洁剂、洗剂或皂块的形式。用于此目的的其他常规形式包括伤口敷料、包被绷带或其他聚合物覆盖物、软膏、霜剂、洗剂、糊剂、凝胶剂、喷雾剂和气雾剂。因此,本发明的治疗性化合物可以经由贴剂或绷带递送用于皮肤给药。可选地,可以将该治疗性化合物配制成粘合剂聚合物(例如,聚丙烯酸酯或丙烯酸酯/乙酸乙烯酯共聚物)的一部分。对于长期应用,可能期望使用微孔和/或可透气衬垫层合片,以至于使皮肤的水化或浸软最小化。衬垫层可以具有能提供期望的保护和支撑功能的任何合适厚度。合适的厚度通常为约10 $\mu$ m至约200 $\mu$ m。

[0114] 用于局部施用的药物制剂可包含(例如)生理上可接受的缓冲盐水溶液,该生理上可接受的缓冲盐水溶液包含介于约0.001mg/ml至约100mg/ml、例如介于0.1mg/ml至10mg/ml之间的一种或多种对于待治疗的适应症或疾病具有特异性的本发明化合物。

[0115] 例如,可以用添加有合适的增稠剂和/或胶凝剂的水性或油性基质来配制软膏和霜剂。洗剂可以用水性或油性基质来配制并且通常还包含一种或多种乳化剂、稳定剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂或着色剂。也可以通过离子电渗法递送活性化合物。存在于局部制剂中的本发明的治疗剂的重量百分数将取决于各种因素,但通常为制剂总重量的0.01%至95%,典型地为0.1重量%至85重量%。

[0116] 可以在含有一种或多种分散剂、增溶剂或悬浮剂的水性或非水性基质中,使用一种或多种治疗性化合物来配制滴剂(例如,滴眼剂或滴鼻剂)。液体喷雾剂可以泵送,或由加压包装方便地递送。滴剂可以经由简单的眼用带帽滴瓶、经由适于逐滴递送液体内容物的塑料瓶、或经由特定形状的封闭物来递送。

[0117] 还可以进一步将治疗性化合物配制用于口腔或咽喉中的局部施用。例如,活性成分可以配制成:还包含调味基质的锭剂,该调味基质通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶;在惰性基质中含有所述组合物的软锭剂,该惰性基质例如为明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯树胶;以及在合适的液体载体中包含本发明的组合物的漱口剂。

[0118] 也可以将本发明的化合物施用于呼吸道。因此,本发明还提供了用于本发明方法的气溶胶药物制剂和剂型。通常,这样的剂型包含有效治疗或预防特定感染、适应症或疾病的临床症状的至少一种本发明药剂的量。在本发明范围内已经根据本发明的方法治疗的感染、适应症或疾病的一种或多种症状的任何统计学的显著衰减被认为是这种感染、适应症或疾病的治疗。

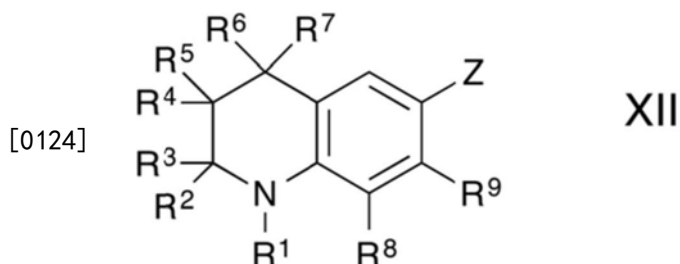
[0119] 可选地,对于通过吸入或吹入的施用,组合物可以呈干粉的形式,例如治疗剂和合适的粉末基质(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。粉末组合物可以以(例如)胶囊或药筒(cartridge)的单位剂量形式存在,或者(例如)为可以借助吸入器、吹入器或定量吸入器来施用粉末的明胶或泡罩包装。

[0120] 当以气溶胶形式或吸入形式施用本发明的化合物时,本发明的化合物也可以以水溶液的形式施用。因此,其他气溶胶药物制剂可以包含(例如)生理上可接受的缓冲盐水溶液,该缓冲盐水溶液包含介于约0.001mg/ml和约100mg/ml之间的一种或多种对待治疗的适应症或疾病具有特异性的本发明的化合物。上述化合物的细分固体颗粒形式的干燥气溶胶也用于本发明的实践中,其中上述化合物不溶于或悬浮于液体中。本发明的化合物可以配制成细粉(dusting powder)并且包含平均粒度介于约1 $\mu$ m至5 $\mu$ m、或者介于2 $\mu$ m至3 $\mu$ m之间的细分颗粒。可以使用本领域公知的技术,通过粉碎和筛滤来制备细分颗粒。可以通过吸入预定量的细分材料来施用颗粒,该细分材料可以是粉末形式。应当理解,每种剂型的单个气溶胶剂量中所含的活性成分或成分的单位含量本身不需要构成用于治疗特定感染、适应症或疾病的有效量,因为通过多个剂量单位的给药可以达到必要的有效量。此外,可以使用比剂型中更少的剂量,通过单独施用或系列施用来达到有效量。

[0121] 对于通过吸入对上(鼻)或下呼吸道给药,本发明的治疗性化合物方便地从雾化器或加压包装或其它方便递送气溶胶喷雾剂的方式递送。加压包装可以包括合适的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体。在加压气溶胶的情况下,可以通过设置阀来递送一定的计量从而可以确定剂量单位。

[0122] 此外,活性成分也可以与其他治疗剂联合使用,其他治疗剂(例如)为止痛剂、消炎剂、抗组胺剂、支气管扩张剂、化学保护剂、化学治疗剂、抗菌剂等中的一种或多种。

[0123] 根据本发明的另一方面,提供了用于制备如本文所述的式I的化合物的工艺,其包括使式XII的化合物与式XIII的化合物反应:



[0125] 其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>分别如本文所限定;并且

[0126] Z为离去基团,例如卤素、假卤素、硼酸或硼酸酯;

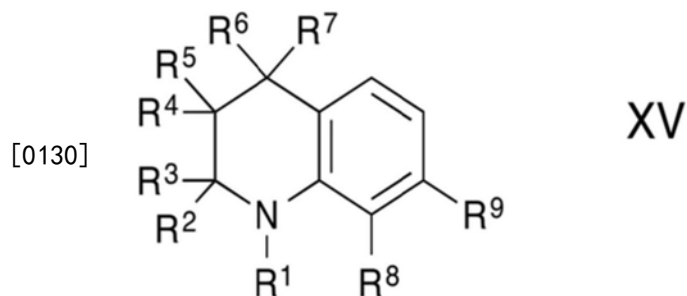
[0127] R<sup>10</sup>H XIII

[0128] 其中R<sup>10</sup>如本文所限定。

[0129] 或者,一种用于制造如本文所述的式I的化合物的工艺可以包括使式XV的化合物



与式XIV的化合物反应：



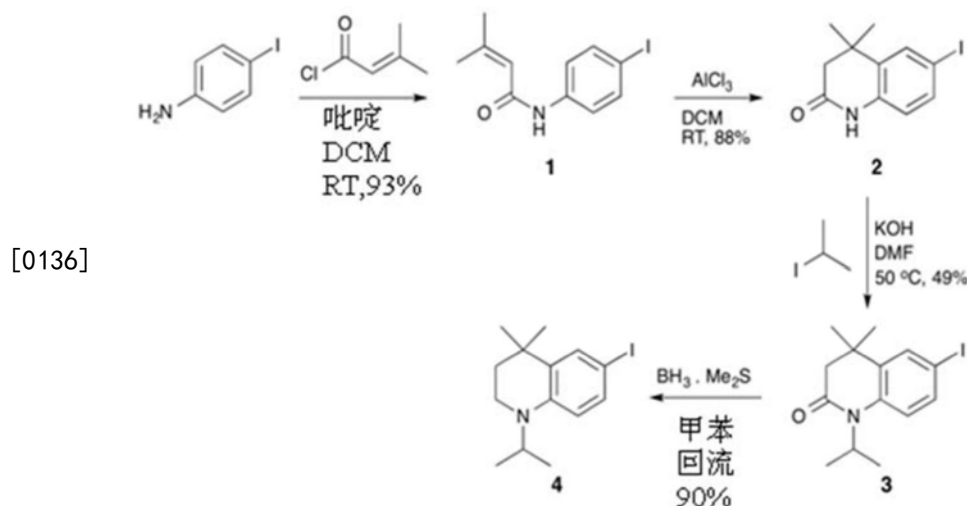
[0131] 其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>分别如本文所限定；

[0132] R<sup>10</sup>Z XIV

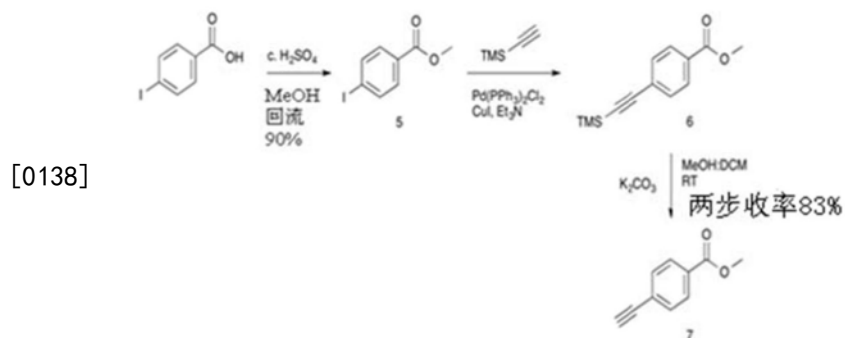
[0133] 其中Z为离去基团，例如卤素、假卤素、硼酸或硼酸酯。

[0134] 可以通过其中R<sup>10</sup>是如本文所述的烷基的式I的化合物的脱烷基化来制备其中R<sup>10</sup>是氢的式I的化合物。

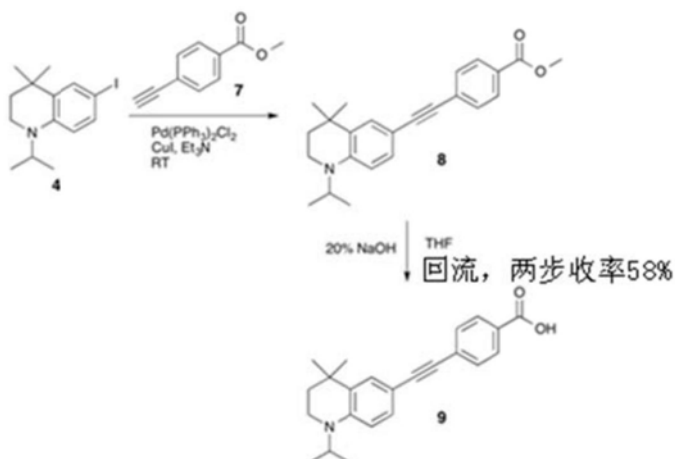
[0135] 可以使用本领域技术人员已知的方法或本文所述的方法来制备式I、XII、XIII和XIV的化合物。这些制备的实例示意性示出如下：



[0137] 示意I



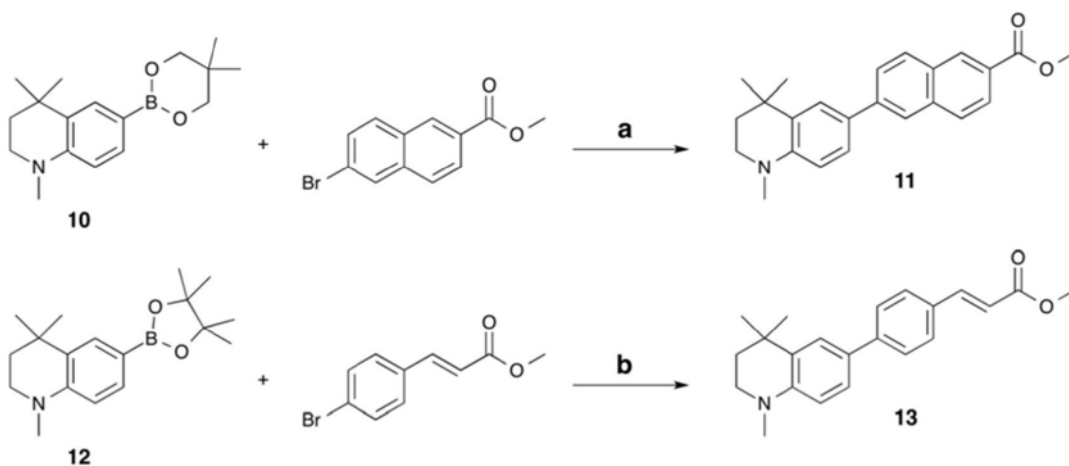
[0139] 示意II



[0140]

[0141] 示意III

[0142] 可以通过将适当的芳基硼酸酯分别与适当的萘部分(例如,6-溴-萘-2-羧酸甲酯)和适当的肉桂酸酯(例如,3-溴-肉桂酸甲酯)偶联来制备萘酯化合物(化合物11)和丙烯酸酯化合物(化合物13)。



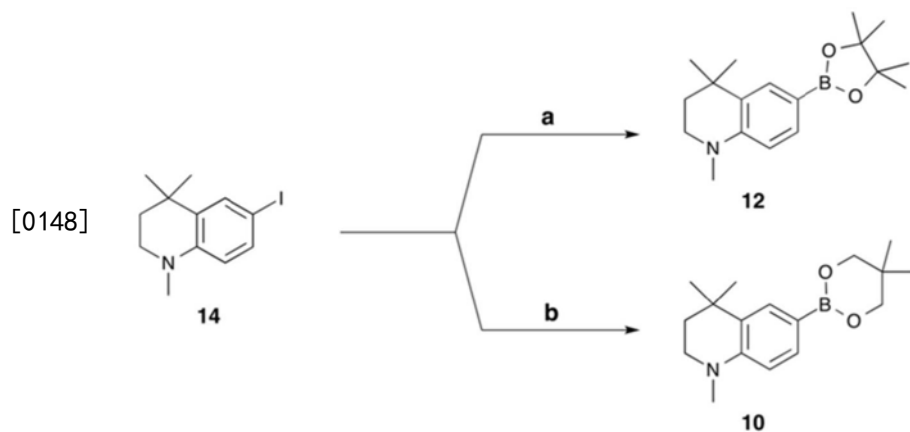
[0143]

[0144] a) 2摩尔%Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, 2当量K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, DMF/H<sub>2</sub>O 80°C, 118小时, 93%

[0145] b) 2摩尔%Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, 2当量K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, <sup>i</sup>PrOH/H<sub>2</sub>O 80°C, 18小时, 66%

[0146] 示意IV

[0147] 在DMSO中,在5摩尔%Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>催化剂和2当量KOAc碱的存在下,通过碘化物14与B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub>或B<sub>2</sub>neop<sub>2</sub>的Pd催化的硼酰化来制备芳基硼酸酯,得到良好产率的芳基硼酸酯12和10,如此提供了将相对于给电子氨基的对位选择性官能化的有效方法。

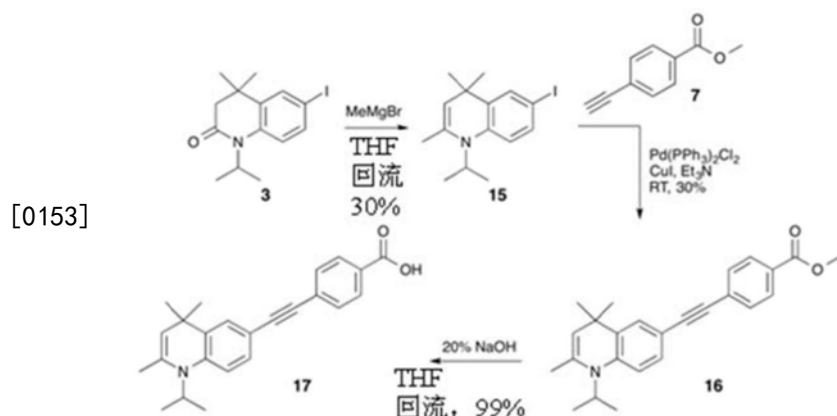


[0149] a) 5摩尔%Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, 1当量B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub>, 2当量KOAc, DMSO 80℃, 18小时, 70%

[0150] b) 5摩尔%Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, 1当量B<sub>2</sub>neop<sub>2</sub>, 2当量KOAc, DMSO 80℃, 18小时, 88%

[0151] 示意V

[0152] 首先可以通过酰胺3的格利雅甲基化, 然后进行Sonogashira偶联和皂化, 从而制备二氢喹啉衍生化合物(如17)。



[0154] 示意VI

## 附图说明

[0155] 现在将仅参考附图通过实施例的方式对本发明进行描述, 其中:

[0156] 图1示出了EC23<sup>®</sup>在多种溶剂中的标准化激发光谱;

[0157] 图2示出了在300nm的激发下, EC23<sup>®</sup>在各种溶剂中的标准化发射光谱;

[0158] 图3示出了实施例3的化合物9在各种溶剂中的标准化激发光谱;

[0159] 图4示出了在275nm至300nm范围内的激发下, 实施例3的化合物9在各种溶剂中的标准化发射光谱;

[0160] 图5示出了实施例6的化合物17在氯仿中的标准化激发光谱;

[0161] 图6示出了在378nm的激发下, 实施例6的化合物17在氯仿中的标准化发射光谱;

[0162] 图7示出了实施例3的化合物9在不存在光的情况下在环境温度下储存后的<sup>1</sup>H NMR光谱, 即在将化合物9暴露于波长为300-400nm的光之前, 化合物9在DMSO-d<sub>6</sub>中的<sup>1</sup>H NMR光谱;

[0163] 图8示出了实施例3的化合物9在环境温度下用典型实验室光处理72小时后的<sup>1</sup>H

NMR光谱,即在将化合物9暴露于波长为300-400nm的光72小时之后,化合物9在DMSO-d<sub>6</sub>中的<sup>1</sup>H NMR光谱;

[0164] 图9示出了与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,实施例3的化合物9的流式细胞术评价,测定了干细胞标记物SSEA-3的表达,即与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,化合物9 (DC271) 的流式细胞术评价,其中测定了干细胞标记物SSEA-3的表达,当与载体对照组 (DMSO) 相比时,在经类视色素处理的细胞中SSEA-3表达显著降低,在两种处理浓度下,经化合物9 (DC271) 处理的细胞显示出比ATRA和EC23<sup>®</sup> 更高的SSEA-3水平,通常,随着类视色素浓度的增加,SSEA-3表达降低;

[0165] 图10示出了与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,实施例3的化合物9的流式细胞术评价,测定了干细胞标记物TRA160的表达,即与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,化合物9 (DC271) 的流式细胞术评价,其中测定了干细胞标记物TRA160的表达,当与载体对照组 (DMSO) 相比时,在经类视色素处理的细胞中TRA160表达显著降低,经化合物9 (DC271) 处理的细胞显示出比ATRA和EC23<sup>®</sup>略高的SSEA-3水平,通常,随着类视色素浓度的增加,TRA160表达降低;

[0166] 图11示出了与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,实施例3的化合物9的流式细胞术评价,测定了干细胞标记物A2B5的表达,即与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,化合物9 (DC271) 的流式细胞术评价,其中测定了干细胞标记物A2B5的表达,A2B5为早期神经元标记物并在未分化细胞 (DMSO) 中以低水平表达,在经类视色素处理的样品中表达显著增强并且随着类视色素浓度的增加而增加,与EC23<sup>®</sup>和化合物9 (DC271) 相比,经ATRA处理的细胞表达更高的A2B5水平;

[0167] 图12示出了在1μM的处理浓度下,实施例3的化合物9与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比较的MTT细胞活力分析,即在1μM的处理浓度下,化合物9 (DC271) 与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比较的MTT细胞活力分析,其中所有处理呈现出与DMSO相当的活力,表明用类视色素处理的细胞不具有显著的毒性作用;

[0168] 图13示出了在10μM的处理浓度下,实施例3的化合物9与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比较的MTT细胞活力分析,即在10μM的处理浓度下,化合物9 (DC271) 与ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比较的MTT细胞活力分析,其中所有处理呈现出与DMSO相当的活力,表明用类视色素处理的细胞不具有显著的毒性作用;

[0169] 图14示出了用各种浓度的化合物9处理并在7天后用共焦显微术成像的TERA-2干细胞;

[0170] 图15示出了用实施例3的化合物9 (10μM) 处理并在8小时后用共焦显微术成像的SHSY5Y细胞 (神经母细胞瘤);

[0171] 图16示出了用实施例3的化合物9 (10μM) 处理并在24小时后用共焦显微术成像的细胞;

[0172] 图17示出了用实施例3的化合物9 (10μM) 处理7天,用4%多聚甲醛固定并用共聚焦显微术成像的TERA-2干细胞;

[0173] 图18示出了用实施例3的化合物9 (10μM) 处理5天的HaCat角质化皮肤细胞;

[0174] 图19示出了用实施例3的化合物9 (10 $\mu$ M) 处理5天并用Involucrin和K14染色的HaCat角质化皮肤细胞,即用化合物9 (10 $\mu$ M) 处理5天的HaCat角质化皮肤细胞,然后用Involucrin (绿色) 和K14 (红色) 将固定的盖玻片染色,并使用共聚焦显微镜成像。将化合物9的荧光染成蓝色,Involucrin选择性地将细胞视黄酸结合蛋白 (CRABP) 染色,该细胞视黄酸结合蛋白转运细胞核内和周围的类视色素,K14是分解基底角质细胞的原型标记物并且有助于维持表皮细胞的形状;

[0175] 图20示出了用实施例6的化合物17 (10 $\mu$ M) 处理5天的HaCat角质化皮肤细胞,即用化合物17 (10 $\mu$ M) 处理5天,固定,然后用共聚焦显微镜成像的HaCat角质化皮肤细胞;

[0176] 图21示出了用实施例6的化合物17 (10 $\mu$ M) 处理5天并用Involucrin和K14染色的HaCat角质化皮肤细胞,即用化合物17 (10 $\mu$ M) 处理5天的HaCat角质化皮肤细胞,然后用Involucrin (绿色) 和K14 (红色) 将固定的盖玻片染色,并使用共聚焦显微镜成像,将化合物9的荧光染成蓝色,Involucrin选择性地将细胞视黄酸结合蛋白 (CRABP) 染色,该细胞视黄酸结合蛋白转运细胞核内和周围的类视色素,K14是分解基底角质细胞的原型标记物,并且有助于维持表皮细胞的形状;

[0177] 图22示出了实施例3的化合物9的拉曼光谱。在2190 $\text{cm}^{-1}$ 处观察到高强度乙炔带,其位于细胞沉默区域 (1800–2800 $\text{cm}^{-1}$ ),其中没有观察到生物来源的信号,例如酰胺键,即化合物9的拉曼光谱。在‘细胞沉默区域’ (1800–2800 $\text{cm}^{-1}$ ) 中观察到在2190 $\text{cm}^{-1}$ 处的高强度的乙炔带;

[0178] 图23示出了与Nestin染色的ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,干细胞中实施例3的化合物9的活性,其中巢蛋白为在神经干细胞中表达的中间丝状体,在10 $\mu$ M MEC23<sup>®</sup>和DC271样品中,所有条件对于可能在较小程度上染色的巢蛋白是阳性的;

[0179] 图24示出了与CK8染色的ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,干细胞中实施例3的化合物9的活性,其中细胞角蛋白8 (CK8) 为非神经分化的标记物,在ATRA和EC23<sup>®</sup>的10 $\mu$ M样品中染色较不明显,但与1 $\mu$ M的样品相比,在DC271中更亮;

[0180] 图25示出了与TUJ-1染色的ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,干细胞中实施例3的化合物9的活性,其中TUJ-1为泛神经元标记物,与具有1 $\mu$ M和载体对照组 (DMSO) 相比,在10 $\mu$ M样品中染色似乎增加;

[0181] 图26示出了与Oct 4染色的ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,干细胞中实施例3的化合物9的活性,其中Oct 4为转录因子,该转录因子为亚全能性的标记物,对于核因子,载体对照组 (DMSO) 显示阳性染色,其中唯一的表达阳性其他条件是1 $\mu$ M ATRA。这表明 EC23<sup>®</sup>和化合物9容易通过促进分化来下调亚全能性的标记物;

[0182] 图27示出了与Sox 2染色的ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO相比,干细胞中实施例3的化合物9的活性,其中Sox 2为转录因子,该转录因子为亚全能性的标记物,对于核因子,载体对照组 (DMSO) 显示阳性染色,所有条件下染色均减少,这表明 EC23<sup>®</sup>和化合物9类视色素容易通过促进分化来下调亚全能性的标记物;

[0183] 图28示出了用实施例3的化合物9、ATRA、EC23<sup>®</sup>和DMSO处理的细胞群的相衬图像

(phase contrast image), 其中在DMSO对照样品中, 细胞很小并且密集地堆积在一起, 然而在用化合物9和 ATRA/EC23<sup>®</sup>处理的样品中, 细胞扩散并且培养物密度较低。

[0184] 在附图中, 所指代的DC271均指的是实施例3的化合物9。

[0185] 在实施例和说明书的其他部分中使用以下缩写:

[0186] ATRA: 全反式视黄酸

[0187] B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub>: 双(频哪醇合)二硼

[0188] DCM: 二氯甲烷

[0189] DMF: N,N-二甲基甲酰胺

[0190] DMSO: 二甲基亚砷

[0191] dppf: 1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁

[0192] EDTA: 乙二胺四乙酸

[0193] EtOAc: 乙酸乙酯

[0194] GCMS: 气相色谱-质谱

[0195] h: 小时

[0196] KOAc: 乙酸钾

[0197] RT: 室温

[0198] THF: 四氢呋喃

## 具体实施方式

[0199] 一般试验

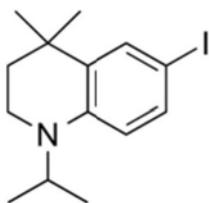
[0200] 除非另有说明, 否则试剂从Sigma-Aldrich、Acros Organics、Alfa-Aesar和Fluorochem购得并且未经进一步纯化而使用。直接使用所提供的溶剂, 并且如果有说明的话, 在使用前用适当的干燥剂干燥该溶剂。通过TLC或NMR光谱法原位监测反应。使用通过UV灯而可视化的Merck Millipore硅胶60G F254 25玻璃板进行薄层色谱法(TLC)。使用来自Sigma-Aldrich的SiO<sub>2</sub> (230-400目, 40-63μm, 60 Å) 进行快速柱层析, 并使用TLC进行监测。除非另有说明, 否则在环境探针温度下操作的Varian VNMR-700、Varian VNMR-600、Bruker Avance-400或Varian Mercury-400光谱仪上记录NMR光谱。在购自Goss Scientific的CDCl<sub>3</sub>或DMSO-d<sub>6</sub>中记录NMR光谱。所报道的NMR峰为单峰(d)、三重峰(t)、四重峰(q)、宽峰(br)、七重峰(hept)、它们的组合或多重峰(m)。使用TQD (Waters UK) 质谱仪和Acquity UPLC (Waters Ltd, UK) 由达勒姆大学部门服务 (Durham University departmental service) 进行ES-MS, 并使用QTOF Premier质谱仪和Acquity UPLC (Waters Ltd, UK) 获得精确的质量测定。由达勒姆大学部门服务使用Shimadzu QP2010-Ultra进行GCMS。在Perkin Elmer FT-IR光谱仪上记录IR光谱。使用Gallenkamp熔点装置获得熔点。由达勒姆大学部门服务使用Exeter Analytical CE-440分析仪获得元素分析。

[0201] 合成方法

[0202] 实施例1

[0203] 6-碘-4,4-二甲基-1-(丙-2-基)-1,2,3,4-四氢喹啉(4)

[0204]



[0205] 1 (a) N-(4-碘苯基)-3-甲基丁-2-烯酰胺, (1)

[0206] 向4-碘代苯胺(25.0g、114.0mmol)的DCM溶液(400mL)中添加3,3-二甲基丙烯酰氯(13.36mL、120.0mmol)并且将所得白色悬浮液搅拌0.5小时,之后加入吡啶(9.70mL、120mmol)并且在RT下将该溶液搅拌16小时。将溶液用H<sub>2</sub>O淬火,用DCM稀释,用饱和NH<sub>4</sub>Cl、H<sub>2</sub>O和盐水洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并蒸发,以得到粗的浅棕色固体(33g)。该浅棕色固体从EtOH中重结晶以得到白色结晶固体1(31.8g,93%):<sup>1</sup>H NMR(700MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ1.91(s,3H)、2.22(s,3H)、5.68(s,1H)、7.01(s,1H)、7.33(m,2H)、7.60(d,J=8.8Hz,2H);<sup>13</sup>C NMR(101MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ20.2、27.7、87.2、118.5、121.8、138.0、138.2、154.5、165.2;IR(neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3294m、3094、2964w、2890w、1666m、1586m、1430m、821s、650m;MS(ES):m/z=302.0[M+H]<sup>+</sup>;HRMS(ES)理论值C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NOI[M+H]<sup>+</sup>:302.0042,实测值:302.0050;实测值:C,43.87;H,4.02;N 4.64。理论值C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>NOI:C,43.88;H,4.02;N 4.65%;m.p.=136-138℃。

[0207] 1 (b) 6-碘-4,4-二甲基-1,2,3,4-四氢喹啉-2-酮, (2)

[0208] 将AlCl<sub>3</sub>(7.66g、57.5mmol)添加至无水DCM(150mL)中并将所得浆料搅拌0.5小时。向该浆料中添加1(11.5g、38.3mmol)并在RT下将该溶液剧烈搅拌2.5小时。将该反应物用H<sub>2</sub>O缓慢淬火,用DCM稀释,用5%NaOH洗涤,直到该溶液变为灰白色,然后进一步用H<sub>2</sub>O和盐水洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并蒸发,以得到粗的黄色固体。该黄色固体从EtOH中重结晶以得到白色结晶固体2(10.2g、88%):<sup>1</sup>H NMR(700MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ1.32(s,6H)、2.47(s,2H)、6.62(d,J=8.3Hz,1H)、7.47(dd,J=8.3,1.9Hz,1H)、7.56(d,J=1.8Hz,1H)、9.20(s,1H);<sup>13</sup>C NMR(176MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ27.7、34.2、45.2、86.8、118.1、133.7、135.1、135.9、136.6、171.3;IR(neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3164m、3102、3040w、2953m、1671s、1596m、1484m、817s;MS(ES):m/z=302.0[M+H]<sup>+</sup>;HRMS(ES)理论值C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NOI[M+H]<sup>+</sup>:302.0042,实测值:302.0042;实测值:C,43.91;H,4.02;N 4.63。理论值C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>INO:C,43.87;H,4.02;N 4.65%;m.p.=199-202℃。

[0209] 1 (c) 6-碘-4,4-二甲基-1-(丙-2-基)-1,2,3,4-四氢喹啉-2-酮, (3)

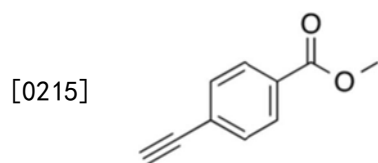
[0210] 向2(7.05g、23.4mmol)的无水DMF溶液(200mL)中加入粉碎的KOH(4.08g、70.2mmol)并在50℃下将所得浆料搅拌1h。向该浆料中添加2-碘丙烷(7.00mL、70.2mmol)并在50℃下将溶液搅拌40小时。该反应物用H<sub>2</sub>O缓慢淬火,用EtOAc稀释,用饱和NH<sub>4</sub>Cl、H<sub>2</sub>O和盐水洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并蒸发,得到粗的透明油状物(7.2g)。通过SiO<sub>2</sub>层析(含有1%Et<sub>3</sub>N的己烷:EtOAc(9:1)作为洗脱液)对该透明油状物进行纯化,以得到无色油状物3(3.93g、49%):<sup>1</sup>H NMR(700MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ1.25(s,6H)、1.49(s,3H)、1.50(s,3H)、2.38(s,2H)、4.66(hept,J=7.0Hz,1H)、6.87(d,J=8.6Hz,1H)、7.50(dd,J=8.6,2.1Hz,1H)、7.52(d,J=2.1Hz,1H);<sup>13</sup>C NMR(176MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ20.3、26.8、33.1、47.2、48.8、86.9、118.9、133.4、135.7、138.9、139.1、169.5;IR(neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 2961m、2934w、2870w、1667s、1582m、1482m、809s;MS(ES):m/z=344.0[M+H]<sup>+</sup>;HRMS(ES)理论值C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NOI[M+H]<sup>+</sup>:344.0511,实测值:344.0512。

[0211] 1 (d) 6-碘-4,4-二甲基-1-(丙-2-基)-1,2,3,4-四氢喹啉, (4)

[0212] 在0℃下向3 (1.25g、3.63mmol) 的无水甲苯溶液 (15mL) 中滴加硼烷二甲硫醚复合物 (2.0M的THF溶液、1.91mL、3.81mmol) 并在回流下将所得溶液搅拌16小时。将该溶液冷却至RT, 然后添加10%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液 (25ml) 并将该溶液搅拌0.5小时, 用EtOAc稀释, 用H<sub>2</sub>O和盐水洗涤, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>) 并蒸发, 以得到粗的无色油状物 (1.12g)。通过SiO<sub>2</sub>层析 (含有1% Et<sub>3</sub>N的己烷:EtOAc (9:1) 作为洗脱液) 对该无色油状物进行纯化以得到无色油状物4 (1.08g、90%) : <sup>1</sup>H NMR (700MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.19 (s, 3H)、1.19 (s, 3H)、1.24 (s, 6H)、1.65–1.67 (m, 2H)、3.14–3.17 (m, 2H)、4.06 (hept, J=6.6Hz, 1H)、6.46 (d, J=8.8Hz, 1H)、7.28 (dd, J=8.9, 2.1Hz, 1H)、7.39 (d, J=2.2Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (176MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 18.9、30.3、32.4、36.6、36.8、47.3、76.1、113.4、134.5、134.8、135.6、144.0; IR (纯) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 2957m、2927w、2863w、1580m、1489m、792s、684w; MS (ES) : m/z = 330.1 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ES) 理论值C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NOI [M+H]<sup>+</sup>: 330.0719, 实测值: 330.0717。

[0213] 实施例2

[0214] 4-乙炔基苯甲酸甲酯 (7)



[0216] 2 (a) 4-碘代苯甲酸甲酯 (5)

[0217] 将4-碘代苯甲酸 (25g、100.8mmol) 悬浮于MeOH (250mL) 中, 然后加入浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5mL) 并在回流下将所得溶液搅拌过夜。然后将透明溶液缓慢冷却至RT, 然后冷却至0℃。将所得固体过滤, 用冷MeOH洗涤并干燥, 以得到无色结晶固体5 (23.7g、90%) : <sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.90 (s, 3H)、7.73 (d, J=8.6Hz, 2H)、7.79 (d, J=8.6Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (176MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 52.5、100.9、129.8、131.2、137.9、166.7; IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3040w、2996w、2946w、1709s、1596m、1436m、1269s、1114s、843s、683m; MS (GC) : m/z = 261.9 [M]<sup>+</sup>; 实测值: C, 36.54; H, 2.71。理论值C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>IO<sub>2</sub>: C, 36.67; H, 2.69%。

[0218] 2 (b) 4-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯甲酸甲酯 (6)

[0219] 在减压下将经烘干的500mL Schlenk烧瓶抽真空并用Ar再填充, 然后添加Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.18g、1.68mmol)、CuI (1.68g、1.68mmol) 和5 (22.0g、83.98mmol), 用隔膜密封该烧瓶。添加三乙胺 (200mL) 和三甲基甲硅烷基乙炔 (13.94mL、100.8mmol) 并将烧瓶再次抽空, 并用Ar (3x) 再填充。在RT下将混合物搅拌过夜。用己烷稀释该溶液, 在真空下通过硅藻土 (Celite)/SiO<sub>2</sub>并蒸发, 以得到灰白色固体6 (19.8g)。无需纯化即可使该灰白色固体进行下一步骤: MS (GC) : m/z = 232.1 [M]<sup>+</sup>; 实测值: C, 66.90; H, 6.88。理论值C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>Si: C, 67.2; H, 6.94%。

[0220] 3 (c) 4-乙炔基苯甲酸甲酯 (7)

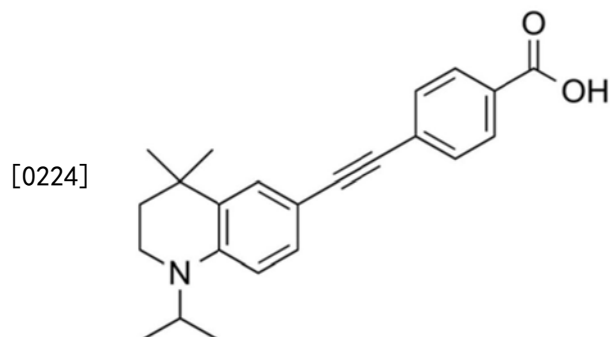
[0221] 向MeOH:DCM溶液 (2:1, 300mL) 中添加6 (18.5g, 79.5mmol) 和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (22.0g, 159mmol)。在Ar下将混合物搅拌6小时。然后将溶液蒸发至1/3体积, 用己烷稀释, 通过硅藻土并蒸发, 以得到浅棕色固体, 通过减压升华将该浅棕色固体纯化以得到白色固体7 (11.1g、两步收率83%) : <sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.23 (s, 1H)、3.91 (s, 3H)、7.54 (d, J=8.4Hz, 2H)、7.98 (d, J=8.6Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (176MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 52.5、80.2、83.0、126.9、



129.6、130.3、132.3、166.6; IR (neat)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3035w、3006w、2950w、2103w、1699s、1605m、1433m、1277s、1107s、859s; MS (GC) :  $m/z=160.1$  [M]<sup>+</sup>; 实测值: C, 74.62; H, 5.01。理论值 C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>: C, 74.99; H, 5.03%。

[0222] 实施例3

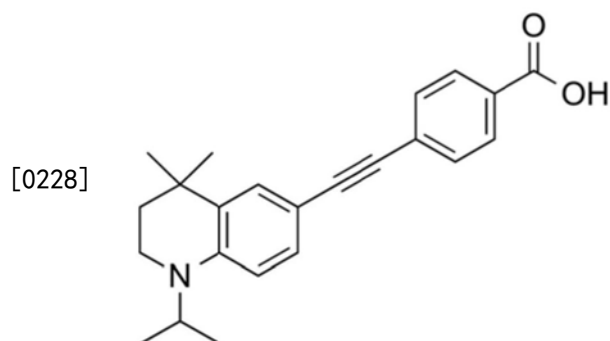
[0223] 4-2-[4,4-二甲基-1-(丙-2-基)-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基]乙炔基苯甲酸 (9)



[0225] 3(a) 4-2-[4,4-二甲基-1-(丙-2-基)-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基]乙炔基苯甲酸酯 (8)

[0226] 在减压下将经烘干的Schlenk烧瓶抽真空并用Ar再填充,然后添加将Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.0744g、0.106mmol)、CuI (0.0202g、0.106mmol) 和7 (0.219g、1.37mmol),用隔膜密封该烧瓶。添加溶解于三乙胺 (6mL) 中的4 (0.349g、1.06mmol) 的溶液并将烧瓶再次抽空并用Ar (3x) 再填充。在RT下将混合物搅拌72小时。将该混合物用Et<sub>2</sub>O稀释,在真空下通过硅藻土/SiO<sub>2</sub>并蒸发,以得到粗的橙色固体 (0.47g)。通过SiO<sub>2</sub>层析 (含有1%Et<sub>3</sub>N的己烷:EtOAc (8:2) 作为洗脱液) 对该橙色固体进行纯化以得到橙色固体8 (0.105g、27%) : <sup>1</sup>H NMR (700MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 1.21/1.23 (s, 6H)、1.28 (s, 6H)、1.66-1.71 (m, 2H)、3.19-3.24 (m, 2H)、3.92 (s, 3H)、4.15 (hept, J=6.6Hz, 1H)、6.64 (d, J=8.7Hz, 1H)、7.24-7.25 (m, 1H)、7.36 (d, J=1.8Hz, 1H)、7.54 (d, J=8.3Hz, 2H)、7.98 (d, J=8.3Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (151MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 19.1、30.1、32.2、36.7、36.8、47.4、52.3、86.8、95.2、108.0、110.6、128.5、129.5、129.6、131.1、131.2、131.7、145.0、167.0; MS (ES) :  $m/z=362.2$  [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ES) 理论值 C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 362.2120, 实测值: 362.2114。

[0227] 3(b) 4-2-[4,4-二甲基-1-(丙-2-基)-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基]乙炔基苯甲酸 (9)

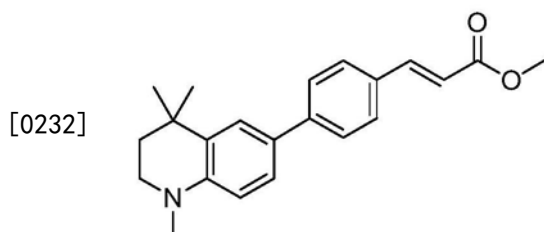


[0229] 在减压下将经烘干的Schlenk烧瓶抽真空并用Ar再填充,然后添加Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.253g、0.36mmol)、CuI (0.0686g、0.36mmol) 和7 (0.634g、3.96mmol),用隔膜密封该烧瓶。在真空下,通过超声对溶解于三乙胺 (30mL) 中的4 (1.185g、1.06mmol) 的溶液进行脱气,并用Ar (3x) 回填。然后,将该溶液加入至Schlenk烧瓶中,再次在真空下脱气并用Ar回填,在RT

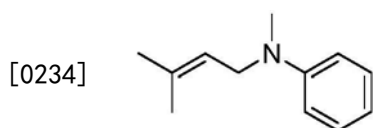
下将所得混合物搅拌72小时。然后将反应混合物蒸干,并先用己烷、然后用己烷:EtOAc (9:1) 通过薄的Celite/SiO<sub>2</sub>塞进行洗脱。然后用饱和NH<sub>4</sub>Cl、3%的EDTA水溶液、H<sub>2</sub>O和盐水洗涤该有机物,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并蒸发,以得到橙色固体(1.38g)。将该橙色固体溶于THF (30mL) 中并添加20%的NaOH水溶液(3mL)。在回流下将所得溶液搅拌40小时,然后将混合物冷却并加入H<sub>2</sub>O。该溶液用5% HCl中和,用EtOAc稀释,用饱和NaHCO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O和盐水洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并蒸发,以得到粗的黄色固体(1.0g)。通过溶剂分层(DCM/己烷)将该黄色固体重结晶两次,得到亮黄色针状结晶17 (0.73g、两步收率58%): <sup>1</sup>H NMR (700MHz; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ1.16 (s, 3H)、1.17 (s, 3H)、1.22 (s, 6H)、1.60-1.64 (m, 2H)、3.17-3.21 (m, 2H)、4.15 (hept, J=7.0Hz)、6.70 (d, J=9.3Hz, 1H)、7.19 (dd, J=8.6, 2.1Hz, 1H)、7.30 (d, J=2.1Hz, 1H)、7.56 (d, J=8.5Hz, 2H)、7.92 (d, J=8.6Hz, 2H)、13.02 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (700MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ18.6、29.7、31.6、35.8、36.1、46.7、86.5、94.9、106.5、109.5、110.5、128.9、129.4、130.7、130.7、131.2、144.7、166.8; MS (ES): m/z=348.2 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ES) 理论值C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 348.1964, 实测值: 348.1965。

[0230] 实施例4

[0231] 3-[4-(1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基)-苯基]-丙烯酸甲酯 (13)



[0233] 4(a) 甲基-(3-甲基-丁-2-烯基)-苯基-胺



[0235] 在500mL圆底烧瓶中,将溶解于160mL MeCN中的N-甲基苯胺(3.24g、30.32mmol)、1-溴-3-甲基-丁-2-烯(5.0g、33.56mmol)和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(4.63g、33.56mmol)的溶液在85℃下加热18小时,此时通过原位ES<sup>+</sup>-MS的分析显示反应完成。用Et<sub>2</sub>O (100mL) 将该混合物稀释并用H<sub>2</sub>O (3×100mL) 进行洗涤。用MgSO<sub>4</sub>干燥有机层,过滤并真空蒸发,以得到粗的油状物,通过二氧化硅垫将该油状物过滤,并用己烷洗脱。在真空中除去溶剂以得到标题化合物,其为透明油状物(3.82g、72%); m/z (ES<sup>+</sup>-MS) 176 (MH<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR (499.76MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.28 (2H, d, J=7.0Hz)、6.79 (2H, d, J=7.0Hz)、6.75 (1H, tr, J=7.0Hz)、5.25 (1H, tr, J=6.0Hz)、3.93 (2H, d, J=6.0Hz)、2.93 (3H, s)、1.76 (6H, s); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (100.61MHz, CDCl<sub>3</sub>) 149.86、134.54、129.08、120.91、116.42、112.97、50.53、37.91、25.70、17.92; HRMS理论值C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N ([M+H]<sup>+</sup>) 176.14338, 实测值176.14336。

[0236] 4(b) 1,4,4-三甲基1,2,3,4-四氢喹啉

[0237] 在500mL圆底烧瓶中,在120℃下将甲基-(3-甲基-丁-2-烯基)-苯基-胺(18.0g、102.86mmol)和多磷酸(75mL)的混合物加热18小时,此时通过<sup>1</sup>H NMR光谱对混合物的纯化等分试样的分析显示反应完成。通过在5分钟内缓慢加入H<sub>2</sub>O (100mL) 来稀释该混合物。通过加入KOH水溶液将该溶液小心地碱化,然后用Et<sub>2</sub>O (1L) 萃取。将有机层用H<sub>2</sub>O (3×200mL) 洗

涤,用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空除去溶剂,以得到粗的油状物,将其通过二氧化硅垫过滤,用己烷洗脱。真空除去溶剂,以得到标题化合物,其为透明油状物(14.93g、83%);*m/z* (EI-MS) 175 (50%, *M*<sup>+</sup>)、160 (60%, *M*<sup>+</sup>-Me); <sup>1</sup>H NMR (499.76MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.23 (1H, dd, *J*=7.5, 1.5Hz)、7.11 (1H, 双峰的三重峰, *J*=7.5, 1.5Hz)、6.63 (1H, 双峰的三重峰, *J*=7.5, 1.5Hz)、6.62 (1H, d, *J*=7.5Hz)、3.25 (2H, tr, *J*=6.0Hz)、2.92 (3H, s)、1.80 (2H, tr, *J*=6.0Hz); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (125.67MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 145.74、131.61、126.94、126.02、116.25、111.09、47.88、39.50、37.50、32.19、31.21, HRMS理论值C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N ([*M*+H]<sup>+</sup>) 176.14338, 实测值176.14332。

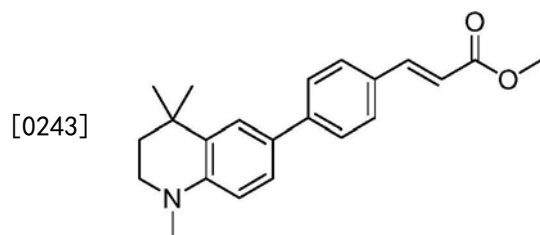
[0238] 4(c) 6-碘-1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢喹啉

[0239] 向溶解于DCM (100mL) 中的1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢-喹啉 (2.10g、12.0mmol) 和碘 (3.05g、12.0mmol) 的溶液中添加红色HgO (2.59g、12.0mmol)。在室温下搅拌反应物,直到通过<sup>1</sup>H NMR的分析显示反应完成为止(2小时)。将混合物过滤,用稀的Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>水溶液(100mL)和H<sub>2</sub>O (100mL) 洗涤。用MgSO<sub>4</sub>干燥有机层并真空除去溶剂。通过氧化铝塞将残余物过滤,用DCM洗脱并真空除去溶剂,以得到标题化合物,其为浅黄色油状物(2.50g、69%);*m/z* (EI-MS) 301 (100%, *M*<sup>+</sup>)、286 (80%, *M*<sup>+</sup>-Me); <sup>1</sup>H NMR (499.67MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.40 (1H, d, *J*=2.0Hz)、7.32 (1H, dd, *J*=8.5, 2.0Hz)、6.35 (1H, d, *J*=8.5Hz)、3.24 (2H, tr, *J*=6.0Hz)、2.89 (3H, s)、1.74 (2H, tr, *J*=6.0Hz) 1.27 (6H, s); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (125.67MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 144.92、135.49、134.34、127.22、126.52、113.35、47.58、39.30、36.87、32.29、30.79; HRMS理论值C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NI ([*M*+H]<sup>+</sup>) 302.04003, 实测值302.04008。

[0240] 4(d) 1,4,4-三甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,2,3,4-四氢喹啉 (12)

[0241] 在干燥的、N<sub>2</sub>填充的手套箱中,将Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0.126g、0.15mmol)、6-碘-1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢-喹啉 (0.93g、3.09mmol)、B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub> (0.78g、3.09mmol) 和KOAc (0.61g、6.18mmol) 在装有Young's龙头的厚壁玻璃管中混合。添加经脱气的DMSO (10mL) 并在80℃下将混合物加热18小时,此时GCMS分析显示反应完成。用Et<sub>2</sub>O (100mL) 将混合物稀释并用H<sub>2</sub>O (3×100mL) 洗涤。用MgSO<sub>4</sub>干燥有机层,过滤并真空除去溶剂,以得到残余物,通过二氧化硅垫将该残余物过滤并用1:1的DCM/己烷洗脱。在真空中去除溶剂得到粗产物,在-20℃下将该粗产物从MeOH中重结晶,以得到白色针状结晶12 (0.66g、70%); mp 140-141℃; *m/z* (EI-MS) 301 (100%, *M*<sup>+</sup>)、286 (100%, *M*<sup>+</sup>-Me); <sup>1</sup>H NMR (699.73MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.63 (1H, s) 7.55 (1H, d, *J*=8.0Hz)、6.56 (1H, d, *J*=8.0Hz)、3.29 (2H, tr, *J*=6.0Hz)、2.94 (3H, s)、1.75 (2H, tr, *J*=6.0Hz)、1.33 (12H, s)、1.31 (6H, s); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (175.73MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 147.8、134.4、132.3、130.3、110.1、83.2、47.7、39.2、37.2、32.1、30.7、25.0, 未观察到附着于硼的碳的共振; <sup>11</sup>B {<sup>1</sup>H} NMR (128.38MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 31.01; 元素分析理论值(%) C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C 71.77、H 9.37、N 4.65; 实测值: C 71.79、H 9.27、N 4.60。

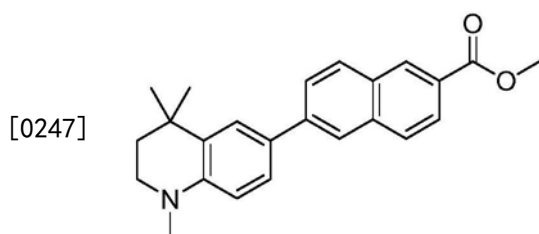
[0242] 4(e) 3-[4-(1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基)-苯基]-丙烯酸甲酯 (13)



[0244] 在干燥的、N<sub>2</sub>填充的手套箱中,将Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(25mg、0.03mmol)、1,4,4-三甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,2,3,4-四氢喹啉(0.49g、1.55mmol)、3-(4-溴-苯基)-丙烯酸甲酯(0.37g、0.83mmol)和K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O(0.77g、3.10mmol)在装有Young's龙头的厚壁玻璃管中混合。添加经脱气的<sup>i</sup>PrOH(10mL)和H<sub>2</sub>O(1mL)并在80℃下将混合物加热18小时,此时GCMS分析显示反应完成。真空除去溶剂并在DCM(100mL)中溶解残余物并用H<sub>2</sub>O(3×20mL)洗涤。用MgSO<sub>4</sub>干燥有机层,过滤并真空除去溶剂,以得到残余物,通过二氧化硅垫将该残余物过滤并用DCM洗脱。在真空中去除溶剂得到黄色固体,在-20℃下该黄色固体从MeOH中重结晶,以得到黄白色针状结晶13(0.32g、62%);mp 121-123℃;UV-vis(CHCl<sub>3</sub>) λ<sub>max</sub>(ε) 380nm(23900L mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);λ<sub>em</sub>(CHCl<sub>3</sub>) 536nm;m/z(ES<sup>+</sup>-MS) 336([M-H]<sup>+</sup>);<sup>1</sup>H NMR(499.77MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ7.73(1H,d,J=16.0Hz)、7.58(2H,d,J=8.5Hz)、7.56(2H,d,J=8.5Hz)、7.48(1H,s)、7.37(1H,d,J=8.0Hz)、6.66(1H,d,J=8.0Hz)、6.45(1H,d,J=16.0Hz)、3.83(3H,s)、3.30(2H,tr,J=5.5Hz)、2.97(3H,s)、1.81(2H,tr,J=5.5Hz)、1.35(6H,s);<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR(125.67MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ167.87、145.49、144.98、143.89、131.85(2个峰重叠)、12.71、127.45、126.49、125.63、124.56、116.56、111.28、51.79、47.75、39.40、37.24、32.34、30.97;HRMS理论值C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>2</sub>([M-H]<sup>+</sup>) 336.19581,实测值 336.19577。

[0245] 实施例5

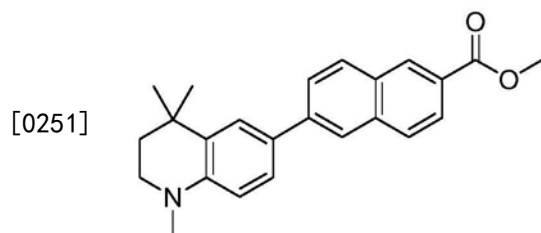
[0246] 6-(1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基)-萘-2-羧酸甲酯(11)



[0248] 5(a) 6-(5,5-二甲基-[1,3,2]二氧杂硼烷-2-基)-1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢喹啉(10)

[0249] 在干燥的、N<sub>2</sub>填充的手套箱中,将Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(0.135g、0.17mmol)、6-碘-1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢喹啉(1.0g、3.22mmol)、B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub>(0.75g、3.32mmol)和KOAc(0.65g、6.64mmol)在装有Young's龙头的厚壁玻璃管中混合。加入经脱气的DMSO(10mL)并在80℃下将混合物加热18小时,此时GCMS分析显示反应完成。用Et<sub>2</sub>O(100mL)稀释混合物并用H<sub>2</sub>O(3×100mL)洗涤。用MgSO<sub>4</sub>干燥有机层,过滤并真空除去溶剂,以得到残余物,通过二氧化硅垫过滤该残余物并用1:1的DCM/己烷洗脱。在真空中去除溶剂得到粗产物,在-20℃下该粗产物从MeOH中重结晶,以得到白色针状结晶10(0.80g、88%);mp 151-153℃;m/z(EI-MS) 287(90%,M<sup>+</sup>),272(100%,M<sup>+</sup>-Me);<sup>1</sup>H NMR(499.77MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ7.64(1H,d,J=1.5Hz)、7.54(1H,dd,J=8.5,1.5Hz)、7.27(1H,s)、6.57(1H,d,J=8.5Hz)、3.75(4H,s)、3.28(2H,tr,J=6.0Hz)、2.94(3H,s)、1.76(2H,tr,J=6.0Hz)、1.32(6H,s)、1.02(6H,s);<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR(125.67MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ147.49、133.29、131.42、130.19、110.09、72.33、47.75、39.24、37.29、32.05、32.03、30.83、20.12,未观察到附着于硼的碳的共振;<sup>11</sup>B{<sup>1</sup>H}NMR(128.38MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ27.02;元素分析理论值(%)C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:C 71.09、H 9.12、N 4.88;实测值:C 71.00、H 9.12、N 4.81。

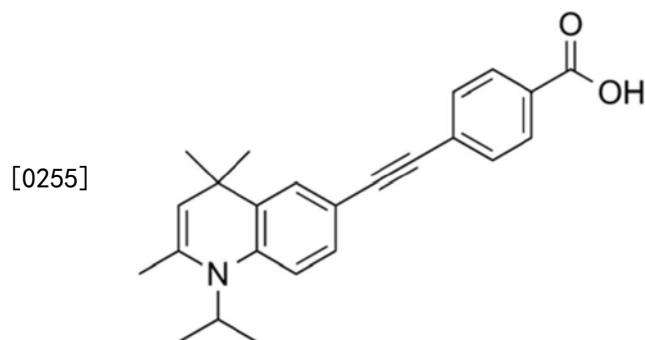
[0250] 5(b) 6-(1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢喹啉-6-基)-萘-2-羧酸甲酯, (11)



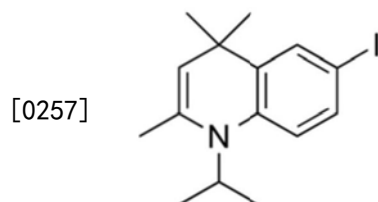
[0252] 在干燥的、N<sub>2</sub>填充的手套箱中,将Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(13mg、0.02mmol)、6-(5,5-二甲基-[1,3,2]二氧杂硼烷-2-基)-1,4,4-三甲基-1,2,3,4-四氢-喹啉(0.25g、0.87mmol)、6-溴-萘-2-羧酸甲酯(0.22g、0.83mmol)和K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O(0.43g、1.74mmol)在装有Young's龙头的厚壁玻璃管中混合。添加经脱气的DMSO(15mL)和H<sub>2</sub>O(3mL)并在80℃下将混合物加热18小时,此时GCMS分析显示反应完成。用Et<sub>2</sub>O(100mL)稀释混合物并用H<sub>2</sub>O(3×100mL)洗涤。用MgSO<sub>4</sub>干燥有机层,过滤并真空除去溶剂,以得到残余物,通过二氧化硅垫过滤该残余物并用DCM洗脱。在真空中去除溶剂得到黄色固体,在-20℃下该黄色固体从MeOH中重结晶,以得到黄白色针状结晶11(0.28g、94%);mp 166-167℃;UV-vis(CHCl<sub>3</sub>)λ<sub>max</sub>(ε)243nm(53200Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);λ<sub>em</sub>(CHCl<sub>3</sub>)494nm;m/z(EI-MS)359(100%,M<sup>+</sup>)、344(60%,M<sup>+</sup>-Me);<sup>1</sup>H NMR(699.73MHz,CDCl<sub>3</sub>)δ8.60(1H,s)、8.06(1H,dd,J=8.5,1.5Hz)、7.99(1H,s)、1.97(1H,d,J=8.5Hz)、7.90(1H,d,J=8.0Hz)、7.81(1H,dd,J=8.5,1.5Hz)、7.60(1H,d,J=2.0Hz)、7.49(1H,dd,J=8.5,2.0Hz)、6.71(1H,d,J=8.5Hz)、3.99(3H,s)、3.32(2H,tr,J=6.0Hz)、2.99(3H,s)、1.84(2H,tr,J=6.0Hz)、1.39(6H,s);<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR(175.73MHz,CDCl<sub>3</sub>)δ167.55、145.49、141.72、136.29、131.99、131.08、129.74、128.74、128.18、126.62、126.31、126.05、125.62、124.97、123.74、111.41、52.29、47.79、39.43、37.31、32.40、31.03;HRMS理论值C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>(M<sup>+</sup>)359.18798,实测值359.18789。

[0253] 实施例6

[0254] 4-2-[2,4,4-三甲基-1-(丙-2-基)-1,4-二氢喹啉-6-基]乙炔基苯甲酸, (17)



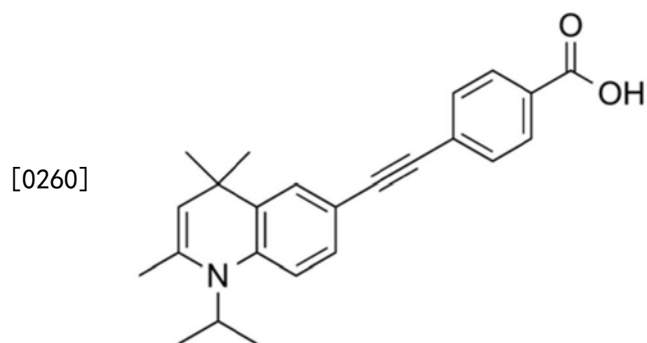
[0256] 6(a) 6-碘-2,4,4-三甲基-1-(丙-2-基)-1,4-二氢喹啉, (15)



[0258] 向3(1.17g、3.42mmol)的无水THF溶液(50mL)中添加MeMgBr(3.0M的Et<sub>2</sub>O溶液,2.28mL,6.84mmol)并在回流下将所得溶液搅拌16小时。将溶液冷却,用20%HCl(1.14mL)和

H<sub>2</sub>O 淬火, 用 EtOAc 稀释, 用 H<sub>2</sub>O 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>) 并蒸发, 以得到粗的无色油状物 (0.95g)。立即通过 SiO<sub>2</sub> 层析 (含有 1% Et<sub>3</sub>N 的己烷: EtOAc (97.5:2.5) 作为洗脱液) 纯化以得到粉红色油状物 15 (0.35g, 30%), 将该粉红色油状物立即用于下一个反应: <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.20 (s, 6H)、1.45 (s, 3H)、1.46 (s, 3H)、1.98 (d, J=0.9Hz, 3H)、4.16 (hept, J=7.1Hz, 1H)、4.50 (q, J=1.2Hz, 1H)、6.73 (d, J=8.7Hz, 1H)、7.34 (dd, J=8.7, 2.2Hz, 1H)、7.42 (d, J=2.1Hz, 1H)。

[0259] 6(b) 4-2-[2,4,4-三甲基-1-(丙-2-基)-1,4-二氢喹啉-6-基]乙炔基苯甲酸, (17)



[0261] 在 Ar 下, 向 Schlenk 烧瓶中加入 Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.073g, 0.104mmol)、CuI (0.0198g, 0.104mmol) 和 7 (0.176g, 1.10mmol)。将烧瓶抽真空并用 Ar 再填充。加入溶解在三乙胺 (12mL) 中的 15 (0.356g, 1.04mmol) 并将烧瓶再次抽真空/用 Ar 再填充 (3x)。在 RT 下将混合物搅拌 72 小时。用 Et<sub>2</sub>O 稀释溶液, 在真空下通过硅藻土/SiO<sub>2</sub> 并蒸发, 以得到粗的绿色固体 (0.4g)。通过 SiO<sub>2</sub> 层析 (具有 1% Et<sub>3</sub>N 的己烷: EtOAc (8:2) 作为洗脱液) 纯化以得到 16 (示意 IV), 其为浅绿色固体 (0.12g, 30%)。然后将 16 (0.073g, 0.195mmol) 溶于 THF (10mL) 中, 并向其中添加 20% NaOH 水溶液 (2mL)。在回流下将所得溶液搅拌 40 小时, 然后将混合物冷却并加入 H<sub>2</sub>O 和 Et<sub>2</sub>O。用 5% HCl 将溶液酸化至 pH 7, 用 Et<sub>2</sub>O 稀释, 用盐水洗涤, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>) 并蒸发, 以得到黄色固体 17 (0.070g, 99%): <sup>1</sup>H NMR (400MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 1.24 (s, 6H)、1.47 (s, 3H)、1.49 (s, 3H)、2.01 (d, J=0.9Hz, 3H)、4.23 (hept, J=7.2Hz, 1H)、4.53 (d, J=1.1Hz, 1H)、6.93 (d, J=8.6Hz, 1H)、7.27-7.29 (m, 1H)、7.37 (d, J=2.0Hz, 1H)、7.54 (d, J=8.3Hz, 2H)、8.03 (d, J=8.4Hz, 2H)。

[0262] 实施例 7

[0263] 实施例 3 的化合物 9 和实施例 6 的化合物 17 的初始荧光表征

[0264] 在各种溶剂中获得 9 的吸收光谱和发射光谱 (图 3 和图 4)。9 与 EC23<sup>®</sup> 的比较 (图 1 和图 2) 示出了最大吸收和发射波长的显著增加。在低至 1nM 的浓度下也容易检测到来自 9 的荧光, 并且观察到溶剂依赖性效应, 其中在非极性溶剂中检测到高强度荧光, 然而特别地, 在水中观察到显著的荧光猝灭。荧光发射波长也非常依赖于溶剂极性, 其中当与非极性溶剂相比时, 在极性溶剂中发生显著的红移。该初始表征表明, 当将 9 应用于细胞时, 根据局部极性, 可以预期在离散的细胞位置中辨别出 9 的荧光。

[0265] 化合物 17 呈现出与化合物 9 类似的发射曲线 (图 6), 但也呈现出更长的最大吸收波长 (图 5)。该吸收带在约 379nm 处达到峰值, 并且进入靛蓝/蓝色 (440nm)。该较长的波长吸收带表明化合物 17 将比化合物 9 更有效地激发, 该化合物 9 具有在荧光显微镜上典型的 405nm 激发源。

[0266] 实施例3的化合物9的光稳定性

[0267] 在不存在光的情况下化合物9在环境温度下储存后,记录化合物9在DMSO-d<sub>6</sub>中的<sup>1</sup>H NMR光谱(图7)。然后将相同的化合物9的样品以30cm的距离暴露于标准实验室光72小时,然后记录<sup>1</sup>H NMR光谱(图8)。尽管化合物9的一小部分转化为结构相似的烯胺形式,但是在这段时间内,化合物9对典型的实验室照明是稳定的。化合物9保持稳定,直到化合物9暴露大约16天,此时一些降解迹象变得明显。虽然22天的暴露后观察到更显著的降解,但是化合物9仍然占样品的主要成分(>60%)。

[0268] 化合物9和化合物17的生物学评价

[0269] 定义类视色素的性质是类视色素诱导特定细胞类型分化以及诱导对视黄酸直接响应的基因表达的能力,该视黄酸与结合配体激活的视黄酸受体(RAR)的定义序列(视黄酸反应单元,RARE)的DNA连接,从而使基因转录机器能够募集到待表达基因的信使RNA转录物所需的基因调控序列(启动子)。

[0270] 为了示出荧光类视色素呈现出类视色素活性,用1μM和10μM的ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9处理TERA-2细胞(胚胎癌细胞系),所得样品用各种免疫细胞化学染色剂进行染色。图23示出了在巢蛋白(通常在神经干细胞中表达的中间丝状体)的存在下,用1μM和10μM的ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及用载体溶剂DMSO处理TERA-2细胞的结果。在10μM的MEC23<sup>®</sup>和化合物9样品中,所有条件对于可能在较小程度上染色的巢蛋白是阳性的。

[0271] 图24示出了在细胞角蛋白8(CK8),非神经分化的标记物的存在下,用1μM和10μM的ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及用载体溶剂DMSO处理TERA-2细胞的结果。如典型的非神经分化中的减少类似,在ATRA和EC23<sup>®</sup>的10μM样品中染色较不强烈,但与1μM样品相比,用化合物9的染色稍微更亮。对于CK8,DMSO处理显示非常亮的染色。

[0272] 图25示出了在TUI-1泛神经元标记物的存在下,用1μM和10μM的ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及用载体溶剂DMSO处理TERA-2细胞的结果。对于TUI-1,用ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9处理的样品显示显著的染色,其中增加的染色对10μM处理的样品更明显。经DMSO处理的细胞仅显示有限的TUI-1染色。

[0273] 图26示出了在Oct 4(作为亚全能性的标记物的转录因子)的存在下,用1μM和10μM的ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及用载体溶剂DMSO处理TERA-2细胞的结果。对于Oct 4,经DMSO处理的细胞显示明显的阳性染色,并且在1μM的ATRA处理中染色也明显。对于Oct 4,所有其他条件没有呈现出染色,表明EC23<sup>®</sup>和化合物9容易通过促进分化来下调亚全能性的标记物。

[0274] 图27示出了在Sox 2(作为亚全能性的标记物的转录因子)的存在下,用1μM和10μM的ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及用载体溶剂DMSO处理TERA-2细胞的结果。对于Sox 2,经DMSO处理的细胞显示明显的阳性染色,而在用ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9处理的细胞中染色显著减少。该观察结果表明ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9容易通过促进分化来下调亚全能性的标记物。

[0275] 图9示出了用ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及DMSO处理的TERA-2细胞的流式细胞术

分析。测定了干细胞标记物SSEA-3的表达,当用类视色素处理细胞时,该表达通常降低。SSEA-3流式细胞术显示,与经DMSO处理的细胞相比,SSEA-3的表达在经类视色素处理的细胞中显著降低。在1 $\mu$ M和10 $\mu$ M处理下,经化合物9处理的细胞显示出比ATRA和EC23<sup>®</sup>高的SSEA-3水平。

[0276] 图10示出了用ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及DMSO处理的TERA-2细胞的流式细胞术分析。测定了干细胞标记物TRA160的表达,当用类视色素处理细胞时,该表达通常降低。TRA160流式细胞术显示,与经DMSO处理的细胞相比,TRA160的表达在经类视色素处理的细胞中显著降低。在1 $\mu$ M和10 $\mu$ M处理下,经化合物9处理的细胞显示出比ATRA和EC23<sup>®</sup>略高的TRA160水平。

[0277] 图11示出了用ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及DMSO处理的TERA-2细胞的流式细胞术分析。测定了早期神经元标记物A2B5的表达,当用类视色素处理细胞时,该表达通常增加。A2B5流式细胞术显示,与经DMSO处理的细胞相比,A2B5的表达在经类视色素处理的细胞中显著增加。与EC23<sup>®</sup>和化合物9相比,经ATRA处理的细胞表达更高的A2B5水平。

[0278] 图28示出了已用ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及DMSO处理的细胞群的相差图像。在用DMSO处理的细胞群中,细胞很小,并且密集地堆积在一起。相比之下,用ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9处理的细胞群体密度较低,并且细胞扩散得更开。

[0279] 图12和图13示出了ATRA、EC23<sup>®</sup>和化合物9以及DMSO的1 $\mu$ M和10 $\mu$ M处理的MTT细胞活力分析。所有处理呈现出与DMSO相当的活力,表明用类视色素处理的细胞不具有显著的毒性作用。

[0280] 图14示出了用10 $\mu$ M、1 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M、0.01 $\mu$ M浓度的化合物9处理并在7天后用共焦荧光显微镜成像的TERA-2细胞。即使在最低处理浓度下,化合物9的荧光也是可见的,其中0.1 $\mu$ M至10 $\mu$ M处理容易成像。化合物9主要位于核被膜周围,并且似乎也位于其他细胞结构周围。

[0281] 图15、16和17分别示出了用10 $\mu$ M的化合物9处理并在8小时(SHSY5Y)、24小时(成纤维细胞)和7天(TERA-2)后用共焦荧光显微镜成像的SHSY5Y细胞(神经母细胞瘤)、成纤维细胞和TERA-2细胞。化合物9再次清晰可见,并在核被膜周围具有明显的定位。

[0282] 图18示出了用10 $\mu$ M的化合物9处理5天,固定,然后用共焦荧光显微镜成像的HaCat角质化皮肤细胞。

[0283] 图19示出了用化合物9(10 $\mu$ M)处理5天的HaCat角质化皮肤细胞。然后用Involucrin(绿色)和K14(红色)将固定的盖玻片染色,并使用共聚焦显微镜成像。将化合物9的荧光染成蓝色。Involucrin选择性地将细胞视黄酸结合蛋白(CRABP)染色,该细胞视黄酸结合蛋白转运细胞核内和周围的类视色素。K14是分解基底角质细胞的原型标记物,并且有助于维持表皮细胞的形状。

[0284] 图21示出了用化合物17(10 $\mu$ M)处理5天的HaCat角质化皮肤细胞。然后用Involucrin(绿色)和K14(红色)将固定的盖玻片染色,并使用共聚焦显微镜成像。将化合物17的荧光染成蓝色。Involucrin选择性地将细胞视黄酸结合蛋白(CRABP)染色,该细胞视黄酸结合蛋白转运细胞核内和周围的类视色素。K14是分解基底角质细胞的原型标记物,并且有助于维持表皮细胞的形状。如图20所示,在相同条件下,来自化合物17的荧光比由化合物



9呈现出的荧光显著更强烈(图19)。

[0285] 图22示出了化合物9的拉曼光谱。在 $2190\text{cm}^{-1}$ 处观察到高强度的乙炔带。这位于细胞沉默区域( $1800\text{--}2800\text{cm}^{-1}$ ),其中没有观察到生物来源的信号,例如酰胺键。当使用拉曼显微镜/光谱法来成像或分析细胞样品时,该光谱分离使得细胞沉默区域中的拉曼带更容易被检测。

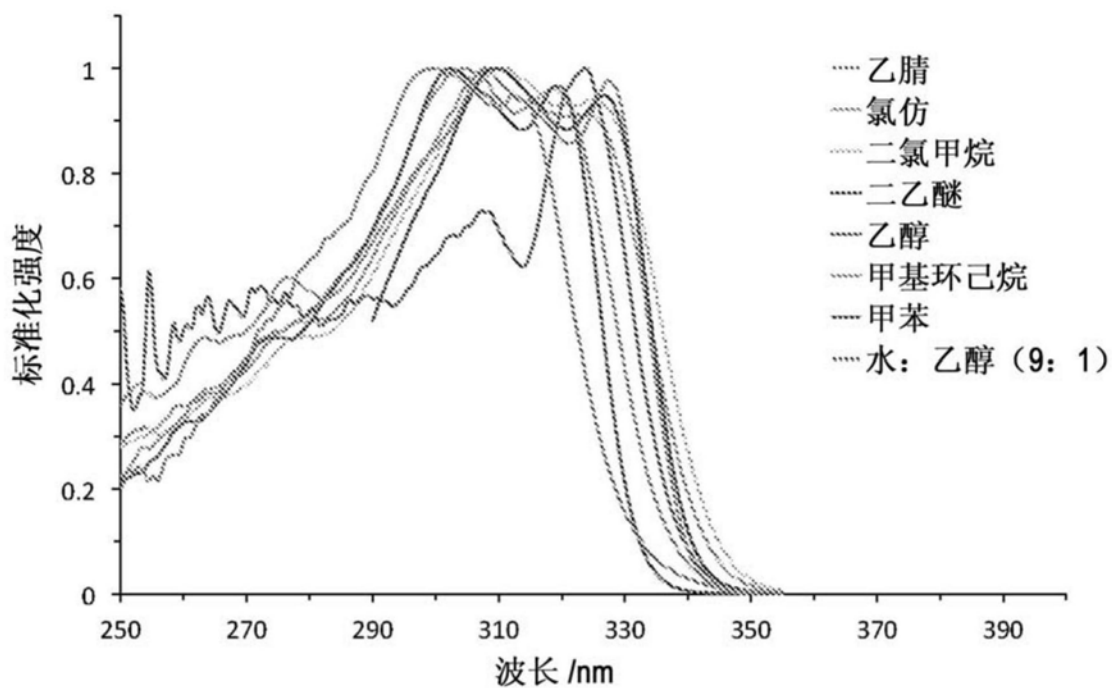


图1

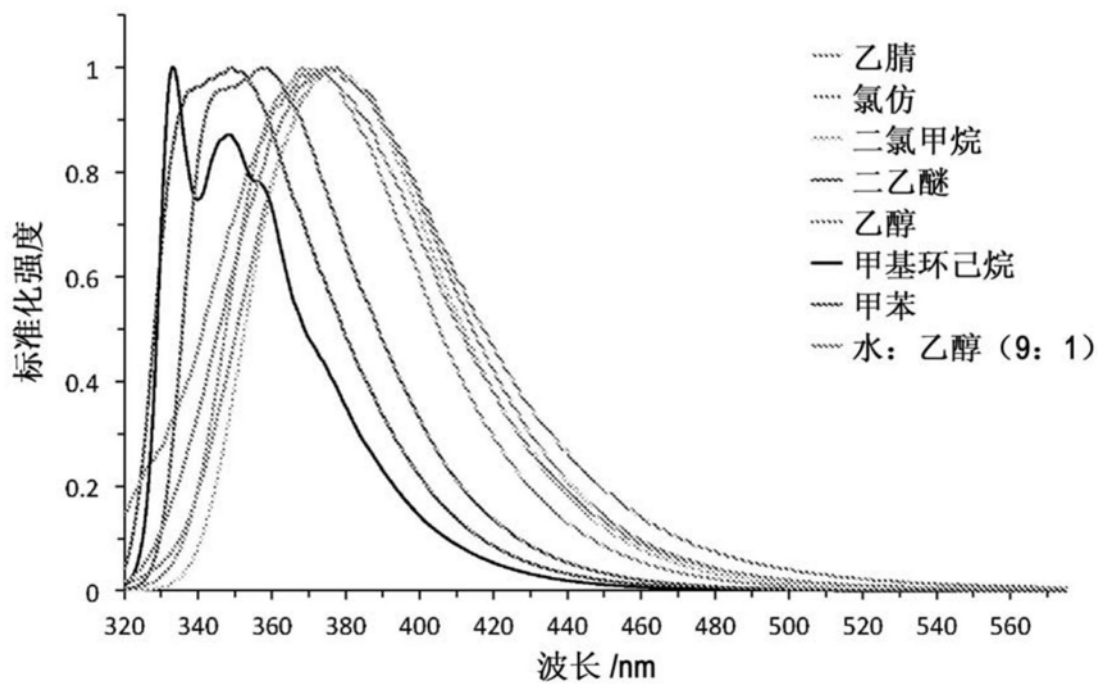


图2

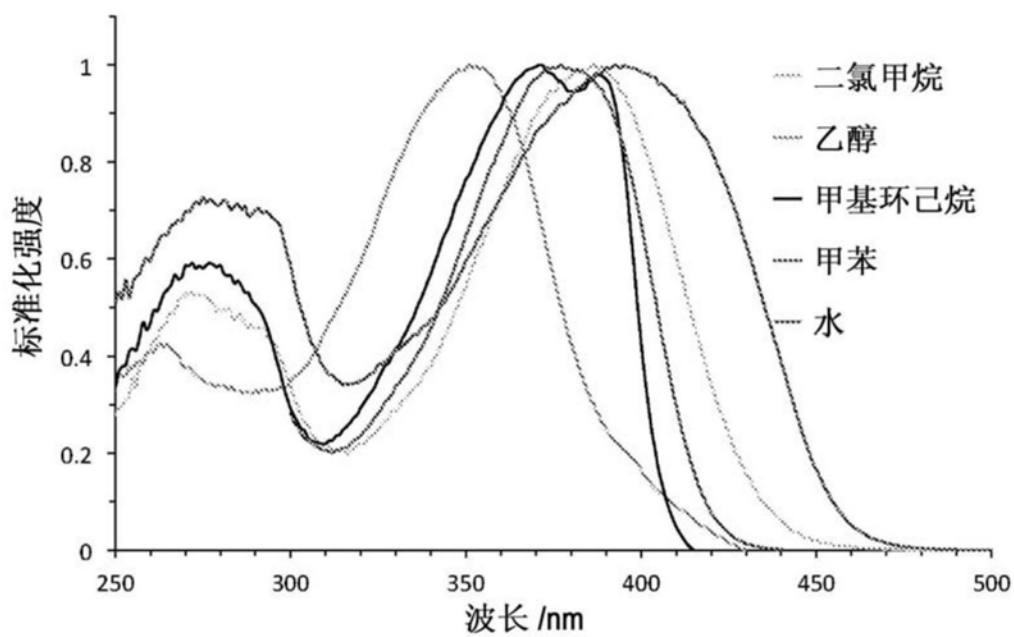


图3

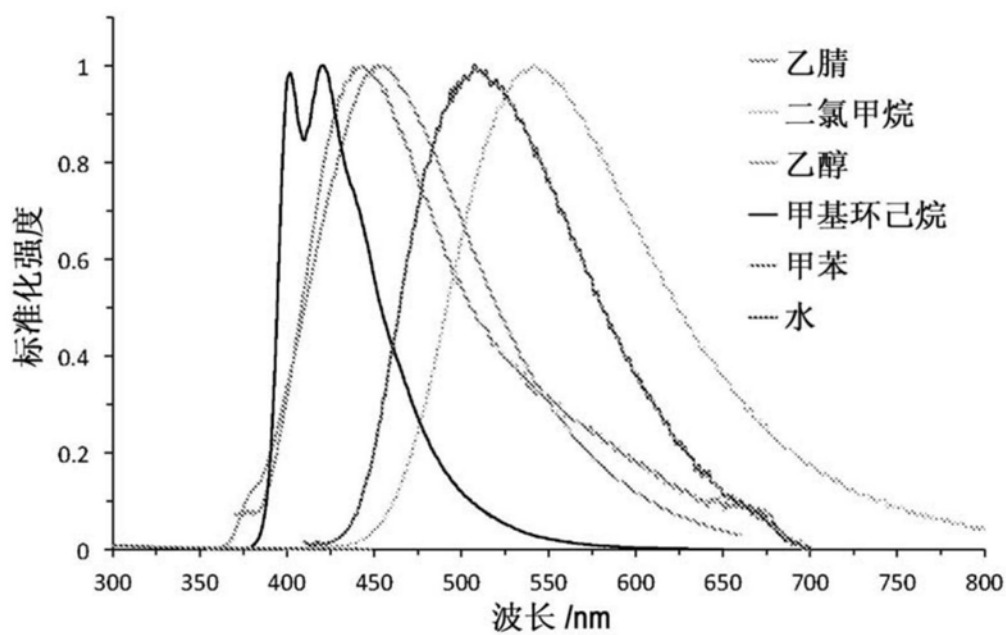


图4

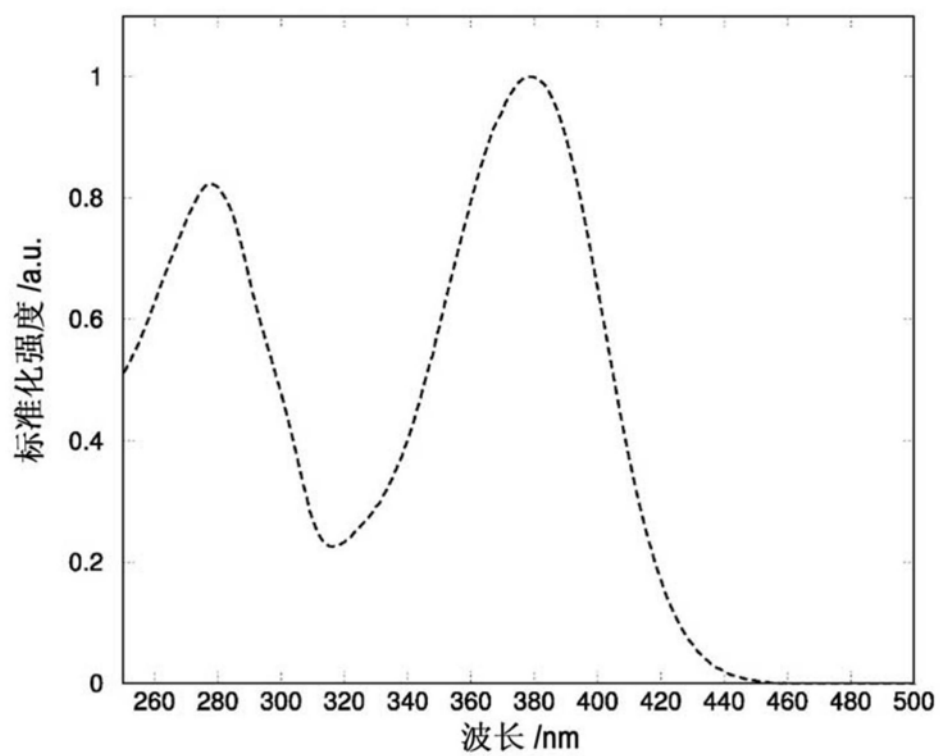


图5

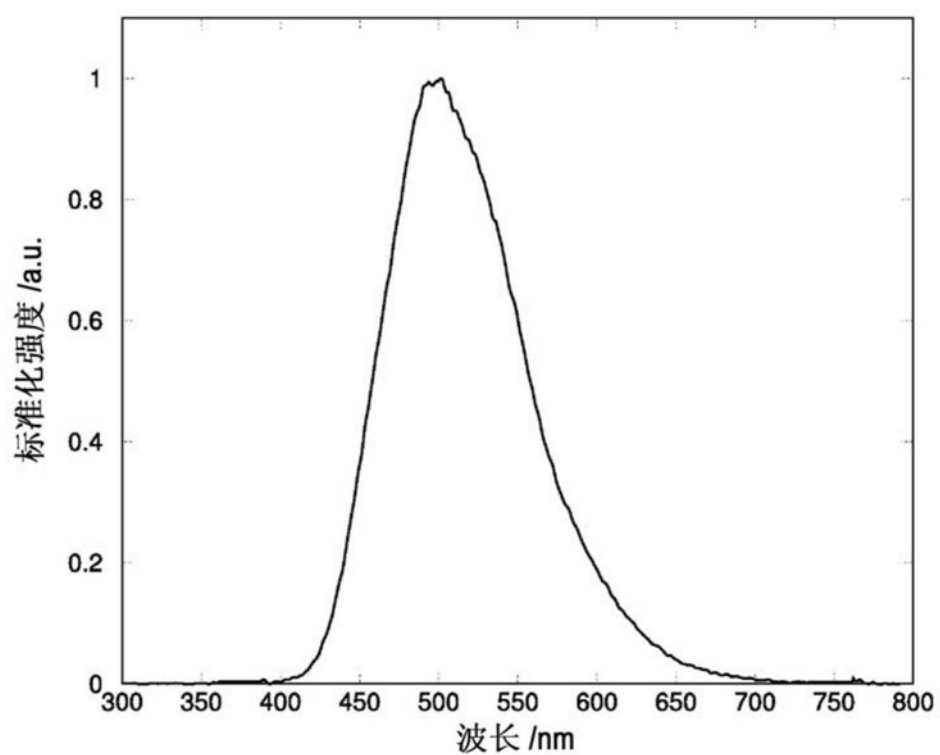


图6

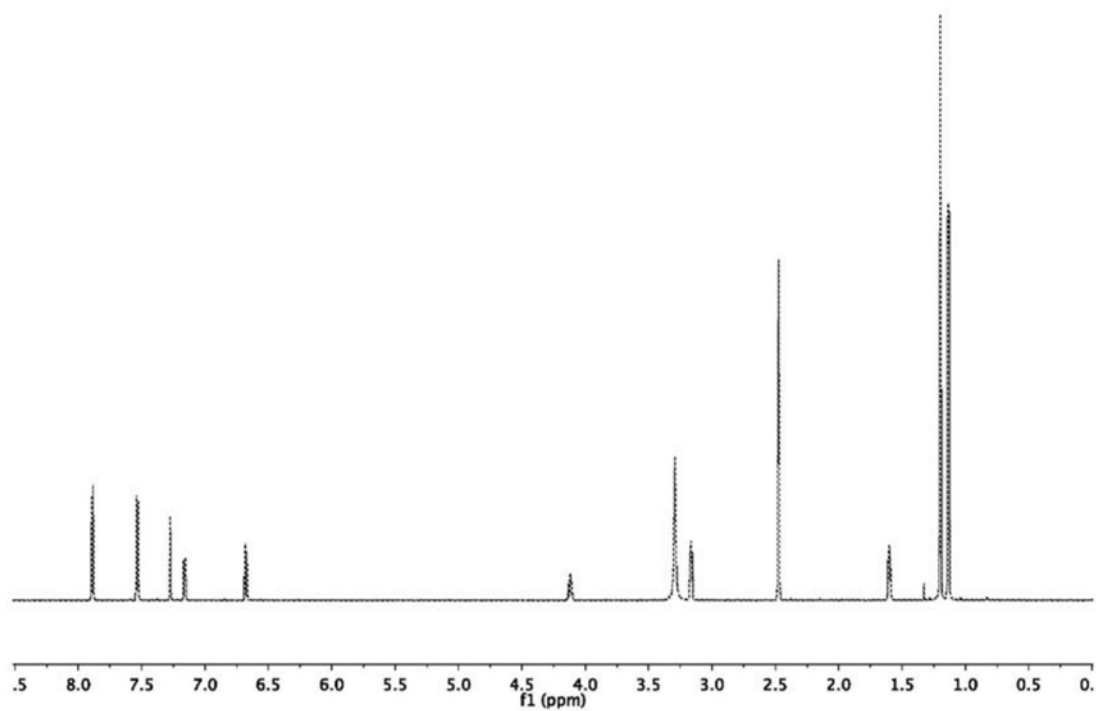


图7

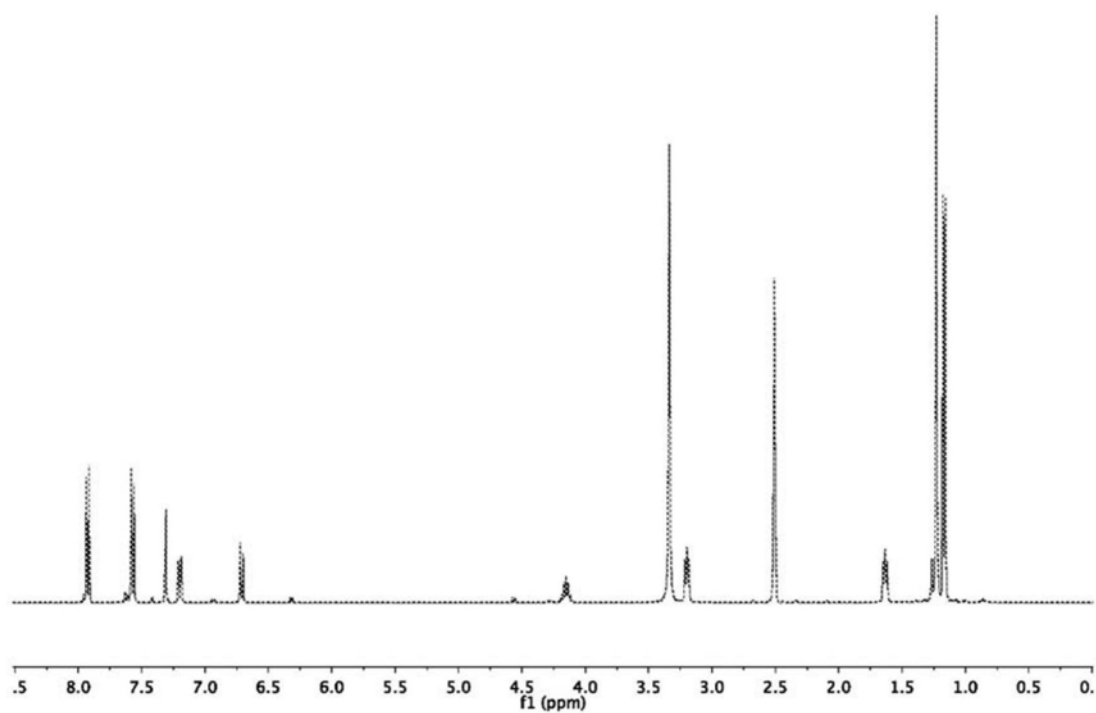


图8

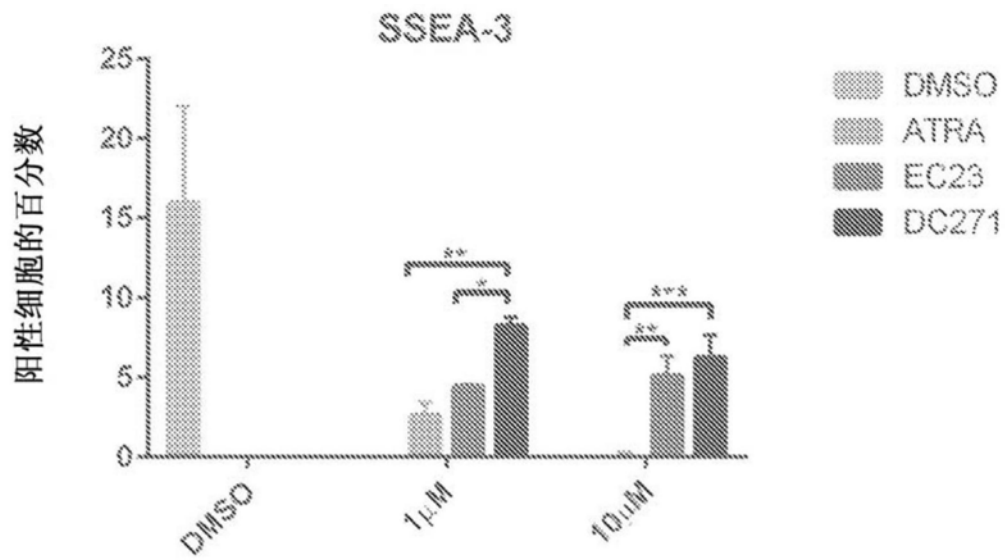


图9

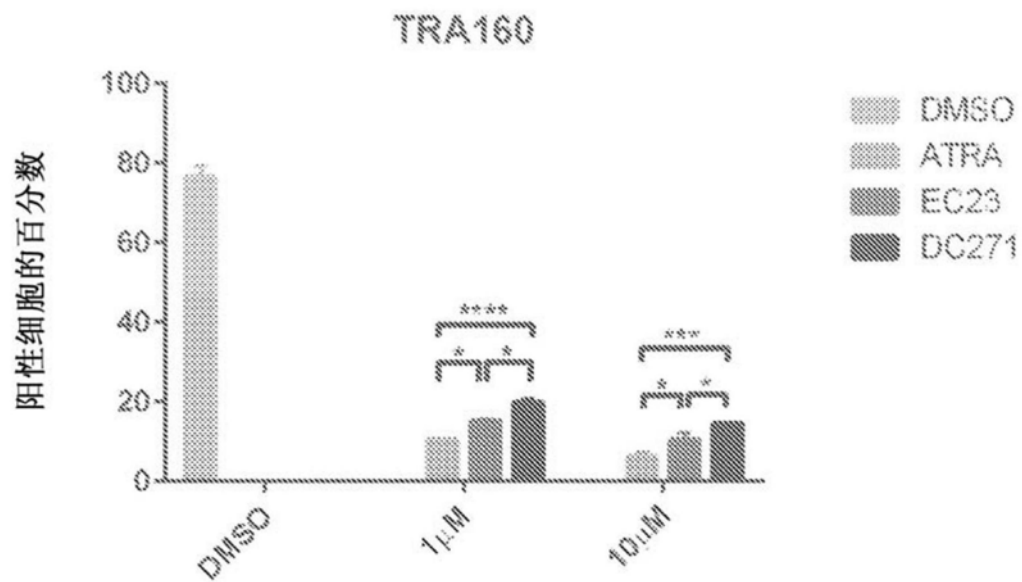


图10

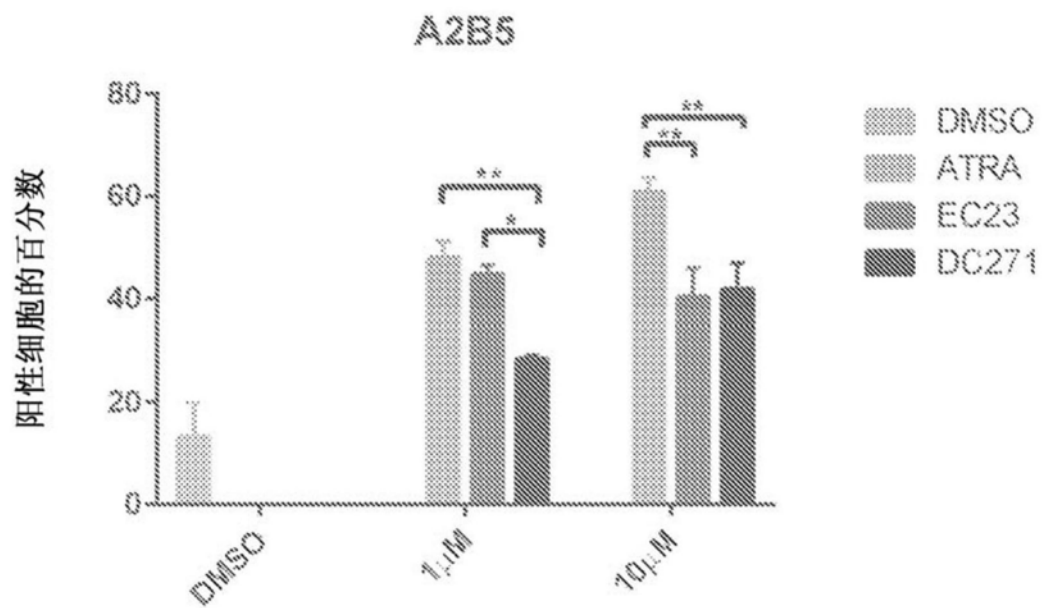


图11

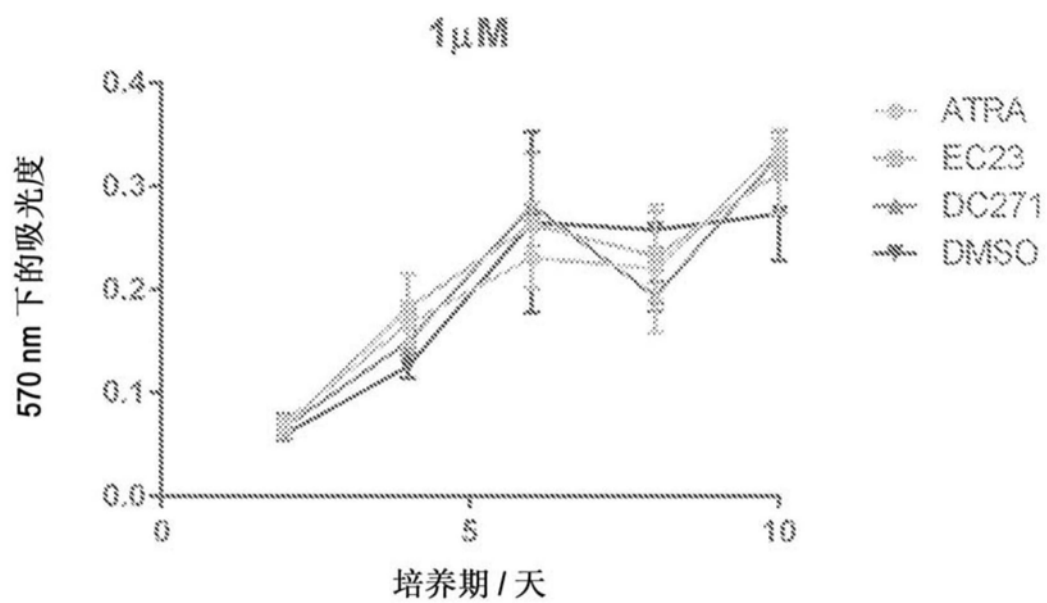


图12

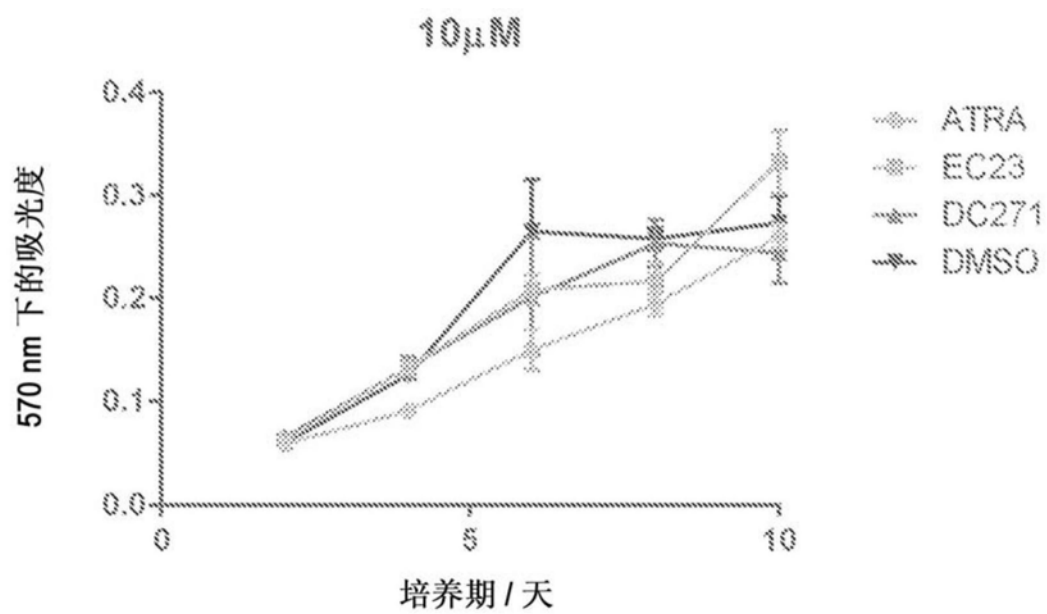


图13

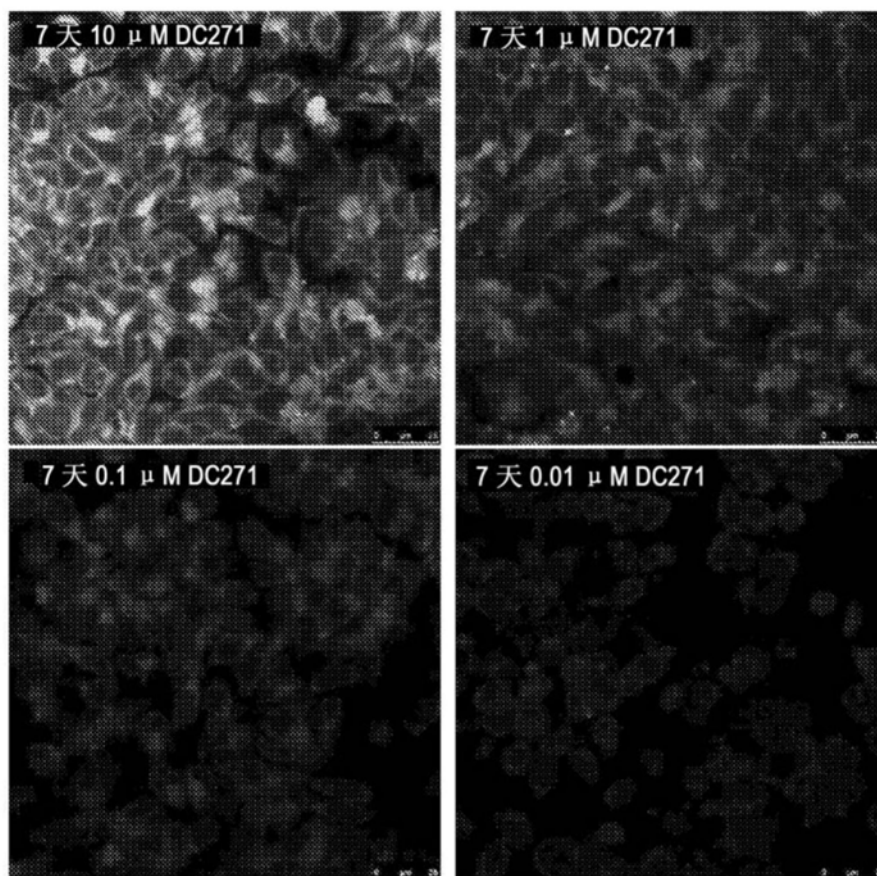


图14



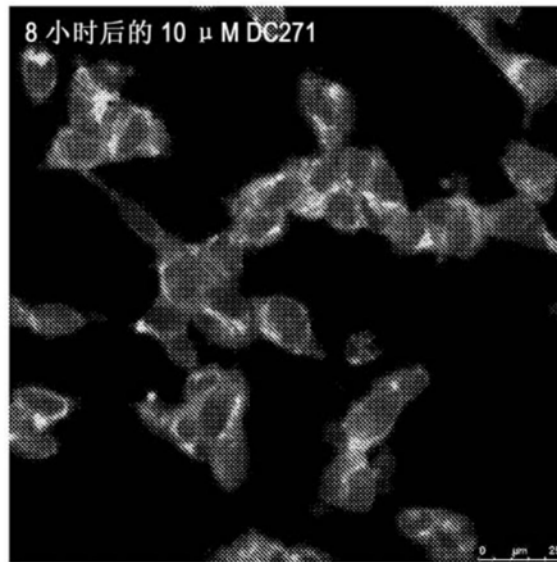


图15

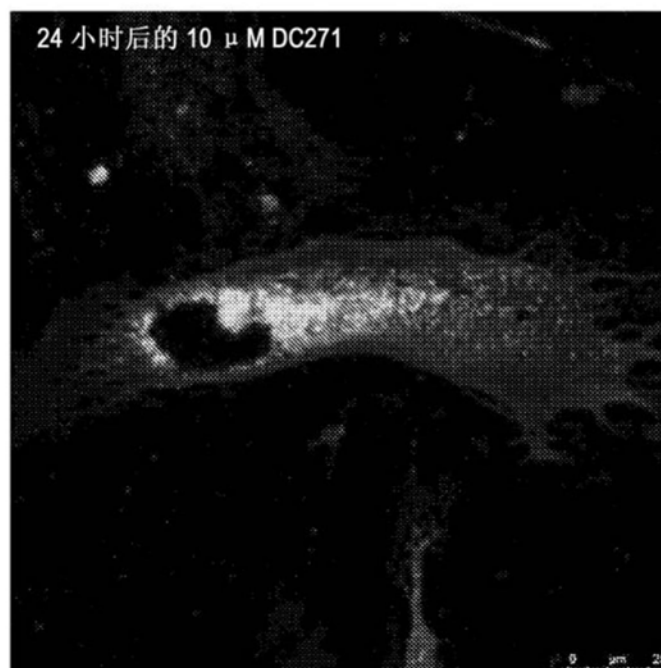


图16

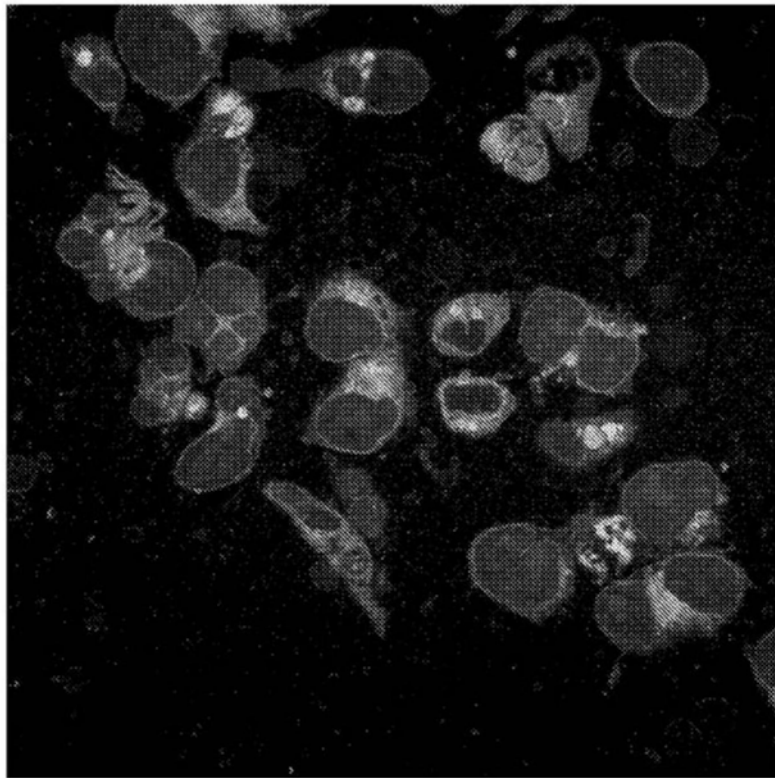


图17

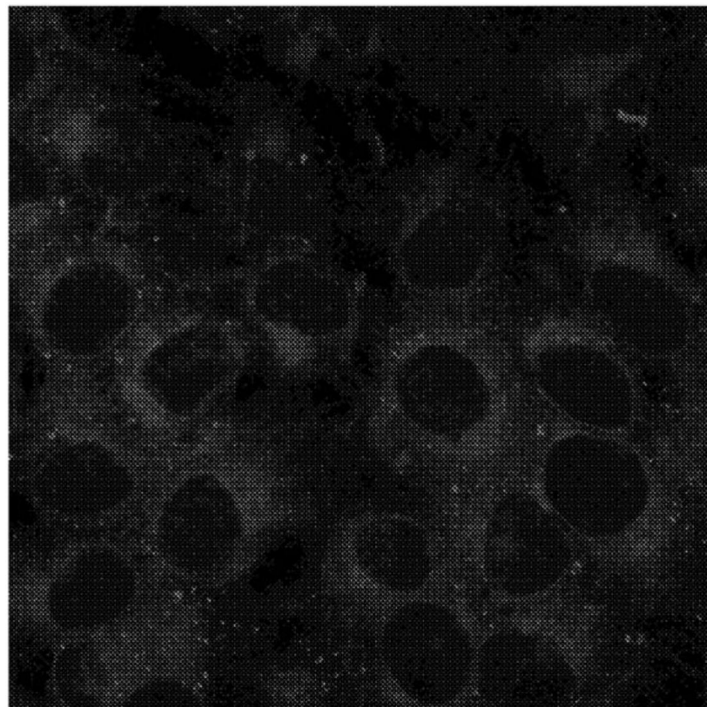


图18

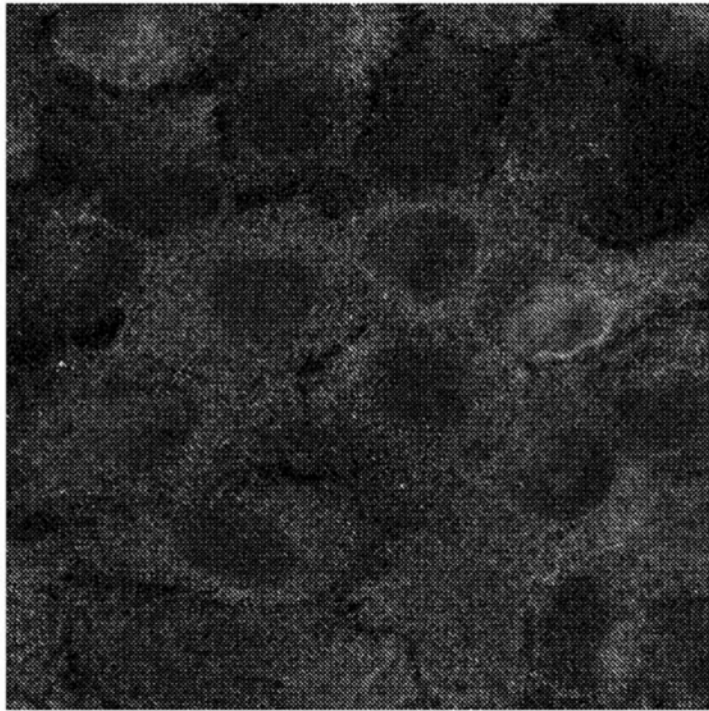


图19

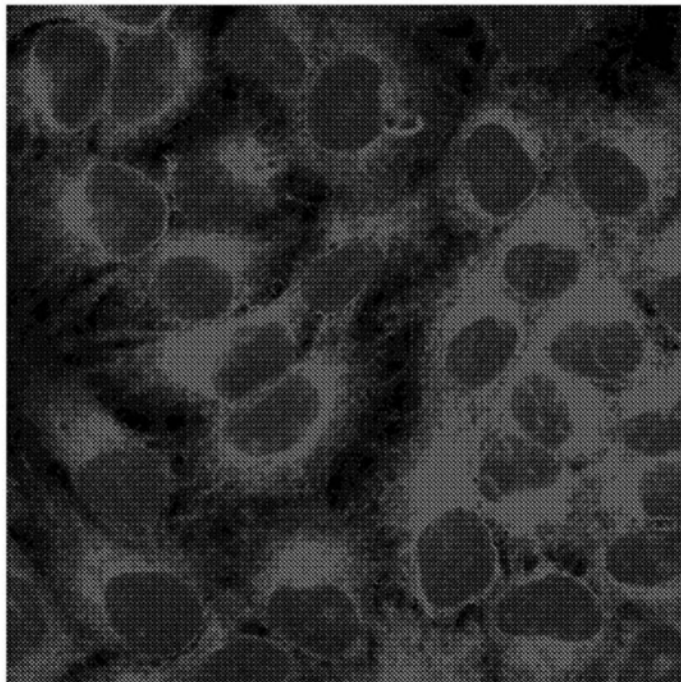


图20

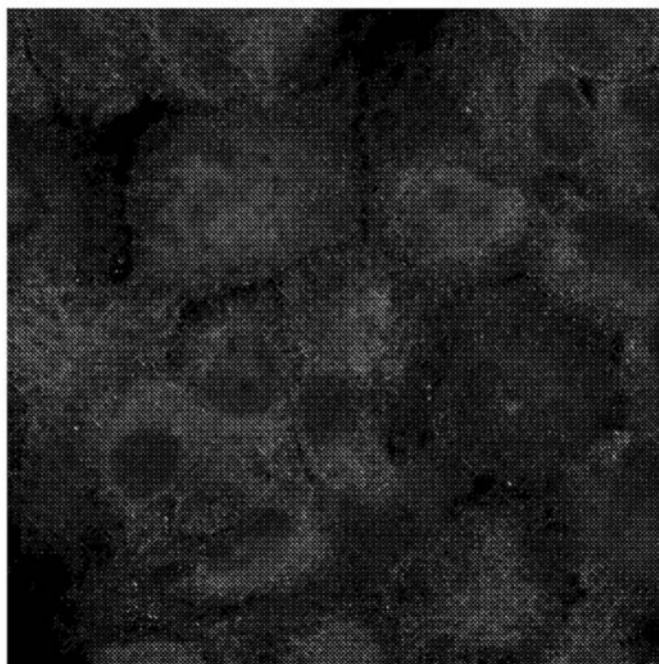


图21

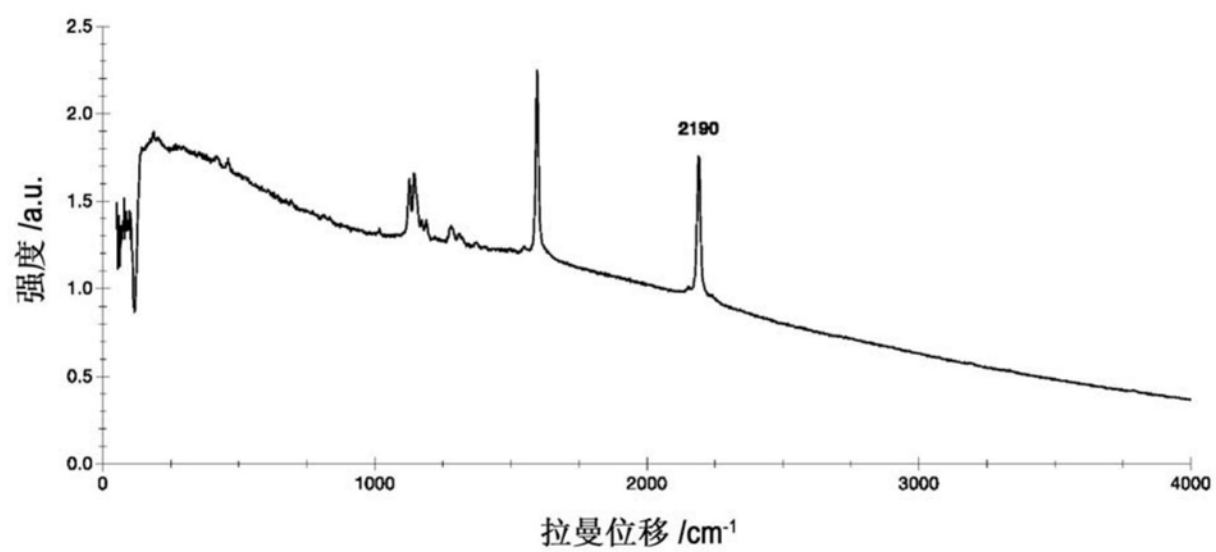


图22

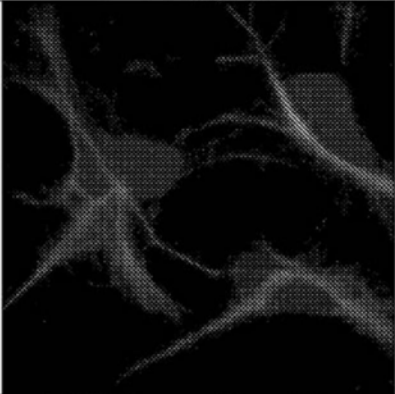
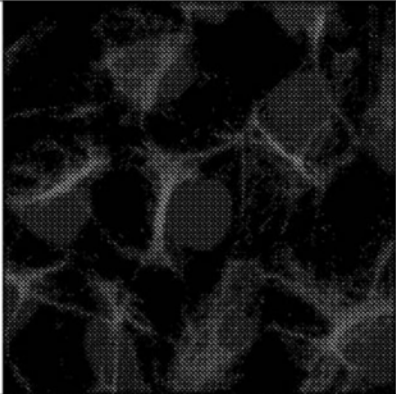
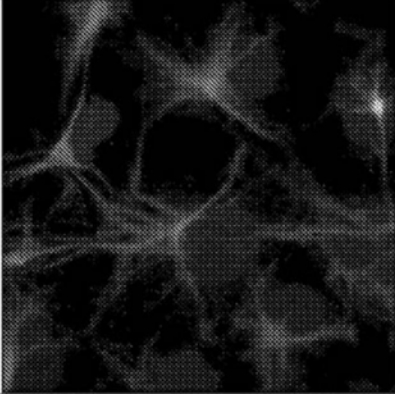
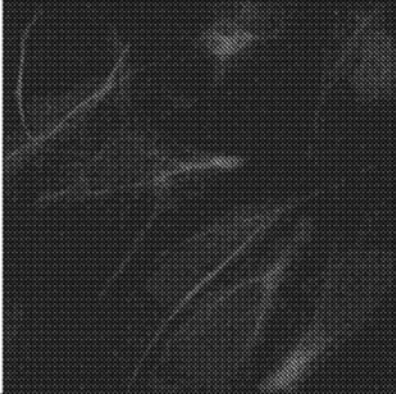

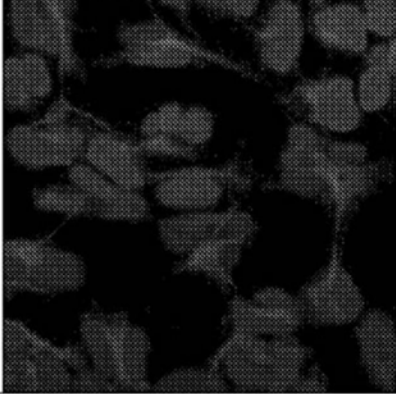
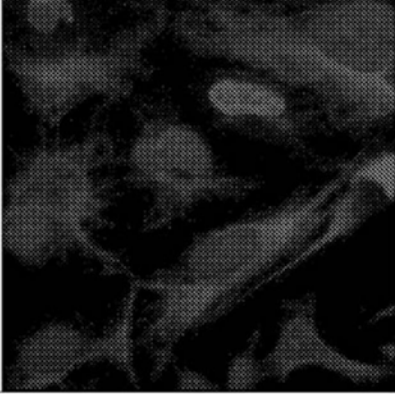
	1 $\mu$ M 处理	10 $\mu$ M 处理
ATRA		
EC23 <sup>®</sup>		
化合物 9		
DMSO		

图23

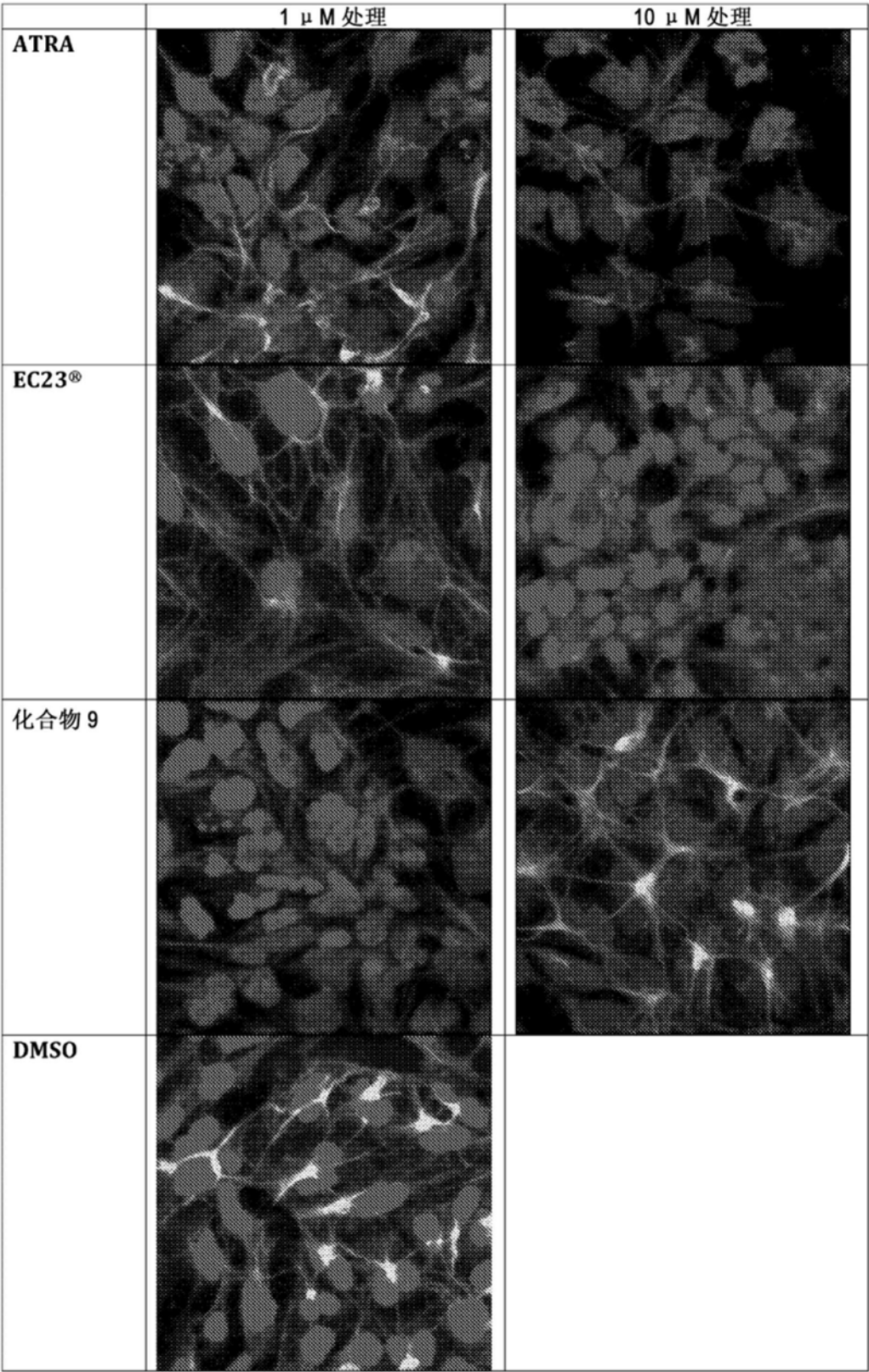


图24



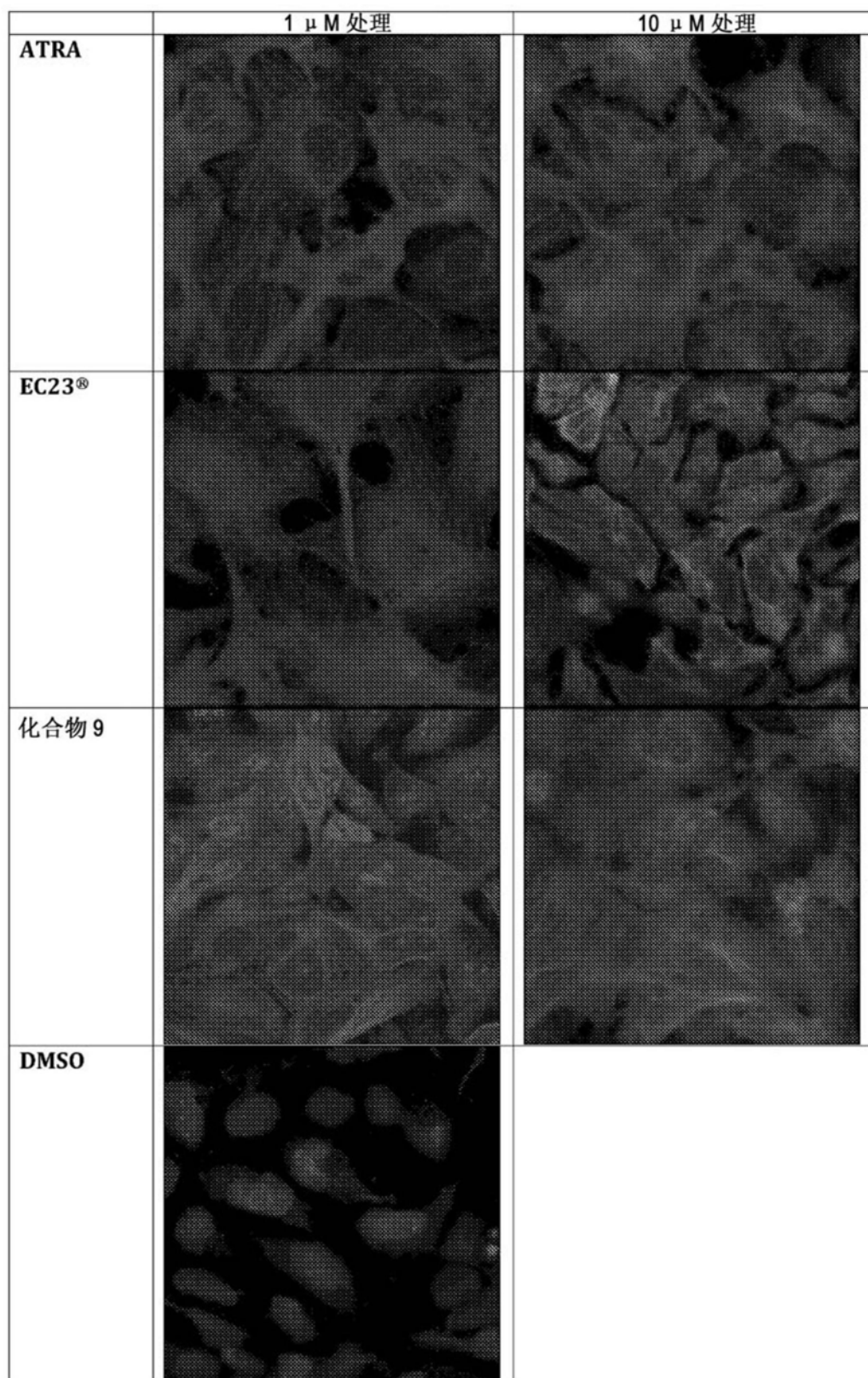


图25

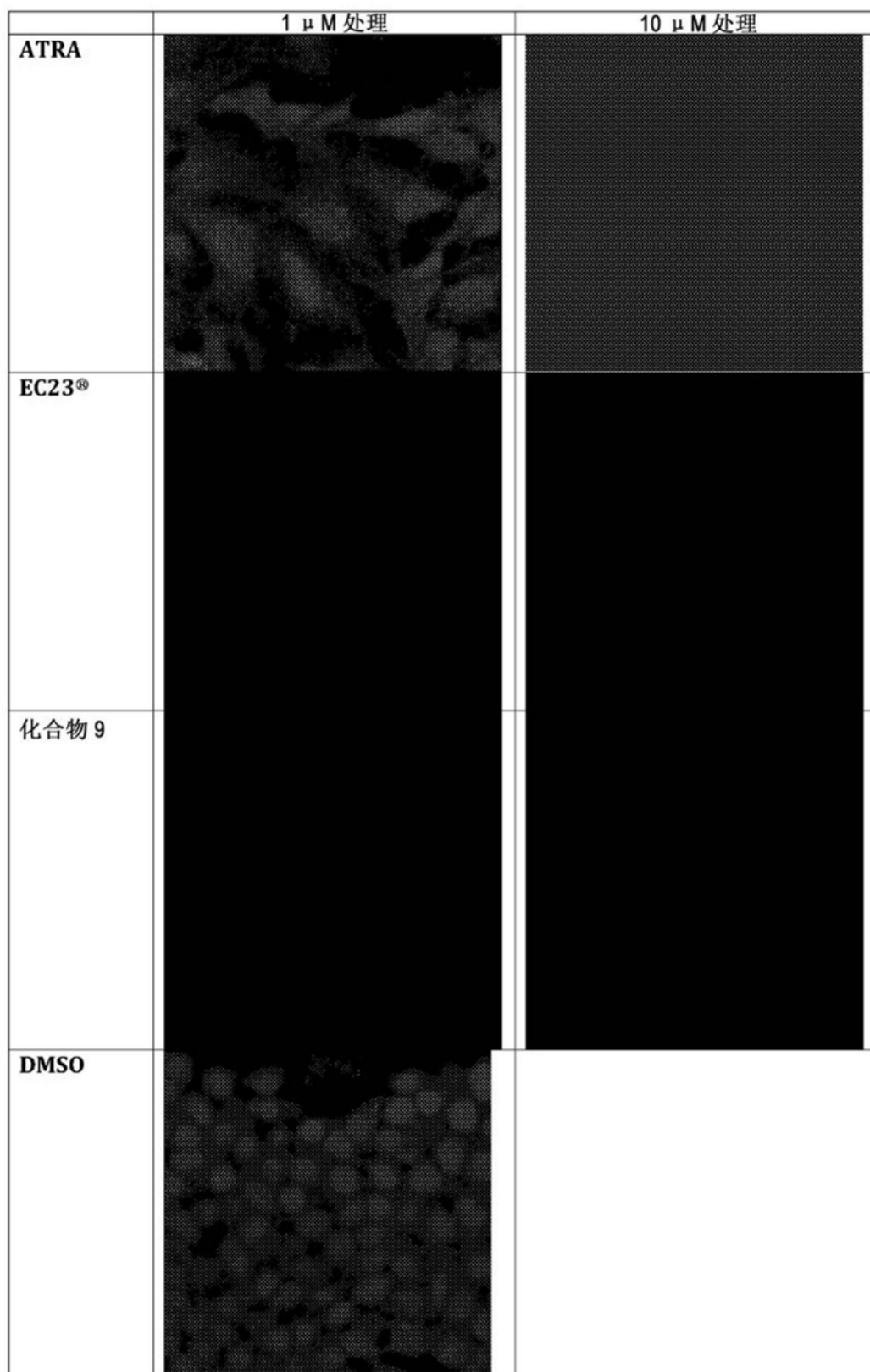


图26



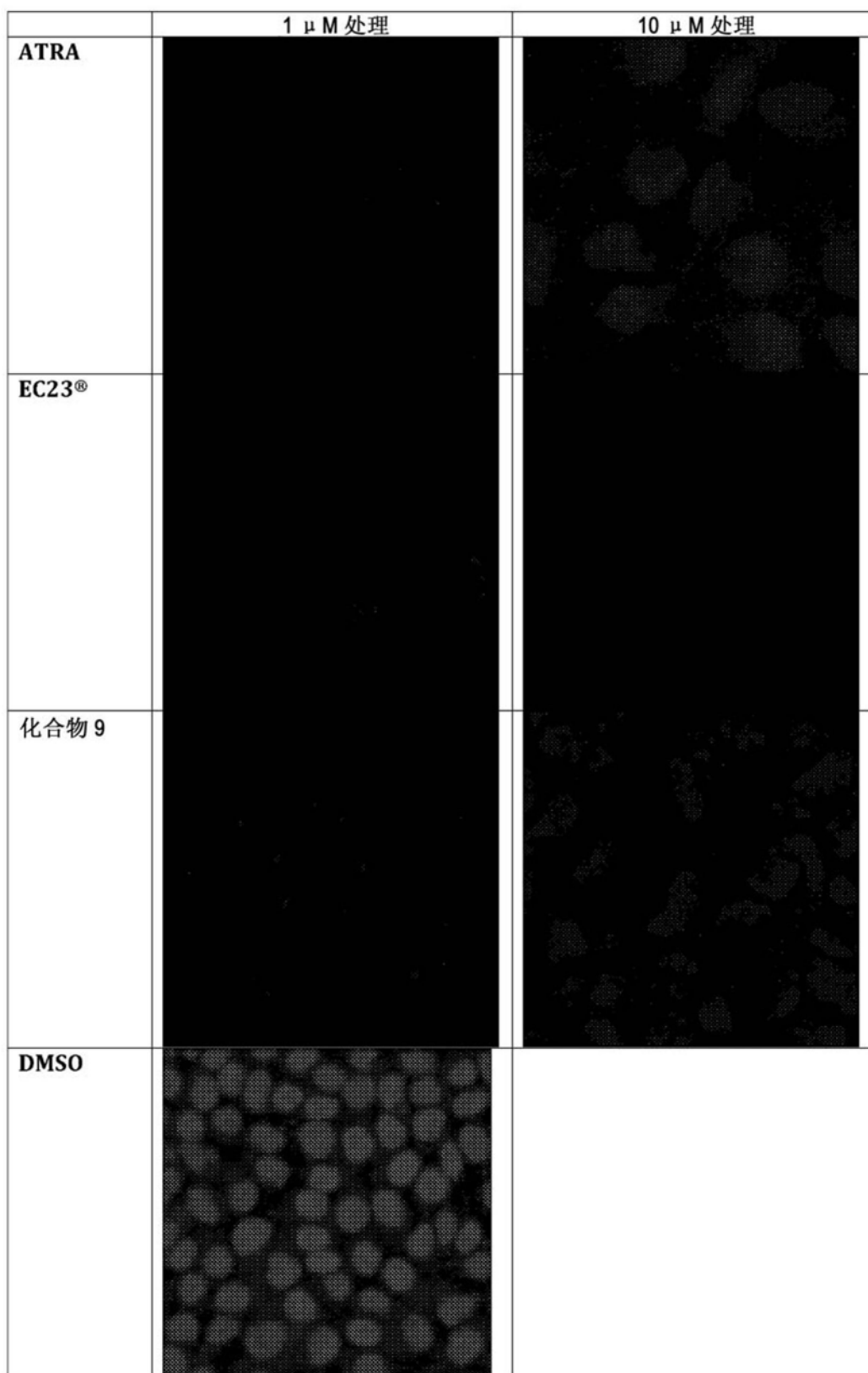


图27

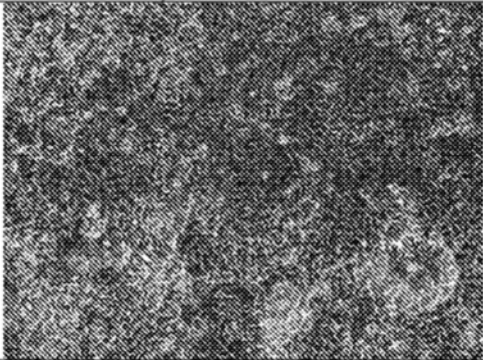
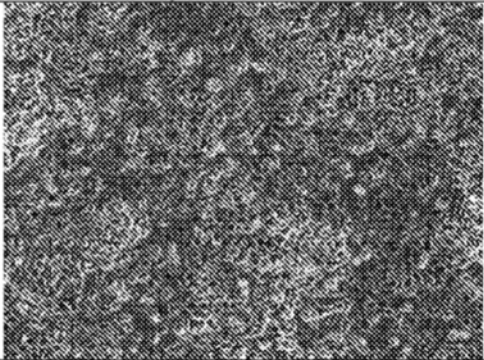
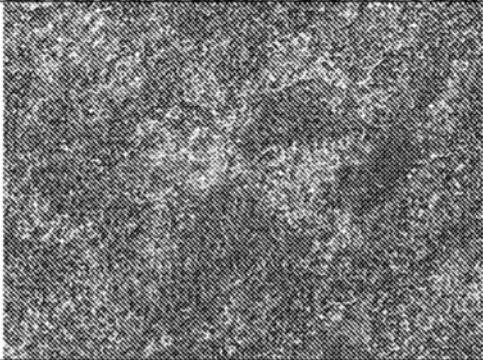
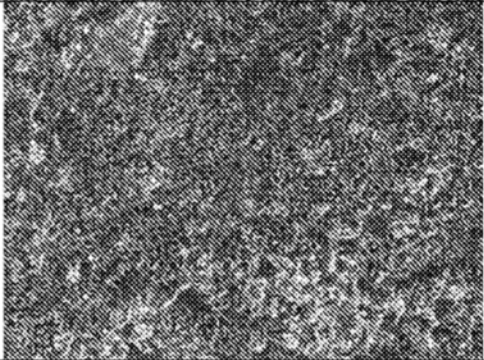
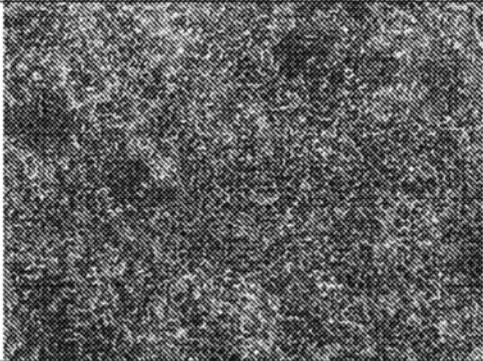
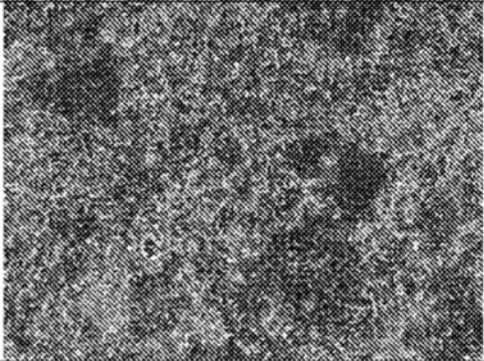
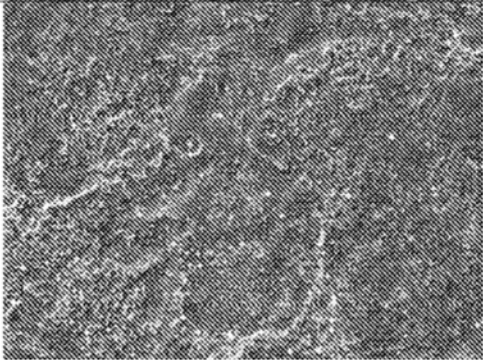
	1 μ M 处理	10 μ M 处理
ATRA		
EC23®		
化合物 9		
DMSO		

图28